



Revista AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica

Volúmen 1, número 3, año 2007 ISSN 0718-378X
PP

ROL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA ESPECIACIÓN QUÍMICA DEL ARSÉNICO: ANÁLISIS DE SEDIMENTOS DEL RÍO CAMARONES, I REGIÓN. CHILE

ROLE OF THE MICROORGANISMS IN THE CHEMICAL
SPECIATION OF ARSENIC: ANALYSIS OF SEDIMENTS OF CAMARONES RIVER,
I REGION. CHILE

Guisella Niní Escalante Tresierra
Víctor Leandro Campos Araneda
Cristian Andrés Valenzuela Valenzuela
Jorge Yañez Toloza
María Angélica Mondaca Jara

ABSTRACT

The biogeochemical cycle of arsenic depends on microbial transformation, which affects the mobility and distribution of arsenic species in the environment, and might influence in the toxicity of arsenic.

The aim was to study the microbial redox transformations of arsenic in Camarones river sediments. The biological transformation of arsenic was observed in column experiments. The detection of As (III) and As (V) was carried out for HPLC/HG/QAAS. Identification of the isolates was achieved by RapID (REMEL. INC). A qualitative KMnO₄ method was used to investigate redox activity. The arsenic tolerance was carried out by serial dilution on agar plate. The *arsC* genes were detected by PCR. The sediments induced with arsenite showed a light decrease of As (III) concentration. On the other hand, when they were induced with arsenate there was a significant transformation of As(V) to As(III). 49 bacterial strains were isolated whose tolerance levels varied among <10 and 20 mM for As (III) and among 50 and 1000 mM for As (V). Of these, the highest percentage corresponded to the reducing bacteria (55%), 4% to oxidizer bacteria, 8% presented both activities and in 33% of the bacteria none activity was detected. The *arsC* gene was detected in 9 strains. In the sediment samples exists, a biological activity responsible for the arsenic transformation, this activity would be given mainly by heterotrophic arsenate reducing bacteria and in smaller proportion for arsenite oxidizing bacteria.

Keys words: arsenic, arsenate, arsenate-reductase, arsenite

II-Escalante-Chile-1

ROL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA ESPECIACIÓN QUÍMICA DEL ARSÉNICO: ANÁLISIS DE SEDIMENTOS DEL RÍO CAMARONES, I REGIÓN. CHILE

Guisella Niní Escalante Tresierra⁽¹⁾. Bióloga. Magíster en Ciencias, mención Microbiología (C) Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Chile

Víctor Leandro Campos Araneda⁽²⁾. Biólogo. Magíster en Microbiología. Doctorado en Ciencias Ambientales, mención en Calidad del agua y Conservación de Sistemas Acuáticos Continentales (C). Colaborador Docente Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Cristian Andrés Valenzuela Valenzuela⁽³⁾. Biólogo Marino. Magíster en Ciencias, mención Microbiología (C). Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Chile

Jorge Yañez Toloza⁽⁴⁾. Bioquímico. Doctor en Química. Profesor Asociado. Departamento de Química Analítica e Inorgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Concepción. Chile.

Claudio Zaror Zaror⁽⁵⁾. Ingeniero Químico. Doctor en Ingeniería Química. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de Concepción. Chile.

María Angélica Mondaca Jara⁽⁶⁾. Bioquímico. Magíster en Microbiología. Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Titular. Directora del Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Chile.

Dirección (1): Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Casilla 160-C. Correo 3. Concepción. Chile. Tel. 56-41-204118. fax. 56-41-245975. guiescalante@udec.cl.

RESUMEN

Los microorganismos presentes en suelos y ambientes acuáticos juegan un rol fundamental en el ciclo biogeoquímico del arsénico, lo que influye en el comportamiento ambiental del metaloide, ya que las diferentes especies químicas del arsénico muestran diferencias en la solubilidad o biodisponibilidad y en la toxicidad. El objetivo del presente trabajo fue conocer las propiedades redox de las bacterias presentes en sedimentos del río Camarones y relacionar el rol que jugarían en la especiación y movilidad del metaloide. La transformación biológica del As, en los sedimentos, fue estudiada en experimento en columna. La detección de As III y As V se realizó por HPLC/HG/QAAS. Las bacterias aisladas desde muestras de sedimentos fueron identificadas mediante el sistema RapID (REMEL. INC). Las propiedades redox se investigaron cualitativamente utilizando KMnO₄. La determinación de la tolerancia a arsénico se realizó mediante dilución seriada en placa y la detección de los genes *arsC* se realizó mediante PCR. Los resultados muestran que en los sedimentos inducidos con arsenito hubo una baja transformación de As (III), en cambio cuando fueron inducidos con arsenato hubo una transformación significativa de As(V) a As(III). Se aislaron 49 cepas bacterianas cuyos niveles de tolerancia variaron entre <10 y 20 mM para As (III) y entre 50 y 1000 mM para As (V). De estas, el mayor porcentaje correspondió a bacterias reductoras (55%), el 4% a bacterias oxidantes, un 8% presentó ambas actividades y en un 33% de las bacterias ensayadas no se detectó ninguna actividad. El gen *ars C* se detectó solamente en 9 cepas bacterianas. De los resultados obtenidos se concluye que en las muestras de sedimento existe una actividad biológica responsable de la transformación de arsénico, la que estaría dada principalmente por bacterias heterotróficas reductoras de arseniato y en menor proporción por bacterias oxidantes de arsenito.

PALABRAS CLAVE

Arsénico, arsenito, arseniato, arseniato-reductasa

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un elemento tóxico, que se distribuye extensa, pero irregularmente en la Tierra: atmósfera, hidrosfera, suelos, sedimentos y organismos vivos. Las fuentes naturales de arsénico ambiental incluyen el volcanismo, la actividad hidrotérmica y la erosión de rocas sedimentarias e ígneas (que contienen arsénico, como parte de sus constituyentes) por acción atmosférica (Kulp et al. 2004). La acción antropogénica, por su parte, constituye una segunda fuente de arsénico en el medio, entre las cuales se encuentran el uso de químicos agrícolas: como pesticidas y herbicidas, preservativos para madera, residuos de la fundición y explotación minera (Welch *et al.* 2000). En áreas industrializadas, los crecientes niveles de arsénico como residuo pueden resultar seriamente perjudiciales para las comunidades humanas y ecológicas ubicadas en las cercanías (Jackson et al. 2003).

La contaminación por arsénico de las fuentes de agua subterránea y acuíferos destinados a agua potable, representan un peligro significativo para el medio ambiente y eventualmente para la salud de millones de personas en todo el mundo (Welch et al. 2000, British Geological Survey, 2001). En Chile, el aumento de la actividad minera, ha producido una cantidad considerable de material de desecho, dentro del cual se incluye al arsénico, parte de estos desechos se dispersa en el aire, agua, sedimento y suelo. Las mayores concentraciones de arsénico ambiental se han encontrado en el norte del país (Romero et al. 2001), y particularmente el alto nivel del metaloide en el agua ha afectado seriamente la salud de la población (Smith et al. 1998).

La quebrada Camarones, se encuentra aproximadamente a 100 Km al sur de la ciudad de Arica, alberga un angosto y sinuoso valle de 150 Km. de longitud con una superficie aproximada de 4.500 hectáreas. Este valle, es recorrido por el río Camarones, de limitado caudal y alimentado por las lluvias altiplánicas estivales, constituyendo el principal recurso hídrico para consumo humano y regadío y el que muestra los mayores niveles de arsénico (Mansilla et al. 2002).

Los efectos toxicológicos del arsénico están relacionados a su forma química y a su estado de oxidación; las formas orgánicas son menos tóxicas. El arsénico en su forma inorgánica, puede presentarse en dos estados redox: la forma reducida, arsenito (AsIII), y la forma oxidada, arseniato (As V). Ambos estados son tóxicos para la mayoría de los organismos. En el ambiente, el arsenito es la forma química más soluble y más móvil y por lo tanto es la forma más tóxica. El arseniato, a diferencia del arsenito, se fija fuertemente a la superficie de varios minerales comunes, tales como ferrihidrita y alúmina. (Smedley, P.L., Kinniburgh, D. G. 2002).

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

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

El sistema de resistencia a arsénico que más se ha estudiado en microorganismos es el sistema de los genes *ars*. (Götz, F., et al.1983). Este sistema, consiste en una serie de tres o más genes que

codifican para un sistema de eflujo transmembranal y una arsenato reductasa. El operón incluye un gen regulador (*ars R*), un gen codificante para una bomba de expulsión transmembranal específica para arsenito (*ars B*) y un gen que codifica para una arsenato reductasa (*arsC*) (Ji, G., et al. 1993). El operón *ars* se ha descrito en *Staphylococcus aureus* y otras bacterias, ya sea en plásmidos o formando parte del cromosoma bacteriano. Dentro de las Proteobacterias, la resistencia a arsénico mediada por el sistema *ars* ha sido descrita en *Escherichia coli* (Carlin, A., et al. 1995; Diorio, C., et al. 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Cai, J., et al 1998), *Yersinia spp* (Neyt, C., et al. 1997; Bansal, N., et al 2000), *Acidiphilum multivorum* (Susuki, K., et al. 1997; Susuki, K., et al. 1998), *Thiobacillus ferrooxidans* (Butcher, B.G., et al. 2000), *Acidithiobacillus caldus* (Dopson, M., et al. 2001).

En sistemas suelo-agua el ciclo redox del As(V) y As(III) es muy importante, pero poco se conoce del rol de las estrategias bacterianas en la detoxificación del As versus el metabolismo del mismo para la conservación de energía. Por esta razón, se hace necesario comprender el posible mecanismo y la diversidad microbiana asociada al ciclo redox del arsénico.

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue conocer las propiedades redox de las bacterias presentes en sedimentos del río Camarones caracterizado por la contaminación natural con arsénico, y relacionar el rol que jugarían en la especiación y movilidad del metaloide.

METODOLOGÍA

Obtención de Muestras

Se tomaron muestras de sedimento del río Camarones (I Región), Chile, las cuales fueron trasladadas, en condiciones de refrigeración, al laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción.

Influyente

El influente fue preparado de acuerdo a lo sugerido por Skerman, V.B.D. (1967): NH_4NO_3 (1.25 mM), CaSO_4 (2 mM), MgCl_2 (2 mM), KH_2PO_4 (10 μM), KOH (1.25 mM), FeCl_2 (5 μM), glucosa (5mM) suplementado con micronutrientes y vitaminas (Newman, D.K., 1997).

Transformación bacteriana del arsénico

Se realizaron experimentos en columnas que contenían una mezcla de 5% de sedimento y 95% de arena estéril a las cuales se les hizo pasar un influente adicionado con NaH_3AsO_3 (75 μM) (columna I); adicionado con NaH_2AsO_4 (250 μM) (columna II). Como Control se realizó el mismo experimento en ausencia de As (columna III). Las columnas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 días (Macur, R. Et al, 2004)

Detección de As (III) y As (V)

Las transformaciones biológicas del arsénico fueron monitoreadas cada tres días, durante todo el

experimento. Se tomó una muestra de 2mL del efluente de cada columna, fue centrifugado a 10,000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se filtró través de un filtro milipore 0.2.um. La presencia y cantidad de los diferentes estados inorgánicos del As se determinó utilizando la técnica de cromatografía líquida a alta presión (HPLC) acoplada a la formación de arsina gaseosa realizando la detección por absorción atómica en cubetas de cuarzo (HPLC/HG/QAAS) (Kumaresan y Riyazuddin, 2001)

Aislamiento de bacterias cultivables

Se tomó una muestra, de cada columna, de aproximadamente 1g de la mezcla sedimento/arena y se agregó 10mL de agua estéril, se sonicó durante 5 minutos. Diluciones adecuadas se sembraron por diseminación en agar Luria y McConkey. Se realizaron recuento de células viables por la técnica de la microgota (Da Silva, R., 1996). La identificación bacteriana se realizó mediante la determinación de la afinidad tintorial y propiedades bioquímicas

Investigación de propiedades redox

Las cepas seleccionadas fueron crecidas en el medio para organismos heterótrofos con As (III) (500µM) y con As (V) (1000µM), durante 48 horas a 25°C. A 5 ml de cultivo de cada cepa con As (III) y As (V) se adicionó 60 µl de KMnO₄ (0,01 M). (Salmassi, T. et al, 2002)

Determinación de tolerancia a arsénico

La determinación de la tolerancia a arsénico se realizó mediante la técnica de dilución seriada en placa (NCCL, 1992). Se utilizó agar Luria con concentraciones variables de As (III) entre 0.5 y 100 mM y Arsénico (V) entre 0.5 y 1000 mM. Cada una de las placas se inoculó con diluciones apropiadas de los cultivos bacterianos de 24 h de incubación. Como control, se inocularon placas con agar Luria sin arsénico. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 24 a 48 h.

Detección de genes *ars C*

El ADN total fue extraído mediante ruptura celular por congelamiento, el ADN extraído fue utilizado como templado para la amplificación por PCR. Los partidores utilizados fueron: *arsC-1-F* (5'-GTAATACGCTGGAGATGATCCG-3') y *arsC-1-R* (5'-TTTTCTGCTTCATCAACGAC -3') de acuerdo a lo descrito por Saltikov y Olson. (2002)

RESULTADOS

Al analizar las muestras, de los experimentos en columnas mencionados anteriormente, se encontró que en los sedimentos inducidos con arsenito (columna I) hubo una baja transformación de As (III). Después de 6 días, de incubación a medida que disminuye el As (III) aparece una baja concentración de As (V) (Fig. 1).

0

1000

2000

3000

4000
 5000
 6000
 0 3 6 9 12

Tiempo (días)

Concentración de As (ppb)

As (III) ppb

As (V) ppb

Figura 1: Actividad oxidativa de sedimentos enriquecidos con As (III) (75 uM) (columna I)

En las muestras de sedimentos inducidos con arseniato (columna II) se observa una gran actividad reductora, a medida que disminuye el As (V) en el medio aparece As (III) (Fig. 2). En el experimento control (columna III) no se detectó actividad oxidante y/o reductora significativa. Estos resultados demuestran que las transformaciones redox del arsénico se deben a la actividad biológica presente en los sedimentos.

0
 5000
 10000
 15000
 20000
 25000
 0 3 6 9 12

Tiempo (días)

Concentración de As (ppb)

As (III) ppb

As (V) ppb

Figura 2: Actividad reductora de sedimentos enriquecidos con As (V) (250uM) (columna II)

Desde muestras de sedimento, obtenidas de los experimentos en columna, se aislaron 49 cepas bacterianas y el 100% de ellas correspondió a bacilos Gram negativos. Al ensayar las propiedades oxidantes y/o reductoras, se encontró que el 55% reducen As (V), el 4% oxidan As (III), un 8% presenta ambas actividades y un 33% de las bacterias ensayadas no presentó actividades redox (Tabla 1).

Tabla 1: Actividades redox de bacilos Gram negativos heterotróficos resistentes a arsénico

Nº cepas Porcentaje (%) Actividad *

Reductora Oxidante

27 55 + -

2 4 - +

4 8 + +

16 33 - -

Total 49 100

* Análisis cualitativo con KMnO₄

Al estudiar los niveles de tolerancia, de las bacterias seleccionadas, se encontró que estos variaron entre <10 y 20 mM para As (III) y entre 50 y 1000 mM para As (V) (Figura 3). Los niveles de tolerancia para arsenito fueron significativamente inferiores, en comparación con los de arseniato, existen bacterias que son capaces de tolerar 1000 mM. Esta concentración de arsenato es alta comparada con lo informado por otros autores. Por ejemplo, Anderson y Cook (2004) aislaron una cepa bacteriana con un nivel de tolerancia a arsenato de 100 mM.

0
 5
 10
 15
 20
 25
 30

Nº de cepas

2 4 6 8 10 20 40

Concentración de As (mM)

As III

A

0 2 4 6 8

10

12

14

16

18

Nº de cepas

50 100 200 400 800 1000

Concentración de As (mM)

As V

Figura 3: Niveles de resistencia a As (III) (A) y As (V) (B) de 49 cepas de bacilos Gram negativos aislados de sedimento del río Camarones

La presencia de genes *arsC* (arsenato reductasa) se investigó mediante PCR, amplificándose un fragmento de aproximadamente 370 bp que corresponde a lo descrito en literatura (Figura 4). De las 49 cepas ensayadas se detectó el gen *ars C* en 9 de ellas. Las cepas restantes parecen no poseer genes de resistencia a arsénico, probablemente posean las secuencias *arsC*, pero estas serían diferentes a las secuencias de los primer utilizados.

Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR utilizando partidores *arsC*-1-F

y *arsC*-1-R. Carril 1, cepa 1 ; 2, cepa 11 ; 3, cepa 18 ; 4, cepa 20 ;5, cepa 29; 6, cepa 31; 7, cepa 37; 8, cepa 39; 9, cepa 54 ; 10, cepa 58 ; 11, cepa 62 ; 12, cepa 71 ; 13, cepa 87 ; 14, cepa

90 ;15, cepa 99 ; 16, cepa 103.

De los resultados obtenidos se concluye que en las muestras de sedimento existe una actividad biológica responsable de la transformación de arsénico, la que estaría dada principalmente por bacterias heterotróficas reductoras de arseniato y en menor proporción por bacterias oxidantes de arsenito.

La reducción de arsenato a As (III) ha sido detectada en muchas bacterias aeróbicas aisladas de suelos contaminados con arsénico(Macur, R.E. et al, 2001; Jones, C.A., 2000), lo que sugiere que la resistencia a As (V) juega un rol importante en el ciclo biogeoquímico de este elemento en la naturaleza (Inskeep, W.P. et al, 2002).

La contribución de los microorganismos a la biogeoquímica del arsénico en el ambiente, es extensa e implica varias reacciones de oxidación, reducción, metilación, y demetilación de sus especies químicas dominantes. Quizás desde una perspectiva ecológica, se puede considerar que

B

es solo el flujo de energía ligado al metabolismo del arsénico el que se traduce en la capacidad para hacer trabajo biológico (por ej. crecimiento celular). Por lo tanto la ecología del arsénico se puede considerar "simple" en el sentido que se basa predominantemente en las transformaciones microbianas entre sus estados de oxidación +3 y +5. Pero a pesar de la simplicidad del ciclo, entender el rol de los microorganismos en la movilidad hidrológica del arsénico en las aguas es altamente complejo y de crítica importancia para la salud de millones de personas alrededor del mundo.

CONCLUSIONES

Las muestras de sedimento del río Camarones presenta una actividad biológica responsable de la transformación de arsénico, la que está dada principalmente por la presencia de bacterias heterotróficas reductoras de As(V) y oxidantes de As(III).

La especiación y movilización del arsénico, en el ambiente, depende de una serie de factores, dentro de los cuales la bacterias resistentes a arsénico juegan un rol importante en el ciclo biogeoquímico del As presente en el ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por Proyecto DIUC N° 204.036.027-1.0. y Proyecto FONDECYT N° 1050088.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anderson, C. R., Cook, G. M. Isolation and characterisation of arsenate reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *Current Microbiology*, 48, 341-347. 2004.
2. BANSAL, N., SINHA, I., VIRDI, J.S., Arsenic and cadmium resistance in environmental isolates of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia*. *Canadian Journal Microbiology.*, 46, 481. 2000.
3. BUTCHER, B.G., DEANE, S.M., RAWLINGS, D.E., The Chromosomal Arsenic Resistance Genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an Unusual Arrangement and Confer Increased Arsenic and Antimony Resistance to *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 1826. 2000.
4. CAI, J., SALMON, K., DUBOW, M.S. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli* *Microbiology*, 144, 2705. 1998.
5. CARLIN, A., SHI, W., DEY, S., ROSEN, B.P. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *Journal Bacteriology*, 177, 981. 1995.
6. DA SILVA R. Técnica de Microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, 1-7. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 1996.
7. DIORIO, C., CAI, J., MARMOR, J., SHINDER, R., DUBOW, M.S. An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *Journal Bacteriology*, 177, 2050. 1995.
8. DOPSON, M., LINDSTROM, E.B., HALLBERG, K.B. Chromosomally encoded arsenical resistance of the moderately thermophilic acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Extremophiles*, 5, 247. 2001.
9. EHRlich, H.L. Bacterial oxidation of As (III) compounds. *Environmental Chemistry of Arsenic*, Marcel Dekker, New York. Pp. 313-327. 2002.
10. GÖTZ, F., ZABIELSKI, J., PHILIPSON, L., LINDBERG, M. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 9, 126. 1983.
11. JACKSON, C., JACKSON E.F., DUGAS, S.L., GAMBLE, K, WILLIAMS, S. E. Microbial transformations of arsenite and arsenate in natural environments. *Recent Research Developments in Microbiology*. 7: 103-118. 2003.
12. JI, G., SILVER, S., GARBER, E.A.E., OHTAKE, H., CERVANTES, C., CORBISIER, P. *Biohydrometallurgical Techniques*, A.E. Torma, M.L. Apel, and C.L. Briery (Ed.), The Minerals, Metals & Materials Society, Warrendale, 529. 1993.
13. JONES, C.A.; LANGNER, H.W; ANDERSON, K., MCDERMOTT, T.R., INSKEEP, W.P. Rates of Microbially Mediated Arsenate Reduction and Solubilization . *Soil Science Society American Journal*. 64, 600. 2000.
14. KUMARESAN M., RIYAZUDDIN P. Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current Science*, vol. 80, NO. 7, 10 april 837. 2001.
15. INSKEEP W.P., MCDERMOTT, T.R., FENDORF, S. Arsenic (V) / (III) cycling in soils and natural waters: Chemical and microbiological processes. *Environmental Chemistry of Arsenic*, W.T. Frankenberger Jr., Ed Dekker, New York, pp 183-215. 2002.
16. MACUR, R.E.; WHEELER, J.T.; MCDERMOTT, T.R.; INSKEEP, W.S. Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environmental Science. Technology*. 35, 3676. 2001.

17. MACUR, R.E., COLIN, J., BOTERO, I., MC DERMOTT, T.R., INSKEEP, W. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environmental Science. Technology.*, 38, 101-111. 2004.
18. MANSILLA, H.D., CORNEJO, L., LARA, F., YAÑEZ, J., LIZAMA, C., FIGUEROA., L. Manual de Remoción de Arsénico por Oxidación Solar, capítulo 2: Remoción de Arsénico de Aguas del río Camarones, Arica, Chile. AICD, OEA. 2002.
19. MULLER, D., LIÈVREMONT, D., SIMEONOVA, D., HUBERT, J.C, LETT, M.C. Arsenite oxidase *aox* Genes from a Metal-Resistant B-Proteobacterium. *Journal Bacteriology* 185: 135-141. 2003.
20. NEWMAN, D. K.; BEVERIDGE, T. J.; MOREL, F. M. M. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2022-2028. 1997.
21. NEYT, C., IRIARTE, M., HA THI, V., CORNELIS, G.R. Virulence and Arsenic resistance in *Yersinia*. *Journal Bacteriology*, 179, 612. 1997.
22. Nriagu, J.O. Arsenic in the Environment. Parts I & II. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1994.
23. ROMERO L., ALONSO H., ESPINOZA S., CAMPANO P., FANFANI L., CIDU R., LORRAI M., LOPEZ L., FERREIRA, R.E. Arsenic and boron contamination in the Loa basin (northern Chile). *Proceedings WRI-10*, Cidu (Ed), Balkema Publishers-The Netherlands 1127-1130. 2001.
24. SALMASSI, T.M., VENKATESWARAN, K., SATOMI, M., NEALSON, K., NEWMAN, D., HERING, J. Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. Nov., Isolated from Hot creek, California. *Geomicrobiology Journal*, 19:53-66. 2002.
25. SALTIKOV, CH. W., OLSON, B. Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* Genes in Arsenic-Resistant Bacteria Isolated from Raw Sewage and Arsenic-Enriched Creek Waters *Applied and Environmental Microbiology*, p. 280-288 Vol. 68, No. 1. Jan. 2002.
26. SKERMAN, V. B. D., A guide to the identification of the genera of bacteria; The Williams and Wilkins Co.: Baltimore, MD. 1967.
27. SMEDLEY, P. L. KINNIBURGH, D. G. A Review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemical*. 17: 517-568. 2002.
28. SMITH, A.H., GOYCOLOLEA, M., HAQUE, R Y M.L. BIGGS.. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *American Journal of Epidemiology* 147: 660-669. 1998.
29. Stolz, J.F., Basu, P., Oremland, R.S. Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium: *International Microbiology*, v. 5, p. 201 – 207. 2002.
30. SUSUKI, K., WAKAO, N., SAKURAI, Y., KIMURA, T., SAKKA, K., OHMIYA, K.. Transformation of *Escherichia coli* with a large plasmid of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 encoding arsenic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2089. 1997.
31. SUSUKI, K., WAKAO, N., KIMURA, T., SAKKA, K., OHMIYA, K.. Expression and Regulation of the Arsenic Resistance Operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 Plasmid pKW301 in *Escherichia coli* *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 411. 1998.
32. WELCH, A.H., WESTJOHN, D.B., HELSEL, D.R., WANTY, R.B. Arsenic in ground water of the United States: Occurrence and geochemistry. *Ground Water* 38 (4) 589pp. 2000.