



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE BIOMASA ESPECIE ESPECIFICA EN LA LIBERACIÓN DE COBRE DE ACUERDO A SUS PROPIEDADES METABÓLICAS Y GENÉTICAS

SEBASTIAN ALEXIS FREYHOFFER ALARCON

Tesis para optar al grado de
Magister en ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
GONZALO PIZARRO

Santiago de Chile, agosto, 2011

© 2011, Sebastian Freyhofer



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE BIOMASA ESPECIE ESPECIFICA EN LA LIBERACIÓN DE COBRE DE ACUERDO A SUS PROPIEDADES METABÓLICAS Y GENÉTICAS

SEBASTIAN ALEXIS FREYHOFFER ALARCON

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

GONZALO PIZARRO

IGNACIO VARGAS

CARLOS BONILLA

RODRIGO DE LA IGLESIA

JUAN DE DIOS RIVERA

Para completar las exigencias del grado de Magister en ciencias de la
Ingeniería

Santiago de Chile, agosto, 2011

(A mí familia y amigos, quienes me
apoyaron siempre)

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta tesis quisiera agradecer a todos los que jugaron algún papel en su desarrollo, pertenecientes todos a dos equipos de investigación, uno en el departamento de postgrado de Ingeniería hidráulica y ambiental, donde destaco a Ignacio Vargas por su paciencia y aportes en el marco de la investigación y a Juan Pablo Pavissich por abrir la puerta al estudio del efecto de la biomasa original del sistema de estudio. También al grupo del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Católica, representado individualizado hoy en Rodrigo de la Iglesia por su entrega de conocimiento y formación en las técnicas microbiológicas.

Agradezco también a mi profesor supervisor, Gonzalo Pizarro, por las constantes muestras de apoyo y no perder la fe en la concreción de este estudio

Esta memoria de investigación fue financiada por FONDECYT por medio de los proyectos 1080578/2008 y 1110440/2011.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Corrosión de cañerías de cobre en sistemas de distribución de agua potable1	
1.1.1 Corrosión en medios acuosos	2
1.1.2 Efectos de las bacterias en el proceso de corrosión	3
1.2 Mecanismo de resistencia interno de los microorganismos a las altas concentraciones de cobre	8
1.3 Sistema de estudio	9
1.4 Hipótesis y objetivos.....	10
2 REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN	11
2.1 Isotermas de adsorción.....	11
2.2 Medición de cobre en solución	13
2.2.1 Electrodo Ion Selectivo (ISE):	14
2.2.2 Voltametría de redisolución anódica (ASV):	15
<i>Fases para la medición con ASV:</i>	15
3 PROCEDIMIENTOS.....	17
3.1 Aislados bacterianos	17
3.2 Identificación de aislados.....	17
3.3 Obtención de biomasa.....	18
3.4 Medición de Cu^{+2} en solución utilizando ISE:	18
3.5 Medición de cobre en solución utilizando ASV	20
3.6 Evaluación de Concentración mínima inhibitoria de cobre.....	21

3.7	Ensayos de liberación de cobre en períodos de estancamiento	21
3.8	Experimentos de crecimiento bacteriano, SEM (microscopía electrónica de barrido)	22
4	RESULTADOS:	23
4.1	Identificación y caracterización de aislados:	23
4.2	Resultados adsorción de cobre en solución utilizando ISE:	25
4.3	Crecimiento de biomasa en contacto con cupones de cobre, efecto en el pH ³⁴	
4.4	Envejecimiento de cañerías en medio de cultivo y agua sintética:	37
5	CONCLUSIONES	42
6	BIBLIOGRAFIA	46
	ANEXOS.....	53
	ANEXO 1: Variables físico-químicas involucradas en el proceso de corrosión	54
	ANEXO 2: Contexto del sistema de estudio.....	57
	ANEXO 3: Isotermas de Langmuir y Freundlich	58
	aANEXO 4: Familia de transportadores de las P-ATPASAS.....	62
	ANEXO 5 Polymerase chain reaction (PCR) e identificación microbiana.....	63
	ANEXO 7: Curvas de ajuste medición concentración de cobre ISE	66
	ANEXO 8: Curvas de Calibración ASV	68
	ANEXO 9: Ventajas y desventajas del ISE	69
	ANEXO 10: Detalles experimentales para la medición de metales utilizando ASV .	70

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Representación esquemática de la corrosión mediada por microorganismos ...	4
FIGURA 2: Representación esquemática de dos posibles modelos de corrosión de cobre mediada por microorganismos.	6
FIGURA 3: Episodio de agua azul en la ciudad de Talca.....	9
FIGURA 4: Diagrama esquemático de las ondas utilizadas durante un ciclo de ASV	16
FIGURA 5: Montaje experimental de la medición de cobre en solución utilizando ISE de Cobre	19
FIGURA 6: Montaje experimental para la medición de cobre en solución utilizando ASV	20
FIGURA 7: Curvas de adsorción de cobre para biomasa en solución de agua MiliQ con ajuste de fuerza iónica de 0,1 con NaNO_3 y pH 6. Blanco consiste en la medición de voltaje sin la presencia de biomasa en suspensión.	26
FIGURA 8: Curvas de adsorción de cobre en función del cobre en el equilibrio	28
FIGURA 9: Ajuste del modelo de Freundlich y Langmuir a la capacidad de adsorción de los distintos aislados.....	33
FIGURA 10: SEM de los cupones puestos en contacto con medio MSVP modificado, A) <i>Variovorax sp.</i> B) <i>Pseudomonas sp.</i> C) <i>Duganella sp.</i> D) control de cupón con medio, todos con aumento 10KX.	36
FIGURA 11: Experimento de envejecimiento de cañerías, concentración de cobre en el afluente utilizando medio de cultivo MSVP modificado	37
FIGURA 12: Experimento de envejecimiento de cañerías, concentración de cobre en el afluente utilizando medio de cultivo MSVP modificado (agua sintética).	38
FIGURA 13: Ejemplo de isoterma de Langmuir	61
FIGURA 14: Ejemplo de Isoterma de Freundlich	61
FIGURA 15: Reacción en cadena de la polimerasa.....	64
FIGURA 16: Curva de calibración en solución Blanco utilizando ISE de cobre	65
FIGURA 17: Curvas de ajuste ISE en sistema utilizado de blanco	67
FIGURA 18: Curvas de Calibración ASV medio MSVP modificado.....	68
FIGURA 19: Esquema de electrodo ión selectivo	69

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Caracterización de los aislados seleccionados..	24
Tabla 2: Variación del pH y análisis de crecimiento de aislados en Medio MSVP modificado en presencia de cupón de cobre.....	34
Tabla 3: Calidad del agua del área de estudio	57

RESUMEN

La ingesta de agua con altas concentraciones de cobre tiene efectos adversos para la salud humana. Esto se hace más relevante cuando proviene desde sistemas de distribución de agua potable, donde se ha encontrado una acumulación de cobre producto de un proceso de corrosión es altamente dependiente de variables fisicoquímicas (abióticas) y de la presencia de microorganismos (variables bióticas). A la fecha es poco lo que se sabe sobre el efecto de la biomasa en el proceso de corrosión de cañerías de distribución de agua potable, especialmente de las capacidades individuales de las bacterias y su efecto en la biocorrosión. Con el objetivo de entender el rol de las bacterias en este proceso es importante identificar los factores relevantes que confieren a las bacterias tolerancia al cobre y su efecto sobre las superficies metálicas. En este estudio, se caracterizan las propiedades relevantes de distintos aislados bacterianos obtenidos desde un caso de estudio afectado por el fenómeno de “agua azul”. Las variables estudiadas fueron la concentración mínima inhibitoria de cobre (o la máxima concentración de cobre adicionada en que un aislado puede crecer), la capacidad de formación de biopelícula, la presencia de genes de resistencia a cobre (genes *cop* para el transporte activo de cobre) y el potencial de adsorción de cobre en la biomasa.

La metodología utilizada para los estudios de adsorción fue realizada utilizando técnicas electroquímicas que permiten obtener resultados en línea in situ. Las mediciones de adsorción de cobre en biomasa y de cobre total liberado desde las superficies metálicas indican que no hay una única variable responsable del proceso de corrosión, sino que es el resultado de una combinación de características. Estos resultados permiten mejorar la comprensión del efecto bacteriano en el fenómeno de corrosión de cobre y los mecanismos involucrados en el proceso

Palabras Claves: Biocorrosión, biomasa, biopelícula, adsorción de cobre.

ABSTRACT

The intake of water with high copper concentration has adverse effects on human health. This becomes more relevant when the source is the drinking water distribution system, where it has been found that copper accumulation due to corrosion is highly dependent on physicochemical (abiotic) and microbial (biotic) variables. There is not much information about the effect of the biomass on the copper adsorption in the plumbing corrosion process, specially the individual capabilities of bacteria inducing biocorrosion. In order to understand the bacterial influence in copper corrosion is important to identify the key factors conferring tolerance to the bacteria and their effect on the metallic surface. This study characterizes relevant properties of several bacterial isolates obtained from a plumbing system and water source affected by the “blue water” phenomenon. The variables studied were the minimal inhibitory copper concentration (or the maximum concentration where an isolate can grow), biofilm formation capacity, the presence of copper resistance genes (*cop* genes for active copper efflux) and the copper adsorption potential on biomass.

The experimental setup for the adsorption studies was done using electrochemical techniques that allow obtaining *in situ* online results, without disturbing the microbial cultures. Measurements of copper adsorption on biomass and mass balances with the total copper released from the metallic surfaces suggest that there is not a unique variable responsible for influencing copper corrosion but a combination of them. These results give a better understanding of the bacterial effect on the copper corrosion phenomenon and the mechanisms involved in the process.

Keywords: Biocorrosion, biomass, biofilm, copper adsorption.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Corrosión de cañerías de cobre en sistemas de distribución de agua potable

El cobre ha sido uno de los materiales más utilizados en sistemas de distribución de agua potable, ya sea en cañerías o como parte de los componentes que forman parte del sistema de distribución (Boulay *et al.*, 2001; Keevil *et al.*, 2004). Esto se debe principalmente a sus cualidades fisicoquímicas, que le entregan estabilidad, durabilidad y la capacidad de presentar un ambiente hostil para el crecimiento de bacterias. A pesar de esto, alrededor de todo el mundo han ocurrido episodios en los que la población ha sido expuesta a concentraciones de cobre potencialmente peligrosas para la salud, llegando en casos extremos a concentraciones de hasta 30 mg/L (Edwards *et al.*, 2000), valor muy superior al máximo permitido por las normativas internacionales, las que al igual que la normativa chilena permiten concentraciones de cobre de hasta 2 mg/L (normativa Chilena, INN2995 y OMS 2006).

Se denomina corrosión de cobre proceso que tiene como resultado la liberación de cobre desde un estado sólido al medio con el que se encuentra en contacto. Esto ocurre cuando el metal pierde electrones y la fase sólida se transforma en un ion de cobre soluble (Lytle *et al.*, 2010). Cuando ésta ocurre en sistemas de agua potable se pueden alcanzar normalmente concentraciones de cobre superiores a 3 mg/L, las que pueden producir trastornos a la salud de las personas que van desde vómitos o náuseas hasta cuadros clínicos de mayor gravedad (Ransom *et al.*, 2007).

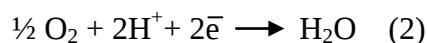
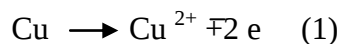
La corrosión de cobre tiene también implicancias estructurales, funcionales y estéticas en los sistemas en que se produce, ya que trae consigo la debilitación de las estructuras y contaminación de los componentes con los que se encuentra en contacto (Dietrich *et al.*, 2004), en casos extremos se genera una apariencia azul en el agua producto del aumento en la concentración de cobre total, tanto en solución como en la forma de subproductos. Estos casos son conocidos como “agua azul”, en los que la concentración de cobre total puede alcanzar incluso los 30 mg/L (Critchley *et al.*, 2004,

Edwards *et al.*, 2004). Existen variados factores que inciden en el proceso de corrosión de cañerías en los sistemas de distribución de agua potable, entre los que se encuentran la edad de la cañería, su operación o períodos de flujo-estancamiento (Vargas *et al.* 2009, Calle *et al.* 2007), calidad del agua (Schock *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1996; Boulay & Edwards, 2001; Pehkonen *et al.*, 2002), formación de subproductos de corrosión y presencia de microorganismos en el sistema (Critchley *et al.* 2004, Calle *et al.* 2007, Pavissich *et al.* 2010).

1.1.1 Corrosión en medios acuosos

La liberación de cobre al medio acuoso se encuentra controlada por 3 procesos fundamentales. Un proceso electroquímico que involucra dos reacciones de óxido-reducción. Un proceso de formación de subproductos asociado a condiciones termodinámicas, pH oxígeno disuelto, temperatura y presencia de iones en solución, y finalmente, la disolución de productos de corrosión sólidos al medio (Merkel *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2010).

La primera reacción se acopla para que ocurra una transferencia de electrones en dirección del cátodo a partir de la liberación de electrones desde el ánodo, desde donde se libera el metal a la fase acuosa, siendo el oxígeno el principal aceptor de electrones, el que asociado al H^+ en el sistema permite la formación de agua.



En presencia de oxígeno, para pH ácidos (menores que 6) el metal se libera como Cu^{+2} , con pH entre 6 y 8 se libera como Cu_2O (cuprita) y con pH mayor que liberaría

como tenorita CuO. Esta última cumpliría funciones de protección (pasivante) del proceso debido a su estabilidad (Oliphant 2003).

1.1.2 Efectos de las bacterias en el proceso de corrosión

Las bacterias crecen y se reproducen, teniendo la capacidad de establecerse como células individuales o agregándose para formar una biopelícula, la cual se define como la adhesión entre células o entre una célula y una superficie, embebida en una matriz extracelular o polímeros auto-producidos (Harrison et al., 2007). La formación de biopelícula y de subproductos de corrosión genera heterogeneidades en las superficies que llevan a la formación de zonas anódicas y zonas catódicas, las que favorecen el proceso de corrosión producto de la formación de un gradiente de oxígeno (Figura 1). La interacción entre la biopelícula y el metal produce un nuevo ambiente fisicoquímico, donde se puede observar un sistema de múltiples componentes: la superficie metálica, la biopelícula y los productos de la corrosión, los que forman una celda electroquímica (Videla, 1996; Figura 2).

Se conoce como biocorrosión al proceso de corrosión que tiene como origen o que es facilitado por la presencia de biomasa, como resultado de la interacción entre la superficie de un metal, los productos de la corrosión abiótica, y las células y sus metabolitos, los que incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos, compuestos volátiles como amoníaco hidrógeno y sulfuros (Beech *et al.*, 2004).

Aún no se ha identificado cual es el componente más relevante para la ocurrencia de la corrosión, ya que a pesar de que la participación de microorganismos en estos eventos se reconoce desde hace muchos años, no existe información que permita comparar las características metabólicas de los aislados presentes en episodios de corrosión, habiéndose puesto énfasis en los procesos de biomineralización en las superficies

metálicas y el impacto de las enzimas extracelulares. (Pavissich *et al.* 2010, Beech *et al.*, 2004).

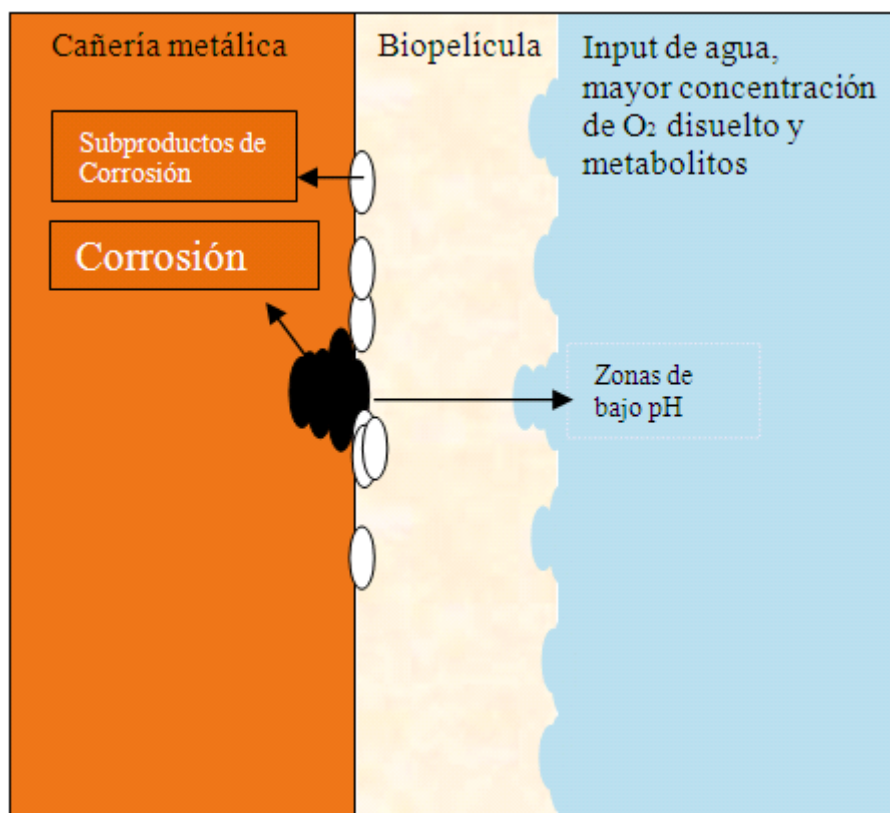


FIGURA 1: Representación esquemática de la corrosión mediada por microorganismos

Gracias a la utilización de técnicas moleculares es posible identificar los tipos y especies de bacterias (Anexo 5), y los mecanismos mediante los cuales propiciarían la corrosión de superficie, por ejemplo, la labor de bacterias capaces de generar metabolitos ácidos que afectan la estabilidad del cobre sólido, o las que son capaces de generar especies de azufre altamente reactivas, responsables del debilitamiento y posterior rompimiento de las capas protectoras y superficiales para iniciar el proceso de corrosión (Bermont-Bouis *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2002; Videla y Herrera., 2005). Otros tipos metabólicos con capacidad de producir el proceso de corrosión son las bacterias capaces de consumir hidrógeno, entre las cuales se encuentran las metanogénicas, denitrificantes y reductoras de sulfato, ya que la disminución de la concentración de hidrógeno en solución acelera la oxidación metálica, aumentando la

pérdida de electrones del ánodo (Jan-Roblero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Si bien los tipos metabólicos anteriormente mencionados no debieran ser mayoría en los sistemas de distribución de agua potable, la capacidad de otros grupos de formar biopelículas y adherirse a las superficies les da la opción de colonizar ambientes que sin la ayuda de los microorganismos formadores de biopelículas no podrían ser capaces de colonizar. Además de esto, las biopelículas bacterianas han demostrado presentar un metabolismo conjunto como comunidad de microorganismos, el que genera componentes físicos y químicos que contribuyen a la corrosión metálica como enzimas y metabolitos altamente reactivos que influyen en el proceso de corrosión (Keevil, 2004).

La agregación bacteriana en comunidades o biopelícula confiere además de una serie de ventajas a la hora de colonizar ambientes adversos, lo cual es facilitado por la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por su traducción al inglés), las que se componen de macromoléculas como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos. La capacidad de los EPS de secuestrar iones metálicos es importante para la influencia de los microorganismos en el proceso de corrosión, y depende tanto de las especies bacterianas como del tipo de metal. La adhesión de metales en los EPS involucra la interacción entre los iones metálicos y los grupos funcionales aniónicos (como carboxilo, fosfato, sulfato, glicerato, piruvato y succinato) que son comunes en los componentes proteicos e hidratos de carbono que forman parte de los EPS.

La formación de EPS protegería a todas las especies bacterianas de la comunidad, no sólo a las con mayor capacidad de producirlo mediante su capacidad de capturar moléculas tóxicas por quelación, adsorción e intercambio iónico (Harrison *et al.*, 2007), generando así un ambiente interno protector distinto al que se enfrentarían estando fuera de la biopelícula.

Los microorganismos obtenidos a partir de sistemas con alta concentración de cobre en solución son capaces de soportar y crecer en condiciones de alta disponibilidad del metal, la cual podría llegar a 25 mg/L en la interfase sólido líquido entre el agua del sistema y la pared de la cañería (Critchley *et al.*, 2003; Critchley *et al.*, 2004, Calle *et al.*, 2007).

Cabe destacar que el proceso de colonización de las bacterias en los sistemas de agua potable tiene dos posibles orígenes, el primero y más probable es el ingreso de una carga bacteriana desde la fuente de agua, y un segundo, a partir de las cañerías o las partes que componen el sistema de distribución. Una vez ingresado al sistema, y si las condiciones lo permiten, las cañerías pueden ser colonizadas por las bacterias, y como resultado de este proceso, su sola presencia y sus actividades fisiológicas en las cercanías de las superficies metálicas promoverían reacciones fisicoquímicas entre las interfaces, las que no serían favorecidas bajo condiciones abióticas.

A pesar de los esfuerzos realizados en la investigación del fenómeno de biocorrosión, aún existen temas que necesitan ser respondidos, como los efectos individuales de las distintas especies presentes en el sistema, basados en las características individuales de los aislados.

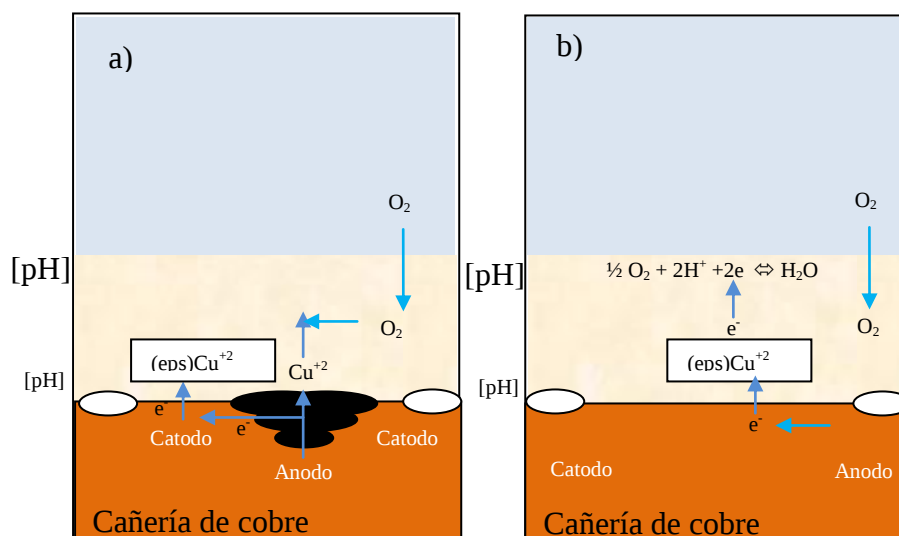


FIGURA 2: Representación esquemática de dos posibles modelos de corrosión de cobre mediada por microorganismos. a) Modelo de corrosión en el que una parte del Cu^{+2} es liberado directamente al medio. b) Modelo en que los EPS bacterianos son intermediarios de la reacción

En el caso particular de las cañerías de cobre, la adhesión de microorganismos y posterior formación de biopelícula provee la capacidad de generar distintos microambientes, lo cual contribuye a la formación de celdas locales de corrosión mediante la formación de gradientes en los potenciales de reducción y a la generación de

productos metabólicos ácidos en sus EPS como los ácidos húmicos que debilitan las capas protectoras naturales de las cañerías provocando disolución de la superficie metálica. Generalmente, las biopelículas formadas en ambientes con presencia de cobre presentan una mayor producción de EPS por célula demostrándose que los efectos de ésta se incrementan. Esta capacidad de formación de EPS podría influir en el equilibrio del cobre en solución, produciéndose así un aumento en la liberación de cobre a partir de la cañería (Keevil *et al.*, 2004). En este contexto, la reactividad de la biopelícula cumple un rol importante en el proceso de corrosión y de liberación de cobre a la fase acuosa. Es por esto, que conocer las capacidades de adsorción de la biomasa bacteriana es un primer paso para conocer la contribución real de los aislados bacterianos durante el proceso de colonización y de formación de biopelícula.

La formación de biopelículas permite generar una heterogeneidad de microambientes a lo largo de las superficies sobre las que se adhieren, lo cual ha permitido plantear un modelo que intenta describir el proceso de colonización y crecimiento de microorganismos. Este proceso comenzaría con el secuestro y acumulación de cobre en compuestos orgánicos de alto peso molecular presentes en la solución (ácidos húmicos y fúlvicos principalmente). La formación de estos complejos entrega dos ventajas principales, disminuir la concentración del metal biodisponible por un proceso de adsorción y además funcionar como reserva de fuente de carbono en ambientes con pocas fuentes de carbono orgánico para el crecimiento de las bacterias. Las especies pioneras que comienzan este proceso serían bacterias aeróbicas y heterótrofas, las que cambiarían su estado de crecimiento, desde un estado en suspensión a otro en el que se encuentran adheridas a una superficie, formando así una biopelícula primaria. Luego de esta etapa, hongos tolerantes a cobre podrían unirse para entregar un soporte físico para permitir la consolidación posterior de la biopelícula mediante la interacción de los colonizadores primarios y secundarios. Una tercera etapa de consolidación de la biopelícula estaría marcada por un aumento en la tasa de producción de EPS y la generación de microambientes producto de la alta variabilidad espacial y metabólica a través ella, lo que permitiría el asentamiento de diversos grupos de microorganismos asociados a distintos tipos de metabolismos, entre los cuales se

encontrarían los sulfato reductores, capaces de generar productos metabólicos altamente corrosivos ((Keevil, 2004)).

Uno de los principales obstáculos a la hora de estudiar el efecto individual de los microorganismos en la corrosión de superficies es la dificultad en la obtención de aislados de microorganismos representativos del sistema, ya que se ha estimado que sólo un 1% de los microorganismos ambientales pueden ser cultivados utilizando las técnicas estándar de cultivo en laboratorios (Amann *et al.*, 1995; Dunbar *et al.*, 1999). En la actualidad, el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido conocer con mayor exhaustividad y precisión las especies bacterianas presentes en los sistemas, eliminando así el sesgo del cultivo tradicional al identificar los tipos bacterianos y su importancia relativa dentro de un sistema en particular (Pavissich *et al* 2010), lo cual permite contrastar los resultados obtenidos a través de la implementación de técnicas de cultivo con la diversidad real del sistema.

1.2 Mecanismo de resistencia interno de los microorganismos a las altas concentraciones de cobre

Los microorganismos requieren de cobre en concentraciones traza para su funcionamiento metabólico, pero en altas concentraciones, tiene efectos nocivos. Por ello, el transporte de cobre (al igual que el de la mayoría de los metales) se encuentra estrictamente regulado, ya que sólo se le permite el acceso a través de co-transporte junto con otros ligandos celulares o mediante bombas de transporte altamente específicas (Silver y Phung, 1996; Rosenzweig, 2002). El equilibrio de la concentración de cobre al interior de las células se regula mediante sistemas de bombeos especializados en la especiación del metal que transportan (Argüello *et al.*, 2007). Estos transportadores son proteínas de membrana de la familia de las P-ATPasas, las que requieren de energía proveniente de la hidrólisis de ATP para redirigir iones hacia el exterior de la célula. En el caso del cobre su transporte es efectuado por P-ATPasas de los subgrupos IB-1 para el

Cu^+ e IB-3 para el Cu^{2+} , miembros de la familia IB de metales pesados (Palmgren y Axelsen, 1998; Argüello *et al.*, 2007).

El resultado de las características anteriormente mencionadas permitirían a las bacterias resistir a ambientes potencialmente nocivos e incluso influir en el aumento de las tasas de corrosión del metal al medio.

1.3 Sistema de estudio

Las muestras utilizadas tienen como origen la ciudad de Talca, Chile, donde se ha documentado la ocurrencia de corrosión, con concentraciones de cobre sobre 2 mg/L y presencia de microorganismos (Castillo 2005). Los aislados bacterianos fueron obtenidos a partir de tres orígenes distintos desde la misma fuente por Pavissich 2010. Un primer origen es la muestra de agua de pozo desde la cual se toma el agua consumida en el sistema de distribución, previa a la radiación UV para desinfección. El segundo origen corresponde a biomasa obtenida a partir de una muestra de cañería corroída y el tercer origen es las pruebas de envejecimiento y liberación de cobre realizadas por Pavissich 2010.



FIGURA 3: Episodio de agua azul en la ciudad de Talca (Castillo 2005)

1.4 Hipótesis y objetivos

A partir de la información entregada anteriormente, se intentará verificar la siguiente hipótesis:

La liberación de cobre a partir de cañerías utilizadas en sistemas de distribución de agua potable es mayor en presencia de microorganismos que cuentan con alta capacidad de resistir cobre, ya sea por su capacidad de adsorberlo, formar biopelícula o tener la capacidad de expresar bombas de eflujo del metal hacia el medio extracelular.

El objetivo general es determinar si existe alguna variable que controle el efecto de microorganismos en los casos de corrosión; capacidad de adsorber cobre en solución, nivel de resistencia a altas concentraciones de cobre, capacidad de formar EPS o presencia de bombas de eflujo a nivel genético.

Los objetivos específicos de este estudio son i) validación de métodos de medición de cobre en solución factibles de utilizar en un laboratorio, de poca complejidad una vez estandarizado el método y factibles de ser replicados, y ii) evaluar el efecto de la materia orgánica en solución y definir un medio de cultivo que permita replicar la fuente original para futuros experimentos.

2 REVISIÓN DE LOS MÉTODOS DE MEDICIÓN

Tanto los mecanismos de resistencia internos como las capacidades metabólicas externas, como la producción de EPS y sustancias quelantes en el medio estarían relacionadas con la capacidad de adsorber cobre en solución, desplazando así el equilibrio de la reacción hacia la liberación de cobre y, a la vez disminuyendo la concentración percibida por las bacterias. Esto puede ser cuantificado a través de la realización de isothermas de adsorción.

2.1 Isothermas de adsorción

La capacidad de adsorción de un adsorbente está definida por su isoterma de adsorción, la que se encuentra caracterizada por una serie de constantes cuyos valores expresan las propiedades de su superficie y su afinidad por un adsorbente. Para ello se utilizan las isothermas de Langmuir y Freundlich, las que se basan en distintos supuestos a la hora de explicar el comportamiento de una superficie como adsorbente.

Langmuir se basa en el supuesto que existe un número finito de sitios de unión que se encuentran homogéneamente distribuidos en la superficie del adsorbente, teniendo la misma afinidad de adsorción que una capa única, sin haber interacción entre las moléculas adsorbidas. La descripción matemática de la ecuación es:

$$q = \frac{Q_{max} \times b \times C_e}{1 + b \times C_e}$$

Donde q es la cantidad de iones metálicos adsorbidos; C_e es la concentración de metal residual en solución (en mg/L); Q_{max} es la tasa específica máxima de adsorción por sitios de saturación (mg/g) y b es la afinidad de unión entre el metal y la biomasa (Donmez and Aksu, 2002).

La ecuación de Freundlich es la relación empírica en la que se asume que la energía de adsorción de un sitio de unión depende de si los sitios de unión adyacentes se encuentran o no ocupados. Esta ecuación empírica es de la forma:

$$q = K \times C_e^{(1/n)}$$

Donde K y n son constantes que indican la capacidad de adsorción y la intensidad de adsorción respectivamente (Bayramoglou, *et al.*, 2005)

La cantidad de metal adsorbido se obtiene a través de la expresión:

$$q = (C_i - C_e) \times \frac{V}{m}$$

Donde C_i y C_e son la concentración inicial y final respectivamente (mg/L), V es el volumen del medio (L) y m es la cantidad de biomasa (g) (Shetty *et al.*, 2009).

El modelo de Langmuir se basa en una serie de supuestos, como una monocapa con sitios de adsorción distribuidos de manera constante y que todos se encuentran disponibles, (Volesky, 2003) mientras que Freundlich se hace cargo de las características fisicoquímicas y la existencia de superficies heterogéneas.

De acuerdo a la literatura, el modelo de Freundlich debería adaptarse bien a la adsorción de metal por biomasa por la naturaleza heterogénea de sus sitios. Todos los sitios de adsorción son equivalentes (Zhou 1998).

2.2 Medición de cobre en solución

Existen diversas técnicas para medir cobre en matrices ambientales. Las que son utilizadas con mayor frecuencia son los métodos espectrofotométricos de reacción química con soluciones reactivas (wet chemistry), el espectro de absorción atómica, el ICP (plasma acoplado inductivamente), el ASV (anodic stripping voltametry) y los electrodos ion selectivos (ISE). Todos estos métodos presentan algunas ventajas y desventajas, como el costo, la complejidad en el proceso de medición, la intervención con la muestra, límites de detección y tiempos para la obtención de los resultados. Por ello, no existe un método en particular que sea siempre mejor que el resto (Rachou *et al*, 2007). Para efectos de esta tesis, los métodos utilizados para realizar las mediciones de cobre libre fueron dos métodos de medición directa que permiten la obtención de resultados sin intervención de la muestra. El electrodo ión selectivo (ISE) con resultados en línea que pueden estandarizarse cuando se conoce la matriz de medición y el ASV con una baja interferencia con los compuestos presentes en la solución y sin intervención química de la muestra.

2.2.1 Electrodo Ion Selectivo (ISE):

El electrodo ion selectivo de cobre (ISE) presenta la cualidad de medir directamente el ion libre en línea sin perturbar la muestra (Bremer y Geesey, 1991). Este método consiste en el uso de una membrana por la que sólo puede ser transportado un ión específico desde una solución en la que se encuentra en alta concentración hacia una de menor concentración, lo cual genera una diferencia de potencial que es medida por la membrana. Su uso presenta una serie de ventajas y desventajas al ser comparado con otros métodos de medición (ANEXO 10).

La estabilización de las adiciones de cobre para estas pruebas se da en 2 a 5 minutos, por lo que se asocia a una cinética de sorción bastante rápida que tiende a estabilizarse en menos de cinco minutos, (Ozturk *et al.*, 2003),

El electrodo ISE mide una diferencia de potencial (E), en unidades de mV y necesita de una curva de calibración con 3 puntos para ajustar y extrapolar sus resultados.

2.2.2 Voltametría de redisolución anódica (ASV):

La voltametría de redisolución anódica es un método que se basa en la reducción del metal a medir en las proximidades de un electrodo de medición, lo que permite determinar el potencial de deposición del ión sin tratamiento de la muestra. Una de las características de este método es que permite realizar mediciones con un límite de detección muy bajo, entregando una buena precisión para su uso en muestras ambientales. Una de sus principales desventajas es que para realizar la medición necesita modificar el equilibrio del metal a medir en la muestra (al menos en la cercanía del electrodo de medición, donde se consume metal), por lo que los análisis no son replicables en una misma celda (Pasavento *et al*, 2009). Esto se debe a que para lograr la medición es necesario que sobre el electrodo se deposite el metal a medir, para luego medir el equilibrio y volver a disolverlo en el medio. Las fases de este procedimiento se explican a continuación.

Fases para la medición con ASV:

La medición utilizando ASV se puede dividir en 3 fases; Deposición, equilibrio y redisolución. (Figura 4)

Fase de deposición o acumulación. El paso de deposición usualmente involucra la deposición electrolítica o adsorptiva de una especie química sobre la superficie del electrodo bajo un potencial de corriente continua. En esta fase se aplica un potencial lo

suficientemente negativo al electrodo de trabajo para causar que el ión metálico de interés se reduzca sobre el metal, el que en muchos casos forma una amalgama con el electrodo de trabajo.

Fase de equilibrio. Cuando el paso de deposición curre bajo condiciones convectivas, se requiere un tiempo de inactividad para permitir que el electrodo vuelva a un estado de equilibrio. Este período se encuentra usualmente en el rango de 10 a 30 s y se le llama fase de equilibrio.

Fase de redisolución. Con el ASV, la fase de redisolución se logra aplicando un voltaje lineal o en forma de rampa, aplicado como un potencial positivo, el cual, causa que el metal, que puede haber concluido en forma de amalgama sobre el electrodo, vuelva a oxidarse de vuelta a la solución, como ión metálico soluble. (Bond, 1999).

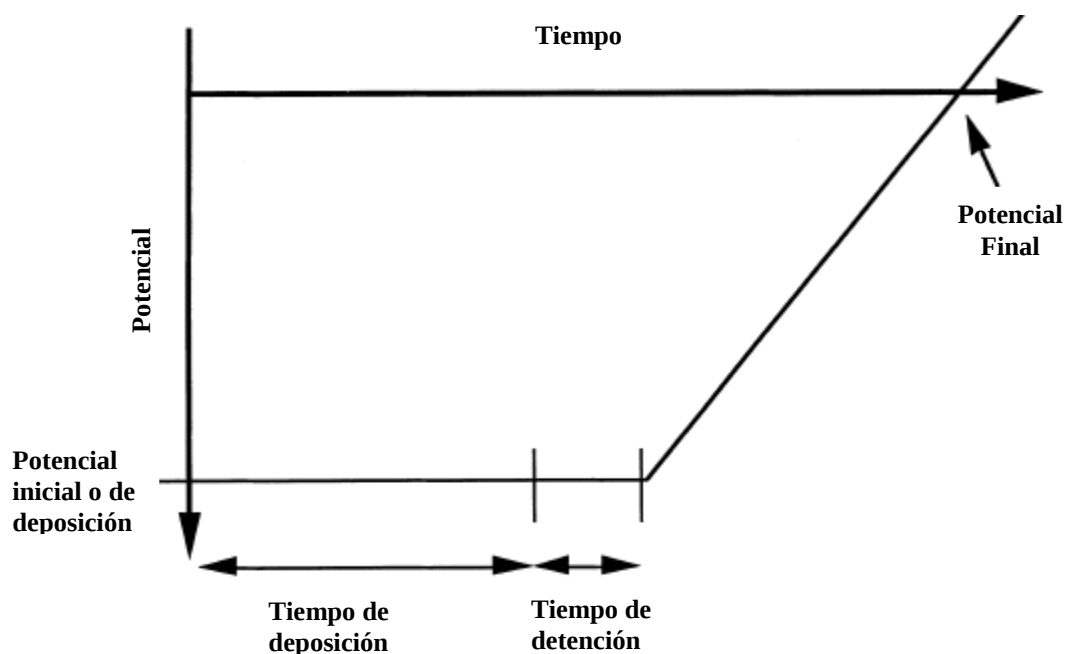


FIGURA 4. Diagrama esquemático de las ondas utilizadas durante un ciclo de ASV (Bond, A, 1999)

3 PROCEDIMIENTOS

3.1 Aislados bacterianos

Los aislados bacterianos seleccionados fueron obtenidos desde tres fuentes distintas:

- 1) Muestras de agua de pozo, que corresponde a la fuente de agua del sistema de estudio,
- 2) Muestras de agua tomadas a partir del sistema de distribución donde ocurría el fenómeno de “agua azul” (biopelícula original) y,
- 3) Experimentos realizados en un estudio anterior de envejecimiento de cañerías nuevas con agua de pozo del sistema original (Pavissich *et al.*, 2010). Cada una de las fuentes fue diluida 1:10, 1:100 y 1:100 y sembradas en agar R2A a 30°C por 4 días. Finalmente, las bacterias seleccionadas fueron aisladas nuevamente en placas de R2A y mantenidas en stock a 4°C.

3.2 Identificación de aislados

La extracción de DNA fue realizada utilizando el kit de extracción wizard DNA (Promega, Madison, WI, USA) y la identificación a través de la secuenciación parcial del gen 16S RNA, cuyos resultados fueron cruzados con las bases de datos del NCBI vía BLASTn para identificar las especies.

.

3.3 Obtención de biomasa

La biomasa se obtuvo a través del cultivo en matraces Erlenmeyer esterilizados de 50mL en medio MSVP Modificado, de solución para 200 mL $\text{NH}_4^+ \text{SO}_4 = 1$ g, $\text{MgSO}_4 = 0,06$ g, $\text{Ca Cl}_2 = 0,06$ g, $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 0,02 g, HEPES 2,383 g, más vitaminas y sulfato de hierro y magnesio 10mM 1mL de C/U y piruvato 5.25×10^{-2} M. El medio de cultivo se inocula y mantiene en agitación en shaker a 50 rpm a temperatura ambiente durante 4 días (Zhang *et al*, 2002).

Para realizar los experimentos y concentrar biomasa se utilizó el siguiente procedimiento:

Después de 4 días, cada matraz de 50mL inoculado se trasvasija a tubos Falcon de 50mL y se centrifugan a 5000 RPM por 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se rellena con 50 mL de MQ, se agita por 5 segundos y se repite la operación 3 veces, obteniendo así biomasa concentrada para la realización de los experimentos (Carvallo 2005).

3.4 Medición de Cu^{+2} en solución utilizando ISE:

Los experimentos de adsorción fueron realizados con mediciones IN SITU utilizando un electrodo ion selectivo de marca ORION a través de adiciones de estándares de cobre de concentración conocida con micropipetas en condiciones batch hasta alcanzar una condición de equilibrio marcada por la estabilización en la medición del electrodo, la que tardaba un promedio de 2 minutos por adición.

Los experimentos fueron realizados utilizando un Electrodo ISE Thermo Orion 720 A selectivo para cobre (Figura 5). 0,1 g de biomasa (ajustados por su peso húmedo) se aforan a 50mL con agua miliQ, ajustando FI a 0,1M con NaNO_3 y pH 6 con NaOH , 23°C y agitación magnética permanente. El electrodo debe ser calibrado en cada ocasión que fuera a ser utilizado, aproximadamente 2 horas antes de ser utilizado, con solución de relleno y papel para pulir para eliminar impurezas depositadas en él (Carvallo, 2005).

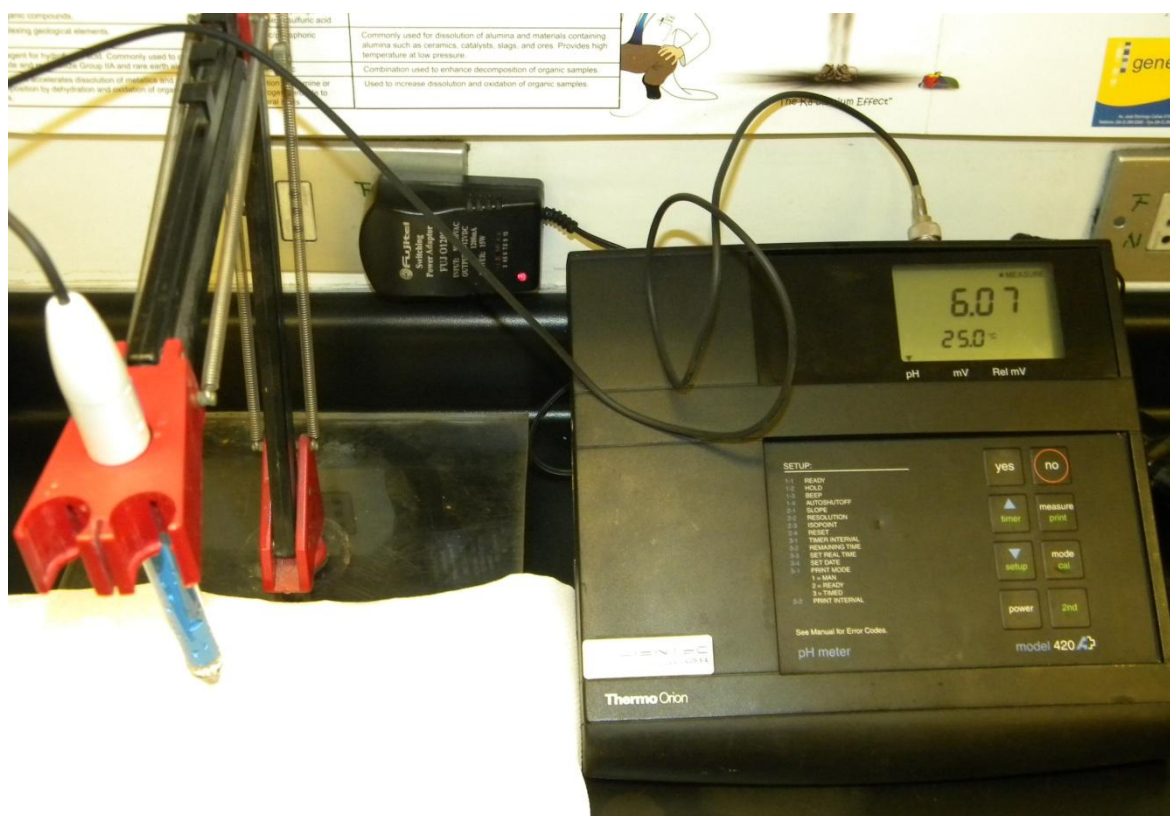


FIGURA 5: Montaje experimental de la medición de cobre en solución utilizando ISE de Cobre

3.5 Medición de cobre en solución utilizando ASV

Los análisis de ASV se realizaron mediante un potenciostato PalmSens (Palm Instruments, BV Houten, Holanda), conectado a un sensor de oro Florence (Florence sensors, Italia), consistente en un electrodo de trabajo de Au, un electrodo de referencia de Ag, y un electrodo auxiliar de carbono (Figura 6).

Con el objetivo de acidificar y estabilizar el electrodo de referencia (Ag/AgCl) se utiliza solución 0,1 M de HCl (densidad = 1,19 g/mL). Luego de esto, se realiza un proceso de pre acondicionamiento de electrodo, a través de un ciclo de lavado con solución especial 0,1M de H₂SO₄ y 0,01M de HCL, con el objetivo de eliminar impurezas y alisar la superficie del electrodo de medición. Todos los ciclos se realizan en celdas de 2 mL y las mediciones con diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 (Detalles del procedimiento en Anexo 10).

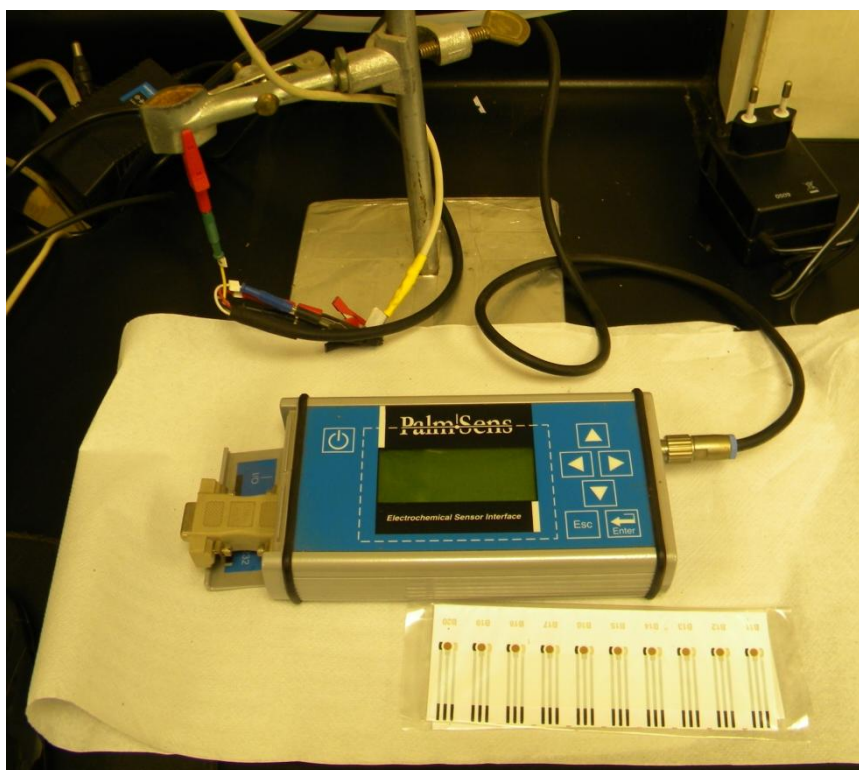


FIGURA 6: Montaje experimental para la medición de cobre en solución utilizando ASV

3.6 Evaluación de Concentración mínima inhibitoria de cobre.

La concentración mínima inhibitoria indica la concentración mínima en solución de una variable en la que un aislado bacteriano no puede crecer bajo condiciones particulares, en este caso se midió inoculando bacterias en un medio MSVP con distintas concentraciones de cobre agregadas a la solución, hasta encontrar la concentración mínima en la que el inóculo no es capaz de crecer. Los experimentos fueron realizados en tubos de ensayo con 2 ml de medio MSVP modificado en con agitación permanente en shaker a 30°C durante 6 días.

El crecimiento se cuantifica a través del crecimiento de biomasa en el medio (turbidez), y medición de absorbancia a OD600.

3.7 Ensayos de liberación de cobre en períodos de estancamiento

Para este experimento se lavaron y cortaron 6 cañerías nuevas de cobre de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro y 25 cm de largo. A continuación, Fueron lavadas por 5 minutos una solución NaOH 0,1M y agua Mili-Q estéril. Posteriormente fueron mantenidas con el medio a utilizar en el experimento por 24 horas para ambientación, y luego mantenidas con medio MSVP o con agua sintética previamente inoculados, en estancamiento durante una semana (Pavissich 2010), el cual fue cambiado al término de cada semana durante dos semanas. Los extremos de cada cañería fueron tapados con tapones de goma esterilizados. El montaje experimental de los ensayos fue dispuesto en una sala limpia a temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$). Cada cañería fue vaciada por gravedad abriendo uno de los extremos de ella y almacenando 50 ml de cada cañería en

tubos de polipropileno estériles luego de descartar los primeros 5 ml de muestra. Una parte del medio no almacenado se utilizó para medir pH.

La composición del agua sintética utilizada corresponde a la del medio MSVP sin la adición de HEPES ni vitaminas y 3.6 mg/L de piruvato.

3.8 Experimentos de crecimiento bacteriano, SEM (microscopía electrónica de barrido)

Se cortaron cupones de 1x1 cm de cañería nueva y se depositaron en matraces de Erlenmeyer con medio de cultivo modificado previamente inoculado. Las muestras se mantuvieron en agitación en shaker a temperatura ambiente por 5 días. Luego de esto, los cupones fueron lavados con agua mili-Q estéril y fueron tratados para ser observados con microscopía SEM. Una fracción del medio fue utilizada para medición del pH final de las muestras. Luego de los 5 días de crecimiento, los cupones de cobre fueron conservados en agua filtrada para mantener su hidratación hasta ser observados en SEM. Para ello, los cupones se secaron al punto crítico y se sombrearon con oro para su visualización por microscopía electrónica de barrido en un microscopio LEO 1420VP.

4 RESULTADOS:

4.1 Identificación y caracterización de aislados:

De un total de más de 30 aislados obtenidos inicialmente (Pavissich *et al.*, 2010), se seleccionaron 5, cuya elección se realizó bajo dos criterios básicos, una representatividad de los tres orígenes disponibles (agua de pozo, cañería original y experimentos de envejecimiento de cañerías nuevas) y un mix amplio de combinaciones en las variables estudiadas, nivel de tolerancia al cobre adicionado (MIC), capacidad de expresión de gen *cop* y capacidad de formación de biopelícula.

Los resultados de la identificación de especies, medición de concentración mínima inhibitoria (MIC) y presencia de gen *cop*, además de la capacidad de formación de biopelícula (Pavissich *et al.*, 2010) en condiciones de laboratorio a partir de los distintos orígenes se muestran en la Tabla 1.

Aislado	Especie	MIC (mM)	GEN <i>cop</i>	Biopelícula*
A5	<i>Arcicella sp.</i>	0.5	N	N
A7	<i>Pseudomonas sp.</i>	5	N	S
A10	<i>Sphingomonas sp.</i>	4	S	S
B14	<i>Variovorax sp.</i>	2	S	S
C33	<i>Duganella sp.</i>	2	S	S

Tabla 1: Caracterización de los aislados seleccionados, donde A representa a aislados obtenidas desde una muestra de agua proveniente del caso de estudio, B obtenida a partir de una muestra de cañería corroída del sistema de estudio y C aislados obtenidos a partir de ensayos de laboratorio con agua de la fuente de estudio y cañerías nuevas (formación de biopelícula son parte de los resultados obtenidos en una investigación anterior).

Se puede observar en la Tabla 1, que el nivel de resistencia a altas concentraciones de cobre (representado por el nivel de MIC) no se encuentra asociada exclusivamente a la suma de efectos de la presencia de gen *cop* o a la capacidad de formación de biopelícula, ya que el aislado con mayor capacidad de resistir a cobre (*Pseudomonas sp.*) cuenta sólo con la capacidad de formar biopelícula y no con la variante del gen *cop* estudiado. El segundo lugar de resistencia entre los aislados seleccionados corresponde a *Sphingomonas sp.*, que presenta las dos características estudiadas y concentración inhibitoria de 4 mM de cobre. Se puede observar también, que la especie que no cuenta con ninguno de los dos mecanismos estudiados presenta una baja capacidad de crecimiento en un ambiente con cobre, por lo que la presencia de alguna de las dos capacidades estudiadas sí implicaría una mayor resistencia a cobre en solución. Su menor resistencia permitiría confirmar la hipótesis del beneficio del asentamiento en una biopelícula heterogénea por parte de las especies con menor

resistencia al metal. *Variovorax sp.* y *Duganella sp.*, presentan tanto la capacidad de formar biopelícula como la expresión del gen *cop*, pero una resistencia a en solución que puede denominarse como intermedia dentro del rango de los resultados obtenidos. Por ello, el rango de MIC no tendría una relación lineal con la suma de los efectos del gen *cop* y capacidad de formación de biopelícula.

4.2 Resultados adsorción de cobre en solución utilizando ISE:

Cada uno de los aislados seleccionados fue sometido a la medición de cobre en solución a través de la medición *on line* utilizando un electrodo ión selectivo de cobre (Cu^{2+}).

Para poder realizar una medición comparable debe conocerse la matriz en la que se realiza y así extrapolar los resultados de las adiciones de cobre a partir de una solución blanco, ya que el electrodo presenta una serie de interferencia con iones y otras sustancias en solución. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos de los experimentos de adsorción.

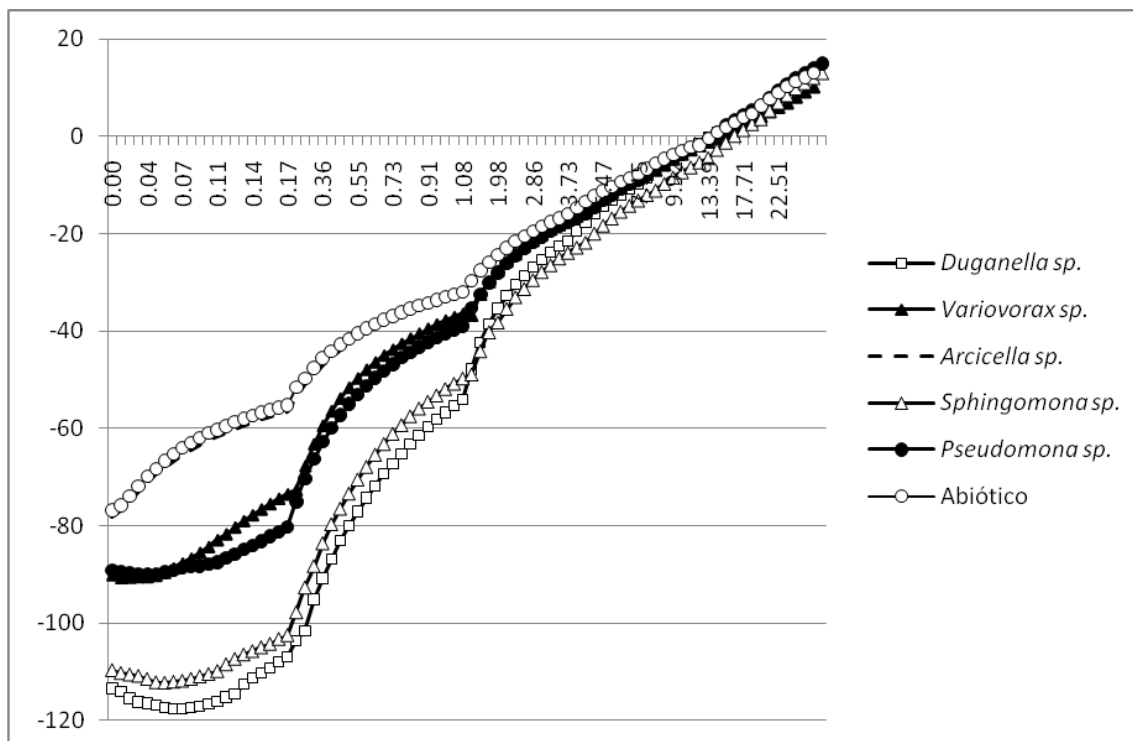


FIGURA 7: Curvas de adsorción de cobre para biomasa en solución de agua MiliQ con ajuste de fuerza iónica de 0,1 con NaNO_3 y pH 6. Blanco consiste en la medición de voltaje sin la presencia de biomasa en suspensión.

Los análisis cuantitativos utilizando el electrodo ion selectivo presentan tres zonas de medición que se pueden observar en la Figura 7. La primera entre los 0 – 0,15 mg Cu/L en la que se presenta la mayor diferencia entre las especies, la segunda entre 0,15 – 1,1 mg Cu/L en la que aún existe alguna diferencia entre las especies con mayor capacidad de adsorción de cobre y el blanco, y una tercera por sobre 1,1 mg Cu/L en la que el electrodo presenta una menor sensibilidad y donde además las bacterias comienzan a tener un comportamiento similar al de la solución blanco. Las tres zonas tienen características de medición distintas, ya que a concentraciones pequeñas el electrodo

tarda más tiempo en estabilizarse (tardando hasta 5 minutos) y a medida que aumenta el cobre adicionado, el tiempo de estabilización va disminuyendo hasta aproximadamente 30 segundos. Cabe mencionar también que las tres zonas presentan curvas de ajuste distinto por lo que cada rango del experimento debe generar curvas de calibración independientes dependiendo de la matriz y de las bacterias que se utilice.

A partir de la Figura 7 se puede concluir que los distintos aislados difieren de la medición inicial de los resultados de la solución blanco ya que sólo la presencia de biomasa haría más negativa la referencia de voltaje en la medición de cobre en solución, lo que está asociado a su capacidad de adsorción, hasta estabilizarse aproximadamente en los 22mg/L de cobre en solución. En una primera instancia se podría esperar que las especies que logren una mayor disminución en el voltaje inicial sean las que adsorban una mayor concentración de cobre en solución y que todas saturen sus sitios de unión antes de los 22 mg Cu/L en solución (lo cual será confirmado por las isotermas de Langmuir y Freundlich de la Figura 9).

A continuación, en la Figuras 8 se grafica la adsorción de cobre medida con ISE una vez alcanzado el equilibrio. Si bien, ambas curvas muestran una tendencia similar de adsorción para cada especie en la zona de mayor concentración de cobre adicionado, en el inicio difieren debido a que la primera muestra la adsorción en función del cobre adicionado, mientras que la segunda lo hace en función del cobre medido en el equilibrio y la modelación de la adsorción esperada de acuerdo a la ecuación de Langmuir estimando también el valor de los parámetros K y a.

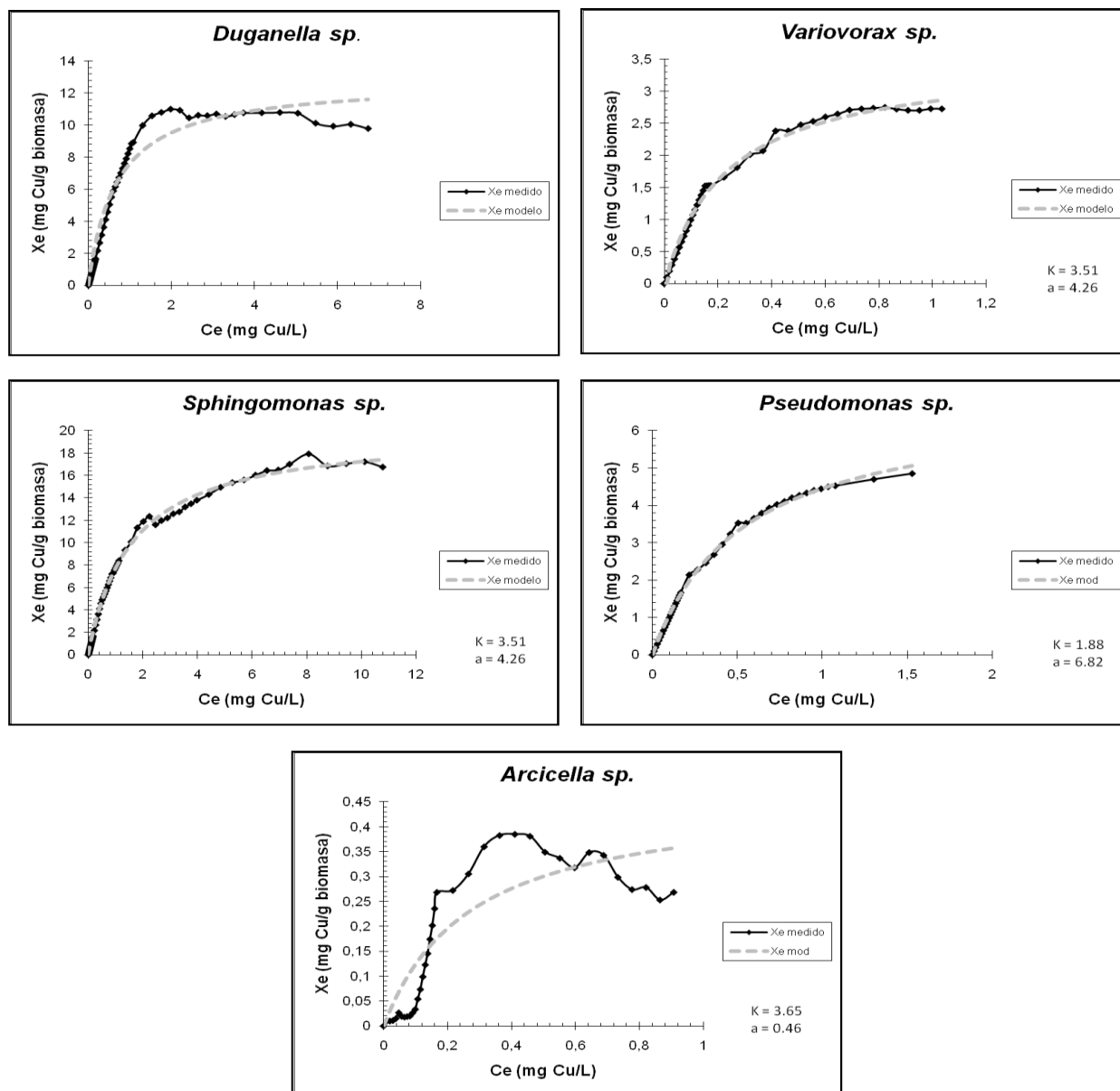


FIGURA 8: Curvas de adsorción de cobre en función del cobre en el equilibrio ($C_{eq} = C_0$ - Concentración de cobre adsorbido) medido con ISE y ajuste de modelo de Langmuir a través de mínimos cuadrados.

De acuerdo los resultados obtenidos de los experimentos de adsorción, el aislado con mayor capacidad de adsorber cobre por unidad de biomasa es *Sphingomonas sp*, la que de acuerdo a los experimentos tiene una MIC de 4 mM, presenta el gen *cop* dentro de su batería génica y la capacidad de formar biopelícula. Por ello, sería capaz de adsorber una concentración máxima de 18 mg de Cu/g biomasa. Este género bacteriano ha sido reportado formando parte de episodios de corrosión mediada por microorganismos (Beale, 2010), como parte de una comunidad bacteriana en la que se comprobó la presencia de metabolitos como pentano y ácido ascético. Así, a pesar de no tener la capacidad de formar biopelícula, es altamente probable que tenga la capacidad de generar otros compuestos con funciones de sitios de unión a cobre que permitan adsorberlo en altas concentraciones.

En segundo lugar, por capacidad de adsorber cobre en solución se encuentra *Duganella sp*. que presenta una MIC de 2mM, expresión de gen *cop* y capacidad de formar biopelículas. Este aislado presenta una capacidad máxima de adsorción de cobre de 11mg de Cu/g de biomasa. No presenta historial de presencia en casos de corrosión.

La siguiente especie en capacidad de adsorción de cobre es la especie *Pseudomonas sp*, con una capacidad máxima de adsorción de 5 mg Cu/g de biomasa, con MIC de 5mM, sin presencia del gen *cop* estudiado pero con capacidad de formación de biopelícula. Este género en particular ha encontrado en episodios de corrosión, tanto de cobre como acero. Su función sería de colonizador primario en el proceso de formación de biopelícula, aumentando por sí sola la tasa de corrosión de las superficies por la formación de polos que permiten la reacción catódica (Videla, 1996) y además

creando un ambiente libre de oxígeno para el establecimiento de bacterias reductoras de sulfato (Yuan, 2007).

En cuarto lugar se encuentra *Variovorax sp.* con capacidad de expresión del gen *cop* y con capacidad de formación de biopelícula, MIC de 2mM y una capacidad de adsorción de 2,8 mg Cu/g biomasa. Este aislado también ha sido reportado como parte de episodios de corrosión de cobre (Reyes *et al.*, 2008; Steinberg *et al.*, 2005).

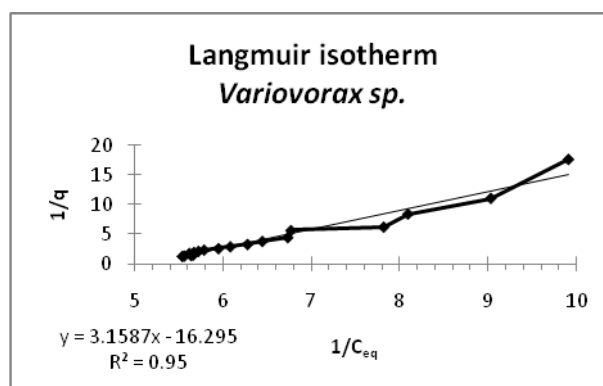
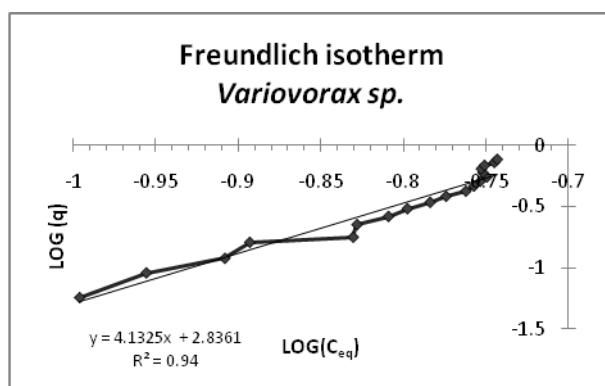
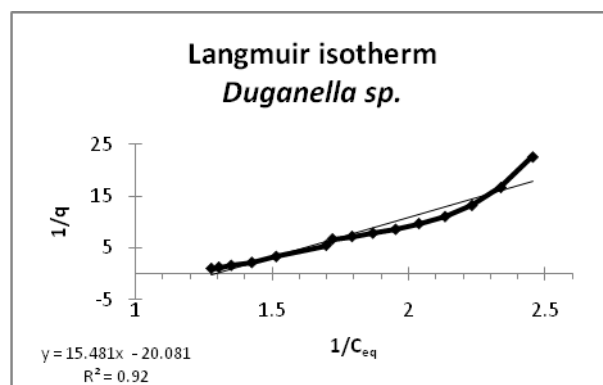
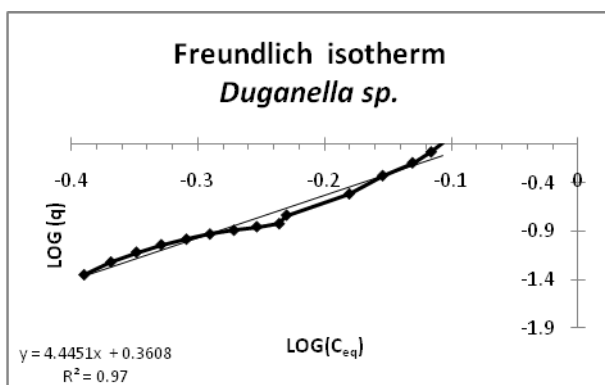
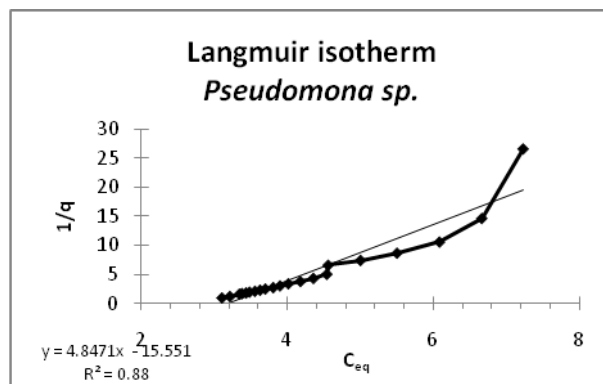
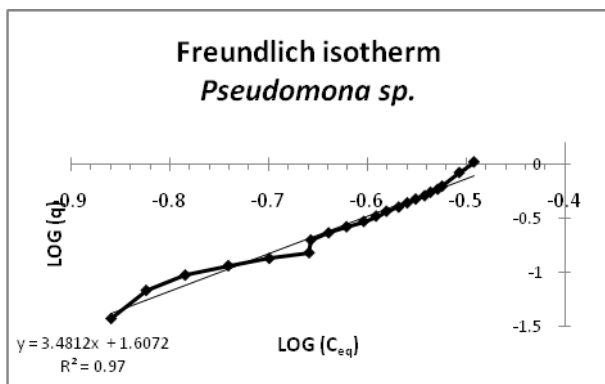
El aislado con menor capacidad de adsorción es *Arcicella sp.* que presenta un comportamiento similar al del medio sin biomasa utilizada como adsorbente, una MIC de 0,5 mM, sin capacidad de expresión de gen *cop* ni capacidad de formación de biomasa y una capacidad de adsorción de 0,38 mg Cu/g biomasa. Este aislado no ha sido asociado con episodios de corrosión de cobre, pero sí encontrado dentro de las especies que se encuentran en muestras de agua potable (Revetta, 2010).

Los aislados que presentan capacidad de formar biopelícula son los que presentan una mayor capacidad de adsorción, la cual es variable debido a la naturaleza y cantidad de EPS que puede ser producida por cada especie bacteriana. Por ello, la formación de biopelícula pareciera ser la variable más importante a la hora de definir la capacidad de adsorber cobre en solución.

El ajuste de los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de cobre utilizando ISE de cobre bajo los parámetros de las ecuaciones de Freundlich y Langmuir para cada uno de los aislados resulta en las isotermas de adsorción que se muestran en la Figura 10. De acuerdo a ellas, se puede observar que todos los aislados a excepción de *Variovorax sp.* (que cumple con ambos ajustes de manera similar, con 94,6% y 95,2%

respectivamente) se ajustan de mejor manera al modelo de adsorción de Freundlich, lo que implica que el modelo de adsorción de cobre en biomasa cumple con los supuestos de ésta ecuación, es decir, se comporta como una superficie heterogénea donde los sitios de unión de cobre difieren entre sí, lo cual es coherente con la hipótesis encontrada que hacía esperable que el mejor ajuste sea el de Freundlich (Zhou *et al.*, 1998). Así, la saturación de los sitios de unión cobre-biomasa tiene un comportamiento variable a medida que la concentración de cobre en solución aumenta, es decir, los sitios de unión se comportan como una superficie heterogénea, en la que los sitios de unión comienzan a saturarse rápidamente con las primeras adiciones de metal hasta que cada vez se vuelve más difícil ocupar los sitios disponibles.

Al realizar un ajuste de acuerdo al modelo de Langmuir se pueden obtener los parámetros K y a para cada una de las especies. De acuerdo a experimentos anteriores los valores de la constante K varían en el rango de 0.1 a 4 (Carvallo 2005, Shetty *et al.*, 2009), lo que implica que la afinidad de los sitios de unión por los ligandos se encuentra dentro de los rangos observados para biomasa.



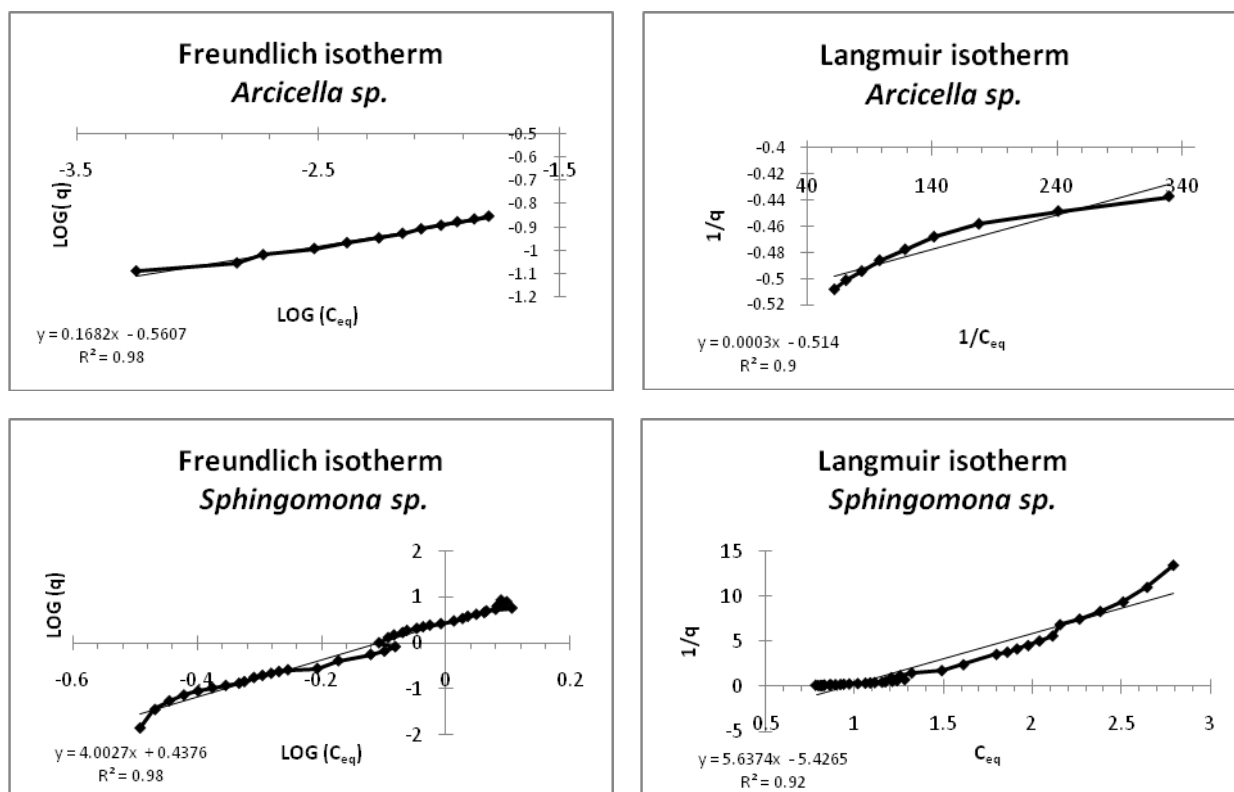


FIGURA 9: Ajuste del modelo de Freundlich y Langmuir a la capacidad de adsorción de los distintos aislados.

4.3 Crecimiento de biomasa en contacto con cupones de cobre, efecto en el pH

Con el objetivo de evaluar el efecto del crecimiento de biomasa en contacto con superficies de cobre, en un medio que sea favorable para su crecimiento, cada uno de los aislados fue inoculado en un matraz de Erlenmeyer con un cupón de 25 cm² en su interior con 50 mL de medio de cultivo MSVP modificado a un pH inicial de 5,6:

Aislado	pH	Crecimiento
Abiótico	6,7	no
<i>Arcicella sp.</i>	6,86	no
<i>Pseudomonas sp.</i>	8,28	si
<i>Sphingomonas sp.</i>	7,92	si
<i>Variovorax sp.</i>	7,4	si
<i>Duganella sp.</i>	8,11	si

Tabla 2: Variación del pH y análisis de crecimiento de aislados en Medio MSVP modificado en presencia de cupón de cobre

Se puede observar que en todos los casos que hubo crecimiento de biomasa el pH de la solución aumenta. Si comparamos este resultado con el obtenido en el experimento de adsorción, se puede observar que los aislados que tienen una mayor capacidad de adsorción de cobre son también los que logran un mayor aumento en el pH, por lo que podría existir una relación entre la capacidad de adsorción y el efecto que el crecimiento de cada aislado tiene sobre el pH lo cual puede deberse a la afinidad de los metabolitos celulares por el cobre a un pH alto, el consumo de protones para la reacción de corrosión o su precipitación en formas de moléculas más estables. Se puede asociar el aumento de pH al consumo de protones durante el proceso de corrosión para la formación de agua.

El medio de cultivo contiene una alta concentración de materia orgánica como piruvato, el cual por si solo tiene un efecto corrosivo sobre la superficie metálica, aumentando también de manera independiente el pH de la solución. A pesar de ello, la actividad metabólica de los aislados (asociada a su crecimiento) tiene un efecto superior al que tiene el medio solo, por ello, se puede concluir que la biomasa tiene un efecto que se suma a la presencia de materia orgánica.

Observación bajo microscopio SEM de los cupones de cobre

Los cupones resultantes del experimento anterior fueron mantenidos en hidratación y luego tratados para ser observados en el microscopio SEM. Debido al tiempo de crecimiento sobre las superficies (5 días) no se espera observar la formación de biopelículas sobre ellas, ya que el tiempo mínimo para la formación de una biopelícula primaria sería del orden de 15 días (Pavissich, 2010). Así se espera observar el crecimiento y adhesión de la biomasa sobre el soporte con el que estuvo en contacto.

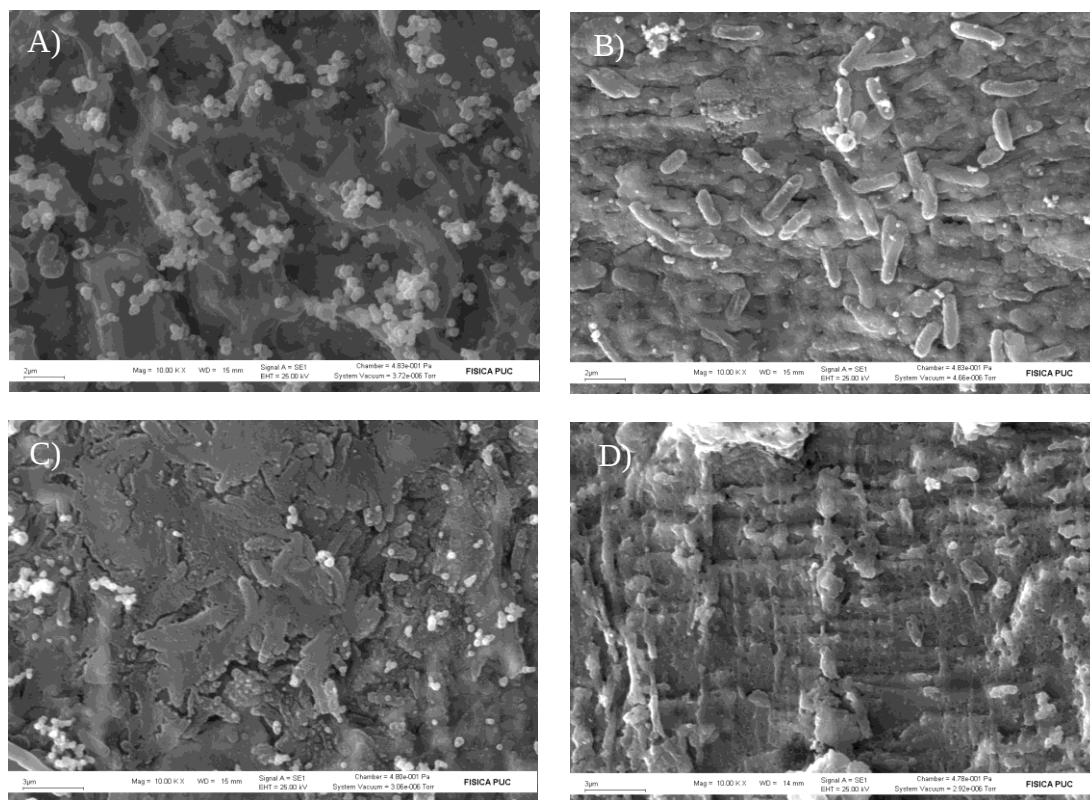


FIGURA 10: SEM de los cupones puestos en contacto con medio MSVP modificado, A) *Variovorax* sp. B) *Pseudomonas* sp. C) *Duganella* sp. D) control de cupón con medio, todos con aumento 10KX.

El crecimiento de biomasa en sobre las superficies metálicas se hace presente a través del crecimiento de estructuras bacilares además de los productos de corrosión abiótica de forma esférica y con tendencia a la aglutinación. Todos los aislados capaces de formar biopelícula fueron capaces de crecer sobre una superficie de cobre y lograron adherirse a ella a los cinco días de ser inoculadas. En todas las imágenes se observa también la formación de productos de corrosión.

4.4 Envejecimiento de cañerías en medio de cultivo y agua sintética:

De acuerdo a los resultados de un experimento anterior (Pavissich *et al.*, 2010), al realizar experimentos de corrosión mediante períodos de estancamiento en laboratorio con presencia de microorganismos existe un aumento en la concentración de cobre en solución (comparado con un sistema abiótico), el que tiene un peak en la segunda semana de envejecimiento.

Basado en estos resultados, se realiza un experimento que permita evaluar la capacidad de corroer de cada aislado por separado utilizando un medio de cultivo que entregue un ambiente más favorable para el crecimiento de las bacterias. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

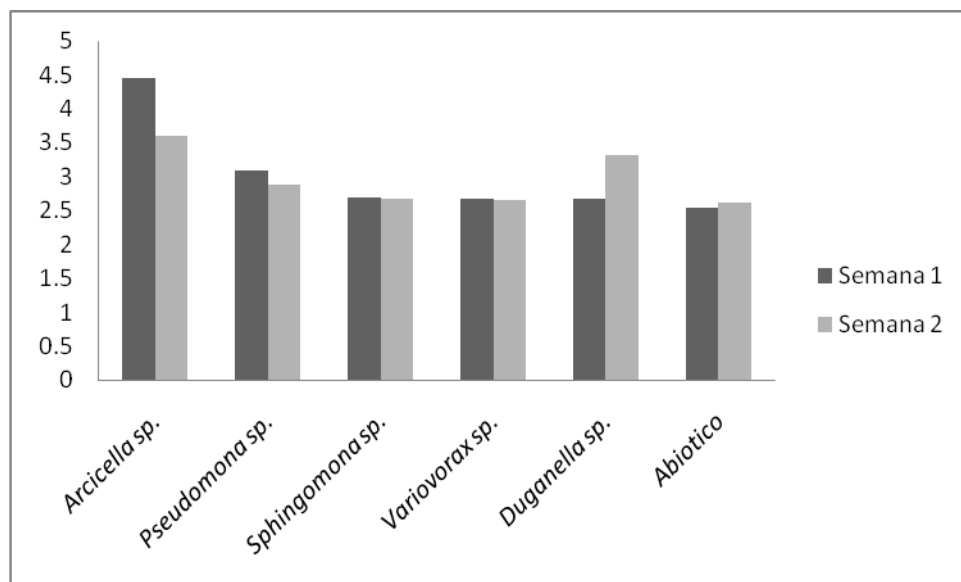


FIGURA 11: Experimento de envejecimiento de cañerías, concentración de cobre en el afluente utilizando medio de cultivo MSVP modificado

Para eliminar el efecto corrosivo de la materia orgánica en el experimento anterior, se replicó el procedimiento utilizando en esta ocasión un “agua sintética” con características similares a las del sistema de estudio, sin la carga corrosiva de la materia orgánica (medio MSVP, HEPES ni vitaminas y con una concentración menor de piruvato). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

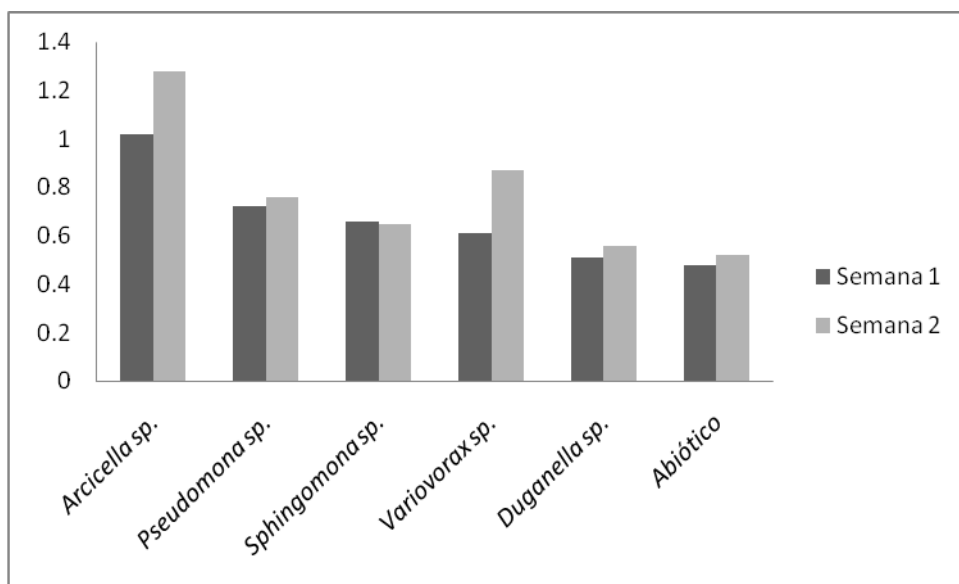


FIGURA 82: Experimento de envejecimiento de cañerías, concentración de cobre en el afluyente utilizando medio de cultivo MSVP modificado (agua sintética).

De acuerdo a las Figuras 11 y 12, la materia orgánica tendría un efecto directo en la liberación de cobre ya sea en presencia o en ausencia de bacterias. Para experimentos abióticos con medio de cultivo, la liberación de cobre tuvo un promedio de 2,5 mg Cu/L,

mientras que el mismo experimento con un agua sintética sin la carga orgánica mostró un promedio de 0,5 mg Cu/L.

En el experimento con medio de cultivo, la presencia de *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.* y *Variovorax sp.* no pareciera significativa en la liberación de cobre al ser comparada con el experimento abiótico, por lo que estos aislados no tendrían, en primera instancia, un efecto corrosivo por sobre el efecto de la materia orgánica. Lo mismo ocurre para *Duganella sp.* durante la primera semana, pero durante la segunda semana muestra un peak de corrosión de cobre de 3,3 mg Cu/L.

El aislado que presenta mayor corrosión en el experimento con medio MSPV modificado es *Arcicella sp.*, un aislado que no presenta capacidad de formación de biopelícula ni expresión de gen *cop*. La ausencia de EPS y bombas de eflujo podría ser la explicación de este resultado, ya que al no tener la capacidad de unirse al cobre liberado al medio, éste quedaría en solución.

Es posible que *Pseudomonas sp.*, *Variovorax sp.* y *Duganella sp.* también puedan aumentar en algo la corrosión del sistema, pero su capacidad de formar biopelícula sea la responsable de que se muestre una menor liberación de cobre al medio, es decir, que se libere una alta cantidad de cobre al medio pero éste sea capturado por la biopelícula.

En los experimentos con agua sintética, la especie no cultivada muestra un efecto similar al de la muestra abiótica. La presencia del resto de los aislados favorecería una mayor liberación de cobre desde la cañería hacia el medio. Esto es coherente con la explicación de la captura de cobre por parte del EPS de la biomasa, ya que al tratarse de un medio menos favorable para el crecimiento bacteriano, existe una cantidad más

limitada de células y por tanto de biopelícula en el sistema. Así, de todo el cobre liberado por la superficie, sólo una fracción puede ser adsorbida por la biomasa.

Al poner foco en la diferencia de resultados obtenidos entre los dos medios, se observa que la presencia de materia orgánica y vitaminas en el sistema permiten que los aislados tengan una mayor capacidad de corroer la cañería producto del aumento en su actividad metabólica. Si se compara el resultado utilizando medio MSVP de *Arcicella sp.* con el resultado abiótico obtenido en el mismo experimento se puede observar que el crecimiento bacteriano logra una concentración de cobre superior en 1,9 mg Cu/L durante la primera semana y de 1 mg Cu/L durante la segunda, diferencia que sería atribuible a la presencia del aislado en el sistema.

En ambos experimentos, el aislado que presentó una mayor tasa de liberación de cobre es *Arcicella sp.*, el que a pesar de presentar una menor capacidad de soportar altas concentraciones de cobre comparado con el resto de los aislados, no tener el gen *cop* analizado ni la capacidad de generar biopelícula, logró en las primeras dos semanas de experimentación una mayor concentración de cobre en solución. Esto puede explicarse a que la ausencia de las características mencionadas anteriormente evitaría que una fracción del cobre liberado sea capturada por sustancias asociadas a su actividad metabólica, por lo que una fracción mayor del cobre se encuentra en solución. Por otra parte, una MIC de 0,5mM representa la adición al medio de 31,8 mg de Cu/L, y aunque una parte de éste se encontraría precipitado al pH de crecimiento bacteriano, aun existiría una gran concentración de cobre en solución, la cual se encontraría muy por sobre las concentraciones que alcanzan a liberarse desde las cañerías.

Los resultados obtenidos en los experimentos con agua sintética muestran que la corrosión durante las primeras dos semanas varía entre los 0,5 mg Cu/L en condiciones abióticas hasta los 1,4 mg Cu/L con el aislado *Arcicella sp.*, lo cual se ajusta a los resultados obtenidos en una investigación anterior (Pavissich 2010), en la cual, a la segunda semana de envejecimiento se observó una liberación de cobre desde las cañerías de 0,4 mg Cu/L para el sistema abiótico y de 2,4 mg Cu/L para el sistema biótico que consistía de una muestra de agua del sistema de estudio con una carga microbiana base. De acuerdo a esto, se puede concluir que el efecto en la liberación de cobre desde la cañería es superior en presencia de una comunidad compleja, en la que existen distintas especies bacterianas, logrando un efecto sinérgico que aumentaría su liberación al medio.

5 CONCLUSIONES

Entre las variables estudiadas, la capacidad de generar biopelícula sería la más importante a la hora de conferir resistencia a altas concentraciones del metal y adsorber cobre.

De los resultados experimentales de este estudio se puede concluir que en primera instancia las variables de resistencia a cobre como la presencia de gen *cop* o la capacidad de formar biopelícula no estarían directamente ligadas con la liberación de cobre en solución. Esto puede deberse tanto a que efectivamente los aislados con capacidad de formar biopelícula generan una capa protectora sobre la superficie o que su capacidad de adsorber cobre en solución no permite medir la concentración de cobre liberada, lo que se traduciría en un aumento en la corrosión pero con una menor concentración disuelta en el líquido.

En la literatura suele asociarse indistintamente la tasa de corrosión con la capacidad de adsorber cobre (Beech *et al.* 2004) o con la formación de metabolitos ácidos (Beale *et al.* 2010). Sin embargo, entre las variables estudiadas (capacidad de formar biopelícula, presencia de gen *cop* y capacidad de crecimiento en presencia de cobre en solución) no habría una sola que sea responsable tanto de la capacidad de adsorber cobre en solución como de influir en la corrosión de la superficie metálica. El efecto corrosivo de la presencia bacteriana no estaría limitado (al menos en el corto plazo) por la formación de biopelícula, ya que de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos, la mayor tasa de corrosión fue producto del efecto de un aislado sin capacidad de formación de biopelícula. Este resultado podría estar siendo oculto por

la acumulación de cobre unido a los EPS, ya que su captura por parte de las bacterias hace disminuir su concentración en solución.

La presencia de un medio metabólicamente favorable contribuye a la corrosión de las superficies en presencia de biomasa, ya que la cantidad de cobre en solución aumenta en presencia de las bacterias por sobre las concentraciones de los experimentos abióticos. Esto podría deberse al aumento de la actividad metabólica de los aislados, lo que aumenta su tasa de crecimiento y por tanto, el número de bacterias activas presentes en el sistema, con un consecuente aumento en la secreción de moléculas potencialmente corrosivas y la formación de biopelícula. Otro efecto de la presencia de microorganismos en el sistema es el aumento en el pH en el medio, incluso en medios de cultivo con características similares a las fuentes de agua para consumo humano (agua sintética) en los que la materia orgánica es baja y en teoría su crecimiento no es favorecido por concentración de cobre y calidad de agua, esto puede deberse a un aumento en el consumo de protones para la reducción del oxígeno y liberación de cobre al medio.

La capacidad potencial de expresar el gen *cop* no pareciera ser relevante a la hora de conferir resistencia. Esto puede deberse a principalmente a dos razones. La primera es que la medición de presencia del gen no implica que éste se exprese en el momento en que se observa, ya que el estudio es a nivel de DNA. La segunda razón es que todos los aislados que contaban con el gen *cop* también podían formar biopelícula, por lo que el efecto de los EPS puede evitar la necesidad de expresión de bombas de eflujo.

La adsorción de cobre en biomasa bacteriana como modelo de adsorción se ajusta de mejor manera a un modelo de isoterma de adsorción de Freundlich, lo que

implica que el comportamiento de la biomasa como adsorbente se comporta como una superficie energéticamente heterogénea, es decir, en una primera instancia, los sitios de unión se ocupan casi inmediatamente, pero a medida que la saturación va en aumento, cada vez se hace más difícil que los sitios disponibles se ocupen por iones de cobre.

Respecto de los métodos de medición, se puede concluir que el uso de ISE y ASV son una buena alternativa para realizar mediciones de cobre en solución, aunque presentarían algunas limitaciones a la hora de realizar mediciones en muestras ambientales, ya que ambos deben utilizarse en soluciones cuya composición es conocida para poder calibrar las mediciones. El ISE de cobre requiere también de un ambiente controlado, ya que presenta interferencias con iones, materia orgánica y temperatura (en este caso no se observó interferencia con la luz como habría sido previsto en estudios anteriores; Carvallo, 2005).

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se abren algunas preguntas y nuevas opciones de investigación sobre las capacidades de los microorganismos y el proceso de corrosión en sistemas de distribución de agua potable:

- Balance de masa de la concentración total de cobre liberada al medio, como resultado del cobre presente en el medio y del cobre adsorbido por la biomasa.
- Repetición de los experimentos utilizando una misma especie pero proveniente de distintos sistemas de estudio. De esta manera se puede evaluar el efecto de la presión selectiva en el metabolismo de las bacterias y el posible efecto de la transferencia horizontal de genes para estos fines.

- Evaluación del efecto de otras variables de calidad de agua en sobre las características corrosivas de los aislados, como presencia de otros iones en solución. Además de otras variables físico químicas como la temperatura.
- Variación de los períodos de estancamiento en las cañerías, identificando los efectos de los aislados en el tiempo hasta conseguir el establecimiento de una biopelícula madura (sobre cuatro semanas).
- Medición de la concentración de cobre en el experimento de cupones de cobre y posterior análisis de cantidad de biomasa y composición de los subproductos de corrosión en SEM para medio de cultivo y “agua sintética”.
- Estudio de la expresión del gen *cop* mediante la expresión de RNA.

6 BIBLIOGRAFIA

Amann, R. I., Ludwig, W., y Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, Vol. 59, 143-169.

Arguello, J. M., Eren, E. y Gonzalez-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport PIB-ATPases, *Biometals*, Vol. 20, 233-48.

Bayramoglou, G., Celik, G., Yalcin, E., Yilmaz, M. and Arica, M.Y., (2005). Modification of surface properties of *Lentinus sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr+6 removal efficiencies from aqueous medium. *J. Hazard. Mater.*, B119, 219- 229.

Beale, A. Michael, S. Dunn b, Donovan Marney (2010). Application of GC–MS metabolic profiling to ‘blue-green water’ from microbial influenced corrosion in copper pipes. *Corrosion Science*, 52, 3140–3145

Beech, W. B. & Sunner, J. (2004). Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15 (3), 181-186.

Bermon-Bouis, D., Janvier, M., Grimont, P. A. D., Dupont, I. y Vallaey, T. (2007) Both sulfate-reducing bacteria and *Enterobacteriaceae* take part in marine biocorrosion of carbon steel, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 102, 161-168.

Bond, A. (1999). 200 years of practical electroanalytical chemistry: past, present and future directions illustrated by reference to the on-line, on-stream and off-line determination of trace metals in zinc plant electrolyte by voltammetric and potentiometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 400, 333–379.

Boulay, N. y Edwards, M. (2001) Role of temperature, chlorine, and organic matter in copper corrosion by-product release in soft water, *Water Research*, Vol. 35, 683-690.

Bremer, P. J. y Geesey, G. G. (1991) Laboratory-Based Model of Microbiologically Induced Corrosion of Copper, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, Nº 7, 1956-1962.

Broo, A. E., Berghult, B. y Hedberg, T. (1998) Copper corrosion in water distribution systems - the influence of natural organic matter (NOM) on the solubility of copper corrosion products, *Corrosion Science*, Vol. 40, 1479- 1489.

Calle, G. R., Vargas, I. T., Alsina, M. A., Pastén, P. A. y Pizarro, G. E. (2007) Enhanced copper release from pipes by alternating stagnation and flow events, *Environmental Science & Technology*, Vol. 41, 7430-7436.

Castillo, C. (2005) Caracterización in situ de parámetros de calidad del agua frente al fenómeno de Agua Azul. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Carvalho, M. (2005) Evaluación de la capacidad de sorción de cobre por biomasa usando electrodo ISE: Implicaciones para un modelo de biocorrosión de cañerías de cobre, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago

Critchley, M. M., Cromar, N. J., McClure, N. and Fallowfield, H. J. (2002) Biofilms in copper plumbing systems: sensitivity to copper and chlorine and implications for corrosion, *Water Science and Technology: Water Supply*, Vol. 2, 81-87.

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

Critchley, M.M., Pasetto, R. and O'Halloran, R. (2004) Microbiological influences in 'blue water' copper corrosion *J. J Appl Microbiol* 97, (2004) 590–597.

De La Iglesia, R., Valenzuela, D., Freyhofer, S., Pavissich, J.P., Andrade, S. y González, B. (2008) Molecular detection of bacterial copper P-Type ATPase gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA, *Lett Appl Microbiol*. 2010 Jun 1;50(6):552-62.

Dietrich, A. M., Glindemann, D., Pizarro, F., Gidi, V., Olivares, M., Araya, M., Camper, A., Duncan, S., Dwyer, S., Whelton, A. J., Younos, T., Subramanian, S., Burlingame, G. A., Khiari, D. y Edwards, M. (2004) Health and aesthetic impacts of copper corrosion on drinking water, *Water Science and Technology*, Vol. 49, 55-62.

Djordjevic, D. Wiedmann, M. and Mclandsborough, L., A. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, 2950- 2958.

Donmez, G. and Aksu, Z., (2002). Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochem.*, 38, 751-762.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A. y Kuske, C. R. (1999) Levels of bacterial community diversity in four arid soil compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, 1662-1669.

Edwards, M., Ferguson, J. F. y Reiber, S. H. (1994) The Pitting Corrosion of Copper, *Journal American Water Works Association*, Vol. 86, N° 7, 74-90.

Edwards, M., Schock, M. R. y Meyer, T. E. (1996) Alkalinity, pH, and copper corrosion by-product release, *Journal American Water Works Association*, Vol. 88, N° 3, 81-94.

Edwards, M., Jacobs, S. and Dodrill, D.M. (1999) Desktop guidance for mitigating Pb and Cu corrosion by-products. *J. Am. Water Works Assoc.*, 91(5): 66-77.

Edwards, M., Jacobs, S. y Taylor, R. J. (2000) The blue water phenomenon, *Journal American Water Works Association*, Vol. 92, 72-82.

Edwards, M., Sprague, N. (2001) Organic matter and copper corrosion by-product release: a mechanistic study, *Corros. Sci.* 43 1–18.

Edwards, M., (2004). Controlling corrosion in drinking water: A grand challenge for the 21st century. *Water Sci Technol*, ; 49 (2). 1-8.

Flemming H, Neu T. and Wozniak D, (2007) The EPS matrix: The “house of biofilm cells” *Journal of Bacteriology*; 189 (22),. 7945-7947.

Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C., and Turner, R.J. (2004) Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ Microbiol* 6: 1220–1227.

Harrison, J., Cer, Howard and. Turner Raymond J (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms *Nature Reviews Microbiology* 5, 928-938

Hernandez, M., Marchand, E. A., Roberts, D. .J. y Peccia, J. (2002) In-situ assessment of active *Thiobacillus* species in corroding concrete sewers using fluorescent RNA probes, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 49, 274-286.

Jan-Roblero, J., Romero J.M., Amaya, M. and Le Borgne, S. (2004) Phylogenetic characterisation of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. *appl microbiol biotechno* 64, 862–867.

Juhna T., Birzniece D., Larsson S., Zulenkovs D., Sharipo A., Azevedo NF., Ménard-Szczebara F., Castagnet S. Féliers C. and C. Keevil W.. (2007) Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks *Appl. Environ. Microbiol*, 73(22):7456-64.

Keevil, C.W. (2004). The physico-chemistry of biofilm-mediated pitting corrosion of copper pipe supplying potable water. *Water Sci. Technol.* 49, 91-98.

Kopteva, Z., Zanina, V., Kozlova, I. (2004) Microbial corrosion of protective coatings. *Surf Eng* 20:275–280.

Korshin, G.V., Ferguson J.F, *Internal Corrosion in Water Distribution Systems* p 56

Lagos, G. E., Cuadrado, C. A. y Letelier, M. V. (2001) Aging of copper pipes by drinking water, *Journal American Water Works Association*, Vol. 93, N° 11, 94-103.

Lytle, D. and Nadagouda, M (2010) A comprehensive investigation of copper pitting corrosion in a drinking water distribution system, *Corrosion Science*, Vol. 52, 1927-1938

Letelier, M. V. P. (2003) Envejecimiento de cañerías de cobre en contacto con agua potable. Pontificia Universidad Católica de Chile, Escuela de Ingeniería. Santiago, Chile

Merkel, T. H., Gross, H. J., Wernera, W., Dahlkeb, T., Reichertera, S., Beuchleb, G. and Eberle, S.H., (2002) Copper corrosion by-product release in long-term stagnation experiments, *Water Research*, Vol. 36, 1547-1555.

Merkel, T.H., Pehkonen, S.O. (2006), General corrosion of copper in domestic drinking water installations: scientific background and mechanistic understanding, *Corros. Eng. Sci. Technol.* 41 21–37

Oliphant, R. J. (2003) Causes of copper corrosion in plumbing systems, *Foundation for Water Research*, UK.

Ozer, D., Asksu, Z., Kutsal, T. and Caglar, A., (1994). Adsorption Isotherms of Lead (II) and Chromium (VI) on *Cladophora crispata*. *Environ. Technol.*, 15, 439- 448.

Öztürk, A., Artan, T. y Ayar, A. (2004) Biosorption of nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor*, *Science Direct. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 34 (2) 105-111

Palmgren, M. G. y Axelsen, K. B. (1998) Evolution of P-type ATPases, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, Vol. 1365, 37-45.

Pasavento, M., Alberti, G., Biesuz, R. (2009) Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review, *Analytica Chimica Acta* 631, 129–141.

Pavissich, J.P., Vargas I.T., Gonzalez B., Pastén, P. y Pizarro, G (2010) Culture dependent and independent analyses of bacterial communities involved in copper plumbing corrosion, *Journal of Applied Microbiology*, 109, (3):771-782

Pehkonen, S.O., Palit, A. y Zhang, X. (2002) Effect of specific water quality parameters on copper corrosion, *Corrosion*, Vol. 58, 156-165.

Pehkonen, S.O., Palit, A. (2003) Copper Corrosion in distribution systems: Effect of ozonation and biofiltration, *Corrosion*, Vol 59, 09.

Ransom Stern, B, Solioz M., Krewski D., Aggett p., Aw T.C., Baker s., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C, Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T., (2007) Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part B, 10:157–222.

Rachou, J., Gagnone, Ch. Y Sauvé, S., (2007) Use of an Ion Selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices, *Environ. Chem.* 4, 90-97

Revetta, R., Pemberton, A., Lamendella, R., Iker B., Santo Domingo,. (2010) Identification of bacterial populations in drinking water using rRNA based sequence analyses *Water Research*, V 44, Pages 1353-1360.

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

Rosenzweig, A. C. (2002). Metallochaperones: bind and deliver, *Chemistry and Biology*, Vol. 9, 673-677.

Rushing, J. C. y Edwards, M. (2004) The role of temperature gradients in residential copper pipe corrosion, *Corrosion Science*, Vol. 46, Nº 8, 1883- 1894.

Schock, M.R., Lytle, D.A., Clement, J.A., (1995) Effect of pH, DIC, Orthophosphate and Sulphate on Cuprosolvency, in EPA/600/R-95/085, National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268.

Shetty, R. and Rajkumar, Sh. (2009) Biosorption of Cu (II) by Metal Resistant *Pseudomonas* sp, *Int. J. Environ. Res.*, 3(1):121-128, Winter 2009

Silver, S. (1996). Bacterial resistance to toxic metal ions – a review. *Gene* 179, 9–19.

Steinberger, R., Holden, P., (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5404–5410.

- Teitzel, G. M. y Parzek, M. R. (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, 2313-2320.
- Vargas, I, Alsina, M., Pastén, P., Pizarro, G (2009) Influence of solid corrosion by-products on the consumption of dissolved oxygen in copper pipes, *Corrosion Science*, 51 1030–1037.
- Vargas, I, Pavissich, J.P., Olivares, T., Jeria, G., Cienfuegos, R., Pastén, P., Pizarro, G (2010) Increase of the concentration of dissolved copper in drinking water systems due to flow-induced nanoparticle release from surface corrosion by-products, *Corrosion Science* 52, 3492–3503
- Vargas, I. Pasten, P., Pizarro, G. (2010) Empirical model for dissolved oxygen depletion during corrosion of drinking water copper pipes, *Corrosion Science*, 52, 2250-2257
- Videla, H. A. (1996) Manual of biocorrosion. *CRC. Lewis Publishers*, Boca Ratón, Florida.
- Videla HA, Herrera LK (2005) Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int Microbiol* 8:169–180
- Volesky, B., (2003). Sorption and Biosorption, *BV Sorbex, Montreal-St.Lambert, Canada*, 316 pgs
- Webster, B. J., Werner, S. E., Wells, D. B. y Bremer, P. J. (2000) Microbiologically influenced corrosion of copper in potable water systems - pH effects, *Corrosion*, Vol. 56, 9, 942-950.
- Yuan, S., Choong, A., Pehkonen, S., (2007) The influence of the marine aerobic *Pseudomonas* strain on the corrosion of 70/30 Cu–Ni alloy *Corrosion Science* 49, 4352–4385
- Zhang, J., Lion, L., Nelson, Y., Shuler, M., Ghiorse, W., (2002) Kinetics of Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS1, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 65, 5, pp. 773–781.
- Zhou, Z.L. and Huang, P.L., (1998). Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. *Environ Pollut.*, 101, 67-75
- Zhang, T., Fang, H. H. P. y KO, B. C. B. (2003) Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 63, 101-106.

ANEXOS

ANEXO 1: VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE CORROSIÓN

Como se mencionó anteriormente, en el proceso de corrosión de cobre están involucradas una serie de variables como la presencia de microorganismos, la concentración de oxígeno en la solución y una serie de características de la calidad del agua y condiciones de operación que influyen la ocurrencia de procesos de óxido-reducción y reacciones ácido-base, precipitación-disolución, adsorción sobre superficies y compuestos orgánicos, etc. A continuación se menciona, a modo de resumen, el efecto de algunas de las variables abióticas involucradas en el proceso:

pH

El pH es una de las variables maestras en el proceso de corrosión, tanto biótico como abiótico debido a su participación en los procesos asociados a la reducción de oxígeno (Pehkonen *et al.*, 2003 Webster *et al.*, 2000; Critchley *et al.*, 2003; Keevil, 2004). En sistemas que cuenten con una concentración de oxígeno disuelto 2 mg/L y pH inferior a 6, el metal sólido puede disolverse y liberarse como Cu^{+2} . Cuando la solución se encuentra en un rango de pH neutro entre 6 y 8, el cobre disuelto se oxida en la forma de cuprita (Cu_2O). En soluciones con pH sobre 8, el cobre disuelto se oxida como hidróxido cúprico o tenorita. Tanto la cuprita como la tenorita son compuestos estables, los que al depositarse sobre las superficies ejercerían una función pasivante del proceso de corrosión (Oliphant, 2003)

Alcalinidad

Se define como alcalinidad de una solución a su capacidad de neutralizar la acidez, la cual se puede expresar en concentración de bicarbonato. Una alcalinidad elevada resultaría beneficiosa como una medida para disminuir la corrosión de las superficies de cobre, ya que activa la formación y depósito de moléculas pasivantes como la malaquita ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$) y el carbonato de calcio (CaCO_3). (Edwards *et al.*, 1994). Cuando la alcalinidad es superior a 100mg/L como CaCO_3 y a pH inferior a 8, la corrosión

aumentaría de forma lineal con la alcalinidad (Edwards 1996) de 0,015 mg Cu/mg CaCO_3 , siendo catalogada como corrosiva. A pH sobre 8 el aporte de la alcalinidad es de 0,0055 mg Cu/mg CaCO_3 , teniendo características pasivantes.

Temperatura

La temperatura puede afectar tanto negativa como positivamente al proceso de corrosión ya que afecta de manera dispar dependiendo del tipo de sólido depositado en la superficie (Letelier, 2003). Termodinámicamente, la temperatura aumentaría directamente la tasa de corrosión, debido a que el potencial de un electrodo es proporcional a la temperatura absoluta. En la práctica, se ha observado que el cobre total aumenta a la vez que lo hace la temperatura (Boulay y Edwards, 2001), mientras que si disminuye, el que aumenta es el cobre en solución (Edwards *et al.*, 1996; Hidmi y Edwards, 1999; Boulay 2001, Edwards, 2001 y 2004; Rushing 2004). Este particular comportamiento se debe principalmente a la variación de la solubilidad de los productos de corrosión ante distintas temperaturas, especialmente el de la malaquita, la que es producto dominante en las cañerías de agua potable. Al aumentar la temperatura, aumenta la formación de sólidos que precipitan sobre las superficies Rushing (2004)

Concentración de oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno en solución es otra de las variables principales dentro del proceso de corrosión ya de ella depende la disolución del metal, gracias a su capacidad de aceptar y ceder electrones. El aumento de la concentración de oxígeno en solución puede aumentar la oxidación de cobre y su acumulación como subproductos depositados sobre las superficie del sistema (Merkel y Pehkonen, 2006). Así, la concentración de oxígeno disuelto se transforma en la variable de referencia para el proceso de corrosión, ya que limita la oxidación del cobre metálico, que es la primera reacción en el proceso (Vargas *et al* 2010).

Materia orgánica

La presencia de materia orgánica incrementaría la cantidad de subproductos de corrosión en el sistema (Korshin *et al.*, 1996; Broo *et al.*, 1998; Boulay & Edwards, 2001). Estos subproductos interfieren en el proceso de corrosión alterando las características de la capa pasivante sobre la superficie de cobre, tanto en su fracción soluble como insoluble. Esta formación de subproductos se ve reflejada principalmente en su fracción soluble (Edwards y Sprague, 2001).

Presencia de Aniones

Fosfato. La presencia de fosfato disminuye la concentración de cobre disuelto (Edwards *et al.*, 2002).

Sulfato. La presencia de sulfato incrementa la liberación de cobre desde la superficie metálica cuando hay estancamiento, ejerciendo su efecto una vez que las capas de óxido ya se han establecido (Edwards *et al.*, 1994a).

ANEXO 2: CONTEXTO DEL SISTEMA DE ESTUDIO

La caracterización inicial de sistema fue realizada a partir de un sistema de distribución de agua potable de la ciudad de Talca, Chile. En el cual ocurría el fenómeno de corrosión. A partir de éste, se han realizado estudios que demostraron la ocurrencia del fenómeno de “agua azul” (Castillo, 2005; Calle *et al.*, 2007).

Entre los análisis realizados, se observó la superficie de cañerías de dos años de antigüedad mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD) y espectroscopía de absorción de rayos X, los que confirmaron la existencia de corrosión localizada y sus subproductos, principalmente malaquita, hidróxido cúprico y malaquita (Calle *et al.*, 2007).

Parámetro	Unidad	Valor
Cobre Total	mg/L	0,07
Cobre disuelto	mg/L	0,07
Fierro	mg/L	0,045
Cloruro	mg/L	15,6
Alcalinidad Total	mg/L	80
Dureza Total	mg/L	160
Sulfato	mg/L	30,2
Nitrato	mg/L	3,20
Fosfato	mg/L	1,66
pH	mg/L	6,0
Oxígeno Disuelto	mg/L	8,11
Conductividad	μS/cm	235
COD	mg/L	1,50
Magnesio	mg/L	6,44
Temperatura	°C	19

Tabla 3: Calidad del agua del área de estudio (Castillo, 2005; Calle *et al.*, 2007)

ANEXO 3: ISOTERMAS DE LANGMUIR Y FREUNDLICH

Freundlich considera que la interacción es sobre una superficie energéticamente heterogénea. Las siguientes ecuaciones, establecen ambos modelos y los valores de capacidad de adsorción C_{max} , se calculan mediante la ecuación del balance de masas.

La reacción que ocurre en la superficie analizada, se puede modelar, simplificada, con la siguiente ecuación de equilibrio:

(1)

Donde:

$[≡B]$: superficie bacteriana de sorción (mg/L).

$[Cu^{2+}]$: Concentración de cobre disuelto (mg/L).

$[≡BCu]$: resultado de sorción en la superficie bacteriana (mg/L).

Luego la constante de formación asociada a la ecuación (1) y el balance de masa correspondiente, entregan finalmente:

$$K_{ads} = \frac{[≡BCu]}{[Cu^{2+}] \cdot [≡B]} \quad (2)$$

$$C_{T,≡B} = [≡B] + [≡BCu] \quad (3)$$

$$[≡BCu] = \frac{C_{T,≡B} \cdot K_{ads} \cdot [Cu^{2+}]}{(1 + K_{ads} \cdot [Cu^{2+}])} \quad (4)$$

Finalmente, se puede deducir la ecuación del modelo de Langmuir:

$$C_s = C_{\max} \cdot \frac{[Cu^{2+}]}{([Cu^{2+}] + K_{eq})} \quad (5)$$

Donde:

Cs: Cantidad de cobre (adsorbato) adsorbido por unidad de masa (adsorbente) en el equilibrio, (mg/g).

Cmax: Máxima cantidad de cobre (mg.) que puede ser adsorbida por gramo de biomasa,(capacidad adsorbente) (mg/g).

Keq: Constante de afinidad, (mg/L).

Es importante notar, que la fórmula utilizada del modelo de Langmuir, considera que Keq (ecuación 5) es equivalente al inverso de Kads (ecuación 2). Esto es Keq= 1/Kads, con lo que la interpretación del parámetro Keq, considera que mientras más grande este valor, la constante de adsorción correspondiente a la formación del complejo superficie-metal, es menor. Bajo esta aclaración, se realiza el análisis y modelación de las curvas de titulación.

La búsqueda de los parámetros Cmax y Keq de la ecuación 5, se realiza por dos métodos diferentes: mínimos cuadrados (entre los datos obtenidos de sorción y la estimación por el modelo de Langmuir), y linealización de la ecuación anterior. En el primer caso se obtienen, como se muestra a continuación gráficamente, excelentes resultados de ajuste a la realidad. La segunda forma de búsqueda de parámetros

(linealización de la ecuación de Langmuir), presenta un buen ajuste para los valores pequeños de $[\text{Cu}^{2+}]$, pero no así para la modelación del fenómeno en mayores concentraciones de cobre.

El procedimiento para la linealización de este modelo consiste básicamente en un análisis gráfico de parámetros. Así, en primer lugar se grafican los valores experimentales: $1/[\text{Cu}^{2+}]$ y $1/\text{Sorbido} [\text{mg Cu/g biomasa}]$. Luego se realiza un ajuste lineal de la forma:

$$y = mx + n \quad (6)$$

Donde:

$1/n$: $C_{\text{max}} [\text{mg Cu/g biomasa}]$

$m \cdot C_{\text{max}}$: $K_{\text{eq}} [\text{mg/L}]$

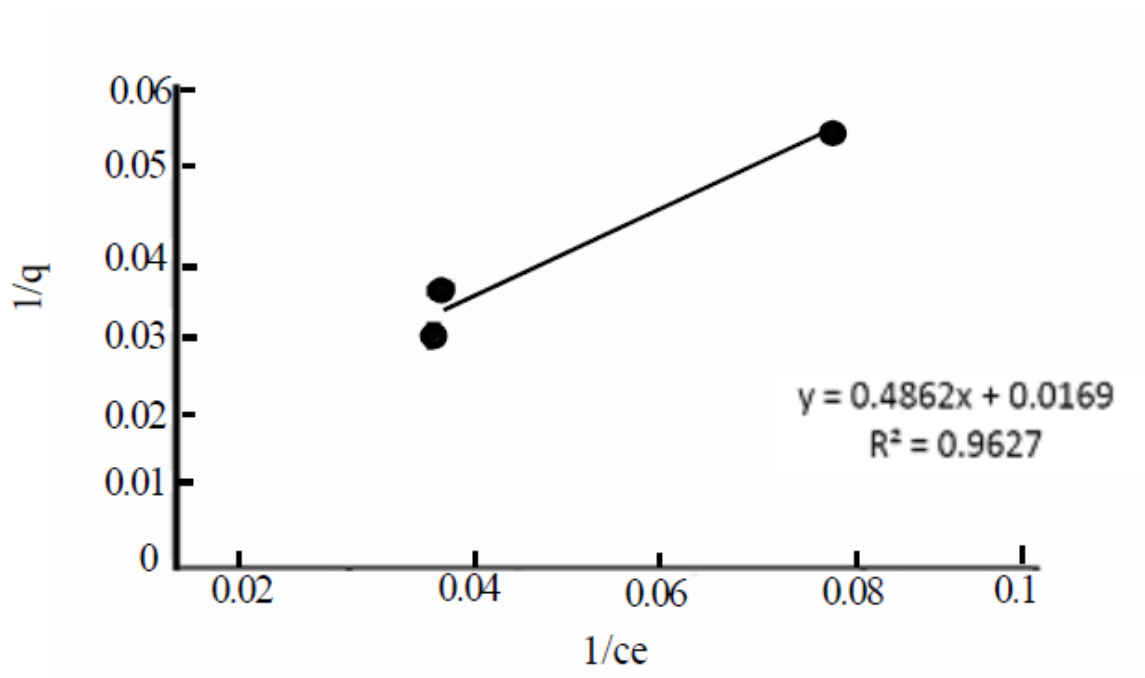


FIGURA 93: Ejemplo de isoterma de Langmuir (Shetty *et al* 2009). C_e es la concentración residual de metal en solución; q representa la cantidad de metal capturado por las células

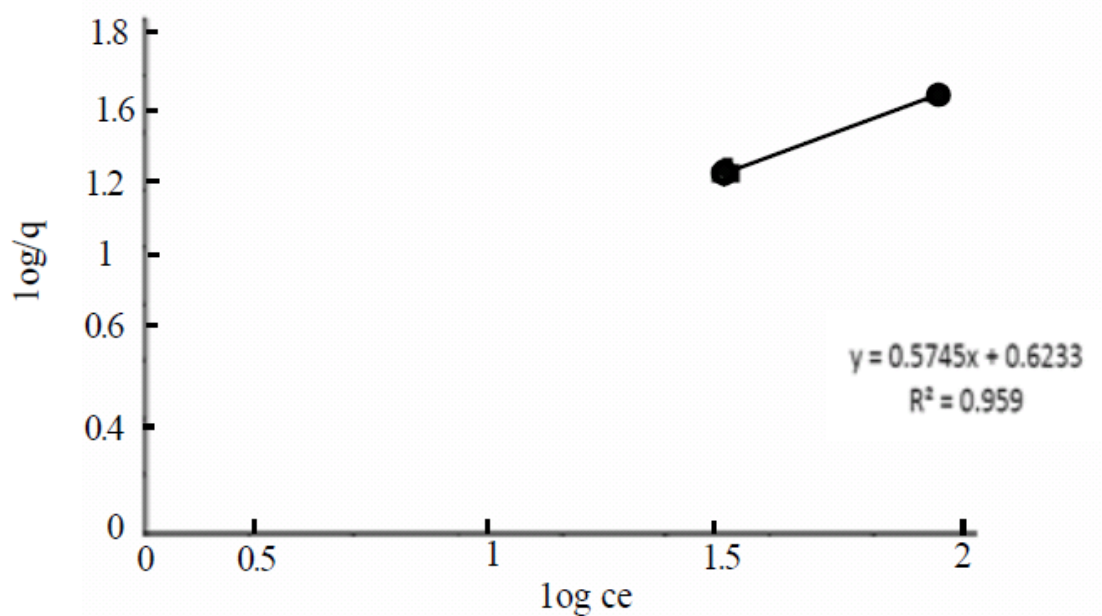


FIGURA 104: Ejemplo de Isoterma de Freundlich (Shetty *et al* 2009). C_e es la concentración residual de metal en solución; q representa a la cantidad de metal capturado por las células

ANEXO 4: FAMILIA DE TRANSPORTADORES DE LAS P-ATPASAS

Las familia de las P-ATPasas son proteínas de membrana que transportan de manera activa iones entre en medio intra y extra celular. Su mecanismo de transporte depende de la fosforilación de una residuo aminoacídico de aspartato en su estructura, siendo el fosfato que se une a la enzima proveniente del ATP hidrolizado a ADP (Palmgren y Axelsen, 1998). El aspartato fosforilado se encuentra EN una secuencia conservada para toda la familia

DKTGT (Aspartato-Lisina-Treonina-Glicina-Treonina). Este grupo ha sido organizado en ocho subfamilias de acuerdo a sus características estructurales y tipificación en cuanto a las especies que transportan : IA para potasio, IB para metales pesados, IIA y IIB para calcio, IIC para sodio y protones, IIIA para protones, IV para fosfolípidos, y V sin especificidad asignada (Palmgren y Axelsen, 1998).

La sub familia de las PIB -ATPasas para metales pesados se encuentran en un espectro amplio de organismos, desde arqueas extremófilas hasta el ser humano. Entre ellas se encuentran diversos subgrupos que se diferencian por el metal que transportan: IB-1 para Cu^+ , IB-2 para Zn^{2+} , IB-3 para Cu^{2+} , IB-4 para Co^{2+} , y IB-5 sin especificidad reconocida (Argüello *et al.*, 2007).

ANEXO 5 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) E IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

El PCR es una técnica molecular que permite obtener una amplificación de una secuencia de ADN (con un factor mayor que 106) a través de una síntesis selectiva y direccionada (Saiki *et al.*, 1988). El PCR requiere de dos partidores de oligonucleótidos que se unen al segmento de DNA a amplificar, y a través una serie de ciclos termoregulados de denaturación, alineamiento y unión de los partidores a su secuencia complementaria, y extensión de los partidores alineados con la enzima DNA polimerasa. Luego de la separación de las hebras complementarias del DNA original producto de la denaturación, los partidores hibridizan las hebras complementarias a la secuencia objetivo. La síntesis efectuada por la polimerasa duplica efectivamente la cantidad de ese segmento de DNA. Así, repitiendo en múltiples ocasiones el ciclo, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo previo (Figura 15). Así se logra amplificar de manera exponencial la secuencia objetivo (Saiki *et al.*, 1988).

Para la identificación de organismos se utilizan secuencias de genes conservados, que sirven como marcadores de una especie en particular. En el caso de los microorganismos generalmente se utiliza como marcador específico al 16S rRNA. Esta molécula posee variaciones suficientes como para clasificar a los microorganismos como bacterias y arqueas, y también en niveles taxonómicos más específicos (Woese *et al.*, 1990).

Una vez realizada la amplificación del rRNA, ésta es secuenciada y comparada con una base de datos que permite identificar la especie (o en el peor de los casos al género) al que pertenece.

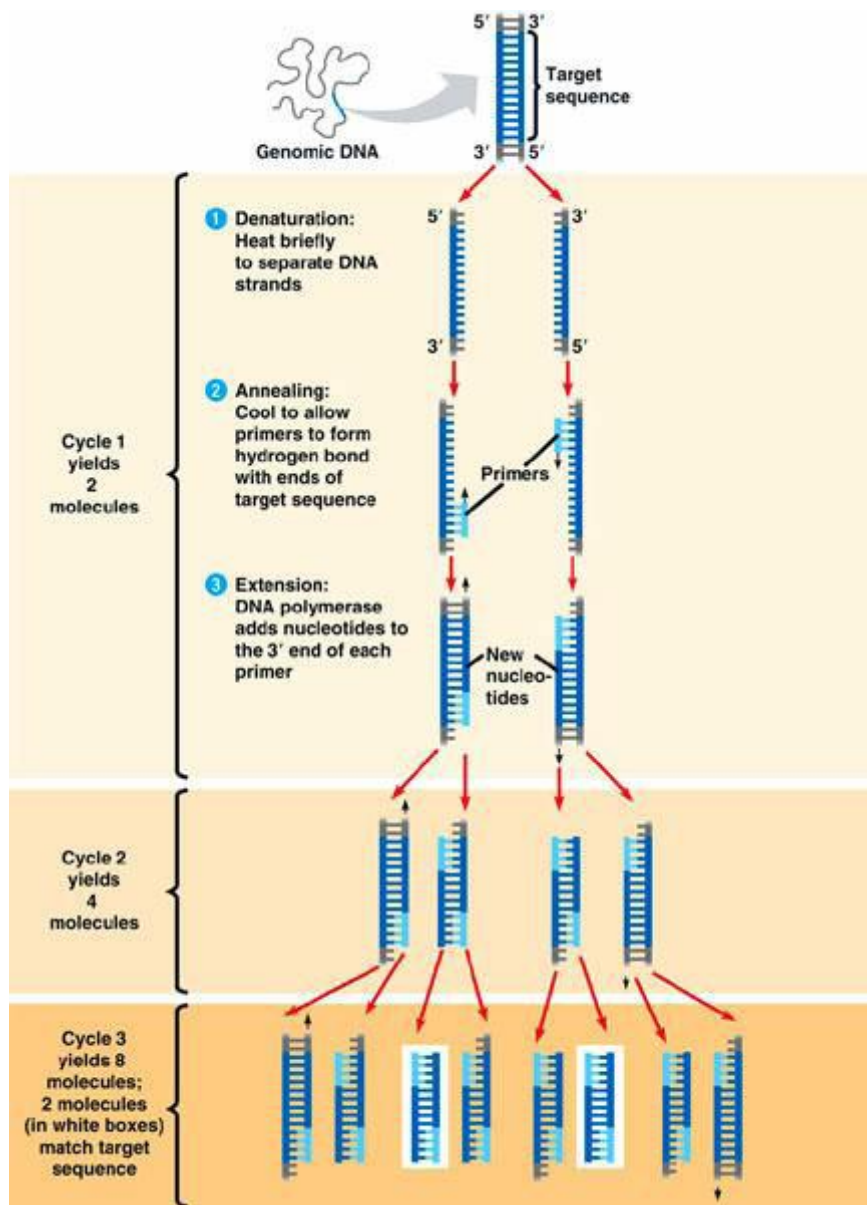


FIGURA 115: Reacción en cadena de la polimerasa (Introductory Biology for Majors, Department of Biology, University of Miami; <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>)

ANEXO 6: CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO DE COBRE

El electrodo de cobre fue calibrado antes de su uso cada vez que fue utilizado mediante el uso de papel para pulir y recambio del líquido al interior de éste. Luego de esto, el electrodo se calibra con soluciones de referencia y se compara con mediciones anteriores

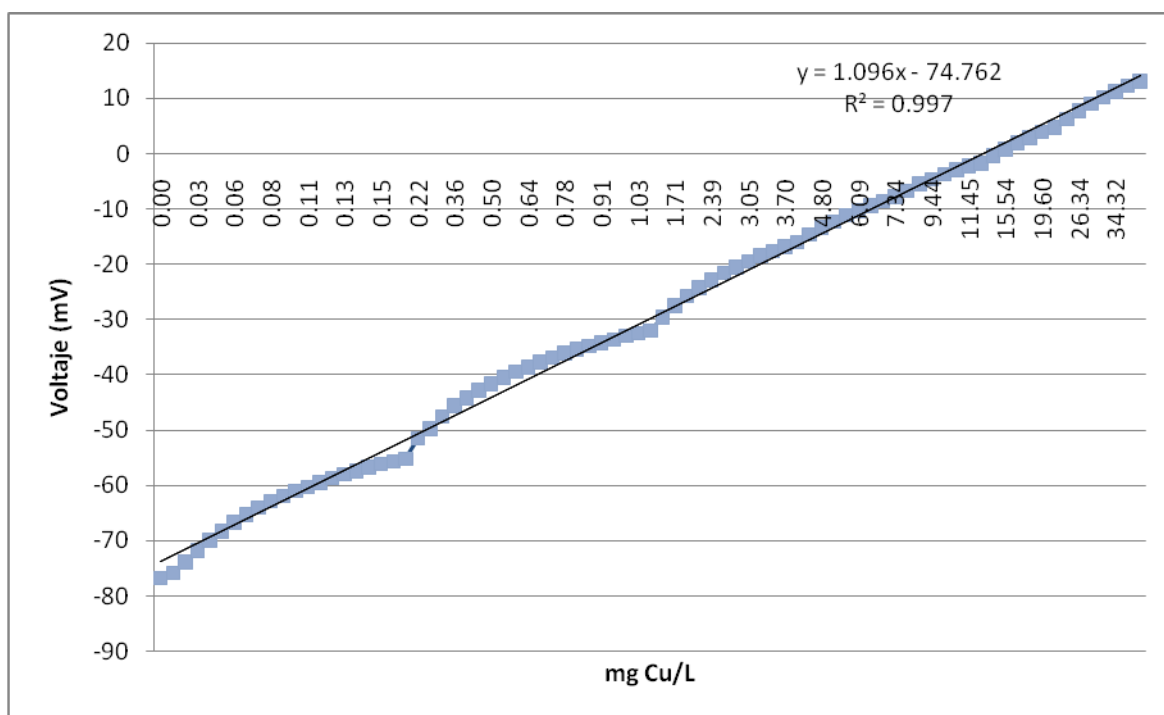
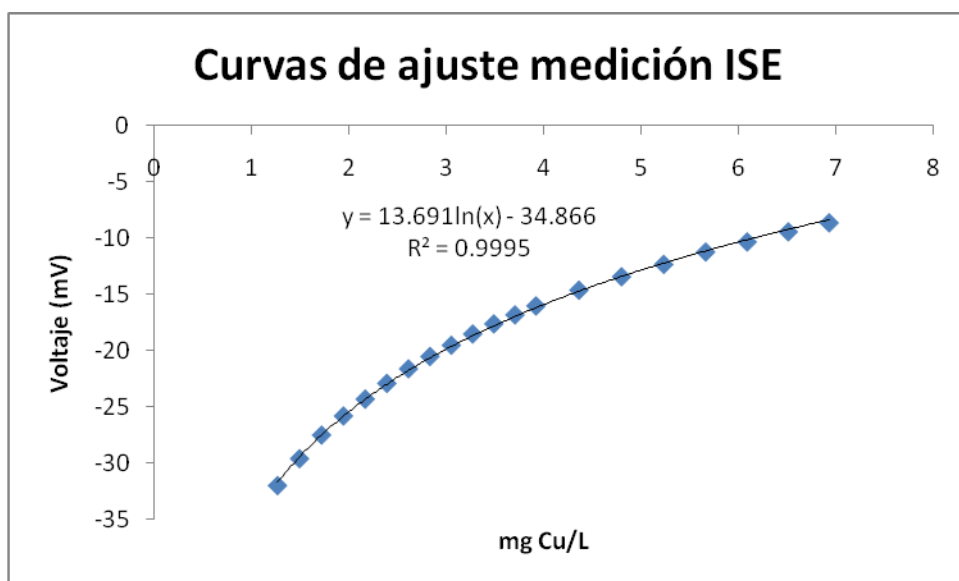
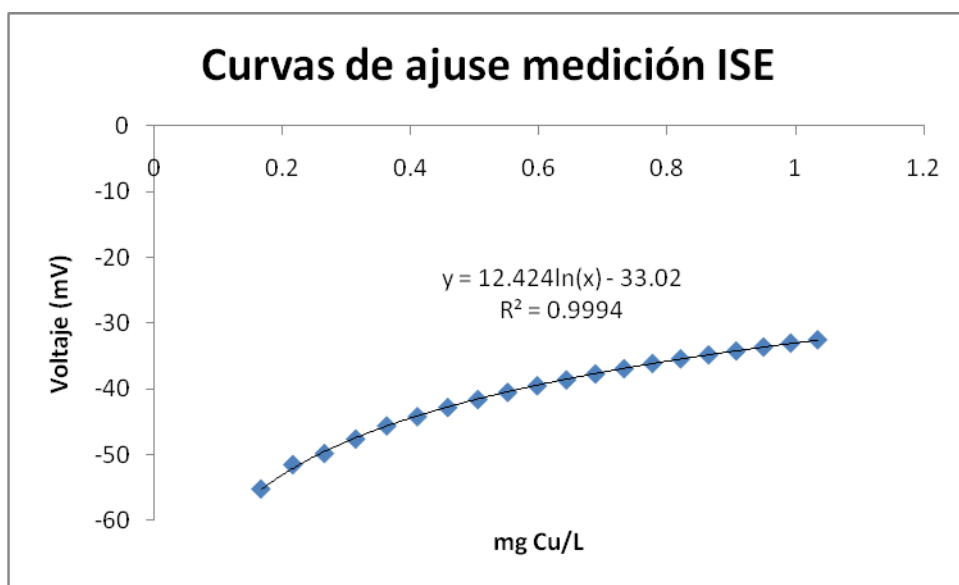


FIGURA 126: Curva de calibración en solución Blanco utilizando ISE de cobre

ANEXO 7: CURVAS DE AJUSTE MEDICIÓN CONCENTRACIÓN DE COBRE ISE



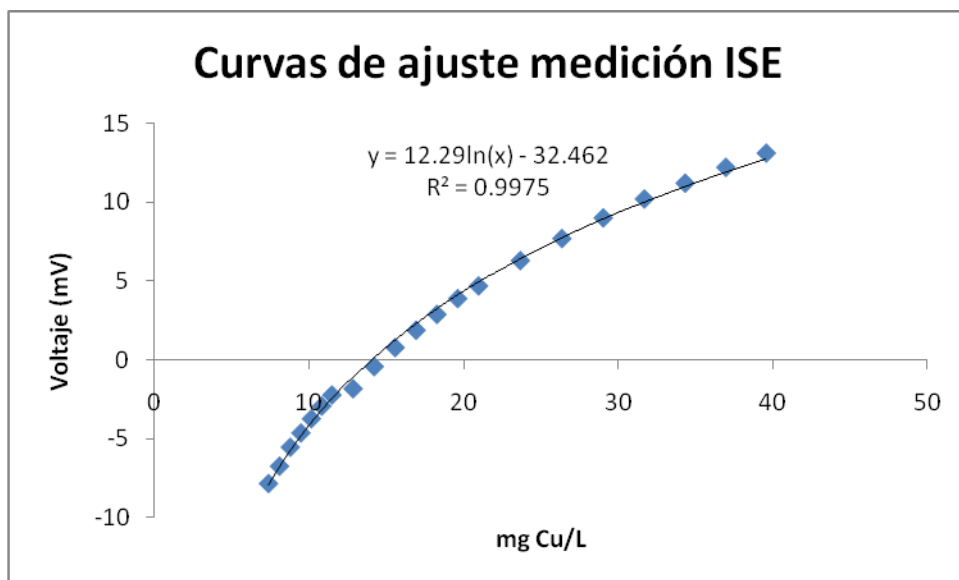


FIGURA 137: Curvas de ajuste ISE en sistema utilizado de blanco

ANEXO 8: CURVAS DE CALIBRACIÓN ASV

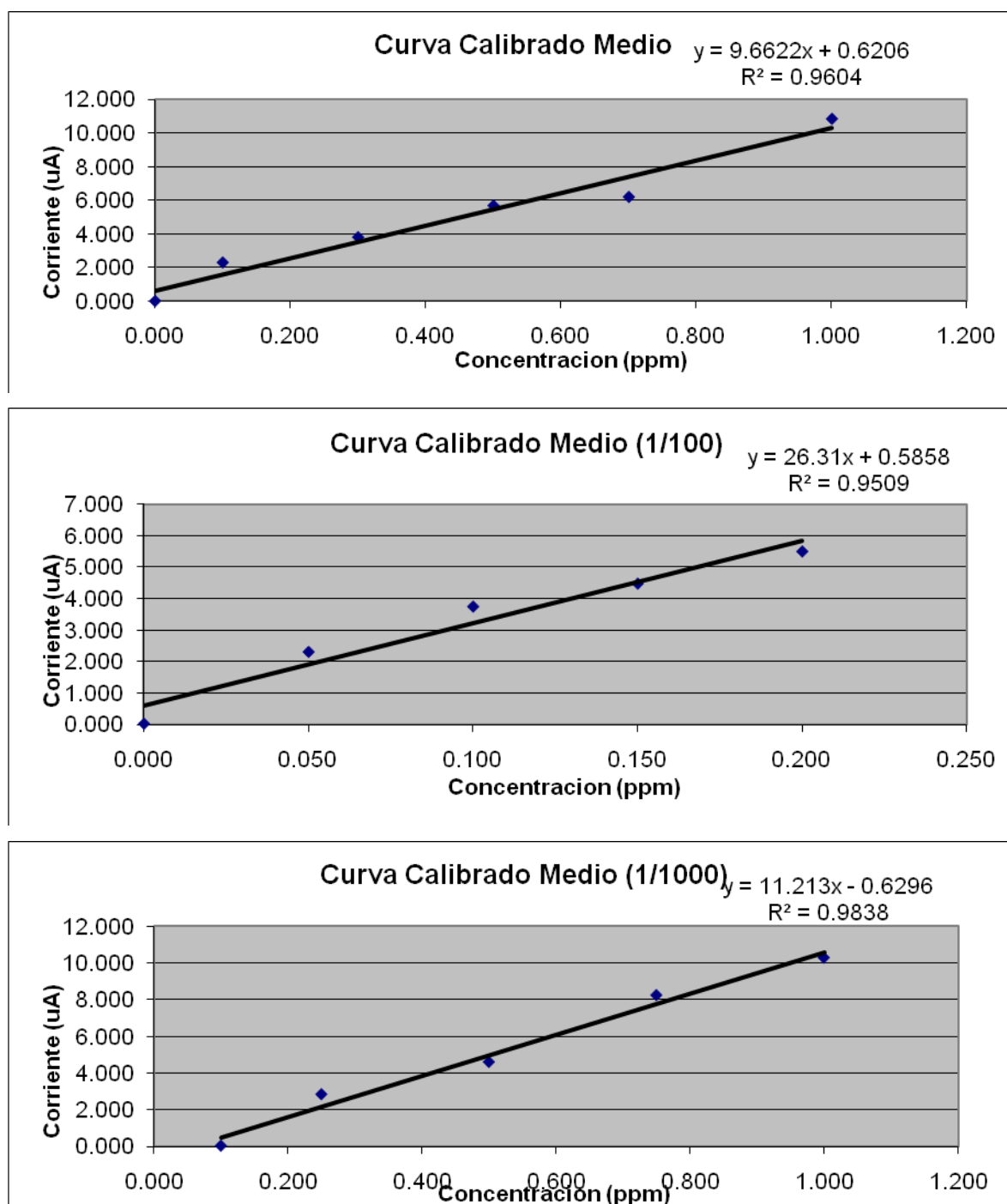


FIGURA 18: Curvas de Calibración ASV medio MSVP modificado

ANEXO 9: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ISE

Ventajas

1. Respuesta lineal: más de 4 a 6 órdenes de magnitud de amplitud.
2. No destruye, consume o modifica la muestra
3. No contamina
4. Corto período de respuesta: segundos o minutos. Usable a nivel industrial
5. No es afectado por color o turbidez.

Desventajas

1. Precisión raramente superior a un 1%.
2. Los electrodos pueden ser afectados por proteínas u otros solutos orgánicos
3. Interferencia con otros iones
4. Los electrodos son frágiles y tienen vida media limitada
5. Los electrodos responden a la actividad del ion sin complexar, por lo que los ligandos pueden pasar desapercibidos

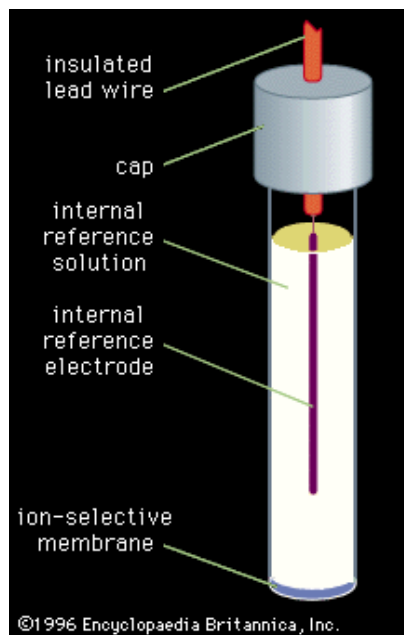


FIGURA 19: Esquema de electrodo ión selectivo

<http://www.britannica.com/EBchecked/media/3147/An-ion->

ANEXO 10: DETALLES EXPERIMENTALES PARA LA MEDICIÓN DE METALES UTILIZANDO ASV

Los análisis de ASV se realizaron mediante un potenciostato PalmSens (Palm Instruments, BV Houten, Holanda), conectado a un sensor de oro Florence (Florence sensors, Italia), consistente en un electrodo de trabajo de Au, un electrodo de referencia de Ag, y un electrodo auxiliar de carbono.

Las soluciones de ácido se prepararon volumétricamente, utilizando reactivos Merck grado ACS de H₂SO₄ (65% m/m) y HCl (37% m/m), ambos disueltos en agua milliQ. Las soluciones estándar de Cu(II) se prepararon gravimétricamente, diluyendo una solución stock Orion ionplus 0.1 M Cu(II) en una solución matriz de 0.1 M HCl. Tanto el pre-acondicionamiento del electrodo como los análisis de ASV se realizaron sumergiendo el electrodo en 2 mL de solución dispuestos en semi-micro cubetas desechables de polimetacrilato de metilo o PMMA (Bibby Sterilin Ltd.). Las mediciones se realizaron bajo atmósfera normal y no fueron agitadas durante ninguna etapa del análisis.

Pre-acondicionamiento del Electrodo

Con el fin de asegurar la sensibilidad y reproducibilidad de las mediciones, se recomienda pre-acondicionar químicamente el electrodo Au previo a las mediciones voltamétricas (Laschi *et al.*, 2006). Este pre-acondicionamiento se realizó aplicando 5 barridos de voltametría cíclica en una solución de 0.1 M H₂SO₄ + 0.01 M HCl, utilizando los parámetros descritos por Laschi *et al.*, (2006); rango potencial 0/+1.25 V, tasa de barrido 100 mV/s, potencial de paso 2 mV.

Determinación de Cu(II)

Inmediatamente finalizado el pre-acondicionamiento se procedió a la determinación de metales en solución mediante ASV. Para verificar la correcta respuesta del método inicialmente se decidió determinar inicialmente la concentración de Cu(II) en soluciones estándar. Estas soluciones fueron preparadas a partir de una solución stock de 0.1 M

Cu(II), diluida en una solución matriz de 0.1 M HCl. La determinación de Cu(II) se realizó con los parámetros de SWASV descritos a continuación (Laschi *et al.*, 2006): potencial de acondicionamiento (Econd) +0.5V por 30s, potencial de deposición (Edep) -0.5V por 120s, tiempo de equilibrio (teq) 30s, amplitud de la onda cuadrada (Eamp) 28mV, potencial de paso (Estep) 3 mV, frecuencia (f) 15 Hz.