



**Universidad Nacional del Comahue
Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud**

***Estudio de la capacidad biorremediadora de
bacterias extremófilas de Neuquén.***

Tesis para optar al título de Licenciado en Saneamiento y
Protección Ambiental

Eduardo Rubén Padilla
Neuquén, 2020

Neuquén, 2020

TESISTA

Eduardo Rubén Padilla

(Legajo 129.444)

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Guillermina Azucena Bongiovanni

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Roberto Daniel Pérez

FECHA DE APROBACION DE PLAN DE TESIS

Diciembre 2018

FECHA DE FINALIZACION DE LA TESIS

Septiembre 2020

Agradecimientos

A Dios por ser mi guía y sostén. A mi familia por haberme animado y ayudado durante todos estos años. A Guillermina y a Daniel quienes de manera altruista me han enseñado y motivado enormemente en este camino. Un enorme agradecimiento a la gente del PROBIEN y especialmente a Cele, Eva, Carmen y Vicky quienes con su buen humor y disposición, me introdujeron y dieron una mano cada día en el laboratorio. También son parte de esta tesis todos los que me cebaron mates e hicieron reír y sonreír durante estos años de estudio. Especialmente mi comunidad, que me alentó y acompañó espiritualmente en los altos y bajos.

Resumen

El agua es un recurso esencial para la vida y su contaminación induce toxicidad en muchas especies, incluyendo a los seres humanos. En particular, la contaminación natural o antrópica con arsénico (As) crea serios problemas de salud mundial. A pesar de la existencia de métodos de remediación físicos y químicos eficientes, la biorremediación los mejora en costos, insumos necesarios y desechos producidos. Por dicha razón, en la presente tesis se analizó la capacidad adsorbente y/o absorbente de As de un biofilm de microorganismos extremófilos pertenecientes a las aguas termales del Volcán Domuyo en la Patagonia Norte para determinar su potencial biorremediador. Caracterizándolo biológicamente y cultivándolo bajo distintas condiciones (iluminación, pH, temperatura), se concluyó que el biofilm denominado comunidad extremófila de Los Tachos presentó mayor crecimiento bajo las condiciones evaluadas en comparación con las comunidades de Aguas Calientes. Luego del ensayo de bioacumulación de As se determinó que la concentración de As había disminuido a niveles no detectables mediante el kit de QUANTOFIX® Sensitive Arsénico. Finalmente, el análisis por técnicas instrumentales (XRF) demostró que la concentración de As disminuyó con el tiempo de cultivo. Diversos resultados indicaron la necesidad de continuar con otras pruebas sobre esta comunidad.

Abstract

Water is an essential resource for human life and its contamination produces toxicity in many species, including human beings. Specially, natural or anthropic contamination with arsenic (As) brings serious health issues worldwide. There are many efficient physical and chemical remediation methods however, bioremediation outstands them in terms of costs, reagent requirements and waste generation. Therefore, the As adsorbent and/or absorbent capacity of a biofilm made by extremophile microorganisms, which belongs to the thermal springs of Domuyo Volcano in Northern Patagonia, was analyzed in order to evaluate its bioremediation capability. It was biologically characterized and cultivated under different conditions (lightning, pH, temperature), in conclusion the biofilm called extremophile community of “Los Tachos” displayed the biggest growing rate under the evaluated conditions against the community of “Aguas Calientes”. After the essay of As bioaccumulation, it was determined that the As concentration had decreased to imperceptible levels by QUANTOFIX® Sensitive Arsenic kit. Finally, the instrumental studies (by XRF) proved that the concentration of As, had declined through the culture time. Several results showed the need to do furthermore researches on this community.

Contenido

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	4
Introducción.....	7
Objetivos.....	10
Marco teórico y antecedentes.....	11
Metales pesados, el arsénico y su toxicidad.....	11
Arsénico en Neuquén, descripción del área de estudio.....	13
Métodos de remediación de Arsénico: ventajas y desventajas.....	15
Biorremediación por medio de biosorción.....	16
Microorganismos extremófilos de la Patagonia Norte.....	17
Materiales y Métodos.....	19
Toma de muestras.....	19
Condiciones estándares de crecimiento.....	20
Condiciones de crecimiento con diferente iluminación.....	20
Condiciones de crecimiento en diferentes pH.....	21
Otras condiciones de crecimiento.....	21
Ensayos de Biorremediación de agua contaminada con As.....	21
Determinación de la composición elemental de las cianobacterias por XRF.....	22
Caracterización de las Cianobacterias del Domuyo.....	23
Determinación de biomasa mediante la concentración de Clorofila A (ISO 1992).....	23
Análisis de los resultados.....	24
Resultados y Discusión.....	25
Condiciones estándar de crecimiento.....	25
Condiciones de crecimiento con diferente iluminación.....	25
Condiciones de crecimiento en diferentes pH.....	26
Curvas de crecimiento en condiciones óptimas de iluminación y pH.....	27

Otras condiciones de crecimiento.	28
Ensayo de biorremediación de agua contaminada con As.	28
Determinación de la composición elemental de las cianobacterias por XRF.	30
Determinación de biomasa mediante la concentración de Clorofila A (ISO1992).	30
Caracterización de las Cianobacterias del Domuyo.	31

Capítulo I.

Introducción

El agua es un recurso esencial para la vida y su contaminación induce toxicidad en muchas especies, incluyendo a los seres humanos. En particular, la contaminación natural o antrópica con arsénico (As) crea serios problemas de salud mundial, particularmente en el agua que es su principal medio de movilidad (hidroarsenismo). El As es un metaloide clasificado como carcinógeno humano de clase A y más de 200 millones de personas en 105 países de los 5 continentes (al menos 4 millones de argentinos) están expuestas crónicamente a concentraciones iguales o superiores al límite de 10 µg/L recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), (Bundschuh J et al., 2012; Bardach et al., 2015; Shakoor et al., 2017). El As no se degrada, por lo que sus diversas formas inorgánicas presentes en el agua se transmiten a plantas y animales por biomagnificación a través de la cadena alimentaria. Después de la ingestión por humanos y otros animales, el As se absorbe en el tracto gastrointestinal, se une a los glóbulos rojos y se distribuye a los principales órganos de todo el cuerpo para experimentar una biotransformación (Thomas et al., 2001; Vahter 2002; Khairul et al., 2017; Herath et al., 2018). La exposición crónica a As da lugar a su acumulación y la de sus metabolitos en varios órganos como el cerebro, el bazo, el riñón y el hígado (Pérez et al., 2006 y 2008; Rubatto Birri et al., 2010; Soria et al., 2017; Mardirosian et al., 2017; Lamela et al., 2018 y 2019; Ramos Elizagaray et al., 2018; Bongiovanni et al., 2019). Este elemento y principalmente sus metabolitos inducen estrés oxidativo, disfunción metabólica, daños al ADN y a otras macromoléculas, promoviendo efectos generalizados en la salud, y en particular el cáncer en humanos (Soria et al., 2007-2018; Grasso et al., 2011; Naranmandura et al., 2011; Mardirosan et al., 2015; Jan et al., 2015; Khairul et al., 2017; Yi et al., 2020). Así, la toxicidad del As es un grave problema de salud mundial. Esto ha obligado a la búsqueda de métodos físicos y

químicos para su remoción, que aunque son efectivos, como la ósmosis inversa, son de alto costo y generan grandes volúmenes de residuos contaminados con tóxicos persistentes. En este sentido, las bacterias son cada vez más usadas para la remediación de suelos y agua contaminada porque son procesos de remediación biosustentados, ecológicamente favorables y relativamente económicos (Gupta et al., 2016; Verma y Kuila, 2019).

Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para mantener la homeostasis y la resistencia a los metales pesados, como el As, para adaptarse en el ecosistema (Rahman et al., 2014; Ayangbenro y Babalola 2017). Sin embargo, el desarrollo de los cultivos y el posterior proceso de remediación implica el uso de nutrientes y energía.

Por esto es que actualmente, las investigaciones se están dirigiendo hacia el uso de cianobacterias. Estas son microorganismos fotoautótrofos que combinan la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, como las plantas, con características procariotas típicas, por lo que solamente requieren luz solar, CO₂ y minerales para formar gran cantidad de biomasa (Hayat et al., 2017). Además, estos microorganismos tienen una envoltura extracelular, compuesta principalmente de macromoléculas orgánicas complejas que impiden el ingreso de los contaminantes, mejorando su capacidad de sobrevivir en ambientes contaminados (Ayangbenro y Babalola, 2017). Esto muestra que las cianobacterias, podrían ser útiles en los procesos de remoción y recuperación de metales pesados disueltos como el As (Li et al., 2013; Chen et al., 2020).

En los últimos años, el grupo de investigación donde se realizó esta tesis describió un biofilm detectado en aguas termales del Volcán Domuyo, Provincia del Neuquén (Lamela et al., 2018 y 2019). Se trata de biofilms que habitan un ambiente de condiciones extremas de temperatura y concentración de metales pesados y arsénico. Los resultados preliminares sugirieron que se trata principalmente de cianobacterias, por lo que fueron denominados “Cianobacterias del Domuyo”

Neuquén, 2020

(Lamela et al., 2018 y 2019). Los estudios previos mostraron que esta comunidad es capaz de sobrevivir en agua con As a una concentración de hasta 900 $\mu\text{g/mL}$, a 85°C y otros metales tóxicos, con una bioacumulación de hasta 26 $\mu\text{g/g}$ de masa seca. La especiación se realizó utilizando fotones de sincrotrón de una energía específica para As, mediante la técnica SR-XRF-XANES (synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis combined with X-ray absorption near edge spectroscopy), encontrándose que una fracción del arsénico retenido es metabolizado hacia la forma Dimetilarsenato (DMA+V) sugiriendo absorción. El resto de As bioacumulado sería principalmente retenido en su forma inorgánica As(V), indicando una posible adsorción del elemento en su forma inorgánica, forma normalmente presente en el agua. Aunque debe destacarse que esta adsorción sería mediante interacciones fuertes, ya que el As no pudo ser desadsorbido con tratamientos agresivos como etanol 50% en agua con calentamiento a 60°C durante 45 minutos (Lamela et al., 2018). Estos antecedentes justifican la hipótesis y objetivos que se plantean a continuación.



El Biofilm en su estado natural en Aguas Calientes. (Foto propia)

Objetivos

HIPÓTESIS

A partir de la revisión de los antecedentes en el tema, se plantea la siguiente hipótesis, los biofilms de microorganismos extremófilos que habitan aguas termales del Volcán Domuyo en la Patagonia Norte, podrían ser usados para la biorremediación de agua contaminada con elementos tóxicos como el arsénico.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la capacidad adsorbente y/o absorbente de As de los biofilms de microorganismos extremófilos que habitan aguas termales del Volcán Domuyo en la Patagonia Norte para determinar su potencial biorremediador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar biológicamente los biofilms
- Optimizar las condiciones para el cultivo *in vitro* de los biofilms mediante ensayos con diferente iluminación, temperatura y pH.
- Medir la bioacumulación de As de los biofilms.
- Analizar la capacidad de remediación del agua por los biofilms.

Capítulo II.

Marco teórico y antecedentes.

Metales pesados, el arsénico y su toxicidad.

Los metales pesados son un grupo de metales y metaloides con una densidad atómica superior a los 4000 kg/m³. Estos son una de las causas de contaminación más comunes, tanto en agua como en suelo y el incremento en las concentraciones de metales pesados en el medio ambiente causa una creciente preocupación en la comunidad médica y científica. Principalmente porque son de naturaleza tóxica, lo que causa graves enfermedades a los seres humanos y los animales, incluso en muy baja concentración. La liberación de metales pesados en los sistemas acuáticos puede dar lugar a diversos procesos físicos, químicos y biológicos. Éstos pueden dividirse en dos clasificaciones generales que incluyen los efectos de los metales pesados en el medio ambiente y los efectos del medio ambiente en los metales pesados. La primera clasificación depende de las condiciones naturales y en gran medida de la concentración de especies de metales pesados en el agua. La segunda clasificación subraya que las condiciones de las aguas receptoras pueden provocar un ajuste en la especiación y la nocividad de los metales pesados (Harsha et al., 2019). Los cambios, como la biometilación y la disminución de la concentración de la forma inorgánica, son impactos del medio ambiente sobre los metales pesados y esto es particularmente relevante porque las formas metiladas suelen ser más tóxicas que las inorgánicas (Igiri et al., 2018).

Este es el caso del arsénico (As), que aunque su abundancia en la corteza terrestre es baja (0,0001%), los niveles de As en el ambiente son variables, ya que es un elemento con muy alta movilidad. Por lo que en algunas regiones, su concentración en el agua alcanza niveles tóxicos, como ocurre en Bangladesh, India, América Latina y aguas termales sobre geología volcánica (Bundschuh et al., 2012; Bardach et al., 2015; Shakoore et al., 2017; Lamela et al., 2018 y 2019). Lamentablemente, el ambiente puede afectar de diversas formas al As, pudiendo sorberse o desorberse de partículas, cambiar de estado de

oxidación al reaccionar con oxígeno u otras moléculas del aire, del agua o del suelo o por acción de microorganismos (Litter M et al., 2010). La presencia de elevados niveles de As en agua está directamente relacionada con su liberación desde la fase sólida, con fenómenos de transporte y de transferencia a otros medios, a procesos de dilución por mezcla (Litter M et al., 2010) o a procesos geotérmicos (Lamela et al., 2019). Debido a su alta movilidad en agua y su capacidad de transformación, el As está ampliamente distribuido en la biosfera, y todos los organismos tienen sistemas de detoxificación para este elemento. La biotransformación por metilación del As o de moléculas tioarsenicales es el principal proceso de detoxificación y ocurre tanto en los organismos acuáticos como en los terrestres, incluyendo al ser humano. Este proceso de detoxificación ha sido descrito en bacterias, algas, hongos, invertebrados y vertebrados, sin embargo, la naturaleza de dicha biotransformación puede mostrar ciertas diferencias según el organismo involucrado (Thomas et al., 2004; Singh et al., 2007; Yang y Rosen, 2016; Herath et al., 2018; De Loma et al., 2018). La metilación es tanto un proceso de detoxificación, como de activación del As. Mientras el As(V) metilado es menos tóxico y genotóxico que el As(V) inorgánico, el As(III) metilado es más tóxico y genotóxico que el As(III) inorgánico (Olmos y Ridolfi, 2018). Así, la exposición crónica al arsénico se ha asociado con el desarrollo de una amplia gama de enfermedades y problemas de salud en los seres humanos como cánceres (por ejemplo, de pulmón, piel, hígado, vejiga y riñón) y otros trastornos no malignos (por ejemplo, enfermedades respiratorias, cardiovasculares, diabetes, neurotoxicidad y enfermedades renales). La toxicidad del As y sus metabolitos se relaciona a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno intracelulares (ROS y NOS), que median múltiples cambios celulares al alterar las vías de señalización o causan un daño oxidativo directo a las moléculas como el ADN, y a las modificaciones epigenéticas (Hu et al., 2020). Aunque se ha descrito que los antioxidantes pueden reducir los niveles de ROS y NOS y prevenir en gran medida los daños inducidos por el arsénico (Soria et al., 2008, 2014, 2015, 2018; Ramos Elizagaray et al., 2018), la toxicidad del As sólo puede disminuirse, reduciendo la exposición a este elemento.

Arsénico en Neuquén, descripción del área de estudio

La Patagonia Norte es un territorio de aproximadamente 300.000 km², entre los paralelos 37° y 42° Sur en Argentina. La atraviesan los ríos Neuquén y Limay, que a la altura de la ciudad de Neuquén, confluyen formando el río Negro, el cual desemboca en el Océano Atlántico. Estos ríos nacen en la zona cordillerana. Particularmente, el río Neuquén, nace cerca del volcán Domuyo, un estratovolcán dormido del norte de la provincia de Neuquén (4707 m). El volcán Domuyo tiene el segundo mayor flujo advectivo de calor de cualquier sistema geotermal en el mundo después de Yellowstone. En su ladera oeste existen varias fuentes hidrotermales que fluyen hacia el río Varvarco, tributario del río Neuquén. Al sureste del Domuyo, también en la provincia de Neuquén, se encuentra el volcán Copahue, un estratovolcán activo (2997 m), donde nace el río Agrio (Lamela et al., 2018 y 2019). Al igual que en otras partes del mundo, donde la geología volcánica se relaciona a la presencia de arsénico en el agua, el arsénico en las aguas del Domuyo y el Copahue se asocia con el vulcanismo paleozoico y los procesos geotérmicos del Mesozoico temprano (Lamela et al., 2018 y 2019). Las mayores concentraciones de As (400-950 µg/L) se encontraron en aguas con 85°C, pH de 8.5 y alta conductividad en laderas del volcán Domuyo. Mientras que una menor concentración (250 µg/L) fue hallada en el río Agrio superior y (25 µg/L) en arroyos sobre la Formación Piedra del Águila, también de origen volcánico pero perteneciente al Jurásico (Lamela et al., 2019). En la imagen 1 se muestra un mapa con los diferentes sectores, las zonas de fuentes termales, las temperaturas geotermométricas entre otras características del área termal del Volcán Domuyo (Tomado de Pesce, 2013). En el mismo se pueden identificar los sectores de Aguas Calientes y de Los Tachos, de donde se recolectaron las muestras de microorganismos extremófilos.

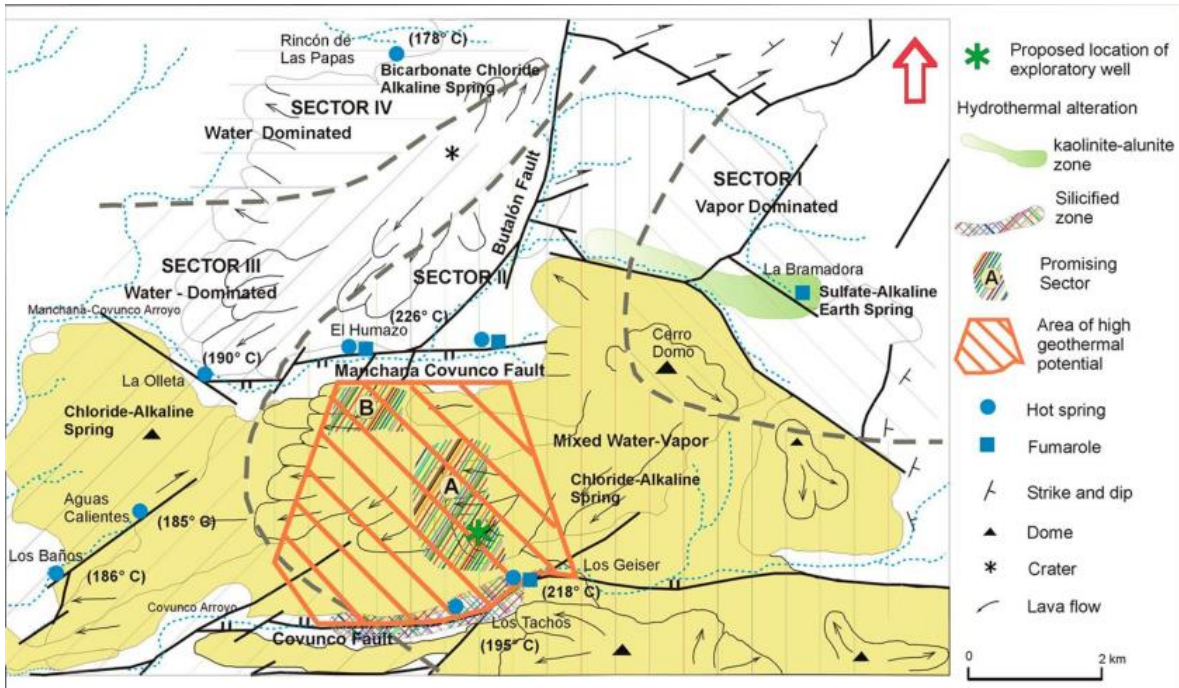


Imagen 1: Área Geotermal del Domuyo

En consecuencia, los puntos de muestreo fueron las fuentes de aguas termales presentes en las laderas del volcán Domuyo, en particular las llamadas “Los Tachos” y “Aguas Calientes”. Las cuales corresponden a diferentes sectores del sistema geotermal del Domuyo con diferentes características geológicas y geoquímicas. Es así que “Los Tachos” pertenece al Sector II (Imagen1) cuyas aguas termales son del tipo cloruro-alcalinas, ricas en sodio y cloruros con una relación K/Ca >1. Por otro lado, “Aguas Calientes” pertenece al Sector III, cuyas aguas son del tipo cloruro-alcalinas, ricas en sodio y cloruros, pero con menor concentración de potasio que el sector anterior (Pesce, 2013).

El protocolo de muestreo fue autorizado por el Sistema Provincial de Áreas Naturales Protegidas de Neuquén (Disposición ANPRF N° 04/2018 y ANP N° 0178/11), y el Ministerio para el desarrollo territorial de la provincia de Neuquén (Resolución COPADE No. 389/11). Para tramitar esta autorización de colecta científica en el 2019 se presentó el proyecto marco que se viene desarrollando en el

laboratorio de la Dra. Bongiovanni, directora de esta Tesis (detalles en Lamela et al., 2018 y 2020 y en la descripción de la Sección "Materiales y Métodos").

Métodos de remediación de Arsénico: ventajas y desventajas.

Existen varios métodos disponibles para la remoción de arsénico del agua en grandes plantas de tratamiento convencionales. Las tecnologías más usadas incluyen oxidación, co-precipitación y adsorción en flóculos coagulados, tratamiento con carbonato de calcio, adsorción en distintos medios, resinas de intercambio iónico y tecnologías de membrana. A escala más pequeña se aplican generalmente métodos como el intercambio iónico, adsorción sobre alúmina activada, ósmosis inversa, nanofiltración y electrodiálisis inversa o métodos solares, entre otros (Litter M. et al., 2010; Vardhan et al., 2019). Sin embargo, estos métodos son generalmente de alto costo de operación y mantenimiento y poco eficientes debido a que resultan en la acumulación de grandes cantidades de lodos, membranas o flóculos contaminados. Por lo tanto, es importante desarrollar un sistema robusto y ecológico con métodos de tratamiento económicamente viables para la eliminación de As (posiblemente capaz de remover metales pesados en general) del sistema acuático salvaguardando así el medio ambiente. Entre los factores para seleccionar una tecnología de remoción eficiente de As, el factor económico es uno de los más importantes. Mientras que, desde el punto de vista técnico, las características fisicoquímicas y microbiológicas del agua como los materiales disponibles en la región, deben considerarse para elegir el método más apropiado. La selección también dependerá grandemente de la especie química mayoritaria, la composición química del agua (otras especies químicas contenidas), el potencial de reducción, la dureza, la presencia de sílice, sulfatos, fosfatos, hierro, los volúmenes a ser tratados y el grado de sofisticación que pueda ser aplicado. No se debe dejar de considerar la manipulación y disposición final de los residuos generados (Litter M et al., 2010).

Biorremediación por medio de biosorción.

La biorremediación es un conjunto de técnicas utilizadas para la remoción de contaminantes ambientales del ecosistema. Utiliza los mecanismos biológicos inherentes a los microorganismos y las plantas para erradicar residuos peligrosos y disminuir su impacto ambiental. El principio básico de la biorremediación es la reducción de la solubilidad de estos contaminantes ambientales cambiando el valor de pH, utilizando reacciones redox o mediante la adsorción de los contaminantes del medio (Ojuederie et al., 2017). Su ventaja sobre la remediación tradicional radica en que la relación de costo beneficio por el uso de reactivos químicos y el consumo de energía es mucho menor mediante los métodos biológicos. Además se disminuye la liberación de productos secundarios tóxicos.

El proceso de biorremediación requiere del uso de microorganismos nativos, genéticamente modificados o bien adaptados a las condiciones en las que se trabajará. En particular, la biorremediación de metales pesados será más eficiente si se utiliza un consorcio o comunidad de bacterias en vez de la aplicación de una sola cepa (Kang et al., 2016). Una de las capacidades que se utiliza de los microorganismos es la biosorción que implica la remoción de metales pesados, compuestos y/o partículas de una solución por medio de materiales biológicos, mediante un proceso pasivo de adsorción ya sea por biomasa muerta o viva. La biosorción ofrece los siguientes beneficios: bajo costo operativo, alta eficiencia en la remoción de metales aún de soluciones muy diluidas, la posibilidad de la recuperación de los metales sorbidos de la biomasa y bajo volumen de desechos biológicos contaminados que hay que disponer (De Philippis et al., 2007). Los mecanismos por los cuales se realiza la biosorción, pueden ser dependientes del metabolismo del microorganismo o del lugar de la célula en donde se sorbe el metal. El primero utiliza organismos vivos y comprende mecanismos dependientes del metabolismo celular como el transporte a través de la membrana y la precipitación o independientes del metabolismo celular como son la complejización, el intercambio

iónico, la adsorción física y la precipitación. El segundo, en cambio, utiliza organismos vivos o muertos, y comprende la adsorción intracelular, la precipitación o adsorción en la superficie celular o extracelular (Gupta et al., 2016). En particular la adsorción o precipitación por secuestro de iones de los metales pesados se obtiene por una cubierta de macromoléculas orgánicas complejas sobre las superficies celulares que poseen los microorganismos como defensa ante condiciones de estrés medio ambiental (Sheng G.P et al., 2010).

Recientemente, ha crecido el interés en el uso de cianobacterias para biorremediación. Puesto que estas son un gran y variado grupo de microorganismos fotoautótrofos que combinan la capacidad de realizar una fotosíntesis oxigénica como una planta con las características típicas de un organismo procariota. La cubierta extracelular de las cianobacterias muestra algunas características típicas que las distingue de otras bacterias: normalmente contienen ácidos urónicos y grupos sulfato que le confieren una alta densidad de cargas negativas, apropiada para la interacción con iones metálicos (Micheletti et al., 2008). Además, las cianobacterias extremófilas son particularmente interesantes porque reúnen características distintivas debido a que los ambientes hostiles estimulan a los microorganismos a producir mecanismos más eficientes de bioadsorción para asegurar su supervivencia (Giovanella et al., 2020).

Microorganismos extremófilos de la Patagonia Norte.

En investigaciones previas se observó que los biofilms formados sobre rocas en arroyos contaminados con As del volcán Domuyo acumulan hasta 26.2 μg As por g de biofilm seco. Resultados preliminares sugieren que se trata de biofilms constituidos principalmente por cianobacterias que denominamos “Cianobacterias del Domuyo”. Estos microorganismos son del tipo extremófilo por tratarse de agua a 85°C, con hasta 950 $\mu\text{g/L}$ de As y otros elementos volcánicos tóxicos (Lamela et al., 2018 y 2019). En este trabajo previo también se evaluó el potencial uso de esta

comunidad como un posible biosorbente, se estudió la capacidad de retención de elementos. Para ello las muestras de microorganismos fueron sometidas a condiciones agresivas de extracción, se observó una alta capacidad de biosorción de elementos tóxicos. Más del 95% de elementos como Ti, V, Ga, Ge, Cr, Ni, Cu, Mn y As no pudo ser desadsorbido con extracción alcohólica y temperatura, previéndose un bajo “leaching” post-remediación (Lamela et al., 2018). Concluyéndose que deberían continuarse los estudios de estas “Cianobacterias del Domuyo” por su aparente capacidad de biorremediación, dando lugar a los estudios realizados en la presente tesis.

Capítulo III.

Materiales y Métodos

Toma de muestras.

En el mes de abril se recolectaron muestras de agua y de las “Cianobacterias del Domuyo” tanto en el paraje conocido como “Los Tachos”, como en la zona denominada “Aguas Calientes” en donde se tomaron de dos lugares que denominamos, “Naciente” y “Arroyo”. Debido a la alta concentración de As en la zona de muestro, las muestras de las comunidades, del tipo “biofilm” fueron recolectadas utilizando elementos de protección personal como guantes, gafas, guardapolvo de laboratorio y calzado de seguridad y guardadas en bolsas plásticas de muestreo. Estas fueron cerradas herméticamente y refrigeradas hasta el ingreso al laboratorio (Laboratorio de Biotecnología Ambiental del PROBIEN), donde fueron inmediatamente pasteurizadas a 60°C por 3h para prevenir contaminación por microorganismos ambientales no-termófilos. Las muestras de agua fueron filtradas con filtro de 0.22μ de poro para extraer las bacterias nativas, reservadas en envases estériles y mantenidas en frío durante su traslado al laboratorio y hasta su análisis dentro de los primeros dos días. Por otro lado, se determinó in situ la temperatura, el pH y la conductividad de las fuentes de agua termal.

Las Cianobacterias del Domuyo se separaron según el color o morfología, en las siguientes categorías (Tabla 1).

Tabla 1: Comunidades recolectadas		
Los Tachos	Aguas Calientes	
	Naciente	Arroyo
Blancas	Blancas	Marrón
Rojas	Rojas	Marrón estructurada
Verde filamentosa	Verde filamentosa	
Verde compacta	Verde compacta	

En el laboratorio, las muestras fueron divididas en tres fracciones. Una de las fracciones fue incubada en condiciones estándares de crecimiento (stock). Una segunda fracción fue congelada y mantenida a -12°C . La otra fracción fue congelada y secada en liofilizador para su posterior análisis por Fluorescencia de Rayos-X (XRF).

Condiciones estándares de crecimiento.

Las Cianobacterias del Domuyo fueron cultivadas en medio líquido recomendado para algas de agua dulce, terrestres, termales y de agua salada (Waterbury y Stanier, 1981).

Para preparar este medio, se utilizó medio comercial Hoagland suplementado con 0.31g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.6g/L de Citrato de sodio y 0.05g/L de CoCl_2 (pH=6). El medio fue esterilizado en autoclave y una vez frío, fue suplementado con 0.002mg/L de vitamina B12. Fracciones de aproximadamente 20-30g de cada comunidad fueron cultivadas en frascos de 100mL (Cultivo en Batch), dentro de una sala acondicionada a 25°C ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), con un régimen de iluminación luz:oscuridad de 16:8hs. Cada 14 días de cultivo, la biomasa fue filtrada y se renovó el medio, manteniéndose la proporción de 20-30g cada 50 mL de medio. Después de meses de adaptación, se determinó el peso húmedo del biofilm en cada recambio de medio para determinar la tasa de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. En todas las etapas se trabajó en cabina de bioseguridad y se mantuvieron las condiciones de esterilidad.

Condiciones de crecimiento con diferente iluminación.

Se evaluó el crecimiento de las comunidades cultivadas con distintos tipos de iluminación utilizando arreglos de LEDs rojo y azul en una proporción 2:1; rojos, azul y blanco en una proporción 2:1:1 (mantiene condición previa) y una luz compuesta de varias longitudes de onda, especial para el crecimiento vegetal. Fracciones de 5g de cada comunidad fueron cultivadas durante 10 días. El crecimiento fue determinado por peso húmedo.

Condiciones de crecimiento en diferentes pH.

Se realizaron curvas de crecimiento en medios de cultivo modificado con NaOH y HCL para lograr diferentes pH. Para la realización de las curvas de crecimiento, 5g de cada comunidad fue cultivado durante 14 días en medio de pH 5, 6 (mantiene condición original), 7 u 8.

Otras condiciones de crecimiento.

Para evaluar otras condiciones extremas de supervivencia, se analizó la viabilidad luego del congelamiento a -12°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).

Ensayos de Biorremediación de agua contaminada con As.

A partir de los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de crecimiento, se seleccionó para los ensayos de biorremediación la comunidad blanca de Los Tachos. Porciones de 5g fueron cultivadas por duplicado durante 7 y 9 días en medios conteniendo diferentes concentraciones de As ($0\mu\text{g/L}$ y $250\mu\text{g/L}$). También se realizaron controles del medio de cultivo con As, sin microorganismos, para evaluar alguna posible modificación del medio durante el periodo de incubación (Tabla 2). La concentración de As en el medio de cultivo se midió mediante QUANTOFIX[®] Sensitive Arsénico (rango $0.005\text{-}3.000\text{ mg/L As}$) de MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. La certeza del método fue controlada con soluciones de As elaboradas con patrones certificados (TraceCERT[®] standards de Sigma-Aldrich). La biomasa fue pesada para calcular el crecimiento y posteriormente fueron secadas en estufa a 50°C para analizar su composición elemental por Fluorescencia de Rayos-X.

Neuquén, 2020

Tabla 2: Diseño del ensayo de biorremediación.		
Rótulo	As [$\mu\text{g/L}$]	Tiempo de cultivo (días)
0-7	0	7
0-9	0	9
250-7	250	7
250-9	250	9
250-7*	250	7
250-9*	250	9
*: controles con medio de cultivo sin biofilms. Todos fueron realizados por duplicado		

Determinación de la composición elemental de las cianobacterias por XRF.

El análisis por XRF requiere el acondicionamiento de las muestras de comunidades termófilas en pastillas, para lo cual se realizaron tandas de secado, la primera apenas llegada al laboratorio, luego a los 3 meses de cultivo y a los 7 meses al finalizar el bioensayo. Las primeras muestras fueron liofilizadas (rotuladas como “liofilizadas”), mientras que las dos siguientes fueron secadas en estufa (rotuladas como “secadas”). Las muestras que formaron parte del ensayo de biorremediación para determinar su concentración de As, también fueron secadas en estufa. Tanto las muestras liofilizadas como las secas en estufa fueron molidas en mortero de ágata y prensadas en pastillas de 1.35cm de diámetro, a una presión de 150bar en una prensa hidráulica. Las mediciones por espectroscopía de Fluorescencia de Rayos X (XRF) se realizaron en el Laboratorio de Técnicas por Fluorescencia de rayos X No Convencional (LTFNC; Pérez et al., 2016) del Instituto de Física Enrique Gaviola, CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, bajo la supervisión del Dr. Roberto D. Pérez.

Para la obtención de los espectros de fluorescencia se usó un equipo convencional de XRF que cuenta con un detector de estado sólido de diodo de Si con un límite mínimo de detección (MDL) de 0.1 μg de As/g de peso seco. Las muestras se colocaron en el plano horizontal a 90° del haz incidente para minimizar

la dispersión y fueron excitadas con un haz monocromático de 17.44 keV de 2mm de diámetro. Para reducir el error estadístico a un nivel aceptable, se irradiaron ambos lados de cada pastilla con un tiempo de conteo por punto de 1800s (desviación estándar relativa <1%). Los espectros fueron procesados por el software PyMca (libre) desarrollado por el grupo de software de la Instalación Europea de Radiación Síncrotrón (Solé et al., 2007).

Para la cuantificación de los elementos en las pastillas, se usó el método de parámetro fundamental calibrado con materiales de referencia certificados. Para la cuantificación de As en las muestras líquidas (muestras de agua del lugar) se utilizó una solución de cloruro de estroncio (SrCl₂) como estándar interno. Los resultados de concentración de elementos se expresaron como µg/g de peso seco.

Caracterización de las Cianobacterias del Domuyo.

Las muestras fueron fijadas con formol (50% final) para analizar su morfología por observación al microscopio óptico. La viabilidad fue determinada por tinción con diacetato de fluoresceína (DAF) y observación en microscopio de fluorescencia. Para su caracterización, las muestras fueron colocadas en portaobjetos y se tiñeron con tinción de Gram o se observaron al microscopio de fluorescencia para detectar emisión natural de la clorofila u otros pigmentos fluorescentes en cianobacterias.

Determinación de biomasa mediante la concentración de Clorofila A (ISO 1992)

La clorofila será extraída con etanol 90% a 75°C durante 5min. La absorbancia del extracto filtrado será medida en espectrofotómetro a 665 y 750nm (A). Luego de acidificar el extracto con HCl 0.12 N se realiza nuevamente la lectura de absorbancia a 665 y 750nm (Aa). La concentración de clorofila se calcula como

$\mu\text{g/L} = 29.6 * ((A_{665} - A_{750}) - (Aa_{665} - Aa_{750})) * V_e / V_m * L$ (donde V_e = volumen de etanol y V_m = volumen de la muestra).

Análisis de los resultados.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, se repitieron al menos 2 veces y se incluyeron los controles adecuados. Los datos fueron expresados como promedio \pm error estándar y se evaluaron mediante modelos de ANOVA seguidos por la prueba de Tukey ($p < 0.05$) y coeficientes de Pearson (PC) para establecer correlaciones entre resultados a diferentes concentraciones de As, pH, luz.

Capítulo IV.

Resultados y Discusión

Condiciones estándar de crecimiento.

Todas las muestras fueron cultivadas en las condiciones descritas como “estándar” desde su colecta en abril hasta junio con el fin de acondicionarlas a las condiciones *in vitro*, seleccionar las más aptas y disminuir la carga de metales pesados. Luego de ese periodo de adaptación, se observó que únicamente las comunidades extremófilas blancas de Los Tachos y las verdes y blancas de Aguas Calientes presentaron crecimiento indicando mejor adaptación a las condiciones *in vitro*. Las muestras blancas de Los Tachos, por haber mostrado crecimiento, y las muestras blancas de Aguas Calientes, por la cantidad con la cual se disponía, fueron seleccionadas para la continuación del trabajo. Esta selección también permitió realizar una comparación significativa entre comunidades similares de diferentes sitios de muestreo.

Condiciones de crecimiento con diferente iluminación.

Cuando se evaluó el crecimiento con diferente iluminación, se observó que aunque el crecimiento de las comunidades de Aguas Calientes se mantuvo poco satisfactorio, el arreglo de LED rojos, azul y blanco con una proporción 2:1:1 fue significativamente el mejor (Tabla 3), comparado con los LED rojos, azul en una proporción 2:1, y particularmente con iluminaciones compuesta de varias longitudes de onda (arreglo comercializado para crecimiento de plantas).

Por el contrario, las comunidades de Los Tachos muestran mayor crecimiento. El mejor resultado se observó bajo la luz compuesta de varias longitudes de onda y en segundo lugar, bajo el arreglo de LEDs rojos, azul y blanco en la proporción 2:1:1 (Tabla 3). Este resultado sugiere que las comunidades de Los Tachos podrían necesitar una mayor densidad de flujo de fotones fotosintéticos. Esto

posiblemente se relacione a la baja concentración de clorofila de estas comunidades claras, a las que se denominaron “blancas”. Estos resultados son coherentes con varios estudios que han descrito que las cianobacterias utilizan la luz azul de forma menos eficiente para la fotosíntesis que la mayoría de los fotótrofos eucariotas (Luimstra et al., 2018). Esto sugiere que se necesitarán estudios futuros para analizar los efectos de la iluminación con diferentes longitudes de onda, a fin de determinar la mejor combinación requerida por cada comunidad. No obstante, la comunidad de Los Tachos también aumentó su biomasa aún en oscuridad, mostrando la capacidad de almacenamiento de recursos en este biofilm para su crecimiento en circunstancias adversas.

Tabla 3: Crecimiento de dos Comunidades del Domuyo en distintas condiciones de Iluminación			
Comunidad Extremófila	A	B	C
	[%Biohum]	[%Biohum]	[%Biohum]
Los Tachos	3 ± 2.5	11.73 ± 2.07	43.82 ± 1.94
Aguas Calientes	6.86 ± 2.18	10.12 ± 14.8	2.61 ± 0.51
A(proporción de LEDs rojo: azul 2:1); B(proporción de LEDs rojo:azul:blanco 2:1:1); C (luz compuesta de varias longitudes de onda); [%Biohum] Porcentaje de crecimiento de biomasa húmeda.			

Condiciones de crecimiento en diferentes pH.

Luego de seleccionar las condiciones óptimas de iluminación, las mismas fueron usadas para evaluar el cultivo a diferentes pH. Los pH inferiores a 5 produjeron la disolución completa de los componentes del medio, mientras que los pH superiores a 8 lo alteraron generando un precipitado color marrón que fue considerado como “medio oxidado”. Se determinó que los biofilms de Los Tachos crecieron mejor a pH 6 y 7 mientras que los biofilms de Aguas Calientes crecieron mejor a pH 7 y 8 (Tabla 4). Lo cual corresponde con los valores de pH de su ambiente nativo, obtenidos durante el muestreo, Los Tachos pH 6 y Aguas Calientes pH 7.

Tabla 4: Crecimiento de dos Comunidades del Domuyo en distintos pH

Diferentes pH				
Comunidad	5	6	7	8
Extremófila	[%Biohum]	[%Biohum]	[%Biohum]	[%Biohum]
Los Tachos	34.14 ± 0.11	42.86 ± 0.12	43.23 ± 0.2	30.47 ± 0.13
Aguas Calientes	12.89 ± 7.5	19.26 ± 3.66	21.71 ± 1.5	24.70 ± 4.56
[%Biohum] Porcentaje de crecimiento de biomasa húmeda.				

Curvas de crecimiento en condiciones óptimas de iluminación y pH.

Se observó que los biofilms blancos presentaron un crecimiento exponencial diferente. Las comunidades de Los Tachos mantuvieron durante dos meses una buena tasa de crecimiento con cada recambio del medio de cultivo, habiendo pasado cuatro meses desde su colecta (Gráfico 1). Después de ese periodo, la tasa de crecimiento disminuyó. Mientras que las comunidades de Aguas Calientes (Gráfico 1) perdieron rápidamente su capacidad de proliferación *in vitro* observándose un aumento casi nulo de la biomasa (peso) entre los recambios del medio de cultivo. Esto podría deberse a una baja viabilidad compensada por la pérdida progresiva de biomasa posiblemente por muerte celular, relacionada a una iluminación inadecuada (resultados del párrafo anterior). Es sabido que la luz es un factor esencial para el desarrollo de biomasa de organismos fotoautótrofos. La pérdida de biomasa podría también estar relacionada a otros factores no evaluados. Por lo tanto, se observó que las comunidades de Los Tachos demuestran mejores condiciones de adaptación para su cultivo *in vitro*, mientras que las comunidades de Aguas Calientes serían más afectadas por el estrés provocado por el recambio de medio o las modificaciones que sufrieron al ingresar al laboratorio (temperatura, pH, nutrientes disponibles, régimen de luz, etc.).

Neuquén, 2020

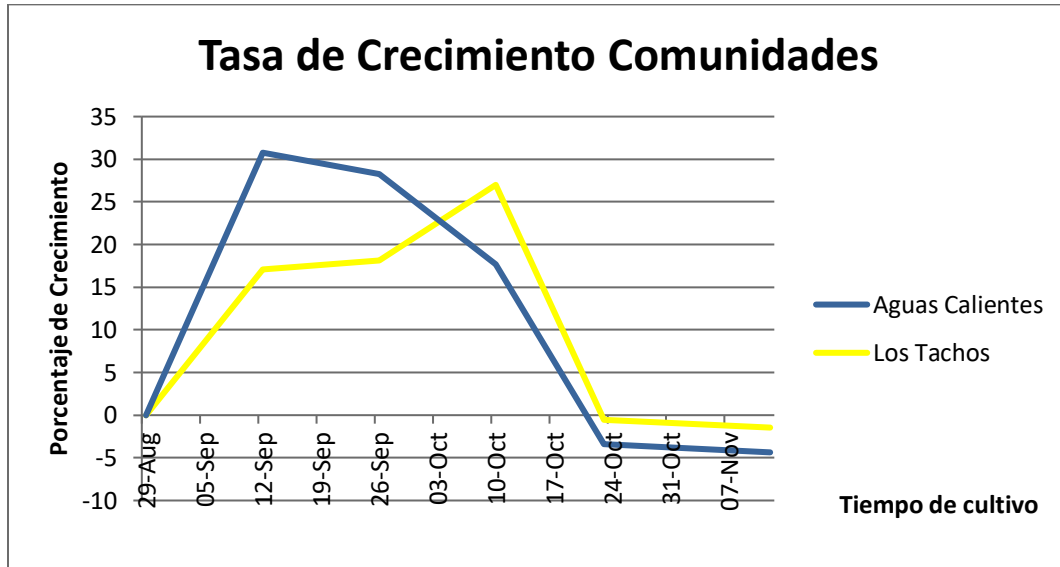


Gráfico 1: Tasa de Crecimiento de las Comunidades

Otras condiciones de crecimiento.

Especímenes de todas las muestras de biofilms de Los Tachos y de Aguas Calientes fueron guardadas a -12°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) durante seis meses. Después de este periodo de exposición al frío, los biofilms presentaron un aspecto sólido que se perdió con el aumento de temperatura dado por las condiciones del cultivo *in vitro*. Sin embargo, su estructura permaneció intacta, lo cual sugiere una capacidad del biofilm para mitigar la exposición a tensiones externas como en este caso la ocasionada por la cristalización del agua. Estos tratamientos ayudan a determinar la capacidad de sobrevivencia de estos microorganismos a diferentes condiciones extremas y son de gran relevancia para identificar formas de vida con características especiales. Una vez descongeladas durante 24 hs, se las pasteurizó y cultivó durante 6 semanas. Durante todo ese tiempo, no se observó viabilidad en los cultivos en las condiciones experimentales ensayadas.

Ensayo de biorremediación de agua contaminada con As.

La capacidad que tienen estos microorganismos para resistir condiciones extremas de temperatura y altas concentraciones de metales tóxicos y también de

As, los hacen adecuados para ensayos de biorremediación. En cuanto al crecimiento que presentaron los biofilms, se pudo observar que la tasa de crecimiento *in vitro* fue afectada por el tiempo de cultivo y por la presencia de As (Tabla 5). Este resultado ya había sido descrito en condiciones estándar y óptimas *in vitro*, principalmente para la comunidad blanca de Aguas Calientes pero en este caso también fue significativa para la comunidad de Los Tachos. Aquellos que estuvieron menos tiempo y sin As agregado, presentaron mayor crecimiento. Por el contrario aquellos que estuvieron más tiempo y fueron cultivados con 250µg/L de As, mostraron el menor crecimiento.

La medición de la concentración de As en el sobrenadante indica una posible capacidad de secuestro de As del medio por parte del biofilm, sin liberación al medio. Esto es así, porque el As no fue detectado, tanto para las muestras que poseían 250µg/L de As, como para aquellas a las cuales no se les agregó As. En otras palabras, la concentración de As en el medio, para todas las determinaciones en presencia de biofilm fue menor de 0.005mg/L de As, límite de detección del kit de As QUANTOFIX® Sensitive Arsénico. Resultados similares y en condiciones similares de cultivo, han sido descritos con bacterias que habitan otros ambientes con altos contenidos de As.

Tabla 5: Crecimiento en ensayo de biorremediación			
Rótulo	As [µg/L]	Tiempo de cultivo [días]	Crecimiento [%]
0-7	0	7	14.25 ± 0.12
0-9	0	9	10.32 ± 0.37
250-7	250	7	10.57 ± 3.4
250-9	250	9	1.38 ± 6.6

Determinación de la composición elemental de las cianobacterias por XRF.

Los resultados de las mediciones por XRF (Tabla 6) indican una disminución en la concentración de As a medida que aumentó el tiempo de cultivo. Las “liofilizadas” fueron las primeras en ser preparadas para pastilla y luego continuaron las “secadas” para dar paso a la serie obtenida del ensayo de biorremediación con menor concentración de As. Tomando en cuenta los resultados descritos en el título anterior, es factible que esta disminución haya ocurrido por el crecimiento de nuevas células que no habían sido expuestas a su ambiente natural con As.

Tabla 6: Medición de la concentración de As en las pastillas.	
Pastillas	Concentración de As [mg/L]
0-7	9.27
0-9	10.84
250-7	13.02
250-9	6.82
Liofilizada (abril)	23.27
Secadas (Julio)	13.51
Std*	26
*Standard, muestra caracterizada previamente, datos publicados en Lamela et al.,2018	

Determinación de biomasa mediante la concentración de Clorofila A (ISO1992).

Usualmente las cianobacterias poseen clorofila A, por lo que estos miembros de la comunidad pueden ser identificados por su fluorescencia natural (entre otros criterios). Sin embargo, al haberse seleccionado las comunidades blancas para continuar los ensayos *in vitro*, se halló que la concentración de Clorofila A estaba por debajo del límite de detección de esta técnica colorimétrica. Este resultado se relaciona a la habilidad de las cianobacterias de adaptarse a las condiciones

ambientales. Otros estudios indican que las cianobacterias cultivadas con diferente luz, pueden cambiar la redistribución del flujo de energía entre los dos fotosistemas que impulsan la fotosíntesis, pudiendo utilizar otros pigmentos diferentes a la clorofila. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se está considerando como herramienta para evaluar la viabilidad y la identificación en trabajos próximos, la determinación de pigmentos accesorios como las ficocianinas (color azulado) o ficoeritrinas (color rojo).

Caracterización de las Cianobacterias del Domuyo.

Los análisis morfológicos mostraron que la comunidad termófila está constituida principalmente por las cianobacterias, que presentan fluorescencia natural, posiblemente por la presencia de clorofila. Por otro lado, al realizar la tinción con DAF se observó fluorescencia verde (Imagen 5), y otros colores que emiten en distintas longitudes de onda, por lo que no descartamos la presencia de pigmentos accesorios, al ser estos fluorescentes (Wu J. et al., 2019).

Por medio de la tinción Gram positiva y negativa, así como el uso de tinta china, se determinó la presencia de diatomeas (Imágenes 2 y 3), bacterias (cocos) y hongos (Imagen 4), que se presume, estarían formando un consorcio junto con las cianobacterias.

Neuquén, 2020

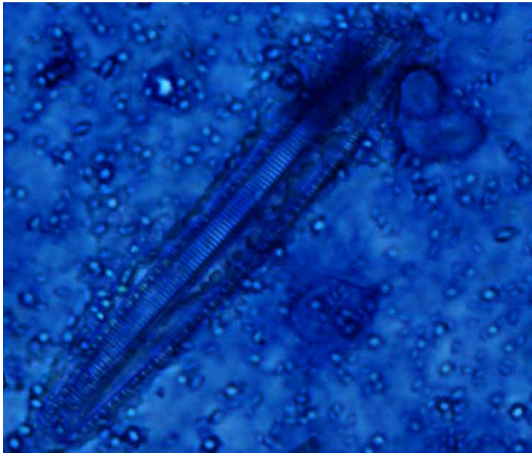


Imagen 2, Diatomea

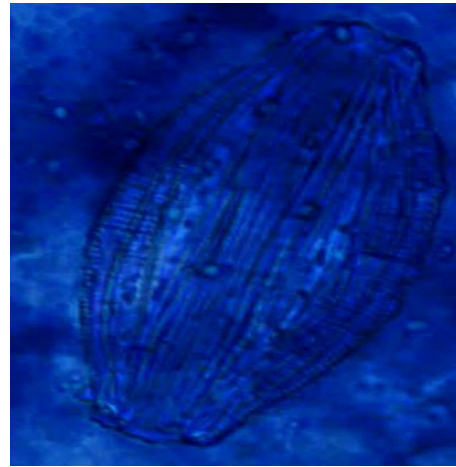


Imagen 3, Diatomea

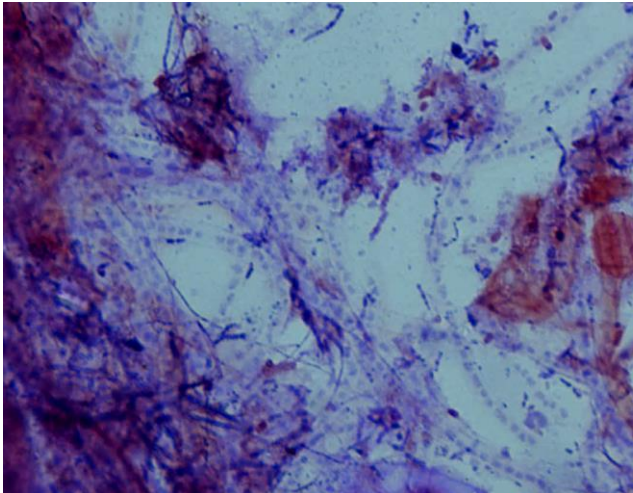


Imagen 4, Cianobacterias y bacterias

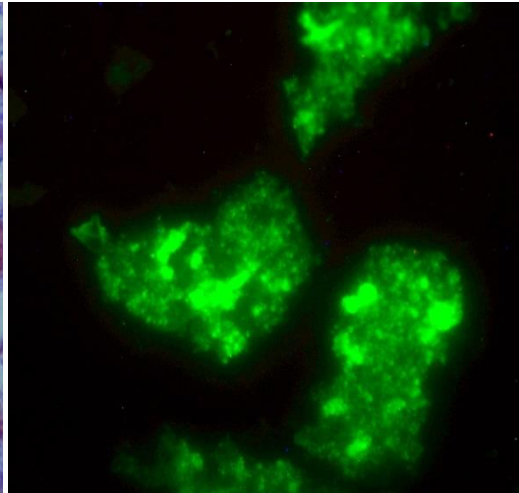


Imagen 5, Fluorescencia verde con DAF

Conclusiones

Tras los resultados obtenidos de las experiencias realizadas, se comprobó que la comunidad extremófila de Los Tachos denominada “blanca” mostró una mejor adaptación a las condiciones *in vitro* y obtuvo mejores resultados tanto para las diferentes iluminaciones utilizadas, cuanto para el cultivo a diferentes pH. A pesar de no haber sido viable luego de ser expuesta a bajas temperaturas, sí demostró crecimiento en la oscuridad. Con respecto a esto, se observó que presumiblemente sus rasgos extremófilos aporten la resistencia necesaria para seguir estudiando su posible uso como biorremediador. Por su parte, los bioensayos realizados con As sugieren que la interacción entre el biofilm y el As resultarían en el secuestro y posible retención del metal pesado. Mientras que los resultados en relación a pigmentos fotosintéticos y los análisis morfológicos llevados a cabo son preliminares y necesitan ser ampliados para llegar a una conclusión.

Por lo expuesto se puede decir que hay mucho trabajo por hacer, que ese trabajo se enmarcará en una tesis de doctorado para dar continuidad a estas investigaciones y que estos biofilms tienen características únicas que sugieren diversas aplicaciones innovadoras. *“Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida”*, Santa Madre Teresa de Calcuta.

Bibliografía citada

- Ayangbenro A. A. and Babalola O. O.(2017). Review: A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 94; <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Bardach AE, Ciapponi A, Soto N, Chaparro MR, Calderon M, Briatore A, Cadoppi N, Tassara R, Litter MI. (2015). Epidemiology of chronic disease related to arsenic in Argentina: A systematic review. *Sci Total Environ.* 538: 802-816. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.070>
- Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H.B., Jean, J.-S., Liu, C.-W., López, D., Armienta, M.A., Guilherme, L.R.G., Gomez Cuevas, A., Cornejo, L., Cumbal, L., Toujaguez, R., 2012. Review: one century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Sci. Total Environ.* 429, 2–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>
- Bongiovanni GA, Pérez RD, Mardirosian M, Pérez CA, Queralt I. (2019). In situ imaging based on X-ray fluorescence allow the visualization of renal accumulation of arsenic at the parenchymal, cellular and subcellular levels after chronic exposure. *Applied Radiation and Isotopes.* 150: 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.05.018>
- Chen J, Wei J, Ma C, Yang Z, Li Z, Yang X, Wang M, Zhang H, Hu J, Zhang C (2020). Photosynthetic bacteria-based technology is a potential alternative to meet sustainable wastewater treatment requirement?. *Environ Int.* 2020. doi: 10.1016/j.envint.2019.105417.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd: Cu and Pb for different pH values, *J. Hazard. Mater.* 151: 185-193
- De Loma J, Skróder H, Raqib R, Vahter M, Broberg K. (2018). Arsenite methyltransferase (AS3MT) polymorphisms and arsenic methylation in children in rural Bangladesh. *Toxicol Appl Pharmacol.* 357: 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.020>
- De Philippis, R., and Vincenzini M. (2003). Outermost polysaccharidic investments of cyanobacteria: nature, significance and possible applications. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 7:13–22.
- Drobna, Z., Narenmandura, H., Kubachka, K.M., Edwards, B.C., Herbin-Davis, K., Styblo, M., Le, X.C., Creed, J.T., Maeda, N., Hughes, M.F., Thomas, D.J., 2009. Disruption of the arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene in the mouse alters the phenotype for methylation

- of arsenic and affects distribution and retention of orally administered arsenate. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1713–1720.
- Flemming H.C. and Wingender J. The biofilm matrix: A review. *Nature Reviews Microbiology* (2010), 8, 623-633
- Gamboa-Loira B, Cebrián M, Franco-Marina F, López-Carrillo L. (2017) Arsenic metabolism and cancer risk: A meta-analysis. *Environmental Research*, Vol 156, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.016>.
- García Botija S. (2016). El Arsénico en las aguas naturales y su incidencia en la salud (Tesis de grado). Facultad de Biología, Ciencias Ambientales y Química; Universidad de Alcalá.
- P. Giovanella, G.A.L. Vieira, I. V. Ramos Otero, E. PaisPellizzer, B. de JesusFontes, L.D. Sette, Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms, *J. Hazard. Mater.* 382 (2020) 121024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>.
- Grasso E.J., Bongiovanni G.A., Pérez R.D., Calderón R.O. (2011) Pre-cancerous changes in urothelial endocytic vesicle leakage, fatty acid composition, and As and associated element concentrations after arsenic exposure. *Toxicology.* 284(1-3): 26-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.009>;
- P. Gupta, B. Diwan, Review Article Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal : A Review on biosynthesis , mechanism and remediation strategies ., *Biotechnol. Reports.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>.
- Gupta, A.; Joia, J.; Sood, A.; Sood, R.; Sidhu, C.; Kaur, G. Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: A review. *J. Microbiological Biochemical Technology* 2016, 8, 364–372
- K. Harsha, P. Senthil, R.C. Panda, A review on heavy metal pollution , toxicity and remedial measures : Current trends and future perspectives, *J. Mol. Liq.* 290 (2019) 111197. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>
- Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol.* 2005 Apr; 79(4):183-91. [10.1007/s00204-004-0620-x](https://doi.org/10.1007/s00204-004-0620-x)
- Hayat K, Menhas S, Bundschuh J, Chaudhary HJ. (2017). Review: Microbial biotechnology as an emerging industrial wastewater treatment process for arsenic mitigation: A critical review. *Journal of Cleaner Production* 151: 427-438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.084>

- Herath I, Vithanage M, Seneweera S, Bundschuh J. 2018. Review article: Thiolated arsenic in natural systems: What is current, what is new and what needs to be known. *Environment International* 115: 370–386. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.027>
- Hu Y., J. Li, B. Lou, R. Wu, G. Wang, C. Lu, H. Wang, J. Pi, Y. Xu, The Role of Reactive Oxygen Species in Arsenic Toxicity, *Biomolecules*. 10 (2020) 240. <https://doi.org/10.3390/biom10020240>.
- Huang M, Douillet C, Styblo M. (2019) Arsenite and its trivalent methylated metabolites inhibit glucose-stimulated calcium influx and insulin secretion in murine pancreatic islets. *Archives of Toxicology* 93:2525–2533. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02526-2>
- B.E. Igiri, S.I.R. Okoduwa, G.O. Idoko, E.P. Akabuogu, A.O. Adeyi, I.K. Ejiogu, Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review, *J. Toxicol.* 2018 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>.
- Jan A, Mudseer A, Kehkashan S, Arif A, Inho C, Qazi H. (2015). Review: Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 29592–29630; <http://dx.doi.org/10.3390/ijms161226183>.
- Kang, C.-H.; Kwon, Y.-J.; So, J.-S. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecol. Eng.* 2016, 89, 64–69; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023>
- Khairul I, Wang QQ, Jiang YH, Wang C. (2017). Review: Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotarget* 8(14): 23905-23926.
- Kocadal K, Alkas FB, Battal D. 2020. Cellular pathologies and genotoxic effects arising secondary to heavy metal exposure: A review. *Hum Exp Toxicol.* 39(1):3-13. doi: <https://doi.org/10.1177/0960327119874439>
- Litter M., Sancha A.M., Ingallinella A.M. “Tecnologías económicas para el abatimiento de arsénico en aguas”. IBEROARSEN-CYTED 2010
- Lamela PA., Pérez RD., Pérez CA., and Bongiovanni GA. (2018). Use of synchrotron radiation x-ray fluorescence and x-ray absorption spectroscopy to investigate bioaccumulation, molecular target and biotransformation of volcanic elements. *X-Ray Spectrometry* 1-15. <http://dx.doi.org/10.1002/xrs.2843>
- Lamela PA., Julio A. Navoni, Roberto D. Pérez, Carlos A. Pérez, Cristian L. Vodopivec, Antonio Curtosi, Guillermina A. Bongiovanni. (2019). Analysis of occurrence, bioaccumulation and molecular targets of arsenic and other selected volcanic elements in Argentinean Patagonia and Antarctic ecosystems- *Science of the Total Environment* 681; 379-391 -: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.096>

- Luimstra, V.M., Schuurmans, J.M., Verschoor, A.M., Hellingwerf, K.J., Huisman, J., Matthijs, H. Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. *Photosynth Res* 138, 177–189 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0561-5>
- Mardirosian MN. (2015). Ecotoxicología del arsénico y mecanismos de acción en el desarrollo del anfibio *Rhinella arenarum* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Micheletti E, Pereira S, Mannelli F, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P, De Philippis R. (2008). Sheathless Mutant of Cyanobacterium *Gloeotheca* sp. Strain PCC 6909 with Increased Capacity To Remove Copper Ions from Aqueous Solutions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9): 2797-2804. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02212-07>
- Minatel B, Sage AP, Anderson C, Hubaux R, Marshall EA, Lam WL, Martinez VD. 2018. Review article: Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environment International* 112: 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.017>
- Naranmandura, H., Rehman, K., Le, X.C., Thomas, D.J., 2013. Formation of methylatedoxyarsenicals and thioarsenicals in wild-type and arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice exposed to arsenate. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 1885–1891
- Olmos V.(2016). Estudio de factores que regulan la biotransformación del arsénico en poblaciones expuestas crónicamente (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Olmos y Ridolfi, (2018). Review: Hydroarsenicism: Mechanisms of action related to arsenic toxicity. *Acta Toxicol. Argent.* 26(1): 32-44.
- Pérez R., Rubio M, Pérez CA., Eynard AR., GA. Bongiovanni. (2006) Study of the effects of chronic arsenic poisoning on rat kidney by means of synchrotron microscopic X ray fluorescence analysis. *X Ray Spectrom*, 35(6): 352-358. doi: <https://doi.org/10.1002/xrs.918>
- Perez R., P. N. Rubatto Birri, M. Rubio, C. A. Perez y G. A. Bongiovanni. (2008) Microanálisis por fluorescencia de rayos X por radiación Synchrotron de hígado y páncreas de ratas bajo exposición crónica de arsénico. *Avances en Análisis por Técnicas de Rayos X*, vol.14, 283-288. ISSN 1515-1565.
- R.D. Perez, G.E. Falchini, F. Cometto Vincente, L. Soares, M.E. Poletti, H.J. Sánchez (2018). A new XRF spectrometer using a crystal monochromator and parallel plates beam guides. *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research B* 440 (2019) 48–53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2018.11.030>

- Pesce A.H. (2013). The Domuyo Geothermal Area, Neuquén, Argentina. GRC Transactions, Vol. 37(309-313).
- Prieto D. M., Devesa-Rey R., Rubinos D. A., Díaz-Fierros F., Barral M. T.. (2013). Arsenate Retention by Epipsammic Biofilms Developed on Streambed Sediments: Influence of Phosphate. *BioMed Research International* 2013, Article 591634, 10 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/591634>
- Rahman S, Kim KH, Saha SK, Swaraz AM, Paul DK. (2014). Review of remediation techniques for arsenic (As) contamination: A novel approach utilizing bio-organisms. *Journal of Environmental Management* 134: 175-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.027>
- Rubatto Birri N., Pérez R.D., Cremonozzi D., Pérez C.A., Rubio M., Bongiovanni G.A., (2010) Association between Cu and As renal cortex accumulation and physiological and histological alterations after chronic arsenic intake. *Environ. Res.* 110: 417-423 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.09.002>
- Ramos Elizagaray S.I., Quiroga PL., Pérez R.D., Pérez C.A., Bongiovanni G.A., Soria EA., (2018). Effect of the aqueous extract of *Lantana grisebachii* Stuck. against bioaccumulated arsenic-induced oxidative and lipid dysfunction in rat splenocyt. *Journal of Dietary Supplements* 1-7. <http://dx.doi.org/10.1080/19390211.2018.1470124>
- Shakoor, M.B., Nawaz, R., Hussain, F., Raza, M., Ali, S., Rizwan, M., Oh, S.E., Ahmad, S., 2017. Review: human health implications, risk assessment and remediation of As contaminated water: a critical review. *Sci. Total Environ.* 601–602, 756–769.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.223>
- Singh N., Kumar D., Sahu AP. (2007). Arsenic in the environment: Effects on human health and possible prevention. *Journal of Environmental Biology*, 28(2):359-365.
- Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review, *Biotechnol. Adv.* 28: 882-894.
- Solé et al., (2007) CHARMed PyMca, Part I: A Protocol for Improved Inter-laboratory Reproducibility in the Quantitative ED-XRF Analysis of Copper Alloys [10.1111/arcm.12282](https://doi.org/10.1111/arcm.12282)
- Soria EA, Pérez RD, Queralt I, Pérez CA and Bongiovanni GA. (2017). Immunotoxicological effects of arsenic bioaccumulation on spatial metallomics and cellular enzyme response in the spleen of male Wistar rats after oral intake. *Toxicol. Lett.* 266: 65-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.014>

- Scotta, Ana Veronica; Bongiovanni, Guillermina Azucena; Soria, Elio Andres; (2017). Actividad moduladora in vitro de extractos acuosos de plantas americanas sobre la toxicidad inducida por clorpirifos en esplenocitos murinos; Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas; *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas*; 74; 4; 12-2017; 325-330.
<http://hdl.handle.net/11336/64213><https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/15361>
- Soria EA, Pérez RD, Queralt I, Pérez CA., Bongiovanni GA. (2017). Immunotoxicological effects of arsenic bioaccumulation on spatial metallomics and cellular enzyme response in the spleen of male Wistar rats after oral intake. *Toxicol. Lett.* 266: 65-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.014>
- Soria EA, Bongiovanni GA, Díaz Luján C, Eynard AR. (2015). Effect of arsenic on nitrosative stress in human breast cancer cells and its modulation by flavonoids. *Nutrition and Cancer: An International Journal.* 67(4): 659-663. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2015.1019637> .ISI: 3.29.
<http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2015.1019637>
- Soria Elio Andrés, Patricia Liliana Quiroga, Claudia Albrecht, Sabina Irantxu Ramos Elizagaray, Juan Jose Cantero and Guillermina Azucena Bongiovanni. (2014). Development of an antioxidant phytoextract of *Lantana grisebachii* with lymphoprotective activity against in vitro arsenic toxicity. *Adv. Pharmacol. Sci.* Volume 2014, Article ID 416761, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/416761>
- Soria Elio A., Eynard Aldo R., and Bongiovanni Guillermina A. (2010). Cytoprotective effects of silymarin on epithelial cells against arsenic-induced apoptosis in contrast with quercetin cytotoxicity. *Life Sciences.* 87(9-10):309-315. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.07.007>
- Soria Elio A., Eynard Aldo R., and Bongiovanni Guillermina A. (2010). Modulation of early stress-related biomarkers in cytoplasm by the antioxidants silymarin and quercetin using a cellular model of arsenic acute poisoning. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 107(6):982-7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00615.x>
- Soria E.A., Goleniowski M.E., Cantero J.J., Bongiovanni G.A. (2008) Antioxidant activity of different extracts of Argentinean medicinal plants against arsenic-induced toxicity in renal cells. *Human Exp. Toxicol.* 27: 341-346.
doi:<https://doi.org/10.1177/0960327108092192>
- Thomas D.J., Waters S.B., Styblo M. (2004) Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198: 319– 326.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.020>

- Taylor V, Goodale B, Raab A, Schwerdtle T, Reimer K, Conklin S, Karagas MR, Francesconi KA. 2017. Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Sci. Total Environ.* 580, 266–282. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.113>
- Vardhan KH, Kumar PS, Panda RC. (2019). Review: A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids* 290: 111197. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111197>.
- Vahter M., Concha G. (2001). Role of Metabolism in Arsenic Toxicity. *Pharmacology & toxicology.* 89. 1-5. 10.1111/j.1600-0773.2001.890101.x.
- Verma, Kuila, Bioremediation of heavy metals by microbial process, *Environ. Technol. Innov.* 14 (2019) 100369. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>.
- Waterbury, J. B., Stanier, R. Y. (1981). Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments. *The Prokaryotes*, 7, 221-223.
- WHO <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
- Wu J, Lu Y, Ren N, Jia M. (2019) DNAzyme-Functionalized R-Phycoerythrin as a Cost-Effective and Environment-Friendly Fluorescent Biosensor for Aqueous Pb²⁺ Detection. *Sensors* 2019, 19, 2732; doi:10.3390/s19122732
- Yang., Rosenb. (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomed J.* 39(1): 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.08.003>
- Ye J, Rensing C, Rosen BP, Zhu Y-G. 2012. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* 17(3): 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.12.003>.
- Yi Y, Gao S, Xia J, Li C, Zhao Y, Zhang Y, Liang A, Ji S. (2020) Study of the accumulation and distribution of arsenic species and association with arsenic toxicity in rats after 30 days of oral realgar administration. *J Ethnopharmacol.* 247:111576. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.037>;