



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**BIOMINERALIZACIÓN DE ARSÉNICO A pH ÁCIDO EMPLEANDO
CONSORCIOS MICROBIANOS SULFIDOGÉNICOS OBTENIDOS DE
SEDIMENTOS DE DRENAJES ÁCIDOS DE MINA UBICADO EN
COLQUIRUMI, HUALGAYOC – CAJAMARCA, 2023**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO Y
BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

Bach. JHORDAN CRUZ MANTILLA CHÁVEZ

ASESOR:

Mblgo.Mtr. LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ

CO-ASESORA:

Dra. MARÍA DE LOURDES BERENICE CELIS GARCÍA

CAJAMARCA – PERÚ

2026

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Jhordan Cruz Mantilla Chávez**

DNI N.^o **72842309**

Escuela Profesional: **Biología y Biotecnología**

2. Asesor: **Mblgo. Mtr. Luis Felipe Váldez Nuñez**

Facultad: **Ciencias de la Salud**

3. Grado académico o título profesional

Bachiller **X Título profesional** Segunda especialidad Maestro Doctor

4. Tipo de Investigación:

X Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico

5. Título de Trabajo de Investigación:

"BIOMINERALIZACIÓN DE ARSÉNICO A pH ÁCIDO EMPLEANDO CONSORCIOS MICROBIANOS SULFIDOGÉNICOS OBTENIDOS DE SEDIMENTOS DE DRENAJES ÁCIDO DE MINA UBICADO EN COLQUIRUMI, HUALGAYOC – CAJAMARCA, 2023"

6. Fecha de evaluación: 22/01/2026

7. Software antiplagio: **X TURNITIN** URKUND (OURIGINAL) (*)

8. Porcentaje de Informe de Similitud: **16%**

9. Código Documento: **oid:::3117:547518497**

10. Resultado de la Evaluación de Similitud:

X APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O
DESAPROBADO

Cajamarca, 22 de enero del 2026



En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©
Jhordan Cruz Mantilla Chávez
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Mantilla Chávez, J 2026. **Biomineralización de arsénico a pH ácido empleando consorcios microbianos sulfidogénicos obtenidos de sedimentos de drenajes ácidos de mina ubicado en Colquirrumi, Hualgayoc – Cajamarca, 2023.**

Jhordan Cruz Mantilla Chávez

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Mblgo.Mtr. Luis Felipe Valdez Nuñez

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo

UNC – 2026.

**Biomineralización de arsénico a pH ácido empleando consorcios microbianos
sulfidogénicos obtenidos de sedimentos de drenajes ácido de mina ubicado en Colquirumi,**

Hualgayoc – Cajamarca, 2023

AUTOR: Jhordan Cruz Mantilla Chávez

ASESOR: Mtr. Luis Felipe Váldez Nuñez

Tesis Evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



Presidente

Dr. José Armando Padilla Sobrados



Secretario

M. Cs. William Edgardo Soriano Castillo



Vocal

M. Cs. Nestor Estuardo Carbajal Caballero



Av. Atahualpa 1050

Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 09:30 del 15 de Enero del 2026, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:
Biomineralización de Arsénico de pH Ácido empleando consorcios microbianos Sulfidogénicos obtenidos de sedimentos de drenajes Ácidos de mina ubicado en Colquirumi, Huallgayoc - Cajamarca, 2023

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Jhordan Cruz Mantilla Chávez

Siendo las 11:00 del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de: 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTO para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador Nombres y Apellidos		Firma
Presidente:	<u>Dr. José Armando Padilla Sobrados</u>	
Secretario(a):	<u>M.Cs. William Edgardo Soriano Castillo</u>	
Vocal:	<u>M.Cs. Néstor Estuardo Carbajal Caballero</u>	
Accesitaria:		
Asesor (a):	<u>Mbgo. Mtr. Luis Felipe Valdez Núñez</u>	
Asesor (a):		

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

Dedicatoria

Para:

Mi mamá, que siempre fue, es y será mi fuerza para seguir adelante y sin importar cuanto me caí siempre creyó en mí; para mis hermanos, que, a pesar de la distancia sabía que puedo contar con ellos; para mi papá, que, a su manera, siempre me mostro su apoyo. A todos ustedes, gracias por ser mi base, mi refugio y mi impulso.

“No hay un manual de instrucciones para la vida, ¡así que crea el tuyo!”
- Brian Tracy

Agradecimientos

A Dios, por darme la salud, la fortaleza y la perseverancia necesarias para enfrentar cada desafío y continuar avanzando. Cada tropiezo que pase, se convirtió en una enseñanza valiosa que me impulsó a no rendirme y a seguir luchando por alcanzar mis metas.

A mi familia, por su amor incondicional, por creer en mí incluso en los momentos más difíciles y por enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa. Gracias por ser mi refugio y mi mayor motivación.

A mi madrina y a su familia, quienes me brindaron un segundo hogar lleno de cariño y apoyo. Su generosidad, compañía y palabras de aliento fueron fundamentales para mantenerme firme y enfocado en esta etapa. Gracias por acogerme como a uno más y ayudarme a continuar cuando más lo necesitaba.

A mi asesor, el Mblgo.Mtr. Luis Felipe Valdez Nuñez, por confiar en mí desde el inicio y por acompañarme con dedicación, paciencia y sabiduría a lo largo de este arduo camino. Sus consejos no solo fueron fundamentales para culminar esta tesis, sino que también fomentaron mi crecimiento personal y académico.

A mi co-asesora, la Dra. María de Lourdes Berenice Celis García, investigadora de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), en México, por compartir generosamente sus conocimientos y experiencia, y por acompañar con atención y guía cada etapa de este proyecto. Su exigencia profesional y su apoyo constante fueron fundamentales para lograr un trabajo más sólido y riguroso.

Al M. Cs. Cristian Ángel Hobán Vergara, por su valioso apoyo en el manejo de equipos del Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNC. Su paciencia y disposición para enseñar me permitieron desarrollar habilidades técnicas esenciales para esta investigación.

A los investigadores del Laboratorio de Geomicrobiología de la Universidad de Tübingen, Alemania, por hacer posible los análisis mediante microscopía electrónica de barrido, los cuales fueron clave para complementar esta tesis.

A mis amigos de siempre, por estar a mi lado en los momentos buenos y en los no tan buenos, por su apoyo sincero, sus palabras de aliento y por hacer que incluso los días más difíciles no se sintieran. Gracias por recordarme, con su amistad, que nunca estuve solo en este camino. Y a mi compañera de vida, por su amor, comprensión y apoyo constante. Gracias por caminar a mi lado con paciencia y ternura, por celebrar mis logros y sostenerme en los momentos más duros.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	xi
GLOSARIO	xii
TÍTULO	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Bases teóricas	8
2.2.1. Bacterias sulfato reductoras	8
2.2.2. Arqueas reductoras de sulfato	9
2.2.3. Consorcios microbianos sulfidogénicos	9
2.2.4. Fisiología de los CMS	11
2.2.5. Donadores y aceptores de electrones	13
2.2.6. Tolerancia a los elementos tóxicos	15
2.2.7. Ciclo biogeoquímico del arsénico	17
2.2.8. Biomineralización del arsénico	21
CAPÍTULO III	25
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS	25
3.1. Nivel de investigación	25
3.2. Tipo y diseño de investigación	25
3.2.1. Tipo de investigación	25
3.2.2. Diseño de investigación	25
3.3. Material biológico	25
3.4. Localización y descripción del sitio de muestreo	26
3.5. Colección de muestras	26
3.5.1. Análisis físicoquímicos de las muestras	27
3.6. Obtención de CMS acidófilos	27
3.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	28

3.8. Ensayo de tolerancia al arsénico	29
3.9. Ensayo de biomineralización del As (III)	29
3.9.1. Preparación del medio de cultivo	29
3.9.2. Inoculación de CMS.....	30
3.9.3. Métodos analíticos.....	30
3.9.4. Determinación de As (III) soluble.....	30
3.10. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	31
3.11. Técnicas de procedimiento y análisis de datos	31
CAPÍTULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. RESULTADOS	32
4.1.1. Características fisicoquímicas de los puntos de muestreo	32
4.1.3. Adjunción de los CMS a la madera.....	35
4.1.4. Ensayo de biomineralización de As (III).....	36
4.2. Discusión	39
4.2.1. Características fisicoquímicas de los puntos de muestreo	39
4.2.2. Generación de CMS y empleo de madera como soporte	40
4.2.3. Tolerancia de los consorcios microbianos sulfidogénicos al As (III)	41
4.2.4. Biomineralización de As (III) por el CMS	44
CAPITULO V	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones	48
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49
APÉNDICES	56
ANEXOS	64

LISTA DE ABREVIACIONES

ATP	Adenosín Trifosfato
ARS	Arqueas Reductoras de Sulfato
As III	Arsenito
ArpAB	Sulfito Reductasa Disimilatoria
BSR	Bacterias Sulfato Reductoras
CMS	Consorcio Microbiano Sulfidogénico
DAM	Drenajes Ácidos de Mina
MSM	Medio de Sales Minerales
ORP	Potencial Óxido Reducción
Pi	Ortofósфato
PPi	Pirofósфato Inorgánico
SulP	Sulfato Permeasa

GLOSARIO

Arsénico

El arsénico (As) es un elemento químico natural que pertenece al grupo de los metaloides o semimetales, con número atómico 33. Se encuentra distribuido a nivel de la corteza terrestre en rocas, suelo y minerales. Es altamente tóxico para los seres vivos, principalmente en sus formas inorgánicas (arsenito y arseniato), pero también se encuentran en sus formas orgánicas menos toxicas. (Darma et al., 2021).

Biomineralización

Es un proceso natural donde los organismos vivos producen materiales inorgánicos mediante la actividad biológica. Es decir, la formación de fases minerales catalizada por microorganismos e implica reacciones redox para la conservación de energía, vías de desintoxicación y la producción de metabolitos extracelulares que promueven la precipitación mineral (Darma et al., 2021; Ríos-Valenciana y Celis, 2025).

Consorcios microbianos sulfidogénicos

Los consorcios microbianos, están compuestos por diferentes especies de bacterias las cuales realizan distintos procesos de reducción de sulfato a sulfuros, permitiéndoles utilizar diferentes sustratos orgánicos y crear una red compleja y coordinada de interacciones microbianas. (Frederico et al., 2022).

Drenaje ácido de mina (DAM)

El DAM se caracterizan por su pH ácido (~4.00), altas concentraciones de sulfatos y metales/metaloides. Son aguas residuales altamente ácidas que se forman como resultado de una reacción química compleja entre el agua y los minerales sulfurosos presentes en las rocas y escombros mineros. (Chai et al., 2023). El DAM es altamente tóxico para la vida acuática y pueden contaminar cursos de agua superficiales y acuíferos subterráneos, afectando negativamente el ecosistema (Burton et al., 2021).

Microcosmos

Es un sistema o mundo a pequeña escala que encapsula y refleja las características, interacciones y complejidad de un sistema mucho más grande. Específicamente en ecología, es un sistema experimental artificial y controlado que simula las condiciones y procesos de un ecosistema natural, permitiendo estudiar la actividad y el comportamiento de los microorganismos involucrados (Valdez-Nuñez et al., 2022).

TÍTULO

**“BIOMINERALIZACIÓN DE ARSÉNICO A PH ÁCIDO EMPLEANDO
CONSORCIOS MICROBIANOS SULFIDOGÉNICOS OBTENIDOS DE
SEDIMENTOS DE DRENAJES ÁCIDOS DE MINA UBICADO EN
COLQUIRUMI, HUALGAYOC – CAJAMARCA, 2023”**

RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide altamente tóxico especialmente en su estado de oxidación III. Su presencia en el agua se debe a procesos de oxidación química o biológica de minerales tales como arsenopirita (FeAsS), rejalar (As_4S_4), oropimente (As_2S_3), entre otros. Actividades antropogénicas como la minería incrementan la disponibilidad de este metaloide representando un alto riesgo para los ecosistemas y la salud humana debido a su toxicidad. En este estudio se evaluó la biomineralización de As (III) a pH ácido empleando un consorcio microbiano sulfidogénico (CMS) acidófilo obtenido de sedimentos de drenaje ácido de mina (DAM) de un túnel minero ubicado en Hualgayoc-Cajamarca. Los sedimentos de DAM fueron inoculados en microcosmos para la obtención de CMS acidófilos empleando acetato y glicerol (5 mM) como fuentes de carbono/donadores de electrones a pH 3.50. También se agregó madera (2–5 mm) recolectada del mismo túnel minero y se empleó como soporte para el desarrollo de los CMS. Se evaluó la concentración máxima tolerada (CMT) de As (III) de los CMS obtenidos empleando distintas concentraciones (0.20, 0.80, 3.20 y 12.80 mM). Finalmente, se llevó a cabo la biomineralización empleando la CMT de As III (0.80 mM) a pH 3.50 empleando el CMS, glicerol (5 mM) como donador de electrones y madera como soporte por un periodo de 91 días. Los resultados evidenciaron una evolución favorable del pH y ORP al final del experimento (pH: 5.97 ± 0.05 , ORP: -255.47 ± 13.00 mV). Se detectó la producción de sulfuros a partir del día 15 obteniendo hasta 3.72 ± 0.22 mM. También, se observó la presencia de precipitados amarillos, potencialmente sulfuros de As (III) (p.e., oropimente, rejalar). Al final del experimento se logró biomineralizar 0.77 ± 0.005 mM de As (III) (96%). Esta investigación aporta una alternativa biotecnológica basada en los recursos biológicos de la región Cajamarca para la remoción de As en aguas residuales de la industria minera.

Palabras clave: Biomineralización, arsénico, consorcio microbiano sulfidogénico, drenaje ácido de mina, madera.

ABSTRACT

Arsenic (As) is a highly toxic metalloid, particularly in its oxidation state III. Its presence in water is due to chemical or biological oxidation processes of minerals such as arsenopyrite (FeAsS), realgar (As_4S_4), orpiment (As_2S_3), among others. Anthropogenic activities such as mining increase the availability of this metalloid, posing a high risk to ecosystems and human health due to its toxicity. In this study, the biomineralization of As(III) at acidic pH was evaluated using an acidophilic sulfidogenic microbial consortium (SMC) obtained from acid mine drainage (AMD) sediments from a mining tunnel located in Hualgayoc–Cajamarca. The AMD sediments were inoculated in microcosms to obtain acidophilic SMCs using acetate and glycerol (5 mM) as carbon sources and electron donors at pH 3.50. Wood fragments (2–5 mm) collected from the same mining tunnel were also added and used as support material for SMC development. The maximum tolerated concentration (MTC) of As(III) of the obtained SMCs was evaluated using different concentrations (0.20, 0.80, 3.20, and 12.80 mM). Finally, biomineralization was carried out using the MTC of As(III) (0.80 mM) at pH 3.50, with the SMC, glycerol (5 mM) as the electron donor, and wood as support for a period of 91 days. The results showed a favorable evolution of pH and ORP at the end of the experiment (pH: 5.97 ± 0.05 ; ORP: -255.47 ± 13.00 mV). Sulfide production was detected from day 15, reaching up to 3.72 ± 0.22 mM. Yellow precipitates, potentially As(III) sulfides (e.g., orpiment, realgar), were also observed. By the end of the experiment, 0.77 ± 0.005 mM of As(III) (96%) was successfully biomineralized. This research provides a biotechnological alternative based on the biological resources of the Cajamarca region for arsenic removal from mining industry wastewater.

Keywords: Biomineralization, arsenic, sulfidogenic microbial consortium, acid mine drainage, wood.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un metaloide el cual es liberado al ambiente debido a la oxidación química o biológica de minerales como la arsenopirita (FeAsS), el rejalar (As_4S_4), y el oropimente (As_2S_3). Los estados de oxidación de este metaloide son -3, 0, +5 y +3 siendo este último el más abundante y tóxico (Sevak y Pushkar, 2024). Debido a su toxicidad, su liberación de As al ambiente representa una gran preocupación debido a su alta movilidad en agua y sedimentos afectando a la flora, fauna y la salud humana (Le Pape et al., 2017). Su presencia también se relaciona con la inactivación de enzimas involucradas en la fotosíntesis y la alteración de las características del suelo y la estructura de las comunidades microbianas (Cruzado-Tafur et al., 2021). Además, genera problemas respiratorios, nerviosos y vasculares e incluso al desarrollo de diferentes tipos de cáncer en humanos (Obando, 2020; OMS, 2022). La contaminación por As continúa siendo un problema constante en nuestro entorno y a nivel global, la cual podría aumentar debido al incremento de actividades extractivas tales como la minería y la falta de tratamiento para mitigar la contaminación (MINEM, 2022).

La remoción de As (III) en el agua se realiza mediante métodos químicos en donde la adición de cal (CaO), sulfato de calcio (CaSO_4), hidróxido de sodio (NaOH), bentonita ($\text{SiO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), o azufre elemental (S^0) reaccionan con este metaloide formando compuestos insolubles a pH circumneutrales tales como arsenatos de calcio ($\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$) y sulfuros de arsénico (As_2S_3 , As_4S_4) (Ramos, 2022). No obstante, este tipo de tratamientos implica un alto costo por los reactivos químicos empleados (Cruzado-Tafur et al., 2021). Además, este tratamiento tiene un impacto negativo en el ambiente, ya que generan grandes

volúmenes de lodos los cuales contienen elevadas concentraciones de hidróxidos y sulfatos metálicos, muchas veces susceptibles a nuevos procesos de oxidación, lo que podría liberar nuevamente el As al ambiente. Asimismo, la formación de complejos coloidales de As es una limitante debido al pequeño tamaño de las partículas, lo que dificulta su separación por métodos convencionales como la sedimentación o la filtración (Pozo et al., 2017; Battaglia-Brunet et al., 2024). Todo esto reduce la eficiencia del tratamiento y puede favorecer la presencia de As en el efluente tratado. Estos factores demuestran que los tratamientos químicos presentan limitaciones económicas, operativas y ambientales, lo que impulsa la búsqueda de alternativas más sostenibles y eficaces, como los tratamientos biológicos (Cosmidis y Benzerara, 2022).

Los tratamientos biológicos se basan en la capacidad natural de los microorganismos para transformar, inmovilizar, remover o eliminar compuestos tóxicos del ambiente mediante su metabolismo (Pozo et al., 2017; Burton et al., 2021). La inmovilización y posterior remoción de As puede lograrse a través de un proceso denominado biomineralización, ya sea de forma controlada en donde los microorganismos regulan de forma intencional la formación y la ubicación del mineral, o inducida, donde la precipitación ocurre como resultado indirecto de su metabolismo (producción de sulfuros) (Cosmidis y Benzerara, 2022). Dentro de los grupos microbianos involucrados en la biomineralización de As se encuentra las bacterias sulfato reductoras (BSR), las cuales al producir sulfuros precipitan As en formas insolubles tales como oropimente (As_2S_3) y rejalar (As_4S_4). La remoción de As mediante su biomineralización podría ser una alternativa óptima pues suele ser eficiente y sostenible (Ríos Valencia et al., 2017).

En ese sentido, el objetivo del presente trabajo fue biomineralizar As a pH ácido (3.50) empleando un consorcio microbiano sulfidogénico (CMS) obtenido de sedimentos de un drenaje ácido de mina (DAM) de un túnel minero ubicado en Hualgayoc-Cajamarca. Para ello se obtuvo los CMS mediante enriquecimientos donde se empleó sedimentos de DAM como inóculo, así como acetato y glicerol como fuentes de carbono y donadores de electrones. También se agregó madera de 2 a 5 mm de diámetro como soporte que también fue recolectada del mismo túnel. Se determinó la concentración máxima tolerada (CMT) de As (III) de los CMS obtenidos usando 4 concentraciones (0.20, 0.80, 3.20 y 12.80 mM) de arsenito de sodio (NaAsO_2). Por último, se realizó la biomineralización As (III) a pH de 3.50 empleando el CMS, la CMT de As (III) (0.80 mM), y glicerol como fuente de carbono/donador de electrones. Los resultados obtenidos brindan información robusta sobre el empleo de consorcios microbianos para la remoción de As (III) a través de la biomineralización, lo que puede sentar nuevas bases para futuras investigaciones relacionadas al tratamiento biológico de aguas residuales de la industria minera.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

En el estudio realizado por Rios-Valenciana y Celi en 2025, en México, se abordó el problema de la contaminación por As (V) en aguas subterráneas, evaluando la capacidad de consorcios bacterianos autóctonos, aislados de sedimentos contaminados, para inducir la bioprecipitación de sulfuros de As en condiciones sintéticas. Promoviendo la acción conjunta de bacterias reductoras de As y sulfato. Empleando técnicas de microscopía y caracterización estructural, se comprobó la formación de nanofibras de sulfuros de As, estructuras cristalinas insolubles que permitieron retener eficazmente el As en fase sólida. Los resultados demostraron que los microorganismos nativos poseen un alto potencial para remover hasta el 96% de As mediante la bioprecipitación, sin necesidad de inoculación externa, proponiendo una alternativa sostenible a los tratamientos convencionales (Rios-Valenciana y Celi 2025). Sin embargo, el estudio no abordó la aplicación a escala piloto ni la estabilidad a largo plazo de los precipitados en condiciones reales.

Un estudio realizando en Francia por Battaglia-Brunet y col., en el 2024, exploraron el uso de bioprocesos sulfidogénicos basados en procariotes reductores de sulfato (SRP) para tratar aguas ácidas de mina, removiendo selectivamente As (III) y otros metales disueltos, mientras se genera agua limpia. Se empleo biorreactores (batch continuos) diseñados para diferentes tipos de aguas mineras ácidas, donde se seleccionaron comunidades microbianas adaptadas al pH ácido y disponibilidad de donadores de electrones de bajo costo (hidrógeno, etanol, glicerol, entre otros). Se emplearon

estrategias de precipitación selectiva de sulfuros de As (oropimente y rejalar), tanto dentro como fuera del biorreactor mediante la recuperación de sulfuro de hidrógeno biogénico. Los resultados mostraron una confiabilidad para precipitar el As como sulfuros y su dependencia del pH (4.50) del agua del drenaje, logrando retirar hasta el 99% de As mediante precipitación de arsenosulfuros (Battaglia-Brunet et al., 2024).

El estudio realizado por Li y col. en el 2024, en China, investigó la respuesta diferencial de un CMS frente al estrés por As (III) bajo condiciones anaerobias y aerobias, con el objetivo de comprender sus estrategias de adaptación y su capacidad para inmovilizar el metaloide en distintos ambientes. El CMS, denominado SRB1, fue sometido a ensayos comparativos en ambas condiciones, evaluando la eficiencia de la sulfato reducción, la formación de minerales de sulfuro de As y los cambios en la comunidad microbiana. Aplicaron técnicas analíticas como SEM, XRD y XPS para caracterizar los precipitados, y analizaron la producción de exopolisacáridos (EPS) y la actividad antioxidante. Los resultados mostraron que bajo condiciones anaerobias se alcanzó una mayor eficiencia de reducción de sulfato (66,72 %) en comparación con las condiciones aerobias (47,37 %), y se generaron minerales como AsS y As₄S₄ en ambos casos. Además, en ambientes con oxígeno, las bacterias activaron mecanismos de defensa adicionales como los EPS con grupos funcionales reactivos y enzimas antioxidantes (como la superóxido dismutasa) (Li et al., 2024). Este trabajo es relevante porque evidencia cómo los microorganismos pueden modificar sus rutas metabólicas y la composición del consorcio microbiano para adaptarse al estrés por As según la disponibilidad de oxígeno.

En el año 2023, en Francia, utilizaron las BSR para reducir sulfato, metales y/o metaloides como el arsénico (As) en condiciones anaeróbicas. Donde se necesitó tres biorreactores a

escala de laboratorio para tratar agua ácida de mina con alta concentración de As (III).

Cada biorreactor contenía una mezcla de sedimento, fuente de carbono y un suministro de agua de mina ácida, manteniéndola a 30°C durante un periodo de 4 meses. Al final del tratamiento se logró observar una reducción de 98% para el sulfato y una remoción de 99,3% para el As (III) (Laroche et al., 2023). La biorremediación emplea microorganismos naturales y autóctonos para remover contaminantes tales como el As (III), minimizando el impacto ambiental relacionado a los DAM.

En Cajamarca, se investigó sobre la composición de la comunidad microbiana en tres túneles mineros diferentes en la provincia de Hualgayoc. Así también, se evaluó la actividad metabólica de BSR acidófilas. Para ello se crearon microcosmos y se les administró por separado diferentes donadores de electrones como el acetato, lactato, glicerol e hidrógeno. También, se evaluó la reducción de sulfato a pH bajo de 3.40. En los resultados, el hidrógeno fue el donador más favorable en la reducción de sulfato y producción de sulfuros. Mientras que el pH aumentó en 2 unidades y la diversidad microbiana fue baja. Sin embargo, se lograron registrar a BSR como *Desulfosporosinus* y *Desulfovibrio* (Valdez-Nuñez et al., 2022). Los hallazgos respaldan que consorcios microbianos nativos acidófilos, aunque escasos en abundancia, pueden ser metabólicamente activos en condiciones ácidas y, si se seleccionan y estimulan adecuadamente (glicerol), pueden potenciar procesos de biominerización de metales/metaloides como el As.

Por otro lado, en el 2017, Le Pape y Cols., tuvieron como objetivo estudiar la posible eliminación total de arsénico (As) y zinc (Zn) disueltos en los DAM en Francia. Para ello, utilizaron BSR autóctonas, empleando la técnica de bioestimulación, que consiste en la

adicción de nutrientes y/o donadores de electrones a los sedimentos, fomentando el crecimiento y actividad microbiana. Sin embargo, también se utilizó el glicerol como fuente de carbono y donador de electrones, bajo condiciones anaerobias y pH ácido (4.0 - 4.5). Los experimentos se realizaron en sistema batch durante 94 días, logrando una eliminación prácticamente completa tanto de As como de Zn sin la necesidad de neutralizar el medio. El mecanismo principal de remoción estuvo asociado a la producción de sulfuro de hidrógeno biogénico por las BSR, el cual reaccionó con el As disuelto, favoreciendo su inmovilización mediante la precipitación de sulfuros de arsénico, principalmente oropimente (As_2S_3) y rejalar (AsS) (Le Pape et al., 2017).

En el 2017, en México, se realizó un estudio a través de microcosmos; donde se evaluó la capacidad de los microorganismos presentes en los sedimentos para remover el As y el sulfato. Para ello, se empleó un sistema hidráulico anaerobio. Se obtuvo como resultados que el consorcio microbiano es capaz de reducir el As y el sulfato en sulfuro de As, como el oropimente (As_2S_3) y rejalar (AsS). Se apreció que hubo reducción del As (V) y sulfato. También se realizó un análisis molecular para determinar la diversidad microbiana presentes en los sedimentos. Se identificó especies de los géneros *Desulfobacterium*, *Desulfosporosinus* y *Desulfovibrio* (Rios-Valencia et al., 2017). Este hallazgo respalda el enfoque de esta investigación, al emplear un consorcio CMS para la remoción de As (III) a pH (3.50), lo que sugiere que la biomineralización mediada por BSR puede ser una estrategia efectiva de biorremediación en ambientes con condiciones extremas.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Bacterias sulfato reductoras

Las bacterias sulfato reductoras (SRB, por sus siglas en inglés) contienen distintos grupos taxonómicos, entre los cuales destaca la subdivisión δ -proteobacteria, que agrupa a SRB mesófilas gram-negativas. Este grupo es especialmente relevante en ambientes ácidos, ya que muchas de estas bacterias pueden desarrollarse en condiciones de pH extremadamente baja, típicas de un sistema como los drenajes ácidos de mina (DAM). También existen SRB gram-positivas formadoras de esporas, que toleran temperaturas más altas que las mesófilas, aunque su papel en ambientes ácidos no es tan destacado (Xing, et al., 2023). Estas bacterias intervienen en el ciclo anaeróbico del carbono, y según el tipo de metabolismo que posean se dividen en dos grupos, las que degradan compuestos orgánicos de forma incompleta hasta acetato y las que degradan completamente los compuestos orgánicos hasta dióxido de carbono (CO_2) (Dong et al., 2023a).

Las BSR oxidantes completas tienen la capacidad de utilizar el acetato como sustrato y usan dos vías para oxidarlo, un ciclo de ácido cítrico modificado usada por *Desulfobacter postgatei* y la vía del acetilCoA, empleado por *Desulfotomaculum*. Por otro lado, *Desulfococcus sp*, *Desulfobacterium sp* y *Desulfobacca acetoxidans* son capaces de usar ambas vías (Kalia y Purohit, 2008). Otras especies, como *Desulfotomaculum auripigmentum*, reduce el arseniato o As (V) y sulfato en un compuesto mineralizado como el sulfuro de arsénico III (As_2S_3) (Alazard et al., 2010). Las bacterias similares a *Desulfobulbus sp.* y a *Desulfosporosinus* (**Figura 1**), son capaces de reducir As V en arsenito o arsénico III (As III) (Pozo et al., 2017). Los mecanismos de tolerancia a altas concentraciones de metales pueden estar asociados a procesos de adsorción superficial, absorción, reacciones de oxido-reducción, especiación enzimática, respiración celular,

bioacumulación, metilación, biosíntesis de proteínas, fijadoras de metales o polímeros extracelulares, entre otros (Anantharaman et al., 2018).

2.2.2. Arqueas reductoras de sulfato

A diferencia de las bacterias, las arqueas sulfato reductoras (ASR) poseen una membrana celular compuesta por éteres de glicerol en lugar de ésteres de glicerol, que le permite vivir en ambientes extremos como fuentes termales, sedimentos marinos, chimeneas, ambientes salinos, ambientes ácidos, entre otros. También poseen una diversidad metabólica mayor que las bacterias y pueden utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Además, tienen la capacidad de utilizar el sulfato como acceptor de electrones y las enzimas para la sulfatorreducción (Pfeifer et al., 2021). Se sabe que las BSR y ASR comparten un metabolismo sulfidogénico y están en ambientes termales como aerobios dentro de consorcios microbianos sulfidogénicos. Las arqueas más relevantes con actividad sulfidogénica son *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus veneficus*, *Thermocladium modestius* y *Caldivirga maquilingensis* (**Figura 1**).

2.2.3. Consorcios microbianos sulfidogénicos

Es un grupo de microorganismos (bacterias y arqueas) que trabajan juntos, para transformar compuestos tóxicos o contaminantes en formas menos dañinas. Su principal característica es la división del trabajo entre diferentes microorganismos o grupos involucrados para realizar una biotransformación bioquímica. (Bradley, Levitt y Johnston, 2011). Los consorcios autóctonos o nativos (propios del lugar), recuperados en los sitios contaminados, están formados por microorganismos nativos que poseen genes

diversos, que les permite adaptarse y metabolizar compuestos tóxicos de manera eficiente (Battaglia-Brunet et al., 2024). Donde, los cultivos mixtos también tengan la ventaja de mantener una red metabólica amplia, que incluye procesos como la fermentación, la oxidación del carbono orgánico mediante diferentes aceptores de electrones y la producción de varios metabolitos. Todo esto hace que los CMS sean más eficientes y resistentes en comparación con cultivos puros. Gracias a estas cualidades, los consorcios microbianos son muy prometedores para tratar efluentes con alta carga contaminante, como los DAM (Rios-Valencia et al., 2025).

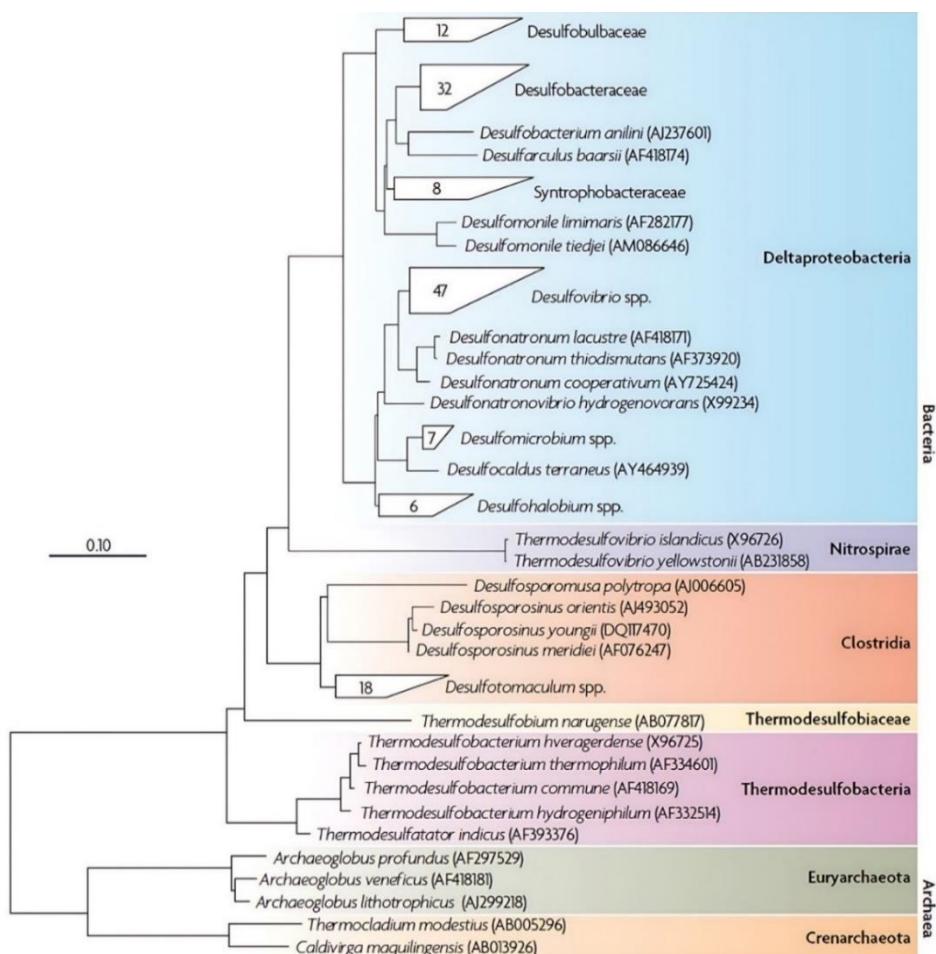
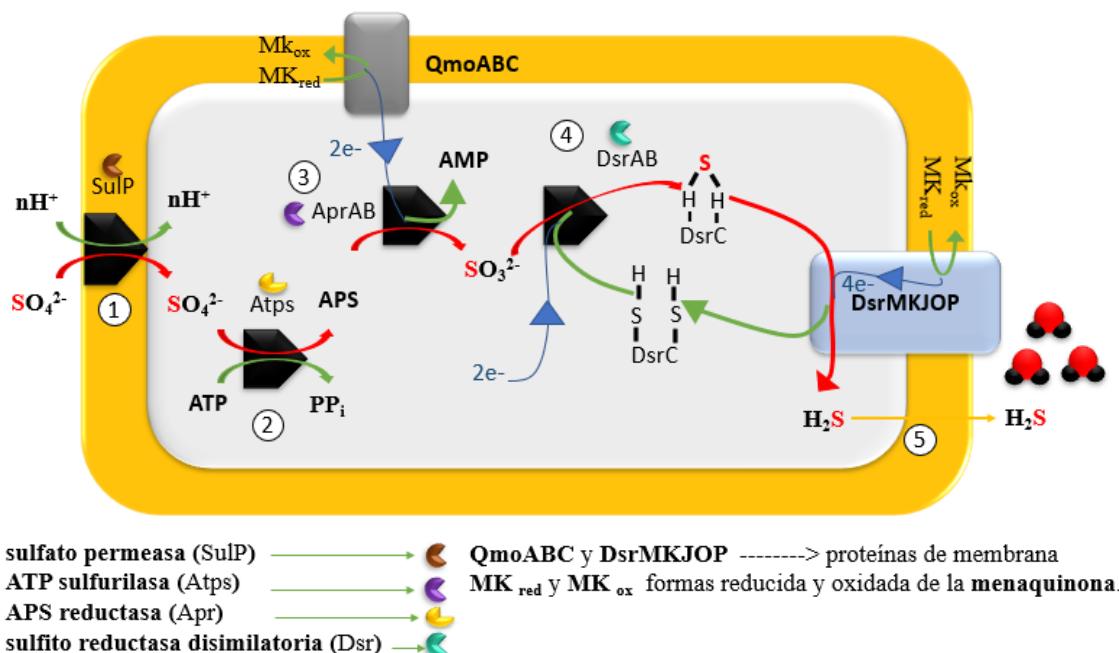


Figura 1. Árbol filogenético basado en secuencias casi completas de ARN ribosomal 16S(ARNr) de especies procariotas reductoras de sulfato descritas. La barra de escala indica una diferencia de secuencia del 10 %. (Muyzer y Stams, 2008).

2.2.4. Fisiología de los CMS.

2.2.4.1. Reducción no asimilatoria del sulfato.

La reducción desasimilatoria del sulfato es un proceso esencial que impulsa el ciclo del azufre en condiciones de temperatura fisiológica. Si esta reducción no ocurriera, la dinámica del azufre se vería alterada, prevaleciendo la precipitación y disolución de minerales de sulfato (Sim et al., 2023). Este proceso involucra cuatro enzimas; la sulfato permeasa (SulP), la sulfato adenililtransferasa (Sat), la APS reductasa (Apr) y la sulfito reductasa disimilatoria (Dsr) (**Figura 2**) (Steger et al., 2011; Sim et al., 2023). Estas enzimas catalizan los pasos limitantes de la velocidad en el ciclo global del azufre y confieren a las bacterias y arqueas la capacidad de crecer mediante la reducción del sulfito (Anantharaman et al., 2018).



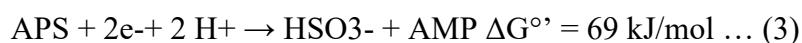
Primero, se da la captación del sulfato que posee carga negativa por importación con los

iones Na^+ o H^+ (Leavitt et al., 2015). Segundo, dado que el sulfato es relativamente inerte en condiciones fisiológicas, necesita ser activado a APS (adenosín fosfatosulfato) antes de poder ser reducido, esta activación consume energía en forma de ATP (adenosín trifosfato). Tercero, para reducir el APS a sulfito se usan dos electrones del complejo QmoABC que se encuentra unido a la membrana (Sim et al., 2023). Cuarto, la respiración del sulfato se da con la reducción de dos electrones (dadas por la enzima DsrAB). Quinto, finalmente se genera la liberación de H_2S (sulfuro de hidrógeno). También se ha demostrado que la reducción de sulfito dado por DsrAB crea la forma trisulfuro de DsrC, que se reduce más a sulfuro y la forma tiol de DsrC mediante otro complejo de membrana como el DsrMKJOP (Dong et al., 2023b; Sim et al., 2023).

Un ejemplo de esto, es la dinámica enzimática presente en las cepas de *Desulfuvibrio*. El trabajo conjunto de estas cuatro enzimas convierte el sulfato en H_2S (Christiane y Cornelius, 2013). A continuación, se presenta la ruta bioquímica de la sulfatorreducción (Rangel et al., 2015). En la activación del sulfato se requiere 2 moléculas de ATP y la enzima Atps. Esta reacción requiere de la energía de la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi) formado a ortofosfato (Pi) por una pirofosfatasa (ecuación 1 y 2).



El par APS = HSO_3^- (ión bisulfito) presenta un potencial redox de punto medio, donde su estado de oxidación (E.O) es de 60 mV y esta reducción de dos electrones la realiza la enzima APS reductasa (ecuación 3).



Finalmente, HSO_3^- se reduce a bisulfuro (HS) más agua mediante la DsrAB, la

participación de la proteína pequeña DsrC y el complejo de membrana DsrMKJOP o simplemente DsrMK en algunos organismos (ecuación 4) (Rabus et al., 2015).



2.2.5. Donadores y aceptores de electrones

2.2.5.1. Donadores de electrones

Son moléculas orgánicas e inorgánicas que funcionan como sustrato y donador de electrones al mismo tiempo, haciendo posible la sulfato reducción. Entre los más utilizados se encuentran el hidrógeno, formiato, metanol, etanol, melaza, lactato, glicerol, acetato, propionato, butirato, azúcar, hidrocarburos y residuos orgánicos. Cada uno de estos tienen un efecto distinto en la cinética enzimática de los microorganismos sulfidogénicos. En ese sentido, en tratamientos a mayor escala, la elección de un donador de electrones implica un análisis del costo, disponibilidad y eficiencia. Por lo que, se debe considerar que la relación estequiométrica teórica explica que 1 mol de sulfato se reduce completamente utilizando 0.67 moles de un donador de electrones (Le Pape et al., 2017; Laha et al., 2022).

A. Glicerol

Es un compuesto orgánico líquido, inodoro, incoloro y de sabor dulce, es un alcohol con tres grupos hidroxilo (-OH) y altamente soluble en agua. Se ha utilizado como donador de electrones en la reducción del sulfato mediante la utilización de sistemas microbianos, donde se emplea compuestos orgánicos para aumentar la producción de sulfuro (S^{2-}) y la precipitación de metales. Su uso permite el crecimiento de MSR, siendo responsables de la reducción de sulfato a sulfuro (Le Pape et al., 2017; Laha et al., 2022).

B. Acetato

Compuesto orgánico formado por un átomo de carbono, tres de hidrógeno y un grupo funcional carboxilo (-COOH). Es un líquido incoloro, inflamable con olor a vinagre, soluble en agua, etanol y éter. Es muy común que se encuentre en la naturaleza y puede ser utilizado como donador de electrones en la reducción de compuestos inorgánicos (Laha et al., 2022). Los microorganismos que utilizan el acetato como donador de electrones son conocidos como bacterias acetatooxidadoras, las cuales pueden estar presentes en una amplia variedad de ambientes como aguas residuales y de minería. Dada su abundancia y disponibilidad son ideales como donadores de electrones en procesos biológicos (Le Pape et al., 2017; Laha et al., 2022). Asimismo, también puede ser producidos por algunas bacterias a partir de la fermentación de compuestos orgánicos.

2.2.5.2. Aceptores de electrones

Son sustancias químicas o compuestos que aceptan electrones durante una reacción de transferencia de electrones. En el contexto de respiración celular y la fermentación, estos cumplen un papel importante en el proceso de generación de energía en las células. (Carty y Ledesma, 2019).

A. Sulfato

El ión sulfato (SO_4^{2-}) proviene del azufre que es un elemento muy común en nuestro planeta, representa $\sim 2\%$ de la masa terrestre y es el sexto más abundante (Sevak y Pushkar, 2024). Además, es uno de los principales contaminantes de los DAM, contribuyendo a la acidificación del agua y a la formación de compuestos tóxicos como el ácido sulfúrico y el sulfato ferroso (Carty y Ledesma, 2019). En la superficie de la

tierra, lo encontramos en muchas formas químicas, desde el sulfuro (que tiene una carga negativa de -II) hasta el sulfato (con una carga positiva de +VI). Esta versatilidad y su presencia abundante lo hacen fundamental en procesos de reacciones redox. El SO₄²⁻ es un compuesto muy importante en la obtención de consorcios microbianos y tratamientos de biorremediación (Muyzer y Stams, 2008; Valdez-Nuñez et al., 2024) pues actúa como acceptor final de electrones en microorganismos sulfidogénicos.

2.2.6. Tolerancia a los elementos tóxicos

Es la capacidad que poseen los organismos para resistir y sobrevivir a contaminantes orgánicos e inorgánicos. Incluyen mecanismos como; la exclusión activa, regulación de la absorción y transporte (Pisoschi y Pop, 2015; Kabiraj et al., 2022). Para minimizar la entrada en sus células los microorganismos secuestran los metales y los almacenan en compartimientos intracelulares como vacuolas o inclusiones citoplasmáticas manteniendo bajos niveles de elementos tóxicos en el citoplasma y protegiendo las funciones celulares esenciales (Kabiraj et al., 2022). Además, estos microorganismos activan el sistema de defensa antioxidante. De esta forma contrarrestan el estrés oxidativo inducido por contaminantes. Por otro lado, ocurren adaptaciones genéticas, de forma natural, dando lugar a mutaciones. Con las cuales los microorganismos adquieren una mayor capacidad de desintoxicación o tolerancia inducidas por la exposición constante a estos elementos (Clemens, 2006; Pisoschi y Pop, 2015). Destacando que esta tolerancia varía entre diferentes especies, poblaciones, dependiendo de los factores ambientales y las formas químicas en la que estén presente los metales.

2.2.6.1. Técnicas de estudio de las BSR

A. Técnicas dependientes de cultivo

Los microcosmos de sedimento son sistemas cerrados que simulan ambientes naturales ricos en materia orgánica y nutrientes, diseñados para favorecer el crecimiento de bacterias sulfidogénicas e inhibir organismos no deseados, permitiendo observar indicadores como el ennegrecimiento del sedimento por producción de sulfuros. Para enriquecer estas comunidades microbianas se emplean distintas estrategias: el enriquecimiento en serie, que consiste en transferencias sucesivas en medios frescos para seleccionar microorganismos de interés; el enriquecimiento selectivo, que promueve específicamente el desarrollo de ciertos microorganismos mediante condiciones que inhiben a otros; el enriquecimiento por sustrato, donde se utiliza sulfato como fuente de energía exclusiva para bacterias sulfidogénicas; y el enriquecimiento por condiciones ambientales, que recrea condiciones extremas típicas de drenajes ácidos de mina (DAM) (Burton et al., 2021), como bajo pH, presencia de metales y falta de oxígeno, para favorecer el crecimiento y estudio de consorcios microbianos adaptados a estos entornos extremos.

B. Técnicas de soporte en el cultivo de CMS

La inmovilización bacteriana se define como el reclutamiento físico de los microorganismos en una región específica del espacio. En el cultivo de bacterias BSR es importante debido a los desafíos asociados con su metabolismo anaeróbico y la necesidad de altas concentraciones de biomasa activa. La inmovilización se clasifica en dos tipos: pasiva o natural y activa o artificial (Pacheco, 2020).

La inmovilización pasiva ocurre cuando las BSR forman biopelículas (biofilms) y crecen en la superficie o dentro de un material de soporte. Este tipo de inmovilización comprende las técnicas de adsorción (donde las BSR se adhieren a la superficie del material) y la colonización de materiales porosos como las astillas de madera (Pacheco, 2020; Valdez-Nuñez et al., 2024). La aplicación en BSR es una estrategia muy ventajosa, debido a que la formación de biofilms protege a las BSR del cizallamiento y estrés ambiental, y pueden generar zonas anóxicas que favorecen su metabolismo. Además, puede facilitar la transferencia de metabolitos y electrones, optimizando la reducción de sulfato (Li et al., 2021).

Por otro lado, la inmovilización activa o artificial hace referencia al uso de agentes químicos o físicos que inducen a la inmovilización (Tanmoy y LeFerve, 2024). Para las BSR, puede ser útil cuando se requiere una mayor densidad celular o una represión mayor de la biomasa. Esta inmovilización incluye; la unión covalente a superficies o entrecruzamiento y el atrapamiento de microorganismos en geles de polímeros (Li et al., 2021). La primera, es menos común para las BSR a gran escala, pero es útil en estudios *in vitro*. La segunda, es una de las técnicas más empleadas. Donde, las BSR pueden ser encapsuladas en matrices de alginato, poliacrilamida, quitosano o agar (Pacheco, 2020). Esto crea perlas o esferas que contienen alta concentración de BSR, permitiendo una fácil manipulación y recuperación. Además, les otorga una mayor resistencia a sustancias o elementos tóxicos (metales y metaloides) y a las fluctuaciones de pH (ácidos o alcalinos).

2.2.7. Ciclo biogeoquímico del arsénico

La movilidad del As depende ampliamente de las formas químicas de Fe, S y el As, a su vez estos elementos se ven impactadas por las biotransformaciones microbianas que representan uno de los principales factores que influyen en el ciclo biogeoquímico del As

(Figura 3) (Zhuang et al, 2023).

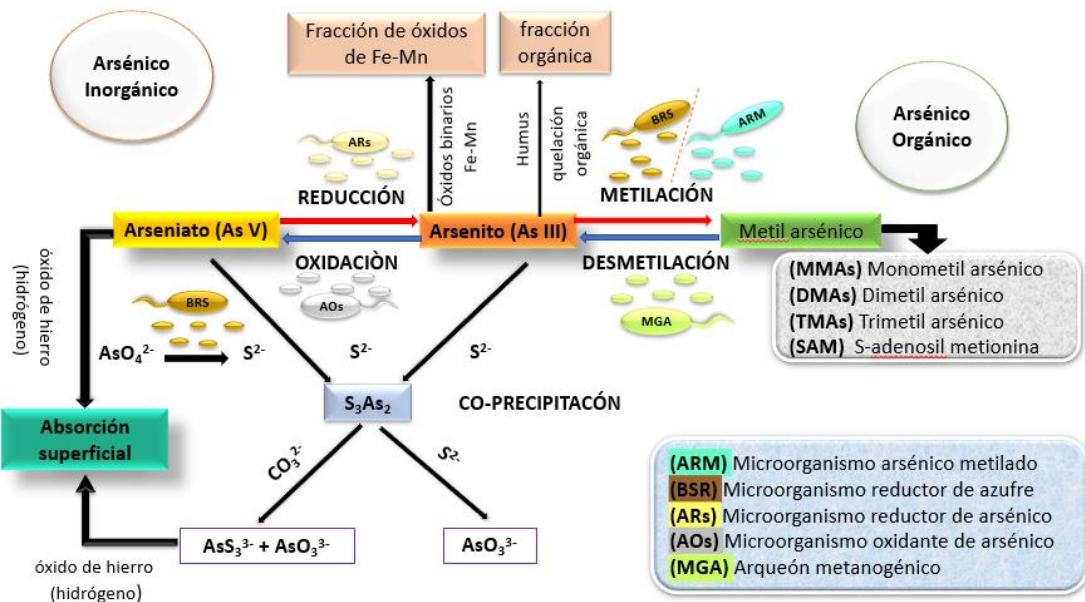


Figura 3. Esquema del ciclo biogeoquímico del As y su interacción con los procesos microbianos de oxidación, reducción, metilación, desmetilación y coprecipitación (Zhuang et al., 2023) modificada.

El comportamiento biogeoquímico del As, incluye oxidación-reducción, metilación y desmetilación, quelación orgánica, adsorción y disociación superficial, y coprecipitación iónica. Tanto para la reducción, la desmetilación y la disociación de As adsorbido forman As III altamente tóxico, lo que lleva a una mayor movilidad y toxicidad. Mientras que la oxidación, metilación, quelación orgánica y coprecipitación del As producen arseniatos menos tóxicos/móviles, lo que reduce la contaminación por arsénico (Darma et al., 2021; Zhuang et al., 2023). Muchos procesos geoquímicos de As involucran la participación de microorganismos. Es por ello, que varias actividades metabólicas directas o indirectas del As de los microorganismos son las principales fuerzas impulsoras del comportamiento biogeoquímico del As.

Por lo tanto, los microorganismos pueden llevar a cabo directamente la reducción, oxidación, metilación y desmetilación del arsénico, y también pueden participar indirectamente en la oxidación del arsénico y la coprecipitación de iones (Zhuang et al., 2023; Valdez.Nuñez et al., 2024). Cabe mencionar que muchos microorganismos pueden llevar a cabo la volatilización biológica, que permite convertir los compuestos de As en derivados volátiles, como la metilación (Zhuang et al., 2023). La biovolatilización, es un tema nuevo en la biogeoquímica y la salud ambiental, que desempeña un papel importante en el ciclo biogeoquímico global del As y también puede utilizarse como un posible método de biorremediación del arsénico (Chang, Yoon y Kim, 2018; Zhuang et al., 2023; Sevak y Pushkar, 2024).

2.2.7.1. Enzimología de la reducción de As

La reducción microbiana del As puede ocurrir mediante dos mecanismos fisiológicos principales; la reducción quimiolitotrófica y la reducción organotrófica (Huda et al., 2021). En el primer mecanismo, las bacterias utilizan el As como acceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones, reemplazando al O₂ o al nitrato (Li et al., 2021; Zhuang et al., 2023). Esto implica la oxidación de compuestos químicos como el H₂S o el Fe, los cuales liberan electrones que se transfieren al As, reduciéndolo a una forma menos tóxica, como el arseniuro (López et al., 2016).

Por otro lado, en el segundo mecanismo, las bacterias utilizan el As como acceptor de electrones en la respiración anaerobia junto con compuestos orgánicos, como el acetato. En este proceso, el As se reduce a formas menos tóxicas como el arseniuro y el As elemental. En ambos mecanismos, las bacterias utilizan enzimas específicas, como la arseniato reductasa y la arsenito oxidasa, para catalizar las reacciones de reducción y

oxidación del As (Ormland, 2003; Alam y McPhedran, 2019).

El As presente en la célula afecta su operación ya que el As V desacopla la fosforilación oxidativa y el As III se une a grupos sulfhidrilo de las proteínas. Donde, la célula tiene un sistema de excreción de As III (Páez-Espino et al., 2009). Por otro lado, la respiración de As es catalizada por la enzima arseniato reductasa (Arr), enzima de la familia dimetilsulfóxido que forma parte de las enzimas molibdeno. Esta enzima se encuentra fuera del citoplasma unida a la membrana citoplasmática (bacterias gram positivas) o en el periplasma (bacterias gram negativas) (**Figura 4**) (Alam y McPhedran, 2019).

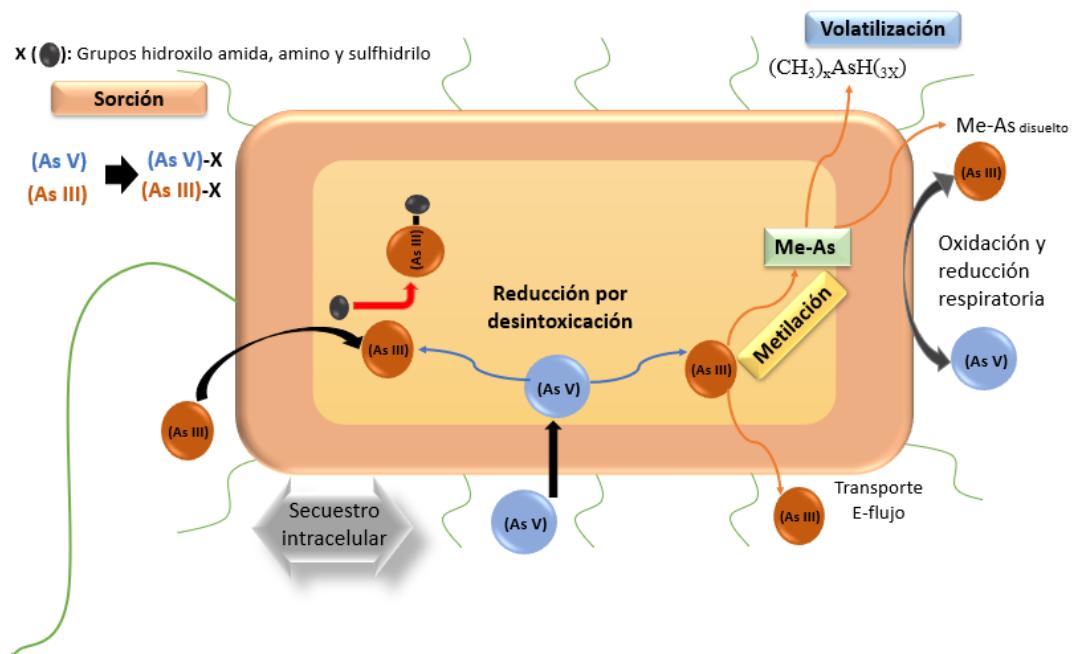


Figura 4. Esquema representativo de un microorganismo y los diferentes mecanismos de interacción con los compuestos de As (Rios-Valencia et al., 2017) modificada.

La respiración de As es energéticamente favorable cuando se acopla a la oxidación de materia orgánica, ya que el potencial redox de la pareja As V/As III es de +135 mV (Oremland, 2003; Li et al., 2021). Estos microorganismos, que abarcan diferentes filogenias como Firmicutes, Gamma, Delta y Épsilon Proteobacteria, utilizan diversos

donadores de electrones, como acetato, lactato, metanol, piruvato, citrato y glucosa. También tienen la capacidad de degradar moléculas aromáticas. Sin embargo, las especies bacterianas que reducen el As V tienen un impacto negativo en el medio ambiente, ya que el As III resultante es altamente tóxico y tiene una mayor capacidad de movilidad. Esto se debe a que el As III no tiene carga en un rango de pH neutro, lo que resulta en una menor afinidad por las superficies minerales (Páez-Espino et al., 2009; Alaniz et al., 2017).

Las BRA desempeñan un papel crucial en la liberación de As en forma de As III en sedimentos subóxicos y anóxicos. Pueden reducir directamente el arseniato adsorbido en los óxidos y oxihidróxidos de hierro o manganeso. Estos compuestos son inestables en condiciones reducidas, lo que hace que el As se disuelva y aumente su movilidad y toxicidad (Rios-Valencia et al., 2017).

2.2.8. Biomineralización del arsénico

2.2.8.1. Tipos de biomineralización

A. Biomineralización inducida

La biomineralización inducida de As, es un proceso en el que los microorganismos juegan un papel importante en la formación de minerales de As en el medio ambiente. Estos microorganismos pueden tomar As disuelto y facilitar su precipitación y transformación en minerales sólidos (Irshad et al., 2021; Burton et al., 2021). Esto se logra mediante procesos bioquímicos y biogeoquímicos en los que utilizan compuestos orgánicos como donadores de electrones y energía para reducir el As y promover su precipitación. La biomineralización inducida de As tiene efectos positivos al contribuir a la remediación de

aguas y suelos contaminados al reducir la disponibilidad y movilidad del As. (Oremland, 2003; Ríos-Valencia et al., 2017).

B. Biominerización controlada

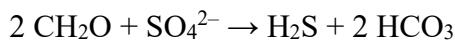
Por otro lado, esta biominerización implica un mayor nivel de control ejercido por los organismos sobre la formación de minerales. Los organismos tienen la capacidad de regular de manera más precisa la forma, tamaño y distribución de los minerales. Esto se logra a través de mecanismos bioquímicos y genéticos específicos que permiten una manipulación precisa de los procesos de mineralización. En el caso del As, la biominerización controlada implicaría una mayor capacidad de los microorganismos para influir en la formación de minerales de As en términos de composición, cristalográfica y morfología (Oremland, 2003; Ríos-Valencia et al., 2017).

2.2.8.2. Precipitación de sulfuros biogénicos

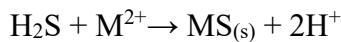
Los géneros bacterianos, *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, utilizan el sulfato como acceptor de electrones, obteniendo como producto al H₂S (Muyzer y Stams, 2008; Rabus et al., 2015), que es un gas incoloro, inflamable y de olor fétido similar a huevo podrido; en altas concentraciones puede ser venenoso. Las especies químicas en las que se encuentra en la naturaleza dependen del pH (Alam y McPedran, 2019). Este producto tiene la capacidad y enlazarse a metales, formando sulfuros metálicos que en medios acuoso se inmovilizan y forman biocristalizaciones.

Cuando esta reacción ocurre se acopla a donadores orgánicos de electrones, liberando también iones bicarbonato, los cuales promueven la alcalinización de un medio ácido,

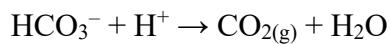
como son los DAM. A continuación, se presenta la dinámica química sobre la precipitación de metales mediada por el H₂S (Alam y McPedran, 2019).



La reacción química general para la precipitación de metales se representa de la siguiente manera:



Donde, M²⁺ es un metal o metaloide: As³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, entre otros. La precipitación de estos metales desprende de los iones de H⁺ que tiende a acidificar el medio, frente a este suceso los iones bicarbonato neutralizan estos protones formando dióxido de carbono y agua.



Bajo esta ruta metabólica se fundamenta el potencial de los microrganismos sulfato reductores o sulfidogénicos, para ser aplicadas en técnicas de biorremediación de DAM (Rabus et al., 2015).

Sin embargo, también se ha demostrado que el As₂S₃ se precipita a pH inferior a 3. Aunque antiguamente se creía que el As₂S₃ y las BSR eran sensibles a la acides; más tarde, estudios recientes demostraron que los procesos de reducción de sulfato pueden ser eficientes incluso en condiciones acidófilas. Esto ocurre siempre que se utilice el sustrato y las condiciones operativas apropiadas (Battaglia-Brunet, 2009; Serrano y Leiva, 2017).

Por lo tanto, los sistemas de biorremediación que se basan en la actividad de las BSR tolerantes a ácidos/metales podrían usarse para el tratamiento de DAM, optimizando los procesos de biominerallización del As (Serrano y Leiva, 2017).

2.2.8.3. Formaciones mineralógicas

Las formaciones mineralógicas (ver Anexo 1) dependen de las condiciones ambientales y de los microorganismos involucrados (Oremland, 2003; Darma et al., 2021) entre las principales formas se incluyen:

A. Oropimente (As_2S_3)

Es un mineral de As que se forma cuando los microorganismos reducen el As y lo precipitan en presencia de sulfuros, como el sulfuro de hierro (FeS_2). Es un mineral amarillo-naranja brillante y es relativamente insoluble, lo que contribuye a la retención del As en el medio ambiente.

B. Rejalgar (As_4S_4)

Es otro mineral de As que se forma por biomineralización en condiciones anaeróbicas. Al igual que el oropimente, el realgar es insoluble y contribuye a la retención del As en forma sólida. Sin embargo, también se menciona que la temperatura es un factor que interviene en la formación mineralógica (Battaglia-Brunet, 2009; Darma et al., 2021).

C. Arsenopirita (FeAsS)

Es un mineral de As que se origina cuando este metaloide se une al Fe y al S. Aunque suele estar asociada a depósitos minerales formados en condiciones geológicas específicas, la biomineralización inducida puede promover su formación en ciertos entornos (Darma et al., 2021).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS

3.1. Nivel de investigación

Explicativo: Esta investigación buscó entender las relaciones de causa y efecto entre los CMS obtenidos de un DAM y la biomeneralización del As (III) a pH ácido.

3.2. Tipo y diseño de investigación

3.2.1. Tipo de investigación

Básica: ya que con esta investigación buscó generar nuevos conocimientos acerca de la biomineralización del As (III) a pH ácido empleando CMS obtenidos de un DAM.

3.2.2. Diseño de investigación

Experimental: ya que implica el uso de CMS en condiciones controladas para evaluar su efectividad en la biomineralización de As (III).

3.3. Material biológico

Para esta investigación, se empleó muestras de sedimentos que albergan microrganismos sulfidogénicos, obtenidos de un DAM ubicado en Hualgayoc – Cajamarca en el 2023.

3.4. Localización y descripción del sitio de muestreo

El sitio de muestreo fue un túnel minero ubicado en Hualgayoc (3600 m.s.n.m), Cajamarca ($6^{\circ}45'27''S$, $78^{\circ}35'06''W$). Este túnel de mina se encuentra abandonado y produciendo DAM en su interior. Los puntos de muestreo se establecieron a 103 m (P1) y a 299 m (P2) desde la entrada del túnel (**Figura 5**).



Figura 5. (A) Mapa del Perú señalando el departamento de Cajamarca. (B) Ubicación del sitio de muestreo situado en la provincia de Hualgayoc (Google Maps). (C) Entrada a la bocamina. (D,E) Puntos de muestreo P1 (103 m) y P2 (299 m).

3.5. Colección de muestras

Las muestras de sedimento fueron recolectadas por triplicado de los puntos de muestreo P1 y P2, con la ayuda de jeringas estériles de 60 mL. Las muestras recolectadas fueron introducidas en una caja anaeróbica (Anaerobox) de 2.5 L. Las condiciones anóxicas fueron generadas empleando un sistema AnaeroGen (Oxoid. Reino Unido). También se recolectó madera del mismo punto de muestreo (P1) la cual fue almacenada en una bolsa hermética estéril. Las muestras fueron rotuladas (**Apéndice 1**) y almacenadas en un cooler

para su transporte al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Ya en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta el inicio de los experimentos.

3.5.1. Análisis fisicoquímicos de las muestras

Tanto el pH como el potencial de oxido-reducción (ORP) fueron medidos *in situ* en el DAM, empleando un potenciómetro Hanna HI2002 (Hanna instruments) y un electrodo de HI11310 con una referencia de Ag/AgCl. El pH del sedimento se midió *ex situ*, empleando una solución 0.01 M de CaCl₂ en una proporción 1:1 con el sedimento (**Apéndice 2**). La concentración de metales totales en el DAM fue enviada previamente (Valdez-Nuñez et al., 2024).

3.6. Obtención de CMS acidófilos

Los CMS se obtuvieron mediante un experimento de microcosmos empleando un medio de sales minerales (MSM) de acuerdo con Valdez-Nuñez et al., (2022) (**Apéndice 3**). El medio fue suplementado con 0.1 g L⁻¹ de extracto de levadura y 1.42 g L⁻¹ (10 mM) de sulfato de sodio (Na₂SO₄) como acceptor terminal de electrones, así como también 0.5 g de cisteína. El pH del medio se ajustó a ~3.50 utilizando HCl o NaOH al 3M. Posteriormente, 45 mL del medio fue distribuido en botellas de suero de 100 mL insuflando N₂. Las botellas se cerraron con tapones de butilo y sellos de aluminio para permitir el ingreso de jeringas. La atmósfera fue reemplazada por N₂:CO₂ (80:20 v/v) manteniendo una presión máxima de 1.5 atm. Las botellas se esterilizaron en autoclave bajo condiciones estándares (121°C a 1 atm por 20 min). Se crearon dos sets considerando la fuente de carbono/donadores de electrones a inocular: glicerol (GlyMix) y acetato

(AceMix) (5mM cada uno). Cada set fue suplementado con una fuente de vitaminas. Todos los microcosmos también fueron suplementados con madera la cual se recolectó de P1 con el fin de actuar como soporte para los consorcios microbianos. Para ello, se utilizó un bisturí estéril para seccionar la madera en pequeños fragmentos (entre ~2 – 5 mm). Se adicionó el 5 % (w/v) a cada botella de suero conteniendo MSM (45 mL) utilizando una pinza estéril. Este procedimiento se realizó en una cámara bajo condiciones anóxicas (atmósfera de N₂) la cual se comprobó mediante la inserción de una tira de resazurina (Oxoid. Reino Unido) (**Apéndice 4**).

Se inoculó (10% (p/v)) una mezcla de los sedimentos colectados de ambos puntos de muestreo (P1 y P2) en cada set de microcosmos con MSM bajo condiciones anóxicas. Las botellas (AceMix y GlyMix) fueron incubadas estáticamente a 30 °C por 28 días. El pH se midió cada 7 días y el ORP al inicio y final del experimento. Así también, se midió la producción de sulfuro cada 7 días mediante el método de azul de metileno de acuerdo con Cline (1969). Posteriormente se realizaron transferencias (hasta 3 transferencias) desde el enriquecimiento a nuevas botellas con MSM nuevo (45 mL) considerando las mismas condiciones de cultivo antes mencionada (**Apéndice 5**). Así también se adicionaron controles abióticos (sin inóculo y sin madera) para corroborar la acción de los microorganismos.

3.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Esta técnica se realizó para corroborar el funcionamiento de la madera como soporte de microorganismos. Se recolectó 2 mL de muestra del microcosmos inoculado con glicerol (GlyMix 3, final de la 3ra transferencia) con una jeringa estéril. Previo a ello, se agitó la

botella para homogenizar el contenido y garantizar la colección de la muestra. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su envío al laboratorio de Geomicrobiología de la Universidad de Tübingen en Alemania en donde fueron analizadas siguiendo el procedimiento descrito por Runge et al., 2024.

3.8. Ensayo de tolerancia al arsénico

Se realizó para determinar la CMT de As (III) por parte de los CMS tomando como valor de referencia la concentración de este metaloide encontrado en el DAM del túnel minero, ubicado en Colquirrumi, Hualgayoc, Cajamarca. Para ello se prepararon 2 sets de microcosmos (uno con glicerol y otro con acetato) por triplicado con 45 mL de MSM (como indica en la sección 3.6), a pH 3.50. Se añadieron 4 concentraciones de NaAsO₂ (0.20, 0.80, 3.20 y 12.80 mM) más el control abiótico a cada uno de los sets. Se inoculó 10 % (v/v) de la última transferencia (incluyendo la madera) de GlyMix y AceMix, las cuales contenían los CMS (**Apéndice 6**). Los microcosmos fueron incubados estáticamente en oscuridad a 30°C durante 47 días. La CMT de As (III) de los CMS se determinó evaluando los parámetros fisicoquímicos (pH, producción de sulfuro y ORP) y visuales (formación de precipitados de color amarillo (sulfuros de As (III)) en cada una de las concentraciones anteriormente mencionadas en donde la evolución de estos (de forma simultánea) fue considerado como un aspecto positivo.

3.9. Ensayo de biomineralización del As (III)

3.9.1. Preparación del medio de cultivo

Se empleó MSM a pH de 3.50 teniendo en cuenta la CMT de As (III) del CMS así como glicerol como donador de electrones y madera como soporte. Se utilizó botellas de vidrio

de 1 L con 450 mL de MSM (triplicados) con tapones de butilo y tapas rosca con agujero en el centro (Duran). Las condiciones anóxicas se lograron de acuerdo a lo mencionado anteriormente. Las botellas se esterilizaron en autoclave bajo condiciones estándares. Seguidamente se adicionó la fuente de vitaminas y el donador de electrones (glicerol).

3.9.2. Inoculación de CMS.

Se empleó como inóculo el CMS obtenido (incluida la madera) en la tercera transferencia del set GlyMix. Se inoculó el 10 % (v/v) a cada una de las botellas las cuales se incubaron a 30°C por 91 días.

3.9.3. Métodos analíticos.

3.9.3.1. Medición de parámetros fisicoquímicos

Se midió el pH cada 7 días y la producción de sulfuros cada 15 días hasta los 91 días del experimento, mientras que el ORP se midió al inicio y al final. Se consideró como aspectos positivos de la biominerización de As (III) la evolución favorable de los parámetros antes mencionados, así como a la formación de los precipitados de color amarillo (sulfuros de As (III)).

3.9.4. Determinación de As (III) soluble

La concentración de As (III) soluble durante el ensayo de biominerización se determinó siguiendo el protocolo descrito por Pasha y Narayana (2008). Para determinar As (III) se empleó un espectrofotómetro UV/VIS (Único, modelo UV2100PU). Este método se basó en la reacción de As (III) con yodato de potasio (KIO_3) en medio ácido para liberar yodo.

El yodo liberado decolora el color rojo rosado de la safranina. La disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 532 nm es directamente proporcional a la concentración de As (III) y se correlaciona con la ley de Beer en el rango de 0,4 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el metaloide (Pasha y Narayana, 2008) (**Apéndice 7**). Con el fin de validar los resultados obtenidos de la remoción de As (III) mediante el método empleado en esta investigación, se enviaron muestras a los 105 días de tratamiento a la empresa SGS del Perú S.A.C empleando el método EPA 200.8 Rev. 5.4, 1994 Determinación de elementos traza en agua y desechos mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

3.10. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La obtención de datos, se realizó mediante fichas de recolección de datos (**Apéndice 8**), también se utilizó un cuaderno de apuntes para escribir los resultados obtenidos de cada proceso en determinado tiempo.

3.11. Técnicas de procedimiento y análisis de datos

Los datos obtenidos durante el ensayo de biomineralización de As III empleando el CMS fueron procesados en “OriginPro 2025 (Learning Edition)”. Las pruebas de normalidad se evaluaron mediante Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. En los casos donde los datos no siguieron una distribución normal ($p < 0,05$), se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar la homogeneidad entre réplicas. Las diferencias estadísticas entre experimentos se analizaron mediante el análisis de varianza de medias repetidas unidireccionales (ANOVA) más una prueba post hoc de Dunn para comparar pares de réplicas (**Apéndice 9**).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Características fisicoquímicas de los puntos de muestreo

Las muestras de agua de los puntos de muestreo P1 y P2 mostraron valores de pH de 3.20 y 2.06 respectivamente, y valores de ORP de + 534.80 y + 516.90 mV, respectivamente. En el sedimento los valores de pH en los mismos puntos de muestreo fueron de 3.15 y 2.28 mientras que los valores de ORP fueron de + 489.20 y + 528.70 mV. La concentración de As en las muestras de agua en cada punto fueron 5.40 y 15.50 mg L⁻¹.

4.1.2. Obtención de los CMS. Se obtuvieron los CMS luego de 28 días de incubación. Los cultivos iniciales mostraron un incremento de pH (AceMix de 5.19 ± 0.03 a 5.97 ± 0.05; GlyMix de 3.90 ± 0.07 a 5.82 ± 0.03), producción de sulfuros (AceMix de 0 a 1.43 ± 0.11; GlyMix de 0 a 2.64 ± 0.03) y valores negativos de ORP (AceMix de -173.37 ± 31.57 a -230.73 ± 36.14; GlyMix de -169.63 ± 1.12 a -263.13 ± 11.10) luego del tiempo de incubación en la tercera transferencia (**Figuras 6 - 9**).

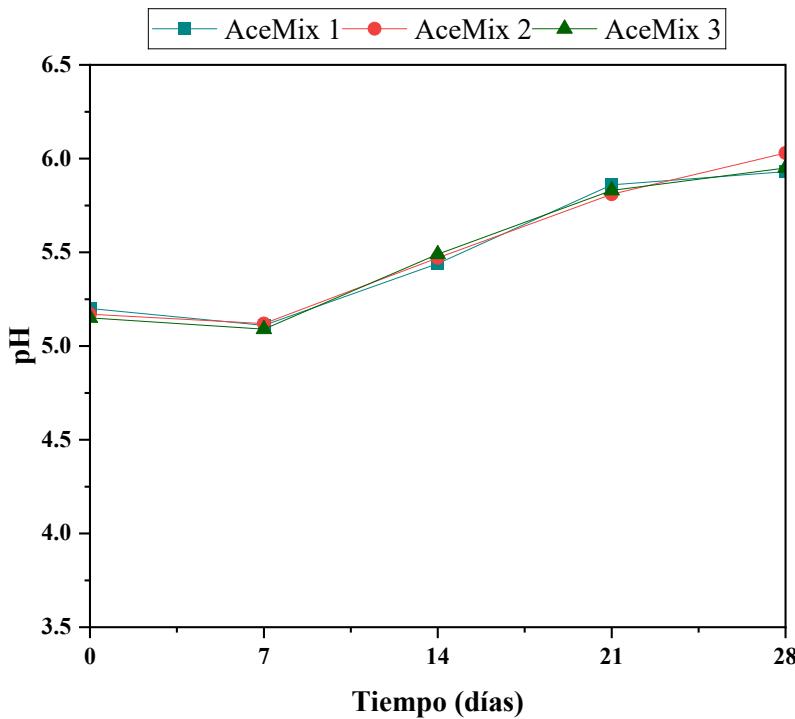


Figura 6. Variación del pH de los microcosmos AceMix (triplicados) tercera transferencia con respecto al tiempo de incubación.

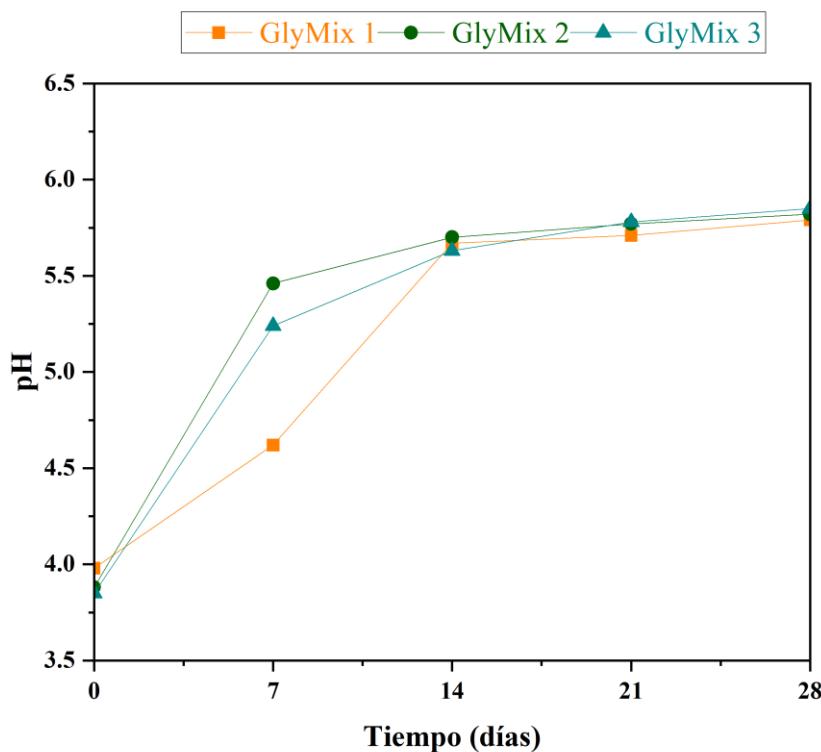


Figura 7. Variación del pH de los microcosmos GlyMix (triplicados) tercera transferencia con respecto al tiempo de incubación.

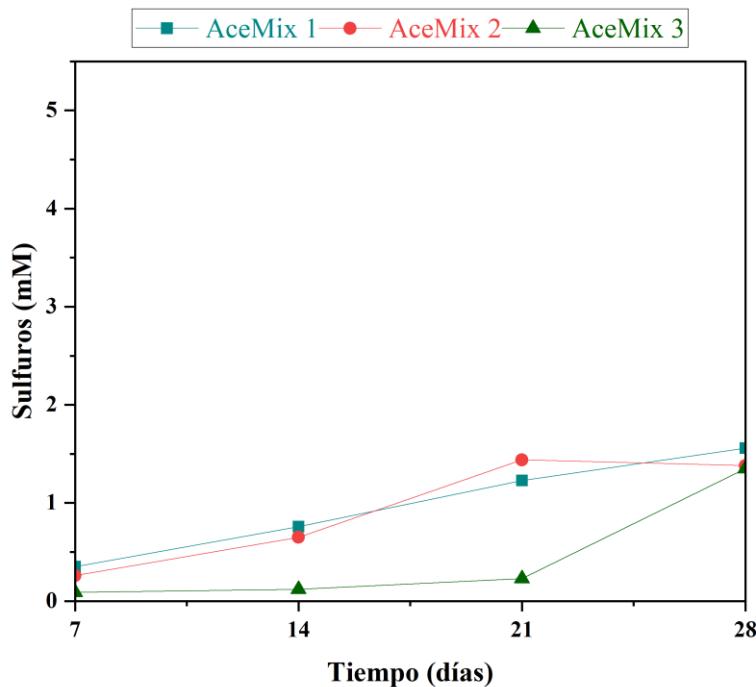


Figura 8. Producción de sulfuro en los microcosmos AceMix (triplicados) tercera transferencia con respecto al tiempo de incubación.

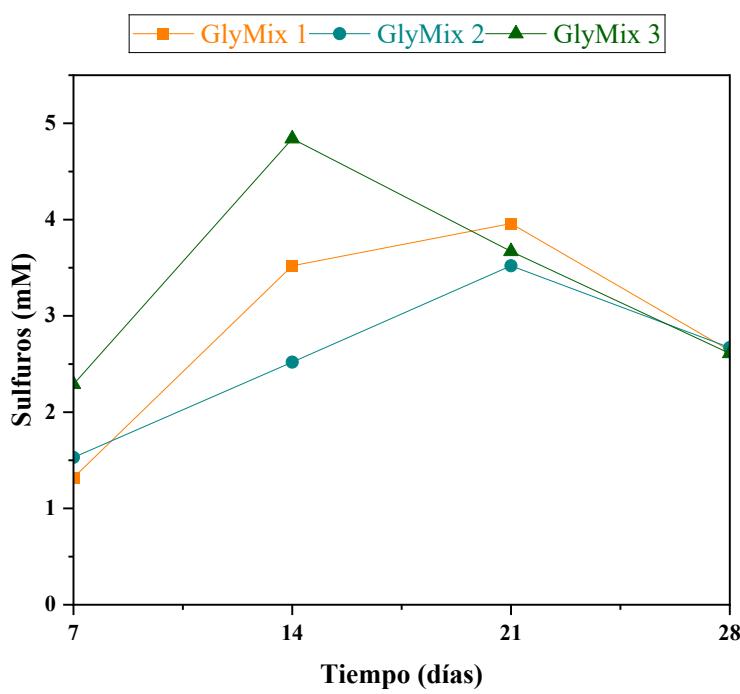


Figura 9. Producción de sulfuros en los microcosmos GlyMix (triplicados) tercera transferencia con respecto al tiempo de incubación.

4.1.3. Adjunción de los CMS a la madera.

Con el fin de comprobar el rol de la madera como un material de soporte para los CMS se realizó un análisis MEB en una muestra del microcosmo GlyMix 3 (3ra transferencia). Los resultados muestran la estructura porosa del material lignocelulósico (madera) y la adjunción microbiana en la superficie (**Figura 10**).

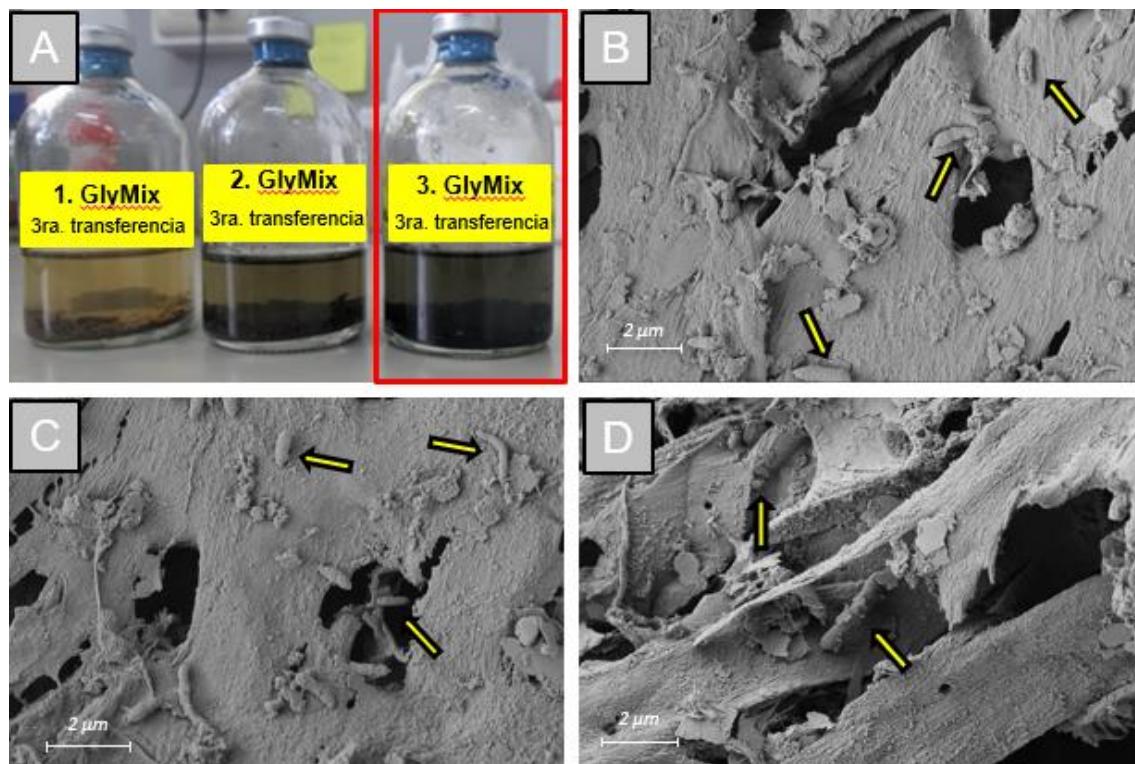


Figura 10. Microcosmos GlyMix contenido madera como soporte e imágenes de MEB. (A) Microcosmos (GlyMix, 3ra transferencia) con madera en donde fueron generados los CMS después de 28 días de incubación. La botella enmarcada en rojo (GlyMix 3) fue seleccionada para este análisis. (B, C y D) Imágenes de MEB de partículas de madera colectadas del microcosmos. Se observa la estructura del material lignocelulósico (madera) así como la adjunción microbiana en la superficie (flechas amarillas).

4.1.4. Ensayo de tolerancia al As (III) por los CMS

En el ensayo de tolerancia al As (III) se emplearon los CMS obtenidos previamente (GlyMix y AceMix) así como cuatro concentraciones diferentes de este metaloide por un periodo de 47 días a pH 3.50 La **Tabla 1** muestra la relación entre la concentración de As (III) y los parámetros fisicoquímicos (pH, producción de sulfuro y variación de ORP)

relacionados a la actividad metabólica de los CMS. La CMT de As (III) encontrada para ambos CMS fue de 0.80 mM.

Tabla 1. Relación entre la concentración de As (III) y el pH, sulfuros y ORP.

As (III) (mM)	AceMix				GlyMix			
	pH	Sulfuro (mM)	ORP (mV)	P	pH	Sulfuro (mM)	ORP (mV)	P
0.20	6.14 ± 0.11	0.75 ± 0.22	-262.03 ± 10.35	Sí	5.96 ± 0.07	1.29 ± 0.37	-205.67 ± 13.08	Sí
0.80	6.20 ± 0.19	0.46 ± 0.05	-265 ± 10.78	Sí	5.98 ± 0.13	1.04 ± 0.10	-265.23 ± 15.60	Sí
3.20	5.96 ± 0.06	UR	-236.43 ± 6.69	No	4.79 ± 0.10	UR	-194.53 ± 7.62	No
12.80	5.27 ± 0.04	UR	-196.67 ± 6.77	No	4.25 ± 0.10	UR	-164.87 ± 8.32	No

UR = Under Range (Bajo del rango) P = Precipitados

La tabla muestra la relación que presenta la concentración de As (III) entre el pH, sulfuros y ORP generados por los CMS durante el tratamiento de tolerancia. Las filas resaltadas en rosado muestran la CMT de los CMS generados en los microcosmos AceMix mientras que las filas resaltadas en amarillo la CMT de los CMS generados en los microcosmos GlyMix.

4.1.5. Ensayo de biominerización de As (III)

Para este tratamiento se empleó el CMS GlyMix, ya que presentó mejores resultados en cuanto a la producción de sulfuros (3.72 ± 0.22 Mm) a los 21 días (ver **Figura 9**) y una mejor evolución del pH durante la 3era transferencia (**Figura 7**), así como la CMT de As (III) obtenida en el ensayo anterior (0.80 mM). Al inicio del tratamiento, el valor de ORP fue de -139.07 ± 18.85 mV obteniéndose hasta -255.47 ± 13.00 mV al final del experimento, lo que indica condiciones altamente reductoras favorecidas por la actividad microbiana.

Estos resultados observados presentan una diferencia significativa ($p > 0,05$) en el pH, ORP, sulfuros y además en la detección del As soluble. La evolución del pH durante el periodo experimental también fue favorable (pH inicial: 3.50, pH final: 6.02) (**Figura 11**). En cuanto a la producción de sulfuros el incremento fue progresivo hasta obtener un valor de 1.78 mM a los 91 días (**Figura 11**). Así también se logró visualizar la presencia de precipitados amarillos en el fondo de la botella lo cual estaría relacionado con la formación de sulfuros de arsénico (probablemente oropimente o rejalar) (**Figura 11**). Los parámetros antes mencionados permanecieron constantes en el control abiótico durante todo el tratamiento.

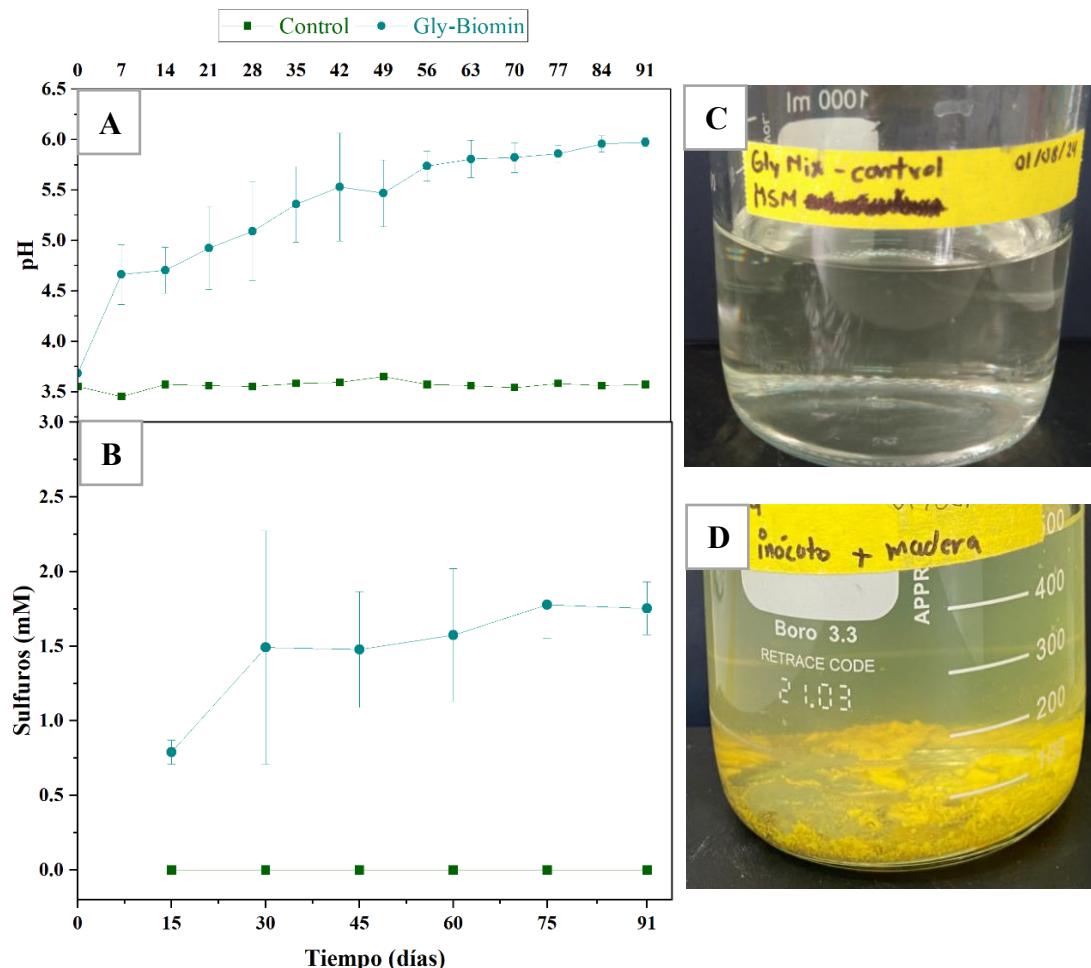


Figura 11. Evolución de parámetros fisicoquímicos y generación de precipitados en el ensayo de biominerización de As (III) empleando un CMS a pH 3.50. (A y B) Evolución del pH y sulfuro durante 91 días. (C) Control abiótico sin formación de precipitados. (D) Biominerización de As (III).

Por otro lado, en cuanto a la variación de la concentración de As (III) soluble en el ensayo de biomineralización de As (III) se observó una disminución progresiva de este metaloide (inicio: 0.80 mM, final: 0.03 mM) obteniendo una remoción superior al 96% (**Figura 12**).

En cuanto al control abiótico, este permaneció inalterado. Finalmente, los resultados obtenidos por la empresa SGS coincidieron con los valores medidos por espectrofotometría en laboratorio, confirmando la fiabilidad del método espectrofotométrico empleado para la medición de As (III) soluble (**Apéndice 10**).

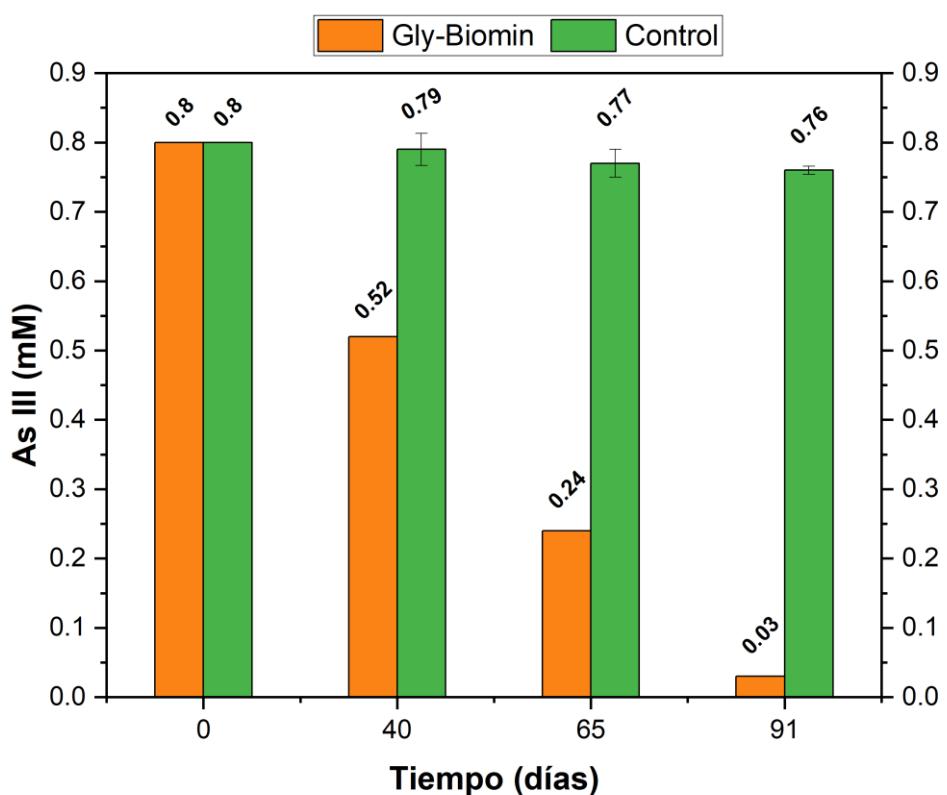


Figura 12. Concentración del As (III) soluble en el ensayo de biomineralización empleando el CMS a pH 3.50 con respecto al tiempo.

4.2. Discusión

4.2.1. Características fisicoquímicas de los puntos de muestreo

Los valores de pH que se registraron en los puntos de muestreo P1 (agua: pH 3.20; sedimento: pH 3.15) y P2 (agua: pH 2.06; sedimento pH 2.28) muestran condiciones ácidas características de un sistema de DAM. El DAM se caracteriza por presentar un pH <5.0, así como altas concentraciones de metal(loid)es (As, Fe, Mn, Mg, Co, Zn, Cu, Pb, Cd) y sulfatos (Baker y Banfield, 2003; Adetunji y Erasmo, 2025). Estudios previos reportan valores de pH similares (2.50) en zonas mineras abandonadas en Hualgayoc, Cajamarca, potencialmente ocasionado por procesos de oxidación de minerales sulfurados tales como la pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2), galena (PbS), y arsenopirita (FeAsS) (Adetunji y Erasmo, 2025; Valdez-Nuñez et al., 2024). Sin embargo, a pesar de las condiciones extremas para la vida, diferentes microorganismos extremófilos pueden prosperar en estos ambientes acídicos realizando procesos de oxidación/reducción de elementos químicos (hierro y azufre) contribuyendo así con los ciclos biogeoquímicos (Dong et al., 2023a).

Los valores de ORP en P1 y P2 (agua: +534.80 y +516.90 mV; sedimento: +528.70 y +489.20 mV) sugieren la existencia de condiciones oxidantes en ambos puntos de muestreo lo que podría influenciar en la movilidad del As (III). A pH ácido (< 6.00) y en condiciones reductoras, la forma predominante es la de As (III). A pH alcalino (> 6.00) y en condiciones oxidantes, la forma predominante es el As (V), una forma más soluble propiciando su movilidad (Burton et al., 2021). De esta manera, y considerando los valores de pH, las concentraciones de As halladas en los puntos de muestreo de agua (P1: 5.40 mg L⁻¹ y P2: 15.50 mg L⁻¹) sugieren la presencia de posibles formas oxidadas de As (As (V)), aunque la presencia de formas reducidas (As(III)) no puede ser descartada

(generación de microambientes reducidos). Es importante señalar que los valores de As encontrados en los puntos de muestreo difieren mucho entre sí, lo que podría estar relacionado con la distancia entre los puntos (P1: 103 m, P2: 299 m desde el ingreso del túnel).

4.2.2. Generación de CMS y empleo de madera como soporte

Los CMS se obtuvieron en microcosmos a pH 3.50 inoculados con sedimentos de DAM colectados en un túnel minero abandonado ubicado en Hualgayoc, Cajamarca. La generación de precipitados negruzcos en las botellas y la evolución de los parámetros fisicoquímicos confirmó el desarrollo de CMS durante el ensayo (**Figura 10**) (Muyzer y Stams, 2008). La generación de precipitado negruzcos se debe a la producción de sulfuros (hasta 3.72 ± 0.22 mM) los cuales generaron después sulfuros metálicos (p.e. FeS) que suelen precipitar al aumentar el pH debido al consumo de protones (H^+) y generación de bicarbonato (HCO_3^-) por la reducción de sulfato y la oxidación de fuentes de carbono (p.e., glicerol y acetato).

En general, los resultados obtenidos muestran al glicerol como un donador de electrones/fuente de carbono favorable debido a su baja toxicidad en condiciones ácidas (Santos et al., 2017). Por el contrario, el acetato suele ser tóxico para las células microbianas a bajo pH (inhibición por sustrato) afectando el desarrollo de CMS a pH ácido (3.50) (Adetunji y Erasmo, 2025).

Los valores de pH aumentaron en el ensayo de microcosmos (GlyMix : de 2.87 a 6.02; AceMix: de 3.15 a 6.08), llegando hasta 6.05 en la última transferencia. Este patrón es consistente con lo reportado por Ríos-Valencia et al. (2017) y Le Pape et al. (2017),

quienes también observaron un aumento de pH conforme pasaba el tiempo del ensayo. A su vez, los valores negativos de ORP y la producción de sulfuros confirman la generación de un ambiente reductor, como es evidenciado en estudios previos (Valdez-Nuñez et al., 2022).

En cuanto al uso de madera como soporte para el desarrollo de CMS se observó una clara adjunción de los microorganismos en la superficie lignocelulósica (Jiang et al., 2024) (**Figura 10**). La adjunción celular puede deberse a la producción de EPS que les permite a los microorganismos adherirse a una superficie. Además de los EPS, algunas bacterias también utilizan estructuras especializadas como fimbrias, pili, flagelos y capsulas las cuales facilitan la adherencia inicial y la formación de biopelículas al permitir el anclaje mecánico a superficies sólidas (Rabus et al., 2015; Obando, 2020). Estas estructuras no solo refuerzan la adherencia, sino que también pueden participar en la comunicación celular y la organización espacial del consorcio (Stams et al 1993; Li et al., 2021; Jiang et al., 2024). De esta manera nuestro estudio confirma que la madera podría favorecer la adjunción de CMS, lo que contribuye a conservar una alta densidad de biomasa activa y mejorar la eficiencia de procesos clave como la reducción de sulfato (Pacheco, 2020; Tanmoy y LeFevre, 2024).

4.2.3. Tolerancia de los consorcios microbianos sulfidogénicos al As (III)

Se evaluó la tolerancia de los CMS obtenidos a 4 concentraciones de As (III) (0.20, 0.80, 3.20 y 12.80 mM) a pH 3.50 y por un periodo de 47 días. Al finalizar los experimentos se encontró una relación inversa entre la concentración de As (III) y los parámetros fisicoquímicos que señalan la actividad metabólica de los CMS (**Tabla 1**), estimándose una CMT de 0.80 Mm para ambos sets, GlyMix y AceMix. A concentraciones más

elevadas de As (III) (p.e.3.20 Mm) no se detectó producción de sulfuro, se evidenció una disminución del pH, un aumento del ORP lo que indicaría una posible inhibición metabólica dada su toxicidad. Tal como lo indican Serrano y Leiva (2017) quienes observaron la disminución del metabolismo de las BSR acido-tolerantes a medida que aumenta la concentración de As (III). Cabe resaltar que el CMS GlyMix mostró una mayor producción de sulfuro (1.04 ± 0.10 mM) que AceMix (0.46 ± 0.05 mM) a 0.80 mM de As (III), probablemente por el estrés adicional que ejerce el acetato cuando es empleado como fuente de carbono a bajo pH (ver sección 4.2.2.).

Los mecanismos involucrados en la tolerancia de As (III) están relacionadas a reacciones de oxidación y reducción, especiación enzimática, bioacumulación, así como a biosíntesis de proteínas de unión a metales o polímeros extracelulares (Serrano y Leiva, 2017). En el consorcio SRB1 analizado por Li et al. (2024), se observó que bajo estrés por As(III), el ensamblaje microbiano adapta su metabolismo según las condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Bajo anaerobiosis se registró alta eficiencia de reducción de sulfato (66.7 %) con precipitación de sulfuros de arsénico (AsS y As₄S₄), mientras que en presencia de oxígeno la eficiencia disminuyó a 47.4 %, sin embargo, se incrementó la producción de EPS y la actividad de la enzima SOD para combatir frente a la toxicidad combinada de As(III) y oxígeno. Estos hallazgos coinciden con los reportes en consorcios acidófilos donde la biosíntesis de EPS y la defensa oxidativa influyen en la supervivencia.

Estudios con otros microorganismos (p.e., *Acidithiobacillus ferriphilus* QBS-3) han demostrado una sobre expresión de genes del operón *ars*, implicadas en la reducción de As (V), expulsión de As (III) y posibles procesos de metilación biológica como mecanismos de detoxificación genética (Liu et al., 2025). Estos sistemas moleculares

podrían expresarse en ciertas BSR acidófilas presentes en el CMS para así conferir mayor tolerancia al As.

La producción de sulfuros biogénicos estaría relacionada también a la tolerancia a As (III). Estudios realizados por Battaglia Brunet et al. (2024) confirman que SRB autóctonas acidófilas capaces de reducir sulfato y generar H₂S dominan procesos de precipitación selectiva de sulfuros de As (III), con alta eficiencia (hasta 99%) incluso en ambientes ácidos (< 4). Esto destaca el rol de SRB productoras de sulfuro en la tolerancia al As (III).

Asimismo, la madera también podría haber intervenido directa e indirectamente en la tolerancia al As (III) de los CMS. De forma directa, destaca la capacidad de la madera natural para retener metales mediante adsorción, en donde estos son adheridos a la superficie del material gracias a interacciones electrostáticas y afinidad química (Tanmoy y LeFevre, 2024; Jiang et al., 2024). Por su parte, Del Sole et al. (2023) observaron que los materiales compuestos de aserrín y arcilla generan la complejación mediante la formación de enlaces estables entre los grupos funcionales de la madera (OH⁻, COOH) y los iones metálicos, reduciendo su movilidad en soluciones acuosas. De forma indirecta, la porosidad de este material proporciona protección física y química a los CMS frente a la exposición a As (III) (Páez et al., 2009; Muyzer y Stams, 2008; Laroche et al., 2023). Así también, la producción de EPS producto de adjunción microbiana a la madera podría servir como sitios de nucleación de elementos metálicos, limitando así la movilización del As (III) y posterior toxicidad en las células microbianas (Burton et al., 2021). De esta manera el empleo de madera como soporte para el CMS podría ser beneficioso en el tratamiento de aguas contaminadas con As (III).

4.2.4. Biomineralización de As (III) por el CMS

La biomineralización de As (III) se evaluó empleando el CMS (3ra transferencia) y su CMT de As (0.80 mM) así como madera como soporte y glicerol como fuente de carbono/donador de electrones a pH 3.50. Durante el ensayo la evolución favorable del pH (desde 3.90 hasta 5.82) y la producción de sulfuros (hasta 1.50 mM) confirman la actividad sulfidogénica de los consorcios microbianos. Este comportamiento también fue reportado por Battaglia-Brunet et al. (2024) y Frederico et al. (2022), donde el incremento de pH (hasta 6.50) facilitó la reducción de sulfato y, por lo tanto, la producción de sulfuros y la precipitación de metales (Laroche et al. 2023, Le Pape et al. 2017) Por su parte, el ORP alcanzó un valor de hasta -255.47 mV al final del experimento sugiriendo la generación de condiciones reductoras.

La remoción eficiente de As (III) en el ensayo y la formación visible de precipitados amarillentos fueron indicativos del proceso de biomineralización llevado a cabo por el CMS a pH ácido (3.50). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Ríos-Valencia et al. (2017), quienes reportaron una alta capacidad de ciertas comunidades microbianas para precipitar As (III) en forma de sulfuros metálicos, particularmente en condiciones de pH ácido (4.50), como rejalar y oropimente. Asimismo, Serrano y Leiva (2017) señalaron que la bioprecipitación de As en condiciones anaeróbicas, facilitada por BSRs, es un mecanismo clave en la inmovilización de este metaloide, destacando la generación de precipitados como una estrategia de detoxificación microbiana.

En nuestro ensayo se redujo la concentración inicial de As (III) de 0.80 mM a 0.03 ± 0.005 mM, lo que representa una reducción del 96%. Esto coincide con lo reportado por Ríos-Valenciana y Celis (2025), quienes observaron la remoción de hasta un 90 % de As al emplear CMS nativos en condiciones similares de pH (2.50 a 4.50) y concentración As

(0.5mM). Así también, la formación de nanoestructuras de sulfuros de As (III) fue la principal forma de biominerización durante el proceso de remoción. Este fenómeno sugiere que las BSR presentes en el consorcio no solo contribuyen a la reducción del As a sus formas menos toxicas como oropimente y rejalar, sino también a la formación de estructuras estables, lo que limita la movilidad del metaloide en el medio y reduce el riesgo de su esparcimiento. Este tipo de biominerización es clave para el desarrollo de estrategias de biorremediación de aguas contaminadas con altas concentraciones de As, como lo han demostrado otros estudios sobre el uso de CMS para el tratamiento de DAM (Liu et al., 2025; Battaglia Brunet et al., 2024).

La presencia de madera en el ensayo de biominerización de As (III) también pudo influir en la disminución de este metaloide del sistema así como en el desarrollo óptimo del CMS. La madera, por su composición rica en celulosa, hemicelulosa y lignina, puede actuar como un material adsorbente natural (Jiang, et al., 2024), capaz de retener metales/metaloides mediante mecanismos físicos y químicos como la interacción con grupos funcionales y la captura en poros tal como se explicó anteriormente.

Es importante mencionar que la concentración de As (III) evaluada en este estudio (0.80 mM, equivale a 60 mg L^{-1}) excede aproximadamente 6000 veces el valor establecido por el Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua destinada para el consumo humano (sub categoría A) en el Perú, el cual es de 0.01mg L^{-1} (MINAM, 2017). Es por ello que, esta investigación aporta un enfoque novedoso al demostrar una remoción eficiente de As (III) bajo condiciones extremas de acidez (pH 3.50) mediante el uso de un CMS nativo y madera como soporte estructural.

Esta investigación demuestra que la biominerización a pH ácido (3.50) empleando CMS es una estrategia viable para la remoción de contaminantes tales como el As (III) en fases acuosas. Considerando la necesidad de implementar tratamientos sostenibles para la

remoción de metales en sistemas como el DAM, el empleo de consorcios microbianos se convierte en una opción eficiente pues permite una remoción adecuada de As (III) en condiciones de bajo pH, sin necesidad de ajustes químicos, lo que reduce costos y complejidad operativa (Battaglia-Brunet et al., 2024). Adicionalmente, el uso de CMS junto con madera como soporte físico favorece la formación de biopelículas estables y resistentes, introduciendo este proceso en el contexto de la economía circular (Jiang et al., 2024), ideal para remediar problemas ambientales relacionados a aguas residuales de la industria minera de forma sostenible.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se lograron CMS (GlyMix y AceMix) mediante un ensayo de microcosmos inoculado con sedimentos recolectados de un túnel minero en Hualgayoc y empleando madera como soporte a pH 3.50. Ambos consorcios mostraron actividad en condiciones acídicas, lo cual fue comprobado por el incremento del pH, la producción de sulfuros y una disminución del ORP.

Los CMS lograron una CMT de As (III) de 0.80 mM (60 mg/L) con glicerol como donador de electrones/fuente de carbono. Potencialmente, esta tolerancia fue mediada por mecanismos fisiológicos (producción de EPS, estructuras extracelulares, procesos de bioacumulación o transformación del As (III) y producción de sulfuros) y por la acción adsorbente de la madera.

Se logró la biomineralización de As (III) empleando un consorcio microbiano sulfidogénico a pH 3.50, empleando glicerol como donador de electrones/ fuente de carbono y madera como soporte, removiéndose hasta 96% de este metaloide luego de 91 días de tratamiento. Así también, al final del tratamiento se logró aumentar el pH, disminuir el ORP, y producir sulfuro. Adicionalmente, se formaron precipitados de color amarillo en el fondo de las botellas, lo que visualmente confirma la formación de sulfuros de arsénico (p.e., oropimente, rejalar).

5.2. Recomendaciones

Realizar estudios moleculares (p.e., metagenómica) para conocer que microorganismos están presentes en los consorcios microbianos sulfidogénicos obtenidos. Esto permitiría identificar rutas metabólicas involucradas en los procesos relacionados con la resistencia al As y la biomineralización de este mismo.

Estudios previos como Del Sole et al. (2023) y Tanmoy y LeFevre (2024) proponen que al uniformizar el tamaño de la madera para garantizar superficies de adjunción para los CMS. Demostrando que los materiales lignocelulósicos con estructura porosa regular, como el aserrín o astillas calibradas, mejoran significativamente la capacidad de adsorción de metales y el soporte físico para microorganismos inmovilizados, favoreciendo la colonización de los microorganismos. Esto es importante al realizar transferencias, ya que asegura que una mayor proporción de la biomasa adherida pueda migrar o reproducirse en nuevos sustratos. Además, la madera blanda y menos densa (p.e. pino, álamo, entre otras) se consideran más aptas para la colonización de los microorganismos por poseer una estructura porosa.

Realizar análisis de difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido combinada con espectroscopía de energía dispersiva (SEM-EDS), para confirmar la composición mineralógica exacta del sulfuro metálico formado y su estabilidad a largo plazo en las condiciones experimentales empleadas.

Se recomienda investigar la efectividad del consorcio microbiano y la eficiencia de la biomineralización frente a variaciones de parámetros tales como la temperatura, el pH inicial o mayores concentraciones de As para simular escenarios más realistas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adetunji, A. y Erasmus, M. (2025). ‘Biological treatment of acid mine drainage: An eco-sustainable strategy for removal of toxic pollutants’, *Journal of Hazardous Materials Advances*, 18. doi: 10.1016/j.hazadv.2025.100659
- Alaniz, A. et al. (2017). ‘Arsenic tolerance in bacterial cultures isolated from metal contaminated soil’, *Acta Universitaria*, 27(3), pp. 9–18. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/416/41652062002.pdf>
- Alam, R. y McPhedran, K. (2019). ‘Applications of biological sulfate reduction for remediation of arsenic’, *Chemosphere*, 222, pp. 932–944. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.194.
- Alazard, D. et al. (2010) ‘Desulfosporosinus acidiphilus sp. nov.: A moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments’, *Extremophiles*, 14(3), pp. 305–312. doi: 10.1007/s00792-0100309-4.
- Anantharaman, K. et al. (2018). ‘Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle’, *The ISME Journal* 2018 12:7. Nature Publishing Group, 12(7), pp. 1715–1728. doi: 10.1038/s41396-018-0078-0.
- Baker, B. y Banfield, J. (2003). ‘Microbial communities in acid mine drainage’, *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), pp. 139–152. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00028-X)
- Battaglia-Brunet, F. (2009) ‘Bioprecipitation of Arsenic Sulphide at Low pH’, *Advanced Materials Research*, 73(71), pp. 581-584. doi: 10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.71-73.581.
- Battaglia-Brunet, F. et al. (2024). ‘Sulphidogenic Bioprocesses for Acid Mine Water Treatment and Selective Recovery of Arsenic and Metals’, *Advances in Biochemical and Engineering Biotechnology*. doi: https://doi.org/10.1007/10_2024_264
- Bradley, A., Leavitt, W. y Johnston, D. (2011) ‘Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway’, *Geobiology*. Geobiology, 9(5), pp. 446–457. doi: 10.1111/J.1472-4669.2011.00292.X.
- Burton, E. et al. (2021) ‘Arsenic-Imposed Effects on Schwertmannite and Jarosite Formation in Acid Mine Drainage and Coupled Impacts on Arsenic Mobility’,

- ACS Earth and Space Chemistry, 5(6), pp. 1418-1435. doi: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsearthspacechem.1c00047>
- Carty, N. y Ledesma, R. (2019) ‘Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology’, Trends in Biotechnology. Elsevier.
- Chai, G. et al. (2023) ‘Effects of organic substrates on sulfate-reducing microcosms treating acid mine drainage: Performance dynamics and microbial community comparison’, Journal of Environmental Management, 330 (Acceso: diciembre del 2022), pp. 117-148. doi: 10.1016/j.jenvman.2022.117148.
- Chang, J.-S., Yoon, I.-H. y Kim, K.-W. (2018). ‘Arsenic biotransformation potential of microbial ars H responses in the biogeochemical cycling of arsenic-contaminated groundwater’, Chemosphere, 191, pp. 729–737. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.044. Christiane, C. G. F. (2013) ‘Microbial Sulfur metabolism’, Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents, pp. 12–26.
- Clemens, S. (2006) ‘Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants’, Biochimie, 88(11), pp. 1707-1719. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2006.07.003.
- Cline, J. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in Natural Waters. Department of Oceanography, University of Washington, Seattle. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454>
- Cosmidis, J. y Benzerara, K. (2022). ‘Why do microbes make minerals?’, Comptes Rendus Géoscience, 354, pp.1–39. doi: doi.org/10.5802/crgeos.107
- Christiane Dahl, y Cornelius G. Friedrich. (2013). ‘Microbial sulfur metabolism’, Springer. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-72682-1>
- Cruzado-Tafur, E. et al., (2021). ‘Heavy metal contents in soils and native flora inventory at mining environmental liabilities in the Peruvian Andes’, Journal of South American Earth Sciences, 106, pp. 0895-9811. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2020.103107>
- Darma, A. et al. (2021). ‘Arsenic biotransformation and mobilization: the role of bacterial strains and other environmental variables’, Environmental Science and Pollution Research volume, 29, pp. 1763–1787. doi: 10.1007/s11356021-17117-x.

- Del Sole, R. et al. (2023). ‘Evaluation of Effective Composite Biosorbents Based on Wood Sawdust and Natural Clay for Heavy Metals Removal from Water’, Materials, 16(15): 5322 doi: 10.3390/ma16155322
- Dong, Y. et al. (2023a). ‘Study on Growth Influencing Factors and Desulfurization Performance of Sulfate Reducing Bacteria Based on the Response Surface Methodology’, ACS Omega, 8(4), pp. 4046–4059. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c06931>
- Dong, Y. et al. (2023b). ‘Study on the Effectiveness of Sulfate Reducing Bacteria to Remove Heavy Metals (Fe, Mn, Cu, Cr) in Acid Mine Drainage’, Sustainability, 15(6), pp. 54-86. doi: 10.3390/su15065486.
- Frederico, T. et al. (2022). ‘Comparison of two acidophilic sulfidogenic consortia for the treatment of acidic mine water’, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A., 10, pp. 21-42. doi: 10.3389/FBIOE.2022.1048412/BIBTEX.
- Huda, N. et al. (2021). ‘Biochemical process and functional genes of arsenic accumulation in bioremediation: agricultural soil’, International Journal of Environmental Science and Technology volume, 19, pp. 9189–9208.
- Irshad, S. et al. (2021). ‘Insights into conventional and recent technologies for arsenic bioremediation: A systematic review’, Environmental Science and Pollution Research, 28, pp. 18870–18892. doi: 10.1007/s11356-021-124878.
- Jiang, J. et al. (2024). ‘Utilizing adsorption of wood and its derivatives as an emerging strategy for the treatment of heavy metal-contaminated wastewater’, Environmental Pollution, 340(1), pp. 269-7491 doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122830>
- Kabiraj, A. et al. (2022). ‘Bacterial Arsenic Metabolism and Its Role in Arsenic Bioremediation’, Current Microbiology, 79(131). doi: 10.1007/s00284-02202810-y.
- Kalia, V. C. y Purohit, H. J. (2008). ‘Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy’, Journal of industrial microbiology & biotechnology, 35(5), pp. 403–419. doi: 10.1007/s10295-007-0300-y.
- Laha, A. et al. (2022). ‘Recent advances in the bioremediation of arseniccontaminated soils: a mini review’, World Journal of Microbiology and Biotechnology volume,

- 38(189). doi: 10.1007/s11274-022-03375-5.
- Laroche, E. et al. (2023). ‘Bio-precipitation of arsenic and antimony in a sulfatereducing bioreactor treating real acid mine drainage water’, FEMS Microbiology Ecology, 99(8). doi <https://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiad075>
- Leavitt, W. et al. (2015) ‘Sulfur Isotope Effects of Dissimilatory Sulfite Reductase’, Frontiers in Microbiology. Frontiers Media SA, 6(DEC), p. 1392. doi: 10.3389/FMICB.2015.01392.
- Le Pape, P. et al. (2017). ‘Complete removal of arsenic and zinc from a heavily contaminated acid mine drainage via an indigenous SRB consortium’, Journal of Hazardous Materials, 321(5), pp. 764–772. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.09.060.
- Li, M. et al. (2024). ‘Contrasting response strategies of sulfate-reducing bacteria in a microbial consortium to As³⁺ stress under anaerobic and aerobic environments’, Journal of Hazardous Materials, 465, pp. 0304-3894. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133052>
- Li, X. et al. (2021). ‘Adaptation mechanisms of arsenic metabolism genes and their host microorganisms in soils with different arsenic contamination levels around abandoned gold tailings’, 291(15), p. 117994. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117994.
- Liu, R.. et al. (2025). ‘Biooxidation of Arsenopyrite by Acidithiobacillus ferriphilus QBS 3 Exhibits Arsenic Resistance Under Extremely Acidic Bioleaching Conditions’, Biology 2025, 14(5), 550. doi: <https://doi.org/10.3390/biology14050550>
- López, C. et al. (2016). ‘Bioquímica microbiana de arsénico: Mecanismos y potencial en biorremediación’. Disponible en: <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/site/wpcontent/uploads/2020/07/bn-carlos-AsBQM-bkchap-only.pdf>
- MINAM (2017). ‘Decreto Supremo N.º 004-2017-MINAM – Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias’, Ministerio del Ambiente, Disponible en: <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>
- MINEM (2022). ‘Resolución Ministerial N.º 335-2022-MINEM/DM - Normas y documentos legales - Ministerio de Energía y Minas’, Plataforma del Estado Peruano, Disponible en:

<https://www.gob.pe/institucion/minem/normaslegales/3456690-335-2022-minem-dm>

Muyzer, G. y Stams, A. J. M. (2008). ‘The ecology and biotechnology of sulphatereducing bacteria’, *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), pp. 441–454. doi:10.1038/nrmicro1892

Obando, P. (2020). ‘Lixiviación de Arsénico a partir de arsenopirita mediada por Streptomyces’. Tesis de Maestría. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8194/Lixiviac ion_ObandoChavez_Pamela.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). ‘Asénico’. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>

Oremland, R. S. (2003). ‘The Ecology of Arsenic’, *Science*, 300(5621), pp. 939–944. doi:10.1126/science.1081903.

Pacheco, S. (2020). ‘Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de bacterias sulfato reductoras libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio de disminuir iones de hierro en solución’. Tesis de Pregrado. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8602/Determinaci on_PachecoHuerta_Sara.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Páez-Espino, D. et al. (2009). ‘Microbial responses to environmental arsenic’, *Biometals*, 22(1), pp. 117–130. doi: 10.1007/s10534-008-9195-y

Pfeifer, K. et al. (2021). ‘Archaea Biotechnology’, *Biotechnology Advances*, 47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107668.

Pasha, C. y Narayana, B. (2008) ‘Determination of arsenic in environmental and biological samples using toluidine blue or safranine O by simple spectrophotometric method’, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(1), pp. 47–51. doi: 10.1007/s00128-008-9454-1.

Pisoschi, A. y Pop, A. (2015) ‘The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, pp. 55-74. doi: 10.1016/J.EJMECH.2015.04.040

Pozo, J. et al. (2017). ‘Tratamiento microbiano de aguas ácidas resultantes de la actividad

- minera: una revisión’, *Tecnología y ciencias del agua*, 8(3). doi: 10.24850/j-tyca-2017-03-05.
- Rabus, R. et al. (2015) ‘A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes’, *Advances in Microbial Physiology*, 66, pp. 55–321. doi: 10.1016/bs.ampbs.2015.05.002.
- Ramos, C. (2022). ‘Optimización de la remoción de cadmio del drenaje ácido de la mina “La Esperanza” empleando humedales anaeróbicos artificiales a escala de laboratorio’. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marco. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/17677/Ramos_nl.pdf?sequence=1
- Rangel, E. et al. (2015). ‘Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos’, *Terra Latinoamericana*, 33(2). Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018757792015000200103
- Ríos-Valencia, E. et al. (2017). ‘Role of indigenous microbiota from heavily contaminated sediments in the bioprecipitation of arsenic’, *Journal of Hazardous Materials*, 339, pp. 114 – 121. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2017.06.019
- Ríos-Valencia, E y Celis, B. (2025). ‘Bioprecipitation of arsenic sulfide nanofibers in synthetic groundwater by indigenous bacterial consortia from arsenic-polluted sediments’, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13 (3), pp. 2213-3437. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117032>
- Runge, E. et al. (2024). ‘Hydrothermal sulfidation of biogenic magnetite produces framboid-like pyrite’, *Communications Earth & Environment*, 5(1), 252. Doi: <https://doi.org/10.1038/s43247-024-01400-z>
- Santos, S. et al, (2017) ‘Bacterial glycerol oxidation coupled to sulfate reduction at neutral and acidic pH’, *J Gen Appl Microbiol*, 64(1), pp.1-8. doi: <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.02.009>.
- Serrano, J. y Leiva, E. (2017). ‘Removal of Arsenic Using Acid/Metal-Tolerant Sulfate Reducing Bacteria: A New Approach for Bioremediation of High-Arsenic Acid Mine Waters’, *Water*, 9(12), p. 994. doi: 10.3390/w9120994.
- Sevak, P. y Pushkar, B. (2024). ‘Arsenic pollution cycle, toxicity and sustainable

- remediation technologies: A comprehensive review and bibliometric analysis', Journal of Environmental Management, 349, pp. 0301-4797. doi: 10.1016/j.jenvman.2023.119504.
- Sim, M. et al. (2023) 'What Controls the Sulfur Isotope Fractionation during Dissimilatory Sulfate Reduction', ACS Environmental Au, 3(2) pp.76-86. doi: <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.2c00059>
- Stams, A. J. M. et al. (1993) 'Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria', Applied and Environmental Microbiology, 59(4), pp. 1114–1119. doi: 10.1128/aem.59.4.1114-1119.1993.
- Steger, D. et al. (2011). 'Microorganisms with novel dissimilatory (bi)sulfite reductase genes are widespread and part of the core microbiota in low-sulfate peatlands', Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology, 77(4), pp. 1231–1242. doi: 10.1128/aem.01352-10/suppl_file/steger_et_al_supplementary_material.pdf
- Tanmoy, D. y LeFevre, G. (2024). 'Sorption and biodegradation of stormwater trace organic contaminants via composite alginate bead geomedia with encapsulated microorganisms', Environmental Science: Water Research & Technology, 12. doi: <https://doi.org/10.1039/D4EW00600C>
- Valdez-Nuñez, L. et al. (2022) 'Microbial Communities in Peruvian Acid Mine Drainages: Low-Abundance Sulfate-Reducing Bacteria With High Metabolic Activity', Geomicrobiology Journal, 39(10), pp. 867–883. doi: 10.1080/01490451.2022.2087808.
- Valdez-Nuñez, L. et al. (2024). 'Acidophilic sulphate-reducing bacteria: Diversity, ecophysiology, and applications', *Environmental Microbiology Reports*, 16(5). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.70019>
- Xing, D. et al. (2023) 'A Comparative Study on Heavy Metal Removal from CCA-Treated Wood Waste by Yarrowia lipolytica: Effects of Metal Stress', Journal of Fungi, 9(4):469. doi: 10.3390/jof9040469
- Zhuang, F. et al (2023) 'Biogeochemical behavior and pollution control of arsenic in mining areas: A review', Frontiers in Microbiology, 14, pp. 626. doi: 10.3389/FMICB.2023.1043024/BIBTEX.

APÉNDICES

Apéndice 1

Tabla 5. Fichas para recolectar los datos del lugar de muestreo

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS		Código de muestra:
Fecha:	Punto de muestreo:	
Nombres del responsable		
pH del DAM		
Volumen de sedimento colectado		
Número de muestras colectadas		

Apéndice 2

Puntos de muestreos y medición de parámetros fisicoquímicos



Figura 13. Muestra el proceso de recolección de las muestras de sedimento y madera, así como la medición de los parámetros fisico-químicos del agua *in situ*. (A). recolección del sedimento en el P1 y P2. (B) recolección de madera en el P2.

Apéndice 3.

Preparación del medio de sales minerales (MSM)



Figura 14. Preparación del medio. (1) agregar las soluciones stock. (2) Dispensar el líquido preparado en frascos de suero de 100 mL. (3) realizar el intercambio de gases ($N_2/CO_2 : 80/20$). (4) Esterilizar el medio dispensado en una autoclave. (5) Añadir la solución de vitaminas y el donador de electrones a cada botella.

Apéndice 4.

Preparación de la madera.



Figura 15. (A) Se muestra las condiciones estériles para almacenar la madera en el microtubo. (B) se procede a pesar cada una de ellas. (C) se colocan para film y se almacenan en una gradilla hasta su uso.

Apéndice 5.

Obtención de los microcosmos



Figura 16. Muestra fotografías de los microcosmos formados con sus respectivos donadores de electrones GlyMix (glicerol) y AceMix (acetato).

Apéndice 6.

Obtención de las concentraciones para la prueba de tolerancia

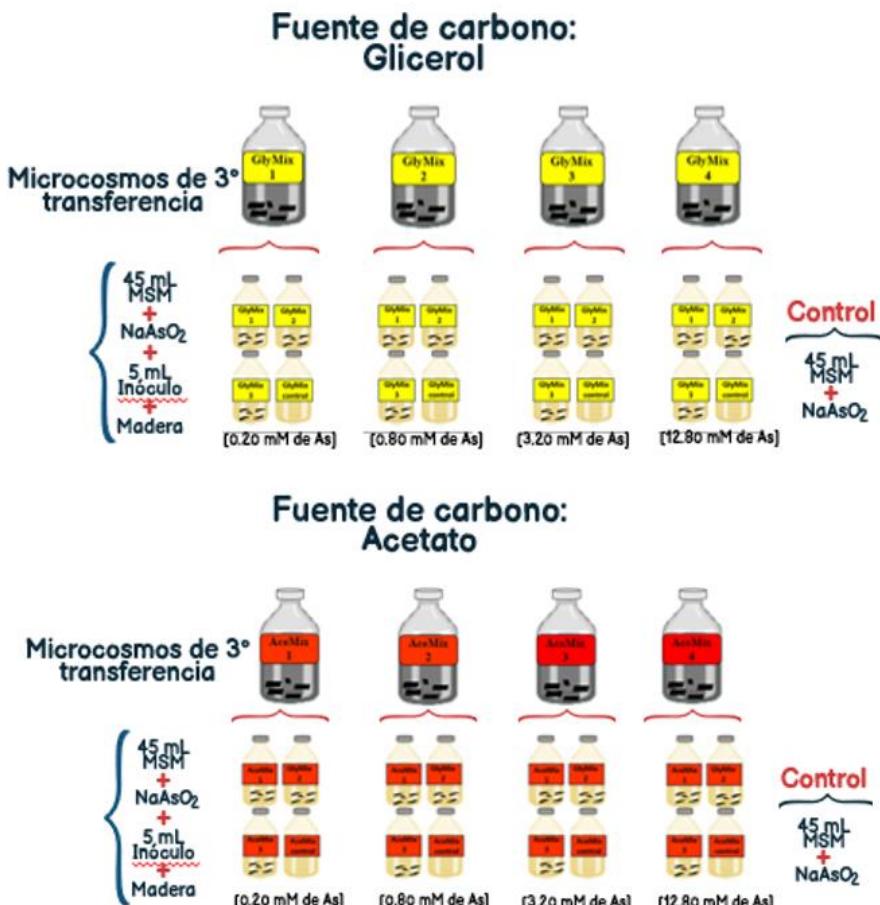


Figura 17. Presenta la combinación que se realizó para obtener los CMS dentro de las siguientes concentraciones.

Apéndice 7.

a. Preparación de la curva de calibración

La metodología analítica empleada para la determinar el As III soluble, se basó en el protocolo de Pasha y Narayana (2008), y modificado en la toma de una alícuota de 0.5 mL de muestra. Este método espectrofotométrico UV/VIS a 532 nm se fundamenta en la reacción del As III con yodato de potasio (KIO_3) en medio ácido, lo que libera yodo. Este yodo, a su vez, blanquea la safranina, resultando en una disminución de la absorbancia que es directamente proporcional a la concentración de As III. La curva de calibración (**Figura 26**) presenta una excelente linealidad $R^2=0.9957$, lo que asegura la fiabilidad de las cuantificaciones de As III dentro del rango de 0.4 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Se preparó una solución estándar de arsénico III a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disolviendo 0.04335 g de $NaAsO_2$ en 25 mL de agua destilada. Se añadió alícuotas de la solución estándar a una serie de folas volumétricas de vidrio de 10 mL. Luego, se completó con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 10 mL. De esta manera, podrá obtener las siguientes concentraciones presentes (0.133, 0.100, 0.067, 0.033, 0.011, 0.001 y 0.000 Mm de As III).

b. Procedimiento de la curva de calibración

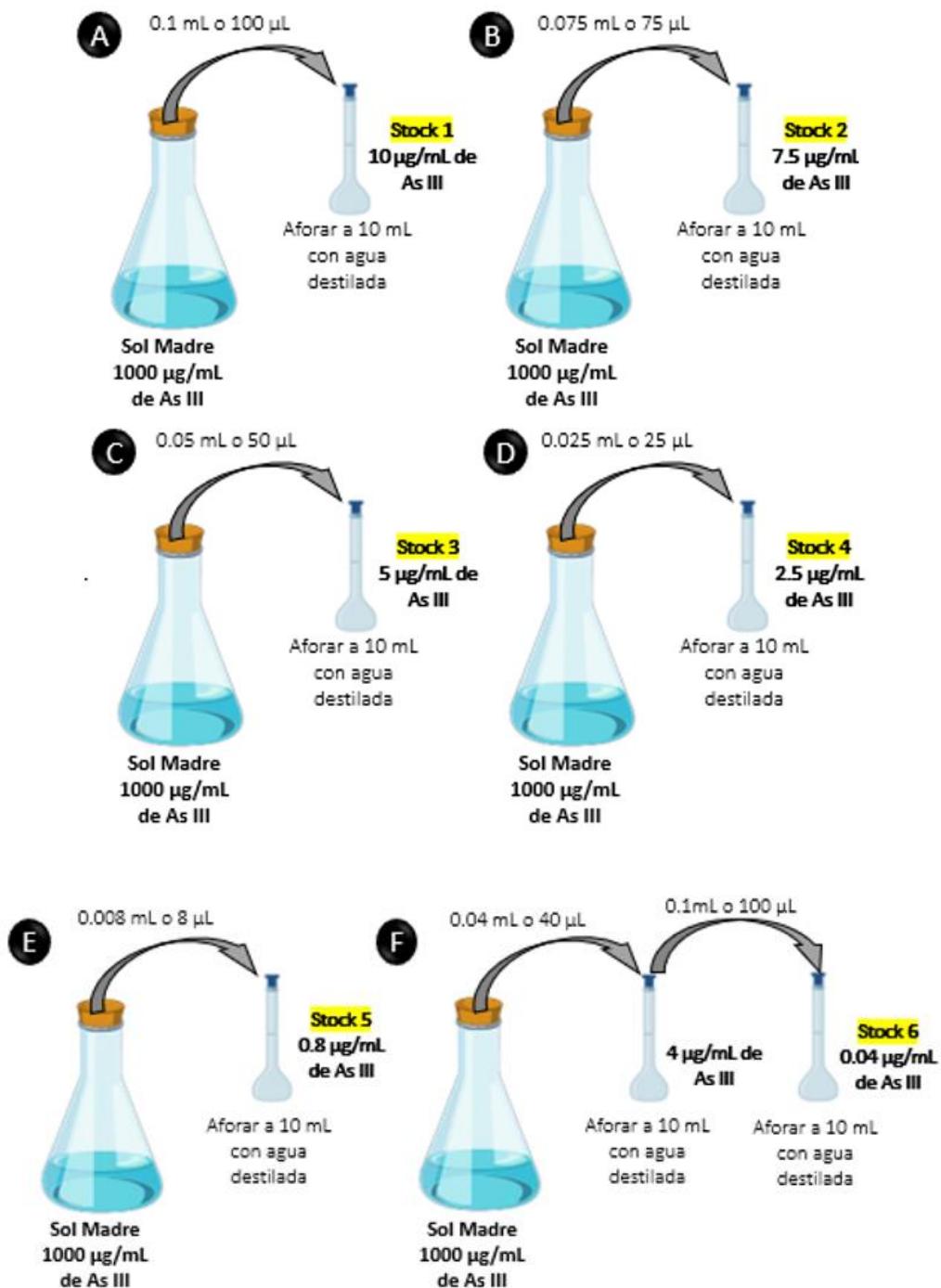


Figura 18. Cada letra representa una solución stock (como indica la **Tabla 2**) que parte desde la concentración primaria o madre.

c. Grafica de la curva de calibración

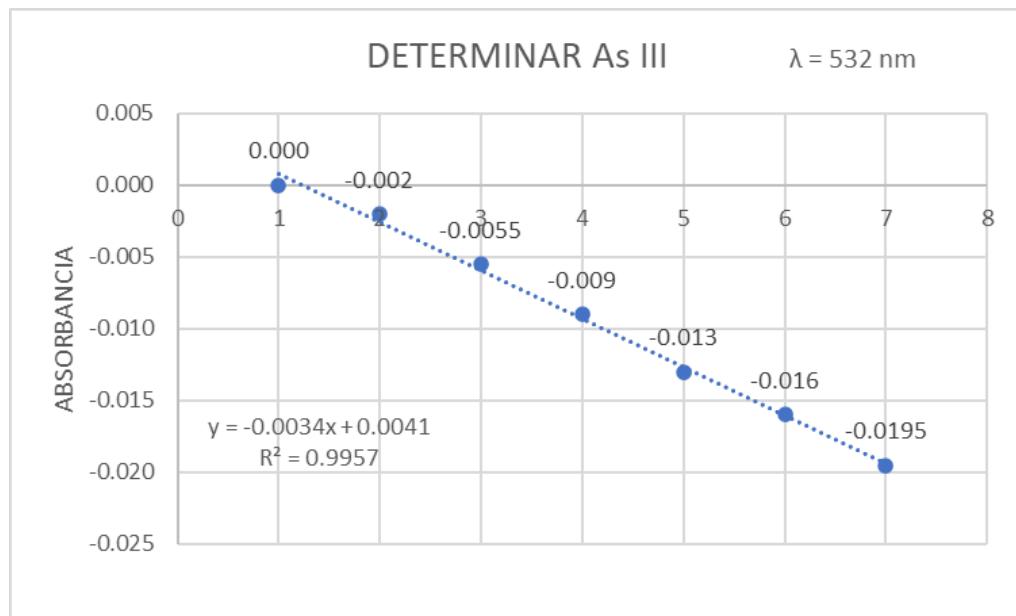


Figura 19. Curva de calibración de las concentraciones de NaAsO₂ (0.000, 0.001, 0.011, 0.033, 0.067, 0.100 y 0.133) respectivamente.

d. Procedimiento para determinar As III en condiciones ácidas.

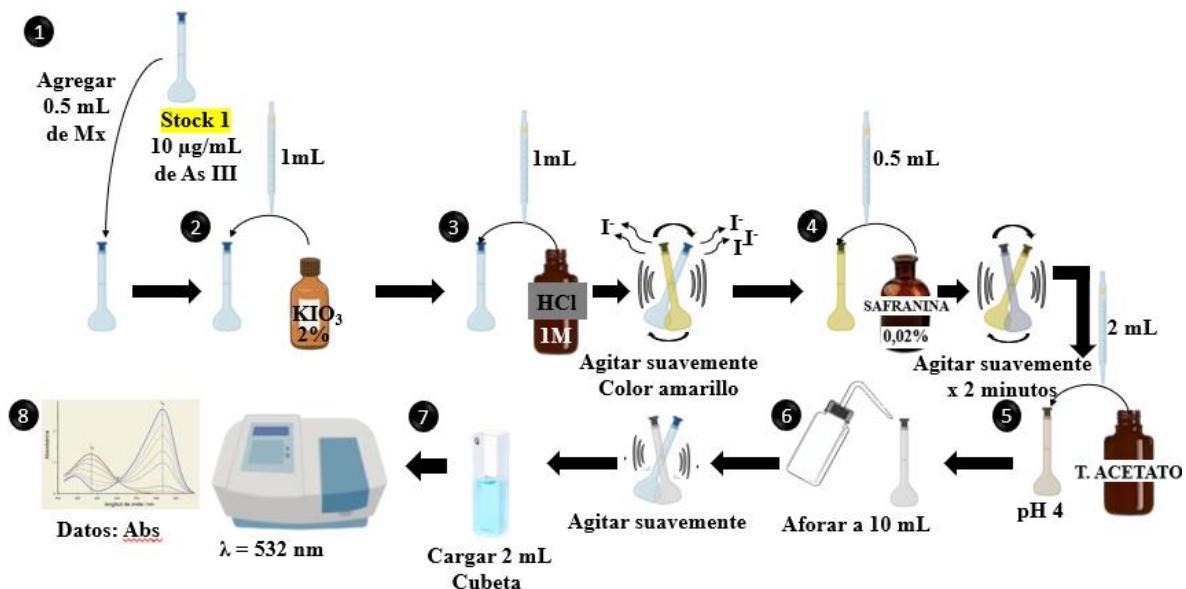


Figura 20. Muestra el procedimiento completamente descrito y paso a paso para poder guiarse observando los números de la imagen

Apéndice 8

Tabla 6. Fichas para recolectar datos en el laboratorio

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS		Código de microcosmo:
Fecha		
Nombres del responsable		
pH		
Donador de electrones	Glicerol	Acetato
Proporción [donador de electrones: sulfato]	[1:2]	[1:2]
Selección de consorcio microbiano sulfidogénico	SÍ	NO
Tratamientos de Biomineralización		
pH [inicial final]		
Potencial de oxido-reducción [inicial final]		
Cuantificación de sulfuros [inicial final]		
Cuantificación de As presente [inicial final]		
Precipitados formados (Presencia)	SÍ	NO

Apéndice 9

Pruebas estadísticas (Kruskal-Walis ANOVA) permitió validar la consistencia entre réplicas y la fiabilidad de los resultados GlyMix para el pH en el tratamiento de biomineralización.

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
"Valor"	G1	14	3.65	5.295	5.77	5.88
	G2	14	3.67	4.6825	5.03	5.68
	G3	14	3.72	4.635	5.675	5.945
						6.05

Ranks

Test Statistics

	Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
"Valor"	3.18663	2	0.20325

Null Hypothesis: The samples come from the same population.
Alternative Hypothesis: The samples come from different populations.
"Valor": At the 0.05 level, the populations are NOT significantly different.

Dunn's Test

	Mean Rank Diff	Z	Prob	Sig
"Valor"	G1 G2	7.85714	1.69486	0.27031 0
	G1 G3	1.67857	0.36208	1 0
	G2 G3	-6.17857	-1.33277	0.54782 0

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.05 level.
Sig equals 0 indicates that the difference of the means is NOT significant at the 0.05 level.

Apéndice 10

Tabla 7. Comparación de los métodos para determinar As en las muestras y el control del tratamiento de biomineralización.

Determinación de As (III)			
Métodos	Tratamiento (Días)	Gly-Biomin (mM)	Control (mM)
Espectrofotometría	91	0.03 ± 0.00	0.76 ± 0.005
SGS (Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente)	105	0.001 ± 0.004	0.75 ± 0.056

ANEXOS

Anexo 1. Formas mineralógicas de los precipitados formados con As



Formas mineralógicas: **A.** Rejalgar (As_4S_4) **B.** Oropimente (As_2S_3) y **C.** Arsenopirita (FeAsS), imágenes recopiladas de Google.

Anexo 4. Componentes del medio MSM (Stams *et al.*, 1993), modificado por (Sanchez-Andrea *et al.*, 2013)

Número	Componente	g L^{-1}
1	KH_2PO_4	0.41
2	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.53
3	NH_4Cl	0.3
4	NaCl	0.3
5	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
6	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.11
7	L-cisteína	0.5

Número	Elementos traza	mL L^{-1}
1	traza ácida y alcalina	0.2
2	solución de vitaminas	1
3	Resazurina	0.05 %