



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

ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* ATCC 53993 SOBRE SOPORTES INORGÁNICOS Y ORGÁNICOS Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO INORGÁNICO

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

MATÍAS SEBASTIÁN CASTRO PIÑA

Profesor Co-Guía: Dr. Miguel Martínez
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co- Guía: Dr. Matías Castro González
Instituto Milenio de Oceanografía
Universidad de Concepción

JULIO 2024
CONCEPCIÓN, CHILE

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

Profesor Co- Guía

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

Profesor Co-Guía

Dr. Matías Castro González
Instituto Milenio de Oceanografía
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. José Becerra Allende
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad de Concepción

Dr. Mauricio Schoebitz Cid
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Dra. Carla León Lemus
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de esta tesis he tenido la oportunidad de trabajar en diferentes laboratorios de esta universidad, lo que a su vez me ha permitido conocer a grandes personas. Todas ellas me han apoyado de diferentes maneras: resolviendo dudas, escuchando mis dramas, conversando sobre la vida fuera del laboratorio (porque sí, hay más vida fuera del estudio o del trabajo) o simplemente haciéndome compañía. Por esas personas con las que he coincidido, que me han dado su cariño y tiempo, me siento profundamente agradecido. La lista de amigos, compañeros, colegas, funcionarios y profesores que me han ayudado es larga, por lo que sólo me queda agradecer y decirles que, todo lo que han hecho por mí durante este tiempo, lo valoro y lo guardo en mi corazón. Personalmente me acercaré a cada uno para agradecerles como amerita.

A pesar de que no todo el proceso fue cómo me lo hubiera imaginado, siento que lo que he podido hacer, todo lo que he ganado y lo que he aprendido, es invaluable. Al término de este Magíster, me siento una persona y un científico muy diferente al que comenzó todo este proceso. Mi versión de niño y adolescente nunca se hubiera imaginado todo lo que he hecho y hasta donde he llegado. Sé que está feliz con este objetivo cumplido.

Por último, me siento muy agradecido de mi familia, mis padres, mis hermanos y sobrinos. Todo lo que siempre hago parte del hecho que los tengo como respaldo y apoyo. Ustedes son fuerza motriz que me permite avanzar, porque siempre me han dado amor y para mí, eso es lo que más importa.

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido	
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vi
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Arsénico, características generales, química y distribución	1
1.2 Contaminación por As en Chile	3
1.3 Efectos del As en la salud humana	4
1.4 Tecnologías de tratamiento convencionales para la remoción de As.....	5
1.5 Tratamientos biológicos alternativos de remoción de As	7
1.6 Óxidos de hierro: Adsorbentes biomineralizados por bacterias con afinidad a metales pesados	8
1.7 Mecanismos de biomineralización de óxidos de hierro en bacterias.....	13
1.8 Biopelículas bacterianas.....	14
1.9 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y la cepa ATCC 53993 como modelo de estudio	16
1.9 Biopelículas formadas por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> sobre soportes inorgánicos	19
2.0 Biomineralización de óxidos de hierro en soportes orgánicos inertes en el tratamiento de aguas contaminadas con arsénico	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	24
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES.....	103
REFERENCIAS.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos evaluados en las curvas de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993.....	30
Tabla 2. Niveles de tolerancia a arsénico inorgánico de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993, biooxidación de Fe(II) y precipitación de minerales	47
Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos del modelo de Gompertz de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C por OD430 nm.....	49
Tabla 4. Velocidades de crecimiento (k) obtenidas con el modelo de Gompertz de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a los diferentes pH y temperaturas.....	51
Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos del modelo de Gompertz de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a pH 2.5 y 28°C por OD430 nm.....	53
Tabla 6. Capacidad de adsorción de arsénico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y porcentaje de adsorción de arsénico de óxido de hierro biomineralizado por biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993.....	80

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del As.....	2
Figura 2. Modelos estructurales de minerales de óxidos de hierro: schwertmannita y jarosita.....	10
Figura 3. Mecanismo de insolubilización de As en óxidos de hierro.....	11
Figura 4. Complejos de arsénico formados en superficies de minerales de óxido de hierro.....	11
Figura 5. Etapas de formación de una biopelícula.....	16
Figura 6. Modelo putativo para la biomineralización de schwertmannita y jarosita por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	18
Figura 7. Niveles de tolerancia a As en caldo BART, suplementado con concentraciones decreciente de As(III) y As(V) (512 – 0.5 mM) en microplaca de 96 pocillos.....	46
Figura 8. Gráfico de niveles de tolerancia a As en caldo BART, suplementado con concentraciones decreciente de As(III) y As(V) (512 – 0.5 mM) evaluado mediante densidad óptica a 430 nm.....	46
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C.....	48
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C ajustada bajo el modelo de Gompertz.....	49
Figura 11. Curva de estandarización de densidad óptica (Abs) y densidad celular (cel·mL ⁻¹) de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C.....	51
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 a 1.8 y 28°C ajustada bajo el modelo de Gompertz.....	52
Figura 13. Biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre pirita durante 1 h a 28°C, teñidas con FM TM 4-64 observadas mediante microscopia de epifluorescencia	54
Figura 14. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 durante 1 h a 28°C sobre pirita	55

Figura 15. Micrografía electrónica de barrido de estructuras redondeadas presentes en biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre pirita.....	56
Figura 16. Biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre cupón de azufre elemental durante 1 h a 28°C, teñidas con FM TM 4-64 observadas mediante microscopia de epifluorescencia	57
Figura 17. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 durante 1 h a 28°C sobre cupón de azufre.....	58
Figura 18. Micrografía electrónica de barrido de estructuras redondeadas y proyecciones tubulares presentes en biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre cupón de azufre.....	58
Figura 19. Concentración celular de biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre <i>bioballs</i> en presencia y ausencia de As(III) 0.5 mM y As(V) 0.5 mM obtenida mediante recuento por microscopia de epifluorescencia con naranja de acridina.....	60
Figura 20. Concentración celular de biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre <i>bioballs</i> en presencia y ausencia de As(III) 0.5 mM y As(V) 0.5 mM obtenida mediante recuento en cámara de Neubauer.....	60
Figura 21. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre superficies de soportes de polipropileno mediante en ausencia de arsénico.....	61
Figura 22. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre superficies de soportes de polipropileno mediante en presencia de As(III) 0.5 mM.....	62
Figura 23. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre superficies de soportes de polipropileno mediante en presencia de As(V) 0.5 mM	62
Figura 24. Distribución en tamaño de la población total de vesículas de membrana (MVs) desde cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 utilizando hierro como fuente de energía.....	64
Figura 25. Estructuras redondeadas nanométricas presentes en las biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre pirita observadas con aumento 100X.....	65
Figura 26. Micrografía electrónica de transmisión de MVs desde cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 utilizando hierro como fuente de energía.....	66

Figura 27. Distribución en tamaño de la población total de muestras de MVs desde cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 utilizando azufre elemental como fuente de energía.....	67
Figura 28. Estructuras redondeadas nanométricas presentes en las biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 sobre cupones de azufre elemental observadas con aumento 100X.....	67
Figura 29. Micrografía electrónica de transmisión de MVs desde cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 utilizando azufre elemental como fuente de energía...	68
Figura 30. Análisis de Proteínas Diferencialmente Expresadas (DEPs) en fracciones celulares y de MVs de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en presencia de azufre elemental.....	69
Figura 31. Ensayo de oxidación de Fe(II) de vesículas de membrana de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en presencia y ausencia de As(III) 0.5 y As(V) 0.5 mM.....	71
Figura 32. Patrones de difracción de rayos X de minerales producidos por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART en ausencia de arsénico.....	72
Figura 33. Patrones de difracción de rayos X de minerales producidos por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(III) 0.5 mM.....	73
Figura 34. Patrones de difracción de rayos X de minerales producidos por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM.....	74
Figura 35. Micrografía electrónica de barrido de minerales de óxidos de hierro producidos por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART en ausencia de As.....	75
Figura 36. Gráfico espectroscopia de dispersión de energía (EDS) de óxidos de hierros biomineralizados por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART en ausencia de arsénico y el porcentaje en peso (%Wt) de la composición elemental.....	76
Figura 37. Micrografía electrónica de barrido de minerales de óxidos de hierro producidos por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(III) 0.5 mM.....	77
Figura 38. Gráfico EDS de óxidos de hierros biomineralizados por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(III) 0.5 mM y el porcentaje en peso (%Wt) de la composición elemental.....	77

Figura 39. Micrografía electrónica de barrido de minerales de óxidos de hierro producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM.....79

Figura 40. Gráfico EDS de óxidos de hierros biomineralizados por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM y el porcentaje en peso (%Wt) de la composición elemental.....79

RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide altamente tóxico para todas las formas de vida, el cual es liberado al ambiente por fuentes naturales y actividades antrópicas. El consumo de agua contaminada con As es un problema a nivel mundial, lo que representa un problema a la salud pública. Para remediar esta situación, existen tecnologías como la adsorción, método basado en la capacidad de retención de contaminantes en la superficie de adsorbentes. En la búsqueda de nuevos adsorbentes, los óxidos de hierro como Schwertmannita (Sch) y Jarosita (Jt), presentan buenas propiedades de adsorción de As, compuestos que pueden ser biomineralizados por bacterias acidófilas oxidantes de hierro como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. La biomineralización de óxidos de hierro es un proceso mediado por factores como la formación de biopelículas y las interacciones del Fe(III) con diferentes estructuras de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*), por lo que es necesario caracterizar las biopelículas formadas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, incluyendo componentes de su matriz extracelular, y evaluar su utilidad en el tratamiento de aguas contaminadas con As inorgánico mediante biomineralización de óxidos de hierro.

Así, se evaluó la viabilidad de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a diferentes concentraciones de As inorgánico, mediante análisis espectrofotométricos midiendo la densidad óptica a 430 nm. Se analizó la formación de biopelículas sobre soportes inorgánicos y orgánicos mediante ensayos de adherencia evaluados por microscopia de epifluorescencia y con microscopia electrónica de barrido. La caracterización de las estructuras presentes en la ECM se realizó

mediante análisis de distribución de tamaño, microscopia electrónica de transmisión y análisis proteómico. Además, se analizaron los óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico inerte, los cuales fueron caracterizados mediante microscopia electrónica de barrido asociado a espectroscopia de rayos X de energía dispersiva y difracción de rayos X, junto también con una evaluación de su capacidad de adsorción de As mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente.

Los resultados indicaron que *A. ferrooxidans* ATCC 53993 fue capaz de tolerar hasta 2 mM de As(III) y 32 mM de As(V). Además, de adherirse a sustratos inorgánicos (pirita y azufre elemental) y a un soporte orgánico inerte (*bioball*), formando biopelículas. En cuanto a la caracterización de su ECM, esta cepa es capaz de producir vesículas de membrana, las cuales presentan capacidad de adherencia a pirita y azufre elemental como también una capacidad oxidativa de hierro reducida con respecto a las células. Por último, las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 son capaces de biomineralizar óxidos de hierro, principalmente Sch y Jt. Los cuales presentaron una capacidad para adsorber As(III) de 23.2 mg·g⁻¹. Valores que sugieren la posibilidad de desarrollar un sistema de tratamiento de aguas contaminadas con As basado en la inmovilización de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 sobre *bioballs* y que permiten la biomineralización de óxidos de hierro y éstos pueden capturar el As inorgánico. Como proyecciones a este proyecto quedan estudiar el desarrollo de un sistema de tratamiento a mayor escala para evaluar los rendimientos de biomineralización de óxidos de hierro

como de la adsorción de As. Por otra parte, surge la necesidad de esclarecer las funciones de las MVs dentro del contexto de la formación de biopelículas de esta bacteria, junto con la interacción con minerales que puede influir en la biomineralización de óxidos de hierro.

ABSTRACT

Arsenic (As) is a highly toxic metalloid to all forms of life, released into the environment through natural sources and anthropogenic activities. The consumption of water contaminated with As is a global issue, posing a public health problem. To remediate this situation, technologies such as adsorption, a method based on the retention capacity of contaminants on the surface of adsorbents, are employed. In the search for new adsorbents, iron oxides such as Schwertmannite (Sch) and Jarosite (Jt) exhibit good As adsorption properties. These compounds can be biomineralized by iron-oxidizing acidophilic bacteria like *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The biomineralization of iron oxides is mediated by factors such as biofilm formation and the interactions of Fe(III) with different structures of the extracellular matrix (ECM). Thus, it is necessary to characterize the biofilms formed by *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, including components of its extracellular matrix, and evaluate their utility in the treatment of water contaminated with inorganic As through the biomineralization of iron oxides.

In this study, the viability of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 at different concentrations of inorganic As was evaluated using spectrophotometric analysis by measuring optical density at 430 nm. Biofilm formation on inorganic and organic supports was analyzed through adherence assays evaluated by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. The characterization of structures present in the ECM was performed using size distribution analysis, transmission electron microscopy, and proteomic analysis. Additionally, iron oxides biomineralized by

biofilms of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 on an inert organic support were characterized using scanning electron microscopy associated with energy-dispersive X-ray spectroscopy and X-ray diffraction, along with an evaluation of their As adsorption capacity using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

The results indicated that *A. ferrooxidans* ATCC 53993 was able to tolerate up to 2 mM of As(III) and 32 mM of As(V). Additionally, it adhered to inorganic substrates (pyrite and elemental sulfur) and an inert organic support (bioball), forming biofilms. Regarding the characterization of its ECM, this strain is capable of producing membrane vesicles, which exhibit adhesion to pyrite and elemental sulfur, as well as a reduced iron oxidation capacity compared to the cells. Lastly, the biofilms of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 can biomineralize iron oxides, primarily Sch and Jt, which demonstrated an As(III) adsorption capacity of 23.2 mg·g⁻¹. These values suggest the potential to develop a water treatment system for As contamination based on the immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 on bioballs, allowing for the biomineralization of iron oxides capable of capturing inorganic As. Future projections for this project include studying the development of a larger-scale treatment system to evaluate the efficiency of iron oxide biomineralization and As adsorption. Additionally, there is a need to clarify the functions of MVs within the context of biofilm formation by this bacterium, as well as the interaction with minerals, which can influence the biomineralization of iron oxides.

INTRODUCCIÓN

1.1 Arsénico, características generales, química y distribución

El arsénico (As) es un metaloide ampliamente presente en el ambiente y es tóxico para todas las formas de vida. El As está presente en diferentes formaciones geológicas y puede ser liberado al ambiente por diferentes vías como la disolución de compuestos de As adsorbidos en minerales, erupciones volcánicas, meteorización de rocas, descargas de aguas geotérmicas. Como también por diversas actividades antropogénicas, como la minería, procesamiento de combustibles fósiles, fertilizantes y fármacos que lo contienen (Singh y col., 2015; Sodhi y col., 2019; Berg y Borges. 2020).

El ciclo biogeoquímico del As involucra su presencia en la atmósfera, agua, suelo y sedimentos (Figura 1), donde la movilidad y biodisponibilidad es afectada por factores como la concentración, el estado de oxidación, factores fisicoquímicos (pH, potencial redox, entre otros) y la acción microbiológica, (Jang y col., 2016; Chatterjee y col., 2017). El As presenta cuatro estados de oxidación, arseniato [As(V)], arsenito [As(III)], As elemental [As(0)], y arseniuro [As(-III)] (Chang y col., 2018). En la naturaleza, el As se puede encontrar en diferentes formas químicas, tanto orgánicas como inorgánicas. Entre las formas inorgánicas, el As(III) [(H₃AsO₃)] y As(V) [(H₃AsO₄)] son las especies predominantes, siendo el primero más tóxico que el segundo y además es más soluble y por esto presenta mayor movilidad (Assis y col., 2019; Rahman y

Singh. 2019). Por último, el As(III) prevalece en condiciones reductoras, mientras que el As(V) lo hace en condiciones oxidantes (Wang y col., 2019; Baloch y col., 2020). La contaminación por As en aguas y suelos representa una seria preocupación ambiental a nivel mundial, ya que se han informado de altas concentraciones de este metaloide en diversas partes del mundo, afectando a 107 países, dentro de los cuales destacan Afganistán, Argentina, Bangladesh, Bolivia, Chile, China, Ghana, India, Japón, México, Mongolia, Pakistán, Rumania, Tailandia, Estados Unidos y Vietnam (Wang y col., 2020), lo que representa un riesgo potencial para cerca de 296 millones de personas, debido al consumo de agua contaminada con este metaloide (Naujokas y col., 2013; Chakrabarti y col., 2018).

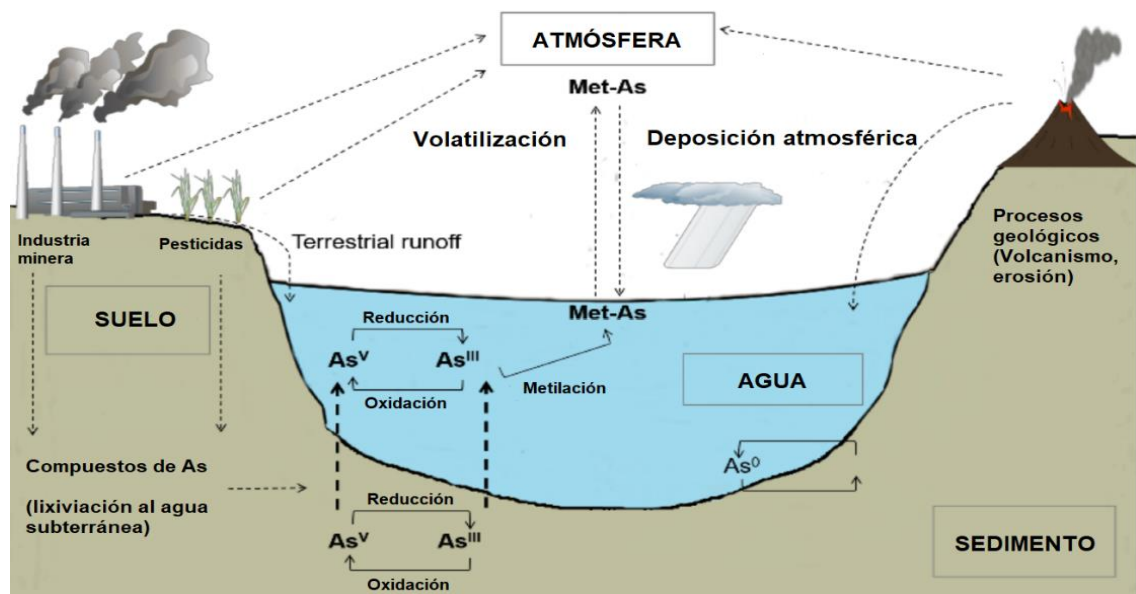


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del As (Modificado de Barral-Fraga, L., y col., 2020).

1.2 Contaminación por As en Chile

Chile posee un importante problema debido a la contaminación de las aguas con As que ocurre principalmente en la zona norte del país, donde las altas concentraciones de este metaloide provienen de la actividad volcánica natural de la Cordillera de Los Andes, como también de la hidrología y mineralogía de las cuencas y ríos que nacen desde ésta (Ferrecio y Sancha. 2006; Castillo y Venegas. 2010; Herrera y col., 2019). A esto se suman fuentes antrópicas, incluidas las actividades de extracción y fundición del cobre en donde se generan gran cantidad de residuos tóxicos que involucran la liberación de As al aire, suelo y agua (Castillo y Venegas. 2010; Ibarra y col., 2018).

La región de Antofagasta es extremadamente árida y con un grave problema de escasez hídrico, donde existe una marcada competencia por el uso del agua para la minería, la agricultura y uso doméstico (Bugueño y col., 2014; Zárate y col., 2020). El río Loa presente en esta región, es la única fuente de agua superficial permanente de la zona y que fluye en dirección oeste hacia al este, cruzando el desierto de Atacama y finalmente desemboca en el Océano Pacífico (Pell y col., 2013). El río Loa se puede dividir en siete áreas principales, en donde cada una posee diferentes características fisicoquímicas y diferentes concentraciones de As, que van desde los 100 hasta $>1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Romero y col., 2003; Dirección General de Aguas, 2004; Wilson y col., 2011). Por otro lado, existen otros ríos en el norte del país que presentan también altas

concentraciones de As, como por ejemplo el río LLuta y el río Camarones, ambos en la región de Arica y Parinacota ($250 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) (Valenzuela y col., 2009; Byrne y col., 2010; Gamboa y col., 2013). Estas altas concentraciones generan un problema sanitario en la zona norte del país, debido a que las personas están expuestas al consumo de agua y productos alimenticios contaminados con este metaloide (Cáceres y col., 2005; Marshall y col., 2007).

1.3 Efectos del As en la salud humana

La exposición al As puede provocar diferentes patologías en el ser humano. De hecho, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC. 2004) ha descrito a este metaloide como un carcinógeno de “clase 1” y es una de las diez sustancias químicas más preocupantes para la salud pública según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). En base a la epidemiología asociada a la exposición crónica a As, la OMS estableció la concentración máxima recomendada de As en agua, de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (OMS. 1996). Lo cual en nuestro país se regula a partir de la Norma Chilena 409 (INN. 2005).

Su toxicidad está relacionada con que el As(V) posee propiedades fisicoquímicas similares al fosfato inorgánico, por lo que puede reemplazarlo, inhibiendo vías energéticas en las mitocondrias. Mientras que el As(III), es capaz de unirse a grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína presentes en proteínas, lo que puede alterar su funcionalidad (Roggenbeck y col., 2016). La

acumulación de estas especies de As inorgánico en el cuerpo humano puede provocar varias alteraciones genéticas y epigenéticas, lo que conlleva finalmente a diversos efectos adversos a la salud, tales como lesiones cutáneas (melanosis, queratosis, hiperqueratosis), cáncer de piel, vejiga, pulmón y riñón. En cuanto a otras patologías, se ha estudiado la relación del As con diabetes mellitus, obesidad, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y neurológicas (Huang y col. 2015; Steinmaus y col. 2016; Kuo y col., 2017; Sage y col., 2017; Bolt y Hengstler. 2018; Minatel y col., 2018; Mochizuki., 2019; Eick y Steinmaus. 2020).

1.4 Tecnologías de tratamiento convencionales para la remoción de As

Diferentes tecnologías se han desarrollado e implementado para remediar el As del agua, en donde los procesos convencionales de remoción son principalmente procesos de tratamiento fisicoquímicos, tales como: 1) oxidación, donde el objetivo principal es convertir el As(III) soluble a As(V), para su precipitación mediante el uso de diferentes químicos como cloro, dióxido de cloro y ozono. Entre sus desventajas están el requerir un control eficiente del pH y la generación de subproductos no deseados; 2) coagulación-filtración, en donde se agrega un coagulante, el cual cambia la carga superficial de sólidos para permitir su aglomeración formando flóculos que pueden precipitar por acción de la gravedad y/o se pueden filtrar más fácilmente. Las principales limitaciones del método es la producción de una gran cantidad de lodos tóxicos

y que requiere un ajuste de pH previo del afluente; 3) tecnologías de membranas, basadas en el uso de membranas las cuales están elaboradas de materiales sintéticos, con gran cantidad de poros de diámetros microscópicos, presentando una permeabilidad selectiva. Las desventajas principales están asociados a altos costos de implementación y de funcionamiento, junto con la necesidad de acondicionamiento previo del afluente; 4) adsorción, un proceso en el que sustancias disueltas son retenidas, mediante reacciones físicas y químicas, por superficies sólidas con las que entran en contacto. Este último, es uno de los métodos más utilizados debido a su alta eficiencia de remoción, fácil operación y manipulación, no se generan lodos ni subproductos nocivos, fácil aplicación en áreas rurales y, además, ciertos adsorbentes se pueden reutilizar y regenerar. Las principales desventajas de este método son el alto costo económico de producción y la baja selectividad asociado a ciertos adsorbentes convencionales. (Singh y col., 2015; Jha y col., 2017; Zakhar y col., 2018; Kumar y col., 2019; Wang y col., 2019; Baloch y col., 2020; Barral-Fraga y col., 2020). Debido a las características y ventajas que presenta el método de adsorción en la remediación del As, es que los esfuerzos científicos han ido hacia la búsqueda de nuevos adsorbentes que sean económicos en su producción, que posean buenas características de adsorción y que sean amigables con el ambiente.

1.5 Tratamientos biológicos alternativos de remoción de As

Debido a las desventajas de los métodos convencionales, se han buscado alternativas que impliquen un menor costo económico y que sean más amigables con el ambiente. Es así como la biorremediación ha sido motivo de estudio debido a las adaptaciones que presentan los microorganismos, especialmente en bacterias, para tolerar contaminantes ambientales, las que le han permitido proliferar en esas condiciones ecológicas, lo que representa una ventaja, ya que se pueden utilizar sin causar un impacto negativo en el ambiente (Tanmoy y Saha. 2019). De esta manera, se han establecido diferentes procesos mediante los cuales ciertas bacterias pueden biorremediar el As, los que corresponden a: 1) biosorción, es un proceso pasivo, en donde el As en la fase acuosa es secuestrado por ciertos componentes de la pared celular de las células bacterianas o biomasa, tales como polisacáridos, proteínas y lípidos (Dadwal y Mishra. 2017; Sher y Rehman. 2019); 2) bioacumulación, en donde las bacterias captan el As del medio, mediante proteínas de membrana como porinas, ingresando a la célula para luego ser secuestrados por proteínas y ligandos peptídicos (Diep y col., 2018; Sher y Rehman, A. 2019); 3) biotransformación, por su parte, implica un cambio en el estado de oxidación de la especie de As, lo que puede ocurrir de tres formas diferentes: mediante la oxidación de As(III) a As(V), en donde bacterias quimiolitótrofas pueden obtener energía y por otro lado, bacterias heterótrofas utilizan este proceso como mecanismo de detoxificación (Silver y Phung, 2005;

Zhang y col., 2016); la reducción de As(V) a As(III), como mecanismo de desasimilación del As (Saunders y Rocap. 2016) y la metilación de As(III), para luego ser expulsados al medio extracelular (Sher y Rehman. 2019). En los procesos de biotransformación las bacterias reductoras de As(V) adoptan una vía de desintoxicación con genes *ars*, mientras que las bacterias oxidantes de As(III) lo hacen mediadas por los genes *aio* (Silver y Phung. 2005; Ye y col., 2020); 4) biomineralización, la cual corresponde a la biosíntesis de minerales (óxidos de hierro, minerales de calcio, entre otros), que pueden tener una alta capacidad de adsorción de As, el que es incorporado a su estructura y luego precipitado, lo que proporciona una desintoxicación o disminución de la concentración de este metaloide en el medio (Gadd y Pan. 2016; Alam y col., 2019; Ghosh y col., 2019; Sher y Rehman. 2019).

1.6 Óxidos de hierro: Adsorbentes biomineralizados por bacterias con afinidad a metales pesados

Entre los minerales con propiedades de adsorción que pueden ser producidos por bacterias se encuentran los óxidos de hierro, cuya síntesis puede ocurrir en diversos ambientes como suelos, sedimentos, aguas superficiales y suelos marinos. Los óxidos de hierro se obtienen dentro de los ciclos biogeoquímicos del hierro y azufre, afectando la disponibilidad de nutrientes, la movilidad de metales pesados y la calidad del agua (Faivre. 2016; Parkinson. 2016). Existe

una gran variedad de este tipo de minerales, donde algunos de los más estudiados corresponden a Schwertmannita (Sch) y Jarosita (Jt), los cuales se encuentran naturalmente en ambientes con pH ácidos, altas concentraciones de hierro, sulfato y metales pesados (Zhang y col. 2018; Cruells y Roca. 2022).

La Sch que posee la siguiente fórmula química $(\text{Fe}_8\text{O}_8 (\text{OH})_{8-2x}(\text{SO}_4)_x)$ ($1 \leq x \leq 1.75$), es un mineral de color anaranjado pardo con una morfología esferoide amorfa, acicular, con prolongaciones en forma de aguja, descrito también con “forma de erizo de mar”. Este mineral posee una alta área de superficie específica, baja cristalinidad y una estructura de túnel con un núcleo de SO_4^{2-} (Figura 2A), el cual puede ser reemplazado por aniones de radios atómicos y cargas similares. Estas características lo hacen un adsorbente capaz de interactuar con diferentes metales pesados como el As(III), As(V), Cu(II), Cd(II), SbO_4 (-III) (Li y col., 2018a; Miyata y col., 2018; Zhang, y col., 2018; Zhu y col., 2020). Por su parte, Jt es un mineral que posee la siguiente fórmula química $[(\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6)$, donde M puede ser reemplazado por un catión monovalente o divalente tal como: NH_4^+ , H_3O^+ , K^+ , Na^+ , Ag^+ , Hg^{2+} o Pb^{2+} . En la naturaleza las formas dominantes de Jt corresponden a K-jarosita, Na^+ -jarosita y H_3O^+ -jarosita (Hudson-Edwards. 2019). Este mineral de color amarillo ocre pálido posee una morfología romboédrica cristalina (Figura 2B), la cual puede variar dependiendo de condiciones fisicoquímicas tales como el pH, la agitación y la presencia de ciertos cationes (Eftekhari y col. 2020b). Al igual que Sch, Jt registra capacidades para adsorber diferentes contaminantes tales como

As(V), Cu(II), Cr(VI) y U(VI), entre otros (Yang y col. 2020; Cruells y Roca. 2022; Picazo-Rodríguez y col. 2022; Guo y col. 2024).

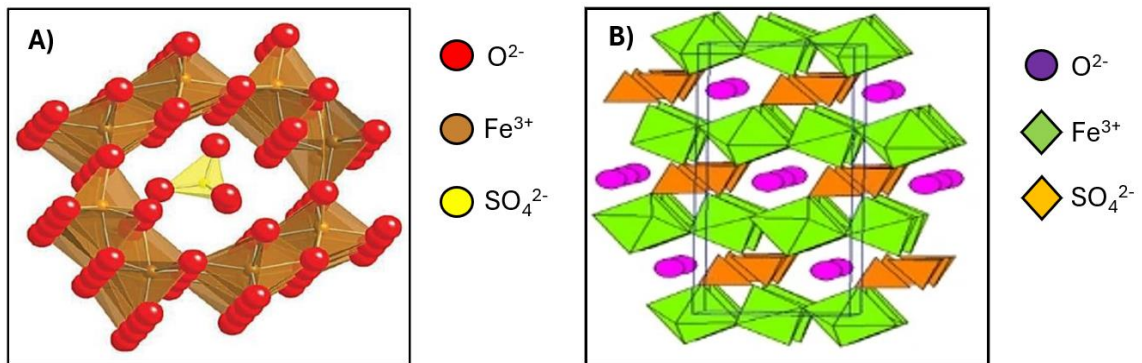


Figura 2. Modelos estructurales de minerales de óxidos de hierro: schwertmannita y jarosita. A) Modelo estructural de Sch. Los aniones de oxígeno y OH⁻ se muestran en rojo, los cationes de Fe³⁺ en naranja, los iones SO₄²⁻ en amarillo. B) Modelo estructural del Jt. Los aniones O²⁻ se muestran en morado, cationes Fe³⁺ en verde y SO₄²⁻ en café. (Modificado de Xu, H. y col. 2010; Bishop, J. L. y col. 2015).

En cuanto a la interacción de estos óxidos de hierro con el As, se han descrito dos mecanismos principales de adsorción: insolubilización, mecanismo por el cual la especie de As intercambia al ion sulfato que posee tanto Sch como Jt en sus estructuras, quedando incorporado en la superficie del mineral (Figura 3). El segundo mecanismo corresponde a la formación de fuertes complejos mediante enlaces covalentes en la superficie del mineral (Figura 4) (Fukushi y col., 2003; Burton y col., 2009; Antelo y col., 2012; Gallegos-Garcia y col., 2012; Paikaray y

col., 2014; Vithana y col., 2014; Li y col., 2018b; Miyata y col., 2018; Zhang y col., 2018; Hudson-Edwards. 2019; Karimian y col. 2023).

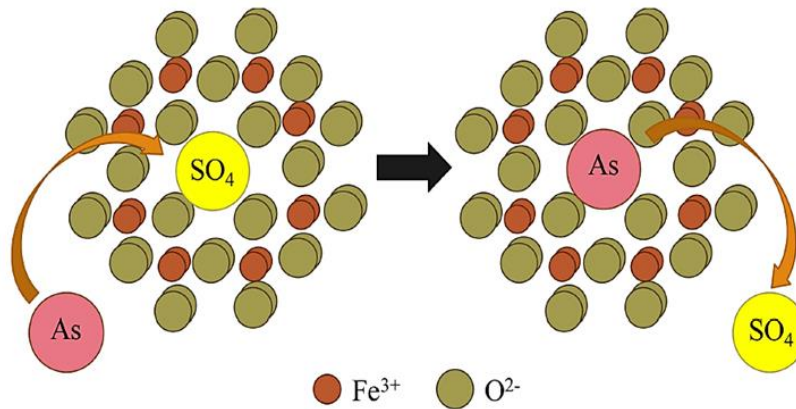


Figura 3. Mecanismo de insolubilización de As en óxidos de hierro (Inazumi y col., 2018).

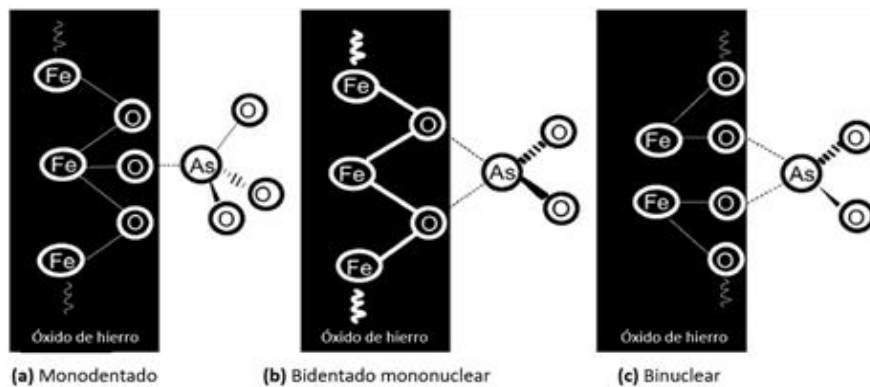


Figura 4. Complejos de arsénico formados en superficies de minerales de óxido de hierro. Modificado de Gallegos-Garcia, M., y col., (2012).

Debido a sus características, se han realizado estudios para comparar la capacidad de adsorber As de los óxidos de hierro biomineralizados, con respecto a adsorbentes convencionales. En el caso de Sch biomineralizada por *A. ferrooxidans* LX5, Liao y col. (2011), obtuvieron una capacidad máxima de adsorción de 113.9 mg As(III)·g⁻¹ Sch. Este resultado es similar a lo obtenido por Song y col. (2018), quienes determinaron que la adsorción máxima de Sch biomineralizada por *A. ferrooxidans* LX5 fue de 117.0 mg As(III)·g⁻¹ Sch. En el caso de Jt, Ahoranta y col. (2016), analizaron la capacidad de un consorcio bacteriano y de los óxidos de hierro biomineralizados de adsorber As(III) y As(V) con una concentración inicial de 100 mg·L⁻¹, obteniendo que el principal mineral producido fue Jt, que registró capacidades de adsorción de 1.24 mg As(III)·g⁻¹ y 2.07 mg As(V)·g⁻¹. A pesar de presentar bajos valores de capacidad de adsorción, la Jt biomineralizada fue capaz de remover el 99.4% de As(V) después de 48 h. Así, las capacidades de adsorción que poseen estos minerales de óxido de hierro son buenas en comparación con los registrados para adsorbentes convencionales utilizados para la remediación de este contaminante, como por ejemplo: el carbón activado, el cual presenta valores de adsorción de As(III) igual a 29.9 mg·g⁻¹ y de As(V) de 30.48 mg·g⁻¹; alúmina activada, que ha registrado una adsorción de As(V) de 15.9 mg·g⁻¹ y zeolita, con valores de adsorción de As(V) que varían desde los 10 – 22.5 mg·g⁻¹, entre otros (Mohan y Pittman Jr. 2007; Singh y col., 2015; Asere y col., 2019).

1.7 Mecanismos de biomineralización de óxidos de hierro en bacterias

Existen tres mecanismos principales mediante los cuales la biomineralización bacteriana puede ocurrir, de manera controlada, inducida e influenciada. En la biomineralización controlada, la bacteria posee actividades celulares determinadas que permiten dirigir la nucleación, crecimiento, morfología y composición de las partículas minerales, las que serán sintetizadas en un lugar definido dentro o sobre la célula, bajo ciertas condiciones fisicoquímicas y genéticas específicas (Bazylinski y Frankel. 2003; Weiner y Dove. 2003; Dong. 2010). En la biomineralización inducida, los minerales se forman en el exterior de la célula como resultado de reacciones químicas de productos metabólicos con iones y/o compuestos en el medio. En el caso de la biomineralización influenciada, los minerales se forman debido a una interacción pasiva con la materia orgánica de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) (Benzerara y col. 2011). Para el caso de la biomineralización de óxidos de hierro, participan los mecanismos inducido e influenciado para lo cual es necesario un proceso de oxidación de Fe(II) para producir Fe(III), el cual va a interaccionar sobre estructuras de la ECM secretada por las células bacterianas, funcionando como sitios de adsorción de iones, nucleación y crecimiento de minerales (Hedrich, y col. 2011). De esta manera, se hace relevante estudiar los distintos elementos que componen la ECM y que pueden participar en el proceso de biomineralización.

La biomineralización de óxidos de hierro es un proceso realizado por una reducida diversidad de bacterias, donde podemos encontrar principalmente extremófilas, tales como: acidófilas, termófilas y psicrofílicas (Donati y col. 2016; Maleke y col., 2019; Yang y col., 2020; Muñoz-Villagrán y col. 2022). Todos estos tipos de bacterias pueden llevar a cabo este proceso de manera natural (en forma planctónica o en biopelículas) o estimulada artificialmente.

En particular, el uso de bacterias acidófilas capaces de biomineralizar óxidos de hierro y de formar biopelículas es un acercamiento metodológico interesante para la biorremediación de aguas contaminadas con As debido a que se puede obtener una alta biomasa estable en el tiempo. De esta manera, se hace necesario entender el proceso de formación de biopelículas y la participación de las diferentes estructuras que la componen en la biomineralización de óxidos de hierro.

1.8 Biopelículas bacterianas

Las biopelículas son sistemas microbianos dinámicos, que se desarrollan en diferentes interfaces (sólido, líquido, líquido-gas, sólido-gas). Albergan comunidades microbianas coordinadas y organizadas funcionalmente, que les otorgan protección frente a diferentes tipos de estresores como el pH, metales pesados, salinidad, radiación, temperatura, entre otros. Las biopelículas están formadas por la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) secretada por las bacterias, la cual a su vez se compone de moléculas como

ADN extracelular, lípidos, polisacáridos, proteínas, y las recientemente descritas vesículas de membranas (MVs, del inglés *membrane vesicles*), las cuales se han descrito como proteoliposomas derivados desde la membrana celular, de forma esférica y de tamaño nanométrico, cuyo cargo molecular le permiten participar en diversas funciones, tales como mortalidad bacteriana, patogenicidad, adquisición de nutrientes, invasión de hospedero, asociación célula – célula, oxidación de sustratos inorgánicos y formación de biopelículas (Jan. 2017; Zlatkov y col. 2021). La ECM presenta diferentes funciones como adherencia a superficies, agregación de células bacterianas, cohesión de la biopelícula, retención de agua y captación de iones inorgánicos (Bellenberg y col., 2014; Vasudevan. 2014; Flemming. 2016a; Khaire y col., 2019; Yin y col., 2019; Zlatkov y col. 2021). La formación de la biopelícula (Figura 6) pasa por diferentes etapas: 1) Fijación, a partir de células en estado planctónico que se unen a una superficie de manera reversible, mediante fuerzas físicas y estructuras celulares superficiales; 2) Formación de una monocapa, las células se adhieren de manera irreversible iniciando la producción de ECM; 3) Formación de microcolonias, en donde las células bacterianas inician la división celular para formar una multicapa; 4) Maduración de la biopelícula, en esta etapa la biopelícula presenta un alto contenido de ECM; 5) Dispersión de la biopelícula, etapa en donde algunas células microbianas se liberan y dejan la biopelícula, debido al hacinamiento y acumulación de desechos tóxicos, donde

las células volverán a un estado planctónico y reanudarán el ciclo (Vasudevan. 2014; Tolker-Nielsen. 2015; Khaire y col., 2019).

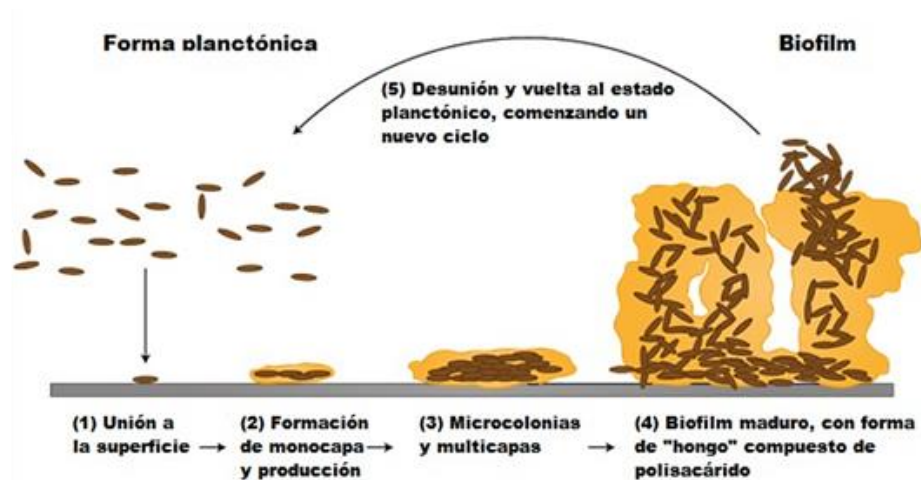


Figura 5. Etapas de formación de una biopelícula. (1) Fijación o adherencia. (2) Formación de una monocapa. (3) Formación de microcolonias. (4) Maduración de la biopelícula. (5) Dispersión de la biopelícula. (Modificado de Vasudevan, R. 2014).

1.9 *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la cepa ATCC 53993 como modelo de estudio

Una de las especies bacterianas acidófilas capaz de biomineralizar óxidos de hierro y de formar biopelículas más estudiada, corresponde a *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la clase *Acidithiobacillia*, que habita ambientes afectados por drenajes ácidos producidos de forma natural o asociados a actividades mineras, caracterizados por un pH extremadamente ácido y una alta concentración de metales tales como el cobre, hierro, azufre y arsénico, entre otros (Park y col. 2014; Quatrini y

Johnson. 2018, Moya-Beltrán y col. 2021). Debido a esto, *A. ferrooxidans* presenta una gran tolerancia a diferentes metales pesados como cobre, cadmio, níquel, arsénico, entre otros, la cual está mediada por diferentes estrategias moleculares de protección y detoxificación (Mykytchuk y col. 2011; Almárcegui y col. 2014; Chen, y col. 2015). *A. ferrooxidans* es un microorganismo mesófilo y acidófilo estricto, capaz de vivir en ambientes con rangos de temperaturas entre 4 y 37°C y valores de pH entre 1.0 y 4.5 (Jung y col. 2022). Posee un metabolismo quimiolitotrófico, fijando carbono desde el CO₂ atmosférico a través del ciclo de Calvin y obteniendo energía mediante la oxidación de hierro ferroso [Fe(II)] y de compuestos reducidos de azufre en presencia de oxígeno (Moya-Beltrán y col. 2021). Esta bacteria es capaz de utilizar el hierro ferroso [Fe(II)] soluble para la obtención de energía, oxidándolo a hierro férrico [Fe(III)] insoluble. el cual puede precipitar mediante el mecanismo de biomineralización inducida e influenciada, diferentes tipos de minerales tales como Sch y Jt, entre otros, dependiendo de condiciones fisicoquímicas del medio como la acidez y la concentración de sulfato (Figura 5) (Kamde y col., 2018; Demir y col., 2020; Pawlowska y Sadowski. 2020).

En particular, las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 han sido las más descritas hasta la fecha, reportando la secuenciación completa de sus genomas, vías metabólicas y biomineralización de óxidos de hierro, lo que las convierte en modelos de estudio idóneos para relacionar procesos

biotecnológicos con elementos moleculares y genéticos (Valdés y col. 2010; Martínez-Bussenius y col. 2016).

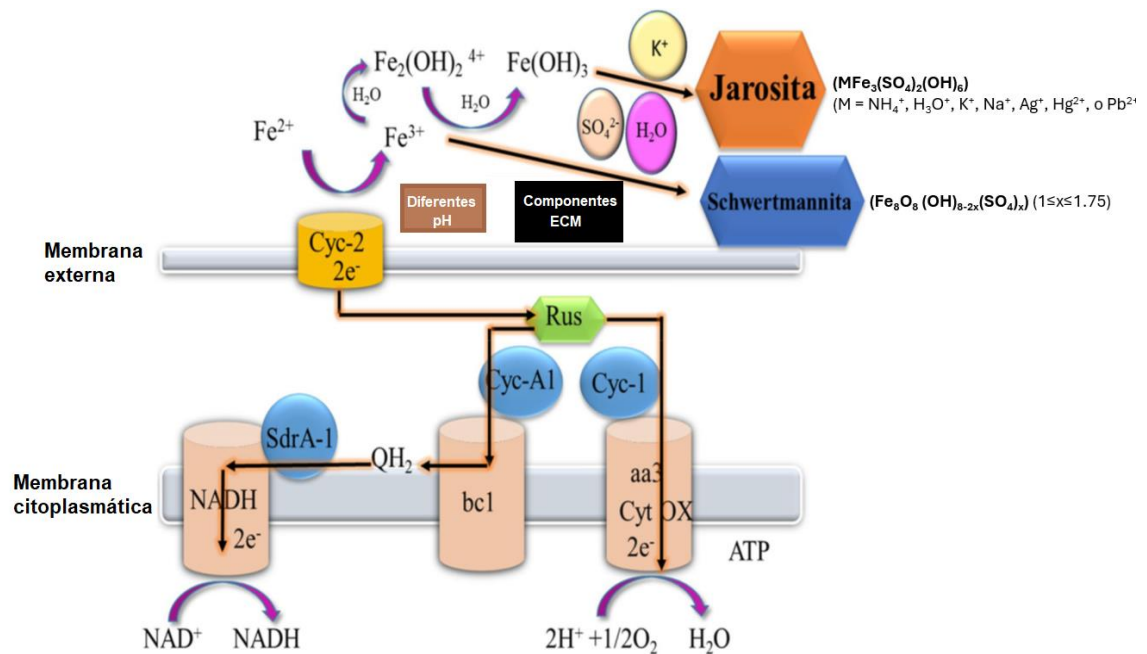


Figura 6. Modelo putativo para la biomineralización de schwertmannita y jarosita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El Fe(II) es oxidado por la proteína Cyc2, localizada en la membrana en la membrana externa, a Fe(III) el cual interacciona con condiciones fisicoquímicas circundantes para la biomineralización de Sch o Jt. Por otra parte, debido a la oxidación del hierro, Cyc2 adquiere electrones que participan en la producción de NADH y de ATP (Modificado de Yang y col. 2020).

Por otra parte, la participación de *A. ferrooxidans* en procesos de biomineralización de óxidos de hierro se ha estudiado generalmente en el contexto de consorcios bacterianos (Ahoranta y col. 2016). En general, los consorcios de microorganismos utilizados en procesos biotecnológicos tienden a perder estabilidad en el tiempo, seleccionándose la actividad de sólo algunas

cepas adaptadas de mejor manera a las condiciones del proceso, debido a un crecimiento competitivo y la incompatibilidad de metabolitos producidos (Xu, y Yu. 2021). Además de esto, la biomineralización de óxidos de hierro puede variar entre cada miembro de un consorcio por sus diferentes capacidades de oxidación del hierro y los diferentes componentes de la ECM que posean, lo que puede alterar la producción de un tipo particular de mineral.

Es por esto que se hace necesario estudiar y comprender cómo se comportan cepas individuales de *A. ferrooxidans* en procesos de biomineralización, así como ahondar en la caracterización de elementos de su ECM con potencialidad para interactuar con metales y modular el proceso de biomineralización.

1.9 Biopelículas formadas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre soportes inorgánicos

Acidithiobacillus ferrooxidans ha sido descrita como una bacteria capaz de adherirse y formar biopelículas sobre la superficie de sustratos o soportes inorgánicos que se encuentran en ambientes naturales en donde habita, como los son los minerales de azufre (por ejemplo: pirita [FeS₂] y calcopirita [CuFeS₂]) (Harneit y col. 2006; Bellenberg y col. 2014; Yang y col. 2015).

En el contexto ambiental donde *A. ferrooxidans* se encuentra, la formación de biopelículas juega un rol importante para su adaptación, ya que previene la toxicidad por metales pesados y permite capturar oligoelementos esenciales y

solubles que pueden ser utilizados en su metabolismo energético y la biosíntesis de estructuras celulares (Flemming y col., 2016b; Tapia y col., 2016; Yin y col., 2019). Además, investigaciones previas indican que la producción de la ECM en las biopelículas favorece la síntesis de minerales de óxidos de hierro facilitando la bioacumulación, crecimiento y agregación de iones metálicos para su biomineralización (Sand y Gehrke. 2006; Zhu y col. 2012; Tapia y col. 2013; Quatrini y Johnson. 2018; Song y col. 2018; Eftekhari y col. 2020a; Feng y col. 2021). En relación con el metabolismo energético, el resultado de la interacción célula – mineral, dada en este tipo de biopelículas, consiste en la oxidación del sustrato para la obtención de energía por parte de la bacteria y la producción de ácido sulfúrico e iones de Fe(III) (Maluckov. 2017). Los iones de Fe(III) interactuarán tanto con la superficie celular de las bacterias, con los diferentes componentes la ECM en la biopelícula, como también serán afectados por las condiciones fisicoquímicas circundantes como el pH, temperatura y concentración de diferentes iones para la biomineralización de óxidos de hierro como Sch y Jt.

Hasta ahora la ECM de *A. ferrooxidans* ha sido caracterizada principalmente en la cepa ATCC 23270, la cual consiste principalmente en azúcares (Ramnosa, Fucosa, Xilosa, Manosa, Glucosa y Ácido urónico), ácidos grasos y proteínas, los cuales interaccionan y forman complejos con iones de Fe(III), los cuales podrían actuar como sitios de nucleación de minerales de óxidos de hierro (Gehrke y col. 1998; Harneit y col. 2006; Sand y Gehrke, 2006; Bellenberg y col.

2012; Vera y col. 2013; Vargas-Straube y col. 2020). Recientemente, en el estudio de Rossoni y col. (2024) se describió que *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377, *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *Fervidacidithiobacillus caldus* 51756 (previamente conocida como *Acidithiobacillus caldus*), tienen la capacidad de producir MVs. En el caso de esta última cepa bacteriana, las MVs constituyen componentes estructurales de la ECM de sus biopelículas, participando en procesos de adherencia al azufre elemental e interacciones célula-célula.

A pesar de esto, existe poca información en particular sobre la capacidad de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 para formar biopelículas sobre diferentes soportes, como tampoco de los componentes de su ECM y si esta cepa es capaz de producir MVs y sobre su posible participación en el contexto de biopelículas y biomineralización de óxidos de hierro, por lo que se hace necesario evaluar la capacidad de adherencia y formación de biopelículas en esta cepa.

2.0 Biomineralización de óxidos de hierro en soportes orgánicos inertes en el tratamiento de aguas contaminadas con arsénico

A. ferrooxidans forma naturalmente biopelículas sobre minerales de azufre, este proceso genera ácido sulfúrico, lo que aporta al desarrollo de drenajes ácidos, lo que dentro de un contexto de biorremediación de aguas contaminadas puede ser un resultado no deseado (Kulshreshtha y col. 2014). De esta manera, surge

la necesidad de estudiar la capacidad de formar biopelículas sobre soportes de otro tipo tales como los orgánicos inertes.

En general, los soportes utilizados en sistemas de tratamientos de aguas deben cumplir con las siguientes características: ser insolubles, no ser biodegradables por la biomasa y el ambiente, no ser tóxicos, económicos, tener una buena difusión de nutrientes, fácil de manipular y reutilizar (Bouabidi y col., 2019). Dentro de los soportes podemos encontrar los orgánicos inertes como el polipropileno, polietileno y poliuretano, entre otros, los que se caracterizan por presentar formas de esponjas, cilíndricas y esféricas (*bioballs*), los cuales poseen diferentes tamaños y superficies, baja densidad, estabilidad, resistencia a la biodegradación y una fuerte resistencia mecánica (Bouabidi y col., 2019; Zhao y col., 2019). Dadas estas características, los soportes orgánicos inertes han sido utilizados en sistemas de tratamientos biológicos basados en la formación de biopelículas por bacterias para la biorremediación de metales, la oxidación de hierro, tratamientos de aguas residuales, eliminación de sustancias orgánicas y nutrientes (Masłoń y Tomaszek. 2015; Yavari y col., 2019; Al-Amshawee y col., 2020; Makisha. 2021). Así, este tipo de soporte permitiría la adherencia de las células bacterianas de *A. ferrooxidans* para la producción de biopelículas, sin la generación de ácido sulfúrico producto de la oxidación de sustrato inorgánicos como la pirita.

Considerando la toxicidad del As y los efectos negativos que provoca en la salud humana, junto con la alta presencia de éste en el norte de nuestro país y en el mundo, es que se hace necesario buscar nuevas formas de tratamiento de aguas contaminadas con este metaloide. Un sistema de tratamiento usando *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, una bacteria acidófila y oxidante de hierro, capaz de biomineralizar óxidos de hierro como Sch y Jt para la adsorción de As aparece como un método alternativo, económico y amigable con el ambiente que merece ser explorada.

En esta tesis se propone el estudio de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* como modelo para ahondar en la caracterización de la formación de biopelículas de este microorganismo sobre diferentes tipos de soportes, inorgánicos (pirita y azufre elemental) y orgánicos inertes (*bioballs*), para identificar y analizar nuevos componentes de su ECM, y comprender la función de estas estructuras en la biomineralización de óxidos de hierro y la capacidad de estos minerales para adsorber As.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 53993, una cepa bacteriana acidófila y oxidante de hierro, es capaz de formar biopelículas sobre soportes inorgánicos y orgánicos, que puede ser utilizada para tratar aguas contaminadas con As(III) mediante adsorción por óxidos de hierro biomineralizados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar biopelículas formadas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, incluyendo componentes de su matriz extracelular, y evaluar su utilidad para el tratamiento de aguas contaminadas con arsénico inorgánico mediante biomineralización de óxidos de hierro.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la tolerancia a arsénico de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y evaluar su crecimiento en presencia del metaloide.
- 2) Caracterizar la matriz extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y evaluar la formación de biopelículas sobre soportes inorgánicos y orgánicos.
- 3) Caracterizar los óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico y determinar su capacidad de adsorción de As(III).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bacteria acidófila oxidante de hierro, medio de cultivo y condiciones de aclimatación inicial.

Se utilizó la cepa ATCC 53993 de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bacteria acidófila oxidante de hierro ferroso Fe(II), la cual fue facilitada por el Dr. Matías Castro González, del laboratorio de Oceanografía Microbiana, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias naturales y oceanográficas, Universidad de Concepción. El cultivo inicial de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 se realizó en medio modificado BART (*Bangor Acidophile Research Team*) más solución de sales trazas descrito por Ñancuqueo y col (2016), con las siguientes modificaciones en su composición debido a la presencia de compuestos orgánicos como fuente de energía, los cuales no son necesarios para esta bacteria. A continuación, se presenta la composición química del medio BART modificado:

Sales basales: $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ ($7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($22.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); KCl ($2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); K_2SO_4 ($1.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), diluidos en agua milli Q y esterilizados mediante autoclave a 121°C por 20 min. Fuente de energía: $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($44.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), al cual se le añadió 5 mL de H_2SO_4 concentrado (18 M) y se ajustó el pH a 1.2, esterilizando por separado mediante filtración ($0.22 \mu\text{m}$) y almacenado a 4°C , protegido de la luz. Solución buffer: KH_2PO_4 ($68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Solución traza

compuesta por: $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); H_3BO_3 ($0.60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); KBr ($0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); KI ($0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); NaVO_3 ($0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), diluidos en agua milli Q estéril y esterilizados mediante filtración ($0.22 \mu\text{m}$) y almacenado a 4°C , protegido de la luz. El medio de cultivo fue ajustado a un pH inicial de ~ 1.8 .

Para las condiciones iniciales de aclimatación de la cepa bacteriana *A. ferrooxidans* ATCC 53993 se utilizaron 2 matraces de 100 mL que contenían 30 mL del medio BART, suplementados con soluciones de arsenito de sodio (NaAsO_2) y arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ambos a una concentración final de 0.5 mM, respectivamente. La cepa se inoculó en una relación al 10%(v/v), desde un cultivo que se encontraba en la fase exponencial y con una densidad celular de $1.0 \times 10^8 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, se incubó a 30°C durante 120 h, con agitación constante de 90 rpm. Como control abiótico, se utilizaron matraces con las mismas condiciones mencionadas anteriormente sin inóculo bacteriano, para descartar la oxidación del hierro debido a interacciones fisicoquímicas del medio de cultivo.

El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante el recuento del número de células en el cultivo con Cámara de Neubauer en un microscopio óptico con un objetivo 40X de contraste de fases (Rossoni y col. 2024). Además, el

crecimiento bacteriano se evidenció mediante la biooxidación del Fe(II) disponible en el medio de cultivo, lo que se determinó por un cambio en la coloración del medio, desde un color celeste claro hacia un color café-anaranjado, junto con la formación de precipitados minerales de óxido de hierro (Dehghani y col. 2019)

2. Caracterización fenotípica de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993

2.1 Niveles de tolerancia a As inorgánico

Los niveles de tolerancia a As(III) y As(V) fueron determinados inoculando la cepa bacteriana *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART modificado suplementado con concentraciones decrecientes de arsenito de sodio [As(III)] y/o arseniato de sodio [As(V)], en el rango de 512 – 0.5 mM, respectivamente. Para esto se utilizaron microplacas de 96 pocillos, considerando un volumen de trabajo de 200 µL en cada pocillo. Se utilizó una microplaca inicial que contenía el medio de cultivo BART suplementado con las respectivas concentraciones de As(III) y As(V) y el inóculo de 2 µL de la cepa bacteriana *A. ferrooxidans* ATCC 53993 que presentaba una densidad celular igual a 1.0×10^8 cel·mL⁻¹. Esta microplaca se incubó durante 72 h a 30°C sin agitación. Luego, desde cada pocillo de la microplaca inicial, se obtuvo un inóculo de 2 µL que se sembraron en una nueva microplaca de 96 pocillos (microplaca final), la cual contenía sólo el medio de cultivo BART. Además, se realizaron controles abióticos para

arsenito de sodio y/o arseniato de sodio, para descartar la interacción química del medio con el arsénico. Cada concentración de As utilizada se realizó en duplicado.

Como criterio de tolerancia, se consideró que la cepa bacteriana *A. ferrooxidans* ATCC 53993 era capaz de tolerar la concentración de As correspondiente si fue capaz de oxidar el Fe(II) disponible en el medio, cambiando la coloración de éste hacia un color anaranjado, junto con la producción de precipitados minerales. Además de esto, se midió la densidad óptica a 430 nm (Dehghani y col. 2019) para analizar el crecimiento celular utilizando un espectrofotómetro Epoch™ (BIOTEK®).

2.2 Análisis de la cinética de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Se analizaron las condiciones fisicoquímicas óptimas tanto para el crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, como para la biomineralización de óxidos de hierro. Para esto, se realizaron curvas de crecimiento con diferentes valores de pH y temperatura. Los valores de pH evaluados fueron 1.8, 2.0 y 2.5, ya que se ha descrito que el pH es un factor clave para la formación de minerales de óxidos de hierro tal como schwertmannita y jarosita, los cuales pueden ser producidos en un rango de pH entre 1.6 y 3.5 (Taghizadeh, S. M., y col. 2020; Schoepfer, V., y Burton, E. 2021). Mientras que los valores de temperatura utilizados fueron 28°C y 30°C, ya que son temperaturas utilizadas comúnmente para el cultivo de este tipo de bacteria y la biomineralización de óxidos de hierro

(Song, Y., 2018; Zhang, J., y col. 2022). En la Tabla 1 se observa la matriz de combinaciones de los valores de temperatura y pH para cada curva de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se realizaron en presencia y ausencia de arsenito de sodio y arseniato de sodio a una concentración final de 0.5 mM, mediante análisis espectrofotométricos midiendo la densidad óptica a 430 nm (Dehghani y col. 2019) utilizando un espectrofotómetro Epoch™ (BIOTEK®). Para esto se incubaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio BART modificado, con una agitación constante de 90 rpm durante 7 días, tomando muestras de 200 µL, las que se depositaron en microplacas de 96 pocillos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos evaluados en las curvas de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)
1	1.8	28
2	1.8	30
3	2	28
4	2	30
5	2.5	28
6	2.5	30

Las curvas de crecimiento obtenidas fueron analizadas y modeladas utilizando el modelo de aproximación matemática Gompertz, debido a que ofrece una mayor flexibilidad y precisión en la descripción del crecimiento bacteriano, especialmente en su capacidad para modelar la fase estacionaria en la curva de crecimiento. Las gráficas y modelos fueron realizados y analizados estadísticamente en GraphPad Prism 8®. Luego de obtener las cinéticas de crecimiento, las velocidades de crecimiento (k) fueron evaluadas para observar si existen diferencias significativas a través del análisis de ANOVA de una vía y posteriormente se seleccionó la prueba de Tukey para separar identificar diferencias significativas entre pares de medias considerando el valor de p (<0.05).

Una vez comparadas las velocidades de crecimiento en cada tratamiento se eligieron los valores de pH y temperatura óptimos para el crecimiento de la cepa bacteriana ATCC 53993 y la biomineralización de óxidos de hierro. Luego, debido a la posible interferencia que podrían presentar algunos minerales de óxidos de hierro en la lectura mediante el método espectrofotométrico midiendo la densidad óptica, se comparó y corroboró la curva de crecimiento seleccionada, mediante recuento celular utilizando Cámara de Neubauer.

3. Evaluación de formación de biopelículas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 sobre soportes inorgánicos

3.1 Características de soportes inorgánicos (cupones de azufre y pirita)

Para evaluar la formación de biopelículas de la cepa ATCC 53993 sobre soportes inorgánicos se utilizaron cupones de azufre elemental y pirita. Los cupones de azufre se prepararon a partir de azufre elemental en polvo, el cual se calentó en un vaso de precipitado sobre una placa calefactora hasta llegar al punto de fusión, momento en el cual se procedió a depositarlo sobre una superficie lisa de vidrio para que se enfriara. Luego, el azufre solidificado se trozó, utilizando una espátula, en pequeños fragmentos de 1 cm de diámetro aproximadamente, los cuales fueron almacenados en alcohol al 95%, para su posterior uso. Mientras que la pirita utilizada consistía en pequeños fragmentos de este mineral de alrededor de 1 cm de largo, los cuales fueron esterilizados lavándolos con HCl 6N durante 30 min con agitación suave, luego fue lavado con agua destilada hasta que el pH volviera a neutro. Posteriormente, se enjuagó con acetona y fue secado a 60°C durante la noche.

3.2 Evaluación de formación de biopelículas sobre soportes inorgánicos

Para la evaluación de formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre cupones de azufre y pirita, se utilizaron los métodos de microscopia de epifluorescencia mediante el uso de la tinción FMTM4-64, el cual

es un colorante de carácter lipofílico que se une a los lípidos de membrana de las células emitiendo una señal roja a los 734 nm. Además, se analizaron las muestras mediante microscopia electrónica de barrido (SEM, del inglés *scanning electron microscope*). Para esto se depositaron cupones de azufre y fragmentos de pirita en el interior de matraces Erlenmeyer, respectivamente, con 30 mL de solución salina del medio BART modificado. Estos matraces fueron inoculados al 10% (v/v) con la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* e incubados durante 1 h sin agitación a 28°C. Posteriormente, los soportes fueron retirados con una pinza desde el medio, manteniendo condiciones asépticas y fueron lavados suavemente en solución salina del medio BART modificado para retirar las células que no se adhirieron al soporte. Para el caso de la tinción fluorescente con FMTM4-64, se procedió a teñir con 50 µL (4 µg·ml⁻¹) de este colorante, cubriendo la superficie del soporte y se incubó durante 10 min en oscuridad. Luego, el soporte se lavó nuevamente en solución salina del medio BART modificado para retirar el exceso de tinción y posteriormente, la muestra se montó sobre un portaobjetos con aceite de inmersión y un cubreobjeto para su observación en microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop 2) usando un objetivo 100X.

Para la microscopia de electrónica de barrido, la formación de las biopelículas sobre los soportes de pirita y cupones de azufre se realizó de la misma manera mencionada anteriormente. Sin embargo, se incubó durante 3 días sin agitación a 28°C. Luego, se procedió a lavar los soportes, con agua destilada estéril para

remover las células bacterianas no adheridas a los soportes. Los minerales con las células adheridas se fijaron utilizando glutaraldehído al 1%, para su posterior observación mediante SEM (Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica, CESMI, Universidad de Concepción).

3.3 Evaluación de formación de biopelículas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 sobre soporte orgánico inerte

Para evaluar la formación de biopelículas de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* sobre un soporte orgánico inerte (*bioball*) se implementó un biorreactor batch aeróbico. Para esto se utilizaron matraces de 500 mL, los cuales contenían 150 mL de caldo BART modificado con los valores de pH y temperatura seleccionados en la sección 2.2. Se plantearon tres tratamientos diferentes: a) con ausencia de As. b) suplementado con arsenito de sodio [As(III)] y c) suplementado con arseniato de sodio [As(V)], a una concentración final de 0.5 mM, en cada caso. Los biorreactores fueron inoculados con la cepa ATCC 53993 en una relación de 10% (v/v), con una densidad celular igual a 1.0×10^7 cel·mL⁻¹ y se mantuvieron durante 7 días, con agitación constante de 90 rpm. Los ensayos fueron realizados en triplicado.

Como soportes se utilizaron esferas de polipropileno, denominadas *bioballs*. Los *bioballs* poseen 18 mm de diámetro, una densidad de 0.92 g cm⁻³, una masa de 0.9 g y una superficie específica estimada de 0.2523 m²·g⁻¹. En su interior contienen una esponja del mismo material con diámetro de 10 mm. Para

su uso en el biorreactor los *bioballs* fueron esterilizados mediante autoclave a 121°C por 20 min. Los *bioballs* se incorporaron en los biorreactores en una proporción de 10% del volumen de trabajo, según lo descrito por Masłoń, A., y Tomaszek, J. A. (2015).

La formación de las biopelículas producidas la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre los soportes se evaluó mediante 3 métodos diferentes: recuento celular por microscopía de epifluorescencia, recuento celular mediante Cámara de Neubauer y SEM.

3.4 Recuperación de *bioballs* desde cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Para esto se obtuvieron muestras de los soportes a las 0, 24, 48, 120 y 168 h de incubación, en condiciones asépticas. Los *bioballs* se depositaron en tubos de ensayo con 5 mL de solución salina 1X del medio BART modificado, con el objetivo de realizar un lavado para retirar las células planctónicas y minerales que no estaban adheridos a las biopelículas. Luego, se agregaron 5 mL más de solución salina 1X y las células sésiles adheridas al soporte fueron fijadas con formalina al 37% con una incubación de 10 min. En este punto, se guardaron 2 *bioballs* con las células fijadas, una para el recuento tanto con tinción fluorescente como con cámara de Neubauer y otra, para realizar observar mediante SEM, para cada tiempo muestral.

3.5 Método de recuento por microscopia de epifluorescencia y cámara de Neubauer

En los métodos de recuento celular por microscopia de epifluorescencia y cámara de Neubauer fue necesario extraer las células sésiles que forman las biopelículas para su visualización. Para esto se procedió a realizar un vortex durante 1 min al *bioball*, con las células fijadas previamente, para luego realizar un baño sónico durante 15 min. Desde el sobrenadante generado, se tomaron muestras de 1 mL que fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras en los tubos eppendorf fueron centrifugadas a 4000 rpm por 1 min, para separar los precipitados minerales de las células. Luego, se recuperó el sobrenadante que contenía a las células y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min y el pellet obtenido fue lavado con solución salina 1X del medio BART modificado. El lavado fue repetido tres veces, para su posterior uso.

La visualización se realizó mediante microscopia de epifluorescencia de las células obtenidas anteriormente. Para esto se tomaron 40 μL de muestra y 20 μL del colorante fluorescente Naranja de Acridina ($125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubado en oscuridad en un tubo Eppendorf de 1 mL durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, 40 μL de la mezcla fueron depositados en un portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente. Se agregó aceite de inmersión y se colocó un cubreobjeto, para luego visualizar con un aumento 1000X en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop-2 Mot Plus, con filtro

para luz azul a una longitud de onda de excitación a 460 nm. Para el recuento, se contabilizaron las células bacterianas que emitían fluorescencia, contando 30 campos visuales, siguiendo un patrón de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, según lo indicado por Muthukrishnan y col. 2017.

Para el cálculo de la densidad celular ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) se consideraron fórmulas que relacionan el área del campo visual del objetivo 100X (0.0491 mm^2), el área del cubreobjeto (400 mm^2) y el número total de campos visuales totales dentro del cubreobjeto (8146 campos visuales totales), presentadas a continuación:

$$\text{n}^\circ \text{ células totales} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células contadas} \times 8146 \text{ campos visuales totales}}{30 \text{ campos visuales contabilizados}}$$

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células totales}}{0.04 \text{ mL}} \times 5$$

Mientras que, para el recuento de las células mediante cámara de Neubauer, una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de las células recuperadas en la etapa anterior fueron contadas considerando 5 cuadrantes de la cámara. Para el cálculo de $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aplicó la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = \frac{\Sigma \text{n}^\circ \text{ de células por cuadrante}}{(4 \times 10^{-6}) \text{ mL}}$$

3.6 Visualización de biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido

Como último método para evidenciar tanto la formación de biopelículas sobre *bioballs* como para analizar su morfología se utilizó SEM. Las muestras de los *bioballs* obtenidas mencionadas en el punto 3.4 fueron depositadas en tubos Falcón de 50 mL con 5 mL de agua destilada ácida a pH ~2.5 estéril para su posterior visualización mediante SEM (Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica, CESMI, Universidad de Concepción).

3.7 Caracterización y análisis proteómico de vesículas de membrana (MVs) producidas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre soportes inorgánicos

Para estudiar las estructuras nanométricas esféricas observadas junto a las células de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en el punto anterior, tanto en microscopía de epifluorescencia como electrónica de barrido, se procedió a realizar un aislamiento de estas, para luego realizar una caracterización de su distribución de tamaño (análisis de Nanotracking), morfología (microscopía electrónica de transmisión) y un análisis proteómico de estas estructuras, para indagar en las funciones en las cuales podrían estar implicadas.

Para el aislamiento, se prepararon 5 L de medio modificado BART utilizando dos fuentes de energía diferentes. En un caso, se utilizó azufre elemental, manteniendo en incubación durante 7 días a 90 rpm y con un pH inicial de 2.8. En un segundo caso, se utilizó sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), manteniendo en

incubación durante 3 días a 90 rpm y con un pH inicial de 1.8. En ambos casos, se inocularon con *A. ferrooxidans* ATCC 53993 al 10% (v/v) para obtener una densidad celular igual a 1.0×10^8 cel·mL⁻¹. Al término del periodo de incubación se midió la densidad celular utilizando una Cámara de Neubauer en cada caso, esperando tener una concentración $\sim 5.0 \times 10^8$ cel·mL⁻¹.

Posteriormente, se procedió a centrifugar los 5 L de cultivo en cada caso a 7000 rpm durante 30 min para precipitar los minerales de óxidos de hierro producidos por las células bacterianas. Luego, el sobrenadante recuperado se filtró por 0.45 μ m y 0.22 μ m utilizando unidades de filtración. El filtrado resultante, fue filtrado nuevamente a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés *Tangential Flow Filtration*), el cual permite concentrar partículas de un tamaño de 100 kDa. Con este nuevo filtrado se procedió a ultracentrifugar a 28,000 rpm durante 2.5 h con la finalidad de precipitar todas las MVs. Las MVs obtenidas, provenientes del medio con azufre como las de sulfato de hierro, se resuspendieron en 1 mL de solución salina del medio modificado BART estéril para su posterior análisis.

Para la caracterización de las MVs, se realizó un estudio de distribución de tamaño mediante Nanosight 300, el cual entrega la distribución de tamaño que presenta la población de estas partículas. Además, se analizó su morfología y ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido (TEM, del inglés

Transmission Electron Microscopy) utilizando el equipo Talos F200C G2 (Unidad de Microscopía Avanzada, UMA, Universidad Católica de Chile).

Para analizar el cargo proteico tanto de las MVs como de las células de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 que originaron, se realizó un análisis proteómico cuantitativo a partir del mismo cultivo en presencia de azufre. Esto permitió determinar qué proteínas están expresadas diferencialmente en cada entidad y así poder comprender en qué actividades puede estar participando las MVs. La purificación y secuenciación de proteínas se llevó a cabo en el Melisa Institute (Concepción, Chile). Las proteínas fueron recuperadas desde muestras concentradas de células de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y desde extractos libres de células enriquecidos de MVs, ambos provenientes desde el mismo cultivo crecido en azufre. La integridad de las proteínas fue evaluada mediante SDS-PAGE. Las proteínas purificadas fueron digeridas con tripsina y sometidas a análisis de LC-MS/MS utilizando un nanoUHPLC nanoElute (Bruker Daltonics) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Espectrometría de Movilidad Iónica Atrapada-Espectrómetro de Masas de Tiempo de Vuelo en Cuadrupolo, Bruker Daltonics). Los datos obtenidos fueron analizados con el software PEAKS Studio X + (Bioinformatics Solutions). La identificación del proteoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 se realizó contra la base de datos UniProt. La estimación de la tasa de falsos descubrimientos (FDR) se incluyó a través de una base de datos señuelo, con un FDR $\geq 1\%$ (significancia ≥ 20 en PEAKS Studio X+) y el requisito de al menos un péptido único por proteína para

la identificación. Las secuencias de proteínas fueron evaluadas por ortología y dominios conservados contra la base de datos Cluster of Orthologous Groups of proteins (COG) utilizando PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) y la búsqueda de la base de datos de Dominios Conservados (CD) (Marchler-Bauer et al., 2017), respectivamente.

3.8 Evaluación de la biooxidación de hierro por MVs producidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993

En una microplaca de 96 pocillos se realizaron los análisis de biooxidación de hierro por las MVs. Para esto se plantearon tres tratamientos a modo de comparación: en presencia y ausencia de As(III) y As(V) 0.5 mM. Primero, en un se inoculó sólo *A. ferrooxidans* ATCC 53993, en otro sólo se inoculó MVs y en el último caso, se inocularon tanto células como MVs. Cada pocillo contenía medio BART modificado y los inóculos se calcularon al 2% (v/v), con un volumen final en cada pocillo de 200 µL. Cada tratamiento fue evaluado en triplicado. La biooxidación se evaluó mediante análisis espectrofotométricos midiendo la densidad óptica a 430 nm (Dehghani y col. 2019) utilizando un espectrofotómetro Epoch™ (BIOTEK®). Como control negativo se utilizaron pocillos sólo con medio BART modificado.

4.0 Caracterización de óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico

Los óxidos de hierro biomineralizados por las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre los *bioballs* fueron caracterizados mediante difracción de rayos X, SEM asociado a espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS). Además, su capacidad de adsorción de As fue evaluada mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS, del inglés *Inductively coupled plasma mass spectrometry*).

Los óxidos de hierro biomineralizados por la cepa ATCC 53993 inmovilizada fueron recuperados posterior al tiempo de incubación de 168 h. Para esto, cada matraz de cada condición de cultivo utilizada fue sonificado durante 15 min en un baño sónico, con el objetivo de desprender los minerales adheridos a la cara interna de cada matraz, como también para separar la fase mineral de las células bacterianas en cada soporte. Luego, los minerales suspendidos fueron recolectados por medio de filtración utilizando papel filtro cuantitativo Whatman™ grado 54. Posteriormente, los precipitados de hierro obtenidos fueron lavados con agua destilada estéril a pH 2.0 en tubos falcon de 15 mL y luego centrifugados a 3,000 rpm por 5 min, proceso que fue repetido dos veces. A continuación, los precipitados fueron secados a 60°C durante 4 h en placas de Petri y luego esterilizados a 121°C, para su posterior análisis.

Para analizar la composición y obtener su identificación mineral, los óxidos de hierro biomineralizados fueron analizados mediante XDR. El espectro de XDR fue obtenido usando un difractómetro Bruker D8 con un ánodo de Cu (40 kV y 30 mA) y escaneado desde 5 hasta $80^\circ 2\theta$. Luego de un secado, las muestras fueron trituradas en un mortero antes de montarlas en un filtro de fibra de vidrio, utilizando una cámara de suspensión de aerosol tubular. Los componentes de las muestras fueron identificados por comparación con estándares establecidos por el Centro Internacional de Datos de Difracción (www.icdd.com) usando el software EVA 15.0.0.0.

Además, se empleó SEM-EDS (Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica, CESMI, Universidad de Concepción). para analizar la morfología, el tamaño y la composición química elemental de las fases minerales de los óxidos de hierro biomineralizados por *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Para esto, las muestras de minerales fueron fijadas en una cinta de carbono que se pulverizó en una máquina de recubrimiento por pulverización catódica Cressington 208 HR con platino a 1.3 nm (~1 min, 40 mA) y se tomaron imágenes a 3 kV por un LEO 1530 SEM equipado con el Cátodo Shotky y columna GEMINI con fuente de radiación ZrO₂.

4.1 Análisis de adsorción de As de óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Para analizar y comparar la capacidad de adsorción de As de los óxidos de hierro biomineralizados por *A. ferrooxidans* ATCC 53993, se realizaron análisis de coprecipitación siguiendo la metodología descrita por Song et al. (2018). En resumen, se utilizó 100 mL de agua Milli-Q estéril a pH 7.0, suplementada con 30 mg·L⁻¹ de As(III). Posteriormente, se añadieron 25 mg de óxido de hierro biomineralizado y la mezcla se incubó a 180 rpm y 28°C durante 12 h. Se tomaron muestras a 0 h y 12 h, se filtraron a 0.45 µm, y se analizó la concentración total de As en el filtrado mediante ICP-MS. La capacidad de adsorción de As de cada muestra (1) y el porcentaje de adsorción de As (2) se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

Capacidad de adsorción de As (mg g⁻¹):

$$As(mg \cdot g^{-1}) = \frac{(C_0 - C_t) \times 0.10 L}{25 mg \times 10^{-3}}$$

Porcentaje de adsorción de As (As%):

$$As(\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

Donde C_0 es la concentración inicial de As ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y C_t es la concentración de As ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el filtrado al tiempo final. El volumen efectivo de la solución corresponde a 0.10 L y 25 mg es la cantidad de mineral añadido.

RESULTADOS

Niveles de tolerancia a As inorgánico de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Se determinaron los niveles de tolerancia a As inorgánico de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (Figura 7 y Figura 8). La oxidación del hierro presente en el medio de cultivo, evidenciado por un cambio en el color de éste y la presencia de precipitados minerales (Tabla 2) indicó que la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 fue capaz de tolerar concentraciones de As(III) y As(V) iguales a 2 mM y 32 mM, respectivamente.

Análisis de la cinética de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en presencia de As

Con el objetivo de analizar y determinar los valores óptimos de temperatura y pH para el crecimiento de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, el crecimiento celular fue estudiado indirectamente mediante análisis espectrofotométricos midiendo la densidad óptica a 430 nm luego de 120 h de incubación en presencia y ausencia de As(III) y As(V) 0.5 mM, respectivamente, a diferentes temperaturas (28°C y 30°C) y valores de pH inicial (1.8, 2.0 y 2.5).

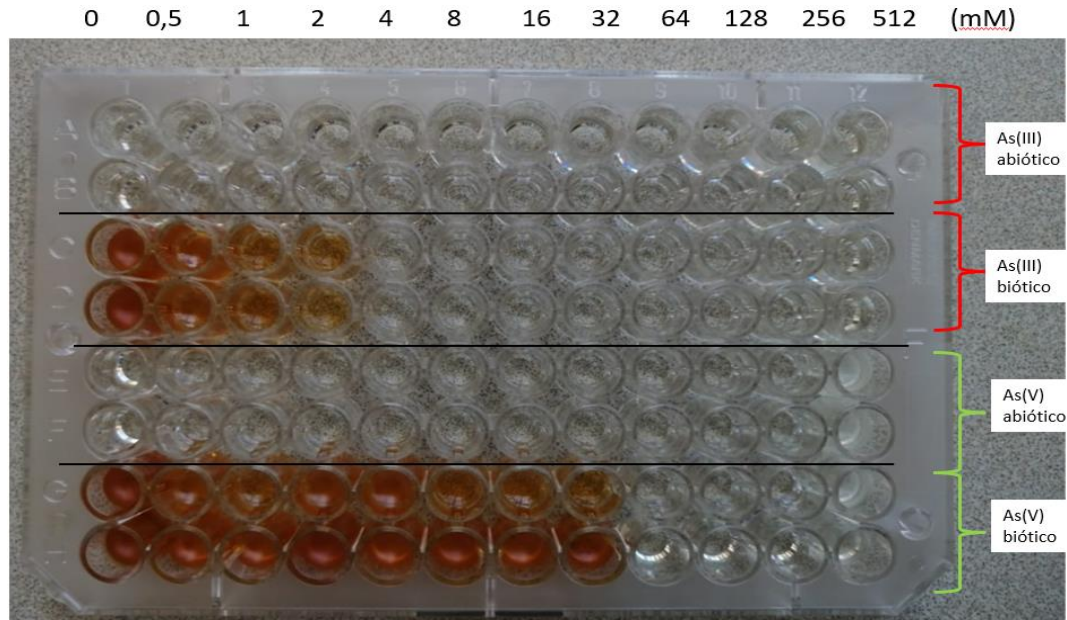


Figura 7. Niveles de tolerancia a As en caldo BART, suplementado con concentraciones decreciente de As(III) y As(V) (512 – 0.5 mM) en microplaca de 96 pocillos.

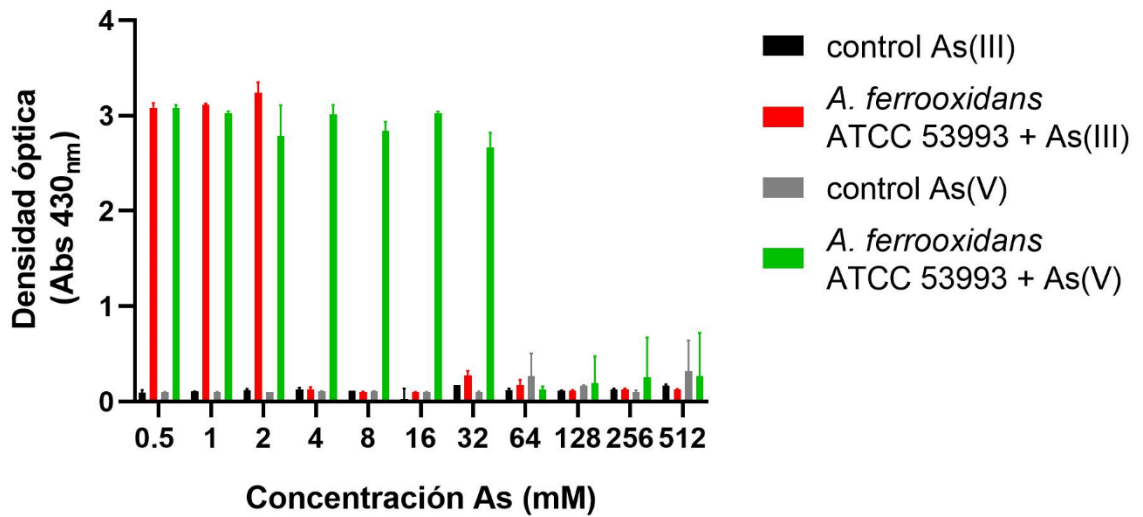


Figura 8. Gráfico de niveles de tolerancia a As en caldo BART, suplementado con concentraciones decreciente de As(III) y As(V) (512 – 0.5 mM) evaluado mediante densidad óptica a 430 nm

Tabla 2. Niveles de tolerancia a arsénico inorgánico de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, biooxidación de Fe(II) y precipitación de minerales.

	Concentración (mM)	Biooxidación de Fe(II)	Precipitación de minerales
As(III)	2	+	+
As(V)	32	+	+

En cada caso, se usaron controles abióticos con el fin de descartar la oxidación del hierro por efectos fisicoquímicos. Los valores de absorbancia se graficaron directamente para obtener las curvas de crecimiento y además se modelaron utilizando modelos de aproximación matemática para la obtención de los parámetros cinéticos como la velocidad de crecimiento k ($OD_{430} \cdot h^{-1}$).

En la Figura 9 se observa la cinética de crecimiento obtenida a pH 1.8 a 28°C, en donde *A. ferrooxidans* ATCC 53993, frente a los tres tratamientos, comienza la fase exponencial a las 24 h. Luego, la cepa en el tratamiento sin As entra a la fase de muerte a las 60 h, mientras que en presencia de As(III) 0.5 mM (línea verde) y de As(V) 0.5 mM (línea azul) lo hace a las 48 h.

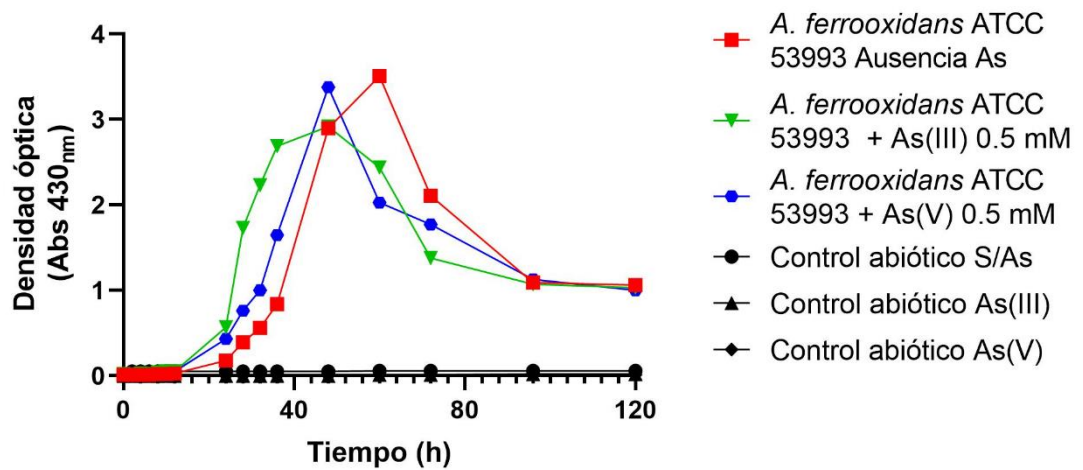


Figura 9. Curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C. 1: Línea roja: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en ausencia de arsénico. Línea verde: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(III) 0.5 mM. Línea azul: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(V) 0.5 mM. En negro: controles abióticos sin arsénico (-●-) y suplementados con As(III) (-▲-) y As(V) (-◆-).

En la Figura 10, se observa la cinética de crecimiento obtenida mediante el modelo de Gompertz, con el cual se obtuvieron los parámetros cinéticos (Tabla 3). Los resultados indican que *A. ferrooxidans* ATCC 53993 no ve afectado su crecimiento celular en presencia o ausencia de As(III) y As(V) a estos valores de pH y temperatura. La prueba de Tukey de comparación múltiple indicó que no existen diferencias significativas entre cada tratamiento ($p > 0.05$).

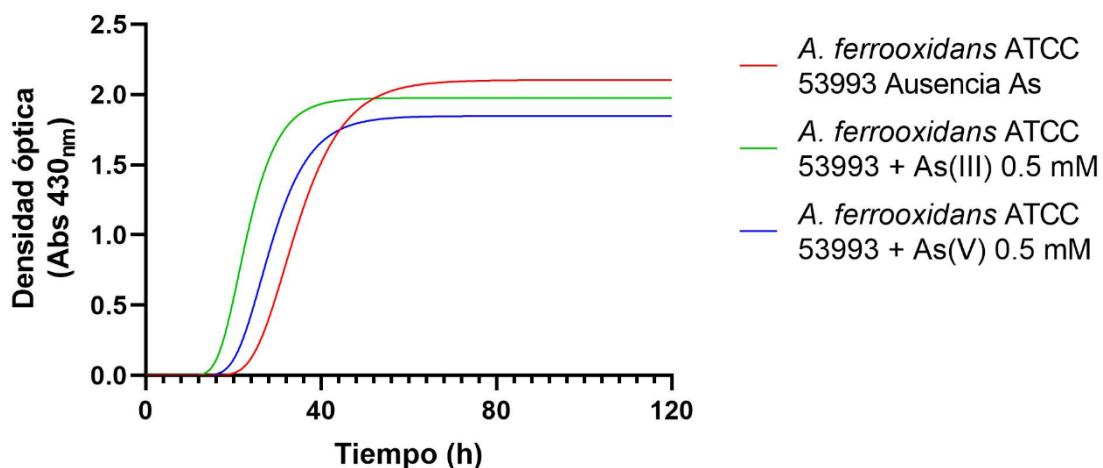


Figura 10. Cinética de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C ajustada bajo el modelo de Gompertz. Línea roja: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en ausencia de arsénico. Línea verde: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(III) 0.5 mM. Línea azul: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(V) 0.5 mM.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos del modelo de Gompertz de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C por OD_{430 nm}.

Parámetros	Sin As	As(III)	As(V)
k (OD ₄₃₀ ·h ⁻¹)	0.138 ± 0.129	0.192 ± 0.226	0.152 ± 0.139
Y ₀ (OD ₄₃₀)	~ 4.930e-32	~ 4.930e-32	~ 4.930e-32
Y _M (OD ₄₃₀)	2.009 ± 0.278	1.928 ± 0.194	1.873 ± 0.247
R ²	0.9784	0.9761	0.9552
Valor p		0.9827	

k: velocidad de crecimiento bacteriano; Y₀: biomasa inicial; Y_M: biomasa máxima; R²: coeficiente de determinación.

En la Figura 11 se observa la cinética de crecimiento obtenida a pH 2.0 a 28°C, en donde *A. ferrooxidans* ATCC 53993 presenta un comportamiento similar frente a los tres tratamientos, iniciando la fase exponencial a las 24 h, para luego a las 60 h llegar a la fase estacionaria para luego inmediatamente entrar a la fase de muerte hasta las 120 h.

Luego de obtener las velocidades de crecimientos frente a los diferentes valores de pH y temperatura obtenidos mediante los análisis espectrofotométricos, se pudo observar que no existen diferencias significativas entre ellas (Tabla 4), por lo que se seleccionaron como parámetros de trabajo en este estudio pH 1.8 y temperatura de 28°C. En base a esto, se realizó una nueva curva de crecimiento utilizando estos parámetros obteniendo una curva de crecimiento mediante el recuento por cámara de Neubauer (Figura 21), para así tener una curva de estandarización entre absorbancia a 430 nm y densidad celular ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 11). Se puede observar que las curvas obtenidas mediante densidad óptica mantienen el comportamiento observado previamente, de una fase exponencial hasta las 48 h, para luego presentar un decrecimiento hasta las 120 h, en la fase de muerte. Por otra parte, en las curvas obtenidas mediante recuento de la densidad celular, se observa un desplazamiento en el comienzo de la fase exponencial, la cual inicia a 48 h. La fase estacionaria se observa a las 72 h y se mantiene hasta las 120 h, llegando a una densidad celular máxima de alrededor de $1.5 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$.

Tabla 4. Velocidades de crecimiento (k) obtenidas con el modelo de Gompertz de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a los diferentes pH y temperaturas

Temperatura	pH	S/As	As(III)	As(V)
28°C	1.8	0.135	0.203	0.163
	2.0	0.177	0.123	0.128
	2.5	0.167	0.197	0.170
30°C	1.8	0.105	0.139	0.111
	2.0	0.141	0.125	0.136
	2.5	0.161	0.174	0.145

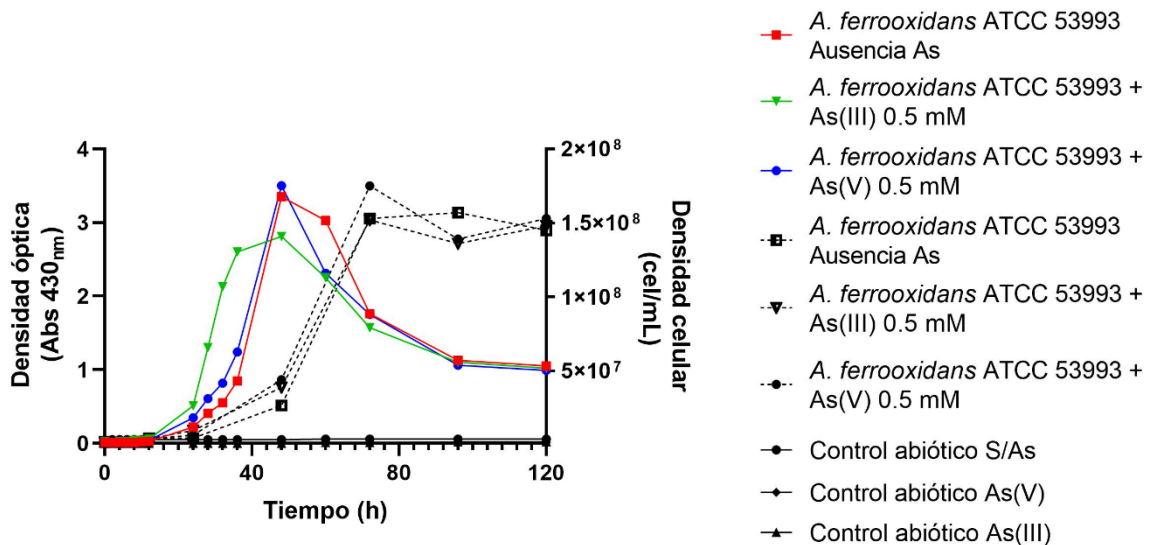


Figura 11. Curva de estandarización de densidad óptica (Abs) y densidad celular ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C. Densidad óptica, línea roja: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sin arsénico. Línea verde: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(III) 0.5 mM. Línea azul: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(V) 0.5 mM. Densidad celular, (- -■- -): *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sin arsénico. (- -▼- -): *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(III) 0.5 mM. (- -●- -): *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(V) 0.5 mM. En negro: controles abióticos sin arsénico (- -●- -) y suplementados con As(III) (- -▲- -) y As(V) (- -◆- -).

En la Figura 12, se observa la cinética de crecimiento obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento de densidad celular, analizada con el modelo de Gompertz, con el cual se obtuvieron los parámetros cinéticos (Tabla 5). Los resultados indican que *A. ferrooxidans* ATCC 53993 no ve afectado su crecimiento celular en presencia o ausencia de As(III) y As(V) a estos valores de pH y temperatura. Los coeficientes de determinación obtenidos muestran un buen ajuste del modelo matemático a los datos, mientras que la prueba de Tukey de comparación múltiple indicó que no existe diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$)

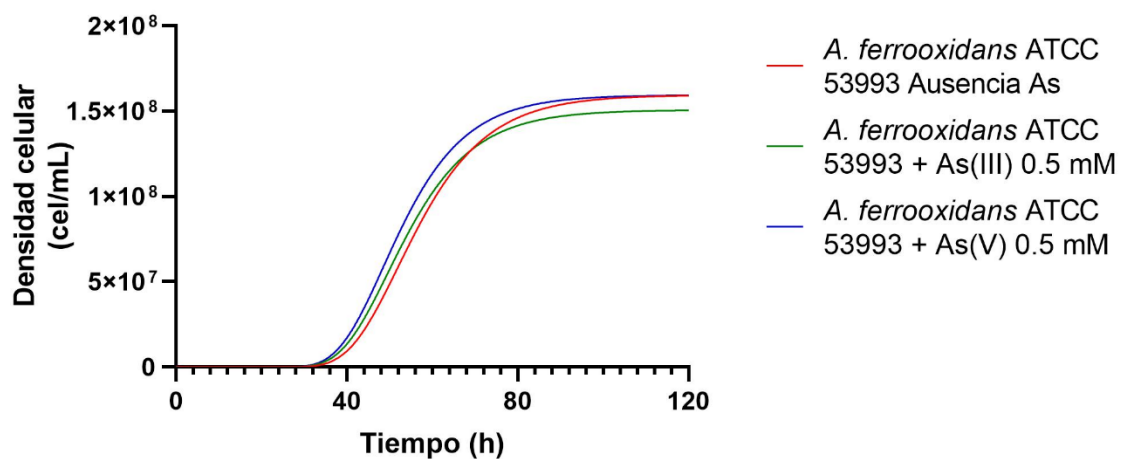


Figura 12. Cinética de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a pH 1.8 y 28°C ajustada bajo el modelo de Gompertz. Línea roja: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sin arsénico. Línea verde: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(III) 0.5 mM. Línea azul: *A. ferrooxidans* ATCC 53993 suplementado con As(V) 0.5 mM.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos del modelo de Gompertz de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 a pH 2.5 y 28°C por OD_{430 nm}.

Parámetros	Sin As	As(III)	As(V)
k (cel·h ⁻¹)	0.087 ± 0.032	0.091 ± 0.043	0.094 ± 0.069
Y0 (cel)	~ 4.930e-32	~ 8.043e-33	~ 6.273e-34
YM (cel)	1.57x10 ⁸ ± 8.3 x10 ⁶	1.52 x10 ⁸ ± 8.1 x10 ⁶	1.75x10 ⁸ ± 1.1 x10 ⁷
R ²	0.9784	0.9761	0.9552
Valor p		0.9827	

Cada resultado es presentado con sus respectivas desviaciones estándar (SD). k: velocidad de crecimiento bacteriano; Y0: biomasa inicial; YM: biomasa máxima; R²: coeficiente de determinación.

Evaluación de formación de biopelículas sobre soportes inorgánicos

Con la finalidad de evaluar la formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre soportes inorgánicos como la pirita y el azufre elemental, se realizaron análisis de formación de éstas, mediante microscopia de epifluorescencia con la tinción lipofílica FMTM4-64 y microscopia electrónica de barrido (SEM). En el primer caso, los minerales fueron incubados con las células durante 1 h para su posterior tinción. En el segundo, el periodo de incubación fue de 3 días.

En la Figura 13 se observa una fotografía de la tinción fluorescente de las biopelículas formadas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 con el colorante lipofílico FMTM4-64 sobre la superficie de fragmentos de pirita. Se observa la morfología

bacilar de alrededor de 1 μm de largo, formando cúmulos o agregaciones de células de forma no homogénea sobre el mineral.

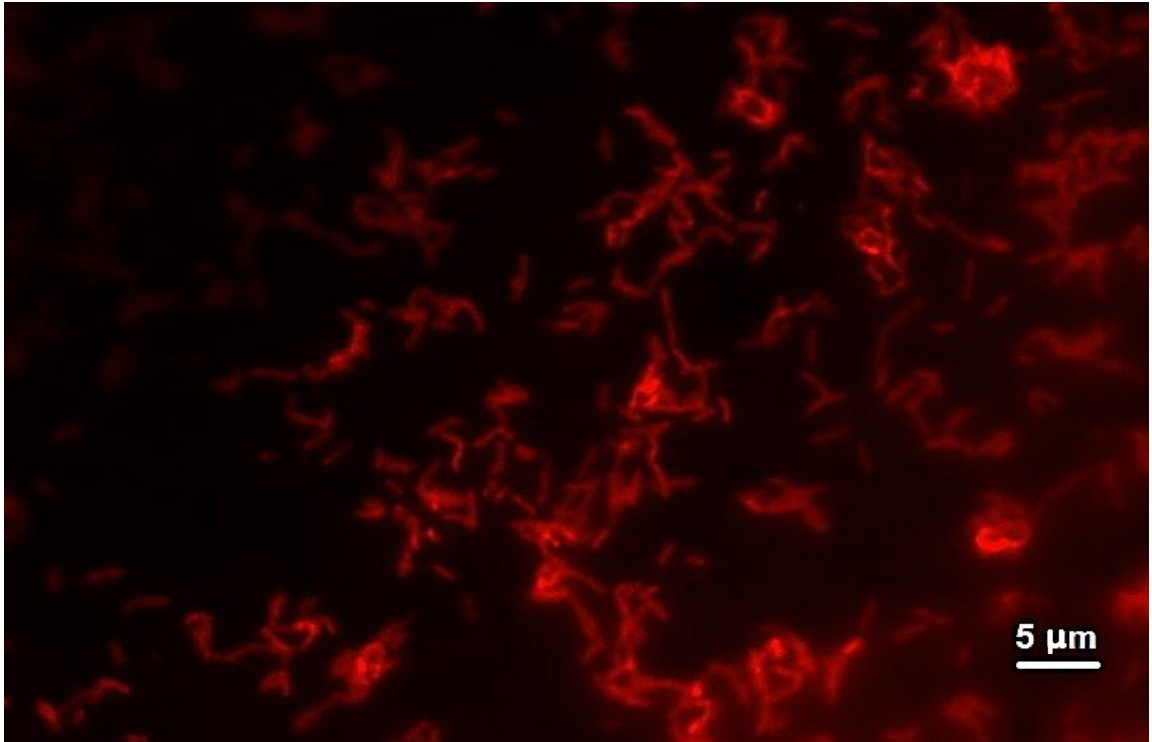


Figura 13. Biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre pirita durante 1 h a 28°C, teñidas con FMTM4-64 observadas mediante microscopia de epifluorescencia.

Luego, en la Figura 14 se observa una micrografía electrónica de barrido de un fragmento de pirita que presenta biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 distribuidas en su superficie. Se observa que las biopelículas son, en general, monocapas de células bacilares. Además, al tener un mayor acercamiento a las biopelículas, se puede apreciar la presencia de estructuras redondeadas nanométricas similares a vesículas de membrana (MVs), que se encuentran

tanto en la superficie de las células como del mineral, las cuales están aglomeradas formando una estructura de conexión entre dos células (Figura 15).

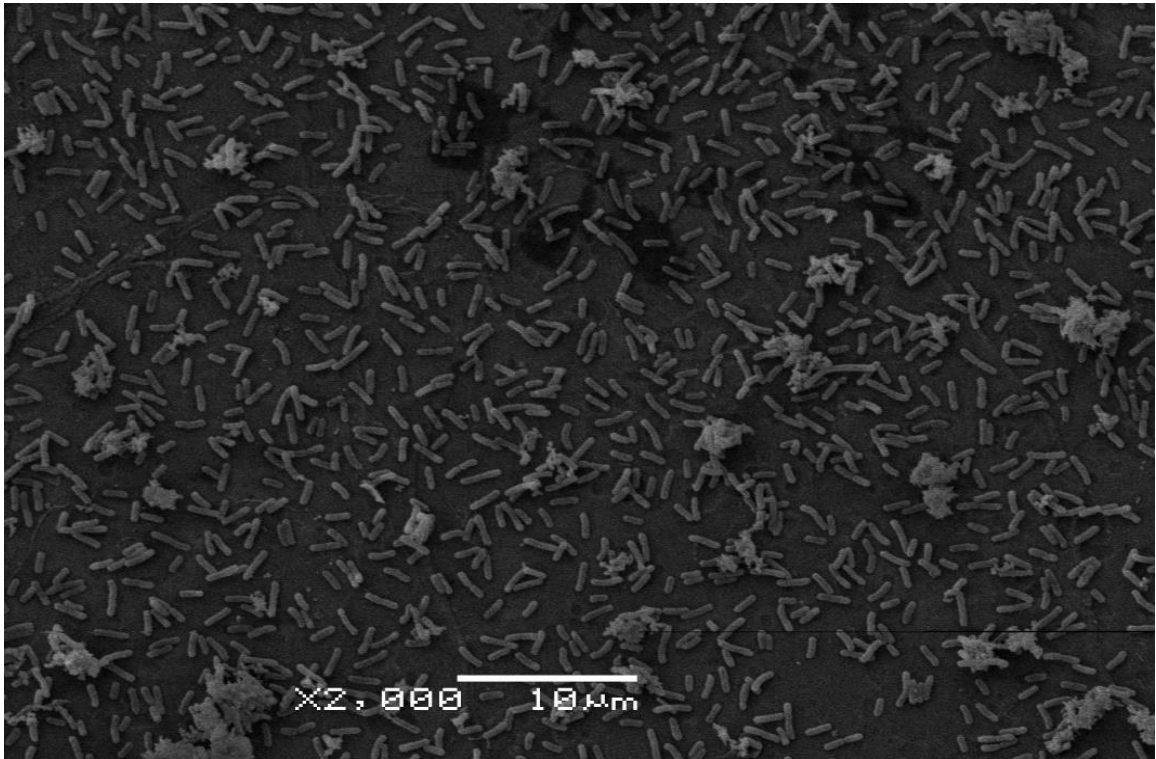


Figura 14. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 durante 1 h a 28°C sobre pirita.

Por otra parte, en la Figura 16 se observa una fotografía de la tinción fluorescente de las biopelículas formadas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 con FMTM4-64 sobre la superficie de los cupones de azufre. Se observa, de igual manera que en el caso anterior, la morfología bacilar de alrededor de 1 a 2 µm de largo, formando cúmulos o agregaciones de células de forma no homogénea

sobre el mineral. Luego, en la Figura 17 se observa una micrografía electrónica de barrido de un cupón de azufre que presenta biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 distribuidas en su superficie. Las biopelículas observadas son, en general, mono capas de células las cuales presentan filamentos similares a “nanotubos”, conectando a las células entre sí. Se observa una mayor agrupación de las células en este caso con respecto a las biopelículas sobre pirita.

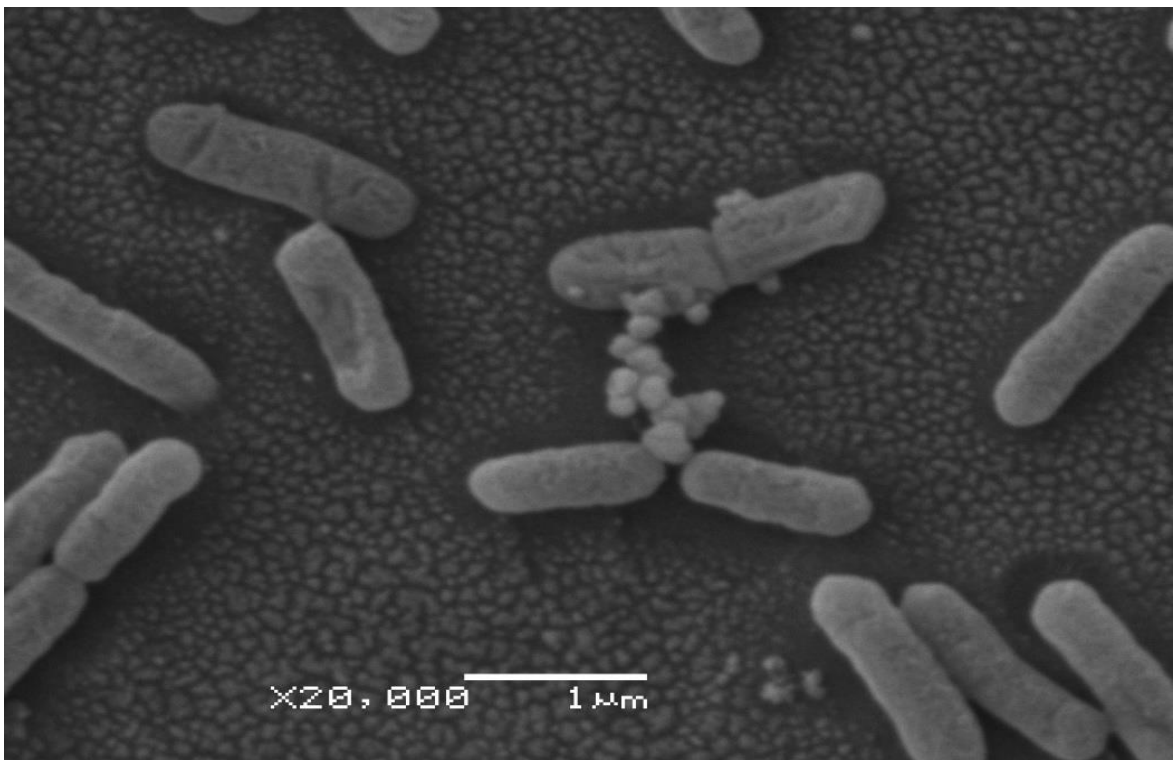


Figura 15. Micrografía electrónica de barrido de estructuras redondeadas presentes en biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre pirita.

Con un mayor acercamiento a las biopelículas (Figura 18), se puede apreciar la presencia de estructuras redondeadas nanométricas que se encuentran en la superficie de las células, al igual que en el caso de las biopelículas sobre pirita, correspondiendo posiblemente a MVs. Junto a éstas, se observan los filamentos, en forma de “cables” o “nanotubos”, los cuales conforman una red que interconecta diferentes células adheridas al mineral. Tanto las estructuras redondeadas (MVs) como las proyecciones tubulares, son las únicas estructuras observables de la matriz extracelular de las biopelículas.

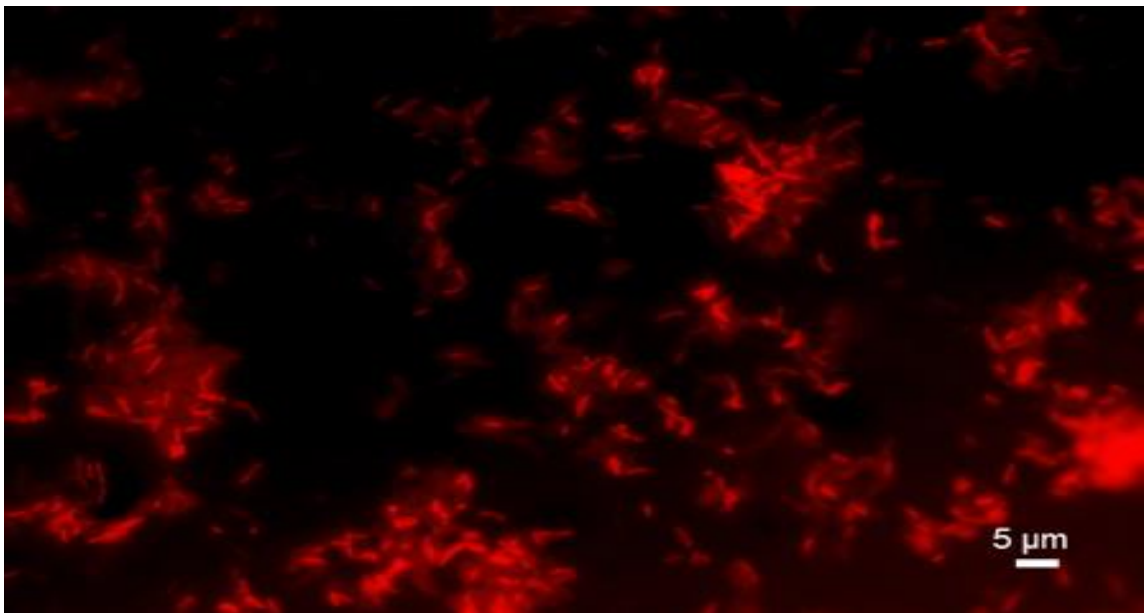


Figura 16. Biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre cupón de azufre elemental durante 1 h a 28°C, teñidas con FMTM4-64 observadas mediante microscopia de epifluorescencia.

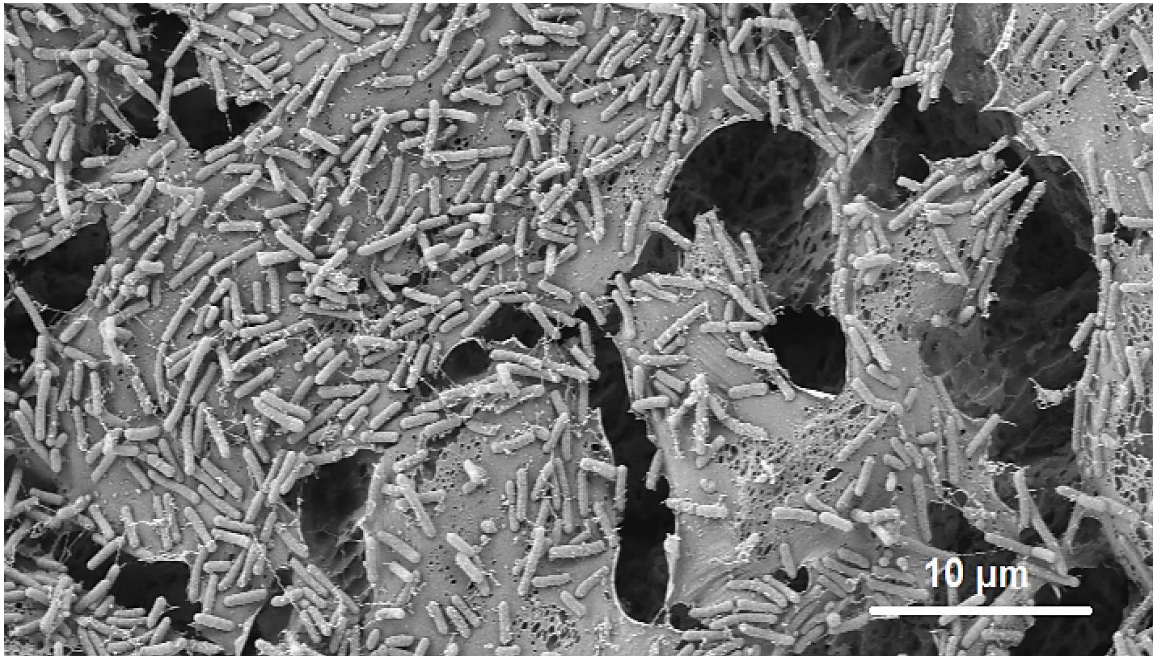


Figura 17. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 durante 1 h a 28°C sobre cupón de azufre.

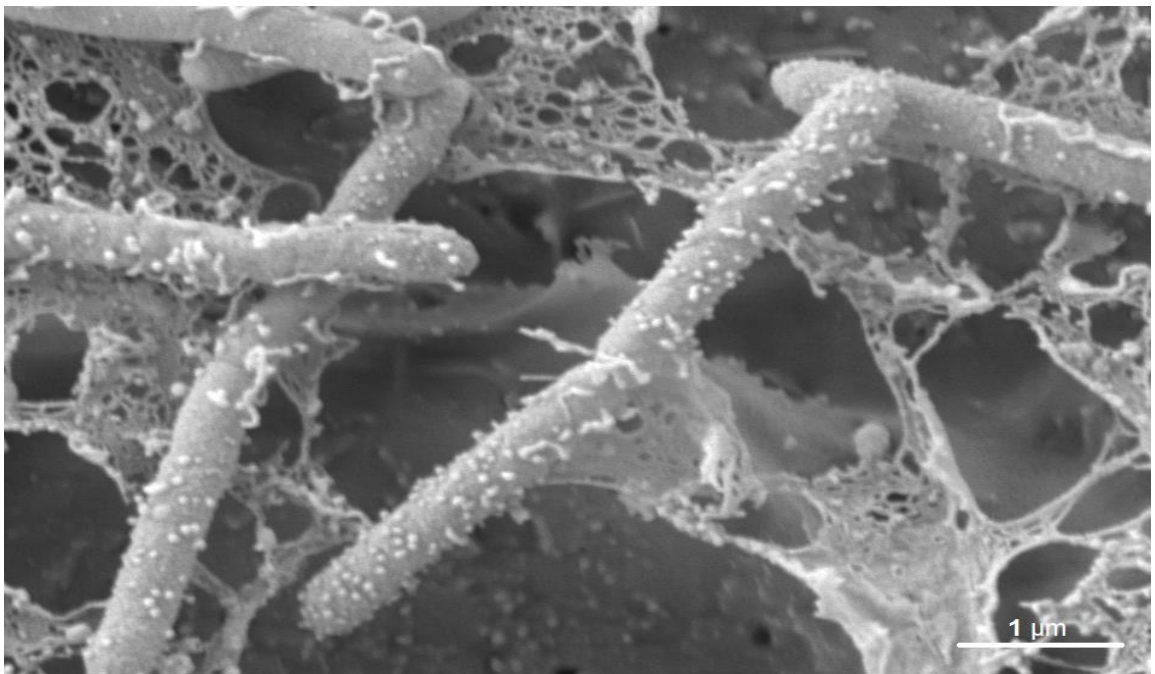


Figura 18. Micrografía electrónica de barrido de estructuras redondeadas y proyecciones tubulares presentes en biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre cupón de azufre.

Posteriormente, se realizaron ensayos de formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico inerte, el cual corresponde a una *bioball*, un soporte esférico de polipropileno. La formación de biopelículas se evaluó de forma indirecta, desprendiendo las células que se adhirieron a la superficie del soporte, para realizar un recuento de éstas mediante cámara de Neubauer y tinción de epifluorescencia. Además de esto, se visualizaron trozos del soporte mediante SEM, para analizar la morfología de la biopelícula en el tiempo.

En la figura 19 se presenta un gráfico de la densidad celular ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 durante 168 h en presencia y ausencia de As(III) y As(V) 0.5 mM analizado mediante recuento con tinción de naranja de acridina. En general, se observa un aumento de la concentración celular hasta el último día de muestreo, el cual no se ve afectado en ningún tratamiento de As. En específico, en presencia de As(V) 0.5 mM el crecimiento demuestra un leve aumento con respecto a los otros dos tratamientos.

Por otra parte, para complementar la medición anterior, se realizó el recuento mediante cámara de Neubauer, el cual se presenta en la Figura 20. En general se observa un aumento de la concentración celular en el tiempo, el cual no se ve afectado por los tratamientos con y sin As.

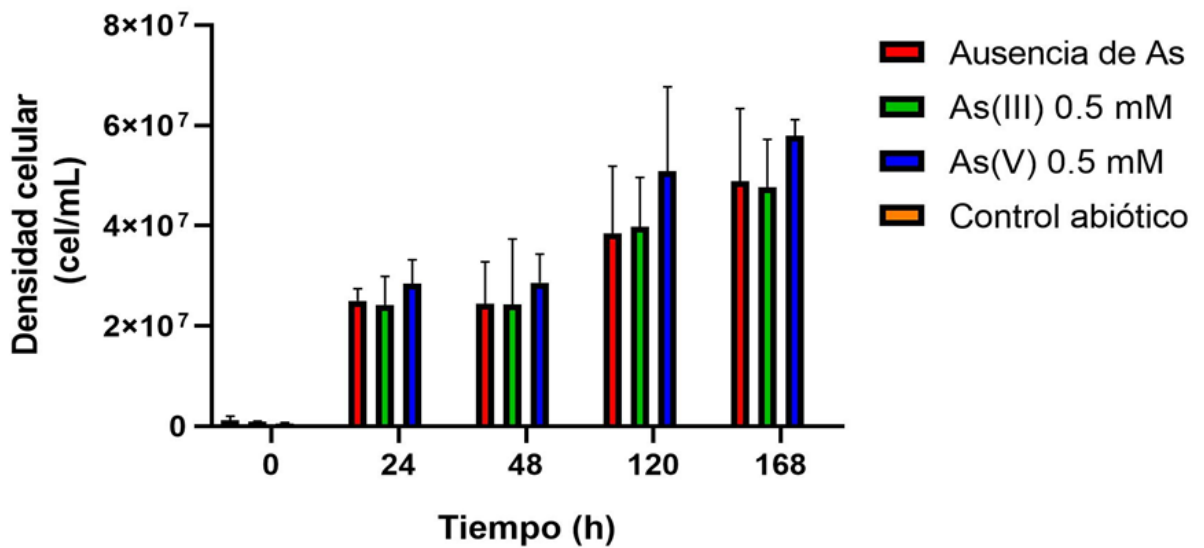


Figura 19. Concentración celular de biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre bioballs en presencia y ausencia de As(III) 0.5 mM y As(V) 0.5 mM obtenida mediante recuento por microscopía de epifluorescencia con naranja de acridina.

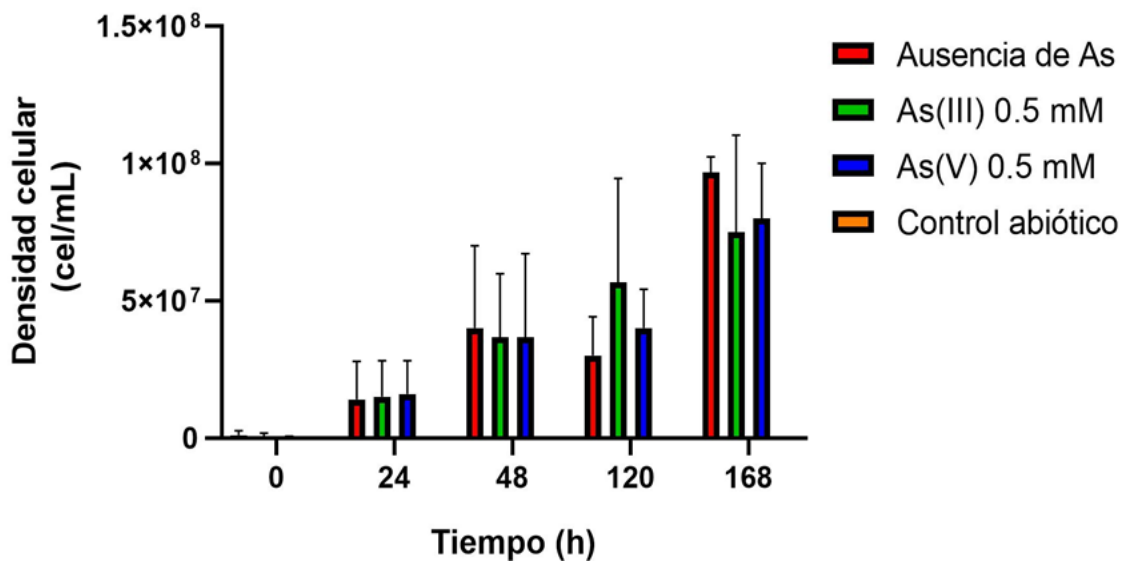


Figura 20. Concentración celular de biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre bioballs en presencia y ausencia de As(III) 0.5 mM y As(V) 0.5 mM obtenida mediante recuento en cámara de Neubauer.

En el análisis de morfología de biopelículas mediante SEM, se observó la presencia de minerales de óxidos de hierro que recubren la superficie del soporte orgánico inerte. Estos minerales muestran una morfología amorfa globular. Además, no se detectaron células bacterianas individuales sobre la superficie del soporte, posiblemente por encontrarse cubiertas por los minerales amorfos. Estas características se comparten en los tratamientos sin As (Figura 21), con As(III) (Figura 22) y con As(V) (Figura 23).

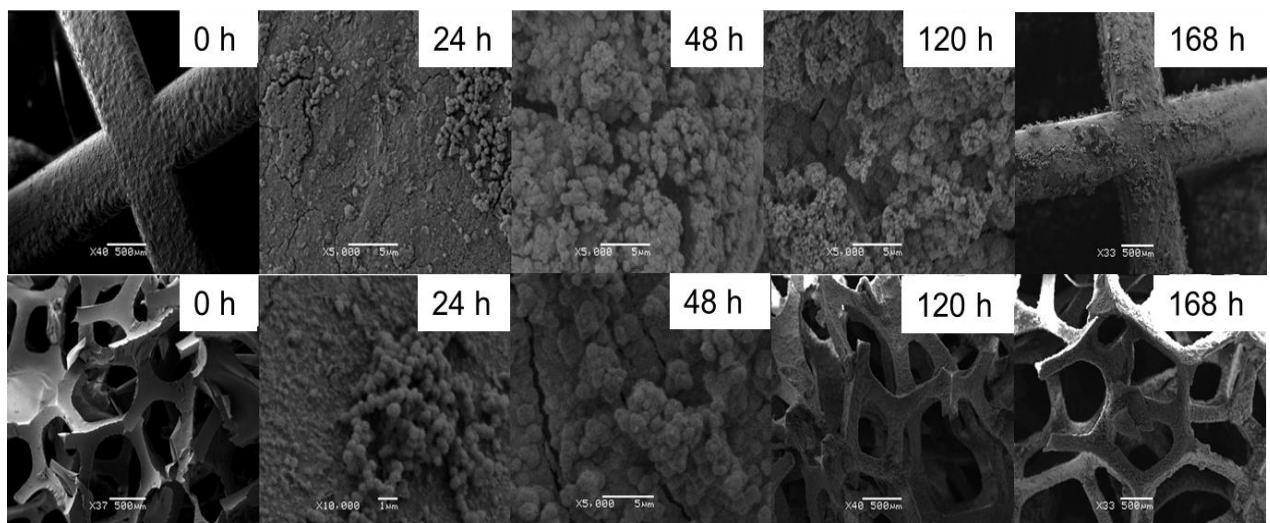


Figura 21. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre superficies de soportes de polipropileno mediante en ausencia de arsénico. En fila superior: esfera externa de polipropileno (*bioball*). En fila inferior: esponja interna de polipropileno.

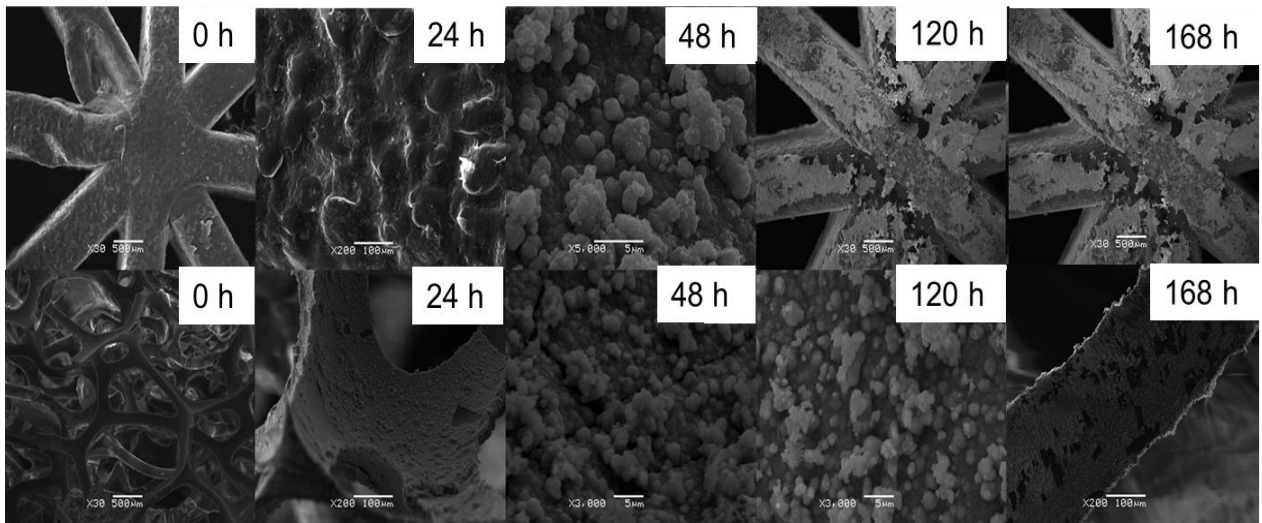


Figura 22. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre superficies de soportes de polipropileno mediante en presencia de As(III) 0.5 mM. En fila superior: esfera externa de polipropileno (*bioball*). En fila inferior: esponja interna de polipropileno.

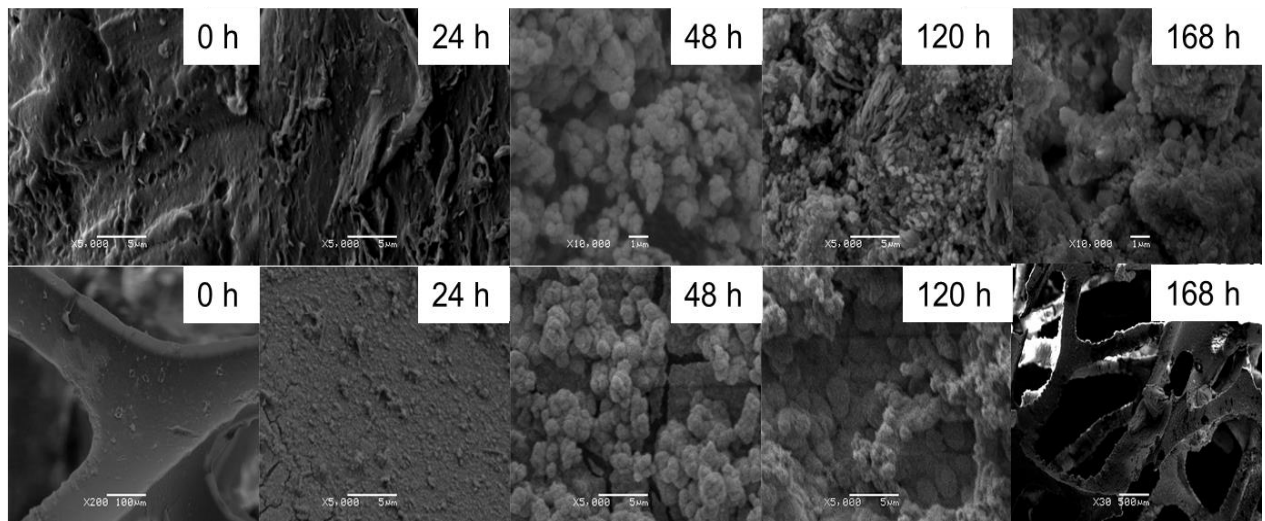


Figura 23. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas formadas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre superficies de soportes de polipropileno mediante en presencia de As(V) 0.5 mM. En fila superior: esfera externa de polipropileno (*bioball*). En fila inferior: esponja interna de polipropileno.

Caracterización y análisis proteómico de MVs producidas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre soportes inorgánicos

En base a la presencia de estas estructuras nanométricas en la superficie de las células de las biopelículas en ambos soportes minerales, se sugiere que pueden ser parte de la matriz extracelular (ECM) de las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Por lo que se realizó un protocolo para aislar y luego caracterizar estas estructuras mediante microscopia de epifluorescencia con la tinción lipofílica FMTM4-64, análisis de distribución de tamaño (Nanotracking), microscopia electrónica de barrido (TEM) y análisis del cargo proteico que poseen para poder analizar su función dentro del contexto de la biopelícula. Cabe destacar que las MVs obtenidas utilizando hierro presentaban precipitados minerales difíciles de separar de la muestra, lo que interfirió en el desarrollo de los análisis.

En la Figura 24, se presenta un gráfico de la distribución en tamaño de la población de MVs obtenidas incubando la cepa bacteriana en presencia de hierro. El análisis de Nanotracking indica que estas estructuras presentan un tamaño variable entre los 50 nm hasta los 400 nm, obteniendo 5 grupos de tamaños diferentes. Luego, en la Figura 25 se presenta una observación por medio de microscopia de epifluorescencia de MVs, teñidas con la tinción lipofílica FMTM4-64, adheridas a la superficie de un trozo de pirita. Se puede apreciar estructuras redondeadas nanométricas distribuidas por sobre el mineral y, además, algunas de estas se acumulan y forman estructuras más

grandes. Además, para tener otra vista y poder analizar la ultraestructura de las MVs, se realizó TEM. En la figura 26 se observa una micrografía electrónica de transmisión de las MVs, donde se observan de diferentes tamaños, las cuales poseen sólo una membrana y en algunos casos se encuentran fusionadas entre sí.

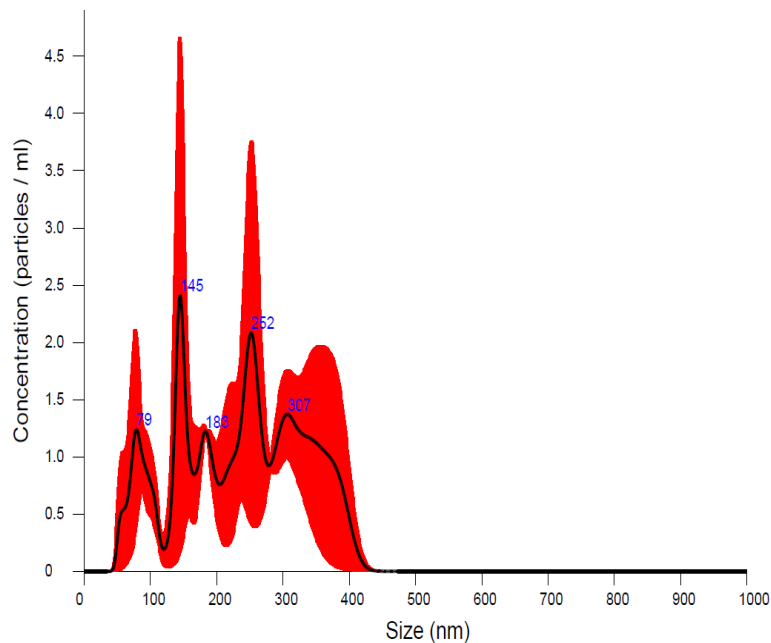


Figura 24. Distribución en tamaño de la población total de vesículas de membrana (MVs) desde cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 utilizando hierro como fuente de energía.

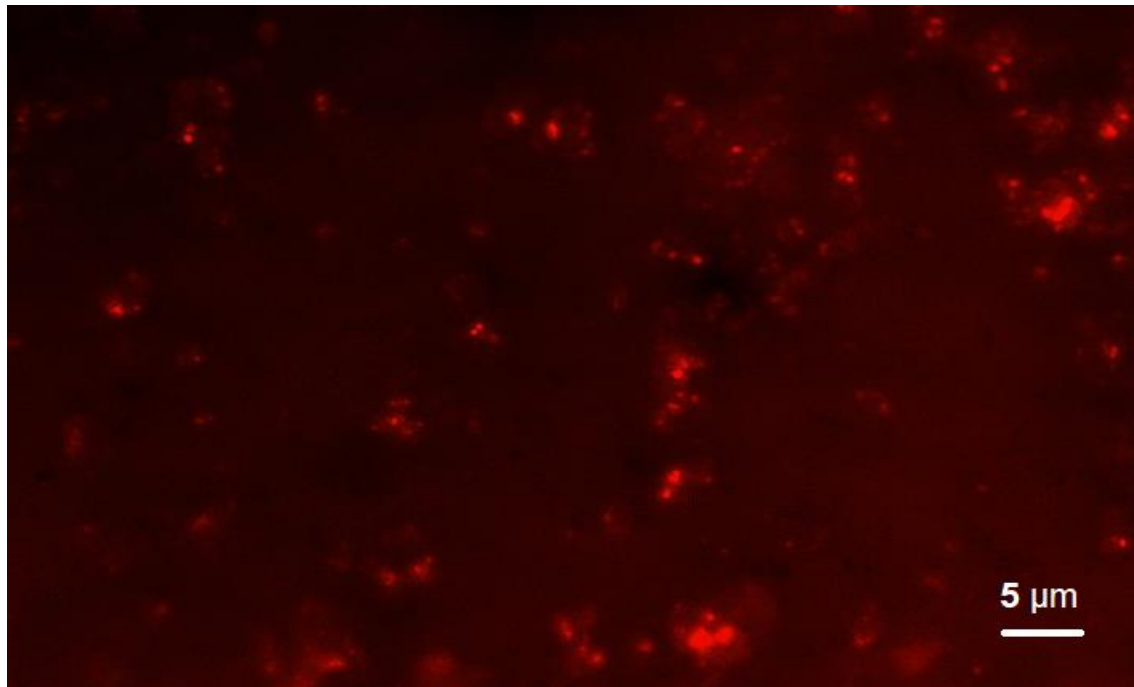


Figura 25. Estructuras redondeadas nanométricas presentes en las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre pirita observadas con aumento 100X.

Para el caso de las MVs obtenidas a partir del cultivo en presencia de azufre elemental, se obtuvieron los análisis de distribución de tamaño presentados en la Figura 27. En este caso, las MVs presentan tamaños que van desde los 67 nm hasta los 365 nm, con un grupo de tamaño predominante a los 128 nm. Además de esto, en la Figura 28, se observan teñidas con el colorante lipofílico, FMTM4-64, el mismo tipo de estructuras redondeadas nanométricas distribuidas sobre la superficie del cupón de azufre. Luego, en la Figura 29 se presenta una micrografía electrónica de transmisión de MVs, donde se observan de diferentes tamaños, las cuales poseen una o dos membranas y en algunos

casos se encuentran fusionadas entre sí. Además de esto, se aprecian los filamentos con forma de nanotubos, los cuales se encuentran individuales o asociados a las MVs, como proyecciones de éstas.

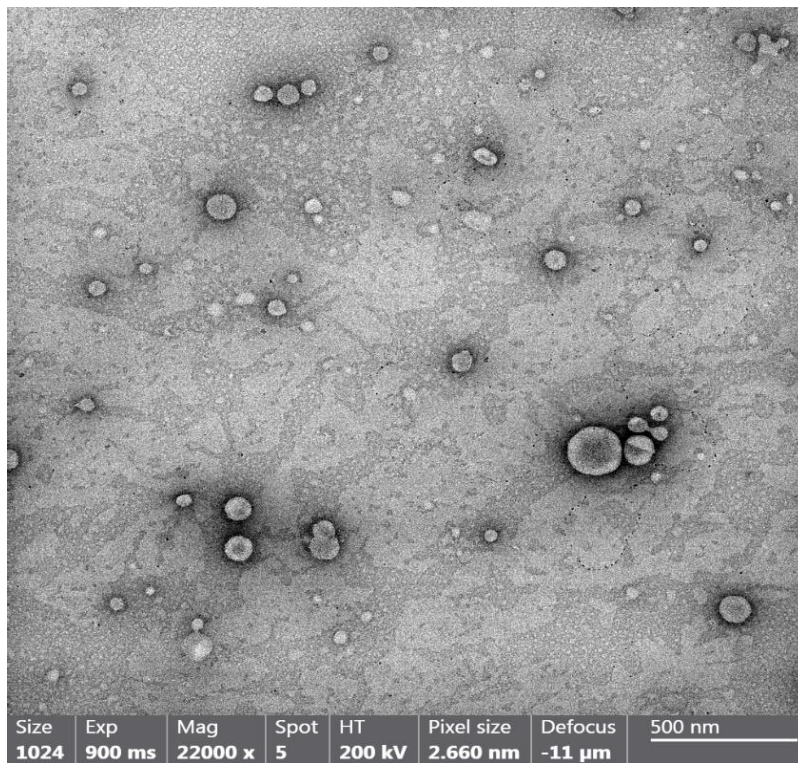


Figura 26. Micrografía electrónica de transmisión de MVs desde cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 utilizando hierro como fuente de energía.

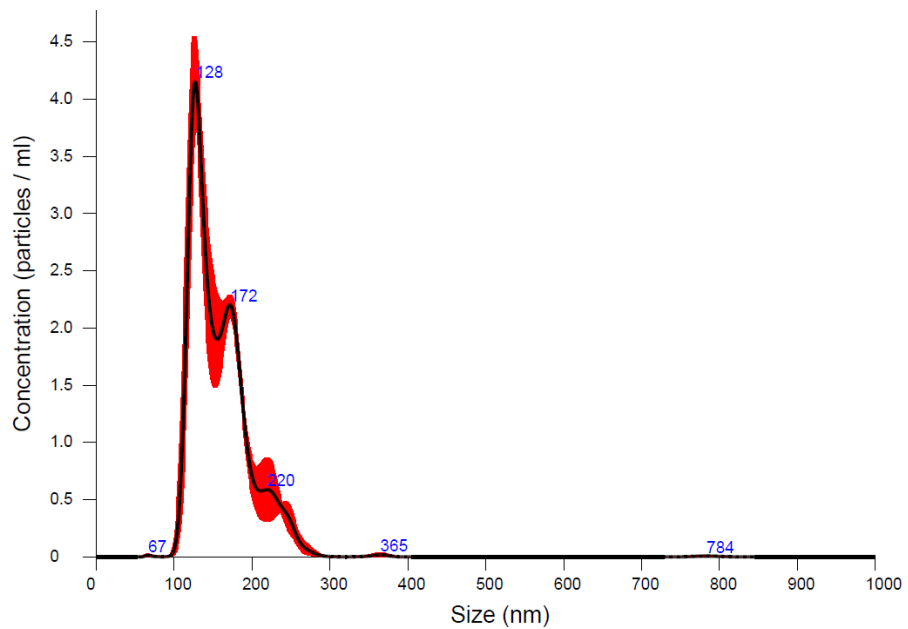


Figura 27. Distribución en tamaño de la población total de muestras de MVs desde cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 utilizando azufre elemental como fuente de energía.

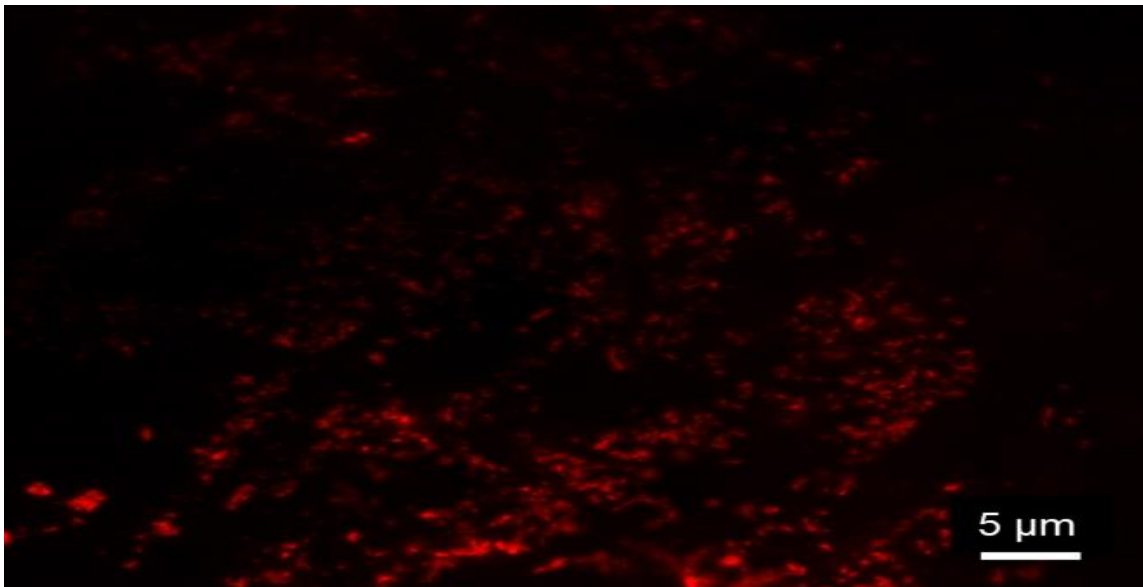


Figura 28. Estructuras redondeadas nanométricas presentes en las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre cupones de azufre elemental observadas con aumento 100X.

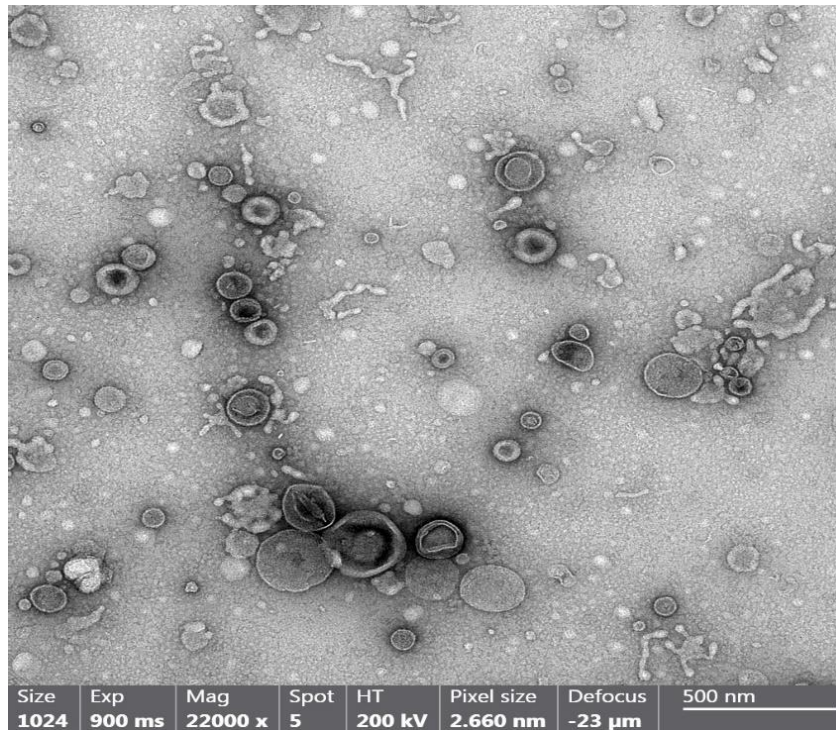


Figura 29. Micrografía electrónica de transmisión de MVs desde cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 utilizando azufre elemental como fuente de energía.

Posteriormente, para analizar las posibles funciones de las MVs, se realizó un análisis proteómico de éstas. Sin embargo, debido a la interferencia que otorgan los precipitados minerales de óxidos de hierro presentes en las muestras, sólo fue posible ejecutar el análisis de la carga proteica de las MVs que provenían del cultivo con azufre elemental, lo cual fue realizado mediante LC-MS/MS. Los resultados de proteínas diferencialmente expresadas en las fracciones celulares y de MVs indican la presencia de 1700 proteínas en la fracción celular, 407 en la fracción de MVs, compartiendo 380 proteínas y dentro de este grupo existen 27 proteínas que están presentes solo en las MVs

(Figura 30A). Por otra parte, de las 380 proteínas compartidas, existe una sobreexpresión diferenciada entre MVs (rojo) y en células (azul), la cual se observa en la Figura 30B.

Dentro de las 27 proteínas diferencialmente expresadas en la fracción de MVs, destacan proteínas tipos adhesinas como componentes del Pili tipo IV (PilP, TadD, PilQ), proteínas de oxidación de sustratos y componentes de la cadena transportadora de electrones (Citocromo C, Rusticianina, Tetrationato hidrolasa), junto también con proteínas de membrana externa (OmpA, OmpL, OprD).

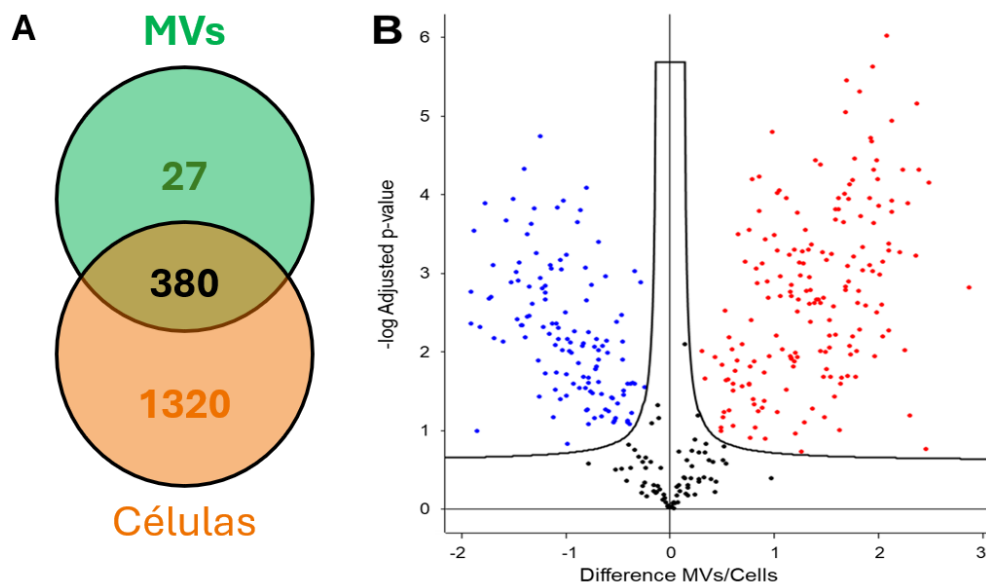


Figura 30. Análisis de Proteínas Diferencialmente Expresadas (DEPs) en fracciones celulares y de MVs de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en presencia de azufre elemental. (A) Se detectaron 1700 proteínas en la fracción celular, 407 en la fracción de MV, compartiendo 380 proteínas. (B) Gráfico de volcán que muestra proteínas sobreexpresadas en MVs (rojo) y en células (azul).

Evaluación de la biooxidación de hierro por MVs producidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993

En base al resultado de la proteómica de las MVs de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 que determinó la presencia de proteínas involucradas en la oxidación de hierro como Rusticianina y citocromos, se realizó un ensayo para analizar la capacidad de estas estructuras para oxidar el Fe(II) soluble en el medio de cultivo BART modificado, de manera independiente y en conjunto con células de esta cepa bacteriana mediante espectrofotometría a 430 nm. Los resultados se presentan en la Figura 31, la cual sugiere que las MVs presentan actividad oxidativa de hierro, la cual es significativamente menor con respecto a las células de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, en los tratamientos con y sin As(III) y As(V) mM. Además de esto, la actividad oxidativa de las MVs es complementaria a las de las células en los tratamientos sin As y con As(V).

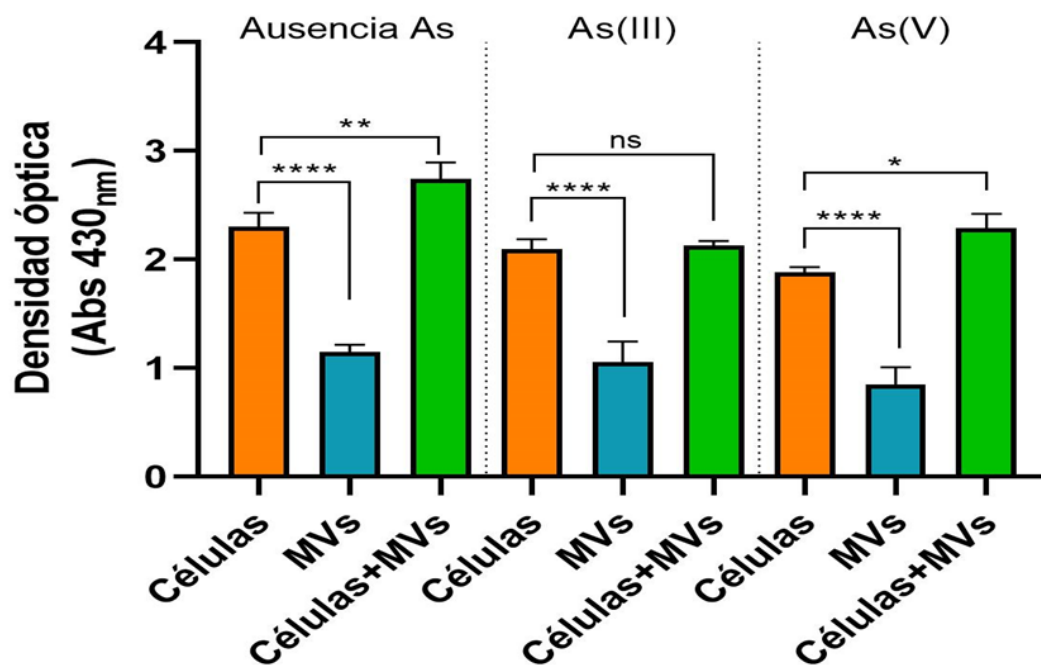


Figura 31. Ensayo de oxidación de Fe(II) de vesículas de membrana de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en presencia y ausencia de As(III) 0.5 y As(V) 0.5 mM.

Caracterización de óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico.

Se utilizó XDR para identificar las fases minerales presentes en los óxidos de hierro biomineralizados por las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre *bioballs* en presencia y ausencia de As. Este método permite conocer el grado de cristalinidad de la muestra al comparar con peaks característicos de diferentes minerales.

Los patrones de difracción obtenidos de las muestras minerales desde el cultivo de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART modificado sin As se observan

en la Figura 32. Las fases minerales presentes mostraron peaks 2θ de baja intensidad y gran amplitud a los 28.7° , 35° , 39.1° , 45.9° , 49.5° y 61.2° . Estos peaks coinciden con los peaks característicos de schwertmannita (azul) y jarosita (rojo).

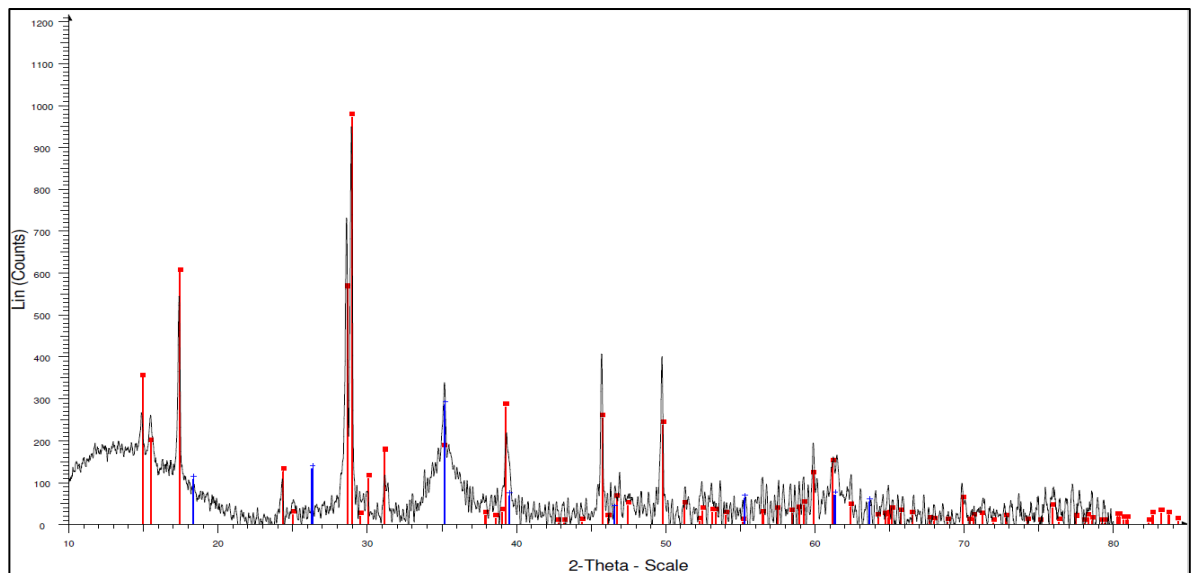


Figura 32. Patrones de difracción de rayos X de minerales producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART en ausencia de arsénico. En negro: patrones de la muestra mineral. En azul: patrones de schwertmannita. En rojo: patrones de jarosita.

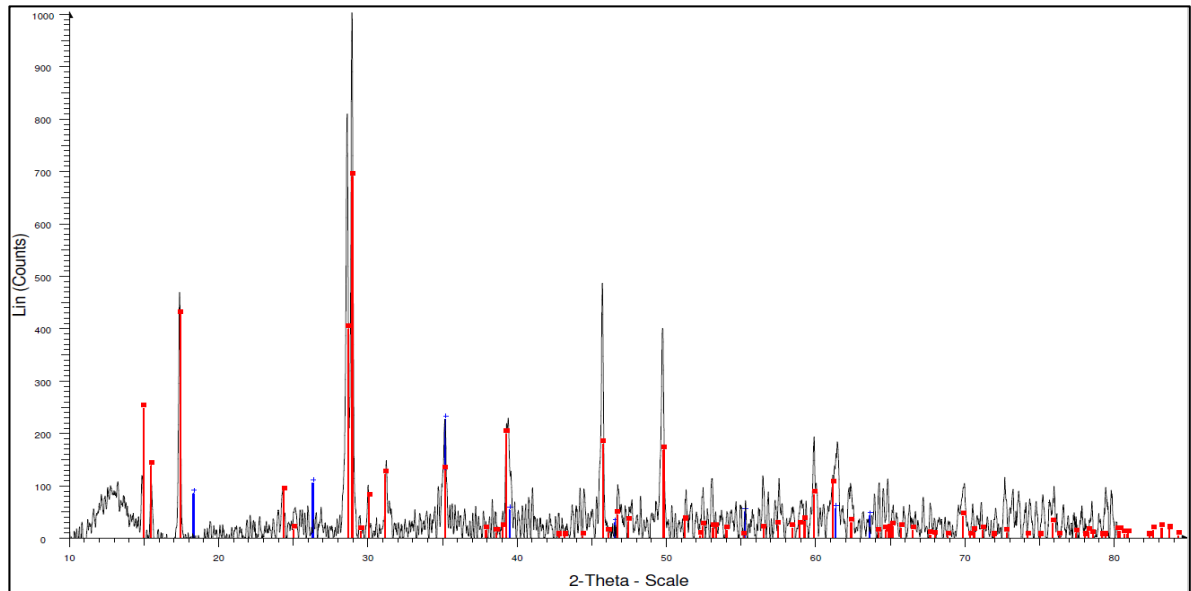


Figura 33. Patrones de difracción de rayos X de minerales producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(III) 0.5 mM. En negro: patrones de la muestra mineral. En azul: patrones de schwertmannita. En rojo: patrones de jarosita.

Los patrones de difracción obtenidos de las muestras minerales desde el cultivo de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM se observan en la Figura 34. Las fases minerales presentes mostraron peaks 2θ a los 28.7° , 31° , 35° , 39.1° , 45.9° , 49.5° y 61.2° . Estos peaks coinciden en mayor medida con los peaks característicos de jarosita (rojo) y en menor medida con los de schwertmannita (azul).

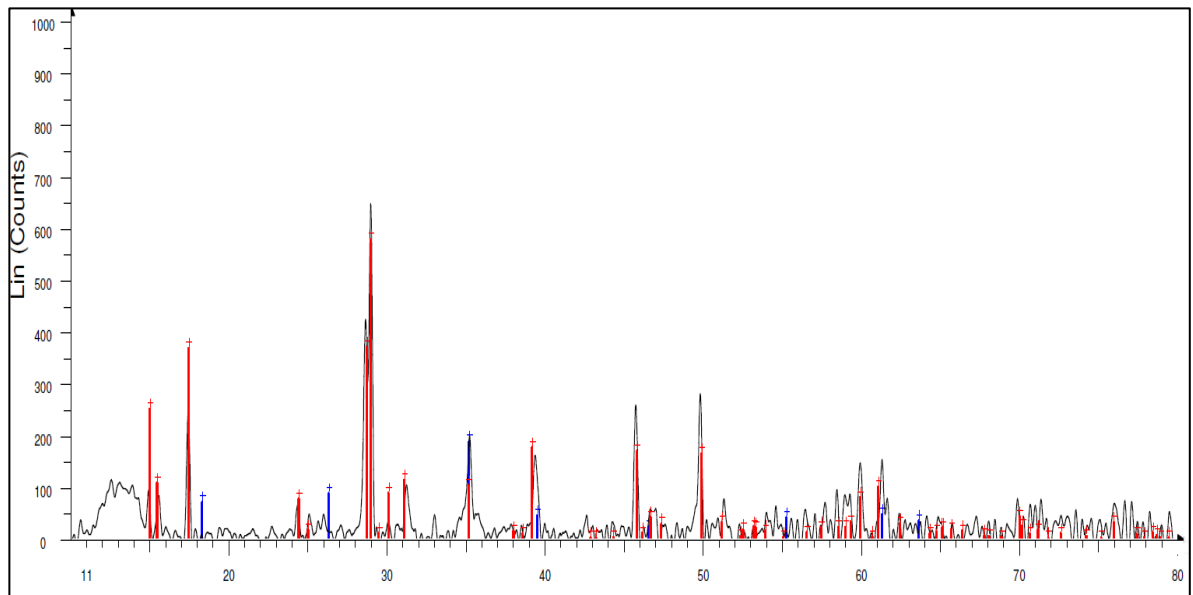


Figura 34. Patrones de difracción de rayos X de minerales producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM. En negro: patrones de la muestra mineral. En azul: patrones de schwertmannita. En rojo: patrones de jarosita.

Posteriormente, para complementar la identificación de las fases minerales presentes en las muestras, se realizó SEM-EDS tanto para poder visualizar la morfología como también conocer la composición atómica relativa de las fases minerales presentes. En la Figura 35, se observan dos tipos de minerales obtenidos utilizando el medio BART modificado sin As, con flechas amarillas están indicados partículas pequeñas y amorfas, similares a morfologías descritas para schwertmannita. Por otra parte, con flechas rojas se indica minerales más grandes que podrían corresponder a jarosita. Luego, en la Figura 36, el análisis EDS indica la presencia un alto porcentaje de Fe, O y S,

átomos principales en la composición de los óxidos de hierro, además de contar con K, el cual es uno de los átomos intercambiables en la composición de jarosita.

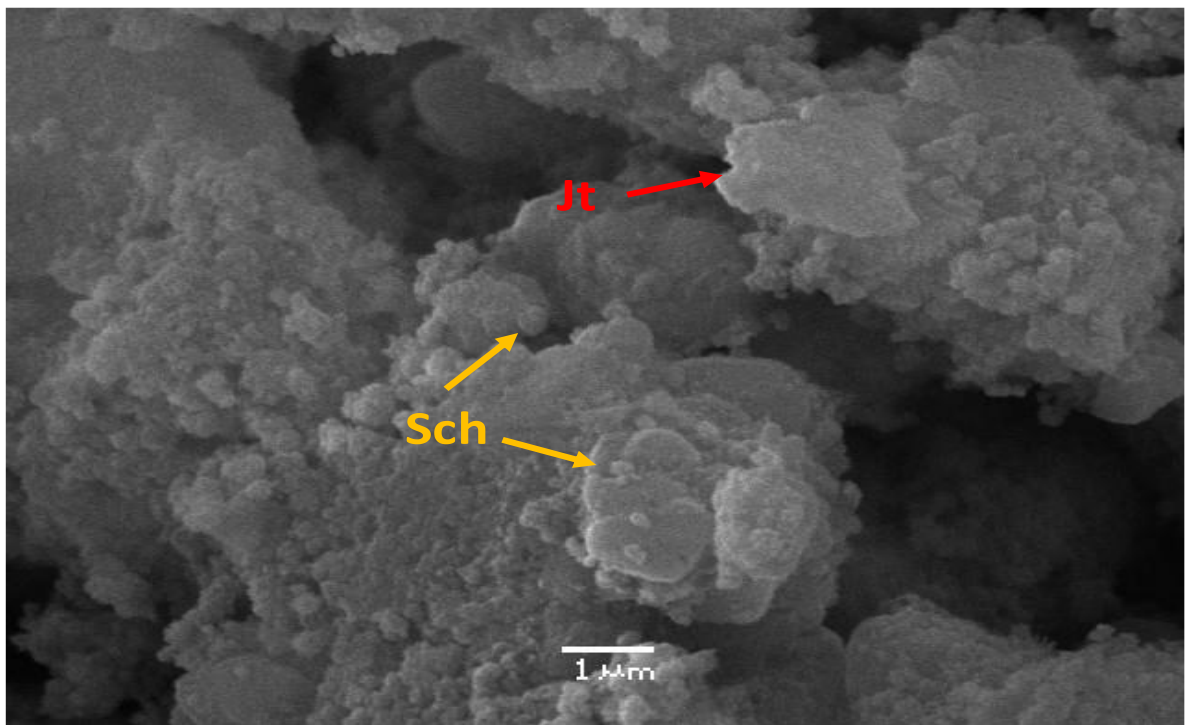


Figura 35. Micrografía electrónica de barrido de minerales de óxidos de hierro producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART en ausencia de As.

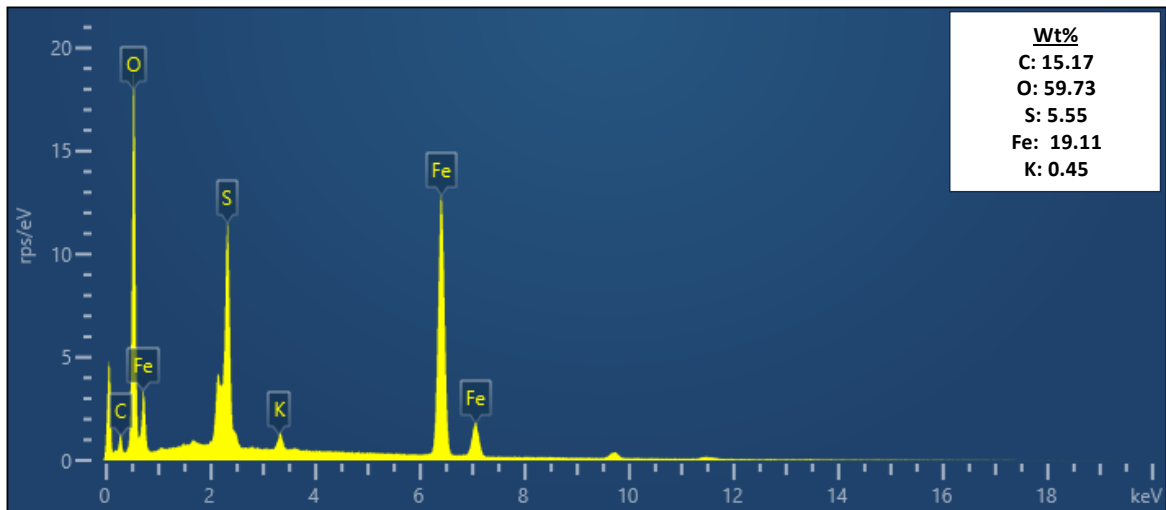


Figura 36. Gráfico espectroscopia de dispersión de energía (EDS) de óxidos de hierros biomineralizados por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART en ausencia de arsénico y el porcentaje en peso (%Wt) de la composición elemental.

En el caso de los minerales obtenidos a partir del medio BART modificado suplementado con As(III) mM, en la Figura 37, se observan claramente dos tipos de minerales, con flechas amarillas están indicados partículas con forma de erizo, porosas y con proyecciones en forma de aguja, similares a morfologías descritas para schwertmannita. Por otra parte, con flechas rojas se indica minerales más grandes, con superficies más lisas, que podrían corresponder a jarosita. Luego, en la Figura 38, el análisis EDS indica la presencia un alto porcentaje de Fe, O y S, átomos principales en la composición de los óxidos de hierro, además de contar con peaks de As, lo que sugiere que este metaloide fue incorporado a la estructura de los minerales de óxido de hierro.

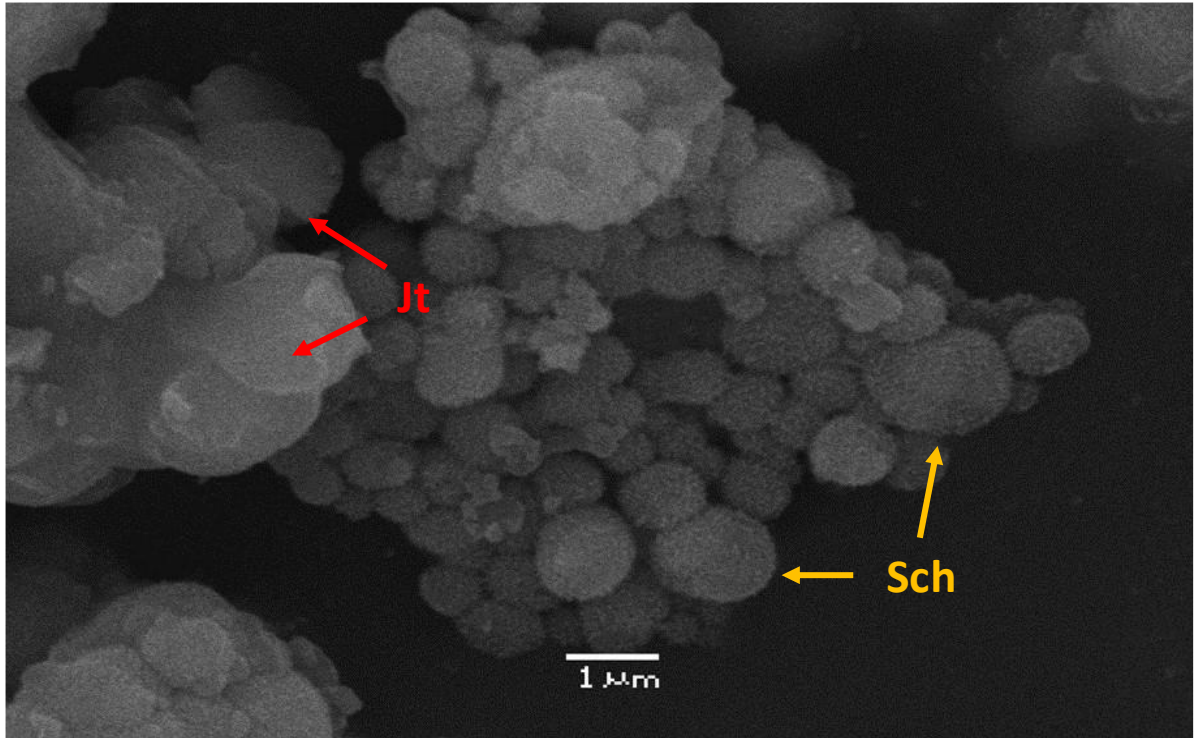


Figura 37. Micrografía electrónica de barrido de minerales de óxidos de hierro producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(III) 0.5 mM.

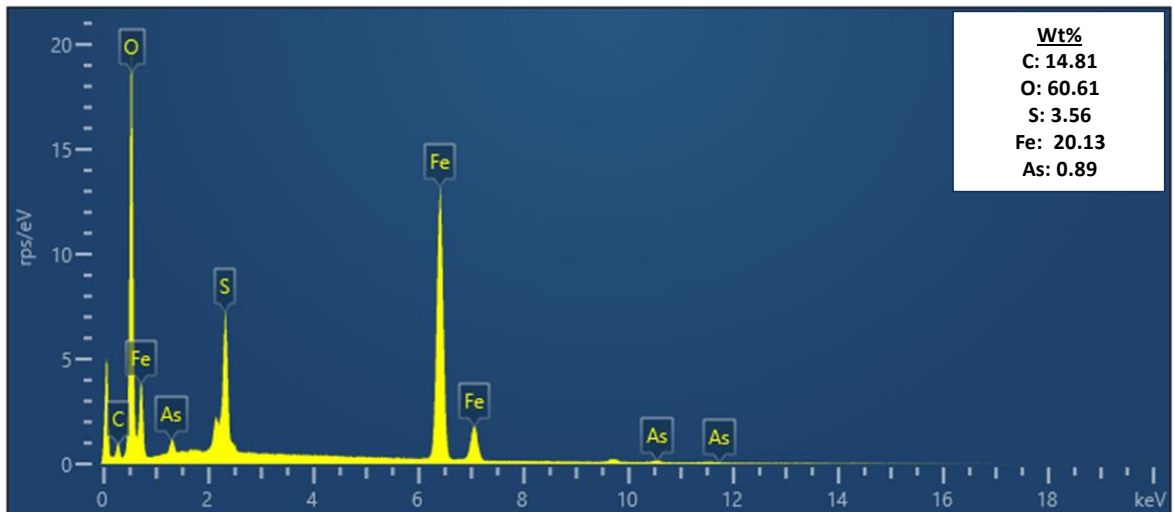


Figura 38. Gráfico EDS de óxidos de hierro biom mineralizados por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(III) 0.5 mM y el porcentaje en peso (%Wt) de la composición elemental.

En el caso de los minerales obtenidos a partir del medio BART modificado suplementado con As(V) mM, en la Figura 39, se observan dos tipos de minerales tal como en el caso anterior, con flechas amarillas están indicados partículas con forma de erizo, porosas y con proyecciones en forma de aguja, similares a morfologías descritas para schwertmannita. Por otra parte, con flechas rojas se indica minerales más grandes, con superficies más lisas, que podrían corresponder a jarosita. Luego, en la Figura 40, el análisis EDS indica la presencia un alto porcentaje de Fe, O y S, átomos principales en la composición de los óxidos de hierro, además de contar con peaks de As, lo que sugiere que este metaloide fue incorporado a la estructura de los minerales de óxido de hierro.

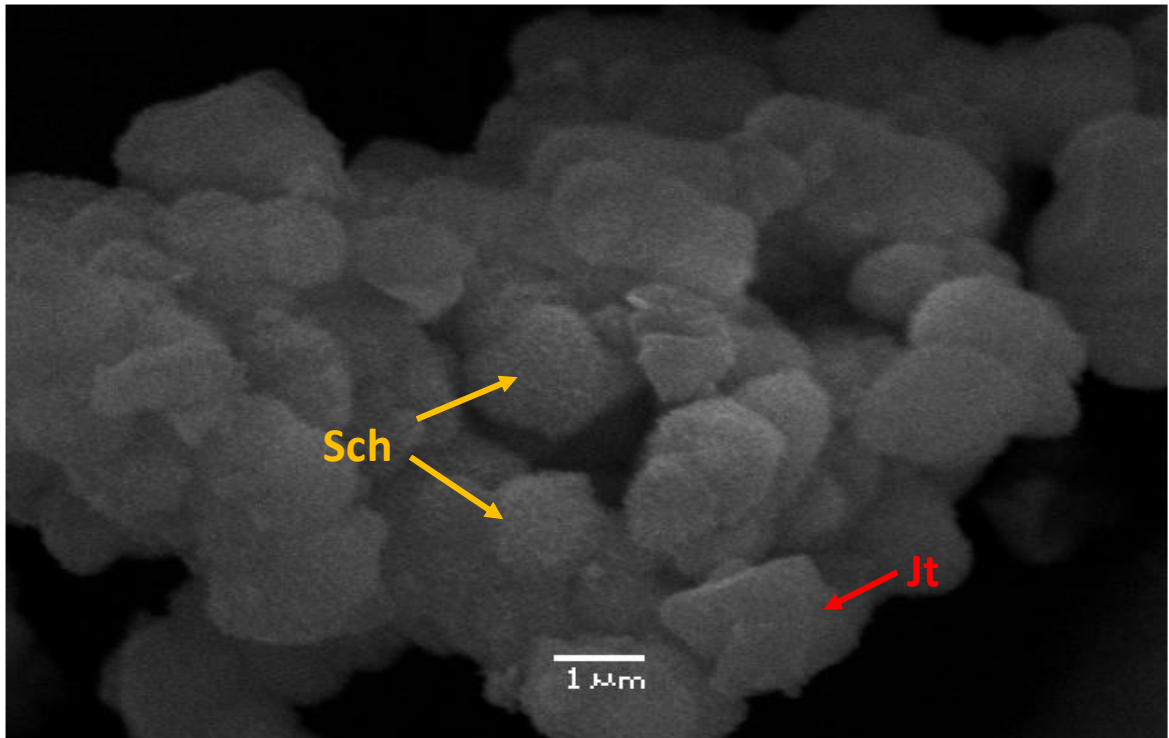


Figura 39. Micrografía electrónica de barrido de minerales de óxidos de hierro producidos por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM.

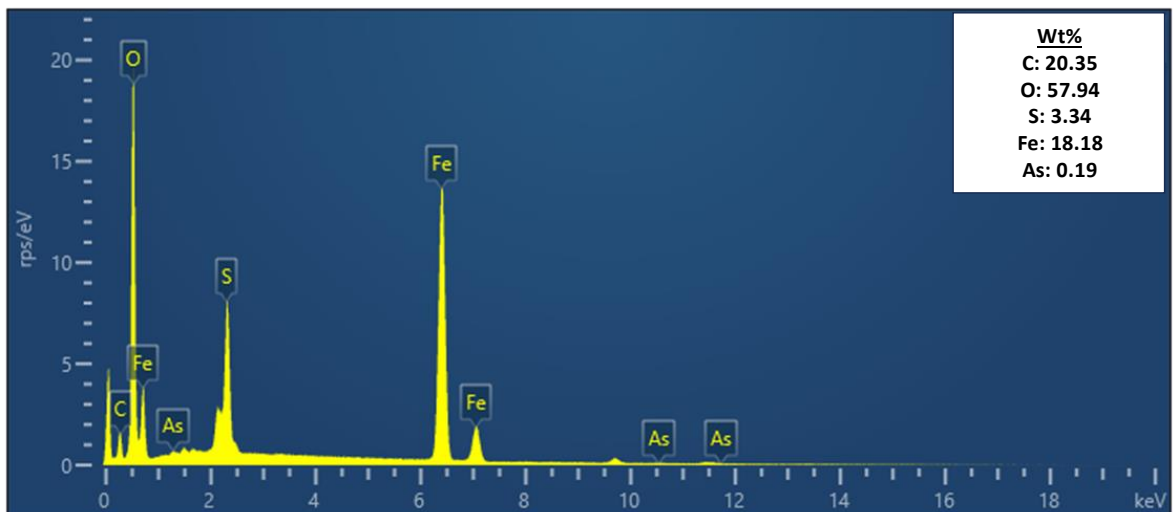


Figura 40. Gráfico EDS de óxidos de hierros biom mineralizados por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en medio BART suplementado con As(V) 0.5 mM y el porcentaje en peso (%Wt) de la composición elemental.

Análisis de adsorción de As de óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Los óxidos de hierro biomineralizados en presencia y ausencia de As(III) y As(V) fueron utilizados para evaluar su capacidad de adsorber 30 mg·L⁻¹ de As(III), para lo cual se añadieron 25 mg de óxidos de hierro biomineralizados en 100 mL de Milli-Q estéril a pH 7.0, suplementada con As(III). Los análisis se realizaron mediante ICP-MS y los resultados de la capacidad de adsorción de As y el porcentaje de adsorción respectivo son presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Capacidad de adsorción de arsénico (mg·g⁻¹) y porcentaje de adsorción de arsénico de óxido de hierro biomineralizado por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

Condición de biomineralización	Adsorción de arsénico (%)	Capacidad de adsorción (mg·g⁻¹)
Ausencia de arsénico	32.2	23.2
As(III) 0.5 mM	28.8	20.8
As(V) 0.5 mM	27.7	20.0

Los resultados indican que los óxidos de hierro biomineralizados en ausencia de arsénico presentan una mayor adsorción de As(III) con un 32.2%, lo que representa una capacidad de adsorción igual 23.2 mg·g⁻¹. Luego, los óxidos de hierro biomineralizados en presencia de As(III) y As(V) 0.5 mM, presentaron un porcentaje de adsorción de As(III) igual a 28.8% y 27.7%, respectivamente.

DISCUSIÓN

Niveles de tolerancia a As inorgánico de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Los valores de tolerancia a As(III) y As(V) determinados para *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 en este estudio fueron de 2 mM y 32 mM, respectivamente. Estos valores son bajos comparados con otros registrados para otras cepas de esta especie como en el caso de *A. ferrooxidans* BYQ-12, la cual fue incubada a pH 2.5 y a 30°C, obteniendo valores de tolerancia igual a 32 mM de As(III) y 64 mM de As(V), (Yan y col., 2017).

Por otra parte, Leng y col. (2009), analizaron cepas de *A. ferrooxidans* aisladas desde diferentes drenajes ácidos asociados a mineras en China, donde se obtuvieron valores de tolerancia con la cepas aclimatadas y no aclimatadas a As. Para el caso de las cepas no aclimatadas, se obtuvieron valores de tolerancia de As(III) entre 20 – 40 mM y de As(V) entre 40 – 60 mM. Luego, en el caso de las cepas aclimatadas, se obtuvieron valores de tolerancia de As(III) entre 40 – 60 mM y de As(V) entre 70 – 100 mM. Por tanto, los niveles de tolerancia a este metaloide por esta bacteria pueden variar dependiendo de la exposición y aclimatación que se realice al momento de la incubación, lo que sugiere que en este estudio para el caso de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 pudieran obtenerse valores de tolerancia más altos posterior a un periodo de adaptación.

La tolerancia a As que presentan cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* se debe, en parte, a estrategias moleculares para la detoxificación de este metaloide mediadas por el operón *ars*, el cual posee diferentes configuraciones dependiendo de la cepa. La cepa ATCC 53993 presenta una configuración *arsCRBH*, que codifica diferentes enzimas: ArsC, una arsenato reductasa capaz de reducir el As(V) a As(III); ArsR, un represor transcripcional de la región promotora del operón *ars*, el cual se transcribe cuando ArsC interacciona con As(III); ArsB, una proteína de bomba de eflujo, que permite expulsar As(III) de la célula; ArsH, una oxidasa organoarsenical, proteína que participa en la oxidación de arsénico (Ben Fekih y col. 2018; Li y col. 2019; Norambuena. 2020; Yachkula y col. 2022).

Además de tolerar hasta 2 mM y 32 mM de As(III) y As(V) respectivamente, la cepa ATCC 53993 fue capaz de oxidar el hierro presente y generar precipitados minerales de color anaranjados, los cuales pueden también estar participando en el proceso de tolerancia a As, mediante el secuestro de este metaloide a través de diferentes mecanismos (Zhang y col. 2018; Karimian y col. 2023), los cuales serán tratados posteriormente en esta sección. De esta manera, la bacteria presenta mecanismos de aclimatación que en conjunto le permiten vivir en ambientes con altas concentraciones de metales pesados.

Análisis de la cinética de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en presencia de As

Se realizaron análisis de las cinéticas de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en presencia y ausencia de As(III) y As(V) 0.5 mM, utilizando diferentes valores de temperatura (28°C y 30°C) y de pH (1.8, 2.0 y 2.5). Se utilizó la concentración de 0.5 mM de As(III) y As(V) debido a que esta cepa bacteriana fue capaz de tolerar por sobre este valor de concentración y también, debido a que corresponde a una concentración significativamente más alta que la que presentan las aguas de ciertos ríos chilenos contaminados con este metaloide, como por ejemplo el río Loa (Antofagasta, Chile) con concentraciones de As por sobre los 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; lo que equivale a aproximadamente 0.0077 mM; el río Camarones (región de Arica y Parinacota, Chile) el cual presente de igual manera 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de As y el río Lluta (región de Arica y Parinacota, Chile), el cual presenta 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que equivale a aproximadamente 0.0019 mM (Romero y col., 2003; Dirección General de Aguas, 2004; Wilson y col., 2011). Es decir, la concentración utilizada en este estudio fue de alrededor de 65 veces mayor a lo presentado en estos cursos de agua natural. Esto, dentro de un contexto de aplicación de un sistema de biorremediación de aguas contaminadas en nuestro país utilizando *A. ferrooxidans* ATCC 53993, implica una ventaja debido a las altas tolerancias a este metaloide por parte de esta cepa bacteriana, por lo que el sistema podría ser capaz de adaptarse a las diferentes fluctuaciones de concentraciones de As.

Las curvas de crecimientos obtenidas se realizaron midiendo la densidad óptica a 430 nm, esto siguiendo lo descrito por Dehghani y col (2019), quienes plantean que esta longitud de onda es óptima para medir densidad celular en medios de cultivo salinos. Los resultados indicaron que la cepa ATCC 53993 presenta una fase adaptativa entre las 0 y las 24 h, una fase exponencial entre las 24 y 48 h, una fase estacionaria de muy corta duración para entrar inmediatamente a la fase de muerte hasta el final del periodo de incubación. El comportamiento del crecimiento celular es similar a lo obtenido en el estudio de Dehghani y col (2019), donde existe una fase de muerte pronunciada, lo cual puede ser debido a la interferencia que otorgan los minerales de óxidos de hierro producidos por las bacterias, los cuales estarían siendo medidos a esta longitud de onda. Esto podría explicar el porqué en todos los casos se llega a un máximo de densidad óptica en la fase exponencial para luego disminuir abruptamente, ya que a medida que los óxidos de hierro son biomineralizados, éstos van decantando y adhiriéndose al fondo del matraz. Por otra parte, la curva de crecimiento obtenida mediante recuento por cámara de Neubauer reveló que la cepa ATCC 53993 presenta un desplazamiento en el comienzo de la fase exponencial, la cual inicia a las 48 h, con respecto a lo obtenido por densidad óptica. La fase estacionaria se observa a las 72 h y se mantiene hasta las 120 h, llegando a una densidad celular máxima de alrededor de 1.5×10^8 cel mL⁻¹. De esta manera, la densidad óptica, a pesar de ser un método rápido para la medición del crecimiento, está sujeto a las interferencias que pueden

presentarse en el medio de cultivo, mientras que con el recuento por cámara de Neubauer se evita esta interferencia al contabilizar directamente las células bacterianas.

Con respecto a los análisis estadísticos de ANOVA de una vía y test Tukey realizados a cada curva de crecimiento, estos indicaron que no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas con los tratamientos en presencia o ausencia de As(III) y/o As(V) 0.5 mM, frente los diferentes valores de pH y temperatura utilizados, lo que demuestra que la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 no ve afectado su crecimiento, siendo capaz de crecer en un amplio rango de pH y temperatura. Además, los parámetros cinéticos obtenidos a través del modelo de Gompertz, corroboran esta información, indicando que la cepa presenta una velocidad de crecimiento (k) similar en cada tratamiento cercana a los 0.157 ($\text{OD}_{430} \cdot \text{h}^{-1}$). Por otra parte, los valores coeficientes de determinación (R^2) obtenidos están sobre 0.7, lo que indica que el modelo se ajusta bien a los datos de las curvas de crecimiento.

De esta manera, la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 fue capaz de proliferar en los diferentes valores de pH (1.8, 2.0 y 2.5) y temperatura (28°C y 30°C) utilizados en este estudio, por lo cual se seleccionaron como valores de trabajo para los siguientes experimentos un pH de 1.8 y una temperatura de 28°C. Esto debido a este tipo de bacteria se encuentra de forma natural en ambientes altamente ácidos y con temperaturas mesófilas (Jung y col. 2022), por lo que

estos valores se ajustan bien dentro de lo descrito. Además de esto, a valores de pH y temperatura similares otras cepas de *A. ferrooxidans* han sido capaces de oxidar el hierro y precipitarlo en minerales de óxidos de hierro, lo que va acorde a lo descrito por otros autores (Song y col. 2018; Dehghani y col. 2019).

Caracterización de la matriz extracelular y evaluación de la formación de biopelículas sobre soportes inorgánicos y orgánicos de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

En el contexto de tratamientos de aguas contaminadas, en este caso con As, la inmovilización de células bacterianas en forma de biopelículas aparece como una opción que presenta buenas propiedades, tales como una alta fuerza mecánica, alta tolerancia a metales y una alta biomasa (Bouabidi y col. 2019). De esta manera, es importante el estudio de la capacidad de adherencia de la bacteria a utilizar, la caracterización de sus biopelículas y su matriz extracelular, para su aplicación en estos sistemas.

Así, una vez caracterizada la tolerancia a As de la cepa ATCC 53993, se procedió a evaluar su formación de biopelículas, primero sobre soportes inorgánicos como la pirita y azufre elemental y luego, sobre un soporte orgánico inerte (*bioball*).

Mediante microscopia de epifluorescencia se observaron células de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 que fueron incubadas sobre trozos de pirita. Se pudo

observar la presencia de bacilos de alrededor de 1 μm de largo, lo cual se corroboró mediante SEM, donde se pudo observar la misma morfología celular y se pudo obtener mayor detalle de la biopelícula formada sobre el mineral la cual consistía, en general, en una monocapa de células distribuidas sobre el mineral de pirita, lo que coincide con lo descrito para las biopelículas formadas por este tipo de bacteria (Bellenberg, y col. 2012).

Entre las micrografías electrónicas de barrido obtenidas, se logró apreciar estructuras que están formando parte de la matriz extracelular (ECM) de las biopelículas de esta bacteria, pequeñas estructuras redondeadas y de tamaño nanométrico en las superficies celulares, las que pueden corresponder a vesículas de membrana (MVs). Este tipo de estructura ha sido ya descrita para diversos tipos de bacterias, como por ejemplo para *Shewanella oneidensis* y *Myxococcus xanthus* (Schwechheimer y col. 2015). Las MVs pueden estar formadas por membrana externa o por membrana externa e interna, las que cumplen diversos tipos de funciones y que coinciden morfológicamente con las observadas mediante SEM en este estudio (Schwechheimer y col. 2015; Rossoni y col. 2024). Además de esto, se observaron estructuras en forma de filamentos o “nanotubos”, los cuales conforman una red que interconecta diferentes células adheridas al mineral. Este tipo de estructura puede ser el resultado de la agregación y fusión de diferentes MVs, los cuales podrían estar participando en procesos de comunicación entre células que conforman la biopelícula. Esto ya ha sido descrito para otros miembros de la clase

Acidithiobacillia, como *Ferriacidithiobacillus caldus* ATCC 51756 (previamente conocida como *Acidithiobacillus caldus*). Esta cepa bacteriana es capaz de producir MVs tanto de manera planctónica como sésil sobre superficie de cupones de azufre, presentando además proyecciones alargadas en formas de nanotubos (TSMS, del inglés *tube shaped membrane structures*) interconectando diferentes células entre sí (Rossoni y col. 2024).

Estos resultados coinciden también con los obtenidos utilizando como soporte cupones de azufre. La microscopia de epifluorescencia FMTM4-64 y SEM, demuestran la capacidad de adherencia que presenta esta cepa bacteriana sobre azufre elemental. De igual manera, se observaron estructuras redondeadas nanométricas por sobre y alrededor de las células, en una mayor cantidad con respecto a las observadas en el caso con pirita. Además, los filamentos observados forman una red mucho más compleja interconectando a diferentes células de la biopelícula.

Por lo anterior, se corrobora que esta cepa bacteriana es capaz de adherirse tanto a pirita como a cupones de azufre. Así, la bacteria puede estar en contacto directo con el hierro y/o azufre, obtener energía a partir de su oxidación y formando así biopelículas (Zhang y col. 2018). Por otra parte, se evidenció que *A. ferrooxidans* ATCC 53993 también es capaz de producir MVs, como los otros miembros de la clase *Acidithiobacillia*, en un proceso independiente del sustrato utilizado como fuente de energía. Además, estas

estructuras, junto con los filamentos o nanotubos formados, son parte estructural de la ECM en las biopelículas.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de adherencia de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico inerte como lo son las *bioballs*, un soporte esférico de polipropileno. Este soporte tiene como características una alta área superficial y resistencia a las condiciones de pH ácido. Además de esto, al ser inerte, no genera subproductos resultado de la interacción con las bacterias como en el caso de la interacción célula y soportes inorgánicos (como piritita y azufre), donde como consecuencia de la biooxidación del hierro y azufre se produce ácido sulfúrico (Maluckov. 2017). Estas características hacen del *bioball* un buen material para su uso en un sistema de tratamiento de aguas contaminadas basado en la inmovilización de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 para biorremediar el arsénico.

Para evaluar la capacidad de adherencia y formación de biopelículas, se realizaron recuentos celulares desprendiendo las células adheridas a los *bioballs* a diferentes intervalos de tiempo durante 7 días, las cuales fueron contadas directamente en cámara de Neubauer y, por otra parte, teñidas con naranja de acridina y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia. Los resultados obtenidos indican que existe un aumento gradual de la concentración de las células adheridas al soporte durante los primeros días y que, además, para el final del periodo de incubación, correspondiente al día 7, las biopelículas

siguen en formación y/o llegaron al máximo de concentración celular adherida debido a que no se apreció una disminución en ésta, frente a los diferentes tratamientos de arsénico en ambos métodos empleados para su evaluación. En el caso de los valores de densidad celular obtenidos mediante tinción con Naranja de acridina, se llegó a un máximo de 6.0×10^7 cel·mL⁻¹, mientras que en el caso de recuento mediante cámara de Neubauer el valor máximo obtenido fue 1.0×10^8 cel·mL⁻¹. Esta diferencia en los valores de densidad celular obtenidas se puede deber a dos factores principales. Primero, el recuento obtenido mediante cámara de Neubauer puede resultar sobrestimado al contabilizar partículas minerales como células. Por otra parte, en el caso de la tinción fluorescente con Naranja de acridina, esta corresponde a una tinción catiónica, por lo que pudiera estar interactuando superficialmente con estructuras de la membrana externa de las células y de la ECM de las biopelículas y no difundiendo a través de su membrana celular para interactuar con los ácidos nucleicos, lo que pudo provocar un recuento celular menor, debido a que no se generó una emisión de fluorescencia o se obtuvo una emisión de fluorescencia no específica disminuida. Luego, con respecto al tiempo de formación de las biopelículas para esta bacteria, autores han determinado que las biopelículas empiezan a formarse desde los 30 min y pueden considerarse maduras a los 5 días de formación (San Martín y col. 2020; Vargas-Straube y col. 2020), por lo que es necesario evaluar la formación

de las biopelículas en un periodo de tiempo mayor para determinar si existen cambios.

Para complementar lo anterior, se obtuvieron muestras de las *bioballs*, para poder visualizar la morfología de las biopelículas formadas sobre este soporte. Los resultados, a diferencia de las biopelículas formadas sobre cupones de azufre y pirita, muestran a los soportes cubiertos por minerales de óxidos de hierro. Esto puede estar ocurriendo debido a que, tanto las células bacterianas como el mismo soporte de polipropileno, están sirviendo como sitios de nucleación para la formación de estos minerales. Así, en las micrografías obtenidas, no se logran apreciar células libres, lo que sugiere que se encuentran incrustadas dentro de estos minerales. Por otra parte, los minerales formados presentaron una morfología globular, poco definida que coinciden morfológicamente con schwertmannita (Zhang y col. 2018), lo cual fue evaluado en las siguientes secciones.

Caracterización y análisis proteómico de MVs producidas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre soportes inorgánicos

En base a los resultados que evidenciaron la presencia de las MVs en la superficie de las células adheridas a los diferentes soportes y fueron, junto a los TSMS, las únicas estructuras apreciables que forman parte de la ECM de las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, se procedió a aislar y caracterizar

MVs. Así, se produjeron y aislaron MVs provenientes de cultivos bacterianos que utilizaban hierro y azufre como fuente de energía en cada caso.

Para la caracterización de las MVs, se analizó el tamaño mediante análisis de NanoTracking. En el caso de las MVs producidas en hierro, se obtuvieron grupos con diferentes tamaños dentro de la muestra, con valores que oscilaban entre 50 nm hasta los 400 nm. Esto sugiere una posible interferencia en el análisis debido, a la presencia de precipitados minerales de óxidos de hierro, que puedan estar siendo considerados como parte de la población de MVs. Por otra parte, en el caso de las MVs producidas en presencia de azufre, se obtuvo solo un grupo predominante de tamaño de 128 nm. Estos valores de tamaño coinciden con tamaños de MVs producidas por otras bacterias de la clase *Acidithiobacillia*, como en el caso de las presentadas en el estudio de Rossoni y col. (2024) con valores que van entre 117 a 158 nm, como también por MVs producidas por bacterias de otras clases como 20 – 250 nm de diámetro (Schwechheimer y Kuehn. 2015).

Por otra parte, las MVs fueron teñidas con el colorante lipofílico FMTM4-64 e incubadas sobre pirita y cupones de azufre. Los resultados mostraron estructuras redondeadas y pequeñas, que están cerca del límite de detección del microscopio de fluorescencia, teñidas de rojo. Esto indica, primero, que estas estructuras poseen una composición lipídica, lo que sugiere que sean realmente MVs. Segundo, que estas estructuras son capaces de interactuar con

el sustrato, al demostrar adherencia a estos. Esto podría explicarse debido a que al momento de generarse las MVs, éstas llevan consigo diferentes tipos de proteínas de membrana externa (Schwechheimer y Kuehn. 2015).

En cuanto a las características de la ultraestructura obtenidas mediante TEM, las MVs producidas tanto en presencia de hierro como de azufre, resultan poseer sólo una membrana apreciable lo que sugiere que, en general, las MVs producidas por esta bacteria son sólo de membrana externa (OMVs, del inglés *outer membrane vesicles*). Además de esto, en el caso de azufre se logran ver MVs muy cercanas e incluso fusionadas entre sí junto también, con estructuras más alargadas que pueden corresponder a los TSMS observados en los resultados de SEM previamente comentados. Estos resultados sugieren que las MVs pueden fusionarse efectivamente para así generar estas otras estructuras en forma de filamentos o nanotubos, los cuales pueden tener funciones de comunicación entre células, esto es un fenómeno que se ha visto en MVs de otras bacterias como en el caso de *Ferriacidithiobacillus. caldus*, *Shewanella oneidensis* y *Myxococcus xanthus* (Pirbadian y col. 2014; Remis y col. 2014; Rossoni y col. 2024)

El contenido proteico sólo de las MVs producidas en presencia de azufre de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 reveló potenciales funciones relacionadas con diferentes adhesinas como componentes del Pili tipo IV (PilP, TadD, PilQ), proteínas de membrana externa (OmpA, OmpL, OprD) y proteínas de oxidación

de sustratos y componentes de la cadena transportadora de electrones (Citocromo C, Rusticianina, Tetrionato hidrolasa). La presencia de estas proteínas sugiere que las MVs tienen interacción directa con la superficie de sustratos como los cupones de azufre y pirita, tal como se analizó previamente con el ensayo de adherencia y tinción fluorescente con FMTM4-64. Por otra parte, las MVs obtenidas en presencia de hierro presentaban precipitados minerales difíciles de separar de la muestra, lo que interfirió en el desarrollo de los análisis.

Evaluación de la biooxidación de hierro por MVs producidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993

En base a los resultados de proteómica se planteó un experimento para explorar la capacidad de biooxidación de hierro por parte de MVs producidas por *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Esto se realizó, además, en presencia y ausencia de As(III) y As(V) 0.5 mM. Los resultados indican que las MVs presentan una actividad oxidativa de hierro, la cual fue significativamente menor con respecto a la de la observada por células de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Además, en el caso del efecto en conjunto de la biooxidación de hierro, entre las células y las MVs, se observó que es una actividad complementaria que resultó ser significativamente mayor a la oxidación mostrada por sólo las células bacterianas en los tratamientos sin As y con As(V) 0.5 mM. Estos resultados

pueden ser explicados dada la presencia de proteínas de interacción con sustratos como lo es Rusticianina, proteína involucrada en la oxidación del hierro y la cadena transportadora de electrones (Quatrini y col. 2009). Sin embargo, la baja actividad oxidativa se puede deber a que las MVs posean una cadena transportadora de electrones incompleta o una baja cantidad de proteínas asociadas a la oxidación del sustrato, por lo que los niveles de oxidación se ven afectados. Por otra parte, los resultados sugieren que las MVs están participando de manera directa en la interacción con los sustratos, en este caso con el hierro, lo que en la naturaleza puede corresponder a la pirita. Esta interacción podría estar facilitando la liberación o biolixiviación de metales y ser una estrategia por parte de las células bacterianas para evitar la generación de minerales de óxidos de hierro sobre su estructura, utilizando a las como MVs sitio de nucleación de estos (Zlatkov y col. 2021).

De esta manera, se demuestra la capacidad de esta cepa bacteriana de adherirse a diferentes sustratos como también de producir MVs, las cuales conforman estructuralmente la ECM de sus biopelículas y están participando activamente en la interacción con los sustratos debido al contenido proteico que llevan consigo. Más estudios son necesarios para la completa caracterización de las MVs, tal como su composición lipídica, el proceso de generación de éstas y las diferentes funciones que pueden estar realizando.

Caracterización de óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre un soporte orgánico

Evaluada la capacidad de formación de biopelículas sobre diferentes sustratos se realizaron ensayos de biomineralización de óxidos de hierro producidos por biopelículas de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* sobre *bioballs*. Se visualizó su aplicación en un sistema de tratamiento para aguas contaminadas con arsénico donde es necesario la estabilidad de los soportes para la inmovilización de las células bacterianas, sin verse afectados por las condiciones ambientales. Esto fue realizado en presencia y ausencia de As(III) y As(V) 0.5 mM.

Los óxidos de hierro biomineralizados fueron recolectados y analizados mediante XDR y SEM-EDS, para identificar las fases minerales presentes y analizar la morfología junto con la composición elemental relativa, respectivamente. Los resultados de XDR para los tres tratamientos de As, indican que las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 producen principalmente dos fases minerales dominantes, las que corresponde a schwertmannita (Sch) y Jarosita (Jt). Esto debido a que las muestras minerales presentaron patrones de difracción de rayos X con peaks a 28.7°, 35°, 39.1°, 45.9°, 49.5° y 61.2°. Estos peaks coinciden con peaks característicos de Sch y Jt (Kamde y col. 2018; Zhang y col. 2018). En cuanto a las características de los peaks, estos presentan en general, una baja intensidad y una gran amplitud, lo

que refleja la presencia de minerales de baja cristalinidad y de morfología amorfa, lo que coincide con Sch (Ali y col. 2022).

Por otra parte, las micrografías electrónicas de barrido, en los tratamientos en ausencia de As y suplementado con As(III) 0.5 mM y As(V) 0.5 mM, respectivamente, revelan la presencia de partículas pequeñas, redondeadas, con proyecciones aciculares, que simulan la forma de un “erizo de mar”. Todas estas características morfológicas coinciden con lo descrito para Sch (Zhang y col. 2018). Por otra parte, se observan minerales con bordes más definidos, de mayor tamaño que los anteriores, características que coinciden con morfologías ya estudiadas de Jt (Eftekhari y col. 2020b). Además de esto, los análisis de composición elemental entregados por EDS, indican la presencia de minerales con un alto porcentaje de Fe, O y S, átomos principales en la composición de Sch $[(Fe_8O_8(OH)_{8-2x}(SO_4)_x) (1 \leq x \leq 1.75)]$ y Jt, además de contar con K, el cual es uno de los átomos intercambiables en la composición de Jt, dada su fórmula química $[(MFe_3(SO_4)_2(OH)_6)]$, donde M puede ser reemplazado por un catión monovalente o divalente tal como: NH_4^+ , H_3O^+ , K^+ , Na^+ , Ag^+ , Hg^{2+} o Pb^{2+} (Cruells y Roca. 2022).

En otros estudios realizados de biomineralización con cepas de *A. ferrooxidans* se han obtenido en general sólo una fase mineral, la cual puede corresponder a Sch, por ejemplo. Sin embargo, en esos estudios se mantiene un control periódico de parámetros fisicoquímicos como el pH, como en la investigación

realizada por Zhou y col. (2022), donde esta regulación permite aumentar la eficiencia de precipitación del hierro y la formación principalmente de Sch. En cambio, en el presente estudio, sólo se consideró un pH inicial, el cual pudo variar durante el transcurso de la formación de la biopelícula y la biomineralización de óxidos de hierro. Cabe considerar que establecer un sistema de tratamiento *in situ* en donde se ajusten los valores de parámetros fisicoquímicos como el pH y temperatura, podría incrementar los costos económicos asociados, por tanto, la aproximación metodológica de este estudio implica una cercanía a las condiciones en las que se espera implementar el sistema de tratamiento.

De esta manera, es posible afirmar que las biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 sobre los soportes de *bioballs* y frente a las condiciones fisicoquímicas utilizadas (28°C y pH 1.8) son capaces de producir minerales de óxidos de hierro como Sch y Jt.

Análisis de adsorción de As de óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Luego de identificar los óxidos de hierro biomineralizados por biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 se procedió a evaluar su capacidad de adsorber As(III). Para esto, los minerales obtenidos en presencia y ausencia de As(III) y As(V) fueron utilizados para un ensayo de adsorción de As(III) a una

concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los resultados indican que los óxidos de hierro biomineralizados en ausencia de As presentan una mayor capacidad de adsorber este metaloide, con un porcentaje de adsorción igual a 32.2% lo que significa una capacidad de adsorción igual a $23.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Luego, los óxidos de hierro biomineralizados en presencia de As(III) 0.5 mM y As(V) 0.5 mM ocuparon el segundo y tercer lugar, en cuanto al porcentaje de adsorción, con un 28.8% y 27.7%.

Los óxidos de hierro que fueron biomineralizados en ausencia de As presentaron los valores más altos de adsorción de este metaloide, lo que puede ser explicado debido a los mecanismos de interacción de los óxidos de hierro con el As. Al ser biomineralizados en ausencia de As, los óxidos de hierro presentarían más sitios disponibles para interactuar con éste, ya sea mediante el desplazamiento del núcleo de sulfato presente en sus estructuras, como también por la unión mediante enlaces covalentes para formar fuertes complejos superficiales (Zhang y col. 2018; Karimian y col. 2023). Estas interacciones se verían disminuidas en el caso de los óxidos de hierro que fueron biomineralizados en presencia, ya sea de As(III) o As(V).

Por otra parte, los valores de capacidad de adsorción de As ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) obtenidos en estudios previos similares son más altos, tal como en el caso de Song y col. (2018) donde se obtuvo un valor de $117.0 \text{ mg As(III)}\cdot\text{g}^{-1}$ Sch. Sin embargo, este valor se obtiene a partir de una fase mineral única, en cambio, en este estudio,

se obtuvo una mezcla de dos fases minerales, lo cual puede afectar en las capacidades de adsorber As. A pesar de esto, los valores de adsorción de As obtenidos en este estudio tienen un buen rendimiento comparados con valores de adsorbentes convencionales como el carbón activado, el cual posee una capacidad de adsorción de As(III) igual a $29.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Mohan y Pittman, 2007), considerando que los óxidos de hierro son biomineralizados, lo que lo hace rentable económicamente.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos, no se rechaza la hipótesis planteada debido a que *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 es capaz de adherirse y formar biopelículas sobre soportes inorgánicos (pirita y azufre elemental) y orgánicos (*bioballs*), como también de biomineralizar óxidos de hierro, tales como schwertmannita y jarosita, los cuales poseen capacidades de adsorción de As(III). Así, sería posible desarrollar un sistema de tratamiento de aguas contaminadas con As basado en la inmovilización de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 sobre *bioballs* y la biomineralización de óxidos de hierro, los cuales pueden capturar el As. Esto permitiría disminuir las concentraciones de este metaloide, sin la necesidad de tratamientos químicos, lo que implica un tratamiento menos costoso y amigable con el ambiente, lo que podría afectar de manera positiva a la salud pública. Además de lo anterior, se destaca la presencia de MVs como parte de la ECM de las biopelículas de la cepa ATCC 53993, estructuras poco estudiadas previamente en este tipo de bacterias, las cuales estarían interaccionando directamente en la oxidación de

minerales como el hierro y, además, pueden estar formando proyecciones alargadas en formas de nanotubos (TSMS), lo que podría estar relacionado a funciones de comunicación entre células.

Como proyecciones a este estudio se propone el desarrollo de un sistema de tratamiento a mayor escala para evaluar los rendimientos de biomineralización de óxidos de hierro como de la adsorción de As. Por otra parte, surge la necesidad de esclarecer las funciones de las MVs dentro del contexto de la formación de biopelículas de esta bacteria, junto con la interacción con minerales que puede influir en la biomineralización de óxidos de hierro.

CONCLUSIONES

- *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 tolera 2 mM de As(III) y 32 mM de As(V).
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 prolifera en un amplio rango de pH (1.5, 2.0 y 2.5) y temperatura (28°C y 30°C).
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, incubada en el medio BART modificado a pH 1.8 y 28°C, se adhiere y forma biopelículas sobre sustratos inorgánicos, como pirita y azufre elemental, y sobre un soporte orgánico inerte, como *bioballs* de polipropileno.
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 produce vesículas de membrana (MVs), las cuales son parte estructural de la matriz extracelular de sus biopelículas.
- Las MVs presentan capacidades de adherencia a sustratos como la pirita y azufre elemental como también capacidad oxidativa de hierro.
- *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 en el estado de biopelícula, incubada en el medio BART modificado a pH 1.8 y 28°C, biomineraliza óxidos de hierro, principalmente schwertmannita y jarosita.
- Los óxidos de hierro schwertmannita y jarosita biomineralizados por la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, en el estado de biopelícula, presentan una capacidad de adsorción de As(III) igual a 23.2 mg·g⁻¹.

REFERENCIAS

- Ahoranta, S. H., Kokko, M. E., Papirio, S., Özkaya, B., & Puhakka, J. A. (2016). Arsenic removal from acidic solutions with biogenic ferric precipitates. *J Hazard Mater*, 306, 124-132.
- Alam, R., & McPhedran, K. (2019). Applications of biological sulfate reduction for remediation of arsenic—A review. *Chemosphere*, 222, 932-944.
- Al-Amshawee, S., Yunus, M. Y., Vo, D. V. N., & Tran, N. H. (2020). Biocarriers for biofilm immobilization in wastewater treatments: a review. *Environ Chem Lett*, 1-21.
- Ali, A., Chiang, Y. W., & Santos, R. M. (2022). X-ray diffraction techniques for mineral characterization: A review for engineers of the fundamentals, applications, and research directions. *Minerals*, 12(2), 205.
- Almárcegui, R. J., Navarro, C. A., Paradela, A., Albar, J. P., von Bernath, D., & Jerez, C. A. (2014). Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur. *Res. Microbiol.*, 165(9), 761-772.
- Antelo, J., Fiol, S., Gondar, D., López, R., & Arce, F. (2012). Comparison of arsenate, chromate and molybdate binding on schwertmannite: Surface adsorption vs anion-exchange. *J Colloid Interface Sci*, 386(1), 338-343.
- Aseré, T. G., Stevens, C. V., & Du Laing, G. (2019). Use of (modified) natural adsorbents for arsenic remediation: a review. *Sci Total Environ*, 676, 706-720.
- Assis, R. C., de Araújo Faria, B. A., Caldeira, C. L., Mageste, A. B., de Lemos, L. R., & Rodrigues, G. D. (2019). Extraction of arsenic (III) in aqueous two-phase systems: A new methodology for determination and speciation analysis of inorganic arsenic. *Microchem J*, 147, 429-436.
- Baloch, M. Y. J., Talpur, S. A., Talpur, H. A., Iqbal, J., Mangi, S. H., & Memon, S. (2020). Effects of Arsenic Toxicity on the Environment and Its Remediation Techniques: A Review. *J Water Environ Technol*, 18(5), 275-289.
- Barral-Fraga, L., Barral, M. T., MacNeill, K. L., Martiñá-Prieto, D., Morin, S., Rodríguez-Castro, M. C., ... & Guasch, H. (2020). Biotic and Abiotic Factors Influencing Arsenic Biogeochemistry and Toxicity in Fluvial Ecosystems: A Review. *Int J Environ Res Public Health*, 17(7), 2331.
- Bazyłinski, D. A., & Frankel, R. B. (2003). Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Rev Mineral Geochem*, 54(1), 217-247.

- Bellenberg, S., Díaz, M., Noël, N., Sand, W., Poetsch, A., Guiliani, N., & Vera, M. (2014). Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Res Microbiol*, 165(9), 773-781.
- Bellenberg, S., Leon-Morales, C. F., Sand, W., & Vera, M. (2012). Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 129, 82-89.
- Ben Fekih, I., Zhang, C., Li, Y. P., Zhao, Y., Alwathnani, H. A., Saquib, Q., ... & Cervantes, C. (2018). Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Front. microbiol.*, 9, 2473.
- Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F., & Ferard, C. (2011). Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *C. R. Geosci*, 343(2-3), 160-167.
- Berg, E. C., y Borges, A. C. (2020). Use of plants in the remediation of arsenic-contaminated waters. *Water Environ Res*, 92(10), 1669-1676.
- Bishop, J. L., Murad, E., & Dyar, M. D. (2015). Akaganéite and schwertmannite: Spectral properties and geochemical implications of their possible presence on Mars. *Am Min*, 100(4), 738-746.
- Bolt, H.M., y Hengstler, J.G., (2018). Contemporary trends in toxicological research on arsenic. *Arch Toxicol* 92, 3251–3253
- Bouabidi, Z. B., El-Naas, M. H., & Zhang, Z. (2019). Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review. *Environ Chem Lett*, 17(1), 241-257.
- Bugueño, M. P., Acevedo, S. E., Bonilla, C. A., Pizarro, G. E., & Pasten, P. A. (2014). Differential arsenic binding in the sediments of two sites in Chile's lower Loa River basin. *Sci Total Environ*, 466, 387-396.
- Burton, E. D., Bush, R. T., Johnston, S. G., Watling, K. M., Hocking, R. K., Sullivan, L. A., y Parker, G. K. (2009). Sorption of arsenic (V) and arsenic (III) to schwertmannite. *Environ Sci Technol*, 43(24), 9202-9207.
- Byrne, S., Amarasiriwardena, D., Bandak, B., Bartkus, L., Kane, J., Jones, J., ... y Cornejo, L. (2010). Were Chinchorros exposed to arsenic? Arsenic determination in Chinchorro mummies' hair by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchem. J.*, 94(1), 28-35.

- Cáceres, D. D., Pino, P., Montesinos, N., Atalah, E., Amigo, H., & Loomis, D. (2005). Exposure to inorganic arsenic in drinking water and total urinary arsenic concentration in a Chilean population. *Environ Res*, 98(2), 151-159.
- Castillo, H., y Venegas, G. (2010). Impacto y consecuencias del Arsénico en la salud y el medio ambiente en el Norte de Chile. *Rev Interamericana Ambiente Tur*, 6(1), 53-60.
- Chakrabarti, D., Singh, S. K., Rashid, M. H., & Rahman, M. M. (2018). Arsenic: Occurrence in Groundwater. *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition)*, Elsevier, 153-168.
- Chang, J. S., Yoon, I. H., & Kim, K. W. (2018). Arsenic biotransformation potential of microbial arsH responses in the biogeochemical cycling of arsenic-contaminated groundwater. *Chemosphere*, 191, 729-737.
- Chatterjee, S., Moogoui, R., & Gupta, D. K. (2017). Arsenic: Source, occurrence, cycle, and detection. *In Arsenic Contamination in the Environment*. Springer, Cham, 13-35.
- Chen, M., Li, Y., Zhang, L., Wang, J., Zheng, C., & Zhang, X. (2015). Analysis of gene expression provides insights into the mechanism of cadmium tolerance in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.*, 70, 290-297.
- Cruells, M., & Roca, A. (2022). Jarosites: formation, structure, reactivity and environmental. *Metals*, 12(5), 802.
- Dadwal, A., y Mishra, V. (2017). Review on biosorption of arsenic from contaminated water. *Clean–Soil, Air, Water*, 45(7), 1600364.
- Dehghani, A., Dousti, B., Gilavand, F., Kavyanifard, A., & Sedighi–Khavidak, S. (2019). The Effect of UV Light on Increasing the Arsenate Resistance of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. environ. health sustain. dev.*
- Demir, E. K., Yaman, B. N., Çelik, P. A., & Sahinkaya, E. (2020). Iron oxidation in a ceramic membrane bioreactor using acidophilic bacteria isolated from an acid mine drainage. *J Water Process Eng*, 38, 101610.
- Dhami, N. K., Reddy M.S. y Mukherjee A. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Front Microbiol*, 4, 314.
- Diep, P., Mahadevan, R., & Yakunin, A. F. (2018). Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Front Bioeng Biotechnol*, 6, 157.

Dirección General de Aguas (DGA) (2004). Diagnóstico y Clasificación de los Cursos y Cuerpos de Agua según Objetivos de Calidad. Cuenca Río Loa, Ministerio de Medio Ambiente, Chile.

Donati, E. R., Castro, C., & Urbieto, M. S. (2016). Thermophilic microorganisms in biomining. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 1-8.

Dong, H. (2010). Mineral-microbe interactions: a review. *Front. Earth Sci in China*, 4(2), 127-147.

Eftekhari, N., Kargar, M., Rokhbakhsh Zamin, F., Rastakhiz, N., y Manafi, Z. (2020a). Bioremoval of iron ions from copper raffinate solution using biosynthetic jarosite seed promoted by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Rev metal*, 56(4), e182.

Eftekhari, N., Kargar, M., Zamin, F. R., Rastakhiz, N., & Manafi, Z. (2020b). A Review on Various Aspects of Jarosite and Its Utilization Potentials. *Ann. Chim.-Sci. Mat.* (Vol. 44, No. 1).

Eick, S. M., & Steinmaus, C. (2020). Arsenic and Obesity: a Review of Causation and Interaction. *Curr Environ Health Rep*, 1-9.

Faivre, D. (2016). Iron oxides: from nature to applications. *John Wiley & Sons*.

Feng, K., Wang, X., Zhou, B., Xu, M., Liang, J., y Zhou, L. (2021). Hydroxyl, Fe²⁺, and *Acidithiobacillus ferrooxidans* Jointly Determined the Crystal Growth and Morphology of Schwertmannite in a Sulfate-Rich Acidic Environment. *ACS omega*, 6(4), 3194-3201.

Ferreccio, C., y Sancha, A. M. (2006). Arsenic exposure and its impact on health in Chile. *J Health Popul Nutr*, 164-175.

Flemming, H. C. (2016a). EPS—then and now. *Microorganisms*, 4(4), 41.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016b). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 563.

Fortin, D., y Langley, S. (2005). Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth-Sci Rev*, 72(1-2), 1-19.

Frankel, R. B., & Bazylinski, D. A. (2003). Biologically induced mineralization by bacteria. *Rev Mineral Geochem.*, 54(1), 95-114.

Fukushi, K., Sato, T. y Yanase, N. (2003). Solid-solution reactions in As(V) sorption by schwertmannite. *Environ Sci Technol*, 37: 3581-3586.

- Gadd, G. M., y Pan, X. (2016). Biomineralization, bioremediation and biorecovery of toxic metals and radionuclides. *Geomicrobiol. J*, 33:3-4, 175-178.
- Gallegos-Garcia, M., Ramírez-Muñiz, K., & Song, S. (2012). Arsenic removal from water by adsorption using iron oxide minerals as adsorbents: a review. *Miner. Process. Extr Metall Rev*, 33(5), 301-315.
- Gamboa, J. C. M., Cornejo, L., Acarapi, J., & Squella, J. A. (2013). Determination of arsenic (III) by differential pulse polarography in the waters of Camarones area, Chile. *J. Chil Chem Soc*, 58(4), 2031-2034.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., & Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl Environ Microbiol*, 64(7), 2743-2747.
- Ghosh, S., Debsarkar, A., & Dutta, A. (2019). Technology alternatives for decontamination of arsenic-rich groundwater—A critical review. *Environ. Technol Innov*, 13, 277-303.
- González-Muñoz, M. T., Rodríguez-Navarro, C., Martínez-Ruiz, F., Arias, J. M., Merroun, M. L., & Rodríguez-Gallego, M. (2010). Bacterial biomineralization: new insights from *Myxococcus*-induced mineral precipitation. *Geol J*, London, Special Publications, 336(1), 31-50.
- Guo, J., Zhou, Z., Yuan, J., Liu, C., Ke, P., Zhao, B., & Hu, Z. (2024). Effect of preparation methods on the morphology of jarosite and its adsorption performance for U (VI). *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 333(1), 317-328.
- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J. H., Gehrke, T., & Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 83(1-4), 245-254.
- Hedrich, S., Schlömann, M., & Johnson, D. B. (2011). The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology*, 157(6), 1551-1564.
- Hedrich, S., y Johnson, D. B. (2014). Remediation and selective recovery of metals from acidic mine waters using novel modular bioreactors. *Environ Sci Technol*, 48(20), 12206-12212.
- Herrera, V., Carrasco, C., Araneda, P., Varas, V., & Rojo, C. (2019). Riesgo ecológico potencial por arsénico en la desembocadura del río loa, norte de Chile. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(3), 609-622.

Huang, L., Wu, H., y van der Kuijp, T. J. (2015). The health effects of exposure to arsenic-contaminated drinking water: a review by global geographical distribution. *Int J Environ Health Res*, 25(4), 432-452.

Hudson-Edwards, K. A. (2019). Uptake and release of arsenic and antimony in alunite-jarosite and beudantite group minerals. *Am. Min.*, 104(5), 633-640.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monogr. Eval. *Carcinog Risks Hum.* 84, 1–477.

Ibarra, C., O’Ryan, R., & Silva, B. (2018). Applying knowledge governance to understand the role of science in environmental regulation: The case of arsenic in Chile. *Environ Sci Policy*, 86, 115-124.

Instituto Nacional de Normalización (INN) (2005). Chile, Norma Chilena 409/1. Agua Potable Parte 1: Requisitos.

Jan, A. T. (2017). Outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: a perspective update. *Front Microbiol* 8: 1053.

Jang, Y. C., Somanna, Y., & Kim, H. (2016). Source, distribution, toxicity and remediation of arsenic in the environment—a review. *Int J Appl Environ Sci*, 11(2), 559-581.

Jha, S. K., Mishra, V. K., Damodaran, T., Sharma, D. K., & Kumar, P. (2017). Arsenic in the groundwater: Occurrence, toxicological activities, and remedies. *J Environ Sci Health C. Part C*, 35(2), 84-103.

Jogler, C., y Schüler, D. (2009). Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Annu Rev Microbiol*, 63, 501-521.

Johnson, D. B. (2014). Biomining—biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current opinion in biotechnology*, 30, 24-31.

Jung, H., Inaba, Y., & Banta, S. (2022). Genetic engineering of the acidophilic chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Trends Biotechnol.*, 40(6), 677-692.

Kamde, K., Pandey, R. A., Thul, S. T., Dahake, R., Shinde, V. M., & Bansiwala, A. (2018). Microbially assisted arsenic removal using *Acidothiobacillus ferrooxidans* mediated by iron oxidation. *Environ Technol Innov*, 10, 78-90.

- Karimian, N., Johnston, S. G., Tavakkoli, E., Friedrich, A. J., & Burton, E. D. (2023). Mechanisms of arsenic and antimony co-sorption onto jarosite: an x-ray absorption spectroscopic study. *Environ. Sci. Tech.*, 57(12), 4813-4820.
- Khaire, K. C., Patel, S., Gavande, P. V., Moholkar, V. A. S., & Goyal, A. (2019). Extremophilic Biofilms: Exploring the Prospects. In Introduction to Biofilm Engineering. *Am. Chem. Soc.* 141-157.
- Kulshreshtha, A., Agrawal, R., Barar, M., & Saxena, S. (2014). A review on bioremediation of heavy metals in contaminated water. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol*, 8(7), 44-50.
- Kumar, R., Patel, M., Singh, P., Bundschuh, J., Pittman Jr, C. U., Trakal, L., & Mohan, D. (2019). Emerging technologies for arsenic removal from drinking water in rural and peri-urban areas: Methods, experience from, and options for Latin America. *Sci Total Environ*, 694, 133427.
- Kuo, C. C., Moon, K. A., Wang, S. L., Silbergeld, E., & Navas-Acien, A. (2017). The association of arsenic metabolism with cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a systematic review of the epidemiological evidence. *Environ Health Perspect*, 125(8), 087001.
- Leng, F., Li, K., Zhang, X., Li, Y., Zhu, Y., Lu, J., & Li, H. (2009). Comparative study of inorganic arsenic resistance of several strains of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 98(3-4), 235-240.
- Li, J., Xie, Y., Lu, G., Ye, H., Yi, X., Reinfelder, J. R., ... & Dang, Z. (2018a). Effect of Cu (II) on the stability of oxyanion-substituted schwertmannite. *Environ Sci Pollut Res*, 25(16), 15492-15506.
- Li, L., Liu, Z., Meng, D., Liu, X., Li, X., Zhang, M., ... & Yin, H. (2019). Comparative genomic analysis reveals the distribution, organization, and evolution of metal resistance genes in the genus *Acidithiobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(2), e02153-18.
- Li, Q., Yang, B., Zhu, J., Jiang, H., Li, J., Zhang, R., y Sand, W. (2018b). Comparative analysis of attachment to chalcopyrite of three mesophilic iron and/or sulfur-oxidizing acidophiles. *Minerals*, 8(9), 406.
- Liao, Y., Liang, J., & Zhou, L. (2011). Adsorptive removal of As (III) by biogenic schwertmannite from simulated As-contaminated groundwater. *Chemosphere*, 83(3), 295-301.

- Makisha, N. (2021). Application of Biofilm Carrier in Aerobic Reactors as a Method to Improve Quality of Wastewater Treatment. *Hydrology*, 8(2), 77.
- Maleke, M., Valverde, A., Vermeulen, J., Cason, E., Gomez-Arias, A., Moloantoa, K. y Castillo, J. (2019). Biomineralization and bioaccumulation of europium by a thermophilic metal resistant bacterium. *Front Microbiol*, 10, 81.
- Mamo, G., & Mattiasson, B. (2019). Alkaliphiles: the emerging biological tools enhancing concrete durability. *Alkaliphiles in Biotechnology*, 293-342.
- Marshall, G., Ferreccio, C., Yuan, Y., Bates, M. N., Steinmaus, C., Selvin, S., & Smith, A. H. (2007). Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst*, 99(12), 920-928.
- Martínez-Bussenius, C., Navarro, C. A., Orellana, L., Paradela, A., & Jerez, C. A. (2016). Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: a quantitative proteomics approach. *J. Proteom.*, 145, 37-45.
- Masloń, A., y Tomaszek, J. A. (2015). A study on the use of the BioBall® as a biofilm carrier in a sequencing batch reactor. *Bioresour Technol*, 196, 577-585.
- Minatel, B. C., Sage, A. P., Anderson, C., Hubaux, R., Marshall, E. A., Lam, W. L., & Martinez, V. D. (2018). Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environ Int*, 112, 183-197.
- Miyata, N., Takahashi, A., Fujii, T., Hashimoto, H., & Takada, J. (2018). Biosynthesis of schwertmannite and goethite in a bioreactor with acidophilic Fe (II)-oxidizing betaproteobacterium strain GJ-E10. *Minerals*, 8(3), 98.
- Mochizuki, H. (2019). Arsenic neurotoxicity in humans. *Int J Mol Sci*, 20(14), 3418.
- Mohan, D., y Pittman Jr, C. U. (2007). Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents—a critical review. *J Hazard Mater*, 142(1-2), 1-53.
- Mori, J. F., Lu, S., Händel, M., Totsche, K. U., Neu, T. R., Iancu, V. V., ... & Küsel, K. (2016). Schwertmannite formation at cell junctions by a new filament-forming Fe (II)-oxidizing isolate affiliated with the novel genus *Acidithrix*. *Microbiology*, 162(1), 62-71.
- Moya-Beltrán, A., Beard, S., Rojas-Villalobos, C., Issotta, F., Gallardo, Y., Ulloa, R., ... & Quatrini, R. (2021). Genomic evolution of the class *Acidithiobacillia*: deep-branching Proteobacteria living in extreme acidic conditions. *The ISME Journal*, 15(11), 3221-3238.

- Muñoz-Villagrán, C., Grossolli-Gálvez, J., Acevedo-Arbunic, J., Valenzuela, X., Ferrer, A., Díez, B., & Levicán, G. (2022). Characterization and genomic analysis of two novel psychrotolerant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains from polar and subpolar environments. *Front. microbiol.*, 13, 960324.
- Mykytczuk, N. C. S., Trevors, J. T., Ferroni, G. D., & Leduc, L. G. (2011). Cytoplasmic membrane response to copper and nickel in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Res.*, 166(3), 186-206.
- Naujokas, M. F., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian, H. V., Graziano, J. H., Thompson, C., & Suk, W. A. (2013). The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ Health Perspect*, 121(3), 295-302.
- Navarro, C. A., von Bernath, D., & Jerez, C. A. (2013). Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Microbiol. Res.*, 46(4), 363-371.
- Norambuena, J. (2020). Mechanism of resistance focusing on copper, mercury and arsenic in extremophilic organisms, how acidophiles and thermophiles cope with these metals. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 23-37). Academic Press.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (1996). *Guideline for Drinking Water Quality* (1,2. Geneva, Switzerland) 41.
- Organización mundial de la salud (OMS). (2010) *Action is Needed on Chemicals of Major Public Health Concern*.
- Paikaray, S., Essilfiedughan J., Göttlicher J., Pollok K., Peiffer S., (2014). Redox stability of As(III) on schwertmannite surfaces. *J Hazardous Mater*, 265:208–216.
- Park, J., Han, Y., Lee, E., Choi, U., Yoo, K., Song, Y., & Kim, H. (2014). Bioleaching of highly concentrated arsenic mine tailings by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Sep. Purif. Technol.*, 133, 291-296.
- Parkinson, G. S. (2016). Iron oxide surfaces. *Surf. Sci. Rep.*, 71(1), 272-365.
- Pawlowska, A., & Sadowski, Z. (2020). Effect of Schwertmannite Surface Modification by Surfactants on Adhesion of Acidophilic Bacteria. *Microorganisms*, 8(11), 1725.
- Pell, A., Márquez, A., López-Sánchez, J. F., Rubio, R., Barbero, M., Stegen, S., ... & Díaz-Palma, P. (2013). Occurrence of arsenic species in algae and

freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River Basin. *Chemosphere*, 90(2), 556-564.

Perri, E., Tucker, M.E., Słowakiewicz, M., Whitaker, F., Bowen, L. and Perrotta, I.D. (2018), Carbonate and silicate biomineralization in a hypersaline microbial mat (Mesaieed sabkha, Qatar): Roles of bacteria, extracellular polymeric substances and viruses. *Sedimentology*, 65: 1213-1245.

Picazo-Rodríguez, N. G., Carrillo-Pedroza, F. R., Soria-Aguilar, M. D. J., Baltierra, G., González, G., Martínez-Luevanos, A., & Almaguer Guzmán, I. (2022). Use of thermally modified jarosite for the removal of hexavalent chromium by adsorption. *Crystals*, 12(1), 80.

Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., ... & El-Naggar, M. Y. (2014). Shewanella oneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(35), 12883-12888.

Qiao, X., Liu, L., Shi, J., Zhou, L., Guo, Y., Ge, Y. & Liu, F. (2017). Heating changes bio-schwertmannite microstructure and arsenic (III) removal efficiency. *Minerals* 7, no. 1: 9.

Quatrini, R., & Johnson, D. B. (2018). Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. *Curr. Opin. Microbiol.*, 43, 139-147.

Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S., & Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC genomics*, 10, 1-19.

Rahman, Z., & Singh, V. P. (2019). The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ Monit Assess*, 191(7), 419.

Reichel, S., Janneck, E., Burghardt, D., Peiffer, S., Kießig, G., Koch, T., ... & Laubrich, J. (2017). Microbial production of schwertmannite: development from microbial fundamentals to marketable products. *Solid State Phenomena*, 262, 568-572.

Remis, J. P., Wei, D., Gorur, A., Zemla, M., Haraga, J., Allen, S., ... & Auer, M. (2014). Bacterial social networks: structure and composition of *M. xanthis* outer membrane vesicle chains. *Environ. Microbiol*, 16(2), 598-610.

- Roggenbeck, B. A., Banerjee, M., & Leslie, E. M. (2016). Cellular arsenic transport pathways in mammals. *Res J Environ Sci*, 49, 38-58.
- Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., ... & Farago, M. (2003). Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). *J Appl Geochem*, 18(9), 1399-1416.
- Rossoni, S., Beard, S., Duarte-Ramírez, J., Osorio, F. K., Varas-Godoy, M., Vera, M., ... & Castro, M. (2024). Membrane vesicles in *Acidithiobacillia* class extreme acidophiles: influence on collective behaviors of '*Fervidacidithiobacillus caldus*'. *Front. microbiol.*, 14, 1331363.
- Sage, A. P., Minatel, B. C., Ng, K. W., Stewart, G. L., Dummer, T. J., Lam, W. L., & Martinez, V. D. (2017). Oncogenomic disruptions in arsenic-induced carcinogenesis. *Oncotarget*, 8(15), 25736.
- San Martín, F., Kracht, W., & Vargas, T. (2020). Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to pyrite in fresh and saline water and fitting to Langmuir and Freundlich isotherms. *Biotechnol. Lett*, 42, 957-964.
- Sand, W., y Gehrke, T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Res Microbiol*, 157(1), 49-56.
- Saunders, J. K., & Rocap, G. (2016). Genomic potential for arsenic efflux and methylation varies among global Prochlorococcus populations. *ISME J*, 10(1), 197-209.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol*, 13(10), 605-619.
- Sher, S., y Rehman, A. (2019). Use of heavy metals resistant bacteria a strategy for arsenic bioremediation. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 103(15), 6007-6021.
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), 599.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. *Ecotoxicol. Environ Saf*, 112, 247-270.

Sodhi, K. K., Kumar, M., Agrawal, P. K., & Singh, D. K. (2019). Perspectives on arsenic toxicity, carcinogenicity and its systemic remediation strategies. *Environ Technol Innov*, 16, 100462.

Song, Y., Liu, Y., & Wang, H. (2018a). Comparison of the biological and chemical synthesis of schwertmannite at a consistent Fe²⁺ oxidation efficiency and the effect of extracellular polymeric substances of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on biomineralization. *Materials*, 11(9), 1739.

Song, Y., Zhang, J., & Wang, H. (2018b). Initial pH and K⁺ concentrations jointly determine the types of biogenic ferric hydroxysulfate minerals and their effect on adsorption removal of Cr (VI) in simulated acid mine drainage. *Water Science and Technology*, 78(10), 2183-2192.

Steinmaus, C., Ferreccio, C., Acevedo, J., Balmes, J. R., Liaw, J., Troncoso, P., ... & Smith, A. H. (2016). High risks of lung disease associated with early-life and moderate lifetime arsenic exposure in northern Chile. *Toxicol Appl Pharmacol*, 313, 10-15.

Tanmoy, P., & Saha, N. C. (2019). Environmental arsenic and selenium contamination and approaches towards its bioremediation through the exploration of microbial adaptations: A review. *Pedosphere*, 29(5), 554-568.

Tapia, J. M., Muñoz, J., González, F., Blázquez, M. L., & Ballester, A. (2013). Sorption of ferrous and ferric iron by extracellular polymeric substances (EPS) from acidophilic bacteria. *Prep Biochem Biotechnol*, 43(8), 815-827.

Tapia, J. M., Muñoz, J., González, F., Blázquez, M. L., & Ballester, A. (2016). Sorption of ferrous iron by EPS from the acidophilic bacterium *Acidiphilium* Sp.: A mechanism proposal. *Rev Metal Madrid*, 52(3), e076.

Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm development. *Microbial Biofilms*, 51-66.

Valdés, J., Cárdenas, J. P., Quatrini, R., Esparza, M., Osorio, H., Duarte, F., ... & Holmes, D. S. (2010). Comparative genomics begins to unravel the ecophysiology of bioleaching. *Hydrometallurgy*, 104(3-4), 471-476.

Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R., ... & Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC genomics*, 9, 1-24.

Valenzuela, C., Campos, V. L., Yañez, J., Zaror, C. A., & Mondaca, M. A. (2009). Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-enriched sediments from Camarones River, Northern Chile. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82(5), 593-596.

- Vargas-Straube, M. J., Beard, S., Norambuena, R., Paradela, A., Vera, M., & Jerez, C. A. (2020). High copper concentration reduces biofilm formation in *Acidithiobacillus ferrooxidans* by decreasing production of extracellular polymeric substances and its adherence to elemental sulfur. *J. Proteom.*, 225, 103874.
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *J Microbiol Exp*, 1(3), 00014.
- Vera, M., Schippers, A., & Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 7529-7541.
- Vithana, C. L., Sullivan, L. A., Burton, E. D. & Bush, R. T. (2014). Liberation of acidity and arsenic from schwertmannite: Effect of fulvic acid. *Chem Geol*, 372: 1-11.
- Wang, C., Luan, J., & Wu, C. (2019). Metal-organic frameworks for aquatic arsenic removal. *Water Res*, 158, 370-382.
- Wang, Y., Li, J., Ma, T., Xie, X., Deng, Y., & Gan, Y. (2020). Genesis of geogenic contaminated groundwater: As, F and I. *Crit. Rev. Environ Sci Technol*, 1-39.
- Weiner, S., & Dove, P. M. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochem*, 54(1), 1-29.
- Wilson, L. R. (2011). Determination of trace element provenance, Rio Loa basin, northern Chile. Master's Thesis, Western Carolina University, Cullowhee, NC, USA.
- Yachkula, A., Rozova, O., Abashina, T., Vainshtein, M., Grouzdev, D., & Bulaev, A. (2022). Attempts to stimulate leaching activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain TFBk. *Minerals*, 12(8), 1051.
- Yan, L., Hu, H., Zhang, S., Chen, P., Wang, W., & Li, H. (2017). Arsenic tolerance and bioleaching from realgar based on response surface methodology by *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from Wudalianchi volcanic lake, northeast China. *Electron. J. Biotechnol.*, 25, 50-57.
- Yang, M., Zhan, Y., Zhang, S., Wang, W., & Yan, L. (2020). Biological materials formed by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and their potential applications. *Biotech*, 10(11), 1-9.

- Yang, Y., Tan, S. N., Glenn, A. M., Harmer, S., Bhargava, S., & Chen, M. (2015). A direct observation of bacterial coverage and biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* on chalcopyrite and pyrite surfaces. *Biofouling*, 31(7), 575-586.
- Yavari, M., Ebrahimi, S., Aghazadeh, V., & Ghashghaee, M. (2019). Kinetics of different bioreactor systems with *Acidithiobacillus ferrooxidans* for ferrous iron oxidation. *React Kinet Mech Catal*, 128(2), 611-627.
- Ye, L., Wang, L., & Jing, C. (2020). Biotransformation of adsorbed arsenic on iron minerals by coexisting arsenate-reducing and arsenite-oxidizing bacteria. *Environ. Pollut.*, 256, 113471.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., y He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *Int J Mol Sci*, 20(14), 3423.
- Zakhar, R., Derco, J., & Čacho, F. (2018). An overview of main arsenic removal technologies. *Acta Chimica Slovaca*, 11(2), 107-113.
- Zárate, A., Dorador, C., Araya, R., Guajardo, M., Florez, J. Z., Icaza, G., ... y Valdés, J. (2020). Connectivity of bacterial assemblages along the Loa River in the Atacama Desert, Chile. *PeerJ*, 8, e9927.
- Zhang, S., Yan, L., Xing, W., Chen, P., Zhang, Y., & Wang, W. (2018). *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its potential application. *Extremophiles*, 22, 563-579.
- Zhang, Z., Bi, X., Li, X., Zhao, Q., & Chen, H. (2018). Schwertmannite: occurrence, properties, synthesis and application in environmental remediation. *RSC adv*, 8(59), 33583-33599.
- Zhang, Z., Yin, N., Du, H., Cai, X., & Cui, Y. (2016). The fate of arsenic adsorbed on iron oxides in the presence of arsenite-oxidizing bacteria. *Chemosphere*, 151, 108-115.
- Zhao, Y., Liu, D., Huang, W., Yang, Y., Ji, M., Nghiem, L. D., ... y Tran, N. H. (2019). Insights into biofilm carriers for biological wastewater treatment processes: Current state-of-the-art, challenges, and opportunities. *Bioresour Technol*, 288, 121619.
- Zhou, J. X., Zhou, Y. J., Zhang, J., Dong, Y., Liu, F. W., Wu, Z. H., ... & Qin, J. M. (2022). Effect of pH regulation on the formation of biogenic schwertmannite driven by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its arsenic removal ability. *Environ. Technol.*, 43(24), 3706-3718.

Zhu, J., Chen, F., & Gan, M. (2020). Controllable biosynthesis of nanoscale schwertmannite and the application in heavy metal effective removal. *Appl Surf Sci*, 529, 147012.

Zhu, M., Legg, B., Zhang, H., Gilbert, B., Ren, Y., Banfield, J. F., & Waychunas, G. A. (2012). Early stage formation of iron oxyhydroxides during neutralization of simulated acid mine drainage solutions. *Environ Sci Technol*, 46(15), 8140-8147.

Zlatkov, N., Nadeem, A., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2021). Eco-evolutionary feedbacks mediated by bacterial membrane vesicles. *FEMS Microbiol. Rev.*, 45(2), fuaa047.