



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

**"Efecto de biopelículas bacterianas sobre materiales de
redes de distribución de agua potable e interacción con
arsénico"**

Tesista: Silvia Elena Rastelli

Directora: Blanca M. Rosales

Codirectora: Marisa R. Viera

Año: 2020

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

I. BIOPELÍCULAS	2
II. ARSENICO Y SU RELACIÓN CON LAS BIOPELÍCULAS	6
a) Presencia de As en el ambiente y su toxicidad	6
b) Relación As- microorganismos	12
III. CORROSIÓN Y SU RELACIÓN CON LAS BIOPELÍCULAS	14
a) Nociones de corrosión	14
b) Relación corrosión-microorganismos	15
IV. TÉCNICAS APLICADAS AL ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y SUPERFICIES	17
V. OBJETIVOS	
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1. Construcción de los circuitos experimentales	26
2.1.2. Caracterización de los materiales a ensayar	28
2.1.3. Procesamiento de las muestras	28

2.2.- CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

2.2.1. Recuento de bacterias heterótrofas totales	31
2.2.2. Aislamiento e identificación de especies sésiles cultivables	32
2.2.3. Análisis molecular de comunidades planctónicas y sésiles	34

2.2.4. Tolerancia y resistencia al As de bacterias heterótrofas aisladas y comunidades	38
2.2.4.1. Análisis de comunidades sésiles y planctónicas cultivadas en medio líquido con distintas concentraciones de As(V)	38
2.2.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	39
2.2.4.3. Búsqueda del gen <i>arsC</i> en microorganismos aislados y biopelículas	41

2.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y LOS DEPÓSITOS LUEGO DE SU EXPOSICIÓN

2.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	42
2.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)	43
2.3.3. Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	43
2.3.4. Microscopía Láser Confocal (MLC)	43
2.3.5. Análisis electroquímicos	45

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS ENSAYADOS

47

3.2.- CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.2.1. Recuento de bacterias heterótrofas totales	49
3.2.2. Aislamiento e identificación de bacterias sésiles	56
3.2.3. Análisis molecular de comunidades planctónicas y sésiles	64
3.2.4. Tolerancia y resistencia al As de bacterias heterótrofas aisladas y comunidades	76
3.2.4.1. Análisis de comunidades sésiles y planctónicas cultivadas en medio líquido con distintas concentraciones de As(V)	76
3.2.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	83
3.2.4.3. Búsqueda del gen <i>arsC</i> en microorganismos aislados y biopelículas	86

3.3.- CORROSIÓN INFLUENCIADA MICROBIOLOGICAMENTE

3.3.1. Análisis de los sustratos y los depósitos luego su exposición	89
3.3.2. Reconstrucción 3D de las biopelículas desarrolladas	122
3.3.3. Análisis electroquímicos.....	132

CAPÍTULO 4. CONSIDERACIONES FINALES	135
--	------------

ANEXOS

ANEXO I	139
ANEXO II	141
ANEXO III a).....	146
III b).....	150
III c).....	156
ANEXO IV	159

REFERENCIAS	162
--------------------------	------------

Agradecimientos:

- A mi directora, Blanca, quién ya no se encuentra entre nosotros, y mi co-directora, Marisa, quienes me dieron esta oportunidad, me guiaron, acompañaron y brindaron todo su conocimiento y apoyo para lograr este trabajo a lo largo de todos estos años.
- A las autoridades de los institutos que me dieron lugar y pusieron a disposición el equipamiento necesario para realizar y llevar adelante esta tesis.
- A todas mis compañeras (hoy mis amigas) del CINDEFI, por haberme integrado y permitido ser parte de un hermoso grupo de trabajo.
- A mis compañeras y compañeros del CIDEPINT, con quienes hemos compartido mucho tiempo de trabajo, charlas, almuerzos y buenos momentos tanto dentro como fuera del instituto.
- A mi familia, por el apoyo brindado y por no dejarme bajar los brazos.
- A todos/as aquellos/as investigadores/as que me enseñaron y ayudaron con alguna/s de las técnicas aplicadas o en el análisis de las mismas durante este trabajo.
- A las entidades que me han otorgado las becas y financiado este trabajo (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y CONICET).

A mi papá

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

I. BIOPELÍCULAS

Una gran variedad de microorganismos, entre los que se encuentran principalmente bacterias, algas y hongos, están presentes en todos los ambientes acuáticos, tanto en sistemas naturales como industriales. Estos microorganismos muestran gran tendencia a fijarse y crecer sobre diversas superficies bióticas o abióticas (Palmer y White, 1997) inmersas en agua formando películas biológicas o "biopelículas" (Dexter, 2003).

En las biopelículas, las bacterias viven agrupadas en acúmulos celulares tridimensionales, constituidos por microcolonias de diferentes células bacterianas aeróbicas y anaeróbicas. Se encuentran envueltas por el *material polimérico extracelular* (MPE), separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos (canales de agua), que permiten el flujo de líquido, nutrientes, oxígeno y remoción de desechos (**Figura 1**).

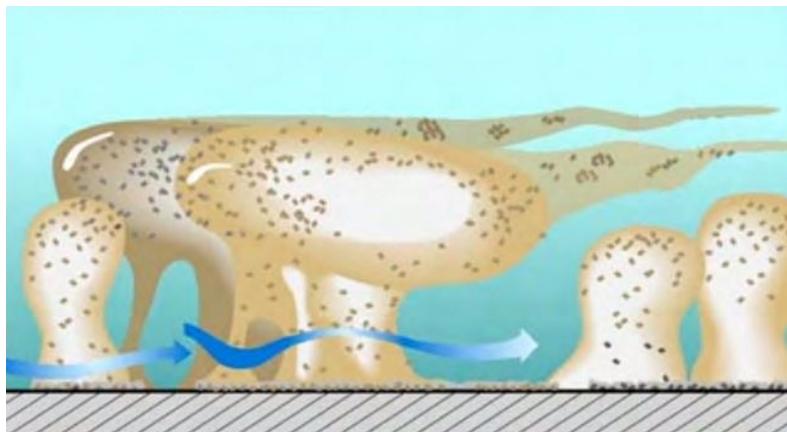


Figura 1. Esquema de una biopelícula. Pueden observarse las microcolonias atravesadas por canales de difusión. Extraído de Paramonova, 2009.

La transición de microorganismos que se desplazan en ambientes líquidos como células libres (microorganismos planctónicos) a microorganismos fijos sobre una superficie (microorganismos sésiles) que lleva a la formación de la biopelícula sobre un sustrato transcurre en distintas etapas (Stoodley *et al.*, 2002; Monds y O`Toole, 2009). En la **Figura 2** puede observarse un esquema de este proceso. Si

bien existen varios modelos que describen la formación de una biopelícula (Metals Handbook, 1987; Jenkinson y Lappin-Scott, 2001; Stoodley *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2010), en términos generales pueden señalarse las siguientes etapas: 1) adsorción instantánea de productos orgánicos sobre la superficie (película condicionante), generando el **acondicionamiento** del sustrato; 2) **adhesión** de especies bacterianas pioneras, etapa en la que algunas bacterias se adhieren a la superficie sumergida en cuestión de horas; 3) **colonización** de la superficie, debido a la división de las células adheridas y a la liberación de MPE. En esta etapa también aparecen otros microorganismos, como hongos y algas que comienzan a asociarse a la superficie luego de la colonización de las pioneras en cuestión de días; 4) **acumulación**, en la cual se produce el agregado de partículas, células muertas, iones provenientes del medio, compuestos derivados del deterioro del sustrato (como por ej. productos de corrosión en el caso de sustratos metálicos); 5) **maduración** de la comunidad, hasta llegar a formar una comunidad en equilibrio o "comunidad clímax", en la que pueden distinguirse microorganismos sésiles y planctónicos y 6) **dispersión**, la biopelícula madura ya establecida, no se mantiene estática sino que es una entidad dinámica gobernada por diversos mecanismos de transporte que tienen lugar en su espesor, y una vez alcanzado un tamaño crítico una parte de ella puede ser desprendida por el movimiento del líquido y redepositarse en otra zona donde el proceso se reiniciará (Metals Handbook, 1987).

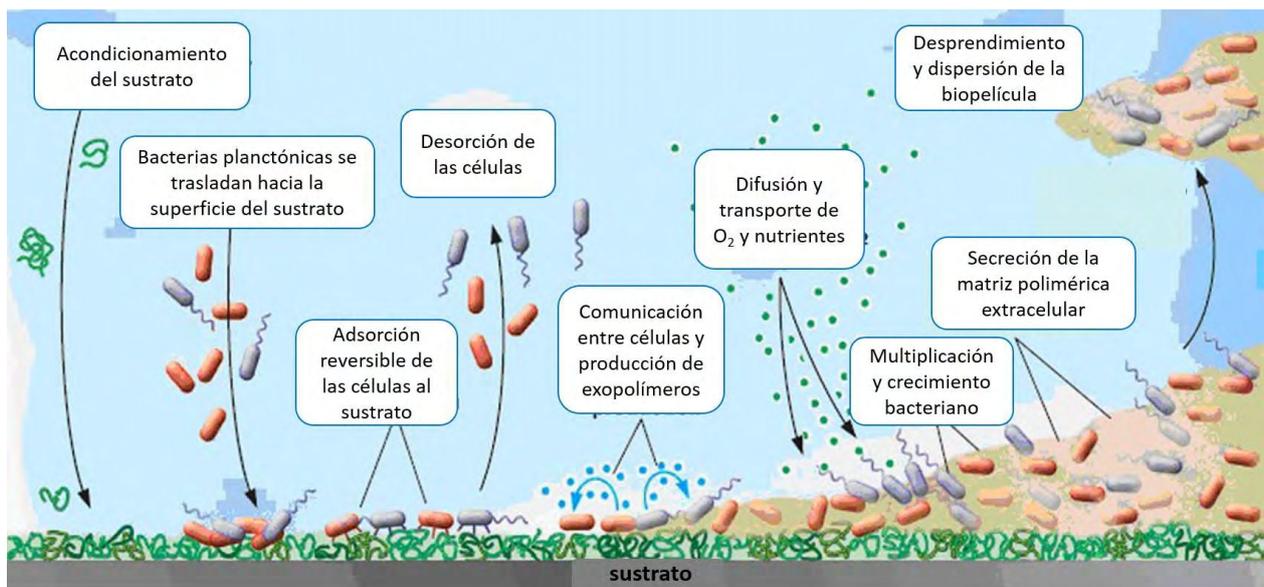


Figura 2. Etapas de desarrollo de una biopelícula. Adaptado de Breyers y Ratner, 2004.

Los microorganismos que constituyen y viven en biopelículas asociadas a superficies exhiben un fenotipo alterado respecto del crecimiento, expresión de sus genes y síntesis de proteínas que sus contrapartes planctónicas, lo que les permite sobrevivir en ambientes más hostiles (Branda *et al.*, 2005; Shirtliff *et al.*, 2002).

Las características estructurales, químicas y fisiológicas de una biopelícula dependen de los microorganismos que la constituyen y de las condiciones ambientales locales. Muchos son los factores que pueden influir en la formación de biopelículas. Entre los más importantes se pueden destacar: fuerza iónica, tipo y concentración de cationes presentes en el medio y características superficiales del sustrato.

El componente principal que mantiene la integridad estructural de la biopelícula es el MPE, también llamado matriz extracelular (Branda *et al.*, 2005; Jenkinson y Lappin-Scott, 2001; Beech *et al.*, 2005). Esta matriz tiene un aspecto de gel y está constituida por proteínas, diversos iones, cadenas de polisacáridos y agua que permiten la cohesión entre las células y las protegen de las condiciones hostiles del medio. La masa de material polimérico se comporta como una membrana de intercambio iónico debido a su alto grado de hidratación.

El comportamiento social llevado a cabo por las bacterias para formar biopelículas es debido a una interacción molecular, que funciona como un sistema de comunicación célula-célula, denominado *quorum sensing*. En este sistema, las bacterias "comunican" su presencia entre sí, liberando y respondiendo a la acumulación de "señales" mediante compuestos químicos denominados autoinductores (Higgins *et al.*, 2007). Si bien los mecanismos del *quorum sensing* no están dilucidados completamente, el proceso de comunicación permite, por ejemplo, a una bacteria percibir la cantidad de otras bacterias que están en estrecha proximidad (**Figura 3**). Si una bacteria puede censar que está rodeada por una densa población de otras bacterias, está más inclinada a unirse a ellas y contribuir a la formación de una biopelícula. En los últimos años se ha introducido el término sociomicrobiología para el estudio de este comportamiento (Parsek y Greenberg, 2005; Blackwell, 2005). Además de la formación de biopelículas, existen otros procesos fisiológicos regulados por el *quorum sensing*, entre los que pueden citarse la expresión de factores de virulencia, la resistencia a antibióticos y metales

pesados, movimientos colectivos (*swarming*), la simbiosis, la competencia interespecífica, la esporulación y la conjugación (Atlas y Bartha, 2002).

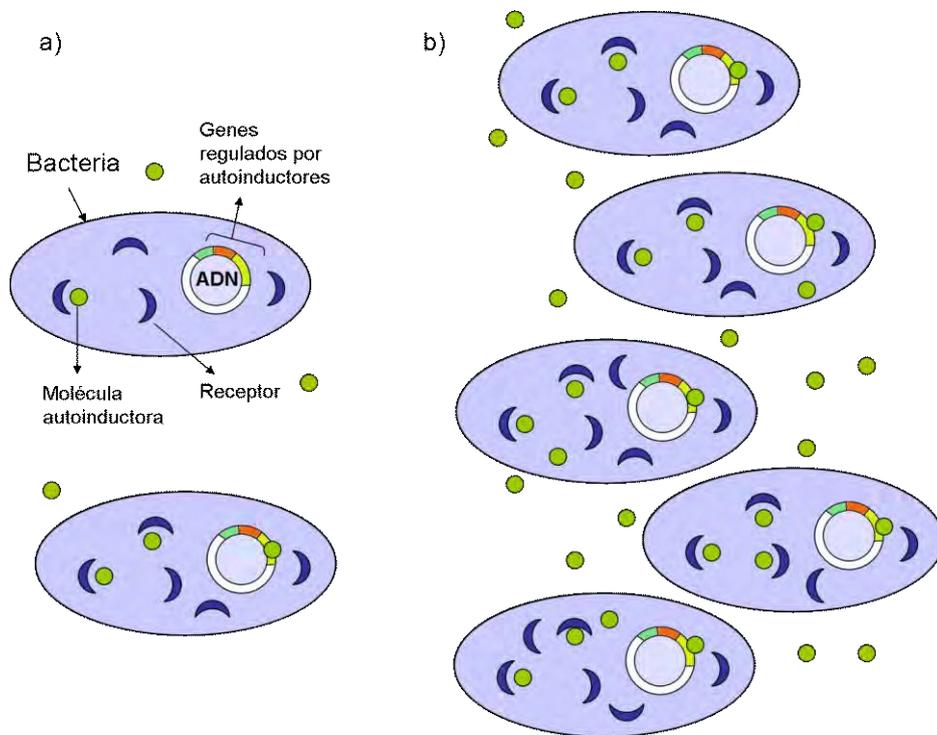


Figura 3. Representación esquemática del sistema de comunicación célula-célula en una biopelícula. En **a)** la densidad poblacional bacteriana es baja y por lo tanto la concentración de la molécula autoinductora (puntos verdes) también es baja. En **b)** la población ha aumentado y como consecuencia, la concentración del autoinductor es alta, lo que activará una señal de respuesta.

A menudo, la formación de biopelículas tiene consecuencias beneficiosas para el ser humano, tales como su utilización en plantas de tratamiento de aguas residuales, en procesos industriales basados en el uso de lodos activados, en procesos de biolixiviación (en los que se produce la disolución de minerales por parte de las bacterias liberando el metal a obtener) y procesos de biorremediación (en los que se utilizan los microorganismos para recuperar ambientes contaminados).

Sin embargo, muchas biopelículas ejercen un efecto negativo y perjudicial sobre diferentes actividades humanas. Entre las que se pueden citar la formación de la placa dental, las infecciones asociadas a prótesis o implantes quirúrgicos (Yang *et al.*, 2011), la resistencia y persistencia de microorganismos patógenos en sistemas

de circulación y almacenamiento que alteran la calidad del producto transportado (sistemas de distribución de agua potable y purificada, industria lechera, industria farmacéutica y cosmética, industria de fabricación de papel), así como también la alteración y el deterioro de los materiales sobre los que se desarrollan (Berry *et al.*, 2006; Ludensky, 2003; Palmer y White, 1997).

Los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable constituyen un ambiente idóneo para la proliferación bacteriana; el flujo de agua favorece el transporte de nutrientes y bacterias, mientras que las paredes de las tuberías y las partículas presentes en el agua sirven de superficie adherente para los microorganismos. Los organismos adheridos tienen una mayor eficacia para absorber nutrientes y además son más resistentes a los ambientes adversos tales como la escasez de nutrientes y la presencia de desinfectantes (Knobelsdorf y Mujeriego, 1997).

II. ARSÉNICO Y SU RELACIÓN CON LAS BIOPELÍCULAS

II. a) *Presencia de As en el ambiente y toxicidad.*

Además de la presencia microbiana y su incidencia en la calidad del agua potable, los ambientes acuáticos presentan otro grave problema: la contaminación química por compuestos aromáticos, metales pesados y metaloides como el arsénico (As).

El arsénico presente en el ambiente, es tanto de origen natural como antropogénico. Está ampliamente distribuido a lo largo de la corteza terrestre, y con concentraciones significativas a todo nuestro alrededor: en el suelo desde 0,1 hasta más de 1.000 mg.kg⁻¹, en la atmósfera en un rango entre 50-400 µg.L⁻¹, en el mar la concentración es alrededor de 2,6 µg.L⁻¹ y en agua dulce cerca de las 0,4 µg.L⁻¹ (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Naturalmente, la presencia de este compuesto en aguas tanto superficiales como subterráneas proviene de la disolución de minerales, la erosión y desintegración de rocas y la deposición atmosférica. Las principales fuentes de contaminación humana y exposición profesional al arsénico provienen de la combustión de carbón, de la industria de fundición de metales, de la industria de

semiconductores y la liberación de minerales ricos en arsénico en la explotación minera. Asimismo, el arsénico ha sido utilizado en medicina (principalmente contra enfermedades protozoarias), en agricultura (en herbicidas), en alimento para animales y en crímenes (como veneno) (NiDhubhghaill y Sadler, 1991; Nriagu, 2001).

El arsénico puede encontrarse en diferentes estados de oxidación (-3; 0; +3 y +5) dependiendo de las condiciones oxidantes del ambiente. El estado de oxidación juega un rol importante en el comportamiento del elemento en sistemas acuáticos, ya que determina su fijación sobre distintos sustratos y su movilidad en el ambiente (Jain y Ali, 2000). Los compuestos del arsénico varían en su toxicidad según su estado de oxidación, la forma química (inorgánico u orgánico), el estado físico (gas, solución, o polvo) y factores como la solubilidad, tamaño de la partícula, velocidad de absorción y eliminación y presencia de impurezas. En general, la toxicidad del As (III) es muy superior a la de la especie pentavalente (Berman, 1980; Gesamp, 1986). El As (V) puede reemplazar al fósforo en varias reacciones bioquímicas, mientras que el As (III) puede reaccionar con grupos tioles de las proteínas, inhibiendo su actividad (Hughes, 2002).

Así como han sido estudiados los ciclos biogeoquímicos de elementos como el C, N, O, S, que son componentes de las células, también han sido estudiados los ciclos de elementos tóxicos como el arsénico (**Figura 4**). El arseniato es el principal compuesto de arsénico en el mar. Este es consumido por los organismos marinos, desde el fitoplancton, algas, crustáceos, moluscos y peces, y posteriormente convertido a compuestos de menor peso molecular (como ácido metilarsónico o ácido dimetilarsínico) o a formas orgánicas de almacenamiento que luego son secretadas al ambiente. Sin embargo, parte del arsénico es retenido por el fitoplancton y metabolizado como compuestos orgánicos complejos. Los peces e invertebrados marinos retienen el 99% del arsénico acumulado en forma orgánica, los tejidos de crustáceos y moluscos contienen concentraciones de arsénico mayores que los peces. El compuesto organoarsénico más abundante que se ha aislado de los organismos marinos (algas, almejas, camarones, langostas, tiburones) es la arsenobetaína. Se sabe que ésta puede ser degradada por los microorganismos a ácido metilarsónico y a arsénico inorgánico, completando este proceso el ciclo biológico del arsénico en el ambiente marino.

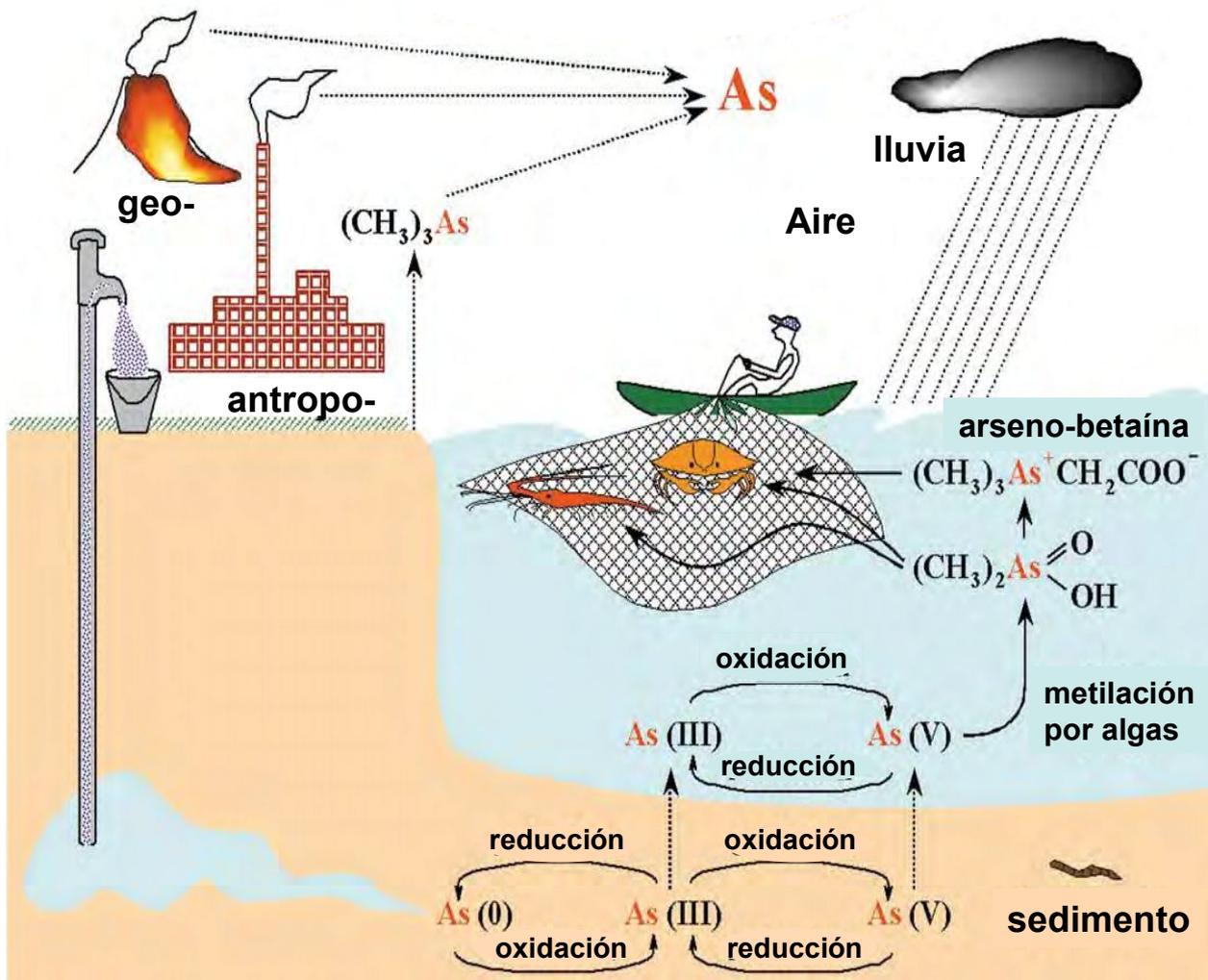


Figura 4. Ciclo biogeoquímico del arsénico. Extraído y traducido de Mukhopadhyay *et al.*, 2002.

Millones de personas en el mundo están en riesgo de padecer los efectos adversos de la exposición al arsénico (**Figura 5**). La mayor parte de esta exposición proviene del agua de bebida extraída de pozos excavados en zonas con sedimentos ricos en arsénico. Se han detectado aguas ricas en arsénico en Argentina, Bangladesh, Bengala, Bolivia, Camboya, Chile, China, Estados Unidos, Ghana, México, Nepal, Perú, Vietnam y Tailandia (Benítez *et al.*, 2011). En ciertas áreas del Oeste y Noreste de Estados Unidos, el agua de red contiene entre 50 y 90 $\mu g \cdot L^{-1}$ de arsénico. La situación en Bangladesh y Bengala es muy diferente: en los años 70, con el objeto de paliar la mortandad generada por el consumo de aguas contaminadas con microorganismos patógenos, se apoyó la iniciativa de cambiar la fuente de agua y millones de pozos se excavaron en terrenos ricos en arsénico,

alcanzando, el agua extraída niveles de arsénico de 500 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estudios de campo posteriores revelaron que la población en riesgo ascendía a más de 500 millones (2004), la “peor intoxicación en masa de la historia” según la OMS. Extensas áreas de China también enfrentan este problema, con más de 3 millones de personas expuestas a aguas que contienen concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arsénico. En Ghana, la contaminación del agua y alimentos con arsénico se debe a la explotación minera del oro. En Nepal, se calcula que alrededor de 500.000 personas se abastecen de pozos superficiales con aguas arsenicales.



Figura 5. Distribución mundial de áreas con presencia de arsénico en aguas subterráneas. Las áreas en azul son lagos. Extraído de Smedley y Kinniburgh, 2002.

El problema de la contaminación con arsénico se encuentra en extensa discusión, debido a sus efectos adversos sobre la salud humana (Katsoyiannis y Zouboulis, 2004; Masud Karim, 2000). Desde hace ya muchos años, diversas investigaciones han reportado que el arsénico es un elemento carcinógeno (Yeh y How, 1963; Yeh *et al.* 1968). El conocimiento de la presencia de elevadas concentraciones de arsénico en agua y sus efectos en la salud están bien documentados en Argentina desde principios del siglo XX. Entre los casos más emblemáticos, y con gran repercusión mundial, se destaca el de Bell Ville en

Córdoba. El gran número de casos detectados en esta ciudad hizo que la patología se conociera como "enfermedad de Bell Ville" hasta 1913, año en que los doctores M. Goyenechea y Pusso relacionaron las patologías observadas con el consumo de agua contaminada con arsénico. Unos años más tarde, Ayerza, redefiniría esta patología como "hidroarsenicismo crónico regional endémico" (HACRE) (Villaamil Lepori, 2015). Desde entonces, se han detectado muertes debidas a varios tipos de cánceres, posteriores a los síntomas del HACRE, en casos en los que el consumo de agua con elevadas concentraciones de arsénico se prolongó durante largos períodos (Tello, 1951, 1981, 1986; Besuschio *et al.*, 1980; Paolini *et al.*, 2005). La contaminación de suelos y aguas con arsénico no sólo tiene importancia sanitaria sino también incidencia económica, ya que el síndrome mencionado es laboralmente incapacitante, por lo que resultaría rentable invertir en el abatimiento y control del arsénico en el agua. Además, como se ha mencionado, su bioacumulación en plantas y animales lleva a exportar secuelas de este problema a otras regiones en principio libres de arsénico (Castro, 1982).

Numerosos trabajos pusieron de manifiesto que la extensión geográfica del área afectada en Argentina era mucho más grande de lo que inicialmente se pensaba. Los valores de arsénico en las aguas subterráneas de algunas regiones del centro de nuestro país (Chaco, Córdoba, La Pampa, Santa Fe, Buenos Aires, Tucumán) han llegado a 600, 700, 1300, 1600 y hasta 4800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Smedley y Kinniburgh, 2002; Farías *et al.*, 2003; Bundschuh *et al.*, 2004; Pérez Carrera y Fernández Cirelli, 2007; Nicolli *et al.*, 2012), es decir valores muy superiores a los límites de seguridad sanitaria especificados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2006) y el Código Alimentario Argentino (Código Alimentario Argentino y Resoluciones de 2007 y 2012) que es de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en agua para ingestión humana, del ganado y para riego. En la **Figura 6** se puede observar la distribución de las áreas afectadas en nuestro país según los datos obtenidos en el censo nacional de 2001.

En un extenso trabajo, Benítez *et al.* (2011) citan y describen las localidades con mayores niveles de arsénico de Argentina. En la provincia de Córdoba, el agua presenta niveles mayores a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de arsénico. En Catamarca, las investigaciones revelaron niveles de arsénico en aguas subterráneas con valores entre 10 y 170 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en los Departamentos de La Paz y de Antofagasta de la Sierra.

En la localidad de Mili (Santiago del Estero), se analizaron muestras de agua subterránea con concentraciones de arsénico de hasta $2400 \mu\text{g.L}^{-1}$, y en la localidad de El Gran Porvenir, concentraciones de hasta $143 \mu\text{g.L}^{-1}$. En la región centro-norte de la provincia de Buenos Aires se hallaron contenidos de arsénico en agua de pozo que superaron los $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ y en el sudoeste, las concentraciones alcanzan valores de hasta $150 \mu\text{g.L}^{-1}$. En la provincia de Mendoza se encontró arsénico en el agua subterránea en un importante sector ubicado al noroeste del oasis norte, cuyas concentraciones variaron entre 10 y $220 \mu\text{g.L}^{-1}$. En la provincia de Tucumán, en toda la zona este se encuentra arsénico en las napas superiores.

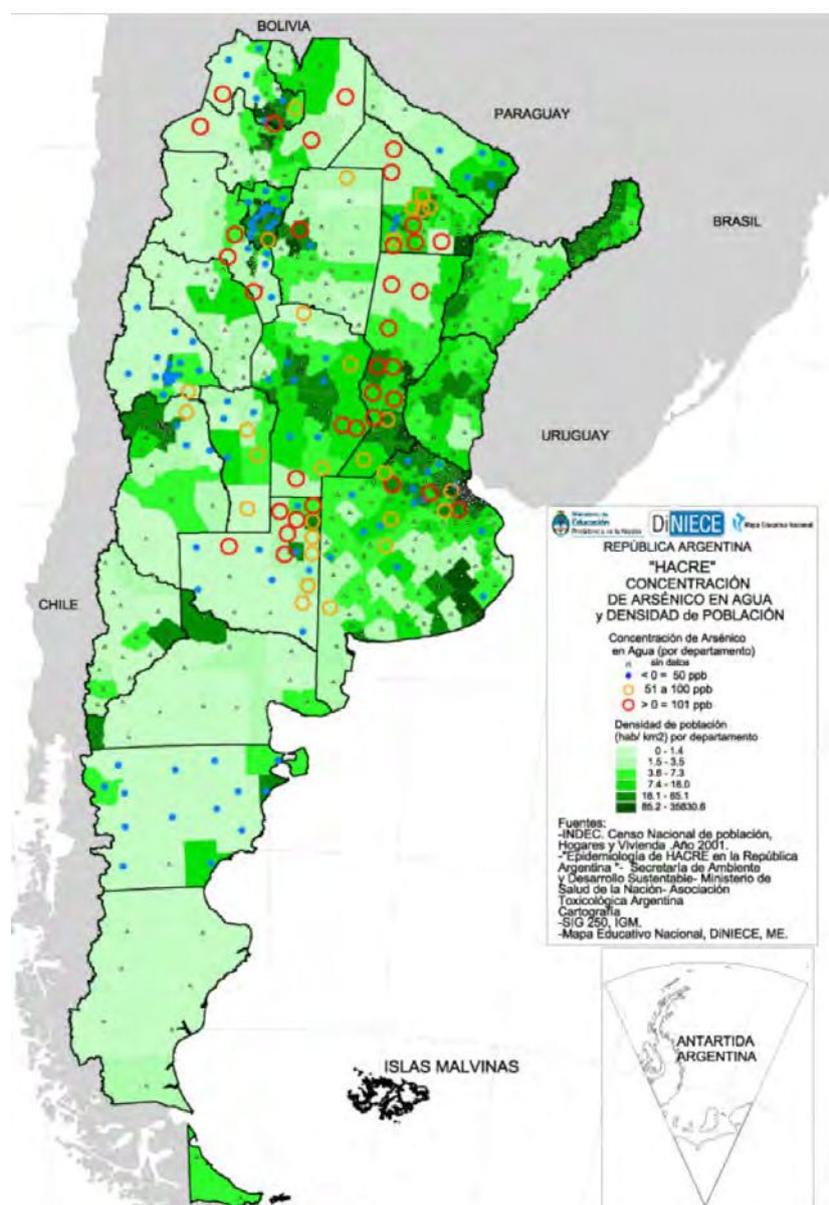


Figura 6. Concentración de arsénico y densidad poblacional en Argentina.

En cuanto a las patologías encontradas, en nuestro país, las dolencias más evidentes han sido las lesiones de la piel (hiperpigmentación, hiperqueratosis, verrugas, melanosis, leucodermia, carcinoma de células basales), así como la alta incidencia de cáncer de vejiga y de uretra. En muchos casos se ha evidenciado en los niños niveles de concentración de arsénico en sangre y orina significativamente altos, indicando una mayor vulnerabilidad de estos, respecto de los adultos (Concha *et al.*, 1998).

II. b) Relación As-microorganismos.

Pese a la toxicidad del arsénico, muchos microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia, como resultado de la exposición a altas concentraciones de arsénico en ambientes específicos (Cai *et al.*, 1998). Algunos organismos minimizan la captura de arsénico aumentando la especificidad de captura de fosfato (Cervantes *et al.*, 1994); otros pueden oxidar el arsenito mediante una enzima arsenito-oxidasa o utilizarlo como donador de electrones (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003); otros pueden utilizar el arseniato como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria (Krafft y Macy, 1998; Switzer Blum *et al.*, 1998). Sin embargo, el mecanismo de resistencia al arsénico mejor conocido en las bacterias, es conferido por 3 a 5 genes (*arsR*, -D, -A, -B y -C) asociados en un operón (operón "*ars*"), localizados en plásmidos o en el cromosoma (**Figura 7**) (Silver, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 2002). *ArsR* y *arsD* son genes reguladores, mientras que *arsA* y *arsB* forman una bomba transmembrana que expulsa el As(III) desde el citoplasma al exterior disminuyendo la concentración intracelular de este tóxico mediante un gasto energético (Cervantes *et al.*, 1994; Oremland y Stoltz, 2005). El gen *arsC* codifica para la enzima arsénico-reductasa, responsable de la biotransformación de As(V) en As(III) (Macy *et al.*, 2000; Macur *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2005; Drewniak *et al.*, 2008; Héry *et al.*, 2008; Hsiu-Chuan Liao *et al.*, 2011). En este sentido cobra gran importancia la expresión del gen *arsC*, ya que puede aumentar la toxicidad del As en el ambiente.

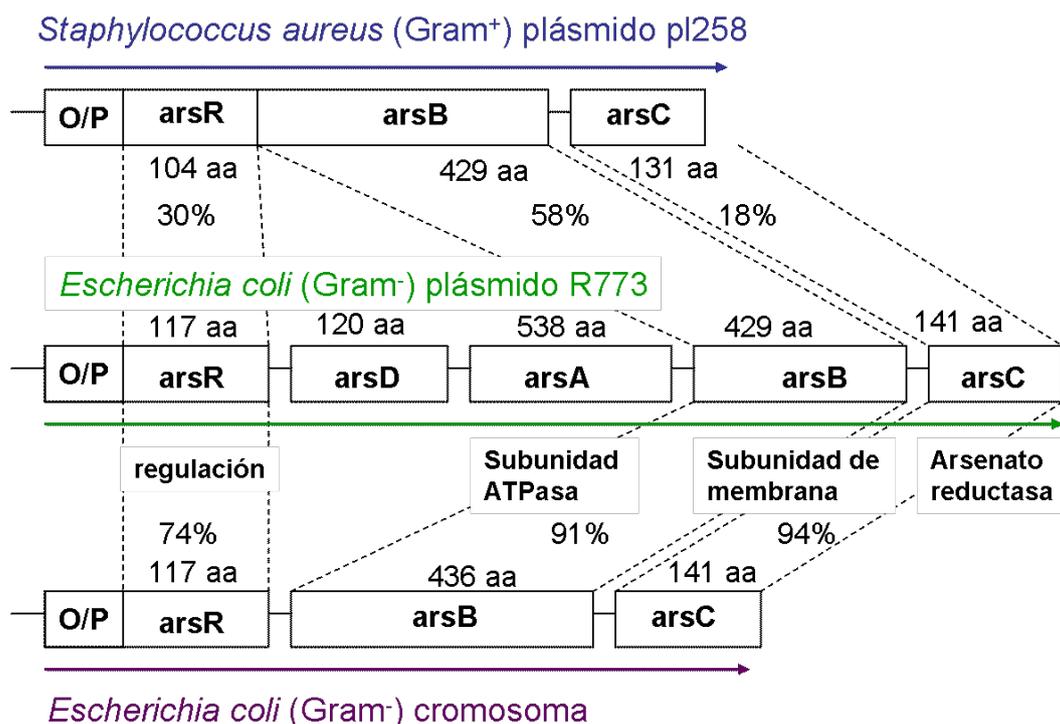


Figura 7. Genes y sus productos para la resistencia al arsénico presentes en *E. coli* y *S. aureus*. Debajo de cada gen se indica el tamaño en aminoácidos (aa) y los porcentajes de similitud de los genes y/o productos entre las diferentes rutas metabólicas. Extraído y traducido de Silver, 1996.

Por otro lado, existen evidencias de que la movilidad del arsénico en aguas contaminadas puede estar asociada a la interacción con biopelículas microbianas de diversa estructura (Oremland *et al.*, 2004; Oremland y Stolz, 2005). Esta característica de los microorganismos es relevante en el tratamiento de este recurso contaminado (Takeuchi *et al.*, 2007), ya que permitiría aplicar un método biológico de tratamiento (Zouboulis y Katsoyiannis, 2005) sin requerir de reactivos químicos adicionales, como sí lo requieren los métodos físico-químicos convencionales.

Puede notarse que los organismos vivos, especialmente los microorganismos generan reacciones de óxido-reducción y uniones químicas covalentes que juegan un rol muy importante en el ciclo del arsénico (**Figura 4**), y tanto las bacterias como las arqueas están involucradas en los procesos de transformación de este elemento (**Figura 8**).

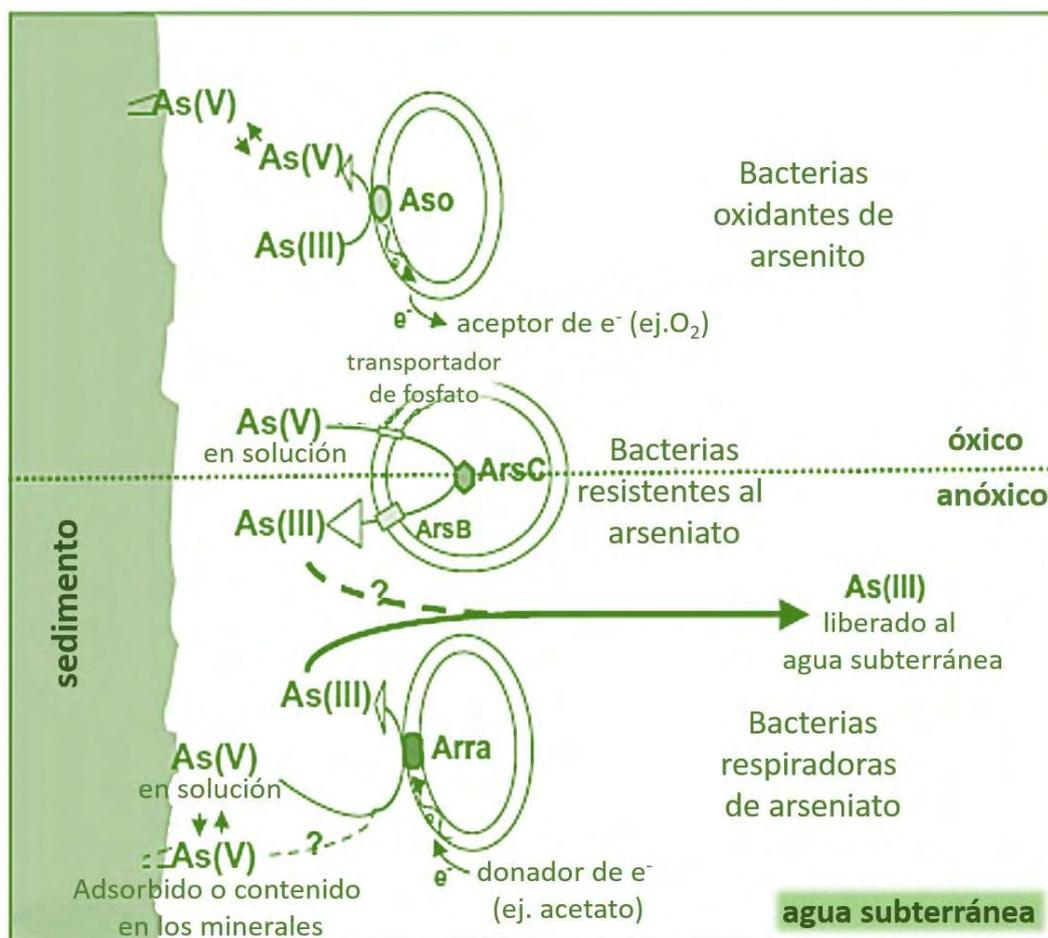


Figura 8. Interacciones entre los microorganismos y el arsénico. Extraído y traducido de Héry *et al.*, 2008.

III. CORROSIÓN Y SU RELACIÓN CON LAS BIOPELÍCULAS

III. a) *Nociones de corrosión*

La corrosión puede definirse como la reacción química o electroquímica de un metal o aleación con su medio circundante con el consiguiente deterioro de sus propiedades (Otero Huerta, 1997). La reacción básica causante de la corrosión es:



que implica el acoplamiento de dos reacciones: oxidación y reducción, con intercambio de electrones sobre la superficie metálica. En la zona en la que se produce la oxidación (ánodo), el metal se disuelve liberando electrones que migran hacia otra región (cátodo) en la que se intercambian los electrones con otra sustancia del medio

(electrolito) para reducirla (**Figura 9**). La velocidad a la que tiene lugar este proceso depende de la temperatura, la salinidad y el pH del fluido en contacto con el metal, del nivel de oxígeno disuelto y de las propiedades del metal en cuestión.

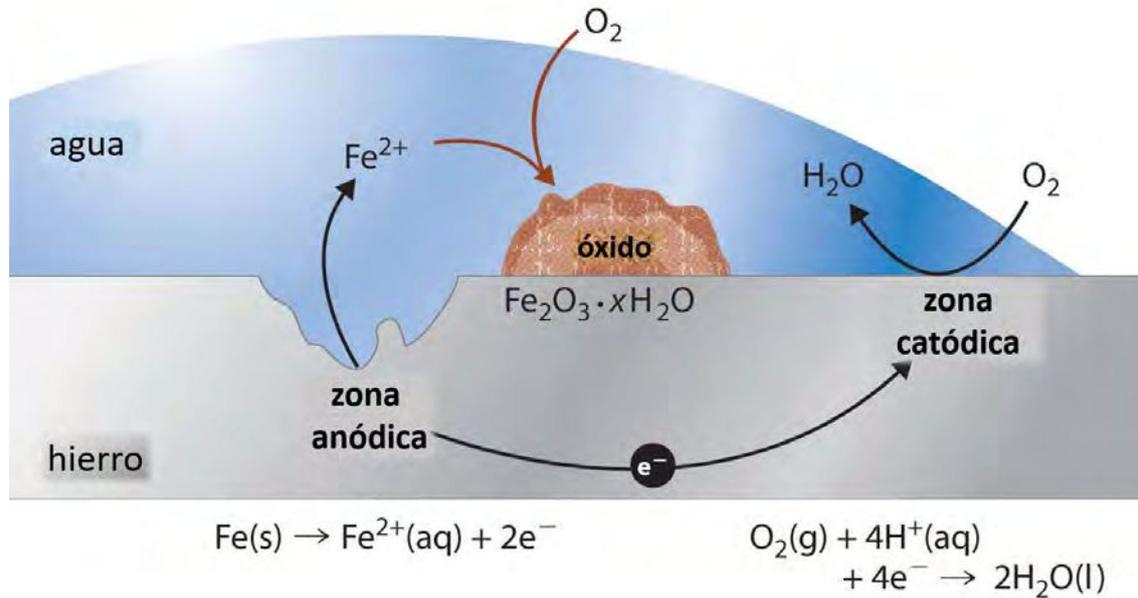


Figura 9. Esquema de corrosión electroquímica del hierro. Adaptado de Averill y Eldredge, 2011.

Respecto de los materiales no metálicos, los mecanismos de deterioro difieren del de los metálicos. Las condiciones para el deterioro de materiales cerámicos, deben ser extremas y, en general, también suele denominarse corrosión. En cambio, para los polímeros se habla de degradación y no de corrosión.

III. b) **Relación corrosión-microorganismos**

Como se ha mencionado, muchas biopelículas ejercen un efecto negativo y perjudicial sobre diferentes actividades humanas, en particular sobre los sustratos sobre los que se desarrollan. La presencia de microorganismos en el agua potable y la formación de biopelículas sobre las paredes de las tuberías generalmente contribuyen a la corrosión de las mismas, aumentando la concentración de metales en el agua contribuyendo así, al deterioro de la calidad del agua distribuida (Lethola *et al.*, 2004). El biodeterioro es la degradación indeseable de materiales que incluyen metales y polímeros generada por las biopelículas. El daño de los

materiales puede llevar a fallas del sistema y pérdidas económicas. El término biodeterioro incluye tanto la biocorrosión o corrosión influenciada por microorganismos (CIM) como la biodegradación (Ji-Dong Gu, 2003).

La CIM se define como un proceso electroquímico donde la participación de los microorganismos o sus metabolitos son capaces de iniciar, facilitar, acelerar o inhibir una reacción de corrosión sin modificar su naturaleza electroquímica (Videla y Salvarezza, 1984; Borenstein, 1994; Xu *et al.*, 2013). Los microorganismos involucrados pueden ser aeróbicos o anaeróbicos y las características del proceso de corrosión microbiológica serán distintas en cada caso. Como se ha mencionado la corrosión es un fenómeno que ocurre en la interfase metal/líquido. La presencia de biopelículas introduce perturbaciones en dicha interfase influyendo en el proceso de corrosión. Esta influencia está relacionada a su capacidad de cambiar variables ambientales como el pH y el poder oxidante, la velocidad de flujo y la concentración de especies químicas en la superficie del metal. Esto puede resultar en el inicio de un proceso de corrosión, en el cambio del mecanismo de corrosión -de uniforme a localizado- o en un aumento o disminución de la tasa de corrosión (Dexter, 2003). Incluso, en algunas circunstancias biopelículas no corrosivas pueden volverse corrosivas con cambios sutiles en el medio ambiente (Little y Lee, 2014).

Un modelo simplificado de una interfase metal-solución en presencia de una biopelícula implica la transferencia de protones y oxígeno a través de la estructura mixta película pasiva-biopelícula. Ambas especies son importantes reactivos en las reacciones catódicas del proceso de corrosión. Si se tiene en cuenta que los microorganismos pueden alterar en gran medida la concentración o la difusión de esas dos especies mediante la respiración (consumo de oxígeno) o la producción de metabolitos ácidos (producción de protones) se puede entender fácilmente la importancia de las biopelículas en los procesos de corrosión (**Figura 10**).

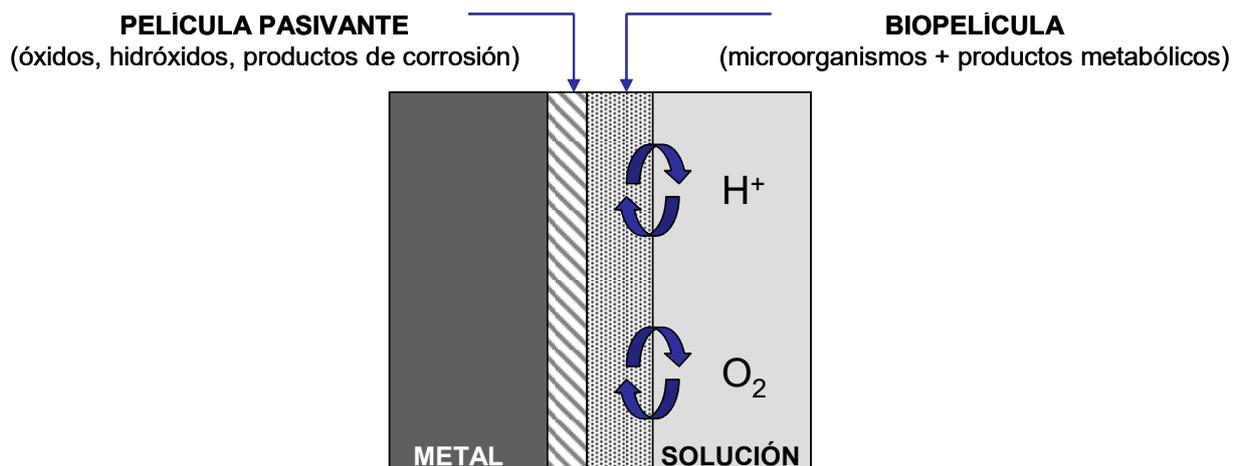


Figura 10. Alteración de la doble capa eléctrica causada por la formación de una biopelícula.

IV. TÉCNICAS APLICADAS AL ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y SUPERFICIES.

El exponencial incremento experimentado en las investigaciones sobre biopelículas refleja la disponibilidad de nuevas y/o mejoradas herramientas para encarar estas investigaciones.

Convencionalmente, muchos estudios se centraron siguiendo procedimientos *ex situ* sobre biopelículas removidas de la superficie mediante raspado, tratamiento ultrasónico, remoción con solventes, etc. y la evaluación del crecimiento del material retirado mediante recuento en placa. Sin embargo, esta metodología tiene dos limitaciones principales. Por un lado, la eliminación de la característica esencial de la complejidad y organización de la estructura de la biopelícula. Por otro lado, los cultivos en medios nutritivos son selectivos y no incluyen a la totalidad de la comunidad bacteriana, ya que se estima que el 99,9 % de las bacterias de una biopelícula no pueden ser cultivadas en un medio estándar (Wimpenny *et al.*, 2000).

Gracias al gran avance en las técnicas de investigación *in situ*, en distintas áreas como química de superficies, biofísica, bioquímica, inmunología e ingeniería de transferencia de calor, es posible ahora realizar análisis que permiten resguardar la integridad y orientación originales de la película sobre el sustrato. Para tal tipo de estudios se han empleado exitosamente técnicas como la espectroscopía infrarroja por

transformada de Fourier (FT-IR) con reflexión total atenuada (ATR) o con reflexión interna, elipsometría, medidas de potencial superficial, determinaciones de ángulo de contacto, microscopía electrónica de barrido y de barrido ambiental (MEB/MEBA), análisis elemental mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), difracción de rayos X (DRX) y microscopía láser confocal (MLC). Si bien, cada una de ellas da un tipo de información diferente, cuando se las aplica de manera complementaria proveen un fructífero enfoque (Rosales y Rastelli, 2013).

Entre las técnicas de estudio de superficies y biopelículas más difundidas cabe señalar las diversas microscopías (Beech *et al.*, 2000). El avance tecnológico, el desarrollo de equipos de MEB y MEBA, en combinación con diferentes técnicas de tinción de muestras y el uso de programas de computación adecuados, han permitido una visualización a elevada resolución de las características, estructura y estadios de formación de las biopelículas (El Abed *et al.*, 2012). Los microscopios electrónicos emplean haces de electrones para obtener información de una muestra a nanoescala. La interacción haz de electrones-materia genera una variedad de señales que transportan información diferente sobre la muestra. Por ejemplo, los electrones retrodispersados producen imágenes con contraste que transportan información sobre las diferencias en el número atómico; los electrones secundarios brindan información topográfica; la catodoluminiscencia puede proporcionar información sobre la estructura electrónica y la composición química de los materiales; y los electrones transmitidos pueden describir la estructura interna y la cristalografía de la muestra.

Otro tipo de señal que se usa ampliamente en MEB son los rayos X: en la materia, cada átomo tiene un número único de electrones tienen energías diferentes y discretas. La generación de rayos X en un MEB es un proceso que implica que, el haz de electrones golpee la muestra y transfiera parte de su energía a los átomos de la muestra. Esta energía puede ser utilizada por los electrones de los átomos para "saltar" a una capa de mayor energía o ser eliminado del átomo. Si ocurre tal transición, el electrón deja un hueco, estos huecos tienen una carga positiva, y por consiguiente atraen electrones de las capas de mayor energía. Cuando un electrón de una capa de mayor energía llena el hueco de la capa de energía más baja, la diferencia de energía se puede liberar en forma de rayos X. La diferencia de energía entre estas dos capas es característica y se puede usar para identificar los elementos presentes en una muestra.

La observación de muestras biológicas en el MEB requiere de la fijación, deshidratación, secado y metalizado con algún revestimiento conductor previo a la toma de imágenes, la que se realiza en alto vacío. Todos estos procesos pueden alterar la estructura y las características de la biopelícula originaria (Chang y Rittmann 1986; Beech, 1996; Priester *et al.*, 2007). A diferencia, las observaciones en MEBA no requieren de ningún pre-tratamiento de las muestras y se pueden tomar imágenes a bajo y medio vacío y en atmósfera húmeda, lo que preserva la morfología original de la biopelícula (Little *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 2001).

Otra herramienta útil que da información morfológica de las biopelículas es el MLC (Walker *et al.*, 1998; Palmer y Sternberg, 1999), el cual en combinación con diferentes protocolos de tinción no sólo permite observar el aspecto o estructura externa, sino también la distribución espacial interna y la cuantificación de células de manera no invasiva de diversas muestras biológicas (Stewart *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2009; Neu *et al.*, 2010). Además, el uso de modelos matemáticos y programas informáticos específicos permiten reconstruir la estructura tridimensional de la biopelícula (Lewandowski, 2000; Beyenala *et al.*, 2004; Pitts y Stewart, 2008; Neu *et al.*, 2010).

Para la caracterización química de superficies, una metodología muy utilizada es la DRX. Esta técnica se basa en la dispersión coherente del haz de rayos X por parte de la materia (se mantiene la longitud de onda de la radiación) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio. El fenómeno de la difracción puede describirse con la Ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal: $n\lambda = 2d \sin \Theta$. La difracción de rayos en muestras policristalinas permite la identificación de fases cristalinas (puesto que todos los sólidos cristalinos poseen su difractograma característico) tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo. Los estudios de polimorfismo, transiciones de fase, soluciones sólidas, medida del tamaño de partícula, determinación de diagramas de fase, etc., se realizan habitualmente por esta técnica.

La espectroscopía FT-IR constituye un método fisicoquímico que da información sobre los principales constituyentes de los sistemas biológicos. Cada

espectro provee información sobre la composición química y bioquímica de las muestras, permitiendo hacer una interpretación a partir de los grupos funcionales detectados. La región compleja del espectro IR desde los 1500 cm^{-1} hasta alrededor de los 400 cm^{-1} es parte del denominado *fingerprint* o región de huella digital. Muchas de las bandas observadas en esta región dependen de la estructura global de la molécula, más que de un grupo funcional. El patrón o diseño en esta región es específico para cada molécula, por lo que permite la identificación de moléculas muy similares (Mc. Murry, 2008). Asimismo, pueden obtenerse las derivadas primeras y segundas de los espectros como técnica de aumento de resolución de las bandas anchas. Cabe recordar que en función de las absorciones específicas se puede dividir el espectro IR en cuatro regiones: una región de 4000 a 2500 cm^{-1} , correspondiente a absorciones ocasionadas por los movimientos de estiramiento de los enlaces sencillos N-H y O-H (que absorben en el intervalo 3300 a 3600 cm^{-1}), y los enlaces C-H (cercanos a 3000 cm^{-1}); una región de 2500 a 2000 cm^{-1} que es donde ocurre el estiramiento de los enlaces triples, los enlaces $\text{C}\equiv\text{N}$ y $\text{C}\equiv\text{C}$ absorben aquí; otra región es de 2000 a 1500 cm^{-1} , que se corresponde con la absorción de los enlaces dobles como $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ y $\text{C}=\text{C}$, en general los grupos carbonilo absorben entre 1680 y 1750 cm^{-1} y los alquenos entre 1640 y 1680 cm^{-1} , finalmente, la última región, por debajo de los 1500 cm^{-1} , es, como ya se mencionó, la denominada huella digital, en la que ocurren absorciones debido a la gran variedad de vibraciones de enlaces sencillos C-C, C-O, C-N, y C-X (Cooper, 1980; Mc. Murry, 2008).

Importantes conceptos a tener en cuenta a la hora de estudiar biopelículas microbianas son conceptos de ecología como *ecosistema*, *comunidades*, *consorcios*, *riqueza*, *abundancia*, *diversidad*. El estudio de la diversidad microbiológica y la estructura de las comunidades en una biopelícula, ayudan a identificar especies dominantes que influyen tanto en la inhibición como en la estimulación de la corrosión (Teng *et al.*, 2008). El desarrollo de técnicas de microbiología molecular, es decir metodologías independientes del cultivo, han permitido un mayor entendimiento de diversos procesos a esta microescala (Muyzer, 1999). Algunas de estas técnicas están basadas en el ARN ribosomal de la subunidad pequeña (ARNr 16S) o de sus genes correspondientes. Esta molécula fue elegida debido a su universalidad y abundancia en todos los seres vivos (10^3 - 10^5 ribosomas/célula) y el hecho de que es una molécula altamente conservada durante la evolución, aunque tiene algunas regiones

muy variables. Organismos dentro de un dominio a menudo comparten la misma secuencia de ADN en la región más conservada, mientras que las especies del mismo género pueden presentar diferencias en las regiones variables (Woese *et al.*, 1990). Estas características permiten la comparación de los organismos dentro del mismo dominio, así como la diferenciación de las cepas de la misma especie. Por otra parte, la secuencia del gen es lo suficientemente larga como para ser obtenida mediante secuenciación y generar datos estadísticamente aceptables.

Entre las técnicas basadas en el análisis del ARNr 16S, la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) es una de las más comúnmente usadas para analizar y comparar perfiles genéticos para obtener información sobre la composición, la diversidad y la dinámica de comunidades microbianas (Green *et al.*, 2009). Mediante esta técnica fragmentos de ADN de igual longitud, pero con secuencia distinta se pueden resolver mediante electroforesis (Fischer y Lerman, 1979), permitiendo la separación de una mezcla heterogénea de genes amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de formamida y urea en concentraciones crecientes en el sentido de la migración electroforética (Muyzer *et al.*, 1993). Se pueden estudiar moléculas de ADN de hasta 700 pb de longitud, con la característica de llevar acoplada una cola artificial rica en citosina y guanina (CG) en uno de los extremos (añadida a uno de los dos cebadores en posición 5') para evitar la desnaturalización completa del ADN (Muyzer *et al.*, 1993). Las bandas individuales representan aquellos ADN que han frenado su migración por el gel al desnaturizarse por completo (excepto la cola de CG) (**Figura 11**). Muyzer y colaboradores (1993) demostraron que mediante esta técnica se puede acceder a la identificación de componentes que representan el 1 % de la población.

Esta técnica se ha utilizado en el estudio de muestras de lixiviados de rellenos sanitarios, muestras de biorreactores industriales (Dar *et al.*, 2005), muestras de microorganismos provenientes de minas (Kaksonen *et al.*, 2006), para caracterizar biopelículas desarrolladas sobre superficies que presentan corrosión microbiológica (Neria-González *et al.*, 2006), así como en el análisis de la composición de biopelículas en las diferentes etapas en el tratamiento del agua potable (Roeder *et al.*, 2010).

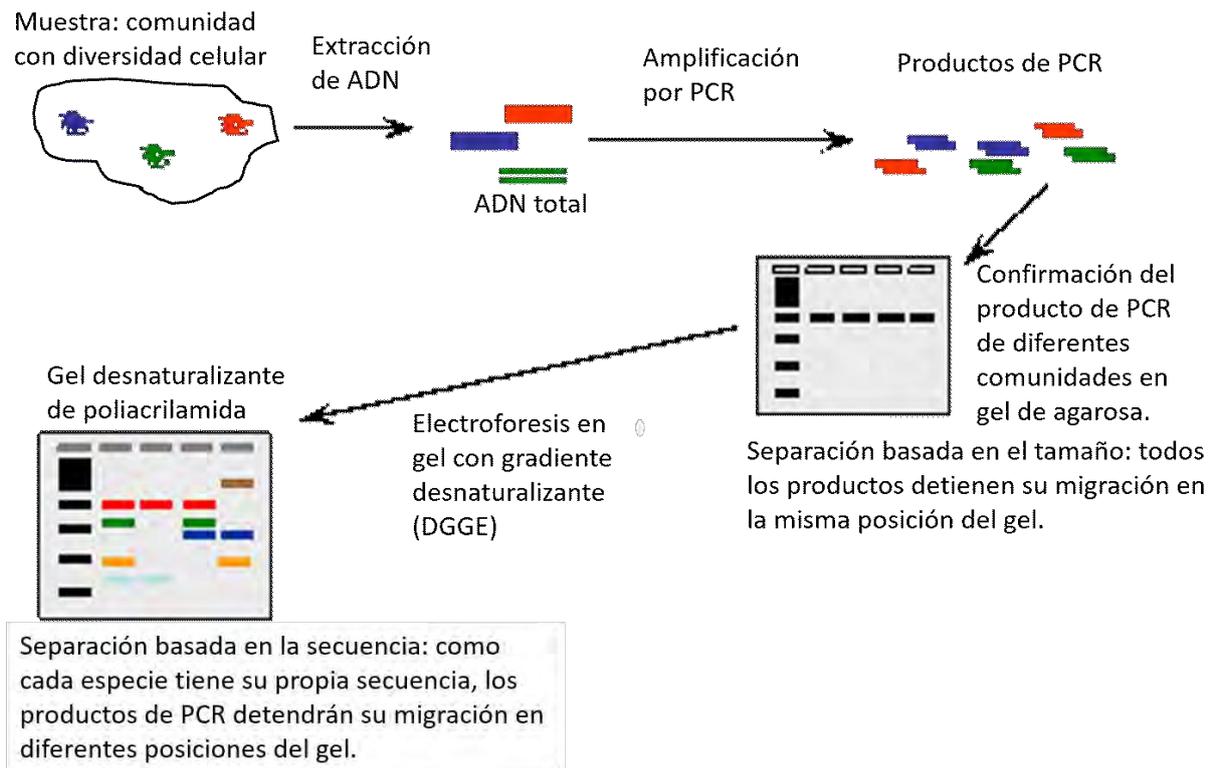


Figura 11. Etapas del procedimiento de la técnica de DGGE.

Debido a que la CIM, como se ha mencionado, es un proceso bioelectroquímico (Xu *et al.*, 2013), diversas técnicas electroquímicas pueden utilizarse para lograr un monitoreo de dicho proceso. El estudio de la corrosión de un metal requiere del conocimiento de los procesos anódicos y catódicos que transcurren simultáneamente. Es por ello que las curvas de polarización son un medio adecuado para estudiar ambas reacciones (Videla y Salvarezza, 1984).

En los métodos directos, la dependencia de la corriente con el potencial de electrodo se determina midiendo la corriente a varios potenciales controlados del electrodo en estudio (electrodo de trabajo) con referencia un electrodo de potencial conocido (control potencioestático) o midiendo el potencial de electrodo a varias corrientes controladas (control galvanostático).

Si se polariza positivamente un metal en contacto con un electrolito, circulará por la interfase metal-solución una corriente positiva; midiendo la corriente a cada valor de potencial o viceversa, se obtiene una relación potencial-corriente,

construyéndose una curva de potencial anódica del metal (**Figura 12**). Esta curva presenta diferentes formas de acuerdo al proceso anódico que esté ocurriendo (Marcus y Maurice, e-book on line).

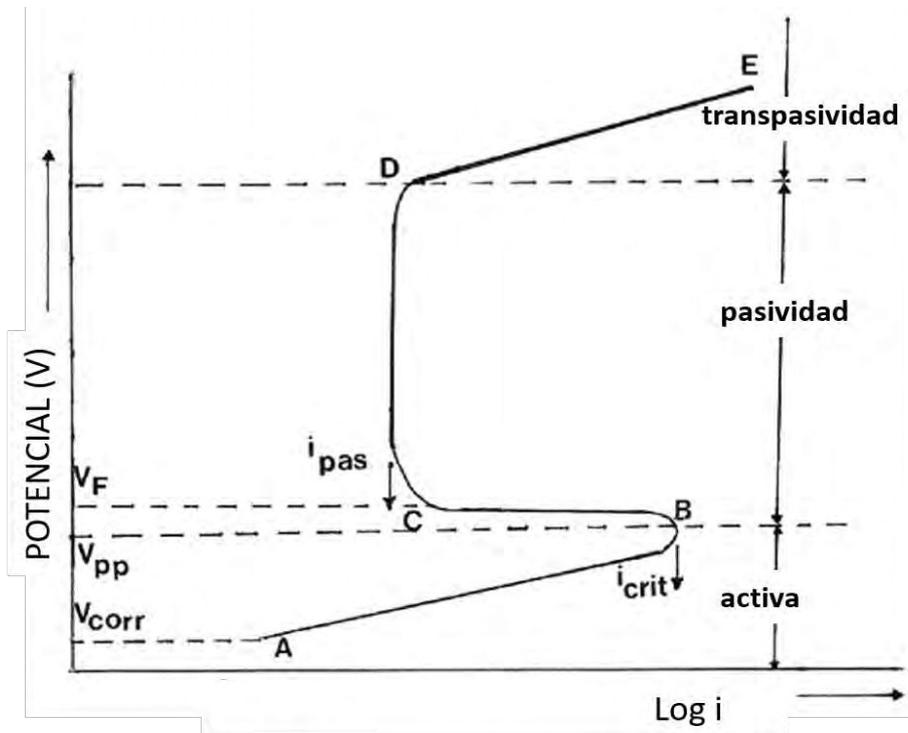


Figura 12. Curva de potencial anódica.

En esta curva pueden distinguirse tres regiones. La primera región corresponde al estado activo del metal. En esta región (zona A-B), la densidad de corriente es una función exponencial del potencial según la cinética electroquímica clásica. La segunda región, que se observa en la **Figura 12**, para metales que pueden pasivarse, corresponde al estado pasivo del metal (zona B-C). Comienza con una transición del estado activo al pasivo, responsable del pico que aparece en la curva de potencial-corriente. Por encima del potencial de pasivación crítico correspondiente al máximo en el pico activo (i_{crit}), una película de óxido (u oxihidróxido) crece sobre la superficie y la corriente de disolución cae a un valor que es varios órdenes de magnitud menor que la corriente de disolución anódica. Se dice que la superficie metálica está pasivada o que el material está en estado pasivo. La región pasiva generalmente se extiende sobre un rango significativo de potenciales (unos pocos cientos de mV) (zona C-D). La tercera región en la curva de

polarización es la región transpasiva en la que, cuando el potencial se incrementa aún más, la densidad de corriente comienza a aumentar (zona D-E). En esta región, tiene lugar una mayor disolución del material (en condiciones en las que se puede realizar el pulido electroquímico).

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar las interacciones de los microorganismos con diferentes materiales que pueden constituir redes de distribución de agua potable y el efecto de la contaminación por As sobre estas interacciones.

Objetivos particulares

- * Estudiar la adherencia de microorganismos sobre materiales empleados en redes de distribución de agua.

- * Evaluar y caracterizar el deterioro producido sobre los materiales.

- * Estudiar el impacto de la presencia de arsénico en el agua sobre la deposición de microorganismos y el deterioro producido.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1. Construcción de los circuitos experimentales.

Para la realización de los ensayos de este trabajo se construyeron dos circuitos cerrados para la circulación de agua potable. Cada circuito constaba de un tanque de 50 L de PVC, con tapa, acoplado a una tubería de polipropileno (PP) (de 200 cm de longitud total) mediante mangueras conectoras flexibles (**Figura 13**). En la parte inferior se colocó un segmento extraíble de acrílico de 20 cm de longitud, donde se colocaron los cupones a ensayar. Tanto la cañería de PP, como los conectores flexibles y el segmento de acrílico presentaban el mismo diámetro interno (2,32 cm) para evitar turbulencia en el flujo de agua. Ambos circuitos se llenaron con agua potable de la red de la ciudad de La Plata. La concentración de las especies químicas presentes en el agua fue determinada en el laboratorio de Química Analítica del CIDEPINT. Los valores se detallan en la **Tabla 1**. El pH y el Cl₂ libre fueron medidos por técnicas colorimétricas mediante kits comerciales (Macherey-Nagel y Merck respectivamente).



Figura 13. Circuitos experimentales diseñados para desarrollar el plan de trabajo.

Para simular el funcionamiento de una red doméstica de agua potable, el agua fue impulsada mediante una bomba en condiciones de flujo laminar ($79 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), regulada con períodos de 30 min de circulación por 60 min de reposo, desde las 9:00 hasta las 18:00 hs, y una última circulación de 20:00 a 20:30 hs.

TABLA 1. Principales componentes del agua potable de la ciudad de La Plata con la que se alimentaron los circuitos experimentales.

Especie química	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
Ca^{2+}	17
Mg^{2+}	19
Na^{+}	75
K^{+}	5
Cl^{-}	130
SO_4^{2-}	105
SiO_2	<4
Al^{3+}	<1
Cl_2 libre inicial	0.5-0.6
pH	6.5

Con el objeto de evaluar el efecto del arsénico sobre las comunidades bacterianas y su influencia en la corrosión de los sustratos metálicos, en uno de los circuitos se agregaron $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de As(V) en forma de arseniato monohidrógeno disodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Según el objetivo de la experiencia, la recirculación de agua se mantuvo por períodos variables entre 30 y 80 días. Pasado ese tiempo, se detenía la circulación de agua, los cupones eran retirados para los distintos estudios, y los tanques eran vaciados, limpiados y recargados para iniciar un nuevo ensayo. Cada uno de estos ensayos fue denominado *SERIE*.

2.1.2. Caracterización de los materiales a ensayar

Para caracterizar los cupones de los distintos materiales a utilizar en los sistemas de circulación de agua, se realizaron observaciones mediante MEB y el análisis químico mediante EDS acoplado a dicho microscopio.

2.1.3. Procesamiento de las muestras.

Para la realización de este trabajo se utilizaron materiales metálicos como hierro, cinc y cobre y un material polimérico como el polipropileno, todos ellos comúnmente empleados en la construcción de redes de distribución de agua. Las características de estos materiales se presentan en la **Tabla 2**. En un principio, durante las primeras series se expusieron en los circuitos cupones de materiales puros identificados como: "FeP", "ZnP", "CuP" y "PPP" y de aleaciones comerciales identificadas como: "FeC", "ZnC", "CuC" y "PPC". Posteriormente, mediante sesiones de microscopía y análisis EDS se determinó la gran similitud en la composición de los dos tipos de muestras (ver Cap.3, sec. 3.1.). Es por ello que se siguió trabajando sólo con los materiales comerciales.

TABLA 2. Característica y composición de los materiales ensayados y denominación utilizada a lo largo de todo el trabajo.

Denominación	Material	Característica/Composición
Fe	Acero de bajo C	AISI 1005 Steel. C: 0.06 %, Mn: 0.38 %, Si: 0.01 %. Recocido a 925 °C.
Zn	Cinc comercial	Zn 98 %, Cu 1 %, Ti + Mg 1 %
Cu	Aleación de Cu Hidro-bronz®	Cu 99,9 %
PP	Polipropileno	-(C ₃ H ₆) _{-n}

Estos materiales se obtuvieron en forma de planchas o de caños comerciales, y fueron laminados en frío en el caso de los metales y por termocompresión en el caso del PP hasta un espesor de 0,2 mm para evitar al máximo posible la turbulencia en el flujo de agua circulante. Estos trabajos fueron realizados en el

Departamento de Mecánica de la Facultad de Ingeniería (UNLP) y en el Departamento de Plásticos del INTI, respectivamente. Una vez obtenido el espesor deseado, los metales se pulieron manualmente con papel esmeril al agua de grano P 1200 – P 1500. Todos los materiales se cortaron en cuadrados de 10 mm de lado, y se pegaron 7 cupones de cada material, previamente enjuagados con etanol y desengrasados con acetona, en un soporte de polietileno, el cual fue introducido en el segmento acrílico desmontable y posteriormente acoplado al circuito (**Figura 14**).

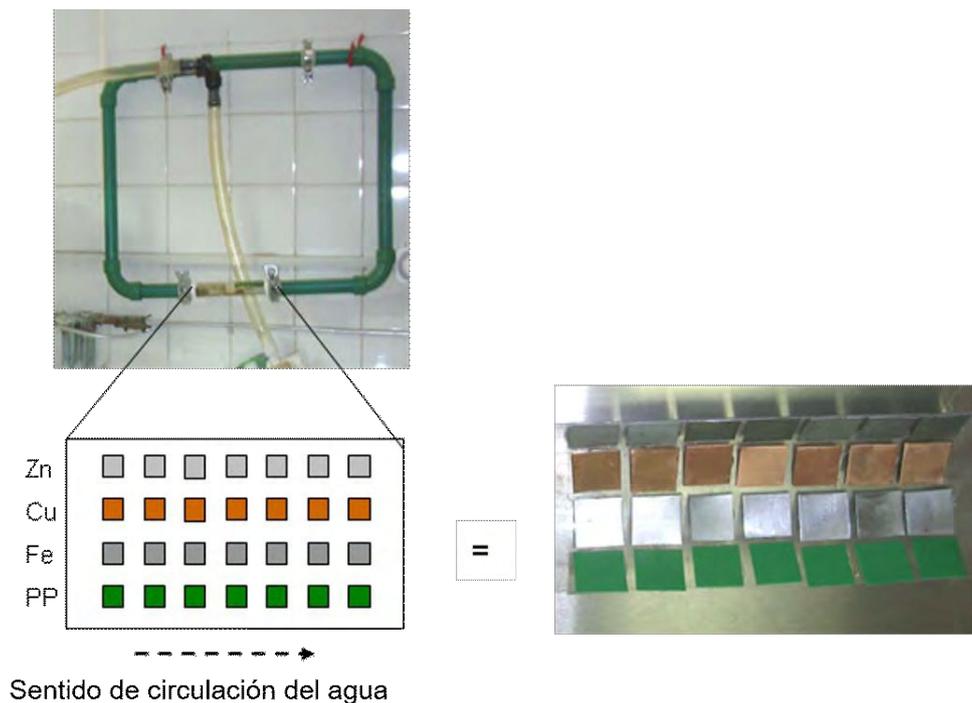


Figura 14. Disposición de los 7 cupones de cada material adheridos al soporte, y su ubicación dentro de la celda extraíble del circuito.

Una vez transcurrido el tiempo adecuado, la circulación del agua era detenida, y la celda de acrílico era extraída. En el banco de flujo laminar (General Filter Argentina S.R.L.) se removían los cupones en condiciones de esterilidad, se enjuagaban con agua destilada estéril y se procesaban según el objetivo de la experiencia. En la **Figura 15** se muestra un esquema del procesamiento de los cupones retirados.

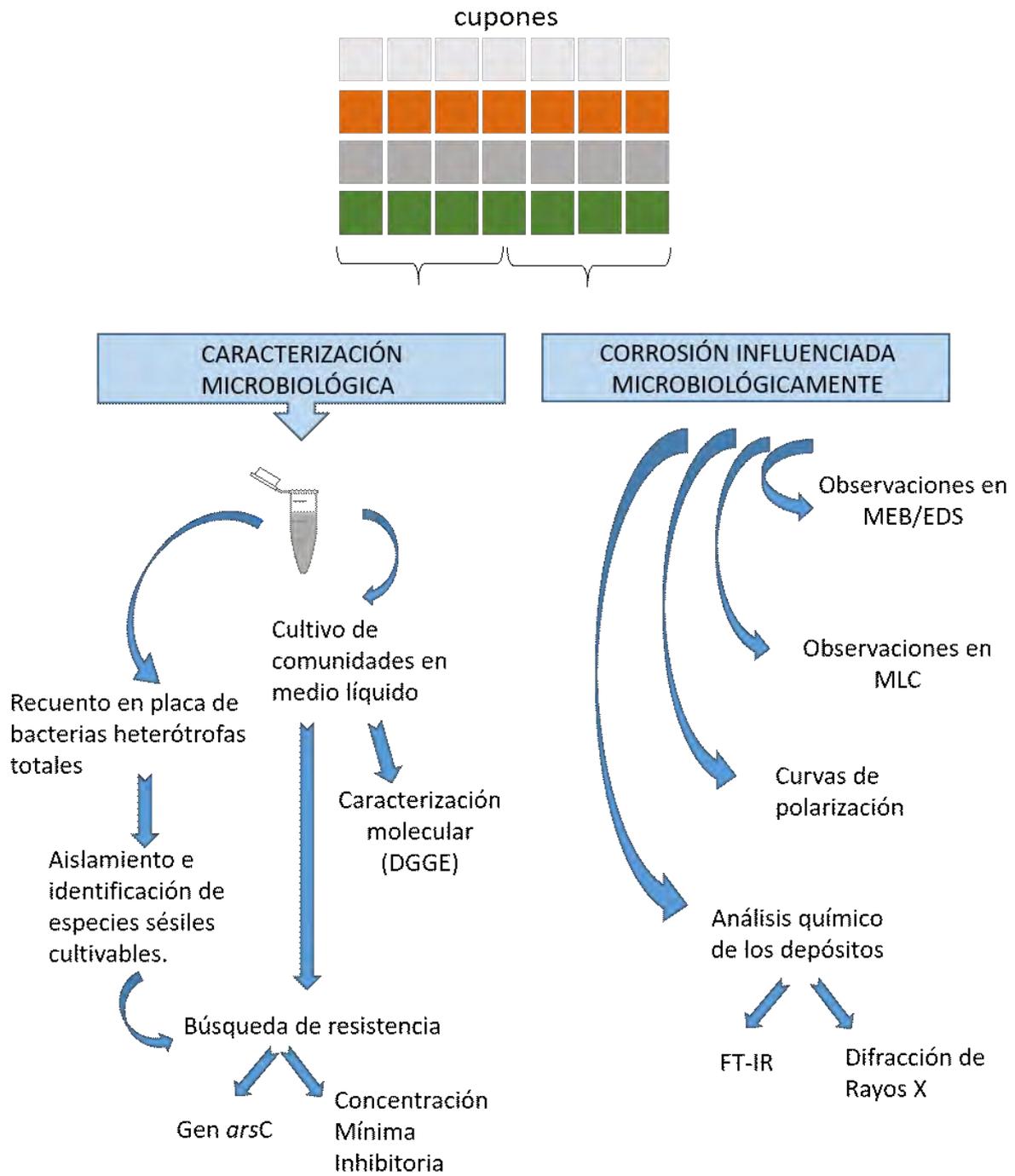


Figura 15. Esquema de trabajo: procesamiento de muestras, ensayos, observaciones y análisis realizados a partir de los cupones extraídos de los circuitos.

2.2.- CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

2.2.1. Recuento de bacterias heterótrofas totales.

Para realizar el recuento de bacterias heterótrofas planctónicas, al terminar la *SERIE* de circulación se extrajo una muestra de agua de cada tanque, de la cual se hicieron diluciones seriadas y se sembraron 100 μL de cada dilución en placas con agar nutritivo (AN) (pluripeptona: 5 g.L^{-1} ; extracto de carne: 3 g.L^{-1} ; cloruro de sodio: 8 g.L^{-1} ; agar: 15 g.L^{-1}) por triplicado. Las placas se incubaron a 25 °C durante 96 h y luego se hizo el recuento. El número de bacterias planctónicas de cada tanque se obtuvo como el promedio de tres placas que presentaban entre 30 y 300 colonias, y se expresó en unidades formadoras de colonias por unidad de volumen (UFC.mL^{-1}). Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por comparación de medias, mediante el test de Student, con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0,05$).

Para realizar el recuento de las bacterias heterótrofas sésiles, las biopelículas (junto con los productos de corrosión) adheridas sobre tres cupones de cada material fueron removidas por raspado con bisturí estéril (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001) y colocadas, cada una, en 1 mL de solución fisiológica estéril. Se realizaron diluciones decimales seriadas, se sembraron 100 μL de cada dilución en placas de Petri con AN y se incubaron a 25 °C durante 96 h, como se muestra en la **Figura 16**. EL número de bacterias adheridas a cada material en ausencia y en presencia de As(V) se obtuvo como el promedio de tres placas que presentaban entre 30 y 300 colonias, y se expresó en unidades formadoras de colonias por unidad de área del cupón (UFC.cm^{-2}).

El análisis estadístico de los recuentos de bacterias sésiles obtenidos en las distintas series se llevó a cabo con el programa Biostat 2008 Professional mediante comparación de medias por el test ANOVA de dos vías ($\alpha=0,05$) corroborados por las diferentes pruebas estadísticas que provee el programa (Contrastes de Scheffé entre pares de medias, Prueba de Bonferroni para Diferencias Entre Medias, test de Fisher y LSD, Prueba HSD de Tukey para Diferencias Entre Medias, Prueba B de Tukey para Contrastes sobre Medias Ordenadas, Prueba de Tukey-Kramer para

Diferencias Entre Medias y Prueba de Neuman-Keuls para Contrastes sobre Medias Ordenadas).

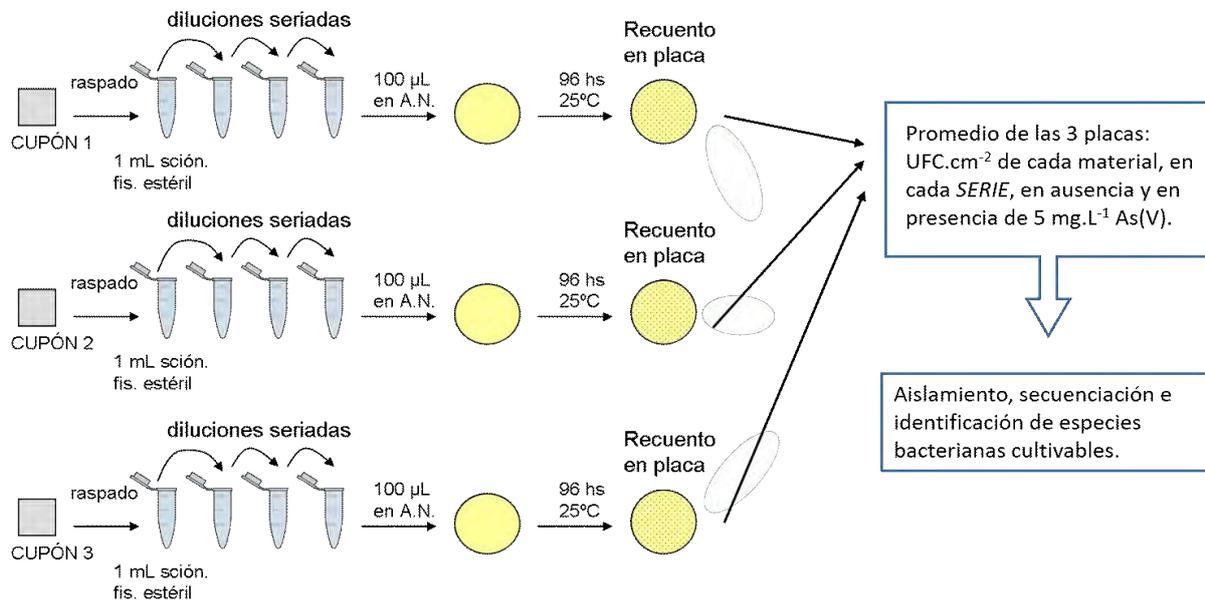


Figura 16. Esquema de raspado de los cupones, siembra y recuento de bacterias heterótrofas sésiles. Este procedimiento se repite para cada uno de los cuatro materiales ensayados, en ausencia y en presencia de As(V).

2.2.2. Aislamiento e identificación de especies sésiles cultivables.

Con el fin de realizar el aislamiento de cepas bacterianas presentes en las biopelículas formadas sobre los distintos materiales, a partir de las placas de recuentos, se seleccionaron diferentes colonias en base a su color, brillo, tamaño, forma de borde y textura que se repicaron en nuevas placas con AN y luego en tubos con AN inclinado ("pico de flauta"). Los tubos se incubaron durante 48 h a 25 °C. Posteriormente se procedió a la extracción, amplificación y secuenciación del ADN.

La extracción de ADN se realizó tomando una pequeña cantidad del cultivo puro en pico de flauta con ansa estéril que se colocó en un tubo eppendorf con 800 µL de agua destilada estéril, se llevó a baño maría durante 10 min, luego se centrifugó a 13.000 g durante 5 min. El sobrenadante con el ADN se pasó a un nuevo eppendorf estéril. El ADN extraído se amplificó mediante la técnica de

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando los cebadores 27F y 1492R (posiciones respecto de *E. coli*) (Brosius *et al.*, 1978; Wilson *et al.*, 1990) que permiten amplificar una porción de aproximadamente 1500 pb del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosómico. El termociclador utilizado fue un Mastercycler® ep, Eppendorf, y el ciclo de PCR empleado se describe en la **Tabla 3**.

TABLA 3. Ciclo de PCR empleado para amplificar el gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosómico.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Cantidad de Ciclos
1	95	5 min	1
2	95*	30 s	30
	48**	45 s	
	72***	60 s	
3	72	10 min	1

*desnaturalización; **hibridación (*annealing*); ***extensión.

La presencia del producto de PCR se confirmó mediante electroforesis (90 V, 2 A, 40 min) en gel de agarosa al 1.2 % en buffer TAE 1x con control negativo. Seguidamente el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 40 min y se observó bajo luz UV.

Para la secuenciación del ADN, los productos de PCR obtenidos se purificaron según instrucciones del kit comercial Gene Clean® III Kit y se enviaron a secuenciar a MacroGen (Corea). Las secuencias se analizaron mediante el programa público BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) que el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) proporciona y se compararon con la base de datos del NCBI para su identificación. Dado que este análisis se realiza sobre una secuencia del gen de gran tamaño, la información filogenética obtenida de este modo tiene mayor grado de confianza.

Las secuencias del ARNr 16S de los aislados y las secuencias de referencia con mayor similitud obtenidas del GenBank fueron alineadas mediante el software Clustal X (Higgins y Sharp, 1988; Thompson *et al.*, 1997). El análisis de distancia y

árbol filogenético de las secuencias se realizó mediante el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2007), el cual se construyó por el método del vecino más cercano (neighbor-joining) (Saitou y Nei, 1987) validado por 1000 réplicas (*bootstraps*) (Felsenstein, 1985).

2.2.3. Análisis molecular de las comunidades planctónicas y sésiles

Para el estudio de las comunidades planctónicas, al finalizar cada serie se filtró 1 L de agua de cada tanque, mediante membrana de acetato de celulosa (Sartorius AG) estéril de 0,22 μm de poro. Para la caracterización de las comunidades sésiles desarrolladas sobre cada sustrato, se combinó el material raspado de los 3 cupones con los que se llevaron a cabo los recuentos de heterótrofos más el raspado de un cuarto cupón. Se centrifugó el volumen total a 13.000 g durante 15 min descartándose el sobrenadante (**Figura 17**).

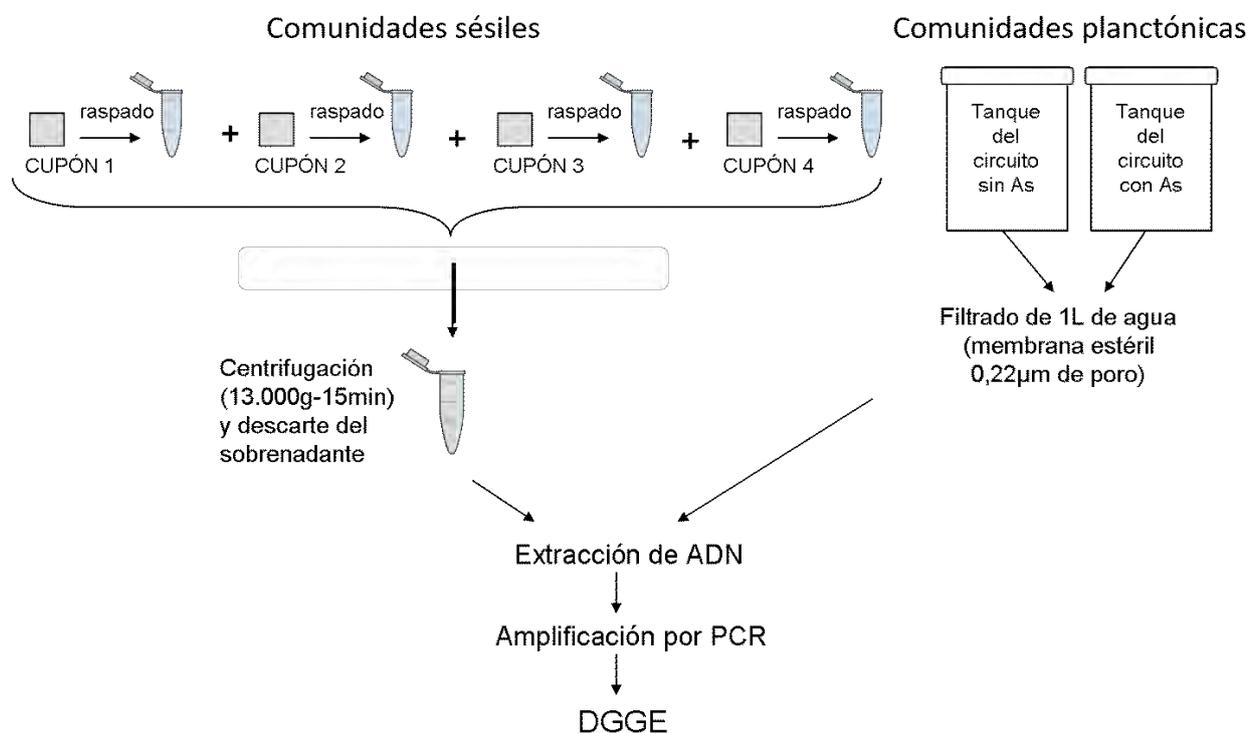


Figura 17. Esquema de obtención de ADN de las biopelículas y de las comunidades planctónicas.

Para la obtención del ADN de las comunidades planctónicas y de las biopelículas se emplearon diferentes métodos: extracción estándar mediante proteinasa K y fenol-cloroformo (Hagelberg y Clegg, 1991), método de purificación con sílica (Höss y Pääbo, 1993) (en el **Anexo I** se detallan los pasos de extracción de ADN de los dos métodos) y también mediante la utilización de un kit comercial (E.Z.N.A. Soil DNA kit Omega bio-tek) según las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 341F con cola CG y 907R para la posterior realización de DGGE (Muyzer *et al.* 1993; Ishii y Fukui, 2001; Schäfer y Muyzer, 2001). Se utilizó un termociclador Mastercycler® ep, Eppendorf con el ciclo de PCR detallado en la **Tabla 4**.

TABLA 4. Ciclo de PCR empleado para amplificar el ADN de las comunidades sésiles y planctónicas, utilizado posteriormente para realizar DGGE.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Cantidad de Ciclos
1	94	4 min	1
2.a	94*	30 s	10
	62**	45 s	
	72***	60 s	
2.b	94*	30 s	25
	57**	45 s	
	72***	60 s	
3	72	10 min	1

*desnaturalización; **hibridación (*annealing*); ***extensión.

Para confirmar la amplificación del gen, los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa al 1,2 % en buffer TAE 1x con control negativo. Se realizó la electroforesis a 90 V y 2 A durante 40 min, luego se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 40 min y se observó bajo luz UV.

La DGGE fue realizada en un equipo CBS Scientific Company Inc. Modelo 2401, de acuerdo a la técnica descrita por Muyzer y Smalla, 1998. Los productos amplificados por PCR, utilizando cebadores con cola CG, fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 6 % p/v con gradiente lineal desnaturalizante. Los geles se

prepararon a partir de una solución stock de acrilamida (acrilamida-N, N'-metilen bis acrilamida, 37,5:1). El 100 % de desnaturalización corresponde a la mezcla de urea 7 M y formamida 40 % v/v. Los geles fueron preparados con las cantidades adecuadas de urea y formamida para conseguir el gradiente entre el 30 y el 70 % de agente desnaturalizante. La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X precalentado a 60 °C y se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 16 h. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó durante 45-50 min en Sybr Gold y se observó y fotografió en un transiluminador Universal Hood II (Bio Rad).

Para la comparación de comunidades planctónicas y sésiles se aplicaron índices de riqueza y diversidad estadísticos comúnmente utilizados en este tipo de estudios (Yu *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013). Estos índices se calcularon usando el número y la intensidad de las bandas en el perfil de DGGE de cada comunidad como representación del número y la abundancia relativa de los distintos filotipos (especies o cepas bacterianas) presentes en cada condición de ensayo (es decir en cada calle o canal sembrado) (Yu *et al.*, 2010). La intensidad relativa de cada banda (p_i) se usó como variable. La riqueza de filotipos, comúnmente denominada **riqueza específica (S)** se calculó como el número total de bandas distinguibles en el perfil de DGGE de cada muestra. El **índice de diversidad de Shannon-Weiner (H)** fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$H = - \sum (p_i) (\log_2 p_i) \quad (1)$$

donde: p_i es la proporción de la intensidad de una banda individual relativa a la suma de las intensidades de todas las bandas (Margalef, 1958).

El **índice de diversidad de Simpson (D)** responde a la siguiente ecuación:

$$D_{Si} = \sum (p_i)^2 \quad (2)$$

donde: p_i es la abundancia proporcional de cada especie, y representa la probabilidad de que un individuo de la especie i esté presente en la muestra, siendo entonces la sumatoria de p_i igual a 1:

$$p_i = n_i / N \quad (3)$$

siendo: n_i = número de individuos de la especie i

N = número total de individuos para las S especies en la comunidad

La ecuación (2) se aplica para comunidades "finitas" donde todos los miembros han sido contados, es decir que $n = N$. Considerando una comunidad "extensa", se plantea entonces una transformación apropiada para obtener un valor correlacionado positivamente con la diversidad:

$$D = 1 - \sum (p_i)^2 = 1 - D_{si} \quad (4)$$

Este índice le otorga un peso mayor a las especies abundantes subestimando las especies poco abundantes, tomando valores entre "0" (baja diversidad) hasta un máximo de $[1 - 1/S]$. (Simpson, 1949).

Tanto el número como las intensidades de las bandas se obtuvieron a partir de la digitalización de los geles de DGGE, empleando las curvas densitométricas de cada perfil mediante el programa *Gel Compare II*. Se consideró que cada pico en el perfil (que corresponde a una banda en el gel) es una población de microorganismos diferente, y la intensidad (altura del pico dividido por la suma total de intensidades de esa calle) corresponde a su abundancia relativa en la comunidad (Zhang y Fang, 2000).

Para el análisis filogenético de las comunidades, los geles obtenidos por DGGE también fueron normalizados y analizados estadísticamente con el programa *Gel Compare II*. En este análisis se aplicó el coeficiente de bandas de Dice para calcular la matriz de similitud (**S**) entre las muestras y una tolerancia del 1 % en la posición entre las bandas (Roeder *et al.*, 2010). El coeficiente de Dice considera el número de bandas compartidas entre dos muestras comparadas respecto del número total de bandas en ambas muestras, según la siguiente ecuación:

$$S_{i,j} = 2n_{i,j} / (2n_{i,j} + n_i + n_j) \quad (5)$$

donde: i y j son las líneas comparadas,

n_i es el número de bandas presentes solo en la línea i ,
 n_j es el número de bandas presentes solo en la línea j ,
y $n_{i,j}$ es el número de bandas compartidas entre las dos líneas.

Para realizar el agrupamiento se aplicó el algoritmo método por Pares de Grupo no ponderado con media aritmética (en inglés: UPGMA). El UPGMA es uno de los métodos de agrupamiento jerárquico o aglomeración más utilizados en ecología para la clasificación de unidades de muestreo sobre la base de las similitudes de a pares de las variables estudiadas (como, por ejemplo, la composición de especies) (Legendre y Legendre, 1998).

2.2.4. Tolerancia y resistencia al arsénico de bacterias heterótrofas

2.2.4.1. Análisis de comunidades sésiles y planctónicas cultivadas en medio líquido con distintas concentraciones de As(V)

Para determinar la concentración de tolerancia máxima (CTM) al arsénico (Shakya *et al.*, 2012; Dey *et al.*, 2016) de las comunidades sésiles y planctónicas, se sembraron 0,5 mL del material raspado de los cupones y del agua de los tanques en caldo nutritivo (CN) (triptona: 10 g.L⁻¹; extracto de carne: 5 g.L⁻¹, cloruro de sodio: 5 g.L⁻¹) con 50, 100, 200, 300, 500 y 1000 mg.L⁻¹ de As(V); a partir de este tubo se realizaron diluciones seriadas hasta 1/100.000 (**Figura 18**). Los tubos se incubaron durante 5 días a 25 °C, y mediante observación de la turbidez del medio se verificó el crecimiento bacteriano. Luego, del tubo con la primera dilución, se tomaron 2 mL del cultivo, se pasaron a eppendorf estéril y se concentraron por centrifugación (13.000 g, 15 min). A partir de este concentrado se realizó la extracción de ADN con un kit comercial (E.Z.N.A. Soil DNA kit Omega bio-tek). El ADN extraído se amplificó mediante PCR con los cebadores 341F con cola CG y 907R para la posterior realización de DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). El termociclador utilizado fue un Mastercycler® ep, Eppendorf, y el ciclo de PCR fue el descrito en la **Tabla 4** (sec. 2.2.3).

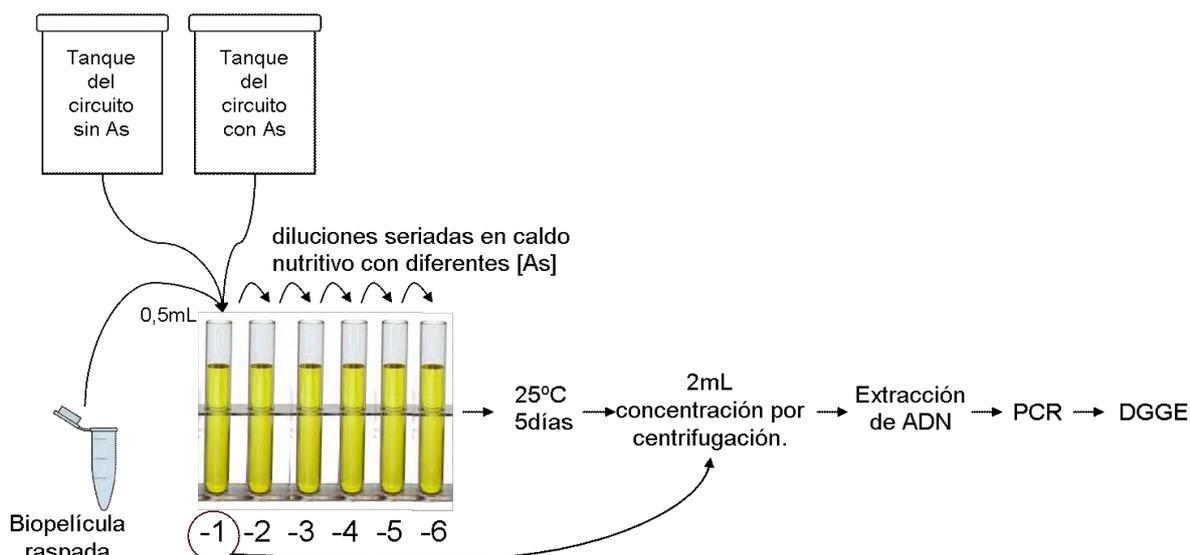


Figura 18. Esquema del ensayo de CTM al arsénico, para las comunidades sésiles y planctónicas, y posterior análisis de la estructura genética de las comunidades.

2.2.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En base a datos bibliográficos (Macur *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2005; Dhaval *et al.*, 2009), se realizó una prueba de sensibilidad al arsénico mediante la determinación de la CMI. Para esta prueba se seleccionaron en principio 6 cepas, provenientes de diferentes sustratos y con diferentes características fenotípicas (82, 83, 85, 90, 91 y 92) y se enfrentaron a 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 500 mg.L⁻¹ As(V). Dados los resultados obtenidos, en una segunda oportunidad se seleccionaron 11 cepas (69, 78, 90, 91, 165, 170, 175, 178, 206, 209 y 239) y se llegó a mayores concentraciones de arsénico en el medio de cultivo (200, 400, 600, 800 y 1000 mg.L⁻¹ As(V)).

En ambos ensayos se utilizaron microplacas de 96 pocillos con medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) (triptona: 10 g.L⁻¹, extracto de levadura: 5 g.L⁻¹, cloruro de sodio: 5 g.L⁻¹) con las diferentes concentraciones de As(V) e inoculados con las cepas bacterianas seleccionadas.

En la **Figura 19** se muestra un esquema de la metodología de trabajo seguida. Primero se hicieron repiques de las cepas seleccionadas en tubos con AN en pico de flauta, los cuales se incubaron a 25 °C durante 24 h. Para preparar los inóculos, con ansa estéril, se tomó una pequeña cantidad de cultivo de los tubos y

se la colocó en frascos con caldo LB hasta obtener una densidad óptica (DO) $\approx 0,1$ a una longitud de onda de 600 nm, lo que corresponde al valor 0,5 de la escala de Mc.Farland equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹.

Aparte, se preparó una solución stock de 2000 mg.L⁻¹ As(V) y se la esterilizó por filtración con membrana estéril de 0,22 μ m de poro. A partir de esta solución se prepararon diluciones en el medio de cultivo LB para alcanzar concentraciones de As(V) deseadas.

En cada pocillo de las microplacas se colocaron 180 μ L del medio LB con las concentraciones preparadas, por triplicado, dejando espacios adecuados para evitar contaminaciones. Luego se sembraron 20 μ L de los inóculos en cada concentración del medio LB con As(V). Asimismo, se sembraron controles positivos del crecimiento de cada cepa bacteriana, es decir en medio LB sin arsénico, controles negativos (sin inóculo) del medio de cultivo LB y de la solución inicial de 2000 mg.L⁻¹ As(V) para descartar cualquier efecto de una contaminación.

Se tomó una lectura inicial de la DO_(600 nm), previa a la incubación (T₀), en un lector de microplacas (Benchmark, Bio-Rad). Las microplacas se incubaron a 30 °C durante 24 h, y se procedió a medir nuevamente la DO_(600 nm) (T₂₄). Los resultados se analizaron estadísticamente por comparación de medias, mediante el test de Student, con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0,05$).

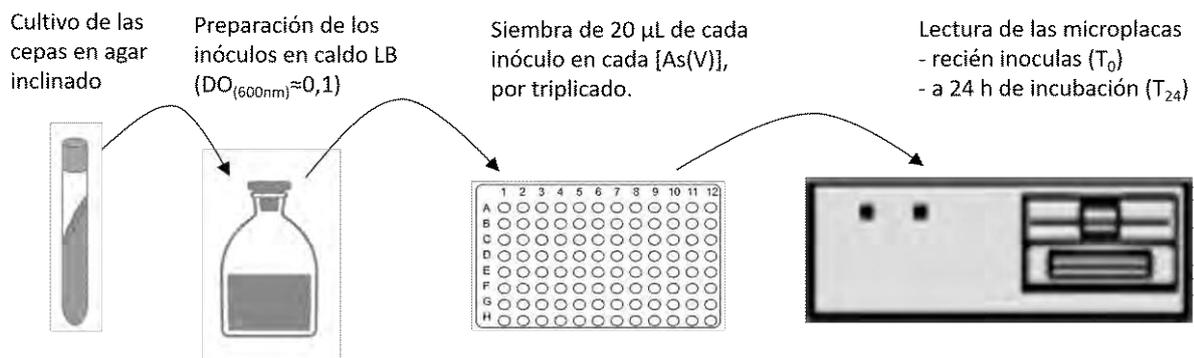


Figura 19. Esquema de trabajo seguido para la realización de los ensayos de CMI.

Para determinar si el arsénico ejerció un efecto bacteriostático o bactericida, los 200 µL de los pocillos en los cuales se observó inhibición o disminución significativa del crecimiento a las 24 h, se sembraron en 1800 µL de medio LB, por duplicado, se incubaron a 30° C durante 72 h y se observó el crecimiento por turbidez.

2.2.4.3. Búsqueda del gen *arsC* en microorganismos aislados y biopelículas.

El ADN extraído de algunas de las cepas aisladas y algunas comunidades fue amplificado con cebadores que codifican para el gen *arsC*. Este gen, como ya se ha descrito, codifica para la enzima arsénico-reductasa, responsable de la biotransformación de As(V) en As(III) y forma parte del operón "ars". En la **Tabla 5** se encuentran detalladas las características de los cebadores seleccionados a partir de la bibliografía.

Tabla 5. Características de los cebadores utilizados en la búsqueda del gen *arsC*.

Denominación del Cebador	Secuencia 5' --- 3'	Ciclo de PCR	Tm* (°C)	Referencia
arsC-gram(+) 16F arsC-gram(+) 317R	ATTTAYTTTATATGYACAG GATCATCAAACCCCAAT	94° 5 min 94° 45 seg } 37° 45 seg } x35 72° 45 seg } 72° 7 min }	42.2 53.1	Macur <i>et al.</i> 2004.
arsC-Pseud. 6F arsC-Pseud. 365R	AGTCCTGTTTCATGTGYAC TGGCGTSGAAYGCCG	94° 5 min 94° 45 seg } 42° 45 seg } x35 72° 45 seg } 72° 7 min }	56.5 60.3	Macur <i>et al.</i> 2004
arsC-amlt 42 F arsC-amlt 376 R	TCGCGTAATACGCTGGAGAT ACTTTCTCGCCGTCTTCCT	94° 5 min 94° 30 seg } 54° 30 seg } x30 72° 30 seg } 72° 10 min }	60.4 60.4	Sun <i>et al.</i> 2004
arsC-smrc 42 F arsC-smrc 376 R	TCACGCAATACCCTTGAAATGATC ACCTTTTCACCGTCCTCTTTCGT	94° 5 min 94° 30 seg } 59° 30 seg } x30 72° 30 seg } 72° 10 min }	61.2 62.8	Sun <i>et al.</i> 2004

*Tm= temperatura de fusión (*melting*).

2.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y LOS DEPÓSITOS LUEGO DE SU EXPOSICIÓN

Para caracterizar los depósitos adheridos a los cupones y la superficie del sustrato subyacente se utilizaron diferentes instrumentos de observación que permitieron tomar imágenes en un amplio rango de magnificaciones. Desde la observación a simple vista y fotografía con cámara digital, pasando por bajos aumentos con lupa estereoscópica (hasta 40x) (Arcano ANT-WT 4130) con cámara acoplada (Motic Cam) hasta mayores aumentos con los diferentes microscopios ópticos y electrónicos mencionados a continuación.

2.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para la observación en el MEB, los cupones retirados de los circuitos se enjuagaron con agua destilada estéril para retirar bacterias y/o productos de corrosión no adheridos, luego se fijó la biopelícula en glutaraldehído al 2,5 % v/v en buffer fosfato salino (PBS) durante 24 h. Posteriormente se deshidrató en mezclas de concentraciones crecientes de etanol en agua destilada en las siguientes proporciones: 20:80; 40:60; 60:40; 80:20 y 100 % etanol, entre 30 y 40 min por solución (modificado de Stewart *et al.*, 1995). Las muestras se secaron por punto crítico con acetona y CO₂, y finalmente se metalizaron con una delgada lámina de oro. Los microscopios utilizados fueron: Zeiss Supra™ 40, FEI Quanta 200 y Philips 505, acoplados a analizadores de rayos X, los que permitieron obtener el análisis semicuantitativo de los depósitos.

Asimismo, un cupón de cada material ensayado se utilizó para la observación y caracterización de la superficie expuesta, es decir de los efectos generados por el agua y los microorganismos. Para ello, previo a la observación en el MEB, los cupones fueron decapados. En algunas ocasiones con un decapante comercial no corrosivo capaz de remover productos de corrosión de superficies metálicas ferrosas y no ferrosas (CORTEC-423 GEL). El decapante se dejó actuar 10 min., luego se retiró con una gasa o hisopo secos. En otras ocasiones se sumergieron los cupones en "urotropina" (hexametilentetramina) al 3 % p/v en ácido clorhídrico al 50 % v/v

en agua destilada durante 5 min., y seguidamente se enjuagaron con agua destilada estéril (modificado de la norma ASTM G1-03, 2011). En ambos casos las muestras fueron metalizadas con oro antes de la observación. Los microscopios utilizados fueron los mismos que para la observación de las biopelículas.

2.3.2. Difracción de Rayos X (DRX)

Con el objeto de ampliar el conocimiento sobre los depósitos inorgánicos adheridos, los cupones extraídos de los circuitos fueron analizados mediante DRX, en un Goniómetro Philips 3020 con un controlador PW 3710, empleando radiación Cu-K α , filtro de Ni, 40 kV-20 mA. No se utilizó monocromador, y el barrido se realizó entre 5° y 70° con paso de 0,02° y 1 seg/paso (esto fue realizado en el CETMIC, CONICET-CIC, La Plata). El análisis se realizó sobre los cupones con los depósitos adheridos a su superficie, así como también de material raspado y extraído de los mismos.

2.3.3. Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Para analizar y caracterizar los depósitos orgánicos se empleó la técnica de FT-IR. Los espectros ATR-FTIR se obtuvieron utilizando un espectrómetro FTIR Perkin Elmer (Spectrum ONE) equipado con una unidad U-ATR en el rango espectral 4000-650 cm⁻¹ que se encuentra en el Laboratorio de Espectrometría del CIDEPINT. Se registraron 4 barridos por muestra en modo de reflexión con una resolución de 4 cm⁻¹. Posteriormente, los espectros fueron analizados mediante los programas Spectrum-One y KnowItAll® (Bio-Rad) y bibliografía adecuada (Cooper, 1980; Mc. Murry, 2008) para identificar los grupos orgánicos presentes.

2.3.4. Microscopía Láser Confocal (MLC)

Con el objeto de caracterizar la estructura interna de las biopelículas depositadas, un cupón de cada material se observó y fotografió en un MLC. Para ello dicho cupón fue teñido con naranja de acridina al 0,01 % en PBS, durante 5 min. y

luego enjuagado con agua destilada. Se utilizó un microscopio Olympus FV 300, acoplado al software Fluoview versión 3.5. Las imágenes fueron tomadas a 100x cada 5 μm de distancia a lo largo de todo el espesor de la biopelícula, a una longitud de onda de 488 nm. Para la reconstrucción de la estructura tridimensional y su posterior análisis, se utilizaron los programas Image J 1.45 y Comstat 2.1, ambos de disponibilidad gratuita.

2.3.5. Análisis electroquímicos

Para estos ensayos fue necesaria la construcción de mini-celdas electroquímicas (**Figura 20**) de 10 x 6 x 2 cm. En estas mini-celdas los electrodos de trabajo fueron los diferentes cupones metálicos, el contraelectrodo fue un cilindro de grafito y el electrodo de referencia un electrodo de Hg/Hg₂SO₄ sat. Los ensayos se realizaron en solución de Na₂SO₄ 0,1 M naturalmente aireada, sin agitación. Para posibilitar la conexión eléctrica, a los cupones se les soldó un cable de cobre. Esta unión, la base y el borde del cupón fueron aislados con una resina epoxi y luego fijados con la misma resina a la base de la celda. De este modo sólo la cara superior del cupón quedó expuesta a la solución. Debido a las débiles fuerzas de adhesión de los productos de corrosión formados, en todos los ensayos los cupones se ubicaron en posición horizontal.

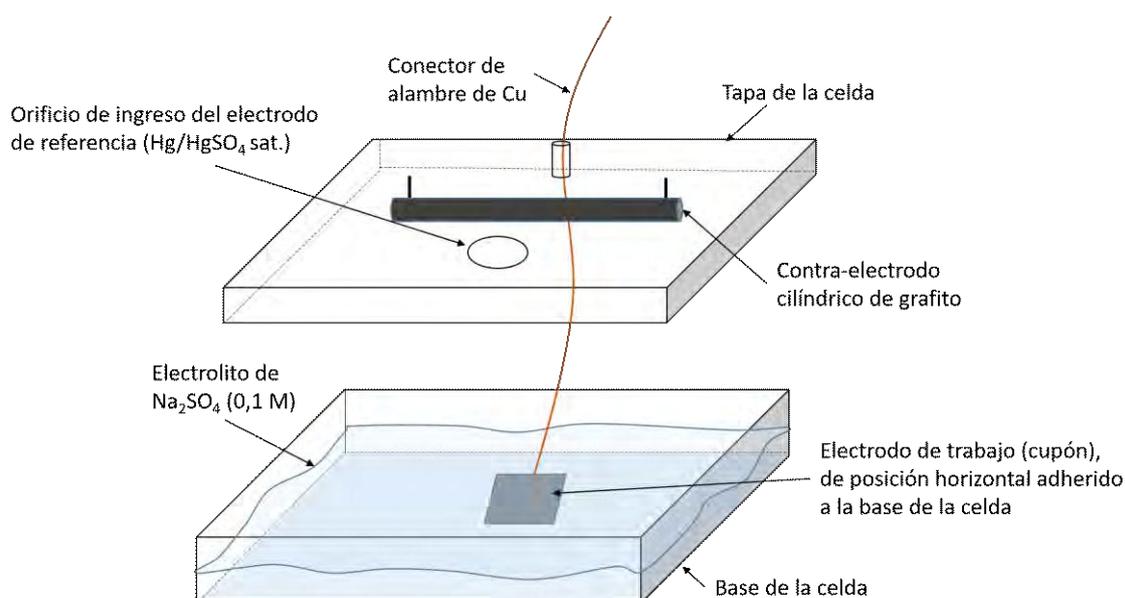


Figura 20. Esquema de las celdas electroquímicas utilizadas en los ensayos. El tamaño de la celda es de 10 x 6 x 2 cm.

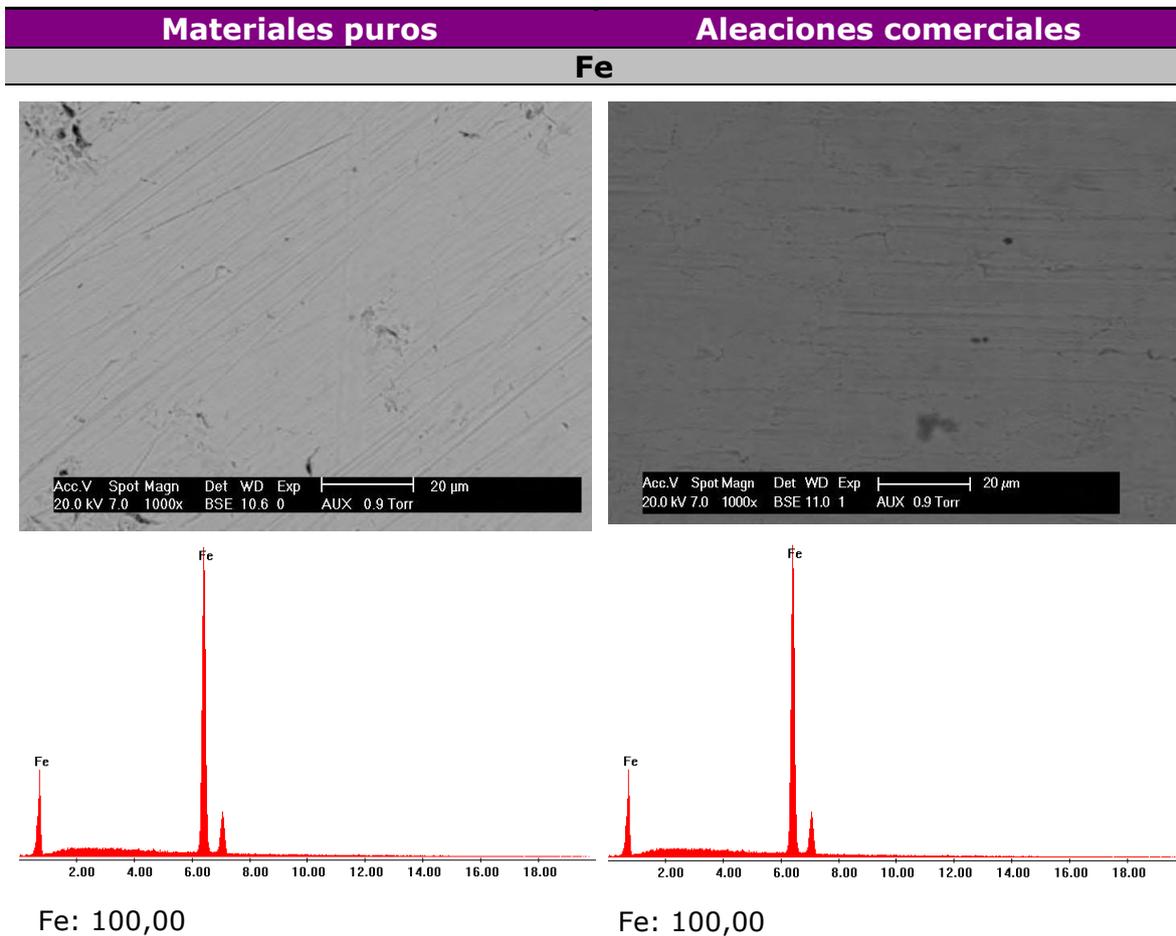
Se realizaron determinaciones de potencial a circuito abierto (PCA) y curvas de polarización anódicas cuasi-estacionarias mediante un potencióstato/galvanostato (EG & G Princeton Applied Research modelo 273 A) en el rango de potencial de -25 a 500 mV (respecto al potencial de corrosión) y con una velocidad de barrido de $0,166 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Las determinaciones se realizaron sobre cupones metálicos sin exponer, utilizados como control de referencia, así como sobre cupones provenientes de ambos tanques. El análisis estadístico para evaluar el efecto de la exposición en los circuitos se realizó mediante comparación de medias por el test ANOVA de una vía ($\alpha=0,05$).

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

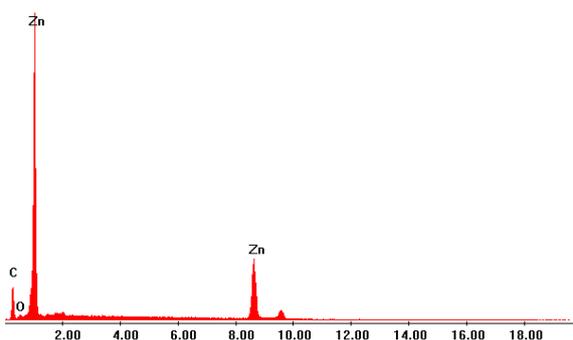
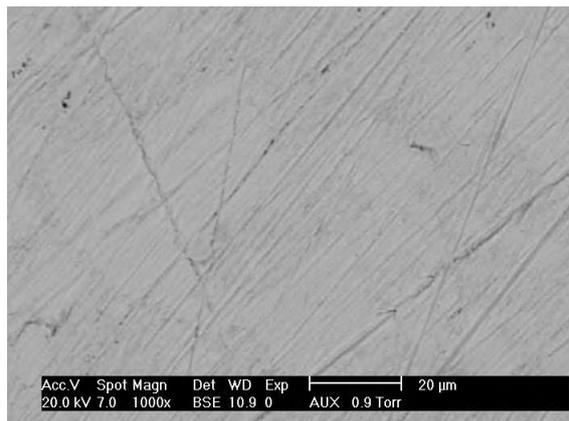
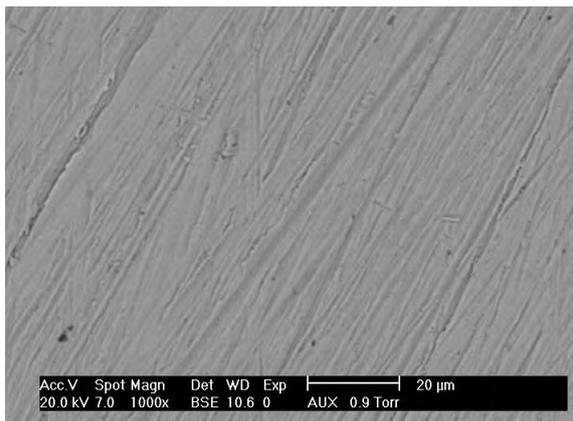
3.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS ENSAYADOS

Como se ha mencionado (Cap.2, sec. 2.1.1), en este trabajo se comenzó ensayando cupones de materiales puros y de aleaciones comerciales. Luego, mediante microscopía electrónica y análisis EDS (**Figura 21**) se pudo determinar la gran similitud en la composición entre ambos tipos de materiales. Por esta razón se prefirió continuar trabajando con los materiales comerciales, debido a su menor costo y mayor facilidad de obtención. A través de estas micrográficas también es posible observar que las superficies presentan irregularidades que no se eliminan durante por el proceso de preparación de los cupones.

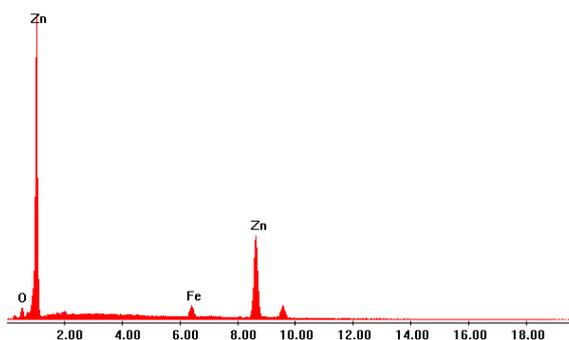


continúa

Zn

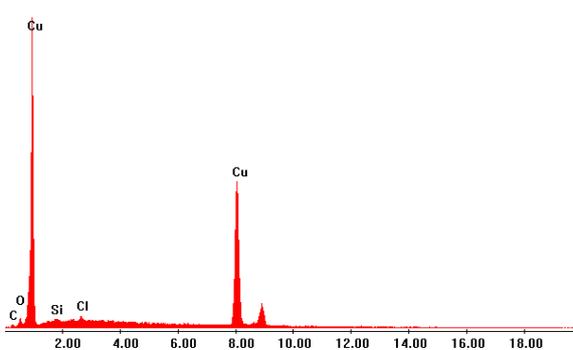
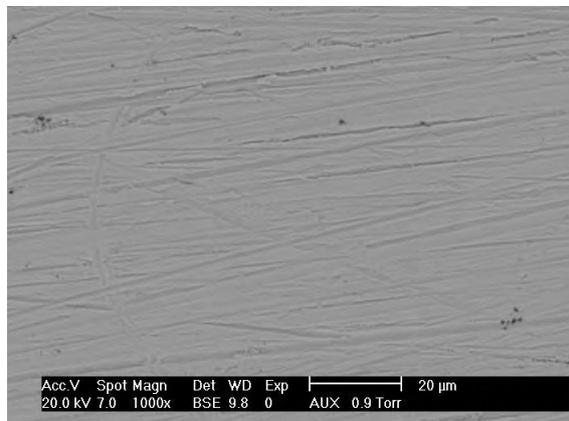
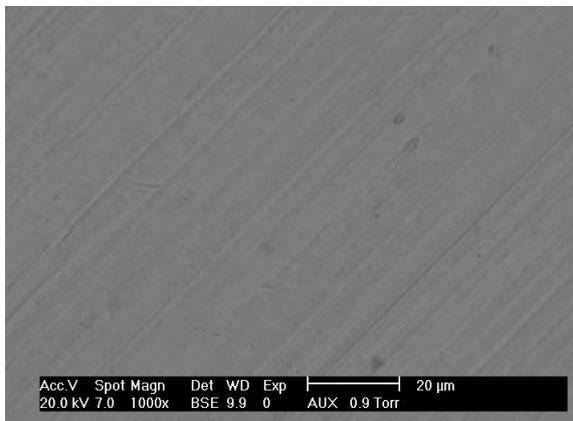


C: 27,43; O: 2,49; Zn: 70,08

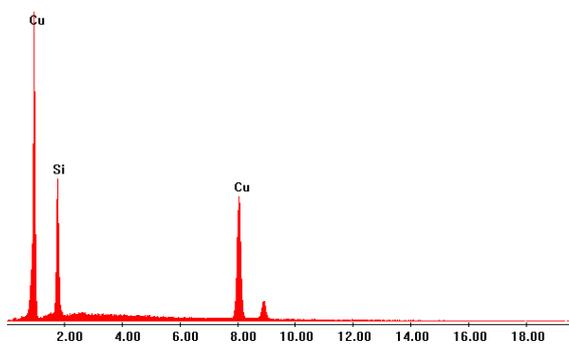


O: 7,77; Fe: 4,67; Zn: 87,56

Cu



C: 0,45; O: 3,72; Si: 0,51; Cl: 0,69;
Cu: 94,63



Si: 20,95; Cu: 79,05

continúa

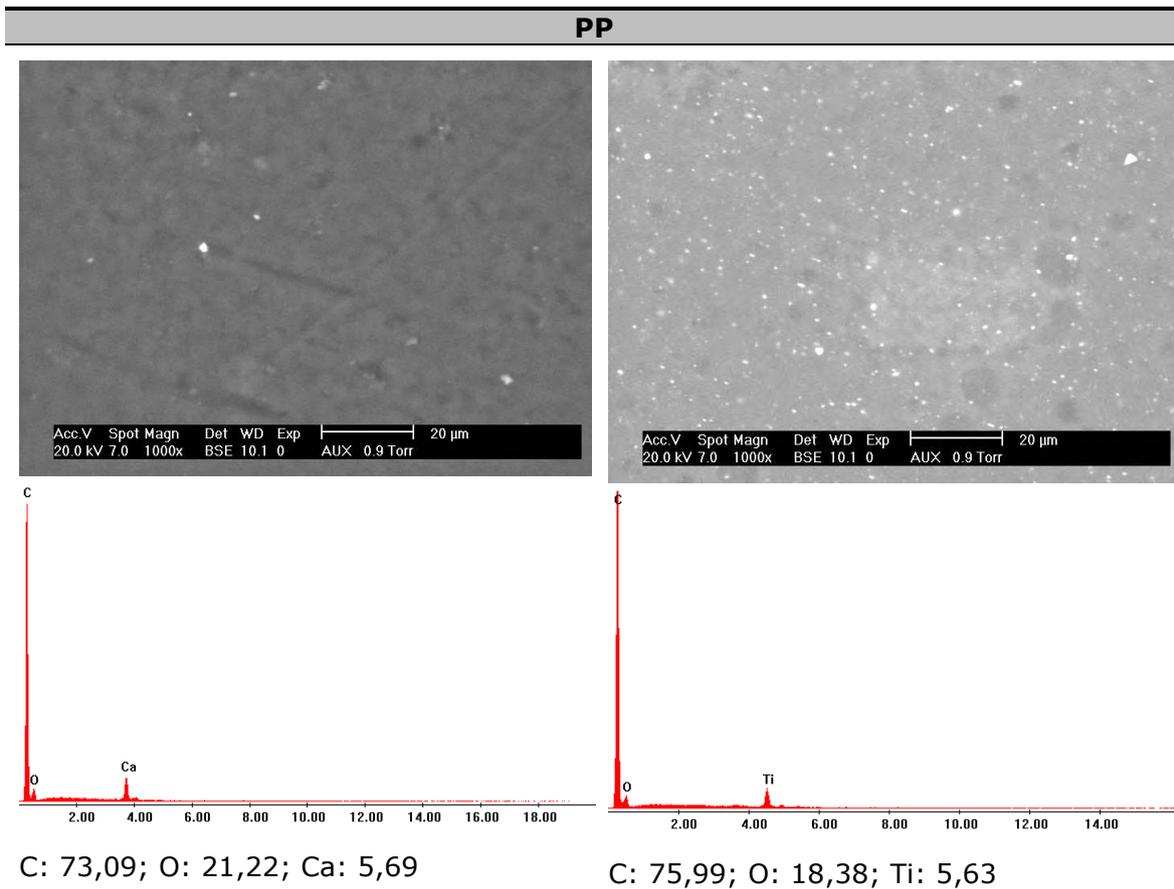


Figura 21. Imágenes de MEB y análisis químico (EDS) semicuantitativo de los materiales puros y las aleaciones comerciales antes de su exposición en los circuitos de agua.

3.2.- CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.2.1. Recuento de bacterias heterótrofas totales

Desde el comienzo de este trabajo se realizaron un total de 16 *SERIES*. Las tres primeras *SERIES* permitieron optimizar el funcionamiento de los sistemas: se determinó el tiempo de alternancia de circulación y detenimiento; el orden y posición de los cupones en la celda minimizando el contacto y/o arrastre de productos de corrosión de un material a otro y se probaron distintos productos para adherir los cupones. Asimismo, se probaron diferentes métodos de extracción de la biopelícula, comprobándose que el raspado de los cupones con espátula o bisturí estéril permitía retirar prácticamente el total del depósito. Es por ello que los resultados presentados a continuación, corresponden a las trece *SERIES* posteriores a dicha optimización.

En base a la literatura, se estima que cerca del 95% de las células microbianas presentes en los sistemas de distribución de agua potable existen en forma de biopelícula, adheridas sobre la superficie de la cañería y sólo un 5% de ellas viven en la fase acuosa (Moritz *et al.*, 2010). Es por ello que el objetivo principal del trabajo fue cuantificar y caracterizar las biopelículas, sin embargo, a lo largo de algunas *SERIES* también se hicieron recuentos y análisis de las comunidades planctónicas de los tanques en presencia y ausencia de arsénico. En general el número de bacterias planctónicas estuvo en el orden de 10^4 - 10^5 UFC.mL⁻¹, en la **Figura 22** se muestran los resultados obtenidos.

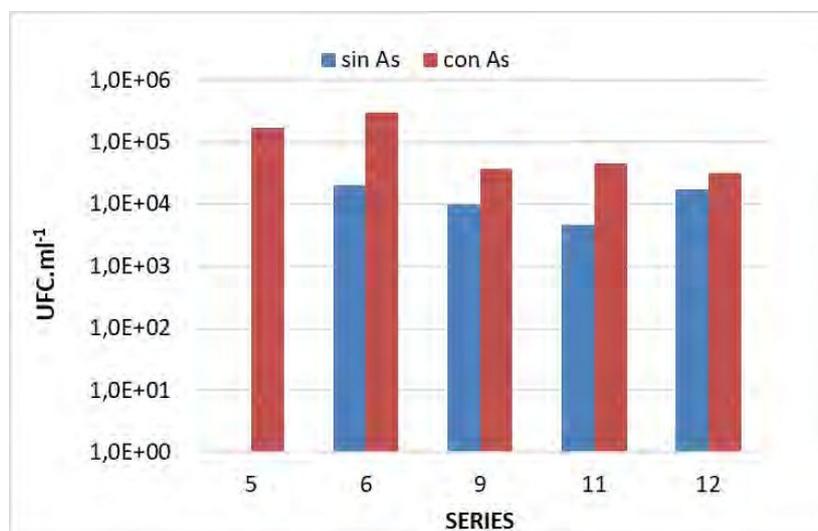


Figura 22. Recuentos de bacterias heterótrofas totales planctónicas obtenidos en diferentes series realizadas.

Contrariamente a lo esperado, los recuentos de bacterias planctónicas del tanque conteniendo arsénico fueron mayores que en el circuito sin arsénico, sin embargo, el análisis estadístico (Test de Student, 95% de confianza, BioStat 2008) no indica una diferencia significativa entre los promedios. Cabe señalar que los números de bacterias en los tanques de los circuitos fueron elevados considerando que dichos tanques fueron llenados con agua potable. Es sabido que las fuentes de abastecimiento de agua contienen compuestos orgánicos, designados genéricamente como carbono orgánico asimilable (COA) que proporcionan el recurso primario para la formación de una cadena trófica dentro de la tubería (Dukan *et al.*, 1996). Estos compuestos son capaces de promover el crecimiento bacteriano en el

sistema de distribución, incluso después de la desinfección final a la que se somete al agua durante su potabilización. Este desarrollo bacteriano depende fundamentalmente del contenido de materia orgánica biodegradable y de nutrientes inorgánicos, de la eficiencia del desinfectante residual (LeChevallier *et al.*, 1988), de la temperatura, del tiempo de residencia del agua en los conductos y depósitos de almacenamiento, del pH del agua y del material de construcción de las tuberías (Colbourne *et al.*, 1988; Schoenen, 1989). El proceso de potabilización puede significar así mismo la incorporación de ciertos compuestos orgánicos o la transformación de aquellos presentes en el agua mediante los procesos de oxidación (ozonación, cloración).

Para cuantificar las biopelículas, se realizó el promedio del recuento de tres cupones de cada material (Cap. 2, secc. 2.2.1.), obteniendo así, el número de bacterias adheridas en los cupones (expresado en UFC.cm⁻²) en cada *SERIE* independiente. Para una mejor apreciación de los resultados, en la **Figura 23** se muestran los recuentos obtenidos en todas las series de circulación en presencia y ausencia de arsénico para cada material por separado.

Cabe señalar, que de las trece series consideradas, sólo en diez se obtuvieron resultados de recuento en placa de ambos circuitos. En las *SERIES* 1, 2 y 5 no se obtuvieron datos del circuito sin arsénico, por lo tanto, los recuentos de dichas series, si bien se incluyeron en el gráfico, no se tuvieron en cuenta en el análisis estadístico.

Dada la alta dispersión que se obtuvo en los promedios de recuentos, se analizó si la heterogeneidad de las sucesivas *SERIES* podría estar asociada a algún factor como el tiempo de permanencia de los cupones en los circuitos o la variación de la temperatura ambiente de acuerdo a las distintas épocas del año en la que se llevaron a cabo los ensayos. El tiempo de permanencia de los cupones se fue incrementando desde 30, 45, 60 y hasta 80-85 días debido a que el material biológico obtenido no resultaba suficiente para los ensayos moleculares. Para ello, se hicieron test de ANOVA de dos vías, con un 95% de confianza ($\alpha=0,05$), considerando como factores por un lado, los sustratos y las estaciones del año, y por otro, los sustratos y el tiempo de permanencia de los cupones, para ambos circuitos.

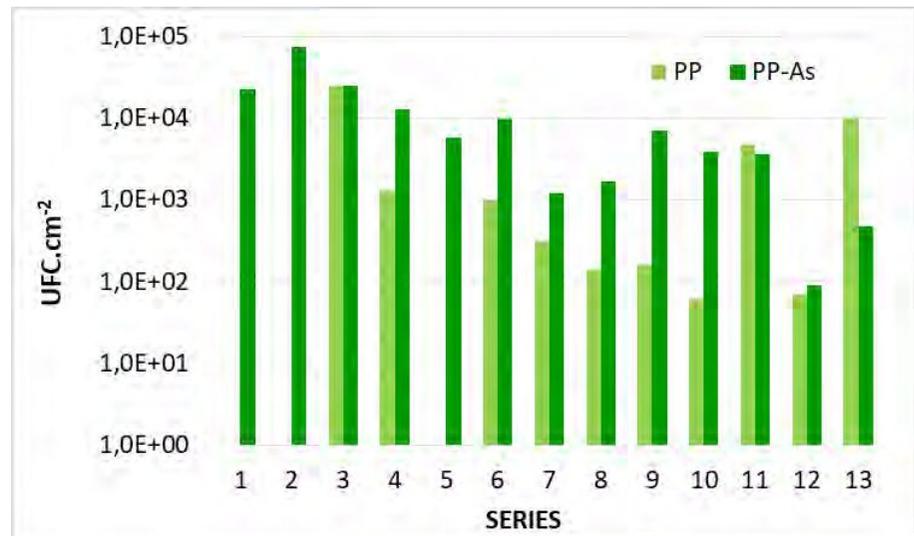
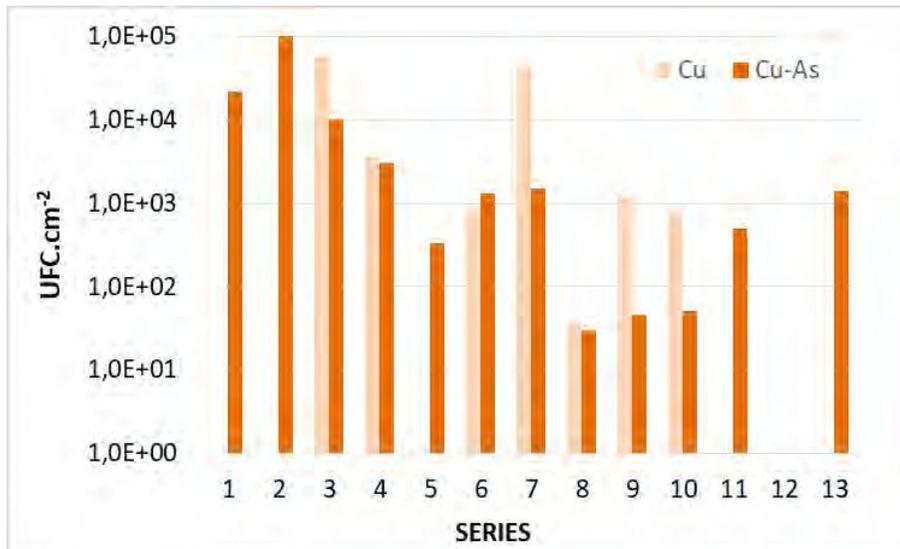
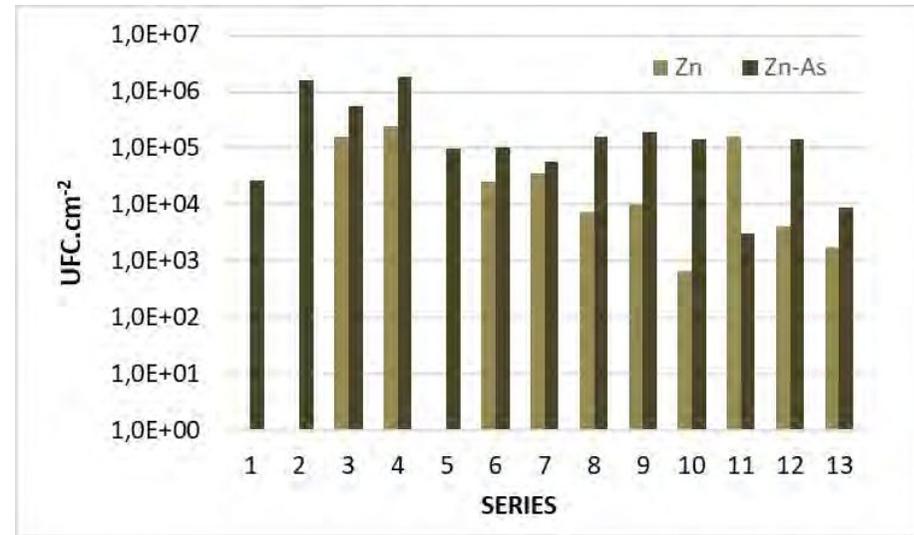
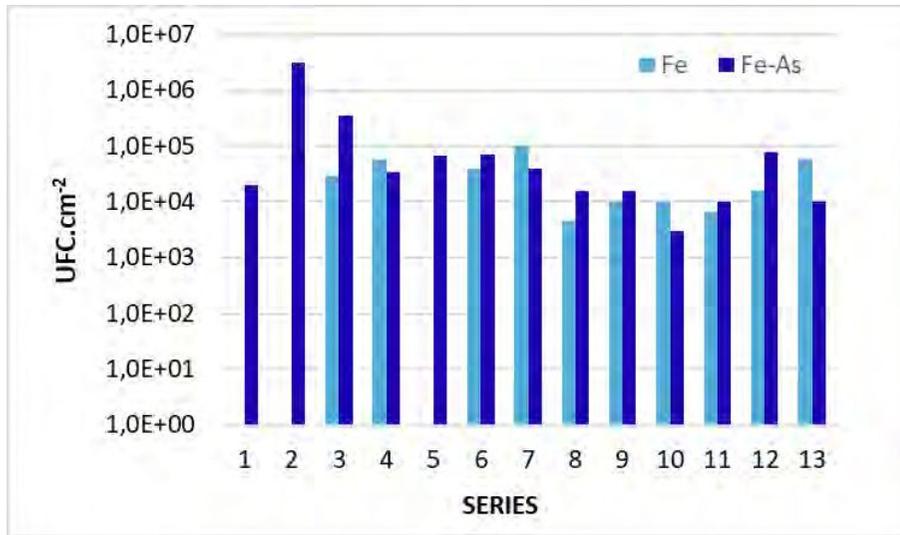


Figura 23. Recuentos de bacterias heterótrofas sésiles obtenidos para cada material, en cada serie de circulación, en ausencia y presencia de 5 mg.L⁻¹ As(V). La escala del eje Y se encuentra expresada en log.

En el circuito sin arsénico, los resultados del análisis de la "temperatura ambiente" indicaron que hay diferencias, aunque muy bajas, en los recuentos obtenidos en cupones de Zn entre otoño e invierno ($p=0,0144$), entre invierno y primavera ($p=0,013$) y entre invierno y verano ($p=0,0098$), así como también diferencias en los recuentos de invierno entre Zn y PP ($p=0,0096$) y entre Zn y Cu ($p=0,0018$). El análisis del factor "permanencia de los cupones" arrojó diferencias significativas muy bajas para los recuentos de Zn entre series de 30 y 60 días ($p=0,0044$) y entre series 30 y 80-85 días ($p=0,0008$). Así mismo dentro de las series de 30 días se encontraron diferencias entre los recuentos de Zn y Fe ($p=0,0034$) y entre Zn y PP ($p=0,0005$). Para el circuito con 5 mg.l^{-1} de As(V) se aceptaron las H_0 en todas las comparaciones.

Estos resultados permitieron descartar la influencia significativa de los factores mencionados sobre las variaciones en los recuentos, por lo tanto, posteriormente se realizó un ANOVA de dos vías para evaluar la influencia de la naturaleza de los distintos sustratos ensayados y la presencia de arsénico en el agua sobre el desarrollo de biopelículas, que responde a uno de los objetivos principales de este trabajo. En la **Tabla 6** se detallan los datos obtenidos de este análisis con el programa BioStat-2008.

Tabla 6. ANOVA de dos vías ($\alpha=0,05$), considerando como variables los sustratos y la presencia-ausencia de arsénico.

Origen de la variación	SS	d.f	MS	F	Nivel p	F _{crít.}
Factor #1 (sustrato)	337609454428,3	3	112536484809,4	2,779	0,0471	2,731
Factor #2 (pres./aus.As)	78978883007,8	1	78978883007,8	1,950	0,1667	3,973
Factor #1 + #2 (sustr. x pres./aus.As)	186108985148,4	3	62036328382,8	1,532	0,2134	2,731
Dentro de Grupos	2914886357859,3	72	40484532748,0			
Total	3517583680443,8	79	44526375701,8			

En principio, como resultado general de esta tabla se puede observar que existen diferencias significativas debidas a la naturaleza de los sustratos utilizados ($F_{\text{calc.}} = 2,779 > F_{\text{crit.}} = 2,731$), no hallándose diferencias significativas debido a la presencia de As(V) o la interacción de ambos factores.

Un análisis más detallado dentro de cada grupo de estos factores indica que:

1) Respecto del efecto de la naturaleza de sustrato, se encontraron diferencias significativas sólo en cupones expuestos al As(V) entre muestras de Zn y Cu y entre Zn y PP (según las pruebas *post hoc* de comparaciones de media que provee el programa). En los cupones expuestos al circuito sin As(V) no se hallaron diferencias significativas entre los recuentos en los diferentes materiales ensayados.

2) Respecto del efecto de la presencia/ausencia As dentro de cada material, sólo se encontraron diferencias significativas debidas a la exposición al agua con As(V) en los cupones de Zn (según las pruebas *post hoc* para contrastes de medias).

Si bien algunas comparaciones no arrojaron diferencias estadísticamente significativas, es posible notar en los gráficos de la **Figura 23**, que la cantidad de microorganismos llegó a ser de hasta un orden de magnitud mayor en los cupones de Fe y de hasta dos órdenes de magnitud mayores en los cupones de Zn que los obtenidos sobre los cupones de PP y Cu en ambos circuitos. Estas "no diferencias" estadísticas probablemente se deban a la alta dispersión de los datos entre las sucesivas series debido a la naturaleza heterogénea del sistema. Existen numerosos estudios acerca de la influencia del sustrato sobre la formación de biopelículas y se han encontrado resultados diversos, muchos de ellos concordantes con los obtenidos en este trabajo. Schwartz *et al.* (1998) han reportado que en distintos puntos de muestreo de un sistema de distribución de agua, el número de bacterias heterótrofas en biopelículas formadas sobre cupones de materiales plásticos como PE y PVC fue aproximadamente igual que los recuentos obtenidos en cupones de acero, mientras que la cantidad encontrada sobre cobre fue mucho menor, probablemente como causa de la liberación de cobre a partir de la propia cañería. Yu *et al.* (2010) han encontrado -a través de la medición de ATP- el menor potencial de formación de biopelículas en cupones de cobre y el mayor sobre cupones de hierro recubiertos de cinc, valores intermedios sobre cupones de acero inoxidable e

intermedios-bajos sobre cupones de diferentes plásticos ensayados en sistemas de distribución de agua potable. Por otro lado, Lehtola *et al.* (2004) han reportado que la formación de biopelículas en cañerías de cobre fue más lenta que en tuberías de PE y que los iones de cobre llevaron a reducir el número de microorganismos en el agua, es decir que la formación de biopelículas sobre cobre requiere mayor tiempo, y es por ello que pueden encontrarse diferentes resultados cuando se analizan y estudian biopelículas más jóvenes, además han reportado diferencias en la estructura de estas biopelículas ya que encontraron que la cantidad de bacterias Gram negativas es mayor en biopelículas desarrolladas sobre cañerías de cobre que de PE. Chang *et al.* (2003) encontraron que el recrecimiento de biopelículas en tuberías con la superficie rugosa, tales como hierro fundido, hierro fundido revestido de concreto y acero galvanizado fue mayor que sobre la superficie lisa del policloruro de vinilo (PVC) de la tubería. Kerr *et al.* (1998) observaron que materiales de base plástica como polietileno de densidad media (MDPE) y cloruro de polivinilo no plastificado (uPVC) soportaron números más bajos de bacterias en comparación con el hierro fundido, pero la diversidad de bacterias heterótrofas era mayor en este último. Algunos resultados opuestos fueron encontrados por Waines *et al.* (2011), quienes compararon la formación de biopelículas en cuatro materiales (cobre, acero inoxidable, monómero de etileno propileno dieno (EPDM) y polietileno reticulado (PEX)), y encontraron que los materiales de base plástica soportaban niveles significativamente más altos de biopelícula.

Como puede notarse, en general, todas estas investigaciones indican que, si bien son muchos los factores que influyen en la formación de las biopelículas, el material con el que está construida una tubería es uno de los más importantes. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo en el que los recuentos bacterianos son mayores en sustratos más susceptibles a la colonización debido a sus características químicas (susceptibles de corrosión) o físicas (heterogeneidad superficial) como el Fe y el Zn que sobre Cu y PP, sustratos química y/o físicamente menos aptos para la colonización microbiana.

Con respecto al efecto del contaminante adicionado, se obtuvieron valores de recuentos mayores en los cupones expuestos al circuito con As(V) (**Figura 23**). Estos datos son coherentes con el concepto de que los microorganismos presentan una mayor tendencia a formar biopelículas en ambientes más hostiles, ya que la

forma de vida sésil y en comunidad les confiere un mecanismo de defensa frente a condiciones adversas (Branda *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2002; Shirliff *et al.*, 2002). Esta tendencia se ve prácticamente anulada en los cupones de Cu, donde a pesar de la presencia del As(V) en el medio acuoso, los microorganismos no pueden protegerse creciendo sobre este sustrato, probablemente debido a la ya mencionada naturaleza tóxica de esta superficie (Schwartz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012).

3.2.2. Aislamiento e identificación de especies sésiles cultivables.

A partir de las placas de recuento de las biopelículas obtenidas de los diferentes materiales expuestos en ambos circuitos, se realizó el aislamiento de las diversas colonias observadas. Se aislaron, durante todo el trabajo, un total de 335 colonias. En el **ANEXO II** se presenta una tabla con la denominación dada a cada cepa, su origen (sustrato y tanque), descripción de la morfología de la colonia, así como también su identificación taxonómica en el caso que corresponda.

De las 335 colonias aisladas, fue posible extraer, amplificar y secuenciar el ADN, sólo de 64, de las cuales pudieron identificarse taxonómicamente 60 aislados (**ANEXO II**). Las cuatro restantes dieron baja calidad de secuenciación, y al compararlas mediante el BLAST se obtuvieron muy bajos valores de similitud con las cepas de referencia del GenBank, motivo por el cual estas secuencias no fueron consideradas en los análisis filogenéticos.

En la **Figura 24** se muestra el árbol filogenético que representa las relaciones entre las clases obtenidas a partir de las secuencias comparadas. Para enraizar el árbol se utilizó la secuencia de *Pseudomonas sp.* A-13 como grupo externo. Como puede verse en la figura, el 40 % del total de las cepas identificadas pertenecen a la clase Bacilli (phylum Firmicutes). La clase Actinobacteria (phylum Actinobacteria) representa el 10 % de las colonias identificadas, y el 50 % restante pertenecen al phylum Proteobacteria, representado por tres de sus clases: la clase α -Proteobacteria con un 40 %, la clase β -Proteobacteria con el 8 % y la clase γ -Proteobacteria con el 2 %. Si bien los resultados corresponden a los 60 aislados identificados, que representa un 20 % del total de aislamientos, las abundancias relativas obtenidas concuerdan con las de diversas investigaciones realizadas en

redes de distribución de agua (Kjellerup *et al.*, 2005; Kormas *et al.*, 2010; Revetta *et al.*, 2010; Revetta *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014).

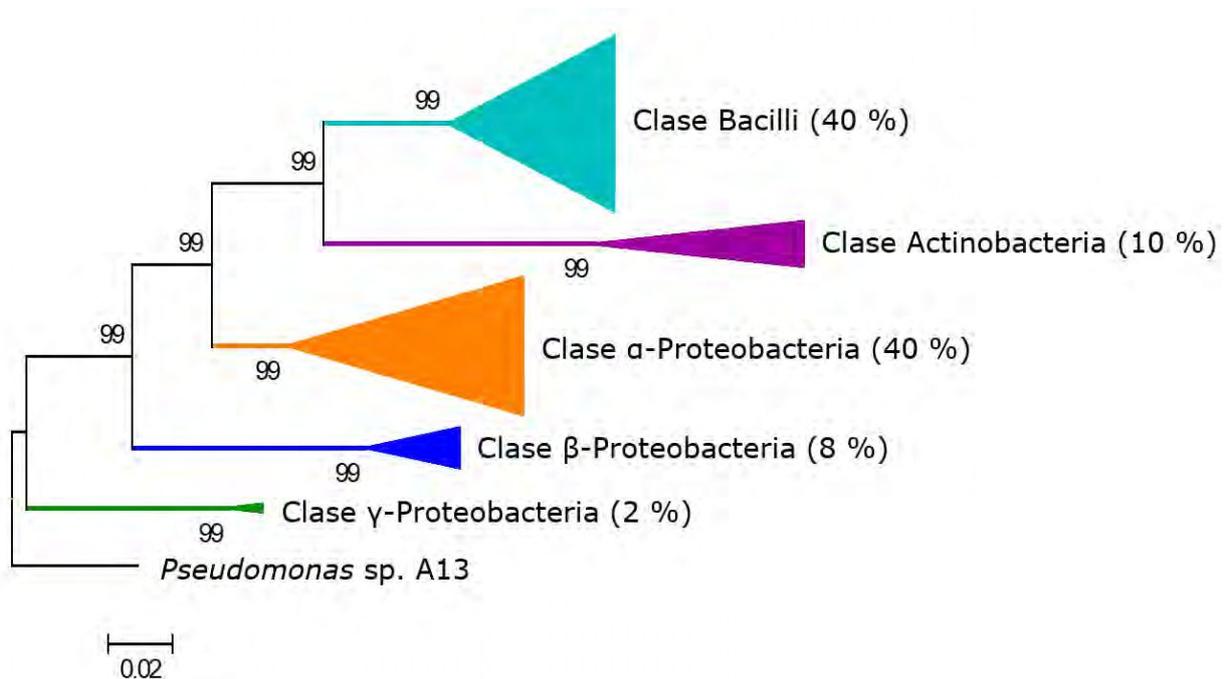


Figura 24. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S mostrando las relaciones entre las clases obtenidas del GenBank. El árbol se construyó por el método del vecino más cercano (neighbor-joining) validado por 1000 réplicas; sobre las ramas se encuentra el porcentaje de réplicas que valida el agrupamiento de esos *taxa*. La barra de escala indica la distancia evolutiva y su unidad está dada en bases sustituidas (es decir 0,02 indica 2 % de los nucleótidos de la secuencia sustituidos).

En la **Figura 25** pueden observarse los porcentajes de abundancia de las clases bacterianas mencionadas y su distribución sobre los diferentes sustratos en ambos sistemas. A partir de este gráfico algunas de las particularidades que caben destacar son:

- 1) las bacterias pertenecientes a las clases Bacilli y α -Proteobacteria se encontraron sobre los cuatro sustratos ensayados, tanto en ausencia como en presencia de arsénico;
- 2) las bacterias pertenecientes a la clase β -Proteobacteria se han encontrado sólo en biopelículas provenientes del circuito con As(V);
- 3) bacterias pertenecientes a la clase γ -Proteobacteria se encontraron sólo sobre cupones de Zn en el circuito sin arsénico.

4) a pesar de los bajos recuentos hallados sobre el PP en presencia de As, sobre este sustrato se encontró la mayor riqueza a este nivel taxonómico (número de clases).

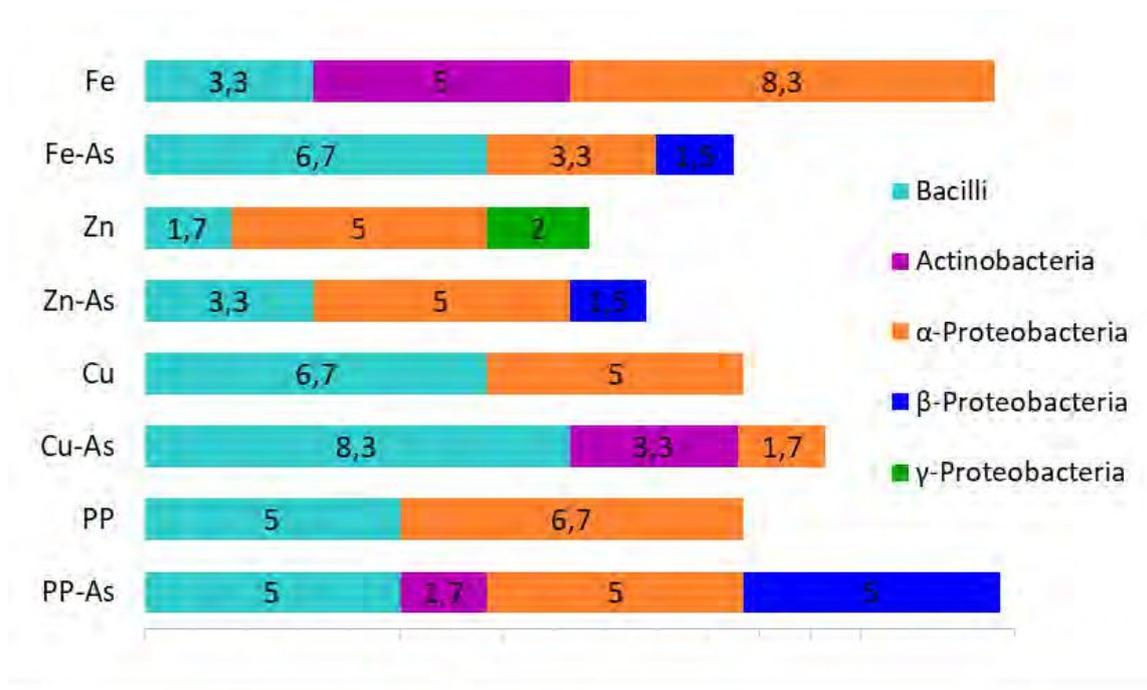


Figura 25. Distribución de las clases taxonómicas identificadas sobre los cuatro sustratos ensayados en ausencia y presencia de arsénico. Los valores están expresados en % de abundancia relativa.

La alineación de las secuencias del ARNr 16S de las cepas aisladas y las secuencias de referencia con mayor similitud obtenidas del GenBank, permitió identificar los géneros presentes dentro de las diferentes clases y construir los árboles filogenéticos correspondientes (**Figuras 26-30**).

Dentro de la clase Bacilli, se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* (**Figura 26**). Las bacterias del género *Bacillus* fueron halladas sobre los cuatro sustratos ensayados tanto en presencia como en ausencia de arsénico en el agua. En cambio, el género *Paenibacillus* fue hallado sólo en biopelículas formadas sobre cupones de Fe y el género *Staphylococcus* sólo en cupones de Cu, ambos en presencia de As(V).

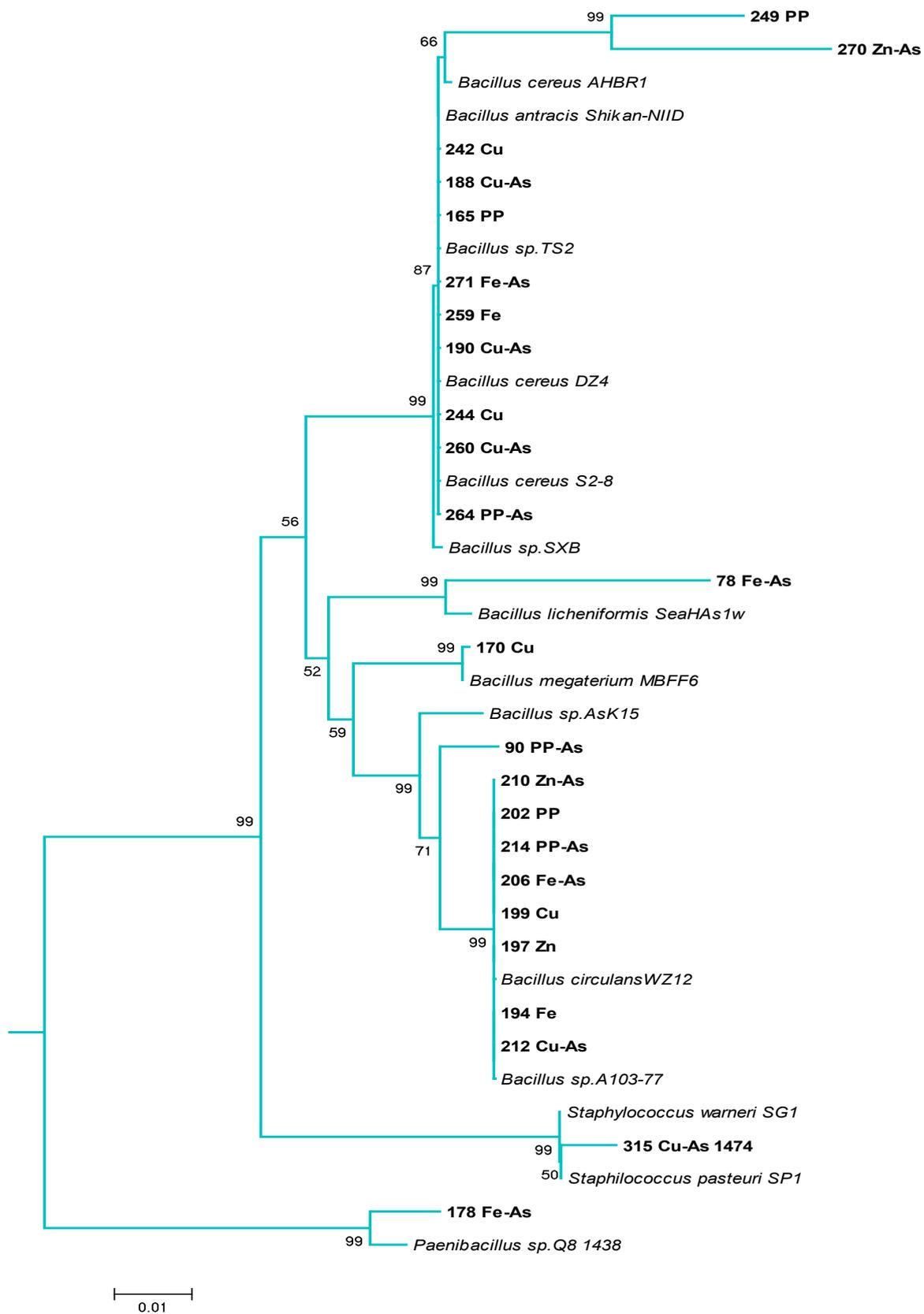


Figura 26. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S mostrando las relaciones entre las de las bacterias pertenecientes a la clase Bacilli (las cepas aisladas se indican con un número seguido del material y el circuito de origen).

Dentro de la clase Actinobacteria, se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Kokuria* y *Micrococcus* encontradas sobre Cu y *Janibacter* sobre PP, todos obtenidos de cupones expuestos al circuito con As(V); también se identificó el género *Brachibacterium* sobre cupones de Fe en ausencia de As(V) (**Figura 27**).

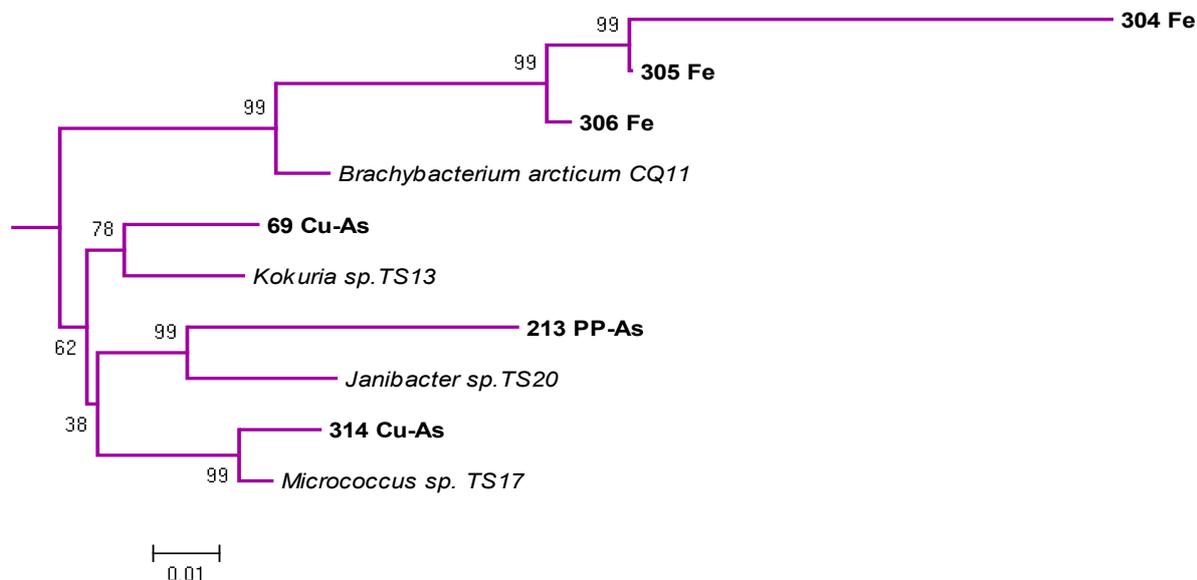


Figura 27. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S mostrando las relaciones entre las bacterias pertenecientes a la clase Actinobacteria (las cepas aisladas se indican con un número seguido del material y el circuito de origen).

El resto de las colonias identificadas pertenecen al phylum Proteobacteria, como se mencionó anteriormente, representado por tres de sus Clases: en la Clase α -Proteobacteria el género *Brevundimonas* fue encontrado sobre los cuatro sustratos tanto en presencia como en ausencia de As(V), el género *Sphingomonas* fue hallado sobre cupones de Fe y Cu en ausencia de As(V) y *Sphingobium* en Fe y PP también en ausencia de As(V) (**Figura 28**). La clase β -Proteobacteria estuvo representada por el género *Delftia*, aislado de biopelículas desarrolladas sobre Zn y PP, ambos en presencia de As(V) y el género *Acidovorax* sobre cupones de Fe en presencia de As(V) (**Figura 29**) y en la clase γ -Proteobacteria, se identificó el género *Acinetobacter*, aislado sólo de cupones de Zn en ausencia de As(V) (**Figura 30**).

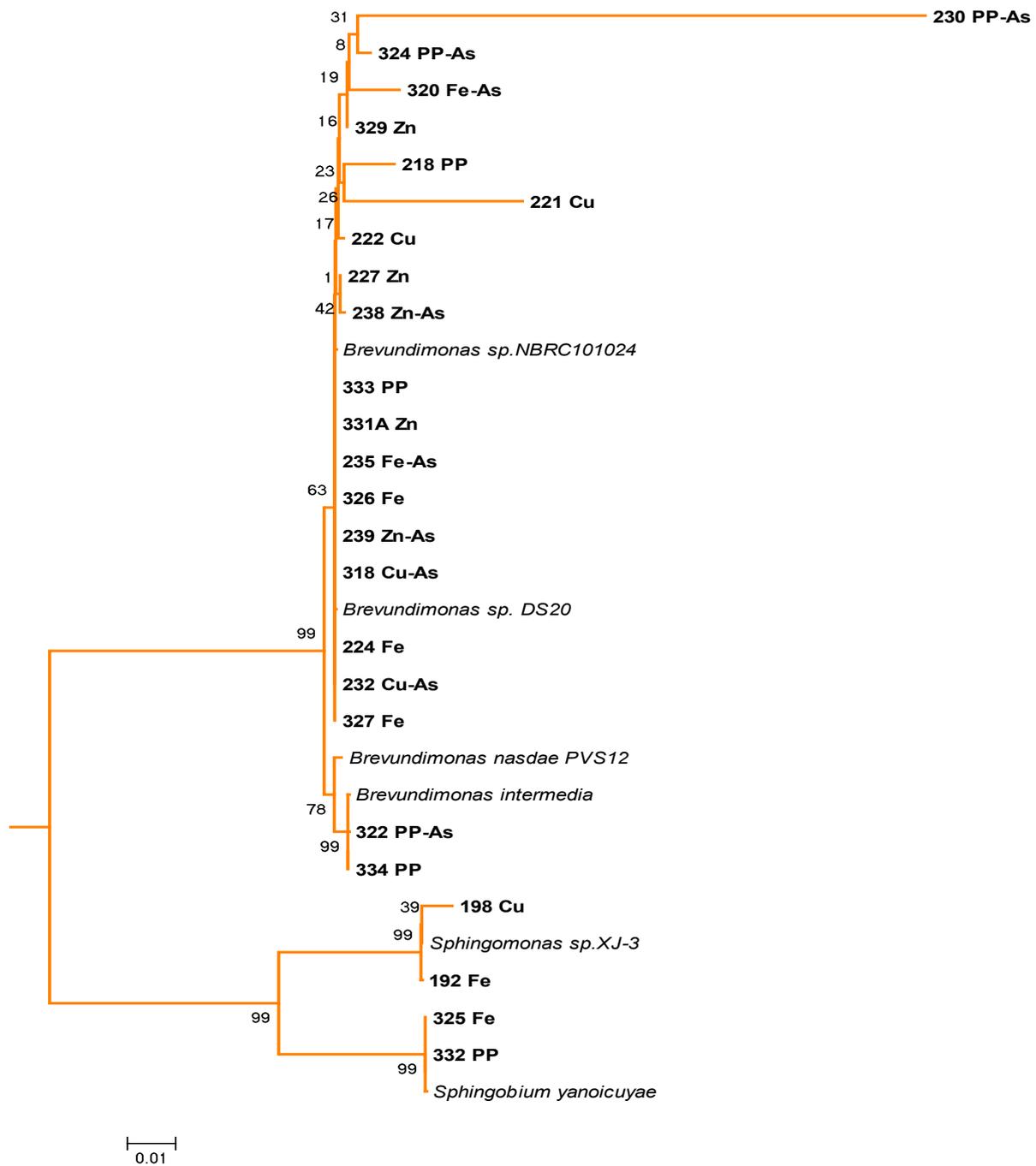


Figura 28. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S mostrando las relaciones entre las bacterias pertenecientes a la clase α -Proteobacteria (las cepas aisladas se indican con un número seguido del material y el circuito de origen).

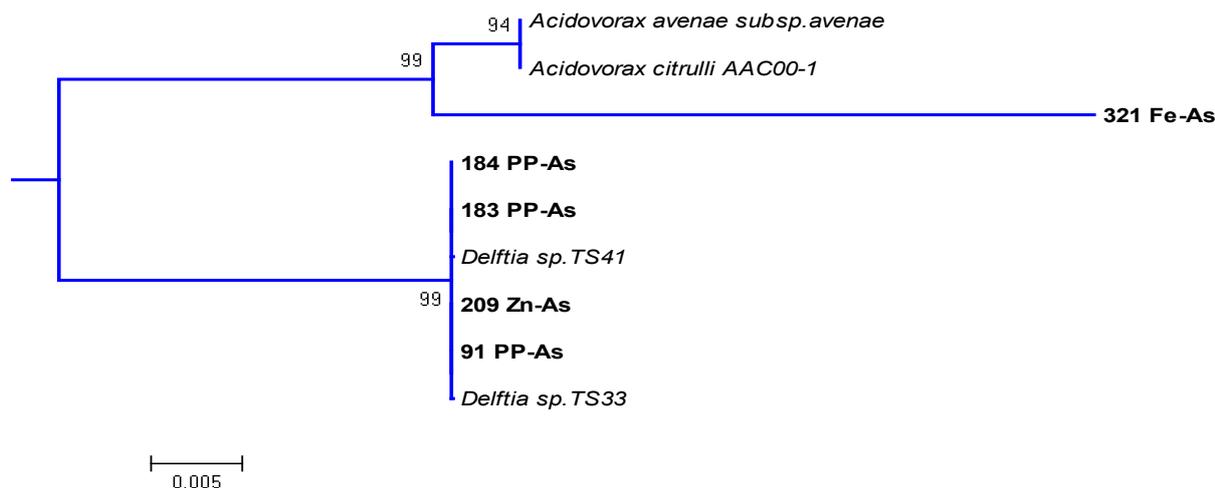


Figura 29. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S mostrando las relaciones entre las bacterias pertenecientes a la clase β -Proteobacteria (las cepas aisladas se indican con un número seguido del material y el circuito de origen).



Figura 30. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S mostrando la relación del aislado perteneciente a la clase γ -Proteobacteria (las cepas aisladas se indican con un número seguido del material y el circuito de origen).

Existen numerosos estudios que demuestran que las biopelículas pueden formarse en el interior de los sistemas de distribución de agua potable, y describen las diferencias encontradas entre los materiales en función de la capacidad de formación de biopelícula, de la biomasa bacteriana fijada, de las características morfológicas de las biopelículas, etc. (Lethola *et al.*, 2004; Lethola *et al.*, 2006; Niquette *et al.*, 2000). En los últimos años, debido al avance de las técnicas moleculares, se han sumado estudios dedicados a identificar los microorganismos presentes tanto en el agua como en las biopelículas formadas sobre diferentes materiales (Kjellerup *et al.*, 2005; Roeder *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con diversos estudios, que reportan que la comunidad bacteriana planctónica del agua potable, así como las biopelículas obtenidas de sistemas de distribución están constituidas principalmente por bacterias pertenecientes al

phylum Proteobacteria (Kjellerup *et al.*, 2005; Kormas *et al.*, 2010; Revetta *et al.*, 2010; Revetta *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014), variando los porcentajes de las diferentes clases en relación a los diversos sustratos analizados. Se ha encontrado que los materiales plásticos, como PVC, son colonizados muy frecuentemente por β - y γ -Proteobacteria, las primeras también han sido encontradas en altos porcentajes en materiales metálicos como el acero y el cobre (Schwartz *et al.*, 1998).

El cladograma de la clase α -Proteobacteria (**Figura 28**) muestra que dos colonias aisladas del PP (**322** y **334**) se agrupan muy estrechamente (99% de las réplicas) con la especie *Brevundimonas intermedia*. Asimismo, otras especies de este género fueron encontradas sobre los otros sustratos ensayados (Fe, Zn y Cu) tanto en presencia como en ausencia de arsénico. Ya en 1966, se ha reportado la presencia de especies del género *Brevundimonas* en agua dulce y en ambientes marinos con bajos niveles de nutrientes (Stanier *et al.*, 1966). También puede notarse que el aislado **198-Cu**, obtenido de biopelículas formadas sobre cupones de Cu, se agrupa con *Sphingomonas* sp. XJ-3. El género *Sphingomonas*, el cual es capaz de sobrevivir a la cloración mediante la formación de agregados bacterianos (Gauthier *et al.*, 1999; Srinivasan *et al.*, 2008) es otro género perteneciente a la clase α -Proteobacteria frecuentemente aislado de sistemas de distribución de agua y que también ha sido asociado a la corrosión microbiológica del cobre (Arens *et al.*, 1995). Por su parte, Yu *et al.* (2010), a partir de la secuenciación de bandas de perfiles de DGGE, han encontrado las especies *Brevundimonas intermedia* cepa CIP106444 y *Sphingomonas phyllosphaerae* presentes sólo en biopelículas formadas sobre polibutileno (PB). El PB pertenece a la familia de poliolefinas de materiales termoplásticos que también incluyen al polietileno (PE) y al PP.

Otros organismos aislados e identificados durante este trabajo, pertenecientes a los géneros *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Delftia*, *Micrococcus* y *Sphingobium*, también han sido reportados en agua potable y/o biopelículas de sistemas de distribución (Critchley y Fallowfield, 2001; Critchley, 2004; Liu *et al.*, 2014).

3.2.3. Análisis molecular de comunidades planctónicas y sésiles.

Si bien se han propuesto algunos posibles mecanismos del efecto de la biopelícula sobre la corrosión, muchas de las investigaciones se han centrado en el comportamiento de la corrosión desde el punto de vista electroquímico, y menor importancia se ha atribuido al conocimiento de la fase microbiana del ambiente en el proceso de corrosión. Pocos estudios abordan la relación compleja entre la biopelícula, la composición del sustrato y las fases cristalinas de la corrosión (Teng *et al.*, 2008). De esta manera surge, entonces la pregunta de, qué rol cumplen los microorganismos en una biopelícula, y qué tipo de efecto generan sobre la corrosión de los materiales.

La aplicación de técnicas moleculares de ecología microbiana contribuiría, en parte, a construir respuestas a las preguntas anteriores. El estudio de la diversidad microbiana y la estructura de la comunidad en la biopelícula pueden revelar las especies dominantes que trabajan en la inhibición o la promoción de la corrosión. Una vez que las especies microbianas están relacionadas con los parámetros ambientales, se podría obtener una mejor comprensión de la reacción de corrosión desde el punto de vista de la fase microbiana.

En este trabajo se ha utilizado la técnica de PCR-DGGE para describir la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas planctónicas y sésiles presentes en los diferentes sistemas de ensayo. En el **Anexo III a)**, se encuentran las imágenes de todos los geles de DGGE realizados y analizados durante este trabajo de tesis.

En la **Figura 31** se muestran los perfiles de DGGE de la comunidad bacteriana original presente en el agua de red (tomada a tres tiempos diferentes) y los perfiles de las comunidades planctónicas al finalizar cada serie en ausencia y presencia de As(V). Los perfiles genéticos Pl.1, Pl.2 y Pl.3 en dicha figura, corresponden a muestras de agua tomadas directamente de la canilla, previo al llenado de los tanques, en tres *SERIES* distintas. Si bien no se hizo un análisis de similitud entre los perfiles, puede notarse a simple vista que son muy semejantes entre sí. Esto indicaría que el inóculo, es decir los microorganismos presentes en el agua con la que fueron llenados los tanques, a lo largo de todas las *SERIES* se

mantuvo prácticamente invariante. Teniendo en cuenta que ambos circuitos, a lo largo de todo el trabajo, se llenaron con la misma fuente de agua (ya que el As(V) fue adicionado posteriormente en uno de ellos), las mismas poblaciones estarían originalmente presentes en ambos circuitos. De este modo, las diferencias entre los perfiles genéticos de las comunidades de ambos circuitos al finalizar cada *SERIE* experimental indican que la comunidad original sufrió modificaciones tanto durante el tiempo de circulación del agua en el circuito, así como por la presencia de arsénico en uno de ellos. Es posible notar que se generan tanto cambios cualitativos (posición de las bandas) como cuantitativos (intensidad de las bandas) respecto de la comunidad microbiana original.

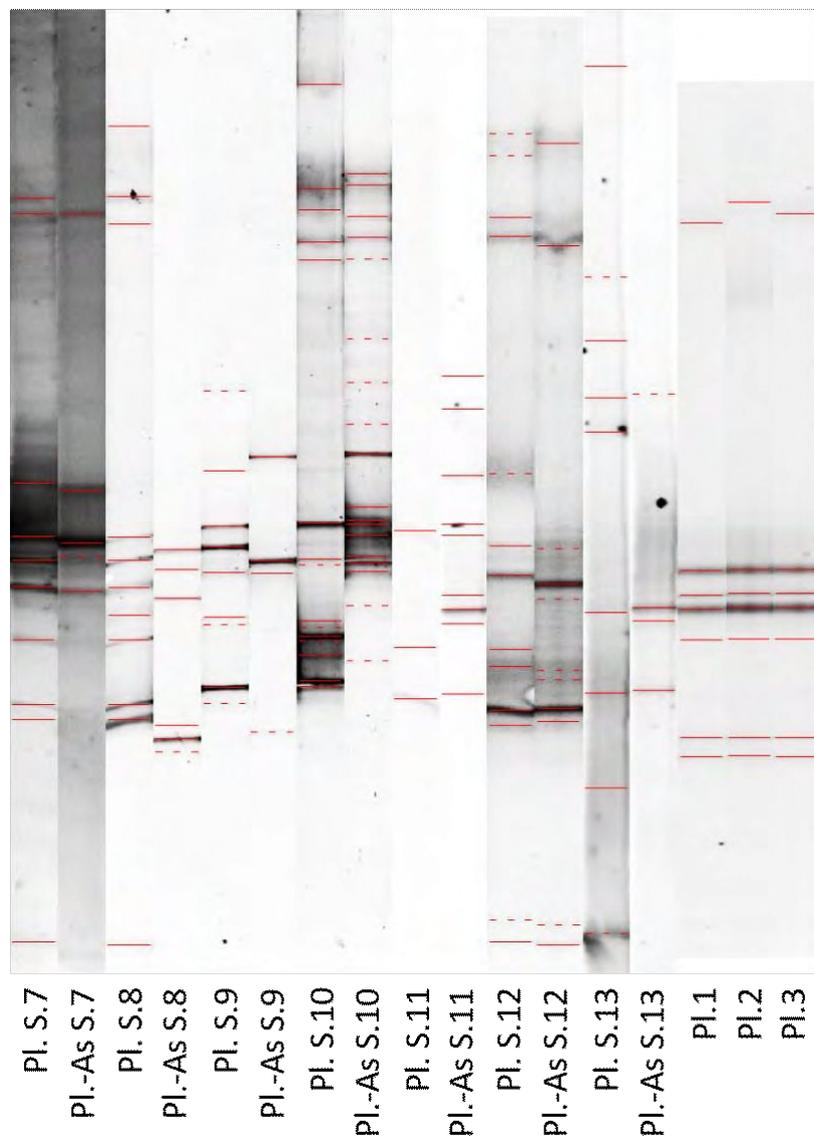


Figura 31. Perfiles de DGGE de las comunidades planctónicas del agua potable y de los circuitos en ausencia y en presencia de arsénico de diferentes series de ensayo. La S seguida del número, indica la *SERIE* a la que pertenece el perfil.

En la **Figura 32** se observan los perfiles de DGGE de las biopelículas desarrolladas en las diferentes condiciones de ensayo. Tanto los distintos sustratos como la presencia o no de As(V) muestran diferentes perfiles, denotando las diferentes comunidades sésiles establecidas. En la imagen es posible visualizar que existen algunas bandas presentes en la mayoría de las comunidades (indicadas con flechas verdes en la figura), es decir especies comunes o generalistas capaces de vivir y adherirse sobre los diferentes sustratos, así como en presencia o ausencia de arsénico. Asimismo, las diferentes intensidades de estas bandas podrían sugerir que algunas de las condiciones de ensayo son más favorables que otras permitiendo un mayor crecimiento de dichas especies. Se distinguen, también, bandas presentes sólo en una biopelícula en particular (indicadas con flechas violetas en la figura). Esto último podría indicar que son especies cuyo desarrollo se ve favorecido por una condición particular (sustrato o arsénico), o que en otras condiciones estarían en muy baja densidad poblacional (< 1%) y es por ello que no pueden ser detectadas a través de la técnica de DGGE (Muyzer *et al.*, 1993). Cabe mencionar que, en algunas *SERIES*, a pesar de haber prolongado el período de circulación, o de haber combinado el material biológico de un cupón extra, la biomasa obtenida no fue suficiente para lograr la extracción y/o amplificación del ADN total de la biopelícula en algunas de las condiciones ensayadas.

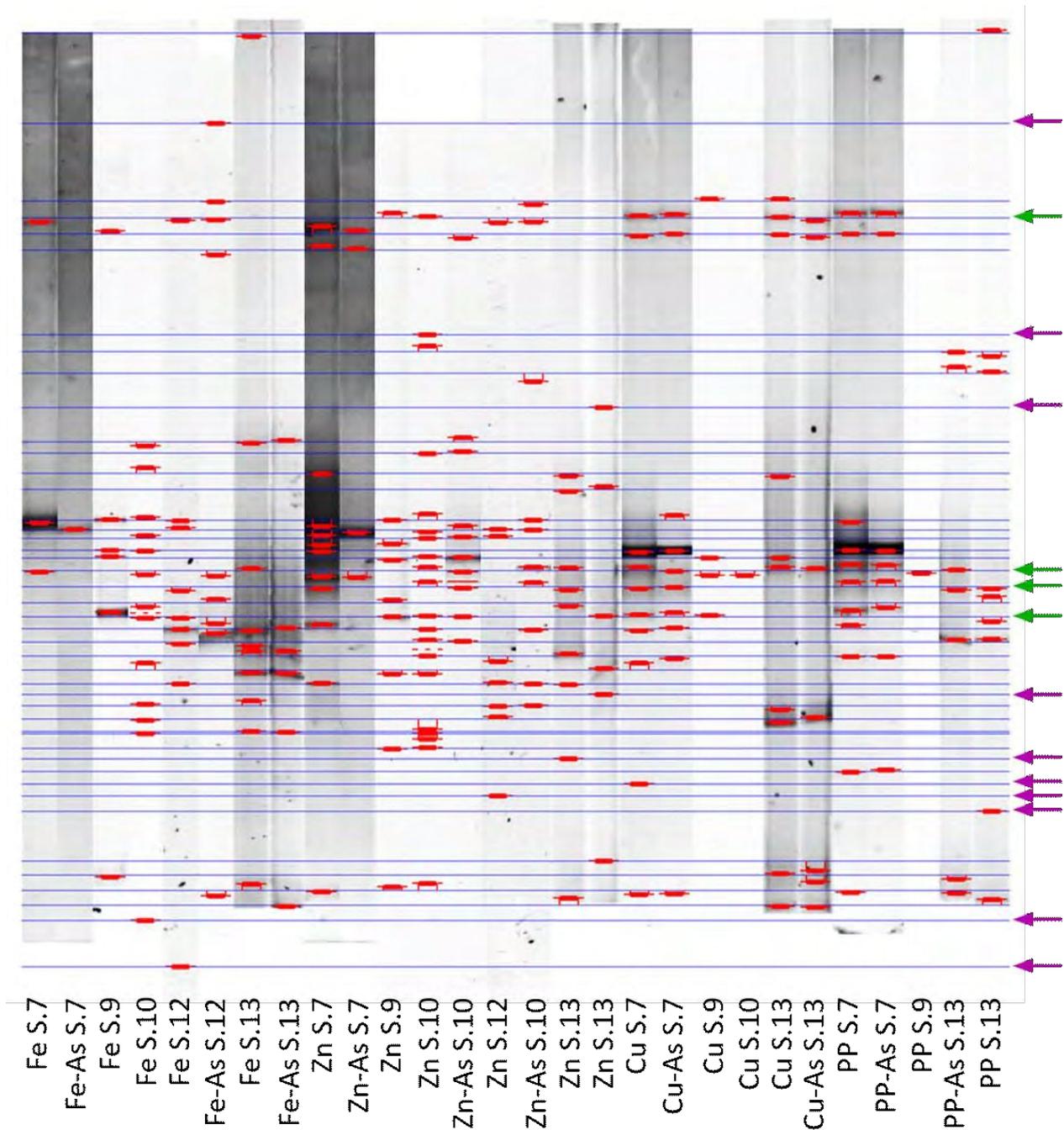


Figura 32. Perfiles de DGGE de biopelículas desarrolladas en diferentes condiciones de ensayo. Los perfiles fueron normalizados mediante el programa GelCompareII. Las marcas rojas señalan todas las bandas distinguibles; las flechas violetas señalan posiciones donde sólo se halló una única banda y las flechas verdes, posiciones con bandas presentes en la mayoría de las comunidades. En la parte inferior se indica: sustrato (Fe, Zn, Cu y PP), la presencia (o no) de As(V) y SERIE a la que pertenece el perfil.

El concepto de *diversidad específica* en ecología de comunidades ha sido durante años intensamente discutido por los especialistas. Este atributo se define como una propiedad emergente de las comunidades biológicas que se

relaciona con la variedad dentro de ellas. Es la expresión de dos componentes: la *riqueza de especies*, que es el número de especies presentes en la comunidad y la *equitabilidad*, que describe cómo se distribuye la abundancia (número de individuos, biomasa, cobertura, etc.) entre las especies que integran la comunidad.

Numerosos índices han sido propuestos para caracterizar la riqueza de especies y la equitabilidad, denominados *índices de riqueza* e *índices de equitabilidad*, respectivamente. Los índices que combinan tanto la riqueza de especies como la equitabilidad en un solo valor se denominan *índices de diversidad*. Una de las principales críticas a estos índices es que combinan y, por lo tanto, confunden un conjunto de variables que caracterizan a la estructura de la comunidad: (a) el número de especies (riqueza específica), (b) la abundancia relativa de las especies (equitabilidad), y (c) la homogeneidad y el tamaño del área muestreada. A pesar de estos debates en relación a su utilización debido a algunos problemas de tipo semántico, conceptual y técnico, los *índices de diversidad* continúan siendo aplicados al momento de caracterizar y/o comparar comunidades. Si bien estos conceptos e índices han surgido del estudio de comunidades macroscópicas, y a pesar de las críticas mencionadas, también se han utilizado y aplicado en estudios de ecología microbiana (Rasmussen y Sørensen, 2001; Li *et al.*, 2006; Swanson, 2007; Lin *et al.*, 2013). En este trabajo, como se mencionó en el Cap. 2, sección 2.2.3, se calcularon los siguientes índices: la **riqueza específica (S)**, el **índice de diversidad de Shannon-Weiner (H)** y el de **Simpson (D)**, tanto para el estudio de las comunidades planctónicas como para las biopelículas.

Para calcular **S** se tomó en cuenta el número de bandas en cada calle, como el número de especies o cepas bacterianas presentes en dicha comunidad. Para los índices de diversidad se tomó como abundancia relativa de cada especie la intensidad relativa de cada banda en la comunidad. Para ello, el perfil de bandas de DGGE de cada comunidad fue asociado a su curva densitométrica obtenida a lo largo del gradiente de desnaturalización del gel mediante el uso del software GelCompareII. En la **Figura 33** se muestra, a modo de ejemplo, un perfil de DGGE procesado y digitalizado para el posterior análisis y cálculo de los índices según Zhang y Fang, 2000. De la misma manera se procesaron los perfiles de todas las comunidades sésiles y planctónicas. En el **ANEXO III b)** se encuentra la totalidad de los perfiles analizados.

El **índice** de **Shannon-Wiener** (**H**) da como resultado un número positivo, es igual a 0 cuando la muestra contiene solo una especie (una banda) y alcanza el máximo valor cuando todas las especies (**S**) están representadas por el mismo número de individuos (misma intensidad de las bandas), lo que corresponde a una distribución de abundancias perfectamente equitativa. En la mayoría de los ecosistemas naturales **H** varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos y superiores a 3 son altos. El **índice** de **Simpson** (**D**) da un peso mayor a las especies abundantes subestimando las especies raras, tomando valores entre 0 (baja diversidad) hasta un máximo (**D_{máx}**) de $[1 - 1/S]$.

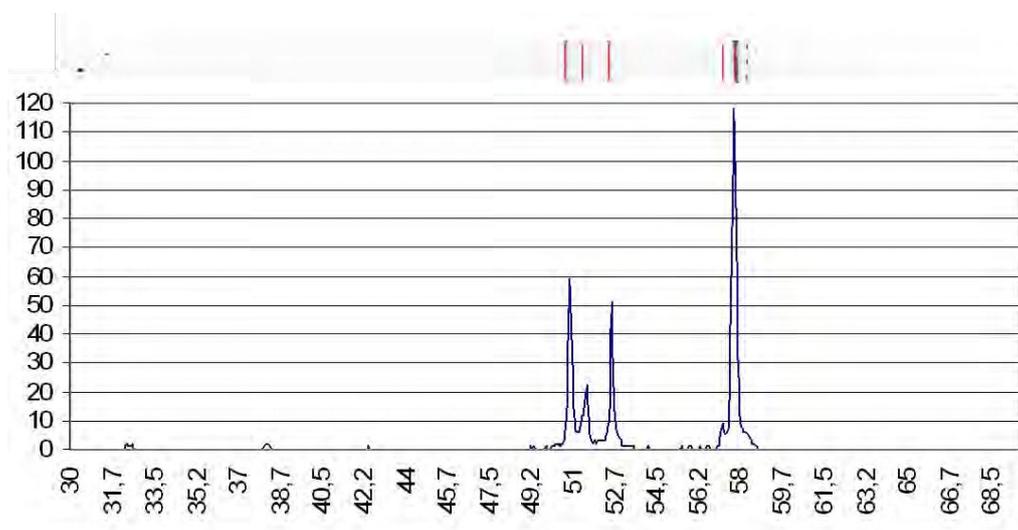


Figura 33. Perfil de DGGE de una comunidad planctónica (calle del gel de DGGE) asociado a su curva densitométrica para la obtención de la cantidad e intensidad de las bandas utilizadas en el cálculo de los índices ecológicos.

En función de lo expuesto y en base al número e intensidad de las bandas de los perfiles de DGGE de las comunidades planctónicas de cada *SERIE* en ausencia y presencia de arsénico, se calcularon los índices mencionados, cuyos resultados se resumen en la **Tabla 7**. En todas las *SERIES* (excepto en la 11), la comunidad planctónica obtenida del circuito sin As presenta índices **S**, **H** y **D** mayores que los de la comunidad original; por el contrario, los índices obtenidos para las comunidades planctónicas en presencia de As(V) fueron generalmente menores que la comunidad original. Estos datos concuerdan con estudios realizados para comparar el efecto de contaminantes (como metales pesados) o desinfectantes

(como cloro) sobre la estructura genética y diversidad de comunidades bacterianas (Li *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2013), en los que se ha observado una disminución de la diversidad genética como resultado de la exposición a un compuesto tóxico. Sin embargo, en suelo, se ha encontrado que la presencia de mercurio, por ejemplo, induce una disminución inicial en la diversidad genética, seguida de un aumento gradual de la misma, con la aparición de nuevas especies o grupos taxonómicos (bandas) dominantes, es decir que se produce una alteración de la estructura de la comunidad, reflejando una adaptación a una condición ambiental adversa (Rasmussen y Sørensen, 2001).

Tabla 7. Índices de riqueza y diversidad calculados para las comunidades planctónicas en ausencia y en presencia de $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de As(V) en el agua de circulación.

Comunidad	Riqueza (S)	Diversidad de Shannon-Weiner (H)	Diversidad de Simpson	
			(D)	D _{máx}
PI. S.7	10	2,917	0,84	0,90
PI.-As S.7	5	1,997	0,69	0,80
PI. S.8	11	3,06	0,85	0,90
PI-As S.8	6	2,07	0,71	0,83
PI. S.9	10	2,58	0,72	0,90
PI-As S.9	4	1,408	0,53	0,75
PI. S.10	17	3,646	0,90	0,94
PI.-As S.10	18	3,734	0,91	0,94
PI. S.11	3	1,402	0,57	0,66
PI.-As S.11	5	1,033	0,32	0,80
PI. S.12	13	3,318	0,87	0,92
PI.-As S.12	11	3,169	0,86	0,90
PI. S.13	9	2,805	0,81	0,88
PI.-As S.13	4	1,583	0,61	0,75
PI.1 (agua potable)	7	2,45	0,78	0,85
PI.2 (agua potable)	7	2,31	0,76	0,85
PI.3 (agua potable)	7	2,40	0,77	0,85

De la misma manera que para las comunidades planctónicas, para las biopelículas, se calcularon los valores de los índices **S**, **H** y **D**, los que se muestran

en la **Tabla 8**. Como puede apreciarse, la mayoría de la biopelículas presentó una diversidad **H** dentro de los valores más comúnmente reportados en estos sistemas, es decir entre 2 y 3. Sin embargo, tres biopelículas presentaron baja diversidad, **H**<2 y **D** significativamente menor que **D_{máx.}** (Fe S.7, Zn-As S.7 y Cu S.9); tres biopelículas presentaron una alta diversidad, **H**>3 y **D** muy cercano al **D_{máx.}** (Fe S.10, Zn S.7 y Cu S.13) y en tres biopelículas (Fe-As S.7, Cu S.10 y PP S.9) sólo se detectó una banda, es decir que **S** igual a 1 y por lo tanto ambos índices de diversidad resultaron igual a 0.

Tabla 8. Índices de riqueza y diversidad calculados para las biopelículas obtenidas en diferentes series de circulación.

Comunidad (BIOPELÍCULA)	Riqueza (S)	Diversidad de Shannon- Weiner (H)	Diversidad de Simpson	
			(D)	D _{máx.}
Fe S.7	3	0,804	0,28	0,66
Fe-As S.7	1	0	0	0
Fe S.9	6	2,087	0,69	0,83
Fe S.10	14	3,577	0,90	0,92
Fe S.12	9	2,741	0,806	0,88
Fe-As S.12	9	2,575	0,768	0,88
Fe S.13	9	2,951	0,853	0,88
Fe-As S.13	6	2,344	0,780	0,83
Zn S.7	12	3,535	0,911	0,91
Zn-As S.7	4	1,035	0,348	0,75
Zn S.9	9	2,729	0,816	0,88
Zn S.10	9	2,828	0,856	0,88
Zn-As S.10	11	2,927	0,822	0,90
Zn S.12	8	2,816	0,839	0,87
Zn-As S.12	10	2,794	0,786	0,90
Zn S.13	9	2,772	0,825	0,87
Zn-As S.13	6	2,473	0,809	0,83
Cu S.7	10	2,980	0,844	0,90
Cu-As S.7	10	2,528	0,717	0,90
Cu S.9	4	1,569	0,600	0,75
Cu S.10	1	0	0	0
Cu S.13	10	3,155	0,879	0,90
Cu-As S.13	7	2,726	0,840	0,85
PP S.7	11	2,941	0,818	0,90
PP-As S.7	8	2,210	0,680	0,87
PP S.9	1	0	0	0
PP S.13	9	2,609	0,787	0,88
PP-As S.13	7	2,447	0,795	0,85

En base a los perfiles de DGGE (**Figura 32**) y a los índices calculados (**Tabla 8**), se puede decir que, en la mayoría de las series, al igual que lo observado para

las comunidades planctónicas, la riqueza es mayor en las biopelículas desarrolladas sobre los materiales expuestos a la circulación de agua sin As(V). Por su parte, los valores de los recuentos en placa (Cap.3, sección 3.1.1) mostraron mayor número de microorganismos en las biopelículas formadas en presencia de As(V). Si bien es difícil correlacionar los resultados obtenidos por técnicas de microbiología clásica y molecular, en las biopelículas expuestas al As se encontró un mayor número de bacterias aunque distribuidas en un menor número de especies, esto refleja que existiría una selección de especies bacterianas que pueden vivir, y multiplicarse, en presencia de dicho compuesto tóxico. Esta tendencia se observó en la gran mayoría de las series donde se pudieron obtener los perfiles de DGGE tanto en ausencia como en presencia de As (Fe en S.7, S.12 y S.13, Zn en S.7 y S.10, Cu en S.7 y S.13, PP en S.7 y S.13). En estos casos, se obtuvo no sólo una disminución de la riqueza en presencia de dicho contaminante, sino también un cambio en la estructura de la comunidad reflejado en el número, la intensidad y la posición de las bandas (**Figura 32**). Resultados similares fueron reportados por Roeder *et al.* (2010), quienes analizaron la influencia de diversos desinfectantes (Cl₂, ClO₂, H₂O₂, O₃, Ag, entre otros) sobre la comunidad bacteriana en un sistema de distribución de agua potable y detectaron que tanto la riqueza como la similitud de la comunidad original se vieron afectadas por los tratamientos. Estos autores, han encontrado similitudes de alrededor de un 50 % entre perfiles genéticos de la comunidad antes y después de un tratamiento, y una riqueza igual o mayor, indicando que una gran cantidad de microorganismos de la biopelícula desaparecen luego de dicho tratamiento, pero son reemplazados por otros tantos, mejor adaptados a las nuevas condiciones. Asimismo, encontraron diferencias entre los perfiles e índices de las biopelículas con diferentes grados de madurez, factor que también podría estar influenciando la composición microbiana de las biopelículas aquí analizadas, ya que las *SERIES* presentan distintos tiempos de duración.

En cuanto al efecto del sustrato, incluyendo todas las series, en ausencia de As(V) la riqueza (**S**) y la diversidad (**H**) tuvieron el siguiente orden: Zn>Fe>PP>Cu y en presencia de As(V): Cu>Zn>PP>Fe. Cabe señalar que, en términos generales, los resultados de **H** son semejantes a los obtenidos por otros autores en estudios de formación y caracterización molecular de biopelículas sobre diferentes sustratos (Teng *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que cupones de PE soportaron un menor nivel de diversidad bacteriana que Fe y Zn, y

con bajos valores de recuento microbianos, lo que sugiere que es un material más adecuado para evitar la formación de biopelículas en los sistemas de distribución de agua potable, coincidiendo con estudios realizados por la técnica microbiología de cultivo tradicional, que demuestran que el material de base plástica soporta menos biomasa fija que los materiales metálicos (Kerr *et al.*, 1998; Niquette *et al.*, 2000). En particular, en este trabajo, como se mencionó, el Zn fue el material con la riqueza específica más alta en ausencia de arsénico (**S** promedio $\approx 9,5$) y la segunda más alta en su presencia (**S** promedio = 7,75). Asimismo, sobre este sustrato se obtuvieron los mayores recuentos microbianos en ambos sistemas (**Figuras 22 y 23** –Cap.3, sección 3.1.1-), por lo tanto, el Zn fue el sustrato más susceptible a la colonización microbiana, permitiendo el desarrollo de biopelículas con mayor cantidad y variedad (riqueza) de microorganismos. Por el contrario, para el Cu, en presencia de arsénico, se obtuvieron los índices **S** y **H** mayores (**S** promedio = 8,5; **H** promedio = 2,62), a pesar de los muy bajos recuentos obtenidos sobre este metal. Yu *et al.* (2010) trabajaron sobre sustratos metálicos (cobre, acero inoxidable, acero galvanizado) y plásticos (PVC, polibutileno y PE) y encontraron mayores índices **S** y **H** en las biopelículas formadas sobre los materiales plásticos habiendo detectado sobre esos materiales los menores valores de ATP (medido para estimar la concentración de biomasa activa de las biopelículas) y de recuentos de microorganismos. Por el contrario, Lin *et al.* (2013) hallaron valores menores de riqueza y diversidad de comunidades microbianas sobre sustratos plásticos que metálicos (PVC < acero inoxidable < hierro fundido).

Con el fin de visualizar las relaciones entre las comunidades, se realizó un análisis de similitud de los patrones de bandas obtenidos de DGGE mediante el programa GelCompareII. En la **Figura 34** se muestra el cladograma obtenido. En el **ANEXO III c) Figuras 1 y 2**, puede observarse este mismo cladograma identificado con diferentes colores que representan los diferentes sustratos ensayados y la presencia o ausencia de arsénico en el agua y las matrices de similitud obtenidas a partir de dichos cladogramas. Como puede notarse, es bastante difícil observar un patrón de agrupamiento por similitud de las comunidades, ya sea debido a los sustratos donde se desarrollaron las biopelículas, a la presencia del arsénico en el agua o en relación a su diversidad. Además, dado que no se pudo extraer y/o amplificar el ADN de todas las comunidades en todas las **SERIES** realizadas, esta comparación es aún más dificultosa.

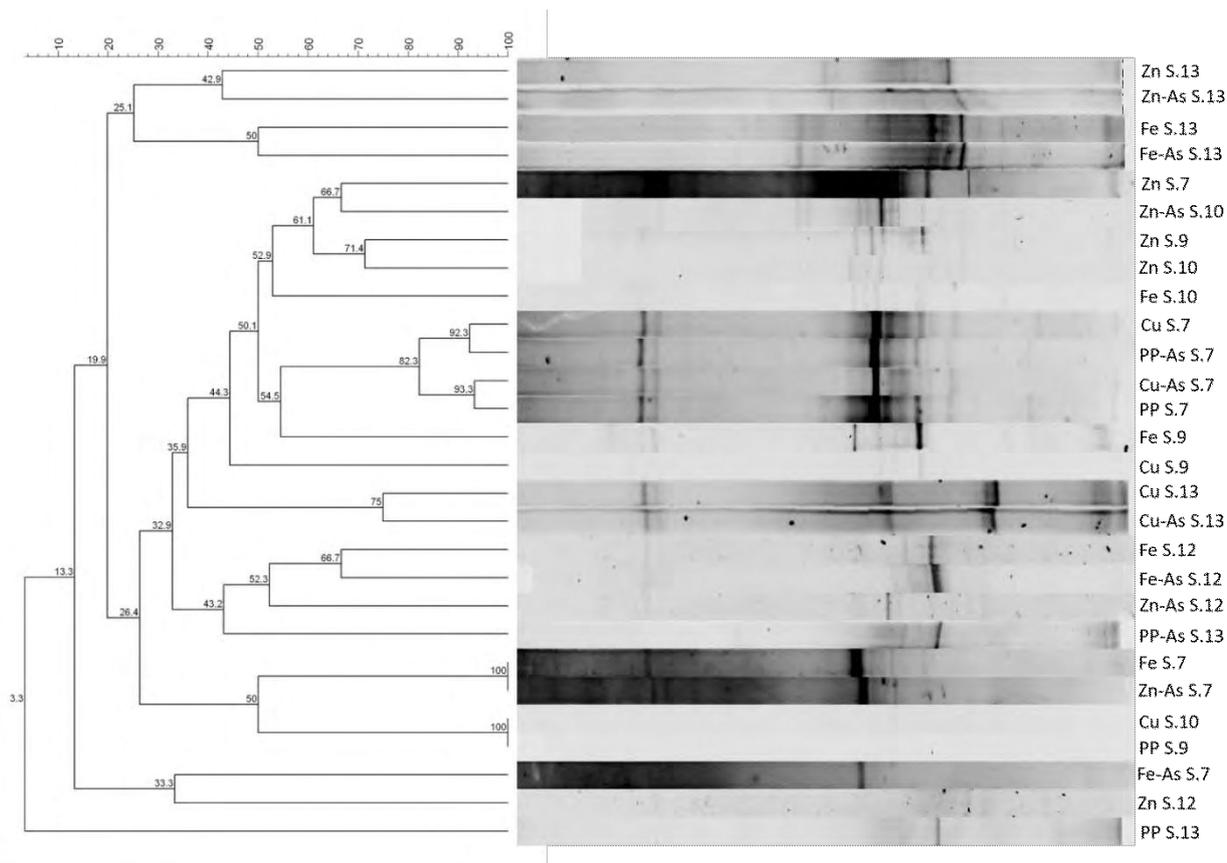


Figura 34. Análisis de similitud de los perfiles de DGGE que muestra las relaciones entre las biopelículas desarrolladas en las distintas condiciones de ensayo. (Coeficiente de Dice, UPGMA, 1% de tolerancia en la posición de las bandas).

A pesar de lo expuesto, en dos ocasiones (*SERIES 7 y 13*) se obtuvo el ADN de las biopelículas en todas las condiciones ensayadas. En la **Figura 35** se presentan los cladogramas resultantes de los análisis para dichas *SERIES*, en los que se incluyeron además, las respectivas comunidades planctónicas. El análisis de agrupamiento muestra una clara tendencia de las biopelículas desarrolladas sobre un determinado material a agruparse juntas, independientemente de la presencia de As en el agua (excepto las biopelículas de Zn/Zn-As la *SERIE 7*), alcanzando algunas de ellas una similitud del 100%: biopelículas formadas sobre Fe/Fe-As (*SERIE 7*), sobre PP/PP-As y sobre Cu/Cu-As (*SERIE 13*). Asimismo, en general, se observó una mayor similitud entre las comunidades establecidas en los materiales menos susceptibles a la colonización bacteriana (PP y Cu). Estos resultados sugieren que la naturaleza de los sustratos es un factor más importante para el establecimiento de la comunidad sésil que la presencia de As. La influencia que los materiales ejercen sobre la adhesión bacteriana, la formación de biopelículas y la composición de las mismas (riqueza, diversidad) está asociada a características

tales como la estructura superficial y la composición química de dichos materiales (Waines *et al.*, 2011). Algunos autores plantean que inicialmente, la adhesión a una superficie es un proceso influenciado por diversas propiedades fisicoquímicas tanto del sustrato como de los microorganismos y luego, las bacterias más fuertemente adheridas pueden desempeñar un papel determinante en el posterior desarrollo y proliferación de la biopelícula (Simoes *et al.*, 2007). La rugosidad de la superficie es uno de los factores que más afecta la adhesión bacteriana. Diversos autores (Yu *et al.*, 2010; Chowdhury, 2012), han determinado que el crecimiento de la biopelícula en tuberías fabricadas con materiales superficiales rugosos, como el hierro fundido y el acero galvanizado, fue mayor que el de una tubería de PVC de superficie lisa. Respecto de la composición química, la liberación de iones de fósforo y compuestos orgánicos por parte de los plásticos (Lethola *et al.*, 2004), así como los iones metálicos producidos por las aleaciones metálicas afectan la adherencia y estructura de la comunidad bacteriana (Yu *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013).

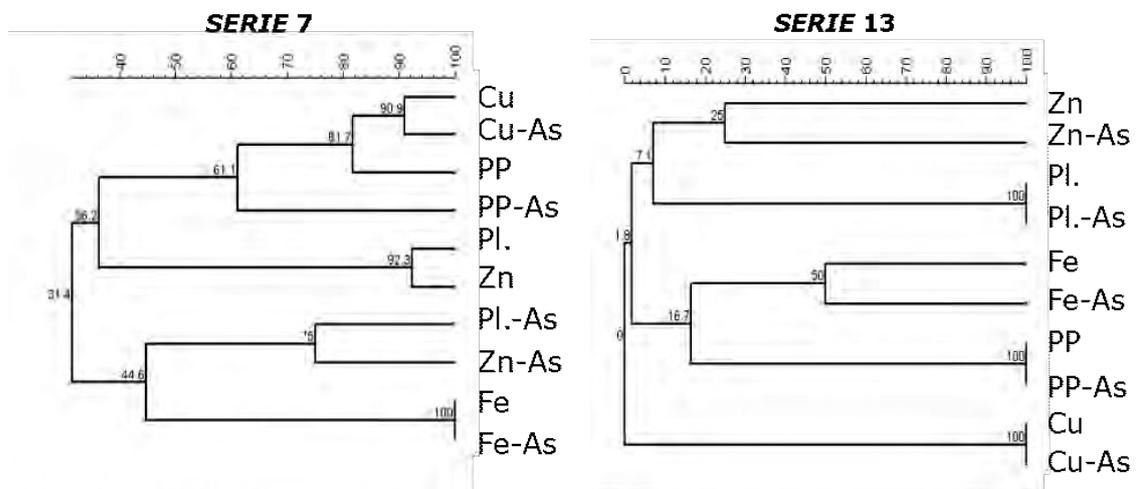


Figura 35. Análisis de similitud entre las biopelículas obtenidas en las dos SERIES donde se pudieron comparar todas las condiciones ensayadas (Coeficiente de Dice, UPGMA, 1% de tolerancia en la posición de las bandas).

3.2.4. Tolerancia y resistencia al arsénico de bacterias heterótrofas aisladas y comunidades

3.2.4.1. Análisis de comunidades sésiles y planctónicas cultivadas en medio líquido con distintas concentraciones de As(V)

Para detectar la presencia de microorganismos tolerantes al As(V), tanto en la comunidad planctónica como en las biopelículas, se realizaron diluciones seriadas de las muestras en caldo nutritivo con diferentes concentraciones de As(V). En la **Tabla 9** se muestran los resultados obtenidos de dichos cultivos. Como puede verse, tanto las comunidades planctónicas, como las biopelículas provenientes de Fe, Zn y PP fueron capaces de crecer hasta en presencia de 1000 mg.L⁻¹ de As(V), mientras que las biopelículas provenientes de cupones de Cu toleraron solo hasta 300 mg.L⁻¹ de As(V). Asimismo, es posible apreciar que, en la mayoría de los casos, disminuye el número de microorganismos en presencia de las concentraciones de arsénico más elevadas (500 y 1000 mg.L⁻¹). Además, en estas concentraciones, los recuentos de muestras provenientes del circuito con arsénico fueron un orden de magnitud mayor que las provenientes del circuito sin arsénico. Esto podría deberse a una selección o adaptación previa de los microorganismos a la presencia de dicho contaminante en el circuito.

Tabla 9. Recuentos en cultivos líquidos (caldo nutritivo) de las comunidades en diferentes concentraciones de As(V). (Valores en microorganismos.mL⁻¹). S/d: sin datos

[As] mg.L ⁻¹	50	100	200	300	500	1000
Sustrato						
Fe	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ³ - 10 ⁴	10 ⁴ - 10 ⁵			
Zn	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ³ - 10 ⁴			
Cu	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	0	0
PP	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	S/d	S/d
Pl.	S/d	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ⁴ - 10 ⁵
Fe-As	10 ⁵ - 10 ⁶					
Zn-As	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵				
Cu-As	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	0	0
PP-As	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ² - 10 ³	10 ² - 10 ³
Pl.-As	S/d	10 ⁵ - 10 ⁶				

Al finalizar el período de incubación de los cultivos seriados con las diferentes concentraciones de arsénico, se realizó la extracción de ADN y amplificación por

PCR-DGGE de la primera dilución de los mismos. En las **Figuras 36-39** se observan los perfiles de DGGE de las biopelículas cultivadas en las diferentes concentraciones de As(V) obtenidas para los cuatro sustratos ensayados. Cabe señalar que, excepto para las biopelículas provenientes de PP-As cultivadas en 500 y 1000 mg.L⁻¹, se obtuvo ADN de todas las comunidades luego de su cultivo en las diferentes concentraciones de arsénico aun cuando no se pudo hallar ADN de la comunidad original. Esto podría deberse a que, a pesar de las altas concentraciones de este compuesto, las comunidades son cultivadas en un medio enriquecido, aumentando la concentración de ADN en la muestra permitiendo su amplificación y por lo tanto la obtención de su perfil genético en la DGGE. Con la misma metodología con la que se analizaron las comunidades planctónicas y sésiles obtenidas de los cupones (Cap.3 - sec. 3.1.3-), se analizó la cantidad e intensidad de bandas de cada perfil para calcular los índices de riqueza y diversidad de las comunidades tolerantes provenientes de las biopelículas formadas sobre los distintos materiales (**Tablas 10-13**)

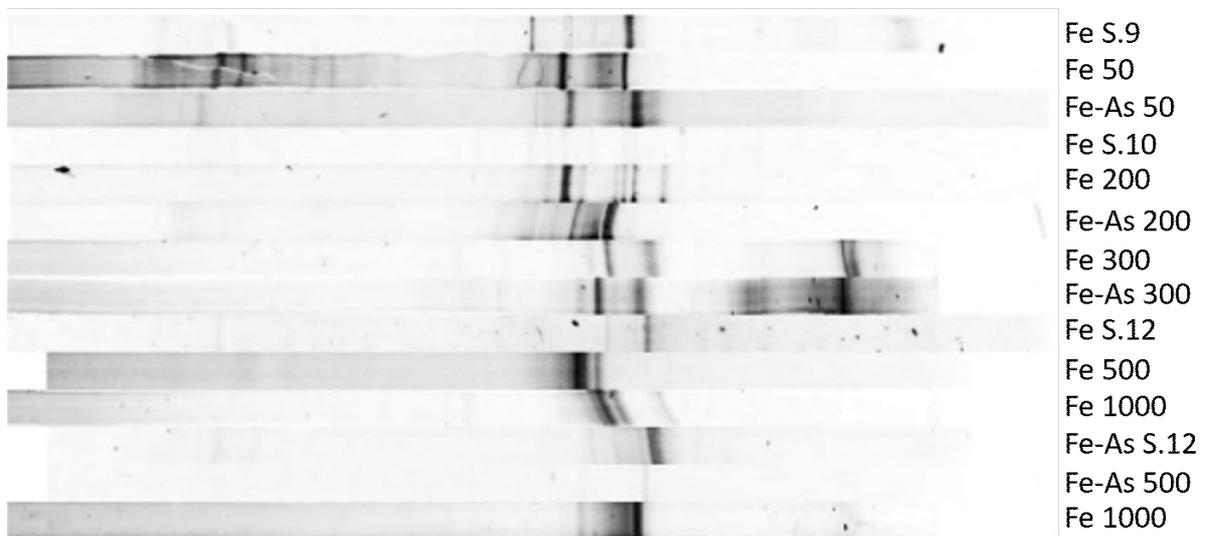


Figura 36. Perfiles de DGGE de las comunidades provenientes de cupones de Fe tolerantes a diferentes concentraciones de As(V) y la biopelícula original.

Tabla 10. Índices de riqueza y diversidad de las biopelículas formadas sobre Fe, cultivadas en diferentes concentraciones de arsénico.

Comunidad	Riqueza (S)	Diversidad de Shannon-Weiner (H)	Diversidad de Simpson	
			(D)	D _{máx}
Fe 50 mg.L ⁻¹	13	3,10	0,85	0,92
Fe 200 mg.L ⁻¹	8	2,72	0,81	0,87
Fe 300 mg.L ⁻¹	5	2,25	0,78	0,80
Fe 500 mg.L ⁻¹	2	0,91	0,43	0,50
Fe 1000 mg.L ⁻¹	5	2,05	0,73	0,80
Fe-As 50 mg.L ⁻¹	5	1,95	0,69	0,80
Fe-As 200 mg.L ⁻¹	11	3,11	0,86	0,90
Fe-As 300 mg.L ⁻¹	7	2,61	0,82	0,85
Fe-As 500 mg.L ⁻¹	2	0,68	0,29	0,50
Fe-As 1000 mg.L ⁻¹	3	1,44	0,60	0,66

Los valores calculados para los índices (**Tabla 10**) muestran que, en general, existe una disminución de la riqueza (**S**) y la diversidad (**H**) de las comunidades cultivables provenientes de cupones de Fe (expuestos en ambos circuitos) a medida que aumenta la concentración de arsénico en el medio de cultivo. Si bien los recuentos de microorganismos en estos cultivos (**Tabla 9**) dieron valores semejantes a los obtenidos para las bacterias heterótrofas totales (**Figura 23**, Cap.3 -sec. 3.1.1), en general la riqueza fue menor que la calculada para la comunidad original total (**Tabla 8**, Cap.3 -sec. 3.1.3-).

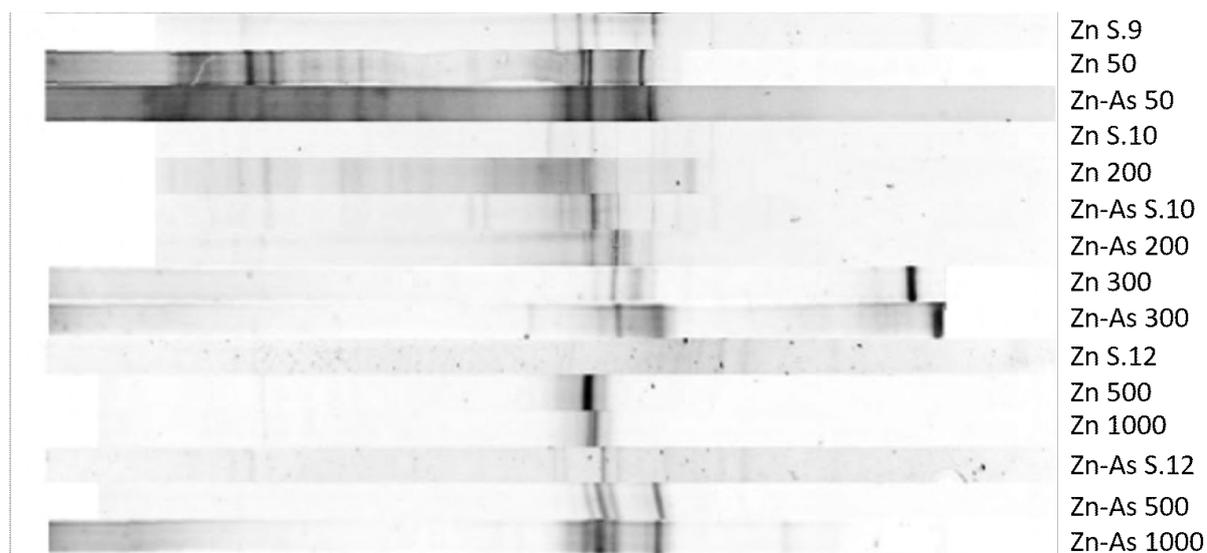


Figura 37. Perfiles de DGGE de las comunidades provenientes de cupones de Zn tolerantes a diferentes concentraciones de As(V) y la comunidad original.

Tabla 11. Índices de riqueza y diversidad de las biopelículas formadas sobre Zn, cultivadas en diferentes concentraciones de arsénico.

Comunidad	Riqueza (S)	Diversidad de Shannon-Weiner (H)	Diversidad de Simpson (D)	D _{máx}
Zn 50 mg.L ⁻¹	11	3,22	0,88	0,90
Zn 200 mg.L ⁻¹	24	4,24	0,93	0,95
Zn 300 mg.L ⁻¹	7	2,12	0,69	0,85
Zn 500 mg.L ⁻¹	2	0,29	0,10	0,50
Zn 1000 mg.L ⁻¹	2	0,41	0,15	0,50
Zn-As 50 mg.L ⁻¹	20	3,68	0,89	0,95
Zn-As 200 mg.L ⁻¹	8	2,49	0,77	0,87
Zn-As 300 mg.L ⁻¹	9	2,77	0,81	0,88
Zn-As 500 mg.L ⁻¹	7	2,25	0,76	0,85
Zn-As 1000 mg.L ⁻¹	8	2,60	0,82	0,87

Para el caso del Zn, se encuentra una tendencia similar a la encontrada en las comunidades desarrolladas sobre Fe. En general, existe una disminución de la riqueza y la diversidad de las comunidades cultivables provenientes de ambos circuitos, a medida que aumenta la concentración de arsénico en el medio de cultivo (**Tabla 11**). Si bien algunos autores no han detectado inhibición en la respiración o disminución de la biomasa microbiana en presencia de As(V) (Speir *et al.*, 1999), diversos estudios han reportado que el estrés debido a la presencia de un contaminante (o un biocida) disminuyen la diversidad de una comunidad y la actividad de los microorganismos (Turpeinen *et al.*, 2004; Roeder *et al.*, 2010). Asimismo, se ha demostrado, tanto a partir de técnicas de microbiología clásica (recuentos en placa) como molecular (PCR y secuenciación del gen 16S ARNr) que el As(V) en el suelo estimula la proliferación de ciertos grupos de microorganismos generando un cambio filogenético en la estructura de la comunidad, quedando ésta reducida a unas pocas especies tolerantes (Maliszewska *et al.*, 1985; Valverde *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo, podrían denotar una selección y desarrollo de microorganismos tolerantes en la comunidad, principalmente en las concentraciones más elevadas de arsénico en el medio de cultivo (500 y 1000 mg.L⁻¹), donde se observa una menor cantidad de bandas, pero de mayor intensidad que en el perfil de la comunidad original (**Figura 37**). Cabe señalar, asimismo, que estas diferencias fueron menores en la comunidad proveniente del circuito con As, lo que indicaría la existencia de poblaciones bacterianas previamente adaptadas a la presencia de este elemento.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el Cu (**Figura 38, Tabla 12**) y el PP (**Figura 39, Tabla 13**). Las comunidades tolerantes obtenidas de cupones de estos sustratos mostraron, en general, una disminución de la riqueza al aumentar la concentración de arsénico. Sin embargo, es muy difícil llegar a un resultado concluyente ya que no fue posible obtener el perfil genético de la biopelícula original en todas las *SERIES* y por consiguiente, no se pudo analizar el efecto que el contaminante ejerce sobre *S* y *H* de las comunidades cultivadas en las diferentes concentraciones de arsénico.



Figura 38. Perfiles de DGGE de las comunidades provenientes de cupones de Cu tolerantes a diferentes concentraciones de As(V) y su comunidad original.

Tabla 12. Índices de riqueza y diversidad de las biopelículas formadas sobre Cu, cultivadas en diferentes concentraciones de arsénico.

Comunidad	Riqueza (S)	Diversidad de Shannon-Weiner (H)	Diversidad de Simpson (D)	D _{máx}
Cu 50 mg.L ⁻¹	8	2,77	0,83	0,87
Cu 200 mg.L ⁻¹	13	3,36	0,88	0,92
Cu 300 mg.L ⁻¹	4	1,45	0,54	0,75
Cu-As 50 mg.L ⁻¹	11	2,97	0,84	0,90
Cu-As 200 mg.L ⁻¹	12	3,28	0,88	0,91
Cu-As 300mg.L ⁻¹	8	2,22	0,70	0,87



Figura 39. Perfiles de DGGE de las comunidades provenientes de cupones de PP tolerantes a diferentes concentraciones de As(V) y su comunidad original.

Tabla 13. Índices de riqueza y diversidad de las biopelículas formadas sobre PP, cultivadas en diferentes concentraciones de arsénico.

Comunidad	Riqueza (S)	Diversidad de Shannon-Weiner (H)	Diversidad de Simpson (D)	D _{máx}
PP 50 mg.L ⁻¹	16	3,72	0,91	0,93
PP 200 mg.L ⁻¹	6	2,10	0,69	0,83
PP 300 mg.L ⁻¹	4	1,68	0,65	0,75
PP-As 50 mg.L ⁻¹	6	2,09	0,71	0,83
PP-As 200 mg.L ⁻¹	7	2,00	0,67	0,85
PP-As 300 mg.L ⁻¹	5	1,86	0,66	0,80

Los perfiles de DGGE observados en las **Figuras 36-39** fueron procesados mediante el programa GelCompareII, para realizar el análisis filogenético. En la **Figura 40** se muestra el cladograma que representa las relaciones de similitud entre las comunidades originales y las comunidades cultivadas en las distintas concentraciones de As(V). El análisis de esta figura es muy complejo, ya que cada una de las unidades taxonómicas (que representa el perfil genético de cada comunidad) con las que se construye el cladograma está influenciada por una gran cantidad de variables independientes (*SERIE*, circuito, sustrato, concentración de arsénico en el cultivo). Sin embargo, de manera similar al resultado observado para las biopelículas (**Figura 34**), pueden notarse aquí también, agrupamientos por un lado de los materiales más colonizados (Fe y Zn) y por otro de los menos susceptibles a la colonización (Cu y PP).

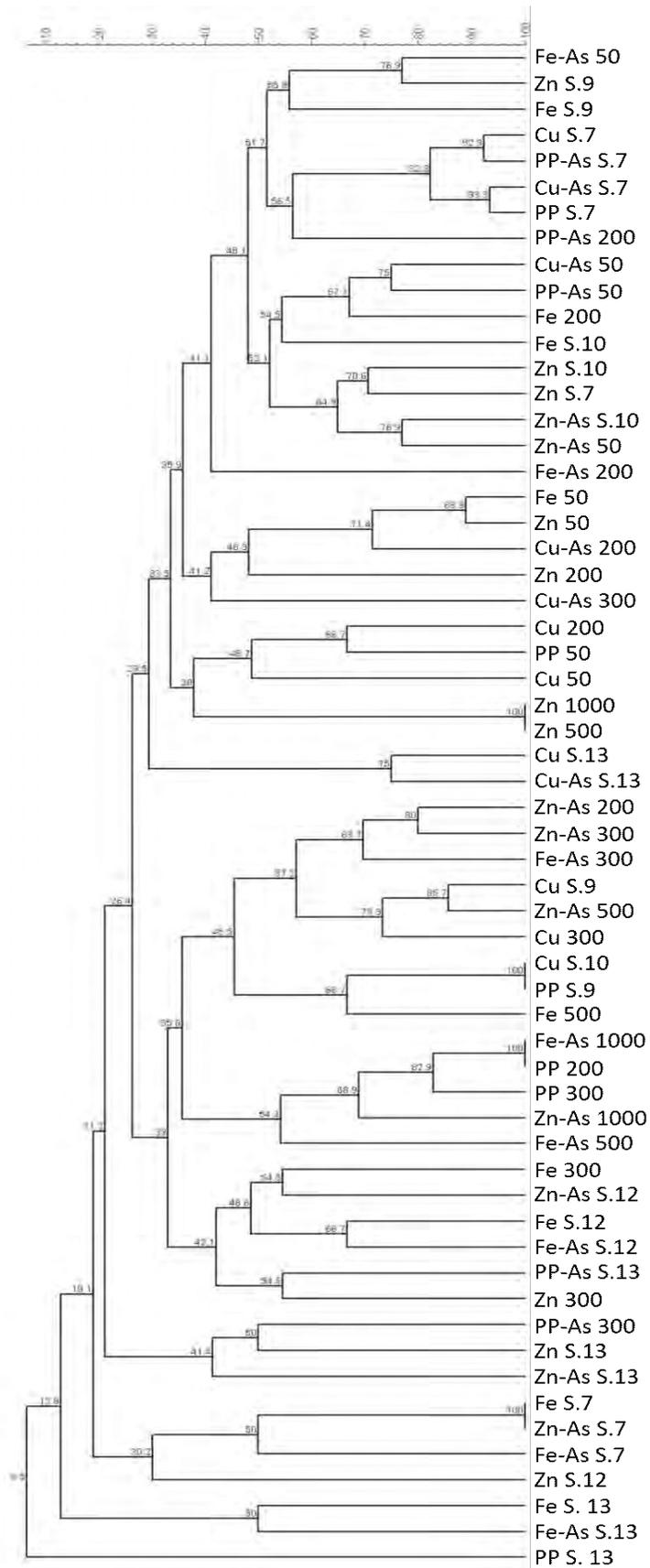


Figura 40. Análisis de agrupamiento filogenético de biopelículas originales y tolerantes cultivadas en distintas concentraciones de As(V). (Coeficiente de Dice, UPGMA, 1% de tolerancia en la posición de las bandas).

3.2.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Como se detalló en el Cap.2 (sec.2.4.2.), se realizaron dos ensayos de CMI, con diferentes cepas bacterianas aisladas de distintas series, sustratos y sistemas de circulación. En las **Figuras 41** y **42** se muestran los resultados correspondientes a la DO₆₀₀ inicial (T₀) y luego de 24 h de incubación. Para evaluar si el arsénico ejerció un efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano, se realizó una comparación estadística entre los promedios obtenidos en cada concentración de arsénico y el promedio del crecimiento de la cepa en el medio de cultivo sin arsénico (control).

El primer ensayo, denominado "CMI A" (**Figura 41**), se realizó con seis cepas bacterianas aisladas del circuito con arsénico y de la misma serie, empleando concentraciones más bajas de arsénico y con un aumento de la concentración más gradual. En este ensayo, los resultados estadísticos indicaron que la cepa **83 Cu-As** resultó ser la más sensible, disminuyendo significativamente su crecimiento en todas las concentraciones de As(V) ensayadas (10-500 mg.L⁻¹). Las cepas **90 PP-As** (*Bacillus* sp.) y **91 PP-As** (*Delftia* sp.), disminuyeron significativamente su crecimiento a partir de una concentración de 150 mg.L⁻¹ de As(V) en adelante, siendo tolerantes a menores concentraciones; y la cepa **92 PP-As** mostró un decrecimiento significativo a las concentraciones más elevadas (250 y 500 mg.L⁻¹ de As(V)). La cepa **82 Cu-As**, resultó ser tolerante a todas las concentraciones de arsénico ensayadas, sin disminuir significativamente su crecimiento. Cabe señalar que para la cepa 85 PP-As no se obtuvieron datos de la DO correspondiente al crecimiento control (T₂₄), por lo tanto no se realizó la comparación estadística, sin embargo puede notarse su crecimiento en todas las concentraciones, lo que indicaría que no hay una inhibición total del mismo en ninguna de las concentraciones ensayadas (**Figura 41**, barras verdes).

En el segundo ensayo, denominado "CMI B" (**Figura 42**), se evaluó un mayor número de cepas bacterianas (11), procedentes de los diferentes sustratos, expuestos tanto en ausencia como presencia de arsénico en el circuito. Además, dados los resultados obtenidos en la CMI "A", se partió de concentraciones mayores de arsénico, llegando a una concentración máxima de 1000 mg.L⁻¹ de arsénico en el medio de cultivo.

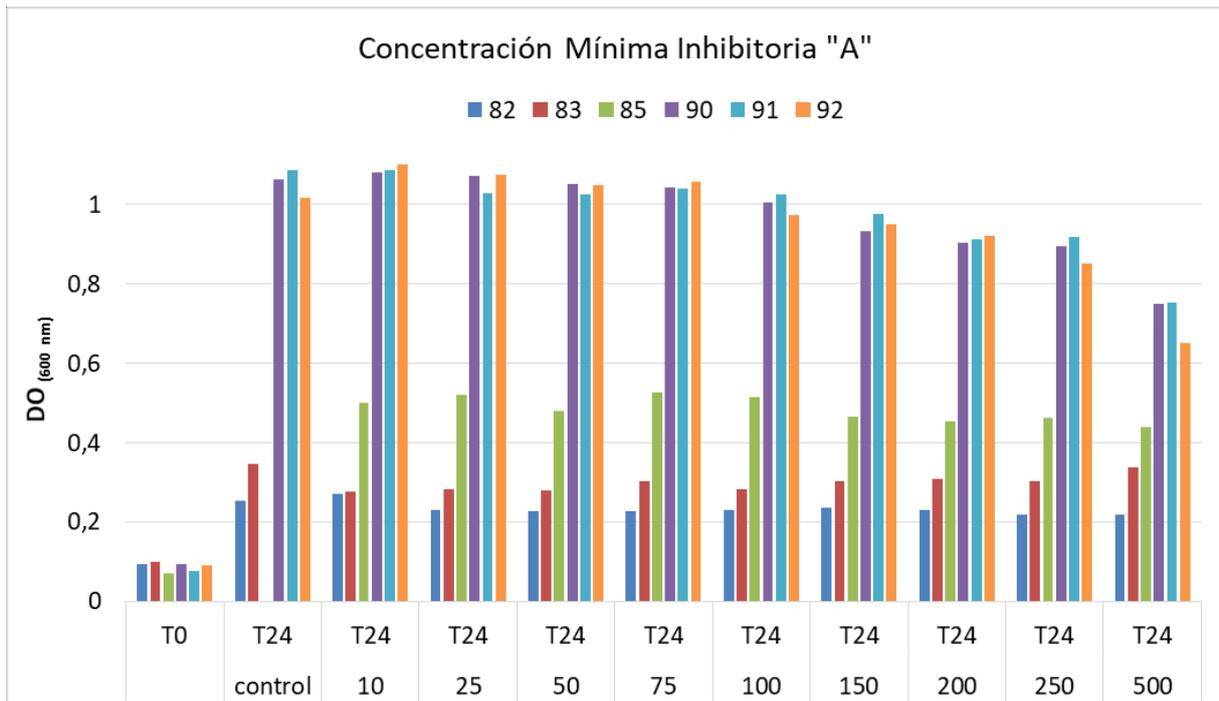


Figura 41. Ensayo "CMI A" realizado con diferentes cepas bacterianas (identificadas con los distintos colores) cultivadas en diferentes concentraciones de arsénico. Sobre el eje Y se muestran los valores de la DO a 600 nm correspondientes al crecimiento bacteriano al tiempo inicial (T₀) y a 24h (T₂₄) para todas las cepas bacterianas cultivadas en caldo nutritivo sin As(V) (control) y con concentraciones crecientes de As(V) (en mg.L⁻¹).

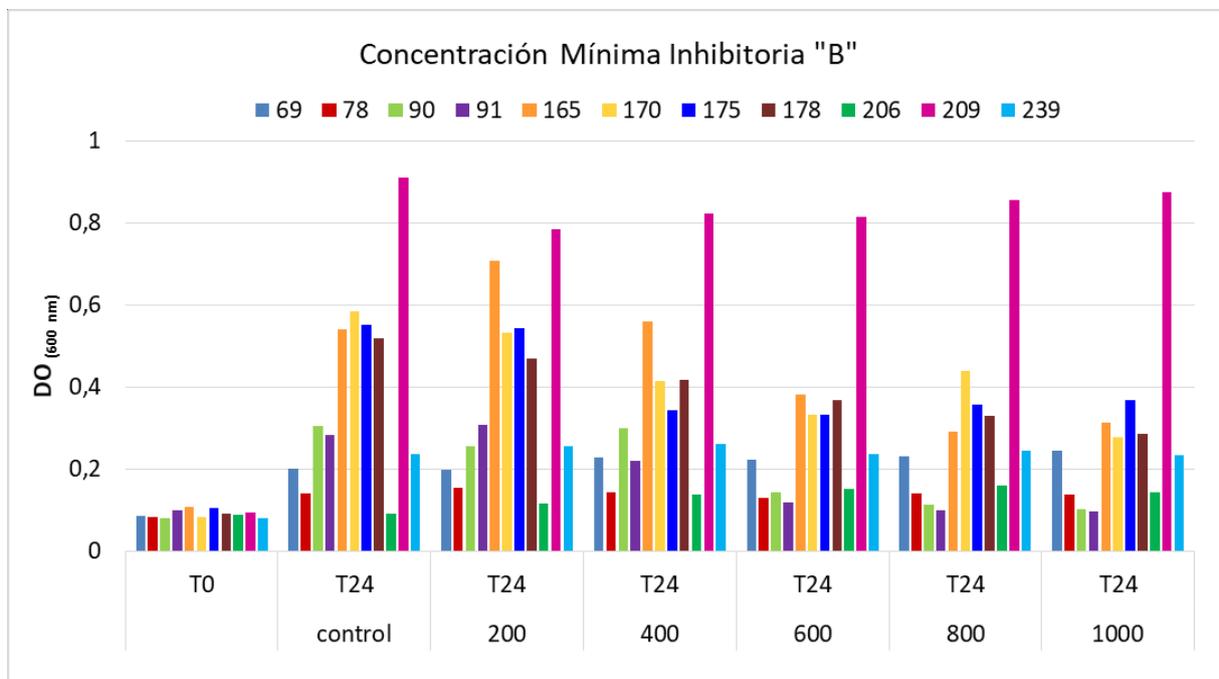


Figura 42. Ensayo "CMI B" realizado con diferentes cepas bacterianas (identificadas con los distintos colores) cultivadas en diferentes concentraciones de arsénico. Sobre el eje Y se muestran los valores de la DO a 600 nm correspondientes al crecimiento bacteriano al tiempo inicial (T₀) y a 24h (T₂₄) para todas las cepas bacterianas cultivadas en caldo nutritivo sin As(V) (control) y con concentraciones crecientes de As(V) (en mg.L⁻¹).

Cabe señalar que, para la cepa **206 Fe-As**, no se pudo realizar la comparación debido a que no creció el control de la cepa (**Figura 42**, barras verde más oscuro). La cepa **91 PP-As** tiene un 99% de similitud con *Delftia* sp. TS33, la cual es una cepa aislada de un suelo altamente contaminado con arsénico y reportada como resistente al arsenito (CMI: 18 mM arsenito As(III)) (Cai *et al.*, 2009), sin embargo, en este ensayo resultó ser la cepa más sensible, disminuyendo significativamente su crecimiento en casi todas las concentraciones de As (400-1000 mg.L⁻¹). Siguen en orden de sensibilidad las cepas **90 PP-As** (*Bacillus* sp.) y **165 PP** (*Bacillus cereus*) que mostraron una disminución significativa de su crecimiento en concentraciones de 600, 800 y 1000 mg.L⁻¹ de As. Las cepas **170 Cu** (*Bacillus megaterium*) y **178 Fe-As** (*Paenibacillus* sp.) llegaron a tener mayor tolerancia, disminuyendo significativamente su crecimiento recién a 800 y 1000 mg.L⁻¹ de As(V). Las cepas **69 Cu-As** (*Kokuria* sp.), **78 Fe-As** (*Bacillus licheniformis*), **175 Zn** (*Acinetobacter lwoffii*), **209 Zn-As** (*Delftia* sp.) y **239 Zn-As** (*Brevundimonas* sp.) resultaron las cepas más tolerantes, ya que sus crecimientos no se vieron afectados aun en la mayor concentración de As(V) en el medio de cultivo (1000 mg.L⁻¹). Estos resultados concuerdan con estudios que han encontrado diversas cepas del género *Bacillus* (incluida *B. licheniformis*, entre otras) capaces de resistir elevadas concentraciones de arsénico (Anderson y Cook, 2004). Asimismo, Dey *et al.* (2016) han aislado cepas de *Bacillus*, provenientes de biopelículas, capaces de aumentar su crecimiento a medida que aumenta la concentración de arsénico. Este género, también ha sido reportado como hipertolerante (Zelibor *et al.*, 1987) llegando a crecer en concentraciones de hasta 400 mM de arseniato de sodio (30 g.L⁻¹ de As(V)) (Joshi *et al.*, 2009). La especie *A. lwoffii* CI-01 se ha reportado en la bibliografía como una cepa aislada de agua subterránea contaminada con As y en ensayos de laboratorio fue capaz de tolerar hasta 750 mg.L⁻¹ de As(III) y de remover hasta casi un 65 % de arsénico del medio luego de 72 h de incubación (Hamzah *et al.*, 2013). Asimismo, otras especies y/o cepas del género *Acinetobacter* han sido reportadas desde hace muchos años, como abundantes en sitios con elevadas concentraciones de As(V), As(III) así como también de diversos metales demostrando, por lo tanto, una alta resistencia a estos contaminantes (Deshpande *et al.*, 1993; Turpeinen *et al.*, 2004); incluso su aparición ha sido identificada como el principal cambio en la estructura de una comunidad tratada con metales, ya que no fue detectada en la comunidad control (Macnaughton *et al.*, 1999). También las

especies *Kokuria* sp. TS13 y *Delftia* sp. TS33 se corresponden con especies aisladas de suelos altamente contaminados con arsénico (Cai *et al.*, 2009).

Con el objeto de corroborar si el arsénico ejerció un efecto bactericida o bacteriostático, los cultivos que demostraron disminución significativa de su crecimiento se transfirieron a tubos con caldo LB fresco. Luego de su incubación se observó crecimiento positivo (turbidez) en todos los tubos, denotando que este contaminante ejerció un efecto bacteriostático y no bactericida, lo que podría atribuirse a la presencia de algún mecanismo de resistencia en estas cepas.

3.2.4.3. Búsqueda del gen *arsC* en microorganismos aislados y biopelículas.

Como se ha mencionado en la Introducción, los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia. Uno de ellos, implica la presencia del gen *arsC* asociado al operón "*ars*" (Drewniak *et al.*, 2008). En este trabajo se orientó la búsqueda del gen *arsC* utilizando diferentes pares de cebadores. Uno de ellos, denominado "*arsC*-gram(+)", fue diseñado a partir del gen *arsC* presente en *Bacillus subtilis* y permite amplificar dicho gen presente en microorganismos gram-positivos pertenecientes a los phyla Firmicutes y Actinobacteria (Macur *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2005). Otro par de cebadores, denominado "*arsC*-Pseud" está basado en el gen *arsC* presente en *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida* y permite amplificar el gen presente en diferentes grupos de bacterias gram-negativas (Macur *et al.*, 2004). Los otros dos pares de cebadores, denominados "*arsC*-amlt" y "*arsC*-smrc", constan de 350 pb y fueron diseñados a partir de múltiples secuencias de genes *arsC* pertenecientes a una gran variedad de bacterias resistentes al arsénico (Sun *et al.*, 2004). Todos estos pares de cebadores se utilizaron para la búsqueda del gen de resistencia al As, tanto a nivel de comunidad como para algunas de las cepas bacterianas aisladas. En las **Figuras 43 y 44** pueden observarse los geles de agarosa sembrados con los productos de PCR obtenidos con los cebadores mencionados y un marcador de peso molecular (mPM) como referencia.

Como puede verse en la **Figura 43**, con el par de cebadores *arsC*-gram(+) sólo se obtuvo resultado positivo para la biopelícula extraída de cupones de Cu expuestos en el circuito con arsénico. Con el par de cebadores *arsC*-Pseud, se obtuvieron resultados positivos para la biopelícula obtenida de cupones de Fe y para la comunidad planctónica, ambas provenientes del circuito sin As y para el par de cebadores *arsC*-amlt pudieron identificarse dos biopelículas que dieron positivo para la presencia del gen *arsC*, una obtenida de un cupón de PP en presencia de As y la otra de un cupón de Zn expuesto al circuito sin As. Las pruebas de PCR para el gen *arsC* con el par de cebadores "smrc" dieron negativas para todas las comunidades ensayadas.

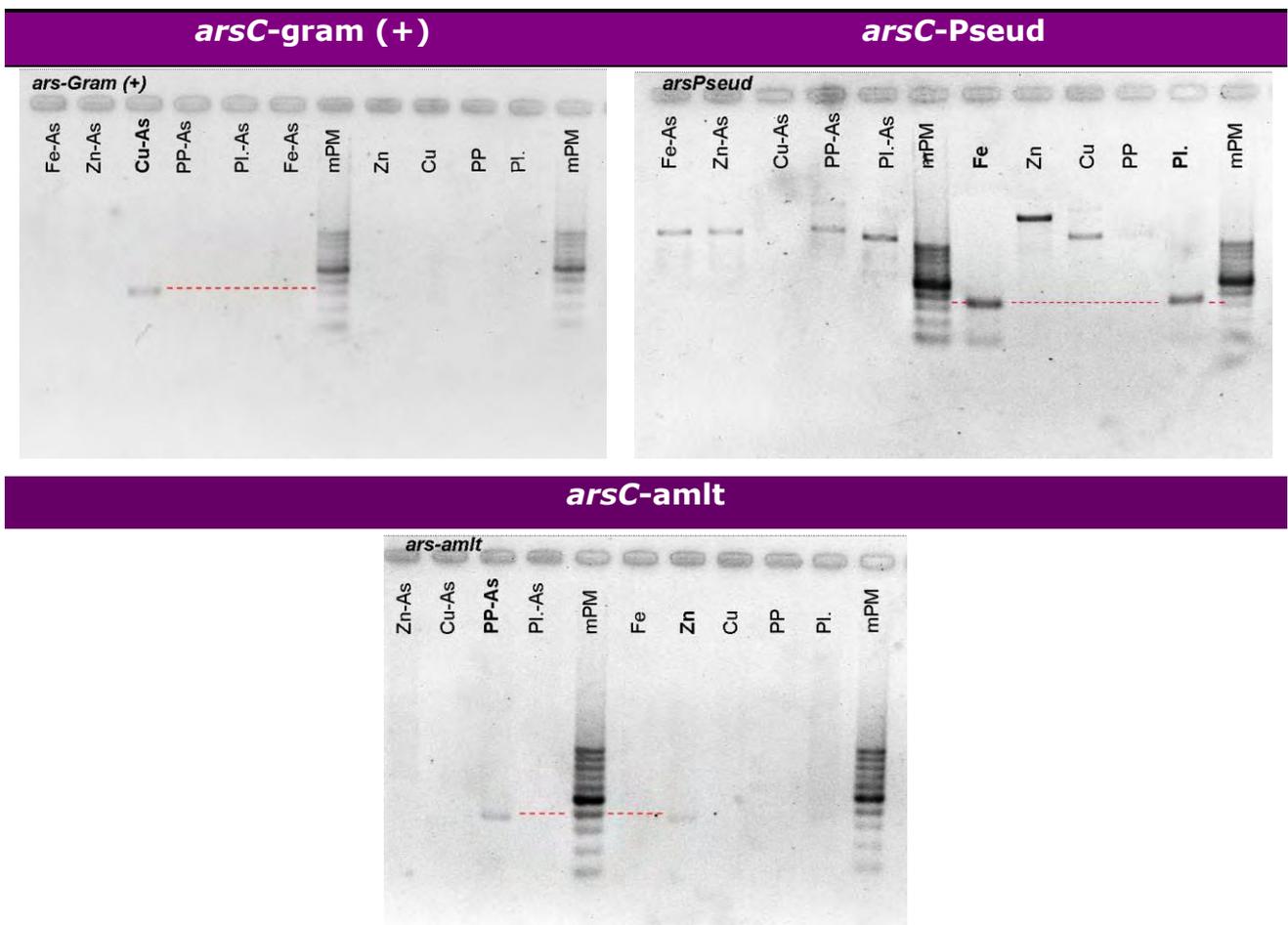


Figura 43. Corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de PCR, de comunidades planctónicas y sésiles, para el gen *arsC* con los pares de cebadores *arsC*-gram(+), *arsC*-Pseud y *arsC*-amlt.

En la **Figura 44** se muestran los resultados obtenidos para las cepas aisladas ensayadas. Las cepas que resultaron positivas para la presencia del gen *arsC*, con el par de cebadores *arsC*-gram(+) fueron: 78, 165, 170, 178, 244 y 249. Cabe recordar que las cepas 170 y 178 alcanzaron una CMI de 600 mg.L⁻¹ y la cepa 78 resultó resistente a todas las concentraciones ensayadas (**Figura 42**). A excepción de 178, que corresponde al género *Paenibacillus*, el resto de las cepas mencionadas pertenecen al género *Bacillus* (**ANEXO II, Tabla 1**), estos resultados concuerdan con trabajos que reportan la presencia de genes asociados a la resistencia al arsénico en diversas cepas de *Bacillus* (Dey *et al.*, 2016). A pesar de la multiplicidad de bandas observadas en el gel para el par de cebadores *arsC*-Pseud (**Figura 44**), en base al mPM, puede notarse que las cepas 78, 91, 178 y 209 dieron positivas para la presencia de este gen. No se obtuvieron resultados positivos para ninguna de las cepas ensayadas con los pares de cebadores *arsC*-amlt ni *arsC*-smrc.

La detección del gen en una cepa determinada, no siempre implica la detección del gen en la comunidad de origen; como puede verse en las figuras, algunas cepas dieron positivas para la presencia del gen, mientras que en su comunidad de origen este no fue detectado, esto podría estar relacionado con la concentración y proporción de la cepa dentro de dicha comunidad.

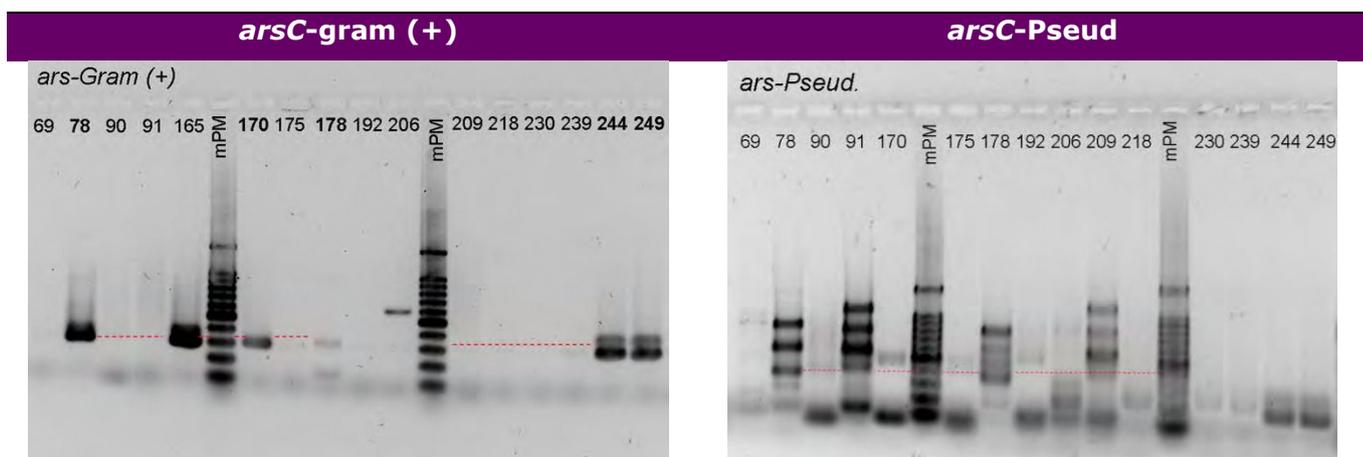


Figura 44. Corrida electroforética en gel de agarosa de los productos de PCR, de diferentes cepas aisladas, para el gen *arsC* con los pares de cebadores *arsC*-gram(+) y *arsC*-Pseud.

Los resultados obtenidos mediante la técnica molecular permitirían explicar los altos valores de CMI hallados en muchas de las cepas analizadas. En la **Tabla**

14 se resumen dichos resultados, correlacionando las cepas identificadas, el sustrato y el circuito de donde se aislaron, el gen *arsC* para el que resultaron positivas y los valores de CMI alcanzados.

Tabla 14. Resultados obtenidos para todas las técnicas aplicadas en la búsqueda de resistencia y tolerancia al arsénico.

Cepa	Origen	Gen <i>arsC</i> detectado	CMI (mg.L ⁻¹)
69 (<i>Kokuria</i> sp.)	Cu-As	---	1000
78 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	Fe-As	<i>arsC</i> gram(+)	1000
91 (<i>Delftia</i> sp.)	PP-As	<i>arsCP</i> pseud	200
165 (<i>Bacillus cereus</i>)	PP	<i>arsC</i> gram(+)	400
170 (<i>Bacillus megaterium</i>)	Cu	<i>arsC</i> gram(+)	600
175 (<i>Acinetobacter lwoffii</i>)	Zn	---	1000
178 (<i>Paenibacillus</i> sp.)	Fe-As	<i>arsC</i> gram(+)	600
209 (<i>Delftia</i> sp.)	Zn-As	<i>arsCP</i> pseud	1000
239 (<i>Brevundimonas</i> sp.)	Zn-As	---	1000
244 (<i>Bacillus cereus</i>)	Cu	<i>arsC</i> gram(+)	No ensayada
249 (<i>Bacillus cereus</i>)	PP	<i>arsC</i> gram(+)	No ensayada

3.3.- CORROSIÓN INFLUENCIADA MICROBIOLOGICAMENTE

3.3.1. Análisis de los sustratos y los depósitos luego de su exposición.

Desde el comienzo de la exposición de los cupones al flujo del agua la formación de biopelículas sobre todos los materiales expuestos se fue desarrollando de manera muy heterogénea, incluso entre cupones del mismo material en una misma serie. A medida que transcurría el tiempo, se notaba un incremento en la cantidad de los productos de corrosión depositados mezclados con el material biológico, principalmente sobre los cupones de Fe y Zn. Al retirar los cupones de ambos circuitos, se observó sobre todos los sustratos, un depósito complejo formado por los microorganismos, el MPE y productos de corrosión. Si bien los

depósitos fueron muy heterogéneos, como se mencionó anteriormente, fue posible observar a simple vista, un mayor desarrollo de la película sobre los cupones Fe y de Zn que sobre los cupones de Cu y de PP, y en general fueron más abundantes en los cupones expuestos al circuito con As(V). En la **Figura 45**, se muestran las fotografías de los cupones extraídos en una de las series.

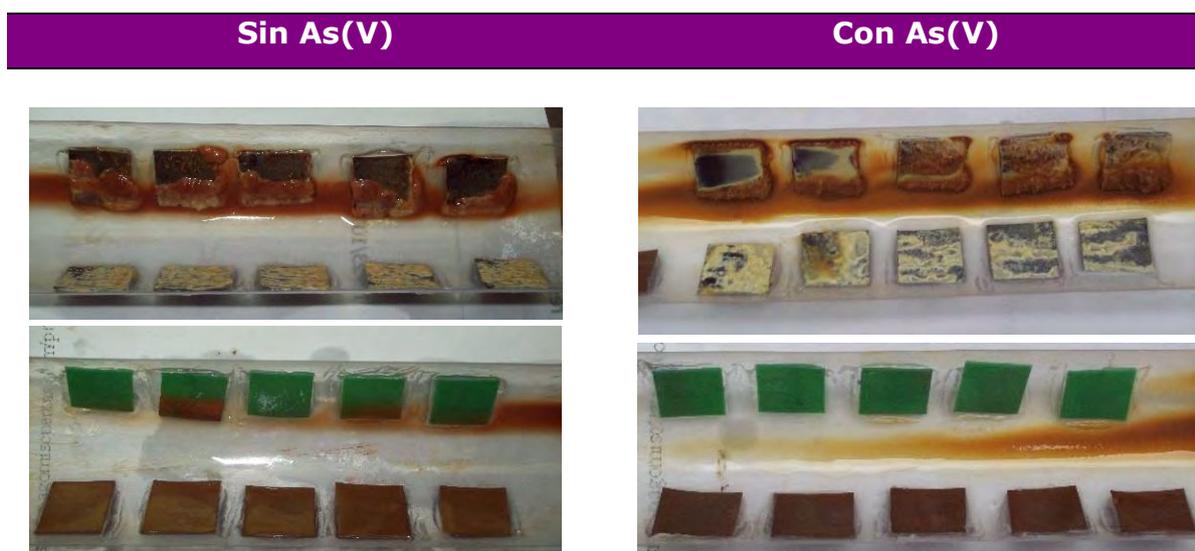


Figura 45. Aspecto de los cupones retirados de los circuitos con y sin As(V) de una de las series experimentales. De arriba hacia abajo: Fe, Zn, PP y Cu.

Debido a la mayor susceptibilidad del Zn y del Fe frente a la colonización y a la corrosión, los depósitos formados sobre estos sustratos fueron muy abundantes, es por ello que fue posible observarlos a bajas magnificaciones (con lupa estereoscópica, a 40 X) y fotografiar algunos aspectos particulares de dichos depósitos. A esta magnificación fue posible revelar que las películas estaban formadas por varias capas superpuestas de diferente morfología y espesor (**Figura 46**). Por el contrario, la observación de los detalles de los depósitos sobre los cupones de Cu y PP sólo pudo realizarse mediante técnicas de microscopía, que proporcionan una mayor magnificación.

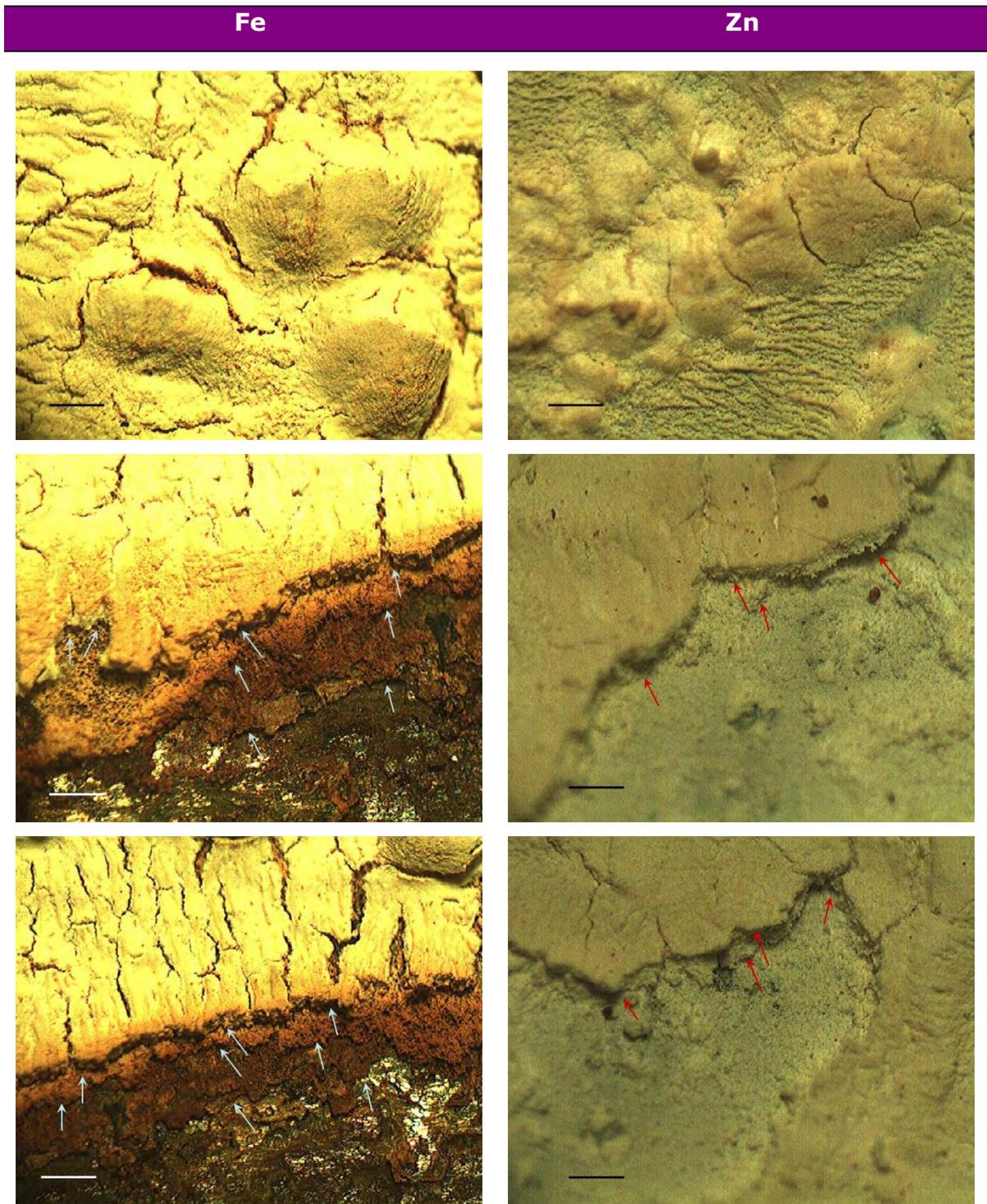


Figura 46. Aspecto de las películas complejas (microorganismos + MPE + productos de corrosión) depositadas sobre los cupones de Fe (izquierda) y de Zn (derecha). Las flechas señalan las diferentes capas que se superponen a medida que los productos se van depositando y acumulando sobre dichos sustratos. Imágenes tomadas con lupa estereoscópica a 40x. Escala: 500 μ m.

Las observaciones a través del MEB de los cupones luego de su exposición en los circuitos, permitieron analizar con mayor detalle la morfología y estructura de los depósitos, así como también corroborar la presencia y distribución de las bacterias adheridas y el MPE. Asimismo, los análisis EDS complementados con los análisis de DRX y FT-IR permitieron caracterizar químicamente las películas en estudio.

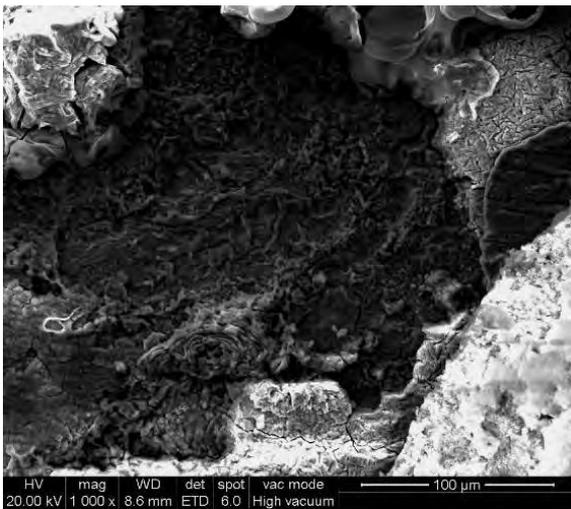
A continuación, se presentan los resultados de todas estas técnicas aplicadas, en cada material luego de su exposición en los circuitos.

Fe

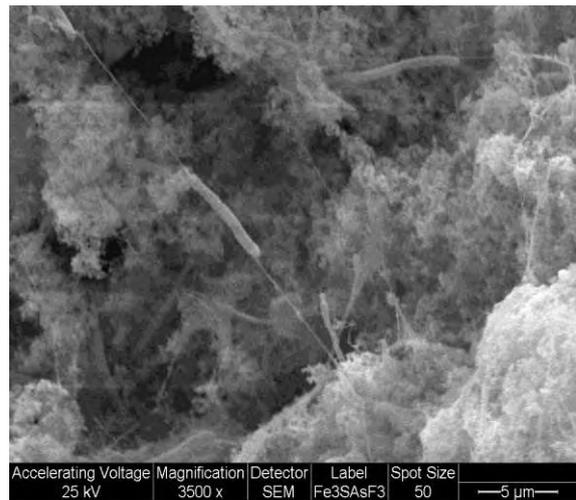
En las micrografías de las **Figuras 47 y 48** se puede apreciar la naturaleza compleja de las películas formadas sobre la superficie del Fe, donde los diferentes productos de corrosión se encontraban entremezclados con las bacterias. En general, sobre este sustrato fue posible distinguir dos o más capas superpuestas, separadas por planos de clivaje, siendo la capa externa más delgada y de estructura ampollada. Esta morfología y la gran cantidad de productos de corrosión acumulados hicieron más dificultosa la observación de las bacterias debido a que las mismas se encontraban entre dichos productos y el MPE.

El análisis elemental de las películas realizado mediante EDS mostró que el Fe como sustrato de base, el O como resultado de los óxidos formados y el C proveniente de los componentes biológicos (Peng *et al.*, 2010) son los elementos predominantes. Además, se pudo detectar la presencia de Ca, Si y Al. Si bien el Al se encontró en muy baja concentración ($<1 \text{ mg.L}^{-1}$) en el agua de red con la que se llenaron los circuitos (Cap. 2, secc. 2.1.1.) la presencia de este elemento detectado sobre los cupones podría deberse a la deposición de alúmina Al_2O_3 , hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, precipitación de hidróxido de aluminio amorfo y formación de aluminosilicatos. Las reacciones de adsorción de superficie/co-precipitación que involucran Al^{3+} libre y sus complejos también pueden explicar su presencia. Las fuentes de aluminio en agua potable, pueden deberse a la presencia natural en la fuente de origen y/o al tratamiento y aplicación de coagulantes a base de aluminio (Peng *et al.*, 2010). También en algunos casos pudo detectarse Zn y Cu provenientes de los productos de corrosión de los cupones cercanos de dichos materiales.

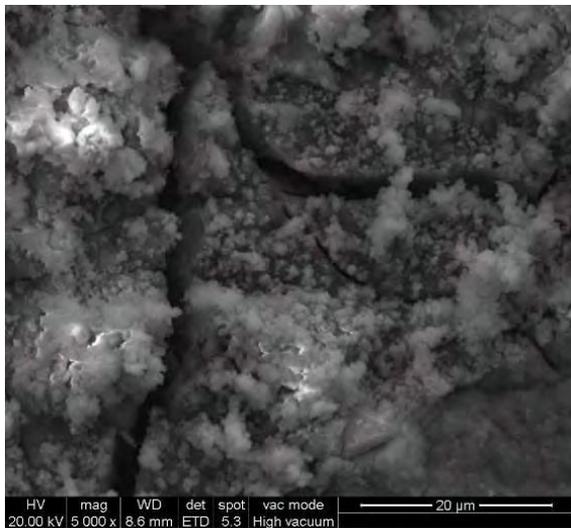
Fe en ausencia de As



C: 2,03; O: 5,73; Al: 1,60; Fe: 90,64



O: 14,59; Si: 4,14; Ca: 3,61; Fe: 20,70;
Zn: 56,97



C: 4,46; O: 21,97; Na: 2,17; Al: 0,30;
Si: 0,66; Ca: 3,41; Fe: 67,03

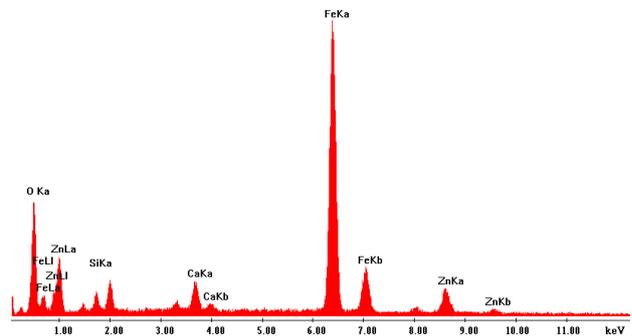
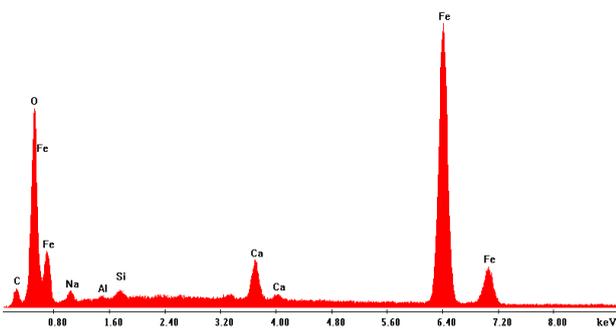
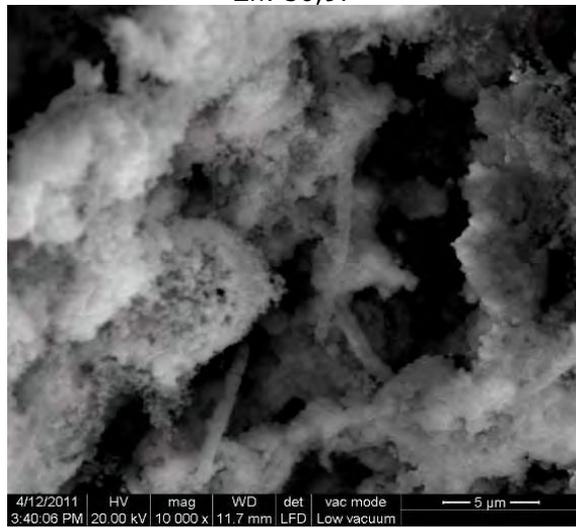
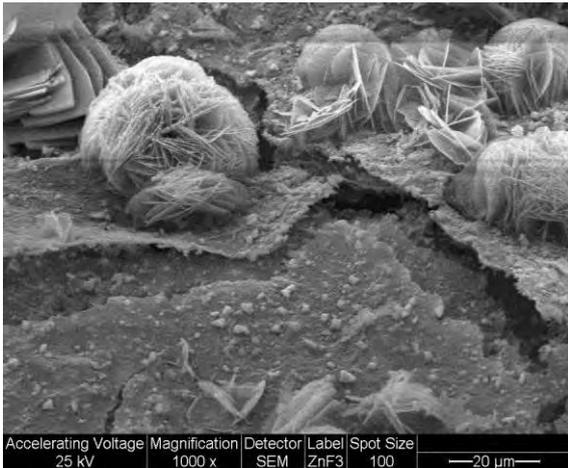
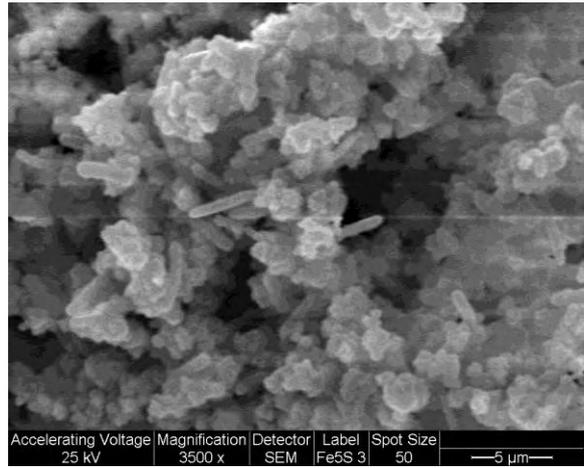


Figura 47. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de Fe, expuestos en el circuito sin As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada micrografía.

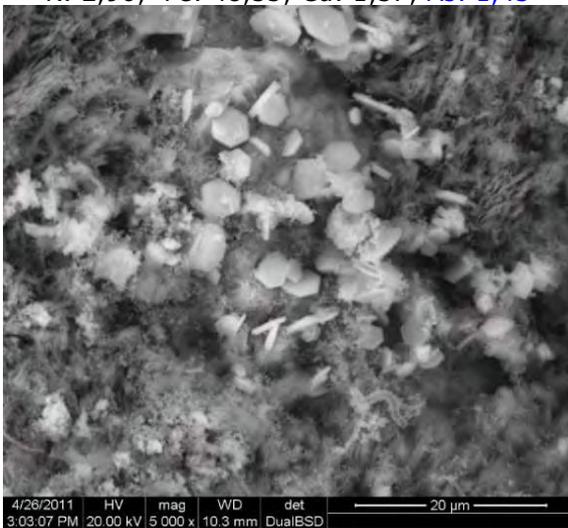
Fe en presencia de As



C: 8,75; O: 28,35; Al: 1,48; P: 6,92;
K: 2,96; Fe: 48,55; Cu: 1,57; As: 1,43



C: 2,84; O: 33,82; Al: 0,27; Si: 2,73; P: 2,82;
K: 1,34; Fe: 48,92; Zn: 2,45; As: 4,80



O: 47,49; Mg: 1,43; Si: 1,60; Ca: 18,55
Fe: 19,90; Zn: 8,15; As: 2,80



C: 5,34; O: 36,10; Si: 1,64; Cl: 0,23; Ca: 1,55;
Fe: 15,12; Cu: 2,32; Zn: 30,16; As: 7,54

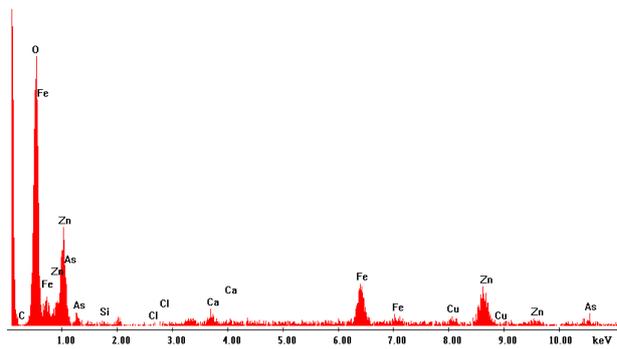
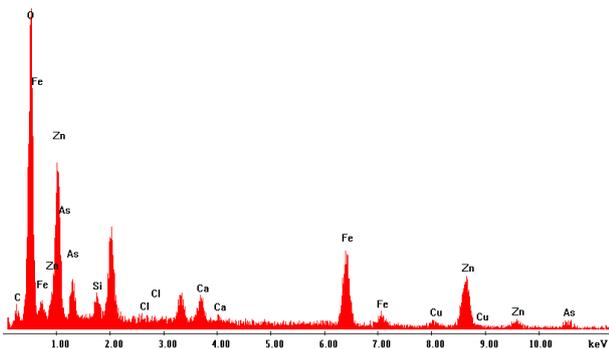


Figura 48. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de Fe, expuestos en el circuito con $5 \text{ mg.L}^{-1} \text{As(V)}$. Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada micrografía.

Los análisis por DRX se realizaron directamente sobre cupones con la película adherida, así como también sobre los productos raspados y desprendidos de los cupones de los diferentes sustratos. Los compuestos detectados en este trabajo, concuerdan en general, con los encontrados en diversos estudios dedicados a caracterizar los productos de corrosión formados en redes de distribución de agua potable (Sarin *et al.*, 2001; Barkatt *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2010). Los difractogramas obtenidos (**Figura 49**) mostraron la presencia de material amorfo, pudiéndose detectar también la presencia de óxidos e hidróxidos de Fe como goethita (α -FeO(OH)), lepidocrocita (γ -FeO(OH)) y hematita (α -Fe₂O₃). La hematita, que se caracteriza por una estructura cristalina hexagonal (Handbook of Mineralogy, 2001-2005; Tartaj *et al.*, 2011) también fue posible apreciarla mediante MEB y se puede observar en la **Figura 48** (segunda imagen, izquierda). Asimismo, se detectaron dos picos en $2\theta=27,315$ ($d=3,26\text{\AA}$) y $2\theta=29,585$ ($d=3,02\text{\AA}$) que no pudieron ser identificados claramente, pero en base a bibliografía (Teng *et al.*, 2008), este último podría indicar la presencia de calcita (CaCO₃). La formación de calcita es posible debido a la presencia de calcio en el agua potable (Peng *et al.*, 2010). En relación a este compuesto, hay autores que reportan que la cantidad de calcita disminuye en los depósitos formados en presencia de biopelículas, reemplazándose el Ca por Fe y dando lugar a una mayor concentración de especies Fe₂O₃ tanto hematita (α -Fe₂O₃) como maghemita (γ -Fe₂O₃) (Teng *et al.*, 2008).

Cabe señalar que mediante EDS, en los cupones expuestos al circuito con arsénico, fue posible encontrar la presencia de este elemento químico en la película depositada (**Figura 48; ANEXO IV: Figura 1**). Es sabido que los óxidos de Fe, por ej. maghemita y magnetita o los oxihidróxidos de Fe especialmente en tamaños nanométricos son capaces de adsorber muy fuertemente compuestos aniónicos como el arseniato (Auffan *et al.*, 2008; Mamindy-Pajany *et al.*, 2011; Luther *et al.*, 2012; Gorny *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la mezcla de óxidos de hierro, material orgánico y presencia bacteriana, produce sólidos complejos que exhiben propiedades únicas de retención de metales (Ferris *et al.*, 2000), particularmente el arsénico. Siendo la adsorción directa o co-precipitación con los óxidos de hierro uno de los métodos para eliminar el arsénico del agua (Manning *et al.*, 2002).

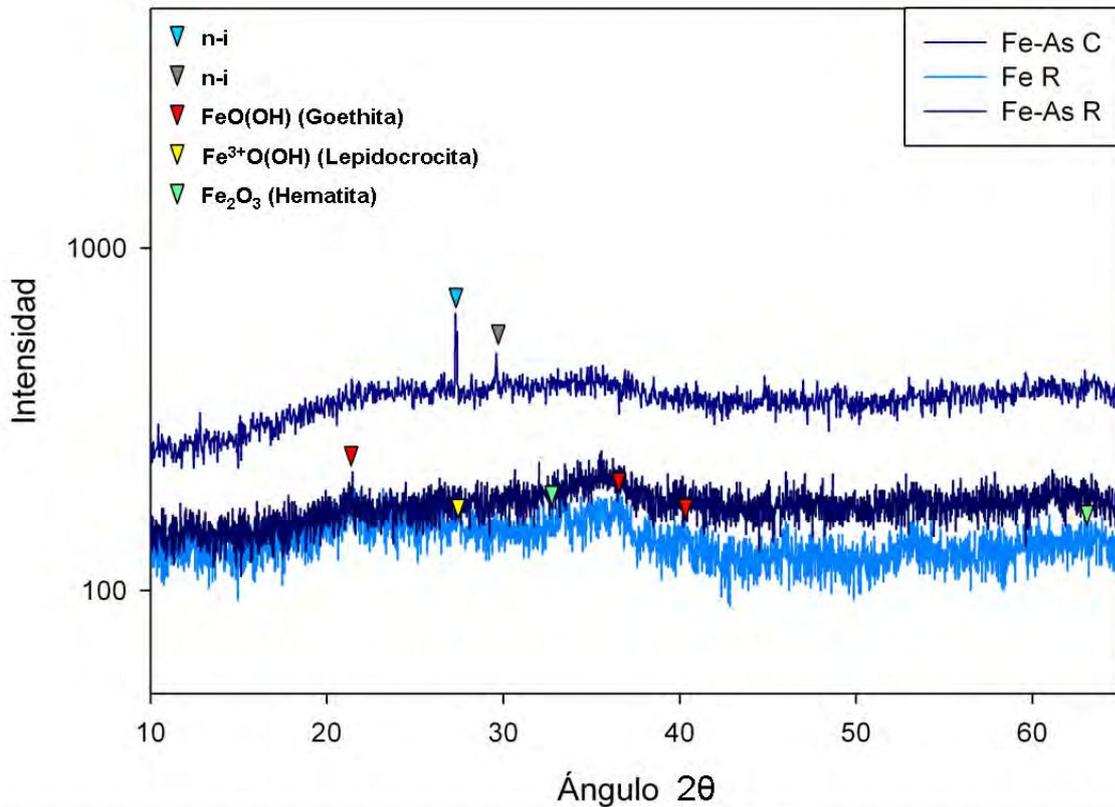


Figura 49. Difractograma de RX obtenido de cupones de Fe en presencia de arsénico (Fe-As C) y de productos raspados de los cupones expuestos en ausencia (Fe R) y en presencia de arsénico (Fe-As R).

En la **Figura 50** pueden observarse los espectros de FT-IR obtenidos para los cupones de Fe "control" y expuestos a los sistemas de circulación en presencia y ausencia de arsénico. En ellos puede notarse que en los controles arrojan una reflectancia del 100% sin variaciones a lo largo de todo el espectro, lo cual es esperable debido a la ausencia de grupos funcionales orgánicos sobre la superficie, previo a su exposición. Mientras que los espectros de los cupones expuestos muestran picos asociados a sustancias orgánicas.

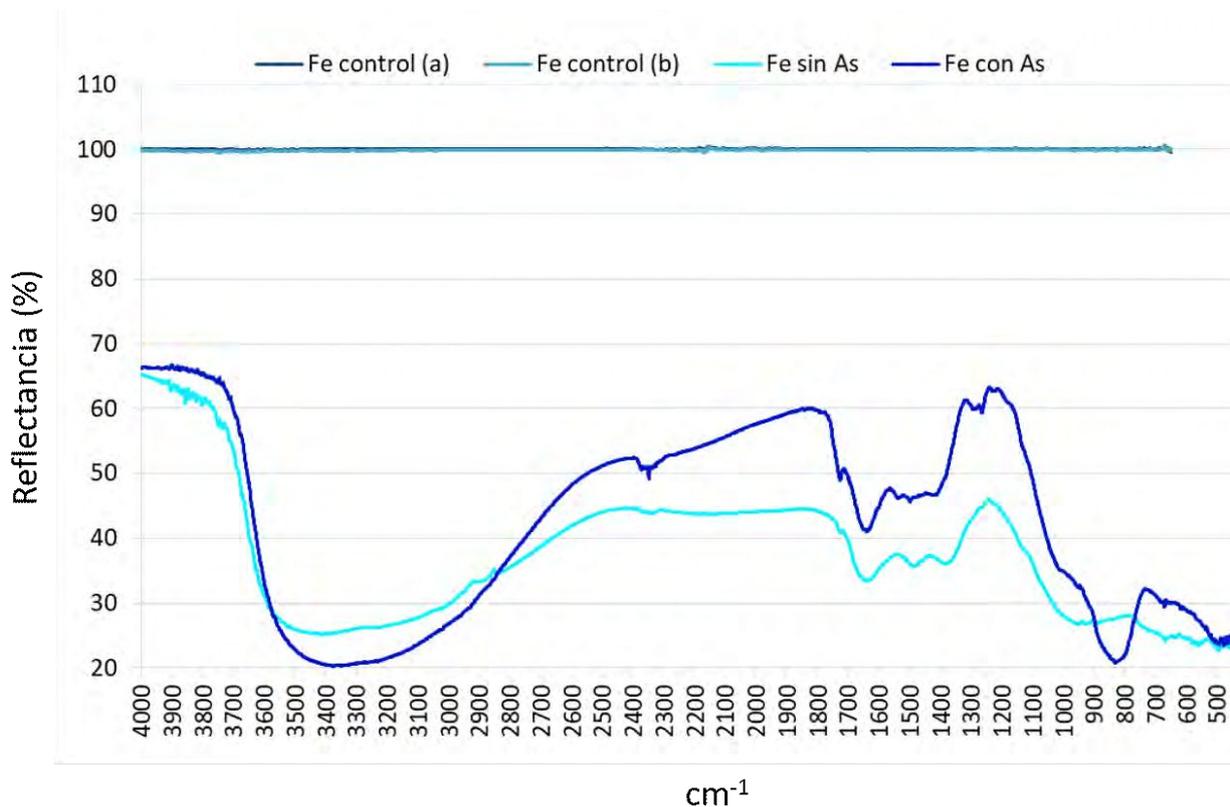


Figura 50. Espectros FT-IR obtenidos para los cupones de Fe no expuestos (controles) y expuestos a los sistemas de circulación en presencia y ausencia de arsénico.

A partir del programa *Spectrum-One*, se realizaron las derivadas primera y segunda de los espectros de los cupones expuestos y posteriormente se analizaron los picos para identificar los grupos orgánicos presentes mediante el uso de una base de datos (*KnowItAll*[®], de Bio-Rad) y bibliografía adecuada (Cooper, 1980; Mc. Murry, 2008) (**Figura 51 a y b**). El análisis de derivada segunda, muestra que las señales entre los 4000 y 3600 se deben principalmente a la presencia de H₂O.

En el gráfico de la derivada segunda de cupones de Fe expuestos al circuito sin arsénico (**Figura 51. a**) se detectan picos atribuibles a grupos funcionales orgánicos detallados a continuación: a 1634 cm⁻¹, uniones N-H de aminas primarias y secundarias; a 1488 cm⁻¹, anillo aromático; a 1375 cm⁻¹, grupo metilo; a 948 cm⁻¹, ácidos carboxílicos y uniones C=CH₂ y a 667 cm⁻¹, uniones C≡CH.

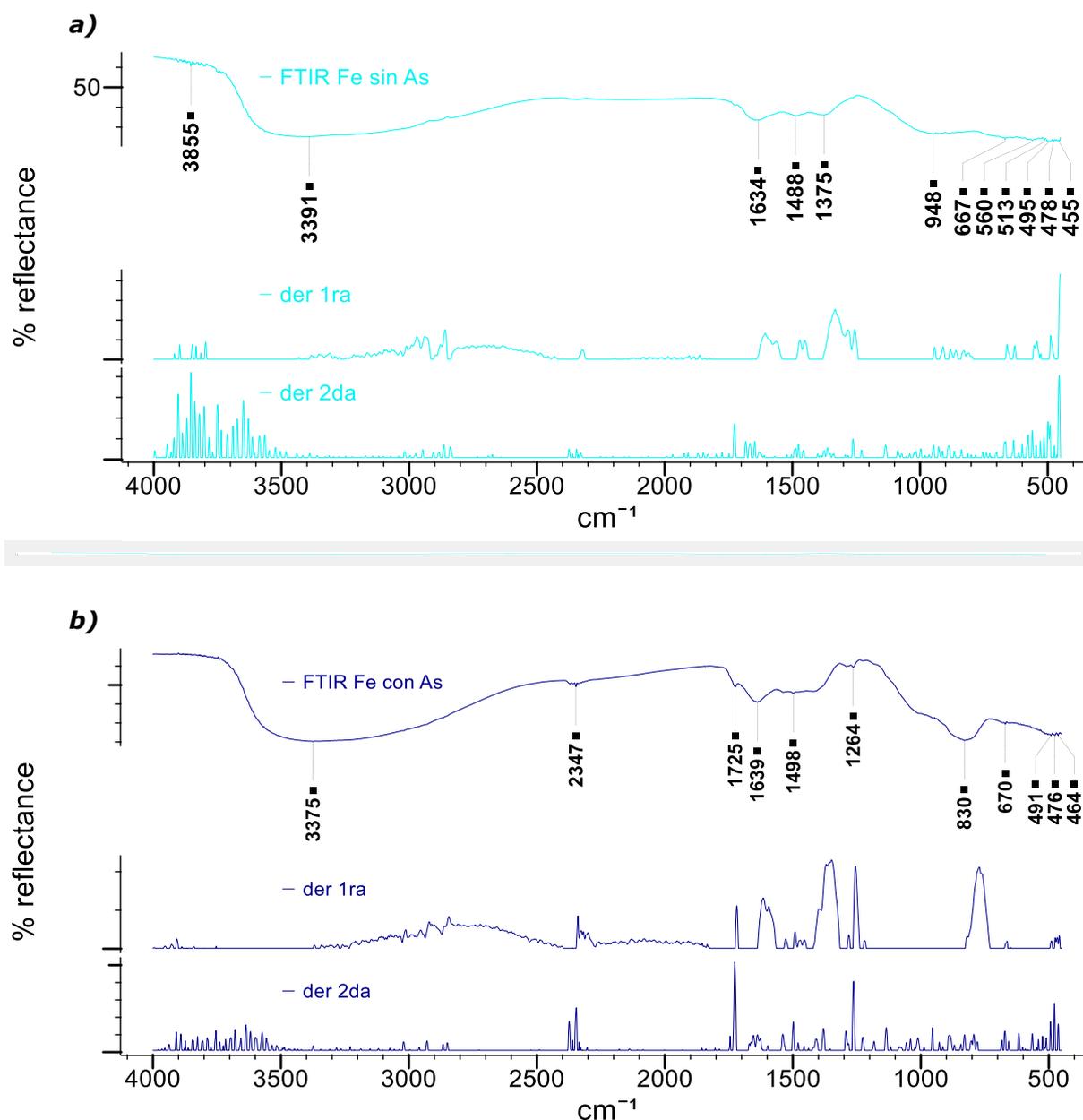


Figura 51. FT-IR de las biopelículas depositadas sobre Fe **(a)** en ausencia y **(b)** en presencia de $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de As(V) en el agua, y sus derivadas primera y segunda.

En el espectro de los cupones de Fe expuestos al agua con arsénico (**Figura 51. b**) se detectaron señales: a 3375 cm^{-1} indicadora de la presencia de aminas primarias y secundarias; a 2347 cm^{-1} , uniones NH^+ o NH_2^+ de sales de aminas, o también podría indicar algún compuesto de P; a 1725 cm^{-1} uniones $\text{C}=\text{O}$ de aldehídos, ésteres y ácidos carboxílicos; a 1639 cm^{-1} uniones $\text{C}=\text{O}$ fuerte de ureas tales como $(\text{R})_2\text{N}-(\text{C}=\text{O})$ ($1660\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$) o $\text{R}-\text{NH}-(\text{C}=\text{O})$ ($1680\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$); a 1498 cm^{-1} , un anillo aromático; a 1264 cm^{-1} podría indicar la presencia del grupo NH ($1305\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) y $\text{C}-\text{N}$ ($1320\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) de amidas como $\text{R}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}$ o $\text{R}-\text{CO}-$

NH-CO-NHR respectivamente, así como también la unión C-O de ácidos carboxílicos como C-C-COOH y C=C-COOH ($1320-1211\text{ cm}^{-1}$); a 830 cm^{-1} , aminas primarias y/o anillos bencénicos *para* sustituidos ($860-800\text{ cm}^{-1}$) o también el grupo R-SOOH ($870-810\text{ cm}^{-1}$) y a 670 cm^{-1} unión $\text{C}\equiv\text{CH}$.

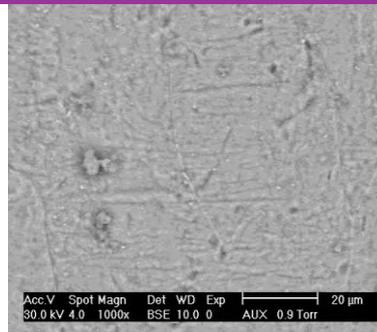
Con el propósito de observar y caracterizar el deterioro sobre el sustrato generado por el agua, así como por los microorganismos adheridos y el MPE, una vez transcurrido el tiempo de circulación en los sistemas, un cupón se limpió para retirar la biopelícula y se observó en el MEB. Cabe señalar, que los efectos de corrosión abiótica tomados como referencia, es decir la corrosión producida por el agua, no pudieron ser evaluados en condiciones de circulación, ya que no fue posible mantener la esterilidad de 50 L de agua en circulación. Es por ello que se realizaron ensayos estáticos, colocándose cupones de este material en recipientes con agua potable esterilizada. De la misma manera se procedió con todos los materiales analizados.

Como se puede ver en las imágenes de la **Figura 52**, después de la exposición al agua estéril, el material mostró una leve corrosión generalizada. Por el contrario, en los cupones expuestos en los sistemas de circulación, y por lo tanto, en presencia de microorganismos, se detectaron signos de ataques localizados. Debido a la complejidad de estos sistemas, y en concordancia con otros autores (Rosales *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2008), no fue posible correlacionar directamente el aspecto final de los cupones expuestos únicamente con la película biológica, ya que las irregularidades originales de las superficies, las condiciones hidrodinámicas, la temperatura y la calidad del agua también pudieron afectar el comportamiento de la corrosión del sustrato.

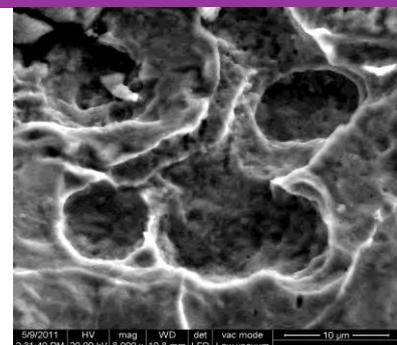
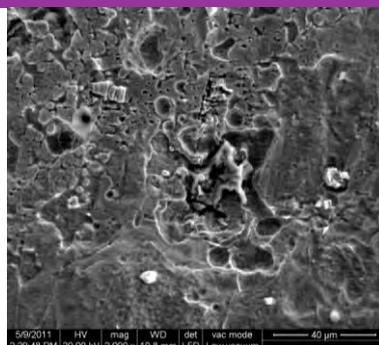
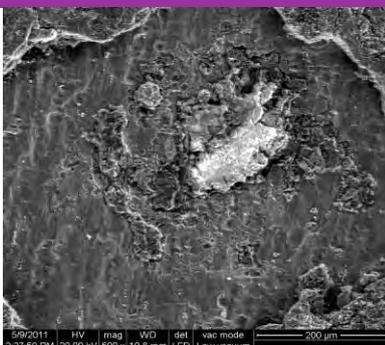
Diversas investigaciones han permitido estudiar el proceso de corrosión en sistemas de distribución de agua sobre diferentes metales, como cobre, fundiciones, aceros galvanizados así como sobre materiales plásticos, y su influencia sobre la calidad del agua (Broo *et al.*, 1997; Lethola *et al.*, 2004; Lethola *et al.*, 2006) abordando tanto el punto de vista electroquímico como el microbiológico (Lin *et al.*, 2001; Starosvetsky *et al.*, 2001; Rosales, 2007). En el caso del Fe, por ejemplo, se sabe desde hace mucho tiempo (Cullimore y Mc Cann, 1977) que para sostener el crecimiento de bacterias oxidantes de hierro se necesita oxidar una gran cantidad

de este metal, debido a que se puede generar muy poca energía durante este proceso, esto sugiere que la presencia de este tipo de bacterias acelera corrosión del metal en la superficie. Además, el hierro ferroso liberado durante el proceso de corrosión puede eliminar el cloro residual, reduciendo la eficacia de la desinfección para crear condiciones favorables para el crecimiento de diferentes grupos bacterianos en los sistemas de distribución (Li *et al.*, 2010). Asimismo, el proceso de corrosión de las tuberías afecta la adhesión microbiana y la formación de biopelículas (Waines *et al.*, 2011). Así, por ejemplo, los óxidos de hierro pueden precipitar haciendo que la superficie de la tubería sea más rugosa, favoreciendo la concentración de nutrientes orgánicos y, en consecuencia, el desarrollo de biopelículas (Volk *et al.*, 2000). Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, durante el cual se observaron biopelículas muy desarrolladas, con grandes espesores y elevada cantidad de microorganismos sobre los cupones de este material.

Fe expuesto al agua estéril



Fe expuesto al circuito sin As(V)



continúa

Fe expuesto al circuito con As(V)

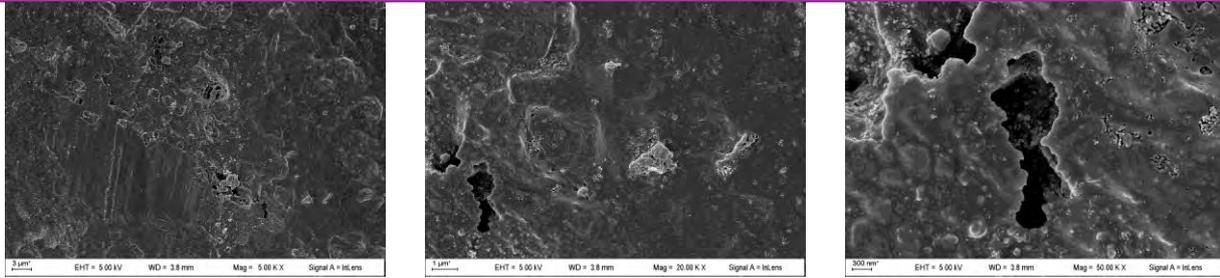
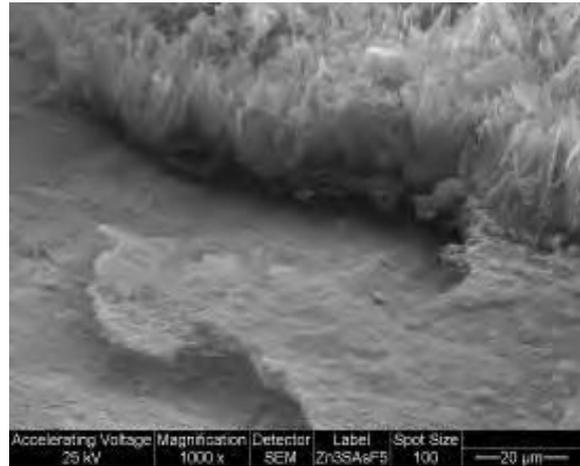
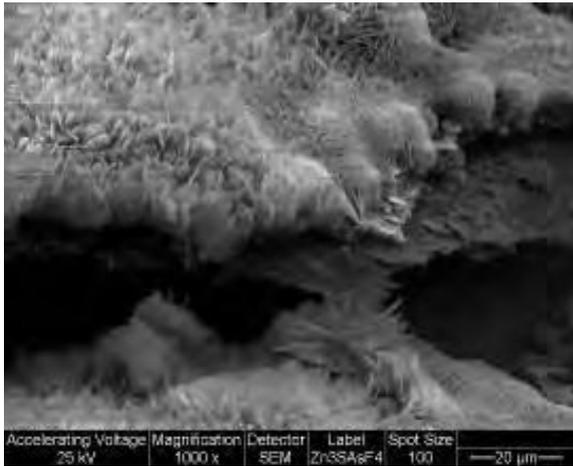


Figura 52. Micrografías de MEB, que muestran el aspecto de la superficie corroída del Fe una vez retirados los depósitos.

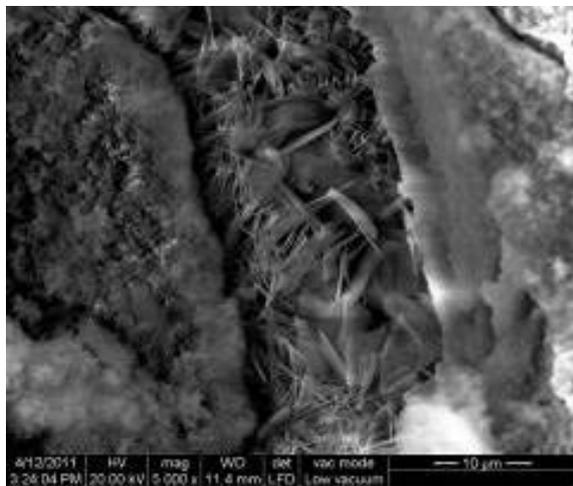
Zn

A través de la observación en el MEB de los cupones de Zn, también fue posible apreciar la complejidad de las películas depositadas sobre la superficie de este material (**Figuras 53 y 54**). Así como en el Fe, sobre este sustrato fue posible distinguir una gran cantidad de productos de corrosión organizados en varias capas superpuestas, entre las cuales se encontraban entremezcladas las bacterias. A partir de los análisis EDS realizados sobre cupones expuestos en ambos circuitos, se detectó principalmente Zn, como base metálica de dicho sustrato; O, proveniente de los óxidos formados; pequeñas cantidades de Ca; C, proveniente de los depósitos biológicos; Fe, proveniente principalmente, de los cupones de Fe cercanos (**Figura 45**). Cabe destacar, la presencia de un gran porcentaje de As retenido entre los productos de corrosión de los cupones expuestos al circuito con este elemento (**Figura 54; ANEXO IV: Figura 2**). Esto podría estar relacionado al alto porcentaje de Fe detectado sobre los cupones de Zn, ya que, como se ha mencionado, los óxidos de Fe son capaces de adsorber fuertemente compuestos aniónicos como el arseniato (Auffan *et al.*, 2008; Mamindy-Pajany *et al.*, 2011; Luther *et al.*, 2012; Gorny *et al.*, 2015). También se detectó la presencia de Al y Si sobre los cupones expuestos en ambos circuitos.

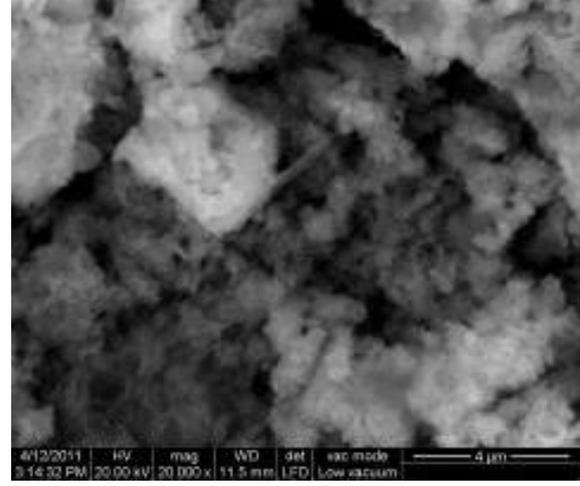
Zn en ausencia de As(V)



C: 13,16; O: 22,50; Al: 0,40; Si: 2,74;
Ca: 1,29; Fe: 2,13; Zn: 57,77



C: 17,00; O: 25,57; Al: 0,26; Si: 2,91;
Ca: 1,28; Fe: 2,14; Zn: 50,84



C: 3,92; O: 26,22; Al: 9,91; Si: 4,58;
Ca: 1,89; Zn: 53,46

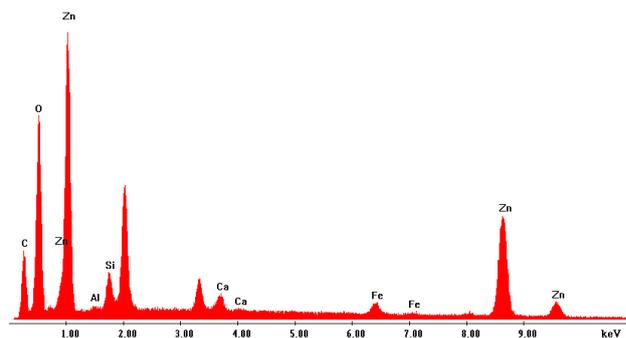
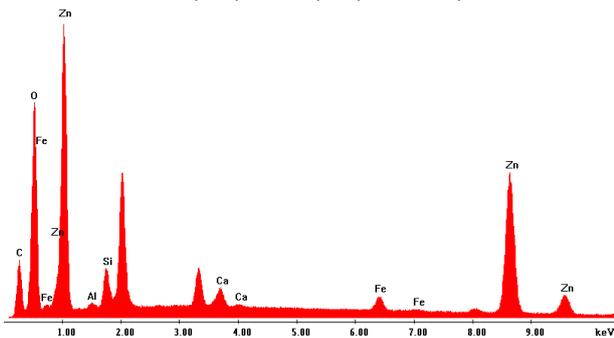
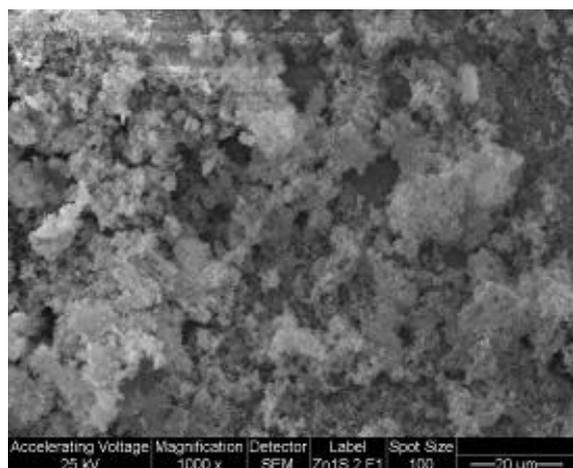
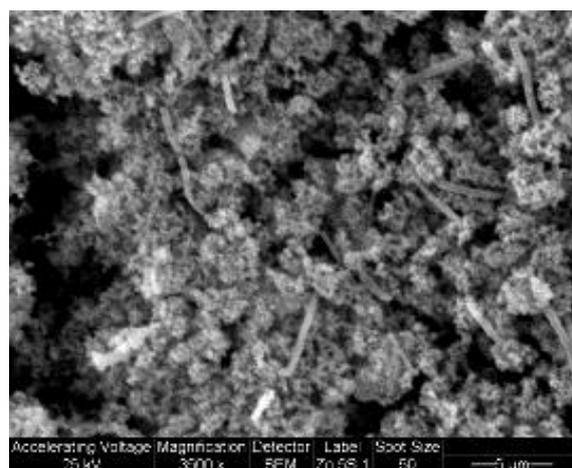


Figura 53. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de Zn, expuestos en el circuito sin As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada micrografía.

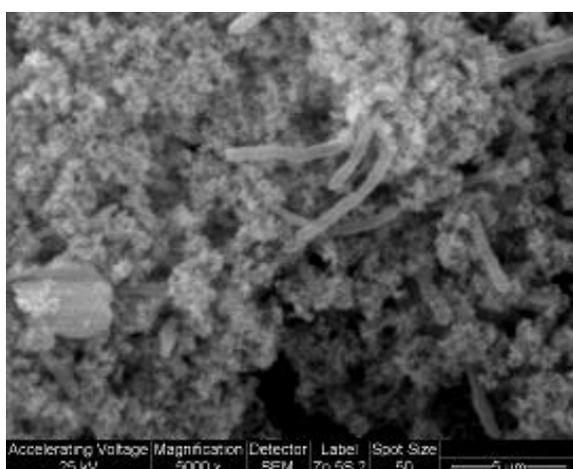
Zn en presencia de As(V)



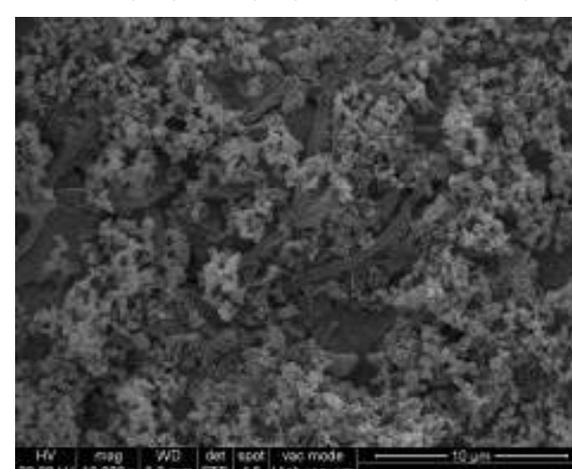
C: 4,30; O: 20,53; Mg: 6,44; Si: 5,08;
Ca: 1,13; Fe: 5,92; Zn: 49,81; As: 6,80



C: 0,24; O: 6,39; Al: 0,69; Si: 1,10;
Ca: 0,47; Fe: 7,10; Zn: 55,05; As: 28,95



C: 11,36; O: 22,11; Al: 1,72; Si: 2,83;
Fe: 10,25; Cu 1,11; Zn: 37,34; As: 13,27



C: 8,85; O: 23,37; Mg: 5,41; Al: 5,16
Si: 8,04; Fe: 9,14; Zn: 31,87; As: 8,16

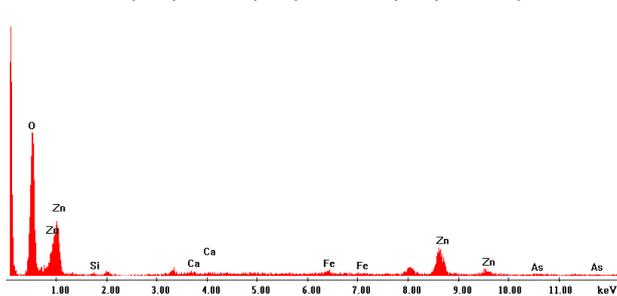
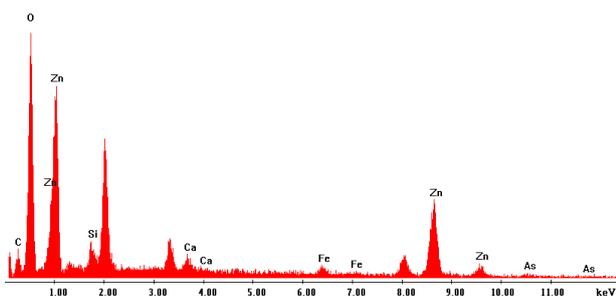


Figura 54. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de Zn, expuestos en el circuito con As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada micrografía.

Mediante el análisis por DRX (**Figura 55**) se detectó la base metálica (Zn^0), zincita (ZnO), carbonato básico o hidrozincita ($Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$), cloruro básico de cinc ($Zn_5(OH)_8 Cl_2 \cdot H_2O$) y, en los cupones expuestos al circuito con As(V) fue posible identificar la presencia de zincmetaarsenito ($Zn(AsO_2)_2$) y aragonita ($CaCO_3$).

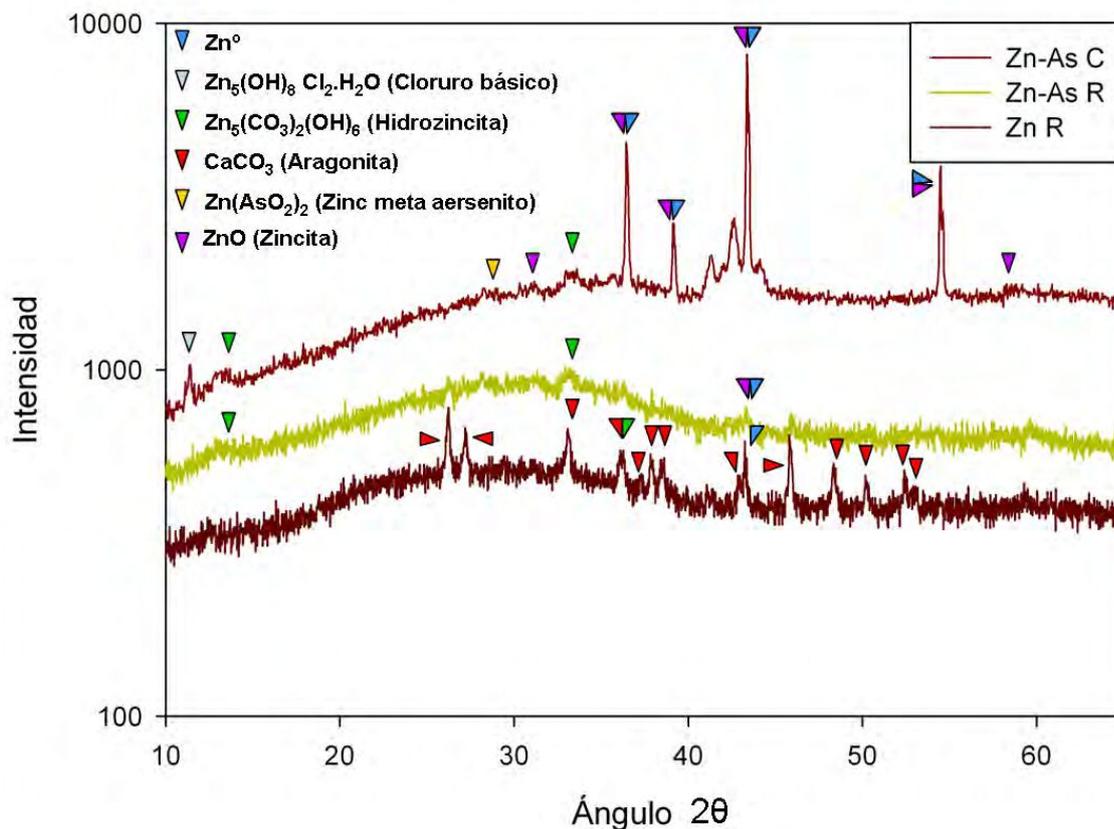


Figura 55. Difractograma de RX obtenido de cupones de Zn en presencia de arsénico (Zn-As C) y de productos raspados de los cupones expuestos en ausencia (Zn R) y en presencia de arsénico (Zn-As R).

Cabe señalar que en los cupones de Fe expuestos en presencia de arsénico, este elemento se detectó en valores entre 1,5 y 7,5 % (**Figura 48; ANEXO IV: Figura 1**), pero mediante DRX no pudo identificarse ningún compuesto de arsénico entre los productos depositados (**Figura 49**). Por el contrario, sobre los cupones de Zn, mediante la DRX, pudo identificarse la formación de zincmetaarsenito entre los productos depositados (**Figura 55**), probablemente debido a que el porcentaje de arsénico detectado mediante EDS fue mayor (entre 7 y 30 %) (**Figuras 54; ANEXO IV: Figura 2**) y a la cristalinidad de los compuestos formados sobre el Zn.

A partir del análisis de los espectros de FT-IR pudieron observarse diferencias entre los cupones no expuestos (control) y los cupones expuestos en los sistemas de circulación (**Figura 56**).

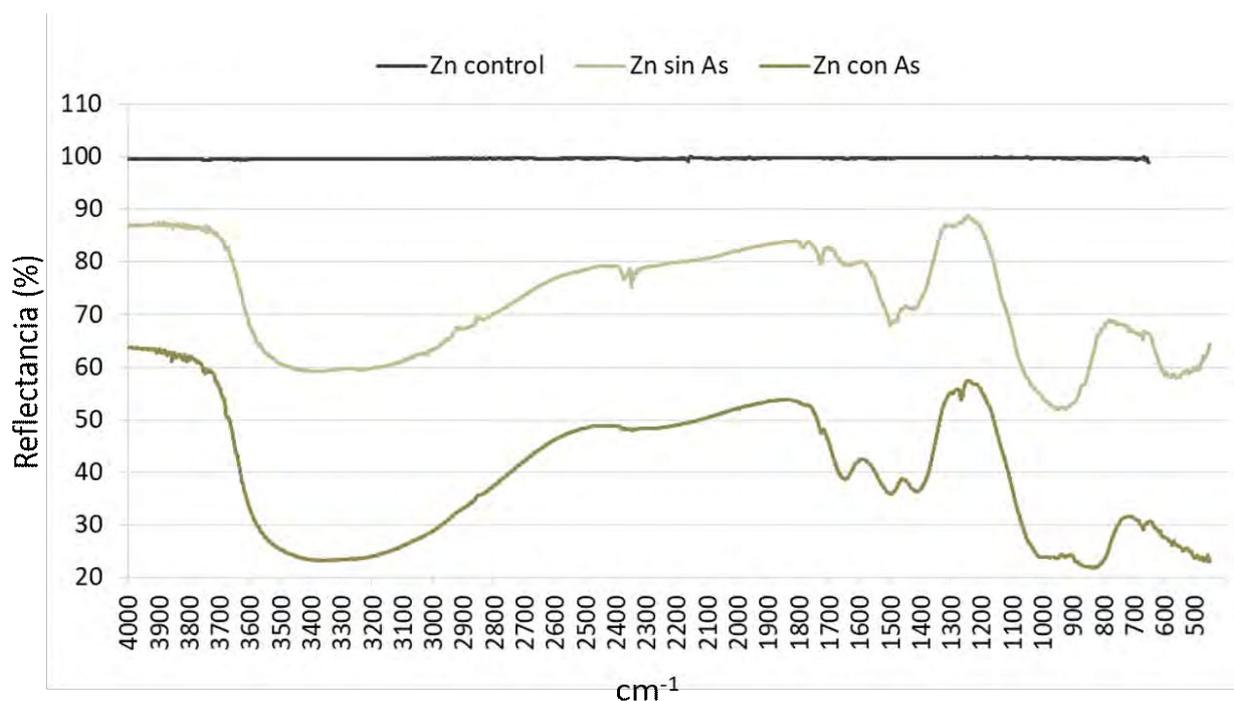
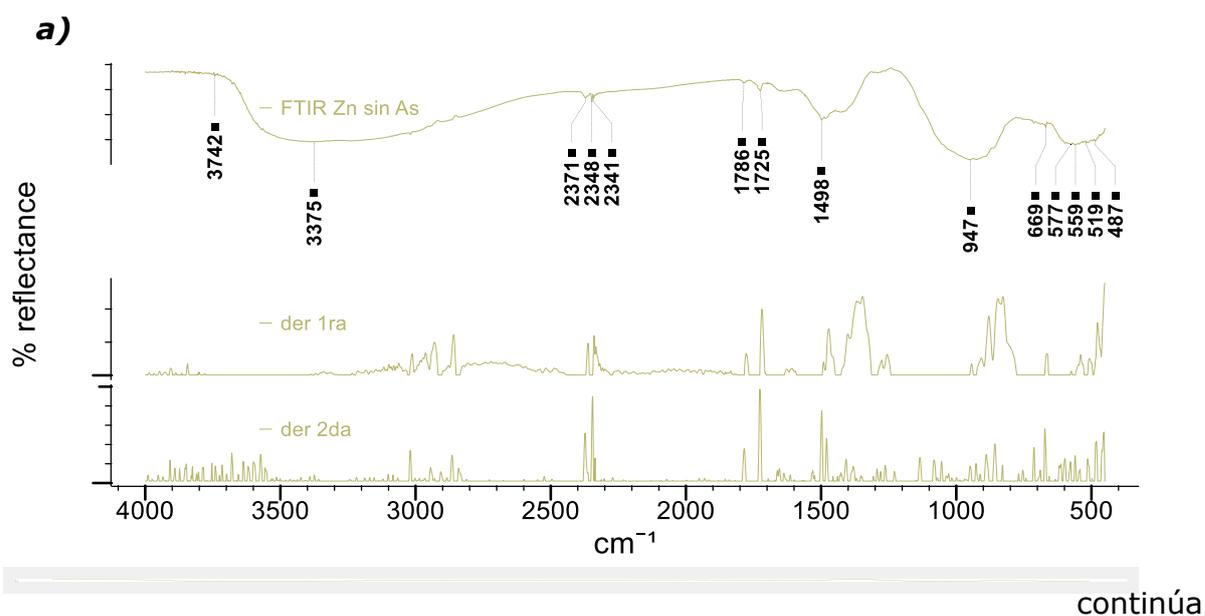


Figura 56. Espectros FT-IR obtenidos para los cupones de Zn no expuestos (control) y expuestos a los sistemas de circulación en presencia y ausencia de arsénico.

De la misma manera que con el Fe, a través de programas informáticos y bibliografía se realizaron los gráficos de las derivadas primera y segunda de los espectros obtenidos, se analizaron las señales y se identificaron los grupos funcionales presentes en las biopelículas (**Figura 57 a y b**).



continúa

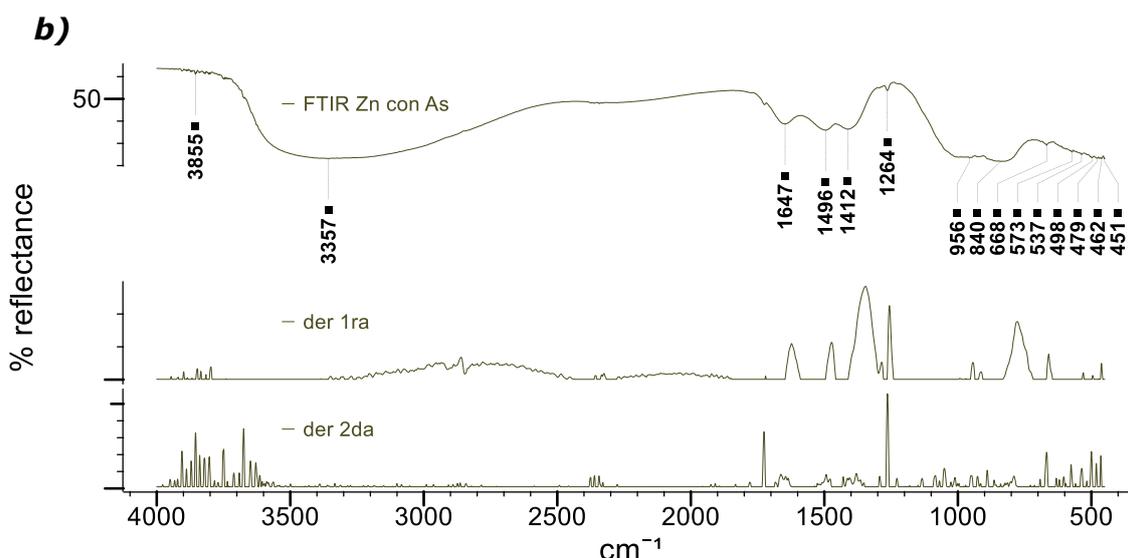


Figura 57. FT-IR de las biopelículas depositadas sobre Zn **(a)** en ausencia y **(b)** en presencia de 5mg.L de As(V) en el agua, y sus derivadas primera y segunda

En los espectros del Zn se observan los picos a 3742 y 3855 cm⁻¹ (**Figura 57 a y b**, respectivamente) que caen dentro del rango asignado al H₂O e impurezas, aunque también es mencionado para este rango la presencia de algún compuesto con sílice: (R)₃-Si-OH.

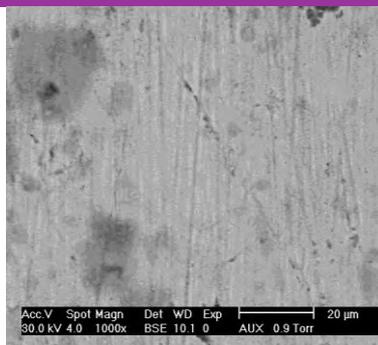
Al analizar el espectro correspondiente al Zn en ausencia de arsénico (**Figura 57 a**) se observan las siguientes señales atribuidas a los siguientes grupos orgánicos: a 2371, 2348 y 2341 cm⁻¹, sales de aminas, compuestos de P; a 1786 cm⁻¹, compuestos aromáticos; a 1725 cm⁻¹, se detecta enlace C=O de aldehídos o ésteres; a 1498 cm⁻¹, anillo aromático; a 947 cm⁻¹, dímeros de ácidos carboxílicos, uniones C=CH₂ y a 669 cm⁻¹, unión C≡CH.

En el espectro del Zn en presencia de arsénico (**Figura 57 b**) se detectaron las siguientes señales: a 1647 cm⁻¹, unión C=O fuerte de ureas tales como (R)₂N-(C=O) (1660-1625 cm⁻¹) o R-NH-(C=O) (1680-1635 cm⁻¹); a 1496 cm⁻¹, anillo aromático, a 1412 cm⁻¹, alcoholes OH-R-OH; el pico en 1264 cm⁻¹ podría indicar la presencia del grupo NH (1305-1200 cm⁻¹) y C-N (1320-1200 cm⁻¹) de amidas como R-CO-NH-C o R-CO-NH-CO-NHR respectivamente, así como también la unión C-O de ácidos carboxílicos como C-C-COOH y C=C-COOH (1320-1211 cm⁻¹); a 956 cm⁻¹ ácidos carboxílicos; la señal a 840 cm⁻¹ se corresponde con aminas primarias y con

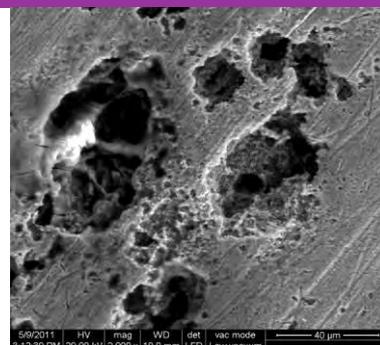
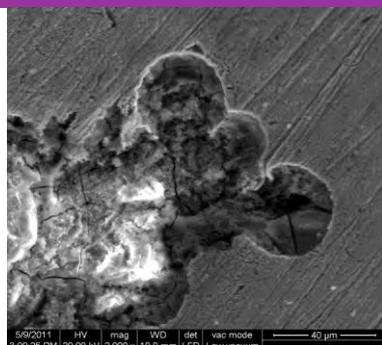
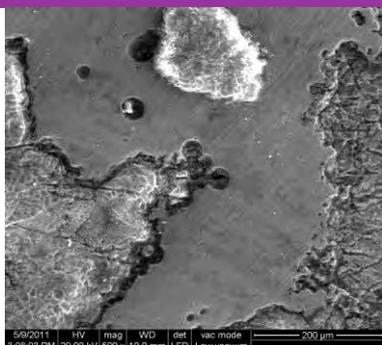
anillos bencénicos *para* sustituidos ($860-800\text{ cm}^{-1}$) o también el grupo R-SOOH ($870-810\text{ cm}^{-1}$) y el pico a 668 cm^{-1} indicaría la presencia del unión $\text{C}\equiv\text{CH}$.

Del mismo modo que para el Fe, para este material, se observaron los efectos de las biopelículas producidos sobre la superficie subyacente del metal luego de su exposición en los circuitos. Estas observaciones, presentadas en la **Figura 58**, se realizaron mediante MEB luego de retirar la biopelícula de los cupones.

Zn expuesto al agua estéril



Zn expuesto al circuito sin As(V)



Zn expuesto al circuito con As(V)

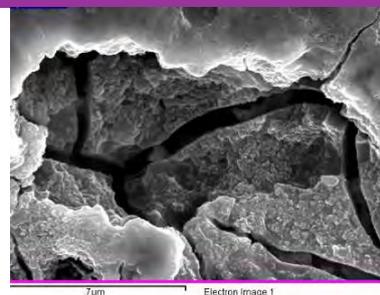
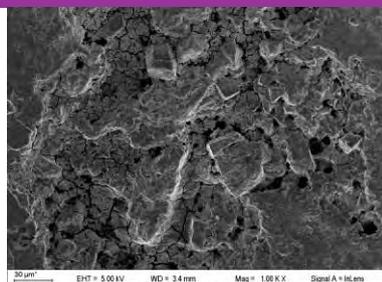
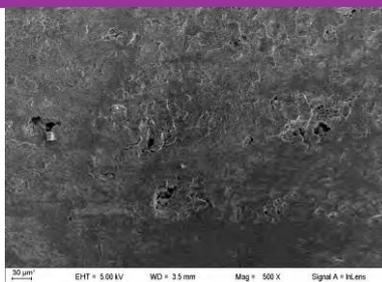


Figura 58. Micrografías de MEB, que muestran el aspecto de la superficie corroída del Zn una vez retirados los depósitos.

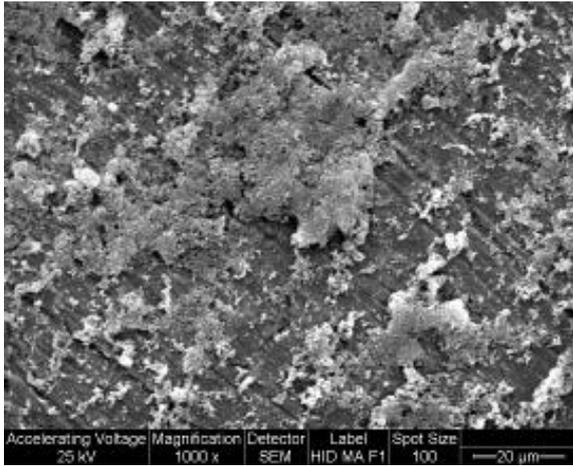
Sobre este material también se ha detectado una corrosión localizada producida por los microorganismos. En general, la razón de este tipo de ataque se correlaciona con la distribución heterogénea de los microorganismos y, en consecuencia, al desarrollo más o menos discontinuo de la biopelícula sobre el sustrato (Dexter, 2003). Así como en el Fe, los óxidos formados sobre los cupones del Zn, aumentan la rugosidad de la superficie, favoreciendo, como se ha mencionado, la concentración de nutrientes orgánicos. Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con estudios en los que el desarrollo de biopelículas sobre materiales de superficies rugosas, como hierro fundido y acero galvanizado, ha sido mayor que en materiales lisos como los de PVC y sus derivados (Camper, 1996; Yu *et al.*, 2010; Chowdhury, 2012).

Cu

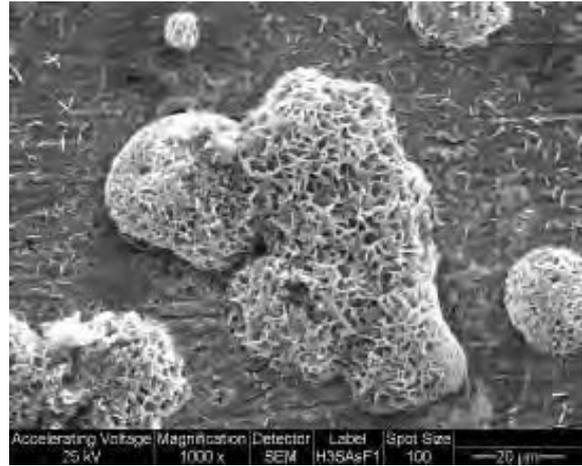
En relación a este material, a lo largo de la exposición de los cupones en los circuitos pudo observarse el depósito de una película delgada de capa simple y generalmente discontinua, pudiendo apreciarse áreas de la superficie del material desnudas (**Figuras 59 y 60**). Se ha demostrado que la presencia de metales tóxicos o un contaminante en el medio (en este caso el arsénico) estimula la producción de MPE, y por lo tanto la formación de biopelículas sobre un sustrato (Fang *et al.*, 2002), sin embargo, la menor susceptibilidad a la colonización del Cu, como se ha observado en los recuentos (Cap.3, sec. 3.1.1.) podría estar relacionada con la naturaleza tóxica de este sustrato (Schwartz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012). A pesar de la menor colonización microbiana, el menor espesor de las películas formadas permitió una mejor visualización de las bacterias en contacto con el material de base tanto en ausencia como en presencia de As(V) (**Figuras 59 y 60**).

Los elementos principalmente detectados mediante EDS sobre los cupones de Cu fueron: Cu, como sustrato de base, O, Fe y Zn, provenientes de los cupones cercanos de dichos materiales y C, proveniente de los depósitos biológicos. En los cupones retirados del circuito con arsénico se detectó también dicho elemento retenido en la película (**Figura 60; ANEXO IV: Figura 3**).

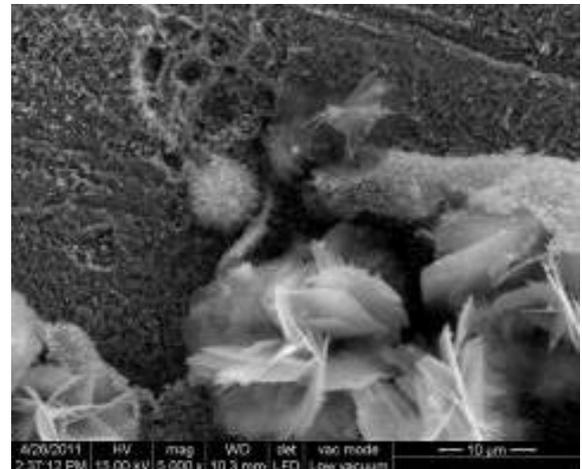
Cu en ausencia de As



C: 5,46; O: 11,21; Si: 3,95; Fe: 3,75;
Cu: 74,06; Zn: 1,57



C: 11,50; O: 19,73; Si: 0,36; K: 0,79
Ca: 0,45; Cu: 67,17



EDS sobre la esfera blanca:
C: 4,01; O: 21,11; Cu: 74,87

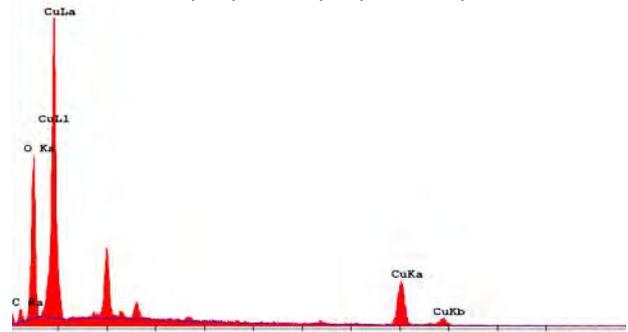
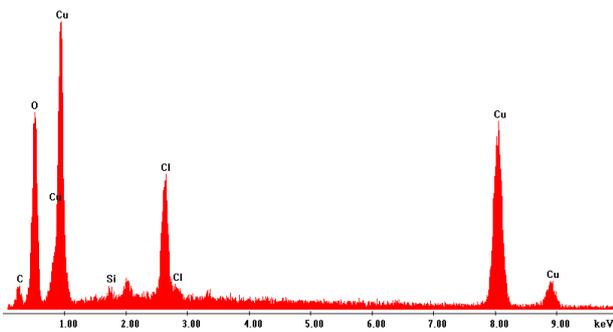
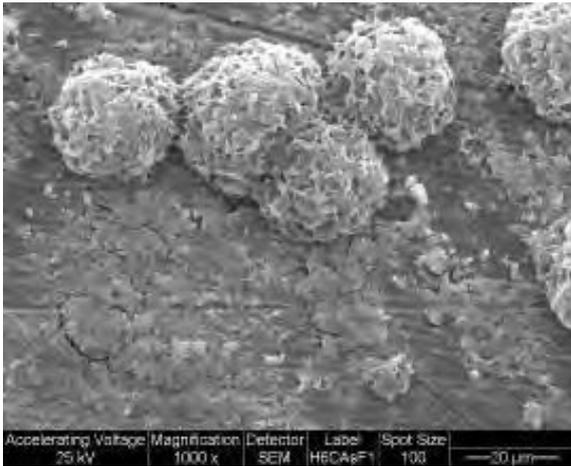


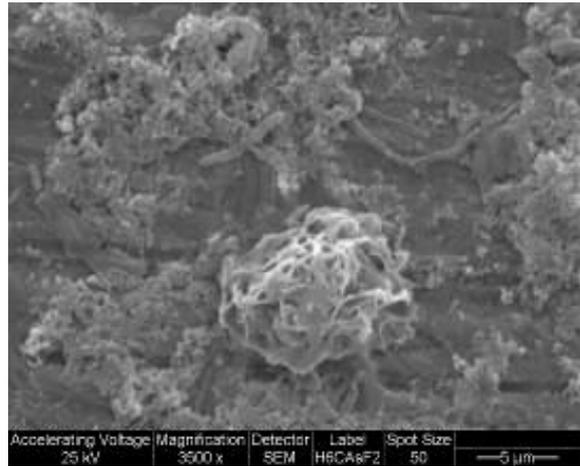
Figura 59. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de Cu, expuestos en el circuito sin As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada microfotografía.

Cu en presencia de As(V)

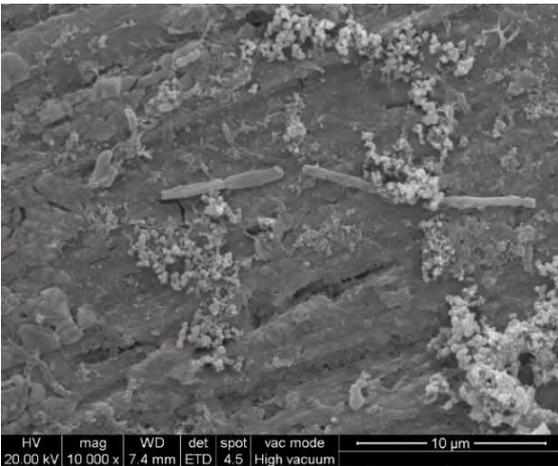


EDS sobre la esferita: C: 11,49; O: 20,04; Si: 0,60; K: 0,54; Ca: 0,91; Fe: 2,47; Cu: 62,84; As: 1,12

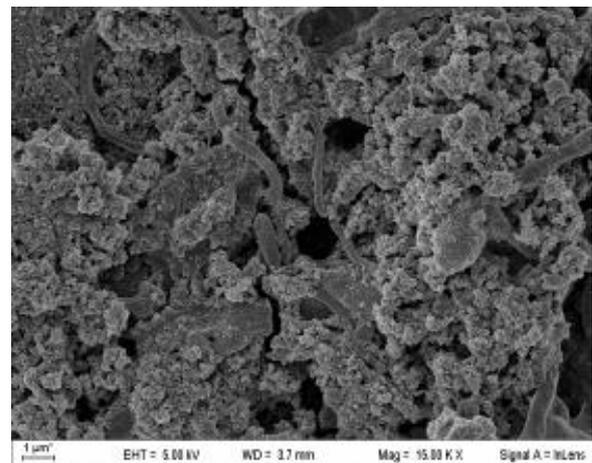
EDS sobre la capa más delgada: C: 5,06; O: 12,85; Si: 1,26; K: 0,27; Ca: 0,53; Fe: 2,23; Cu: 75,12; As: 2,68



C: 7,27; O: 19,63; Si: 0,47; Cl: 3,47; Ca: 0,38; Fe: 1,72; Cu: 59,48; Zn: 2,74; As: 4,84



C: 9,50; O 13,90; Si: 0,97; Cl: 2,03; Ca: 0,20; Fe: 1,18; Cu: 67,42; Zn: 1,38; As 3,42



C: 2,52; O: 8,70; Mg: 4,95; Si: 1,02; Ca: 0,30; Fe: 1,62; Cu: 75,84; Zn: 2,83; As: 2,23

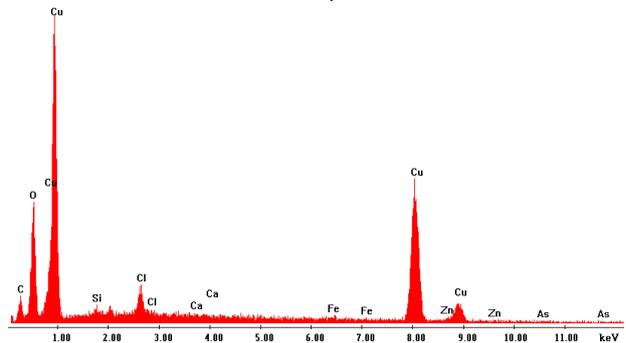
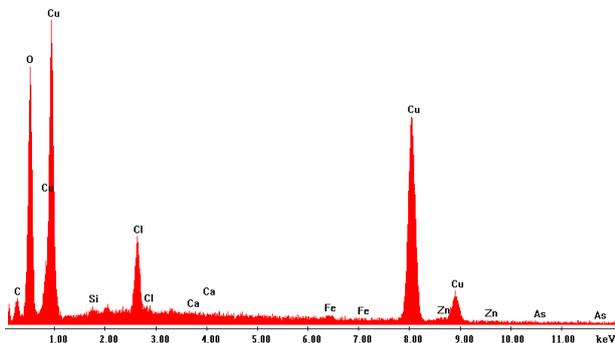


Figura 60. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de Cu, expuestos en el circuito con As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada micrografía.

En las imágenes de MEB pueden notarse estructuras esferoidales, que podrían corresponderse a la cuprita (Cu_2O) identificada mediante el análisis de DRX (**Figura 61**). La presencia de este óxido ha sido reportada en diversas investigaciones abocadas a la corrosión del cobre. En esos estudios se describe la formación de una cubierta uniforme de color marrón-rojiza, atribuida, por DRX a la cuprita (Reyes *et al.*, 2008). Asimismo, estos autores han detectado que las cañerías de cobre de zonas rurales, en las que el agua suele estar estancada por períodos más largos, los productos de corrosión son más porosos y poco adheridos al sustrato observándose además la presencia de biopelículas bacterianas; por el contrario, en cañerías de zonas urbanas, donde hay un flujo de agua más continuo, los productos de corrosión observados fueron más compactos, con presencia de cuprita y tenorita, y no se observó presencia microbiana. Si bien a través del EDS se detectó arsénico en los cupones expuestos al circuito con $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de este elemento en el agua, entre los productos depositados no se identificó, a través de DRX, la formación de ningún compuesto cristalino con arsénico.

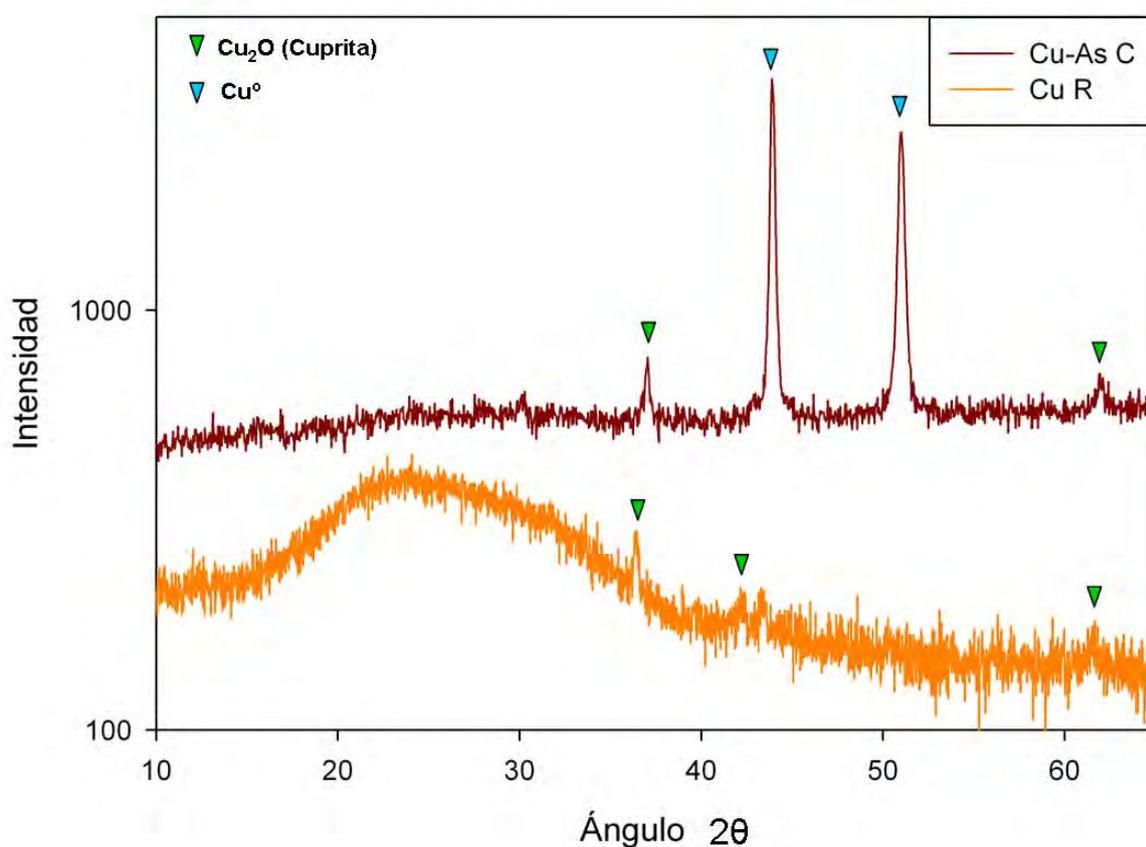


Figura 61. Difractograma de RX obtenido de cupones de Cu expuestos en presencia de arsénico (Cu-As C) y de productos raspados de cupones expuestos en ausencia de arsénico (Cu R).

Como se hizo para los sustratos anteriormente analizados, para el Cu también se compararon los espectros obtenidos por FT-IR de cupones no expuestos (control) frente a los cupones con biopelículas formadas durante la exposición en los sistemas de circulación (**Figura 62**).

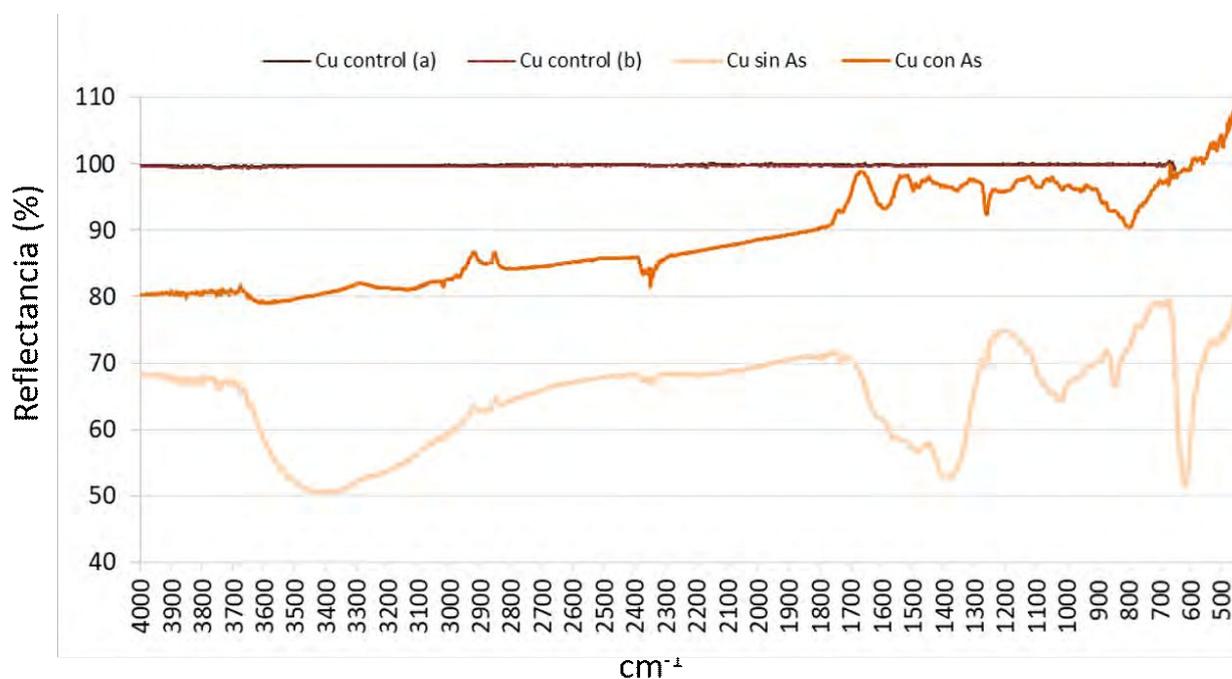


Figura 62. Espectros FT-IR obtenidos para los cupones de Cu no expuestos (control) y expuestos a los sistemas de circulación en presencia y ausencia de arsénico.

Posteriormente, a partir de los programas informáticos y la bibliografía ya mencionados se realizaron las derivadas primera y segunda de los espectros y se identificaron los grupos químicos presentes (**Figura 63 a y b**). Puede notarse que en ambos espectros del Cu se observan varias señales localizadas dentro del rango 3600-4000 cm^{-1} atribuidos al H_2O e impurezas.

En el espectro correspondiente a cupones de Cu expuestos al circuito sin arsénico (**Figura 63 a**) se obtuvieron picos atribuibles a los siguientes grupos funcionales: a 2890 y 2830 cm^{-1} , grupos aldehídos; a 2348 cm^{-1} , grupos NH^+ o NH_2^+ de sales de aminas; a 1725 cm^{-1} , C=O de aldehídos o ésteres; a 1482 cm^{-1} se observa una señal atribuible a compuestos nitrogenados (sales de amonio o amidas cíclicas); a 1388 cm^{-1} , grupos metil/metileno; a 1263 cm^{-1} , el grupo NH (1305-1200 cm^{-1}) y C-N (1320-1200 cm^{-1}) de amidas como R-CO-NH-C o R-CO-NH-CO-NHR

respectivamente, así como también la unión C-O de ácidos carboxílicos como C-C-COOH y C=C-COOH ($1320-1211\text{ cm}^{-1}$); a 1023 cm^{-1} , alcoholes primarios, unión S=O de un ácido sulfínico (R-SOOH), así como también de un anhídrido; a 840 cm^{-1} , aminas primarias y anillos bencénicos *para* sustituidos ($860-800\text{ cm}^{-1}$); a 669 cm^{-1} , presencia del unión C≡CH y a 617 cm^{-1} el grupo SO_4^{2-} .

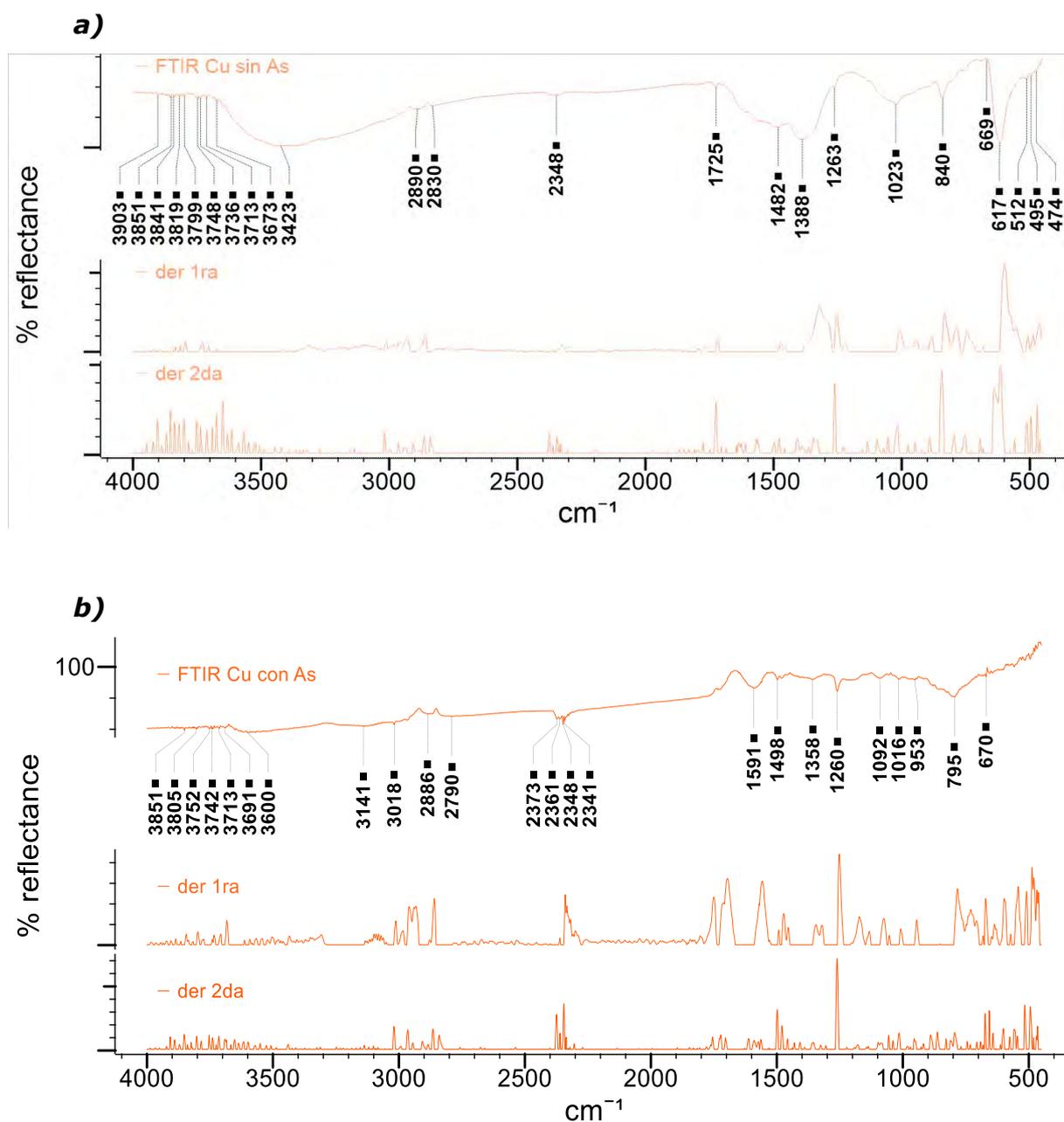
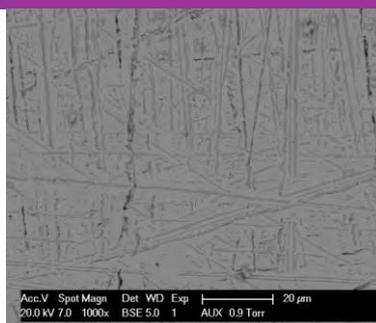


Figura 63. FT-IR de las biopelículas depositadas sobre Cu **(a)** en ausencia y **(b)** en presencia de 5mg.L de As(V) en el agua, y sus derivadas primera y segunda.

En el espectro del Cu expuesto al circuito con As (**Figura 63 b**) se pudieron detectar señales atribuibles a grupos funcionales como: a 3018 cm^{-1} , dímeros de ácidos carboxílicos o epóxidos; a 2886 cm^{-1} , unión C-H de aldehídos, a 2790 cm^{-1} , grupo -OH de ácidos carboxílicos; se identifican varios picos a 2373 , 2361 , 2348 y 2341 cm^{-1} correspondientes a la zona de detección de sales de aminas; entre los 1800 y 1700 cm^{-1} , unión C=O de aldehídos, ésteres o ácidos carboxílicos; a 1591 cm^{-1} , sales ácidas, aminoácidos y la unión N-H de sales de aminas primarias y secundarias; a 1498 cm^{-1} , anillo aromático; a 1260 cm^{-1} , grupo NH (1305 - 1200 cm^{-1}) y C-N (1320 - 1200 cm^{-1}) de amidas R-CO-NH-C y R-CO-NH-CO-NHR respectivamente, así como también la unión C-O de ácidos carboxílicos como C-C-COOH y C=C-COOH (1320 - 1211 cm^{-1}); a 1092 y 1016 cm^{-1} , alcoholes primarios, la unión S=O de un ácido sulfínico (R-SOOH), así como también de un anhídrido; a 953 cm^{-1} (muy débilmente marcada en la derivada segunda), dímeros de ácidos carboxílicos y/o de sales de amonio cuaternario; a 795 cm^{-1} , bencenos *meta* sustituidos y/o nitritos y a 670 cm^{-1} , unión $\text{C}\equiv\text{CH}$.

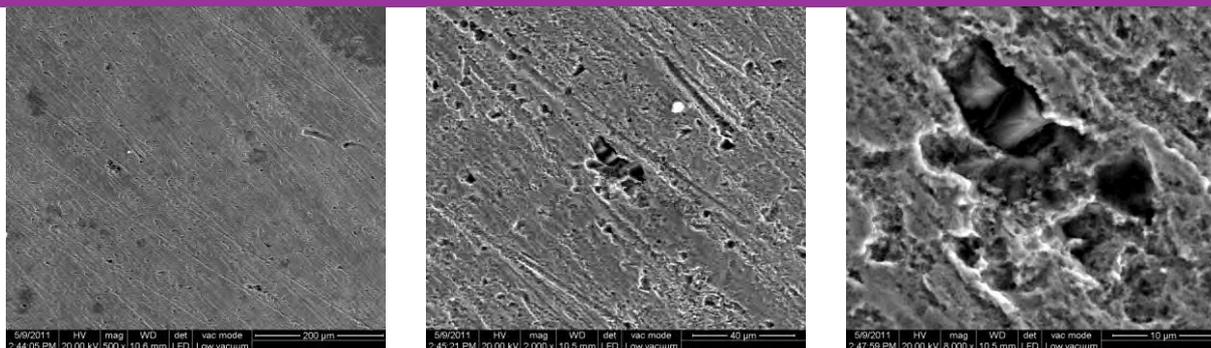
Luego del período de exposición de los cupones en los circuitos, algunos de ellos se limpiaron y observaron al MEB, para analizar los efectos producidos por los microorganismos. En la **Figura 64** se presentan los resultados obtenidos.

Cu expuesto al agua estéril



Continúa

Cu expuesto al circuito sin As(V)



Cu expuesto al circuito con As(V)

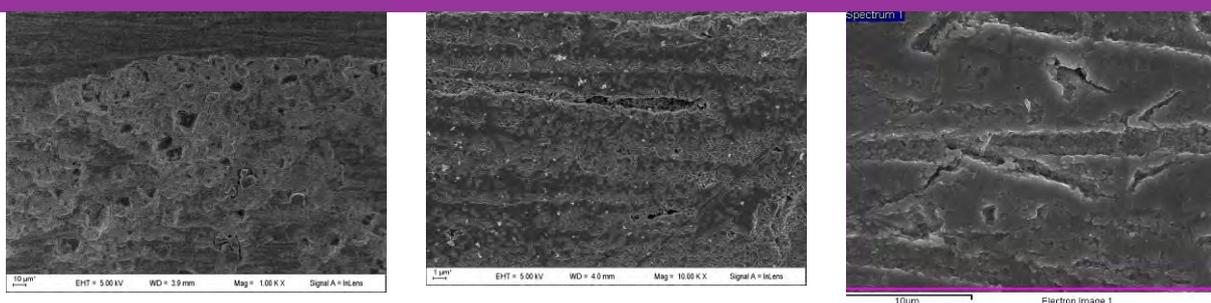


Figura 64. Micrográficas de MEB, que muestran el aspecto de la superficie corroída del Cu una vez retirados los depósitos.

La corrosión del cobre, en redes de distribución de agua potable, puede manifestarse como un ataque localizado, así como también de manera generalizada. Desde hace muchos años se sabe que, si bien, las características químicas del agua como pH, alcalinidad y materia orgánica influyen sobre la tasa de corrosión del cobre (Broo *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 2008), también se ha implicado a los microorganismos en este proceso (Arens *et al.*, 1995). Se han aislado diversos géneros bacterianos tolerantes al Cu, así como también se ha comprobado el desarrollo de biopelículas en superficies de cañerías de Cu corroídas (Critchley *et al.*, 2003). La presencia de microorganismos, en particular el MPE producido por ellos, disminuye el pH de la interfase solución-cobre, aumentando la disolución de la capa protectora de este metal (Davison *et al.*, 1996) y en consecuencia generando valores elevados de Cu en el agua. Esto tiene gran implicancia, no solo en las características estéticas del agua potable, sino también en la salud de la población que consume dicha agua (Pizarro *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo, mediante los análisis de FT-IR y de las observaciones al MEB, concuerdan con los de otros autores (Geesey *et al.*, 1994;

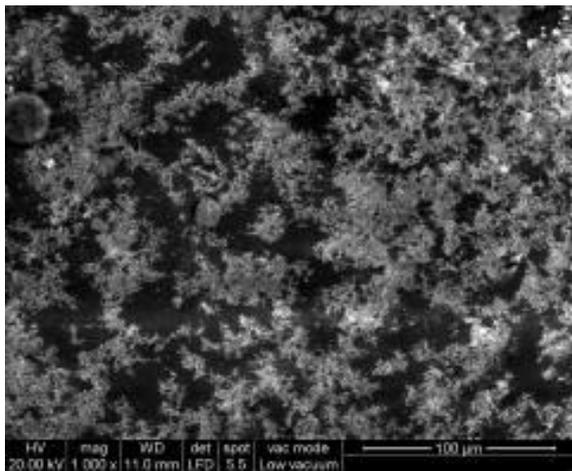
Bremer *et al.*, 2001) que han encontrado, en sistemas de Cu, irregularidades y picaduras notables y de diversos tamaños asociados al crecimiento desigual de las biopelículas y a la naturaleza generalmente ácida de algunos compuestos presentes en el MPE. Asimismo, las imágenes del MEB (**Figura 64**) indican que, en general, la corrosión del Cu se ha localizado en las líneas producidas durante la preparación de los cupones, previo a su exposición.

PP

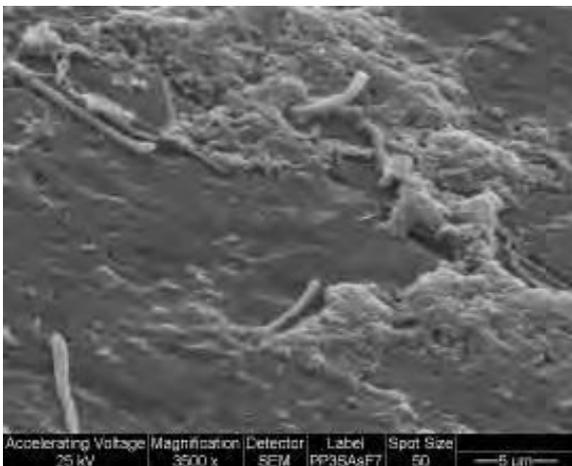
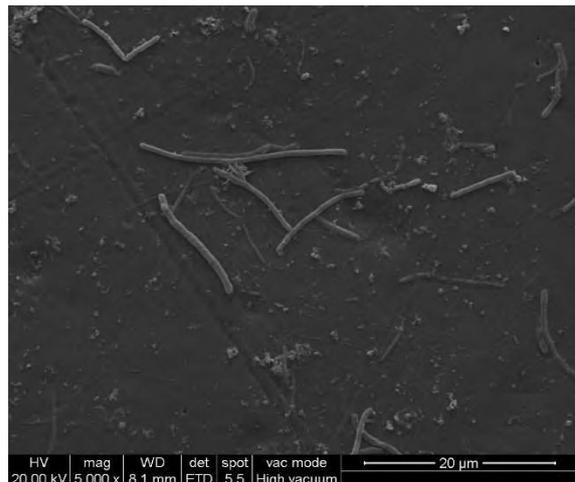
Con el objeto de reducir los problemas de corrosión, se han ido incorporando nuevos materiales en la construcción de redes de agua potable, como los materiales poliméricos. A pesar de que algunos estudios muestran que los materiales plásticos pueden ayudar al desarrollo de las biopelículas, el crecimiento en las tuberías plásticas es generalmente igual o menor que en el hierro, el acero o el cemento (Camper *et al.*, 1996; Niquette *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2010).

Mediante la observación en el MEB de los cupones expuestos en ambos circuitos, puede notarse la formación de una película delgada de capa simple y discontinua, semejante a la observada sobre el Cu, apreciándose una considerable parte de la superficie del material descubierta (**Figuras 65 y 66**). A partir del análisis EDS de dichos cupones, se detectó principalmente C y O, que son los elementos constituyentes del PP, así como también Fe, Zn y Cu, procedentes de los productos de corrosión de los cupones metálicos cercanos, transportados por el agua durante la circulación. Entre estos depósitos es donde se encontró el MPE y las bacterias adheridas. También fue posible detectar la presencia de arsénico sobre los cupones expuestos en el circuito que contenía dicho elemento.

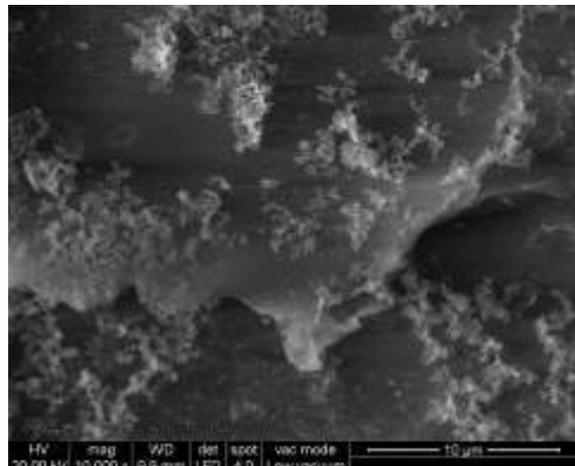
PP en ausencia de As



C: 76,93; O: 15,82; Na: 2,04; Al: 0,17;
Si: 0,20; Cl: 0,33; Ca: 0,04; Fe: 1,25;
Cu: 1,99; Zn: 1,23



C: 83,81; O: 12,04; Si: 0,55; K: 0,30;
Fe: 1,94; Cu: 1,37



C: 81,97; O: 11,90; Na: 1,58; Al: 0,11;
Si: 0,19; Cl: 0,23; Fe: 1,29; Cu: 1,80;
Zn 0,93

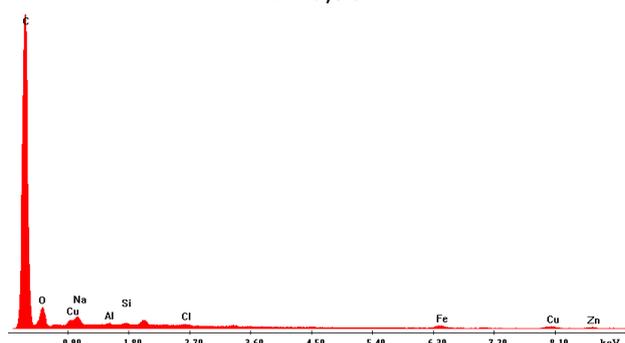
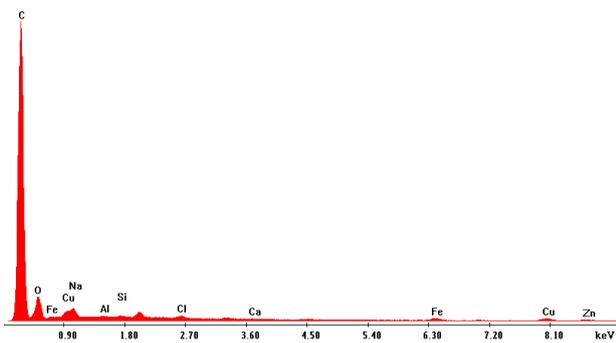
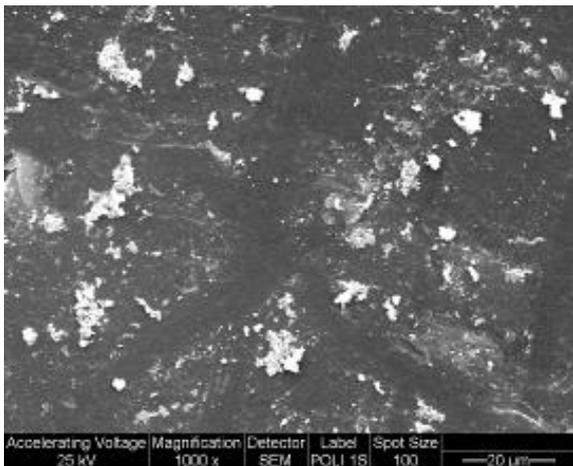
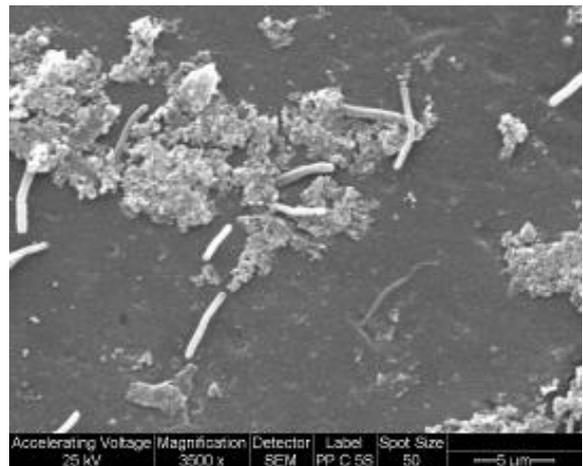


Figura 65. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de PP, expuestos en el circuito sin As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada micrografía.

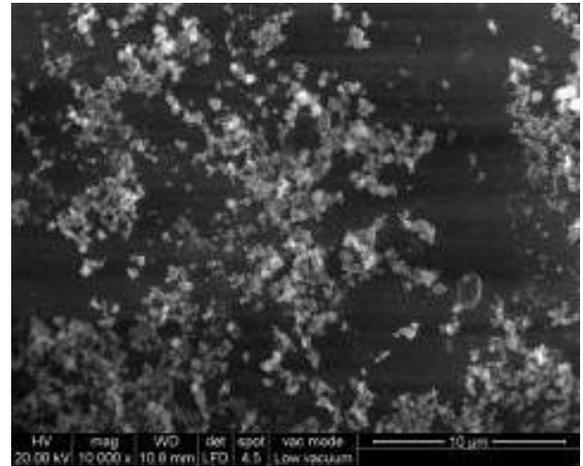
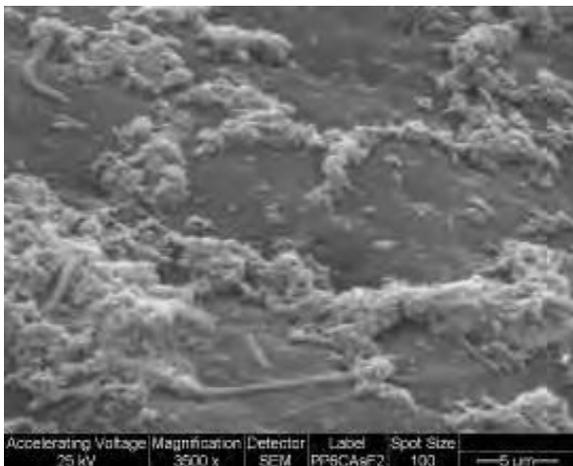
PP en presencia de As



C: 78,66; O: 7,12; Mg: 0,81; Si: 1,95;
Fe: 2,05; Cu: 4,26; Zn: 3,53; As: 1,61



EDS en zona con productos: C: 63,48; O: 20,94;
Al: 1,33; Si: 1,23; Fe: 3,76; Cu: 2,78;
Zn: 4,36; As: 2,11



C: 81,60; O: 16,44; Cl: 0,53; As: 1,44

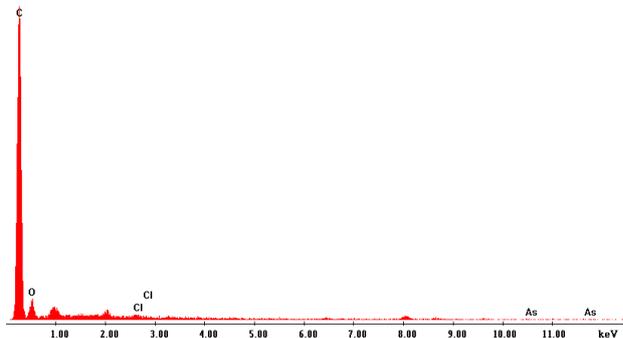
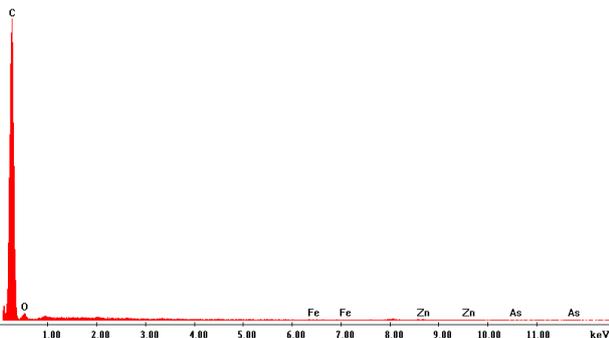


Figura 66. Microfotografías obtenidas con el MEB de cupones de PP, expuestos en el circuito con As(V). Los valores de los EDS se encuentran expresados en porcentaje y se muestran debajo de cada microfotografía.

El análisis por DRX de los cupones de PP expuestos al circuito con arsénico (**Figura 67**) evidencia la base de composición orgánica de γ -polipropileno isotáctico $(C_3H_6)_n$ (con todos los metilos dispuestos hacia el mismo lado de la cadena principal), con picos característicos en 2θ : 14,4; 17,2; 18,8; 21,4; 22,1; 25,7

(Quijada Garrido, 1996; Mora *et al.*, 2015). Algunos picos detectados (2θ : 18; 26,1; 26,9; 28; 32,9; 34,2; 35; 40) son compatibles con el espectro del óxido arsenioso (claudetita, As_2O_3), lo que podría indicar la presencia de este compuesto en la película formada, aunque podrían estar enmascarados por los picos propios del PP. La existencia de As (III) en cupones de PP probablemente sea el resultado de la reducción del As(V) añadido al agua. En ausencia de cualquier efecto galvánico, la presencia de As(III) revelaría la existencia de alguna/s especie/s bacteriana/s capaz/ces de utilizar este elemento como un aceptor de electrones durante la respiración anaeróbica, o de reducir el As(V) en As(III) como un mecanismo de resistencia (Oremland y Stolz, 2005). Varios autores (Oremland *et al.*, 2004; Oremland y Stolz, 2005) han puesto en evidencia que la movilidad del arsénico en aguas contaminadas podría estar asociada a la interacción con biopelículas microbianas de estructura diversa. Cabe recordar que durante este trabajo se identificaron diversas bacterias (*Delftia sp.*, *Bacillus cereus*) aisladas de biopelículas formadas sobre PP, en las cuales se detectó la presencia del gen *arsC* implicado en los mencionados procesos.

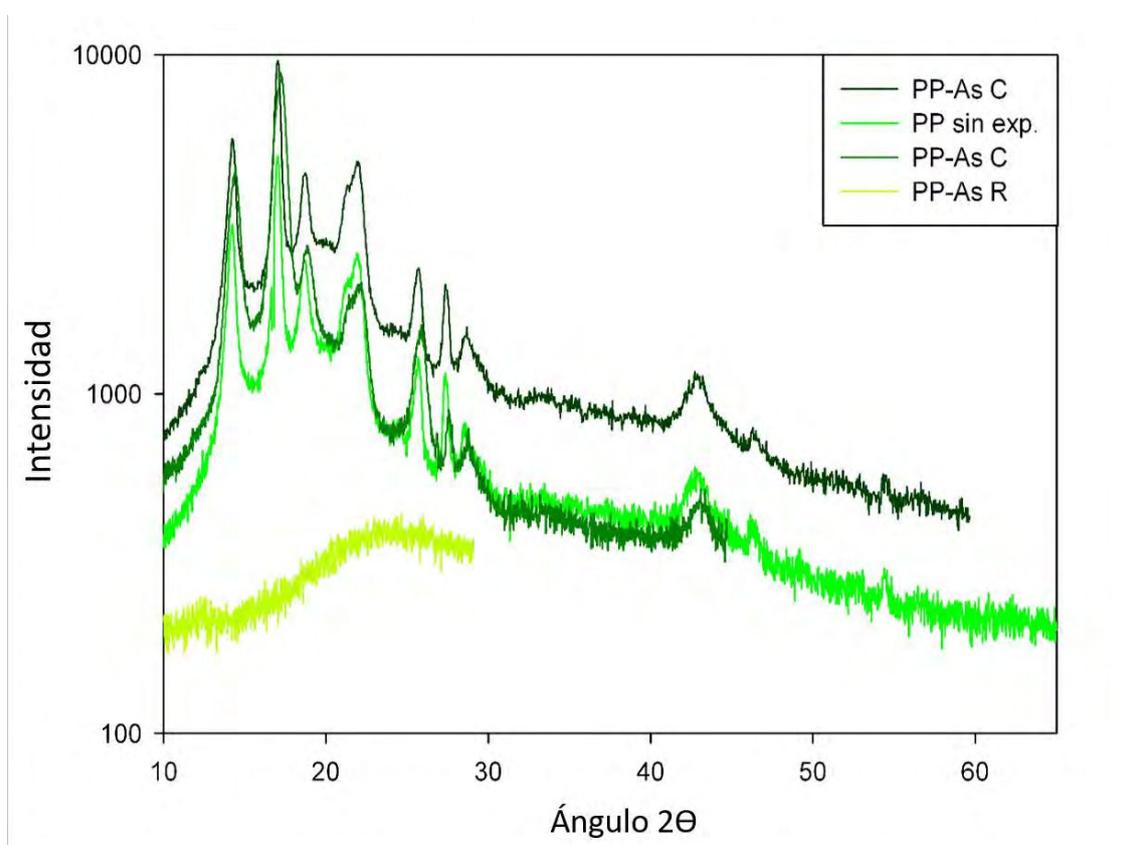


Figura 67. Difractograma de RX obtenido de cupones de PP no expuestos, expuestos en presencia de arsénico (PP-As C) y de sus productos raspados (PP-As R).

Para este material, también se realizó el análisis por FT-IR, tanto del material no expuesto (control) como de cupones de PP expuestos en el circuito con 5 mg.L⁻¹ de As(V) (**Figura 68**). En este caso, en el material sin exponer, se identificaron los tres grupos de bandas correspondientes a movimientos de tensión de los enlaces C-H a 2900 cm⁻¹, movimientos de tensión C-C en 1350-1450 cm⁻¹ y a movimientos de flexión de -CH₃ entre 1200-1000 cm⁻¹ característicos del PP (Velandia Cabra, 2017).

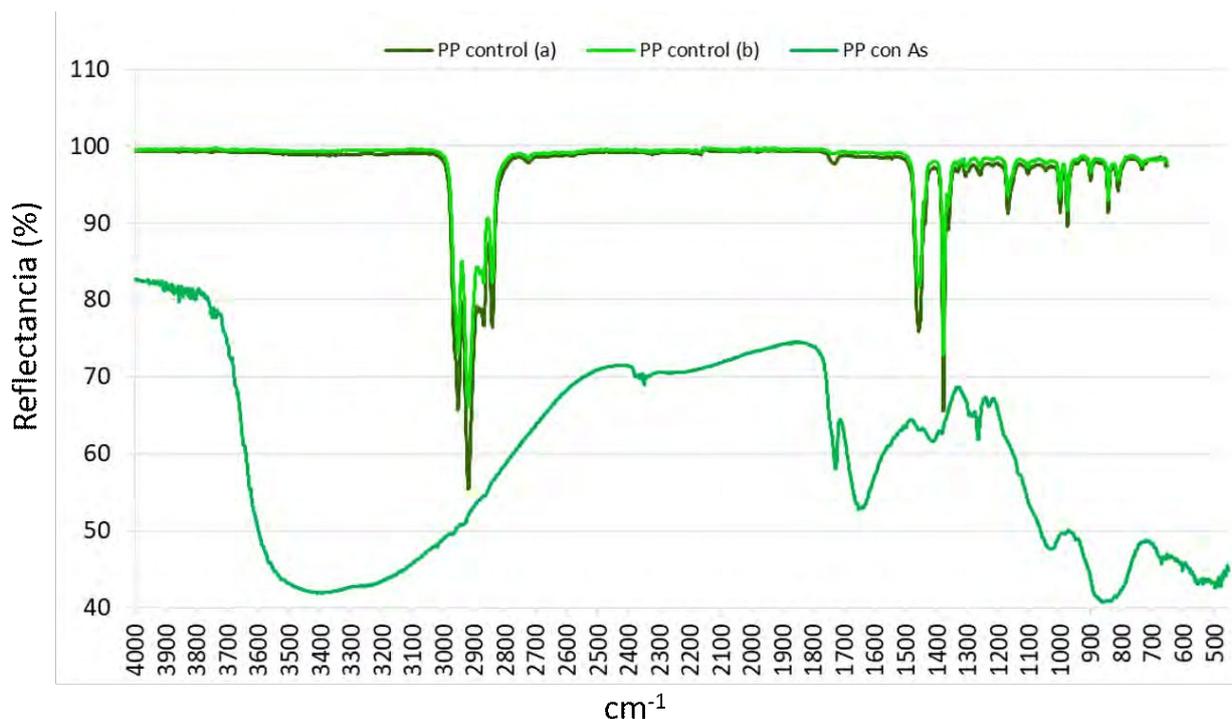


Figura 68. Espectros FT-IR obtenidos para los cupones de PP no expuestos (control) y expuestos al circuito en presencia de arsénico.

Luego, a partir de los programas informáticos y bibliografía se obtuvieron las derivadas primera y segunda del espectro y se identificaron los grupos funcionales presentes en las biopelículas (**Figura 69**).

Las primeras señales observadas (3855, 3819, 3804 y 3747 cm⁻¹) están localizadas dentro del rango 3600-4000 cm⁻¹ identificado como H₂O e impurezas; las otras señales que se encontraron son atribuibles a los siguientes grupos funcionales: a 2347 cm⁻¹, grupos NH⁺ o NH₂⁺ de sales de aminas, o también podría indicar la presencia de algún compuesto de P (R-PH₂); a 1725 cm⁻¹, C=O de aldehídos o ésteres; a 1651 cm⁻¹, C=O fuerte de ureas tales como (R)₂N-(C=O)

(1660-1625 cm^{-1}) o R-NH-(C=O) (1680-1635 cm^{-1}); a 1412 cm^{-1} , alcoholes OH-R-OH; los picos a 1263 y 1230 cm^{-1} indicarían la presencia del grupo NH (1305-1200 cm^{-1}) y C-N (1320-1200 cm^{-1}) de amidas como R-CO-NH-C y R-CO-NH-CO-NHR respectivamente, así como también la unión C-O de ácidos carboxílicos como C-C-COOH y C=C-COOH (1320-1211 cm^{-1}); a 1023 cm^{-1} , alcoholes primarios, unión S=O de un ácido sulfínico (R-SOOH), así como también de un anhídrido; a 862 cm^{-1} , nitratos o el grupo R-SOOH (870-810 cm^{-1}) y el pico a 668 cm^{-1} , grupo $\text{C}\equiv\text{CH}$.

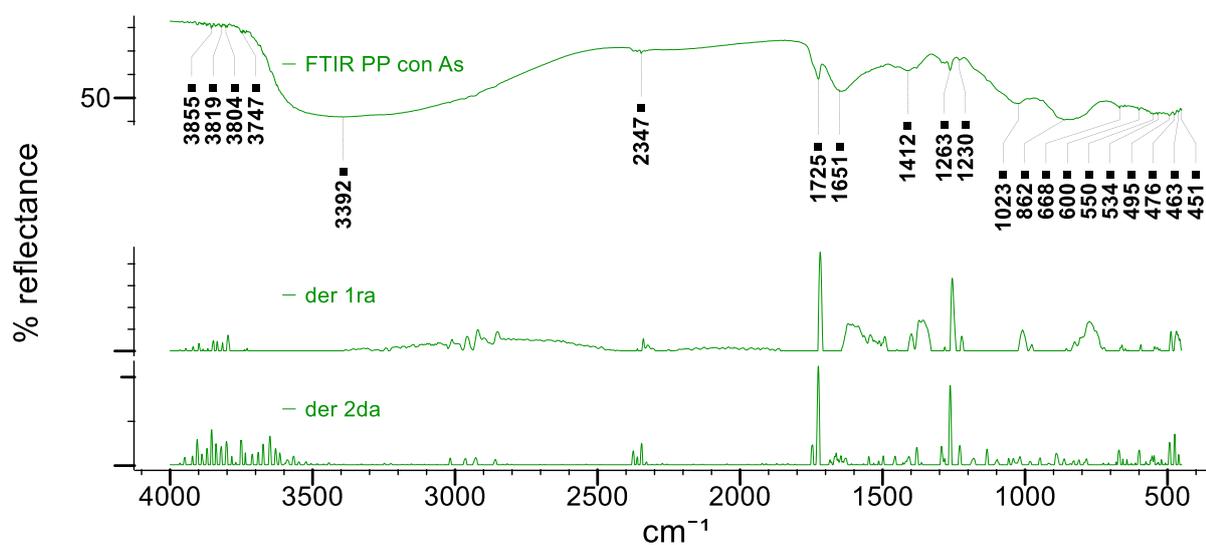


Figura 69. FT-IR de las biopelículas depositadas sobre PP en presencia de 5mg.L de As(V) en el agua, y sus derivadas primera y segunda.

Si bien en los últimos años se han ido reemplazando los materiales metálicos en las redes de distribución de agua potable por materiales poliméricos, como se ha mencionado anteriormente, estos materiales contienen muchos aditivos para mejorar sus propiedades físicas y químicas (Brocca *et al.*, 2002). La mayoría de estos compuestos, son moléculas orgánicas aromáticas que presentan elementos como nitrógeno, azufre o fósforo, los cuales pueden influenciar el crecimiento microbiológico dentro de la cañería (Lethola *et al.*, 2004). Es por ello que tanto los materiales metálicos como los no metálicos sumergidos en ambientes acuosos o en condiciones de alta humedad son también susceptibles a la bioincrustación y/o al biodeterioro (Ji-Dong Gu, 2003).

Cabe destacar que los defectos observados en la superficie de los cupones de PP, aún detectados en cercanías de bacterias, no fue posible atribuirlos exclusivamente a un efecto de biodeterioro o biodegradación generado por éstas, ya que durante el proceso de termocompresión del material se generaron fallas o imperfecciones sobre el mismo (**Figura 70**).

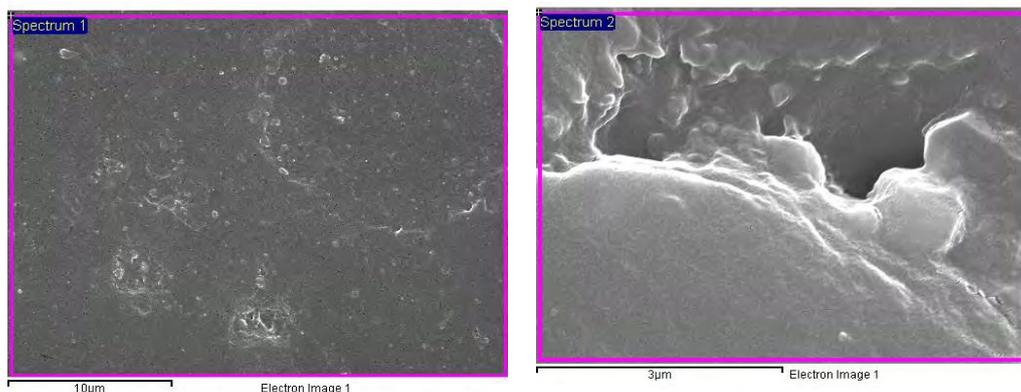


Figura 70. PP no expuesto, detalles de defectos generados durante la termocompresión.

3.3.2. Reconstrucción 3D de las biopelículas desarrolladas.

Si bien el MEB, como se ha visto hasta ahora, permite una visualización de mayor resolución de las biopelículas microbianas respecto de otras técnicas de imagen (Walker *et al.*, 2001), los requisitos para la observación de las muestras biológicas pueden introducir artefactos (Richards y Turner, 1984; Priester *et al.*, 2007). Un análisis de las biopelículas sin alteraciones proporcionaría una información complementaria de las mismas. Con este propósito se ha utilizado el MLC, ya que permite la representación y reconstrucción en 3D a partir del procesamiento de una serie de imágenes digitales 2D (Lawrence *et al.*, 1996). Esta reconstrucción proporciona un mejor entendimiento de la estructura interior y exterior, la distribución y compactibilidad de las biopelículas (Neu *et al.*, 2010). Usando este microscopio, se tomaron imágenes de las biopelículas, en sitios seleccionados aleatoriamente, cada 5 µm a lo largo del espesor de la biopelícula. En las **Figuras 71-78** se muestra una selección de imágenes de las biopelículas formadas sobre cada material en presencia y ausencia de As(V), estas imágenes permiten una visualización e interpretación del desarrollo de la biopelícula durante la exposición de los cupones en los sistemas de circulación.

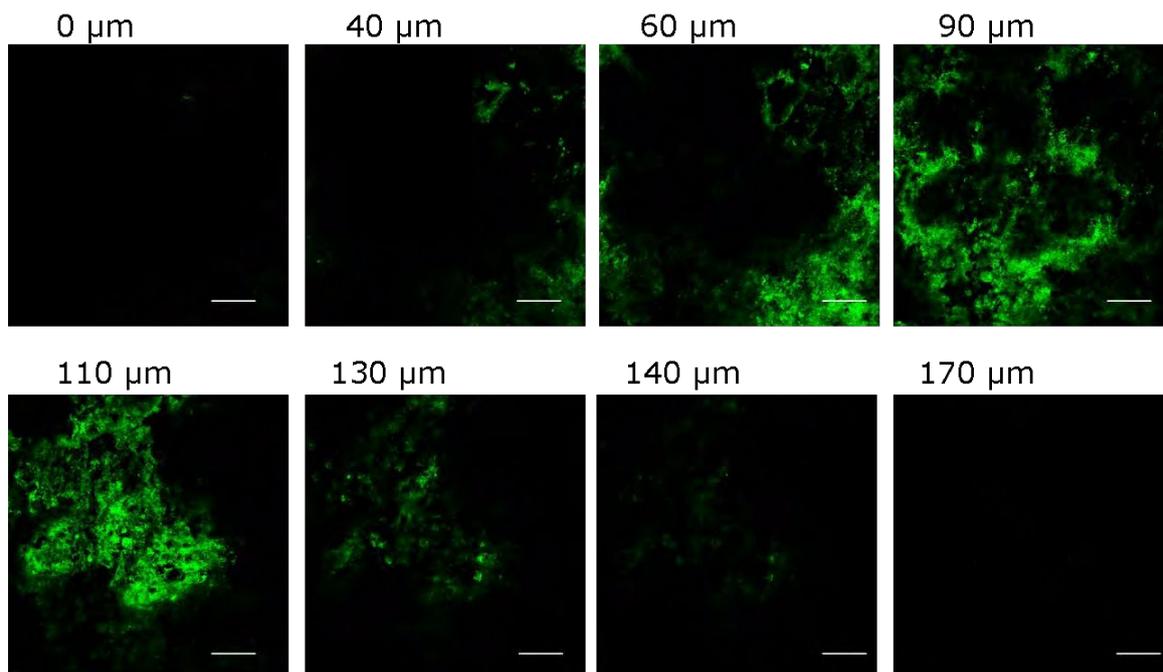


Figura 71. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de Fe en ausencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

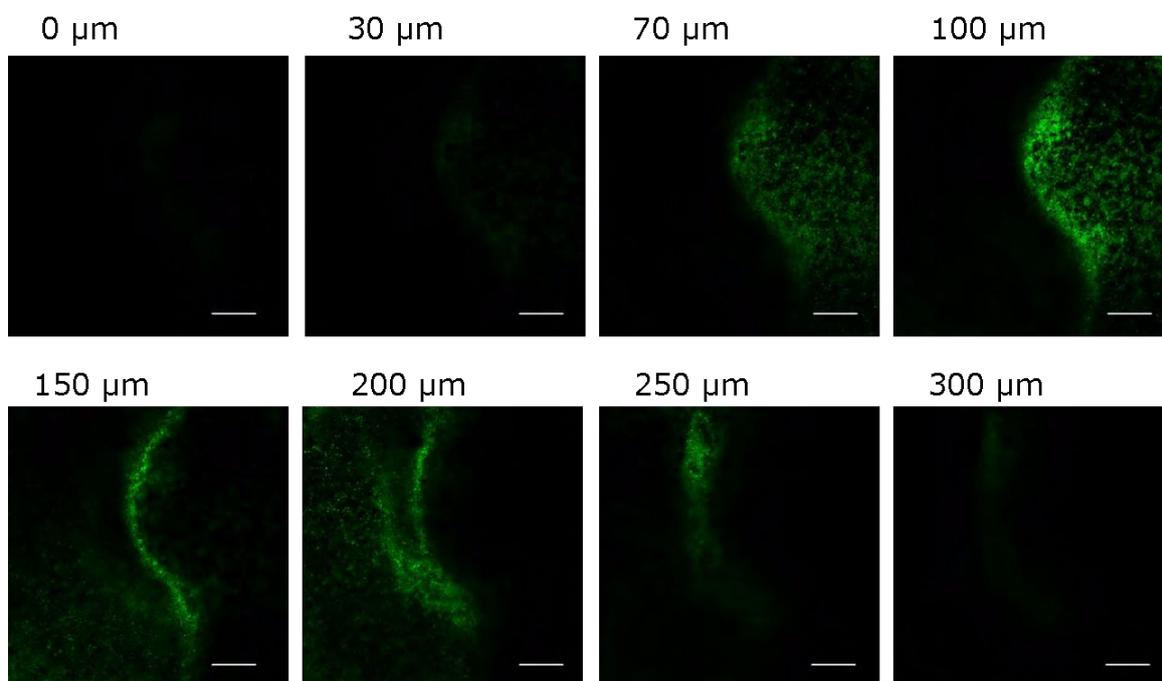


Figura 72. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de Fe en presencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

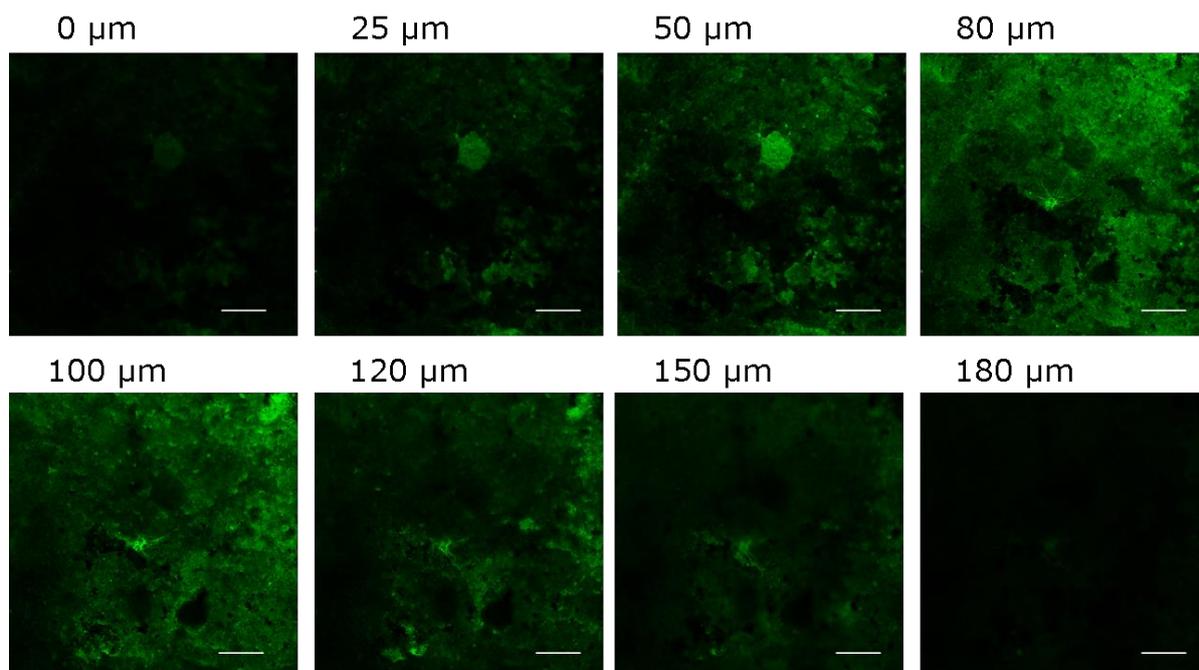


Figura 73. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de Zn en ausencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

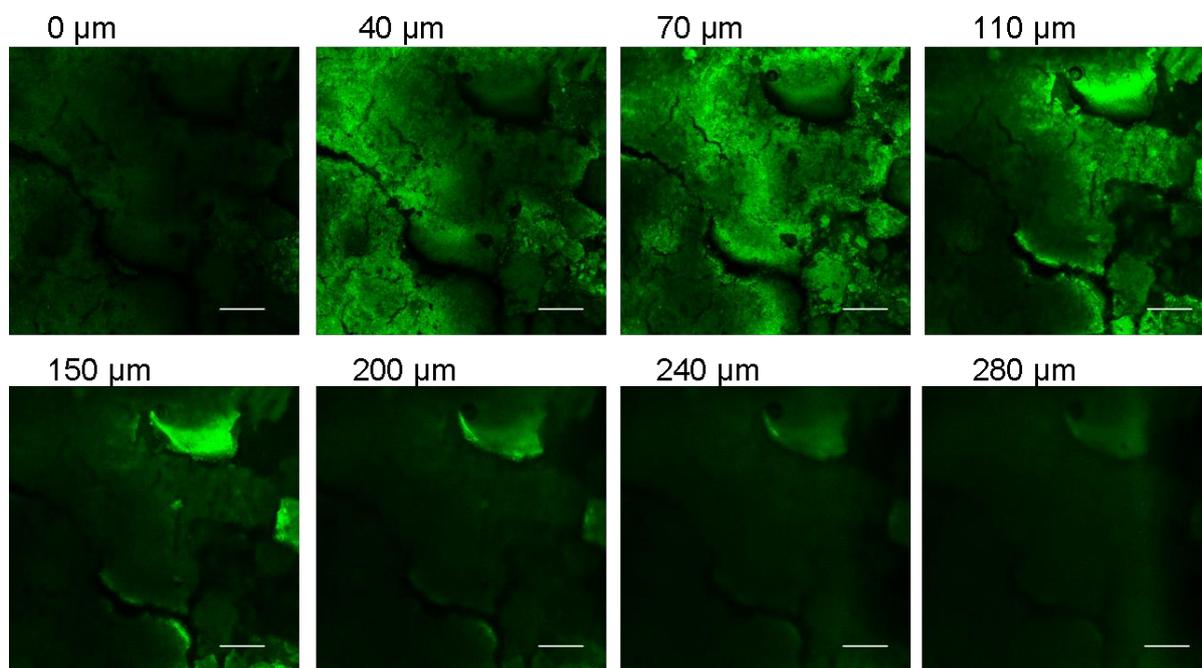


Figura 74. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de Zn en presencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

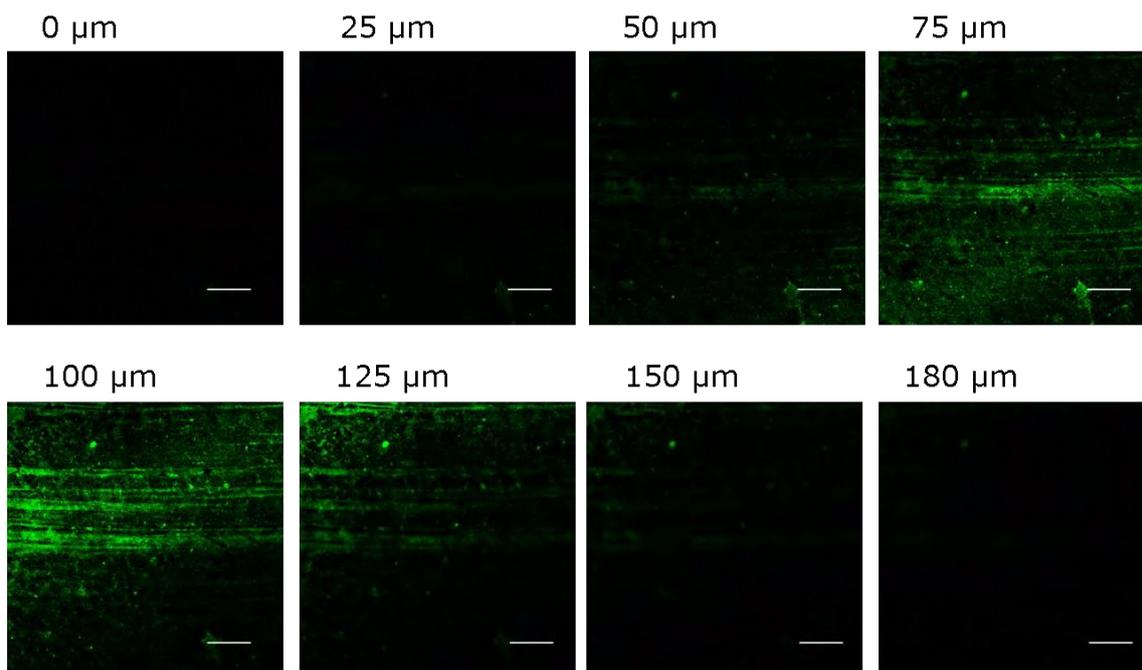


Figura 75. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de Cu en ausencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

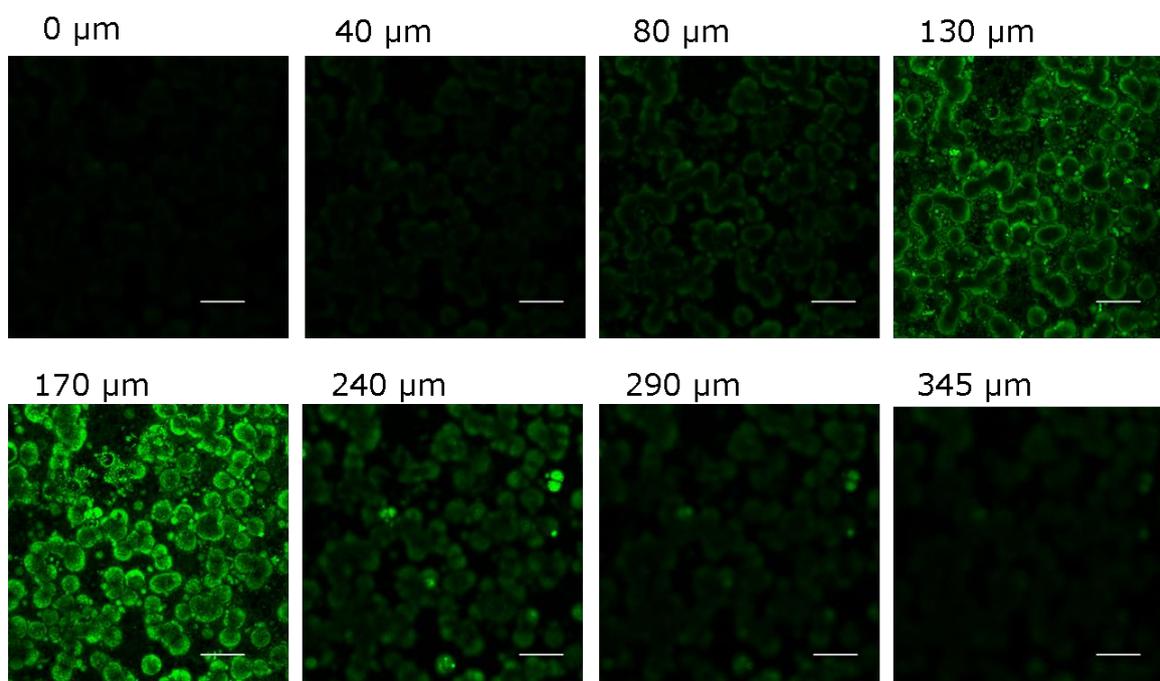


Figura 76. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de Cu en presencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

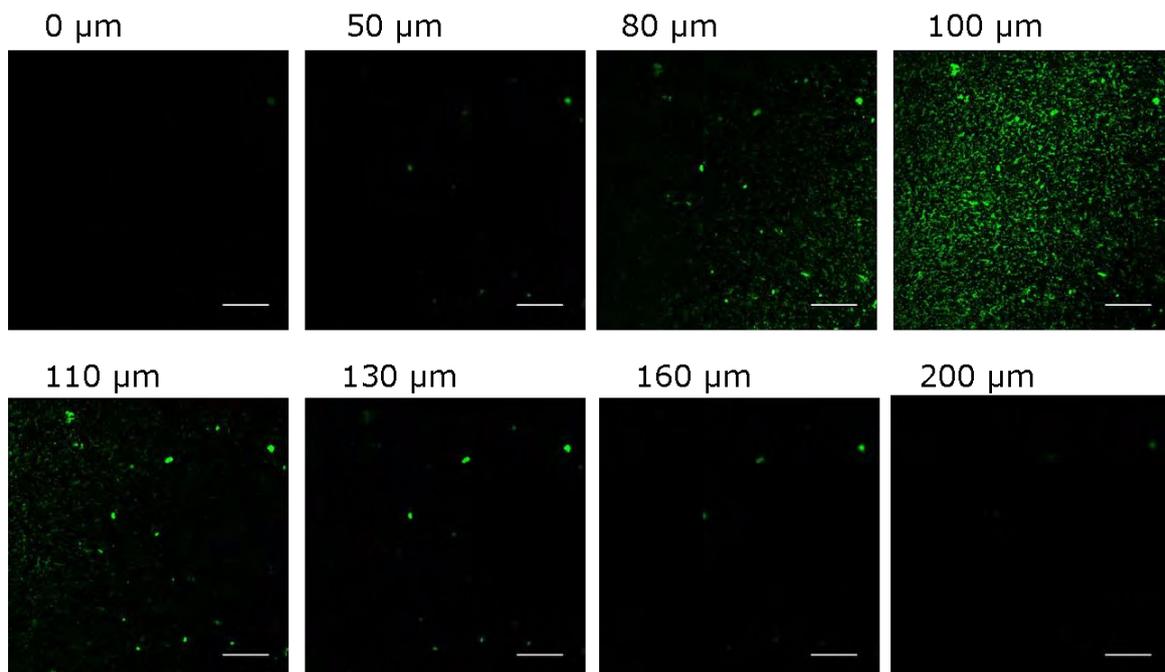


Figura 77. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de PP en ausencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

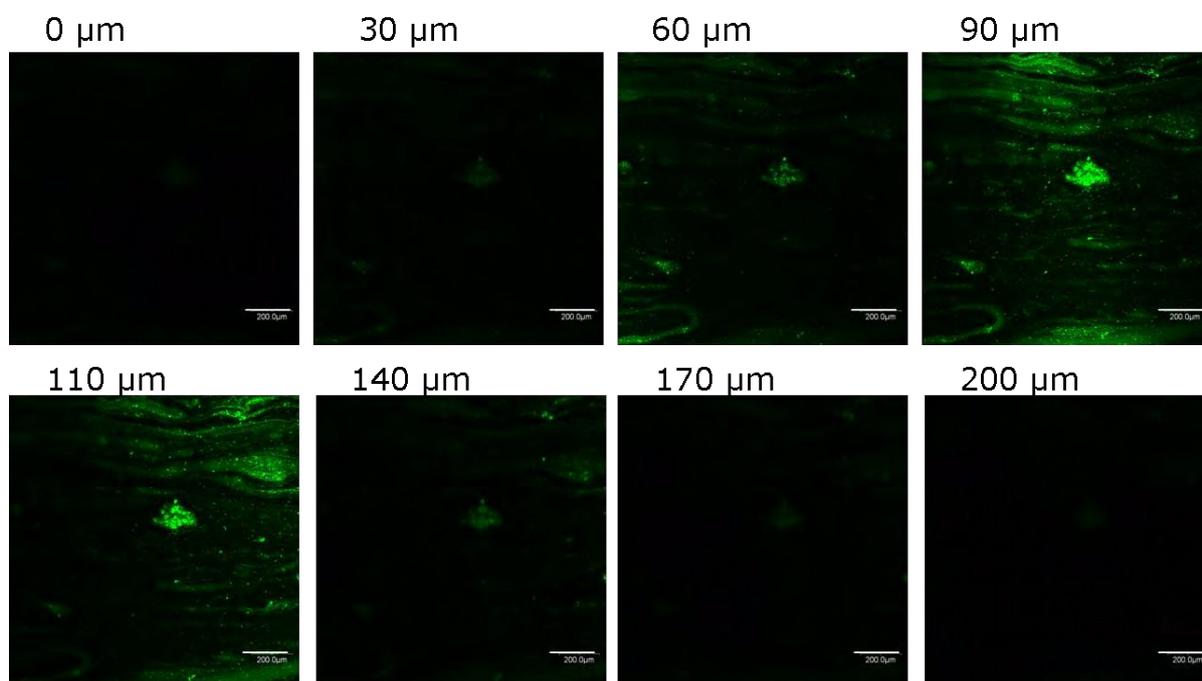
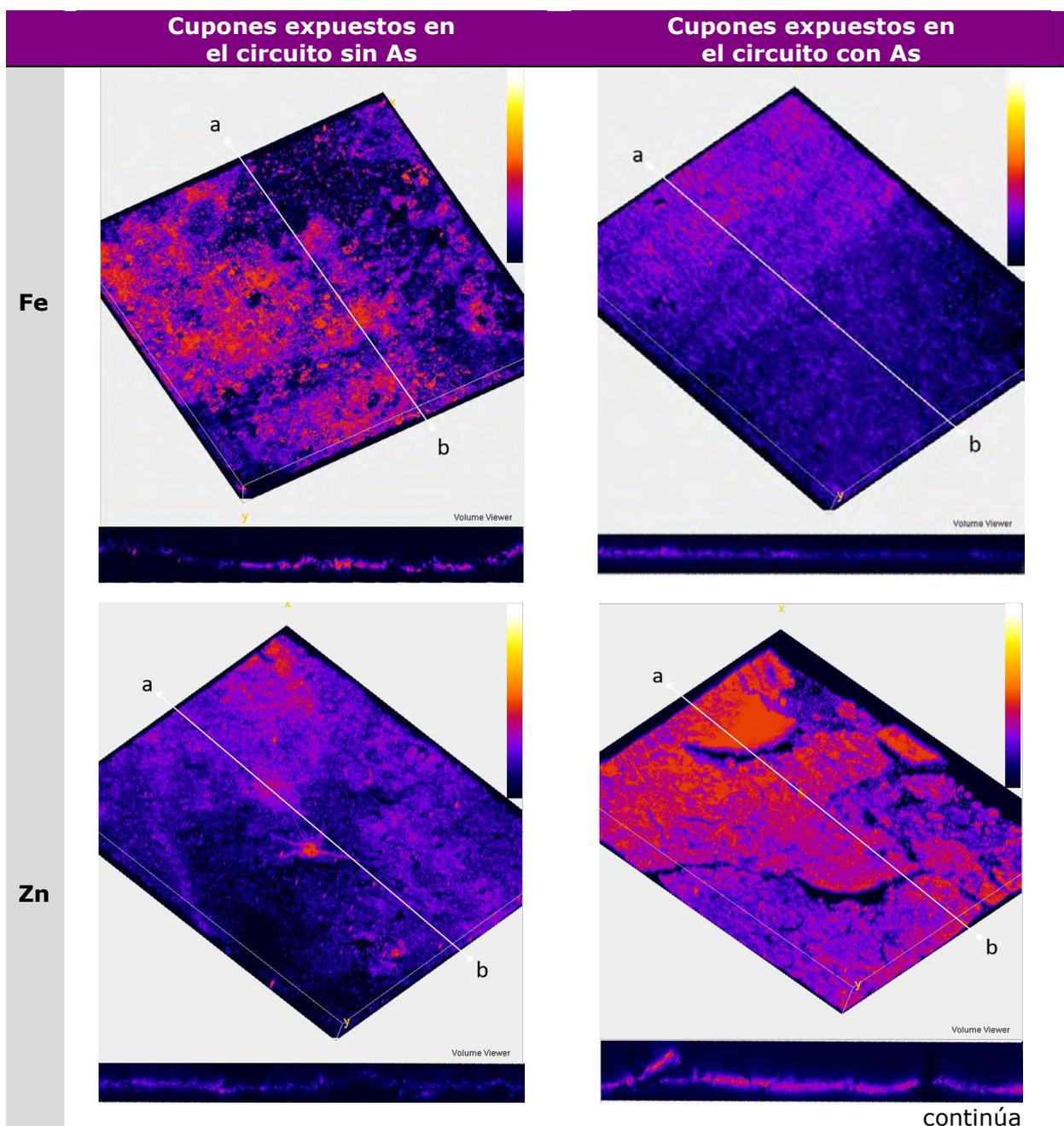


Figura 78. Imágenes tomadas con el MLC, a diferentes profundidades del espesor de la biopelícula formada sobre cupones de PP en presencia de As(V). Las imágenes se ordenan desde la base de la biopelícula en contacto con el sustrato (0 μm) hasta la parte más externa. Barra de escala = 200 μm .

Utilizando el programa Image J, de análisis de imagen, se reconstruyeron las estructuras tridimensionales de las biopelículas formadas en todos los materiales (**Figura 79**), mostrando una topografía muy heterogénea, diferente distribución espacial de los microorganismos, y huecos y canales, concordando con observaciones realizadas por otros autores utilizando la misma técnica (Lewandowski y Beyenal, 2003). Asimismo, las vistas en planta de las biopelículas así como sus secciones transversales confirmaron las características en cuanto a la estructura, morfología, espesor y compactibilidad observadas mediante el MEB (**Figuras 47, 48, 53, 54, 59, 60, 65, 66**).



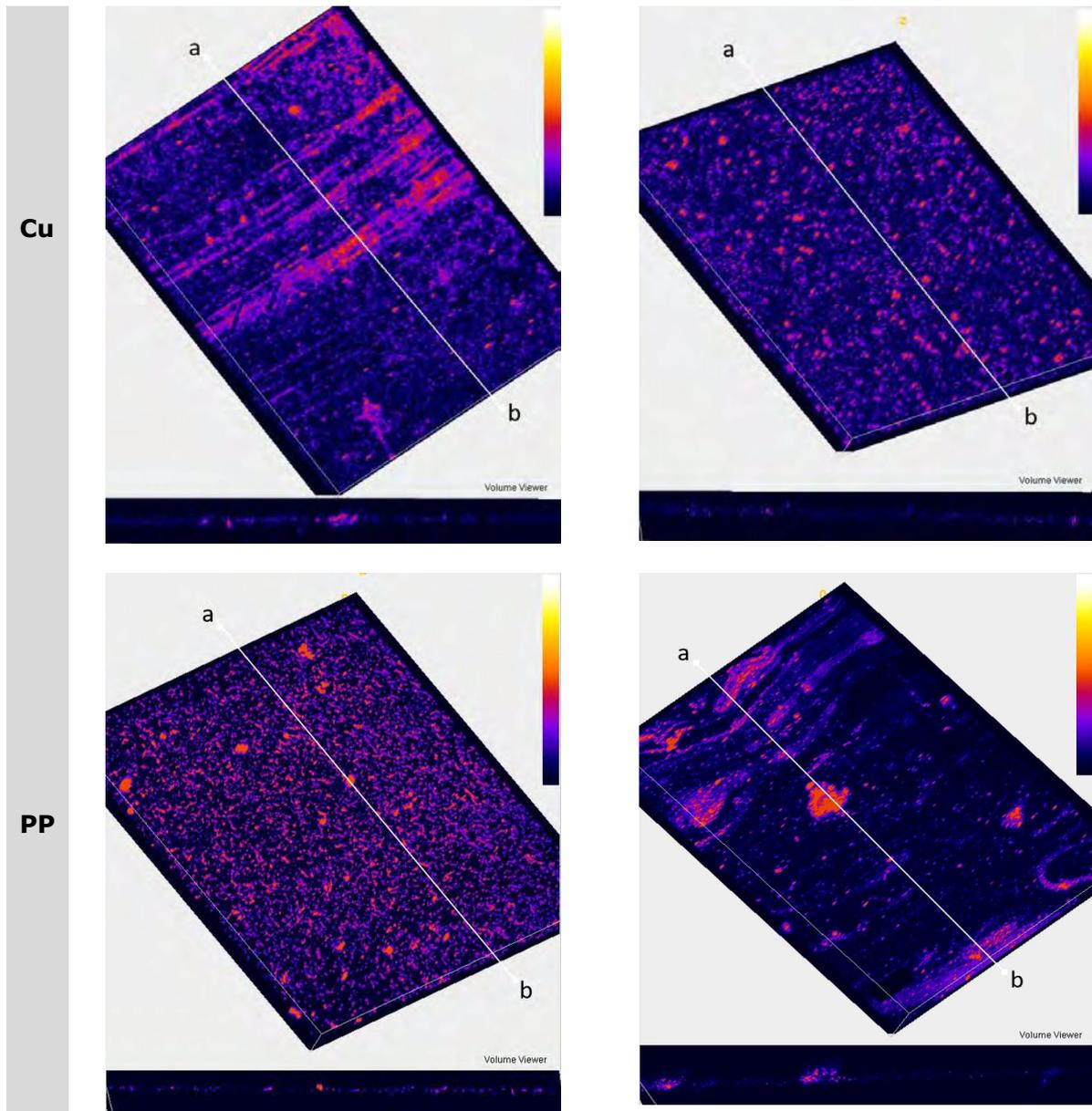


Figura 79. Reconstrucción tridimensional de las biopelículas adheridas sobre todos los sustratos luego de su exposición en ambos circuitos. Superficie escaneada: 1,4 mm x 1,4 mm. En la parte inferior de cada imagen tridimensional se encuentra representada una vista de la sección transversal (sentido a-b indicado en la imagen) del espesor correspondiente. La escala colorimétrica indica las alturas relativas de las biopelículas.

Utilizando el mismo programa, a partir de las imágenes obtenidas con el MLC, fue posible estimar el porcentaje de cobertura de las biopelículas. La **Figura 80** muestra el detalle de los pasos seguidos. A partir de la imagen binaria (**Figura 80 c**) se computó el área de puntos negros y blancos, lo que permitió calcular el porcentaje de cobertura respecto del área total de la imagen (2,016 mm²). Esta metodología, mostrada sobre un cupón de Zn, se aplicó sobre las imágenes de los 4 materiales en presencia y en ausencia de As(V). Los resultados obtenidos se

detallan en la **Tabla 15**. Es posible notar que, a excepción del Cu, la cobertura de la superficie resultó significativamente más alta en los cupones expuestos al circuito de agua con As(V), estos datos confirman las apreciaciones de los cupones realizadas a simple vista (**Figura 45**, secc. 3.2.2) concordando, además, con estudios realizados por otros autores, donde la presencia de un compuesto tóxico genera una tendencia al desarrollo de biopelículas por sobre una forma de vida planctónica, ya que como se ha mencionado, esta forma de vida sésil y en comunidad confiere a los microorganismos un mecanismo de defensa frente a condiciones adversas (Fang *et al.*, 2002; Shirtliff *et al.*, 2002; Branda *et al.*, 2005).

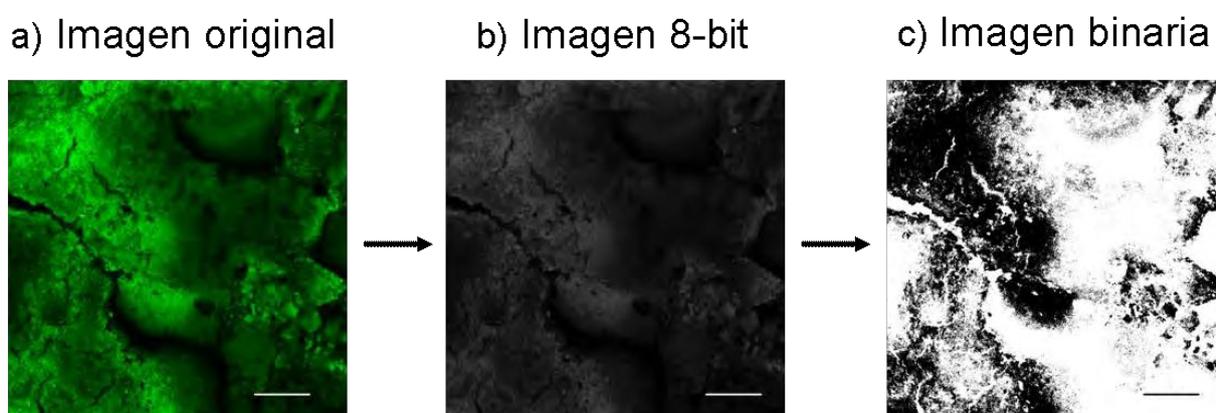


Figura 80. Pasos del análisis de imágenes de MLC para la obtención del porcentaje de cobertura de las biopelículas con el Software ImageJ: **a)** imagen original, **b)** imagen convertida a escala de grises (tipo de imagen 8 bit) y **c)** imagen binaria construida.

Tabla 15. Porcentaje de cobertura de las biopelículas desarrolladas sobre los cuatro sustratos ensayados en presencia y en ausencia de As(V).

Sustrato	Cobertura (%)	
	<i>Sin As</i>	<i>Con As</i>
Fe	12,83	41,16
Zn	30,34	35,28
Cu	17,59	18,21
PP	5,27	27,18

Otras características de las biopelículas, como la biomasa por unidad de área, la rugosidad, el espesor promedio, fueron obtenidas a partir del análisis de estas mismas imágenes con el programa COMSTAT 2.1 (Heydorn *et al.*, 2000). En la **Tabla 16** se muestran los resultados obtenidos para cada sustrato expuesto en los circuitos en presencia y en ausencia de As(V). Puede notarse que la rugosidad media por ejemplo, es muy variable tanto entre los diferentes sustratos como entre el mismo sustrato en ausencia y en presencia de arsénico, denotando la heterogeneidad y/o discontinuidad de las películas formadas. También cabe señalar que los valores de biomasa, área superficial y espesores resultaron en general, mayores en las películas formadas sobre cupones de Fe y de Zn que sobre Cu y PP. Todos estos parámetros concuerdan y confirman las tendencias obtenidas mediante las distintas técnicas de microbiología y de microscopías ya presentadas.

Tabla 16. Parámetros analizados con el programa COMSTAT 2.1 para las biopelículas depositadas sobre los cuatro sustratos expuestos en ausencia y en presencia de As(V)

Material	Fe		Zn		Cu		PP	
	sin As	con As						
Parámetro								
Coefficiente de rugosidad (Ra*)	0,223	0,066	0,117	0,082	0,129	0,070	1,993	1,896
Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	10,12	26,62	25,00	27,51	12,89	7,77	0,047	0,29
Área superficial (mm^2)	53075,6	38206,5	131120,0	183683,0	121037,6	314622,9	196,1	2237,1
Espesor promedio del área completa (μm)	19,41	30,66	30,06	49,99	26,92	32,50	0,08	1,26
Espesor promedio de biomasa (μm)	19,88	30,72	30,12	50,57	26,95	32,79	23,64	24,38

3.3.3. Análisis electroquímicos

Para evaluar la influencia de la película compleja (material biológico + MPE + productos de corrosión) en el comportamiento electroquímico de los sustratos metálicos, se realizaron determinaciones de potencial a circuito abierto (PCA) (a los 30 min. de colocar el cupón en la solución electrolítica) y curvas de polarización anódica de cupones de Cu, Fe y Zn no expuestos a circulación (como control) así como también de los expuestos en los sistemas de circulación en ausencia y en presencia de 5 mg.L⁻¹ de As(V) en el agua. La **Tabla 17** muestra los valores de PCA obtenidos. Como era de esperar, teniendo en cuenta la reactividad electroquímica de los sustratos, el Zn presentó el PCA más negativo, alrededor de -1,4 V (SSE), seguido del Fe con un valor de alrededor de -0,9 V (SSE) y por último el Cu con un valor de -0,4 V (SSE) aproximadamente. El análisis estadístico, realizado mediante un ANOVA de una vía, con un 95% de confianza indicó que no existen diferencias significativas entre los PCA debidas la exposición al agua potable con o sin arsénico.

TABLA 17. Promedios y desvíos (expresados en V) de los PCA obtenidos para los cupones controles y los expuestos a los circuitos.

	Fe (ctrl)	Fe	Fe-As	Zn (ctrl)	Zn	Zn-As	Cu (ctrl)	Cu	Cu-As
PCA	-0,977	-0,944	-0,956	-1,451	-1,448	-1,450	-0,430	-0,424	-0,418
σ	0,048	0,031	0,012	0,026	0,008	0,017	0,014	0,015	0,016

Las curvas de polarización obtenidas y promediadas para cada condición se muestran en la **Figura 81**. Todos los materiales mostraron una disolución activa con un efecto de bloqueo bien definido debido a la acumulación de productos anódicos en la superficie a medida que el nivel de polarización aumentaba. Se observó que el potencial en el que comenzaba este comportamiento dependía de la cantidad y características de la película depositada. La presencia de la película compleja, en general no produjo un efecto significativo sobre los valores del PCA. La única excepción fue el caso de los cupones de Fe en los que se observó un cambio positivo. Este comportamiento estaría relacionado con un aumento del efecto barrera proporcionado por la película compleja, así como por la influencia del contaminante en el agua sobre la comunidad microbiana y en el desarrollo del proceso de corrosión del sustrato.

Como se ha mencionado en la Introducción, existen resultados controvertidos acerca del efecto que los microorganismos ejercen sobre la corrosión. Algunos estudios sugieren que, bajo ciertas condiciones, la biopelícula puede proteger el metal de la corrosión y/o inhibir la corrosión localizada (Nagiub y Mansfeld, 2001; Dubiel *et al.*, 2002; Dexter, 2003; Zuo, 2005) y otros resultados contradicen esto, en el sentido de que los microorganismos podrían promoverla, acelerarla, o provocar una corrosión más agresiva (Fang *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que si bien las películas complejas no produjeron un efecto significativo sobre el PCA de los sustratos ni en la forma general de las curvas, se evidenció un desplazamiento de las curvas anódicas hacia menores densidades de corriente. Este efecto fue más significativo para el Zn que para Fe y prácticamente irrelevante para el Cu. Asimismo, el efecto de bloqueo debido a la presencia de la biopelícula y los productos de corrosión fue mayor para las muestras expuestas al agua potable con el agregado de As(V) (**Figura 81** -curvas naranjas-). Este comportamiento es coherente con el resto de los resultados obtenidos, como la cantidad de microorganismos formadores de las biopelículas (recuentos de bacterias heterótrofas), la estructura y la morfología (abundancia y espesor) de la película compleja depositada (**Figuras 46-48, 53, 54, 59, 60, 65, 66, 79**). Como se mencionó anteriormente, la presencia de As(V) produjo, en general, un aumento en el recuento de bacterias heterótrofas sésiles así como la cantidad MPE con el consiguiente aumento en el espesor y la compactibilidad de la biopelícula. Además, tanto la cantidad como la densidad de productos de corrosión formados sobre Zn fueron mayores que sobre Fe (**Figura 79**). Es por ello que el efecto barrera proporcionado por la película formada sobre el Zn resultó superior y, en consecuencia, la disminución observada de la corriente anódica fue más importante. El efecto barrera prácticamente nulo observado para los cupones de Cu, tanto en ausencia como en presencia de arsénico, está relacionado con el escaso desarrollo de biopelícula, lo que podría estar asociado a la naturaleza biocida del Cu, generándose en consecuencia, una menor cantidad y densidad de productos de corrosión, así como una mayor discontinuidad de su distribución sobre la superficie. Esto concuerda con estudios recientes (Shi *et al.*, 2018) en los que se ha demostrado que el desarrollo de tuberías de acero con diversas concentraciones de Cu presentan características antimicrobianas muy prometedoras y resistentes a la CIM.

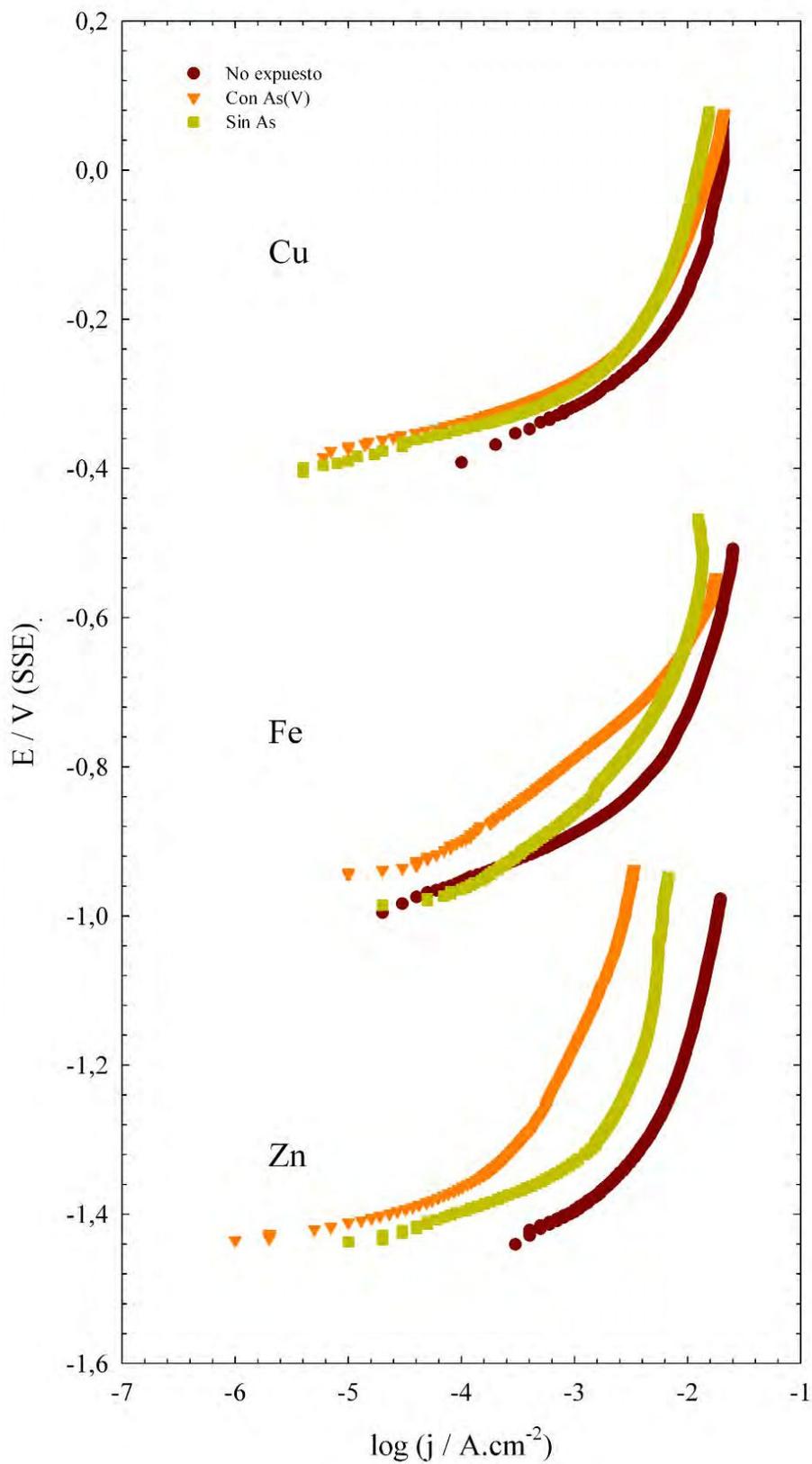


Figura 81. Curvas de polarización anódica de los metales ensayados antes y después de su exposición en los circuitos de circulación de agua en ausencia y presencia de As(V). Las curvas graficadas representan un promedio de varios cupones analizados en cada situación ($n= 4-6$).

CAPITULO 4

CONSIDERACIONES FINALES

Como se ha mencionado, diversas investigaciones, así como los resultados obtenidos en este trabajo, indican que, si bien son muchos los factores que influyen en la formación de biopelículas, el material con el que está construida una tubería es uno de los más importantes, afectando no sólo la cantidad de microorganismos sino también la estructura de la comunidad microbiana de las mismas. En particular, en los sistemas de distribución de agua potable, ciertos materiales pueden modificar y/o disminuir el efecto residual de los desinfectantes, generando un aumento del crecimiento microbiano en dichos sistemas. Los materiales de las tuberías también pueden afectar el crecimiento microbiano al liberar compuestos químicos tales como cobre, hierro, iones de fósforo y compuestos orgánicos. Si bien las cañerías de plástico como PE o PP han sido últimamente utilizadas para sustituir a las tradicionales tuberías metálicas, también pueden liberar diversos compuestos orgánicos biodegradables, capaces de suscitar un nuevo crecimiento microbiano y la formación de biopelículas. Asimismo, la rugosidad de la superficie de una cañería y la presencia de productos de corrosión también afectan la adhesión bacteriana a dicha superficie.

En relación a estos conceptos, durante este trabajo, se demostró que:

- Tanto en ausencia como en presencia de arsénico en el agua, sobre los materiales con superficies más heterogéneas y con mayor tendencia a la formación y depósito de óxidos, se desarrollaron biopelículas con mayor cantidad de microorganismos alcanzando mayores espesores.

- El desarrollo de las biopelículas formadas sobre los cupones expuestos al circuito con As(V) fue mayor. Estos datos son coherentes con el concepto de que los microorganismos presentan una mayor tendencia a formar biopelículas en ambientes más hostiles, siendo esta forma de vida sésil y en comunidad un mecanismo de defensa frente a estas condiciones adversas.

- Las comunidades bacterianas planctónicas, así como las sésiles estuvieron constituidas por bacterias pertenecientes al phylum Proteobacteria (50%), phylum Firmicutes (40%) y phylum Actinobacteria (10%).

- Existen especies bacterianas generalistas capaces de adherirse sobre todos los sustratos, tanto en presencia como en ausencia de arsénico, mientras que otras sólo fueron detectadas sobre un material o condición particular.

- La presencia de arsénico en el agua potable produjo una disminución de la riqueza, generando asimismo un cambio en la estructura de la comunidad planctónica.

- El perfil genético de las comunidades desarrolladas en los diferentes materiales fue diferente. Observándose una similitud de las biopelículas desarrolladas sobre un material, independientemente de la presencia de arsénico en el circuito. Asimismo se observó una gran similitud entre las comunidades establecidas en los materiales menos susceptibles al ataque bacteriano (PP y Cu).

- En consecuencia, la naturaleza del sustrato fue un factor más importante para el establecimiento de la comunidad sésil que la presencia de arsénico en el agua.

- Elevadas concentraciones de arsénico produjeron una selección y desarrollo de microorganismos tolerantes en las comunidades. Esta selección fue menos notable en las comunidades provenientes del circuito con As, lo que indicaría la existencia de poblaciones bacterianas previamente adaptadas a la presencia de este elemento.

- Algunos microorganismos provenientes del agua poseen un mecanismo de resistencia al arsénico evidenciado por la detección del gen *arsC*, así como por la presencia de As(III) en biopelículas desarrolladas sobre PP.

- El desarrollo más o menos discontinuo de las biopelículas sobre los sustratos, los tipos de ataques encontrados, así como su magnitud denotaron una relación entre la comunidad establecida y el deterioro del mismo.

- Todos los materiales mostraron una disolución activa con un efecto de bloqueo debido a la acumulación de productos anódicos y al desarrollo de la biopelícula.

- El efecto barrera mencionado fue mayor para los cupones expuestos en el circuito con arsénico, debido a que su presencia favoreció el desarrollo de películas complejas con mayor número de microorganismos y mayor espesor.

Finalmente, cabe señalar la complejidad del estudio de las biopelículas y su relación con los sustratos sobre los que se desarrollan, dado que una gran cantidad de factores bióticos y abióticos influyen en esta relación. Es por ello la importancia de un abordaje interdisciplinario de esta temática, haciendo necesaria la utilización e interpretación de una gran diversidad de técnicas que permiten un mejor conocimiento de este complejo y heterogéneo sistema. Asimismo, esta complejidad implica estudiar de forma independiente y específica cada sistema en particular, siendo muy dificultosa la obtención de conclusiones o tendencias generales y su aplicación y extrapolación a otros sistemas.

ANEXO I:

Pasos seguidos en las diferentes técnicas de extracción de ADN

Como se menciona en Materiales y Métodos (sección 2.3) las biopelículas se obtuvieron a partir del raspado de los cupones en 1 mL de solución fisiológica estéril en eppendorf, se centrifugaron 15 min. a 13.000 g descartándose el sobrenadante. Las comunidades planctónicas se obtuvieron mediante el filtrado de 1 L de agua de cada tanque colocándose luego el filtro cortado en trocitos en eppendorf estériles. Para ambos tipos de muestra, luego se procedió de la misma manera:

MÉTODO DE EXTRACCIÓN ESTÁNDAR MEDIANTE PROTEINASA K Y FENOL-CLOROFORMO (modificado de Hagelberg y Clegg, 1991):

- se resuspende cada muestra en 100 μ L de sarcosil (al 0,1 % en TE);
- se centrifuga a 10.000 rpm durante 2 min. y se descarta el sobrenadante;
- se resuspende el sedimento en 1 mL de buffer de lisis (400 mM NaCl, 750 mM sacarosa, 20 mM EDTA, 50 mM Tris HCl, pH: 9) y 20 μ L de lisozima (1 mg/mL)
- se incuba a 37 °C durante 60 min.
- se agregan de 50 μ L de sarcosil (al 5 %) y 50 μ L de proteinasa K (10 μ g/mL en TE), se mezcla cuidadosamente a mano;
- se incuba a 37 °C durante 60 min.;
- se agregan 70 μ L de acetato de Na 3M (pH: 5,4), 200 μ L de fenol equilibrado con Tris (pH:8) y 100 μ L de cloroformo;
- se centrifuga a 13.000 rpm durante 10-15 min.;
- luego se pasa la fase acuosa a un nuevo eppendorf y se repite el paso anterior;
- se pasa la fase acuosa a un eppendorf y se agregan 200 μ L de cloroformo;
- se centrifuga a 13.000 rpm durante 10-15 min.;
- nuevamente se pasa la fase acuosa a un eppendorf y se precipita el ADN mediante el agregado de un vol. igual de isopropanol;
- se invierte varias veces el eppendorf, (en ocasiones es posible observar el ovillo de ADN);
- se deja en heladera 24 h;
- se centrifuga a 13.000 rpm durante 10-15 min.;
- se lava el precipitado con unos 50 μ L de etanol (al 70 %)

- se deja evaporar el etanol a T° ambiente;
- finalmente se resuspende el ADN en 50-100 µL de agua bidestilada.

MÉTODO DE PURIFICACIÓN CON SÍLICA (adaptado de Höss y Pääbo, 1993):

- se resuspenden las muestras en 250 µL de sacarosa (al 20% en TE) y se vortea;
- se agregan 250 µL de lisozima (5 mg/mL en TE)
- se incuban las muestras a 37 °C durante 60 min.;
- se agregan 200 µL de SDS (al 5 %) y 50 µL de proteinasa K (10 mg/mL) mezclando cuidadosamente;
- se incuban las muestras a 37 °C durante 60 min.;
- se centrifuga a 13.000 rpm (o máxima velocidad) durante 15 min.;
- se pasa el sobrenadante a otro eppendorf (≈ 400 µL);
- se agregan 10-15 µL de sílica y se agita la solución,
- se centrifuga 30 seg., se descarta el sobrenadante y se agregan 400 µL de solución de lavado (etanol al 70 %) (repetir este paso 3 veces);
- luego del último lavado se deja evaporar el alcohol en estufa unos 15 min.;
- se resuspende el ADN en 50-70 µL de agua destilada estéril;
- se incuba a 60 °C durante 20 min.;
- finalmente se centrifuga y se pasa el sobrenadante con el ADN a un nuevo eppendorf.

UTILIZACIÓN DE KIT COMERCIAL (E.Z.N.A. Soil DNA kit Omega bio-tek)

Extracción realizada según las instrucciones del fabricante.

Abreviaturas utilizadas:

SDS = sodium dodecyl sulphate

EDTA = ethylene diamine tetra-acetic acid

Tris = tris(hydroxymetil)aminometano; (HOCH₂)₃CNH₂.

TE = Tris-EDTA

ANEXO II.

Descripción e identificación de las cepas aisladas durante todas las series de circulación realizadas.

Como se ha mencionado (Cap.2, secc. 2.1), durante las primeras series se expusieron en los circuitos cupones de materiales puros: FeP, ZnP, CuP y PPP, y de aleaciones comerciales: FeC, ZnC, CuC, PPC, pero luego de comprobar la gran similitud entre ambos tipos de muestras, se decidió proseguir sólo con las aleaciones comerciales denominadas: Fe, Zn, Cu y PP.

En la **Tabla 1** se encuentran detalladas las especies aisladas identificadas mediante comparación del gen ARNr 16S completo y en la **Tabla 2** se describen y enumeran las especies bacterianas aisladas *no identificadas*, a lo largo de todas las **SERIES** realizadas.

Referencias:

Fe, Zn, Cu, PP: corresponden al sustrato del cual fue aislada la colonia; **P:** puros y **C:** aleación comercial.

Pl.: planctónica, es decir que es un microorganismo aislado del agua del tanque.

-As: indica que la muestra proviene del circuito con 5mg.L⁻¹ de arsénico adicionados al agua.

Tabla 1. Especies bacterianas identificadas mediante secuenciación y comparación en el BLAST del gen completo ARNr 16S aisladas de las biopelículas desarrolladas sobre los cuatro sustratos ensayados en ausencia y presencia de As(V).

Denominación y origen	Color y aspecto externo de la colonia	Identificación	Similitud (%)	Nº de acceso (genBank)
69 Cu-As	Rosa	Kokuria sp TS 13	1255/1309 (96%)	KM349187
78 Fe-As	Translúcida, muy pequeña	Bacillus licheniformis SeaHAs1w	1386/1450 (96%)	KM349188
90 PP-As	Natural, translúcida de bordes definidos	Bacillus sp AsK 15	1423/1454 (98%)	KM349189
91 PP-As	Natural, translúcida de bordes esfumados	Delftia sp TS 33	1394/1396 (99%)	KM349190
165 PP	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus cereus DZ4	1441/1441 (100%)	KM349191
170 Cu	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus megaterium MBFF6	1454/1459 (99%)	KM349192

175 Zn	Blanca, grande, de bordes flavelados	Acinetobacter lwoffii CI-01	1393/1438 (97%)	KM349193
178 Fe-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Paenibacillus sp Q8	1402/1425 (98%)	KM349194
183 PP-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Delftia sp. TS33	1394/1395 (99%)	KM349195
184 PP-As	Natural, translúcida de bordes esfumados	Delftia sp. TS33	1388/1391 (99%)	KM349196
188 Cu-As	Blanca	Bacillus sp. SXB	1447/1456 (99%)	KM349197
190 Cu-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus sp. SXB	1446/1459 (99%)	KM349198
192 Fe	Amarilla, bien redonda	Sphingomonas sp. XJ-3	1353/1355 (99%)	KM349199
194 Fe	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus circulans WZ12	1430/1431 (99%)	KM349200
197 Zn	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus circulans WZ12	1446/1454 (99%)	KM349201
198 Cu	Amarilla	Sphingomonas sp. XJ-3	1342/1356 (99%)	KM349202
199 Cu	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus circulans WZ12	1414/1450 (98%)	KM349203
202 PP	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus circulans WZ12	1445/1450 (99%)	KM349204
206 Fe-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus sp. A103-77	1417/1417 (100%)	KM349205
209 Zn-As	Natural, translúcida, de bordes esfumados	Delftia sp. TS33	1395/1395 (100%)	KM349206
210 Zn-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus sp. A103-77	1417/1417 (100%)	KM349207
212 Cu-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus sp. A103-77	1416/1417 (99%)	KM349208
213 PP-As	Amarilla	Janibacter sp. TS20	1171/1243 (94%)	KM349209
214 PP-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus sp. A103-77	1417/1418 (99%)	KM349185
218 PP	Salmón	Brevundimonas sp. NBRC 101024	1281/1294 (99%)	KM349210
221 Cu	Salmón	Brevundimonas sp. NBRC 101024	1186/1225 (97%)	KM349211
222 Cu	Salmón	Brevundimonas sp. NBRC 101024	1340/1347 (99%)	KM349212
224 Fe	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1352/1357 (99%)	KM349213
227 Zn	Salmón	Brevundimonas sp. NBRC 101024	1340/1344 (99%)	KM349214
230 PP-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1211/1347 (90%)	KM349215
232 Cu-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1342/1344 (99%)	KM349216
235 Fe-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1350/1358 (99%)	KM349217
238 Zn-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1329/1337 (99%)	KM349218
239 Zn-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1342/1344 (99%)	KM349219
242 Cu	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus cereus DZ4 (=Bacillus cereus)	1441/1443 (99%)	

		165 PP)		
244 Cu	Salmón	Bacillus cereus DZ4	1441/1441 (100%)	
249 PP	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus cereus AHBR1	1419/1497 (95%)	
259 Fe	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus cereus DZ4 (=Bacillus cereus 165 PP)	1435/1440 (99%)	
260 Cu-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus anthracis Shikan-NIID	1437/1442 (99%)	
264 PP-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus anthracis Shikan-NIID	1449/1453 (99%)	
270 Zn-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus anthracis Shikan-NIID	1350/1405 (96%)	
271 Fe-As	Blanca, grande, de bordes flavelados	Bacillus anthracis Shikan-NIID	1437/1440 (99%)	
304 Fe	Salmón	Brachybacterium arcticum CQ11	1162/1183 (98%)	
305 Fe	Amarilla	Brachybacterium arcticum CQ11	1189/1191 (99%)	
306 Fe	Natural-translúcida	Brachybacterium arcticum CQ11	1188/1189 (99%)	
314 Cu-As	Amarillo claro	Micrococcus sp. TS17	1343/1377 (98%)	
315 Cu-As	Blanca, pequeña	Staphylococcus pasteurii SP1	1434/1448 (99%)	
318 Zn-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1352/1358 (99%)	
320 Fe-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1325/1349 (98%)	
321 Fe-As	Natural- translúcida	Acidovorax avenae subsp. avenae ATCC 19860	1367/1434 (95%)	
322 PP-As	Natural-translúcida	Brevundimonas nasdae PVS12	1340/1351 (99%)	
324 PP-As	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1346/1367 (98%)	
325 Fe	Amarilla	Sphingobium yanoikuyae St17	1374/1376 (99%)	
326 Fe	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1347/1349 (99%)	
327 Fe	Natural-translúcida	Brevundimonas sp. DS20	1353/1357 (99%)	
329 Zn	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1352/1358 (99%)	
331 Zn	Natural-translúcida	Brevundimonas sp. DS20	1346/1349 (99%)	
332 PP	Amarilla	Sphingobium yanoikuyae	1380/1383 (99%)	
333 PP	Salmón	Brevundimonas sp. DS20	1344/1344 (100%)	
334 PP	Natural-translúcida	Brevundimonas vesicularis 266XY4	1354/1361 (99%)	

Tabla 2. Colonias bacterianas aisladas (sésiles y planctónicas) a lo largo de todas las *SERIES*, no identificadas.

Color y aspecto externo de la colonia	Denominación y origen
Craquelada	1 PPP-As, 14 FeC-As, 16 PPC-As, 40 PPP-As, 58 PPC-As, 92 PP-As
Cremita, translúcida	2 PPP-As, 65 CuP-As, 68 CuC-As, 72 ZnP/ZnC-As, 76 PPP/PPC-As
Rosada	3 PPP-As, 4 PPC-As, A Planc-As, 17 PPP-As, 21 ZnC-As, 22 FeC-As, 24 CuC-As, 27 Pl.-As, 30 ZnC-As, 41 PPP-As, 43 PPC-As, 220 PP, 237 Fe-As, 241 Zn-As, 313 Plct
Blanca, de bordes flavelados	5 PPC-As, 131 Fe, 133 Fe-As, 139 Zn-As, 143 Cu, 147 Cu-As, 151 PP, 157 PP-As, 162 Fe, 251 Zn, 275 Fe-As, 283 PP-As
Amarilla	6 PPC-As, 54 CuP-As, 64 CuP-As, 67 CuC-As, 70 ZnP/ZnC-As, 74 PPP/PPC-As, 79 FeC-As, 84 Cu-As, 89 PP-As, 96 Zn-As, 103Fe, 107 PP, 108 Zn, 113 Cu, 115 Fe-As, 118 PP-As, 122 Zn-As, 127 Fe, 134 Zn, 140 Cu, 144 Cu-As, 148 PP, 154 PP-As, 158 Fe, 163 PP, 167 Cu, 171 Zn, 176 Fe-As, 179 Zn-As, 182 PP-As, 185 Cu-As, 187 Cu-As, 196 Zn, 204 Fe-As, 208 Zn-As, 211 Cu-As, 219 PP, 225 Fe, 228 Zn, 231 PP-As, 233 Cu-As, 236Fe-As, 240 Zn-As, 243 Cu, 247 PP, 252 Zn, 261 Cu-As, 255 Fe, 267 Zn-As, 277 Zn-As, 279 Cu-As, 282 PP-As, 286 Fe, 289 Zn, 291 PP, 296 Fe-As, 298 PP-As, 301 Zn-As, 303 Plct.-As, 309 Zn, 311 Plct. , 317 Zn-As, 319 Fe-As, 323 PP-As, 328 Zn
Natural, translúcida	7 ZnP-As, 8 ZnC-As, 31 ZnC-As, 35 FeP-As, 38 FeC-As, 46 CuP-As, 48 CuC-As, 81 FeP-As, 193 Fe
Crema, translúcida (amarilla muy pálido)	9 CuP-As
Translúcida, muy pequeña	11 CuP-As, 101 Fe
Muy pequeña, brillante	12 FeP-As
Color crema	13 FeP-As, 53 CuP-As, 59 PPC-As, 216 PP
Salmón	B Planc-As, 34 FeP-As, 37 FeC-As, 39 FeC-As, 45 CuP-As, 47 CuC-As, 52 CuP-As, 56 FeC-As, 62 PPC-As, 66 CuP-As, 71 ZnP/ZnC-As, 75 PPP/PPC-As, 80 FeC-As, 83 Cu-As, 87 PP-As, 97 Zn-As, 98 Fe-As, 102 Fe, 105 PP, 109 Zn, 112 Cu, 116 Fe-As, 119 PP-As, 123 Zn-As, 126 Cu-As, 128 Fe, 132 Fe-As, 135 Zn, 141 Cu, 145 Cu-As, 149 PP, 155 PP-As, 160 Fe, 166 PP, 173 Zn, 177 Fe-As, 181 Zn-As, 183 PP-As, 189 Cu-As, 191 Fe, 195 Zn, 200 PP, 203 Fe-As, 207 Zn-As, 246 PP, 253 Zn, 256 Fe, 262 Cu-As, 265 PP-As, 268 Zn-As, 272 Fe-As, 273 Fe-As, 276 Zn-As, 278 Cu-As, 281 PP-As, 285 Fe, 288 Zn, 292 PP, 294 Fe-As, 297 PP-As, 299 Zn-As, 302 Plct.-As, 307 Zn
Beige claro	18 PPP-As, 28 Pl.-As, 168 Cu
Anaranjada	19 PPP-As
Natural, muy pequeña	20 ZnC-As, 23 FeC-As, 26 CuC-As
Natural (más grande)	25 CuC-As, 152 PP, 201 PP, 205 Fe-As, 223 Fe, 226 Zn, 229 PP-As, 234 Fe-As, 245 Cu, 248 PP, 254 Zn, 257 Fe, 274 Fe-As, 284 PP-As
Beige oscuro	29 ZnP-As, 32 ZnC-As, 36 FeC-As
Amarillo fuerte	33 ZnC-As, 85 PP-As, 86 PP-As, 99 Fe-As, 280 Cu-As
Natural, translúcida,	42 PPP-As, 44 PPC-As, 49 CuC-As, 57 FeC-As, 63 PPC-As, 114 Fe-

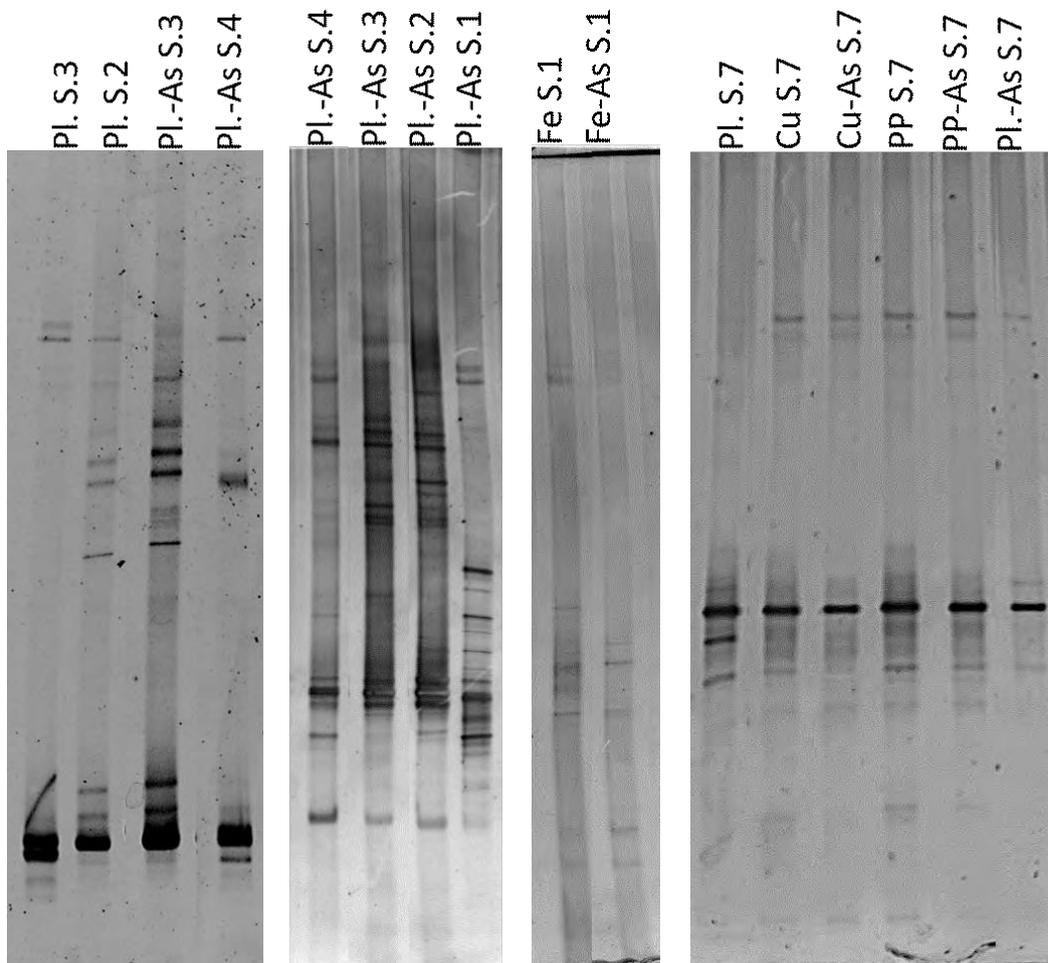
pequeña	As
Crema, translúcida, de bordes esfumados	50 ZnP-As, 60 PPC-As, 73 ZnP/ZnC-As, 77 PPC-As
Natural, amarillenta, de borde definido	51 ZnC-As, 55 FeC-As, 61 PPC-As
Crema, casi blanca	82 Cu-As, 88 PP-As, 95 Zn-As, 100 Fe-As, 104 Fe, 106 PP, 110 Zn, 111 Cu, 117Fe-As, 121 PP-As, 124 Zn-As
Natural translúcida, de bordes definidos	93 Zn-As, 295 Fe-As, 300 Zn-As, 308 Zn, 312 Plct.
Natural translúcida, de bordes esfumados	94 Zn-As, 120 PP-As, 125 Zn-As
Blanca, cremosa	129 Fe, 138 Zn-As, 146 Cu-As, 150 PP
Rosado claro, de bordes esfumados	130 Fe, 136 Zn, 153 PP, 174 Zn, 215 PP-As
Blanca pequeña, bien redonda	142 Cu, 250 PP, 266 PP-As, 269 Zn-As, 263 Cu-As, 310 Zn
Blanca translúcida	156 PP-As, 161 Fe, 316 Cu-As, 330 Zn, 335 PP
Blanca	159 Fe, 164 PP, 169 Cu, 172 Zn, 180 Zn-As, 184 PP-As, 186 PP-As, 217 PP, 258 Fe, 287 Fe, 290 Zn, 293 PP

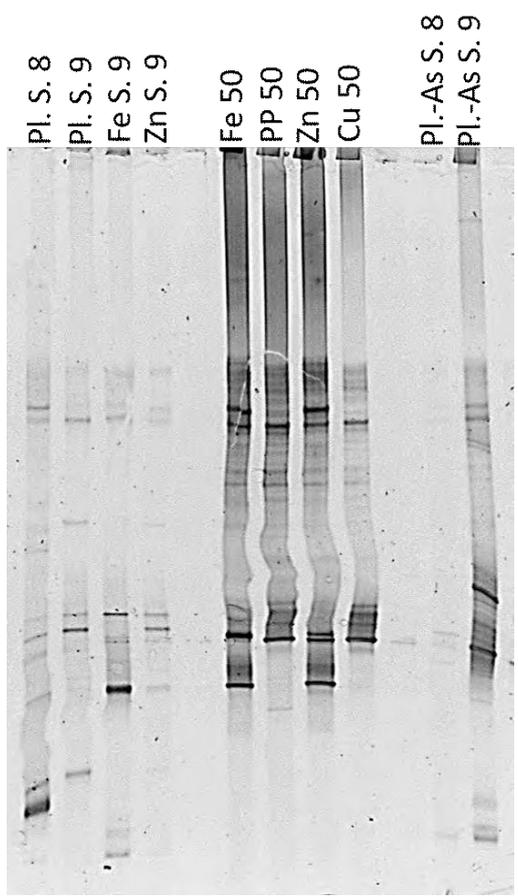
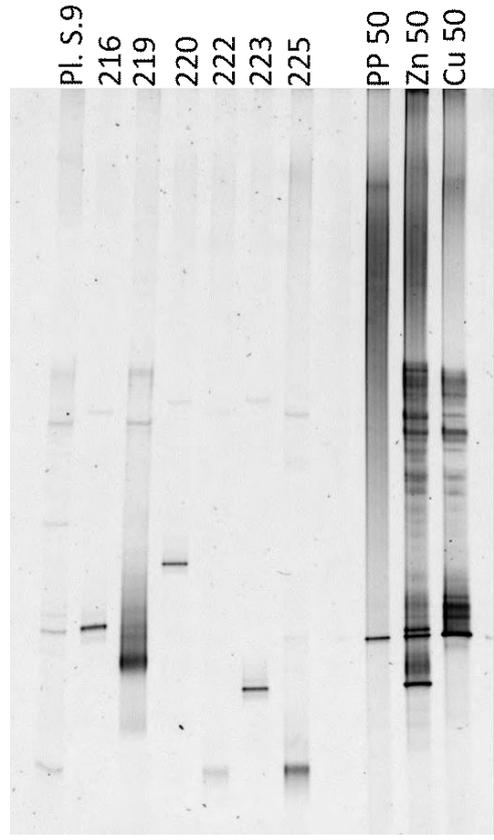
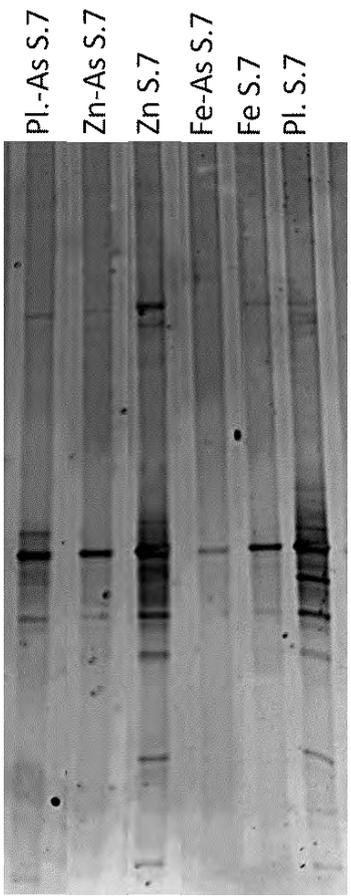
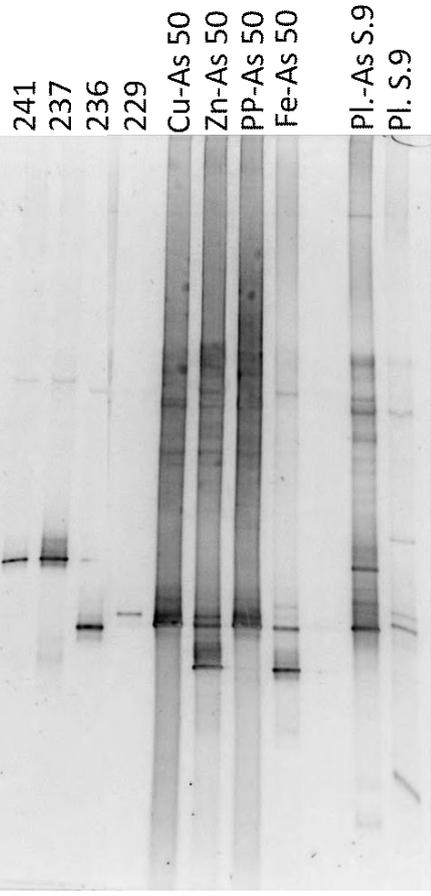
10 CuP-As, 15 FeC-As, 137 Zn-As: no descriptas.

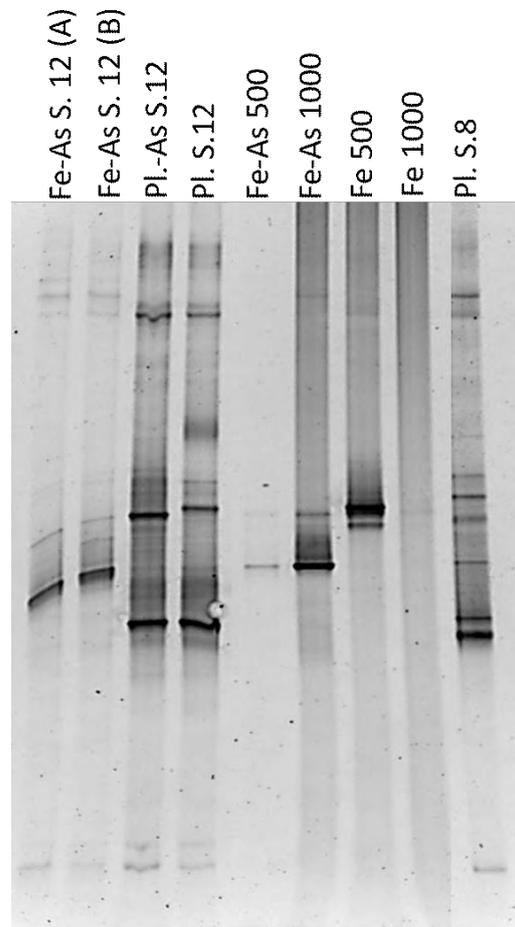
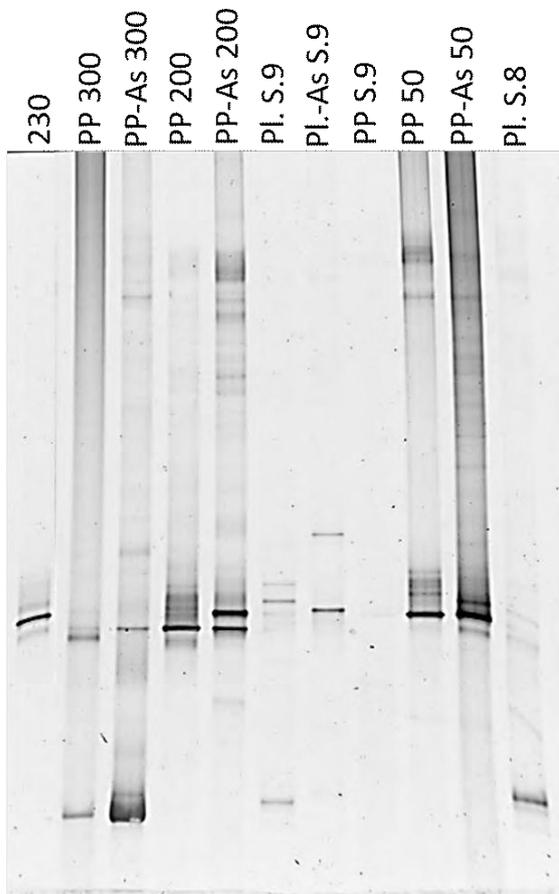
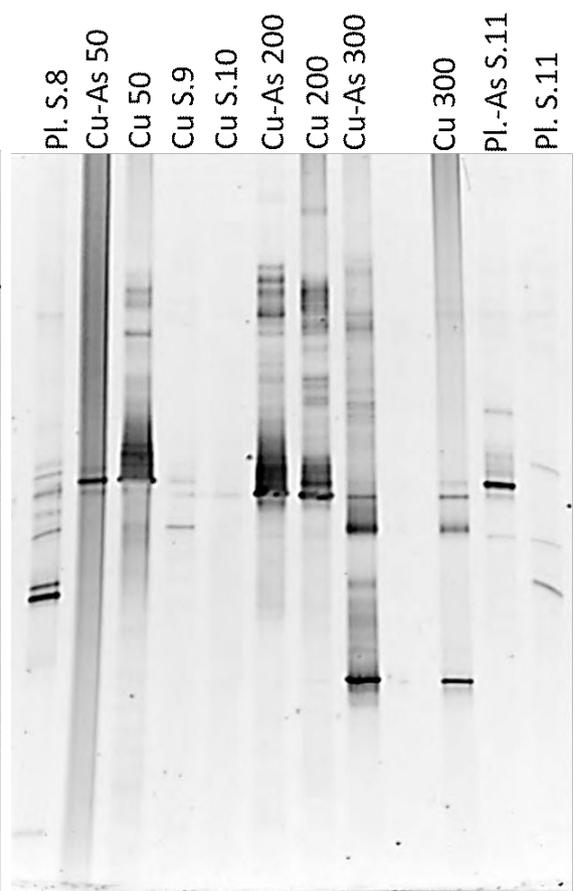
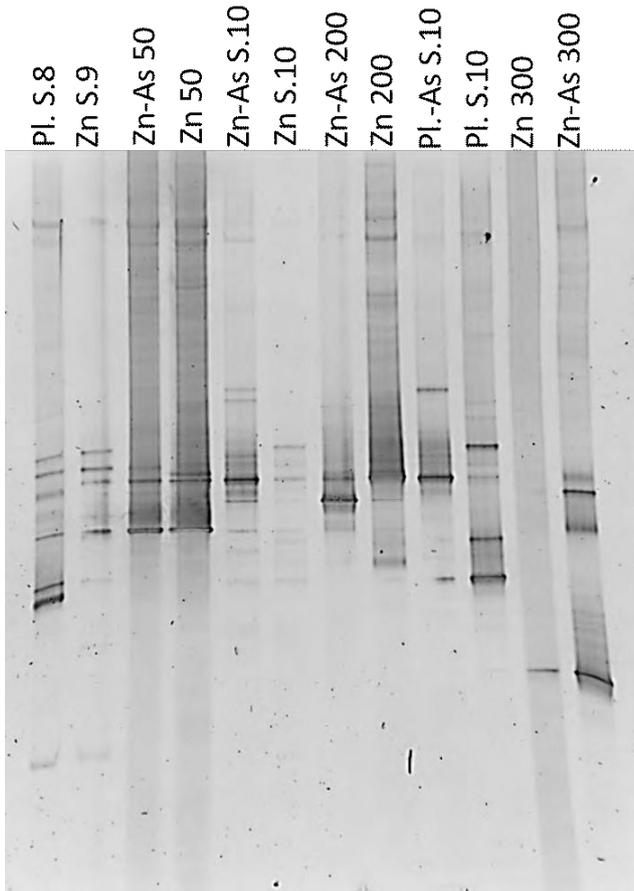
ANEXO III

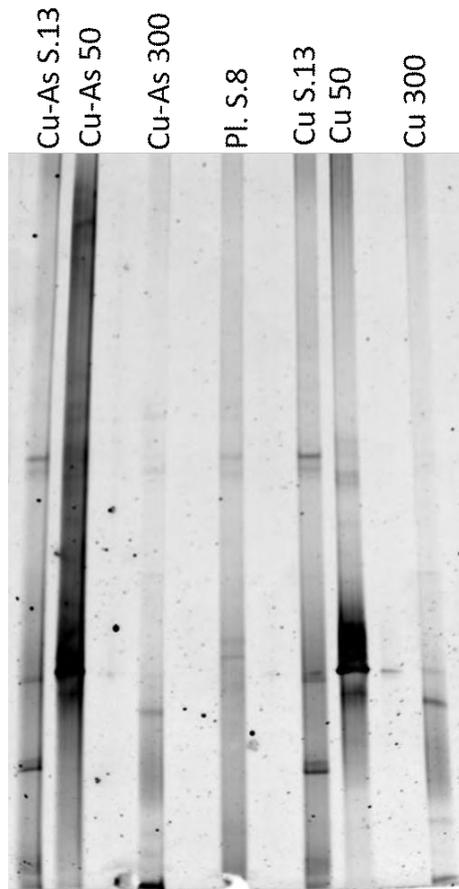
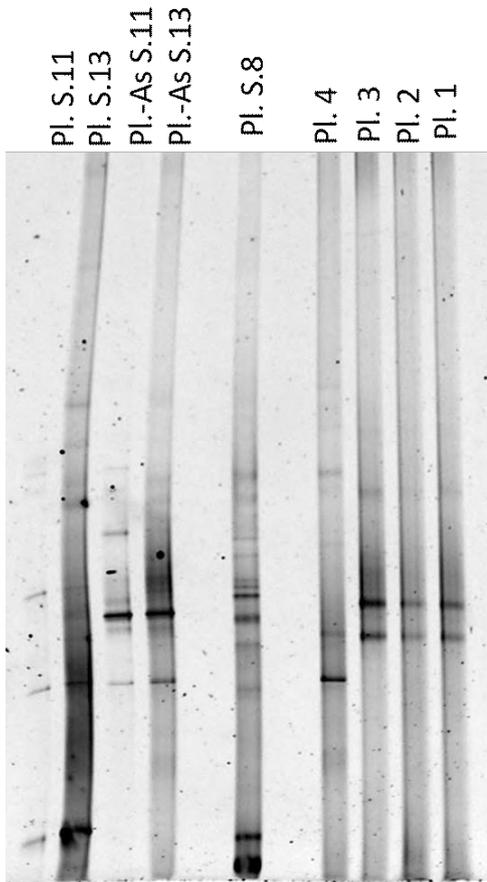
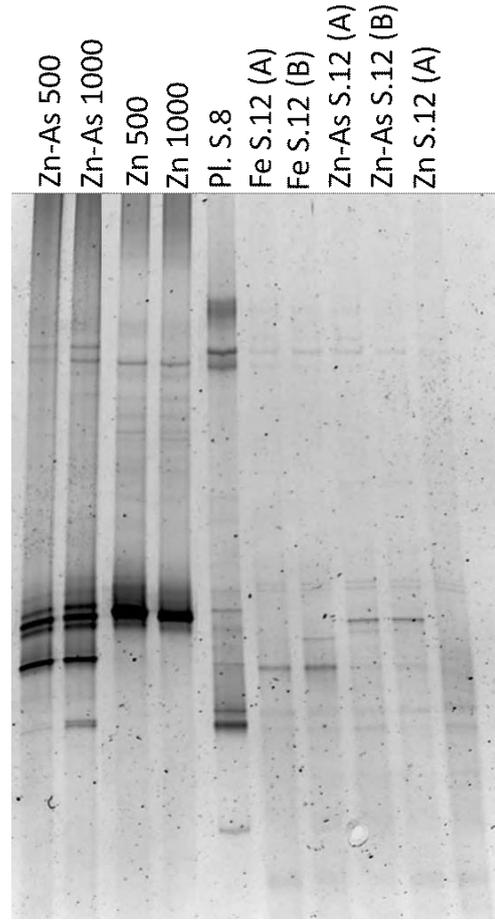
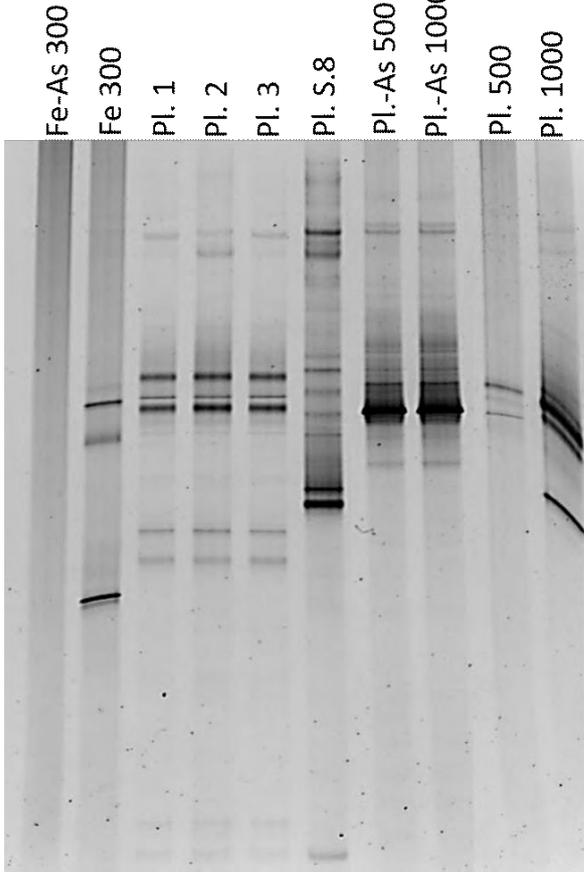
a) Geles de DGGE.

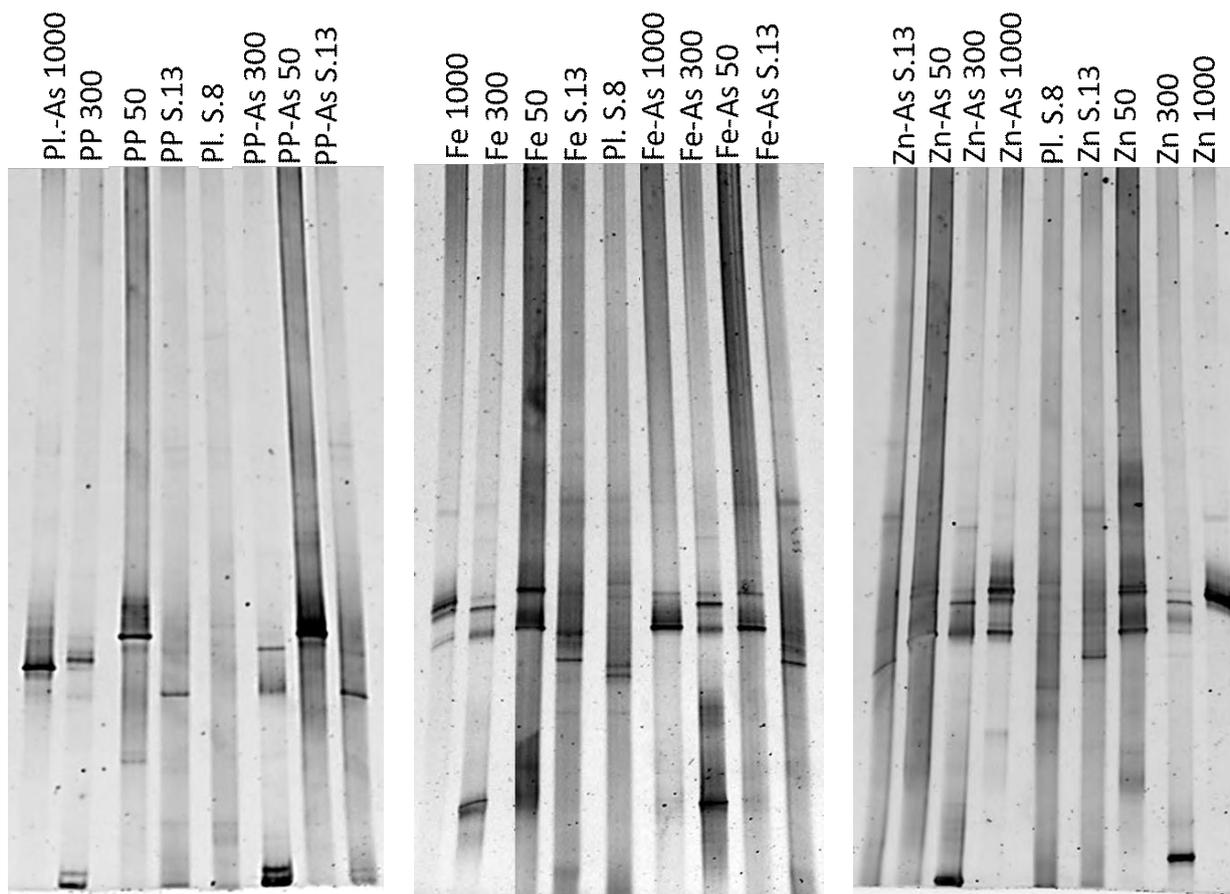
Las siguientes imágenes corresponden a los geles de DGGE realizados durante todo el trabajo de tesis. Las fotos fueron tomadas con un transiluminador Universal Hood II (Bio Rad) luego de la tinción del gel con Syber Green. Cada línea vertical corresponde a una comunidad obtenida en las sucesivas series (indicadas con la letra "S" y su número correspondiente), sobre los distintos sustratos (Fe, Zn, Cu, PP), en ausencia o presencia de arsénico (-As) en el circuito y en las diferentes concentraciones de arsénico cultivadas (50, 200, 300, 500, 1000 ppm). Las bandas horizontales representan a las especies o cepas presentes en cada comunidad.





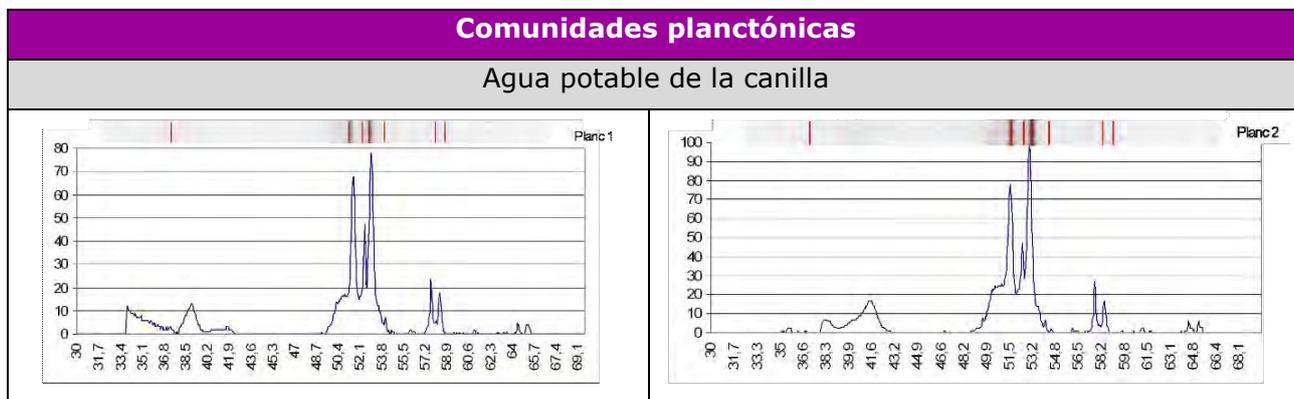


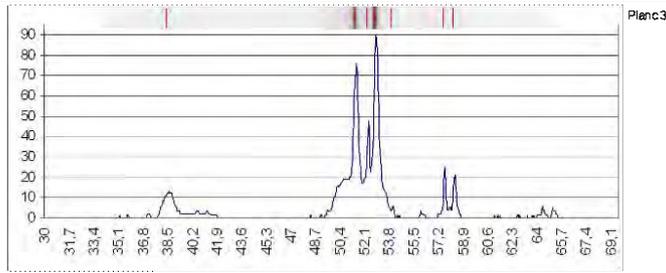




b) Procesamiento de las imágenes para el cálculo de los índices de diversidad.

A continuación, se muestran los perfiles de DGGE de cada comunidad asociados a su curva densitométrica. A partir de este procesamiento con el programa GelCompareII, se obtuvo el número e intensidad de las bandas para el cálculo de los índices **S**, **H** y **D**.

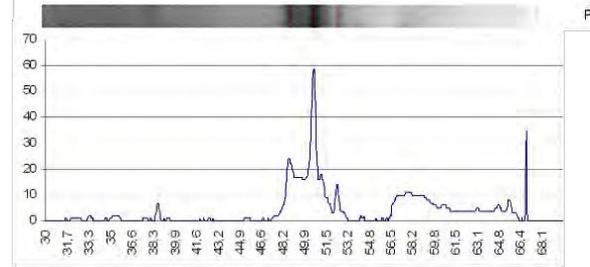
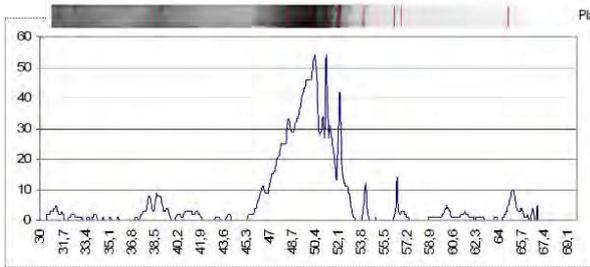




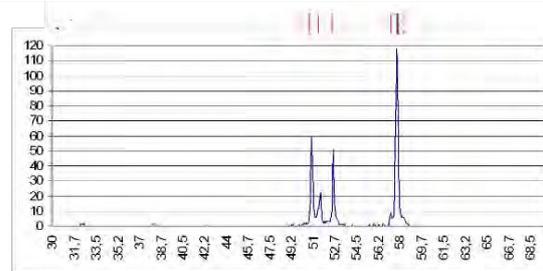
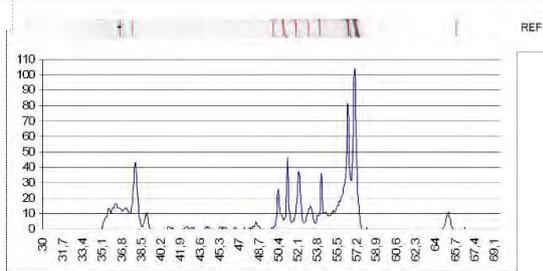
Circuito sin As(V)

Circuito con 5 mg.l⁻¹ As(V)

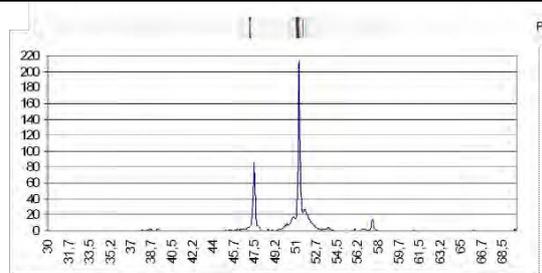
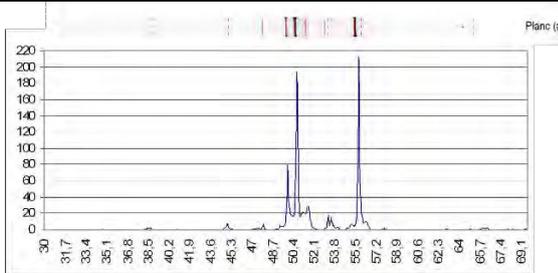
Serie 7



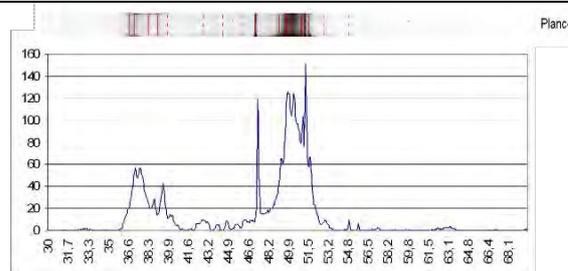
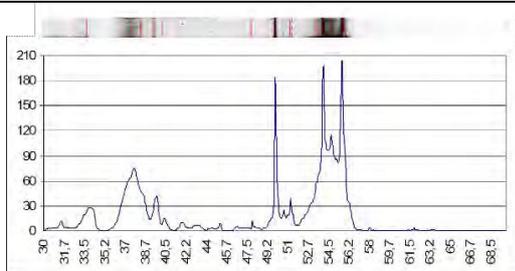
Serie 8



Serie 9

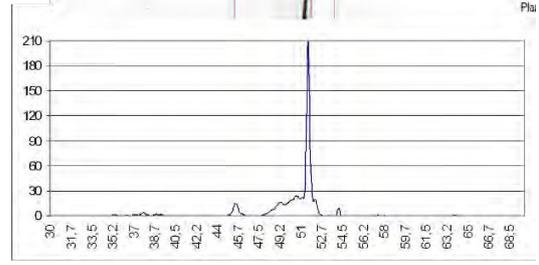
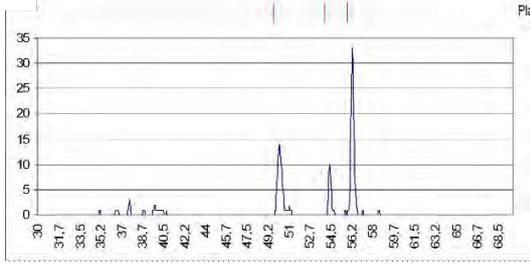


Serie 10

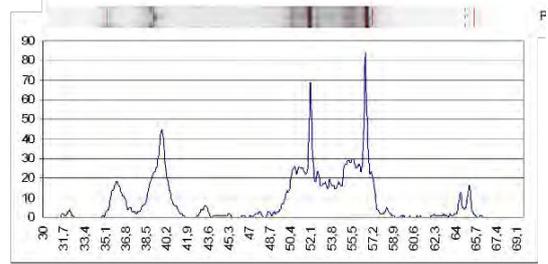
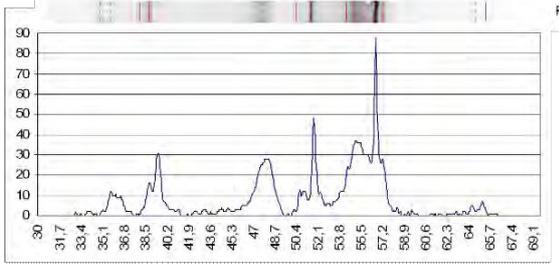


continúa

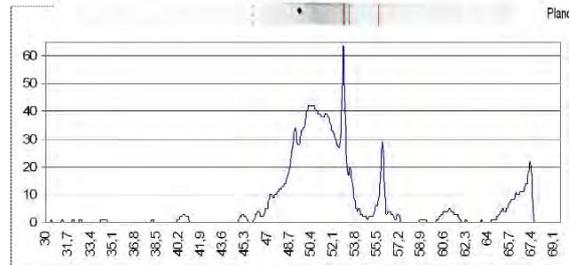
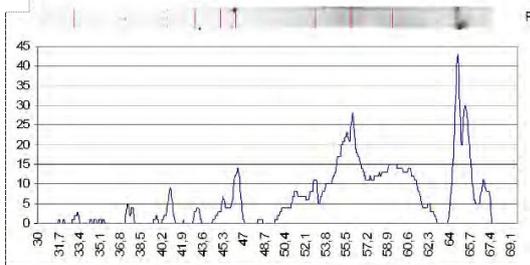
Serie 11



Serie 12



Serie 13



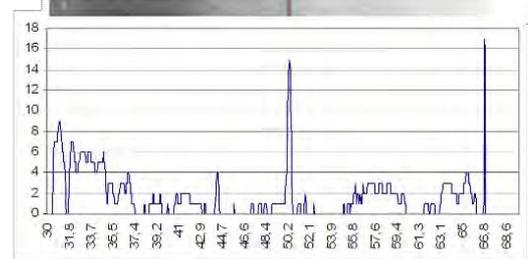
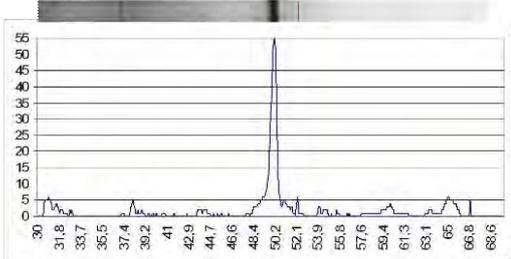
Comunidades sésiles

Circuito sin As(V)

Circuito con 5 mg.l⁻¹ As(V)

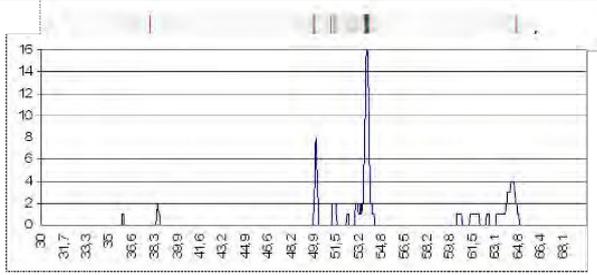
Serie 7

Fe

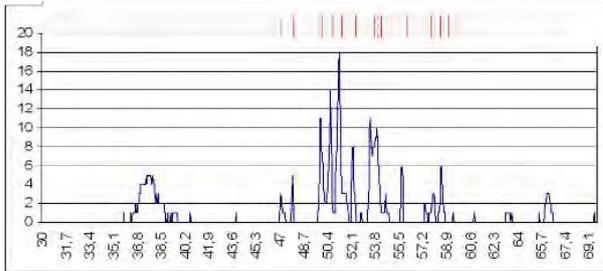


continúa

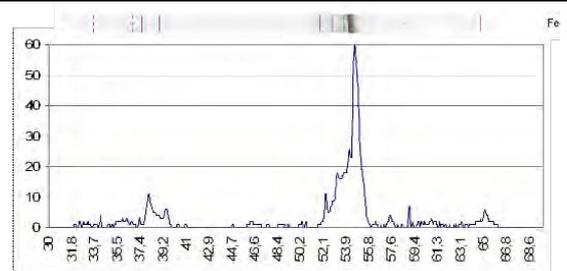
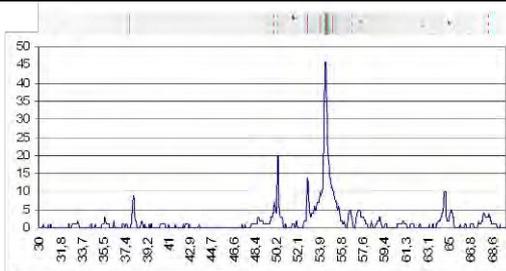
Serie 9



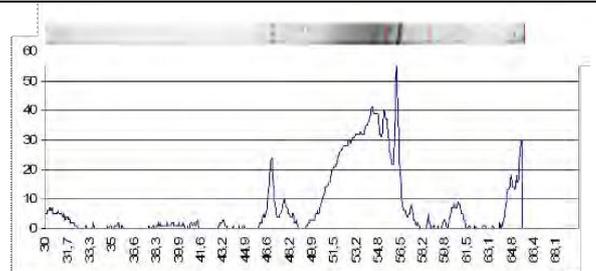
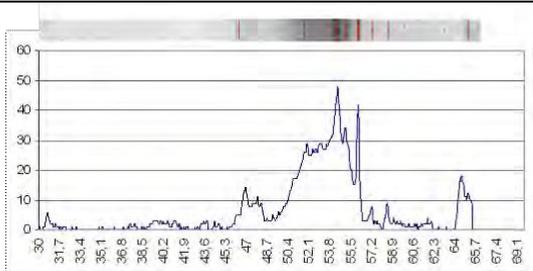
Serie 10



Serie 12

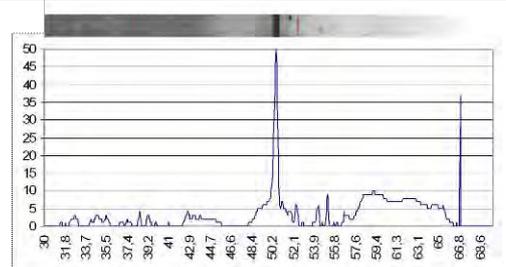
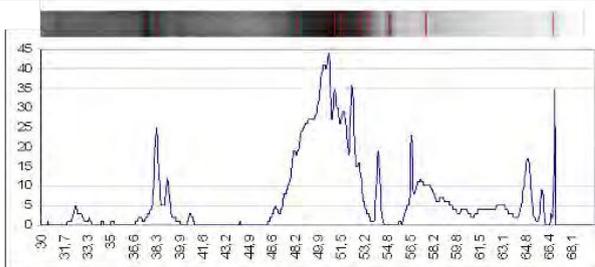


Serie 13



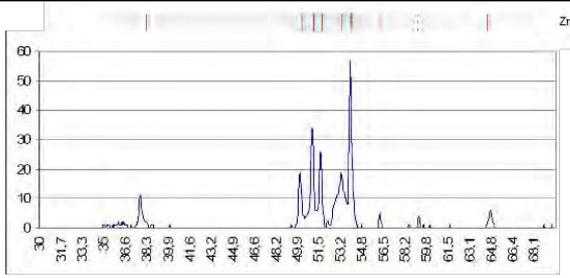
Serie 7

Zn

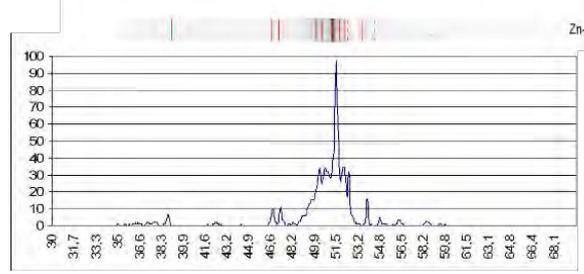
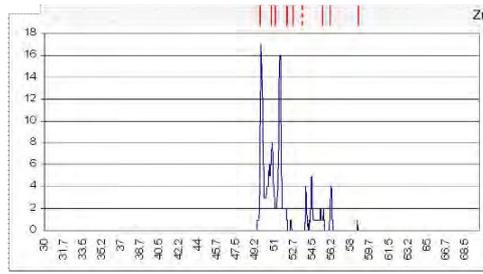


continúa

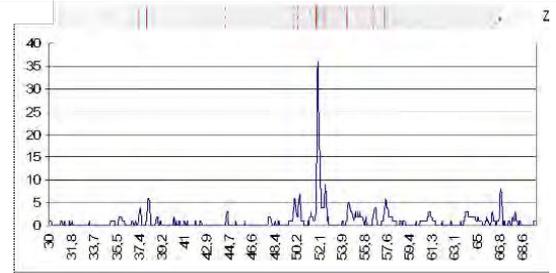
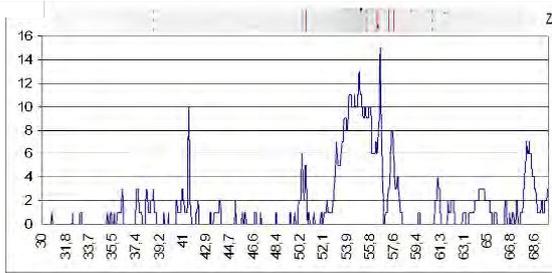
Serie 9



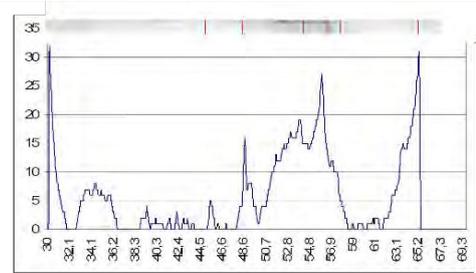
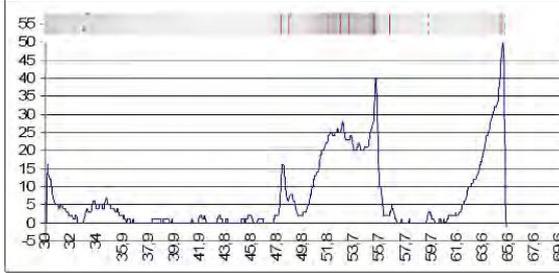
Serie 10



Serie 12

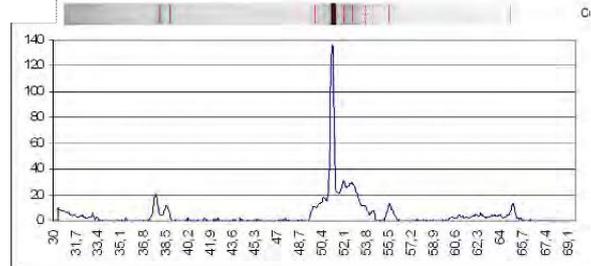
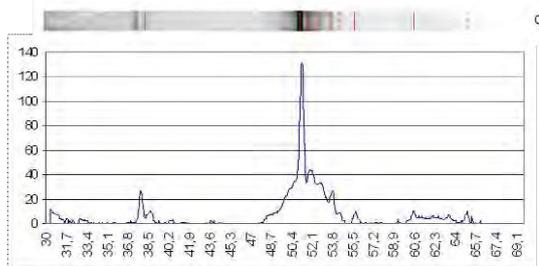


Serie 13



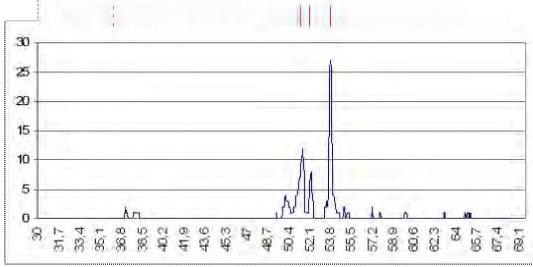
Serie 7

Cu

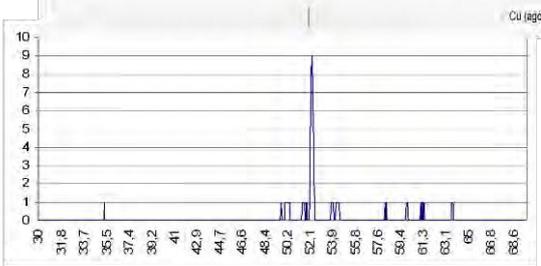


continúa

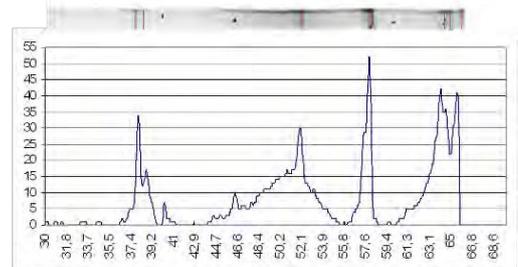
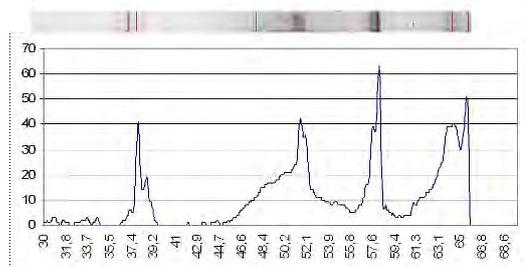
Serie 9



Serie 10

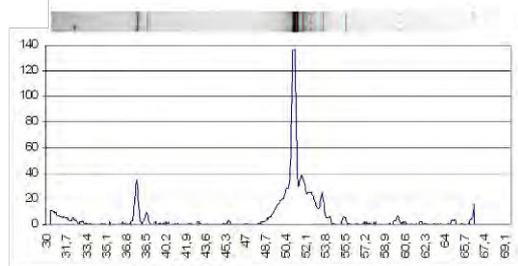
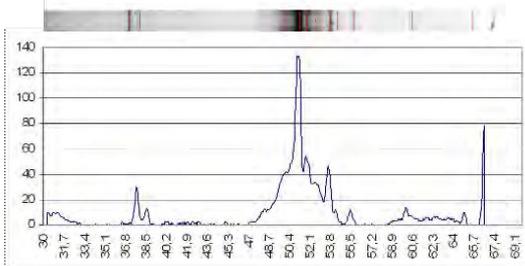


Serie 13

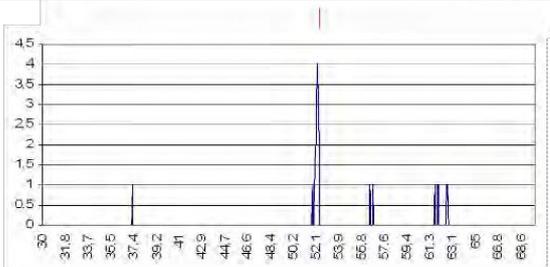


PP

Serie 7

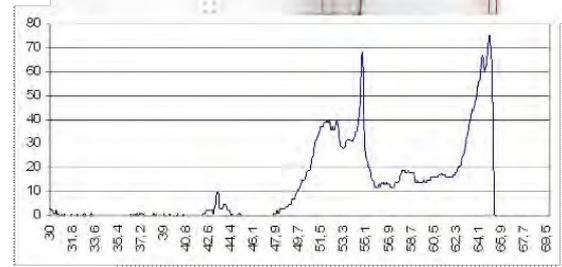
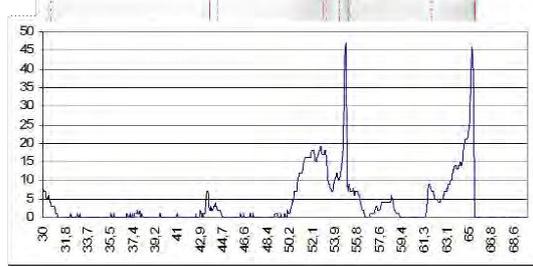


Serie 9



continúa

Serie 13



c) Cladogramas y matrices de similitud

Con el objeto de corroborar si existen relaciones entre las comunidades sésiles, a partir de los perfiles de DGGE de dichas comunidades y mediante el programa GelCompareII, se construyeron los siguientes cladogramas y sus respectivas matrices de similitud. Como puede observarse, el ordenamiento de los cladogramas en todas las figuras es el mismo, pero las comunidades se identificaron con distintos colores para visualizar algún patrón de agrupamiento (sustrato, presencia de As, o ambos factores).

En la **Figura 1** se muestra el cladograma **a)** y su correspondiente matriz de similitud **b)**. Los 4 colores observados representan los 4 sustratos, sin tener en cuenta la ausencia o presencia de arsénico.

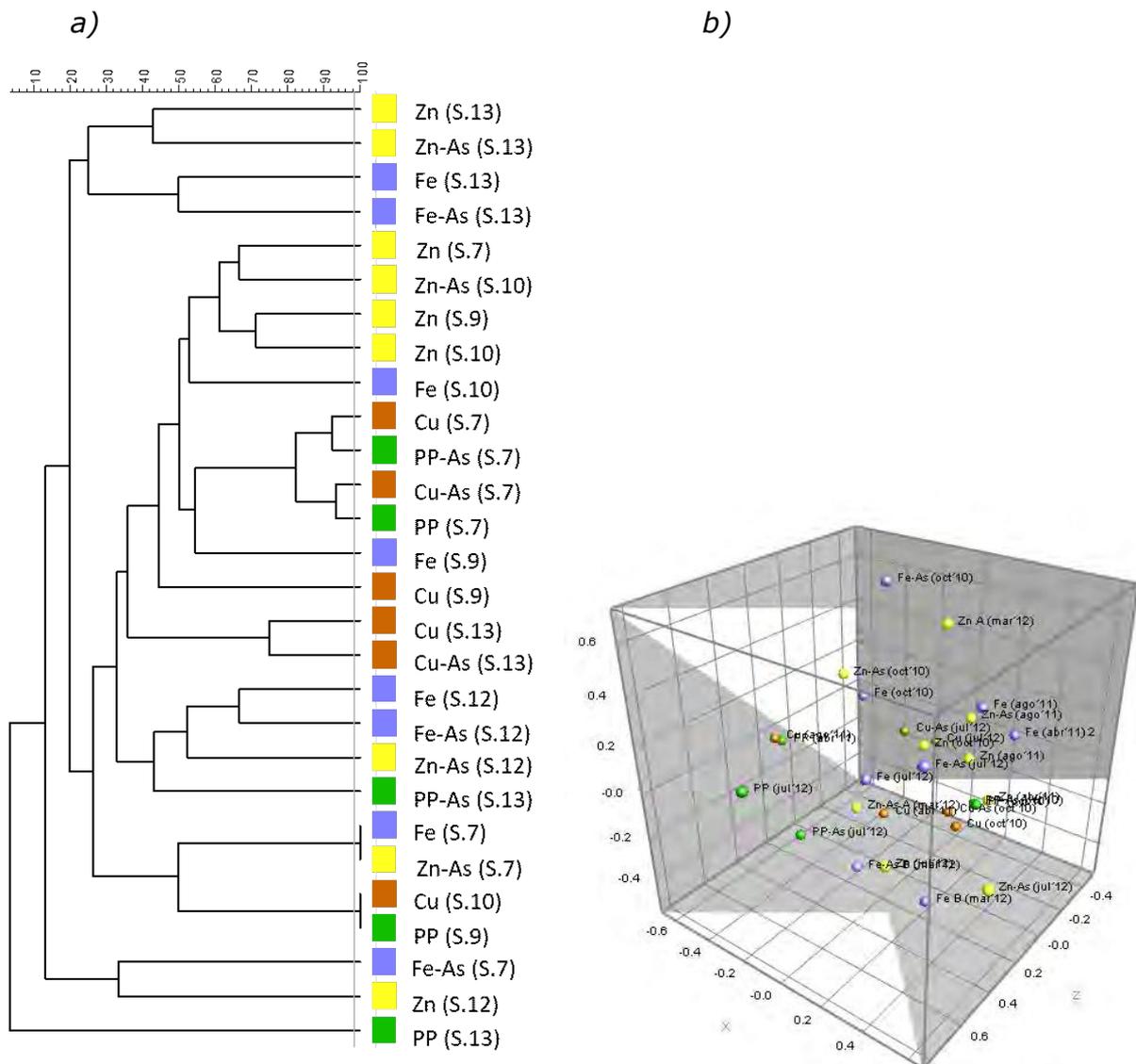
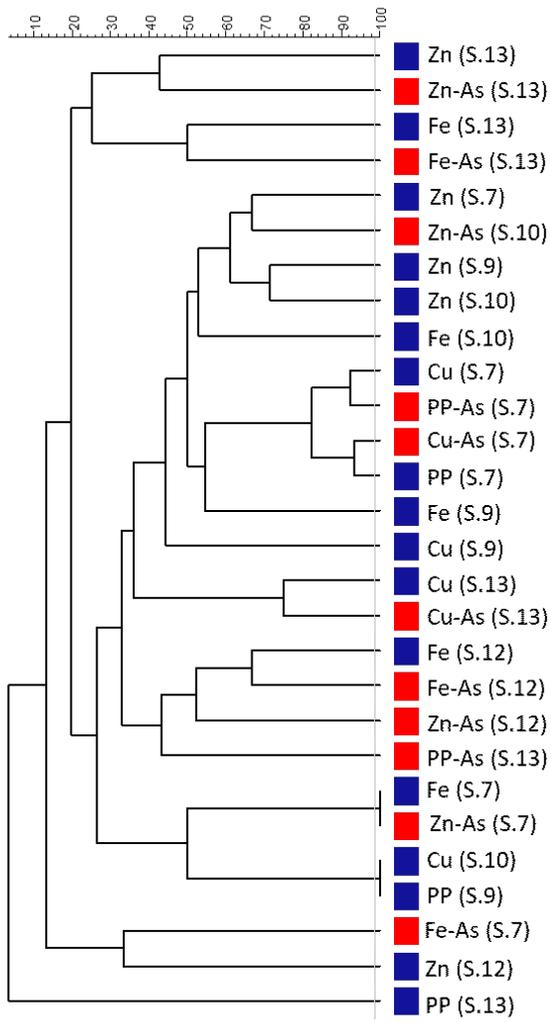


Figura 1. Análisis de similitud de los perfiles de DGGE que muestra las relaciones entre las biopelículas desarrolladas sobre los distintos sustratos ensayados. **a)** Cladograma, **b)** distribución 3D a partir de la matriz de distancia del cladograma.

En la **Figura 2** se observa el mismo cladograma y su matriz de similitud obtenida, pero en este caso presentan 2 colores que identifican la ausencia o presencia de arsénico en el agua del circuito.

a)



b)

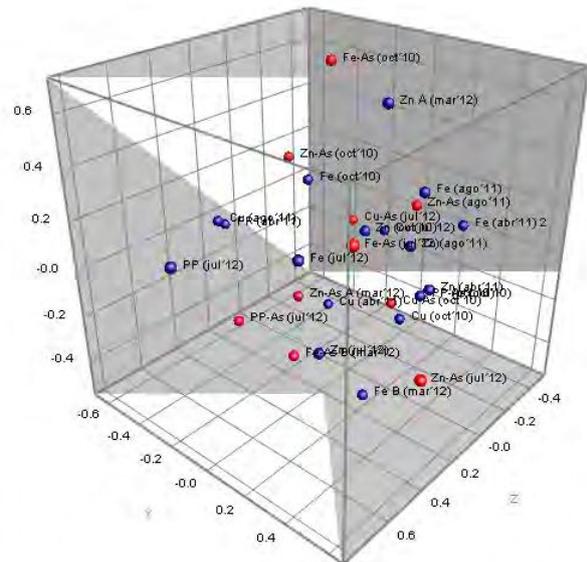


Figura 2. Análisis de similitud de los perfiles de DGGE que muestra las relaciones entre las biopelículas desarrolladas en ausencia (azul) y en presencia de As(V) (rojo) en el agua del tanque del circuito. . **a)** Cladograma, **b)** distribución 3D a partir de la matriz de distancia del cladograma.

ANEXO IV.

Mapeos

Mapeos y sus respectivos EDS realizados sobre los cupones de los materiales expuestos en los circuitos en presencia y ausencia de arsénico:

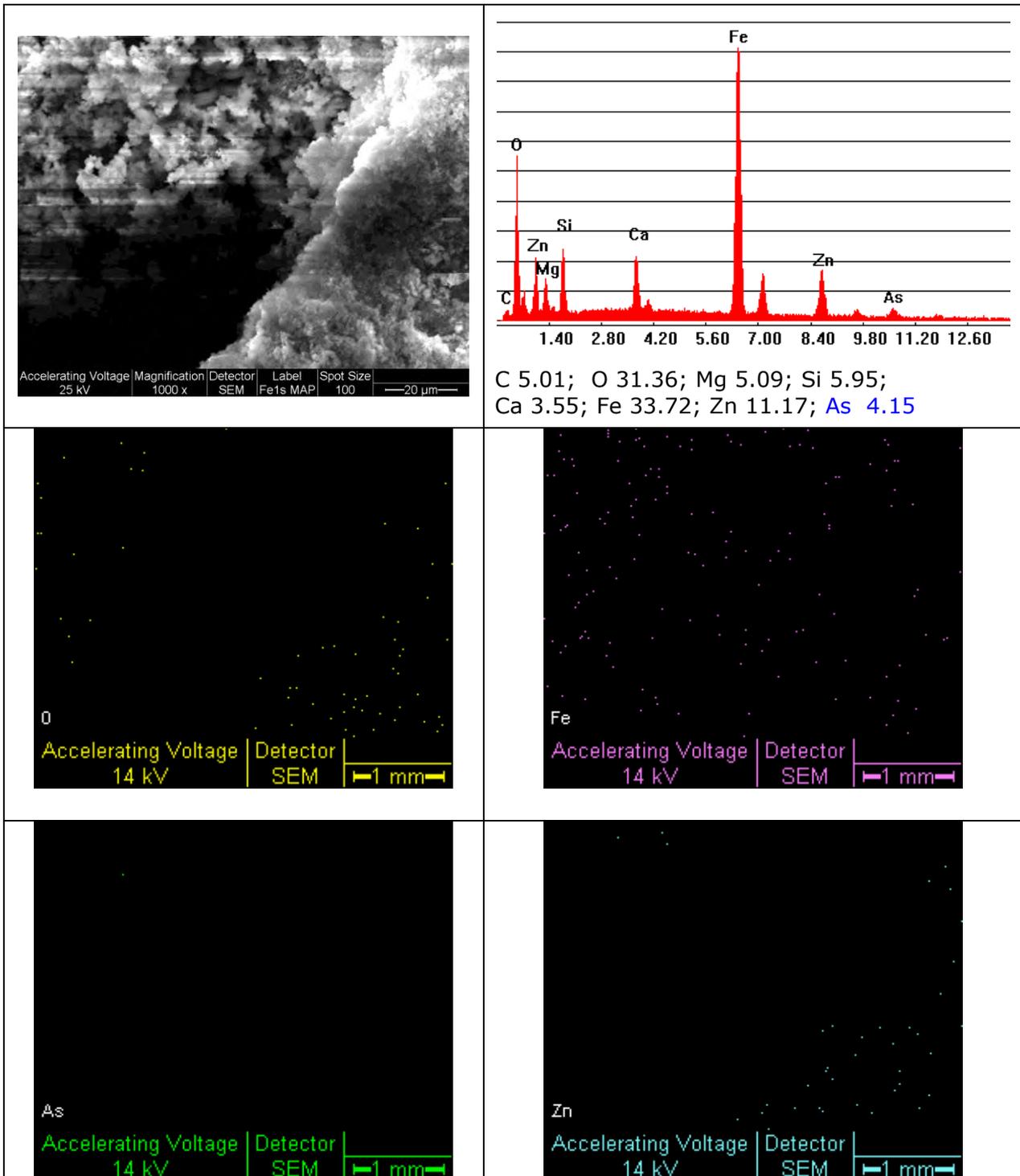


Figura 1. MAPEO sobre un cupón de Fe expuesto en el circuito de agua con arsénico.

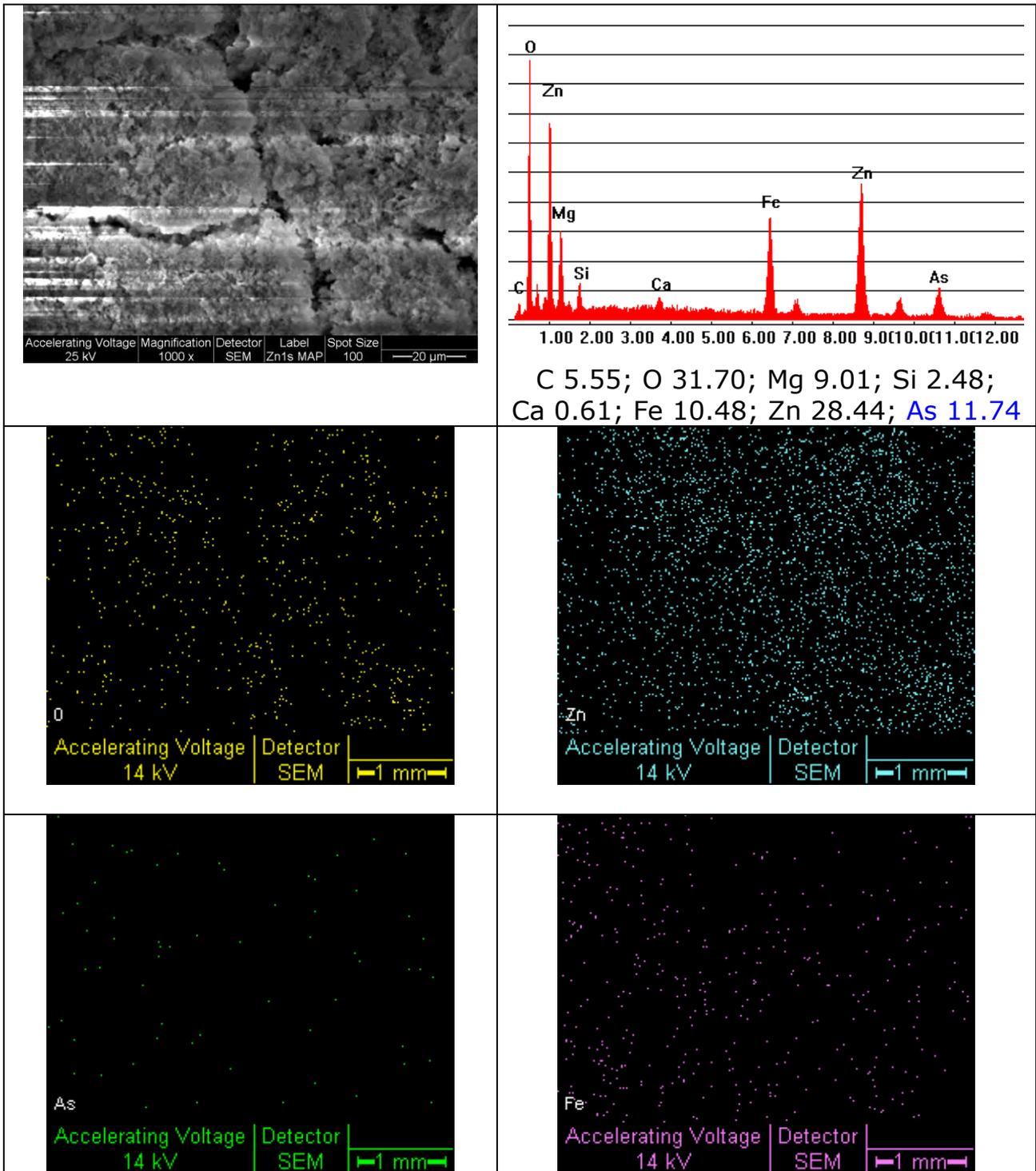


Figura 2. MAPEO sobre un cupón de Zn expuesto en el circuito de agua con arsénico

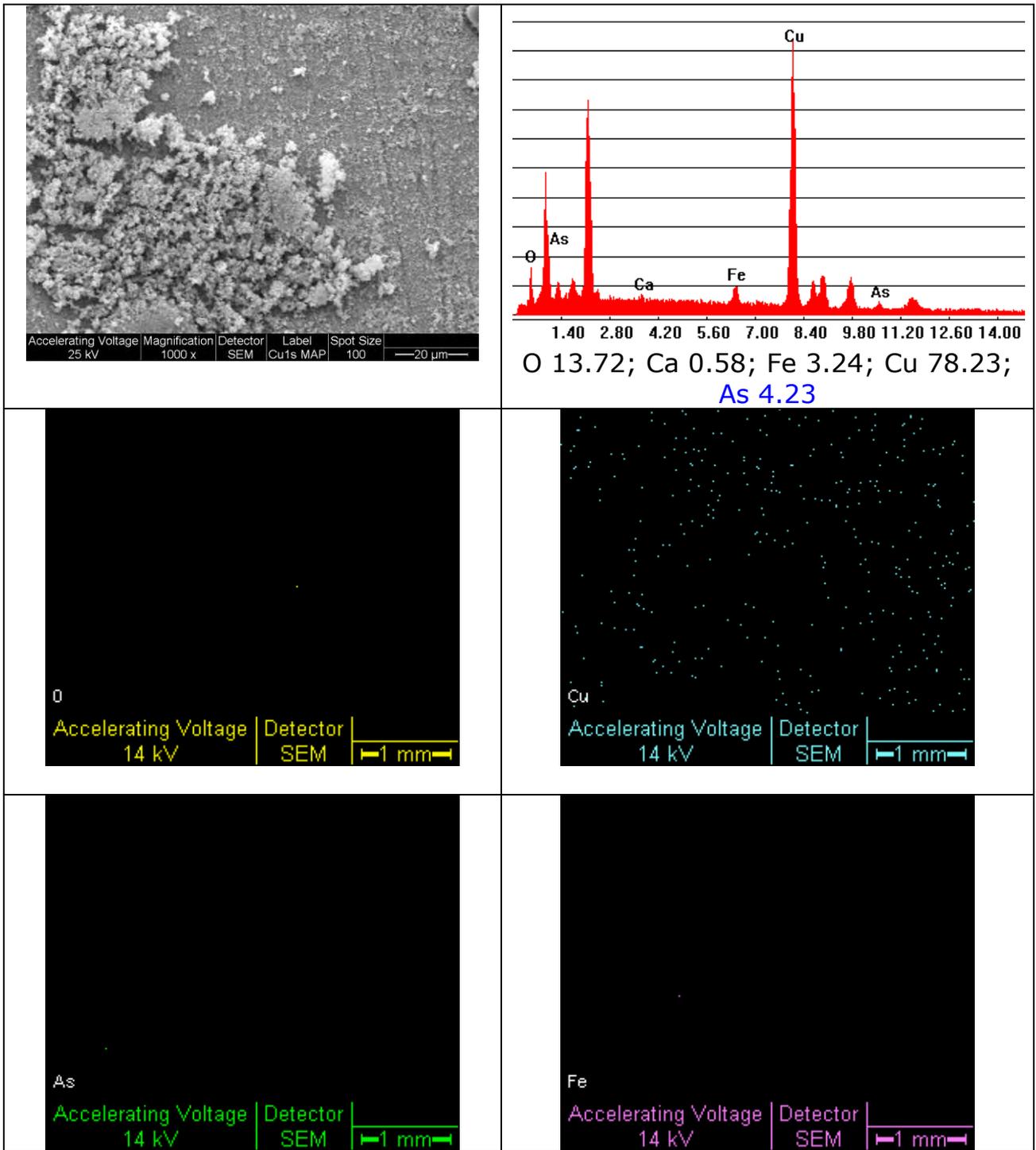


Figura 3. MAPEO sobre un cupón de Cu expuesto en el circuito de agua con arsénico.

REFERENCIAS

Anderson C.R., Cook G.M., 2004. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic contaminated sites in New Zealand, *Current in Microbiology*, Vol. 48, pp. 341–347.

Arens P., Tschewitski G.J., Wollman M., Follner H., Jacobi H., 1995. Indicators for microbiologically induced corrosion of copper pipes in a cold water plumbing system. *Zentralblatt fuer Hygiene und Umweltmedizin*, Vol. 196, pp. 444–454.

ASTM G1-03, 2011 Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens.

Atlas R.M y Bartha R., 2002. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. Capítulo 3, p. 59-92. Pearson Educación S.A. Madrid, España.

Auffan M., Rose J., Proux O., Borschneck D., Masion A., Chaurand P., Hazemann J.-L., Chaneac C., Jolivet J.-P., Wiesner M.R., VanGeen A., Bottero J.-Y., 2008. Enhanced adsorption of arsenic onto maghemite nanoparticles: As(III) as a probe of the surface structure and heterogeneity. *Langmuir*, Vol. 24 (7), pp. 3215–3222.

Averill B., Eldredge P., 2011. *General Chemistry: Principles, Patterns, and Applications*, v. 1.0 (2 Volume Set) Cap.19. Electrochemistry, Secc. 6. Corrosion. ISBN: 978-1-4533-2231-4.

Barkatt A., Pulvirenti A.L., Adel-Hadadi M.A., Viragh C., Senftle F.E., Thorpe A.N., Grant G.R., 2009. Composition and particle size of superparamagnetic corrosion products in tap water. *Water Research* Vol. 43 (13), pp. 3319–3325.

Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Claren M., Baranger P., 2002. An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 93, pp. 656–667.

Beech, I.B., 1996. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms - an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*. PII 0964-8305, pp. 141-149.

Beech I.B., Tapper R., Gubner R., 2000. Microscopy methods for studying biofilms. In: Evans, L.V. (Ed.), *Biofilms: Recent Advances for Their Study and Control*. Harwood, London, pp. 51–70.

Beech I.B., Sunner J.A., Hiraoka K., 2005. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology*. Vol.8, p.157-168.

Benítez R., Rivero S., García S.I., Antolini L., Haas A., Martin M. L., Parenti A.L., Ryczel M., Yanicelli M.T., 2011. *Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico HACRE: Módulo de Capacitación*. García, S.I. (ed.) - 1a ed. - Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones.

Berman E., 1980. *Toxic Metals and their Analysis*. Phyladelphia, PA: Heyden and Sons, London.

Berry D., Xi Chuanwu, Raskin Lutgarde, 2006. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Environmental biotechnology*. Vol. 17, p. 297–302.

Besuschio S.C, Pérez Desanzo A.C., Croci M., 1980. Epidemiological Association between Arsenic and Cancer in Argentina. *Biological Trace Element Research*. Vol. 2, p. 41-45.

Beyenala H., Donovan C., Lewandowski Z., Harkinc G., 2004. Three-dimensional biofilm structure quantification. *Journal of Microbiological Methods* 59 (2004) 395– 413.

Blackwell H. E., 2005. Bacterial Crowd Control with Iron. *Chemistry & Biology*. Vol. 12, (7), p. 721-723.

Borestein S.W. 1994. *Microbiologically Influenced Corrosion*. Handbook. Cambridge, England.

Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. Vol.13 (1), pp. 20-26.

Bremer P.J., Webster B.J., Wells D.B., 2001. Biocorrosion of copper in potable water. *Journal of American Water Works Association*, Vol. 93, pp. 82–91.

Breyers J.D., Ratner J.P., 2004. Bioinspired implant materials befuddle bacteria

ASM News, 70 pp. 232-237

Brocca D., Arvin E., Mosbæk H., 2002. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. *Water Research*, Vol. 36 (15), pp. 3675–3680.

Broo A.E., Berghult B., Hedberg T., 1997. Copper corrosion in drinking water distribution systems- The influence of water quality. *Corrosion Science*, Vol. 39 (6), pp. 1119-1132.

Brosius J., Palmer M.L., Kennedy P.J., Noller H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.*, Vol. 75 (10), pp. 4801-4805.

Bundschuh J., Farias B., Martin R., Storniolo A., Bhattacharya P., Cortes J., Bonorino G., Albouy R., 2004. Groundwater arsenic in the Chaco-Pampean Plain, Argentina: case study from Robles county, Santiago del Estero Province. *Applied Geochemistry*. Vol. 19, pp. 231–243.

Cai J., Salmon K., DuBow M.S., 1998. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology*. Vol. 144, pp. 2705-2713.

Cai L., Liu G., Rensing C., Wang G., 2009. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*, Vol.9, art. nro.4.

Camper A.K., Jones W.L., Hayes J.T., 1996. Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms. *Applied Environment and Microbiology*, Vol. 62 (11), pp. 4014–4018.

Castro J.A., 1982. Efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos del arsénico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Vol. XVI, (1), p. 3-17.

Cervantes C., Ji G., Ramírez, J.L., Silver S., 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 15, pp.355-367.

Chang H.T., Rittmann B.E., 1986. Biofilm loss during sample preparation for scanning electron microscopy. *Water Research*, Vol. 20, (11), pp. 1451–1456.

Chang Y.C., Le Puila M., Biggerstaff J., Randall A.A., Schultec A., Taylor J.S., 2003. Direct estimation of biofilm density on different pipe material coupons using a specific DNA-probe. *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 17, pp. 237–243.

Chowdhury S., 2012. Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system: a review. *Environmental and Monitoring Assessment*, 184 (10), pp. 6087–6137.

Código Alimentario Argentino. Ley 18.284. Decreto 2126/71. Capítulo XII: BEBIDAS HÍDRICAS, AGUA Y AGUA GASIFICADA. Agua Potable. Artículo 982. Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007. Modificado por Resolución Conjunta SPR N° 34/2012 y SAGyP N° 50/2012.

Colbourne J.S., Trew R.M., Dennis P.J., 1988. Treatment of water for aquatic bacterial growth studies. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 65, pp. 79-85.

Concha G., Vogler G., Lezcano D., Nermell B., Vahter M., 1998. Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicological Sciences*. Vol. 44, p. 185-190.

Cooper J.W. 1980. Spectroscopic techniques for organic chemists. Cap. 2. Interpretation of Infrared Spectra. John Wiley & Sons, Inc. USA; pp. 22-52.

Critchley M.M., Cromar N.J., McClure N.C., Fallowfield H.J., 2003. The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 94, pp. 501–507

Critchley M.M., Fallowfield H.J., 2001. The effect of distribution system bacterial biofilms on copper concentrations in drinking water. *Water Science and Technology: Water Supply*, Vol. 1, pp. 247–252.

Critchley M.M., Pasetto R., O'Halloran R.J., 2004. Microbiological influences in "blue water" copper corrosion. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 97, pp. 590–597.

Cullimore D.R., McCann A.E., 1977. The identification, cultivation and control of iron bacteria in ground water. In: FA Skinner and JM Shewan (Eds) *Aquatic Microbiology*, Academic Press, London, pp. 219-261

Dar S.A., Kuenen J.G., Muyzer G., 2005. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 2325–2330.

Davidson D., Beheshti B., Mittelman M.W., 1996. Effects of *Arthrobacter* sp., *Acidovorax delafieldii*, and *Bacillus megaterium* colonization on copper solvency in a laboratory reactor. *Biofouling*, Vol. 9, pp. 279–292.

Deshpande L.M., Kapadnis B.P., Chopade B.A., 1993. Metal resistance in *Acinetobacter* and its relation to beta-lactamase production. *Biometals* Vol.6, pp. 55-59.

Dexter S.C., 2003. ASM Handbook. Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection, Vol.13, A, p. 398-416.

Dey U., Chatterjee S., Mondal N.K., 2016. Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. *Biotechnology Reports*, Vol. 10, pp. 1-7.

Dhaval N.J., Flora S.J.S., Kalia K., 2009. *Bacillus* sp. strain DJ-1, potent arsenic hypertolerant bacterium isolated from the industrial effluent of India. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 166, pp.1500–1505.

Drewniak L., Styczek A., Majder-Lopatka M., Sklodowska A., 2008. Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environmental Pollution*. Vol. 156, p. 1069–1074.

Dukan S., Levi Y., Piriou P., Guyon F., Villon P., 1996. Dynamic modelling of bacterial growth in drinking water networks. *Water Research*, Vol. 30, (9), p. 1991-2002.

Dubiel M., Hsu C.H., Chien C.C., Mansfeld F., Newman D.K., 2002. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68 (3), pp. 1440–1445

El Abed S., Ibsouda S.K., Latrache H., Hamadi F., 2012. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Environmental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation. In: Kazmiruk V (ed) *Scanning Electron Microscopy*, ISBN: 978-953-51-0092-8, InTech (DOI: 10.5772/34990).

Fang H.H.P., Xu L.C., Chan K.Y., 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research*, Vol. 36, pp. 4709–4716.

Fariás S., Casa V., Vázquez, C., Ferpozzi L., Pucci G., Cohen I. 2003. Natural contamination with arsenic and other trace elements in ground waters of Argentine Pampean Plain. *The Science of the Total Environment*. Vol. 309, p. 187–199.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, Vol. 39, pp. 783-791.

Ferris F.G., Hallberg R.O., Lyven B., Pedersen K., 2000. Retention of strontium, cesium, lead and uranium by bacterial iron oxides from a subterranean environment. *Applied Geochemistry*, Vol.15, pp.1035–1042.

Fischer S.G., Lerman L.S., 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, Vol. 16 (1), pp. 191-200.

Gauthier V., Redercher S., Block J-C., 1999. Chlorine Inactivation of *Sphingomonas* Cells attached to goethite particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65 (1), pp. 355-357.

Gesamp, 1986. (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP) Joint group of experts on the scientific aspects of marine pollution). Review of potentially harmful substances: arsenic, mercury and selenium. Rept. Stud. GESAMP 28.

Geesey G.G., Bremer P.J., Fischer W.R., Wagner D., Keevil C.W., Walker J., Chamberlain A.H.L., Angell P., 1994. Unusual types of pitting corrosion of copper tubes in potable water systems. In: Geesey, G.G., Lewandowski, Z., Flemming, H.-C. (Eds.), *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 243–263.

Gorny J, Billon G, Lesven L, Dumoulin D, Madé B, Noiriel C., 2015. Arsenic behavior in river sediments under redox gradient: a review. *Science of Total Environment*, Vol. 505, pp. 423-434.

Green S.J., Leigh M.B., Neufed J.D., 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. (In) Timmis, K.N. (Ed) *Microbiology of*

Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds. Springer (Heidelberg, Germany), pp. 4137-4158.

Hagelberg E., Clegg J.B., 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of Royal Society of London, B Biological Sciences*, Vol. 244, pp. 45-52.

Hamzah A., Wong K.K., Hasan F.N., Mustafa S., Khoo K.S., Sarmani S.B., 2013. Determination of total arsenic in soil and arsenic-resistant bacteria from selected ground water in Kandal Province, Cambodia. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 297 (2), pp. 291-296.

Handbook of Mineralogy. Hematite. 2001-2005 Mineral Data Publishing, version 1.

Héry M., Gault A.G., Rowland H.A.L., Lear G., Polya D.A., Lloyd J.R., 2008. Molecular and cultivation-dependent analysis of metal-reducing bacteria implicated in arsenic mobilisation in south-east asian aquifers. *Applied Geochemistry*. Vol. 23, p. 3215-3223.

Heydorn A., Nielsen A.T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B.K., Molin S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, Vol. 146, pp. 2395-2407.

Higgins DA, Pomianek ME, Kraml CM, Taylor RK, Semmelhack MF, Bassler BL., 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature*. Vol. 450, (7171), pp. 883-886.

Higgins D.G., Sharp P.M., 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, Vol. 73 (1), pp. 237-44.

Höss M., Pääbo S., 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, pp. 3913-3914.

Hughes M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* Vol. 133, p. 1-16.

Hsiu-Chuan Liao V., Yu-Ju Chu, Yu-Chen Su, Sung-Yun Hsiao, Chia-Cheng Wei, Chen-Wuing Liu, Chung-Min Liao, Wei-Chiang Shen, Fi-John Chang, 2011. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*. Vol. 123, p. 20-29.

Ishii K., Fukui M., 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67 (8), pp. 3753-3755.

Jackson C.R., Harrison K.G., Dugas S.L., 2005. Enumeration and characterization of culturable arsenate resistant bacteria in a large estuary. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 28, p. 727-734.

Jain, C.K., Ali, I., 2000. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research*. Vol. 34, (17), p. 4304-4312.

Jenkinson H.F., Lappin-Scott H.M., 2001. Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, Vol. 9, (1), p. 9-10.

Ji-Dong Gu, 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 52, p. 69 - 91.

Joshi N., Wang X., Montgomery L., Elfick A., French C.E., 2009. Novel approaches to biosensors for detection of arsenic in drinking water. *Desalination*, Vol. 248, (1-3), pp. 517-523.

Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Spring S., Schumann P., Franzmann, P.D., Puhakka J.A., 2006. Novel Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria from a Geothermally Active Underground Mine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72 (5) pp. 3759-3762.

Katsoyiannis I. A., Zouboulis A.I., 2004. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. *Water Research* Vol. 38, p. 17-26.

Kerr C.J., Osborn K.S., Roboson G.D., Handley P.S., 1998. The relationship between pipe material and biofilm formation in a laboratory model system. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 85 (S1), pp. 29-38.

Kjellerup B.V., Thomsen T.R., Nielsen J.L., Olesen B.H., Frølund B., Nielsen P. H., 2005. Microbial diversity in biofilms from corroding heating systems *Biofouling*, Vol. 21, (1), pp. 19-29.

Knobelsdorf J., Mujeriego R., 1997. Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: una revisión bibliográfica. *Ingeniería del Agua*. Vol. 4 (2), pp. 17-28.

Kormas K.A., Neofitou C., Pachiadaki M., Koufostathi E., 2010. Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system. *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 165, pp. 27-38.

Krafft T. y Macy J.M. 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, Vol.255 (3), pp.647-53.

Lawrence J.R., Korber D.R., Wolfaardt G.M., Caldwell D.E., 1996. Analytical imaging and microscopy techniques. En: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 29-51.

Le Chevallier M.W., Cawthon C.D., Lee R.G., 1988. Inactivation of Biofilm Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54 (10), pp. 2492-2499.

Legendre P., Legendre L., 1998. *Numerical Ecology*. Second English Edition. *Developments in Environmental Modelling 20*. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Lehtola M.J., Miettinen I.T., Keinänen M.M., Kekki T.K., Laine O., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P.J., 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*, Vol. 38, pp. 3769-3779.

Lehtola M.J., Laxander M., Miettinen I.T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P.J., 2006. The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Research*, Vol. 40, pp. 2151-2160.

Lewandowski Z., 2000. Notes on biofilm porosity. *Water Research*, Vol. 34 (9), pp. 2620-2624.

Lewandowski Z., Beyenal H., 2003. Biofilm monitoring: a perfect solution in search of a problem. *Water Science and Technology*, Vol. 47 (5), pp. 9-18.

Li Z., Xu J., Tang C., Wu J., Muhammad A., Wang H. 2006. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere*, Vol. 62 (8), pp. 1374-1380.

Li D., Li Z., Yu, J.W., Cao N., Liu R.Y., Yang M., 2010. Characterization of bacterial community structure in a drinking water distribution system during an occurrence of Red Water. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76 (21), pp. 7171-7180.

Lin J.P., Ellaway M., Adrien R., 2001. Study of corrosion material accumulated on the inner wall of steel water pipe. *Corrosion Science*, Vol.43 (11), pp. 2065-2081.

Lin W., Yu Z., Chen X., Liu R., Zhang H., 2013. Molecular characterization of natural biofilms from household taps with different materials: PVC, stainless steel, and cast iron in drinking water distribution system. *Applied in Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97, pp. 8393-8401.

Little B., Wagner P., Ray R., Pope R., Scheetz R., 1991. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology*, Vol. 8 (4), pp. 213-221.

Little B.J., Lee J.S., 2014. Microbiologically influenced corrosion: an update. *International Materials Reviews*, Vol. 59 (7), pp. 384-393.

Liu R., Zhu J, Yu Z., Joshi D., Zhang H., Lin W., Yang M., 2014. Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system. *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 26, pp. 865-874.

Ludensky M., 2003. Control and monitoring of biofilms in industrial applications *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 51, pp. 255-263.

Luther S., Borgfeld N., Kim J., Parsons J.G., 2012. Removal of arsenic from aqueous solution: a study of the effects of pH and interfering ions using iron oxide nanomaterials. *Microchemistry Journal*, Vol. 101, pp. 30-36.

Macnaughton S., Stephen J.R., Chang Y.J., Peacock A., Flemming C.A., Leung K.T., White D.C., 1999. Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain

reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 45, pp. 116-124.

Macur R.E., Jackson C.R., Botero L.M., Mc Dermott T.R., Inskeep W.P., 2004. Bacterial Populations Associated with the Oxidation and Reduction of Arsenic in an Unsaturated Soil. *Environmental Science & Technology*. Vol. 38, p. 104-111.

Macy J.M., Santini J.M., Pauling B.V., O'Neill A.H., Sly L.I., 2000. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Archives of Microbiology*. Vol. 173, p. 49-57.

Maliszewska W., Dec S., Wierzbicka H., Wozniakowska A., 1985. The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil microorganisms. *Environmental Pollution (Ser. A)*, Vol. 37, pp. 195-215.

Manning B.A., Hunt M.L., Amrhein C., Yarmoff J.A., 2002. Arsenic(III) and arsenic(V) reactions with zero-valent iron corrosion products. *Environmental Science and Technology*, Vol. 36 (24), pp.5455-5461.

Marcus P., Maurice V. *Materials Science and Engineering – Vol. II – Fundamental Aspects of Corrosion of Metallic Materials - P. Marcus and V. Maurice* ©Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). <https://www.eolss.net/Sample-Chapters/C05/E6-36-02-04.pdf>

Margalef, R., 1958 Information theory in ecology. *General Systems*, Vol. 3, pp. 36-71.

Masud Karim M.D., 2000. Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. *Water Research*. Vol. 34, (1), p. 304-310.

Mc Murry J., 2008. *Química Orgánica*. 7ª edición. Cap.12. Determinación de la estructura: espectroscopía de masas y espectroscopía de infrarrojo. (Cengage Learning eds. S.A. México); pp. 408-438.

Metals handbook, 1987. Vol. 13, p. 492.

Mamindy-Pajany Y., Hurel C., Marmier N., Roméo M., 2011. Arsenic(V) adsorption from aqueous solution onto goethite, hematite, magnetite and zero-valent iron: effects of pH, concentration and reversibility. *Desalination*, Vol. 281, pp. 93-99.

Monds R.D., O'Toole G.A., 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*. Vol. 17, p. 73-87.

Mora J.C., Esquivel M., Durán M., Zamora R., 2015. Obtención y evaluación de mezclas de polipropileno con fibras de raquis de banano (*Musa AAA*). *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Vol. 16 (2), pp.95-111

Moritz M.M., Flemming H.C., Wingender J., 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. 213, pp. 190-197.

Mukhopadhyay R., Rosen B.P., Phung Le T., Silver S., 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 26, p. 311-325.

Muller D., Lièvreumont D., Simeonova D., Hubert J.C., Lett M.C., 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant B-proteobacterium. *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, pp.135-141.

Muyzer G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 2 (3), pp. 317-322

Muyzer G., de Wall E.D., Vitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental microbiology*, Vol. 59, pp. 695-700.

Muyzer G., Smalla K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 73, pp. 127-141

Nagiub A., Mansfeld F., 2001. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition using electrochemical noise analysis. *Corrosion Science*, Vol.43, pp. 2001-2009.

Neria-González I., Wang E.T., Ramírez F., Romero J.M., 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe*, Vol. 12 (3), pp. 122-133.

Neu T.R., Manz B., Volke F., Dynes J.J., Hitchcock A.P., Lawrence J.R., 2010. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 72, pp.1-21.

Nicolli H., Bundschuh J., Blanco M., Tujchneider O., Panarello H., Dapeña C., Rusansky J., 2012. Arsenic and associated trace-elements in groundwater from the Chaco-Pampean plain, Argentina: Results from 100 years of research. *Science of the Total Environment*. Vol. 429, p. 36–56.

NiDhubhghaill, O.M., Sadler, P.J., 1991. The structure and reactivity of arsenic compounds: biological activity and drug design. *Structure and Bonding*. Vol. 78, p.129-190.

Niquette P., Servais P., Savoie R., 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Research*, Vol. 34, (6), pp. 1952-1956.

Nriagu, J.O., 2001. Arsenic poisoning through the ages. In: *Environmental Chemistry of Arsenic* (Frankenberger, W.T., Jr., Ed.), p. 126. Marcel Dekker, New York.

Oremland R.S., Stolz J.F., Hollibaugh J.T., 2004. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 48, p. 15–27.

Oremland R.S., Stolz J.F., 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *TRENDS in Microbiology* Vol.13, (2), p. 45-49.

Otero Huerta E., 1997. *Corrosión y degradación de metales*. Cap.2. Editorial Síntesis. Madrid.

Palmer R.J. Jr., White D.C., 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology*. Vol. 5, (11), p. 435-440.

Palmer R.J. Jr., Sternberg C., 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 10, pp. 263-266.

Paolini J.D., Sequeira M., Fiorentino C.E., 2005. Mapping of arsenic content and distribution in groundwater in the southeast Pampa, Argentina. *Environmental Health*. Vol. 67, (8), p.50-53.

Paramonova, E. 2009. Compressive strength of fungal and oral biofilms: biological and environmental influences. (Tesis, University of Groningen) 113 p.

Parsek M.R., Greenberg E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*. Vol.13, (1), p.27-33.

Peng C.Y., Korshin G.V., Valentine R.L., Hill A.S., Friedman M.J., Reiber S.H., 2010. Characterization of elemental and structural composition of corrosion scales and deposits formed in drinking water distribution systems. *Water Research*, Vol.44 (15), pp. 4570-4580

Pérez Carrera A., Fernández Cirelli A., 2007. Arsenic in the southeast plains of Cordoba province, Argentine. Biotransference to bovine milk. *Veterinary Research*, Vol. 9, pp. 123-135.

Pitts B., Stewart P., 2008. Confocal laser microscopy on biofilm: Successes and limitations. *Microscopy today*, Vol. 16 (4), pp. 18-22.

Pizarro F., Olivares M., Araya M., Gidi V., Uauy, R., 2001. Gastrointestinal effects associated with soluble and insoluble copper in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 109, pp. 949–952.

Priester J.H., Horst A.M., Van De Werfhorst L.C., Saleta J.L., Mertes L.A.K., Holden P.A., 2007. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 68 (3), pp. 577–587.

Quijada Garrido I., 1996. Difusión, solubilidad e interacciones de erucamida (13-cis-docosenamida) en polipropileno isotáctico (i-PP). Tesis Doctoral. <http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/D/1/AD1023801.pdf>

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

Revetta R.P., Pemberton A., Lamendella R., Iker B., Santo Domingo J.W., 2010. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. *Water Research*, Vol. 44, pp. 1353–1360

Revetta R.P., Matlib R.S., Santo Domingo J.W., 2011. 16S rRNA Gene Sequence Analysis of Drinking Water Using RNA and DNA Extracts as Targets for Clone Library Development. *Current Microbiology*, Vol. 63, pp. 50–59.

Richards S.R., R.J. Turner. 1984. A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning electron microscopy. *Water Research*, Vol. 18(6), pp. 767-773.

Reyes A., Letelier M.V., De la Iglesia R., González B., Lagos G., 2008. Microbiologically induced corrosion of copper pipes in low-pH water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 61, pp. 135-141.

Roeder R.S., Lenz J., Tarne P., Gebel J., Exner M., Szewzyk U., 2010. Long-term effects of disinfectants on the community composition of drinking water biofilms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. 213 (3), pp. 183-189.

Rosales B., 2007. Residual useful life estimate of the Buenos Aires drinking water network. In: Scarpati OE, Jones JAA (eds) *International Geographical Union (UGI). Environmental change and rational water use*. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, 410-417.

Rosales B., Pujol M., Rastelli E., 2008. Initial steps on microbial colonization and corrosion on drinking water networks. 17th ICC, NACE, Las Vegas, NE, USA, Paper # 2519.

Rosales B.M, Rastelli S.E. 2013. Biopelículas. (Cap III.4). En: *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*, pp. 226-237. e-book: ISBN 978-987-26716-3-1.

Saitou N., Nei M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 4 (4), pp. 406-425.

Sarin P., Snoeyink V.L., Bebee J., Kriven W.M., Clement J.A., 2001. Physico-chemical characteristics of corrosion scales in old iron pipes. *Water Research*, Vol. 35 (12), pp. 2961-2969.

Schabereiter-Gurtner C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S., 2001 An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 45, pp.77-87.

Schäfer H., Muyzer G. 2001 Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, Vol. 30, pp. 425-468.

Schoenen D., 1989. Influence of materials on the microbiological colonization of drinking water. *Aqua*, Vol. 38, pp.101-113.

Schwartz T., Hoffmann S., Obst U., 1998. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research*, Vol. 32 (9), pp. 2787-2797.

Shakya S. , Pradhan B., Smith L., Shrestha J., Tuladhar S., 2012. Isolation and characterization of aerobic culturable arsenic-resistant bacteria from surfacewater and groundwater of Rautahat District, Nepal *Journal of Environmental Management*, Vol. 95, pp.250-255.

Shi X., Yan W., Xu D., Yan M., Yang C., Shan Y., Yang K., 2018. Microbial corrosion resistance of a novel Cu-bearing pipeline Steel. *Journal of Materials Science & Technology*, Vol. 34, pp. 2480-2491

Shirtliff M.E., Mader J.T., Camper A.K., 2002. Molecular Interactions in Biofilms. *Chemistry & Biology*, Vol. 9, pp.859-871.

Silver S., 1996 Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene*, Vol. 179, pp. 9-19.

Simões L.C., Simões M., Vieira M.J., 2007. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, (19), pp. 6192-6200.

Simões M., Simões L.C., Vieira M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 43, pp. 573-583.

Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, Vol. 163, pp. 688.

Srinivasan S., Harrington G.W., Xagorarakis I., Goel R., 2008. Factors affecting bulk to total bacteria ratio in drinking water distribution systems. *Water Research*, Vol. 42, (13), pp. 3393-3404.

Smedley P.L., Kinniburgh D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, Vol. 17, pp. 517-568.

Speir T.W., Kettles H.A., Parshotam A., Searle P.L., Vlaar L.N.C., 1999. Simple kinetic approach to determine the toxicity of As(V) to soil biological properties. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 31, pp.705-713.

Stanier R.Y., Palleroni N.J., Douduroff M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of Genetic Microbiology*, Vol. 43, pp. 159-271.

Starosvetsky D., Armon R., Yahalom J., Starosvetsky J., 2001. Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* Vol. 47, pp. 79-87.

Stewart P.S., Murga R., Srinivasani R., de Beer D., 1995. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research*, Vol. 29 (8), pp. 2006-2009.

Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 56, p.187-209.

Sun Y., Polishchuk E.A., Radoja U., Cullen William R., 2004. Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 58, pp. 335- 349.

Swanson J.S., 2007. Structural and spatial analysis of the microbial communities in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Tesis Doctoral, Universidad de Carolina del Norte. https://cdr.lib.unc.edu/concern/parent/pv63g127g/file_sets/z029p575z.

Switzer Blum J., Burns Bindi A., Buzzelli J., Stolz J.F, Oremland R.S., 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of Microbiology*, Vol. 171 (1), pp. 19-30.

Tamura K., Nei M., Kumar S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.*, Vol. 101, pp. 11030-11035.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 24, pp. 1596-1599.

Takeuchi M., Kawahata H., Gupta L.P., Kita N., Morishita Y., Ono Y., Komai T., 2007. Arsenic resistance and removal was evaluated in nine bacterial strains of marine and non-marine origins. *Journal of biotechnology*. Vol. 127, (3), pp. 434-442.

Tartaj P., Morales M.P., Gonzalez-Carreño T., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C.J., 2011. The iron oxides strike back: from biomedical applications to energy storage devices and photoelectrochemical water splitting. *Advanced Materials*, <https://doi.org/10.1002/adma.201101368>

Teng F., Guan Y.T., Zhu W.P., 2008. Effect of biofilm on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution system: Corrosion scales characterization and microbial community structure investigation. *Corrosion Science* Vol. 50, pp. 2816-2823.

Tello E.E., 1951. Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), sus manifestaciones clínicas. Imprenta de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Tello E.E., 1981. Las manifestaciones del Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico Argentino (HACREA). *Archivos Argentinos de Dermatología* Vol.31, p. 27-40.

Tello E.E., 1986. Arsenicismos Hídricos: ¿Qué es el hidroarsenicismo crónico regional endémico argentino (HACREA)? *Archivos Argentinos de Dermatología*. Vol. 36, p. 197-214.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. y Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25 (24), pp. 4876-4882.

Turpeinen R, Kairesalo T., Häggblom M.M., 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 47, pp.39-50.

Valverde A., González-Tirante M., Medina-Sierra M., Santa-Regina I., García-Sánchez A., Igual J.M., 2011. Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten-tin mining area. *Chemosphere*, Vol.85, pp.129-134.

- Velandia Cabra J.R., 2017. Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja. *Revista Ontare*, Vol. 5, pp. 115-140.
- Videla H.A., Salvarezza R.C., 1984. *Introducción a la corrosión microbiológica*. 1era edic. Librería Agropecuaria S.A., Bs As. Argentina.
- Villaamil Lepori E.C., 2015. Hidroarsenicismo crónico regional endémico en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Vol.49, (1), p. 83-104.
- Volk C., Dundore E., Schiermann J., Lechevallier M., 2000. Practical evaluation of iron corrosion control in a drinking water distribution system. *Water Research*, Vol. 34 (6), pp. 1967–1974.
- Wagner M., Ivlevab N.P., Haischb C., Niessnerb R., Horna H., 2009. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Research*, Vol. 43 (1), pp. 63–76.
- Waines P.L., Moate R., Moody A.J., Allen M., Bradley G., 2011. The effect of material choice on biofilm formation in a model warm water distribution system. *Biofouling*, Vol. 27 (10), pp. 1161–1174.
- Walker J.T., Hanson K., Cadwell D., Keevil C.W., 1998. Scanning confocal laser microscopy study of biofilm induced corrosion on copper plumbing tubes. *Biofouling*, Vol. 12, pp. 333–444.
- Walker J.T., Verran J., Boyd R.D., and Percival S., 2001. Microscopy methods to investigate structure of potable water biofilms. *Methods Enzymology*, Vol. 337, pp. 243–255.
- Wang H., Hu X., Hu C., 2012. Effect of chlorine and pipe material on biofilm development and structure in a reclaimed water distribution system. *Water Science & Technology: Water supply*, Vol. 12 (3), pp. 362-371.
- Wilson K.H., Blitchington R.B., Greene R.C., 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 28 (9), pp. 1942–1946.
- Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U., 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 24 (5), pp. 661–671.
- WHO. World Health Organization, 2006. *Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum*. Vol. 1, Recommendations. – 3rd ed.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*, Vol 87 (12), pp. 4576-4579.
- Xu D.K., Li Y.C., Song F.M., Gu T.Y., 2013. Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion (MIC) of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corrosion Science*. Vol. 77, pp. 385–390.
- Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S., Song, Z., 2011. Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*. Vol. 3, p. 74-81.
- Yeh S., How S.W., 1963. A pathological study on the blackfoot disease in Taiwan. *Reports, Institute of Pathology, National Taiwan University*. Vol. 14, p. 25-73.
- Yeh S., How S.W., Lin C.S., 1968. Arsenical cancer of skin, histologic study with reference to Bowen's disease. *Cancer*, Vol. 21, p. 312-339.
- Yu J., Kim D., Lee T., 2010 Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Science & Technology*, Vol. 61 (1), pp. 163-171.
- Zeliber J.L.J., Doughten M.W., Grimes D.J., Colwell R.R., 1987. Testing for bacterial resistance to arsenic in monitoring well water by the direct viable counting method. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.53, pp. 2929-2934.
- Zhang T., Fang H.H.P., 2000. Digitization of DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profile and cluster analysis of microbial communities. *Biotechnology Letters*, Vol. 22, pp. 399–405.
- Zouboulis A.I, Katsoyiannis I.A., 2005. Recent advances in the bioremediation of arsenic-contaminated groundwaters. *Environment International*. Vol. 31, p. 213– 219.
- Zuo R., Kus E., Mansfeld F., Wood T.K., 2005. The importance of live biofilms in corrosion protection. *Corrosion Science*, Vol. 47, pp. 279–287.