

Tesis Doctoral

Estudios de corrosión microbiológica en una instalación nuclear

Forte Giacobone, Ana Florencia

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Forte Giacobone, Ana Florencia. (2012). Estudios de corrosión microbiológica en una instalación nuclear. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Forte Giacobone, Ana Florencia. "Estudios de corrosión microbiológica en una instalación nuclear". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudios de corrosión microbiológica en una instalación nuclear

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Ana Florencia Forte Giacobone

Director de Tesis: Dr. Ramón A. Pizarro

Director Asistente: Dr. Eduardo Cortón

Consejero de Estudios: Dra. Julia Pettinari

Lugar de trabajo: Departamento de Corrosión y Departamento de Radiobiología. Centro Atómico Constituyentes. Comisión Nacional de Energía Atómica.

Buenos Aires, 2012.

Estudios de corrosión microbiológica en una instalación nuclear

El objetivo de este trabajo ha sido analizar las poblaciones bacterianas y los mecanismos de corrosión microbiológica en un depósito de almacenamiento interino en húmedo de elementos combustibles gastados provenientes del reactor de investigación y producción de radioisótopos, también llamado repositorio.

Se realizaron análisis de la población bacteriana cultivable presente en el repositorio, identificándose 18 microorganismos diferentes, con presencia mayoritaria de *Bacillus cereus*, seguido del género *Pseudomonas*.

Se investigó el efecto de una de las cepas aisladas de *B. cereus*, *B. cereus* RE10 tanto en la aleación de aluminio 6061 empleada en la fabricación de elementos combustibles como en aluminio de alta pureza (Al 99,999%). Los experimentos fueron llevados a cabo en un medio altamente diluido, con la finalidad de reproducir las condiciones ambientales presentes en el repositorio. Se observó la presencia de picaduras no cristalográficas en forma de túnel en las muestras de AA6061 expuestas a *B. cereus* RE10 pero no así en Al 99,999%. Dichas picaduras se encontraron cubiertas de depósitos blancos, de tipo globular, compuestos por una mezcla de biofilm y óxido de aluminio. Se determinó la existencia de una correlación entre las zonas atacadas y la presencia de inclusiones de tipo Al-Fe-Si. Se postuló que dicha correlación podría estar relacionada con el pH generado en torno a las inclusiones, el cual favorecería el desarrollo del biofilm, contribuyendo a generar un fenómeno de corrosión bajo depósito.

Uno de los mayores problemas en el estudio de los biofilms, en particular en presencia de óxidos, es la dificultad de seguir su desarrollo por técnicas no invasivas, ya que habitualmente se emplean métodos basados en tratamientos tales como desecación, tinción con colorantes, etc. El uso de microorganismos

genéticamente modificados capaces de producir la proteína verde fluorescente (GFP) propuesto en este trabajo, ha permitido superar este obstáculo ya que hace posible el seguimiento de los biofilms sin ningún tipo de tratamiento, mediante microscopía de epifluorescencia. Por este motivo se decidió evaluar en forma comparativa la capacidad de formación de biofilms en diferentes condiciones y el efecto sobre AA6061 en medio diluido de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, de su derivada PAO1-GFP y de dos cepas de *Pseudomonas* aisladas del repositorio. El empleo de la cepa PAO1-GFP como modelo en estudios de corrosión microbiológica permitiría el estudio del fenómeno en forma rápida, fácil y de bajo costo. Los resultados muestran que, en todos los casos se observó formación de depósitos y ataque debajo de los mismos, con una morfología similar a la encontrada para el caso de *B. cereus* RE10. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas analizadas, lo que permitiría el uso de PAO1-GFP en futuros estudios de biocorrosión.

Este trabajo muestra una primera aproximación al estudio de la corrosión inducida microbiológicamente en repositorios nucleares en Argentina. Los resultados obtenidos permiten destacar la importancia de dicho fenómeno, aún en medios con una baja concentración de nutrientes, así como también enfatizar las ventajas del empleo de microorganismos portadores de genes reporteros en estudios de corrosión microbiológica. Como conclusión general puede decirse que la profundización de estudios de los mecanismos de corrosión inducida microbiológicamente podría contribuir a la prevención y control del proceso de corrosión ya que es o puede llegar a ser un fenómeno de importancia en lo referente a la vida útil, costo operativo y seguridad de este tipo de instalaciones nucleares.

Palabras clave: Biocorrosión, AA6061, aluminio, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, nuclear, repositorio

Studies of microbiologically induced corrosion at a nuclear facility

The aim of this Thesis was to analyze the bacterial population and the mechanisms of microbial corrosion in a spent nuclear fuel pool storage system from a research reactor.

Analyses of the cultivable bacterial population present in the pool were performed and 18 different microorganisms were identified, with a preponderance of *Bacillus cereus*, followed by the genus *Pseudomonas*. The effect of one of the isolates of *B. cereus*, *B. cereus* RE10 was investigated both in the aluminum alloy 6061 (used for the manufacture of fuel elements) and in high purity aluminum (Al 99.999%). To simulate the environmental conditions, the experiments were performed using a highly diluted medium. After the exposure to *B. cereus* RE10 non crystallographic, tunnel-like pitting was found on AA6061 samples but not on Al 99.999%. These pits were covered with white, lumpy, globular deposits, comprised of a mixture of biofilm and aluminum oxide. We found a correlation between the areas under attack and the presence of inclusions such as Al-Fe-Si. It was postulated that this correlation could be the result of the pH generated around these kinds of inclusions, which could favor the development and survival of the biofilm, contributing to under-deposit corrosion.

One of the main problems in the study of biofilms, particularly in the presence of oxides, is the difficulty of following their development by noninvasive techniques, since most commonly used methods are based on treatments such as drying, staining with dyes, etc. The use of genetically modified microorganisms capable of producing green fluorescent protein (GFP) proposed in this Thesis, has overcome this obstacle as it allows for monitoring of biofilms without any treatment by epifluorescence microscopy. For this reason we decided to evaluate and compare the ability to form biofilms under different conditions and the effect on AA6061 in a diluted medium of the strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, its derivative PAO1-GFP and two strains of

Pseudomonas isolated from the storage system. The use of the strain PAO1-GFP as a model for microbiologically induced corrosion experiments allows the study of the phenomenon in a fast, easy and low cost way. The results show that all tested *Pseudomonas* strains developed biofilms and initiated under deposit corrosion on AA6061 in a diluted medium, independently of the origin of the strain. The morphology of the attack was similar between the samples exposed to the different *Pseudomonas* strains and the samples exposed to *B. cereus* RE10.

This work shows a first approach to the study of microbiologically induced corrosion in nuclear storage facilities in Argentina. The results obtained allow us to highlight the importance of this phenomenon, even in media with a low concentration of nutrients, as well as emphasize the advantages of using microorganisms carrying reporter genes in studies of microbiologically induced corrosion. As a general conclusion, it is possible to say that the studying of microbiologically induced corrosion mechanisms could contribute to the prevention and control of a process that is or may become a phenomenon of importance in relation to the life, operating cost and safety of nuclear installations.

Key words: Biocorrosion, AA6061, aluminum, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, nuclear, repository

Agradecimientos

A Sergio, por hacerme muy feliz.

A mis padres y abuelos.

A mis directores de doctorado, Dr. Ramón A. Pizarro y Dr. Eduardo Cortón y a mi director de beca Lic. Arturo L. Burkart, por su guía y paciencia.

A mi ex codirectora de beca, Bqca. Patricia Silva Paulo por su condición de jefa, maestra y amiga.

Al Dr. Alberto Keitelmann por confiar en mi al seleccionarme para la beca de perfeccionamiento.

A la Gerencia de Materiales y a los Departamentos de Corrosión y Radiobiología por posibilitar (y financiar) el desarrollo de este trabajo. A la CNEA por su apoyo económico.

Al Grupo ECRI del Departamento de Combustibles de CNEA, por proveer el material para los ensayos.

Al personal del Área de Gestión de Residuos Radioactivos del CAE y al oficial de radioseguridad Sr. Aldo Perez, por su participación en la toma y procesamiento de muestras biológicas.

A la Dra. Cristina S. Costa por su ejemplo continuo (tanto profesional como humano) y su aporte en relación al género *Pseudomonas*.

Al Ing. Sebastián A. Rodríguez por su amistad y su aporte en relación a la corrosión del aluminio.

A los técnicos Claudio Lafont (Corrosión), Patricia Pereyra y Agustina Amar (Radiobiología) por sus múltiples aportes a este trabajo. A la Lic. Mariana Rosenbush y a los técnicos Adriana Domínguez y Pablo Reynoso por sus aportes en todo lo relacionado con las técnicas de SEM-EDX.

A Fátima y Damián, dos seres humanos maravillosos y los mejores compañeros de oficina que alguien puede desear.

A Mariano, un excelente compañero de laboratorio y amigo.

A mis compañeros de Radiobiología, (en particular Magui, Pato, Agus, Marina y Oscar) y de Materiales (en particular Patri, Carolina, Zaira, Abner, Lucio, Mauricio, Evelina, Nati, Pablo, Jorge y Maia) por tantos momentos compartidos.

A Mabel Giordano y Guillermina Cocoz por las charlas, los cafes y los tecitos.

A Caro, Maya y Marina.

A Cecilia, Rocío y Laura.

A mis docentes, porque de todos aprendí algo.

A las secretarias de la Gerencia de Materiales, Mónica Barrientos y Marta Longarela por su paciencia y tolerancia.

Al personal de apoyo (en especial Al Sr. Vicente Nuñez) y al personal de limpieza de la CNEA, sin los cuales este trabajo hubiese sido mucho más complicado (sino imposible).

Al Dr. Lucas Fumagalli y al equipo de cirugía del Sanatorio de la Trinidad Palermo.

A los que se fueron pero siguen estando.

A todos los que de alguna manera u otra participaron en este trabajo, ya sea directa o indirectamente.

“Felix, qui potuit rerum cognoscere causas”

Virgilio. Georgicas.

A Sergio, con amor

Los resultados que se presentan en este trabajo han sido parcialmente presentados en:

Publicaciones

Forte Giacobone A.F., Rodriguez S.A., Burkart A.L., Pizarro R.A. (2011) Microbiological induced corrosion of AA 6061 nuclear alloy in highly diluted media by *Bacillus cereus* RE 10 Int. Biodet. Biodeg, V.65 (8) pp. 1161-1168.

Forte Giacobone A.F., Pezzoni M., Rodríguez S.A., Burkart A.L., Cortón E., Pizarro R.A., Costa C.S. Preliminary analysis of a GFP tagged *Pseudomonas* strain as a model for biocorrosion testing in AA6061. *Manuscrito en preparación.*

Presentaciones a congresos

Empleo de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 GFP como modelo en biocorrosion. Forte Giacobone A.F., Rodríguez S.A., Pezzoni M., Amar, A., Burkart A.L., Pizarro R.A, Costa C.S. XXVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear. Buenos Aires. 14 al 18 de noviembre 2011.

Microbiology induced corrosion in AA6061 alloy by the genera *Pseudomonas*: PAO1-GFP strain as a model for biocorrosion testing. Forte Giacobone A.F., Pezzoni M., Rodríguez S.A., Burkart A.L., Cortón E., Pizarro R.A, Costa C.S. XXXV Symposium Scientific Basis for Nuclear Waste Management. Materials Research Society. Buenos Aires. 2 al 7 de octubre 2011.

Estudios de seguimiento de biofilms de bacterias con implicancia en corrosión microbiológica. Forte Giacobone A.F., Pezzoni M., Pizarro R.A., Burkart A.L., Costa C.S. XXVII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear. Buenos Aires. 22 al 26 de noviembre 2010.

Evaluación de la población bacteriana de un depósito de almacenamiento interino en húmedo de reactores de investigación. Forte Giacobone A.F, Pizarro R. XII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires. 24 al 27 de octubre 2010.

Evaluación de la población bacteriana de un depósito de almacenamiento interino en húmedo de reactores de investigación. Forte Giacobone A.F, Pizarro R. XII Congreso Argentino de Microbiología. II Taller interdisciplinario sobre biofilms. Instituto Leloir. Buenos Aires. 15 de octubre 2010.

Aislamiento y caracterización de una población bacteriana de un depósito de almacenamiento interino en húmedo de combustibles gastados de reactores de investigación: Estudios de biocorrosión. Forte Giacobone A.F., Lanzani L.A., Mosquera Rodríguez L., Oppezzo O.J, Venturini M., Pizarro R.A. XXXVI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear. Buenos Aires. 16 al 20 de noviembre 2009.

Biocorrosion studies in nuclear industry alloys induced by a strain of *Bacillus cereus* Forte Giacobone, A.F., Lanzani L.A., Oppezzo O.J, Pizarro R.A., XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. *Biocell*, 2008, vol. 32 (suppl.), p. 101, ISSN 0327-9545. Villa Carlos Paz, Córdoba, 8 al 11 de noviembre 2008.

Índice

Capítulo 1: Introducción, antecedentes y objetivos.	16
1.1. Introducción.....	16
1.1.1. Reactores de investigación y producción de radioisótopos en Argentina..	16
1.1.2. Elementos combustibles de placa MTR(“material test reactor”)	18
1.1.3. Residuos radiactivos.	19
1.1.4. El aluminio y sus aleaciones.....	20
1.1.4.1. Corrosión del aluminio y sus aleaciones	23
1.1.4.2. La serie 6xxx y la aleación de aluminio AA6061.....	25
1.1.5. Microorganismos	26
1.1.5.1. Concepto de especie en microbiología.....	26
1.1.5.2. Abundancia y diversidad microbiana.....	27
1.1.5.3. Biofilms.....	29
1.1.6. Corrosión inducida microbiológicamente (MIC).....	32
1.2. Antecedentes.....	34
1.2.1. Microorganismos y MIC en instalaciones de almacenamiento interino en húmedo de combustible nuclear gastado.	34
1.2.2. MIC en aluminio y sus aleaciones.....	37
1.3. Objetivos.....	38
1.4. Referencias.....	40
Capítulo 2: Técnicas empleadas.....	48
2.1. Introducción.....	48
2.2. Técnicas bacteriológicas convencionales para la caracterización de microorganismos	48
2.2.1. Tinción de Gram.....	49
2.2.2. Tinción de esporas	50
2.2.3. Sistemas de pruebas bioquímicas.....	51

2.3.	Secuenciación del gen 16s ARN.....	51
2.4.	Alineamiento múltiple de secuencias y confección de árboles filogenéticos....	52
2.5.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	53
2.6.	Espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDX).....	55
2.7.	Microscopía de fluorescencia.....	55
2.7.1	Microscopía de epifluorescencia.....	56
2.7.2.	Microscopía de fluorescencia confocal.....	57
2.8.	Referencias.....	58
Capítulo 3: Aislamiento y caracterización de la población microbiana cultivable de un depósito de almacenamiento interino en húmedo de elementos combustibles gastados de media actividad		
		59
3.1	Introducción.....	59
3.2.	Experimental.....	62
3.2.1	Reactivos	62
3.2.2.	Toma de muestras.....	62
3.2.3.	Procesamiento de las muestras	62
3.2.4.	Pruebas bioquímicas.....	63
3.2.5.	Secuenciación del gen 16s RNA.....	65
3.2.6.	Análisis filogenético.....	65
3.2.7.	Evaluación de formación de biofilms por el método del tubo de ensayo ..	66
3.3.	Resultados.....	66
3.3.1	Aislamientos y análisis de filogenia.....	66
3.4.	Discusión y conclusiones.....	71
3.5.	Referencias.....	74
Anexo 3.1.....		77
Anexo 3.2		79
Anexo 3.3		92
Capítulo 4: Caracterización de la cepa <i>Bacillus cereus</i> RE 10		
		93
4.1	Introducción.....	93
4.2.	Experimental.....	94
4.2.1	Reactivos	94
4.2.2.	Evaluación de crecimiento a diferentes pH y concentraciones de nutrientes	
	94	

4.2.3.	Evaluación de proteasa alcalina extracelular.....	95
4.2.4.	Evaluación de la capacidad de formación de biofilms.	96
4.3.	Resultados.....	96
4.3.1.	Evaluación de crecimiento a diferentes pH y concentraciones de nutrientes 96	
4.3.2.	Evaluación de la capacidad de formación de biofilm.....	98
4.3.3.	Evaluación de la producción de proteasa alcalina extracelular.....	99
4.4.	Discusión.....	100
4.5.	Referencias.....	101
Anexo 4.1.	102
Capítulo 5: Ensayos de inmersión de la cepa <i>Bacillus cereus</i> RE 10 sobre AA6061 y Al 99,999%		
		103
5.1.	Introducción.....	103
5.2.	Experimental.....	104
5.2.1.	Reactivos	104
5.2.2.	Caracterización y procesamiento de las muestras metálicas.	104
5.2.3.	Desarrollo de los ensayos de inmersión.....	105
5.2.4.	Estudio del biofilm mediante métodos disruptivos.	106
5.2.5.	Estudio del biofilm. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de dispersión por rayos X (EDAX).	106
5.2.6.	Estudio del biofilm. Microscopía confocal láser de fluorescencia (CLM).	106
5.2.7.	Análisis de la superficie por SEM - EDAX.....	107
5.2.8.	Evaluación de la profundidad de ataque.....	107
5.3.	Resultados.....	107
5.3.1.	Evaluación del efecto corrosivo de la cepa <i>B. cereus</i> RE 10 sobre AA6061 de uso nuclear y Al 99,999%.	107
5.3.2.	Evaluación del desarrollo de biofilms de <i>B. cereus</i> RE 10 sobre AA6061 ..	111
5.4.	Discusión.....	115
5.5.	Referencias.....	117
Capítulo 6: Evaluación del crecimiento y capacidad de formación de biofilm de cepas del género <i>Pseudomonas</i>		
		119
6.1.	Introducción.....	119
6.2.	Experimental.....	120

6.2.1. Reactivos	120
6.2.2. Cepas empleadas.....	120
6.2.3. PCR.....	120
6.2.4. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms en diferentes condiciones.	121
6.2.5. Evaluación de crecimiento en medio diluido.	121
6.3. Resultados.....	122
6.3.1. PCR con primers específicos e inespecíficos para <i>Pseudomonas</i>	122
6.3.2. Capacidad de formación de biofilms en diferentes condiciones.	123
6.3.3. Crecimiento en CN 1/30 a 25 °C durante 41 días.	123
6.4. Discusión.....	124
6.5. Referencias.....	126
Capítulo 7: Ensayos de inmersión de cupones de AA6061 utilizando cepas del género <i>Pseudomonas</i>	127
7.1. Introducción.....	127
7.2. Experimental.....	128
7.2.1. Reactivos	128
7.2.2. Cepas empleadas.....	129
7.2.3. Caracterización y procesamiento de las muestras metálicas.	129
7.2.4. Desarrollo de los ensayos de inmersión.....	129
7.2.5. Estudio del biofilm mediante métodos disruptivos.	130
7.2.6. Estudio del biofilm. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de dispersión por rayos X (EDAX).	130
7.2.7. Estudio del biofilm. Microscopía de epifluorescencia	130
7.2.8. Análisis de la superficie por microscopía metalográfica.....	131
7.2.9. Evaluación de la profundidad de ataque.....	131
7.3. Resultados.....	132
7.3.1. Evaluación del crecimiento bacteriano en medio altamente diluido.....	132
7.3.2. Evaluación de corrosión y biofilms en las probetas de AA6061 mediante SEM y microscopía metalográfica	133
7.3.3. Evaluación de biofilms en las probetas de AA6061 mediante EM.....	137
7.4. Discusión.....	139
7.5. Referencias.....	140

Capítulo 8: Conclusiones.....	142
8.1 Conclusiones generales.....	142
8.2 Trabajos a futuro	143

Capítulo 1: Introducción, antecedentes y objetivos.

1.1. Introducción

1.1.1. Reactores de investigación y producción de radioisótopos en Argentina

La historia de los reactores de investigación en Argentina tiene más de medio siglo. En enero de 1958 entró en fase crítica el primer reactor nuclear del país, el RA-1, construido por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) sobre la base del reactor norteamericano Argonauta. Este trabajo pionero, que incluyó la fabricación de los diversos componentes, su instalación, operación y el mantenimiento posterior, permitió adquirir un conocimiento detallado del comportamiento del reactor posibilitando asumir el desafío de diseñar una serie de modificaciones y adaptaciones a nuevas necesidades, en particular la producción de radioisótopos de vida corta, cuya importación se deseaba sustituir. En 1959 se construyó un prototipo con el fin de estudiar distintos modelos de geometrías y configuraciones nucleares al que se denominó RA-0, actualmente en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Como resultado de la experiencia adquirida, en el año 1967 se inauguró el reactor RA-3, de diseño totalmente nacional, con el doble propósito de investigación y producción de radioisótopos de uso medicinal, agropecuario e industrial, siendo los más significativos: ^{99}Mo , ^{131}I , moléculas marcadas, ^{32}P y ^{51}Cr . Las instalaciones actuales, diseñadas y operadas por personal propio, permitieron satisfacer la demanda nacional de ^{99}Mo , y generar un saldo exportable capaz de cubrir las necesidades regionales de Latinoamérica. En el año 1982 fue inaugurado el reactor nuclear RA-6, ubicado en el Centro Atómico

Bariloche (CAB) y destinado a desarrollar tareas de enseñanza, entrenamiento, investigación y desarrollo en el campo de la ingeniería nuclear. El Reactor Argentino RA-8 que tuvo como misión exclusiva probar el núcleo del futuro reactor denominado Central Argentina de Elementos Modulares (CAREM), funcionó entre 1997 y 2001. Por otra parte, la Argentina ha exportado reactores a Egipto, Australia, Perú y Argelia (Mattei, 2011; caebis.cnea.gov.ar). En la tabla 1.1 se resumen las características de los reactores de investigación presentes en Argentina

	REACTOR					
	RA-0	RA-1	RA-3	RA4	RA-6	RA-8
Ubicación	Ciudad Universitaria Córdoba	Centro Atómico Constituyentes	Centro Atómico Ezeiza	Universidad Nacional de Rosario	Centro Atómico Bariloche	Complejo Pilcaniyeu
Operador	Universidad Nacional de Córdoba	CNEA	CNEA	Facultad de Ingeniería UNR	CNEA	CNEA
Función	Investigación y docencia	Investigación	Producción de radioisótopos e investigación	Investigación y docencia	Investigación y docencia	Investigación
Potencia	1W	40 KW	10 MW	1W	0,5 MW	10 W
Combustible	Uranio enriquecido al 20% en U ²³⁵	Uranio enriquecido al 20% en U ²³⁵	Uranio enriquecido al 20% en U ²³⁵	Uranio enriquecido al 20% en U ²³⁵	Uranio enriquecido al 90% en U ²³⁵	Uranio enriquecido al 3% en U ²³⁵
Tipo de elemento combustible	Barra Cilíndrica	Barra Cilíndrica	Placa MTR	Discos	Placa MTR	Barra Cilíndrica
Operación	1970-1974 , 1987	1958- actual	1967-actual	1971-actual	1982-actual	A reiniciarse

Tabla 1.1 Reactores de investigación en Argentina. Extraída de caebis.cnea.gov.ar

1.1.2. Elementos combustibles de placa MTR (“material test reactor”)

Existen diferentes tipos de elementos combustibles empleados en reactores de investigación y/ o producción de radioisótopos, dependiendo de las características del reactor. En este trabajo nos referiremos a los elementos combustibles de tipo placa MTR, empleados en los reactores RA-3 y RA-6. Las características de estos elementos se detallan en la Figura 1.1. La fabricación de este tipo de combustibles se realiza de acuerdo a la siguiente técnica: se parte de dos planchuelas exteriores de 5 mm de espesor de AA6061 y un marco interno de 8 mm de espesor, conteniendo una mezcla de polvo de U_3O_8 (enriquecido al 20%) y Al. Previo al armado del ensamble placa-marco-placa se reduce el espesor de las placas externas hasta 3,5 mm mediante una laminación a 500°C. El ensamble de 15 mm de espesor es sometido a 8 pasos de laminación en caliente a 500 °C con calentamientos intermedios hasta alcanzar un espesor de 1,6 mm. Luego se trata térmicamente 1 hora a 500 °C con enfriamiento en horno y finalmente se ajusta el espesor final hasta 1,5mm mediante un último paso de laminación en frío. En estas condiciones, cada una de las placas externas y el marco interno presentan un espesor del orden de 0,5 mm.

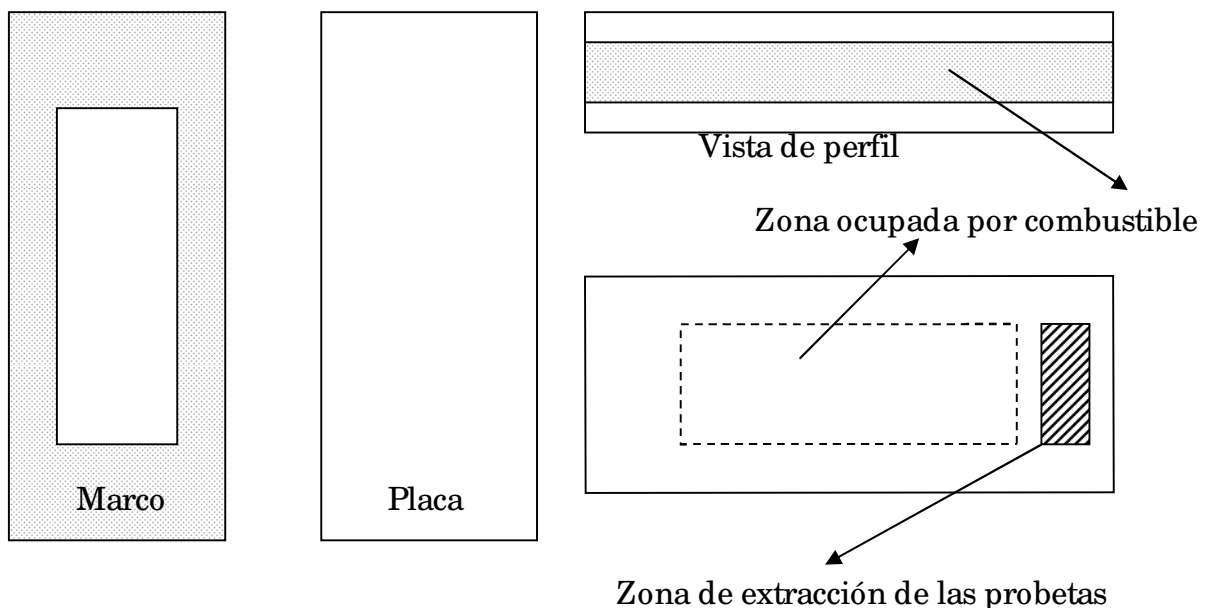


Figura 1.1: Esquema del armado del ensamble de las placas combustibles.

1.1.3. Residuos radiactivos.

En el artículo 3 de la Ley Nacional 25.018/ 98 (“Régimen de residuos radioactivos”) se denomina “residuo radiactivo” a todo material radiactivo, combinado o no con material no radiactivo, que haya sido utilizado en procesos productivos o aplicaciones, para los cuales no se prevean usos inmediatos posteriores en la misma instalación, y que, por sus características radiológicas no puedan ser dispersados en el ambiente de acuerdo con los límites establecidos por la Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN).

Según la misma ley, la Gestión de Residuos Radiactivos, entendida como “el conjunto de actividades necesarias para aislar los residuos radiactivos de la biosfera derivados exclusivamente de la actividad nuclear efectuada en el territorio de la Nación Argentina, el tiempo necesario para que su radiactividad haya decaído a un nivel tal, que su eventual reingreso a la misma no implique riesgos para el hombre y su ambiente” (artículo 2, Ley Nacional 25.018/ 98), es una tarea y responsabilidad que corresponde a la CNEA (artículo 4, Ley Nacional 25.018/ 98).

El alcance de esta gestión radica en la interposición entre el residuo y el ecosistema, de un conjunto de barreras naturales e ingenieriles, optimizando los costos y dosis involucrados. Este conjunto de barreras múltiples y redundantes tiene por objetivo impedir o retardar la llegada de los radionucleidos al hombre y al ambiente hasta que los mismos hayan perdido su peligrosidad. Las barreras y los procedimientos a emplear dependen del tipo de residuo (Tabla 1.2).

En particular, los elementos combustibles gastados, una vez descargados del reactor (ya sea de potencia o de investigación), se introducen en piletas de enfriamiento donde son almacenados en forma interina bajo agua destilada con el fin de permitir la disipación del calor residual que generan. Luego, dependiendo de la instalación, los elementos combustibles continúan siendo almacenados en húmedo o se los traslada a silos para almacenamiento en seco, en ambos casos de forma temporal. Por último, una vez transcurrido el período

de almacenamiento temporal, el combustible gastado será sometido a un encapsulamiento, constituido por materiales especiales con características de estabilidad frente a la corrosión, capacidad de transmisión de calor y compatible con las diferentes barreras ingenieriles, y almacenado en un repositorio nuclear profundo que se construirá a tal fin.

Nivel	Aislamiento	Disposición	Ejemplos
Bajo	50 años	Sistema superficial con mejoras de ingeniería	Ropa, papel, plástico, filtros, líquidos, etc.
Medio	300 años	Repositorio monolítico cercano a la superficie	Filtros, resinas de intercambio iónico, aplicaciones medicinales
Alto	Más de 300 años	Repositorio geológico profundo	Elementos combustibles gastados

Tabla 1.2: Clasificación y disposición de residuos radiactivos.

1.1.4. El aluminio y sus aleaciones

El aluminio es el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre (aproximadamente el 8% m/ m) encontrándose en la naturaleza en una diversidad de compuestos, mayormente oxidos y silicatos. Su obtención comercial se realiza mayormente explotando depósitos de bauxita, mineral compuesto principalmente por alúmina (Al_2O_3). La producción de aluminio metálico se basa en la reducción electrolítica de la alúmina mediante los procesos descubiertos de manera independiente en 1886 por Charles Hall y Paul Heroult. Las mayores impurezas en el aluminio fundido son el hierro y el silicio (presentes en la bauxita), encontrándose también cinc, galio, titanio y vanadio como contaminantes menores (Rooy, 1997).

Una de las principales características del aluminio es su versatilidad, existiendo más de trescientas composiciones diferentes de aleaciones basadas en este metal. Este material posee baja densidad ($2,7 \text{ g/cm}^3$), buena conductividad eléctrica y térmica, es no ferromagnético, no pirofórico, poco tóxico y algunas aleaciones se caracterizan por su elevada resistencia mecánica. Posee buena formabilidad y la ausencia de transición dúctil-frágil lo hace apto para aplicaciones criogénicas. Por otra parte, la presencia de una capa de óxido protectora le otorga una elevada resistencia a la corrosión. Estas propiedades llevan a que el aluminio y sus aleaciones se encuentren entre los materiales de mayor uso industrial en la actualidad. Las aplicaciones de las aleaciones de aluminio incluyen a industrias de tipo automotriz, aeronáutica, alimenticia, eléctrica (fabricación de cables), electrónica, de la construcción y nuclear, entre otras (Rooy, 1997).

Con el fin de mejorar tanto la dureza como la resistencia mecánica del aluminio suelen emplearse diferentes elementos como aleantes, siendo los más usuales Cu, Mg, Mn, Si y Zn. Habitualmente esta adición se encuentra asociada al uso posterior de tratamientos térmicos y/ o trabajado en frío. Por debajo de su límite de solubilidad, estos elementos se encuentran en solución sólida con la matriz mientras que por encima del mismo, el aleante aparece formando una “segunda fase”, pudiendo ser ésta pura (es decir, conformada únicamente por el aleante) o un compuesto intermetálico. La resistencia a la corrosión y las propiedades electroquímicas de las aleaciones dependen entre otros factores de los aleantes empleados, de las segundas fases formadas, de la naturaleza de la matriz, de las impurezas presentes y de las relaciones entre estos factores. (Bray, 1997). Las aleaciones de aluminio se dividen en dos grandes grupos en función de los diferentes procesos de conformado que pueden sufrir: aleaciones para productos trabajados (es decir, aquellos productos resultado de procesos de deformación mecánica tales como forja, laminado, extrudido y trefilado) y aleaciones para productos colados (fabricados a partir de la introducción del metal fundido en moldes). Las aleaciones para productos forjados a su vez pueden dividirse en endurecibles por precipitación y aquellas que solo pueden

ser endurecidas por solución sólida y trabajado en frío. Estas últimas presentan una mayor resistencia a la corrosión debido a que no poseen una gran cantidad de precipitados pero por ese mismo motivo su resistencia mecánica es menor que para las primeras. En la Tabla 1.3 se detallan los diferentes grupos de aleaciones para productos trabajados con sus principales características.

Aleaciones para productos trabajados		
Numeración	Principal aleante	Características principales
1xxx	No aleadas.	Alta resistencia a la corrosión, elevada conductividad eléctrica y térmica, alta trabajabilidad, pobres propiedades mecánicas. Endurecible solo por trabajado en frío.
2xxx	Cu (Mg*)	Muy buenas propiedades mecánicas, en especial luego de tratamientos térmicos. Endurecible por precipitación. Baja resistencia a la corrosión (en especial intergranular).
3xxx	Mn	Alta trabajabilidad, moderada resistencia mecánica, algunas aleaciones no tratables térmicamente.
4xxx	Si	Bajo punto de fusión, baja formabilidad, bajo coeficiente de expansión*, no tratables térmicamente.
5xxx	Mg	Buena resistencia a la corrosión en ambientes marinos, soldabilidad. Endurecible por trabajado en frío.
6xxx	Mg y Si	Buena soldabilidad, maquinabilidad, resistencia a la corrosión. Resistencia mecánica media. Tratables térmicamente.
7xxx	Zn (Cu,Mg,Cr,Zr*)	Tratables térmicamente. Resistencia mecánica media a alta.
8xxx	(Sn,Li,Ca,Zn,Fe,Mn)*	Dependientes de la composición. Este grupo incluye aleaciones de características muy variadas.

Tabla 1.3: Clasificación de aleaciones de aluminio para productos trabajados.

(*) Algunas aleaciones.

1.1.4.1. Corrosión del aluminio y sus aleaciones

El aluminio es un metal altamente reactivo en presencia de oxígeno, a pesar de lo cual posee una elevada resistencia a la corrosión. Este hecho se explica por la existencia de una capa de óxido altamente adherida a la superficie, que se regenera muy rápidamente y que actúa como barrera protectora. En condiciones atmosféricas normales dicho óxido está compuesto por dos estratos, uno interior (compacto y amorfo) que depende de la temperatura del medio, cubierto por una capa de óxido hidratado más permeable y dependiente del conjunto de las condiciones ambientales (Hollingsworth y Hunsicker, 1987). En la práctica, el comportamiento ante la corrosión del aluminio está determinado principalmente por el comportamiento -en el medio considerado- de la capa de óxido que lo recubre. Factores como el grado de porosidad y de hidratación de dicho óxido, así como cambios en los mismos, resultan de particular importancia al evaluar el comportamiento ante la corrosión (Deltombe, Vanleughenaghe y Pourbaix, 1974). A pHs ácidos y básicos el óxido resulta inestable desapareciendo la capa pasivante. Los potenciales de electrodo dependen de la solución sólida (es decir, de la matriz de aluminio con los aleantes disueltos en ella) tal como se observa en la Tabla 1.5, así como también de la temperatura. En el rango pasivo y en presencia de oxígeno, la corrosión del aluminio puede existir en forma de picaduras distribuidas al azar al alcanzarse el potencial de picado (E_p). La existencia de iones haluro, en especial Cl^- resulta la causa más habitual de este fenómeno.

Por otra parte, las diferentes fases de la aleación presentan potenciales propios (Tabla 1.6) y pueden generar en ciertos medios caminos preferenciales para que ocurra la corrosión, generalmente en forma localizada. Las segundas fases intermetálicas de carácter anódico respecto a la matriz son sitios favorables a nuclear picaduras, mientras que las partículas de carácter catódico favorecen el ataque alcalino en la matriz que rodea al intermetálico (Szkłarska-Smialowska, 1999; Aballe et al. 2001). Los tratamientos térmicos resultan

entonces de fundamental importancia en cuanto a la resistencia a la corrosión de una aleación ya que determinan el tamaño y distribución de los precipitados.

Aleación de Al	Potencial (V) vs. ECS
1060	-0,84
5052	-0,85
7072	-0,96
2024	(-0,69; -0,82)*
6061	(-0,80; -0,83)*
7075	(-0,83; -0,84)*

Tabla 1.5: Potenciales de corrosión vs. electrodo de referencia de calomel saturado (ECS), de algunas aleaciones de aluminio. Estos valores fueron obtenidos en las condiciones especificadas por la norma ASTM 69 (extraído de Hollingsworth y Hunsicker, 1987). Estas condiciones corresponden a 58,5 g NaCl y 9 ml de solución de H₂O₂ 30% por litro de agua, en medio aireado. (*) El potencial depende del tratamiento térmico al que fue sometida la aleación.

El aluminio y sus aleaciones se comportan como ánodos en relación a la mayoría de los metales de uso habitual, siendo susceptibles de sufrir corrosión galvánica. Este fenómeno es de particular importancia cuando el aluminio se encuentra polarizado al potencial de picado (por ejemplo en soluciones aireadas conteniendo haluros), posibilitando su uso como ánodo de sacrificio.

Otros tipos de corrosión a considerar en las aleaciones de aluminio son: corrosión intergranular, corrosión bajo tensión (ambos modos se dan mayormente en las series 2xxx, 5xxx y 7xxx), corrosión por exfoliación, corrosión fatiga, corrosión erosión y corrosión filiforme (en aluminio con un recubrimiento orgánico).

Fase	Potencial (V) vs. ECS
Si	-0,26
Al ₃ Ni	-0,52
Al ₃ Fe	-0,56
Al ₂ Cu	-0,73
Al ₆ Mn	-0,85
Al ₈ Mg ₆	-1,24

Tabla 1.6: Potenciales de corrosión vs. ECS de algunos constituyentes habituales de segundas fases en aleaciones de aluminio, obtenidos en las condiciones especificadas por la norma ASTM 69 (extraído de Hollingsworth y Hunsicker, 1987)

1.1.4.2. La serie 6xxx y la aleación de aluminio AA6061

Las aleaciones de la serie 6xxx presentan como principales aleantes al Mg y al Si en una proporción aproximada de 1,73:1, requerida para la formación de Mg₂Si, que actúa como fase endurecedora. Estas aleaciones son susceptibles de aumentar su resistencia mediante tratamientos térmicos. Poseen buena formabilidad, soldabilidad, maquinabilidad y resistencia a la corrosión y son las que mejor combinan una buena resistencia mecánica con una alta resistencia a la corrosión, lo que las convierte en las aleaciones de aluminio de mayor uso en la actualidad, siendo ampliamente utilizadas en aplicaciones arquitectónicas, estructuras soldadas, equipamiento de transporte, industria nuclear, entre otras.

En cuanto al comportamiento ante la corrosión, la fase Mg_2Si es un compuesto iónico altamente reactivo en soluciones ácidas, sin embargo posee un efecto despreciable en el potencial de corrosión de la aleación AA6061. La presencia de Si por encima del nivel requerido para la formación de Mg_2Si al igual que un elevado nivel de impurezas catódicas incrementa la susceptibilidad a la corrosión intergranular. Por otra parte, la resistencia a la corrosión se ve disminuida por el agregado de Cu (Hollingsworth y Hunsicker, 1987).

La AA6061 en particular se emplea en la fabricación de los elementos combustibles de tipo MTR, tal como se detalló en la sección 1.1.2. Esta aleación presenta la siguiente composición expresada en % peso: Mg: 0,95%-1,10%; Si: 0,55%-0,65%; Fe: 0,15%-0,45%; Cu: 0,2%-0,4%; Cr: 0,10%-0,2%; Mn: 0,1 %; Zn: 0,25%; Ti: 0,03%-0,07%; Al: hasta completar 100% (ASTM standard B 209-00). El comportamiento electroquímico de las principales fases presentes en la aleación AA 6061, tales como Mg_2Si , α y β Al-Fe-Si y Al_3Fe indica que la fase Mg_2Si sufre disolución anódica del magnesio, aún en medios de alta pureza (Rodríguez et al. 2005) mientras que las fases ricas en hierro se comportan en forma catódica, tal como es esperable al considerar los potenciales de corrosión de las mismas. La presencia de estas fases aumentan la susceptibilidad a la corrosión localizada de la aleación AA6061 tal como sucede en el resto de las aleaciones de aluminio, a pesar de lo cual este material presenta una alta resistencia a la corrosión cuando se compara con otras series.

1.1.5. Microorganismos

1.1.5.1. Concepto de especie en microbiología

El concepto de especie referido a procariotas ha sido y es sujeto de múltiples polémicas. Los sistemas de clasificación de estos organismos han evolucionado a partir de aquellos basados únicamente en características

fenotípicas (tales como forma, tamaño, respuesta a la tinción de Gram, capacidad de metabolizar determinados compuestos, etc.) e incluyendo en forma creciente características correspondientes al genotipo (Vandamme et al. 1996; Stackebrandt et al. 2002; Doolittle y Papke, 2006; Konstantinidis et al. 2006). En la actualidad se suele considerar como una definición operativa de especie bacteriana aquella propuesta por Stackenbrandt y Goebel en 1994, que requiere un mínimo de 3% de disimilaridad en las secuencias del gen del 16s rRNA entre organismos de diferentes especies. En función de esto, muchas veces se emplea el término de “unidad taxonómica operacional” (UTO) en lugar de especie. Si bien la definición expuesta es de amplia utilidad, teniendo en cuenta que se calcula que solo el 1% de los microorganismos es susceptible de ser cultivado (Pace, 1997), en un trabajo posterior Stackenbrandt y colaboradores (Stackenbrandt et al. 2002) remarcan que “Las especies deben ser identificables por los métodos disponibles (genotípicos, fenotípicos). Deben realizarse esfuerzos para establecer métodos estandarizados que permitan informar datos fenotípicos y genotípicos” y que “El fenotipo (junto con el genotipo) continúan jugando un rol saliente en la decisión acerca de los puntos de corte de los datos genómicos para la delineación de especie”, lo que manifiesta la importancia de los datos fenotípicos en la identificación de una especie bacteriana en los casos en que puede contarse con ellos. Estas definiciones distan mucho de ser absolutas y se encuentran en proceso continuo de revisión en función de la aparición y estandarización de nuevas técnicas para el análisis microbiano.

1.1.5.2. Abundancia y diversidad microbiana

Los procariotas son los seres vivos más numerosos en la actualidad, y posiblemente también en las distintas eras geológicas desde el comienzo de la vida en la Tierra. Se estima que la biosfera contiene entre 10^{30} y 10^{31} genomas

procariotas, lo que es al menos 2-3 órdenes de magnitud más que el total de las células animales y vegetales sumadas (Whitman et al. 1998). En cuanto a las estimaciones del número de UTO por gramo de suelo, estas varían entre 10^8 (Schloss y Handelsman, 2006) y 10^7 (Gans et al. 2005). Para el crecimiento de los microorganismos son requisitos la existencia de agua, una fuente de carbono (orgánica o inorgánica), una fuente de energía, un aceptor de electrones y un dador de electrones (Tabla 1.7).

Los microorganismos regulan la composición de la atmósfera, influyen en el clima, reciclan nutrientes, descomponen compuestos tóxicos, fijan nitrógeno, nitrifican, reducen nitratos y participan de múltiples formas en los ciclos biogeoquímicos del azufre, hierro y manganeso. Sin ellos la vida en la tierra tal como la conocemos no sería posible.

Requisito	Fuente	Tipo de metabolismo
Energía	Luz Sustancias químicas	Fotótrofo Quimiótrofo
Carbono	CO ₂ Compuestos orgánicos	Autótrofo Heterótrofo
Dador de electrones	Compuestos inorgánicos Compuestos orgánicos	Litótrofo Quimiótrofo
Aceptor de electrones	O ₂ Otros (NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , S, SO ₄ ²⁻ , CO ₂ , Fe ³⁺ , MnO ₂ , etc.)	Aeróbico Anaeróbico

Tabla 1.7: Requisitos para el crecimiento de microorganismos.

La presencia de microambientes, así como la enorme variedad de metabolismos existentes en procariotas que permiten el crecimiento en un amplio rango de condiciones (Tabla 1.8), llevan al establecimiento de comunidades con un alto grado de complejidad. La diversidad de las comunidades microbianas y sus relaciones ecológicas y metabólicas han sido analizadas en un enorme rango de ambientes naturales, como ser: suelos (Fieder et al. 2007; Schloss y Haldelmann, 2006; Roesch et al. 2007), aire (Brodie et al. 2007), aguas continentales (Kenzaka et al. 2001; De Souza y Silva-Souza,

2001) mares y océanos (Alonso-Saez y Gasol, 2007; Dang et al. 2008) y formando parte de la microbiota de plantas y animales (Fang et al. 2005; Shanks et al. 2011). Se han encontrado comunidades de microorganismos en ambientes extremos tales como fosas submarinas (Jolivet et al. 2002; Sogin et al. 2006), ambientes extremos en el Ártico y Antártico (Brinkmeyer et al. 2003; Stoeck et al. 2007), suelos contaminados con uranio (Barns et al. 2007; Mondani et al. 2011), ambientes hipersalinos (Oren, 2002), y repositorios nucleares (Sarró et al. 2005), entre otros.

Condición	Rango
T, °C	-20 °C a 120 °C
pH	0 a 13
Salinidad	Agua ultrapura a agua saturada con sales
Potencial rédox	Rango de estabilidad del agua
Presión	Hasta 1000 atm
Radiación gamma	Hasta 30000 Gy Esporas: 10000 Gy

Tabla 1.8: Rango de condiciones en el cual es posible la vida microbiana.

1.1.5.3. Biofilms

En sistemas acuosos, los microorganismos pueden encontrarse en forma libre (planctónica) o adheridos a superficies (sésil). A pesar de que los agregados sésiles de microorganismos fueron descritos por primera vez en 1684 por A. van Leewenhoek, hasta mediados del siglo XX prácticamente todos los estudios realizados en microbiología se centraron en el comportamiento de la forma planctónica. Estudios recientes muestran sin embargo que más del 90% de los microorganismos se encuentran adheridos a superficies, formando parte de biofilms y presentando propiedades, comportamientos y estrategias de supervivencia muy diferentes a las que se observan en la forma planctónica. Un

biofilm es una estructura compleja, altamente heterogénea, tridimensional, formada por microorganismos (pudiendo incluir macroorganismos) que se encuentran inmersos en una matriz polimérica, todo ello adherido a una superficie. Si bien un biofilm puede estar formado por una única especie bacteriana, lo habitual en la naturaleza es encontrar comunidades de organismos (con diferente grado de complejidad), incluyendo procariotas, hongos, algas, protistas, etc. La matriz polimérica está compuesta por sustancias inorgánicas (principalmente agua, sales, productos de degradación de la superficie, etc.) y compuestos orgánicos producidos por los organismos, (tales como exopolisacáridos (EPS), proteínas, ADN y lípidos). (Hall-Stoodley et al. 2004; Cunningham et al. 2011).

Según el modelo de generación de biofilms más aceptado hasta el momento, la formación de un biofilm (Figura 1.2) se produce en diferentes etapas. Primero las células toman contacto con una superficie y se adhieren a ella primero reversible y luego irreversiblemente (adhesión). En una segunda instancia, los microorganismos producen la matriz y se reproducen (crecimiento), por último parte del biofilm se desprende y coloniza nuevas superficies (desprendimiento). Los biofilms resultan así estructuras de resistencia, protegiendo a las células de la influencia de condiciones adversas así como también de tóxicos presentes en el medio (tales como biocidas, antibióticos, metales pesados, etc.) y concentrando nutrientes. El espesor de los biofilms puede variar desde unos pocos micrones hasta varios centímetros.

Los sitios para la formación de biofilms incluyen todo tipo de superficies tanto naturales como artificiales: metales, plásticos, minerales, tejidos de plantas y animales, etc. La combinación de humedad, nutrientes, y una superficie suele bastar para encontrar un biofilm (Cunningham et al. 2011).

Pasar de una forma planctónica a formar parte de un biofilm implica para un célula una gran cantidad de cambios en su patrón de expresión que se reflejan en modificaciones de su metabolismo. El comportamiento de dos

células pertenecientes al mismo cultivo, una formando parte de un biofilm y otra de vida libre es muy diferente y, por lo tanto, la población planctónica y la sésil no resultan necesariamente correlacionables. Esto se debe a que las condiciones dentro de un biofilm y en la solución distan mucho de ser semejantes, pudiendo existir una diferencia en varias unidades de pH entre uno y otro sistema, así como también gradientes de concentración muy marcados que pueden llevar a la generación de zonas anaeróbicas en un biofilm crecido en un medio aerado, entre otros ejemplos.

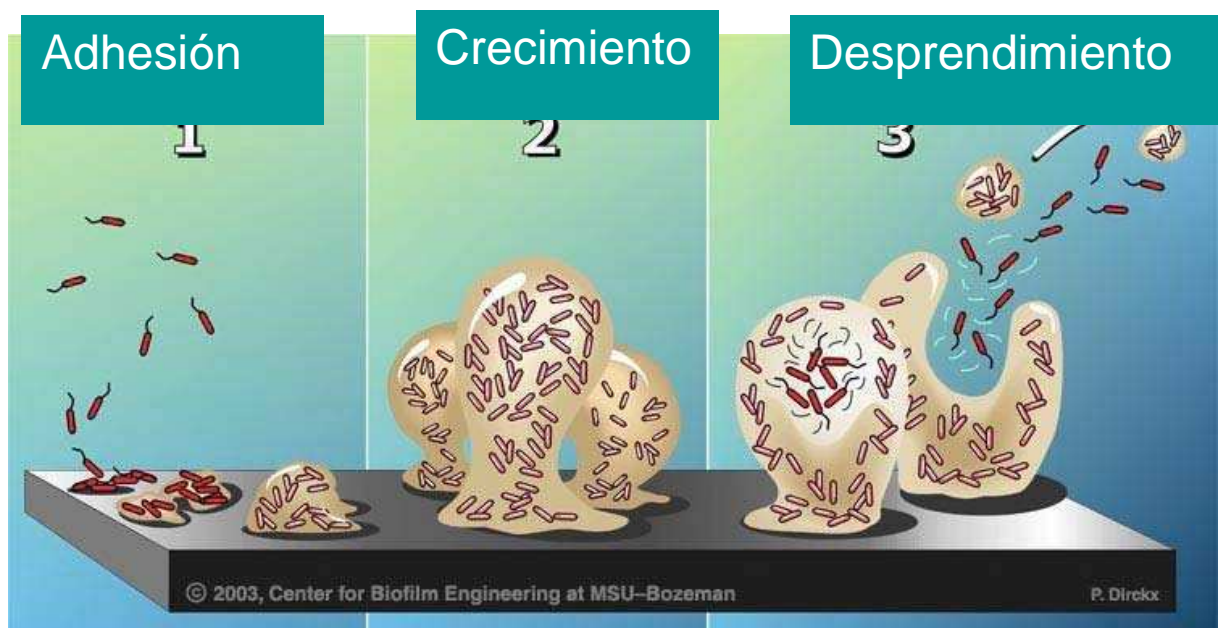


Figura 1.2: Etapas de la formación de un biofilm (Center for Biofilm Engineering, MSU-Bozeman)

Distintos factores tanto independientes como dependientes de los microorganismos influyen en la formación de un biofilm y su estructura. Entre los primeros cabe destacar la composición de la superficie, si bien no hay consenso en cuanto a la influencia de la rugosidad (Korber et al. 1997; Sreekumaria et al. 2001; Medilanski et al. 2002). Otro factor de importancia es la disponibilidad de nutrientes, de oxígeno y de agua. Estudios recientes indican diferencias significativas en el tipo de biofilms formados en sistemas

sumergidos con relación a aquellos formados en interfases (Kozá et al. 2009; Wijman et al. 2007, Ude et al. 2006). En cuanto a aquellos factores dependientes de los microorganismos, se cuentan: el tipo y número de microorganismos presentes, la capacidad de secretar EPS al medio, la capacidad de participar de mecanismos de respuesta concertada, entre otros. Las implicancias económicas de los biofilms son múltiples. Desde un punto de vista claramente antropocéntrico, éstas pueden dividirse en “benéficas” y “perjudiciales”. Entre las “benéficas” se encuentran el mantenimiento de cadenas tróficas (Lefrancois et al. 2011) y ciclos biogeoquímicos (Prosser, 2007), degradación y concentración de sustancias tóxicas (Singh et al. 2006), producción de compuestos de interés industrial (Rosche et al. 2009) y generación de electricidad (Ren et al. 2008). Por otra parte, entre las “perjudiciales” se destacan: contaminación de alimentos, infecciones, taponamiento de cañerías y catéteres y degradación y corrosión microbiológica (MIC) (Cunningham et al. 2011).

1.1.6. Corrosión inducida microbiológicamente (MIC)

Los términos “corrosión inducida microbiológicamente” (MIC), “corrosión microbiológica”, “biocorrosión” y “corrosión influenciada por microorganismos” se refieren a la influencia de los microorganismos adheridos a superficies formando biofilms, en los procesos de corrosión de metales. El fenómeno de MIC no implica la existencia de nuevos mecanismos de corrosión, sino que integra el rol de los microorganismos en los procesos corrosivos (Beech y Flemming, 2000). Para que exista MIC es condición necesaria (aunque no suficiente) la preexistencia de un biofilm. El biofilm actúa modificando el ambiente fisicoquímico (pH, concentración de sales, concentración de oxígeno, concentración de compuestos orgánicos, potencial redox, conductividad, etc.) en la interfase superficie-solución en forma localizada, pudiendo influenciar de esta manera la corrosión ya sea induciendo corrosión localizada, modificando la

tasa de corrosión o incluso inhibiéndola (Videla, 1996). Como regla general, cualquier efecto ocasionado por los microorganismos que facilite la reacción catódica (ej. producción de H₂S) o la anódica (ej. producción de metabolitos ácidos) de un proceso corrosivo o impida una de ellas en forma preferencial, o que separe los sitios anódicos de los catódicos, incrementará la corrosión. Por otra parte, al desprenderse el biofilm, se generan parches que ocasionan la formación de celdas de aireación diferencial. En los casos en que exista una capa pasivante, dicho desprendimiento puede producir daños en esa capa (Videla y Herrera, 2005). Algas y hongos a su vez, pueden actuar ya sea produciendo metabolitos agresivos o mediante la colonización de superficies favoreciendo el establecimiento de biofilms. Los principales grupos de microorganismos involucrados en corrosión microbiológica así como también los mecanismos propuestos, se detallan en la Tabla 1.9. Debe señalarse que se trata de una división funcional basada en los procesos corrosivos, sin respetar criterios taxonómicos (Beech y Flemming, 2000). En la naturaleza estos microorganismos suelen coexistir, formando comunidades complejas que actúan en forma cooperativa, por otra parte un mismo microorganismo puede influir en la corrosión mediante multiplicidad de mecanismos.

Microorganismo	Modo/s de acción.
Bacterias sulfato reductoras (SRB)	Depolarización catódica/ anódica, producción de H ₂ S, liberación de exopolímeros capaces de ligar Fe
Bacterias reductoras de metales (MRB)	Disolución de óxidos pasivantes
Bacterias precipitantes de metales (MDB)	Precipitación de óxidos de Fe y/ o Mn. Consumo de oxígeno en forma local
Bacterias y hongos productores de ácidos (APB y ACF)	Producción de ácidos inorgánicos (HNO ₃ , H ₂ SO ₃ , H ₂ SO ₄ , HNO ₂ , H ₂ CO ₃) y orgánicos en forma localizada
Microorganismos productores de exopolisacáridos.	Formación de biofilm. Múltiples efectos (ver 1.1.5.3 y 1.1.6)

Tabla 1.9: Principales grupos de microorganismos involucrados en MIC.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Microorganismos y MIC en instalaciones de almacenamiento interino en húmedo de combustible nuclear gastado.

Como se indicó anteriormente, los microorganismos son capaces de sobrevivir y proliferar en agua de alta pureza; pudiendo tolerar osmolaridades, pHs y temperaturas extremos así como también niveles elevados de radiación. Estos factores llevan a la existencia de comunidades complejas de microorganismos en piletas de almacenamiento de combustible nuclear gastado. A partir de la década del 90, estas comunidades han sido objeto creciente de estudio, tanto por su potencial como agentes causantes de corrosión microbológica (Gazso, 1997; Dyosi et al. 2003) como por las posibilidades que otorga su uso en biorremediación. (Chicote et al. 2005; Sarro et al. 2005). En 1996, se llevó a cabo en Budapest una reunión auspiciada por la OTAN (Organización del Tratado del Atlántico Norte) dedicada a los procesos de degradación microbiana en repositorios y áreas de almacenamiento de combustible nuclear. En ella se determinó que a pesar de estar probada la presencia de microorganismos en estas instalaciones y la existencia de indicios de MIC, este fenómeno había sido subestimado, al punto de no incluirse análisis microbiológicos en el monitoreo rutinario del agua.

Un informe previo, realizado por el departamento de energía de EE.UU. (Wolfram et al. 1996) detalla conclusiones similares. En particular, se han encontrado picaduras cubiertas por una película mucosa en cupones de AA 6061 sumergidos en piletas de almacenamiento de combustible nuclear gastado en el INEL (Idaho National Engineering Laboratory), aún en aquellas con agua de características consideradas no agresivas para la aleación. Análisis

microbiológicos realizados en dichas piletas mostraron la presencia de bacterias sulfato-reductoras, bacterias productoras de ácidos y otras bacterias heterotróficas. Por otra parte se encontraron evidencias de biofouling y MIC en cupones de acero inoxidable 304.

Ambos informes recomiendan la implementación de monitoreos microbiológicos, así como también de estrategias orientadas a la mitigación y prevención de formación de biofilms. Se aconseja continuar con el análisis en laboratorio de los efectos de los microorganismos en materiales de interés nuclear y evaluar los efectos (desde el punto de vista de la corrosión microbiológica) del almacenamiento en seco de combustibles nucleares gastados.

Posteriormente, estudios realizados en laboratorio a partir de cultivos puros de seis cepas bacterianas (tres aeróbicas y tres anaeróbicas) aisladas de una piqueta de almacenamiento de combustible nuclear gastado ubicada en Budapest (Hungría) y diferenciadas considerando únicamente características morfológicas, sin llegar a niveles que permitiesen la identificación taxonómica de las mismas (Dyosi et al. 2003) mostraron que todas ellas fueron capaces de formar biofilms e inducir MIC de tipo picado (velocidad de corrosión: 1,5-2 $\mu\text{m}/\text{año}$) sobre acero inoxidable (Cr 18%, Ni 7%). A su vez los tres aislamientos aeróbicos presentaron una capacidad relativamente elevada de captación de Cd, Cr, Sr y en uno de los casos Co.

Estudios de las poblaciones microbianas presentes en piletas de almacenamiento de combustible nuclear gastado proveniente de la central nuclear Cofrentes ubicada en Valencia, España (Sarro et al. 2005) mostraron la presencia de biofilms sobre cupones de diferentes aceros inoxidables austeníticos y titanio. Los materiales fueron seleccionados específicamente debido a que no eran susceptibles de sufrir corrosión (incluyendo MIC) en el medio analizado. El análisis de dichos biofilms permitió la identificación de microorganismos pertenecientes a las clases α , β y γ *Proteobacteria*, *Firmicutes* y

Actinobacteridae, siendo el género más abundante *Bacillus*, en especial *B. cereus*, seguido de *Stenotrophomonas* y *Mycobacterium*. Los recuentos de microorganismos planctónicos mediante epifluorescencia indicaron un promedio de 10^3 células/ ml mientras que los microorganismos cultivables se encontraron entre 0,41 y 1,77 UFC/ ml, en coincidencia con resultados obtenidos para otros sitios (Santo Domingo et al. 1998). Por otra parte, los biofilms presentaron la capacidad de concentrar radionucleidos, destacándose su potencial en el campo de la biorremediación.

Un caso particular, debido principalmente a su repercusión mediática (Ralof, 1998) mostró los resultados obtenidos en piletas de almacenamiento de combustible nuclear gastado en el Sitio Río Savannah (SRS) en los EE.UU. Los mismos señalaron la presencia de biofilms y de grupos microbianos asociados a MIC, en particular SRB, en cupones de AA6061 sumergidos en dichas piletas así como de daño asociado a los mismos y atribuible a MIC. Poco tiempo después, en base a comparar la morfología de las picaduras encontradas en los cupones (de tipo no cristalográfico y cubiertas de óxido) con las informadas en bibliografía hasta ese momento para casos de MIC en aluminio (de tipo cristalográfico y sin óxido), se descartó el origen microbiológico de las mismas (Louthan, 1998). Esta comparación no consideró las diferencias existentes tanto entre las aleaciones de aluminio (serie 6000 vs. serie 7000) como entre los medios analizados (medio acuoso oligotrófico vs. interfase agua-combustible). Por último, un informe técnico de la IAEA del año 2003, se refiere al caso como al “mito de la corrosión microbiológica en SRS” y se atribuyen los daños observados a “estrés causados por la expansión del óxido como consecuencia de un proceso de pre-acondicionamiento por autoclave” debido a que “Las grietas fueron observadas en áreas de la superficie no cubiertas por parches de biofilm”. A su vez se indica que “No se observó corrosión de tipo picado en la superficie del metal en contra de lo informado inicialmente”.

1.2.2. MIC en aluminio y sus aleaciones

La corrosión microbiológica en aleaciones de aluminio ha sido ampliamente estudiada, debido principalmente a su importancia en la industria aeronáutica, como consecuencia de fallas en tanques de combustible en aviones (Salvarezza et al. 1983; Hagenauer et al. 1994). Los agentes causantes de MIC en aleaciones de aluminio pueden ser de tipo fúngico (Salvarezza et al. 1983; Guiamet et al. 1995) o bacteriano (Guiamet y Videla, 1986; Rajasekar y Ting 2010). En todos los casos se trata de corrosión localizada pero las características de la misma dependen tanto del medio como del material y de los microorganismos involucrados.

Hagenauer (Hagenauer et al. 1994) en un extenso trabajo donde se evaluó en forma independiente el efecto de 208 aislamientos (correspondientes a bacterias, levaduras y hongos) sobre AA7075 asocia la presencia de productos de corrosión a MIC de origen bacteriano y la ausencia de los mismos a un origen fúngico. Además, cepas pertenecientes a un mismo género mostraron diferentes niveles de capacidad de inducir MIC. Por otra parte existen evidencias de que una cepa del hongo *Hormoconis resinae* puede perder (y luego volver a adquirir) su capacidad corrosiva en aquellos casos en que la misma estaría relacionada con cambios en su patrón de expresión (Araya et al. 2007).

Existen cepas de *Bacillus* capaces de inducir MIC en AA2024 (Rajasekar y Ting, 2010) y otras (tanto naturales como modificadas genéticamente) con un efecto protector sobre la misma aleación (Ornek et al. 2001)

En cuanto a la variedad de morfologías del ataque, puede citarse como ejemplo el caso de *Serratia marcescens*, ya que existen evidencias de inducción de picado cristalográfico por una cepa de dicha bacteria en aluminio de alta pureza (Guiamet y Videla, 1986) y de picado no cristalográfico asociado a productos de

corrosión en AA2024 por parte de otra cepa del mismo microorganismo (Rajasekar y Ting, 2010).

De estos antecedentes se deduce que la presencia o ausencia de un microorganismo de determinado género no es por si mismo indicador de MIC, y que no puede asociarse este fenómeno a un tipo de morfología de ataque característica sino más bien a un conjunto de morfologías, debiendo cada caso particular ser evaluado de manera independiente.

1.3. Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- ✓ Analizar la población bacteriana cultivable presente en un depósito de almacenamiento interino en húmedo de elementos combustibles gastados provenientes de reactores de investigación y producción de radioisótopos, ubicado en Centro Atómico Ezeiza (Buenos Aires, Argentina), teniendo en cuenta que no existen antecedentes en el país al respecto y que los existentes a nivel mundial muestran la necesidad de estudiar cada caso en forma local, en función de la diversidad de condiciones.
- ✓ Evaluar en laboratorio la capacidad de formación de biofilms de los microorganismos aislados, considerando un medio rico en nutrientes (de uso habitual en laboratorio) y un medio diluido bajo en Cl⁻, semejante al del repositorio.
- ✓ Estudiar el efecto de los microorganismos mayoritarios (tanto en lo referente a formación de biofilms como a MIC) sobre AA6061 en el medio diluido, en un sistema estático sin reposición de nutrientes. Comparar dicho efecto con el causado por el mismo medio (y el mismo sistema) en ausencia de microorganismos.
- ✓ Analizar la existencia de efectos asociables a las inclusiones presentes en el AA6061 en relación a la formación de biofilms y MIC.

- ✓ Evaluar el empleo de cepas de laboratorio sobre AA6061 en las condiciones estudiadas, con el fin de emplearlas como modelo en posteriores estudios de los mecanismos.

1.4. Referencias

Aballe A., Bethencourt M., Botana F., Cano M., Marcos, M. (2001) Localized alkaline corrosion of alloy AA5083 in neutral 3.5% NaCl solution. *Corr. Sci.*, V. 43, pp. 1657-1674.

Alonso-Saez L., Gasol JM. (2007) Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in northwestern mediterranean coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 73 pp. 3528–3535.

Araya R., Bobadilla C., Vera R., Rosales B.M. (2007) Biochemical analysis of the *Hormoconis resiniae* fungal mycelium in the corrosion of aeronautical aluminum alloys. *Rev. Metal. Madrid*, V. 43 pp. 228-236.

Barns S.M., Cain E.C., Sommerville L., Kuske C.R. (2007) *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 73 pp. 3113–3116.

Beech I., Flemming H.C. (2000) What is MIC? Microbial influenced corrosion of industrial materials. *Biocorrosion Network*. Beech I., Bergel A., Mollica A., Flemming H.C., Scotto V., Sand W. (Eds)

Bray, JW. (1997) Aluminum mill and engineered wrought products. *ASM Handbook*, V. 2, Properties and Selection: Nonferrous Alloys and Special-Purpose Materials. ASM International. Handbook Committee. EE.UU.

Brinkmeyer R., Knittel K., Jurgens J, Weyland H., Amann R., Helmke E. (2003) Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 69 pp. 6610–6619.

- Brodie E.L., DeSantis T.Z., Parker J.P.M., Zubietta I.X., Piceno Y.M. (2007) Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *PNAS*, V. 104 pp. 299–304.
- Chicote E., Garcia A.M., Moreno D.A., Sarro M.I., Lorenzo P.I., Montero F. (2005) Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, V. 32 pp. 155–162.
- Cunningham A.B., Lennox J.E., Ross R.J., (Eds). *Biofilms: The Hypertextbook*. Bozeman, MT: Center for Biofilm Engineering, Montana State University. 2011.
- Dang H., Li T., Chen M., Huang G. (2008) Cross-ocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 74 pp. 52-60.
- Deltombe, E., Vanleughenaghe, C., Pourbaix, M. (1974) Aluminum, atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. M. Pourbaix (Ed). NACE.
- De Souza JA., Silva-Souza A.T., (2001) Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, V. 44 pp. 373 - 381.
- Doolittle W.F., Papke R.T. (2006) Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biol.*, V. 7 pp. 116-120.
- Dyosi J, Telegdi Gy., Farkas L., Gazso G., Bokori E. (2003) Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. *Int. Biodeter. Biodegr.*, V. 51 pp. 151-156.
- Fang M., Kremer R.J, Montavalli P.P., Davies G. (2005) Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 71 pp. 4132–4136.
- Fierer N., Breitbart M., Nulton J, Salamon P., Lozupone C. (2007) Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and viruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 73 pp. 7059–7066.

Gans J, Wolinsky M., Dunbar J, (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, V. 309 pp. 1387-1390.

Gazsó L.G. (1997) Basic radiation microbiology. In Wolfram JH., Rogers R.D., Gazsó L.G. (Eds) *Microbial degradation processes in radioactive waste repository and in nuclear fuel storage areas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NATO ASI Series 1, Disarmament Technologies.

Guiamet P.S., Videla. H.A. (1986) Efecto de dos contaminantes microbianos de turbocombustibles en la corrosión microbiológica del aluminio y aleaciones. *Rev. Iberoam. Corros. Prot.*, V. 27 pp. 351-354.

Guiamet P.S., Videla.H.A., Reinoso E.H. (1995) Fungal contaminants of jet fuels and their effect on fuel tanks structural materials. *Biodeter. Biodegr.*, V. 9 pp. 615-620.

Hagenauer A., Hilpert R., Hack T. (1994) Microbiological investigations of corrosion damages in aircraft. *Mater. Corros.*, V. 45 pp. 355–360.

Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, V. 2 pp. 95-108.

Hollingsworth, E.H., Hunsicker H.Y. (1987) Corrosion of aluminum and aluminum alloys. *ASM Handbook*, V. 13, Corrosion. ASM International. Handbook Committee. EE.UU.

International Atomic Energy Agency (2003) Corrosion of research reactors aluminum clad spent fuel in water. *Technical Reports Series No 418*.

Jblivet E., L'Haridon S., Corre E., Forterre P., Prieur D. (2003) *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, V. 53, pp. 847–851.

Kenzaka T., Yamaguchi N., Prapagdee B., Mikami E., Nasu M., (2001) Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.*, V. 47 (4), pp. 353-361.

Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M. (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B*, V.361, pp. 1929–1940.

Korber D.R., Choi A., Wolfaardt G.M., Ingham S.C., Caldwell D.E. (1997) Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 63 pp. 3352-3358.

Koza A., Hallett P.D., Moon C.D., Spiers A.J. (2009) Characterization of a novel air–liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 155 pp. 1397-1406.

Lefrancois E., Lepoint G., Vachiery N., Gros O., Monti D. (2011) Epilithic biofilm as a key factor for small-scale river fisheries on Caribbean islands. *Fisheries Manag. Ecol.*, V. 18 pp. 211–220.

Louthan M.R. (1996) The potential for microbiologically influenced corrosion in the Savannah River spent fuel storage pools. In Wolfram J.H., Rogers R.D., Gzásó L.G. (Eds) *Microbial degradation processes in radioactive waste repository and in nuclear fuel storage areas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NATO ASI Series 1, Disarmament Technologies.

Mattei, C. (2011) Vivencias de una antigua reactorista. Conferencia Plenaria. XXVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear. Buenos Aires. Argentina.

Medilanski E., Kaufmann K., Wicka L.Y., Wannerb O., Harmsa H. (2002) Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofouling*, V. 18 pp. 193-203.

Mondani L., Benzerara K., Carriere M., Christen R., Mamindy-Pajany Y., Fevrier L., Marmier N., Achouak W., Nardoux P., Berthomieu C., Chapon V. (2011) Influence of uranium on bacterial communities: a comparison of natural uranium-rich soils with controls. PLoS ONE, V. 6 e. 25771.

Oren A. (2002) Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. FEMS Microb. Ecol., V. 39 pp. 1-7.

Örnek D., Jayaraman A., Syrett B.C., Hsu C.H., Mansfeld F.B., Wood T.K. (2002) Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or γ -polyglutamate. Appl. Microbiol. Biotechnol., V. 58 pp. 651–657.

Pace N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science V. 276 pp. 734-740.

Prosser J.I. (2007) The ecology of Nitrifying Bacteria, en Biology of the Nitrogen Cycle. H. Bothe, S.J. Ferguson, W.E. Newton (eds) Elsevier.

Rajasekar A., Ting Y.P. (2010) Microbial corrosion of aluminum 2024 aeronautical alloy by hydrocarbon degrading bacteria *Bacillus cereus* ACE4 and *Serratia marcescens* ACE2. Ind. Eng. Chem. Res., V. 49 pp. 6054-6061.

Raloff J (1998) Something's bugging nuclear fuel. Science News. V. 1553 p. 325.

Ren Z., Steinberg L.M., Regan J.M. (2008) Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells. Water Sci. Technol., V. 58 pp. 617-622.

Rodríguez S., Lanzani L., Quiroga A., Silva E., Haddad R. (2005) Study of the effect of sediments on corrosion behaviour of aluminium clad spent fuel during storage in water. In: IAEA, (ed.) Proceedings of an International Conference on Research Reactor Utilization, Safety, Decommissioning, Fuel and Waste Management organized by the International Atomic Energy Agency and hosted

by the Government of Chile through the Nuclear Energy Commission of Chile and International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 645-650.

Roesch L.W.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O, Farmerie W.G., Triplett E.W. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*, V. 1, pp. 283–290.

Rooy E.L. (1997) Introduction to Aluminum and Aluminum Alloys ASM Handbook, V. 2, Properties and Selection: Nonferrous Alloys and Special-Purpose Materials. ASM International. Handbook Committee. EE.UU.

Rosche B., Zhong Li X., Hauer B., Schmid A., Buehler K. (2009) Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis?. *Trends Biotechnol.*, V. 27 pp. 636-643.

Salvarezza R.C., De Mele F.L., Videla H.A. (1983) Mechanisms of the microbial corrosion of aluminum alloys. *Corrosion*, V. 39 pp. 26-30.

Santo Domingo J.W., Berry C.J, Summer M., Fliermans C.B. (1998) Microbiology of spent nuclear fuel storage basins. *Curr. Microbiol.*, V. 37 pp. 387-394.

Sarro M.I., Garcia A.M., Moreno D.A. (2005) Biofilm formation in spent nuclear fuels pools and bioremediation of radioactive water. *Int. Microbiol.*, V. 8 pp. 223-230.

Schloss P.D., Handelsman J (2006) Toward a census of Bacteria in soil. *PLoS Comp. Biol.*, V. 2 e 92.

Shanks C., Kelty A., Archibeque S., Jenkins M., Newton R.J, McLellan S.L., Huse S.M., Sogin M.L. (2011) Community structures of fecal Bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 77 pp. 2992–3001.

Singh R., Paul D., Jain R.K. (2006) Biofilms: Implications in bioremediation. *Trends microbiol.*, V. 14 pp. 389-397.

Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *PNAS*, V. 103 pp. 12115-12120.

Sreekumari K.R., Nandakumar K., Kikuchi Y. (2001) Bacterial attachment to stainless steel welds: Significance of substratum microstructure. *Biofouling*, V. 17 pp. 303-316.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, V. 52, pp. 1043–1047.

Stackebrandt E., Goebel B.M., (1994) Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, V.44 pp. 846-849.

Stoeck T., Kasper J., Bunge J., Leslin C., Ilyin V., Epstein S. (2007) Protistan diversity in the Arctic: a case of paleoclimate shaping modern biodiversity. *PLoS ONE*, V. 2 e. 728.

Szklarska-Smialowska, Z. (1999) Pitting corrosion of aluminum. *Corros. Sci.*, V. 41, pp. 1743-1767.

Ude S., Arnold D.L., Moon C.D., Timms-Wilson T., Spiers A.J. (2006) Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.*, V. 8 pp. 1997-2011.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings. J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, V. 60 pp. 407-438.

Videla H.A. (1996) Corrosion inhibition in the presence of microbial corrosion. Proceedings of the Corrosion 96 conference. Denver. EE.UU. NACE International (Ed).

Videla H.A., Herrera L.K. (2005) Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int. Microbiol.*, V. 8 pp. 169-180.

Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, V. 95, pp. 6578–6583.

Wijman A.G., de Leeuw P. L., Moezelaar R., Zwietering M. H., Abee T. (2007) Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 73 pp. 1481-1488.

Wolfram J.H., Mixia R.E., Jex R., Nelson L., Garcia K.M. (1996) The impact of microbially influenced corrosion on spent nuclear fuel and storage life. Report INEL 96/ 0335 for the U.S. Department of Energy.

Capítulo 2: Técnicas empleadas

2.1. Introducción

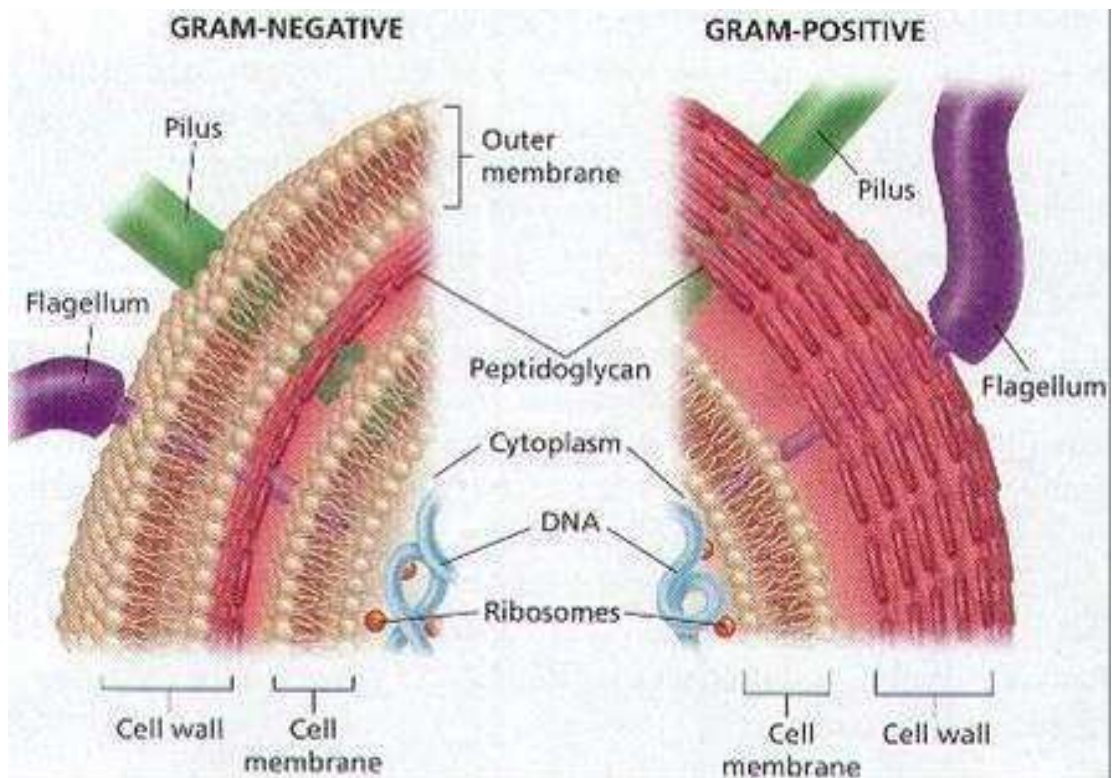
Durante la realización de este trabajo se han empleado diferentes técnicas con la finalidad de caracterizar la población bacteriana cultivable presente en una instalación nuclear así como también el análisis de biofilms y corrosión microbiológica. En este capítulo se desarrollará una breve descripción del fundamento teórico de las mismas, el tipo de información que brindan, sus ventajas y limitaciones así como también el tipo de instrumental necesario para su implementación.

2.2. Técnicas bacteriológicas convencionales para la caracterización de microorganismos

La caracterización de microorganismos mediante esquemas basados en técnicas bacteriológicas convencionales (pruebas bioquímicas, tinciones, características morfológicas) ha sido tradicionalmente y hasta el advenimiento y popularización de técnicas de biología molecular, la forma elegida para la clasificación de los mismos. A continuación se detallan los fundamentos de las principales técnicas empleadas en este trabajo.

2.2.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram, desarrollada por H.C. Gram en 1884, es un tipo de tinción diferencial que permite clasificar a las bacterias en función de características estructurales de sus paredes celulares permitiendo definir dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Figura 2.1). La técnica consiste en una serie de pasos, siendo el primero de ellos la tinción de las células (previamente fijadas) con un colorante primario catiónico (cristal violeta). Este colorante penetra en todas las bacterias presentes. Luego se aplica una solución de I_2/I^- denominada lugol. El lugol entra en las células y forma un complejo, insoluble en solución acuosa, con el cristal violeta. A continuación se somete a la muestra a un paso de decoloración con una mezcla de etanol y acetona. El complejo es eliminado de las células Gram negativas (junto con la membrana externa de las mismas) mientras que permanece en las Gram positivas (retenido por la gruesa pared de peptidoglicano). Por último se emplea un colorante de contraste (usualmente fucsina o safranina) para permitir la visualización de las células Gram negativas. Esta técnica permite evaluar a su vez la morfología celular, lo que termina definiendo cuatro grandes grupos: cocos (es decir, microorganismos con morfología esférica) Gram positivos, cocos Gram negativos, bacilos (morfología cilíndrica) Gram positivos y bacilos Gram negativos. Por otra parte existen microorganismos que resultan Gram variables, pudiendo aparecer como Gram positivos o Gram negativos en función de factores tales como el medio y estadio del ciclo de vida, entre otros (por ejemplo *Mycobacterium*, *Arthobacter*, *Clostridium*) (Beveridge, 1990).



A

B

Figura 2.1: Esquema de la estructura de las envolturas de bacterias Gram negativas (A) y Gram positivas (B). Extraído de www.americanaquariumproducts.com

2.2.2. Tinción de esporas

Esta tinción se basa en diferencias en la retención de un colorante (verde de malaquita), en este caso entre la pared de la spora (retiene el colorante) y la de la forma vegetativa (no lo retiene). Se emplea safranina como colorante de contraste. Permite identificar tanto la presencia de esporas como su ubicación dentro de la célula vegetativa, sirviendo así de criterio de clasificación tanto entre géneros (presencia o ausencia de esporas) como dentro de un mismo género (morfología y localización de la spora).

2.2.3. Sistemas de pruebas bioquímicas

Se basan en evaluar diferencias metabólicas entre microorganismos con el objetivo de diferenciarlos (y clasificarlos) en función de las mismas. Entre estas pruebas pueden señalarse: producción de ciertas enzimas (catalasa, oxidasa, lecitinasa, ureasa, gelatinasa, amilasa, ADNasa, etc.), capacidad de fermentar diferentes carbohidratos, capacidad de oxidar determinados compuestos (glucosa, acetato, etc.), producción de pigmentos, reducción de nitratos, entre otras. La realización de cada prueba, genera “grupos” en función de los resultados. A medida que se avanza dentro de estos “grupos” se requieren unas u otras pruebas para continuar con la clasificación. Si bien es un método ampliamente utilizado, en especial por su bajo costo y facilidad de implementación relativamente pocos microorganismos pueden ser tipificados con certeza mediante el mismo. Esto se debe a que microorganismos muy cercanos taxonómicamente pueden presentar patrones de respuesta muy diferentes y, a la inversa, organismos con poca relación entre sí pueden presentar comportamientos similares ante algunas pruebas. A su vez, existen numerosos organismos (particularmente ambientales) cuya respuesta a estos sistemas de pruebas no se conoce. En la actualidad el mayor uso de esta técnica como método de tipificación se encuentra ligado a la bioquímica clínica. Sin embargo, sigue siendo un método de importancia en otras áreas de la microbiología (aunque no desde el punto de vista de la taxonomía) debido que provee una gran cantidad de información acerca de las características metabólicas de las cepas en estudio.

2.3. Secuenciación del gen 16s ARN

El advenimiento de técnicas de biología molecular basadas en el análisis de las diferencias entre los genomas de los microorganismos ha permitido

revisar la taxonomía microbiana y ampliar el conocimiento de las relaciones entre los mismos. En la actualidad, el uso de un sistema filogenético basado en la secuencia del gen 16s ARN para procariotas y del 18s ARN para eucariotas se encuentra ampliamente aceptado, tal como se indica en el capítulo 1 de este trabajo. Estos genes son considerados buenos "relojes moleculares", debido a que están presentes en todos los microorganismos; contienen tanto regiones conservadas (útiles para establecer relaciones filogenéticas lejanas) como regiones variables (de importancia al momento de evaluar relaciones próximas) y no son susceptibles de sufrir modificaciones abruptas como consecuencia de la adaptación al ambiente.

Las bases de datos de secuencias del 16s ARN se iniciaron a partir de cepas bien caracterizadas de cultivos de colección (Larsen et al, 1993) y en la actualidad representan un sistema dinámico y en continuo crecimiento, incluyendo tanto secuencias de microorganismos procedentes de cultivo como también de genes clonados a partir de material genético proveniente de muestras ambientales (Pace et al, 1986). El método consiste en la extracción (y purificación) del ADN de una muestra seguida de la amplificación de una región del 16s ARN mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) empleando cebadores ("primers") universales (que se unen a las regiones conservadas del gen), purificación del producto de PCR, secuenciación del mismo, análisis y ensamblado de la secuencia y por último, ingreso de la misma en la base de datos donde se la compara con el resto de las secuencias presentes, obteniéndose así información taxonómica.

2.4. Alineamiento múltiple de secuencias y confección de árboles filogenéticos

Se denomina "alineamiento múltiple de secuencias" o MSA ("multiple sequence alignment") al alineamiento de tres o más secuencias biológicas (de aminoácidos o nucleótidos). Se emplea en general con el objetivo de evaluar la

homología entre las secuencias, y realizar el análisis filogenéticos de las mismas. Habitualmente se utilizan programas computacionales para evaluar y producir los alineamientos. En la actualidad, los programas mas utilizados en la construcción de árboles filogenético corresponden a las diferentes versiones de Clustal. Clustal se basa en la realización de alineamientos de a pares, a partir de los cuales se construye un alineamiento múltiple final, generándose una matriz de similitudes que se convierte en una matriz de distancias donde la longitud de la distancia reflejaría la distancia evolutiva entre las secuencias. A partir de la matriz de distancias se genera un árbol filogenético mediante un algoritmo de categorización de pares mas relacionados denominado “neighbour joining”. Las secuencias son alineadas en forma progresiva empezando por los pares más cercanos (Thompson et al. 1994).

2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM por su sigla en inglés) se basa en el empleo de un haz de electrones (en lugar de un haz de luz como sucede en los microscopios ópticos) que interactúa con los átomos de la superficie de una muestra. Como resultado de dicha interacción se generan señales, tales como electrones secundarios, electrones retrodifundidos, rayos x característicos, electrones Auger y catodoluminiscencia. Si bien todas estas señales se producen simultáneamente, cada una de ellas requiere un tipo diferente de detector. Los detectores más usuales son los de electrones secundarios. La detección de electrones secundarios otorga información topográfica. Las diferencias en la intensidad de la señal en función del área muestreada permite la generación de un mapa de distribución de dicha señal que se traduce en una imagen de muy alta resolución. El rango de magnificación de una muestra se encuentra entre 10 y 500000 veces aproximadamente (como comparación, el rango de magnificación de un

microscopio óptico se encuentra entre 10 y 2000 veces). Las aplicaciones del SEM son múltiples abarcando áreas como biología, medicina, ciencias de materiales, nanotecnología, geología y paleontología.

En el SEM convencional, las muestras deben ser capaces de conducir la corriente eléctrica, de manera de no acumular cargas electrostáticas (lo que se reflejaría en artificios en las imágenes generadas y en bajos niveles de resolución). Por este motivo, aquellas muestras poco conductoras (por ejemplo especímenes biológicos) deben ser recubiertas (“metalizadas”) por una capa muy fina de un material conductor (oro, aleación oro/ paladio, platino, entre otros). Por otra parte, este tipo de microscopía requiere la fijación y desecación de aquellas muestras con un elevado contenido de agua (como los biofilms) debido a que se emplean condiciones de alto vacío en la cámara donde se deposita el espécimen. La fijación suele realizarse por medio de un agente químico (usualmente formaldehído, glutaraldehído o combinaciones de ambos) seguido de un procedimiento de desecación. La selección de este último depende de las características de la muestra y del equipamiento disponible, e incluye métodos tales como secado al aire y el uso de una gradación de solventes con distinto contenido de agua (diversas series de etanol, etanol y hexametildisilazano, etanol-acetona o acetona) seguido o no de secado por punto crítico (es decir, del reemplazo del solvente por CO₂). Si bien son métodos simples, su principal desventaja es que todos ellos generan diferentes artificios en las muestras, limitando la información estructural que se obtiene (Fratesi et al., 2004). El empleo de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), que permite analizar muestras hidratadas y poco conductoras ha permitido superar estos inconvenientes, sin embargo los detalles acerca de esta técnica se encuentran fuera del alcance de este trabajo.

2.6. Espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDX)

Esta técnica se basa en la detección de fotones de rayos X emitidos por la muestra como resultado de su interacción con un haz de electrones y consecuente ionización. La energía de los fotones emitidos está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor, permitiendo el análisis cualitativo de la muestra. Debido a la similitud de energías de orbitales de distintos elementos, a veces pueden presentarse problemas de solapamiento de picos en el espectro, los que en general pueden resolverse mediante algoritmos de deconvolución. Por otra parte, el número de fotones emitido de cada energía permite realizar un análisis cuantitativo de los elementos presentes, si bien la precisión del mismo es altamente dependiente de la calibración del equipo para los elementos a analizar. Habitualmente este tipo de sistemas se encuentran acoplados a microscopios electrónicos ya sea de barrido o de transmisión (Orellana, 2010).

2.7. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es un tipo de microscopía óptica que emplea el fenómeno de fluorescencia para generar una imagen. Por este motivo su empleo se encuentra limitado a muestras fluorescentes (ya sea naturalmente o por medio de algún tratamiento o tinción). El principio en el que se basa este método consiste en iluminar una muestra con luz de una longitud de onda tal que induzca la emisión de fluorescencia, la cual es detectada mediante un objetivo. La longitud de onda incidente se denomina λ de excitación mientras que la longitud de onda emitida (mayor que la incidente, es decir de menor energía) se denomina λ de emisión. Se emplean filtros tanto de emisión como de excitación de manera de asegurar la estrechez de las bandas de excitación y de

2.7.2. Microscopía de fluorescencia confocal

En la microscopia de fluorescencia confocal, se emplea un láser que ilumina la muestra de manera puntual, a la vez que un orificio enfrente del detector permite eliminar las señales provenientes de zonas diferentes al plano focal. De esta manera pueden realizarse cortes ópticos (cuyo espesor depende de la apertura del orificio) permitiendo una mayor resolución así como también el análisis en profundidad de una muestra, posibilitando la reconstrucción de imágenes tridimensionales y perfiles. La necesidad de detectores muy sensibles es uno de los motivos del alto costo de este tipo de equipamiento (Spring y Davidson, 2008).

2.8. Referencias

Beveridge T.J (1990) Mechanism of Gram variability in select bacteria. *J Bacteriol.*, V. 172 pp. 1609-1620.

Fratesi S.E., Lynch F.L., Kirkland B.L., Brown L.R. (2004) Effects of SEM preparation techniques on the appearance of Bacteria and biofilms in the carter sandstone. *J Sediment. Res.*, V. 74 pp. 858-867.

Larsen N., Olsen G.J, Maidak B.L., McCaughey M.J, Overbeek R., Macke T.J, Marsh T.L., Woese C.R. (1993) The ribosomal database project. *Nucleic Acid Res.*, V. 21 pp. 3021-3023.

Orellana A.M. (2010) Microanálisis por dispersión de energías de rayos X (XEDS). Conceptos básicos. Servicio de Microscopía Electrónica. SCAI. Universidad de Málaga.

Pace N.R., Stahl D.A., Lañe D.J, Olsen G.J (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.*, V 9 pp. 1-55.

Spring K.R., Davidson M.W. (2008) Introduction to fluorescence microscopy. Nikon MicroscopyU.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.*, V. 22 pp. 4673-4680.

Capítulo 3: Aislamiento y caracterización de la población microbiana cultivable de un depósito de almacenamiento interino en húmedo de elementos combustibles gastados de media actividad

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en **Forte Giacobone A.F.**; Rodríguez, S.A., Burkart, A.L., Pizarro, R.A. (2011) Microbiological Induced Corrosion of AA 6061 nuclear alloy in high diluted media by *Bacillus cereus* RE 10. Int. Biodet. Biodeg., V. 65 pp. 1161-1168.

3.1. Introducción

Luego de completar su ciclo de quemado, los combustibles nucleares manufacturados en aleación de aluminio AA6061 provenientes de reactores de investigación argentinos, son almacenados en forma interina bajo agua destilada en una instalación denominada “depósito de almacenamiento interino en húmedo de combustible gastado de media actividad” (al que a partir de este momento llamaremos “repositorio” o “repositorio nuclear”). En el Centro Atómico Ezeiza (CAE) esta instalación consiste en una serie de tubos de acero inoxidable interconectados, enterrado en una estructura de hormigón. Posee dos secciones con 16 líneas de 8 tubos cada una (Figura 3.1). Los elementos combustibles se depositan de forma vertical, a razón de dos por canal. En los extremos de cada línea de canales se encuentra un canal de monitoreo, donde no se almacenan elementos combustibles y que sirve para realizar evaluaciones periódicas. Los elementos combustibles se almacenan en

estos canales por periodos de tiempo de entre 30 y 40 años hasta su disposición final.



Figura 3. 1: Repositorio nuclear del CAE.

Tal como se observa en la Tabla 3.1, el medio presente en los canales es altamente oligotrófico, a lo que se suma la existencia de elevados niveles de radiación gamma. Estas condiciones, si bien extremas, no son impedimento para el crecimiento microbiano, como se desprende de los trabajos de distintos autores (Santo Domingo et al. 1998; Chicote et al. 2005; Diosi et al. 2003; Sarro et al. 2005).

En ambientes oligotróficos, los microorganismos tienden a adherirse a superficies, formando biofilms. En un repositorio nuclear como el descrito anteriormente, esta capacidad puede tener efectos benéficos concentrando radionucleidos y facilitando estrategias de biorremediación (Sarro et al. 2005) así como también efectos perjudiciales incluyendo la inducción de corrosión microbiana en los elementos combustibles, pudiendo ocasionar la liberación de radionucleidos al medio acuoso de las piletas, con las consiguientes consecuencias desde el punto de vista ambiental.

	Rango	Unidades
pH	7-8	
Conductividad	70-200	$\mu\text{S}/\text{cm}$
Tº	15-22	ºC
Cl ⁻	3-16	ppm
NO ₂ ⁻	<0,5	ppm
NO ₃ ⁻	<0,5	ppm
SO ₄ ²⁻	1-5	ppm
Cu ²⁺	<0,5	ppm
Total sólidos disueltos	55-120	$\mu\text{g}/\text{ml}$
Actividad γ		
Co	0,9-12 exp4	Bq/ l
Cs	<58	Bq/ l

Tabla 3.1: Análisis del agua del repositorio nuclear del CAE. Datos extraídos de Technical Report N° 418. IAEA 2003.

Por lo expuesto y considerando las características particulares de la aleación de aluminio AA6061 (que se describen en el capítulo 1 de este trabajo) que la hacen altamente susceptible a la corrosión localizada aún en medios de baja conductividad, se procedió a estudiar la población microbiana cultivable del repositorio nuclear del CAE.

3.2. Experimental

3.2.1. Reactivos

Los medios de cultivo para bacterias aeróbicas empleados corresponden a la marca Oxoid. El agua que se utilizó fue destilada y pasada luego por un sistema MilliQ. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

3.2.2. Toma de muestras

Con el objetivo de identificar la población bacteriana cultivable presente en el Repositorio, se tomaron muestras de agua de los 20 cm superiores de los canales de monitoreo N° 181, 164 y 147. Las muestras fueron trasladadas al Centro Atómico Constituyentes (CAC) donde se procedió a su procesamiento. En la Figura 3.1 se observa una vista general de los canales.

Por otra parte se realizó inspección visual de las tapas y paredes de los canales de almacenamiento.

3.2.3. Procesamiento de las muestras

Con la finalidad tanto de reducir la radioactividad de las muestras como de concentrar los microorganismos, y considerando que el radioisótopo predominante en el repositorio es ^{137}Cs (altamente soluble en agua), se tomaron 100 ml de cada muestra, se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en solución salina fisiológica (NaCl 0.9% p/ v). Este procedimiento fue repetido dos veces hasta que la radioactividad de las muestras resultó igual a la del fondo. El material de

muestreo y los sobrenadantes fueron descartados a través del AGE (área de gestión de residuos radioactivos) de la CNEA. Tanto la toma de muestras como su procesamiento fueron realizados bajo la supervisión de oficiales de radioprotección.

Las muestras procesadas fueron sembradas en placas de Petri conteniendo los siguientes medios sólidos: agar nutritivo, agar nutritivo 1/ 10 y agar nutritivo 1/ 30 Las composiciones de los mismos se detallan en el Anexo 3.1. Las placas se incubaron a 25 °C durante 14 días. Se seleccionaron las colonias desarrolladas y se procedió a su aislamiento y caracterización mediante la aplicación de técnicas bacteriológicas convencionales que incluyeron la determinación de la morfología, propiedades tintoriales, fisiológicas y bioquímicas. Si bien se registró la presencia de hongos, éstos no fueron analizados.

Por otra parte, se realizaron siembras en medio Postgate E (Postgate, 1963; Anexo 3.1) y se incubaron en anaerobiosis durante 60 días, con el fin de detectar la presencia de bacterias sulfato reductoras.

3.2.4. Pruebas bioquímicas

Se evaluaron las características morfológicas de las colonias seleccionadas (tamaño, forma, color). Se realizaron tinciones de Gram (Anexo 3.2) de los aislamientos, y en función de los resultados obtenidos se realizaron pruebas bioquímicas específicas (Anexo 3.2), siguiendo los esquemas de Bergey (1994) tal como se detalla en la Tabla 3.2.

Pruebas efectuadas a Bacilos Gram positivos	Pruebas efectuadas a Bacilos Gram negativos	Pruebas efectuadas a Cocos Gram positivos
<ul style="list-style-type: none"> -Tinción de esporas -Producción de lecitinasa -Motilidad -Reducción de nitratos -Catalasa 	<ul style="list-style-type: none"> -Capacidad de oxidar/fermentar carbohidratos -Oxidasa -Catalasa -Motilidad -Producción de pigmentos -Capacidad de oxidar glucosa -Crecimiento con citrato como única fuente de carbono. -Capacidad de degradar Tween 80 -Actividad β Galactosidasa -Degradación de gelatina -Hidrólisis de esculina -Producción de DNasa -Producción de H₂S -Crecimiento en TCBS 	<ul style="list-style-type: none"> -Catalasa -Oxidasa -Motilidad -Capacidad de oxidar carbohidratos -Lecitinasa -Capacidad de degradar almidón -Capacidad de degradar urea.

Tabla 3.2: Pruebas bioquímicas efectuadas a los aislamientos del repositorio del CAE.

3.2.5. Secuenciación del gen 16s RNA

Concluida la caracterización mediante pruebas bioquímicas se procedió a estudiar los aislamientos cuyas resultados de las pruebas resultaron diferentes entre si, mediante secuenciación de los genes 16 srRNA y posterior procesamiento y análisis de las secuencias obtenidas. Con este propósito se realizaron cultivos permanentes en agar nutritivo blando (tal como se describe en el Anexo 3.3) y se enviaron a la empresa MacroGen Corea, encargada de la extracción, purificación, amplificación y secuenciación del ADN. La amplificación se realizó empleando los primers universales 518F (5' ccagcagccgcgtaatacg3') y 800R (5' taccagggtatctaatacc3').

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el programa DNA cluster. Las secuencias procesadas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), empleándose para ello la herramienta básica de búsqueda y alineamiento Blastn. Por último las secuencias fueron depositadas en el European Bioinformatics Institute (EBI).

3.2.6. Análisis filogenético.

Las secuencias fueron alineadas y se construyeron árboles filogenéticos mediante las herramientas del programa CLUSTAL_W2 (Larkin et al. 2007), empleando el “neighbour-joining method”.

3.2.7. Evaluación de formación de biofilms por el método del tubo de ensayo

La capacidad de formar biofilms de las cepas aisladas fue evaluada, tanto en caldo nutritivo (CN) como en caldo nutritivo diluido 30 veces (CN 1/30), mediante el método del tubo de ensayo (Christensen et al. 1982) en cultivos estacionarios de 14 días. La composición de los medios se detalla en el Anexo 3.1 y los detalles de la técnica en el Anexo 3.2.

3.3. Resultados

3.3.1. Aislamientos y análisis de filogenia

Los estudios realizados en el repositorio nuclear del CAE, dieron como resultado una carga bacteriana aproximada de 10 UFC/ ml. Se detectó además presencia de al menos 3 tipos de hongos morfológicamente diferentes, si bien no se realizaron estudios posteriores de los mismos. No se detectaron bacterias anaeróbicas, en particular no se detectó ni presencia ni indicadores de la acción de bacterias sulfato reductoras (BSR) (tales como sulfuro de hidrógeno, presencia de tubérculos y morfología de ataque característica). De los microorganismos aislados, aproximadamente el 60 % presentó características correspondientes al género *Bacillus*, identificándose dos grupos diferenciados en función de las pruebas bioquímicas, mientras que aproximadamente el 30 % presentó características del género *Pseudomonas*. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos canales de monitoreo.

La caracterización de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas indicó la presencia de 20 grupos de microorganismos con características diferentes entre si. Se seleccionó un aislamiento correspondiente a cada uno de esos grupos y se realizó secuenciación del gen del 16sRNA y posterior análisis

de secuencias, como se detalla en los incisos 3.2.5 y 3.2.6. Se obtuvieron secuencias de 1100 pb aproximadamente, con excepción de dos aislamientos (correspondientes a *Microbacterium*) donde solamente hubo amplificación con uno de los primers empleados, por lo que la longitud de dichas secuencias resultó de unos 500 pb. Por este motivo, la alineación de secuencias se efectuó sin tomar en cuenta a este grupo. Las secuencias procesadas fueron enviadas al banco de genes del EBI bajo los números de acceso FR749828 a FR749848 (Tabla 3.3).

Los resultados obtenidos indican que los microorganismos analizados pertenecen a diferentes grupos filogenéticos, siendo los más abundantes aquellos correspondientes al grupo *Bacillus*, seguido por las subclases alfa y gama proteobacterias (Tabla 3.3).

El estudio taxonómico mediante alineación de secuencias confirma dichos resultados (Figura 3.2)

Aislamiento/ N° de acceso EBI	Género/ especie	Familia	Orden	Clase	Phylum
RNE2/ FR749828	<i>Bosea sp.</i>	Bradyrhizobiaceae	Rhizobiales	α proteobacteria	P
RNE22/ FR749829	<i>Rhizobium sp.</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	α proteobacteria	P
RNE15/ FR749830	<i>Leifsonia sp.</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RNE20/ FR749831	<i>Micrococcus sp.</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RNE19/ FR749832	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Bacilli	F
RNE8/ FR749833	<i>Sinorhizobium sp.</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	α proteobacteria	P
RNE9/ FR749834	<i>Pseudomonas sp.</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	γ proteobacteria	P
RNE10/ FR749835	<i>Pseudomonas sp.</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	γ proteobacteria	P
RNE22/ FR749836	<i>Sinorhizobium sp.</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	α proteobacteria	P
RNE17/ FR749837	<i>Bacillus cereus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Bacilli	F
RNE14/ FR749838	<i>Pseudomonas sp.</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	γ proteobacteria	P
RE50/ FR749839	<i>Arthrobacter sp.</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RE51/ FR749840	<i>Acinetobacter sp.</i>	Moraxelaceae	Pseudomonadales	γ proteobacteria	P
RE54/ FR749841	<i>Aminobacter sp.</i>	Phyllobacteriaceae	Rhizobiales	α proteobacteria	P
RE59/ FR749842	<i>Rhodococcus sp.</i>	Nocardiaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RE62/ FR749843	<i>Mezorhizobium sp.</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	α proteobacteria	P
RE44/ FR749844	<i>Arthrobacter sp.</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RE59/ FR749845	<i>Rhodococcus sp.</i>	Nocardiaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RE10/ FR749846	<i>Bacillus cereus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Bacilli	F
RNE5/ FR749847	<i>Microbacterium sp.</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A
RNE12/ FR749848	<i>Microbacterium sp.</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	A

Tabla 3.3: Aislamientos correspondientes al repositorio del CAE.

P: proteobacteria ; F: Firmicutes; A: Actinobacteria

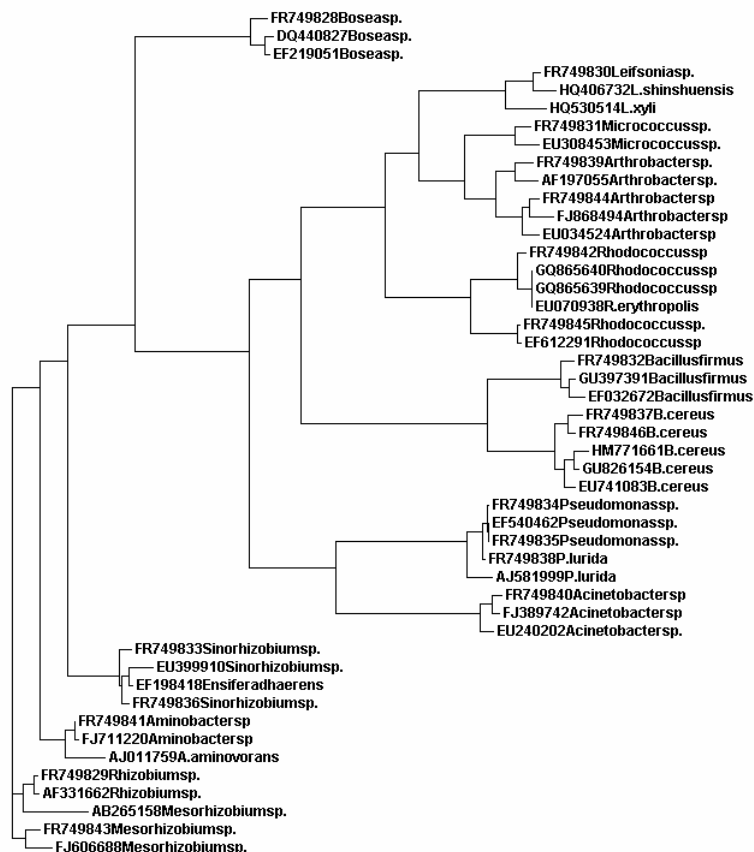


Figura 3.2: Filograma donde se muestran las relaciones filogenéticas de los aislamientos del repositorio del CAE entre si (FR749828 a FR749846) y con otros organismos relacionados.

3.3.2. Evaluación de la capacidad de formación de biofilm.

Se evaluó la capacidad de formación de biofilm de los aislamientos tanto en caldo nutritivo como en CN 1/ 30 mediante el método del tubo de ensayo (Figura 3.3). En función de los resultados, y en base a una escala arbitraria se agruparon las cepas como altamente formadoras de biofilm (+++), formadoras de biofilm (+), escasamente formadoras de biofilm (+/-), para cada uno de los medios de cultivo empleados (Tablas 3.4 y 3.5).



Figura 3.3: Método del tubo de ensayo para evaluar formación de biofilms.

Caldo nutritivo		
Cepas +++	Cepas +	Cepas +/-
<i>Rhizobium sp.</i> RNE22	<i>Pseudomonas sp.</i> RNE10	<i>Bosea sp.</i> RNE2
<i>Micrococcus sp.</i> RNE20	<i>Sinorhizobium sp.</i> RNE21	<i>Leifsonia sp.</i> RNE15
<i>Bacillus firmus</i> RNE19	<i>Bacillus cereus</i> RNE17	<i>Acinetobacter sp.</i> RE51
<i>Sinorhizobium sp.</i> RNE8	<i>Arthrobacter sp.</i> RE50	<i>Rhodococcus sp.</i> RE65
<i>Pseudomonas sp.</i> RNE9	<i>Rhodococcus sp.</i> RE59	<i>Microbacterium sp.</i> RNE5
<i>Pseudomonas sp.</i> RNE14	<i>Arthrobacter sp.</i> RE64	
<i>Aminobacter sp.</i> RE54	<i>Bacillus cereus</i> RE10	
<i>Mesorhizobium sp.</i> RE62	<i>Microbacterium sp.</i> RNE12	

Tabla 3.4: Capacidad de formación de biofilm de los aislamientos en caldo nutritivo evaluada por el método del tubo de ensayo.

Caldo Nutritivo 1/ 30		
Cepas +++	Cepas +	Cepas +/-
<i>Pseudomonas sp.</i> RNE9	<i>Pseudomonas sp.</i> RNE10 <i>Sinorhizobium sp.</i> RNE21 <i>Bacillus cereus</i> RNE17 <i>Arthrobacter sp.</i> RE50 <i>Rhodococcus sp.</i> RE59 <i>Bacillus cereus</i> RE10 <i>Microbacterium sp.</i> RNE12 <i>Rhizobium sp.</i> RNE22 <i>Micrococcus sp.</i> RNE20 <i>Bacillus firmus</i> RNE19 <i>Sinorhizobium sp.</i> RNE 8 <i>Pseudomonas sp.</i> RNE14 <i>Aminobacter sp.</i> RE54 <i>Mesorhizobium sp.</i> RE62 <i>Leifsonia sp.</i> RNE15 <i>Acinetobacter sp.</i> RE51 <i>Rhodococcus sp.</i> RE65	<i>Bosea sp.</i> RNE2 <i>Microbacterium sp.</i> RNE5 <i>Arthrobacter sp.</i> RE64

Tabla 3.5: Capacidad de formación de biofilm de los aislamientos en CN 1/ 30 evaluada por el método del tubo de ensayo.

3.4. Discusión y conclusiones

Este trabajo muestra que microorganismos pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos pueden desarrollarse en un ambiente oligotrófico con una

elevada incidencia de radiaciones ionizantes, como ser el del repositorio nuclear del CAE. Los valores de UFC/ ml obtenidos resultan muy cercanos a los informados por otros autores (Sarro et al. 2005) en ambientes similares. Teniendo en cuenta que se analizó únicamente la población bacteriana cultivable (que se estima entre un 0,1 y un 10% de la población bacteriana total) así como también los sucesivos pasos de descontaminación que fueron efectuados antes de poder realizarse los análisis, se desprende que la población bacteriana real estaría entre 10^2 y 10^4 UFC/ ml.

Los microorganismos aislados pertenecen a cuatro grupos filogenéticos claramente diferenciados (α y γ Proteobacteria, Actinobacteria y Bacilli). Coincidiendo con los resultados obtenidos para el repositorio de almacenamiento de combustibles gastados correspondiente a la Central Nuclear de Cofrentes, España (Sarro et al. 2005); el género más abundante ha sido el género *Bacillus*, en particular *Bacillus cereus*. Este género presenta como características más destacadas la capacidad de formar esporas altamente resistentes a condiciones desfavorables tales como radiación γ , radiación UV, desecación y presencia de H_2O_2 (Setlow y Setlow, 1996; Gioia et al. 2007) así como también la de captar y acumular Mn, Zn, Cs, U y Co (Selenska-Pobell et al. 1999). Cepas de *Bacillus cereus* han mostrado una alta radioresistencia, reflejada en valores de D10 (dosis requerida para matar al 90% de la población bacteriana) de 1 kGy (Farrag et al. 2000).

En segundo lugar se han identificado aislamientos correspondientes al orden Pseudomonadales (géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*). *Pseudomonas* es un género de amplia distribución cuya capacidad de formación de biofilms y producción de sideróforos lo convierten en uno de los principales agentes involucrados en corrosión microbiológica, ya sea directamente (induciendo corrosión en rendijas, despolarización catódica y corrosión galvánica por precipitación de compuestos de hierro) o indirectamente, permitiendo el establecimiento de otras especies (tales como bacterias sulfato reductoras). Por otra parte *Acinetobacter* es un género muy diverso, compuesto de especies

mayormente ambientales entre las que se encuentra *Acinetobacter radioresistens*, caracterizada por su alto nivel de resistencia a la radiación gamma (Nishimura et al. 1988).

Otros microorganismos predominantes han sido los del orden Rhizobiales (géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Aminobacter* y *Bosea*) todos ellos habituales en suelos y aguas continentales. En particular, algunas especies de *Mesorhizobium* se caracterizan por su amplia tolerancia a la presencia de metales (Vidal et al. 2009) o a la temperatura (Gao et al. 2004).

Se han aislado también representantes del orden de los Actinomicetales (géneros *Leifsonia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* y *Microbacterium*). Como características destacadas se encuentran la posibilidad de proliferar en ambientes glaciarios presentada por algunas cepas de *Leifsonia* (Reddy et al. 2008; Pindy et al. 2009), la capacidad de oxidar hierro, manganeso y reducir cromo hexavalente propia de algunas especies de *Arthrobacter* (Megharaj, 2003; Dubinina y Zhdanov, 1975) y la habilidad de proliferar y formar biofilms en repositorios nucleares por parte de cepas de *Microbacterium* (Sarro et al. 2005).

La mayoría de los microorganismos aislados presentan capacidad de formar biofilms sobre vidrio tanto en medio nutritivo como en medio oligotrófico, dependiendo la cantidad de biofilm tanto del aislamiento como del medio considerado. Por este motivo, es de particular importancia analizar el potencial efecto corrosivo de los mismos tomando en consideración no solamente su capacidad de formación de biofilms sino también su representatividad en las muestras.

3.5. Referencias

Chicote E., Garcia A.M., Moreno D.A., Sarró M.I., Lorenzo P.I., Montero F. (2005) Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, V. 32 pp. 155-162.

Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.*, V. 37 pp. 318-26.

Dubinina G., Zhdanov A.V. (1975) Recognition of the iron bacteria "Siderocapsa" as arthrobacter and description of *Arthrobacter siderocapsulatus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, V. 25 pp. 340-350.

Diosi G., Telegdi J, Farkas Gy., Gazso L.G., Bokori E. (2003) Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. *Int. Biodeter. Biodeg.*, V. 51 pp. 151-156.

Farrag H.A., El-Bazza Z.E.M, El-Fouly M.E.D., El-Tablawy S.Y.M.(2000) Effect of gamma radiation on the bacterial flora of *Nigella sativa* seeds and its oil constituents. *Acta Pharmacol.*, V. 50 pp. 195-207.

Gao J.L., Turner S.L., Kan F.L., Wang E.T., Tan Z.Y., Qiu Y.H., Gu J, Terefework Z., Young J.P.W., Lindström K., Chen W.X. (2004) *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, V. 54 pp. 2003-2012.

Gioia J, Yerrapragada S, Qin X, Jang H., Igboeli O.C., Muzny D., Dugan-Rocha S, Ding Y., Hawes A., Liu W., Perez L., Kovar C., Dinh H., Lee S, Nazareth L, Blyth P., Holder M., Buhay C., Tirumalai M.R., Liu Y., Dasgupta I, Bokhetache L, Fujita M., Karouia F., Moorthy P.E., Siefert J, Uzman A., Buzumbo P., Verma A., Zwiya H., McWilliams B.D., Olowu A., Clinkenbeard K.D., Newcombe D., Golebiewski L., Petrosino J.F., Nicholson W.L., Fox G.E.,

Venkateswaran K., Highlander S.K., Weinstock G.M. (2007) Paradoxical DNA repair and peroxide resistance gene conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. PLoS ONE V. 2, e 928.

Holt J G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J T., Williams S. T. (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. (9th ed.). Baltimore, Williams & Wilkins Co.

International Atomic Energy Agency (2003) Corrosion of research reactors aluminum clad spent fuel in water. Technical Reports Series No 418.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson JD., Gibson T.J, Higgins D.G. (2007) ClustalW and ClustalIX version 2. Bioinformatics V. 23 pp. 2947-2948.

Megharaj M. (2003) Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by Bacteria isolated from soil contaminates with tannery waste. Curr. Microbiol., V. 47 pp. 51-54.

Nishimura Y., Ino T., Iizuka H. (1988) *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. Int. J Syst. Bacteriol., V. 38 pp. 209-211.

Pindi P.K., Kishore K.H., Reddy G.S.N., Shivaji S. (2009) Description of *Leifsonia kafniensis* sp. nov. and *Leifsonia antarctica* sp. nov. Int. J Syst. Bacteriol., V. 59 pp. 1348-1352.

Postgate J.R. (1963) Versatile medium for the enumeration of sulfate reducing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., V. 11 pp. 265-267.

Reddy G.S.N., Prabakaran S.R., Shivaji S. (2008) *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. Int. J Syst. Bacteriol., V. 58 pp. 2229-2234.

Santo Domingo J.W., Berry C.J., Summer M., Fliermans C.B. (1998) Microbiology of spent nuclear fuel storage basins. *Curr. Microbiol.*, V. 37 pp. 387-394.

Sarró M.I., Garcia A.M., Moreno D.A. (2005) Biofilm formation in spent nuclear fuel pools and bioremediation of radioactive waste. *Int. Microbiol.*, V. 8 pp. 223-230.

Selenska-Pobell S., Panak P., Miteva V., Boudakov I., Bernhard G., Nitsche H. (1999) Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus* from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiol. Ecol.*, V. 29 pp. 59-67.

Setlow B., Setlow P. (1996) Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *J Bacteriol.*, V. 178 pp. 3486-3495.

Vidal C., Chantreuil C., Berge O., Mauré L., Escarré J., Béna G., Brunel B., Cleyet-Marel J C. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. *Int. J Syst. Bacteriol.*, V. 59 pp. 850-855.

Anexo 3.1

Medios de cultivo

Caldo nutritivo (Nutrient broth Oxoid CM 0001, composición nominal en g/l)

Polvo LabLemco	1,0
Extracto de levadura	2,0
Peptona	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agua MilliQ	llevar a 1 l.

Caldo nutritivo 1/10 (para 1 l)

Caldo nutritivo	100 ml
Agua MilliQ	900 ml

Caldo nutritivo 1/30 (para 1 l)

Caldo nutritivo	33 ml
Agua MilliQ	967 ml

Para preparar los medios sólidos respectivos se añadió a la composición original, agar en una concentración 1,5% p/ v.

Medio Postgate E (g/l)

Solución 1

KH ₂ PO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0

Na ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0
Lactato de sodio	3,5
Extracto de levadura	1,0
Ácido ascórbico	0,1
Ácido tioglicólico,	0,1
Agar	15,0
NaCl	5,0
Agua MilliQ	llevar a 800 ml

Solución 2

CaCl ₂ .6H ₂ O	1 g
Agua MilliQ	100 ml

Solución 3

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Agua MilliQ	100 ml

Las soluciones 1-3 fueron esterilizadas en forma independiente y luego mezcladas. Todos los medios fueron esterilizados por autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo 3.2

Tinción de Gram

Solución 1

Cristal violeta	2,0 g
Fenol	2,0 g
Etanol 96%	10 ml
Agua destilada	90 ml

Solución 2 (Lugol)

Iodo metálico	1,0 g
KI	2,0 g
Agua destilada	200 ml

Solución 3

Etanol 96%	80 ml
Acetona	20 ml

Solución 4

Fucsina básica	1,0 g
Fenol	5,0 g
Etanol 96%	10 ml
Agua destilada	100 ml

Preparar un extendido en un portaobjetos. Fijar con calor. Cubrir con la solución 1 durante 1 minuto. Lavar con agua. Cubrir con la solución 2 durante 1 minuto. Lavar con agua. Cubrir con la solución 3 durante 10 segundos. Lavar con agua. Cubrir con la solución 4 diluida 1:10 durante 30 segundos. Lavar con agua y dejar secar al aire. Observar al microscopio morfología y color (violeta: Gram +, rosado: Gram -).

Tinción de esporas

Solución 1

Verde de malaquita	5,0 g
Agua destilada	100 ml

Solución 2

Safranina	0,5 g
Agua destilada	100 ml

Preparar un extendido en un portaobjetos. Fijar con calor. Cubrir con la solución 1. Calentar en llama 5 minutos. Lavar con agua. Cubrir con la solución 2 durante 1 minuto. Lavar con agua y dejar secar al aire. Observar al microscopio presencia y ubicación de esporas. Esporas verdes sobre fondo rosado-naranja.

Prueba de oxidasa

Aplicar con ansa una colonia del microorganismo sobre papel de filtro embebido en una suspensión acuosa de oxalato de p-aminodimetilanilina (Difco) de color ligeramente rosado. El desarrollo de color azul-violeta intenso (reacción positiva) indica la presencia de la actividad oxidasa.

Prueba de catalasa

Colocar una gota de agua en un portaobjetos. Añadir el microorganismo con ansa y suspenderlo en el agua. Agregar 2 gotas de peróxido de hidrógeno 6%. Prueba positiva: formación de burbujas (desprendimiento de O₂). Prueba negativa: ausencia de burbujas.

Producción de lecitinasa

Agar yema de huevo (g/ l)

Peptona	30,0
NaCl	2,0
Na ₂ HPO ₄	5,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2
Agar	25,0
Glucosa	2,0
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Mezclar y calentar a ebullición. Ajustar pH a 7,3. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 60 °C. Añadir una yema de huevo por cada 500 ml de medio. Homogenizar. Preparar placas de Petri con el medio. Sembrar el microorganismo e incubar a la temperatura indicada. Reacción positiva: halo de precipitación alrededor de la siembra. Reacción negativa: ausencia de halo.

Motilidad

Esta propiedad se determina por observación de los microorganismos vivos al microscopio de contraste de fase. Se los clasifica en organismos con motilidad (positivo) o sin ella (negativo). Debe diferenciarse la verdadera motilidad del movimiento browniano o del flujo de líquido debajo del cubreobjeto. Las bacterias móviles efectúan movimientos direccionales y cambios de posición unas respecto de otras.

Reducción de nitratos

Caldo Nitrato (g/ l)

Extracto de levadura	0,1
Peptona de caseína	1,0
KNO ₃	1,0
K ₂ HPO ₄	0,2
NaCl	3,0
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Reactivo A

α -Naftilamina	5,0 g
Ácido acético glacial 30%	1000 ml

Reactivo B

Ácido sulfanílico	8,0 g
Ácido acético glacial 30%	1000 ml

Autoclavar el caldo nitrato a 121 °C durante 15 minutos. Preparar tubos de ensayo. Inocular con un cultivo fresco. Incubar a la temperatura deseada entre 24 h y 5 días. Agregar 5 gotas de reactivo A y 5 gotas de reactivo B. Mezclar suavemente. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente. Observar aparición de color: color rojo indica resultado positivo (reducción de nitrato a nitrito). Si no hay cambios de color entonces agregar una punta de espátula de polvo de zinc. La aparición de color rojo indica resultado negativo. La ausencia de color indica resultado positivo ya que el nitrato se redujo a nitrógeno gaseoso.

Producción de pigmento

Medio King A (g/ l)

Peptona de proteasa	20,0
---------------------	------

K ₂ SO ₄	10,0
MgCl ₂ 6H ₂ O	3,5
Glicerol	10,0 ml
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Medio King B

Peptona de proteasa N°3	20,0
K ₂ HPO ₄ anhidro	1,5
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,5
MgCl ₂ 6H ₂ O	3,5
Glicerol	15,0 ml
Agua destilada	llevar a 1000 ml.

Autoclavar los medios a 121 °C durante 15 minutos. Dispensar en tubos. Inocular la cepa en cada uno de los medios e incubar en las condiciones adecuadas. Observar a la luz ultravioleta (365 nm). Fluorescencia en el cultivo en medio King A indica expresión de piocianina y en medio King B indica producción de pioverdina.

Capacidad de oxidar /fermentar carbohidratos

Medio Hugh y Leifson (OF) (g/ l)

Peptona de caseína	2,0
Extracto de levadura	1,0
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	0,2
Azul de bromotimol	0,08

Agar	2,5
Agua destilada	llevar a 900 ml
Solución de carbohidrato 10%	100 ml

Autoclavar el medio sin carbohidratos a 121 °C durante 15 minutos. Esterilizar la solución de carbohidrato por filtración y añadir al medio. Preparar pares de tubos de ensayo. Sellar uno de ellos con parafina estéril. Inocular las cepas por punción (una cepa por par de tubos). Incubar al menos 48 h a la temperatura óptima. Ambos tubos color amarillo: fermentación. Tubo abierto amarillo y tubo sellado sin cambios: oxidación. Ambos tubos sin cambios: no emplea el carbohidrato.

Capacidad de usar citrato como única fuente de carbono

Agar citrato (g/ l)

(NH ₄)H ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄	0,02
K ₂ HPO ₄	1,0
Azul de Bromotimol	0,08
NaCl	5,0
Agar	15,0
Citrato de sodio	2,0
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Preparar tubos de vidrio con el medio. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar inclinados. Sembrar por estría en la superficie. Incubar a la temperatura óptima. Reacción positiva: color azul. Reacción negativa: sin cambios de color (verde).

Capacidad de degradar Tween 80

Caldo de hidrólisis de Tween 80 (g/ l)

Na ₂ HPO ₄	5,8
NaH ₂ PO ₄	3,5
Rojo neutro	0,02
Agua destilada	995,0 ml
Solución de Tween 80 (20%)	5,0 ml

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos en forma independiente la solución de Tween 80 y el resto del medio. Mezclar en esterilidad. Distribuir en tubos, sembrar e incubar en las condiciones adecuadas durante 5 días. Positivo: el medio pasa de rosado a rojo.

Presencia y cuantificación de actividad de β galactosidasa

Buffer Z (g/ 100 ml)

Na ₂ HPO ₄	1,07
NaH ₂ PO ₄	0,48
KCl	0,075
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,025
β-mercaptoetanol	0,27 ml
Agua destilada	llevar a 100 ml luego de ajustar el pH a 7,0. Mantener en heladera. No esterilizar.

Solución de SDS 0,1%

SDS	10 mg
Agua destilada	10 ml

Solución de Na₂CO₃ 1M

Na ₂ CO ₃	2,12 g
Agua destilada	20 ml

Solución de ONPG (mg/ ml)

ONPG	4,0
Buffer Z	1,0 ml

Preparar fresco antes de usar.

Enfriar el cultivo a ensayar en hielo. Medir A_{650} . Diluir el cultivo para tener una absorbancia aproximada de 0,5. Mantener en hielo y medir $A_{650\text{nm}}$ de la dilución. Preparar tubos conteniendo cada uno 20 μl de la solución de SDS y 40 μl de cloroformo. Agregar a cada tubo 0,1 a 0,5 ml de cultivo diluido y llevar a 1 ml con buffer Z. Agitar 10 segundos y colocar en baño a 28 °C durante 10 minutos. Volver a agitar y colocar en el baño durante 5 minutos. Agregar a cada tubo 0,2 ml de solución de ONPG esperando 15 segundos entre tubo y tubo. Agitar y dejar en el baño. Incubar hasta 24 h. Ante la aparición de color amarillo intenso cortar la reacción con la solución de Na₂CO₃. Agitar y dejar decantar el cloroformo. Sin remover el cloroformo retirar 1 ml y centrifugar a 8000 rpm. Pasar el sobrenadante a cubetas y medir $A_{420\text{nm}}$. Calcular la actividad mediante la fórmula: $1000 \times A_{420\text{nm}} / \text{tiempo (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times A_{650\text{nm}}$.

Capacidad de degradar gelatina

Permite determinar la actividad proteolítica en bacterias mediante la hidrólisis de gelatina contenida en el medio de crecimiento. Las bacterias se siembran en agar-gelatina (agar nutritivo suplementado con gelatina 5%) y se incuban durante 20 h a 25 °C. Sobre el medio que presenta crecimiento se agrega una solución de cloruro de mercurio 15% en ácido clorhídrico 6% como revelador. La adición del revelador produce la precipitación de gelatina en el medio. Una reacción positiva está indicada por la presencia de un halo claro alrededor de las colonias

Hidrólisis de esculina

Agar suplementado con esculina (g/ l)

Bacto peptona	5,0
Extracto de levadura	1,0
Citrato férrico	0,05
Agar	15,0
Esculina	0,1
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Distribuir en tubos. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Inocular e incubar en las condiciones adecuadas durante 7 días. Positivo: ennegrecimiento.

Hidrólisis de ADN

Permite determinar si la bacteria presenta la enzima ADNasa, responsable de hidrolizar ADN. Se siembra la especie en estudio en agar-ADN (medio nutritivo con ADN 0,2 g/ l). El cultivo se incuba durante 20 h. Se agrega ácido clorhídrico 6 M como revelador, cubriendo todo el cultivo. El ADN presente en el medio precipita ante el revelador. La presencia de un halo claro alrededor de la colonia indica un resultado positivo.

Producción de H₂S, indol y motilidad

Medio SIM (g/ l)

Peptona de caseína	20,0
Peptona de carne	6,6
Citrato de hierro y amonio	0,2
Tiosulfato de sodio	0,2
Agar	3,0
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Reactivo de Kovac

Alcohol isoamílico	75 ml
HCl concentrado	25 ml
Dimetilaminobenzaldehido	5.0 g

Preparar tubos de vidrio con el medio. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Sembrar por punción. Sembrar e incubar a la temperatura adecuada. Motilidad positiva: turbidez en todo el tubo. Motilidad negativa: turbidez en línea de siembra. Producción de H₂S positiva: ennegrecimiento. Agregar 5 gotas de reactivo de Kovac. Producción de indol positiva: anillo rojo en la superficie del tubo.

Crecimiento en TCBS (Medio diferencial para Vibrio spp.)

Agar TCBS (composición nominal g/ l)

Sacarosa	20,0
Agar	14,0
NaCl	10,0
Citrato de sodio	10,0

Na ₂ S ₂ O ₃	10,0
Extracto de levadura	5,0
Digesto pancreático de caseína	5,0
Digesto péptico de tejido animal	5,0
Bilis de buey deshidratada	5,0
Clorato de sódio	3,0
Citrato férrico	1,0
Azul de timol	0,04
Azul de bromotimol	0,04
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Calentar hasta ebullición. No autoclavar. Preparar placas de Petri. Sembrar e incubar a la temperatura indicada. Positivo: crecimiento. Negativo: ausencia de crecimiento.

Capacidad de degradar almidón

Agar almidón g/ l

Extracto de levadura	3,0
Almidón soluble	5,0
Peptona	3,0
Agar	12,0
Agua destilada	llevar a 1000 ml

Autoclavar 121 °C durante 15 minutos. Preparar placas. Sembrar e incubar a la temperatura adecuada 48 hs. Revelar con lugol. Positivo: área clara alrededor del cultivo.

Capacidad de degradar urea

Medio para detección de ureasa (g/ l)

Peptona	1,0
NaCl	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
Glucosa	1,0
Rojo de fenol	0,012
Agar	15,0
Agua destilada	llevar a 900 ml
Solución de urea 20%	100 ml

Preparar tubos de vidrio con el medio. Autoclavar el medio sin urea a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 60°C y agregar la solución de urea esterilizada por filtración. Inocular e incubar 24 hs a la temperatura adecuada. Reacción positiva (degradación rápida): todo el tubo pasa de amarillo a rojo. Reacción positiva (degradación lenta): Coloración roja en superficie. Reacción negativa: sin cambios de color.

Método del cristal violeta para la determinación de biofilms (también llamado método del tubo de ensayo o del violeta de genciana).

Se preparan cultivos secundarios de las cepas a evaluar en tubos de ensayo y se incuban a la temperatura de interés por el tiempo requerido. Luego de la incubación, se vuelcan los cultivos y se realizan dos lavados con solución fisiológica estéril (NaCl 0,9% en agua MilliQ). Se dejan secar los tubos invertidos. Se agrega a cada tubo solución de cristal violeta 0,1% en agua MilliQ, considerando un volumen superior al de cultivo. Se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se vuelcan los tubos y se realizan tres lavados con agua destilada. Se dejan secar los tubos invertidos toda la

noche. Se recupera el colorante añadiendo volúmenes iguales de ácido acético 30% y etanol 96% y agitando mediante vortex. Se mide absorbancia a 575 nm.

Método del cristal violeta para la determinación de biofilms modificado para microplacas de 96 pocillos

Se preparan cultivos en tubos de ensayo de las cepas a evaluar y se dejan crecer hasta alcanzar fase estacionaria. Se realizan diluciones 1:100 de los cultivos en el medio a evaluar. Se agregan 100 µl de cultivo diluido por pocillo. Se consideran cuatro pocillos por cultivo. Se tapa la placa y se incuba a la temperatura de interés por el tiempo requerido. Luego de la incubación se vuelca la placa y se realizan dos lavados con agua destilada de manera de eliminar los microorganismos planctónicos. Se añaden 125 µl de solución de cristal violeta 0,1% en agua MilliQ por pocillo. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Se vuelca la placa y se realizan 2 lavados con agua destilada. Se deja secar la placa invertida. Se agregan 200 µl de etanol 96% por pocillo. Se incuba a temperatura ambiente 10 minutos. Se resuspende el colorante de cada pocillo usando una pipeta. Se transfieren 125 µl del contenido de cada pocillo a un pocillo nuevo de un microplaca limpia. Se mide absorbancia a 500-600 nm mediante un lector de placas.

Anexo 3.3

Preparación del cepario en agar blando

Agar blando (g/ l)

Caldo nutritivo 1000 ml

Agar 7,0 g

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Dispensar 1 ml de medio en viales estériles de 2 ml. Dejar solidificar. Inocular con la cepa. Incubar en las condiciones adecuadas. Sellar con Parafilm y almacenar.

Criopreservación de cultivos

Cultivar la cepa en medio líquido hasta llegar a fase estacionaria. Agregar 220 µl de glicerina esterilizada mediante autoclave a viales de 2 ml. Agregar 780 µl de cultivo a cada vial. Cerrar bien. Mezclar mediante un vortex. Poner en hielo. Una vez completados todos los viales, almacenar a -80 °C.

Capítulo 4: Caracterización de la cepa *Bacillus cereus* RE 10

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en **Forte Giacobone A.F.**; Rodríguez, S.A., Burkart, A.L., Pizarro, R.A. (2011) Microbiological Induced Corrosion of AA 6061 nuclear alloy in high diluted media by *Bacillus Cereus* RE 10. Int. Biodet. Biodeg. V. 65 pp. 1161-1168.

4.1. Introducción

En el presente capítulo se describe la caracterización de la cepa *Bacillus cereus* RE10. La misma fue considerada de particular importancia debido tanto a su presencia mayoritaria en el repositorio del CAE (tal como fue descrito en el capítulo 3 de este trabajo) como a la existencia de numerosos antecedentes (Rajasekar y Ting 2010; Hagenauer et al. 1994) que relacionan este microorganismo con la corrosión microbiológica de aleaciones de aluminio.

Se evaluó la capacidad de crecer y formar biofilms de *Bacillus cereus* RE10 ante dos situaciones claramente diferenciadas desde el punto de vista nutricional, dadas por un medio rico y el mismo medio extremadamente diluido. Por otra parte, y teniendo en cuenta la presencia de microambientes de diferentes pHs en la aleación de aluminio AA6061 en medio acuoso como consecuencia de la activación de inclusiones (Alodan y Smyrl, 1998, Park et al. 1996, Szklarska-Smialowska, 1996; Nisancioglu, 1990), se analizó la capacidad de sobrevivir, proliferar y producir proteasa alcalina extracelular de *Bacillus cereus* RE10 a diferentes pH tanto en medio rico como oligotrófico.

4.2. Experimental

4.2.1. Reactivos

Los medios de cultivo utilizados corresponden a la marca OXOID. El agua que se utilizó fue destilada y pasada luego por un sistema MilliQ. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

4.2.2. Evaluación de crecimiento a diferentes pH y concentraciones de nutrientes

Se realizaron cultivos primarios de *B. cereus* RE 10 en caldo nutritivo diluido 30 veces (CN 1/30) a partir de cultivos en placa frescos (48 h) y se incubaron con agitación a 25 °C por 24 h. Se realizaron cultivos secundarios, con una $A_{650\text{nm}}$ inicial de 0,01 aproximadamente y se incubaron sin agitación a 25 °C. Se midieron $A_{650\text{nm}}$ y unidades formadoras de colonias (UFC), esto último mediante recuento en placas de agar nutritivo a diferentes intervalos con el fin de evaluar la cinética de crecimiento de la cepa. La composición de los medios se detalla en el anexo 3.1. De igual forma a la descrita anteriormente, se prepararon cultivos primarios en caldo nutritivo (CN) y CN 1/30, a partir de los cuales se realizaron cultivos secundarios ($A_{650\text{nm}}$ inicial de 0,01 aprox.) en dichos medios sin suplementar (pH inicial 7,0) o suplementados con diferentes soluciones reguladoras de pH, tal como se detalla en la Tabla 4.1. Se evaluaron crecimiento (mediante $A_{650\text{nm}}$ y UFC) y producción de proteasa alcalina extracelular. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Medio	Buffer	pH inicial
Caldo nutritivo	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ , 100 mM	6,0
Caldo nutritivo	Tris, 50mM	8,1
Caldo nutritivo	Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ , 100 mM	9,3
Caldo nutritivo 1/ 30	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ , 100 mM	6,0
Caldo nutritivo 1/ 30	Tris, 50mM	8,2
Caldo nutritivo 1/ 30	Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ , 100 mM	9,1

Tabla 4.1: Medios de cultivo suplementados con diferentes soluciones reguladoras de pH (buffers) empleados para evaluar crecimiento de *B. cereus* RE10.

4.2.3. Evaluación de proteasa alcalina extracelular

La evaluación de la capacidad de producción de proteasa alcalina extracelular mediante el método de agar leche se detalla a continuación:

Se preparan placas de Agar leche (composición: Agar-agar 1%, leche descremada 5% en buffer fosfato 0,1 M pH 8). Se realizan agujeros en el agar con un sacabocado estéril. Se centrifugan 500 µl de cultivo (o de medio de cultivo para los blancos) a 8000 g durante 10 minutos a 25 °C, de manera de precipitar las células. Se toman 50 µl de sobrenadante y se los siembra dentro del agujero. Luego de 24 hs se observa la presencia y el tamaño del halo de precipitación. El ensayo se realizó por duplicado.

4.2.4. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms.

La capacidad de formar biofilms de las cepas aisladas fue evaluada, tanto en CN como en CN 1/ 30, mediante el método del tubo de ensayo (Christensen et al. 1982) a los 2, 7 y 14 días. El colorante Violeta de Genciana fue resuspendido empleando cantidades iguales de etanol 96% seguido de ácido acético 30% y se midió A_{575} como forma de cuantificar comparativamente la cantidad de biofilm. El ensayo se realizó por duplicado. Por otra parte, se evaluó la formación de biofilm en ambos medios mediante el método del tubo de ensayo modificado para microplacas de 96 pocillos (Merrit et al. 2005), en cultivos de 6 días a 25 y 37 °C. El colorante fue recuperado con etanol 96% y se midió A_{550nm} . Esta evaluación se realizó por cuadruplicado.

4.3. Resultados

4.3.1. Evaluación de crecimiento a diferentes pH y concentraciones de nutrientes

Tal como se desprende de la Figura 4.1, se determinó que un cultivo secundario de *Bacillus cereus* RE10 en CN 1/ 30 a 25 °C sin agitación se encuentra en fase estacionaria a las 24 h, manteniéndose en ese estado durante al menos 20 días sin pérdida significativa de la viabilidad. Al evaluarse la capacidad de proliferación y supervivencia de *B. cereus* RE 10 a 25°C sin agitación a diferentes pH, se observa que la cepa estudiada es capaz de crecer a pH entre 6 y 8 tanto en CN como CN 1/ 30 mientras que a pH 9 existe supervivencia en CN 1/ 30 aún después de 6 días aunque no hay proliferación. Por último, cuando se realizó el experimento en CN el efecto fue mas notorio que en CN 1/ 30, ya que

además de que no hay proliferación también la viabilidad se ve severamente afectada (Figura 4.2).

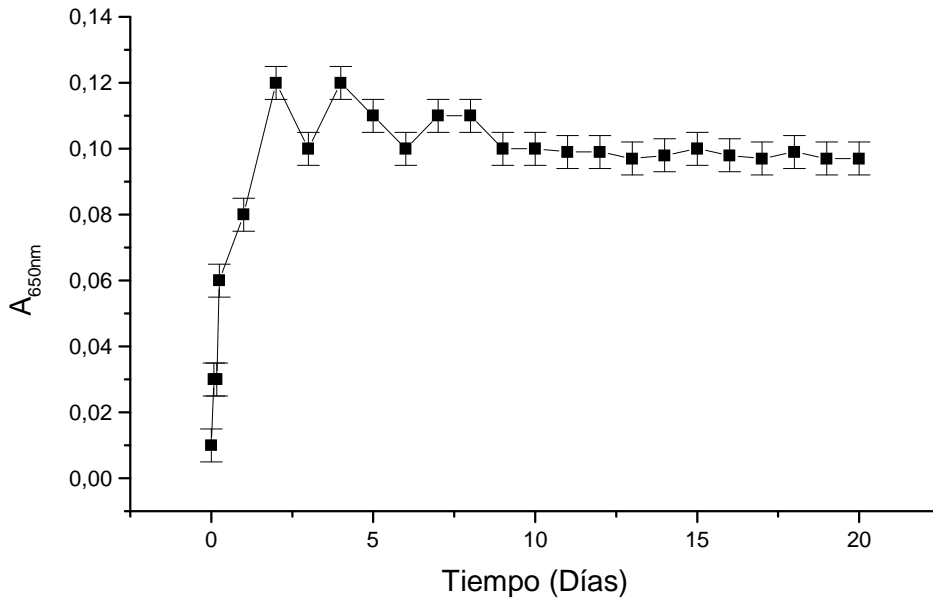


Figura 4.1: Curva de crecimiento de *B. cereus* RE 10 en CN 1/ 30 a 25 °C sin agitación. En las condiciones del ensayo, $A_{650nm} = 0,07$ equivale a 10^6 UFC/ ml para un cultivo en fase estacionaria.

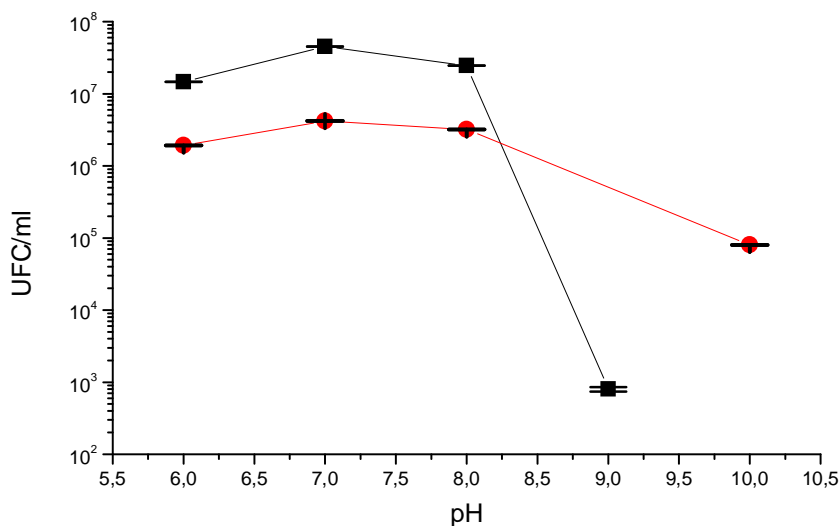
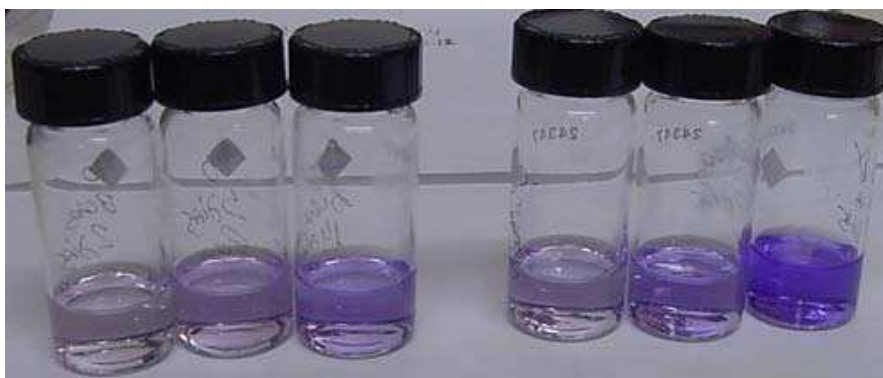


Figura 4.2: Crecimiento de *B. cereus* RE 10 en función del pH final para un cultivo de 6 días a 25 °C. Cuadrados: CN. Círculos: CN 1/ 30.

4.3.2. Evaluación de la capacidad de formación de biofilm

Al evaluarse la capacidad de formación de biofilm de *B. cereus* RE10 a 25 °C en una superficie de vidrio mediante el método del tubo de ensayo, no se observó (Figura 4.3) biofilm detectable a los dos días de iniciado el experimento en ninguno de los dos medios evaluados, mientras que luego de ese tiempo existió un aumento en la cantidad de biofilm. Las diferencias entre ambos medios se evidencian recién al considerar periodos largos de tiempo (14 días) y están dadas por la cantidad final de biofilm formado, la que es mayor al ser mayor la disponibilidad de nutrientes.



Días	2	6	14	2	6	14
A _{575 nm}	0,0	0,06	0,13	0,0	0,06	0,3

Figura 4.3: Evaluación del desarrollo de biofilm por *Bacillus cereus* RE10 en caldo nutritivo (A) y en (B) caldo nutritivo diluido 30 veces. Experimento representativo.

De manera similar, la evaluación de la capacidad de formación de biofilm en microplacas mediante el método del tubo de ensayo modificado muestra que, a los 6 días de iniciado el ensayo, las diferencias entre la cantidad de biofilm formado en CN y CN 1/ 30 a 25 °C, no resultan significativas (Tabla 4.2).

Al evaluarse por el mismo método de microplacas las diferencias en la cantidad de biofilm formado en función de la temperatura, se observa que a 37 °C, no se detecta biofilm en ninguno de los dos medios analizados (Tabla 4.2).

Medio	T °C	A _{550nm}	Desvío estándar, (n=4)
CN	25	0,170	0,08
CN	37	n.d.	----
CN 1/ 30	25	0,133	0,05
CN 1/ 30	37	n.d.	----

Tabla 4.2: Evaluación de la cantidad de biofilm mediante el método del tubo de ensayo modificado para microplacas, n.d.: no se detecta.

4.3.3. Evaluación de la producción de proteasa alcalina extracelular

La evaluación de proteasa alcalina extracelular luego de 6 días de incubación mediante el método de agar leche muestra una producción similar a pH 7 y 8 (4 -5 mm de halo de inhibición aprox.), siendo en ambos casos marcadamente superior a lo observado a pH 6 (1,5 mm de halo de inhibición aprox.). Por otra parte en CN 1/ 30, se encontró producción de proteasa alcalina a pH 6, 7 y 8 no pudieron establecerse diferencias significativas entre ellos (0,7 mm de halo de inhibición aprox.). A pH 9 no existe producción de proteasa alcalina en ninguno de los medios considerados.

4.4. Discusión

Se determinó que *B. cereus* RE 10 es capaz de proliferar y sobrevivir a pHs de entre 6 y 8 tanto en CN como en CN 1/30. A pH 9 no existe proliferación, tanto en presencia de alta o baja concentración de nutrientes, pero la supervivencia es mayor en el medio oligotrófico (CN 1/30), lo que estaría relacionado posiblemente con el mayor contenido de esporas del inóculo primario.

La producción de proteasa alcalina extracelular es mayor a pH 7 y 8 que a pH 6 en CN, lo que sería un indicador a favor de un cambio en el patrón de expresión de esta enzima en función del pH. Sin embargo, no fue posible establecer diferencias significativas en CN 1/30.

En cuanto a la capacidad de formación de biofilms de la cepa estudiada, los resultados indican que *B. cereus* RE 10 es capaz de formar biofilms a 25 °C aún en un medio con una baja concentración de nutrientes, sin embargo la cantidad final de biofilm formado depende del medio, siendo mayor en CN que en CN 1/30. Por otra parte, a 37 °C *B. cereus* RE 10 no es capaz de formar biofilms en ninguno de los dos medios analizados.

4.5. Referencias

Alodan M. A., Smyrl W. H. (1998) Detection of localized corrosion of aluminum alloys using fluorescence microscopy. *J Electrochem. Soc.*, V. 145 pp. 1571-1577.

Hagenauer A., Hilpert R., Hack T. (1994) Microbiological investigations of corrosion damages in aircraft. *Mater. Corros.*, V. 45 pp. 355–360.

Merrit J.H., Kadouri D.E., O Toole G.A. (2005) *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley and Sons (Eds).

Nisancioglu K. (1990) Electrochemical behavior of aluminum-base intermetallics containing iron. *J Electrochem. Soc.*, V. 137 pp. 69-77.

Park J.O., Paik C.H., Alkire R.C. (1996) Scanning microsensors for measurement of local pH distributions at the microscale. *J Electrochem. Soc.*, V. 143 pp. 174-176.

Rajasekar A., Ting Y.P. (2010) Microbial corrosion of aluminum 2024 aeronautical alloy by hydrocarbon degrading bacteria *Bacillus cereus* ACE4 and *Serratia marcescens* ACE2. *Ind. Eng. Chem. Res.*, V.49 pp. 6054-6061.

Szklarska-Smialowska Z. (1999). Pitting corrosion of aluminum. *Corros. Sci.*, V. 41 pp. 1743-1767.

Anexo 4.1

Preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica de barrido

Incubar las muestras en glutaraldehído 2,5% durante 3 h a 25 °C. Reemplazar la solución de glutaraldehído por agua destilada e incubar a 4 °C durante 10 minutos. Reemplazar el agua por agua destilada limpia y volver a incubar a 4 °C durante 10 minutos. Reemplazar el agua por etanol 70% e incubar a 4 °C durante 10 minutos. Reemplazar el etanol 70% por etanol 96% e incubar a 4 °C durante 10 minutos. Reemplazar el etanol 96% por etanol 100% e incubar a 4 °C hasta el momento de metalizar (entre 1 y 24 h).

Capítulo 5: Ensayos de inmersión de la cepa *Bacillus cereus* RE 10 sobre AA6061 y Al 99,999%

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en **Forte Giacobone A.F.**; Rodríguez, S.A., Burkart, A.L., Pizarro, R.A. (2011) Microbiological Induced Corrosion of AA 6061 nuclear alloy in high diluted media by *Bacillus Cereus* RE 10. Int. Biodet. Biodeg. V. 65 pp. 1161-1168.

5.1. Introducción

En el presente capítulo se describe el efecto, desde el punto de vista de la corrosión, de la cepa *Bacillus cereus* RE10 sobre AA6061 y Al 99.999% en un medio oligotrófico con una concentración de NaCl (2,8mM). Esta concentración resulta inferior a la requerida para inducir corrosión de tipo picado en Al 99,99 % al potencial de corrosión, en medio acuoso aireado a 25 °C (Galvele y De Micheli, 1970). Por otra parte el empleo de un medio oligotrófico responde a la necesidad de acercarse a las condiciones presentes en el repositorio nuclear del CAE. Por último se discute una hipótesis que podría explicar el fenómeno observado.

5.2. Experimental

5.2.1. Reactivos

Los medios de cultivo utilizados corresponden a la marca OXOID. El agua que se utilizó posee calidad MilliQ. Todos los reactivos empleados poseen grado analítico.

5.2.2. Caracterización y procesamiento de las muestras metálicas.

El material empleado proviene de los residuos de de la fabricación de placas de elementos combustibles nucleares, preparados con aleación de aluminio AA6061. Estos residuos, dados por los extremos de las placas, no poseen material radiactivo incorporado pero presentan la misma terminación superficial que los elementos combustibles finales.

La composición química de la aleación cumple los requisitos especificados en la norma ASTM 6061, los cuales se detallan a continuación (expresados en % p/ p.): Mg 0,95% -1,10 %, Si 0,55% -0,65%, Fe: 0,15% -0,45%, Cu: 0,2% -0,4%, Cr: 0,10% -0,2%; Mn: 0,1%, Zn: 0,25%, Ti: 0,03% -0,07% y Al hasta completar 100%. A su vez se emplearon probetas de aluminio puro (Al 99,999%).

Las probetas metálicas, de dimensiones aproximadas 10 mm x 10 mm x 3 mm, fueron pulidas mecánicamente en forma secuencial con una serie de papeles de esmeril (grados 220, 320, 400, 600, 1000, y 1500) seguido de pasta de diamante de 3 μ m hasta obtener un acabado en espejo. Las muestras pulidas fueron caracterizadas al microscopio metalográfico, y luego desengrasadas con

detergente, lavadas con agua, desengrasadas nuevamente con acetona, enjuagadas con etanol, secadas con aire caliente y mantenidas en desecador hasta el momento del ensayo. Antes de iniciar los ensayos, las probetas fueron esterilizadas mediante inmersión en etanol 98% seguido de flameo.

5.2.3. Desarrollo de los ensayos de inmersión

Se cultivó *B. cereus* RE 10 en caldo nutritivo diluido 30 veces (CN 1/ 30). Los cultivos fueron incubados con agitación a 25 °C por 24 h. A partir de ellos, se efectuaron cultivos secundarios con una D.O._{650nm} inicial de 0,01, en frascos Schott de 250 ml conteniendo 150 ml de CN 1/ 30. La composición del medio se detalla en el anexo 3.1.

Los ensayos fueron llevados a cabo según el siguiente diseño experimental:

-Sistema 1: Frasco Schott de 250 ml conteniendo 150 ml de cultivo secundario de *B. cereus* RE 10.

-Sistema 2: Similar al sistema 1 pero se omitió el inóculo bacteriano.

Las probetas metálicas fueron suspendidas mediante hilo de teflon estéril en ambos sistemas (de manera de quedar completamente sumergidas) e incubadas a 25 °C sin agitación durante 20 días.

Luego de 4, 7, 11 y 20 días de incubación las muestras de AA6061 fueron retiradas, enjuagadas con buffer fosfato salino pH 7,0 (PBS) y evaluadas por los métodos que se detallan a continuación. Los cupones de Al 99,999% fueron evaluados únicamente luego de una exposición de 20 días.

5.2.4. Estudio del biofilm mediante métodos disruptivos.

Una vez concluido el ensayo, se raspó una de las caras de las probetas, se resuspendió el biofilm en solución fisiológica (NaCl 0,9%) y se evaluó su viabilidad mediante la técnica de recuento en placa. Los datos fueron expresados como UFC/ cm².

5.2.5. Estudio del biofilm. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de dispersión por rayos X (EDAX).

Las características morfológicas del biofilm así como también la integridad de la superficie metálica fueron evaluadas mediante SEM EDAX (equipo: FEI Quanta 200, EDAX DX4), para lo cual las muestras fueron fijadas con glutaraldehído, deshidratadas con etanol y metalizadas con oro, según el procedimiento detallado por Hamilton (Hamilton et al, 2003) y descrito en el Anexo 4.1.

5.2.6. Estudio del biofilm. Microscopía confocal láser de fluorescencia (CFLM).

Con el objetivo de estimar el espesor de los agregados biofilm-óxidos, las muestras fueron teñidas con solución de naranja de acridina 0,1% durante 5 minutos, lavadas dos veces con PBS pH 7,0, secadas al aire y examinadas mediante un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV300.

5.2.7. Análisis de la superficie por SEM -EDAX.

Los productos de corrosión y el biofilm fueron removidos mecánicamente mediante cepillado, desengrasado con detergente y ultrasonido con etanol 96% durante 15 minutos. La topografía de la superficie de las probetas y la composición elemental de las regiones corroídas fueron evaluadas mediante SEM-EDAX.

5.2.8. Evaluación de la profundidad de ataque.

Se realizaron cortes longitudinales de probetas a lo largo del eje mayor de una picadura, se incluyeron las probetas en resina acrílica y se las pulió a espejo para revelar la morfología de ataque. Por último, las características morfológicas y la composición elemental dentro de las picaduras fueron evaluadas mediante SEM-EDAX.

5.3. Resultados

5.3.1. Evaluación del efecto corrosivo de la cepa *B. cereus* RE 10 sobre AA6061 de uso nuclear y Al 99,999%.

En la Figura 5.1.A se observan probetas de AA6061 expuestas al sistema 1 (probeta izquierda, con microorganismos) y al sistema 2 (probeta derecha, sin bacterias), mientras que la Figura 5.1.B muestra probetas de Al 99,999% expuestas a los mismos medios. En todos los casos los productos de corrosión y el biofilm han sido eliminados mediante limpieza mecánica. De esta figuras se desprende que *B. cereus* RE 10 puede inducir daño localizado observable en

forma macroscópica en AA6061 pero no en Al 99,999%. La densidad de picaduras, determinada en base al análisis de 10 probetas se estimó entre 1 y 3 picaduras/ cm², siendo su distribución de tipo aleatoria.

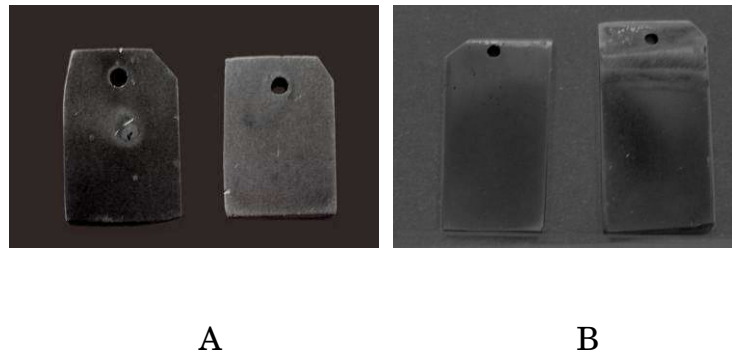
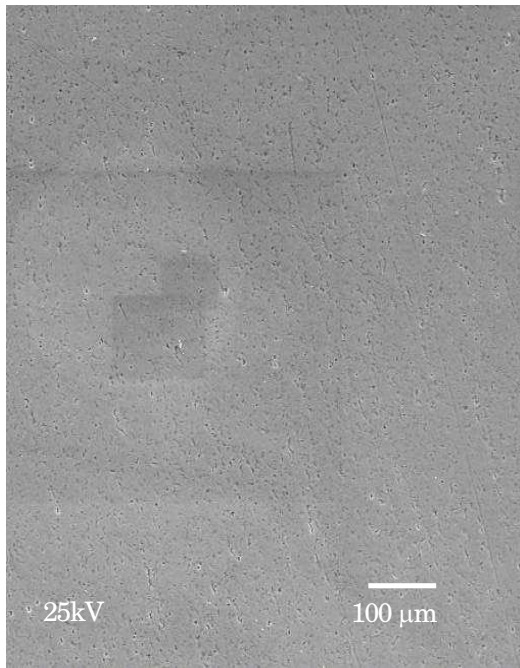
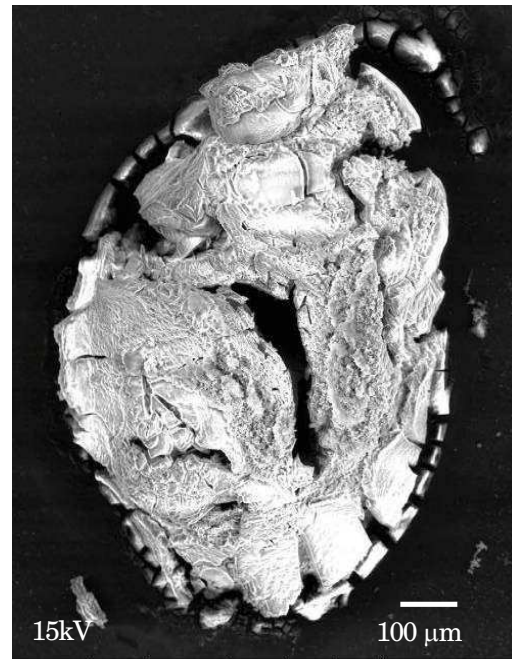


Figura 5.1: Probetas de AA6061 (A) y Al 99.999% (B) expuestas a un cultivo de *B. cereus* RE 10 en CN 1/ 30 (izquierda) o a CN 1/ 30 estéril (derecha) a 25 °C sin agitación durante 20 días.

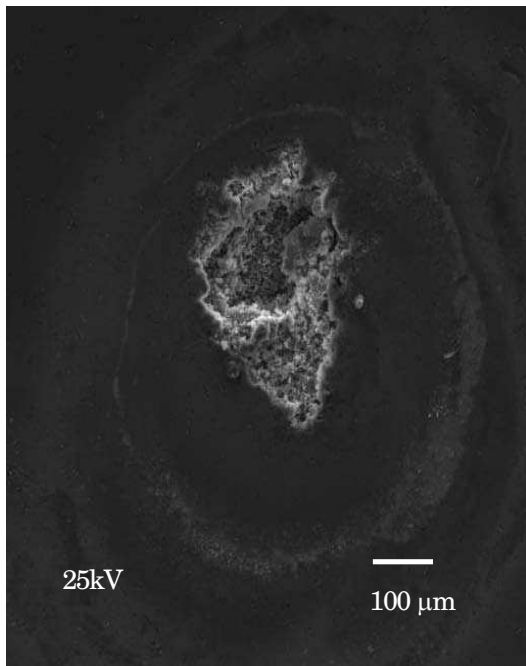
La Figura 5.2 muestra el resultado de la observación por SEM de la superficie de probetas de AA6061 antes y después de la remoción de los productos de corrosión. Las probetas expuestas al sistema con bacterias presentan agrupaciones de productos de corrosión y biomasa que conforman un depósito blanco, denso, de tipo globular, pulverulento y frágil (Figura 5.2.B). Debajo de dichos depósitos se encuentran grandes zonas atacadas en forma de picaduras no cristalográficas recubiertas por óxidos (Figura 5.2.C). Por otra parte, no se encontraron ni depósitos ni picaduras en las probetas expuestas al medio estéril (Figura 5.2.A).



A



B



C

Figura 5.2: Micrografía SEM de depósitos de corrosión sobre la superficie de probetas de AA6061 expuestas a (A) CN 1/ 30 estéril como control o (B) *B. cereus* RE10. (C) Micrografía de picaduras luego de la remoción de productos de corrosión.

En la Figura 5.3 se observa la sección transversal de una picadura, la cual muestra una morfología en forma de túneles, característico de picado asistido por microorganismos. La profundidad máxima de dicha picadura fue determinada en 70 μm . El análisis por EDAX de la superficie interna reveló la presencia de óxidos y de silicio dentro de las picaduras.

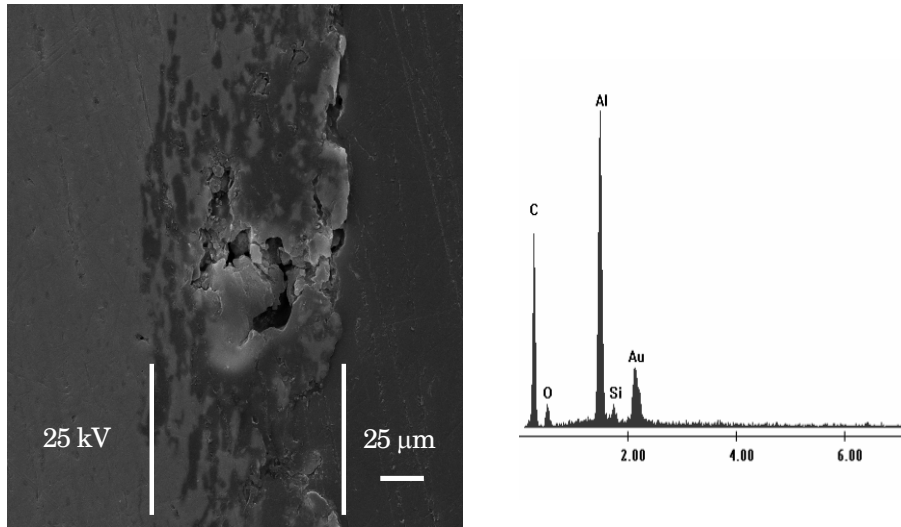


Figura 5.3: Micrografía SEM y análisis EDAX de corte transversal de una picadura en una probeta de AA 6061 expuesta a *B. cereus* RE10.

Por otra parte, la evaluación del efecto de *B. cereus* RE 10 en la corrosión del Al 99,999%, mostró que, a diferencia de lo que sucede en AA6061, no existen evidencias de picado en ninguno de los sistemas evaluados, tal como se observa en la Figura 5.4.

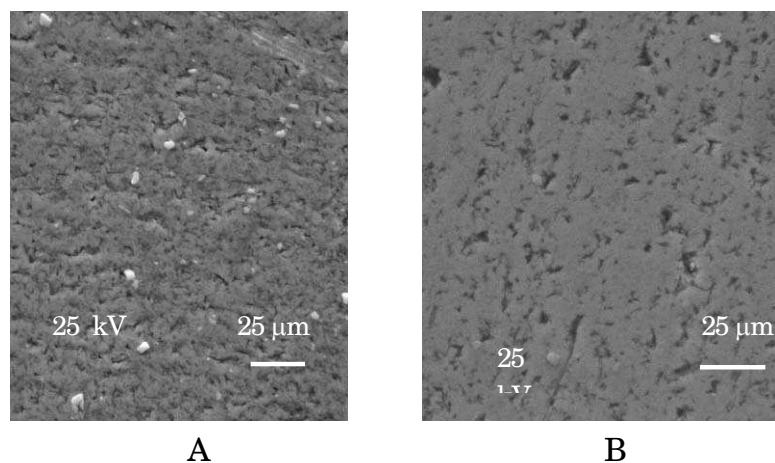
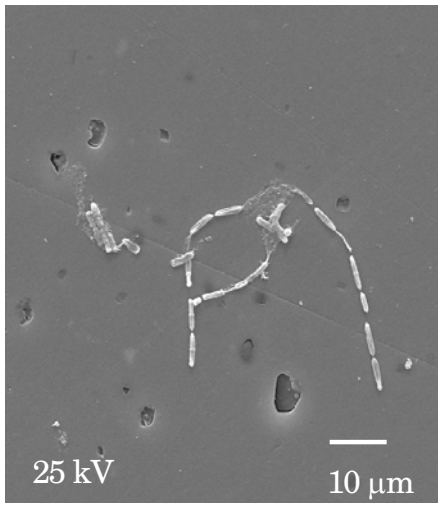


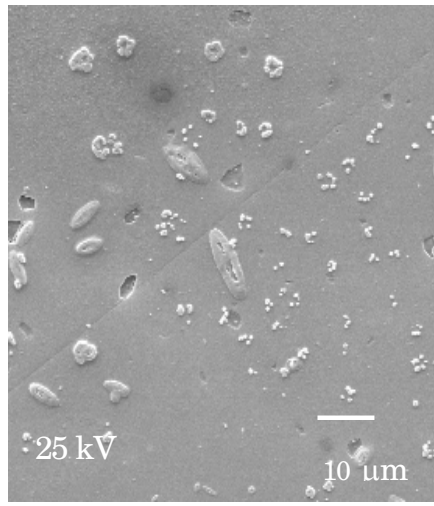
Figura 5.4: Micrografía SEM de Al 99,999% luego de 20 días de exposición en (A) *B. cereus* RE10. (B) CN 1/ 30 estéril.

5.3.2. Evaluación del desarrollo de biofilms de *B. cereus* RE 10 sobre AA6061.

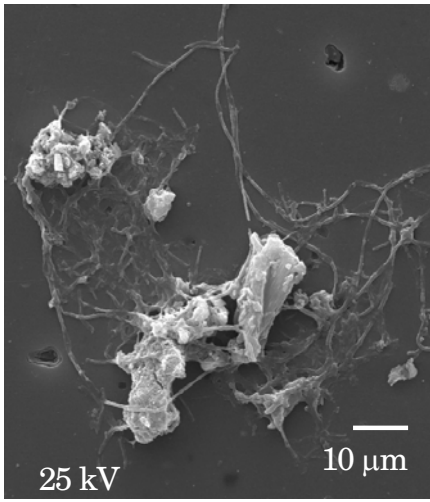
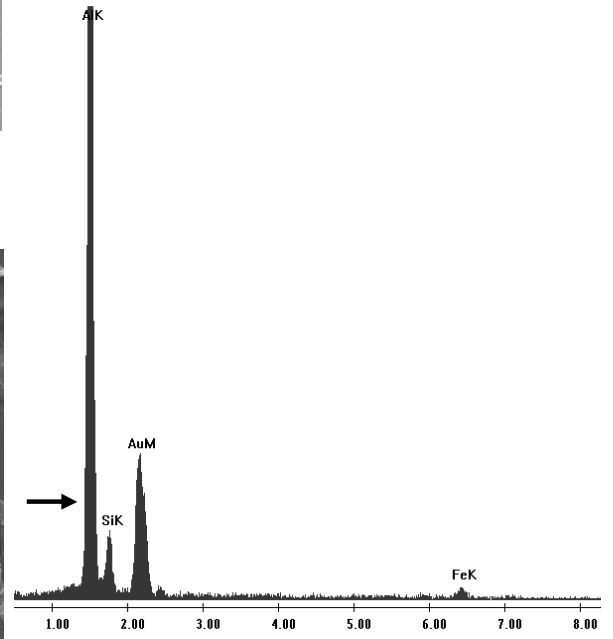
Se evaluaron la cinética de crecimiento y las características, desarrollo y cambios en los biofilms de *B. cereus* RE 10 sobre AA6061. El análisis por SEM-EDAX de las probetas expuestas a los microorganismos reveló que, luego de 4 días se observan las marcas dejadas por la disolución de las inclusiones MgSi, habitual en superficies de AA6061 expuestas a ambientes acuosos. Por otra parte, se observa una distribución aleatoria de cadenas bacterianas adheridas a la superficie de las muestras (Figura 5.5.A). Luego de 7 días de inmersión, la mayor parte del cultivo (tanto planctónico como en el biofilm) consiste en esporas y bacilos cortos aislados. Este comportamiento es típico de organismos de género *Bacillus* en condiciones de escasez nutricional. En la Figura 5.5.B se observa lo que podrían ser remanentes de microcolonias y agregados celulares. Simultáneamente, se detecta corrosión alrededor de inclusiones de tipo Al-Fe-Si (Figura 5.6). Luego de 11 días de inmersión, el biofilm exhibe una distribución en parches alrededor de algunas inclusiones intermetálicas (Figura 5.5.C). La morfología de los microorganismos presentes en los parches resulta una combinación de cadenas largas y finas junto con esporas y bacilos cortos. Existe correlación entre los parches de biofilm y las inclusiones corroídas de tipo Al-Fe-Si y Al-Ti-Si. Luego de 20 días, los parches crecen y consisten en una mezcla de EPS, microorganismos y óxidos de aluminio, conformando los depósitos blanquecinos descritos en la sección 5.3.1. El análisis por EDAX muestra un contenido de Fe y Si relativamente alto en los depósitos con relación a la matriz (Figura 5.5.D). Fuera de estas regiones no se encontraron ni biofilm ni daño por corrosión.



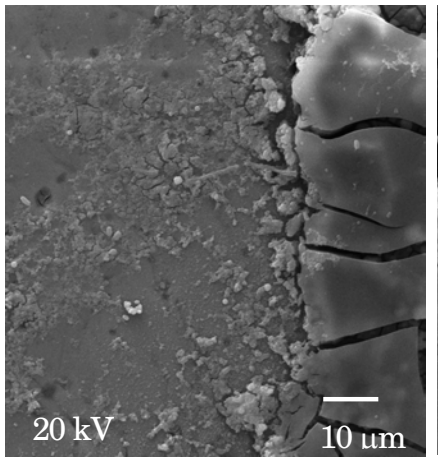
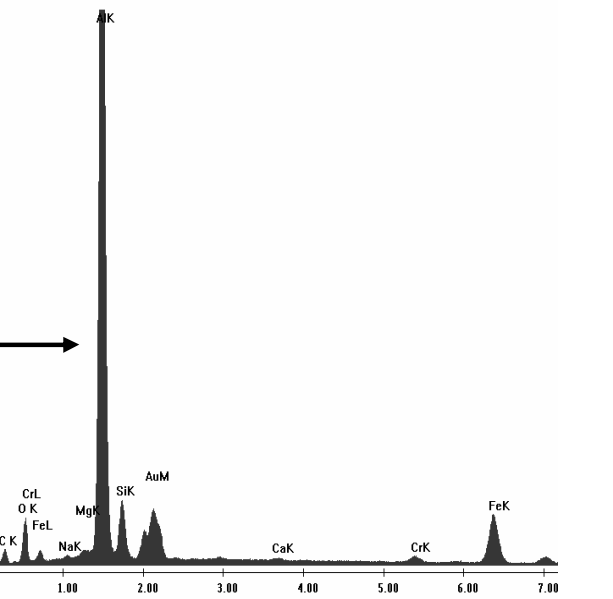
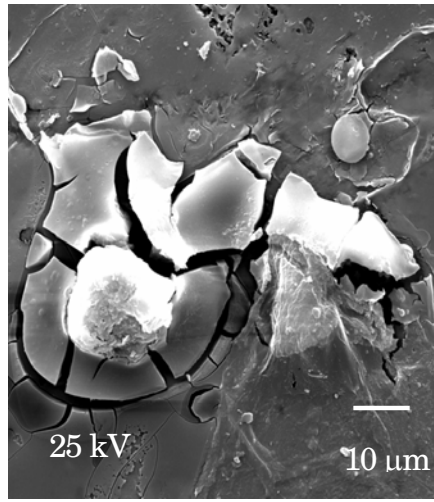
A



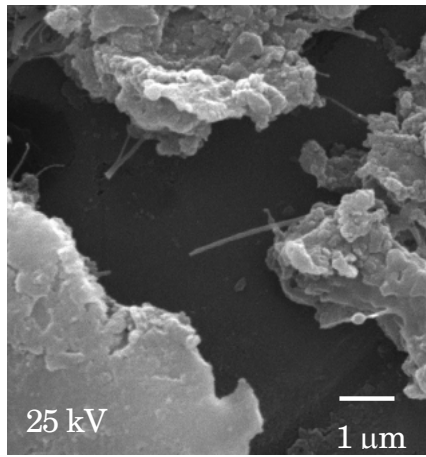
B



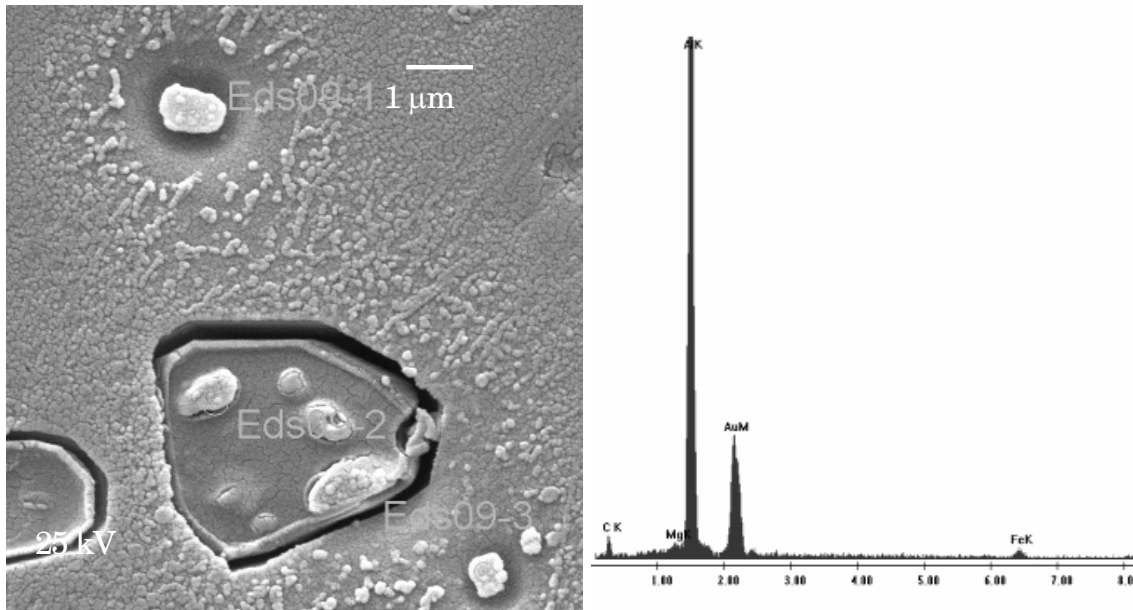
C



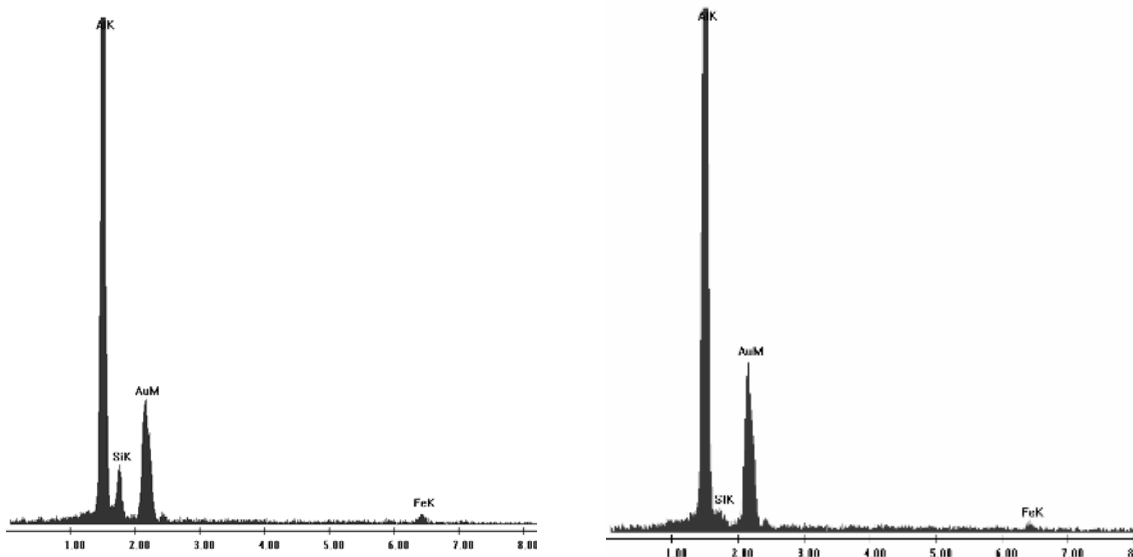
D



(Página anterior) Figura 5.5: Micrografía SEM y análisis EDAX de un biofilm de *B. cereus* RE10 sobre AA 6061 luego de (A) 4, (B) 7, (C) 11 y (D) 21 días de exposición a un cultivo de *B. cereus* RE 10 en CN 1/ 30.



Eds 09-1



Eds 09-2

Eds 09-3

Figura 5.6: Micrografía SEM y análisis EDAX donde se muestran indicios de activación de las inclusiones Al-Fe-Si y Al-Ti-Si en AA6061 luego de 7 días de exposición a un cultivo de *B. cereus* RE 10 en CN 1/ 30.

El análisis por CFLM muestra que, a los 20 días, el espesor de los depósitos es muy irregular variando entre 1 y 100 μm aproximadamente (Figura 5.6). La fluorescencia observada es mayormente verde pudiendo ser indicador de un pH alcalino en los depósitos. Los recuentos de UFC en los biofilms raspados de la superficie muestran una densidad muy baja de UFC (alrededor de 10^3 UFC/ cm^2). Esta observación puede ser atribuida al hecho de que los parches de biofilm se encuentren muy empaquetados, dificultando su dispersión. En este contexto los valores de UFC podrían reflejar agregados de microorganismos en lugar de células aisladas.

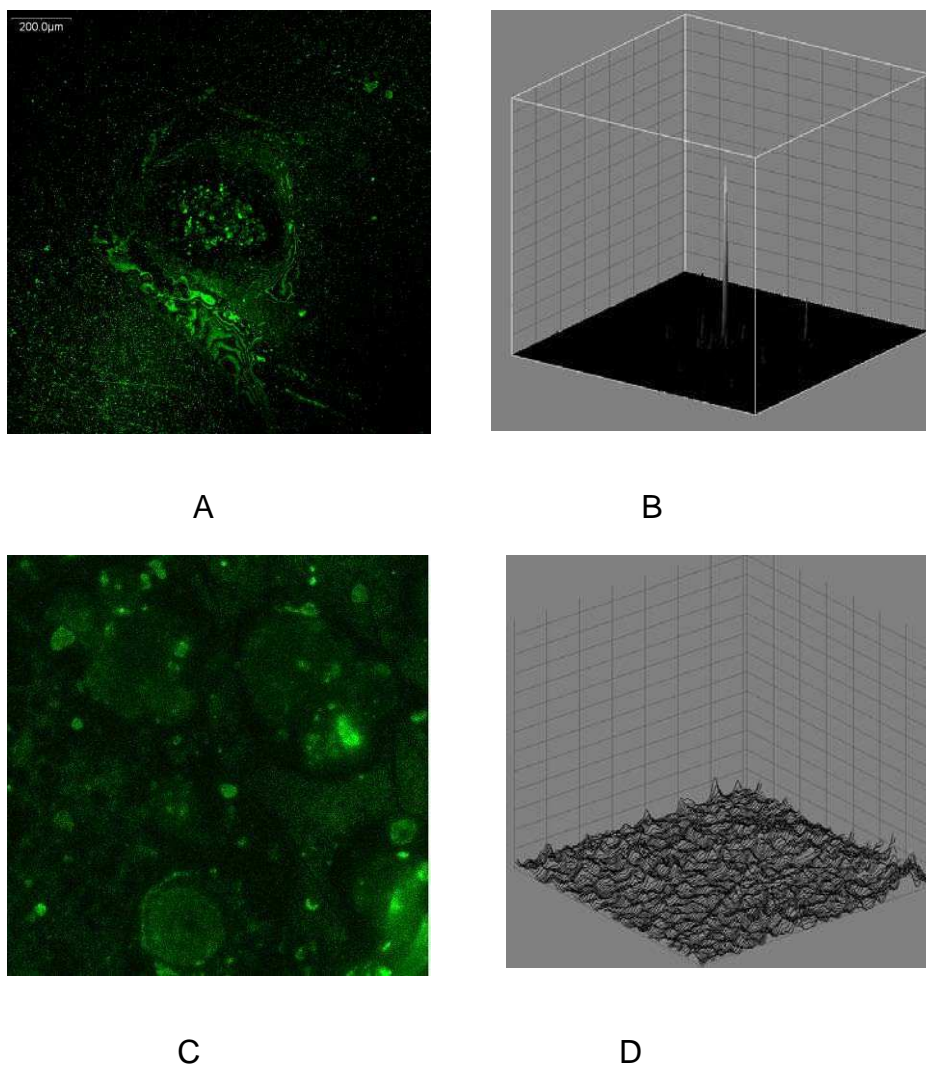


Figura 5.7: CFLM. Probeta de AA6061 luego de 20 días de exposición a un cultivo de *B. cereus* RE 10 en CN 1/ 30. (A) 100X; (B) topografía de A; (C) 1500X; (D) topografía de C. Tinción con naranja de acridina.

5.4. Discusión

Resultados previos (Rajasekar and Ting 2010; Hagenauer et al. 1994) muestran que algunas cepas de *B. cereus* pueden inducir corrosión bajo depósito de tipo picado en las aleaciones de aluminio AA7075 y AA 2024. Este trabajo muestra que *B. cereus* RE10 puede inducir corrosión localizada en AA6061 de uso nuclear en un medio oligotrófico de baja conductividad pero no en Al 99,999. Esta diferencia entre ambos materiales podría ser atribuible a la presencia de partículas intermetálicas que actuarían como sitios preferenciales de inicio de la corrosión y que se encuentran presentes en AA6061 pero no en Al 99,999%. Los resultados presentados muestran que el ataque observado correlaciona con las inclusiones intermetálicas de tipo Mg Al-Fe-Si de la aleación AA6061 pero no con las inclusiones de tipo MgSi ni las de tipo FeAl. Esta observación indica que el ataque preferencial alrededor de las partículas intermetálicas de Mg Al-Fe-Si no puede ser atribuido a un requerimiento de hierro o de magnesio por parte de los microorganismos, ya que de ser así las inclusiones de tipo MgSi y/ o FeAl serían también atacadas. En lugar de ello, el daño preferencial podría estar relacionado con la presencia de microambientes que se desarrollan alrededor de las inclusiones y con características químicas específicas en función del tipo de inclusión.

Es sabido que las fases intermetálicas ricas en hierro presentes en las aleaciones de aluminio pueden actuar como sitios catódicos en medios acuosos aireados, ocasionando alcalinización localizada debido a la reducción catódica del oxígeno (Szkłarska-Smialowska, 1996; Nisancioglu, 1990):



Al medir el proceso de alcalinización, Park (Park et al. 1996) encontró valores de pH de 9,5 alrededor de las partículas intermetálicas Al_3Fe en AA6061. A este pH, *B. cereus* RE10 no puede crecer, aún en medios ricos en nutrientes, tal como se determinó en el capítulo 4 de este trabajo. Esto explicaría

el hecho de que los intermetálicos FeAl, en el caso de actuar como sitios catódicos activos no se vieran colonizados por biofilms.

Sin embargo, la presencia de Si en intermetalicos AlFe disminuye la tasa de reacción catódica (Szkłarska-Smialowska, 1996), lo que podría implicar condiciones más favorables desde el punto de vista de los microorganismos. La presencia de depósitos blancos, globulares, de óxido de aluminio con las características morfológicas de la bayerita alrededor de las zonas corroídas, sumado a los resultados de la tinción con naranja de acridina, sugieren la existencia de una zona de pH neutro - alcalino alrededor de la región atacada.

Las condiciones mencionadas generarían un microambiente que, combinado con la depleción nutricional, podría inducir cambios en el patrón de expresión del microorganismo, permitiéndole sobrevivir y proliferar. Como ejemplo de estos cambios se encuentra la producción de proteasas alcalinas extracelulares por cepas de *Bacillus* a pH 7 o superior, de amplio uso en la industria (Joshi et al. 2007; Yossan et al. 2006). La consecuente formación de un biofilm generaría las condiciones óptimas para la inducción de corrosión bajo depósito. Por otra parte, la posibilidad de una acción de los metabolitos generados por *B. cereus* RE10 no puede ser descartada. Aún teniendo en cuenta la baja densidad de picaduras observada, si se considerase una velocidad de corrosión lineal, ésta sería de aproximadamente 1,3 mm/ año, lo que muestra la importancia del fenómeno observado. Dentro de este contexto, estos resultados podrían ser de importancia en futuros análisis relacionados con el impacto microbiológico en el almacenamiento seguro de residuos radioactivos en la República Argentina.

5.5. Referencias

Alodan M.A., Smyrl W.H. (1998) Detection of localized corrosion of aluminum alloys using fluorescence microscopy. *J Electroch. Soc.*, V. 145 pp. 1571-1577.

Du X., Wang Y., Su X., Li J (2009) Influences of pH value on the microstructure and phase transformation of aluminum hydroxide. *Powder Technol.*, V. 192 pp. 40-46.

Hagenauer A., Hilpert R., Hack T. (1994) Microbiological investigations of corrosion damages in aircraft. *Mater. Corros.*, V. 45 pp. 355–360.

Hamilton, M., Heersink J, Buckingham-Meyer K., Goeres D.(Eds.) (2003). *The biofilm laboratory: step-by-step protocols for experimental design, analysis and data interpretation*, Cytergy, Bozeman, MT.

Josh G.K., Kumar S., Sharma V. (2007) Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from Lake Nainital, Uttaranchal State, India. *Braz. J Microbiol.*, V. 38 pp. 773-779.

Nisancioglu K. (1990) Electrochemical behavior of aluminum-base intermetallics containing iron. *J Electroch. Soc.*, V. 137 pp. 69-77.

Park J.O., Paik C.H., Alkire R.C. (1996) Scanning microsensors for measurement of local pH distributions at the microscale. *J Electroch. Soc.*, V. 143 pp. 174-176.

Pourbaix M. (1974) *Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions*. (2nd ed. in English), Houston, Texas, National Association of Corrosion Engineers.

Rajasekar A., Ting Y.P. (2010) Microbial corrosion of aluminum 2024 aeronautical alloy by hydrocarbon degrading bacteria *Bacillus cereus* ACE4 and *Serratia marcescens* ACE2. Ind. Eng. Chem. Res., V. 49 pp. 6054-6061.

Szklarska-Smialowska Z. (1999) Pitting corrosion of aluminum. Corros. Sci., V. 41 pp. 1743-1767.

Yossan S., Reungsang A., Yasuda M., 2006. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. Science Asia, V. 32 pp. 377-383.

Capítulo 6: Evaluación del crecimiento y capacidad de formación de biofilm de cepas del género *Pseudomonas*

Los resultados de este capítulo fueron presentados en: **Forte Giacobone A.F.**, Pezzoni M., Rodríguez, S. A., Burkart, A.L., Cortón E., Pizarro, R. A. y Costa C.S. (2011) Microbiology induced corrosion in AA6061 alloy by the genera *Pseudomonas*: PAO1-GFP strain as a model for biocorrosion testing

XXXV International Symposium “Scientific Basis for Nuclear Waste Management”. Buenos Aires. Argentina.

6.1. Introducción

En el presente capítulo se describe la evaluación del crecimiento y capacidad de formación de biofilm en diferentes condiciones de dos cepas de *Pseudomonas* aisladas del repositorio del CAE (tal como fue descrito en el capítulo 3 de este trabajo) en relación a la cepa prototipo de *Pseudomonas*, la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y su derivada portadora del gen que codifica a la proteína verde fluorescente (GFP). Se evaluó la capacidad de formar biofilms de las cepas ante dos situaciones claramente diferenciadas desde el punto de vista nutricional, dadas por un medio rico y el mismo medio extremadamente diluido, a dos temperaturas diferentes (25 °C y 37 °C). En función de esos resultados (y teniendo en cuenta las condiciones presentes en el repositorio) se seleccionó el empleo de medio diluido e incubación 25 °C para analizar el crecimiento de las cepas durante 41 días.

6.2. Experimental

6.2.1. Reactivos

Los medios de cultivo utilizados corresponden a la marca OXOID. El agua que se utilizó fue destilada y pasada luego por un sistema MilliQ. Todos los reactivos empleados poseen grado analítico.

6.2.2. Cepas empleadas

Las cepas empleadas se detallan a continuación en la Tabla 6.1.

Cepa	Número de acceso EMBL	Característica relevante	Origen
PAO1	--	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , cepa silvestre	Colección de laboratorio
PAO1-GFP	--	PAO1 marcada con GFP	Klausen et al.
RNE9	FR749834	<i>Pseudomonas sp.</i> aislada de un repositorio nuclear.	(ver capítulo 3 de este trabajo)
RNE10	FR749835	<i>Pseudomonas sp.</i> aislada de un repositorio nuclear.	(ver capítulo 3 de este trabajo)

Tabla 6.1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

6.2.3. PCR

La PCR se realizó mediante el siguiente programa:

-un ciclo de 95 °C 5min

-35 ciclos (95 °C 2min; 60 °C 30seg; 72 °C 1min)

-Extensión final 72 °C 20min.

Los primers universales empleados fueron fd1 bis (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y rD1 bis (AAG GAG GTG ATC CAG CC), mientras que los específicos para *Pseudomonas* corresponden a Ps for (GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT) y Ps rev (TTA GCT CCA CCT CGC GGC). El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% empleando GeneRuler™ 1kb DNA Ladder como marcador de peso molecular.

6.2.4. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms en diferentes condiciones.

La capacidad de los microorganismos de formar biofilms en CN y CN 1/ 30 a 25 °C y 37 °C fue evaluada mediante el método del cristal violeta modificado para microplacas de 96 pocillos tal como se describe en el Anexo 3.2.

6.2.5. Evaluación de crecimiento en medio diluido.

El crecimiento de los microorganismos fue evaluado inoculando cada cepa en frascos de tipo Schott de 250 ml conteniendo 150 ml de caldo nutritivo (CN) diluido 30 veces en agua MilliQ (CN 1/ 30) seguido de incubación a 25 °C sin agitación. El crecimiento fue seguido mediante monitoreo de la densidad óptica a 650 nm (DO_{650nm}) y por recuento en placa de unidades formadoras de colonias (UFC/ ml).

6.3. Resultados

6.3.1. PCR con primers específicos e inespecíficos para *Pseudomonas*.

Si bien todas las cepas empleadas en este capítulo pertenecen al género *Pseudomonas*, se decidió realizar un control de los cultivos de partida mediante la amplificación por PCR de una región del gen del 16s ribosomal específica de este género comparándola con la amplificación mediante primers universales. En la Figura 6.1 se observa que tanto los microorganismos aislados del repositorio como las cepas de colección amplifican con ambos sistemas de primers (específicos y universales). Por otra parte, la amplificación de una cepa del género *Bacillus* empleada como control de especificidad resultó positiva para los primers universales y negativa para los específicos del género *Pseudomonas*, tal como era de esperarse.

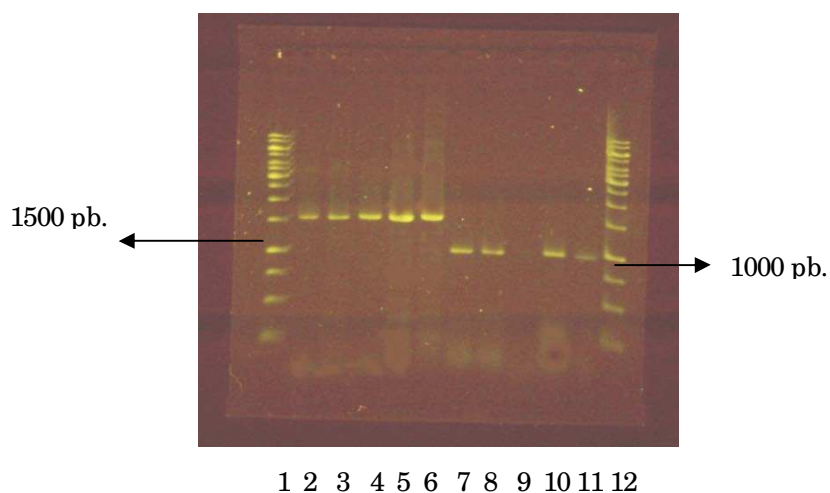


Figura 6.1: Amplificación del gen del 16s ribosomal mediante primers universales (2-6) y específicos para el género *Pseudomonas* (7-11). GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (1,12). ADN molde: PAO1 (2,7); PAO1-GFP (3,8); *B. cereus* RE10 (4,9); RNE9 (5,10) RNE 10 (6,11).

6.3.2. Capacidad de formación de biofilms en diferentes condiciones.

Tal como se observa en la Figura 6.2, todas las cepas analizadas presentan la capacidad de formar biofilms en CN 1/ 30 a 25 °C; los valores de las cuatro cepas son similares. En cambio, al evaluarse el mismo medio a 37 °C, solamente las cepas aisladas del repositorio forman biofilms. Por otra parte en CN, las cepas PAO1 y PAO1-GFP forman cantidades importantes de biofilm, tanto a 37 °C como a 25 °C, mientras que las cepas del repositorio no forman o forman muy poco biofilm en las mismas condiciones.

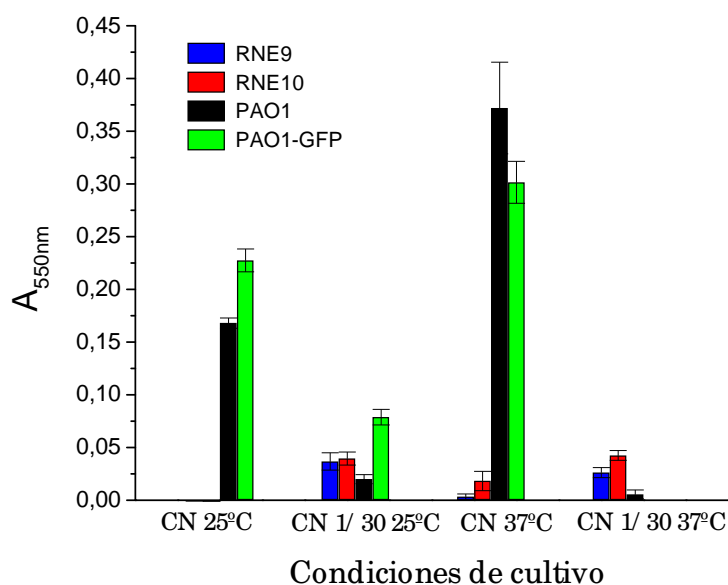


Figura 6.2: Formación de biofilms por cepas de *Pseudomonas* evaluada en Caldo Nutritivo (CN) y en CN diluido 30 veces con agua milliQ a 25 °C y 37 °C.

6.3.3. Crecimiento en CN 1/ 30 a 25 °C durante 41 días.

En la Figura 6.3 se muestra la evolución de cultivos de las cepas de *Pseudomonas* analizadas, incubadas a 25°C sin agitación durante 41 días. Es posible observar que, a los 2 días todos los cultivos se encuentran en fase

estacionaria, sin pérdida de la viabilidad durante el desarrollo del ensayo. Los valores de UFC/ ml resultan similares para todas las cepas, encontrándose en el orden de 10^8 UFC/ ml.

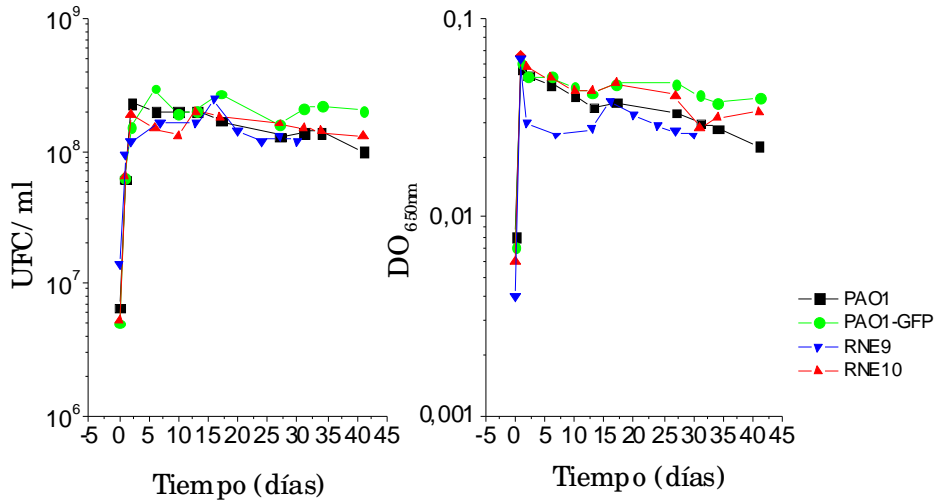


Figura 6.3: Evaluación de crecimiento de cepas de *Pseudomonas* en CN 1/ 30 veces a 25 °C durante 41 días.

6.4. Discusión

En concordancia con los resultados obtenidos previamente, las cepas en estudio pertenecen al género *Pseudomonas*.

Todos los microorganismos analizados presentan un comportamiento similar en CN 1/ 30 a 25 °C, tanto en su cinética de crecimiento como en la formación de biofilms.

La presencia de un medio rico en nutrientes como ser CN, resulta estimuladora de la formación de biofilms por parte de las cepas PAO1 y PAO1-GFP. Contrariamente, las cepas aisladas del repositorio muestran una marcada inhibición en su capacidad de formar biofilms en dichas condiciones.

El cultivo en medio diluido limita fuertemente el crecimiento de *Pseudomonas*, sin embargo estas células tienen la capacidad de mantener su viabilidad por periodos prolongados de tiempo.

6.5. Referencias

Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aes-Jørgensen A., Molinand S., Tolker-Nielsen T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants Mol. Microbiol., V. 48, pp. 1511-1524.

Capítulo 7: Ensayos de inmersión de cupones de AA6061 utilizando cepas del género *Pseudomonas*

Los resultados de este capítulo fueron presentados en: **Forte Giacobone A.F.**, Pezzoni M., Rodríguez, S. A., Burkart, A.L., Cortón E., Pizarro, R. A. y Costa C.S. (2011) Microbiology induced corrosion in AA6061 alloy by the genera *Pseudomonas*: PAO1-GFP strain as a model for biocorrosion testing

XXXV International Symposium “Scientific Basis for Nuclear Waste Management”. Buenos Aires. Argentina.

7.1. Introducción

La aleación de aluminio 6061 es susceptible a la corrosión localizada, aún en medios altamente diluidos (Hart, 1957; Rodríguez et al. 2005). En el capítulo 5 de este trabajo se describió una inducción del fenómeno de MIC sobre AA6061 en un medio oligotrófico, por parte de una cepa de *Bacillus cereus* aislada de un repositorio nuclear. Por otra parte, existen antecedentes que demuestran la inducción de MIC por parte de organismos del género *Pseudomonas*, sobre aleaciones de aluminio (De Mele et al, 1979; Guiamet y Videla, 1986; Vaidya et al. 1997). Sin embargo, el efecto de *Pseudomonas* sobre AA6061 en medios diluidos ha sido escasamente estudiado.

Uno de los problemas en el estudio de biofilms sobre aleaciones metálicas, en particular en presencia de óxidos, proviene de la dificultad de seguir el desarrollo de los biofilms en forma directa. El uso de microscopía electrónica de barrido (SEM) por ejemplo, implica procedimientos de fijación,

desechado y metalizado los cuales pueden introducir artificios en el sistema. Si bien estos inconvenientes han sido parcialmente subsanados mediante la introducción del microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM), ambas técnicas resultan demasiado costosas para ser empleadas en forma rutinaria.

Por otra parte, la microscopía de epifluorescencia presenta como principal desventaja la captura, por parte de los óxidos presentes en el metal, de los colorantes habitualmente empleados (tales como naranja de acridina, bromuro de etidio, etc) resultando en una tinción de tipo inespecífica. El empleo de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador genético ha sido una manera de subsanar este problema, permitiendo la visualización de los organismos marcados de manera rápida, simple y no destructiva particularmente en biofilms bacterianos (Hamon y Lazzarezza, 2001; Yoshida y Kuramitsu, 2002; Klausen et al. 2003).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar en forma comparativa los procesos de corrosión sobre AA6061 en medio altamente diluido a 25 °C de las diferentes cepas de *Pseudomonas* analizadas en el capítulo 6 de este trabajo, con el fin de emplear a la cepa derivada de *P. aeruginosa* PAO1 portadora del gen que codifica a la proteína GFP, como modelo en el estudio de MIC.

7.2. Experimental

7.2.1. Reactivos

Los medios de cultivo utilizados corresponden a la marca OXOID. El agua que se utilizó fue destilada y pasada luego por un sistema MilliQ. Todos los reactivos empleados poseen grado analítico.

7.2.2. Cepas empleadas

Las cepas empleadas se detallan en el capítulo 6 de este trabajo (Tabla 6.1.).

7.2.3. Caracterización y procesamiento de las muestras metálicas.

El material empleado proviene de los residuos de la fabricación de placas de elementos combustibles nucleares, preparados con aleación de aluminio AA6061, tal como se describió en la sección 5.2.2.

Las probetas metálicas, de dimensiones aproximadas de 18 mm x 25 mm x 3 mm, fueron pulidas mecánicamente en forma secuencial con una serie de papeles de esmeril (grados 220, 320, 400, 600, 1000, y 1500) seguido de pasta de diamante de 3 μm hasta obtener un acabado en espejo. Las muestras pulidas fueron caracterizadas al microscopio metalográfico, y luego desengrasadas con detergente, lavadas con agua, desengrasadas nuevamente con acetona, enjuagadas con etanol, secadas con aire caliente y mantenidas en desecador hasta el momento del ensayo. Antes de iniciar los ensayos, las probetas fueron esterilizadas mediante inmersión en etanol 98% seguido de flameo.

7.2.4. Desarrollo de los ensayos de inmersión

Los ensayos consistieron en exponer las probetas a CN 1/ 30 a 25 °C, en presencia y en ausencia de microorganismos. Cada frasco Schott de 250 ml conteniendo 150 ml de CN 1/ 30 fue inoculado con un cultivo estacionario de la cepa seleccionada obtenido en las mismas condiciones. El inóculo inicial fue ajustado a una $\text{DO}_{650\text{nm}}$ de 0,005-0,008. Los controles fueron realizados de manera similar pero omitiendo el inóculo bacteriano. Las probetas de AA6061

fueron colgadas mediante hilos de teflon y mantenidas a 25 °C por 41 días sin agitación. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

7.2.5. Estudio del biofilm mediante métodos disruptivos.

Luego de la incubación, las probetas fueron retiradas de los frascos y lavadas dos veces con solución fisiológica. Los biofilms fueron raspados de una cara de cada probeta y resuspendidos en solución fisiológica para evaluar la viabilidad celular y el contenido de proteínas totales. Ambos parámetros también se estudiaron en los cultivos planctónicos. La viabilidad celular se determinó mediante diluciones seriadas y recuento de unidades formadoras de colonias en placas de agar nutritivo incubadas a 25 °C y el contenido total de proteínas se cuantificó mediante el método de Lowry (Lowry et al, 1951).

7.2.6. Estudio del biofilm. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de dispersión por rayos X (EDAX).

Las características morfológicas del biofilm así como también la integridad de la superficie metálica fueron evaluadas mediante SEM EDAX (equipo: Philips 515, EDX PV9100), para lo cual las muestras fueron fijadas con glutaraldehído, deshidratadas con etanol y metalizadas con oro, según el procedimiento detallado por Hamilton (Hamilton et al, 2003).

7.2.7. Estudio del biofilm. Microscopía de epifluorescencia

Los biofilms fueron observados mediante microscopía de epifluorescencia (ME). Para ello, las probetas fueron teñidas con naranja de

acridina 0,1% por 5 minutos, lavadas dos veces y secadas al aire. Este procedimiento se llevó a cabo para todas las cepas evaluadas con excepción de PAO1-GFP, que fue observada directamente al microscopio debido a su fluorescencia intrínseca. Las muestras fueron examinadas mediante un microscopio de fluorescencia Olympus FV300.

7.2.8. Análisis de la superficie por microscopia metalográfica.

La topografía superficial de los cupones y las características de las regiones corroídas fueron analizadas mediante microscopía óptica metalográfica luego de retirar el biofilm y los productos de corrosión mediante cepillado, seguido de desengrasado con detergente y secado con aire caliente. La profundidad de ataque fue estimada mediante el análisis de las diferencias en el foco

7.2.9. Evaluación de la profundidad de ataque.

Se realizó un corte longitudinal de una probeta a lo largo del eje mayor de una picadura, se incluyó la probeta en resina acrílica y se la pulió a espejo para revelar la morfología de ataque. Por último, las características morfológicas fueron evaluadas mediante SEM.

7.3. Resultados

7.3.1. Evaluación del crecimiento bacteriano en medio altamente diluido.

Luego de 41 días de ensayo, los cultivos planctónicos de las cepas RNE9 y RNE10 presentaron una mayor concentración de proteínas, menor recuento de células viables y valores similares de DO_{650nm} que los cultivos de PAO1 (Tabla 7.1). Todas las cepas estudiadas alcalinizaron ligeramente el medio. En lo referente a los biofilms adheridos a las probetas de AA6061, PAO1-GFP muestra un crecimiento significativo en comparación con la cepa parental PAO1 y, especialmente, con respecto a los aislamientos ambientales. Por otra parte, el contenido de proteínas resultó muy similar entre las cepas PAO1, RNE9 y RNE10.

Muestra	UFC	Proteínas	pH	DO ₆₅₀
<i>Cultivos planctónicos</i>				
PAO1	1x10 ⁸ / ml	1,4 µg/ml	7,29	0,023
PAO1-GFP	1,2x10 ⁸ / ml	1,6 µg/ml	7,40	0,039
RNE9	3,6x10 ⁷ / ml	4,6 µg/ml	7,37	0,025
RNE10	5x10 ⁷ / ml	3,2 µg/ml	7,45	0,029
<i>Biofilms</i>				
PAO1	8x10 ⁴ / cm ²	0,13 µg/cm ²	-	-
PAO1-GFP	5x10 ⁶ / cm ²	0,27 µg/cm ²	-	-
RNE9	1,5x10 ⁴ / cm ²	0,18 µg/cm ²	-	-
RNE10	1x10 ⁴ / cm ²	0,13 µg/cm ²	-	-

Tabla 7.1: Evaluación de cultivos planctónicos y biofilms luego de 41 días de incubación

7.3.2. Evaluación de corrosión y biofilms en las probetas de AA6061 mediante SEM y microscopía metalográfica

Independientemente de la cepa, todas las probetas expuestas a microorganismos presentaron depósitos superficiales aislados globulares de tipo denso y frágil (Figura 7.1). Dichos depósitos se encontraron distribuidos de manera azarosa en una densidad de entre 0,2 y 0,6 depósitos/ cm². El análisis por SEM-EDAX reveló que la composición de los mismos estaba dada por una mezcla de óxidos de aluminio con materia orgánica. No se encontraron depósitos en las muestras expuestas al medio estéril (Figura 7.2).

Al retirar los depósitos se observó picado macroscópico debajo de los mismos (Figura 7.3). Las características morfológicas del ataque se correspondieron con picado no cristalográfico y cavidades de tipo túnel recubiertas de óxidos. La profundidad de las picaduras calculada en base a diferencias en la distancia de foco, se estimó entre 2 y 31 μm , sin embargo cortes transversales de las mismas indicaron una profundidad muy superior (70- 100 μm) evidenciando ataque de tipo sub-superficial (Figura 7.4). En todos los casos, el porcentaje total de área atacada se encontró por debajo del 0,01% de la superficie total, revelando un tipo de corrosión extremadamente localizada. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas evaluadas.

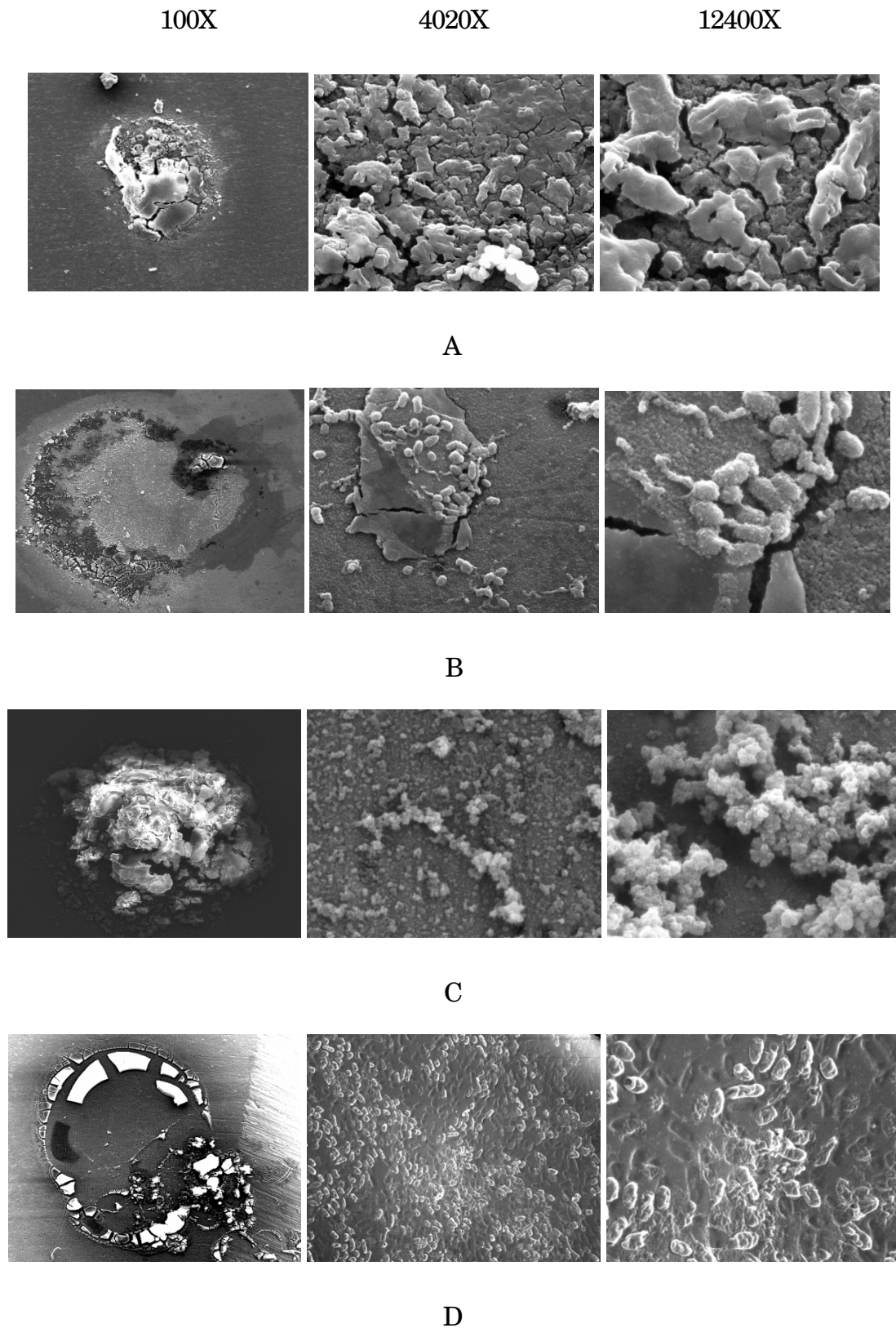
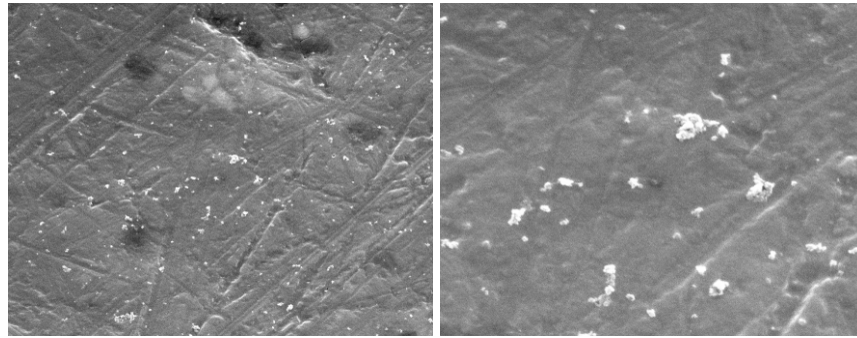


Figura 7.1: SEM de probeta de AA 6061 luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 en presencia de (A) cultivo de PAO1 (B) cultivo de PAO1-GFP; (C) cultivo de RNE 9 y (D) cultivo de RNE 10.



4020X

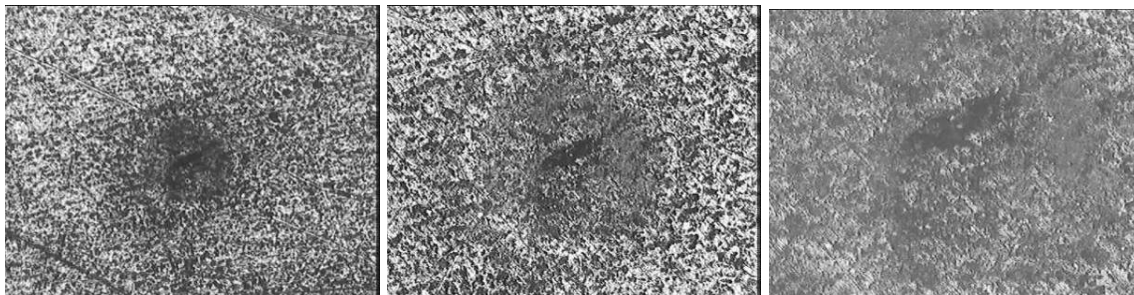
12400X

Figura 7.2: SEM de probeta de AA6061 luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 estéril.

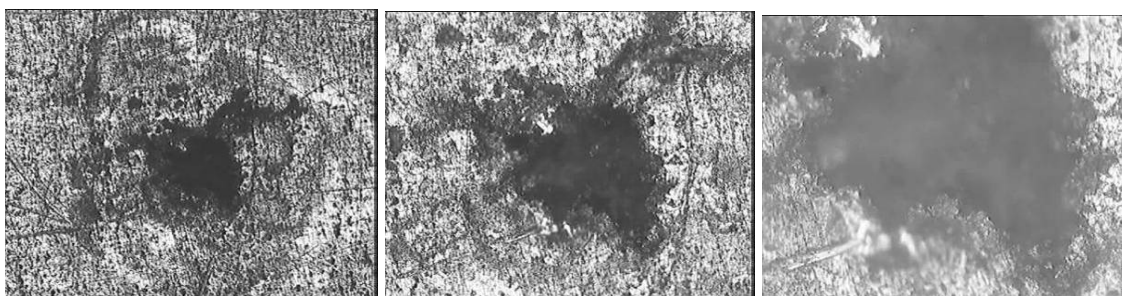
50X

100X

200X



A



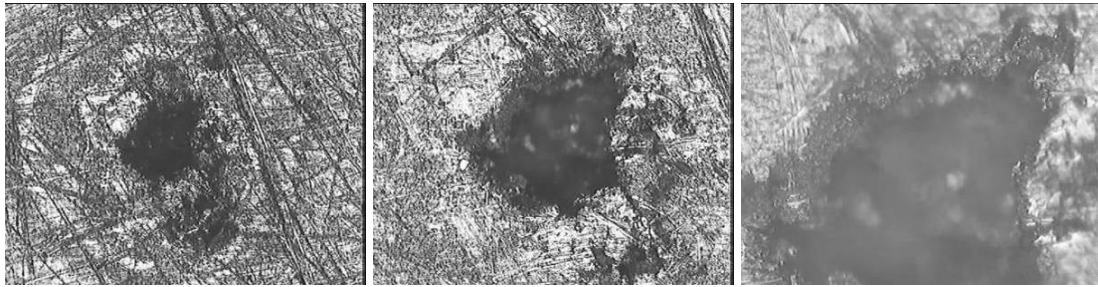
B

Figura 7.3. Microscopía óptica metalográfica. Probetas de AA6061 luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 en presencia de (A) cultivo de PAO1; (B) cultivo de PAO1-GFP.

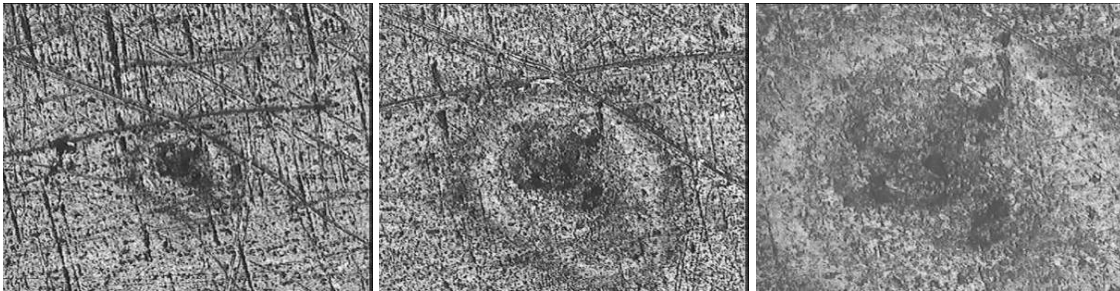
50X

100X

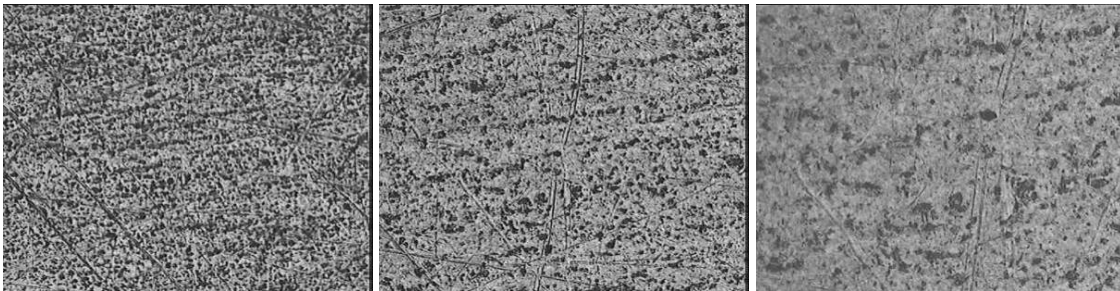
200X



C

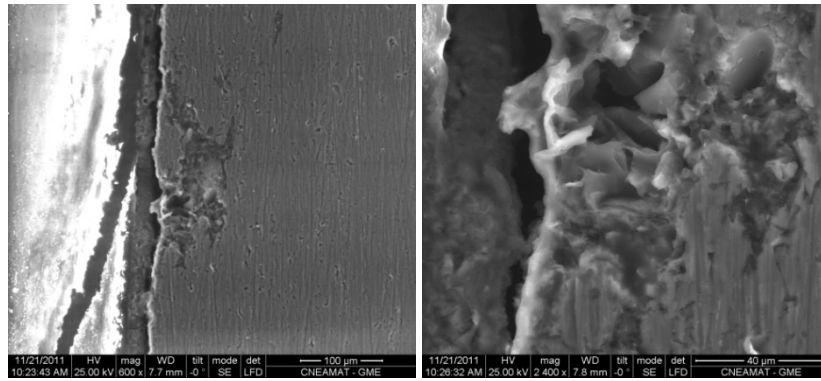


D



E

Figura 7.3 (continuación): Microscopía óptica metalográfica. Probetas de AA6061 luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 en presencia de (C) cultivo de RNE 9; (D) cultivo de RNE 10 y (E) medio estéril. Obsérvense las picaduras bajo depósito (A-D).



A

B

Figura 7.4: SEM correspondiente a un corte transversal de una picadura en una probeta de AA 6061 luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 en presencia de un cultivo de PAO1-GFP. (A) 600X. (B) 2400X.

7.3.3. Evaluación de biofilms en las probetas de AA6061 mediante EM

La tinción con el colorante naranja de acridina seguida por observación por EM reveló que dicho compuesto fue captado por las imperfecciones presentes en la superficie de la probeta aún en ausencia de microorganismos (Figura 7.5.D). Como es bien sabido, el color del naranja de acridina es dependiente del pH. Esto se vio reflejado en el hecho de que en la Figura 7.5.D, las inclusiones MgSi se observaron en naranja (como consecuencia del pH ácido generado a su alrededor) mientras que las inclusiones FeAl se observaron de color verde (debido al microambiente alcalino generado en su entorno).

El mismo procedimiento de tinción aplicado a las probetas con PAO1, RNE9 y RNE10 mostró que resultó muy difícil la observación del biofilm debido a que el colorante fue captado tanto por los microorganismos como por los óxidos. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas evaluadas (Figura 7.5.A, B y C).

Por otra parte, la observación por EM de probetas no teñidas reveló que resultó sencillo distinguir el biofilm formado por PAO1-GFP (Figura 7.6.A) de los óxidos globulares, aún cuando estos últimos se observaron como fluorescentes (Figura 7.6.B). En ausencia de PAO1-GFP o de óxidos globulares, la matriz de AA6061 no presentó fluorescencia (Figura 7.6.C).

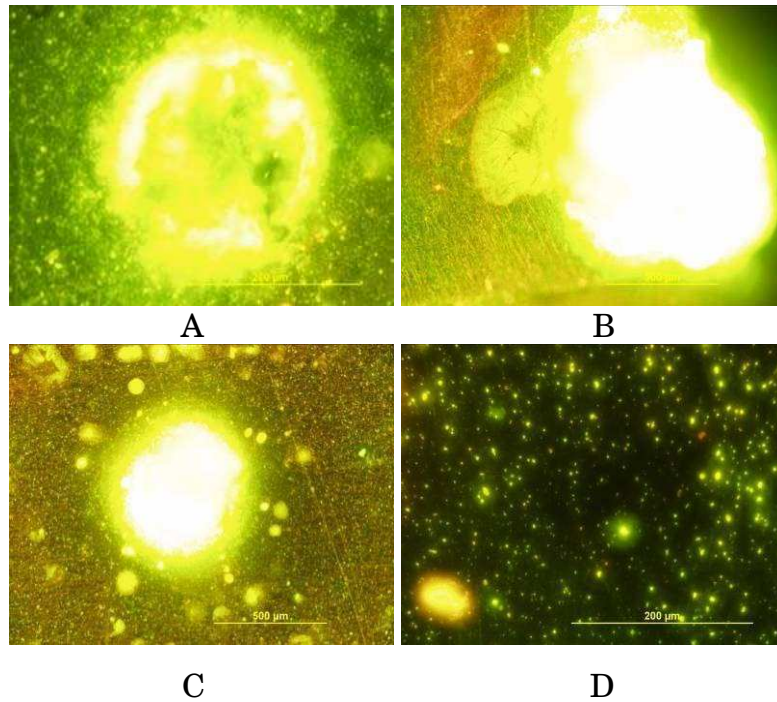


Figura 7.5: EM de probetas de AA6061 teñidas con naranja de acridina luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 en presencia de (A) cultivo de PAO1; (B) cultivo de RNE9; (C) cultivo de RNE10 y (D) medio estéril.

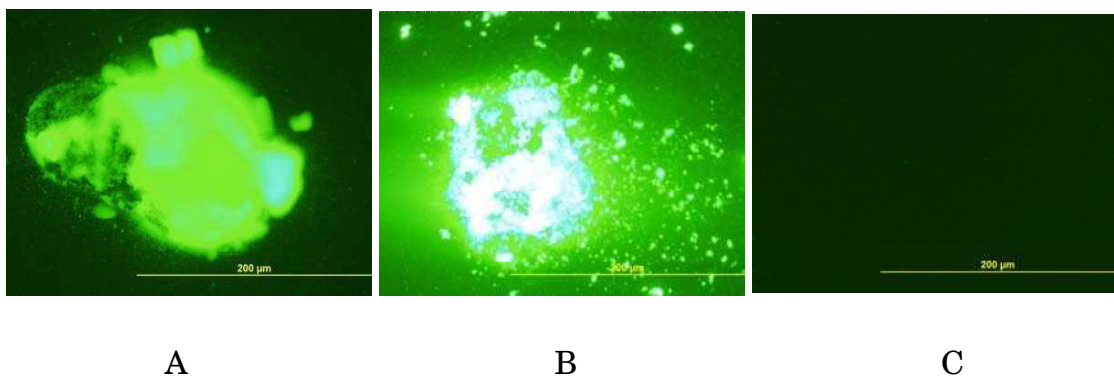


Figura 7.6: EM de probetas de AA 6061 luego de 41 días de inmersión en CN 1/ 30 en presencia de (A) cultivo de PAO1-GFP; (B) cultivo de RNE 9 y (C) medio estéril. Observación directa (sin tinción).

7.4. Discusión

Con el objetivo de analizar la posibilidad de emplear la cepa PAO1-GFP como modelo para el estudio de MIC en una instalación de almacenamiento interino en húmedo de combustible nuclear gastado, se realizaron ensayos de crecimiento de biofilm y corrosión en un medio oligotrófico de baja conductividad. Dichos experimentos se llevaron a cabo comparando el efecto de PAO1-GFP con respecto a PAO1 y dos cepas de *Pseudomonas* aisladas de una facilidad de este tipo en Argentina.

Tal como se indicó en el capítulo 3 de este trabajo, resulta posible encontrar miembros del género *Pseudomonas* en repositorios nucleares. A su vez, existen antecedentes que muestran la inducción de picado en aleaciones de aluminio por microorganismos de este género (Guiamet y Videla, 1986). Por otra parte, en el capítulo 5 de esta tesis se demostró que AA6061 es susceptible de sufrir corrosión bajo depósito inducido por una cepa de *Bacillus cereus* en medio oligotrófico. Los resultados aquí expuestos muestran que diferentes cepas de *Pseudomonas* forman biofilms e inducen MIC en AA6061 de uso nuclear, en presencia de un medio oligotrófico de baja conductividad. No se encontraron diferencias significativas ni en la formación de biofilms ni en la inducción de MIC entre todas las cepas evaluadas.

La tinción con el colorante naranja de acridina aparece como altamente inespecífica en presencia de óxidos de aluminio y de imperfecciones superficiales, resultando extremadamente difícil distinguir los óxidos del biofilm. El empleo de PAO1-GFP, una cepa de *P. aeruginosa* genéticamente modificada con un marcador fluorescente, permite superar este problema y observar el biofilm directamente al microscopio sin la inducción de artificios ocasionados por los procesos de fijación y desecación. La visualización de biofilms de PAO1-GFP resulta sencilla aún en presencia de óxidos fluorescentes. Se concluye por lo tanto que PAO-GFP podría ser usada como modelo en estudios de biocorrosión en AA6061 en las condiciones analizadas.

7.5. Referencias

De Mele F.L., Salvarezza R.C., Videla H.A. (1979) Microbial contaminants influencing the electrochemical behavior of aluminum and its alloys in fuel/ water systems. *Int. Biodeterior.*, V. 15 pp.39-44.

Guiamet P.S., Videla. H.A. (1986) Efecto de dos contaminantes microbianos de turbocombustibles en la corrosión microbiológica del aluminio y aleaciones. *Rev. Iberoam. Corros. Protec.*, V. 27 pp. 351-354.

Hamilton, M., Heersink J, Buckingham-Meyer K, Goeres D. (Eds.) (2003) *The biofilm laboratory: step-by-step protocols for experimental design, analysis and data interpretation*, Cytergy, Bozeman, MT.

Hamon M.A., Lazazzera B.A. (2001) The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, V. 42 pp. 1199-1209.

Hart R.K. (1957) The formation of films on aluminium immersed in water. *T. Faraday Soc.*, V. 53 pp. 1020-1027.

Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molinand S., Tolker-Nielsen T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants *Mol. Microbiol.*, V. 48 pp. 1511-1524.

Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A.L., Randall R.J (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol. Chem.*, V. 193 pp. 265-269.

Rodríguez S., Lanzani L., Quiroga A., Silva E., Haddad R. (2005) Study of the effect of sediments on corrosion behaviour of aluminium clad spent fuel during storage in water. In: IAEA, (ed.) *Proceedings of an International Conference on Research Reactor Utilization, Safety, Decommissioning, Fuel and Waste Management* organized by the International Atomic Energy Agency and hosted

by the Government of Chile through the Nuclear Energy Commission of Chile and International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 645-650.

Vaidya R.U., Butt D.P., Hersman L.E., Zwick A. (1997). Corrosion of aluminium and Al₂O₃ Particle reinforced aluminium composite in a Pseudomonas Bacteria/ seawater environment. *Corr. Rev.*, V. 15 pp. 387-404.

Yoshida A., Kuramitsu H. K., (2002). Streptococcus mutans biofilm formation: utilization of a gtfB promoter–green fluorescent protein (PgtfB::gfp) construct to monitor development. *Microbiology*, V. 148 pp. 3385-3394.

Capítulo 8: Conclusiones

8.1. Conclusiones generales

- En coincidencia con resultados obtenidos para otros ambientes similares, se determinó que microorganismos pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos, todos ellos característicos de ambientes acuáticos continentales, se desarrollan en un ambiente radioactivo y oligotrófico como el del repositorio nuclear del CAE, siendo los géneros predominantes *Bacillus* y *Pseudomonas*.
- La mayoría de los microorganismos aislados presentan capacidad de formar biofilms sobre vidrio tanto en medio nutritivo como en medio oligotrófico, dependiendo la cantidad de biofilm tanto de la cepa como del medio considerado.
- Se determinó que el aislamiento mayoritario del repositorio, correspondiente a una cepa de *Bacillus cereus* denominada *B. cereus* RE10, es capaz de formar biofilms tanto en medio oligotrófico como en caldo nutritivo a 25 °C pero no a 37 °C. Por otra parte, dicha cepa puede proliferar y sobrevivir a pH entre 6 y 8 tanto en medio rico en nutrientes como en un medio oligotrófico (CN 1/ 30), no existiendo proliferación a pH 9.
- La cepa *B. cereus* RE10 puede inducir formación de depósitos y corrosión localizada con características de picado no cristalográfico en AA6061 de uso nuclear en un medio oligotrófico de baja conductividad pero no en Al 99,999. El ataque observado correlaciona con inclusiones intermetálicas de tipo Mg Al-Fe-Si de la aleación AA6061. El daño preferencial podría estar relacionado con la presencia de microambientes que se desarrollan alrededor de las inclusiones y que favorecerían el desarrollo de biofilms de *B. cereus* RE10 en condiciones de estrés nutricional. La consecuente formación de un biofilm generaría las condiciones óptimas para la inducción de corrosión bajo depósito.

- Al analizar el efecto sobre AA6061 en un medio oligotrófico de dos cepas de *Pseudomonas* aisladas del repositorio, la cepa modelo de *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1 y de su derivada PAO-GFP modificada con un marcador fluorescente, se determinó que todas pueden inducir formación de depósitos y corrosión localizada asociada, no encontrándose diferencias significativas al respecto entre cepas. Estos resultados permitirían el uso de mutantes derivadas de PAO1 con la finalidad de analizar los mecanismos genéticos asociados a este fenómeno.
- El empleo de PAO-GFP permite observar el biofilm directamente al microscopio de epifluorescencia, evitando la aparición de artificios ópticos ocasionados por los procesos de fijación y desecación. Además, se ha logrado eliminar de esta manera problemas de tinción inespecífica ocasionados por el uso de colorantes, aún en presencia de óxidos fluorescentes. Como consecuencia de lo expuesto, PAO-GFP podría ser usada como modelo en estudios de biocorrosión en AA6061 en las condiciones analizadas.
- Por último, las características del ataque observado en AA6061 por microorganismos del género *Pseudomonas* resultan muy similares a las observadas en el caso de *B. cereus* RE10, lo que reforzaría la hipótesis de que el daño observado sería consecuencia de la presencia del biofilm aunque no puede descartarse la posibilidad de una acción metabólica directa de los microorganismos.

8.2. Trabajos a futuro

- Analizar la implicancia de mecanismos genéticos involucrados en respuesta a estrés y/ o en respuesta concertada, en la corrosión microbiológica de AA6061 en medios diluidos o en medios minerales similares en formulación al agua de los repositorios nucleares.
- Evaluar el fenómeno estudiado desde el punto de vista electroquímico.

- Desarrollar un sensor de biofilms aplicable en medios de baja conductividad y zonas de difícil acceso.