



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROPUESTA PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL
GLUTARALDEHIDO EN LA CORROSION MICROBIOLÓGICA
INDUCIDA POR *Pseudomonas aeruginosa* EN
ACERO ESTRUCTURAL AISI 1010

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARCOS GONZALEZ MARTINEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

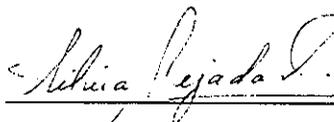
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Guadalupe Velez Pratt
Vocal Prof. Lilia Vierna García
Secretario: Prof. Silvia Lilia Tejada Castañeda
1er. Suplente Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chavez
2do. Suplente Prof. Marco Antonio Talavera

Sitio donde se desarrolló el tema:

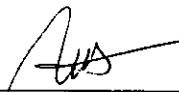
Laboratorio 112.
Departamento de Físicoquímica
División de Estudios de Posgrado.
Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:



QFB. Silvia Lilia Tejada Castañeda

SUSTENTANTE:



Marcos González Martínez

*Jamás te ha sido dado un deseo
Sin que se te haya otorgado
El poder de hacerlo realidad*

Richard Bach

DEDICATORIA

A mis **padres**, mis **hermanos** y mi **abuela**
por todos los momentos familiares
que hemos compartido.

A mi **Mamá** por su apoyo, su amor y dedicación,
durante toda mi vida. Por respetar mis opiniones
y mis ideales, por sus consejos y regaños.

A mi **Papá** por creer en mí, por su apoyo,
por su amor y respecto a mis convicciones.

A mi hermana **Verónica** por sus consejos y opiniones,
su confianza y apoyo a lo largo de mi carrera y de mi vida.

A mi hermano **Gustavo** por su confianza.

A mi hermano **Jorge** por su apoyo y confianza.

A mi hermana **Wendy** por su dedicación, confianza,
y tiempo, por seguir mis consejos y compartir opiniones.

A mi hermano **Bryan** por su cariño y su tiempo.

A mi **abuela** por consentirme y apoyarme mucho.

A mi **teacher** por creer siempre en mí.

A mis amigas intrañables, **Verónica y Adriana**
por compartir momentos muy gratos a lo largo de todos estos años,
por su apoyo, confianza, y solidaridad.

AGRADECIMIENTOS

A **Silvia Tejada Castañeda**, -Teacher- por su apoyo, confianza, enseñanzas, y asesoría, respeto a mis ideas pero sobretodo por su amistad a lo largo de la realización de mi servicio social y tesis, y por estar presente en los últimos años.

A **Lilia Vierna García** por su colaboración, asesoría, apoyo, sugerencias y comentarios en la realización del proyecto de tesis y el desarrollo de ella.

A **Aurora Ramos Mejía** por su apoyo, comentarios y sugerencias durante mi estancia en el laboratorio 112 D. E. Pg. de la Facultad de Química de la UNAM.

A **Ma. Luisa** por el apoyo en la realización de esta tesis, además de ser aliada y "cómplice" durante mi estancia en el laboratorio.

A **Guadalupe Vélez Pratt** por sus observaciones, comentarios y sugerencias.

A **Germán** por compartir momentos agradables en el laboratorio.

A **Mónica Balderas**, por compartir momentos muy buenos.

A mis amigos de generación **Margarita, Israel, Sandra, Mónica, Federico, Abigail, Alejandra, Adrián, Paco, Deyanira, Erika, Aurora, Gerardo** por hacer la estancia en la Universidad muy divertida.

A mis compañeros y amigos de la AMBC-SE, **Paco, Frausto, Rivelino, Eva, Luis Joaquín, Frausto**, por formar un equipo de trabajo de "*calidad rumbo a la excelencia*".

A **Gabriel** por sus "enseñanzas" a largo de la carrera.

A mis amigas **Mónica "la ardilla", Myriam "The Nanny", Mirna**, por hacer de la Genética algo divertido.

A mis compañeros y amigos de trabajo en Q. V., **Lety, Cathy, Eliseo, Toño**, por hacer el trabajo más leve y divertido y por su apoyo durante mi estancia.

A mis amigo de una etapa muy importante de mi vida, **Vicente y Yudel**.

A **Maricela** por sus consejos, ayuda y amistad.

A **América, Guadalupe, Karla, Adriana, Erika** por todos los momentos que pasamos.

A **Daniel** por su apoyo durante mucho tiempo, sus enseñanzas y su colaboración en esta tesis.

A todos mis compañeros y maestros que hicieron que mi formación fuera plena.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A **K. H.** por su creatividad y cariño.

A **G. B. H.** por su apoyo, su amistad incondicional, y confianza.

A **Nohemí** por ser una amiga de tiempo completo

A mi amiga **Val** por su compañía y su amistad en la Universidad y en por ser un gran apoyo en Q. V.

A **Samantha y Aarón** por todos los momentos que pasamos juntos durante nuestra estancia en AMBC-SE y fuera de ella.

A "*hermanita*" **Mayren** por ser tan inocente y apoyarme durante la carrera.

A **Paty**, por compartir los buenos momentos y "los días de estudio", por su apoyo y su comprensión y confianza.

A **Armando** por compartir, confiar, creer, y trabajar juntos durante la carrera

Abreviaturas usadas en esta tesis

AISI. American Iron and Steel Institute.

APasa. Fosfatasa alcalina.

BSR. Bacterias Sulfato Reductoras

DNA o ADN. Ácido desoxirribonucleico.

EDTA. Ácido etilendíamino tetrasódico

ELISA. Inmunoanálisis enzimático.

MPE. Material Polimérico Extracelular.

NMP. Número Más Probable.

PVC. Cloruro de polivinilo.

QUATS. Compuestos de amonio cuaternario.

RNA o ARN. Ácido ribonucleico.

R_p. Resistencia de polarización.

UFC o CFU. Unidades Formadoras de Colonias.

USEPA. Siglas en inglés de *United States Enviromental Protection Agency*.

INDICE

Introducción	1
Capítulo 1. Fundamentos de Corrosión	5
1.1 Corrosión	7
1.2 Clasificación de la Corrosión	8
1.2.1 Clasificación según la forma	
1.2.2 Clasificación según el medio	10
1.3 Corrosión electroquímica	10
Capítulo 2. Fundamentos de Microbiología	13
2.1 Microbiología	15
2.2 Anatomía de las bacterias	
2.3 Reproducción bacteriana y crecimiento	17
2.3.1 Curva de crecimiento bacteriano	
2.4 Nutrición bacteriana	19
2.5 Medición del crecimiento bacteriano	21
2.5.1 Recuento del total de células	
2.5.2 Recuento de células viables	
2.5.3 Masa células	22
2.6 Influencia de factores ambientales sobre el crecimiento	23
2.6.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento y supervivencia de las bacterias	24
2.6.2 Efecto de la concentración de iones hidrógeno (pH) en la actividad microbiana	25
2.6.3 Efecto de la presión osmótica en el crecimiento bacteriano	26
2.6.4 Efecto del oxígeno en el crecimiento de las bacterias	27
2.7 Pseudomonadales	29
2.7.1 El género <i>Pseudomonas</i>	
2.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32

INDICE

Capítulo 3. Corrosión Microbiológica	35
3.1 Corrosión microbiológica y <i>biofouling</i>	37
3.1.1 Secuencia de producción de la corrosión metálica y el <i>biofouling</i>	
3.1.2 Mecanismos de interacción entre el <i>biofouling</i> y la corrosión	39
3.1.3 Biocorrosión y <i>biofouling</i> sobre diversos metales y aleaciones de interés	41
3.1.3.1 Acero al carbón y aceros inoxidables	
3.1.3.2 Titanio	42
3.1.3.3 Aleaciones de cobre níquel	
3.1.3.4 Aluminio y aleaciones	
3.1.4 Incidencia práctica y económica de la biocorrosión y el <i>biofouling</i> en diversos sistemas industriales.	43
3.2 Cómo identificar la biocorrosión	44
3.2.1 Aspecto superficial del metal	
3.2.2 Aspectos biológicos	
3.3 Seguimiento y evaluación de la biocorrosión y el <i>biofouling</i>	48
3.3.1 Técnicas de monitoreo del <i>biofouling</i>	
3.3.1.1 Monitores para el <i>microfouling</i>	
3.3.1.3 Monitores para el <i>macrofouling</i>	49
3.3.1.3 Medidas directas del <i>biofouling</i>	
3.3.1.4 Medidas indirectas del <i>microfouling</i>	
3.3.2 Monitores de biocorrosión	50
3.3.2.1 Metodologías de estudio en la biocorrosión	
3.4 Prevención y control	53
3.4.1 Conceptos básicos	
3.4.1.1 Limpieza	54
3.4.1.1.1 Limpieza mecánica	55
3.4.1.1.2 Limpieza química	

INDICE

3.5 Biocidas	56
3.5.1 Biocidas oxidantes	57
3.5.1.1 Cloro	
3.5.1.2 Bromo y derivados	
3.5.1.3 Ozono	58
3.5.1.4 Peróxido de hidrógeno	
3.5.2 Biocidas no oxidantes	
3.5.2.1 Glutaraldehído	59
3.5.2.2 Compuestos de amonio cuaternario	
3.5.2.3 Acroleína	60
3.5.2.4 Isotiazolinas	
3.6 Otros métodos de prevención y control	61
3.6.1 Recubrimientos	
3.6.2 Selección de materiales	
3.6.3 Protección catódica	
3.7 Corrosión microbiológica causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Capítulo 4. Propuesta Experimental para Determinar el Efecto del glutaraldehído en la corrosión Microbiológica Inducida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
4.1 Selección del medio de cultivo y cinética de crecimiento	71
4.1.1 Selección del medio de cultivo	
4.1.1.1 Medios de cultivo empleados por Tejada y cols.	
4.1.1.2 Medios de cultivo empleados en los trabajos publicados de corrosión inducida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
4.1.1.3 Recomendación sobre el medio de cultivo	73
4.1.2 Cinética de crecimiento	
4.2 Experimentos para determinar el efecto del glutaraldehído en la corrosión microbiológica inducida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en acero AISI 1010	76
4.2.1 Preparación de los elementos de las celdas de corrosión aerobia	
4.2.1.1 Elaboración de los electrodos de trabajo	77
4.2.1.2 Elaboración de las celdas de corrosión	78

INDICE

4.3 Mediciones de pH y temperatura	80
4.4 Mediciones de corriente y potencial	81
4.5 Pruebas microbiológicas	
4.5.1 Pruebas de identificación de bacterias	
A. Tinción de Gram	
B. Pruebas bioquímicas	82
B.1 Producción de ácido sulfhídrico	
B.2 Utilización de citrato	
B.3 Prueba de la ureasa	83
B.4 Prueba de la catalasa	
B.5 Prueba de nitratos	
B.6 Prueba del Indol	
B.7 Prueba de la oxidasa	84
4.5.2 Determinación del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85
4.6 Prueba de actividad	
4.7 Microscopía electrónica	86
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones	87
Conclusiones	89
Recomendaciones	90
Glosario	91
Bibliografía	101

INTRODUCCIÓN

Al escuchar la palabra corrosión la mayor parte de la gente la asocia con la herrumbre, oxidación propia de los metales ferrosos, sin embargo, la corrosión implica la causa general de alteración y destrucción de los materiales naturales o fabricados por el hombre, como son, entre otros, tuberías de agua, construcciones de, piedra o concreto, automóviles, envases metálicos para conservas.

La corrosión tiene una importancia tal que los problemas derivados de ella se pueden observar en tres vertientes:

- económica, con pérdidas reflejadas en el Producto Nacional Bruto, que en países desarrollados como Gran Bretaña, son alrededor del 3 y el 5%.
- conservación de recursos, por el agotamiento de las reservas naturales.
- seguridad humana, por fallos fatales en medios de transporte, corrosión de bidones que contienen residuos radiactivos, escapes de tuberías de refrigeración de plantas nucleares, etc.

La corrosión inducida por microorganismos ha demostrado ser un serio problema, reconocido actualmente como la mayor fuente de problemas y fallas estructurales que afectan a gran variedad de industrias.

En una estimación realizada por Wakerley en el Reino Unido hacia fines de la década de los setenta, atribuye el 20% de los casos de corrosión de ese país a aquéllos causados por microorganismos. Si esto se relaciona con los gastos promedio debidos a la corrosión de un país industrializados, con una estimación del 4% del Producto Nacional Bruto, la biocorrosión causaría pérdidas económicas para el caso de Estados Unidos de Norteamérica, de aproximadamente 60 billones de dólares / año (97).

Uno de los microorganismos causantes de corrosión es *Pseudomonas aeruginosa*, que se encuentra en una gran variedad de ambientes, y cuya presencia ha demostrado tener importantes consecuencias económicas y sociales.

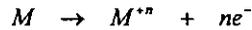
El objetivo de esta tesis es realizar una propuesta para evaluar el efecto de un biocida, considerando trabajos previos llevados a cabo por Tejada y colaboradores, en el laboratorio 112 de la División de Estudios de Posgrado (DEPg.) de la Facultad de Química de la UNAM, así como lo reportado en la bibliografía para *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismo causante de corrosión que presenta resistencia a un gran número de biocidas por factores que se explican en el capítulo 3, en acero estructural AISI 1010 y glutaraldehído como biocida de prueba, empleando técnicas electroquímicas, como R_p y pendientes de Tafel, con el uso de material y equipo existente en este laboratorio.

CAPÍTULO 1
FUNDAMENTOS DE CORROSIÓN

1.1 CORROSIÓN

La corrosión es la reacción química o electroquímica entre un material, generalmente un metal, y su medio ambiente (114), que como consecuencia produce el deterioro del mismo y sus propiedades.

La reacción de corrosión puede expresarse parcialmente por la ionización del metal, es decir, es el proceso por el cual un átomo metálico pierde electrones y queda cargado con un exceso de cargas positivas, que es igual al número de cargas negativas o electrones que se perdieron. Esta reacción puede ser representada así:



Donde M es un metal de valencia n , M^{n+} es su forma iónica y e^{-} el número de electrones cedidos (Figura 1).

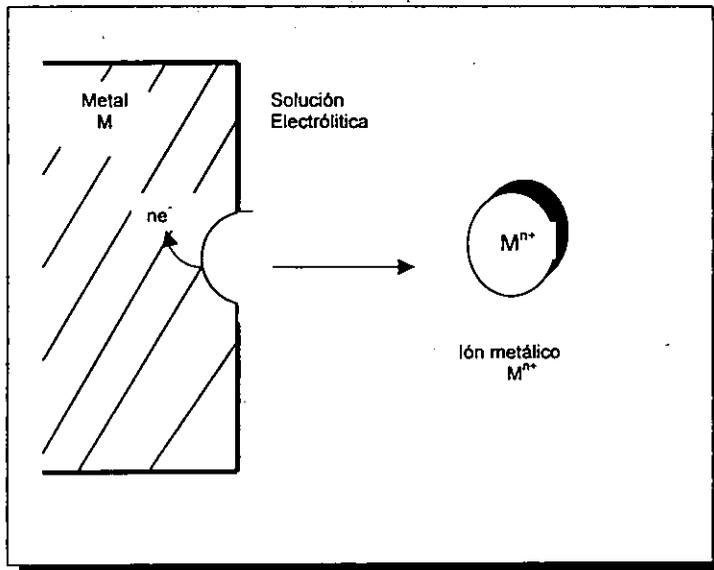


Fig. 1.1 Reacción de corrosión parcial

El fenómeno de la corrosión está asociado con los metales siendo un proceso indeseado que involucra reacciones químicas y electroquímicas, óxido-reducción o redox, que en algunos ambientes llegan a ser de mayor importancia. El ambiente es el nombre que se le da a todas las especies químicas y factores fisicoquímicos que rodean al metal que adquiere carga positiva, o que se corroe, al tiempo en que se desarrolla el proceso. Dado que las reacciones electroquímicas involucran la transferencia de electrones, este tipo de reacciones puede ser influenciado por el potencial eléctrico.

1.2 CLASIFICACIÓN DE LA CORROSIÓN (52)

Para su estudio los procesos de corrosión pueden ser clasificados según el medio en el que se desarrollan o según su morfología. Se clasifican de la siguiente manera:

1.2.1 Clasificación según la forma

La clasificación según la forma es útil cuando se requiere evaluar los daños producidos por la corrosión.

Corrosión uniforme. Es la forma de corrosión más benigna. El ataque se extiende en forma homogénea, sobre toda la superficie metálica, y su penetración media es igual en todos los puntos. Un ataque de este tipo permite calcular fácilmente la vida de materiales expuestos a él. Por ejemplo: el ennegrecimiento de la plata.

Corrosión en placas. Abarca los casos intermedios entre corrosión uniforme y corrosión localizada. En este caso el ataque se extiende más en algunas zonas, pero se presenta aún como ataque general.

Corrosión por picado. Este tipo de ataque, así como el intergranular y fisurante, son las formas más peligrosas en que puede presentarse la corrosión. En estos casos de ataque localizado, la cantidad de material afectado no guarda relación con la magnitud de los inconvenientes que puede causar. Por ejemplo, el acero inoxidable sumergido en agua de mar que se corroe por la formación de picaduras profundas, y la perforación de cañerías o tanques.

Este es un tipo de ataque localizado donde la rapidez de corrosión es más grande en una áreas que en otras. Si el ataque está confinado a un área fija, relativamente pequeña, que actúa como ánodo, la picadura resultante se conoce como picadura profunda. Si el área de ataque es relativamente grande y poco profunda, se llama picadura superficial.

Durante el picado, el ataque se localiza en puntos aislados de superficies metálicas pasivas, se propaga hacia el interior del metal, en ocasiones formando túneles microscópicos.

Una variación de la corrosión por picado, es la denominada corrosión por rendijas, *crevice corrosion*. Se presenta en uniones e intersticios, donde la renovación del medio sólo puede producirse por difusión.

Corrosión intergranular. Este es un tipo de ataque localizado en los límites de grano de un metal, que resulta en una pérdida de dureza y ductilidad. El conjunto del límite de grano y el área del grano, funcionan como una celda electroquímica, esto es, el material del límite de grano es un área limitada que actúa como ánodo, mientras que las grandes áreas de grano actúan como cátodos. Este ataque frecuentemente, es rápido, penetrando profundamente dentro del metal, causando algunas veces fallas catastróficas. Un ejemplo intergranular no electroquímico, es el ataque que sufre el níquel en una atmósfera sulfurosa, esto se debe a que el sulfuro penetra a través de los límites de grano.

Corrosión fisurante. Conocida también como corrosión bajo tensión. Puede presentarse cuando el metal está sometido simultáneamente a la acción de un medio corrosivo y a tensiones mecánicas de tracción.

Se forman fisuras que pueden ser transgranulares o intergranulares y que se propagan hacia el interior del metal, hasta que las tensiones se relajan o el metal se fractura.

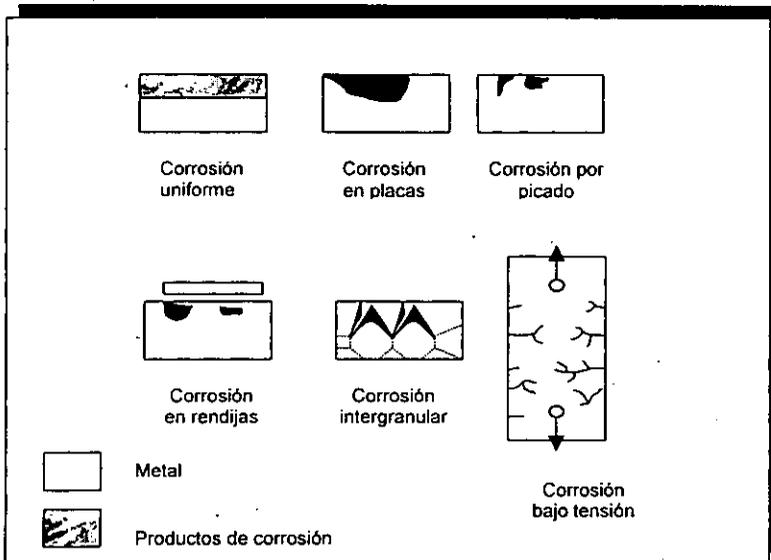


Fig. 1.2. Clasificación morfológica de las formas de corrosión

1.2.2 Clasificación según el medio

La clasificación según el medio es útil cuando se estudian los mecanismos de ataque. Se clasifican de la siguiente manera:

Corrosión Química. Se estudian bajo esta denominación todos aquellos casos en que el metal reacciona con un medio no iónico, por ejemplo: oxidación en aire a alta temperatura, reacción con una solución de yodo en tetracloruro de carbono, etc.

Corrosión Electroquímica. Considerando la participación de iones metálicos, todos los procesos de corrosión son electroquímicos. Sin embargo es usual designar corrosión electroquímica a la que implica un transporte simultáneo de electricidad a través de un electrolito. A este grupo pertenecen la corrosión en soluciones salinas y agua de mar, corrosión atmosférica, corrosión de los suelos, etc.

1.3 CORROSIÓN ELECTROQUÍMICA (52)

En presencia de un medio acuoso, la corrosión es de naturaleza electroquímica. Tal corrosión es un proceso espontáneo que denota la existencia de una zona anódica (que sufre corrosión), una zona catódica y un electrolito, siendo indispensable la presencia de estos tres elementos para que este tipo de corrosión pueda existir (se requiere asimismo de contacto eléctrico entre la zona catódica y la anódica).

El término ánodo se emplea para describir aquella porción de una superficie metálica en que tiene lugar la corrosión (disolución) y en la cual se liberan electrones como consecuencia del paso del metal en forma de iones, al electrolito. La reacción que sucede en el ánodo, por ejemplo en el caso del zinc, es una reacción de oxidación:

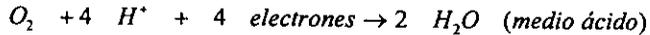
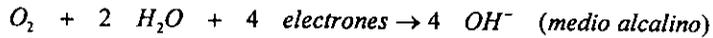
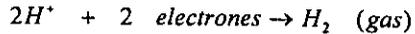


Como los electrones, en un conductor metálico, se mueven en sentido opuesto al convencional¹, en el ánodo la corriente eléctrica sale del metal para entrar a la solución. El término cátodo se aplica a la porción de una superficie metálica en la cual los electrones producidos en el ánodo se combinan con determinados iones presentes en el electrolito.

¹ El sentido de una corriente eléctrica se define como el sentido del movimiento de las cargas libres. Sin embargo, surge la dificultad de que en un conductor electrolítico están en movimiento en sentidos opuestos cargas libres de ambos signos (cationes y aniones). Cualquiera que fuera el sentido asignado a la corriente, habría cargas moviéndose en sentido opuesto. Ya que ha de adoptarse algún convenio, se ha coincidido en hablar del sentido de una corriente como si los portadores fueran todos compuestos por cargas positivas.

En un conductor metálico, sólo son libres las cargas negativas o electrones libres. De aquí que toda la corriente en un conductor metálico se produce por el movimiento de cargas negativas y, por tanto, los electrones se mueven en sentido opuesto al convencional.

- Las reacciones catódicas más comunes en presencia de agua son reacciones de reducción:



La corrosión más frecuente es de naturaleza electroquímica y resulta de la formación de multitud de zonas anódicas y catódicas sobre una superficie metálica, siendo el electrolito en caso de no estar sumergido o enterrado el agua de condensación de la atmósfera para lo cual se necesita que la humedad relativa del aire sea del orden del 70% o superior.

Al cambiar continuamente de posición estas zonas catódicas y anódicas, llega un momento en que el metal se disuelve continuamente. Este tipo de corrosión se caracteriza porque casi siempre es más pronunciada en unas zonas que en otras, y su forma de manifestarse más característica es la aparición de picaduras.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records.

2. It is essential to ensure that all data is entered correctly and consistently.

3. Regular audits should be conducted to verify the accuracy of the information.

4. Proper documentation is crucial for the long-term success of the project.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA

2.1 MICROBIOLOGÍA

La **Microbiología** es el estudio de los organismos demasiado pequeños para ser claramente percibidos a simple vista y que se denominan, por ello, microorganismos (109).

Los microorganismos productores de la corrosión pueden ser (22, 113):

- ✓ Hongos, filamentosos y levaduriformes
- ✓ Algas
- ✓ Bacterias

La corrosión microbiológica es un tema difícil de tratar por ser un área interdisciplinaria que es y ha sido analizada principalmente por ingenieros químicos, ingenieros químicos metalúrgicos, químicos (115, 116), los cuales en su currículo no tienen materias relacionadas a la microbiología por lo cual en esta tesis realizamos una breve revisión de las características de las bacterias.

2.2 ANATOMÍA DE LAS BACTERIAS

La anatomía de un organismo se refiere a su tamaño y forma, y las características estructurales que lo hacen distinto. La anatomía es una característica heredada derivada de información almacenada en DNA cromosomal. Se transmite de una generación a otra (109).

Observando bajo la luz del microscopio, las bacterias aparecen en variaciones de tres diferentes formas: la cilíndrica, la esférica, y la espiral. La forma cilíndrica se conoce como **bacilo**. Algunos son rectangulares con terminaciones cuadradas otros se encuentran en grupos. La mayoría de los bacilos se encuentran solos, pero muchos forman cadenas llamadas **estreptobacilos**.

Una bacteria esférica se conoce como **coco**. Aquellos cocos que se mantienen juntos en pares después de la división son llamados **diplococos**. Aquellos que consisten en cadenas de diplococos son llamados **estreptococos**. Otra variación de los cocos es la **sarcina**. Esta es como paquetes cúbicos de ocho cocos. Ciertos cocos se dividen al azar y forman grupos irregulares parecidos a racimos de uvas de células llamados **estafilococos**.

La tercera forma importante de organismos bacterianos es la espiral. Ciertas bacterias espirales denominados **vibrios** son cilindros curvos que semejan comas bajo el microscopio. Otras bacterias espirales llamadas **espirilos** tienen forma de sacacorchos. Y existen otras conocidas como **espiroquetas** (15, 95, 100).

Variaciones en la anatomía bacteriana son realmente visibles cuando los organismos son amplificados unas cien veces bajo el microscopio óptico. Cuando se usa el microscopio electrónico, se amplifica un millón de veces o más y los científicos pueden observar un mundo de finos detalles bacterianos que no pueden ser vistos por un observador casual.

En la tabla 2.1 se resumen las características de las bacterias (109).

Estructura	Composición Química	Función	Observaciones
Flagelos	Proteína	Movimiento	Presente en varios bacilos y espirilos; algunos cocos; varía en el número y la ubicación
Pili	Proteína	Unión a superficies Transferencia genética	Se encuentran en varias bacterias Gram negativas Estimula el sistema inmune
Cápsula y glicocalix	Polisacáridos y proteínas pequeñas	Barrera para el medio ambiente Contribuyen a la enfermedad	Fuente de viscosidad de la leche y el pan Se encuentra en medios sólidos
Pared celular	Las Gram positivas tienen péptidoglicano con ácido teicoico. Las Gram negativas tienen péptidoglicano, lipopolisacáridos, fosfolípidos, lipoproteínas	Unión a superficies Protección celular Determinación de la forma	Sitio de actividad de la penicilina y lisozima
Membrana celular	Proteínas Fosfolípidos	Límite celular Transporte dentro y fuera de la célula Sitio de enzimas	Conforme al modelo de mosaico fluido Susceptible a los detergentes, alcoholes y algunos antibióticos.
Citoplasma	Agua, proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.	Sustancia fundamental de la célula	Sitio del metabolismo y del crecimiento Semitransparente, delgada
Ribosomas	RNA y proteína	Síntesis de proteínas	Inhibidos por ciertos antibióticos
Gránulos metacromáticos	Fosfato	Almacenamiento	Encontrado en el bacilo de la difteria
Magentosoma	Magnetita	Orientación celular	Ayuda a la localización preferente de la célula
Cromosoma	DNA	Sitio del código genético Sitio de la herencia	Llamado nucleóide
Plasmidos	DNA extracromosomal	Sitio de algunos genes	Contienen factores R
Esporas	Composición química compleja con ácido dipicolínico	Resistencia al medio ambiente	Producidas por especies de <i>Bacillus</i> y <i>Clostridium</i> Probablemente la mayor forma de resistencia conocida.

Tabla 2.1. Un resumen de las características de las bacterias.

2.3 REPRODUCCIÓN BACTERIANA Y CRECIMIENTO

Las bacterias se reproducen por un proceso asexual llamado fisión binaria. En esta secuencia de eventos, el cromosoma se duplica, la célula se alarga, y la membrana citoplasmática se invagina en el centro de la célula (108, 73). Micrografías electrónicas de varias bacterias revelan una estructura membranosa llamada mesosoma que puede fungir como el sitio de unión del DNA durante la división cromosómica. Cuando el material nuclear se ha distribuido, la pared celular se vuelve más gruesa y crece hacia el interior para separar la celular en división (109).

Una vez completada la división, la bacteria madura y desarrolla las características que hacen a cada especie única. El intervalo de tiempo hasta el final de la siguiente división se conoce como tiempo de generación. En algunas bacterias, el tiempo de generación es muy corto; para otras es muy grande.

2.3.1 Curva de crecimiento bacteriano.

Una típica curva de crecimiento para una población de células bacterianas, es como muestra la figura 2.1 (138), ilustra algo de la dinámica de la población que es afectada con el transcurso del tiempo. La historia de la población puede iniciar cuando las bacterias son transferidas a un tubo de ensayo con medio de cultivo en el laboratorio.

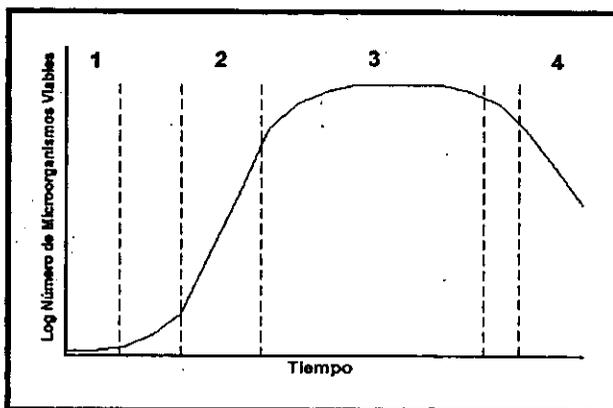


Fig. 2.1 Curva de crecimiento bacteriano

Se reconocen cuatro distintas fases de la curva de crecimiento como sigue (15, 95):

La **fase lag** (Figura 2.1, 1.) abarca las primeras horas de la curva. Durante este período las bacterias se acostumbran a su nuevo medio ambiente. En un medio de cultivo muchos organismos pueden morir por el efecto de la transferencia. Sin embargo, la actividad bioquímica de las células sobrevivientes se intensifica y comienzan a almacenar nutrientes, sintetizar enzimas, y prepararse para la fisión binaria. En la curva se ve una meseta, equilibrada por la reproducción temprana de algunas células y la muerte de otras.

La población entra a una etapa de crecimiento denominada la **fase logarítmica** (frecuentemente llamada **fase log**, Figura 2.1, 2). La masa de cada célula aumenta rápidamente y la reproducción continúa. Conforme pasa el tiempo de generación, el número de bacterias se duplica y la gráfica crece en línea recta si se usan los logaritmos (base 10) de los números actuales para la curva.

En el laboratorio, el crecimiento poblacional puede ser vigoroso tanto que aparecen colonias visibles en los medios sólidos, cada colonia consiste de millones de organismos. Los medios líquidos se pueden enturbiar con el crecimiento. Debido a que la población está en su óptimo bioquímicamente, las investigaciones se llevan a cabo, generalmente, durante la fase log.

Después de varias horas o días, el vigor de la población cambia y, las velocidades de reproducción y muerte se igualan, la población entra a otra meseta, la **fase estacionaria** (Figura 2.1, 3).

En medios de cultivo, los nutrientes comienzan a escasear, productos de desecho se acumulan, y factores como el oxígeno o el agua deben proporcionarse.

Si estas condiciones continúan, el medio ambiente ejercerá su acción limitante en la población y sobrevendrá la **fase de declinación** (Figura 2.1, 4). Ahora el número de células muriendo excede el nuevo número de células formadas. La cápsula bacteriana puede evitar la muerte actuando como amortiguador para el medio ambiente, y los flagelos pueden permitir al microorganismo desplazarse a un nuevo lugar.

2.4 NUTRICIÓN BACTERIANA

Los requerimientos nutritivos de una bacteria están determinados por la composición química de la célula, por su constitución genética y por factores del medio ambiente. Considerando las necesidades nutricionales de las bacterias desde el punto de vista meramente químico, cualquier sustrato o medio de cultivo que contenga los componentes constitutivos de las células proporcionará los requerimientos nutricionales para el desarrollo de las bacterias; no obstante, estos varían ampliamente en sus características genéticas y consecuentemente en sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar a los diferentes compuestos químicos.

La forma química específica bajo la cual las bacterias adquieren el carbono, nitrógeno, fósforo y oxígeno, así como su energía, es muy variable, lo que determina que los microorganismos presenten múltiples tipos nutricionales. Una clasificación muy sencilla es aquella que se basa en dos parámetros: la naturaleza de las fuentes de carbono y la de fuente de energía. Con respecto a la fuente de carbono, se denominan **autótrofos** a los microorganismos que usan CO_2 y carbonatos y **heterótrofos** a aquellos que derivan su carbono celular de compuestos orgánicos. Con relación a la fuente de energía se tienen dos grupos: los **fotoótrofos**; estos utilizan la energía electromagnética (luz) para su desarrollo, los **quimiótrofos**, que obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos químicos (101).

Utilizando estos criterios se ubica a los microorganismos en cuatro clases nutricionales que se describen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2

Clases nutricionales	Fuente de energía	Fuente de carbono	Ejemplos de grupos microbianos
Fotoautótrofas	Luz	CO_2	Algas y muchas bacterias fotosintéticas
Fotoheterótrofas	Luz	Compuestos orgánicos	Bacterias verdes y rojas
Quimioautótrofas ¹	Oxidación de compuestos inorgánicos como: NH_3 , H_2 , H_2S , S^0 , S_2O_3 , Fe^{2+}	CO_2	Sólo algunas bacterias (nitrificantes, oxidantes del hidrógeno, azufre y hierro)
Quimioheterótrofas ²	Oxidación de compuestos orgánicos	Sustratos orgánicos	Protozoarios, hongos y la mayoría de las bacterias

1. Como resultado de la capacidad distintiva de crecer en medios estrictamente minerales y en ausencia de luz, también se les denomina quimiolitótrofos (de la palabra griega *lithos*, roca)
2. Estos microorganismos utilizan un mismo nutriente como fuente de carbono y energía

La versatilidad fisiológica de los microorganismos determina en cierto grado que esta clasificación sea arbitraria, por ejemplo: muchas algas (fotoautótrofas pueden crecer también en la oscuridad comportándose como quimioheterótrofas. Esta versatilidad se conoce con el término de **facultativo**.

Así, un fotoautótrofo estricto forzosamente depende de la luz y del CO_2 , en tanto que un fotoautótrofo facultativo no es dependiente absoluto y tienen requerimientos nutricionales alternativos.

2.5 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento se mide por cambios sucesivos en el número de células o por el masa de la masa de las células (15, 36).

2.5.1 Recuento del total de células

El recuento de células en una población se puede medir contándolas bajo el microscopio, método que se llama **recuento directo al microscopio** (15). La utilización de una cámara de recuento o cámara de conteo es fácil, económica y relativamente rápida; ofrece también información acerca del tamaño y la morfología de los microorganismos (100). Las cámaras de Petroff-Hausser se pueden emplear para contar bacterias al microscopio pero es más conveniente utilizar un analizador electrónico de partículas (p. e. el contador Coulter) (36, 109). Las cámaras de recuento y contadores electrónicos permiten contar todas las células, vivas o muertas (100, 138).

El recuento directo al microscopio es tedioso, pero es una forma rápida de estimar la cantidad de células microbianas (15).

2.5.2 Recuento de células viables

En muchos casos sólo nos interesa contar el número de células vivas para este propósito se han desarrollado métodos de recuento de células viables. Célula viable se define como la que es capaz de dividirse y formar una progenie, y la forma usual para realizar una cuenta de viabilidad en la muestra, capaces de formar colonias sobre un medio adecuado de agar. Por esta razón el recuento de viables se suele llamar recuento en placa o de colonias (23). La consideración hecha de este tipo de procedimientos de recuento es que cada célula o grupo de células dará una colonia (15, 100).

Hay dos formas de realizar un recuento en placa: el método de **siembra en placa** por extensión y el método de **vaciado en placa** (15, 36, 100, 109, 138). Con ambos métodos es importante que el número de colonias que se desarrollan no sea demasiado grande, ya que en las placas muy atestadas, algunas células pueden no formar colonias y la cuenta sea errónea. También es esencial que el número de colonias no sea demasiado pequeño, caso en el cual la significación estadística de la cuenta calculada será muy baja. La práctica común, la que tiene mayor significado estadístico, es la de contar solamente aquellas placas que tengan entre 25-30 y 250-300 colonias (15, 100).

Para obtener el número apropiado de colonias, usualmente se debe diluir la muestra a contar. Como rara vez se conoce la cuenta viable aproximada en un momento, suele ser necesario hacer más de una dilución (15).

Nótese que dos o más células agrupadas pueden formar una sola colonia, de modo que el recuento de viabilidad puede resultar muy bajo. Para establecer más claramente el resultado, el recuento de viables se expresa como el número de unidades formadoras de colonias con preferencia a la cantidad de células viables (dado que una unidad formadora de colonias puede contener una o más células).

2.5.3 Masa de células

Para muchos estudios es deseable estimar la masa de las células con preferencia al número. La única manera de directa de medir la masa celular es determinar el **peso seco** del material celular en un volumen fijo de cultivo (109). El número neto se puede medir, después de la centrifugación de las células, pesando el depósito de células obtenido. El peso seco se mide secando la masa celular centrifugada antes de pesarla, colocándola de un día para otro en una estufa a 100-105° C. Usualmente el peso seco es alrededor del 20 al 30% del peso húmedo (15). Como las bacterias pesan poco, puede ser necesario centrifugar varios cientos de mililitros de cultivo para recoger una cantidad suficiente (100). Tal determinación requiere mucho tiempo y es relativamente poco sensible (109).

Un método más sencillo y más útil para obtener una estimación relativa de la masa celular consiste en medir la **turbidez**. Una suspensión de células se ve turbia porque cada célula dispersa la luz y será más turbia. La turbidez se puede medir con un dispositivo que funciona eléctricamente, llamado colorímetro o espectrofotómetro. Con tal dispositivo, la turbidez se expresa en unidades de **absorbancia**. Para organismos unicelulares, la absorbancia es proporcional a la cantidad de células, así como su peso, por lo que las lecturas de turbidez se pueden utilizar como sustituto de la cuenta. Para efectuar el recuento de células en esta forma, se debe preparar una curva estándar para cada uno de los organismos estudiados, relacionando el número de células con la masa de las células o la absorbancia. La turbidez es mucho menos sensible como medio de medir la densidad celular que hacer la cuenta de viables, pero tiene la virtud de que es rápido, fácil y no destruye la muestra. Tales mediciones se utilizan ampliamente para seguir la velocidad de crecimiento de los cultivos, dado que la misma muestra se puede comprobar repetidamente (15, 36, 73, 95, 109, 138).

2.6 INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO

Los factores físicos y químicos tales como la temperatura, presión osmótica, pH, radiaciones, oxígeno, actividad del agua, naturaleza y concentración de los compuestos químicos orgánicos e inorgánicos que predominan en un medio específico, determinan los tipos nutricionales y metabólicos de las bacterias que habitan el mismo, debido a que el conjunto de éstos favorece selectivamente a algún(os) grupo(s) microbiano(s) y prácticamente pueden eliminar la posibilidad de que otros se instalen en él (101).

El conocimiento de las condiciones físicas y químicas ambientales que regulan la sobrevivencia y multiplicación de las bacterias, nos ayuda a explicar la distribución de las mismas en la naturaleza y nos permite idear y aplicar métodos que permitan:

- Cultivarlas en condiciones óptimas, o bien,
- Disminuir o eliminar la actividad bacteriana en áreas o productos terminados

A menudo y por múltiples razones, la actividad microbiana es inoportuna o indeseable, en estos casos es necesario aplicar agentes físicos y/o químicos en tal cantidad que permitan disminuir esa actividad, (**efecto biostático**), o bien, inhibir la actividad microbiana, **efecto biocida**.

El efecto estimulante, inhibitorio o destructivo que ejercen los factores físicos y químicos sobre las bacterias está condicionado por:

- El tipo, edad, cantidad y estado fisiológico de las bacterias
- La cantidad o concentración del agente externo
- El tiempo de exposición
- La interacción de otros factores ambientales

Por ejemplo, el fenol al 5.0% elimina a la mayoría de las bacterias, en tanto que cuando está muy diluido puede servir como fuente de energía para bacterias del género *Pseudomonas*.

Los agentes físicos y químicos ejercen su acción inhibitoria o destructiva a través de diversos mecanismos que ocasionan:

- ✓ Destrucción de la célula, principalmente por daño a nivel de pared celular o de membrana citoplasmática.
- ✓ Alteración de la organización celular. Principalmente de la permeabilidad, o de las proteínas estructurales.
- ✓ Interferencia en los procesos de producción y utilización de energía, o de biosíntesis y crecimiento, por inhibición de enzimas o combinación con coenzimas o metabolitos intermedarios.

2.6.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento y sobrevivencia de las bacterias

La temperatura es uno de los factores más importantes, afecta tanto el índice de crecimiento como de muerte de un microorganismo. Cada grupo microbiano crece dentro de una gama de temperaturas limitadas por las llamadas **temperaturas cardinales**, que corresponden a la **temperatura mínima**, debajo de la cual un cultivo no puede crecer, y la **temperatura máxima**, por encima de cual un cultivo no se desarrolla. Dentro de estos límites se encuentra la **temperatura óptima** que es aquella en la que se registra el mejor crecimiento. La temperatura óptima, mínima y máxima de crecimiento de una especie bacteriana, está relacionada con la temperatura del hábitat normal del microorganismo.

Considerando la temperatura óptima de crecimiento las bacterias se clasifican en:

- **Psicrófilas**, aquéllas que se desarrollan en temperaturas entre 0 y 20°C; este grupo es importante en la descomposición de los alimentos y algunas de ellas están relacionadas con la corrosión microbiológica como *Ferrobacillus ferroxydans* (15).
- **Mesófilas**, crecen entre 20°C y 40°C; están representados por muchos microorganismos de la flora normal del cuerpo humano y con la mayoría de las bacterias que inducen la corrosión como *Desulfovibrio desulfuricans* o *Pseudomonas aeruginosa* (15).
- **Termófilas**, crecen mejor entre los 40°C y 65°C; este grupo se distribuye en los manantiales de aguas termales y en las salidas de vapor de lavanderías, y algunas que tienen relación con la corrosión son *Thiobacillus thiooxidans*, *Desulfovibrio thermophilus* y *Sulfolobus acidocaldarius* (15). Esta última es más termófila ya que es capaz de crecer a temperaturas hasta 85-90° C.

Las temperaturas bajas o inferiores a la mínima de desarrollo tienen efecto **biostático** o **biocida**, según se puede ver a continuación.

Con temperaturas bajas, pero por encima del punto de congelación, las reacciones metabólicas disminuyen y las células se conservan viables durante meses, en tanto que en el punto de congelación el efecto puede ser biostático pero también biocida; esto depende de:

- **Tipo de célula**, las bacterias cocoides y las formadoras de esporas son más resistentes que los bacilos Gram negativos
- **Medio en que se encuentran suspendidas las células**, los compuestos de alto peso molecular protegen a las células, posiblemente por regulación de la presión osmótica, favoreciendo el desplazamiento de solutos y evitando la concentración de éstos en el interior de la célula.

- **Ritmo de congelación y descongelación**, cuando las células se someten a temperaturas de -10°C o -15°C en el medio interno hay mayor cantidad de vapor de agua que tiende a compensarse por deshidratación, el agua líquida del interior pasa a su estado sólido, lo que determina la formación de cristales que lesionan las estructuras internas y la membrana, produciéndose lisis durante la descongelación.

De este modo, mediante la refrigeración o congelación es posible evitar el crecimiento microbiano, métodos que son ampliamente utilizados en la conservación de alimentos, así como de cultivos microbianos. Un proceso más eficiente corresponde a la combinación de la congelación y la deshidratación al vacío denominado liofilización; en éste la suspensión microbiana se congela a -76°C en un baño de alcohol y hielo seco y se deshidrata al vacío. Mediante este proceso las bacterias permanecen viables y conservan sus características por años.

Respecto a las temperaturas elevadas se tiene que, cuando la temperatura sube encima de la óptima, la actividad metabólica aumenta considerablemente y al mismo tiempo aumenta la velocidad de degradación de enzimas y desnaturalización de proteínas estructurales, provocando alteraciones y la muerte de la célula. Esto indica que las temperaturas elevadas son más nocivas y en consecuencia se emplean para destruir a las bacterias. La temperatura necesaria para eliminar microorganismos varía con:

- ♣ Tipo y cantidad de microorganismos
- ♣ Condiciones como el pH, presión osmótica, presencia o ausencia de materia orgánica
- ♣ Tiempo de exposición

Para determinar el intervalo de temperatura y el tiempo que deben aplicarse para destruir a las bacterias, se emplean las determinaciones que son, **punto térmico mortal**, temperatura a la cual muere un microorganismo en un término de diez minutos, y **periodo térmico mortal**, tiempo necesario para destruir a una población microbiana a una temperatura dada.

2.6.2 Efecto de la concentración de los iones hidrógeno (pH) en la actividad microbiana

El efecto de pH sobre los índices de crecimiento microbiano se basa, en gran parte, en la naturaleza de las proteínas. Debido a que la interacción de las cargas de los grupos R de los aminoácidos en las cadenas de polipéptidos influye mucho en la estructura y función de las proteínas, las enzimas son inactivas a valores de pH muy elevados o muy bajos, los valores de pH deben ser controlados para poder obtener índices óptimos de crecimiento, esto se logra añadiendo soluciones amortiguadoras a los cultivos.

La mayoría de las bacterias que inducen la corrosión crecen cerca de la neutralidad; otras llamadas **acidófilas**, crecen en un intervalo de pH bajo, como por ejemplo los *Thiobacillus*, se adaptan muy bien en un pH próximo a 1 (22).

Las bacterias acidófilas poseen adaptaciones fisiológicas que les permiten realizar las actividades enzimáticas y de transporte de membrana. La membrana citoplasmática de las bacterias acidófilas se desintegran a valores de pH neutros.

Los hongos son tolerantes a la acidez, lo que permite desarrollarse a pH más bajo que las bacterias, por lo que las frutas se contaminan más con hongos que con bacterias. La tolerancia a pH ácido se utiliza para diseñar medios de cultivo selectivos. Un medio de cultivo con un pH de 5.5 es favorable para el crecimiento de la mayoría de las bacterias.

Las condiciones alcalinas extremas pueden digerir muchos compuestos celulares; sin embargo, existen bacterias que crecen a pH 12 y se denominan alcalófilas.

2.6.3 Efecto de la presión osmótica en el crecimiento bacteriano

Las células bacterianas tienen una concentración osmótica diferente a la del medio en el cual están suspendidas. Cuando se coloca una célula bacteriana en un medio, éste ejerce una presión osmótica a través de la membrana semipermeable que rodea a la célula. La presión osmótica de una solución depende directamente de la concentración de sustancias disueltas en ella. Se dice que las soluciones de la misma presión osmótica son **isotónicas**. Por lo general, un microorganismo crece mejor en un medio que contenga una concentración osmótica ligeramente inferior a la propia célula. Esto hace que el agua fluya hacia el interior de la célula, condición esencial para que fluyan los nutrientes y para mantener una presión hacia fuera, denominada **turgencia**.

Al cambiar la concentración de solutos, no sólo se altera la disponibilidad de agua, sino también se altera la presión osmótica. La pared celular de bacterias las hace resistentes a los cambios de presión osmótica, pero modificaciones exageradas de ésta dan como resultado su muerte.

La tolerancia se ve en términos de actividad del agua y presión osmótica. Para describir la tolerancia a la sal se utiliza una terminología especial. Algunas bacterias conocidas como **halófilas** necesitan cantidades elevadas de cloruro de sodio para crecer. Las **halófilas moderadas**, en los que se incluyen muchas bacterias marinas, como *Desulfovibrio* crecen mejor a concentraciones de sal del 3%. Las **halófilas extremas** presentan sus índices de crecimiento más elevados en soluciones saturadas de sal (salmueras); dichos microorganismos crecen bien a concentraciones de sal mayores de 15% de cloruro de sodio y se distribuyen en lugares tales como lagos salados o barriles de salmuera. Las grandes concentraciones de sal, normalmente desorganizan los sistemas de transporte de las membranas y desnaturalizan proteínas, por lo que las halófilas extremas deben poseer mecanismos fisiológicos para tolerar concentraciones elevadas de cloruro de sodio, además de requerir otros solutos como potasio.

Sin embargo, la mayoría de las bacterias no tienen estas adaptaciones fisiológicas y no toleran las concentraciones elevadas de sal. El grado de sensibilidad a la sal varía para las distintas especies microbianas. Muchas bacterias no crecen a concentraciones de sal de 3.0%. Algunas cepas de *Staphylococcus*, son tolerantes y crecen en concentraciones mayores del 10%. Estas adaptaciones fisiológicas son muy importantes y están íntimamente ligadas con su hábitat.

Pero en general, las bacterias son inhibidas por altas concentraciones de solutos, 10-15% de cloruro de sodio y 50-70% de azúcar.

Este efecto es la base de la conservación de alimentos mediante salazón o utilizando soluciones concentradas de azúcar, lo que causa deshidratación y plasmolisis de las células y consecuentemente su inactivación o incluso su destrucción.

2.6.4 Efecto del oxígeno en el crecimiento de las bacterias

El crecimiento de muchas bacterias también depende en gran parte del aporte de oxígeno y, a este respecto, las bacterias aerobias son similares a la mayoría de los organismos complejos. Las bacterias anaerobias, por el contrario, deben tener un ambiente sin oxígeno para poder sobrevivir. Muchas bacterias anaerobias mueren si el oxígeno está presente, mientras otras simplemente dejan de crecer y multiplicarse.

Algunas bacterias son tanto aerobias como anaerobias, o sea son facultativas. Las bacterias facultativas crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Algunos microbiólogos creen que la mayoría de las bacterias pueden ser microorganismos facultativos. Un grupo final es el de las bacterias microaerófilas. Estas requieren de una baja concentración de oxígeno para crecer (15, 100, 109).

La respiración es un proceso de oxidación-reducción en el cual el oxígeno molecular, en general, sirve como un aceptor externo de electrones. Debido al elevado potencial de reducción del oxígeno, la cantidad máxima de energía disponible se libera a partir de una fuente de energía cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones (15, 73, 95).

Cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones se denomina respiración aerobia para diferenciarlo de la respiración anaerobia, en la cual se usa un compuesto inorgánico, como un nitrato (NO_3^-), un sulfato (SO_4^-) o un carbonato (CO_3^{2-}) y otros compuestos orgánicos, la utilización de estos aceptores alternos permite a los microorganismos desarrollarse en ambientes donde no hay oxígeno. Los contrastes de la respiración aerobia y la anaerobia se presentan en la siguiente figura (73).

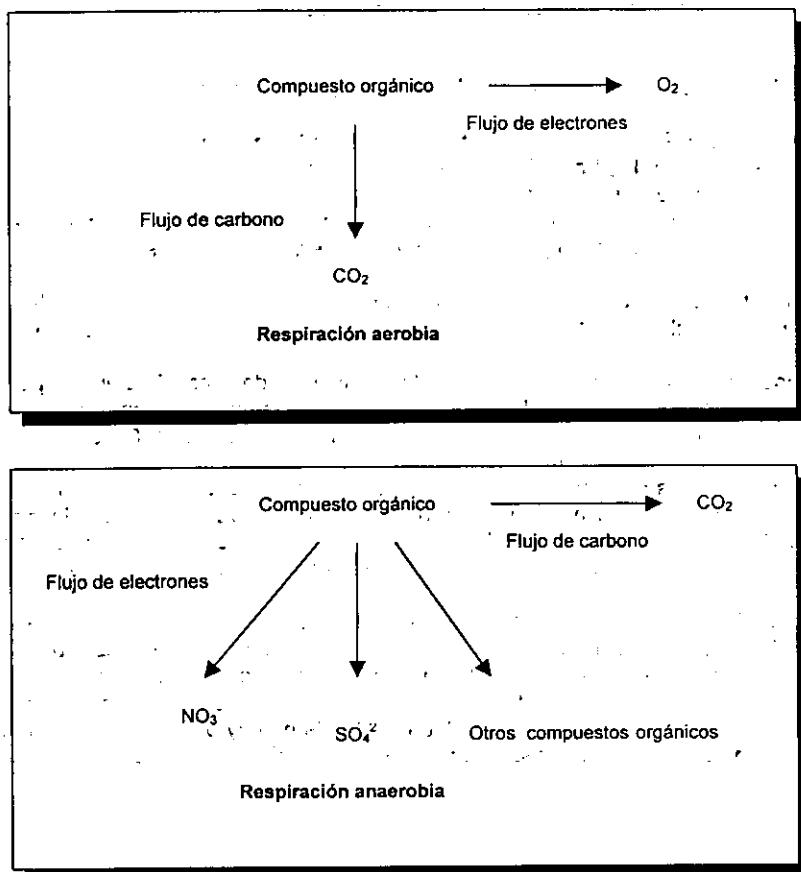


Fig. 1. Flujo de carbono y electrones en la respiración aerobia y la respiración anaerobia

2.7 Pseudomonadales

Todos los *Pseudomonadales* de este orden son bacilos rectos o ligeramente curvos con flagelo polar. Las bacterias *Pseudomonadales* son un orden grande de bacilos y cocos aerobios Gram negativos reunidos principalmente con base a estas características en el *Bergey's Manual*. Son aerobios organotróficos, y nunca presentan metabolismo fermentativo. El género más importante es *Pseudomonas*, que se analizará posteriormente. Otro género incluido es *Xanthomonas*, principal patógeno responsable de numerosas lesiones necróticas en plantas y las cuales se caracterizan por pigmentos color amarillo. *Zoogloea* caracterizada por la formación de un polímero fibrilar extracelular, el cual causa la agregación celular en flóculos indiferenciables, y *Gluconobacter*, caracterizado por la oxidación incompleta de azúcares o alcoholes a ácidos, tal como la oxidación de la glucosa a ácido glucónico o etanol a ácido acético (15).

2.7.1 El género *Pseudomonas*

Las características de los miembros del género *Pseudomonas* se dan en la tabla 2.3. También se menciona en esta tabla las características mínimas para identificar un organismo como perteneciente a este género. Las características de identificación principales son la ausencia de formación de gas a partir de glucosa, y positiva la prueba de la oxidasa, las cuales ayudan a diferenciar *Pseudomonas* de las bacterias entéricas. También el género *Rhodopseudomonas* se distingue del género *Pseudomonas* por la presencia de pigmentos fotosintéticos cuando el formador está creciendo anaerobicamente en la presencia de luz (15, 84).

Las especies del género *Pseudomonas* se definen con base a varias características como se indica en la Tabla 2.4 y 2.5. Algunas especies (por ejemplo, *P. aeruginosa*) son casi homogéneas, para ello todas son aisladas dentro de un amplio intervalo de características de distribución, así como otras especies son muy heterogéneas. La taxonomía del género *Pseudomonas* ha sido ampliamente caracterizado por estudios de hibridación del DNA, y los subgrupos dados en la tabla 2.4 se basan en la secuenciación de rRNA 16S.

Los representantes del género *Pseudomonas* tienen, en la mayoría de los casos, requerimientos nutricionales simples y crecen organotróficamente a pH neutro y a temperaturas en el rango de los mesófilos. Una de las características relacionadas a las pseudomonadales es la amplia variedad de compuestos orgánicos usados como fuentes de carbono y como donadores de electrones para la generación de energía. Algunas cepas utilizan más de 100 diferentes compuestos y solamente unas cuantas cepas utilizan menos de 20.

Como ejemplo de esta versatilidad, una sola cepa de *P. aeruginosa* puede utilizar diferentes carbohidratos, hidrocarburos, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, alcoholes, polioles, glicoles, compuestos aromáticos, aminoácidos, y aminas, una serie de compuestos orgánicos no agrupados en las categorías antes mencionadas (15, 108).

Por otro lado, las *Pseudomonas* son, generalmente, incapaces de romper polímeros en sus componentes monoméricos. Nutricionalmente versátiles, las *Pseudomonas* típicamente contienen numerosos operones inducibles porque el catabolismo de sustratos orgánicos inusuales frecuentemente requiere la actividad de diversas enzimas diferentes. Las *Pseudomonas* son organismos ecológicamente importantes en el suelo y agua y son probablemente responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos solubles derivados de la descomposición de materiales animales y plantas.

Pseudomonas es uno de los principales géneros más comunes en la descomposición de los alimentos y que causan viscosidad (45), producen sulfuro de hidrógeno (H_2S) como resultado de la putrefacción pueden producir mercaptanos.

Tabla 2.3 El género *Pseudomonas*

Características Generales:

Bacilos rectos o curvos pero no vibriodes; tamaño 0.5-1.0 μm por 1.5-4.0 μm ; no esporulados; Gram negativos; flagelo polar: simple o múltiple; sin envoltura, apéndices o fimbrias; metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque puede producir pequeñas cantidades de ácido a partir de glucosa anaerobicamente; usa compuestos orgánicos de bajo peso molecular, no polímeros; muchos son litotróficos usan H_2 o CO como único donador de electrones; muchos pueden usar nitrato como aceptor de electrones anaerobicamente; muchos pueden utilizar arginina como fuente de energía anaerobicamente.

Características mínimas para identificación:

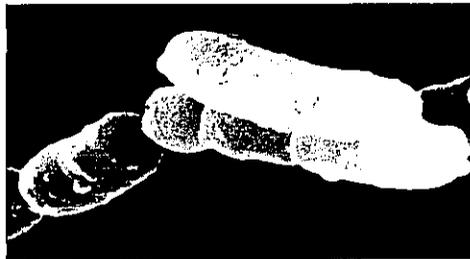
Gram negativas; bacilos rectos o ligeramente curvos; no esporulados; móviles (siempre); flagelo polar (tinción de flagelo); medio oxidativo fermentativo con glucosa: abierto, producción de ácido; cerrado; no produce ácido; no produce gas a partir de glucosa (las distingue fácilmente de las bacterias entéricas y *Aeromonas*); oxidasa, casi siempre positiva (las bacterias entéricas son oxidasa negativa); catalasa siempre positiva; pigmento fotosintetéticos ausentes (las distingue de las bacterias púrpura no productoras de sulfuro); indol, negativo; rojo de metilo negativo; Voges Proskauer, negativo

Tabla 2.4 Características de subgrupos y especies del género *Pseudomonas*

Grupo	Grupo rRNA 16S	Características	DNA (% mol GC)
Subgrupo fluorescente	Gama	La mayoría produce pigmentos fluorescentes verde amarillo solubles en agua	
<i>P. aeruginosa</i>		Producción de piocianina, crece a 43°C, un flagelo polar, desnitrificación.	67
<i>P. fluorescens</i>		No produce piocianina ni crece a 43°C; flagelos polares;	59-61
<i>P. putida</i>		Similar a <i>P. fluorescens</i> pero no licúa la gelatina y crece en bencilamina	60-63
<i>P. syrygae</i>		Falta de arginina hidrolasa, oxidasa negativa patogénica para plantas	58-60
Subgrupo acidovorans	Beta	No pigmentado, forma poli- β -hidroxibutirato, flagelos polares, no usa carbohidratos; grupo homólogo de DNA simple	
<i>P. acidovorans</i>		Utiliza el ácido mecóico como única fuente de carbono y donador de electrones	67
<i>P. testoteroni</i>		Utiliza testosterona como única fuente de carbono	62
Subgrupo pseudomallei-cepacia	Beta	Pigmentos no fluorescentes, muchos flagelos polares, forma poli- β -hidroxibutirato; grupo homólogo de DNA simple	
<i>P. cepacia</i>		Versatilidad nutricional extrema; algunas patogénicas para plantas	67
<i>P. pseudomallei</i>		Causa meliodosis en animales; no móvil; nutricionalmente restringida	69
<i>P. mallei</i>		Causa muermo en animales; nutricionalmente versátil	69
Subgrupo Diminuta-vesicularis	Alfa	Flagelo simple de muy corta longitud de onda, requiere vitaminas (pantotenato, biotina, B ₁₂)	
<i>P. diminuta</i>		No pigmentada, no utiliza carbohidratos	66-67
<i>P. vesicularis</i>		Pigmento carotenoide, utiliza carbohidratos	66
Especies misceláneas			
<i>P. solanacearum</i>		Patógenas para plantas	66-68
<i>P. saccharophila</i>		Crece litotroficamente con H ₂ , digiere la sacarosa	69
<i>P. maltophila</i>		Requiere metionina; no utiliza NO ₃ ⁻ como fuente de nitrógeno, oxidasa negativa	67

2.8 *Pseudomonas aeruginosa*

Este microorganismo presenta la forma cilíndrica con flagelos simples, en pares o en pequeñas cadenas de 0.5 a 0.8 por 1.5 a 3.0 μm . Son microorganismos con dos o más flagelos polares que son poco frecuentes (15, 22, 70, 73).



Pseudomonas aeruginosa
 Microscopía Electrónica de Barrido x 14400
 Fotografía adaptada del Atlas de Microbiología. Laboratorio Roemmers
 Figura 2.2 (de referencia 205)

Se encuentran en el suelo, en el agua, en aguas residuales y es muy adaptable, en la mayoría de los casos produce un pigmento color verde azulado o verde amarillento soluble en el agua que se difunde en el medio.

No requiere de factores de crecimiento, es nutricionalmente versátil, las cepas puras pueden usar 76-82 o más compuestos orgánicos diferentes para su crecimiento (22, 45, 73, 95, 108). La combinación de caracteres nutricionales es particularmente útil para la distinción de cepas de esta especie. Aerobia obligada, excepto en medios con nitrato (facultativa). La temperatura óptima de crecimiento es de 37 a 41°C.

Pseudomonas aeruginosa es un parásito no obligado, y puede ser aislado del suelo, y como desnitrificante tiene un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno en la naturaleza (15).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Taxonomía	
Orden	Pseudomonales
Suborden	Pseudomonadineae
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>aeruginosa</i>
Sinónimo	<i>Pseudomonas pyocyanea</i>

Tabla 2.5 Características Celulares de *Pseudomonas aeruginosa*

Morfología	Cilíndrica
Movilidad	Posee un flagelo polar, pero puede presentar dos o tres
Flagelo	Monótrico o lofótrico
Gram	Negativo
Habitat	Suelo, agua, aguas residuales, muy adaptables y en el aire.
Agrupación	Solas, en pares o en cadenas
Tamaño	0.5 a 0.6 por 1.5 a 3.0 μm

Tabla 2.6 Características de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*

Colonias en agar	Colonias redondas, lisas, de color verdoso fluorescente y de olor aromático dulzón.
Olor	Los cultivos tienen olor a trietanolamina
Color	Pigmentos azulados no fluorescentes: piocianina, soluble en agua y cloroformo, que posee cierta actividad antimicrobiana; verde fluorescente: pioverdina o floresceína, hidrosoluble, insoluble en cloroformo; rojo oscuro: piorrubina; negro: piomelanina.

Tabla 2.7 Factores de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Oxígeno	Facultativa aerobia
Temperatura	Óptima a 37°C pero es capaz de crecer a temperaturas superiores a los 43°C.
pH	Ácido, neutro y básico
Nutrición	Es muy versátil. Puede utilizar carbohidratos, hidrocarburos, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, alcoholes, polioles, glicoles, compuestos aromáticos, aminoácidos, y aminas, más una gran cantidad de compuestos no agrupados en ninguna de las categorías anteriores.

...

...

...

...

CAPÍTULO 3
CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA

3.1 CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA Y *BIOFOULING*

La corrosión microbiológica y el *biofouling* son los procesos de *biodeterioro* que son reconocidos actualmente como la mayor fuente de problemas y fallas estructurales que afectan a una gran variedad de industrias.

La corrosión microbiológica es una de las causas de la corrosión, la cual ocurre como resultado directo o indirecto de la actividad de los organismos vivos.

La *BIOCORROSIÓN* y el *BIOFOULING* de las superficies metálicas, en las cuales ocurren procesos biológicos y electroquímicos mediante la participación de microorganismos adheridos a la superficie formando *biopelículas* (*biofilms*). Estas películas biológicas modifican drásticamente las condiciones de la interfase metal/solución formando una barrera de contacto entre el metal y el medio líquido circundante. Es por ello que debemos considerar que la corrosión microbiológica transcurre sobre una superficie modificada, con características fisicoquímicas y biológicas muy particulares y que podríamos denominar biológicamente condicionada. Ignorar este hecho y pretender interpretar un proceso de corrosión microbiológica con los mismos parámetros y consideraciones que en un caso de corrosión inorgánica puede conducir a un fracaso total en un tratamiento e incluso a un agravamiento de los problemas que afectan al sistema en cuestión (122).

Las biopelículas pueden ser consideradas como una matriz mucilaginoso de material polimérico extracelular (MPE) de naturaleza polisacáridica con un elevado contenido de agua (aprox. 95 % de la masa), células microbianas y detritos inorgánicos variados (56). Las reacciones que se producen entre los metabolitos microbianos y la superficie metálica tienen lugar por debajo de la biopelícula o dentro de su estructura (124). Por ello, un factor clave para la modificación de las condiciones fisicoquímicas de la superficie metálica – y por ende la aceleración o retardo de la corrosión – es la formación de la biopelícula (33).

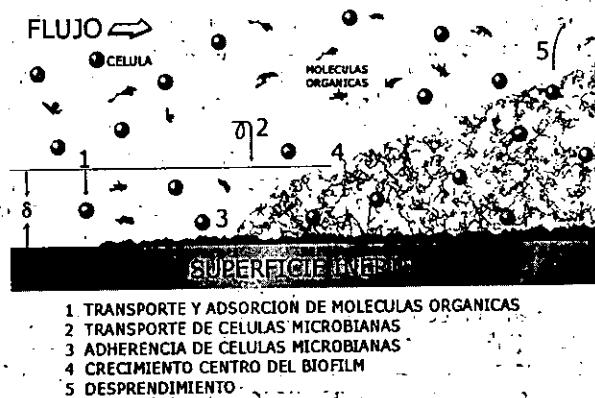
3.1.1 Secuencia de producción de la corrosión metálica y el *biofouling*

Una superficie metálica en contacto con aguas industriales o naturales experimenta una serie de cambios biológicos, orgánicos e inorgánicos que conducen al *fouling* y la corrosión respectivamente (123, 23, 131). La secuencia de cambios biológicos es debida a la adherencia irreversible de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, microalgas, hongos y protozoarios) sobre el metal a través de la producción de MPE. Esta adherencia de tipo irreversible es la que resulta finalmente en la producción de la biopelícula (Figura 3.1). Este es la consecuencia de un proceso de acumulación en la interfase metal/solución que no es necesariamente uniforme ni en el tiempo ni en el espacio (23).

La precipitación de incrustaciones o "scaling" es un proceso que ocurre cuando las sales inorgánicas cristalinas insolubles se depositan en las paredes de las tuberías. La velocidad de este proceso es función de una serie de variables como la temperatura, concentraciones de sales formadoras de depósitos, pH, calidad del agua de alimentación y condiciones de flujo. La secuencia de procesos inorgánicos se completa con el proceso de disolución metálica (corrosión) y de deposición de productos de corrosión (pasivación) que ocurren simultáneamente con los procesos de *biofouling* (100, 122).

Si bien son simultáneos en el tiempo, las direcciones en que se desarrollan ambos procesos son opuestas: la corrosión y la formación de depósitos de productos de corrosión, se dirige desde la superficie hacia la solución, mientras que el biofouling y el "scaling" provienen del seno de la solución y se depositan sobre el metal.

A consecuencia de estos procesos simultáneos resulta una nueva interfase metal/solución que es controlada por variables de origen biológico (biofouling) y electroquímico (la corrosión) (Figura 3.2). El comportamiento del metal en ese medio será la resultante de las interacciones entre ambos tipos de variables (122).



PROCESO DE BIOFOULING

Figura 3.1 Esquema de la formación de biopelículas en la interfase metálica (de referencia 23)

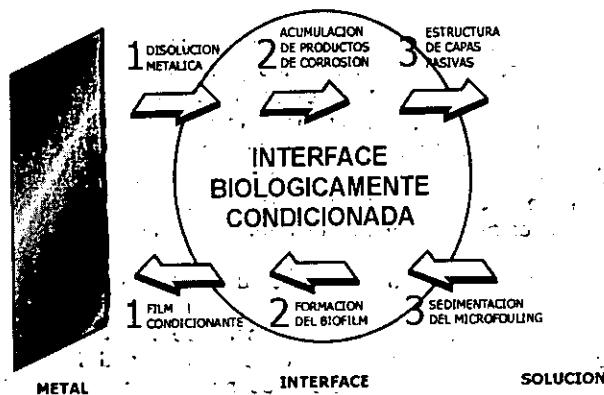


Figura 3.2 Secuencia de cambios biológicos y electroquímicos en la interfase metal / solución durante la formación de biopelículas (de referencia 123)

3.1.2 Mecanismos de interacción entre el biofouling y la corrosión

Las distintas formas en que el proceso de biofouling puede inducir un proceso de corrosión fueron enumeradas de la siguiente forma por Characklis (23):

1. Influenciando el metabolismo microbiano a través de la estructura de la biopelícula (especialmente si este es heterogéneo).
2. Influenciando la concentración de productos metabólicos dentro de la biopelícula.
3. Restringiendo el pasaje de especies química a través de la matriz de MPE de la biopelícula
4. A través de una posible acción quelante de la biopelícula sobre ciertos iones.
5. Modificando la conductividad eléctrica del medio a través de la acción del MPE.
6. Dificultando el acceso de sustancias biocidas
7. Alterando la concentración o acción de inhibidores de la corrosión.

Previamente a la colonización de una superficie metálica por microorganismos se adsorbe una "película acondicionante" de macromoléculas en la interfase. Este proceso de adsorción espontánea modifica la humectación y distribución de las cargas eléctricas en la superficie metálica (122). La adsorción posterior de las células microbianas y su actividad metabólica impactan sobre los procesos electroquímicos (por ej. la corrosión) que pueden ocurrir en la interfase metal/solución. Las células adheridas crecen y se reproducen formando colonias que constituyen zonas heterogéneas que favorecen la formación de zonas localizadas que actúan como ánodos o cátodos sobre la superficie del metal (43). Esta colonización no uniforme induce la formación de celdas de aireación diferencial donde las zonas bajo las colonias microbianas presentan condiciones anaeróbicas debido al consumo respiratorio de los microorganismos, respecto a las áreas circundantes donde la concentración de oxígeno es mayor. Tenemos así una zona anódica donde la disolución metálica se veía favorecida respecto a una zona donde la reacción catódica de reducción del oxígeno es predominante (Figura 3.3).

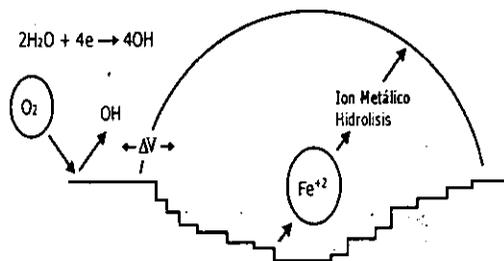


Figura 3.3 Esquema de reacciones anódicas y catódicas bajo una colonia microbiana (de referencia 22)

Las medidas *in situ* efectuadas con microelectrodos revelan que en un medio líquido, una biopelícula puede causar un agotamiento del oxígeno presente en tan sólo 180 micrómetros de espesor (54). Como en ese nivel el medio es anaeróbico, las bacterias anaeróbicas causantes de la corrosión, como las bacterias sulfato reductoras (BSR) pueden proliferar aún cuando en el seno del agua en contacto con la biopelícula la concentración de oxígeno disuelto sea elevada.

Este concepto de barrera difusional de la biopelícula (o de su matriz de MPE) ha sido modificado recientemente a través de observaciones y resultados obtenidos mediante la aplicación del microscopio confocal de rayos láser (23). Estos resultados permiten elaborar un nuevo modelo de biopelícula constituido fundamentalmente por "clusters" o acúmulos microbianos y canales intercomunicantes en donde el flujo sería esencialmente controlado por convección más que por difusión (Figura 3.4). Esta nueva concepción de la biopelícula modifica la interpretación de la acción de ciertos biocidas sobre los microorganismos adheridos al metal (5).

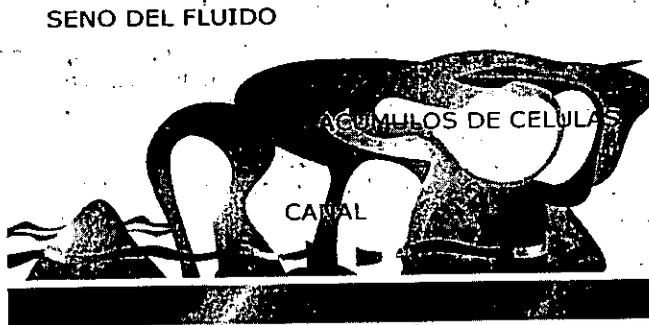


Figura 3.4 Dibujo esquemático de la concepción actual sobre la estructura de las biopelículas con base a "clusters microbianos" (de referencia 51)

Así como una biopelícula constituida por células microbianas y su MPE modifica perfiles de concentración de oxígeno en la interfase metal/solución, puede igualmente alterar las concentraciones locales de iones que facilitan la corrosión como cloruros, o impedir la salida hacia la solución de productos metabólicos de naturaleza ácida generando áreas de bajo pH en la interfase (79). La magnitud de estos gradientes de pH estará condicionada por la capacidad buffer del medio líquido y otras variables (125, 129).

Los microorganismos forman consorcios microbianos o comunidades mixtas en el espesor de las biopelículas que producen efectos sinérgicos incapaces de ser originados por las especies en forma aislada. Por ejemplo la coexistencia de especies aeróbicas y anaeróbicas sobre superficies de acero al carbono, permite que las bacterias capaces de reducir los compuestos férricos (insolubles) a ferrosos (solubles) produzcan la disolución de las capas pasivantes del hierro constituidas predominantemente por óxidos e hidróxidos férricos.

De esta manera se facilita el acceso a superficie metálica de los sulfuros y otros productos corrosivos generados por las BSR anaeróbicas que forman en el espesor de la biopelícula consorcios microbianos (10, 55).

El impacto de los metabolitos excretados por los microorganismos sobre la reacción de corrosión se ve intensificado en las zonas de contacto entre microorganismos y la superficie metálica.

3.1.3 Biocorrosión y *biofouling* sobre diversos metales y aleaciones de interés industrial.

Los procesos abióticos de corrosión pueden influenciar la velocidad, extensión y distribución de las especies microbianas, así como la composición química y propiedades físicas (por ej. cohesión) de la biopelícula. Se ha encontrado que la naturaleza del sustrato metálico influye la velocidad y distribución del *fouling* microbiano en el agua de mar (125). En las zonas de corrosión no uniforme (ánodos y cátodos localizados) promueven la adsorción heterogénea de los microorganismos. Por otra parte, esta falta de homogeneidad en la biopelícula es la precursora de efectos de aireación diferencial como se ha encontrado en diversos aceros inoxidables y aleaciones cobre-níquel en agua de mar. En las zonas catódicas de las superficies metálicas que se corroen se produce generalmente un incremento del pH y de la concentración de electrolitos. Por el contrario, una disminución localizada del pH y de la concentración electrolytica influye sobre la adsorción bacteriana en las zonas anódicas. También afectan a la adherencia microbiana los diferentes iones inorgánicos producidos en ambas zonas electródicas y la disminución del oxígeno en las zonas catódicas (122).

3.1.3.1 Acero al carbón y aceros inoxidables

El acero al carbón es un ejemplo de una superficie activa en un medio agresivo (por ej. agua de mar). La interfase metal/solución se cubre rápidamente de productos de corrosión de diferente naturaleza y distribución. La interacción entre el *biofouling* y los productos de corrosión es compleja y resulta difícil observar a través de la microscopía electrónica las características morfológicas y distribución de la población microbiana que constituye la biopelícula. En muchos casos la disolución de las películas pasivas a través de procesos de oxidación o reducción biológicamente inducidos, deja a la superficie metálica expuesta a la acción corrosiva de los cloruros del agua de mar y a los metabolitos agresivos generados en el seno o la base de la biopelícula (por ej. los sulfuros producidos por las BSR) (89, 43).

Los aceros inoxidables por el contrario, proveen una superficie homogénea y casi libre de productos de corrosión, adecuada para la adherencia microbiana. La presencia de cromo, níquel y molibdeno, posibilitan un comportamiento pasivo espontáneo de los aceros inoxidables en muchos medios agresivos. Sin embargo, a pesar de su buena resistencia a la corrosión los aceros inoxidables son sensibles al picado, a la corrosión por rendijas y a la corrosión bajo tensiones en soluciones cloruradas como el agua de mar (123).

3.1.3.2 Titanio

El titanio parece ser el metal más resistente a la biocorrosión de todos los probados hasta el presente (123). La característica de presentar altos potenciales anódicos de picado y repasivación hacen al titanio menos susceptible al picado, que es el tipo de ataque más común en biocorrosión. Este buen comportamiento pasivo lo han convertido en uno de los materiales de elección como elemento de construcción de tubos intercambiadores de calor expuestos al agua de mar, a pesar de ser un sustrato favorable para la formación de biofouling y haberse detectado colonización bacteriana en sólo 5 horas de exposición a medios contaminados (83, 125).

3.1.3.3 Aleaciones de cobre níquel

Las aleaciones de base cobre como los cuproniques 90:10 y 70:30, el latón, almirantazgo y el bronce/aluminio se utilizan generalmente como material estructural de sistemas intercambiadores de calor alimentados con agua de mar (14) por su aceptable capacidad anti-fouling en ambientes marinos. A pesar de esta reconocida ventaja, se ha reportado importante colonización bacteriana luego de varios meses de exposición al agua de mar bajo la forma de cubiertas superpuestas constituidas de células bacterianas, MPE y productos de corrosión de diversa naturaleza, generalmente óxidos e hidróxidos de cobre. Las biopelículas alteran la estructura de las películas pasivas y el efecto tóxico de los iones cúpricos lixiviados desde la superficie metálica es amortiguado por su unión con el MPE de la biopelícula. Como consecuencia de esta estructura multi-capas, el desprendimiento parcial de las cubiertas pasivas y de las biopelículas originan heterogeneidades superficiales que favorecen la corrosión por aireación diferencial (123, 55, 111, 122).

3.1.3.4 Aluminio y aleaciones

El aluminio es un metal activo, aunque en contacto con el medio ambiente rápidamente se pasiva a través de la formación de óxidos estables en diversos medios neutros y ácidos que protegen al metal de la corrosión en ambientes agresivos. Las aleaciones de aluminio tienen amplio uso en la industria aeronáutica (122).

El aluminio y sus aleaciones son susceptibles a la biocorrosión y el biofouling. A este respecto la mayor parte de la literatura está referida a la biocorrosión de las aleaciones de uso aeronáutico usadas en los tanques integrales de aviones a retropropulsión por efecto de los contaminantes microbianos de termocombustibles (130).

3.1.4 Incidencia práctica y económica de la biocorrosión y el biofouling en distintos sistemas industriales

Una estimación realizada por Warkeley en el Reino Unido hacia fines de la década de setenta, atribuye el 20 % de los casos de corrosión de ese país a aquéllos causados por microorganismos. Si esto se relaciona con los gastos promedio debidos a la corrosión de un país industrializado, que se estiman dentro del orden de 4 % del producto interno bruto, la biocorrosión causaría pérdidas económicas para el caso de Estados Unidos, de aproximadamente de 60 billones de dólares / año (69).

Estos gastos son de origen muy diverso y comprenden costos debidos a la interrupción de la planta para el reemplazo de estructuras corroídas o para su limpieza o mantenimiento, limpieza o reemplazo de filtros y sistemas diversos de medición, remoción de depósitos biológicos en sistemas de almacenaje y cañerías de distribución, etc. (63)

Son pocas las industrias que se encuentran exentas del riesgo de biocorrosión. En la industria del petróleo, en sus diversas fases de extracción, procesamiento, distribución y almacenamiento se presentan serios problemas derivados de la presencia de microorganismos y depósitos de *biofouling* (49, 122).

La biocorrosión de tanques integrales de aviones a retropropulsión y los problemas de taponamiento de filtros y de mal funcionamiento de instrumentos de medida, es frecuente en aviación comercial y militar (122).

La industria naval y de construcción de estructuras marinas es altamente vulnerable a la biocorrosión y al *biofouling*. Esto incluye especialmente cascos de embarcaciones (debido a la fijación del macrofouling marino); motores marinos (por contaminación de combustibles y lubricantes de uso naval); tanques combustibles (por contaminación en sistemas agua/combustible). Sistemas de intercambio calórico alimentados con agua de mar, tales como los utilizados en centrales eléctricas o instalaciones industriales costeras.

Además de la industria del petróleo, presentan frecuentes problemas de biocorrosión la distribución de gas natural (131); la distribución y almacenamiento de agua potable (54), las plantas de generación de energía térmica (14); la hidroeléctrica (122) y la nuclear (80), la industria química y de procesos (23), la industria del papel, las refinerías de alcohol (122) y la industria siderúrgica (31).

El avance en el conocimiento de la biocorrosión se dificulta por razones de carácter interdisciplinario; el estudio de la biocorrosión que requiere conocimientos de áreas muy diversas (microbiología, metalurgia, electroquímica y biología, entre otras). A partir del inicio de la década del 80, se observa una concientización creciente sobre la importancia práctica y económica de los diversos procesos de biocorrosión y *biofouling* (122).

3.2 CÓMO IDENTIFICAR LA BIOCORROSIÓN

3.2.1 Aspecto superficial del metal

Se han propuesto diferentes métodos para estudiar la corrosión microbiana de los metales (25). Una de las formas posibles de identificar la biocorrosión es mediante la inspección macroscópica de la muestra. Varios tipos de modificaciones de la superficie del metal podrían ser atribuidos a la presencia de microorganismos:

- Depósitos característicos, blandos y/o mucilaginosos.
- Tubérculos del metal que frecuentemente contienen bacterias vivas.
- Hoyuelos y/o perforaciones en las superficies de aleaciones diversas como acero inoxidable, acero al carbono, aleaciones de cobre, casi siempre distribuidos irregularmente.
- Pequeños orificios con cavidades formadas por debajo de superficie (Figura 3.5) (54, 55).
- Estrías brillantes, visibles después de la remoción de depósitos.

El aspecto de los depósitos puede indicar cuáles son los organismos participantes:

- fibroso: hongos filamentosos
- negro: bacterias sulfato reductoras (BSR)
- naranja o castaño: bacterias oxidantes del hierro (ej. *Gallionella*)
- amarillos: bacterias oxidantes del azufre (ej. *Thiobacillus*)
- marrón o ceniza con aspecto viscoso: bacterias formadoras de limo.

Sin embargo, estas observaciones no siempre indican el origen biológico de la corrosión y es indispensable el análisis microbiológico para corroborarlo.

3.2.2 Aspectos biológicos

Es preciso identificar y enumerar los microorganismos causantes de la corrosión.

Los organismos presentes en la fase planctónica son capaces de inducir corrosión a través de la producción de metabolitos corrosivos o indirectamente por el consumo de inhibidores de la corrosión (53). Una forma frecuente de corrosión de los metales atacados por los microorganismos planctónicos es la corrosión generalizada, que se produce por acción química.

Los organismos adheridos a la superficie (biopelícula) producen corrosión localizada, generalmente más severa. Se observa corrosión puntiforme, estrías o áreas brillantes en el metal, conforme a la localización y tipo de depósitos.

La detección de los organismos debería ser mediante el muestreo de los depósitos o de la fase acuosa (Figura 3.5) (54).

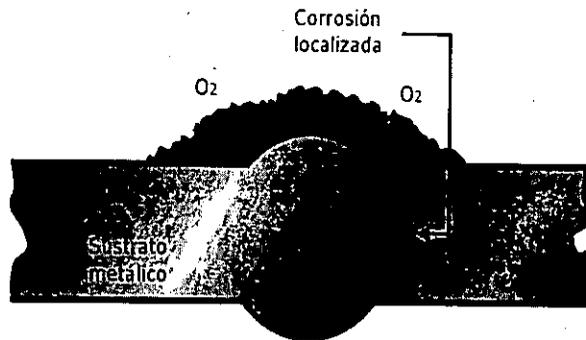


Figura 3.5 Perforación asociada cavidades frecuentemente encontradas bajo depósitos biológicos (de referencia 54)

El análisis químico de los depósitos podría mostrar el tipo de organismo participante

- compuestos de azufre reducido: BSR
- compuestos de azufre oxidado: bacterias oxidantes del azufre
- óxidos de hierro: bacterias oxidantes del hierro

Las técnicas empleadas son métodos de rutina de química analítica y varían desde el microanálisis a la espectrofotometría de masas.

El análisis microbiológico consta de dos partes:

- evaluación de microorganismos generales
- evaluación de microorganismos específicos

Existen básicamente tres métodos de detección y conteo, que detectan, respectivamente:

1. Células totales (vivas y muertas)
2. Células vivas (capaces de reproducirse)
3. Células activas (con actividad metabólica)

El primer ítem involucra métodos ópticos (microscopía) o inmunológicos (detección de componentes superficiales de las células). El segundo utiliza el crecimiento de las células en medios generales o selectivos. El tercer método evalúa la actividad de una enzima o la producción de un determinado metabolito (54).

Las ventajas y desventajas de éstos métodos se muestran en la tabla 3.1 y ejemplos de cada método en la tabla 3.2.

Evaluación de las células totales				
Parámetro	Microscopía	Inmunología	Vivas	Activas
Facilidad	+	0	-	+
Rapidez	+	+	-	+
Equipo complejo	+	-	+	0
Personal entrenado	-	-	-	0
Sensibilidad	+	+	-	0
Biopelículas <i>in situ</i>				
✓ Finos	+	+	-	+
✓ Densos	-	-	-	+
Costo	+	-	0	0

Tabla 3.1. Ventajas y desventajas de los métodos normalizados de detección y conteo de microorganismos.

+ = ventaja - = desventaja 0 = normal

Prueba	Organismos detectados	Base de detección	Detec. anaerobica	Uso en campo	Rapidez	Sensibilidad	Costo
Plaqueo	Bacterias y hongos vivos	Crecimiento en medio sólido	+	-	-	-	M
"Dip slides"	Bacterias y hongos vivos	Crecimiento	-	+	-	-	M
NMP	Organismos vivos	Crecimiento en medios líquidos	+	-	-	-	B
Quimiluminiscencia	Organismos vivos	Evaluación de ATP	+	+	+	+	A
ELISA	Org. específicos vivos y muertos	Inmunológico (moléculas superficiales)	+	-	+	+	A
Inmunofluorescencia	Org. específicos vivos y muertos	Inmunológico (moléculas superficiales)	+	-	+	+	M/A
Hidrogenasa	Org. Activos (hidrogenas a positiva)	Actividad enzimática	+	+	+	-	A

B = bajo M = medio A = alto
 ATP = Trifosfato de adenosina (compuesto de transferencia de energía de las células).
 NMP = Número Más Probable
 ELISA = Ensayo inmunoenzimático

Tabla 3.2. Ensayos para detectar microorganismos relacionados con la corrosión.

Entre los grupos microbianos y los métodos de detección y conteo más relacionados con los procesos de corrosión se pueden citar los siguientes:

- ✓ Bacterias oxidantes del hierro y del azufre. Los métodos más utilizados para su detección y crecimiento en medios sólidos o líquidos se pueden encontrar en una publicación reciente (34).
- ✓ Bacterias anaeróbicas sulfato reductoras (BSR). En la referencia 2 se puede encontrar un método normalizado de detección y crecimiento en medio Posgate (99), que utiliza una técnica de dilución a extinción tal como el Número Más Probable.
- ✓ El hongo *Hormoconis resinae*. El método de detección incluye microscopía óptica y el crecimiento en medio líquido Bushnell-Haas (18, 54).

3.3 SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA BIOCORROSIÓN Y EL *BIOFOULING*

Justificación de la inversión en un sistema de monitoreo

El control del crecimiento microbiológico es caro en comparación a los costos de los análisis químicos. El costo de un sistema de monitoreo de biofouling y biocorrosión varía considerablemente de acuerdo al nivel de sofisticación y a los accesorios provistos. La industria del petróleo gasta cerca de US\$ 12.000.00 anuales solamente para determinar la concentración de bacterias reductoras de sulfato, realizar estudios sobre biocidas y otros análisis de rutina. No obstante, el costo de los sistemas más caros es despreciable con relación a las pérdidas derivadas de los perjuicios que el biofouling y la biocorrosión ocasionan (123).

Es difícil evaluar las pérdidas ocasionadas por microorganismos ya que en general han sido consideradas irrelevantes y se encuentran ocultas entre los costos generales de mantenimiento. No se conocen datos confiables sobre los costos relacionados con el crecimiento microbiano no deseado en la industria iberoamericana. Este costo depende del grado de industrialización de la nación (21, 12)

Algunos de los problemas en las industrias son: en el caso de los sistemas de recuperación secundaria de petróleo, el biofouling además de inducir la corrosión, disminuye la permeabilidad de las rocas, con lo que baja la inyectabilidad en los pozos; en la industria naviera se pican los depósitos de combustible a consecuencia del biofouling; en los servicios de agua potable se bloquean y se pican las cañerías que conducen el agua contaminando el fluido; etc. (35, 23, 14)

Se debe contar con los datos necesarios para poder estimar las tendencias al deterioro del establecimiento y poder realizar un tratamiento preventivo del mismo.

3.3.1 METODOLOGÍAS DEL MONITOREO DEL *BIOFOULING*

Seleccionar un tipo de monitor para *biofouling* implica determinar, entre otras cosas, qué tipo de biofouling se analizará (microfouling, macrofouling) y en qué principios se basará su funcionamiento (medidas directas o indirectas)

3.3.1.1 Monitores para el *microfouling*

A fin de determinar el efecto de la presencia del microfouling sobre el sistema es necesario conocer: a) la cantidad de depósito biológico (medida directa), o b) la influencia que ejerce el depósito sobre alguna propiedad del sistema (122, 118, 135, 81). Estos parámetros reflejan una medida promedio del *biofouling*. Otras variables que reflejan valores locales por ejemplo las medidas de transmitancia de luz y las de oxígeno disuelto.

3.3.1.2 Monitores para el *macrofouling*

Consisten principalmente en sustratos artificiales sumergidos, donde las larvas de los macroorganismos se fijan y desarrollan.

3.3.1.3 Medidas directas del *biofouling*

Las medidas directas consisten en evaluar la masa del depósito, el número de microorganismos y/o el espesor de la biopelícula (23). El conocimiento de la acumulación de masa es importante para el desarrollo de modelos de *fouling*. Estas medidas se pueden llevar a cabo utilizando como sustrato una superficie de área conocida del metal que tienen problemas de biocorrosión en el circuito. Los cupones, generalmente discos o anillos (secciones de tubos) del metal, son sometidos a condiciones similares a las imperantes en el equipo en operación y sobre los mismos se podrán realizar estudios microbiológicos y por microscopía óptica de campo claro (123).

A través de la utilización de otras técnicas microscópicas como microscopía de epifluorescencia, de barrido, de transmisión de fuerza atómica, se podrá obtener una información más detallada sobre las características de la biopelícula (59).

Brevemente, puede decirse que: a) las técnicas de microscopía óptica de campo claro o el uso de lupas estereoscópicas resultan de gran utilidad en la observación preliminar de muestras de campo o de laboratorio; b) el uso de microscopía de epifluorescencia permite una rápida enumeración de bacterias y su caracterización morfológica preliminar; c) a través de la microscopía de barrido se ha podido establecer formas de adherencia y la asociación que existe entre la adherencia microbiana y la biocorrosión; d) el desarrollo del microscopio de barrido ambiental ha permitido realizar estas observaciones sin deshidratación preliminar de las muestras, que es condición necesaria para la aplicación de la microscopía de barrido tradicional; e) la microscopía de transmisión ayuda a establecer la estructura de la película biológica y la distribución celular estratificada, pero la preparación de las muestras para realizar el estudio es muy compleja; f) los métodos de observación microscópica más sofisticados como la de fuerza atómica, o el microscopio de barrido láser confocal permiten tener detalles del orden del nanómetro respecto a las distribuciones de las sustancias orgánicas adsorbidas y material polimérico extracelular, g) la técnica QCM (Quartz Crystal Microbalance) y ATR-FT/IR (espectrometría de infrarrojos utilizando transformadas de Fourier con reflectancia total atenuada) permiten detectar la información de la actividad microbiana en la biopelícula en forma no destructiva.

3.3.1.4 Medidas indirectas del *microfouling*

Las medidas indirectas utilizan las correlaciones de ciertos parámetros existentes y el espesor de la biopelícula. Parámetros como coeficiente de conductividad térmica, factor de fricción, esfuerzo de corte, corriente necesaria para mantener un potencial de catodización.

A través de comparaciones realizadas entre medidas directas e indirectas del *biofouling* se ha podido concluir que aún cuando éstas últimas exhiben buena sensibilidad y reproducibilidad su correlación con las medidas de masa acumulada no es buena.

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de utilizar ciertos parámetros electroquímicos como un índice de la formación de biopelículas sobre las superficies de aleaciones constitutivas de intercambiadores de calor.

Por ejemplo, el potencial de corrosión de ciertos metales pasivos como los aceros inoxidable se incrementa luego que el biopelícula alcanza una cierta densidad de microorganismos, pudiendo llegar este desplazamiento a varios cientos de milivoltios. Sin embargo, este parámetro constituye un índice ambiguo de la presencia o no de la biopelícula (102).

3.3.2 MONITORES DE BIORCORSIÓN

Las técnicas electroquímicas han demostrado ser de suma utilidad en el estudio de la biocorrosión. En un área tan compleja como la biocorrosión no se puede esperar que a través de la aplicación de una técnica se tenga una información certera de lo que está ocurriendo en el sistema en estudio (43, 86, 96).

3.3.2.1 Metodologías de estudio en la biocorrosión

Las técnicas electroquímicas aplicables al estudio de la biocorrosión pueden ser divididas en tres grupos grandes teniendo en cuenta el tipo de perturbación aplicada a la muestra:

- Sin aplicación de una señal externa (medidas de potencial a circuito abierto, potencial redox, ruido electroquímico, celda doble).
- Con la aplicación de pequeñas perturbaciones (medidas de resistencia a la polarización, espectroscopia de impedancia electroquímica).
- Con la aplicación de significativas perturbaciones (registro de curvas de polarización potencioestáticas y potenciodinámicas, transitorios de corriente).

En el ambiente industrial el control de la corrosión se realiza frecuentemente utilizando los métodos tradicionales de pérdida de peso, resistencia eléctrica y resistencia de polarización. Estos métodos son muy adecuados para seguir casos de corrosión uniforme. Sin embargo, la biocorrosión aparece en general localmente en forma de picado o rendijas.

Entre las técnicas que no aplican señales de perturbación externa las medidas del **potencial de corrosión**, **potencial redox** y **ruido electroquímico** nos informan acerca de la condición activo-pasiva del metal y de las características oxidantes o reductoras del medio, siendo muy útiles como complemento de otra información electroquímica. En el primer caso se determina la diferencia de potencial entre el metal sumergido en el medio corrosivo correspondiente al sistema y un electrodo de referencia. El **potencial redox** en cambio está asociado al equilibrio redox del oxígeno del medio sobre un electrodo de platino. La técnica de medida del **ruido electroquímico** consiste en evaluar las fluctuaciones del potencial o de la corriente como función del tiempo o de las condiciones experimentales.

Los datos obtenidos a través de microvoltímetros son analizados estadísticamente a fin de correlacionar la amplitud de la variación del potencial con la naturaleza de los procesos corrosivos (43, 44, 46, 86, 93).

En la técnica de la *celda doble* se mide la corriente que circula entre dos electrodos idénticos incluidos en compartimentos electrolíticos iguales excepto en que la solución de uno de ellos ha sido inoculada con microorganismos. Si bien estas medidas permiten demostrar la participación de los microorganismos en el proceso de corrosión, las corrientes que se miden son muy bajas (43).

Se ha probado que existe un ennoblecimiento del potencial de corrosión como consecuencia de la formación del biofouling sobre superficies de metales resistentes a la corrosión, como el acero inoxidable (89). Por lo tanto, cuando se aplica protección catódica a un sistema el incremento de la demanda de corriente necesaria para mantener un potencial puede estar estrechamente ligado a la formación de biofouling sobre la superficie metálica.

Una técnica en la que se aplican pequeñas señales de perturbación externa es la *resistencia a la polarización (R_p)* (46, 114, 44, 116). En esta se aplican potenciales de 10 mV. La principal ventaja de la técnica de R_p es la posibilidad de monitorear la velocidad instantánea de corrosión de un metal expuesto a un medio corrosivo. Por lo tanto esta técnica es muy adecuada para detectar los cambios en las velocidades de corrosión debido a la presencia de bacterias, inhibidores, biocidas, etc. Un problema persistente con el uso de los datos de R_p es la tendencia a mal interpretar los datos experimentales como velocidades de corrosión exactas (44, 80, 116).

R_p se define como:

$$R_p = (\delta E / \delta i)_{i=0}$$

El valor de R_p puede ser evaluado, por tanto, como la tangente a la curva potencial – intensidad de corriente, donde la densidad de corriente de corrosión (J_{corr}) se puede calcular de:

$$\frac{ba \quad bc}{2.303(J_{corr})(ba + bc)} = \frac{B}{J_{corr}}$$

$$J_{corr} = \frac{B}{R_p}$$

Donde

$$B = \frac{ba \quad bc}{2.303(ba + bc)}$$

El cálculo exacto de J_{corr} para un tiempo dado durante el experimento, requiere, por lo tanto la medida simultánea de las pendientes de Tafel anódica a y catódica b . Si no se efectúa la técnica de pendientes de Tafel se pueden tomar los valores de las pendientes de la literatura.

Para calcular la *rapidez de corrosión* se aplican las siguientes fórmulas:

$$R_c = \frac{K(J_{\text{corr}} \times P.E)}{D}$$

$$R_c = 11575.2275 \times J_{\text{corr}}$$

Donde

R_c = rapidez de corrosión en milímetros por año

K = constante

J_{corr} = densidad de corriente de corrosión

P.E. = Peso equivalente del metal en estudio en g eq/mol

D = densidad del metal en estudio en g/mL

En la técnica de las **pendientes de Tafel**, se aplican perturbaciones externas significativas. Experimentalmente, hay desviaciones de la linealidad en las vecindades del potencial de corrosión, sin embargo, ambos segmentos referidos como pendientes de Tafel, tienen una parte lineal, las cuales extrapolando se obtiene un punto válido para el potencial y corriente de corrosión. Se observa en las gráficas de potencial contra log de la densidad de corriente, en donde se representan las líneas anódica y catódica, en teoría deben ser lineales y ambas curvas deben intersectarse en un punto que representa el potencial y la corriente de corrosión (44, 43, 86).

La determinación de los **potenciales de picado y repasivación** en sistemas simulados proporciona también una herramienta muy útil para predecir la susceptibilidad del metal cubierto con el biofouling al ataque localizado. El potencial de picado se obtiene a través de la realización de barridos lineales de potencial en sentido anódico. El cambio brusco que se observa en la pendiente de la curva corriente/potencial luego de atravesar la zona de pasividad se asocia a la formación de picaduras sobre la superficie de óxido. El potencial donde ocurre dicho cambio es denominado potencial de picado.

La **espectroscopia de impedancia electroquímica** encuentra diferencias significativas entre experiencias realizadas en presencia y ausencia de biofouling. Este método es muy costoso y la interpretación de los resultados es sumamente compleja (129, 93).

3.4 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BIOCORROSIÓN

3.4.1 Conceptos básicos

La regla de oro para prevenir y controlar la corrosión y el *biofouling* en los sistemas industriales es mantener el sistema limpio.

El *biofouling* puede generalmente ser considerado como una acumulación indeseable de depósitos de naturaleza biológica en una superficie. Estos depósitos pueden contener micro (*microfouling*) o macroorganismos (*macrofouling*). La prevención y control de los efectos del *microfouling* son de interés. El *microfouling* se ha definido como la resultante de la acumulación de biopelículas microbianas (56, 23).

La planta de una industria contiene diversos sistemas donde la biocorrosión y el *biofouling* son causantes de problemas (13), los más frecuentes:

- Sistemas de enfriamiento industrial (de recirculación cerrada o abiertos)
- Líneas de inyección de agua
- Tanques de almacenamiento
- Sistemas de tratamiento de aguas residuales
- Sistemas de filtración
- Tuberías de uso diverso
- Membrana de ósmosis inversa
- Sistemas de distribución de agua potable

En la industria es conveniente prevenir los problemas microbiológicos ya que resulta costoso y difícil eliminarlos una vez que se presentan, en la mayoría de los casos. El uso correcto de los equipos, así como su limpieza regular contribuyen a optimizar el uso de métodos de prevención.

Los métodos empleados para prevenir la biocorrosión deber considerar dos aspectos fundamentales:

- Inhibir el crecimiento o actividad metabólica de los microorganismos
- Modificar las características del ambiente donde se desarrolla el proceso de corrosión para evitar la adaptación de los microorganismos al medio ambiente.

Es importante señalar que en la selección de un método de tratamiento se deben considerar también las características del sistema: tipo de funcionamiento (abierto o cerrado), características del agua (enfriamiento o inyección), geometría del sistema, materiales estructurales, etc. (13)

Los métodos más utilizados para prevenir y controlar la corrosión microbiológica se pueden agrupar de la siguiente forma:

- Limpieza: mecánica y química.
- Biocidas: oxidantes y no oxidantes
- Otros métodos de prevención y control.

3.4.1.1 Limpieza

Considerando que la limpieza en general está orientada a la remoción de depósitos en las superficies metálicas de un sistema, desde el punto de vista práctico se consideran dos tipos principales de depósitos:

- ✓ Incrustaciones (scaling)
- ✓ Sedimentos (slime)

Las incrustaciones son depósitos cristalinos, duros, formados por la precipitación de material disuelto siendo los más comunes: carbonato, sulfato y silicato de calcio. La formación de incrustaciones es función de diversas variables tales como temperatura, concentración de especies incrustantes, pH, calidad del agua y condiciones hidrodinámicas.

El tratamiento químico de las incrustaciones se realiza generalmente mediante la adición de ácidos o compuestos específicos para inhibir su formación o modificar su estructura cristalina. Generalmente se utiliza el ácido sulfúrico por su bajo costo y en menor proporción el ácido clorhídrico o el ácido sulfámico.

Los sedimentos o limos son depósitos formados por material en suspensión que sedimenta o se adhiere a las superficies metálicas.

Los sedimentos son causados por un fenómeno físico y en algunos casos puede ser necesaria su remoción a través de filtración o el uso de agentes dispersantes para mantener las partículas suspendidas.

Las altas velocidades de flujo (1,5 a 2,5 m/s) pueden desprender los sedimentos comunes a flujos menores (menos de 0,5 m/s) ayudan a la deposición de sustancias en suspensión. Estas bajas velocidades son comunes en diversos sistemas de enfriamiento industrial.

Los métodos mecánicos de reducción del fouling pueden comprender el uso de filtros gruesos (sistemas abiertos) para la remoción del material particulado de mayores dimensiones, o filtros finos para el caso de sistemas de recirculación abierto.

La selección del método de limpieza debe ser muy rigurosa debida a que en algunos sistemas hay soldaduras y sitios donde el acceso no es fácil. Estas áreas inaccesibles pueden representar puntos para recontaminación del sistema y con el tiempo se pueden convertir en celdas de corrosión por aireación diferencial (13).

3.4.1.2 Limpieza mecánica

La limpieza mecánica comprende cualquier método, capaz de remover por un medio físico el material depositado sobre la superficie.

En el cuadro 1 se indican los factores que se deben considerar en la selección de un procedimiento de limpieza (12).

- ✓ Identificación del material a remover
- ✓ Identificación de la superficie metálica a limpiar
- ✓ Evaluación de la condición de la superficie
- ✓ Grado de limpieza requerida
- ✓ Limitaciones por geometría de la estructura o componente
- ✓ Impacto en el ambiente
- ✓ Costo

Cuadro 3.1. Factores para la selección de procedimientos de limpieza

La limpieza mecánica no es un sustituto de los programas de tratamiento de agua y aquella misma debe incluir enjuagues con agua mas un agente biocida a fin de que esta combinación elimine de la superficie los microorganismos responsables de la corrosión microbiológica. Es importante considerar que el método de limpieza que se escoja debe ser capaz de remover cualquier depósito de la superficie, ya que de otra forma se puede acelerar la producción de picaduras por corrosión bajo depósitos o aireación diferencial.

3.4.1.3 Limpieza Química

La limpieza química generalmente se aplica después de la limpieza mecánica y es más efectiva para limpiar espacios confinados y zonas de ataque localizado. En la limpieza química puede utilizar alguno de los siguientes compuestos: ácidos minerales (clorhídrico, sulfúrico y sulfámico), ácidos orgánicos (fórmico, acético, cítrico son ácidos débiles y son menos corrosivos que los ácidos minerales), pudiendo ser utilizados en sistemas que necesitan sucesivas limpiezas. Quelantes, que tienen la propiedad de formar complejos con iones metálicos (EDTA y su forma n-hidroetilada HEDTA), tienen una fuerte dependencia del pH (12).

En la tabla 3.1 se presentan un resumen sobre la selección de agentes para limpieza química.

AGENTE QUÍMICO	Carbonatos	Fosfatos	Sulfuros	Óxidos de hierro	Óxidos de cobre
Ac. Sulfúrico	-	-	-	X	-
Ac. Cítrico	-	-	-	X	-
Ac. Clorhídrico	X	X	X	X	X
Ac. Sulfámico	X	-	-	-	-
Ac. Fosfórico	X	-	-	X	-
Ac. Fórmico	X	X	-	X	-
EDTA	X	X	-	-	-

Tabla 3.1. Selección de agentes para limpieza química.

3.5 BIOCIDAS

El tratamiento químico por excelencia usado para prevenir o controlar la corrosión microbiológica es el tratamiento con biocidas. Estos compuestos (o combinación de compuestos) capaces de matar microorganismos o eliminar el crecimiento microbiológico.

La desinfección de cualquier sistema utilizando biocidas debe cumplir con tres funciones principales: bactericida, fungicida y alguicida. Esto hace que aparezca el concepto de polivalencia de los biocidas. Sin embargo, en un mismo grupo de bacterias o de hongos, el producto puede que actúe sobre una especie y no necesariamente sobre la otra.

La efectividad del biocida depende de la naturaleza de los microorganismos a eliminar y la selección de las condiciones de operación del sistema a tratar por lo que se recomienda que se haga su ensayo, preferiblemente en las condiciones de operación o en su defecto a nivel de laboratorio, para determinar la dosis óptima así como el componente activo más apropiado para el sistema que se va a tratar (13).

Los requisitos que deben exigirse para un biocida de uso industrial se resumen en el cuadro 3.2.

- Selectividad para los microorganismos a eliminar
- Capacidad de mantener su efecto inhibitor frente a la acción de otras sustancias presentes en el medio bajo condiciones similares de operación.
- No ser corrosivo para los sistemas donde se aplique
- Presentar una adecuada biodegradabilidad
- Bajo costo
- Baja Toxicidad

Cuadro 3.2. Principales requisitos de un biocida para sistemas industriales

A continuación se describen los biocidas más utilizados para el control microbiológico de las aguas de uso industrial.

3.5.1 Biocidas Oxidantes

Los más comunes son el cloro, bromo, ozono y peróxido de hidrógeno.

3.5.1.1 Cloro

El cloro es utilizado frecuentemente bajo la forma gaseosa o en forma de uno de sus hipocloritos en ambos casos se hidroliza para formar ácidos hipocloroso y clorhídrico



El hipocloroso es la especie activa y se disocia en función del pH:



Se cree que además de la acción de ión ClO^- , la biocida del cloro es debida, también, a que parte del ClO^- se descompone y libera oxígeno nascente (20, 13).

El intervalo de pH de 6.5 a 7.5 es considerado como ideal para la acción biocida. El cloro es un excelente alguicida y bactericida a pesar que la concentración efectiva de cloro se ve reducida considerablemente cuando debe penetrar las biopelículas bacterianas (12, 13). Las mediciones con microelectrodos específicos han permitido determinar que la concentración de cloro dentro de la biopelícula es sólo un 20% de la concentración presente en la solución en contacto con el mismo. Esto explica la baja actividad de los biocidas desarrollada por diversas especies de bacterias sulfato reductoras o consorcios microbianos mixtos (13, 26, 106, 18):

Otras fuentes de cloro son las sales del ácido hipocloroso como el hipoclorito de sodio (NaClO) o de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) que funcionan de igual manera que el cloro gaseoso. El dióxido de cloro (ClO_2) es también usado como sustituto del cloro gaseoso, especialmente por su condición de no formar ácido hipocloroso y proporcionar una relación costo/beneficio más ventajosa que el cloro en determinadas condiciones operacionales.

3.5.1.2 Bromo y derivados

Los compuestos de bromo que forman ácido hipobromoso (HBrO) tienen una acción biocida más efectiva en un intervalo de pH amplio que el ácido hipocloroso. A pH de 7.5, un 90% de ácido hipobromoso está presente (sólo un 50% en el caso del hipocloroso) que se reduce al 50% cuando el pH se eleva a 8.7 (sólo un 10% para el hipocloroso).

3.5.1.3 Ozono

El ozono puede ser considerado como el biocida ideal por sus características especiales: i) por ser oxidante que lo hace sumamente efectivo sobre la mayoría de las bacterias presentes en sistemas industriales, incluso sobre biopelículas microbianas; ii) su concentración residual en el sistema es mínima pues por su corta vida media se consume en forma casi simultánea a su producción; iii) su baja agresividad hacia la mayoría de los metales estructurales, incluso el acero al carbono, lo hace seguro desde el punto de vista de la corrosión; iv) su capacidad anti-incrustante, si bien no está aun debidamente documentada sería una ventaja adicional (141, 190, 10). Concentraciones de 0.2 mg/L son efectivas para controlar un sistema con baja contaminación orgánica. Se puede generalizar que intervalos de concentraciones estables entre 0.01- 0.05 mg / L son suficientes para evitar la formación de biopelículas, si bien esto sobre superficies conteniendo depósitos biológicos, son necesarias concentraciones entre 0.2 y 1.0 mg / L para poder desprender el *biofouling*. Un adecuado balance entre las ventajas y desventajas del ozono como biocida de elección debe considerar: i) su efectividad en reemplazar al cloro; ii) su efecto sobre los materiales estructurales del sistema; iii) su relación costo / beneficio en sustitución del tratamiento con un biocida convencional.

3.5.1.4 Peróxido de hidrógeno

Es económico y relativamente estable. Es también muy seguro, se utiliza como ingrediente básico en productos farmacéuticos por ser desinfectante cutáneo, en concentraciones tan elevadas como 30000 ppm. En aplicaciones donde el agua va a estar en contacto con metales por un largo período de tiempo se puede dosificar peróxido de hidrógeno a niveles entre 50-100 ppm como un buen agente para inhibir el crecimiento bacteriano del sistema (13).

3.5.2 Biocidas no Oxidantes

La diversidad de estos compuestos es muy amplia y en general deben cumplir con las regulaciones ambientales, ya que la mayoría de ellos son tóxicos y pueden impactar los ecosistemas. Las características de los sistemas a tratar, los materiales de construcción, las condiciones operacionales y el régimen de flujo determinarán el producto a ser usado y la mejor forma de aplicación

A continuación se describen algunas características de los biocidas no oxidantes utilizados para el control microbiológico.

3.5.2.1 *Glutaraldehído*

El glutaraldehído es un ingrediente activo en una gran variedad de biocidas comerciales usados para el control de hongos, algas y bacterias (bacterias sulfato reductoras entre otras y biopelículas bacterianas). Actúa en amplios intervalos de pH y temperatura. El grupo funcional aldehído es un agente alquilante que reacciona con los constituyentes básicos de las proteínas (como por ejemplo los grupos: -OH, -NH₂, -COOH y -SH) en las membranas de las células, la pared celular y el citoplasma. La máxima concentración permitida actualmente por la USEPA (United States Environmental Protection Agency) es de 50 ppm. El glutaraldehído es soluble en agua e insoluble en aceites. Las formulaciones pueden contener agua, metanol, isopropanol o combinaciones de ambos, estos alcoholes son adicionados con el propósito de mejorar su capacidad de penetración y para evitar su congelamiento durante el almacenamiento. Algunos productos pueden contener 2 a 5% de compuestos de amonio cuaternario los cuales favorecen la actividad biocida bajo ciertas condiciones. El glutaraldehído es incompatible con sustancias alcalinas o con ácidos fuertes. En particular es muy reactivo con amoníaco y sustancias que contengan aminas. Las aminas pueden promover una polimerización exotérmica del glutaraldehído. Los compuestos cuaternarios de amonio son compatibles con el glutaraldehído, sin embargo algunos productos a base de cuaternarios de amonio son formulados con otras aminas que puede originar un producto incompatible, por lo que es aconsejable realizar los ensayos de compatibilidad antes del uso (13, 100).

3.5.2.2 *Compuestos de amonio cuaternario*

Los compuestos de amonio cuaternario (QUATS) constituyen una clase de compuestos catiónicos (cargados positivamente) que son usados como biocidas e inhibidores de corrosión microbiana. Como biocidas los QUATS actúan sobre las células de los microorganismos como detergentes y disuelven los lípidos y causan pérdida de material vital. Las propiedades de estos compuestos proveen protección adicional contra la formación de material polisacárido que se forma durante la colonización bacteriana. Los biocidas conteniendo cuaternarios de amonio pueden ser formulados con una gran variedad de aditivos, incluyendo hidróxido de potasio, alcoholes, agua, etc. El alcohol y el agua son utilizados como diluyentes aunque el alcohol le confiere algunas propiedades biocidas adicionales y mayor capacidad de penetración. Como inhibidores de corrosión forman una capa protectora en las superficies internas de los sistemas tratados reduciendo la exposición a los oxidantes (1., 100).

Las aplicaciones principales de los QUATS han sido en sistemas cerrados y en separadores gas/líquido. En operaciones de producción de crudo se usan poco ya que pueden afectar la permeabilidad de las arenas productoras. Son incompatibles con agentes oxidantes fuertes como el cloro, peróxidos, cromatos, percloratos y permanganato. La mayoría de ellos son biodegradables y no requieren de una desactivación química luego de su aplicación.

3.5.2.3 Acroleína

Este es registrado por la USEPA como compuesto contaminante y de uso restringido como biocida. Su acción biocida resulta de los grupos funcionales vinilo y aldehído, siendo el vinilo más reactivo y tóxico. Adicionalmente la acroleína es un secuestrante de sulfuro que reacciona con el H_2S disuelto para formar compuestos de azufre. Esta reactividad puede disminuir su acción biocida cuando es aplicado en ambientes conteniendo H_2S .

La acroleína es incompatible con aminas (usadas frecuentemente con inhibidores de corrosión), bisulfitos, sulfitos, dióxido de azufre, peróxidos, yodo y cloro. Puede ser desactivada químicamente usando soluciones de carbonato de sodio o sulfito de sodio, pero los productos de esta neutralización se deben tratar como residuos peligrosos.

3.5.2.3 Isotiazolinas

Las isotiazolinas contienen azufre, nitrógeno y oxígeno. En las formulaciones de biocidas estos compuestos usualmente son clorados y metilados y son solubles en agua. Las isotiazolinas son desactivadas por el H_2S por lo que no se espera un buen control microbiológico en ambientes conteniendo esos compuestos. Han sido usadas en aguas de inyección y aguas de enfriamiento.

En el cuadro 3.3 se resumen las características de los biocidas más comúnmente utilizados para tratamiento de aguas en sistemas industriales así como sus concentraciones más usuales.

- CLORO: efectivo sobre bacterias y algas; oxidante; pH dependiente; las concentraciones usuales son: 0.1 – 0.2 mg/L (continuo)
- DIÓXIDO DE CLORO: efectivo sobre bacterias, menos sobre algas y hongos; las concentraciones usuales son: 0.05 – 0.1 mg/L.
- BROMO: efectivo sobre bacterias y biopelículas; oxidante; pH dependiente; las concentraciones usuales son: 0.2 – 0.5 mg/L.
- METILBISTIOCIANATO: efectivo sobre bacterias; no oxidante; hidroliza encima de pH 8.0; las concentraciones usuales son: 1.5 – 8.0 mg/L.
- ISOTIAZOLINAS: efectivo sobre bacterias, algas y biopelículas; no oxidante; no depende del pH; las concentraciones usuales son: 0.9 – 10 mg/L.
- QUATS: efectivos sobre bacterias y algas; no oxidante; de acción tensoactiva; las concentraciones usuales son: 8 – 35 mg/L.
- GLUTARALDEHÍDO: efectivo sobre bacterias, algas, hongos y biopelículas; amplio intervalo de pH; no oxidante; las concentraciones usuales son: 10 – 70 mg/L.

Cuadro 3.3. Biocidas más comúnmente utilizados en sistemas de aguas industriales

3.6 OTROS MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL

3.6.1 Recubrimientos

El uso de recubrimientos como método de protección contra la corrosión inducida microbiológicamente se ha orientado al uso de productos no tóxicos basados en productos con silicón, resina epóxica y fluorados. El recubrimiento es, en general, un buen método de protección siempre que no presente soluciones de discontinuidad pues las imperfecciones pueden proveer sitios preferenciales para ataque localizado.

Como método de control bacteriano también son utilizadas las pinturas antifouling, para el caso de que no puedan ser utilizados los biocidas (por ejemplo, en sistemas abiertos). Los recubrimientos deben cumplir los siguientes requisitos: no se deben alterar por el ataque bacteriano y no deben sufrir procesos de degradación que produzcan sustancias corrosivas. Estos recubrimientos disminuyen el macrofouling y pueden eliminar algunos problemas de corrosión microbiológica reduciendo el número de bacterias formadoras de limo proveyendo superficies de baja tensión superficial donde la adherencia bacteriana es difícil. En la experiencia práctica se han probado con buenos resultados cubiertas del tipo *coaltar* y de base epoxica mientras que no se han encontrado resultados satisfactorios con recubrimientos a base de PVC (12).

3.6.2 Selección de materiales

Al seleccionar los materiales para utilizarlos en las condiciones de operación se deben tener en cuenta si éstos van estar expuestos a ambientes donde se puedan desarrollar problemas de biocorrosión; se deben seleccionar en ese caso materiales aleados para ofrecer una resistencia superior al picado, corrosión por rendijas y ataque localizado en general.

La selección de materiales debe incluir los siguientes pasos:

1. Revisión de las condiciones de operación
2. Revisión del diseño
3. Selección del material más adecuado
4. Evaluación de los materiales
5. Especificación de calidad
6. Seguimiento e inspección

3.6.3 Protección catódica

La protección catódica se realiza imprimiendo una corriente externa a la estructura metálica a proteger, que se opone así a la corriente de corrosión; para ello el metal debe ser polarizado a un potencial preseleccionado. El costo del método depende principalmente de la magnitud de la corriente aplicar. Como la protección catódica incrementa localmente el pH de la interfase metal/solución debido a la producción de hidroxilos disminuye consecuentemente la solubilidad de los compuestos de calcio y magnesio favoreciendo la precipitación de depósitos calcáreos.

Estos depósitos disminuyen la cantidad de corriente necesaria para la protección y resultan beneficiosos desde el punto de vista económico. La interacción de los depósitos calcáreos y el *biofouling* marino se ha estudiado recientemente (10, 126) encontrándose que las biopelículas microbianas interaccionan en el inicio de la protección con depósitos inorgánicos causando dos efectos principales: a) una modificación en la estructura y distribución de los depósitos calcáreos; b) un incremento de la corriente necesaria para lograr una adecuada protección. La protección catódica parece ser efectiva para controlar el crecimiento de biopelículas de bacterias aeróbicas sobre estructuras de acero al carbono sumergidas en agua de mar, mientras que actuaría favoreciendo el crecimiento de biopelículas anaeróbicas de bacterias sulfato reductoras (60). Una adecuada combinación de protección catódica y cubiertas protectoras puede ser un eficiente sistema de control de biocorrosión, especialmente cuando se trata de proteger tuberías o estructuras expuestas al agua de mar o suelos potencialmente agresivos.

Otros métodos para combatir las velocidades de flujo adecuadas (1m/s), tratamiento térmico, radiación ultravioleta, corrientes eléctricas, ultrasonido, sistemas magnéticos, o filtración. Es importante señalar que la selección del método dependerá de su costo y de cada situación en particular.

Al seleccionar cualquier método de control se debe siempre considerar que lo mejor es mantener el sistema limpio, no olvidando que el término "limpio" varía de acuerdo a las características del proceso. En general se puede decir que un sistema limpio es aquél que cuenta con un adecuado programa de tratamiento de agua, limpieza y mantenimiento.

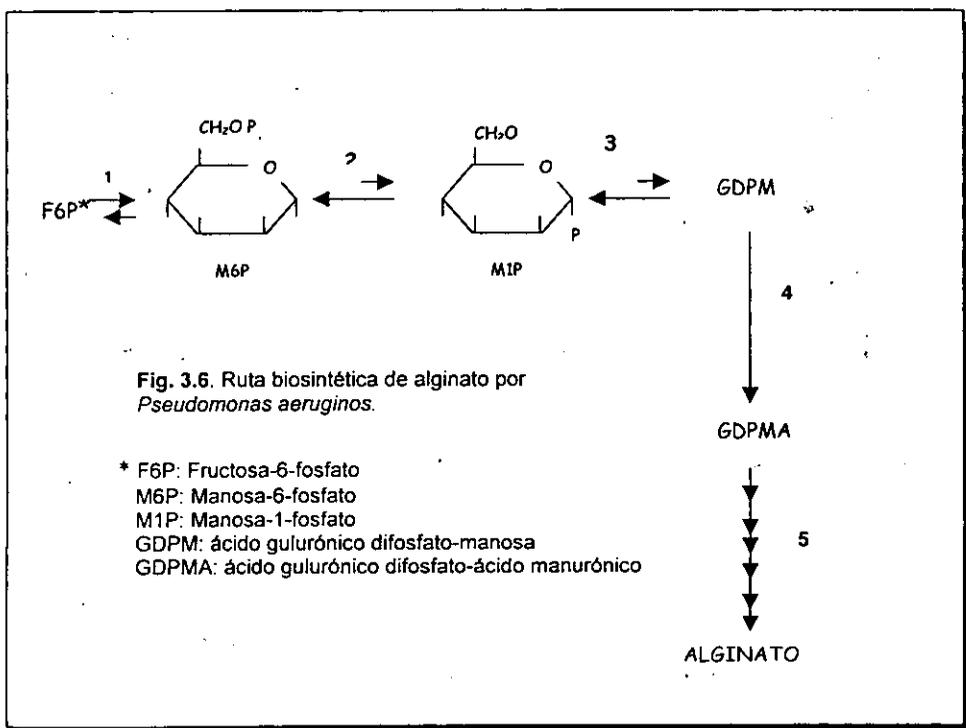
Es aconsejable ensayar siempre el programa de tratamiento propuesto en las condiciones más parecidas a las condiciones de operación. Estos ensayos pueden indicar la efectividad relativa del tratamiento y el potencial de pérdidas en el sistema. Por ello, los ensayos deben realizarse usando los materiales y agua del sistema a evaluar.

3.7 CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA CAUSADA POR *Pseudomonas aeruginosa*

La corrosión microbiológica inducida por *Pseudomonas aeruginosa* tiene diferentes características que influyen de manera importante para la acción de los biocidas (16, 25, 26, 29, 58, 61). Por ello, el análisis de la presencia de la biopelícula es importante en los estudios de biocorrosión en los sistemas industriales (31).

Pseudomonas aeruginosa ha mostrado preferencia por asumir un crecimiento en forma de biopelícula (29), embebiéndose a sí misma en una matriz orgánica polimérica compuesta principalmente de **alginato** (31). Las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* tienen gran relevancia agentes que favorecen la acumulación de depósitos en las superficies en sistemas de procesos industriales y en diversas superficies expuestas al medio ambiente (23).

El **alginato** es copolímero del ácido manurónico con uniones β -1,4 a su epímero C-5, ácido L-gulucorónico (35). El alginato como un polímero de la matriz de la biopelícula juega un papel importante en el biofiling (57). La ruta biosintética del alginato se resume en la figura que sigue a continuación (37).



Reacción	Enzima	Gen
1	PMI: fosfomanosa isomerasa	alg A
2	PMM: fosfomanosa mutasa	alg C
3	GMP: GDP-manosa pirofosforilasa	alg A
4	GMD: GDP-manosa deshidrogenasa	alg D
5	Son diversas reacciones, las enzimas no están caracterizadas aún	—

Tabla 3.2 Enzimas que catalizan las reacciones en la biosíntesis de alginato por *P. aeruginosa*; los genes que codifican para estas enzimas

La producción del alginato se ve favorecida o disminuida por diversos factores. Davies et al. (42, 43), mencionan que a pesar de tener conocimiento sobre la activación del gen promotor del alginato como consecuencia de la unión celular a una superficie sólida, ellos demostraron que también superficies como el Teflón favorecían la activación del promotor *algC* en la producción del exopolímero alginato (37, 38). Dagostino (35) también reportó que cepas de *Pseudomonas sp.* S9 que crecían en microplacas de poliestireno con este mismo efecto. Otros trabajos han demostrado que la producción de alginato es sobrerregulada en *Pseudomonas aeruginosa* durante la limitación de nutrientes (41, 120), durante la perturbación de la membrana inducida con solventes provocando deshidratación o desecación (42) y bajo condiciones de alta tensión de oxígeno (7).

Vandevivere et al. (120), demostraron que las superficies sólidas pueden estimular la síntesis de exopolisacárido de manera irreversible y que este efecto puede tomar lugar independientemente de los cambios en condiciones de crecimiento. Esto es, las células unidas a una superficie produjeron cinco veces más MPE, en ausencia de una interfase sólido-líquido, que aquellas que se encontraban no unidas a una superficie.

Se ha demostrado que la producción de alginato varía a través del ciclo de crecimiento. Anison y Couperwhite (2) observaron la producción de alginato casi exclusivamente durante la fase exponencial del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Piggot et al. (98) encontraron que la producción del exopolisacárido no la comienza *P. aeruginosa* sino hasta el final de la fase exponencial y continúa por mucho hasta la fase estacionaria. En los estudios realizados por Davies et al. (37), hallaron para las células planctónicas que el máximo de actividad del gen *algC* ocurría en la fase lag tardía y la exponencial temprana, del ciclo de crecimiento cultivos continuos:

Estos autores vieron durante la fase estacionaria, cuando el cultivo llegaba a la limitación de oxígeno, un segundo incremento en la producción de exopolímero, los cuales son datos paralelos a los reportados por Piggot et al (98). Las células en la biopelícula muestran variación en la expresión de la actividad del gen promotor *algC*. Sin embargo, la actividad fue mayor que con las células planctónicas por la duración del ciclo de crecimiento (37).

Además, estos mismos autores (37) observaron que no todas las células expresan el gen *algC* al mismo tiempo aunque todas estén en un cultivo continuo. Esto puede deberse al tiempo, al estado nutricional o al grado o naturaleza de la adherencia de las células en una superficie sólida.

Sus resultados demuestran que no es necesario que sea continua la producción de alginato para que las células se mantengan unidas al sustrato.

Los investigadores han observado durante mucho tiempo que las biopelículas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* tienen menor susceptibilidad a agentes antibacterianos que aquellas que se encuentran en la contraparte planctónica, o en flotación (3, 4, 16, 67, 92). Uno de los mecanismos primarios sugeridos por varios investigadores para explicar la baja susceptibilidad a antibacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* dentro de las biopelículas es la limitación en el transporte de los agentes antibacterianos dentro de la comunidad de la biopelícula (16). Este mecanismo está relacionado con la absorción o la reacción del antimicrobiano dentro de la biopelícula, la cual establece una barrera de difusión, como lo menciona Xu et. al. cuando usaron cloro atrapado en perlas de alginato (135). Sin embargo, la limitación en el transporte no ha sido suficiente para explicar la reducida susceptibilidad de las biopelículas a los agentes antimicrobianos (120). Es por esto que, las respuestas de unión-inducción y la adaptación fisiológica a la limitación de nutriente de las bacterias en las biopelículas está recibiendo más atención (5, 58). Específicamente, se ha especulado que las porciones internas de los biopelículas experimentan inanición y un crecimiento lento debido a la limitación de nutriente, estableciéndose así una heterogeneidad dentro de las biopelículas.

La heterogeneidad de crecimiento dentro de la biopelícula es un punto crucial en la determinación de la susceptibilidad a agentes microbianos dependiente de la velocidad de crecimiento (134).

Xu et al. (134) emplearon un como indicador fisiológico la expresión de la enzima fosfatasa alcalina (APasa) con la máxima inanición de fosfato, la cual refleja la capacidad de síntesis de proteínas de novo. El oxígeno administrado fue controlado por variación de la composición de los gases ambientales y medido directamente con un microelectrodo para oxígeno.

Los resultados obtenidos (ver figura 3.6) muestran que la dimensión de la banda de expresión de APasa se incrementa 1.5 veces cuando el experimento se realiza en condiciones de oxígeno puro con respecto a condiciones ambientales y también se observaron sitios aislados en la profundidad de la biopelícula. La actividad específica de la APasa de la biopelícula completa bajo condiciones aeróbicas ambientales fue aproximadamente de 1/15 comparada con respecto a las bacterias planctónicas lo cual causa sensación porque solamente 1/5 o un ¼ parte superior de la biopelícula expresó la enzima.

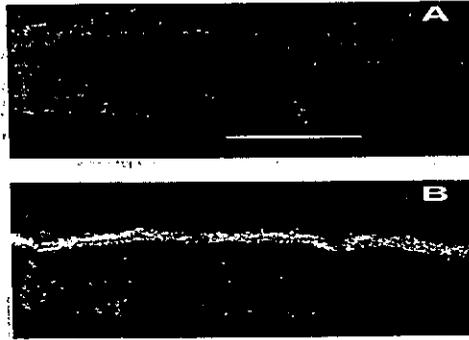


Fig. 3. 6 Fotomicrografías de un corte de la biopelícula de *P. aeruginosa* teñidas para detectar actividad de APasa bajo diferentes condiciones, designadas así: medio alto en fosfato con ambiente aerobio atmosférico (control) (A) y medio bajo en fosfato con ambiente aerobio atmosférico (B). La zona más blanca representa células APasa positiva, la zonas más grises representan el resto de las células. Las imágenes están orientadas con el sustrato hacia la parte inferior de las fotografías (de referencia 134).

Xu et al. (134) suponen que *P. aeruginosa* tiene este patrón de distribución espacial debido a la limitación de oxígeno porque (1) el oxígeno es frecuentemente limitado en las biopelículas aeróbicas por su rápido consumo; (2) en un sistema de flujo por goteo, tanto el nutriente y como el oxígeno vienen de la parte superior de la biopelícula y las células cerca de la interfase biopelícula-seno del fluido tienen un mayor acceso al oxígeno y pueden consumirlo; (3) el oxígeno está limitado en la profundidad dentro de las biopelículas como lo sugiere Beer et al. (10).

Costerton et al. (33) propone que existen otros cambios para especies bacterianas que se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza como *Pseudomonas aeruginosa* que responden a condiciones favorables de nutrientes adhiriéndose a superficies disponibles por fisión binaria y producción del exopolímero para desarrollar biopelículas maduras, que sirven de protección contra condiciones adversas del medio ambiente y de agentes antibacterianos químicos y biológicos. Esta protección es sacrificada por las células planctónicas que periódicamente son desalojadas de las biopelículas establecidas para que los nuevos hábitats puedan ser colonizados con las nuevas biopelículas. Cuando las condiciones de los nutrientes llegan a ser desfavorables tanto las células sésiles como las planctónicas (71) de estas especies reducen su forma a un tamaño más pequeño ($\pm 0.3 \mu\text{m}$), "ultramicrobacterias" esféricas por un proceso que está bien documentado como inanición de supervivencia (72). En este proceso reversible el DNA de la célula bacteriana se estabiliza mientras sus capacidades metabólicas son selectivamente seleccionadas para producir células latentes que puedan ser fácilmente resucitadas hasta varios años después, es una estrategia bacteriana que al reducirse a su forma más simple, que favorece claramente la formación de biopelículas estacionarias cooperativas metabólicamente a favor de las condiciones nutricionales y de las células planctónicas o de las ultramicrobacterias latentes cuando los intereses de las especies sirven mejor para diseminación y / o simple supervivencia.

Con base en la activación de los genes de producción de MPE, y a la heterogeneidad espacial que presenta *Pseudomonas aeruginosa*, se puede decir que dentro de las biopelículas las bacterias son generalmente mucho más resistentes a los biocidas que sus contrapartes planctónicas.

Cuando un problema industrial es causado por células planctónicas, los agentes antibacterianos deben ser probados en condiciones que asemejen las de los sistemas afectados. Las pruebas rutinarias para la elección exitosa de biocidas permitirán resolver estos problemas. Incluso cuando los problemas industriales involucren bacterias dentro de una biopelícula, las pruebas contra las células planctónicas pueden ser muy útiles; pueden indicar la eficacia contra las células planctónicas que se separan de la biopelícula y cuando se obtienen resultados negativos se descalifica a un agente para usarlo en contra de los organismos dentro de la biopelícula (31).

CAPÍTULO 4

PROPUESTA PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL GLUTARALDEHÍDO EN LA CORROSIÓN INDUCIDA POR *Pseudomonas aeruginosa*

En este capítulo realizamos una propuesta para llevar a cabo experimentos con el objetivo de determinar el efecto de biocidas en la corrosión inducida microbiológicamente, considerando, principalmente, los trabajos realizados en el laboratorio 112 de la División de Estudios de Posgrado (DEPg.) de la Facultad de Química de la UNAM, del grupo de investigación de Tejada y cols.

Nos enfocaremos específicamente al glutaraldehído como biocida en la corrosión inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en acero estructural AISI 1010, planteando el uso de los equipos y materiales existentes en el laboratorio arriba mencionado pues con ellos se han observado resultados confiables, por ello se sugiere su empleo en esta propuesta.

Con base a lo expuesto en la sección 3.7, el trabajo que se propone aquí es estudiar el efecto que tiene el glutaraldehído contra las bacterias planctónicas, como indicativo de la eficacia de dicho biocida, calificándolo para su posterior utilización contra bacterias dentro de una biopelícula.

4.1 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y REGISTRO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO

4.1.1 Selección del medio de cultivo

Para realizar la selección de un medio de cultivo tenemos que considerar que el glutaraldehído reacciona con los constituyentes básicos de las proteínas (como por ejemplo los grupos: -OH, -NH₂, COOH y -SH) (13), por ello el medio de cultivo empleado no deberá contener aminoácidos o proteínas, sin embargo debe favorecer el crecimiento del microorganismo.

4.1.1.1 Medios de cultivo empleados por Tejada y cols.

El medio de cultivo empleado por Aguilar et al. (1) es utilizado para analizar corrosión en acero estructural 1010 causada por *Pseudomonas aeruginosa*, determinan la acción de los iones cloruro, y también el pH. El medio está constituido así:

NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Na ₂ B ₄ O ₇	0.05 M
Sacarosa	0.01 M
NaCl	0.5 M

Este medio facilita la realización de las determinaciones electroquímicas, y como se observa por su constitución, aunque suponemos que este no reaccionaría con el glutaraldehído, sus resultados muestran que el pH no tiene grandes variaciones, por el efecto amortiguador que ejercen el fosfato monobásico y el borato de sodio.

Un medio de cultivo que contiene asparagina (3.0 g), K_2PO_4 (1.0 g), y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g) y agua destilada (1 l), el pH se ajusta en el intervalo de 6.9 y 7.2 (3), que favorece el crecimiento de la bacteria fue empleado por Tejada et al. (115) para estudiar la relación entre la población microbiana y la corrosión en acero, causada por *Pseudomonas aeruginosa* y, también, por Diego et al. (44) para evaluar la corrosión en acero estructural AISI 1010 por *Pseudomonas aeruginosa*. Este medio emplea un aminoácido, la asparagina, el cual creemos puede reaccionar con el glutaraldehído y no ejercer su acción biocida, obteniendo resultados falsos negativos

4.1.1.2 Medios de cultivo empleados en trabajos publicados de corrosión inducida por *Pseudomonas aeruginosa*

El medio de cultivo propuesto por Morales et al. (90, 91) en la determinación del efecto que ejerce *Pseudomonas aeruginosa* en la corrosión localizada de acero inoxidable 304, está constituido por NaH_2PO_4 (0.1 M), $Na_2B_4O_7$ (0.05 M) el pH es ajustado a 7.5 y adicionan $10^{-2}M$ de sacarosa como fuente de carbono, facilita las técnicas electroquímicas, sin embargo las variaciones de pH no son muy notorias por el efecto del buffer.

Sanderson y Stewart (106) utilizan un medio para la evaluación de un modelo de acción biocida, el cual es un medio mínimo en sales con 20 mg l⁻¹ de glucosa como única fuente de carbono. Aunque este medio puede ser adecuado, y sencillo, para llevar a cabo el ensayo, se opta por un hidrato de carbono diferente a la glucosa por la rápida utilización de este por el microorganismo

Para determinar el efecto de los biofilm en el transporte de masa y distribución de oxígeno, de Beer et al. (8) utilizan, también, un medio mínimo en sales que consiste de KH_2PO_4 (2.2 mM), K_2HPO_4 (4 mM), $(NH_4)_2SO_4$ (0.76mM), $MgSO_4$ (4.1×10^{-2} mM), y glucosa (2.2 mM), agua destilada y pH de 7. Este medio tiene efecto buffer por lo cual no se notarían las variaciones de pH, y al igual que el anterior, se prefiere un hidrato de carbono distinto a la glucosa.

Fernández et al. (50) utilizaron una solución electrolítica con sacarosa, como fuente carbono, constituido así:

CaCl ₂	$1.8 \times 10^{-4} M$
MgSO ₄	$1.7 \times 10^{-3} M$
(NH ₄)SO ₄	$7.6 \times 10^{-3} M$
Agua destilada	c. b. p 1000
pH	7.0

Es importante mencionar que el inóculo conserva una relación de 4:1.

Este medio se utilizó para estudiar la influencia de los contaminantes microbianos en el comportamiento electroquímico del aluminio y sus aleaciones en sistemas de distribución de agua.

Al no tener ninguno de los compuestos que están reportados con los que el glutaraldehído pudiese reaccionar creemos que se podrá observar el efecto del biocida sobre el microorganismo y al no tener ningún buffer permitirá la determinación de la variación de pH provocada por el microorganismo. Este medio no interfiere con las determinaciones electroquímicas.

Hedrick H.G. (61) emplea un medio de cultivo con el cual estudia la corrosión microbiológica en aluminio, causado por *Pseudomonas aeruginosa*. Dicho medio tiene la siguiente composición.

NaH ₂ PO ₄	1.00 g
(NH ₄) ₂ NO ₃	1.00 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.01 g
Agua	csp. 1000 ml
pH'	6.8-7.2

Además adicionan una solución de bicarbonato de sodio al 1% esterilizada por filtración. En este medio lo mantienen en una atmósfera gaseosa con 10% de CO₂, 60% de hidrógeno y 30% de aire, esto a 30°C.

4.1.1.3 Recomendación sobre el medio de cultivo

Con base al análisis de los medios de los puntos 4.1.1.1 y 4.1.1.2 creemos que uno de los medios que puede funcionar, sin interferir con el biocida, sin amortiguar el medio y facilitar las determinaciones electroquímicas es el propuesto por Fernández et. al. (50) además de ser fácil de preparar.

4.1.2. Cinética de Crecimiento

Es de utilidad registrar la cinética de crecimiento del *Pseudomonas aeruginosa* en el medio de cultivo propuesto, manteniendo la relación con el volumen de microorganismo a inocular, con lo cual podemos observar las cuatro fases de crecimiento del microorganismo. Esto se puede observar gráficamente en una curva de tiempo contra el logaritmo del número de microorganismos.

Determinar la cantidad de microorganismos presentes en el medio de cultivo interpolando los datos obtenidos de las lecturas de absorbancia en una curva de calibración de McFarland (15, 100, 101, 109, 141), empleando un espectrofotómetro, con longitud de onda entre 400 y 800 nm. y con capacidad para una celda de ½ " de diámetro.

Para lo cual se recomienda mantener la proporción del medio de cultivo que empleó Fernández et. al. (50) para el volumen de microorganismo con respecto al medio de cultivo, y considerando las concentraciones de glutaraldehído dentro de los límites permitidos por la USEPA (13) proponemos los valores que aparecen en la tabla 4.1. Considerando que la adición del glutaraldehído debe realizarse, preferentemente durante la fase log. Llevar a cabo este experimento en condiciones de asepsia, en una campana de seguridad microbiológica clase II por trabajar con un microorganismo patógeno como *Pseudomonas aeruginosa*.

Relacionar la concentración de glutaraldehído contra el logaritmo del número de bacterias y se obtiene entonces la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés, Minimal Inhibitory Concentration). Recordando que la MIC es la concentración a la que se inhibe por completo el desarrollo del microorganismo (15; 95).

Tanto en el seguimiento de la curva de crecimiento como en la determinación del efecto del glutaraldehído es necesario determinar los cambios de pH con el objeto de comparar las variaciones de pH del medio de cultivo con y sin glutaraldehído sabiendo que algunos de los productos metabólicos de *Pseudomonas aeruginosa* son básicos (NH₃-R) (66), en este punto podemos proponer la siguiente hipótesis: el glutaraldehído reacciona con las sustancias que tienen en su estructura grupos -NH₂, -OH, -COOH y -SH, cierta cantidad de glutaraldehído reaccionará con los metabolitos que presenten las estructuras mencionadas, y no podrán modificar el pH de manera notable.

Concentración Glutaraldehído (mg / ml)	Volumen Glutaraldehído (ml)	Volumen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ml)	Volumen Medio Cultivo (ml)	Volumen total (ml)
10	0.2	1.0	3.8	5.0
15	0.3	1.0	3.7	5.0
20	0.4	1.0	3.6	5.0
25	0.5	1.0	3.5	5.0
30	0.6	1.0	3.4	5.0
35	0.7	1.0	3.3	5.0
40	0.8	1.0	3.2	5.0
45	0.9	1.0	3.1	5.0
50	1.0	1.0	3.0	5.0
55	1.1	1.0	2.9	5.0
60	1.2	1.0	2.8	5.0
65	1.3	1.0	2.7	5.0
70	1.4	1.0	2.6	5.0

Tabla 4.1 Tabla para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria

Realizar los experimentos a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, 37° C, para favorecer su crecimiento. Sin embargo, el experimento se puede realizar a la temperatura ambiente, esperando un crecimiento más lento. Así mismo se recomienda el monitoreo continuo de la temperatura.

Para realizar el ensayo de inhibición de la corrosión causada por *Pseudomonas aeruginosa* emplear la concentración mínima inhibitoria así como las concentraciones siguientes en las celdas de corrosión aerobia.

Este ensayo puede ser llevado a cabo de manera automatizada, con el Bioscreen C™, de Labsystems Oy™, mostrado en la figura 4.2, como un ejemplo de uno de los equipos existentes en el mercado.

Usando un medio de cultivo líquido, el Bioscreen C mide y despliega los resultados directamente en una computadora; se basa en la determinación de la turbidez. Los datos obtenidos por un ensayo realizado en este equipo se correlacionan directamente con ensayos de recuento en placa como el método de la vaciado en placa (75, 76).

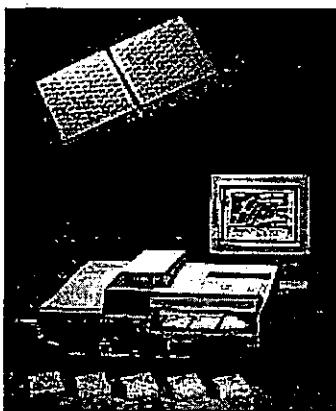


Figura 4.2 Bioscreen C™

La principal aplicación del Bioscreen C es registrar la cinética de crecimiento (por desarrollo de la turbidez) controlando parámetros como son agitación, incubación y dispensación en condiciones de esterilidad; esto se realiza en microplaca de 100 pozos donde la cuantificación de 200 muestras pueden ser procesadas al mismo tiempo. También se puede determinar el pH y otros parámetros como son el consumo de oxígeno, manteniendo la temperatura constante durante todo el proceso (85, 75).

4.2 EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR EL EFECTO DE GLUTARALDEHÍDO EN LA CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA INDUCIDA POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN ACERO AISI 1010

El esquema de trabajo que proponemos para evaluar la corrosión inducida por *Pseudomonas aeruginosa* (115, 116) así como el efecto del glutaraldehído en el medio de cultivo seleccionado en ambiente aerobio, en condiciones de asepsia dentro de una campana de seguridad microbiológica clase II.

En cada uno de los experimentos se trabaja, por lo menos, con cinco celdas en ambiente aerobio. La distribución de las celdas es como sigue:

Celda control, contiene únicamente el medio de cultivo, esta celda servirá para determinar la corrosión producida por el medio de cultivo, variaciones de pH y temperatura debidas únicamente al medio de cultivo y nos podrá indicar en caso de que exista contaminación si se observase cierta turbidez.

Celda blanco, esta celda tiene el medio de cultivo, además del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa*, y nos servirá para comparar la turbidez del medio producido por el microorganismo en crecimiento normal sin el biocida.

Celdas de prueba de acción del biocida, en este caso 3 celdas que contienen medio de cultivo, inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* y concentraciones diferentes de glutaraldehído, mismas que fueron obtenidas en el experimento anterior. En estas celdas se determinará el efecto del biocida a una concentración específica que al ser comparada con la celda blanco.

4.2.1 Preparación de los elementos de las celdas de corrosión aerobia

Las celdas de corrosión están diseñadas para poder determinar parámetros como pH, temperatura y consisten de los siguientes elementos (1, 44, 115, 116) (ver figura 4.2):

- ✓ Dos electrodos de trabajo (g en la figura 4.2)
- ✓ Un electrodo de referencia: Electrodo Saturado de Calomel (ESC) (h)
- ✓ Un electrodo auxiliar: Barra de grafito de 0.8 cm de diámetro y 10 cm de longitud (e)
- ✓ Un electrodo para medir pH: electrodo de vidrio (f)
- ✓ Un termómetro convencional o bien con el electrodo de vidrio con conector DIN (c)
- ✓ Celda de vidrio de ½ " de diámetro (a)
- ✓ Dos agujas de jeringa de 5 cm de longitud (d)
- ✓ 400 ml Medio de cultivo
- ✓ 100 ml de *Pseudomonas aeruginosa* de 24 horas de crecimiento en caldo nutritivo como propone Fernández et. al.
- ✓ Vaso de precipitados de 600 ml y modificado con boquilla lateral.
- ✓ Tapón de goma
- ✓ Tubo de látex (b)

Cuadro 4.1 Elementos de las celdas de corrosión aerobia

4.2.1.1 *Elaboración de los electrodos de trabajo*

Preparación del acero. Utilizar una varilla de acero AISI 1010 de forma cuadrada de 0.45 cm de lado, de 1 metro de longitud, la cual se cortará en segmentos de aproximadamente 1.5 cm de longitud. Cada segmento se perforará en un extremo con una broca de alta velocidad 7/64. Desengrasar con acetona. Amarrar el orificio del acero con cable No. 6 de 25 cm de longitud. Posteriormente soldar el cable.

Preparación de la resina. La resina deberá prepararse mezclando 100 g resina poliéster con 35 gotas de endurecedor hasta obtener una consistencia viscosa.

Fabricación de los electrodos de trabajo. Preparar los moldes (jeringas de 3 ml, sin aguja) colocando cera de Campeche en la punta para evitar que la resina salga por ahí.

Introducir el segmento de acero que ya está unido al cable en el molde fijándolo en el centro con la cera de Campeche, una vez fijo, se recubre con 2 ml resina, cuidando de que no se formen burbujas y manteniendo el cable en posición vertical. Fijar los moldes en una gradilla para dejar endurecer la resina durante 24-48 horas. Una vez que endurece la resina retirar el electrodo y limpiar la cera de Campeche adherida en la cara del electrodo sin resina. Pulir la superficie del electrodo con movimientos en forma de ocho sobre una lija de grano No. 600 procurando obtener un acabado uniforme resina - acero.

4.2.1.2 *Elaboración de las celdas de corrosión*

Una vez preparados los electrodos de trabajo (g, figura 4.2), y teniendo el resto de los elementos de la celda (a, b, c, d, e, f, h, figura 4.2) perforar los tapones para cada una de las celdas con el número de orificios y tamaño necesarios para dichos elementos.

Introducir en el tapón el electrodo auxiliar (e) y las agujas (d), procurar que una de ellas penetre totalmente en el tapón de forma que quede sumergida en el medio de cultivo y la otra no.

Esterilizar con calor húmedo en autoclave a 121°C de temperatura y una presión de 15 lb / in² durante 15 minutos: 1) los tapones de goma preparados con el electrodo auxiliar (e), y las agujas (d) con tapones de algodón, así como en todos los orificios del tapón, el algodón tiene la función filtrar el aire y así evitar la contaminación del medio; 2) los vasos de precipitados en la boquilla con el tubo látex unido a su vez con la celda de vidrio (a) y 3) los tubos de vidrio para colocar, posteriormente los electrodos de trabajo (g).

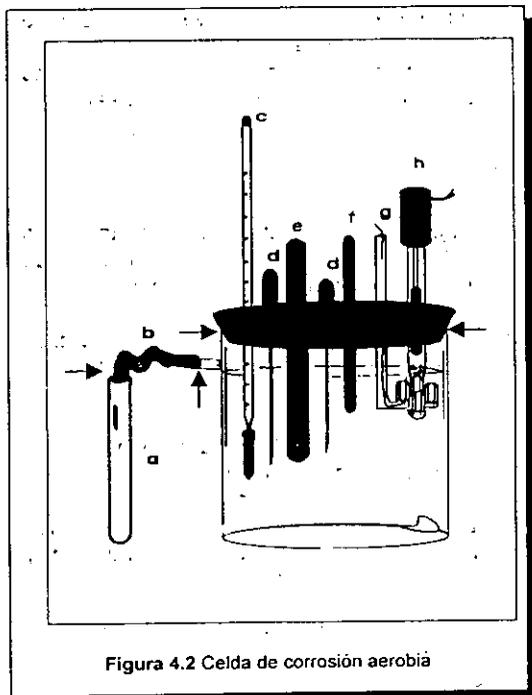
Los termómetros (c), los electrodos de trabajo (g) y los electrodos para medir pH (f) son elementos de manejo delicado y no resisten la esterilización en autoclave por lo que se deberán desinfectar con alcohol y enjuagar con medio de cultivo estéril, para retirar los residuos de alcohol. Esto se realiza en condiciones de asepsia y debajo de una campana de seguridad microbiológica clase II, con lo cual se controla la contaminación proveniente del aire.

En las condiciones mencionadas arriba y con todos los elementos listos montar las celdas de corrosión, introduciendo en el tapón los elementos desinfectados. Colocar los electrodos de trabajo con la superficie del metal hacia el electrodo de referencia de tal forma que éste quede en el centro de ellos. Colocar los electrodos en la interfase líquido aire ya que es ahí donde preferentemente crece la bacteria.

Sellar la celda con parafilm en la unión de la celda de corrosión y el tapón, así como en las uniones de la celda de corrosión – tubo látex – celda de vidrio.

Inocular la bacteria, excepto la celda control, a través de la aguja que se encuentra sumergida en el medio de cultivo se inyecta cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* manteniendo la proporción del medio de cultivo y el inóculo 4:1.

En la figura 4.2 se observa el esquema de la celda de corrosión en ambiente aerobio.



Simbología de la figura 4.2:

- a. Tubo nefelométrico
- b. Tubo látex
- c. Termómetro
- d. Aguja
- e. Electrodo auxiliar
- f. Electrodo de vidrio (pH)
- g. Electrodo de trabajo
- h. Electrodo de referencia
- Sellar con parafilm

Vista superior del tapón, se maneja la misma simbología que la figura 4.2:

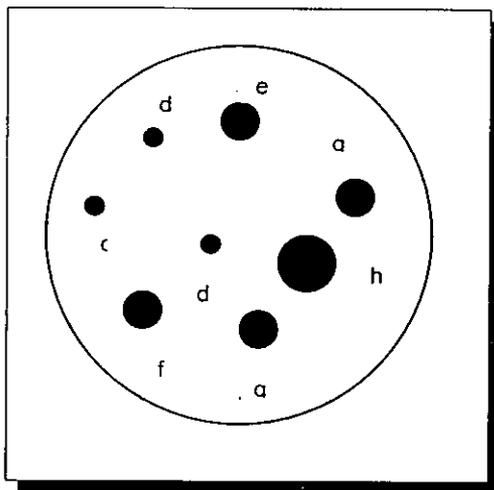


Figura 4.3 Tapón de la celda

Realizar las lecturas durante el tiempo del experimento, haciendo las determinaciones y pruebas que se mencionan a continuación:

1. Determinación de pH y Temperatura
2. Pruebas de corriente y potencial
3. Determinación de la cinética de crecimiento
4. Pruebas bioquímicas para determinar el estado metabólico del microorganismo
5. Prueba de actividad de *Pseudomonas aeruginosa* sobre el acero AISI 1010.

Considerando que el experimento se lleva a cabo a la temperatura óptima de crecimiento entonces éste tendrá una duración de 6 y 15 días (1, 44), hasta que se observe la fase de declinación.

4.3 MEDICIONES DE PH Y TEMPERATURA

Para determinar el pH emplear un potenciómetro, que tenga preferentemente la capacidad de determinar también la temperatura.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Si se utiliza un equipo como el potenciómetro de mesa marca ATI Orión realizar la calibración del equipo con compensación automática de temperatura empleando el modo de auto calibración utilizando soluciones tampón de pH 4.01, 7.00 y 10.01. Realizar la calibración de este equipo con las tres soluciones amortiguadoras pues las variaciones de pH que habrá en el medio de cultivo las desconocemos y debido a que este equipo emplea un esquema de calibración de punto a punto, esto significa que el equipo almacena en memoria las diferentes pendientes para cada porción de curva de calibración.

Cuando se realiza una determinación en una región particular de la curva, la pendiente para esta región será empleada para el cálculo del pH de la muestra. Después de la calibración, se calcula la pendiente promedio para todos los segmentos de la curva y se emplea para el cálculo de pH de la muestra. El uso del esquema de calibración aumenta la precisión en las diferentes regiones de la curva de calibración (142).

Se debe realizar compensación de temperatura para tener mejores resultados, así se tendrán las soluciones buffer y la muestra a la misma temperatura. Esto se realiza empleando un conector DIN (142).

4.4 MEDICIONES DE CORRIENTE Y POTENCIAL

Las mediciones de corriente y potencial se realizarán con el objeto de determinar la rapidez de corrosión del acero AISI 1010 en condiciones aerobias; las mediciones se hacen por dos técnicas, resistencia a la polarización (R_p) (116) y pendientes de Tafel (PT) (1, 44).

En el método de R_p la pieza de acero AISI 1010 se somete a una polarización anódica y catódica de 10 mV a partir del potencial a circuito abierto (E_{ca}), mientras que para el método de PT la pieza se somete a una polarización anódica y catódica de 200 mV. El potencial a circuito abierto o potencial de reposo es el potencial de electrodo medido con respecto a un electrodo de referencia u otro electrodo cuando no fluye corriente desde, o hacia él. El potencial de circuito abierto podría ser un potencial de equilibrio o bien un potencial que cambie por ejemplo un potencial de corrosión (114).

Para realizar las lecturas de corriente y potencial se recomienda utilizar el potencióstato Vimar (PG 3EV), haciendo los barridos a una velocidad de 2 mV / min., aunque Pacheco et. al. (44) utilizan un multimetro digital acoplado a una computadora personal (PC), en trabajos posteriores se ha observado que no es necesario porque el sistema acoplado a una PC proporciona datos más confiables pues no se introduce el error de lectura a la velocidad del ojo humano (datos no publicados).

Para la técnica de PT se emplea un potencióstato Vimar (PG 3EV) acoplado a una PC, ejecutar las lecturas a una velocidad de barrido de 10 mV / s, por ser la velocidad a la que se observan mejor las curvas de Tafel, a diferencia de lo realizado por Diego et al. (44) que lo realizan a una velocidad de 1 mV / s.

ELIAS OM BIRREY ATRE
ADETOLABES A I NO

Cada celda de corrosión deberá contar con 2 electrodos de trabajo para realizar los barridos para R_p y PT, de manera periódica pues como demostraron Aguilar et. al.(1) y Diego et. al.(44) los comportamientos para el potencial a circuito abierto y de rapidez de corrosión son similares si se sometieran los electrodos a barridos periódicos o bien a un barrido al inicio de experimento y uno al final de él, es decir de inicio-final.

4.5 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

4.5.1 Pruebas de identificación de bacterias

4.5.1.1. Tinción de Gram

Esta prueba se realiza con la finalidad de confirmar la respuesta a la tinción de Gram del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, observar las características morfológicas además de conocer la pureza del cultivo, al inicio y al final del experimento.

4.5.1.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizan con el objeto de comparar la actividad metabólica de la cepa al inicio y al final del experimento en las celdas control, blanco y en las que contienen al biocida.

4.5.1.2.1. Producción de ácido sulfhídrico

Existen diferentes medios para detectar esta actividad metabólica los cuales los presentan una sensibilidad diferente, que depende de la alteración de una o más de las condiciones.

El medio agar hierro de Kliger (KIA), es más sensible que el agar triple azúcar hierro (TSI) lo que se atribuye de una manera particular a la sacarosa que inhibe los mecanismos enzimáticos responsables de la producción de H_2S . Respecto al indicador de sulfuros, el acetato de plomo es el más sensible y se debe emplear toda vez que las bacterias en estudio puedan producir sólo trazas de H_2S . Desafortunadamente, el acetato de plomo es también inhibidor del desarrollo de muchas bacterias, por lo que se recomienda la utilización de tiras de papel filtro impregnadas con acetato de plomo, las que deben fijarse en el tapón del tubo, evitando de este modo la incorporación del indicador al medio (84, 101).

El medio hierro peptonado (SIM), es el más sensible de los tres, presumiblemente porque carece de carbohidratos que inhiban la formación de H_2S y al uso de hierro peptonado como indicador.

En cualquiera de estos sistemas el punto final de la prueba corresponde a la formación de un precipitado negro insoluble de sulfuro de metal pesado formado en el medio, o en la tira de papel filtro. Dado que se requiere de iones hidrógeno para la formación de H_2S , el cual ennegrece el medio y se observa donde hay máxima producción de ácido (139).

Para la prueba colocar cada uno de los medios antes mencionados en tubos en "pico de flauta" y a cada medio se inocula *Pseudomonas aeruginosa* por picadura dejándolos en incubación a $35^\circ C$ por 48 horas. Emplear un tubo como control. Realizar la interpretación de la prueba una vez transcurrido el tiempo de incubación.

4.5.1.2.2 Utilización de citrato

Esta prueba se realiza para comprobar la utilización del citrato como única fuente carbono, es necesario emplear medios de cultivo desprovistos de hidratos de carbono y proteínas.

A partir del cultivo tomar unas asadas y transferirlas a un tubo con solución salina, homogeneizar el contenido y a partir de estas suspensiones diluidas, inocular *Pseudomonas aeruginosa* por estría recta, incubar a $35^\circ C$ durante 24 a 48 horas. Interpretar la prueba (101, 84).

4.5.1.2.3 Prueba de la ureasa

En esta prueba se detecta la presencia de la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de la urea detectando como producto final carbonato de amonio. La hidrólisis de la urea determina la alcalinización del cultivo y el vire del indicador:

Con un asa de 2 mm de diámetro inocular cada tubo mediante la introducción de 3 asadas del cultivo microbiano, para asegurar un inóculo inicial alto. Agitar suavemente hasta lograr suspensiones homogéneas de los diferentes cultivos microbianos. Incubar los tubos a $35^\circ C$, durante 24 a 48 horas. Realizar observaciones a las 8, 12, 24 y 48 horas de incubación. Hacer la interpretación de la prueba (101, 84).

4.5.1.2.4 Prueba de la catalasa.

La catalasa es una enzima que está muy relacionada con la capacidad de los microorganismos para utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones. La catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; este tipo de enzima no existe en los microorganismos anaerobios y algunas especies microaerofílicas. Aparentemente, esta carencia determina que el oxígeno les resulte tóxico, debido a que al ser reducido a peróxido de hidrógeno, este se acumula y envenena a los anaerobios. Para determinar la presencia de esta enzima, sobre las colonias desarrolladas en triptosa fosfato agar, sembradas por estría, con un tiempo de incubación de 24-48 horas, se agrega peróxido de hidrógeno diluido (al 3%), su transformación a agua y oxígeno se pone en evidencia por la aparición de pequeñas burbujas que parten de las colonias sumergidas en agua oxigenada (101, 84).

4.5.1.2.5 Reducción de nitratos

Los microorganismos facultativos, durante la respiración, utilizan como aceptor final de electrones al oxígeno y, en ausencia, de éste a los nitratos, los que son reducidos a nitritos, óxidos de nitrógeno a nitrógeno molecular, los productos varían con el microorganismo que se trate. El medio basal para efectuar esta prueba debe contener nitrato de potasio en una concentración de 0.1% (caldo nitrato) y después de la incubación a 35° C de 24 a 48 horas, se agrega el reactivo de Griess (ácido sulfanílico y alfa naftil amina), la aparición de color rojo indica que los nitratos fueron reducidos a nitritos (101, 84).

4.5.1.2.6 Prueba del Indol

El triptófano, es un aminoácido que al ser transformado por el microorganismo da origen a amoníaco, ácido pirúvico y tres metabolitos indólicos (indol, ácido indol acético y escatol). Las enzimas intracelulares que catalizan estas transformaciones, constituyen un complejo enzimático que recibe el nombre colectivo de triptofanasa. Para demostrar la actividad de esta enzima, se emplea un medio rico en triptófano (caldo tripton), se inocula cuidando que el inóculo no sea abundante y se incuba a 35° C durante 24 a 48 horas.

Al finalizar el periodo, añadir 5 gotas del reactivo de Kovac por la pared interior del tubo, o bien si se emplea el reactivo de Ehrlich, este paso debe ser precedido por la adición de un mililitro de cloroformo, se forma entonces un complejo rojo violáceo en la interfase del cultivo y el reactivo (101, 84).

4.5.1.2.7 Prueba de la oxidasa

Esta prueba está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción se debe a la presencia de un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como receptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Existen cuatro pigmentos bacterianos que actúan como enzimas respiratorias citocromo oxidasa terminal: citocromo a₁, citocromo a₂, citocromo a₃ y un pigmento que liga el monóxido de carbono denominado citocromo o. La distribución de los diferentes citocromos varía en cada especie bacteriana; algunos organismos poseen solamente una oxidasa, en tanto que otros pueden producir dos o tres.

Para detectar la presencia de la oxidasa agregar 2 o 3 gotas de reactivo de Kovacs a algunas colonias desarrolladas en placa, observar los cambios de color dentro de 10 o 15 segundos. Este reactivo imparte un color lavanda a las colonias oxidasa positivas que gradualmente vira a un púrpura-negruzco, pero también puede impartir color al medio que las rodea (84).

El perfil bioquímico de *Pseudomonas aeruginosa* reportado en la bibliografía y con el cual se deben comparar los resultados de las pruebas anteriores es el siguiente:

Prueba metabólica	Resultado
Oxidasa	+
Catalasa	+
Reducción de NO ₃	+
Citrato	+
Indol	-
Ureasa	Variable
Kliger:	
Fermentación de glucosa	Variable
Fermentación de lactosa	-
Producción de sulfhídrico	Variable
Motilidad	+

Tabla 4.2 Perfil bioquímico de *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.2 Determinación del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Nefelometría

Realizar la lectura del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo en un espectrofotómetro, previamente calibrado y ajustado.

La curva de crecimiento se obtiene al graficar el logaritmo del número de bacterias contra el tiempo. Los datos del número de bacterias se hace por la interpolación de los datos de densidad óptica en la curva de McFarland (101).

4.6 PRUEBA ACTIVIDAD

Cuantificar la pérdida de peso que sufren piezas de acero AISI exponiéndolas al medio de cultivo, al cultivo bacteriano, al medio de cultivo con biocida y al medio de cultivo con bacterias y glutaraldehído. Realizar este experimento una vez determinada la concentración a la que el glutaraldehído ha mostrado una mayor efectividad (ver sección 4.2).

Para la prueba de actividad de pérdida de peso seguir el siguiente procedimiento: pulir las piezas para obtener una superficie completamente lisa y uniforme, conseguir un pulido a espejo, utilizando diferentes materiales y dando el terminado final con una lija de número 400 y alúmina. Pesar cuidadosamente las piezas antes y después de la exposición al medio corrosivo, evitando dejar grasa de los dedos en ellas.

Se recomienda usar 6 cajas Petri estériles, etiquetadas y, como se establece en la tabla 4.3 para una corrida, en condiciones de asepsia, debajo de la campana de seguridad microbiológica clase II, adicionar aproximadamente 15 ml de medio de cultivo estéril para *Pseudomonas aeruginosa*. Adicionar 1 ml de *Pseudomonas aeruginosa* en las cajas 3-6. Colocar en todas las cajas una pieza de acero pulida a espejo perfectamente limpia (realizar la limpieza con alcohol y medio de cultivo estéril para retirar los residuos de alcohol) y taparlas. Adicionar glutaraldehído, a la concentración a la que tiene mayor efectividad, en el tiempo de la fase log a las cajas 2, 4-6 incubar a la temperatura óptima. El tiempo de este experimento está determinado por la cinética de crecimiento y la efectividad del biocida contra las bacterias.

Transcurrido el tiempo de experimentación limpiar las piezas para que después sean pesadas. Limpiar de la siguiente manera: todas las piezas que hayan estado en contacto con las bacterias deben introducirse cada una en fenol al 5% por un período de 30 minutos. Todas las piezas, hayan o no tenido contacto con las bacterias, deben ser enjuagadas con agua destilada, remover el *microfouling*, si lo hay, así como productos orgánicos con la ayuda de una espátula de hule suave, por último, se limpian con acetona todas las piezas.

Observaciones	No. de caja	Medio de cultivo	Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> (1 ml)	Glutaraldehído
Efecto del medio	1	√		
Efecto del medio + biocida	2	√		√
Efecto del medio + bacteria	3	√	√	
Efecto de medio + biocida + bacteria	4	√	√	√
Efecto de medio + biocida + bacteria	5	√	√	√
Efecto de medio + biocida + bacteria	6	√	√	√

Tabla 4.3 Prueba de actividad

4.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Exponer pequeñas piezas de acero AISI 1010, previamente pulidas a espejo, en cada una de las condiciones establecidas en la tabla 4.3. y observar en un microscopio electrónico las piezas con la finalidad de registrar las características del efecto que produce la corrosión inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en las diferentes condiciones experimentales; dejar las piezas de metal en las condiciones experimentales establecidas con respecto a temperatura y tiempo establecidas en el experimento de la sección 4.2 y observar en un microscopio electrónico al final de período establecido. Inspeccionar el aspecto físico antes y después de la exposición a los diferentes medios según la tabla (1, 44, 93).

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Nos parece importante resaltar los siguientes puntos del trabajo que aquí se presenta:

- ✓ La **biocorrosión** afecta a las industrias naval, de construcción de estructuras marinas, del petróleo, la química y de procesos, del papel, la siderúrgica, la hidroeléctrica, la nuclear además afecta a las refinerías de alcohol, la distribución y almacenamiento de agua potable, las plantas generadoras de energía térmica, a aviones comerciales y militares.
- ✓ En la **biocorrosión** de las superficies metálicas ocurren procesos biológicos y electroquímicos mediante la participación de microorganismos adheridos a la superficie formando biopelículas.
- ✓ Las *biopelículas* pueden ser consideradas como una matriz mucilaginosa de material polimérico extracelular (MPE) de naturaleza polisacáridica con un elevado contenido de agua (aprox. 95% de la masa), células microbianas y detritos inorgánicos variados.
- ✓ En una superficie metálica, previa a la colonización, se adsorbe una película de macromoléculas, posteriormente las células microbianas, son adsorbidas, y su actividad metabólica impacta sobre los procesos electroquímicos que pueden ocurrir en la interfase metal / solución dando lugar a una interfase biológicamente condicionada.
- ✓ El modelo más reciente de la *biopelícula* establece que la biopelícula está constituida fundamentalmente por "clusters" o acúmulos microbianos y canales intercomunicantes en donde el flujo sería esencialmente por convección.
- ✓ Las *biopelículas* pueden alterar las concentraciones locales de iones que facilitan la corrosión como cloruros, o impedir la salida hacia la solución de productos metabólicos de naturaleza ácida generando áreas de bajo pH en la interfase.

5. CONCLUSIONES

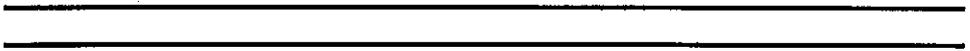
1. *Pseudomonas aeruginosa* produce biopelículas que la protegen de los agentes biocidas, comparativamente con la sensibilidad de bacterias planctónicas.
2. El control de las biopelículas continúa siendo un problema, en parte por la falta de entendimiento de la formación de las biopelículas.
3. El tratamiento químico usado por excelencia para prevenir o controlar la corrosión microbiológica es la utilización de biocidas.
4. Se propone el uso de glutaraldehído como biocida contra *Pseudomonas aeruginosa* por su amplio espectro de acción que tiene contra bacterias, algas, hongos.

5. La distribución en las biopelículas de diferentes microorganismos pueden no ser iguales a las biopelículas puras de *Pseudomonas aeruginosa*, de hecho son más complicadas las biopelículas naturales por estar compuestas tanto de microorganismos aerobios como de anaerobios. Sin embargo, los resultados reportados para las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* dan un idea de lo que ocurre en la naturaleza.
6. Llevar a cabo la propuesta experimental presentada en esta tesis por la importancia en la información que aportaría para su aplicación en sistemas de distribución de agua.

RECOMENDACIONES

- ♦ Continuar con los experimentos para favorecer el desarrollo de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

GLOSARIO



Abiótico: la parte no biológica de un sistema.

Aeróbico: que utiliza oxígeno o está expuesto al oxígeno.

Aerobio: organismo que requiere oxígeno para vivir.

Algicida: agente que destruye algas.

Anaerobio: microorganismo capaz de crecer en ausencia de oxígeno.

Ánodo: electrodo positivo de una celda electrolítica, en cuya interfase ocurre una reacción de oxidación. Los electrones fluyen hacia fuera del ánodo en el circuito externo.

Ánodo galvánico: metal que a causa de su posición en la serie galvánica provee de protección por sacrificio a metales que son más nobles en la serie cuando se encuentran acoplados en un electrolito.

Ataque bajo depósitos: corrosión de una superficie metálica que ocurre debajo de un depósito donde se crean condiciones de aireación diferencial.

Autótrofo: organismo capaz de utilizar anhídrido carbónico como única o principal fuente de carbono.

Bacterias anaerobias: bacterias que viven en ausencia de oxígeno.

Bacterias del hierro: (ver ferrobacterias)

Bacterias sulfatorreductoras (BSR): Bacterias anaerobias capaces de inducir la corrosión rápida del hierro y acero en soluciones de pH cercano a la neutralidad y en ausencia de oxígeno disuelto.

Bactericida: agente que destruye bacterias.

Biocidas: compuestos seleccionados por su capacidad de destruir cualquier tipo de célula.

Biocorrosión: corrosión causada o acelerada por agentes biológicos.

Biodegradable: que puede ser degradado o destruido por organismos vivos.

Biodegradación: acción de degradar realizada por organismos.

Biofilms o biopelículas: matriz mucilaginoso de material polimérico de naturaleza polisacáridica, con un elevado contenido de agua (aprox. 95 % de la masa), células microbianas y detritos inorgánicos variados. Se pueden formar sobre materiales inertes.

Biofouling: acumulación de depósitos biológicos sobre una superficie.

Biorremediación: uso de agentes biológicos, principalmente microorganismos, para eliminar o reducir la concentración de compuestos tóxicos en sitios contaminados o en residuos industriales.

Biotransformación: proceso efectuado por un agente biológico mediante el cual la molécula es transformada en otra, estructuralmente relacionada, también conocido como bioconversión.

Cátodo: electrodo negativo de una celda electrolítica en cuya interfase ocurre la reacción de reducción. Los electrones fluyen hacia el cátodo en el circuito externo. Los procesos catódicos típicos son: cationes tomando electrones y descargándose, oxígeno reduciéndose y la reducción de un elemento metálico o grupo de elementos de un estado alto de valencia a uno bajo.

Celda de aireación diferencial: celda de concentración causada por diferencias en la concentración de oxígeno a lo largo de la superficie de un metal en el electrolito.

Celda de concentración: celda galvánica en la que los electrodos son del mismo material y la fuerza electromotriz se debe a las diferencias en la concentración de uno o más reactivos constituyentes de la solución electrolítica.

Celda electrolítica: celda en la que la energía eléctrica aplicada se usa para llevar a cabo reacciones en los electrodos y de este modo convertir dicha energía en energía química.

Celda electroquímica: un sistema electroquímico que consiste de un ánodo y un cátodo unidos por contacto metálico e inmersos en un electrolito. El ánodo y el cátodo pueden ser metales diferentes o áreas distintas sobre la misma superficie del metal. Estas celdas pueden ser electrolíticas o galvánicas.

Celda galvánica: celda en la cual la energía química es convertida en energía eléctrica. En general una celda galvánica está constituida por sistemas químicamente diferentes. Esto es, dos electrodos distintos sumergidos en dos soluciones distintas. Cuando la solución es la misma se llama celda voltaica.

Células facultativas: células bacterianas que pueden vivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Cepa: población de microorganismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

Colonia: modo de crecer de los microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida, como la de un medio de cultivo con agar.

Contaminante: Cualquier material no deseado en un medio.

Corrosión: reacción química o electroquímica entre un material, generalmente un metal, y su medio ambiente que produce un deterioro del metal y sus propiedades; es causada por una reacción de óxido-reducción.

Corrosión galvánica: corrosión asociada con una celda galvánica. Es la corrosión acelerada de un metal debido a un contacto eléctrico con un metal más noble o con un conductor no metálico en un electrolito corrosivo.

Corrosión generalizada: ver corrosión uniforme.

Corrosión microbiológica: la corrosión microbiológica ocurre como resultado directo o indirecto de la actividad metabólica de los microorganismos.

Corrosión en rendijas (crevice corrosion): corrosión localizada en forma de hendidura entre dos superficies, donde por lo menos una de ellas es un metal, y una de estas superficies está protegida de la exposición total al medio ambiente.

Corrosión uniforme (corrosión general): forma de deterioro distribuido más o menos uniformemente sobre una superficie. El metal se disuelve lentamente y llega a transformarse totalmente en otra especie. También se le conoce como corrosión general.

Corrosividad: tendencia de un medio ambiente a causar corrosión en un sistema dado.

Cracking ambiental: fractura de metales comúnmente dúctiles causada por el efecto corrosivo del ambiente. "Cracking" ambiental es un término general que incluye a los siguientes términos: corrosión por fatiga, ataque por hidrógeno a alta temperatura, ampollado por hidrógeno, fragilización por hidrógeno, *cracking* inducido por hidrógeno, *cracking* de metal líquido, *cracking* bajo tensiones, *cracking* de tensión por sulfuros.

Cuerpo receptor: es el ecosistema donde tienen o pueden tener destino final los residuos peligrosos ya tratados como resultado de operaciones de eliminación. Son cuerpos receptores las aguas dulces superficiales, la atmósfera, los suelos, las estructuras geológicas estables y confinadas.

Despolarización: reducción o eliminación, por métodos físicos o químicos de la polarización del electrodo para producir una corriente específica.

Desulfovibrio: género de bacterias anaerobias obligadas que reducen sulfato a ácido sulfhídrico. Son vibriónes ligeramente curvos, de longitud variable, se encuentran aislados o en cadenas que ofrecen aspecto de un espirilo. Bacterias muy móviles gracias a su flagelo polar. Quimiolitótrofo facultativo. Se le encuentra en el agua de mar, en el limo marino y en el suelo.

Electrodo: conductor electrónico en contacto con un conductor iónico.

Electrodo auxiliar: el electrodo que en una celda electroquímica es usado para transferir corriente hacia o desde un electrodo de trabajo. Se le conoce también como contraelectrodo. Generalmente está hecho de material no corrosivo.

Electrodo de calomel: electrodo de referencia que consiste de platino, mercurio y Hg_2Cl_2 en contacto con una solución de KCl. Usualmente el nombre lleva el prefijo que indica la concentración del KCl que contiene el electrodo. Cuando la solución está saturada con respecto al KCl, se llama electrodo de calomel saturado. Si la concentración del KCl es 1 N. Se llama Electrodo Normal de Calomel (ENC).

Electrodo de referencia: electrodo que tiene un potencial estable y reproducible, el cual puede ser usado en la medida de otros potenciales de electrodo.

Electrodo de trabajo: electrodo de prueba en una celda electroquímica. Es el electrodo donde tiene lugar la reacción de interés.

Electrodo de vidrio para la medida de pH: electrodo sensible a los iones hidrógeno, generalmente consiste de un bulbo, u otra forma conveniente, de vidrio especial, unido a un vástago de vidrio de alta resistencia completándose el sistema con un electrodo de referencia interno y una solución interna, con la que se llena el electrodo. Otras formas geométricas pueden ser apropiadas para aplicaciones especiales, por ejemplo, el electrodo capilar para la medida de pH en la sangre.

El electrodo de referencia interno puede ser el electrodo de plata / cloruro de plata, conectado eléctricamente al cable blindado de entrada al potenciómetro, y en contacto con la solución interna.

Electrolito o electrólito: sustancia o mezcla química, comúnmente líquida, que contiene iones que migran en un campo eléctrico.

ELISA: ver: inmunoanálisis enzimático.

Enzima: proteína que funciona como catalizador en organismos vivos, con especificidad respecto de la reacción catalizada o grupos de reacciones y de sus sustratos.

Erosión: pérdida progresiva de material original de una estructura sólida debido a la interacción mecánica entre dicha superficie y un fluido, un fluido multicomponente, o líquido impactante o partículas sólidas.

Estéril: libre de cualquier organismo viviente.

Esterilización: proceso por el que todos los organismos vivos, esporas viables, virus y viroides son destruidos o eliminados de un objeto o hábitat.

Facultativo: Adjetivo calificativo que indica que un organismo es capaz de crecer tanto en presencia o en ausencia de un factor ambiental (p. ej. "aerobio facultativo", "psicrófilo facultativo").

Ferrobacterias: microorganismos que metabolizan el hierro, tienen la posibilidad de extraer el hierro ferroso contenido en los medios acuosos en los medios acuosos y depositarlo en forma de hidróxido férrico hidratado, el cual aparece como una especie de secreción de consistencia mucilaginosas.

Fosfatasa alcalina: enzima que cataliza la liberación hidrolítica de fosfato de las moléculas.

Fouling: acumulación de depósitos sobre una superficie.

Hábitat: el ambiente natural de un organismo.

Herrumbre (rust): productos de corrosión del hierro o aleaciones ferrosas dando como resultado óxido férrico hidratado; término aplicado propiamente sólo a aleaciones ferrosas.

Heterótrofo: organismo que utiliza moléculas orgánicas, como principal fuente de carbono.

Impacto ambiental: es toda alteración en el ambiente que afecte positiva o negativamente la calidad de vida.

Incrustaciones (scale): depósito de constituyentes insolubles en agua sobre una superficie metálica. Formación de capas gruesas de productos de corrosión a altas temperaturas sobre la superficie de un metal.

Inmunoanálisis enzimático (ELISA): técnica empleada para detectar y cuantificar anticuerpos y antígenos específicos.

Limo (slime): material extracelular producido por algunos microorganismos, caracterizado por una consistencia mucilaginosa de variada composición química.

Material polimérico extracelular (MPE): material polisacárido altamente hidratado segregado por los microorganismos para adherir a otras células o a otros sustratos sólidos a través de la formación de biopelículas.

Medio de cultivo: mezcla de sustancias usada para proveer nutrientes para el crecimiento celular. Puede ser líquido (caldo), sólido (agar), semisólidos (para determinar movilidad de los microorganismos).

Metabolismo: La suma total de las reacciones químicas, tanto anabólicas como catabólicas, que se producen en una célula.

Metabolito: sustancia química producida en el metabolismo celular.

Microbiocida: cualquier sustancia química que mate microorganismos.

Microbiología: estudio de organismos que, son con frecuencia, demasiado pequeños para observarlos directamente con el ojo humano. Se precisan técnicas especiales para aislarlos y cultivarlos.

Microorganismo: organismo que es demasiado pequeño para ser visto por el ojo humano.

Número Más Probable (NMP): Estimación estadística de la población probable (número de microorganismos) que está presente en un medio, determinado tras diluciones y determinación de la multiplicación microbiana.

Oxidación: proceso en el que una especie química pierde carga negativa o gana carga positiva. Este proceso se puede llevar a cabo ya sea química o electroquímicamente; en el caso químico la pérdida o ganancia de carga se hace a través de un agente oxidante por ejemplo el oxígeno.

En el caso electroquímico la transferencia de carga se lleva a cabo a través de un conductor electrónico en el ánodo de una celda electroquímica.

Pasivación: reducción de la rapidez de reacción anódica de un electrodo involucrado en la corrosión.

Pendiente de Tafel: pendiente de la fracción recta de la curva de polarización, que generalmente se presenta más o menos a 50 mV del potencial de circuito abierto, cuando se presenta una gráfica logarítmica en términos de volts por ciclo logarítmico de la densidad de corriente, comúnmente referido como volts por década.

Picado: corrosión localizada de una superficie metálica confinada a una pequeña área, que toma la forma de cavidades.

Plancton: comunidad acuática de vida libre que está formada por cianobacterias, algas y protozoarios.

Planctónico: microorganismos que flotan o deambulan en agua.

Polarización: cuando un metal se encuentra sumergido en un electrolito en el que existen varias reacciones que se llevan a cabo al mismo tiempo, y que además no hay paso de corriente, el potencial de la interfase metal-electrolito se llama potencial de circuito abierto, mixto (U_{mix}) o de corrosión. Si se hace circular una corriente por dicho electrodo, el potencial variará y el nuevo valor del potencial ϵ dependerá de la corriente.

La diferencia entre ambos potenciales se denomina polarización (η'):

$$\eta' = \epsilon - U_{mix}$$

Nota: en muchas ocasiones la polarización es identificada erróneamente con sobretensión utilizándose así el mismo símbolo para ambas:

Polarización anódica: Cambio del potencial de electrodo en la dirección noble (positiva) debida al flujo de corriente. Ver polarización.

Polarización catódica: cambio del potencial de electrodo en la dirección activa (negativa) causada por el flujo de corriente. Ver polarización.

Potencial a circuito abierto: potencial de electrodo medido con respecto a un electrodo de referencia u otro electrodo cuando no fluye corriente desde o hacia él. (Vea potencial de corrosión). Nota: el potencial de circuito abierto podría ser un potencial de equilibrio o bien un potencial que cambie con el tiempo por ejemplo un potencial de corrosión.

Potencial de corrosión (E_{corr}): Potencial que toma una interfase metal-electrolito con relación a un electrodo de referencia medido bajo condiciones de circuito abierto. Este potencial generalmente se modifica con el tiempo ya que es el resultado de las reacciones de oxidación y reducción que se llevan a cabo a la misma rapidez, y que constituyen la reacción total de corrosión. También se le llama potencial residual, potencial de circuito abierto, potencial libre de corrosión.

Potencial de picado (E_p) o potencial de picadura: potencial al cual un metal presenta picadura:

$$E_p = A - B \log C_x$$

donde A y B son constantes y $\log C_x$ es el logaritmo de la concentración del anión agresivo.

Potencial de electrodo estándar: Es el potencial de equilibrio de una interfase metal-electrolito en el que todos los componentes involucrados en el proceso de electrodo se encuentran en condiciones estándar; este potencial siempre está referido al electrodo estándar de hidrógeno. El potencial estándar del hidrógeno es cero; entonces el potencial estándar de electrodo corresponde a la fuerza electromotriz de una celda formada por el electrodo estándar de hidrógeno (ESH, por sus siglas en inglés) y el sistema a considerar en condiciones estándar. Las condiciones estándar corresponden a la presión de una atmósfera para cada gas que esté involucrado en el proceso de electrodo, actividad de uno para sólidos puros, actividad de uno para especies disueltas y temperatura de 25° C.

Potenciostato: instrumento para mantener un electrodo en un electrolito a un potencial constante o potenciales controlados de manera automática con respecto a un electrodo de referencia apropiado.

Protección catódica: técnica usada para reducir la velocidad de corrosión de la superficie de un metal convirtiendo a éste en el cátodo de una celda electroquímica, mediante la aplicación de una fuerza electromotriz externa, tal como un ánodo metálico menos noble o por una corriente directa impresa.

Quimioautótrofos: Organismos que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos químicos inorgánicos.

Rapidez de corrosión: rapidez a la cual procede la corrosión, (la degradación del material) expresada ya sea como pérdida de peso o penetración por unidad de tiempo. Es la medida de la cantidad de sustancia transferida por unidad de tiempo en una superficie específica.

Reacción óxido-reducción (redox): par de reacciones acopladas, en las cuales un compuesto es oxidado mientras que otro es reducido y este utiliza los electrones liberados en la reacción de oxidación.

Recalcitrante: resistente a la biodegradación bajo cualquier condición.

Reducción: Ganancia de electrones por una especie química durante una reacción química o electroquímica.

Es el proceso en que una especie química gana carga negativa o pierde carga positiva. Este proceso se puede llevar a cabo ya sea química o electroquímicamente. En el caso químico la pérdida de carga positiva o ganancia de carga negativa se hace a través de un agente reductor, por ejemplo el hidrógeno. En el caso electroquímico la transferencia de carga se lleva a cabo a través de un conductor electrónico; así, la ganancia de carga negativa se lleva a cabo en el cátodo de una celda electroquímica.

Resistencia a la corrosión: capacidad de un metal de resistir la corrosión de un medio.

Resistencia de polarización: pendiente de la curva "lineal" polarización vs. densidad de corriente a potenciales cercanos a E_{corr} o la tangente a la curva si no es lineal; $R_p = (\Delta E / \Delta J) = \Omega$. Se usa también para describir el método de medida de las velocidades de corrosión usando esta pendiente.

Serie Electromotriz: lista de elementos arreglados de acuerdo a sus potenciales de electrodo estándar, el signo es positivo para los elementos cuyos potenciales son catódicos en relación al hidrógeno y negativo para los anódicos en relación al hidrógeno.

Sésil: adherido a una superficie.

Sustrato: material o sustancia que sufre cambios como consecuencia de un proceso.

Termófilo (termófilico): organismos que crecen mejor entre 40° C y 65° C; este grupo se distribuye en los manantiales de aguas termales y en las salidas de vapor de lavanderías.

Tubérculo: excrescencia de las superficies metálicas constituidas por productos de corrosión que frecuentemente contiene bacterias vivas.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC o CFU): Número de microorganismos que pueden formar colonias cuando se cultivan en medios de cultivo sólidos; indica el número de microorganismos viables en una muestra.

Velocidad de corrosión: ver rapidez de corrosión.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguilar J. J., Domínguez J. A., Sánchez Ma. de J.** 1996. *Estudio de la Corrosión en Acero Estructural A.I.S.I. 1010 Causada por Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Licenciatura. FESZ Cuautitlán. UNAM.
2. **Annisson G., Couperwhite I. Aust.** 1987. *Composition of Alginate Synthesized During the Growth Cycle of Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Sci. **40**, 435-441.
3. **Anwar H., Costerton J. W.** 1990. *Enhanced Activity of Combination of Trombomycin and Piperacilin for Eradication of Sessil Biofilm Cells of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **34**, 1666-1671.
4. **Anwar H., van Biesen T., Dasgupta M., Lam K., Costerton J. W.** 1989. *Interaction of Biofilm Bacteria with Antibiotics in a Novel in vitro Chemostat System*. Antimicrob. Agents Chemother. **33**, 1824-1826.
5. **Anwar H., Strap J. L., Costerton J. W.** 1992. *Establishment of Alginate Biofilms: Possible Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial Therapy*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**, 1347-1351.
6. **Bancroft K. E. A. P., Wiebe W. J.** 1976. *The Extraction and Measurement of Adenosine Triphosphate from Marine Sediments*. Limnology & Oceanography. **21**, 473-480.
7. **Bayer A. S., Eftekhar F., Tu J., Nast C. C., Speert D.P.** 1990. *Oxygen-Dependent Up-Regulation of Mucoïd Exopolysaccharide (Alginate) Production in Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity. **58**(5), 1344-1349.
8. **De Beer D., Stoodley P., Roe F., Lewandowski Z.** 1994. *Effects of Biofilm Structures on Oxygen Distribution and Mass Transport*. Biotechnology and Bioengineering. **43**(11), 1131-1138.
9. **De Beer D., Srinivasan R., Stewart P. S.** 1994. *Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms During Desinfection*. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 12, 4339-4344.
10. **Berry A. J., DeVault J. D., Chackrabarty. J.** 1989. *High Osmolarity is a Signal for Enhanced algD Transcription in Mucoïd and non Mucoïd Pseudomonas aeruginosa Strains*. Bacteriol. **172**, 2312-2317.
11. **Blackwood D. J., de Rome J. L., Oakley D. L., Prichard A. M.** 1994. *Novel Sensors for on-site Detection of MIC*. Corrosion / 94. Paper No. 254. NACE International. Houston, TX.
12. **Boristein S.** 1994. *Microbially Influenced Corrosion Handbook*. Industrial Press Inc. New York. pp.179-220.

13. Boscan de González C. y Videla H. A. 1998. *Prevención y Control*. CYDETEQ. 54-64.
14. Brankevich G. J. Fernández M., Videla H. A. 1990. *Biofouling and Corrosion in Coastal Power Plant Cooling Water Systems*. Marine Tech. J. 24(3), 18-28.
15. Brock T. D., Mandingan M. T., Martinko J. M., Parker J. 1994. *Microbiology*. 7th edition. Ed. Prentice Hall. U.S.A.
16. Brown M. R. W., Allison D.G., Gilbert P. J. 1988. *Resistance of Bacterial Biofilms to Antibiotics: a Growth-Rate Related Effect?*. Antimicrob. Chemother. 22, 777-780.
17. Bryant, R. D., Jansen W., Brown J., Laishley E. J. & Costerton J. W. 1991. *Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of the steel*. Applied & Environmental Microbiology 57, 2804-2809.
18. Bushnell, C. D., Haas H. F. 1941. *The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms*. Journal of Bacteriology 41, 654-673.
19. Canfield D. E., Des-Marais D. J. 1991. *Aerobic Sulfate Reduction Microbial Mats*. Science 251, 1471-1473.
20. Carpenter P. L. 1972. *Microbiology*. 3^d edition. W. B. Saunders Company. U. S. A.
21. Chalut J., Cairns J., Korkonan N. 1994. *Identification and Quantification of Cooling Water Biofilms Using Fluorescent Staining and ATP Monitoring Techniques*. Corrosion / 94. Paper No. 272. NACE International. Houston, TX.
22. Chantereau J. 1985. *Corrosión Bacteriana*. Ed. Limusa. México.
23. Characklis W. G., Marshall K. C. 1990. *Biofilms*. Wiley and Sons Ltd. NY. pp. 293.
24. Characklis W. G. 1981. *Fouling Biofilm Development: A Process Analysis*. Biotech. Bioeng. 23, 1923-1960.
25. Chapman J. S. 1998. *Characterizing Bacterial Resistance to Preservatives and Desinfectants*. International Biodeterioration Biodegradation 41(3-4), 241-245.
26. Chen X., Stewart P. S. 1996. *Chlorine Penetration into Artificial Biofilm is Limited by a Reaction-Diffusion Interaction*. Environ. Sci. Technol. 30, 2076-2083.
27. Coleman A. W. 1980. *Enhanced Detection of Bacteria in Natural Environments by Fluorochrome Staining of DNA*. Limnology & Oceanography 25, 948-951.
28. Coplin D. L., Cook D. 1990. *Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria*. Mol. Plant-Microbe Interact. 271-279.
29. Costerton J. W. 1984. *The Etiology and Persistence of Cryptic Bacterial Infections: a Hypothesis*. Rev. Inf. Dis. 6 (Suppl. 3), 608-616.

30. Costerton J. W. 1984. *The Formation of Biocide-Resistant Biofilm in Industrial, Natural and Medical Systems*. Dev. Ind. Microbiol. **25**, 363-372.
31. Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M., Marrie T. J. 1987. *Bacterial Biofilms in Nature and Disease*. Annual Review of Microbiology **41**, 435-464.
32. Costerton J. W., Geesey G. G., Johns P. A. 1998. *Bacterial Biofilms in Relation to Internal Corrosion Monitoring and Biocide Strategies*. Materials Performance. **27**, 49.
33. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995. *Microbial Biofilms*. Annual Review of Microbiology **49**, 711-745.
34. Cragolino C., Tuovinen O. Li. 1984. *The Role of Sulphate-reducing and Sulphur-Oxidising Bacteria in the Localised Corrosion of Iron-Base Alloys – a Review*. International Biodeterioration **20**, 9-26.
35. Dagostino L. Goodman A. E., Marshall K. C. 1991. *Physiological Responses Induced in Bacteria Adhering to Surfaces*. Biofouling **4**, 113-119.
36. Davies D. D. Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S. 1984. *Tratado de Microbiología*. 3ª edición. Salvat Editores. 1097 pp.
37. Davies D.G., Chakrabarty A. M., Geesey G. G. 1993. *Exopolysaccharide Production in Biofilms: Substratum Activation of Alginate Gene Expression by Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology **59**(4), 1181-1186.
38. Davies D. G. Geesey G.G. 1995. *Regulation of the Alginate Biosintesis Gene algC in Pseudomonas aeruginosa during Biofilm Development in Continuous Culture*. Applied and Environmental Microbiology **61**(3), 860-867.
39. Dexter S. C., 1995. *Bioextraction & Biodeterioration of Metals*. Cambridge, Cambridge University Press.
40. Dexter S. C., Shiang-Ho Lin. 1992. *Effects of Marine Biofilms on Cathodic Protection*. Int. Biodet. Biodegrad. **29** (3-4), 231-249.
41. DeVault J. D., Berry A., Misra T. K. Chacrabarty A. M. 1989. *Enviromental Sensory Signals and Microbial Patogenesis: Pseudomonas aeruginosa Infección in Cystic Fibrosis*. Bio / Technology **7**, 352-357.
42. DeVault J.D., Kimbara K., Chakrabarty A. M. 1990. *Pulmonary Dehydration and Infection in Cystic Fibrosis: Evidence that Ethanol Activates Alginate Gene Expression and Induction of Mucoidy in Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **4**, 737-745.
43. Dexter, S. C., Duquette, D. J. Siebert O. W. Videla H. A. 1991. *Use and Limitations of Electrochemical Techniques for Investigating Microbial Influenced Corrosion*. Corrosion **47**, 308-318.

44. **Diego L., Hernández L., Priego E. A.** 1995. *Evaluación de la Corrosión en Acero Estructural A.I.S.I. 1010 Inducida por Bacterias Aerobias y Anaerobias*. Tesis. Facultad de Química. UNAM. México.
45. **Díez N.** 1990. *Microbiología de los alimentos*. ICYT. 12(168), 23-29.
46. **Fernández M.** 1998. *Sistemas de Seguimiento y Evaluación de la Biocorrosión y el Biofouling*. CYDETEQ. 36-53.
47. **Fernández M., Brankevich G., Videla H. A.** 1989. *Corrosion of CuNi30Fe in Artificial Solutions and Natural Seawater. Influence of Biofouling*. Br. Corros. J. 24(3), 211.
48. **Fernández, M. Moreno D. A., Ibars J. R., Videla H. A.** 1991. *Effect of Inorganic and Biogenic Sulphide on Localized Corrosion of Heat-Treated Type 304 SS*. Corrosion, 47(1), 24.
49. **Fernández M., Salvarezza R. C., Videla H. A.** 1979. *The Use of Pitting to Study the Microbial Corrosion of 2024 Aluminum Alloy*. Int. Biodeterior Bull. 15(4), 125-132.
50. **Fernández M., Salvarezza R.C., Videla H. A.** 1979. *Microbial Contaminants Influencing the Electroquimical Behavior of Aluminium and its Alloys in Fuel-Water Systems*. Intern. Biodeterior Bull. 15(2), 39-44.
51. **Fung D. Y. C., Phebus R. K.** 1995. *Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Proceedings of the Second Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium, Gramado R. S. Brasil. Abril 2-5.
52. **Galvele J. R.** 1979. *Corrosión*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D. C.
53. **Gaylarde C. C.** 1990. *Advances in the Detection of Microbiologically Induced Corrosion*. International Biodeterioration 26, 11-22.
54. **Gaylarde C. C. y Leal A. R.** 1998. *Cómo Identificar la Biocorrosión*. CYDETEQ. 27-32.
55. **Gaylarde C. C., Videla H. A.** 1987. *Localized Corrosion Induced by a Marine Vibrio*. Intern. Biodet. 23, 91-104.
56. **Gessey G. G.** 1982. *Microbial Exopolymers: Ecological and Economical Considerations*. Am. Soc. Microbiol. News 48, 9-14.
57. **Geesey G.G., Mutch R., Costerton J.W., Green R. B.** 1978. *Sessile Bacteria: an Important Microbial Population in Small Mountain Streams*. Limnol. Oceanogr. 23, 1214-1222.
58. **Gilbert P., Collier P. J., Brown M. R. W.** 1990. *Influence of Growth Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents: Biofilms, Cell Cycle, Dormancy, and Stringency Response*. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 585-581.

59. **Gómez de Saravia S. G., Guiamet P. S. Videla H. A.** 1992. *Uso de Técnicas Microscópicas para el Estudio de Adherencia Microbiana sobre Diversas Superficies Metálicas.* En Anales del 4to. Congreso Iberoamericano de Corrosión y Protección. 2, 33. Mar de Plata, Argentina.
60. **Guezannec J.** 1991. *Influenced of Cathodic Protection on Mild Steel on the Growth of Sulphate-Reducing Bacteria at 35° C in Marine Sediments.* Biofouling 3(4), 339-348.
61. **Hedrick H.G.** 1970. *Microbial Corrosion of Aluminum.* Mater. Prot. 9(1), 27-31.
62. **Hernández G., Kucera V., Thierry D., Pedersen A., Hermansson M.** 1994. *Corrosion Inhibition of Steel by Bacteria.* Corrosion Science 50(8), 603-608.
63. **Hill E. C. (ed.)**. 1983. *Microbial Problems and Corrosion in Oil and Oil Product Storage.* Institute of Petroleum. London. 105 pp.
64. **Hill E. C., Shennan J. L., Watkinson R. J. (eds.)**. 1987. *Microbial Problems in the Offshore Oil Industry.* Institute of Petroleum / John Wiley & Sons. Chichester, U. K. pp. 257.
65. **Hodges N. A., Gordon C. A.** 1991. *Protection of Pseudomonas aeruginosa Against Ciprofloxacin and β -lactams by Homologus Alginate.* Antimicrob. Agents Chemother. 35, 2450-2452.
66. **Horacek G.** 1988. *Biocorrosión in the Oilfield. Experimental Methods Development, Scanning Electron Microscopy Technique.* En Corrosion / 88. NACE Conference. St. Louis Mo. March, 21-25. NACE. Houston, TX.
67. **Hoyle B. D., Williams L.J., Costerton J. W.** 1995. *Production of Mucoide Exopolysaccharide during Development of Pseudomonas aeruginosa Biofilms.* Applied and Environmental Microbiology 61(2), 777-780.
68. **Huang C. T., Xu K. D., McFeters, Stewart P. S.** 1998. *Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase Expresión whitin Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation.* Appl. Environ. Microbiol. 64, 1526-1531.
69. **Iverson W. P.** 1987. *Microbial Corrosion of Metals.* Adv. Appl. Microbiol. 32, 1-37.
70. **Jawetz E., Meinick J. L., Adelberg E. A.** 1985. *Manual de Microbiología Médica.* 11ª edición. El Manual Moderno, S.A. México. 1-15, 247.
71. **Kjelleberg S., Humprey B. A., Marshall K. C.** 1982. *The Effect of Interfaces on Small, Starved Marine Bacteria.* Appl. Enviromen. Microbiol. 43, 1116-1172.
72. **Kjelleberg S.** 1993. *Starvation in Bacteria.* New York: Plenum.
73. **Koklik W. K. Willerr H. P., Amos D. B., Wilfert C. M.** 1996. *Microbiología Zinsser.* 20ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.

74. Kolter R., O'Toole G., Kaplan H. 2000. *Biofilm Formation as Microbial Development*. Annu. Rev. Microbiol. 54, 49-49.
75. Lambert R. J., Johnston M. D., Simons E. A. 1998. *Disinfectant Testing: use of the Bioscreen Microbiological Growth Analyser for Laboratory Biocide Screening*. Lett Appl Microbiol 26(4), 288-92.
76. Lambert R. J., Johnston M. D., Simons E. A. J. 1999. *An Investigation into the Differences between the Bioscreen and the Traditional Plate Count Disinfectant Test Methods*. Appl. Microbiol. 86(4), 689-694.
77. Lamont J. L., C. A. Sequeira, A. K. Tiller 1988. *Microbial Corrosion 1*. Elsevier Applied Science. London, 224-234.
78. LeChevalier M. W., Cawthon C. D., Lew R. G. 1988. *Inactivation of Biofilm Bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2492-2499.
79. Lewandowski Z., Lee W., Characklis W. G. Little B. J. 1998. *Microbial Alteration of the Metal Water Interface: Dissolved Oxygen and pH Microelectrode Measurements*. Paper No. 93. Corrosion / 88. NACE International, Houston Tx.
80. Licina G. J. 1988. *An Overview of Microbiology Influenced Corrosion in Nuclear Power Plant Systems*. Mater. Perform. 28, 55-60.
81. Licina G. J., Nekoksa G. 1994. *Experience with on-line Monitoring of Biofilms in Power Plant. Environment. Corrosion / 94*, Paper No. 257. NACE International. Houston, Tx. 1994.
82. Linker A., Jones R.S. 1966. *A New Polysaccharide Resembling Alginate Isolated from Pseudomonas*. J. Biol. Chem. 241, 3845-3851.
83. Little B. J., Wagner P. A., Ray R. I. 1992. *An Experimental Evaluation of Titanium Resistance to Microbiologically Influenced Corrosion*. Paper No. 173. Corrosion / 92. NACE International. Houston Tx.
84. MacFaddin J. F. 1993. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 2ª reimpresión. Editorial Médica Panamericana, S. A. de C. V. México.
85. McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W. and Anderson, W.A. 1993. *The Use of Automated Turbidimetric Data for the Construction of Kinetic Models*. Journal of Industrial Microbiology 12(3-5), 277-285.
86. Mansfeld F., Little B. J. 1991. *A Technical Review of Electrochemical Techniques Applied to Microbiologically Influenced Corrosion*. Corrosion 32(3), 247-272.
87. Meitz A. 1991. *Environmental Concerns and Biocides*. Corrosion / 91, No. 306. NACE International. Houston, Tx.

88. **Mollica A.** 1992. *Biofilm and Corrosion on Active-Passive Alloys in Seawater*. Intern. Biodet. Biodegr. **29**, 213-229.
89. **Mollica A., Trevis A., Traverso E., Ventura G., Decarolis G., Dellepiane R.** 1989. *Cathodic Performance of Stainless Steels in Natural Seawater as a Function of Microorganism Settlement and Temperature*. Corrosion. **45**, 48-57.
90. **Morales J., Esparza P., González S., Salvarezza R., Arévalo M. P.** 1993. *The Role of Pseudomonas aeruginosa on the Localized Corrosion of 304 Stainless Steel*. Corrosion **34**(9), 111531-1540.
91. **Morales J. Morales J., Esparza P., González S., Salvarezza R., Arévalo M. P.** 1993. *Modificación del Estado Pasivo de un Acero Inoxidable por Depósitos Microbianos*. Anales de Química **89**(2), 190-195.
92. **Nickel J. C., Ruseska I., Wright J. B., Costerton J. W.** 1985. *Trobamycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material*. Antimicrob. Agents Chemother. **27**, 619-624.
93. **Pérez J. J.** 1998. *Estudio de la Corrosión por Métodos Electroquímicos de Acero Estructural 1010 Causada por una Mezcla de Microorganismos Anaerobios*. Tesis de Maestría. FEZ Cuautitlán. UNAM. México.
94. **Pedersen A., Kjelleberg S., Hermansson M. A** 1988. *Screening Method for Bacterial Corrosion of Metals*. Journal of Microbiological Methods **8**(4), 191-198.
95. **Pelczar M. J., Reid R. D., Chan E. C. S.** 1997. *Microbiología*. 4a edición (2a edición en español). McGraw Hill de México. México.
96. **Perkin A. J.** 1993. *On-line Monitoring of Microbiologically Influenced Corrosion in Power Plant Environments*. Corrosion / 93. Paper No. 185. National Association of Corrosion Engineers. Houston, Tx.
97. **Pintado J. L., Montero F.** 1986. *Corrosión Microbiológica en Centrales Hidroeléctricas*. Corrosión y Protección XVII (5), 361-366.
98. **Piggot N. H., Sutherland I. W., Jarman T. R.** 1982. *Alginate Synthesis by Mucoid Strains of Pseudomonas aeruginosa PAO*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **16**, 131-135.
99. **Posgate J. R.** 1984. *The Sulphate-reducing Bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge.
100. **Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A.** 1999. *Microbiología*. 4ª edición. Mc Graw Hill Interamericana. España.

101. Ramírez R. M., Luna B., Mejía A., Velázquez O., Tsusuki G., Vierna L., Müggenburg I. 1995. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
102. Revsbch P. S. 1989. *An Oxygen Microsensor with a Guard Cathode*. *Limnol. Oceanogr.* 34, 474-478.
103. Rice, R. G., Wilkes J. F. 1992. *Fundamental Aspects of Ozone Chemistry in Recirculating Cooling Water Systems*. Paper No. 205. Corrosion / 91. NACE International. Houston, Tx.
104. Roberge P. R., Sastri V. S. 1994. *On-Line Corrosion Monitoring with Electrochemical Impedance Spectroscopy*. *Corrosion* 50(10), 744-754.
105. Ruseska I., Robbins J., Costerton J. W. Lashen E. S. 1982. *Biocide Testing Against Corrosion-Causing Oilfield Bacteria Helps Control Plugging*. *Oil & Gas J.* 80, 253-264.
106. Sanderson S. S. Stewart P. S. *Evidence of Bacterial Adaptation to Monochloramine in Pseudomonas aeruginosa Biofilms' and Evaluation of Biocide Action Model*. 1997 *Biotechnology and Bioengineering* 56(2), 201-209.
107. Scotto V., Di Cinto R., Marcenaro G. 1985. *The Influence of Marine Microbial film on Stainless Steel Corrosion Behavior*. *Corrosion* 25, 184.
108. Sirvins A. y Tramier B. 1994. *La Biodegradación de los Hidrocarburos*. *Mundo Científico* 6(54), 46-54.
109. Stainer R., Duodoroff M., Adelberg E. 1985. *Microbiología*. 3ª edición. Ediciones Aguilar S. A. de C. V. España. 214-220, 633-636.
110. Steel A., Goddard D. T., Beech I. B. 1994. *An Atomic Force Microscopy Study of the Biodeterioration of Stainless Steel in the Presence of Bacterial Biofilms*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 34, 35-46.
111. Sutherland I. W. 1990. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge University Press, Cambridge.
112. Syrett B. 1991. *The Mechanism of Accelerated Corrosion of Copper-Nickel Alloys in Sulfide Polluted Seawater*. *Corrosion* 21, 187-209.
113. Tejada S. L. 1993. *Corrosión Microbiológica*. ICYT. 15(200). 24-26.
114. Tejada S. L., Salas J. M. 1995. *Glosario de Términos de Corrosión*. Facultad de Química. UNAM. México.
115. Tejada S. L., Vierna L. 1998-1999. *Corrosión Causada por Pseudomonas aeruginosa. Relación entre Población Microbiana y la Corrosión en Acero*. *Anuario Latinoamericano De Educación Química (ALDEQ)*. 155-159.

116. Tejada S. L., Vierna L. 1998-1999. *Rapidez de Corrosión en Corrosión Microbiológica*. ALDEQ. 221-223.
117. Terry J.M. Piña S. E., Mattingly S.J. 1990. *Environmental Conditions Which Influence Mucoïd Conversion in Pseudomonas aeruginosa PA01*. Infect. Immun. **59**, 471-477.
118. Turakhia M. H. Characklis W. G. 1984. *Fouling of Heat Exchange Surfaces*. J. Wat. Poll. Contr. Fed. **54**, 1288-1295.
119. Vaidya R. U., Butt D. P., Hersman L.E., Zurek A. K. 1997. *Effect of Microbiologically Influenced Corrosion on the Tensile Stress-Strain Response of Aluminum and Alumina Particle Reinforced Aluminum Composite*. Corrosion **53**(2), 136-141.
120. Vandevivere P., Kirchman D. L. 1993. *Attachment Stimulates Exopolysaccharide Synthesis by a Bacterium*. Applied and Environmental Microbiology **59**(10), 3280-3286.
121. Van Loosdrecht M. C. M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A. 1990. *Influences of Interfaces on Microbial Activity*. Microbiol. Rev. **54**, 75-87.
122. Videla H. A. 1998. *Corrosión Microbiológica y Biofouling en Sistemas Industriales*. Introducción. CYDETEQ. 4-26.
123. Videla H. A. 1997. *Biofilms and Corrosion Interactions on Stainless Steel in Seawater*. Int. Biodet. Biodegr.
124. Videla H. A., Characklis W. G. 1992. *Biofouling and Microbially Influenced Corrosion*. Intern. Biodet. & Biodegradation **29**, 195-212.
125. Videla H. A., Fernández M., Brankevich G. J. 1988. *Assesment of Corrosion and Microfouling of Several Metal in Polluted Seawater*. Corrosion **44** (7), 423-426.
126. Videla H. A., Gomez de Saravia S.G. Fernández M., Hernández G., Hartt W. 1993. *The Influence of Microbial Biofilms on Cathodic Protection at Different Temperatures*. Corrosion / 93. Paper No: 298. NACE International. Houston, Tx.
127. Videla H. A., Gomez de Saravia S.G. Fernández M. 1992. *MIC of Heat Exchanger Materials in Marine Media Contaminated with Sulphate-Reducing Bacteria*. CORROSION / 92. Paper No. 189. NACE International. Houston TX.
128. Videla H. A., Guiamet P. S., Dovalle S. Reionoso E. H. 1998. *Effects of Fungal and Bacterial Contaminants of Kerosene Fuels on the Corrosion of Storage and Distribution Systems*. Paper No. 91. Corrosion / 88. NACE International. Houston, Tx.
129. Videla H. A., Guiamet P. S., Pardini O. R., Freitas M. M.S. Echarte E., Trujillo D. 1991. *Monitoring Biofilms and Microbiologically Influenced Corrosion in an Oilfield Water System*. Paper No. 103. Corrosion / 91. NACE International. Houston, Tx.

130. **Videla H. A., Viera M. Guiamet, P. S., Fernández M., Bianchi F. Canales C. G.** 1993. *Laboratory Studies on the Effect of Ozone on the Passivity of Steel and Mixed Bacterial Biofilms*. Paper No. 486. Corrosion / 93. NACE International. Houston, Tx.
131. **Videla H. A., Viera M. R., Guiamet P. S., Staibano Alais J. C.** 1994. *Combined Action of Oxidizing Biocides for Controlling Biofilms and MIC*. Paper No. 260. Corrosion / 94. NACE International. Houston, Tx.
132. **Videla H. A., Viera M. R., Guiamet P. S., Staibano Alais J. C.** 1995. *Effect of Dissolved Ozone on the Passive Behavior of Heat-exchanger Structural Material. Biocidal Efficacy on Bacterial Biofilms*. Paper No. 199. Corrosion / 95. NACE International. Houston, Tx.
133. **Wrangstandh M., Conway P. L., Kjelleberg S.** 1989. *The role of an extracellular Polysaccharide Produced by Marine Pseudomonas sp. S9 in Cellular Detachment During Starvation*. Can. J. Microbiol. **35**, 309-313.
134. **Xu K. D., Stewart P. S., Xia F., Huang C., McFeters G. A.** 1998. *Spatial Physiological Heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa Biofilm is Determined by Oxygen Availability*. Applied Environmental Microbiology **64**(10), 4035-4039.
135. **Xu X., Stewart P. S., Chen X.** 1996. *Transport Limitation of Chlorine Disinfection of Pseudomonas aeruginosa Entrapped in Alginate Beads*. Biotechnology and Bioengineering. **49**(1), 93-100.
136. **Zielinski N.A., Maharaj R., Roychoudhury S., Danganan C.E., Hendrickson W., Chakrabarty A. M.** 1992. *Alginate Synthesis in Pseudomonas aeruginosa: Environmental Regulation the algC Promoter*. J. Bacteriol. **174**, 7680-7688.
137. <http://www.corrosion.com>.
138. <http://www.microbiologia.com.ar>
139. <http://www.microbiologia.com.ar/paeruginosa-me>
140. <http://www.labsystems.fi>
141. <http://www.spectronic.com>
142. <http://www.orionres.com>
143. <http://www.orionres.com/labcat/benchmtr/429.html>