



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CAMPUS IZTACALA

"EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE BIOCIDAS UTILIZADOS PARA EL CONTROL BACTERIOLOGICO EN SISTEMAS DE INYECCION DE AGUA PARA LA RECUPERACION SECUNDARIA DE HIDROCARBUROS"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ADRIANA CAROLINA PONCE DEL BOSQUE

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

2007



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.


*"En la vida hay dos tipos de hombres:
los que ven que las cosas pasan
y los que hacen que las cosas pasen"*

Lao Tse.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Jurado

M. en C. Adolfo Cruz Gómez
Biol. Ma del Carmen Ramírez Ramírez
M. en C. Gloria Garduño Solorzano
Biol. Ma de los Angeles García Gómez
Biol. Angel Moran Silva



Sustentante
Adriana Carolina Ponce del Bosque



Directora de Tesis
Biol. Ma del Carmen Ramírez Ramírez

El desarrollo del presente trabajo, se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Microbiológicos del Instituto Mexicano del Petróleo.

TESIS CON
FALLA DE ORICTM

A Dios

Por guiarme a lo largo de toda mi vida y por darme esta gran oportunidad.

Gracias...

A mis Padres

Por su gran apoyo y por todos los sacrificios que tuvieron que hacer para el termino de mi carrera profesional.

Y de quienes aprendí que los valores humanos no son nunca parciales ni temporales.

Con todo mi cariño...

A mi hermano Nacho

Quien ha sido para mi un ejemplo de entrega, coraje y dedicación.

No desistas...

A mi hermano Omar

Por su optimismo y buen humor.

Quien siempre le pone una pizca de buen humor a la vida.

Nunca cambies y sigue adelante (flaco)...

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mis abuelitos Luis y Carmen

Por todo su apoyo y por los consejos que me dan día con día.

Gracias...

A mis abuelitos Nacho y Pipina

A quienes me hubiera gustado tanto conocer.

A mi tía Ana Elena

Por ser para mi un ejemplo de lucha y perseverancia.

Y por guiarme a lo largo de mi vida.

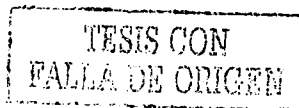
Espero lo sigas haciendo...

A ti Luis, por ponerle a mi vida esa chispa que le faltaba.

Gracias por enseñarme a ver las cosas buenas de la vida y sobre todo por enseñarme a vivirla al máximo.

Esta tarde vi llover...

A todos mis amigos y compañeros de la carrera, por brindarme su amistad y confianza.



AGRADECIMIENTOS

Al Biol. José Luis López Arenas

Por el apoyo y motivación recibida a lo largo de este trabajo.

A la Biol. Ma. Del Carmen Ramírez Ramírez

Por darme la oportunidad de crecer como persona y como profesionista, y por los conocimientos y consejos transmitidos.

Al Biol. Juan Manuel Romero Domínguez

Por la asesoría recibida durante la realización de esta tesis, principalmente en lo que corresponde al campo petrolero.

Al M. en C. Juan Antonio Zermeño Eguía Lis

Por el apoyo y por la asesoría recibidos de manera incondicional y por los conocimientos transmitidos, principalmente en las caracterizaciones microbiológicas.

A la Biol. Maritza Gómez Delgado

Por su apoyo en el área experimental.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Recuperación Secundaria de Hidrocarburos	2
Crecimiento bacteriano	2
Desarrollo de <i>biofilms</i>	3
Corrosión microbiológica	4
Tratamientos para el control bacteriológico	6
ANTECEDENTES	9
Proliferación de microorganismos	9
Uso de biocidas	9
Adaptaciones y mutaciones bacterianas	10
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Aislamiento y caracterización de microorganismos	13
Evaluación de biocidas	14
RESULTADOS	18
Aislamiento bacteriano	18
Caracterización morfológica	19
Caracterización bioquímica	21
DISCUSIÓN	27
Bacterias aisladas y su relación con los niveles de corrosión	27
Eficiencias de los biocidas evaluados y sus mecanismos de acción	28
Efecto de la concentración del agente biocida	29
Efecto de los tiempos de exposición	29
Importancia del tipo de microorganismo a eliminar	30
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
LITERATURA CITADA	33
ANEXOS	38

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En los últimos años, la corrosión microbiológica y la formación de *biofilms* o lodos biológicos han sido reconocidos como dos de los grandes problemas a los que se enfrentan diversos sistemas que conforman la Industria Petrolera, incluyendo los Sistemas de Inyección de agua, ya que por lo general, estos problemas derivan en cuantiosas pérdidas económicas, debido a paros no programados y al reemplazo de equipos. Por esta razón, la mayor preocupación actual ha sido mejorar los métodos para controlar el crecimiento masivo de microorganismos, por ello, a fin de darle seguimiento a este tipo de problemas, se realizó en el presente trabajo la evaluación de la eficiencia de tres biocidas industriales XC-407, XC-102 y XC-535, con sales cuaternarias de amonio, glutaraldehído y tetrakis(hidroxi)metil sulfuro fosfatado (THPS) como componente activo respectivamente. De esta manera, para cumplir con este propósito, se aislaron y caracterizaron morfológicamente y bioquímicamente las bacterias del agua del flujo de inyección y de los *biofilms*, presentes en el Sistema de Inyección de agua de mar en estudio, para formar dos consorcios bacterianos, a partir de los cuales, se evaluaron los biocidas a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ppm, considerando tres tiempos (2 h, 4h y 6 h) en que los biocidas estuvieron en contacto con las bacterias a eliminar.

Del sistema de Inyección de agua de mar en estudio se aislaron siete colonias bacterianas morfológicamente diferentes, logrando determinar cuatro géneros bacterianos *Pseudomonas sp*, *Moraxella sp*, *Corynebacterium sp* y *Alcaligenes sp*, relacionados con los niveles de corrosión y con la formación de *biofilms* en éste tipo de sistemas.

En las evaluaciones realizadas, se observó que el biocida XC-535 fue el más eficiente para inhibir el crecimiento de las bacterias aisladas del Sistema de Inyección, presentando una eficiencia del 99%, posteriormente le siguió el biocida XC-102 con una eficiencia del 98 % y por último con la eficiencia más baja se presentó el biocida XC-407 con un 74 %. Así mismo, se encontró que las eficiencias registradas no estuvieron relacionadas con las cuatro concentraciones manejadas, ni con los tres tiempos de contacto considerados, ya que no fueron factores determinantes en el incremento de estas. Por otro lado, se observó que las eficiencias de los biocidas disminuyeron significativamente al evaluarlos en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, factor que se puede atribuir a que posiblemente las bacterias pudieron haber desarrollado alguna adaptación o algún mecanismo de resistencia contra los biocidas empleados, debido a que el material polimérico extracelular que ellas mismas secretan para protegerse de agentes físicos o químicos, ocasiona que el contacto de los biocidas con las bacterias a eliminar sea casi nulo, provocando el desarrollo de estirpes resistentes que pueden transmitir esta resistencia o adaptación a las estirpes sensibles.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

La Industria Petrolera ha sido para muchos países una de sus principales fuentes económicas, debido al sin fin de productos derivados a partir del petróleo, el cual a través del tiempo ha transformado la economía de las naciones y la vida de las personas (Nivens *et al.*, 1978).

No obstante, su extracción es un proceso bastante complejo, que comienza con la perforación de yacimientos, a partir de los cuales el petróleo brota a grandes alturas debido a la fuerza natural que este ejerce hacia la superficie. Sin embargo, cuando se produce una considerable disminución de esta energía, la producción declina y se ingresa a la etapa secundaria, donde es necesario inyectarle al yacimiento un fluido a fin de proporcionarle energía adicional para aumentar la producción y la recuperación secundaria de hidrocarburos (Galván *et al.*, 1982). Comúnmente esta energía secundaria que se imparte a los yacimientos, se hace de forma mecánica, por medio de sistemas de inyección de gas inerte (nitrógeno y CO₂), gas natural o bien mediante la inyección de agua, desplazando el crudo progresivamente hacia la superficie de los pozos de producción (Smith, 1982).

Por su disponibilidad y bajo costo, la inyección de agua dulce o salada, es en la actualidad el método más usual en nuestro país (Galván *et al.*, 1982). Sin embargo, debido a las características bajo las que operan estos sistemas, como es el flujo constante de agua y la exposición continua a los rayos solares, el crecimiento de bacterias es muy común, debido a que es un grupo universalmente distribuido en la naturaleza, capaz de proliferar en cualquier tipo de ambiente (Khattab, 1995).

Las bacterias como células individuales no causan problemas, ya que a ellas corresponde el papel clave de restaurar el balance natural de los ciclos de vida, interviniendo en la fijación de algunos compuestos y en la descomposición de otros, transformándolos de ésta manera en compuestos más sencillos. No obstante, cuando se rompe este balance, debido a la construcción de sistemas de acopio, conservación y uso constante del agua, como el ocurrido en los sistemas de inyección, donde las condiciones naturales son alteradas y modificadas por el hombre, se proveen las condiciones óptimas para el desarrollo de consorcios o grupos bacterianos, los cuales se caracterizan por presentar características que por lo general los diferencian de otros, debido al tipo y metabolismo de las bacterias que los conforman, y a los daños que ocasionan en el sistema en el que se encuentran (Eycott, 1990).

En el caso de los sistemas de inyección, el flujo de agua lleva constantemente partículas orgánicas e inorgánicas suspendidas que son aprovechadas por las bacterias como fuente nutricional, promoviendo el desarrollo de poblaciones microbiológicas planctónicas y sésiles (Prasad *et al.*, 1989). Bajo estas circunstancias, el desarrollo de microorganismos sobre la superficie de los tubos, ocasiona la formación de una película conocida como "biofilm" o lodo biológico (Figura 1), considerada como una matriz gelatinosa de material polimérico extracelular (MPE) de naturaleza polisacáridica, con un elevado contenido de agua (aprox. 95 % de la masa), así como por una intrínseca asociación de bacterias, productos de secreción y por detritos orgánicos e inorgánicos variados (Ferrari *et al.*, 1995).

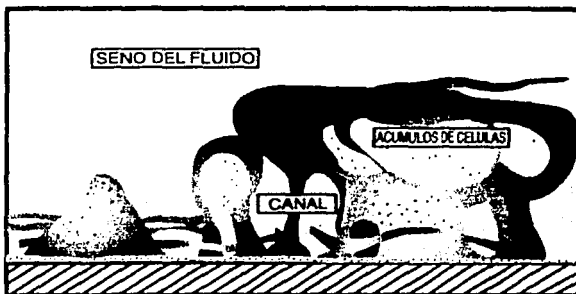


Figura 1 Esquema de la estructura de *biofilms* o lodos biológicos, donde se puede apreciar la formación de cúmulos celulares adheridos a la superficie, que presentan canales por los cuales el flujo de agua pasa llevando nutrientes que son aprovechados por las bacterias.

Numerosos estudios han demostrado que el desarrollo de *biofilms* (Figura 2) comienza con la formación de una capa orgánica, que se forma unos cuantos minutos después de que la superficie ha estado expuesta a aguas naturales, inclusive con bajas concentraciones de materia orgánica, seguido por la fijación de los microorganismos en la superficie del tubo. Una vez fijos a la superficie, comienzan a reproducirse causando el crecimiento de la película, que en ocasiones, cuando es muy gruesa, es parcialmente arrancada por la fuerza que lleva el agua, pero si la concentración de oxígeno y alimento en la superficie del tubo es suficiente, los microorganismos que quedan adheridos pueden regenerarse nuevamente (Characklis y Marshall, 1990).

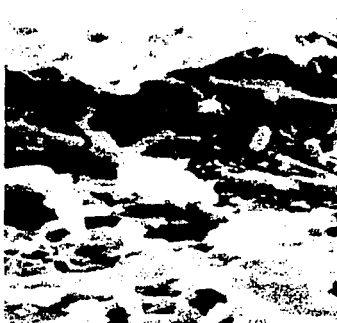


Figura 2 Microfotografía electrónica de barrido de un *biofilm* microbiano sobre una superficie de acero, luego de su exposición al agua de inyección de un sistema de recuperación secundaria de petróleo.

De esta manera, los *biofilms* modifican drásticamente las condiciones de la interfase metal/solución, formando una barrera al contacto entre el metal y el medio líquido circundante, dando lugar a la corrosión microbiológica, causada directa o indirectamente por las bacterias, ya que muchos polímeros y ácidos orgánicos secretados por éstas incrementan la corrosión al hacer contacto con la superficie. Además de que el estado en que se encuentra el material y las características del medio, determinan la proliferación de determinado tipo de bacterias y consorcios bacterianos (Ramírez, 1992). De este modo, los consorcios microbianos o comunidades mixtas que forman parte del *biofilms*, producen efectos sinérgicos incapaces de ser originados por especies en forma aislada, permitiendo así la coexistencia tanto de especies aerobias como anaerobias sobre las superficies de los ductos (Ferrari *et al.*, 1995).

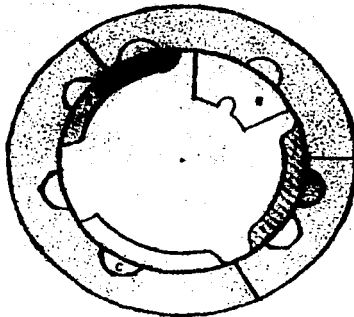


Figura 3 Esquema de un ducto de inyección, donde se puede observar el desarrollo de *biofilms* (A), la acumulación de material polimérico extracelular (B), y el desarrollo de bacterias anaerobias (C).

Comúnmente las bacterias que proliferan en este tipo de sistemas, causantes de la corrosión, pueden extraer el hierro ferroso contenido en los medios acuosos, como el caso de las ferrobacterias, depositándolo en forma de hidróxido férrico hidratado, hasta formar densas masas de herrumbre, bajo las que se crea un ambiente anaerobio en el que pueden crecer bacterias sulfatorreductoras, las cuales transforman los sulfatos del medio en ácido sulfhídrico, ejerciendo una acción altamente corrosiva, mientras que las sulfobacterias, metabolizan el azufre a partir de compuestos azufrados reducidos y los expulsan al medio almacenándolo en forma de ácido sulfúrico, causando la formación de lodos (Figura 4) y una acidificación corrosiva (Nivens *et al.*, 1978).

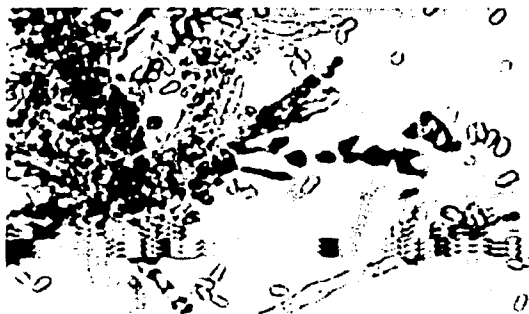


Figura 4 Aspecto del lodo biológico que se forma en los Sistemas de Inyección a causa del crecimiento bacteriano

En la actualidad, estos problemas de corrosión y taponamiento han sido reconocidos como uno de los mayores problemas operacionales en la producción del petróleo, siendo las bacterias las principales causantes de la obstrucción total o parcial de los ductos, el taponamiento de las válvulas y la perforación inesperada de materiales, provocando una producción insuficiente de hidrocarburos (Prasad *et al.*, 1989). En este sentido, se debe tener presente que el uso de productos químicos como biocidas y/o biostatos en estos sistemas pueden controlar el crecimiento bacteriano y subsecuentemente la biocorrosión y la formación de depósitos (Costerton, 1998).

Los agentes nocivos que producen efectos reversibles, sin acción mortal inmediata son conocidos como **biostatos**, ya que sólo inhiben temporalmente el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, manteniendo a la población en una fase latente; debido a lo cual su uso se restringe principalmente sólo a aquellas situaciones en las que se pueden mantener relativamente estables las condiciones, ya que de lo contrario no se lograría un control efectivo de los microorganismos, mientras que los agentes nocivos de acción irreversible, que interactúan con las células de los organismos al estar en contacto con ellas, alterándolos morfológica y enzimáticamente, hasta causarles la muerte son conocidos como **biocidas** (Grier y Christensen, 1979)

Bajo esta consideración, los biocidas se clasifican por su composición química en orgánicos, inorgánicos y mixtos y de acuerdo a su mecanismo de acción, se dividen en: **oxidantes y no oxidantes**.

Los no oxidantes funcionan básicamente dañando la permeabilidad de las paredes celulares de los microorganismos, alterando el ingreso de sustancias esenciales, la excreción de materiales de desecho (Tabla 1) y causando la pérdida de componentes celulares que interfieren con su proceso vital (Boivin, 1992).

Biocida	Mecanismo de Acción
Metales pesados	Atraviesan la pared celular, penetrando el citoplasma y destruyendo las proteínas.
Surfactantes	Reducen la permeabilidad de la célula.
Sales cuaternarias de amonio	Reaccionan químicamente con las cargas negativas asociadas a la pared celular.
Glutaraldehído	Reacciona con los constituyentes básicos de las proteínas de membranas, pared celular y citoplasma.
Sales de cobre	Rompen las membranas celulares y aumentan la permeabilidad.

Tabla 1 Mecanismo de acción de los Biocidas no oxidantes, empleados comúnmente a nivel Industrial (Tomado de Boivin, 1992).

Los biocidas oxidantes provocan una hidrólisis irreversible en la desnaturalización de algunos grupos de proteínas celulares (Tabla 2), provocando que se interrumpa el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos (Grier y Christensen, 1979).

Biocida	Mecanismo de Acción
Compuestos organo-sulfurados	Inhiben la reacción metabólica enzima-sustrato. Reaccionan en forma competitiva por la enzima en lugar del metabolito normal, atacando también otros sitios enzimáticos.
Cloro y sus derivados	Se difunde a través de la pared de los microorganismos, reacciona con el citoplasma y produce enlaces estables con el nitrógeno de las proteínas.
Propionamidas brominadas	Reacciona con ciertos grupos de proteínas, deteniendo la óxido-reducción

Tabla 2 Mecanismo de acción de los Biocidas oxidantes, empleados comúnmente a nivel Industrial (Tomado de Boivin, 1992).

Por lo general, la eficiencia de un biocida está en función del tiempo de exposición y del tipo de bacteria, ya que las bacterias encapsuladas son de las más difíciles de eliminar, debido a que forman una cápsula gelatinosa que las protege de ataques físicos y químicos (Sullivan y O'Brien, 1996). Así mismo, es importante mencionar que la concentración del biocida influye directamente en el crecimiento bacteriano, debido a lo cual, la concentración empleada debe ser la suficiente como para eliminar un buen porcentaje de la microflora bacteriana, tomando en cuenta que la concentración requerida dependerá a su vez de la cantidad de materia orgánica presente en el sistema a tratar, ya que ésta disminuye considerablemente la eficiencia del producto (Carpenter, 1977).

Finalmente, otro factor importante de tomar en cuenta es la sensibilidad de los microorganismos al producto, ya que ésta es una propiedad que varía considerablemente de una especie a otra, reflejándose en el hecho de que existen poblaciones microbianas que incluyen células con varios grados de resistencia, donde las células más susceptibles mueren en primer término, las de mayor resistencia mueren en intervalos sucesivos y por último mueren las más resistentes. De esta forma encontramos que las células activas jóvenes en crecimiento tienen notable susceptibilidad a los agentes químicos, en tanto que las células inactivas o maduras son más resistentes (Freedman, 1985).

**¡CUIDADO CON
FALLA DE ORIGEN**

Por esta razón, los mecanismos que median la resistencia bacteriana son muy diversos, siendo los más frecuentes aquellos en donde las bacterias producen enzimas que inactivan al agente nocivo, o bien sintetizan objetivos modificados contra los cuales el agente no tiene efecto, así como la capacidad de algunas bacterias para alterar su permeabilidad de modo que no se logra una concentración eficaz del producto. No obstante, la resistencia mediada por la transferencia de ADN es una de las características más importantes de la genética bacteriana, ya que permite que genes que codifican la resistencia, sean transferidos a estirpes sensibles por medio de **plásmidos** y **transposones** (Davies y Smith, 1978).

Los plásmidos son elementos extracromosómicos formados por ADN que se intercambia con relativa facilidad entre células de la misma especie, e incluso entre géneros diferentes, mientras que los transposones son secuencias de nucleótidos que tienen la capacidad de moverse con mucha facilidad de un elemento de ADN a otro, esto es, de un plásmido a otro, de un plásmido a un cromosoma y de un cromosoma a un plásmido, por tanto, los transposones permiten que los genes que codifican para la resistencia puedan incorporarse con relativa facilidad al material genético de estirpes sensibles, incluso si las estirpes resistentes se encuentran en menor cantidad, ya que la exposición de las bacterias sensibles a los agentes químicos, seleccionará la resistencia (Davies y Smith, *op. cit.*).

De esta manera, el tratamiento químico deberá controlar el crecimiento selectivo de microorganismos dentro de límites razonables, manteniendo su efecto inhibitorio frente a la acción de otras sustancias presentes en el medio, por lo que una vez seleccionado el biocida, los puntos de tratamiento y el método deberán ser diseñados para obtener el mayor beneficio posible (Ferrari *et al.*, 1995).

ANTECEDENTES

En otro tiempo, los daños causados por microorganismos responsables de diversos aspectos de la corrosión se hacían sentir menos que en la actualidad, y de igual manera se les prestaba menor atención. Sin embargo, las necesidades cada vez mayores de agua, tanto para el uso doméstico como industrial han provocado la proliferación de redes formadas por ductos y tuberías que utilizan diferentes tipos de agua provenientes con frecuencia, de puntos muy diversos. (Chantercau, 1985).

De acuerdo a lo anterior, numerosas especies de bacterias aerobias son capaces de proliferar y producir colonias activas en los sistemas de la industria petrolera, promoviendo la formación de *biofilms* que se estancan en secciones de filtros, bombas, superficies y pozos de inyección principalmente, provocando la alta corrosión de metales, debido a que las bacterias actúan como depolarizadores catódicos (Smith, 1982).

Algunos grupos bacterianos sólo se proliferan en el agua de mar, como es el caso de *Gallionella* y diversas especies de *Thiothrix*, mientras que otros son comúnmente activos en agua dulce pero ocasionalmente se les puede encontrar en agua de mar, como *Pseudomonas* y *Bacillacea* (Nivens *et al.*, 1978).

Bajo esta consideración, la implementación de medidas de prevención y control de corrosión microbiológica exige un conocimiento adecuado de los efectos derivados de los microorganismos en el proceso, ya que las consecuencias en el deterioro son reconocidos actualmente como uno de los mayores problemas, así como una de las grandes fallas estructurales que afectan a una gran variedad de sistemas (Ferrari *et al.*, 1995).

Por tal motivo, los métodos tradicionales para probar los biocidas y monitorear el número de microorganismos en el área industrial han tenido como objetivo principal el controlar poblaciones planctónicas, ya que al parecer el número de estas puede estar relacionado con los niveles de *biofilms* (Eycott, 1990).

Por esta razón, diversos tipos de agentes químicos han sido empleados para el control de microorganismos en diversas plantas industriales, siendo el cloro el más común, debido a que es uno de los métodos de tratamiento más económico. Sin embargo, éste puede ser altamente tóxico en elevadas concentraciones, además de que reacciona fácilmente con el agua formando ácido hipocloroso (Simpson, 1996).

En Estados Unidos y Canadá el cloro ha sido considerado como un biocida restringido, debido a lo cual se emplean comúnmente otro tipo de biocidas, como el hipoclorito de sodio, el glutaraldehído, el dióxido de cloro, formas brominadas y sales cuaternarias de amonio, no solo en estos países, sino también en Alemania, Suecia, Holanda, Suiza, Dinamarca, Francia y México, entre otros (Henley, 1994).

Ehrlich (1960) descubrió que las bacterias pueden volverse resistentes durante el tratamiento con cualquier compuesto, debido a la alta tasa de mutaciones espontáneas y específicas, transferidas por plásmidos y transposones principalmente. Entre los grupos de plásmidos ampliamente distribuidos y mejor estudiados, se encuentran los factores para la resistencia, conocidos como factores R, que confieren la resistencia a los inhibidores del crecimiento, los cuales fueron descubiertos por primera vez en Japón en cepas de bacterias entéricas que habían obtenido resistencia a un número de antibióticos (resistencia múltiple) y desde entonces se han descrito en otras partes del mundo (Dulbecco *et al.*, 1990). Debido a que los factores R son capaces de sufrir recombinación genética, es decir, los genes provenientes de dos factores R distintos pueden ser integrados en uno solo, se puede explicar el mecanismo por el cual pudieron haberse originado inicialmente los organismos con resistencia a los agentes químicos (Levinson y Jawetz, 1998).

Dado que no se dispone de método alguno para disminuir efectivamente las tasas de mutaciones espontáneas, no se puede prevenir la formación de mutantes resistentes, pero puede prevenirse su selección, ya que cuando la resistencia se desarrolla a través de la acumulación de pequeños incrementos debidos a mutaciones sucesivas, puede evitarse la aparición de una cepa que "escape" al tratamiento, manteniendo concentraciones lo bastante elevadas del producto y de forma constante para inhibir la aparición de un primer mutante resistente (Dulbecco *et al.*, 1990). Por consiguiente, la eficiencia de un biocida depende de la naturaleza de los microorganismos a eliminar y a la selección de las condiciones de operación del sistema a tratar (Faraquhar *et al.*, 1989).

JUSTIFICACION

En virtud de que la Industria Petrolera constituye uno de los pilares más importantes de la economía nacional, es evidente que se debe prestar especial atención a encontrar soluciones a los problemas de contaminación de origen biológico que se presentan en los sistemas de inyección de agua, siendo la corrosión y la formación de depósitos las causas principales de alteraciones en estas instalaciones, ocasionados en gran parte por bacterias que crecen y proliferan en *biofilms* adheridos en superficies de contacto, tuberías y accesorios.

Por esta razón, se han creado programas de control, como el que se está llevando a cabo en el Instituto Mexicano del Petróleo, que tiene como objetivo principal la eliminación de dichos microorganismos, por lo que el alcance del presente trabajo es llevar a cabo la evaluación de los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, que contienen sales cuaternarias de amonio, glutaraldehído y tetrakis(hidroxi)metil sulfuro fosfatado (THPS) como componente activo respectivamente, con el fin de mantener la contaminación ocasionada por bacterias por debajo de los límites máximos permitidos en estos sistemas, así como para evitar que desarrollen adaptaciones a los componentes químicos. En este sentido, los resultados obtenidos aportarán información útil para adoptar estrategias efectivas de prevención y control del crecimiento bacteriano, disminuyendo en lo posible paros no programados y el reemplazo de equipos.

Objetivo general

Determinar la eficiencia de los biocidas industriales XC-407, XC-102 y XC-535 utilizados para controlar la población bacteriana en los procesos de Recuperación Secundaria, que utilizan la inyección de agua de mar.

Objetivos específicos

Caracterizar las unidades formadoras de colonias aisladas del flujo del agua de inyección y de los *biofilms* presentes en los Sistemas de Inyección.

Evaluar la eficiencia de tres biocidas industriales al aplicarlos en un consorcio de bacterias aisladas del flujo del agua de inyección y en otro formado por bacterias de *biofilms*.

Comparar las eficiencias de los biocidas evaluados en los dos consorcios bacterianos y establecer cual es el más eficaz para el control bacteriológico.

MATERIAL Y METODOS

La realización del presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas, en la primera se aislaron y caracterizaron unidades formadoras de colonias (U.F.C.) presentes en un Sistema de Recuperación Secundaria, ubicado en el Golfo de México y en la segunda se evaluaron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, compuestos por sales cuaternarias de amonio, glutaraldehído y tetrakis(hidroxi)metil sulfuro fosfatado (THPS) como componente activo respectivamente.

Aislamiento y caracterización de microorganismos

Para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos del agua del flujo de inyección, se filtraron 5 litros del agua, empleando una membrana de 0.45 μm , la cual se resuspendió en 8 ml de agua de mar (Anexo I). Por otro lado, para aislar las U.F.C. de *biofilms*, se resuspendieron en agua de mar los elementos de las bioprobetas instaladas a la entrada y a la salida de los ductos de inyección, dichas probetas estuvieron expuestas a 300 ppm de glutaraldehído, por un periodo de 48 horas.

De cada suspensión, se realizaron diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-7} , inoculándolas en cajas petri con medio de cultivo NACE (NACE 1990, Anexo I). Las cajas se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas en posición invertida.

Transcurrido el tiempo de incubación y una vez que se detectó crecimiento bacteriano, se seleccionaron todas las colonias morfológicamente diferentes y bajo condiciones de esterilidad, se realizaron estríados de cada una en medio de cultivo NACE, hasta que se obtuvieron colonias únicas que presentaron una sola coloración y una sola morfología.

Cada colonia aislada se caracterizó morfológicamente tomando en cuenta su forma, tipo de borde, elevación, tamaño, coloración y transparencia, realizándose las siguientes pruebas:

- Tinción de gram, para la clasificación de las U.F.C. como gram positivas o gram negativas (Anexo II, Norma SCE 01/Ms.785, 1982).
- Tinción Schaffer y Fulton, para establecer la presencia de esporas (Anexo II, Murray *et al.*, 1999).

- Tinción con tinta china, para establecer la presencia de cápsulas (Anexo II, Murray *et al.*, 1999).
- Pruebas de motilidad en medio semisólido, para determinar la presencia de flagelos (Anexo II, Mac Faddin, 1993).
- Inoculación en tubos de gelatina nutritiva, para determinar la presencia de enzimas proteolíticas (Anexo II, Mac Faddin, 1993).
- Pruebas de oxidasa y catalasa (Anexo II, Mac Faddin, 1993).

Posteriormente, se caracterizaron bioquímicamente las bacterias aisladas del Sistema de Inyección de agua de mar en estudio, empleando galerías estandarizadas para bacterias gram positivas y gram negativas (ver Anexo III). La galería correspondiente para cada cepa, se seleccionó de acuerdo a los datos obtenidos en las tinción de gram y en las pruebas de oxidasa y catalasa realizadas (Mac Faddin, 1993).

Una vez seleccionada la galería, se tomó una asada de la colonia a identificar y se preparó un inóculo bacteriano con una concentración de 0.5 en escala de Mac Farland, el cual se midió en un densitómetro. A continuación, con el inóculo bacteriano preparado se llenó cada una de las cúpulas con las pruebas bioquímicas correspondientes a cada galería. Las galerías se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, sobre una superficie húmeda, para evitar que éstas se secaran.

Transcurrido el tiempo de incubación, las galerías se interpretaron en el sistema de identificación modelo miniAPI, el cual de acuerdo a los resultados obtenidos en las bioquímicas correspondientes a cada galería, determinó automáticamente el género correspondiente de cada una de las U.F.C. aisladas.

Evaluación de la eficiencia de biocidas.

De cada colonia aislada del agua del flujo de inyección, se tomó bajo condiciones de esterilidad una asada de cada una y se inoculó en 250 ml de caldo NACE, realizando el mismo procedimiento para las colonias aisladas de *biofilms*, formando dos consorcios bacterianos diferentes, semejantes a los que se presentan en los Sistemas de Inyección, cada consorcio se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 se evaluaron con los dos consorcios bacterianos formados, considerando concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ppm, y a tres tiempos de exposición (2h, 4 h y 6 h). Se realizaron cuatro repeticiones para cada producto.

En cada evaluación, se prepararon 6 matraces con 300 ml de agua de mar sintética, a 3 de ellos se les inocularon 20 ml del consorcio formado por bacterias aisladas del agua del flujo de inyección y a los 3 restantes se les inocularon 20 ml del consorcio formado por bacterias de *biofilms*. Así mismo, se preparó un control para cada consorcio, con 20 ml del inóculo bacteriano y 300 ml de agua de mar.

Una vez preparados los matraces, se adicionaron alícuotas de 30 μ l, 60 μ l, 90 μ l y 120 μ l de cada producto, para llevarlos a una concentración de 100, 200, 300 y 400 ppm respectivamente, partiendo de una concentración de 1000 ppm de cada uno.

Después de dosificar los biocidas, se tomó 1 ml del control y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} en agua de mar, para conocer el tamaño de la población bacteriana con la que se inició la prueba. Posteriormente, los matraces se pusieron en agitación con el fin de homogeneizar la muestra y recrear un ambiente dinámico semejante al que se presenta en los Sistemas de Inyección.

A las primeras dos horas en que estuvieron en contacto los productos con las bacterias, se tomó 1 ml de cada matraz y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} , las cuales se inocularon en cajas con medio de cultivo NACE, y se incubaron a $30 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, en posición invertida. Este mismo procedimiento se realizó a las 4 y 6 horas de exposición.

Transcurrido el tiempo de incubación y para determinar el número de bacterias que sobrevivieron, se seleccionaron aquellas cajas que presentaron de 25 a 250 colonias y se contaron de acuerdo a la NOM-092 (1994), para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), tanto del control como de las concentraciones de cada producto y de los tiempos de contacto considerados para cada uno de los consorcios bacterianos.

Las eficiencias de los biocidas evaluados, se determinaron para cada consorcio bacteriano de acuerdo a lo establecido en el ASTM E645-1991, donde la eficiencia estuvo en base al porcentaje de mortandad:

$$\% \text{ mortandad} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

Donde:

A= Población Inicial.

B= Población Final.

Una vez obtenidas las eficiencias en porcentaje de mortandad, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) factorial, para determinar si las eficiencias que presentaron cada uno de los biocidas se debieron o no al efecto que tuvieron las concentraciones evaluadas y los tres tiempos de contacto considerados (Daniel, 1985).

Mientras que para comparar las eficiencias que presentaron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, en el consorcio formado por bacterias aisladas del flujo de agua, y en el consorcio formado por bacterias aisladas de *biofilms*, se aplicó una ANOVA en bloques, con el fin de determinar si existió una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos de un consorcio y otro (Milton, 1994).

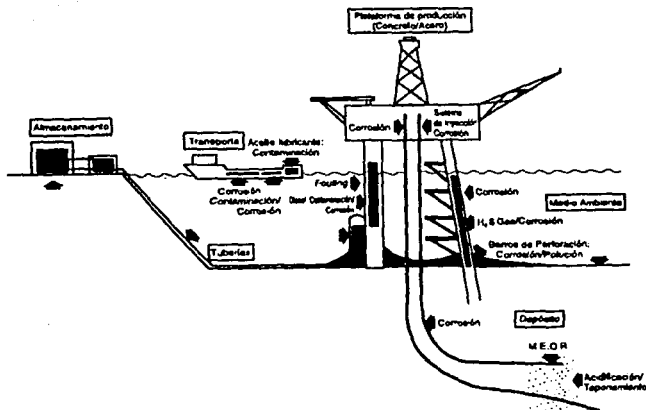


Figura 5 Representación esquemática de un Sistema de Recuperación Secundaria, donde se muestran los diversos elementos que lo conforman, además se pueden apreciar los diferentes puntos que están propensos a sufrir taponamientos y corrosión originados por el crecimiento microbiológico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de microorganismos

De las muestras provenientes del Sistema de Inyección de agua de mar en estudio, se aislaron siete colonias bacterianas diferentes (Tabla 3); cuatro se aislaron del agua del flujo de inyección y tres de *biofilms*. De acuerdo a las caracterizaciones morfológicas y a las pruebas bioquímicas realizadas (Tablas 4 y 5) tres pertenecen al género *Pseudomonas sp*, dos al género *Moraxella sp* y las dos restantes a los géneros *Corynebacterium sp* y *Alcaligenes sp* (Figura 6).

Clave	Sitio de Aislamiento	Grupo Bacteriano Identificado
A-1	Agua de inyección	<i>Pseudomonas sp</i>
A-2	Agua de inyección	<i>Pseudomonas sp</i>
A-3	Agua de inyección	<i>Moraxella sp</i>
A-4	Agua de inyección	<i>Alcaligenes sp</i>
B-1	<i>Biofilms</i>	<i>Corynebacterium sp</i>
B-2	<i>Biofilms</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
B-3	<i>Biofilms</i>	<i>Moraxella sp</i>

Tabla 3 Grupos bacterianos aislados del Sistema de Inyección de agua de mar.

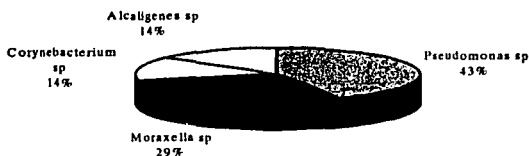


Figura 6 Géneros bacterianos aislados del Sistema de Inyección de agua de mar en estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caracterización morfológica y clasificación taxonómica (Holt *et al.*, 1986)

Cepa A-1

División: Gracilicutes
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas sp*

Caracterización:

Colonias amarillo intenso, irregulares, convexas, de borde ondulado, de apariencia cremosa, de 2 a 3 mm de diámetro. Bacilos rectos o ligeramente curvos, gram negativos, de 0.7-1.2 x 1.0-3.0 μm , que no forman esporas, ni cápsula, motilidad positiva, licuefacción de la gelatina positiva.

Cepa A-2

División: Gracilicutes
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas sp*

Caracterización:

Colonias de color blanco, circulares, de elevación plana, borde entero, textura cremosa, de 1 a 2 mm de diámetro. Bacilos rectos o ligeramente curvos, gram negativos, de 0.5-1.0 x 1.5-5.0 μm , que no forman esporas, ni cápsula, motilidad positiva, licuefacción de la gelatina positiva.

Cepa A-3

División: Gracilicutes
Orden: Spirillales
Familia: Neisseriaceae
Género: *Moraxella sp*

Caracterización:

Colonias de color blanco, puntiformes, planas, de borde entero, de textura cremosa, translúcidas a la luz, de 0.2 mm a 0.7 mm de diámetro. Bacilos muy cortos y gruesos, amorfos, generalmente aislados o en cadenas cortas, gram negativos, de 1.0-1.5 x 1.5-2.5 μm , que no forman esporas ni cápsula, motilidad negativa, licuefacción de la gelatina negativa.

Cepa A-4

División: Gracilicutes
Orden: Achromobacterias
Familia: Achromobacteriaceae
Género: *Alcaligenes sp*

Caracterización:

Colonias de color anaranjado, irregulares, de elevación convexa, borde entero, textura cremosa, translúcida en los bordes, de 2 a 4.5 mm de diámetro. Bacilos cortos, generalmente en pares, gram negativos, que no forman esporas ni cápsula, de un tamaño de 0.5-1.0 x 0.5-2.6 μm , motilidad positiva, licuefacción de la gelatina negativa.

Cepa B-1

División: Firmicutes

Orden: Mycobacteria

Familia: Micobacteriaceae

Género: *Corynebacterium sp*

Caracterización:

Colonias de color crema-amarillento, irregulares, planas, con el borde lobulado, textura seca, de tamaño de 2-3 mm de diámetro. Bacilos cortos, gram positivos, de 0.3-0.8 x 1.5-3.0 μm , con gránulos metacromáticos, motilidad negativa, licuefacción de la gelatina negativa.

Cepa B-2

División Gracilicutes

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas sp*

Caracterización:

Colonias de color crema, irregulares, elevadas, con el borde ondulado y translúcido, textura cremosa, de 3-5 mm de diámetro. Bacilos gram negativos, que no forman esporas ni cápsula, de un tamaño de 0.4-1.0 x 1.3-4.6 μm , motilidad positiva, licuefacción de la gelatina positiva.

Cepa B-3

División: Gracilicutes

Orden: Spirillales

Familia: Neisseriaceae

Género: *Moraxella sp*

Caracterización:

Colonias pequeñas, de color blanco, irregulares, planas, de borde entero, textura cremosa, translúcidas a la luz, de 0.3 mm a 0.6 mm de diámetro. Bacilos cortos y gruesos, generalmente aislados o en cadenas cortas, gram negativos, de 1.3-1.5 x 1.5-2.1 μm , que no forman esporas ni cápsula, motilidad negativa, licuefacción de la gelatina negativa.

CLAVE	CAT	OXID	IND	O/F GLU	LDC	LIP	MNT	CIT	GLU	β GLU	α GAL	PRO	ALA	ASPA	TAXÓN
A-1	+	+	-	O	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
A-2	-	+	-	O	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Pseudomonas sp</i>
A-3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>Moraxella sp</i>
A-4	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Alcaligenes sp</i>
B-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Pseudomonas sp</i>
B-3	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Moraxella sp</i>

Tabla 4 Pruebas bioquímicas realizadas para identificar las bacterias gram negativas, aisladas del Sistema de Inyección de agua en estudio.

CLAVE	GEL	CAT	OXID	NIT	PYZ	PAL	α GLU	GLU	RIB	MAN	MAL	URE	LAC	SAC	GLYG	TAXÓN
B-1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>Corynebacterium sp</i>

Tabla 5 Pruebas bioquímicas realizadas para identificar las bacterias gram positivas, aisladas del Sistema de Inyección de agua en estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Evaluación de la eficiencia de biocidas.

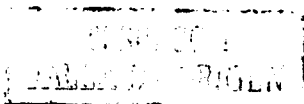
Los valores promedio de las eficiencias que presentaron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 al evaluarlos en el consorcio formado por bacterias aisladas del agua del flujo de inyección, en cada una de las cuatro repeticiones realizadas, se muestran en la Tabla 6, y los valores promedio obtenidos al evaluarlos en el consorcio formado por bacterias aisladas de *biofilms* se muestran en la Tabla 7.

Biocida	Concentración (ppm)	Población Inicial (control)	Eficiencia (%)		
			2h	4h	6h
XC-407	100	1,600,000 UFC/ml	77.28	83.57	90.13
	200		75.85	83.90	90.55
	300		76.16	83.68	91.61
	400		76.03	83.80	91.99
XC-102	100	1,200,000 UFC/ml	99.82	99.97	99.99
	200		99.86	100	100
	300		99.83	100	100
	400		100	100	100
XC-535	100	1,658,000 UFC/ml	100	100	100
	200		100	100	100
	300		100	100	100
	400		100	100	100

Tabla 6 Valores promedio de las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 al evaluarlos en el consorcio formado por bacterias aisladas del agua del flujo de inyección.

Biocida	Concentración (ppm)	Población Inicial (control)	Eficiencia (%)		
			2h	4h	6h
XC-407	100	1,500,000 UFC/ml	64.38	64.20	65.11
	200		64.28	63.91	64.08
	300		63.91	64.58	64.76
	400		64.60	64.15	65.10
XC-102	100	1,100,000 UFC/ml	96.93	96.85	96.76
	200		96.89	97.21	96.84
	300		97.17	97.10	97.93
	400		96.70	97.17	97.14
XC-535	100	880,000 UFC/ml	98.69	98.23	98.64
	200		97.91	96.78	100
	300		98.31	98.00	98.11
	400		97.11	97.84	100

Tabla 7 Valores promedio de las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102, XC-535 al evaluarlos en el consorcio formado por bacterias aisladas de *biofilms*.



Los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, evaluados en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección, mostraron una diferencia significativa en las eficiencias registradas (Tabla 8, Anexo IV), como se puede apreciar en la Figura 7.

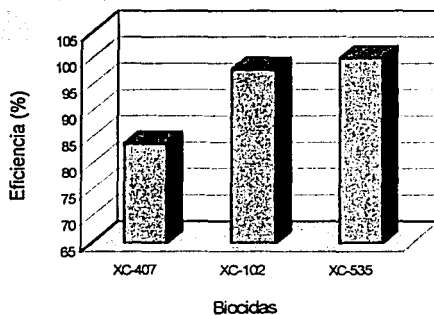


Figura 7 Eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección.

En la Figura 8 se puede observar que en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección, los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, evaluados a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ppm, no presentaron diferencias significativas en las eficiencias registradas entre una concentración y otra (Tabla 8, Anexo IV).

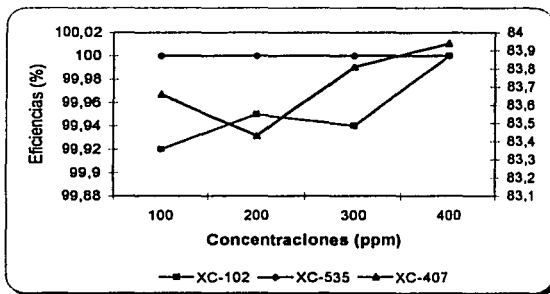


Figura 8 Eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ppm, en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto a las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección, se encontró que solamente en el biocida XC-407 las eficiencias difirieron significativamente a las 2, 4 y 6 h de contacto (Tabla 9, Anexo IV), como se aprecia en la Figura 9.

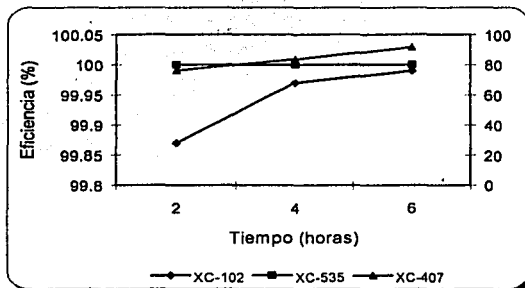


Figura 9 Eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 a las 2, 4 y 6 h de estar en contacto con las bacterias aisladas del agua del flujo de inyección.

Para el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, se encontró que las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, difirieron entre un biocida y otro (Tabla 10, Anexo IV), como se observa en la Figura 10.

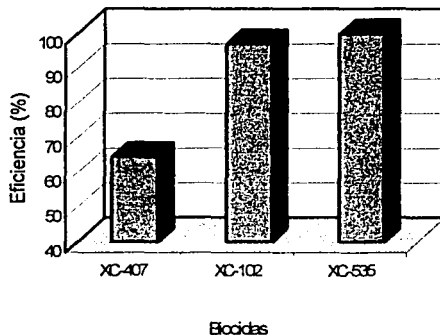


Figura 10 Eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, evaluados en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 ppm, no presentaron diferencias significativas en las eficiencias registradas (Tabla 10, Anexo IV), como se muestra en la Figura 11.

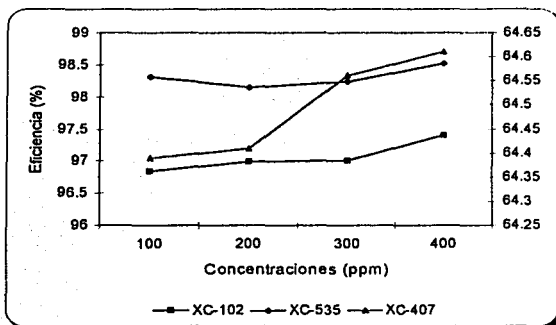


Figura 11 Eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, a concentraciones de 100 200, 300 y 400 ppm.

En relación a las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, a las 2 hrs, 4 hrs y 6 hrs, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 11, Anexo IV, como se observa en la Figura 12.

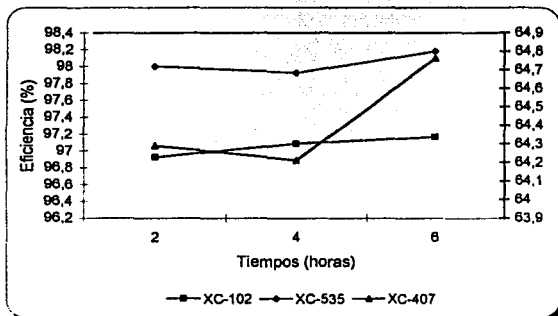


Figura 12 Eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 a las 2, 4 y 6 h en que estuvieron en contacto con las bacterias aisladas de *biofilms*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la Figura 13, se puede apreciar las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 evaluados en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección, y en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms* (Tabla 12, Anexo IV), encontrando una diferencia significativa entre un consorcio y otro.

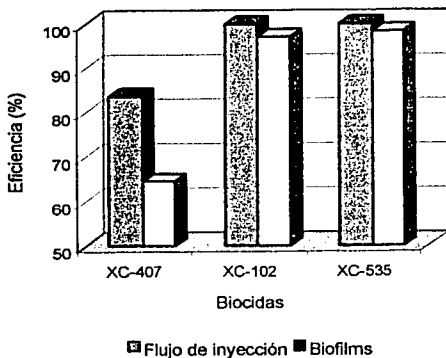


Figura 13 Comparación de las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, evaluados en los dos consorcios bacterianos formados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos en los aislamientos y en las caracterizaciones realizadas, se encontró que los cuatro géneros bacterianos aislados del Sistema de Inyección de agua de mar en estudio (*Pseudomonas sp*, *Moraxella sp*, *Alcaligenes sp* y *Corynebacterium sp*), han sido reportados como parte de la flora bacteriana común de este tipo de sistemas. Además, de acuerdo a lo reportado por Miller 1977 y Pucci 1991, se les ha relacionado de manera indirecta con los niveles de corrosión, ya que algunos de sus productos metabólicos tales como sulfatos, fosfatos y nitratos, pueden reaccionar con sustancias surfactantes presentes en el medio, y finalmente, estos pueden reaccionar fuertemente con el oxígeno, propiciando el desarrollo de pequeñas picaduras en los ductos de inyección.

Así mismo, de acuerdo a lo reportado, se ha observado que este tipo de bacterias ha sido aislada frecuentemente de *biofilms*, los cuales de acuerdo a los reportado por Costerton (1998) y por Characklis (1990), producen una corrosión generalmente más severa, debido al contacto directo que existe con la superficie, formando una barrera de características físicas y biológicas, que originan celdas de corrosión, picaduras, estrías o perforaciones en el metal. Además se ha observado que este tipo de formaciones fomenta el desarrollo de otro tipo de bacterias implicadas directamente con la corrosión, como las sulfatorreductoras y las ferrobacterias (Chantereau, 1985 y Gaylarde, 1993).

Por otro lado, se observó que tres de los cuatro géneros bacterianos aislados, se presentaron en las muestras provenientes de *biofilms*, lo cual de acuerdo a los programas enfocados a dar seguimiento al desarrollo y monitoreo de los *biofilms*, es común, ya que se ha encontrado que por lo general el 90 % de las bacterias totales presentes en un Sistema de Inyección, están representadas en los *biofilms*, debido a que las bacterias suspendidas en el agua del flujo de inyección, pueden quedar adheridas al material polimérico extracelular que constituye parte de los *biofilms*, donde comienzan a desarrollarse (Watkins *et al.*, 1987, Galván *et al.*, 1982 y Smith, 1982).

De acuerdo a lo anterior y con la finalidad de disminuir y/o contrarrestar los efectos causados por éste tipo de microorganismos, se encontró de acuerdo a los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas (Figura 13), que las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 difirieron significativamente entre un biocida y otro ($F < 0.05$), encontrando que el biocida XC-535 con tetrakishidroximetil sulfuro fosfatado (THPS) como componente activo fue el más eficiente, presentando una eficiencia en promedio del 99 %, posteriormente le siguió el biocida XC-102 con glutaraldehído como componente activo, con una eficiencia del 98 % y por último con la eficiencia más baja (74 %), se presentó el biocida XC-407 con sales cuaternarias de amonio como componente activo.

Por lo general la eficiencia de un biocida está en relación a diversos factores, tales como los mecanismos de acción del componente activo, la concentración del agente mortal, el tiempo de contacto y el tipo de microorganismo a eliminar (Videla *et al.*, 1991 y Faraquar *et al.*, 1989). De esta manera, en relación al componente activo de los biocidas evaluados, se encontró de acuerdo a lo reportado en la literatura, que el tetrakis(hidroximetil) sulfuro fosfatado (THPS) tiene la capacidad de reducir la permeabilidad de la célula, reaccionando químicamente con las cargas negativas de la pared celular de la bacteria y una vez dentro de la célula ataca los sitios enzimáticos e inhibe las reacciones metabólicas, hasta ocasionarle la muerte a la bacteria (Larsen *et al.*, 2000 y Downward *et al.*, 1997). En cuanto al glutaraldehído (1,5-pentanedial) se encontró que debe su actividad al grupo funcional aldehído, el cual actúa contra una gran variedad de microorganismos. El aldehído es un agente alquilante que reacciona con los aminoácidos por medio de contrapunteos o cruzamientos con los grupos amino de las membranas celulares, pared celular y citoplasma, provocando con ello que la bacteria se degenera lentamente, hasta que muere a consecuencia de un choque osmótico (Ferrari *et al.*, 1995 y Eagar, 1981). Finalmente, en cuanto a las sales cuaternarias de amonio o "QUATS", se encontró que constituyen una clase de compuestos catiónicos que actúan sobre las células bacterianas como detergentes, disolviendo los lípidos de las envolturas microbianas, ocasionando la pérdida de material vital para la bacteria. Sin embargo, una de las desventajas de este componente, a sido su lenta actividad para inhibir el crecimiento bacteriano, principalmente en aquellos sistemas en donde el agua presenta un alto contenido de sólidos disueltos (Boivin, 1992), como el caso del agua empleada en el Sistema de Inyección en estudio, en el cual, de acuerdo a las evaluaciones realizadas, el nivel de sólidos y de materia orgánica es elevado, de ahí que las eficiencias del biocida XC-407, hayan aumentado paulatinamente al transcurrir las 2 h, 4h y 6 h de exposición, en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección, llegando a alcanzar una eficiencia del 91.07 % (Figura 9). No obstante, este aumento en las eficiencias no fue lo suficiente como para alcanzar el 98 % necesario para que un biocida sea considerado como eficiente (ASTM, 1991).

En consideración a lo anteriormente referido, se determinó de acuerdo al lo reportado por Larsen *et al.*, 2000, Boivin, 1992 y Eagar, 1981 que el mecanismo de acción de los biocidas evaluados, radicó principalmente en su habilidad para lesionar la membrana y pared celular de las bacterias, ocasionando con ello una inestabilidad en el equilibrio que guarda la célula bacteriana al mantener una composición y presión osmótica constante con el medio circundante. Así mismo, se encontró que el componente activo del biocida XC-535, que fue el más eficiente en las evaluaciones realizadas, inhibe la acción de enzimas vitales para el metabolismo bacteriano, provocando inevitablemente que la bacteria se degenera y muera.

Así mismo, se ha observado que la concentración a la que es dosificado un biocida, modifica notablemente la velocidad de muerte de las bacterias (Carpenter, 1979). No obstante, en las evaluaciones realizadas, se encontró que las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección y en el consorcio bacteriano de los *biofilms*, no estuvieron en relación con las cuatro concentraciones aplicadas (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm y 400 ppm) ya que no hubo variaciones significativas ($F > 0.05$) entre una concentración y otra llegándose inclusive a presentar en los biocidas XC-102 y XC-535 eficiencias del 98 % y 100 % respectivamente, a las 100 ppm (Figuras 8 y 11). Dando indicios de que quizá a concentraciones más bajas, si se hubiera registrado un incremento paulatino en las eficiencias. Sin embargo, se ha observado que es necesario determinar la eficiencia de los biocidas a concentraciones de hasta 400 ppm, ya que éstas eficiencias obtenidas en el laboratorio tienden a disminuir al aplicar los productos en los Sistemas de Inyección de agua, debido a la interferencia que ocasiona la materia orgánica presente. De esta manera, de acuerdo a la experiencia obtenida en los campos petroleros, y en especial en éste Sistema de Inyección de agua de mar en estudio, se ha visto que es necesario aplicar los biocidas a concentraciones de hasta 400 ppm o 500 ppm, con la finalidad de tener un mejor control del crecimiento bacteriano. En base a esto, es recomendable conocer la eficiencia de los biocidas al evaluarlos en el laboratorio a 100, 200, 300 y 400 ppm (Grier, 1979, NACE, 1990 y Ferrari *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha determinado que la muerte bacteriana es un fenómeno gradual que por lo general depende del tiempo en que los microorganismos están en contacto con el biocida empleado (Freedman, 1985 y Carpenter, 1977). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas (Figura 9), se encontró que solamente las eficiencias del biocida XC-407 aumentaron paulatinamente al evaluarlo en el consorcio de bacterias aisladas del agua del flujo de inyección al transcurrir las 2 h, 4 h y 6 h de exposición, lo cual se relacionó a la lenta actividad de las sales cuaternarias de amonio en las aguas con un alto contenido de sólidos disueltos, como se indicó anteriormente. No obstante, aunque se haya encontrado que las eficiencias de los biocidas XC-102 y XC-535 no presentaron diferencias significativas ($F < 0.05$) entre un tiempo de exposición y otro, se determinó que es necesaria su evaluación a distintos tiempos de exposición, ya que los ductos del Sistema de Inyección en estudio miden aproximadamente 16.5 km de largo, y el agua del flujo de inyección tarda en recorrerlos aproximadamente ± 4 horas, por esta razón es indispensable conocer la eficiencia de los biocidas a las 2 h, 4 h y 6 h, a fin de garantizar que las eficiencias de los biocidas evaluados se incrementen o se mantengan a lo largo del trayecto, evitando con ello que el número de bacterias en los ductos de inyección, sobrepase el límite permisible o de seguridad, estimado en una población de alrededor de 10^3 bact/ml (Khattab, 1995, Galván *et al.*, 1982 y Smith, 1982).

Con respecto al tipo de microorganismo a eliminar, se observó que éste fue un factor determinante en las eficiencias que registraron los biocidas evaluados, ya que de acuerdo a los datos obtenidos en las caracterizaciones realizadas, se encontró que ninguna de las siete colonias bacterianas aisladas del Sistema de Inyección en estudio, presentó estructuras de resistencia tales como esporas o cápsulas, favoreciendo de esta manera que el componente activo de cada biocida actuara directamente contra el microorganismo a eliminar, ya que se ha observado que cuando las condiciones no son las favorables, la bacteria adopta formas de resistencia como las esporas, en las que se mantiene protegida de cualquier agente físico y/o químico que pueda alterar su integridad, mientras que las cápsulas proporcionan una barrera que impide o dificulta el paso de agentes químicos que pudieran dañar la integridad de la célula bacteriana (Levinson y Jawetz, 1998, Beverdige, 1981).

En cuanto a las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, se encontró que estas disminuyeron significativamente ($F < 0.05$) al evaluarlos en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, en comparación con las obtenidas en el consorcio formado por bacterias del agua de inyección (Tablas 6 y 7, Figura 13), éste factor se puede atribuir a que posiblemente éstas bacterias pudieron haber desarrollado algún mecanismo de adaptación o mutación a los agentes químicos, ya que como se mencionó en la metodología, éstas bacterias estuvieron expuestas a 300 ppm de glutaraldehído durante 48 h. Sin embargo, se piensa que quizá éste no inhibió el crecimiento bacteriano debido a que por lo general las bacterias que forman parte de los *biofilms* están protegidas por una capa gelatinosa de material polimérico extracelular, que ellas mismas secretan para facilitar su adhesión a los sustratos y a otras células bacterianas, substancia que por su consistencia provoca que materia orgánica e inorgánica se adhiera a ellas, ocasionando que la eficiencia del biocida disminuya debido a que el contacto entre éste y las células bacterianas no es directo, promoviendo con ello que las bacterias que quedaron sin eliminar, desarrollen mecanismos de resistencia frente al producto empleado (Eycott, 1990).

A todo esto, es preciso agregar que a medida que las bacterias sufren las agresiones de los diferentes agentes bactericidas que el hombre emplea para inhibir su crecimiento, aparece una selección de bacterias resistentes a dichas sustancias, originando con ello la proliferación de cepas, que para combatirlas se hace necesario evaluar periódicamente la eficiencia de los biocidas empleados para éste fin, así como la síntesis continua de nuevos y mejores biocidas (Chantereau, 1985).

CONCLUSIONES

Del Sistema de Inyección de agua de mar en estudio, se aislaron siete colonias bacterianas morfológicamente diferentes, determinando cuatro géneros bacterianos distintos: *Pseudomonas sp*, *Moraxella sp*, *Corynebacterium sp* y *Alcaligenes sp*, relacionados de manera indirecta con los niveles de corrosión que ocurren en los ductos de inyección.

Las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 en las evaluaciones realizadas, determinaron que el biocida XC-535 con tetrakis(hidroxi)metil sulfuro fosfatado (THPS) como componente activo, fue el más eficiente para inhibir el crecimiento de las bacterias aisladas del Sistema de Inyección de agua de mar en estudio, seguido por el biocida XC-102 con glutaraldehído como componente activo, y por último se presentó el biocida XC-407 con sales cuaternarias de amonio.

Las cuatro concentraciones manejadas de 100, 200, 300 y 400 ppm, no fueron un factor determinante en el incremento de las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, en los dos consorcios bacterianos.

Los tres tiempos de contacto considerados (2 h, 4 h y 6 h), no influyeron de manera directa en el incremento de las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535, en los dos consorcios bacterianos evaluados.

Las eficiencias que registraron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 disminuyeron en el consorcio de bacterias aisladas de *biofilms*, en comparación con las registradas en el consorcio de bacterias del agua del flujo de inyección, representando con ello uno de los factores más problemáticos para el control bacteriológico en el Sistemas de Inyección de agua de mar en estudio.

Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que la eficiencia de un biocida difiere de acuerdo al tipo de microorganismo a eliminar y al sistema a tratar, por lo que es indispensable evaluar periódicamente los biocidas empleados comúnmente en los Sistemas de Inyección de agua de mar.

RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere rotar de manera periódica el uso de los biocidas empleados en los Sistemas de Inyección de agua, con la finalidad de evitar que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia a los productos empleados. Así mismo, antes de establecer el biocida y la concentración necesaria para el control de microorganismos, es necesario eliminar del sistema a tratar todas las posibles fuentes que pudieran favorecer su desarrollo y proliferación, tales como las pérdidas de aceite y de productos que pudieran servirles de nutrientes.

Así mismo, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos biocidas, que permitan mejorar el control del crecimiento bacteriano y con ello mejorar el funcionamiento de los Sistemas de Inyección, y de esta manera disminuir los gastos que derivan en cuantiosas pérdidas para la Industria Petrolera.

Para mejorar la calidad del ambiente, es recomendable no solo evaluar la eficiencia de biocidas para inhibir el crecimiento de microorganismos, sino también determinar su toxicidad, a fin de no alterar el desarrollo óptimo de otras especies.

LITERATURA CITADA

American Society For Testing And Materials (ASTM D665-98). 1998. "Standard Test Method for Rust-Preventing Characteristic of Inhibited Mineral Oil in the Presence of Water". **Water and Environmental Technology**, 1-7.

American Society For Testing And Materials (ASTM E645-91). 1991. "Standard Test Method for Efficacy of Microbicides Used in Cooling Systems". **Water and Environmental Technology**, 378-380.

Beveridge, T. 1981. "Ultrastructure, Chemistry and Function of the Bacterial Cell Internat". **Rev Cytol**, 72:229-317.

Boivin, J. 1992. "Oil Industry Biocides, Environmental Effects". **NACE Houston TX**, 61-64.

Carpenter, P. 1977. "Microbiología". 4ª. Edición, Editorial Interamericana, México, pp 518.

Costerton, J.W. 1994. "Structure of Biofilms in Industrial Water Systems". **Corrosión/94:9-14**.

Costerton, J. W. 1998. "Bacterial Biofilms in Relation to Internal Corrosion Monitoring and Biocide Strategies". **Material Performance**, 27(4): 49-53.

Croize, J. y D. Rouhand. 1987. "Identificación de Bacterias Aerobias y Anaerobias". **Ann. Bil. Clin.** 45:70-77.

Chantereau, J. 1985 "Corrosión Bacteriana". Editorial Limusa. México, 204 pp.

Characklis, W. G. y K. C. Marshall. 1990. "Biofilms" **Wiley Interscience Publications** 31-36.

Daniel W. 1985. "Bioestadística, Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud". Edít. Limusa, México D.F., 485 pp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Davies, J. y D. H. Smith. 1978. "Plasmid Determined Resistance to Antimicrobial Agents". *Microbiology*, 32:469-471.

Dauget, G. L. y P. Mathieu-Saint. 1977. "Técnicas en Bacteriología", Tomo I, Editorial JIMS, Barcelona, pp 77.

Downward, B., Haack, R. Talbot. 1997. "Tetrakishidoxymethylphosphonium sulfate (THPS) A New Biocide for Industrial Systems". *Corrosión/97* (12): 19-16.

Dulbecco, R., B. D. Davis., H. M. Eisen., H. S. Ginsberg. 1990. "Tratado de Microbiología". Editorial Salvat Editores, 1097 pp.

Eagar, R. G. 1981. "Glutaraldehido, un Microbicida Aplicable en Campos Petroleros", *Corrosión/81* (112): 27-36.

Ehrlich, P. 1960. "Chemoterapy". *Collected Papers*, 3:65-71.

Eycott, R. 1990. "Controlling Biofilms in Cooling Water Systems". *Industrial And Process Water Treatment*, 33:40-43.

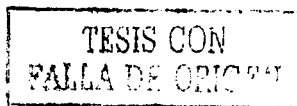
Faraquhar, G. B., C. A. Lacey., S. D. Deans. 1989. "Laboratory Screening of Comercial Biocides for Use in Oilfield Production". *NACE, Houston TX* 106-109.

Ferrari, M., M. de Mele, H. Videla. 1995. "Manual Práctico de Biocorrosión y Biofouling para la Industria". *CYTED*, 178 pp.

Freedman, B. A.. 1985. "Microbiología de Burrows", 22º Edición, Editorial Interamericana, México. 592 pp.

Galván, J., A. Lory., J.;Nolasco., Y. Nava. 1982. "Tratamiento de Agua de Inyección", División de Producción, Subdirección de Tecnología de Explotación Instituto Mexicano Del Petróleo, 78 pp.

Gaylarde, C. 1993. "Corrosao Microbiana". *Ciencia Hoje* 15, 60-66.



Grier, J. C. y R. J. Christensen. 1979. "Microbiological Control in Alkaline Cooling Water Systems". **Annual Meeting, Canada. 22-26.**

Henley, M. 1994. "Market Review. Western European Water Treatment Market Remains Steady". **Industrial Water Treatment, 12:14-18.**

Holt J., Sneath, P., N. Marr, Sharpe M., 1986. "Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology". 9ª edición, Vol 2, Williams and Wilkins, Baltimore 639 pp.

Khattab, N.. M. 1995. "Mitigation of Microbial Corrosion in Ras Budran Water Injection Plant". **Corrosion/95(212): 74 -81.**

Larsen, J., P. Sanders, R. Talbot. 2000. "Experience with the Use of Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) for the Control of Downhole Hydrogen Sulfide". **Corrosion /2000, 123: 36-47.**

Levinson, W y E. Jawetz. 1998. " Microbiología e Inmunología". 2ª. Edición, Editorial Manual Moderno, 816 pp.

Mc Faddin J. F. 1993. "Pruebas Bioquímicas Para La Identificación De Bacterias De Importancia Clínica". Editorial Panamericana, México, 301 pp.

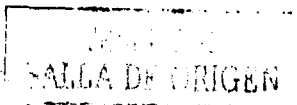
Miller J.D. 1977. "Corrosion. the influence of micro-organisms". ". **Annual Meeting, Canada, 3-9.**

Milton, S. 1994. "Estadística para Biología y Ciencias de la Salud", 2ª.Edición. Edit. Mc. Graw Hill, México, 326 pp.

Mitchell W. 1987. "The Forties Field Sea Water Injection System". **Journal of Petroleum Technology, 12 (3): 877-884.**

Murray, P., E. Barone, F. Tenover. 1999. "Manual of Clinical Microbiology", 7ªedición, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 209 pp.

NACE #54281. 1990. "Review of Current Practices for Monitoring Bacterial Growth in Oilfield Systems", **NACE Houston, TX. 1-15.**



Nivens, D., J. Chambers., D. White. 1978. "Subsurface Salt Water Injection and Disposal". **American Petroleum Institute. 16-28.**

Norma Oficial Mexicana NOM-065 SSA1. 1993. "Que Establece las Especificaciones Sanitarias de los Medios de Cultivo". **Diario Oficial, 19-27.**

Norma Oficial Mexicana NOM-092 SSA1. 1994. "Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa". **Diario Oficial. 14-19.**

Norma Oficial Mexicana NOM-110 SSA1. 1994. "Preparación y Dilución de Muestras Para su Análisis Microbiológico". **Diario Oficial. 61-66.**

Norma SCE01/MS.785. 1982. " Técnica Para la Realización de Tinción de Gram", **IMSS. 13-14.**

Prasad, R., N. Grahmann., C. Walker., G. Maddux. 1989. "Solving Problems Associated With Biocorrosion in Oil Production Operations". **Corrosión/89 (184):145-152.**

Pucci, O. 1991. "Enumeración de Bacterias Presentes en Tuberías de Agua de Inyección ", **Boletín Informativo del Petróleo, España, 32 pp.**

Ramírez, D.R. 1992. "La Comunidad Bacteriana y su Influencia en la Corrosión de los Sistemas de Enfriamiento Abiertos". **Corrosión/92(27):11-21.**

Smalijohann, R. 1984 "Morphological Investigations on Bacterioplankton of the Baltic Sea, Kattegat and Skagerrak" **Bot. Mar. 27, 425-436.**

Simpson G. 1993. "Microbial control: A focus on Biocides; Past, Present and Future". **Industrial Water Treatment, 9(2) 22-27.**

Simpson, G. 1996. "Cooling, Increasing Mold Life in Electric Arc Furnace Mini Steel Mills". **Industrial Water Treatment, 13(1):36-39.**

Sikyta, B. 1995. "Techniques in Applied Microbiology". **Progress In Industrial Microbiology, 31:26-29.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Smith, C. R. 1982. "Mechanics of Secondary Oil Recovery". Department Of Petroleum Engineering The University Of Wyoming. Reinhold Publishing Corporation, 9:13-17.

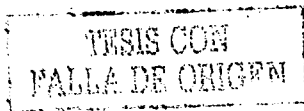
Starr, M., H. Stolp, H. Truper, A. Balows y H. Schlegel. 1981. "The Prokaryotes. A Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria". New York, 228 pp.

Sullivan, P. J. y F. O'Brien. 1996. "Biocontrol, Performance of Hydroxy- Phosphono Acetic Acid with Oxidizing Biocides". *Industrial Water Treatment* 2(6):30-35.

Videla, H., P. Guiamet, O. Pardini. 1991. "Seguimiento del Biofouling y la Corrosión en Sistemas de Inyección Para la Recuperación Secundaria del Petróleo". *Corrosión/91*, 136-140.

Villarreal, J. 1992. "Estudio Microbiológico de Bacterias en un Sistema de Inyección de Agua en un Campo Petrolero". *Industrial Water Treatment* 7(2): 21-28.

Watkins, L. y J.W. Costerton. 1987. "Growth and Biocide Resistance of Bacterial Biofilms in Industrial Systems". *Chemical Times And Trends*. 10-14.



ANEXO I

PREPARACIÓN DE MEDIOS

**I Medio de Cultivo NACE
(NACE, 1990)**

Reactivos	g/l
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	1.0
Citrato férrico	0.1
Cloruro de sodio	19.5
Cloruro de magnesio	8.8
Sulfato de sodio	3.3
Cloruro de calcio	1.8
Cloruro de potasio	0.6
Bicarbonato de sodio	0.16
Agar bacteriológico	16.5

Disolver los reactivos uno por uno en agua bidestilada, y calentar para que se disgregue y se incorpore el agar.
Ajustar el pH a 8 con NaOH al 1N y esterilizar a 15 lbs por 15 minutos.

**II Caldo de cultivo NACE
(NACE, 1990)**

Reactivos	g/l
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	1.0
Citrato férrico	0.1
Cloruro de sodio	19.5
Cloruro de magnesio	8.8
Sulfato de sodio	3.3
Cloruro de calcio	1.8
Cloruro de potasio	0.6
Bicarbonato de sodio	0.16

Disolver los reactivos uno por uno en agua bidestilada
Ajustar el pH a 8 con NaOH al 1N y esterilizar a 15 lbs por 15 minutos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**III Agua de mar sintética
(ASTM D665-1998)**

Reactivos	g/l
Cloruro de sodio	25.23
Cloruro de magnesio	5.20
Sulfato de sodio	4.09
Cloruro de calcio	1.16
Cloruro de potasio	0.695
Bicarbonato de sodio	0.201
Bromuro de potasio	0.101
Acido ascórbico	0.027
Cloruro de estroncio	0.025
Fluoruro de sodio	0.003

Disolver los reactivos en agua bidestilada y ajustar el pH a 8 con NaOH al 1N.
Esterilizar a 15 lbs durante 15 minutos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO II

TÉCNICAS EMPLEADAS

TESIS CON
ESCUELA DE INGENIERIA

I Técnica para la coloración de Gram (Norma SCE 01/Ms.785, 1982)

- Tomar una asada de la colonia y colocarla en portaobjetos limpio y desengrasado.
- Fijar el frotis con calor.
- Cubrir la solución de cristal violeta por un minuto.
- Lavar con agua.
- Cubrir con lugol por un minuto.
- Lavar con agua.
- Decolorar con alcohol-acetona durante 30 segundos.
- Lavar con agua.
- Cubrir con solución de safranina por un minuto.
- Lavar con agua.
- Dejar secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

II Técnica para la coloración de Schaffer y Fulton (Dauget y Mathieu-Saint, 1977)

- Fijar el frotis con calor.
- Agregar verde de malaquita al 5 % y calentar a emisión de vapores por un minuto.
- Lavar con agua.
- Agregar safranina por 15 segundos.
- Lavar con agua.
- Dejar secar.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

III Técnica en fresco con tinta china (Dauget y Mathieu-Saint, 1977)

- Colocar una gota de la colonia en el centro del portaobjetos.
- Agregar una gotita de tinta china (de granos chinos y homogéneos).
- Cubrir con el cubreobjetos y parafinar.
- Buscar una región de densidad conveniente en tinta y en bacterias.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.
- Las cápsulas se observarán bajo la forma de un halo claro rodeando a la bacteria.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**IV Técnica para determinar la motilidad de las bacterias
(Mac Faddin, 1993)**

Reactivo	g/l
Extracto de levadura	3.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar bacteriológico	4.0

- Disolver los reactivos en 1000 ml de agua bidestilada, esterilizarlo y distribuir 5 ml en cada tubo.
- Tomar una pequeña cantidad de un cultivo de 18 a 24 h de crecimiento.
- Hacer una punción en el centro del medio con una aguja de inoculación hasta una profundidad de 1-2 cm.
- Incubar a 35°C durante 24 a 48 h, si resulta negativo incubar a 21-25°C durante 5 días más.
- La prueba se considerará positiva (motilidad) si se observa un desplazamiento de las bacterias de la línea de siembra, difundiéndose en el medio y provocando turbidez, y negativa (sin motilidad) cuando el crecimiento bacteriano acentuado permanezca en la línea de siembra y el medio circundante se mantenga claro.

**V Técnica para determinar la producción de enzimas proteolíticas
(Mac Faddin, 1993)**

Reactivo	g/l
Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Gelatina	120

- Preparar el medio de cultivo en 1000 ml de agua bidestilada, esterilizarlo y distribuir 5 ml en cada tubo.
- Tomar una pequeña cantidad de un cultivo de 18 a 24 h de crecimiento.
- Hacer una punción en el centro del medio con una aguja de inoculación hasta una profundidad de 1-2 cm, o bien agregar 1 ml de inoculo bacteriano.
- Incubar a 22-25 °C o a 35°C durante 24 a 48 h.
- Al término de cada periodo de 24 h colocar ambos tubos en un refrigerador o en un baño de hielo durante 2 h.
- Se considerarán como positivos aquellos tubos que presenten el medio licuado, a pesar de haber sido enfriado el medio, mientras que se considerarán como negativos los tubos en los que el medio se mantenga sólido.

**VI Técnica para la realización de la prueba de la catalasa
(Mac Faddin, 1993)**

- Tomar con una asa de siembra el centro de una colonia pura de 18 a 24 h y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio.
- Agregar una gota de Peróxido de hidrógeno H_2O_2 al 30 %, usar un gotero o una pipeta Pasteur.
- Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y registrar el resultado
- Desechar el portaobjetos poniéndolo en desinfectante.

**VII Técnica para la realización de la prueba de la oxidasa
(Mac Faddin, 1993)**

- Colocar un trozo de 6 cm² de papel filtro de Whatman N°1 en una caja Petri estéril.
- Agregar de 2 a 3 gotas de reactivo de oxidasa de Kovacs (Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 %).
- Hacer un extendido con el asa de siembra, del centro de la colonia de interés en el papel impregnado con el reactivo, siguiendo una línea de 3 a 6 cm de longitud.
- La reacción positiva se produce a los 5 o 10 segundos, virando de un color rosado a marrón y finalmente a negro.

ANEXO III

CLAVES DE REACCIONES BIOQUÍMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 16 Pruebas bioquímicas realizadas para la caracterización de las UFC gram negativas aisladas del sistema de inyección de agua de mar en estudio.

TEST	REACCION
CAT	Catalasa
OXID	Oxidasa
LDC	Lisina de carboxilasa
O/F GLU	oxidación y/o fermentación de la glucosa
MNT	Malonato
CIT	Citrato
β GLU	β Glucosidasa
ALA	L-alanina
AspA	L- Aspártico ácido arilamidasa
PRO	L- prolina
IND	Indol
GLU	Glucosa
α GLU	α Glucosidasa
α GAL	α Galactosidasa

Tabla 17 Pruebas bioquímicas realizadas para la caracterización de las UFC gram positivas aisladas del sistema de inyección de agua de mar en estudio.

TEST	REACCION
CAT	Catalasa
OXID	Oxidasa
URE	Ureasa
MAN	Manitol
MAL	Maltosa
Lic Gelat	Licuefacción de la gelatina
PAL	Fosfatasa alcalina
GLU	Glucosa
RIB	Ribosa (fermentación)
LAC	Lactosa (fermentación)
α GLU	α Glucosidasa
SAC	Sacarosa (fermentación)
GLYG	Glicógeno (fermentación)
NIT	Nitratos
PYZ	Pyrazinamidasa

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO IV

Resultados estadísticos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

47

Tabla 12 Resultados del ANOVA factorial de las eficiencias obtenidas de los biocidas XC-107, XC-102 y XC-535 a 100, 200, 300 y 400 ppm, aplicados en el consorcio formado por bacterias aisladas del flujo de agua.

FUENTE	SC	GL	CM	RV	F _{0.95}
Biocidas evaluados	462.03	3	154.01	1.47	2.92
Concentraciones (ppm)	462.03	2	145.01	20.93	3.32
Biocidas Vs. Concentraciones	1971	6	328.5	3.15	2.42
Tratamientos	5491.16	11	---		
Residual	3747.92	36	104.10		
Total	9239.08	47			

Biocidas evaluados: $F(3, 36) = 2.92$

Valor crítico calculado = 1.47

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

Concentraciones: $F(2, 36) = 3.32$

Valor crítico calculado = 20.93

$F >$ valor crítico; No se rechaza la H_0

Biocidas Vs Concentraciones: $F(6,36)=2.42$

Valor crítico calculado = 3.15

$F >$ valor crítico; No se rechaza la H_0

Tabla 13 Resultados del ANOVA factorial de las eficiencias que presentaron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 a las 2 h, 4 h y 6 h de estar en contacto con las bacterias aisladas del flujo de agua.

FUENTE	SC	GL	CM	RV	F _{0.95}
Biocidas evaluados	57.62	2	28.81	0.083	3.00
Tiempos de contacto (horas)	149.96	2	74.98	0.218	3.00
Biocidas Vs. Tiempos de contacto	183.98	4	45.99	0.133	2.37
Tratamientos	17591.56	9	---		
Residual	28817.24	135	343.76		
Total	46408.80				

Biocidas evaluados: $F(2, 135) = 3.00$

Valor crítico calculado = 0.083

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

Tiempos de contacto: $F(2, 135) = 3.00$

Valor crítico calculado = 0.218

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

Biocidas Vs Tiempos de contacto: $F(4,135) = 2.37$

Valor crítico calculado = 0.133

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14 Resultados del ANOVA factorial de las eficiencias obtenidas de los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 a 100, 200, 300 y 400 ppm en el consorcio formado por bacterias aisladas de *biofilms*.

FUENTE	SC	GL	CM	RV	F _{0.95}
Biocidas evaluados	856.48	3	5085.18	0.67	2.92
Concentraciones (ppm)	10170.37	2	285.49	12.09	3.32
Biocidas Vs Concentraciones	6.542.9	6	1090.48	2.59	2.42
Tratamientos	11569.75	11	---		
Residual	15139.01	36	420.52		
Total	226708.76	47			

Biocidas evaluados: $F(3, 36) = 2.92$ Valor crítico calculado = 0.67

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

Concentraciones: $F(2, 36) = 3.32$ Valor crítico calculado = 12.09

$F >$ valor crítico; No se rechaza la H_0

Biocidas Vs Concentraciones: $F(6,36) = 2.42$ Valor crítico calculado = 2.59

Tabla 15 Resultados del ANOVA factorial de las eficiencias que presentaron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 a las 2 h, 4 h y 6 h de estar en contacto con las bacterias aisladas de *biofilms*.

FUENTE	SC	GL	CM	RV	F _{0.95}
Biocidas evaluados	155.23	2	77.61	0.20	3.00
Tiempos de contacto	24866.59	2	12433.29	32.33	3.00
Biocidas Vs Concentraciones	11134.94	4	27837.48	7.33	2.37
Tratamientos	25156.76	9	---		
Residual	519913.63	135	384.54		
Total	77070.38	143			

Biocidas evaluados: $F(2, 135) = 3.00$ Valor crítico calculado = 0.20

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

Tiempos de contacto: $F(2, 135) = 3.00$ Valor crítico calculado = 32.33

$F >$ valor crítico; No se rechaza la H_0

Biocidas Vs Tiempos de contacto: $F(4,135) 2.37$ Valor crítico calculado = 7.33

$F >$ valor crítico; No se rechaza la H_0

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

Tabla 15 Resultados del ANOVA en bloques de las eficiencias que presentaron los biocidas XC-407, XC-102 y XC-535 al evaluarlos en los dos consorcios formados.

FUENTE	SC	GL	CM	RV	F _{0.95}
Biocidas	22.82	2	11.41	2.87	3.89
Consortios	17.27	1	17.27	4.35	4.75
Biocidas Vs Consortios	7.94	2	3.97	0.63	---
Tratamientos	2428.03	5			
Residual	74.98	12			
Total	2503.01				

Biocidas evaluados: $F(2, 12) = 3.89$

Valor crítico calculado = 2.87

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

Consortios: $F(1, 12) = 4.75$

Valor crítico calculado = 3.35

$F <$ valor crítico; Se rechaza H_0

SC.- Suma de los cuadrados.

GL.- Grados de libertad.

CM.- Cuadrado medio.

RV.- Valor relativo o valor crítico.

F.- Valor de varianza en tablas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN