

ARSÉNICO EN AGUA: INFLUENCIA EN EL DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS Y EN EL BIODETERIORO DE REDES DE DISTRIBUCIÓN

Rastelli, Silvia E.^{1,2}; Rosales Blanca M.¹ y Viera Marisa R.^{1,3}

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CONICET-CCT La Plata)

2. Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP)

3. Facultad de Ingeniería (UNLP).

Av.52 s/nº e/ 121 y 122, tel. 0221-4831141, fax: 0221-4271537

serastelli@hotmail.com, marisa.viera@gmail.com, brosales@fibertel.com.ar

RESUMEN: Los sistemas de distribución de agua están expuestos a microorganismos capaces de adherirse a la superficie de los conductos y formar biopelículas, causando frecuentemente el deterioro de los mismos. Otro problema es la contaminación de las aguas con compuestos químicos de diverso origen, como por ejemplo el arsénico (As). Se ha demostrado la presencia, en ciertos microorganismos, de genes que intervienen en los procesos de movilización del As. Este trabajo se ha focalizado en estas dos problemáticas, analizando la influencia del As sobre el desarrollo y estructura de biopelículas y su consecuencia en el deterioro producido sobre diferentes materiales. Para ello se construyeron dos circuitos de circulación de agua, uno de ellos con 5mgL^{-1} de As(V), donde se expusieron cupones de cuatro materiales: Zn, Fe, Cu y Polipropileno. El estudio de las biopelículas se realizó mediante técnicas de microbiología clásica (recuento y aislamiento en cultivos) y molecular (PCR-DGGE, PCR 16s rRNA completo, PCR-gen *ars-C*), y microscopía láser confocal. Los sustratos se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y técnicas electroquímicas. En general, los cupones expuestos al circuito de agua con As revelaron un mayor número de microorganismos y depósitos (biológicos + productos de corrosión) de mayor espesor y más compactos que, consecuentemente, generan una mayor protección de los materiales. Las comunidades sésiles mostraron perfiles genéticos diferentes condicionados más por la naturaleza del sustrato que por la presencia del As. Se encontraron bacterias arsénico-tolerantes capaces de crecer en altas concentraciones de As(V) ($50\text{-}1000\text{mg.L}^{-1}$). Se identificaron especies pertenecientes a la Clase Bacilli (44%), α -Proteobacteria (35%), β -Proteobacteria (12%), γ -Proteobacteria (3%) y Actinobacteria (6%). El gen *arsC* fue detectado tanto en comunidades sésiles como en colonias aisladas.

ABSTRACT: The water distribution systems are exposed to microorganisms capable of adhering to the surface of the duct and form biofilms, often causing damage thereto. Another problem is the contamination of water with chemicals from various sources, such as arsenic (As). It has been shown that some microorganisms have genes involved in the processes of

mobilization of As. This work has focused on these two issues, analyzing the influence of As on the development and structure of biofilms and the deterioration produced on different materials. With this aim two water circulation circuits were built, one with 5mgL⁻¹ of As (V). Coupons of Zn, Fe, Cu and Polypropylene were exposed in both circuits. The study of biofilms formed was performed using classical microbiology techniques (counting and culturing) and molecular (PCR-DGGE, complete 16s rRNA PCR, PCR-gene ars-C) and confocal laser microscopy. The substrates were analyzed by scanning electron microscopy, X-ray diffraction and electrochemical techniques. In general, the coupons exposed to the water circuit with As revealed a greater number of microorganisms, thicker and more compact deposits (biological + corrosion products) which consequently generate greater protection of materials. Sessile communities showed different genetic profiles conditioned by the nature of the substrate more than by the presence of As. Arsenic-tolerant bacteria able to grow in high As (V) concentrations of (50-1000mg.L⁻¹) were found. Species belonging to the class Bacilli (44%), α -Proteobacteria (35%), β -Proteobacteria (12%), γ -Proteobacteria (3%) and Actinobacteria (6%) were identified. The arsC gene was detected in both sessile communities and isolated colonies.

Palabras claves: arsénico, biopelículas, corrosión microbiológica, microscopía, análisis molecular.

INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de bacterias presentes en los ambientes acuáticos, tanto en sistemas naturales como industriales que presentan gran tendencia a fijarse y crecer sobre las superficies (Palmer y White, 1997) y formar películas biológicas o “*biopelículas*” (Dexter, 2003). Las biopelículas son complejas estructuras tridimensionales que incluyen el material polimérico extracelular (MPE) producido por las propias bacterias que la constituyen. En estos sistemas de distribución de agua, el desarrollo de biopelículas ocasiona diversos problemas tales como la corrosión (incluso llegando al picado) o la obstrucción (parcial o total) de las tuberías y la persistencia de especies patógenas, dada la mayor resistencia a biocidas que genera la forma de vida en comunidades sésiles (Branda *et al.* 2005, Shirliff *et al.*, 2002). Estos efectos provocan el deterioro en la calidad del agua transportada, pudiendo tener consecuencias severas sobre la salud humana.

Otra problemática de los ambientes acuáticos, también de impacto sanitario, es la presencia de contaminantes químicos como compuestos aromáticos, metales pesados y metaloides. Entre estos últimos, el arsénico, es un elemento habitual en aguas de nuestra región (Pérez Carrera y Fernández Cirelli 2007; Nicolli *et al.* 2012), tanto de origen natural como antropogénico.

Existen evidencias de que la movilidad del As en aguas contaminadas puede estar asociada a la interacción con biopelículas microbianas de diversa estructura (Oremland *et al.* 2004, Oremland y Stolz, 2005). Diferentes estudios sugieren la existencia de un sistema de resistencia al arsénico en ciertas bacterias, adquirida como resultado de la exposición a ambientes con altas concentraciones de As (Cai *et al.* 1998). Esta característica de los microorganismos ha ido ganando importancia en el tratamiento de recursos contaminados - como el agua-, debido a ciertas ventajas respecto de los métodos físico-químicos convencionales (Zouboulis y Katsoyiannis, 2005)

Los **objetivos** de este trabajo fueron estudiar la influencia del arsénico sobre el desarrollo de biopelículas bacterianas sobre cuatro materiales empleados comúnmente en redes de distribución de agua, evaluar el deterioro de estos sustratos debido a la presencia de las biopelículas, y estudiar la resistencia a diferentes concentraciones de As de los microorganismos presentes en las biopelículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Circuitos experimentales y materiales a ensayar

Se construyeron dos sistemas de circulación (Fig. 1), con reservorios de PVC, de 50 l, una cañería de 200cm de largo total, y una celda acrílica extraíble de 20cm. Ambos tanques se llenaron con agua de la red de la ciudad de La Plata (Tabla 1). Uno se tomó como circuito control y al otro se le adicionaron 5mg.L⁻¹ de As(V). En las celdas extraíbles se colocaron cupones de 1x1x0.02 cm de acero de bajo carbono (AISI 1005) ("Fe"), cinc comercial (Zn 98%, Cu 1%, Ti + Mg 1%) ("Zn"), una aleación de cobre (Hidro-bronz[®]) ("Cu") y polipropileno ("PP"). Con el objeto de evitar turbulencias durante la circulación, el espesor de los cupones se llevó a 0.02cm, esto se logró mediante laminación en frío en el caso de los cupones metálicos y mediante termocompresión para el PP. Los cupones metálicos fueron lijados con lija de grano 1200 y todos los cupones fueron desengrasados con acetona y enjuagados con abundante etanol antes de colocarse dentro de cada circuito.

Tabla 1. Características físico-químicas del agua de la red de la ciudad de La Plata.

Compuesto	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺¹	K ⁺¹	Cl ⁻¹	SO ₄ ⁻²	Cl ₂ libre inicial	pH= 6.5
Concentración (mg.L ⁻¹)	17	19	75	5	130	105	0.5 – 0.6	

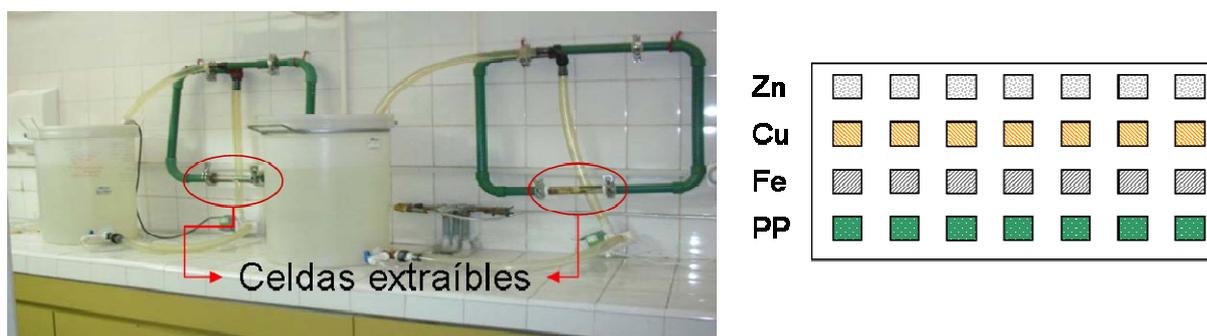


Figura 1. Circuitos de circulación de agua. A la derecha se muestra un esquema de la disposición de los cupones colocados en las celdas extraíbles expuestos en ambos circuitos.

Caracterización microbiológica

Luego de 45-60 días de exposición (período denominado "serie") se retiraron en condiciones de esterilidad todos los cupones de ambos circuitos. Cuatro cupones de cada material se utilizaron en el análisis microbiológico: se rasparon individualmente para desprender la biopelícula adherida, la cual se colocó en 1ml de solución fisiológica estéril (SFE), se realizaron las diluciones correspondientes, se sembraron 100 µl en placas con agar nutritivo, se incubaron a 30°C por 96hs y se realizaron los recuentos de bacterias, evaluando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de área. Estos datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de dos vías ($\alpha=0.5$).

A partir de estas placas de recuento, se aislaron y sembraron en nuevas placas las colonias fenotípicamente diferentes para su posterior identificación.

Para evaluar la tolerancia al As(V) se sembraron 0,5ml de biopelícula en SFE, en caldo nutritivo con diferentes concentraciones de As(V) ($50-1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y se realizaron las diluciones seriadas de cada concentración.

El análisis molecular se realizó a partir de:

- *Comunidades sésiles totales*: La suspensión de las biopelículas de los 4 cupones de cada material, se centrifugaron a 13.000g y se descartó el sobrenadante.
- *Comunidades cultivables tolerantes*: se tomaron 2ml de cultivo 1/10 de cada concentración, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante
- *Colonias aisladas*: se tomó una pequeña cantidad con una punta de ansa estéril y se resuspendió en 0.8 ml de agua destilada estéril.

En todos los casos se realizó la extracción de ADN mediante un kit comercial (E.Z.N.A. Soil DNA kit Omega bio-tek) según sus instrucciones de uso. Luego de verificar la extracción positiva por electroforesis en gel de agarosa, se amplificó el ADN de las muestras por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores adecuados para cada objetivo: en las comunidades sésiles totales se utilizaron el 907R y el 341F con cola CG (para su posterior análisis en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturante (DGGE)) y diferentes pares de cebadores para amplificar el gen *arsC* (Macur *et al.* 2004, Drewniak *et al.* 2008). Las comunidades cultivables tolerantes se amplificaron con cebadores 907R y 341F con cola CG (para DGGE).

Los geles para DGGE fueron preparados adecuadamente para conseguir el gradiente 30 - 70% de agente desnaturante; la electroforesis se realizó en buffer TAE a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100 V durante 16 hs. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron en Sybr Gold, se fotografiaron, y las imágenes se analizaron mediante software adecuado.

El ADN de las colonias aisladas se amplificó con los cebadores 27F y 1492R para su posterior secuenciación (Macrogen, Corea) e identificación con el programa público BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Observación y análisis de los depósitos inorgánicos y biológicos.

Para la observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB), una vez retirados, los cupones, se enjuagaron con agua destilada estéril. La biopelícula se fijó en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato salino (PBS) durante 24hs, se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (20; 40; 60; 80 y 100% etanol), entre 30-40 min. por concentración, se hizo el secado de la muestra por punto crítico y finalmente se metalizaron con una lámina de oro. La observación y fotografiado se realizó en diversos MEBs (Zeiss SupraTM 40; FEI Quanta 200; Philips 505) acoplados a analizadores de rayos X, los que permitieron obtener el análisis semicuantitativo de los elementos depositados.

Con el objeto de una mejor interpretación de la estructura interna de las biopelículas depositadas, un cupón de cada material fue teñido con naranja de acridina al 0,01% en PBS, durante 5 min. y enjuagado con agua destilada. Los cupones fueron observados en un microscopio láser Confocal (MLC) y se fotografió a 100x cada $5\text{ }\mu\text{m}$ a lo largo de todo el espesor de la biopelícula ($\lambda=488\text{nm}$). La reconstrucción de la estructura tridimensional se realizó mediante el programa Image J versión 1.45.

Para los ensayos electroquímicos se construyeron mini-celdas en las que los electrodos de trabajo fueron los cupones metálicos sin exponer, utilizados como blanco de referencia, y los cupones expuestos en ambos circuitos. El contraelectrodo fue un cilindro de grafito y el electrodo de referencia un electrodo de Hg/HgSO_4 , sat. Los ensayos se realizaron en solución de Na_2SO_4 0,1 M en presencia de O_2 disuelto, sin agitación. Las curvas de polarización anódicas cuasi-estacionarias fueron obtenidas con un

potentiostato/galvanostato (EG & G Princeton Applied Research modelo 273 A) en el rango de potencial de -0,025 a 500 mV y con una velocidad de barrido de 0,166mV/s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización microbiológica

Recuento de comunidades sésiles

totales: en la Figura 2, se observan los resultados de los recuentos de las bacterias adheridas sobre los cuatro materiales expuestos en ambos circuitos. Las barras del gráfico representan el promedio de los recuentos de 10 series realizadas y los datos están expresados en escala logarítmica. Es posible notar una gran dispersión entre los recuentos en una misma condición, a pesar de ello el análisis estadístico arrojó diferencias significativas: en cuanto a los **sustratos:** se hallaron diferencias en los recuentos de los cupones expuestos al agua con As entre el **Zn** y **Cu** y entre **Zn** y **PP**. Respecto de la **influencia de As(V)**, se hallaron diferencias significativas sólo entre los recuentos de los cupones de **Zn**. Si bien no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas debidas a la influencia del As sobre todos los sustratos, es posible notar en el gráfico (Fig.2) que los promedios de recuentos son mayores en los cupones expuestos al circuito con As(V), datos concordarían con el concepto de que los microorganismos presentan una mayor tendencia a formar biopelículas en ambientes más hostiles, ya que esta forma de vida sésil y en comunidad les confiere un mecanismo de defensa frente a estas condiciones adversas (Branda *et al.* 2005, Shirliff *et al.*, 2002). Esta tendencia no se ve reflejada en los cupones de Cu, debido a la naturaleza tóxica del mismo.

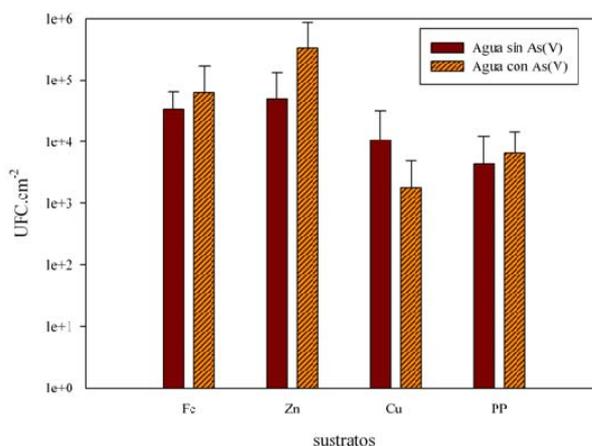


Figura 2. Valores promedio de los recuentos de bacterias adheridas (UFC.cm⁻²) obtenidos sobre los cuatro materiales testeados en ausencia y presencia de 5mg.L⁻¹ de As(V). eje y en escala log. barras representan la desviación estándar, n= 10.

Recuento de comunidades sésiles tolerantes: en las diluciones seriadas de caldo nutritivo en diferentes concentraciones de As(V) fue posible obtener cultivos positivos a partir de biopelículas provenientes de Fe, Zn y PP hasta en 1000mg.L⁻¹ de As, mientras que las biopelículas provenientes de cupones de Cu toleraron hasta 300mg.L⁻¹ de As (Tabla 2).

Tabla 2. Recuentos en cultivos líquidos (caldo nutritivo) de las biopelículas en diferentes concentraciones de As(V). (Valores en microorganismos.mL⁻¹)

Sustrato	[As]	50 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	200 mg.L ⁻¹	300 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1000 mg.L ⁻¹
Zn - As		10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵				
Fe - As		10 ⁵ - 10 ⁶					
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
Zn		10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵	10 ³ - 10 ⁴			
Fe		10 ⁵ - 10 ⁶	10 ³ - 10 ⁴	10 ⁴ - 10 ⁵			
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	sin datos	sin datos

Identificación de colonias aisladas: a partir de la comparación de las secuencias de nucleótidos en el programa BLAST se identificaron bacterias pertenecientes a distintas clases: el género *Paenibacillus* y varias especies y cepas del género *Bacillus*, ambos pertenecientes a la Clase Bacilli (44%); los géneros *Kokuria* y *Janibacter* de la Clase Actinobacteria (6%); los géneros *Brevundimonas* y *Sphingomonas* pertenecientes a la Clase Alpha-proteobacteria (35%), el género *Delftia* de la Clase Beta-proteobacteria (12%), y el género *Acinetobacter* de la Clase Gamma-proteobacteria (3%). En la Figura 3 puede observarse la distribución de las Clases bacterianas sobre los distintos sustratos en presencia y ausencia de 5mg.L⁻¹ As(V).

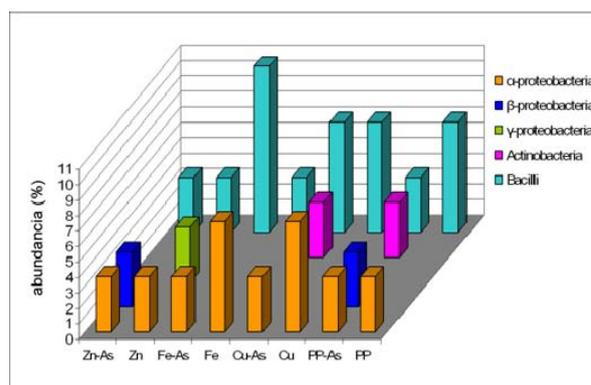


Figura 3. Abundancia relativa (en porcentaje) de las Clases bacterianas encontradas sobre los distintos sustratos en presencia o ausencia de As(V)

Caracterización de comunidades mediante DGGE: la técnica de PCR-DGGE del ADN total de las comunidades sésiles permite una descripción de la estructura las biopelículas. En este análisis, el número de bandas de DGGE se tomó como indicador del número de especies presentes en la muestra. Esta técnica refleja las poblaciones predominantes (proporción mayor al 1% aproximadamente) (Portillo y Gonzalez, 2008), es decir que poblaciones que se encuentran en menor proporción pueden no ser detectadas.

En la Figura 4 se muestran los perfiles pertenecientes a las biopelículas desarrolladas sobre los 4 materiales. En este análisis se incluyeron todas las muestras en las que fue posible obtener el ADN de la comunidad sésil en las diferentes series realizadas. En algunas series no se obtuvo ADN de alguno de los materiales (principalmente sobre PP y Cu), situación que se correlacionó con los bajos recuentos obtenidos. Los perfiles de las biopelículas son distintos entre las diferentes condiciones de ensayo. Si bien hay estudios que han encontrado que la presencia de un contaminante afecta las características y la estructura de toda la comunidad (Muller *et al.*, 2001), y a pesar de la falta de algunas muestras de ADN para su comparación, parecería ser que estas diferencias están más influenciadas por la naturaleza del sustrato que por la presencia de 5mg.L⁻¹ de As en el agua, ya que comparando las calles indicadas con "a" (circuito sin As) y "b" (circuito con As) de una misma serie de cada material no existen mayores diferencias. Podría decirse que lo que condiciona el desarrollo de las distintas poblaciones es el tipo de material y la susceptibilidad a la colonización de los mismos, más que la presencia del contaminante.

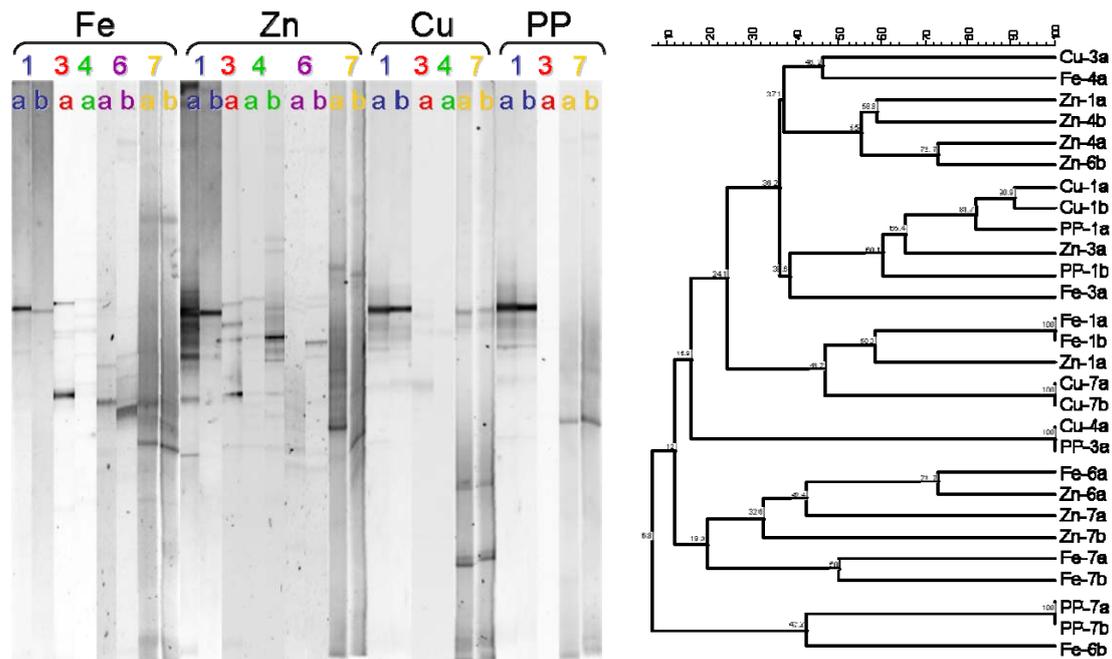


Figura 4. Izq.: Perfiles de DGGE de 16S ARNr del ADN de las comunidades sésiles desarrolladas sobre los cuatro sustratos ensayados. Der.: Análisis del agrupamiento de los perfiles de DGGE (el número sobre las ramas indica el % de similitud). Referencias: **1- 7**: series; **a**: circuito sin As; **b**: circuito con As.

En la Figura 5 se observa el gel correspondiente a las bacterias sésiles cultivables en presencia de diferentes concentraciones de As(V) y su respectiva biopelícula de origen, para los tres materiales metálicos. Puede notarse que, aún en altas concentraciones de As en el cultivo, el número de bandas y/o la intensidad de las mismas es mayor respecto de la biopelícula original. En general, la intensidad de las bandas en los perfiles de DGGE correspondientes a cultivos es mayor que en muestras ambientales, ya que la cantidad de ADN obtenido de cultivos es mayor. Si bien sería esperable una selección de especies resistentes, reflejado en un menor número de bandas en presencia del contaminante, esto no es lo que ocurrió en nuestro caso, hecho que concuerda con resultados de algunos autores (Rasmussen y Sørensen, 2001; Dell'Amico *et al.*, 2008) y se contrapone al de otros.

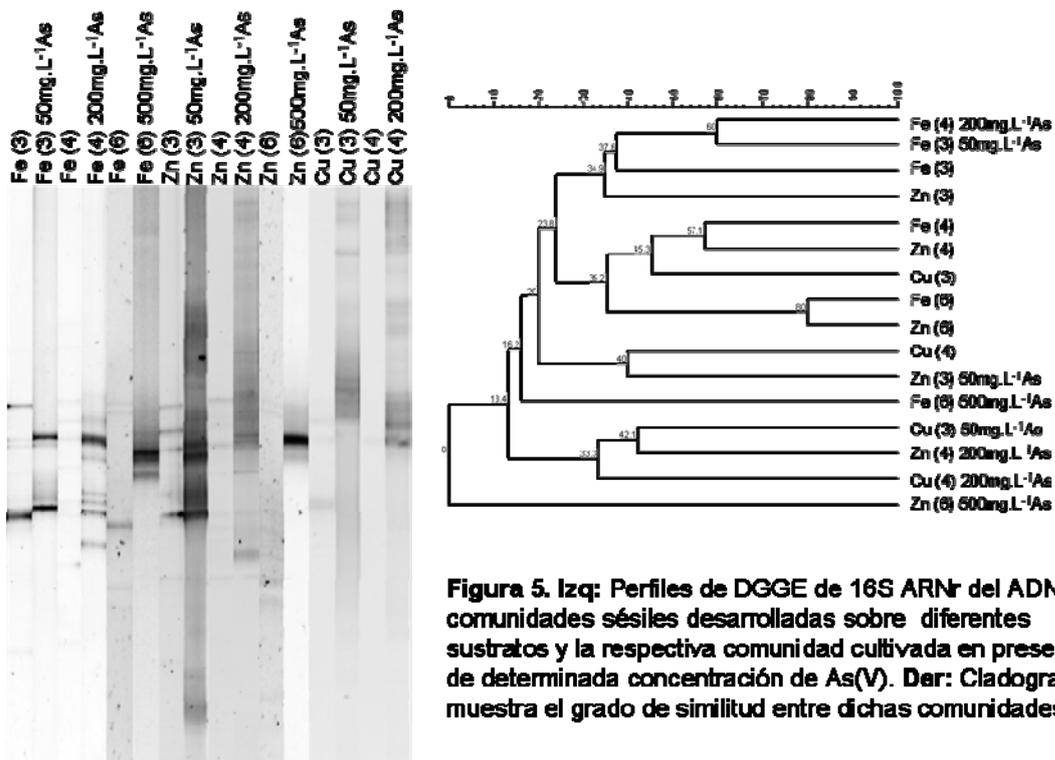


Figura 5. Izq: Perfiles de DGGE de 16S ARN^r del ADN de comunidades sésiles desarrolladas sobre diferentes sustratos y la respectiva comunidad cultivada en presencia de determinada concentración de As(V). Der: Cladograma que muestra el grado de similitud entre dichas comunidades

Detección del gen *arsC*: la presencia del componente genético asociado a la resistencia al As fue confirmada tanto en biopelículas (Cu-As, PP-As, Fe y Zn) como en algunas de las bacterias identificadas (Fig. 6) en ambos circuitos.

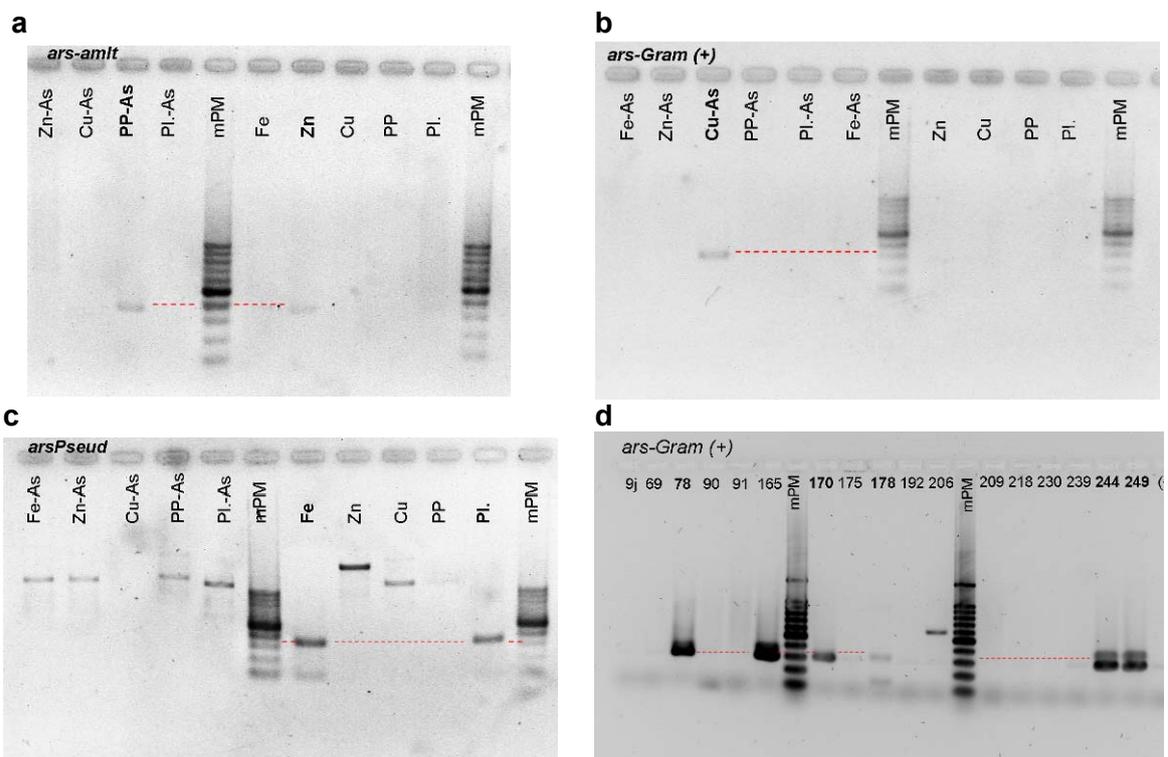


Figura 6. a, b y c: Detección de componentes del gen de resistencia a arsénico en comunidades sésiles. d: Detección de componentes del gen de resistencia a arsénico en bacterias aisladas.

Observación y análisis de los depósitos inorgánicos y biológicos

Análisis MEB-EDS de los depósitos inorgánicos: transcurrido el tiempo de circulación, sobre los cupones se observa a simple vista una película (MO + EPS + productos de corrosión) de distribución muy heterogénea incluso entre replicados del mismo material de una misma serie. Aún así, puede destacarse que los cupones provenientes del circuito con As(V) presentan un mayor desarrollo de las biopelículas y consecuentemente mayor cantidad de productos de corrosión, principalmente sobre Fe y Zn. En todos los casos fue posible observar la presencia de microorganismos sobre los cupones tanto en ausencia como en presencia de As(V). Sobre el Cu y el PP la discontinua y delgada capa de los depósitos permite observar claramente las bacterias en contacto directo con la superficie del material, por el contrario, a pesar de los mayores recuentos obtenidos de las biopelículas desarrolladas sobre Fe y Zn, es más difícil la observación de las bacterias ya que se encuentran distribuidas entre la gran cantidad de productos de corrosión (Fig. 7). No se detectaron diferencias debidas al As, por ello se muestra sólo una de las condiciones de ensayo de los materiales. Cabe destacar que los defectos de la superficie del PP no expuesto detectados aún en cercanías de los microorganismos, no son atribuibles a un efecto de biodeterioro o biodegradación, sino a irregularidades producidas durante la termocompresión. Así mismo, el material inorgánico depositado sobre estos cupones proviene de los productos de corrosión generados sobre los otros materiales y transportados por el agua.

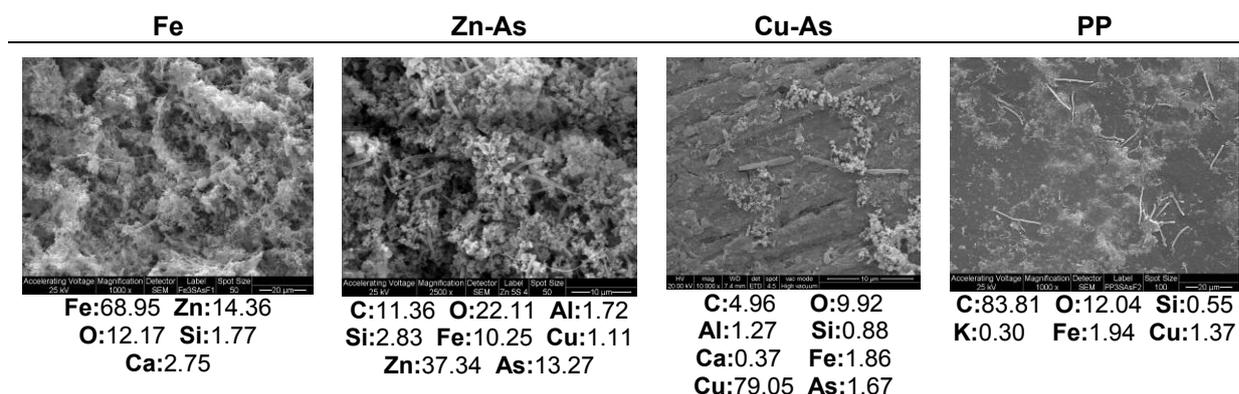


Figura 7. MEB-EDS de las biopelículas desarrolladas sobre los cuatro sustratos ensayados. En la primera fila se indica el sustrato, “-As” indica la exposición al circuito con 5 mg.L^{-1} As(V).

MLC: las biopelículas formadas sobre todos los materiales presentan una topografía muy heterogénea, coincidente con las observaciones a simple vista y al ME. El aspecto es también concordante con la literatura: grupos de células rodeados por una matriz y canales que la atraviesan. A través de las imágenes 3-D reconstruidas (Figura 8) puede notarse que, en presencia de As, los depósitos formados sobre Fe, Zn y PP son de mayor espesor y más compactos, datos que se correlacionan con los mayores recuentos y con el mayor efecto barrera generado por los depósitos (ver siguiente sección: “análisis electroquímico”) en estas condiciones de ensayo. Probablemente esto este asociado a la tendencia de formación de biopelículas como mecanismo de defensa frente a un contaminante. Esta característica no es observable sobre el Cu, ya que este material tiene en sí mismo un efecto biocida.

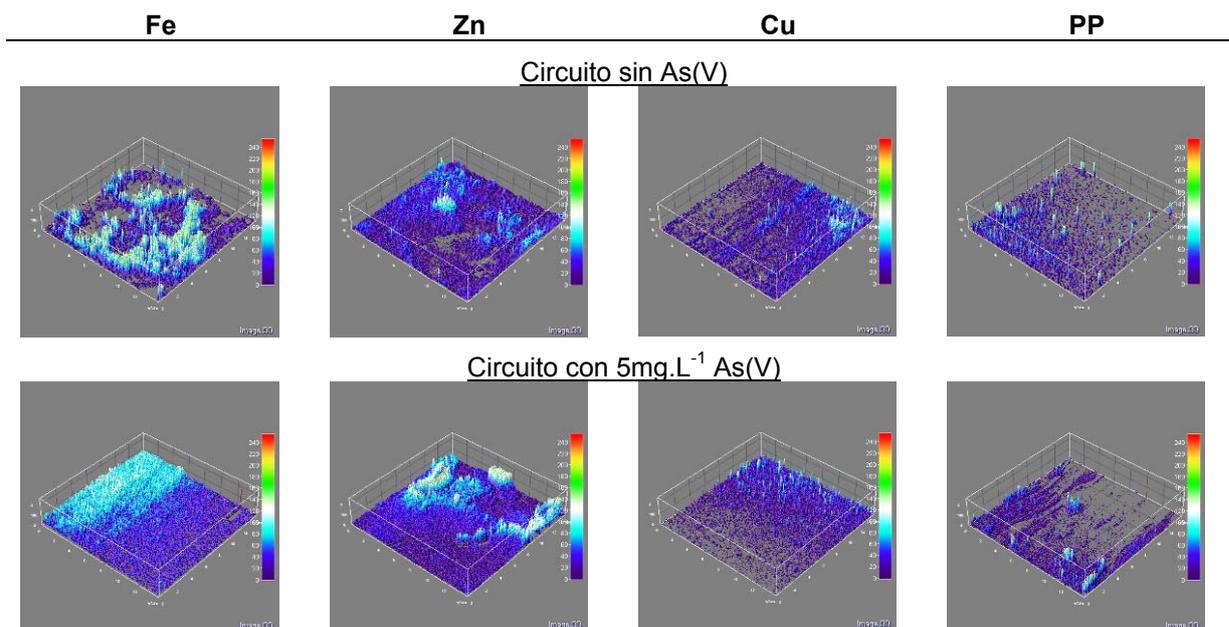
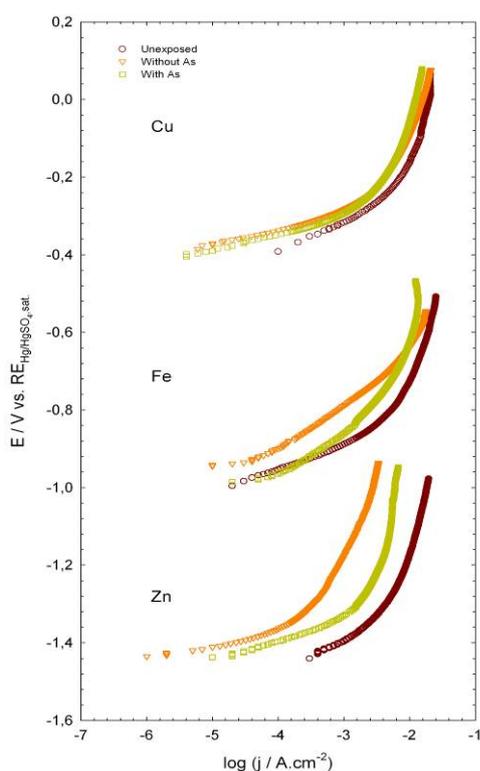


Figura 8. Estructuras 3D reconstruidas mediante software a partir de las imágenes tomadas con el MLC, de los cuatro sustratos testados en presencia y ausencia de As(V).



Análisis electroquímicos: observando las curvas anódicas de polarización de los tres sustratos metálicos (Fig. 9) no se detecta, en general, un efecto significativo de las películas formadas sobre los valores de E_{corr} respecto del sustrato sin exponer. Por el contrario, los depósitos (microorganismos + MPE + productos de corrosión) producen un desplazamiento de las curvas hacia menores densidades de corrientes; efecto más significativo en el Zn que en el Fe e irrelevante sobre el Cu. Este efecto barrera es además más importante en los cupones expuestos al circuito con As, resultados que concuerdan con los mayores recuentos obtenidos en estos cupones y con los mayores espesores y compactación de las biopelículas observados en MEB y MLC. El efecto barrera prácticamente nulo observado sobre el Cu se debe a la naturaleza química del sustrato: baja susceptibilidad a la corrosión y baja susceptibilidad a la colonización por microorganismos.

Figura 10. Curvas anódicas de polarización de los tres sustratos metálicos antes y después de su exposición en los circuitos en ausencia y presencia de 5mg.L^{-1} As(V).

CONCLUSIONES

-Diferente morfología y cantidad de depósitos se acumularon sobre los cuatro materiales testados, tanto en presencia como en ausencia de As(V), evidenciándose una mayor colonización microbiana y de productos de corrosión en las muestras expuestas en presencia de As(V).

- La estructura de los depósitos observada, de dos o más capas sobre Zn y Fe o de una capa simple sobre Cu y PP fue independiente de la presencia o no del As(V). Sin embargo sobre los cupones de Zn los depósitos fueron mayores en presencia de As, generando un mayor efecto barrera.

-Los análisis de rayos X demostraron la presencia del As sobre los depósitos, no detectándose el contaminante en las áreas desnudas de los cupones.

-La diversidad genética de las biopelículas se vio mas afectada por la naturaleza y susceptibilidad del sustrato que por la presencia o no de los 5mg.L⁻¹ de As(V).

-Fue posible encontrar bacterias, obtenidas de ambos circuitos, capaces de crecer hasta muy elevadas concentraciones de As(V).

-En los perfiles genéticos se detectaron mayor número y/o mayor intensidad de las bandas en las biopelículas cultivadas que en las biopelículas originales (las obtenidas del raspado original).

-Fue posible detectar la presencia del gen de resistencia al As en microorganismos presentes en ambos circuitos.

REFERENCIAS

- Branda S.S., Vik A., Friedman L. y Kolter R.**, 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology, Vol.13 (1), p. 20-26.
- Cai J., Salmon K. y DuBow MS**, 1998. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. Microbiology, Vol 144 p. 2705-2713.
- Dell'Amico E., Mazzocchi M., Cavalca L., Allievi L. y Andreoni V.**, 2008. Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex vineyard soil. Microbiological Research, Vol. 163 (6), p. 671-683.
- Dexter S.C.**, 2003. ASM Handbook. Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection., Vol.13, A, p. 398-416.
- Muller A.K., Westergaard K., Christensen S. y Sørensen S.**, 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 36 (1), p. 11-19.
- Nicolli, H., Bundschuh, J., Blanco, M., Tujchneider, O., Panarello H., Dapeña C. y 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.
- Oremland R.S., Stolz J.F. y Hollibaugh J.T.**, 2004. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 48 (1), p. 15-27.
- Oremland R.S., y Stolz J.F.**, 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. TRENDS in Microbiology Vol.13 (2) p. 45-49.
- Palmer R.J. Jr. y White D.C.**, 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. Trends in Microbiology, Vol. 5 (11), p. 435-440.
- Pérez Carrera, A. y Fernández Cirelli, A.**, 2007. Arsenic in the southeast plains of Cordoba province, Argentina. Biotransference to bovine milk. Veterinary Research Vol. 9 (1), 123-135.
- Portillo, M.C. y Gonzalez, J. M.**, 2008. Statistical differences between relative quantitative molecular fingerprints from microbial communities. Antonie van Leeuwenhoek 94 (2),157-163.
- Rasmussen L.D. y Sørensen S.J.**, 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), p. 1-9.
- Shirliff M.E, Mader J.T. y Camper A.K.**, 2002. Molecular Interactions in Biofilms. Chemistry & Biology, Vol. 9 (8), p. 859-871.
- Zouboulis A.I. y Katsoyiannis I.A.**, 2005. Recent advances in the bioremediation of arsenic-contaminated groundwaters. Environment International Vol. 31 (2), p. 213- 219.