



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL GLUTARALDEHÍDO EN LA
BIOCORROSIÓN PRODUCIDA POR UN
CONSORCIO MICROBIANO EN ACEROS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARIA ELENA MORALES PARRA



MÉXICO, D.F.



2005

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

m 351980



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. VIERNA GARCIA LILIA
VOCAL PROF. ORTEGA MUÑOZ RAQUEL
SECRETARIO PROF. CASTELLANOS CHAVEZ NORMA ANGELICA
1^{ER}. SUPLENTE PROF. TREJO MEDINA NORMA
2^º. SUPLENTE PROF. ORTIZ FRADE LUIS ANTONIO

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 112 POSGRADO, EDIFICIO "B". FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



Q. LILIA VIERNA GARCIA

SUSTENTANTE



MA. ELENA MORALES PARRA

Autotizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Morales Parra

Maria Elena

FECHA: 05-DIC-2005

FIRMA: 

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis **padres**, por todo el apoyo, comprensión y amor que me han brindado.
Mi guía en la vida es su ejemplo.

A mi **hermana Violeta** por ser mi eterna compañera.

A mi **Tía Luisa** por estar presente en todo momento.

A la maestra **Silvia Tejada**[†] por permitirme conocer el maravilloso tema que es la biocorrosión.

A la maestra **Lilia Vierna** por brindarme todo su apoyo para concluir esta etapa en mi vida.

A **Ilian y Ari** por su amistad incondicional.

A **Miguel** por compartir conmigo la etapa universitaria.

A **Raúl, Gaby y Violeta**.

Al profesor **Mauricio**, a la profesora **Aurora** y a **María Luisa**, integrantes del laboratorio 112 del Posgrado Edificio "B", Facultad de Química, por todo su apoyo para la realización del trabajo experimental de esta tesis.

En fin, gracias a todos aquellos que por diversos motivos hoy no se encuentran cerca, pero que durante mi estancia en la universidad compartieron conmigo su conocimiento, cariño, tiempo y amistad.

Y por supuesto a **Diego**.

*“Evaluación del Glutaraldehído en la
biocorrosión producida por un consorcio
microbiano en aceros”*

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	4
II.	OBJETIVOS	7
III.	HIPÓTESIS.....	7
IV.	INTRODUCCIÓN.....	8
	IV.1 CORROSIÓN	8
	IV.1.1 CLASIFICACIÓN DEL FENÓMENO DE CORROSIÓN	10
	A. Clasificación según el medio	10
	B. Clasificación según su forma	11
	IV.2 CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA Ó BIOCORROSIÓN	13
	IV.2.1 FACTORES E INDICADORES DE LA BIOCORROSIÓN	14
	IV.3 MEDICIÓN DE LA BIOCORROSIÓN.....	16
	IV.3.1 TÉCNICA ELECTROQUÍMICA: POLARIZACIÓN	16
	IV.3.2 RESISTENCIA A LA POLARIZACIÓN	17
	IV.4 INHIBIDORES.....	18
	IV.4.1 INHIBIDOR.....	19
	IV.4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES.....	21
	IV.4.3 BIOCIDA.....	21
	IV.4.4 EL GLUTARALDEHÍDO	22
	IV.4.4.1 ACTIVIDAD BIOCIDA DEL GLUTARALDEHÍDO	23
	IV.5 LA CÉLULA MICROBIANA	25
	IV.5.1 BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	26
	IV.5.2 BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	27
	IV.5.3 BACTERIAS BAAR.....	28
	IV.6 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	29
	IV.6.1 MEDIDA DEL CRECIMIENTO	31
	IV.7 CONSORCIO MICROBIANO	34
	IV.8 BIOPELÍCULA.....	37
	IV.8.1 DEFINICIÓN.....	39
	IV.8.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA SUPERFICIE.....	40
	IV.8.3 ADSORCIÓN Y FIJACIÓN.....	41
	IV.8.4 MADURACIÓN: EL GLICOCALIX Ó EXOPOLIMERO	42
	IV.8.5 COOPERACIÓN ENTRE ESPECIES.....	42
	IV.8.6 CRECIMIENTO Y DISPERSIÓN	43
	IV.8.7 LA PROTECCIÓN: RESISTENCIA A LOS BIOCIDAS.....	44
V.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	46
VI.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
	VI.1 CONSORCIO MICROBIANO: CARACTERIZACIÓN.....	52
	VI.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	58
	VI.3 ACTIVIDAD DEL GLUTARALDEHÍDO	60
	VI.4 ACCIÓN BIOCIDA DEL GLUTARALDEHÍDO	61
	VI.5 EFICIENCIA BIOCIDA DEL GLUTARALDEHÍDO.....	63
	VI.6 EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA.....	66

VII. CONCLUSIONES	69
VII.1 CONCLUSIONES GENERALES	69
VII.2 CONCLUSIONES PARTICULARES.....	71
VIII. RECOMENDACIONES	72
IX. REFERENCIAS	73
X. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS, GRÁFICAS Y FOTOGRAFÍAS	76
XI. APÉNDICES	77
XI.1 APÉNDICE I	77
XI.2 APÉNDICE II	81
XI.3 APÉNDICE III	82
XI.4 APÉNDICE IV.....	85
XI.5 APÉNDICE V.....	87
XI.6 APÉNDICE VI.....	88

I. RESUMEN

Lo primero que piensa mucha gente al decir corrosión es evocar la imagen de la "herrumbre", propia de los metales ferrosos, como si sólo el hierro fuera susceptible de presentar este fenómeno.

En realidad, la corrosión es la causa general de la alteración y destrucción de la mayor parte de los materiales naturales o fabricados por el hombre. Si bien esta fuerza destructiva ha existido siempre, no se le ha prestado atención hasta los tiempos modernos.

Anualmente son perdidos millones de dólares a causa de la corrosión, se ha estimado que la pérdida por corrosión puede representar entre del 3 al 4% de la totalidad del producto interno bruto (PIB) nacional de muchos países. No solo tiene importancia en el aspecto económico, ya que desde la perspectiva industrial, es necesario considerar la seguridad del personal, el equipo, la pérdida de energía, la preservación de los materiales y el impacto ambiental; para tener una pequeña idea de lo que esto pueda suponer, hay que considerar que aproximadamente un 25% de la producción anual de acero es destruida por la corrosión (J. R. Galvele / 1985).

La corrosión de los metales constituye el despilfarro más grande en que incurre la civilización moderna.

Las roturas en los tubos de escape y silenciadores de los automóviles, la sustitución de los calentadores de agua domésticos (cerca de 2.5 millones de unidades en los EUA en 1967), explosiones por fugas de gas en los tanques de almacenamiento o tuberías de conducción, roturas en las conducciones de agua, incluso el derrumbe de un puente, son algunos de los problemas con los cuales se

encuentra el hombre. Nada metálico parece ser inmune a este tipo de acontecimientos (*H.H. Uhling / 1950*).

A veces los daños causados por un problema de corrosión pueden ser muy amplios. Pensemos en la reparación de la falla de un oleoducto de crudo, resultante de problemas de corrosión interna o externa. Aparte del costo inherente a la sustitución del tramo de tubería dañado, hay que tener en cuenta el daño causado por el aceite derramado al terreno, muchas veces irreversibles, así como el posible paro de la refinería y los consiguientes problemas de desabastecimiento que ello puede llegar a acarrear (*H.H. Uhling / 1950*).

Por otra parte, se hablará de la Biopelícula, la cual es una comunidad compleja de microorganismos, que significa un reservorio de bacterias y otros microorganismos como hongos y algas, que se pueden involucrar en contaminaciones cruzadas, obturar ductos de líquidos y dificultar la higiene (*G. Piera / 2002*).

En esta tesis se aborda un tipo específico de corrosión la microbiológica, mejor conocida como biocorrosión, para esto fue utilizado como agente causante de corrosión un consorcio microbiano extraído de un sistema de recuperación secundaria y como biocida un agente químico utilizado actualmente para su control, el 1,5 pentanedial o mejor conocido como Glutaraldehído, el cual es uno de los microbicidas más eficientes que se conocen.

Los parámetros medidos es la corrosividad producida por el consorcio microbiano, el consorcio + biocida y el biocida, utilizando un método electroquímico denominado "resistencia a la polarización".

Este documento esta formado por once capítulos distribuidos en el siguiente orden: en los capítulos II y III se establecieron los objetivos de la investigación y la hipótesis de resultados propuesta, continuando en el capítulo IV con la introducción necesaria para efectuar el trabajo experimental, por otro parte, el

capítulo V presenta las matrices experimentales que incluyó el diseño experimental empleado en esta tesis.

El capítulo VI está formado por un resumen de los resultados experimentales obtenidos y su análisis; para las conclusiones y recomendaciones se han destinado los capítulos VII y VIII.

Posteriormente los capítulos IX, X y XI presentan las referencias bibliográficas, el índice de tablas, figuras, gráficas y fotografías y por último los apéndices.

II. OBJETIVOS

- Evaluar algunas características del consorcio microbiano en estudio y la corrosividad de éste en un acero.
- Determinar las concentraciones a las cuales el Glutaraldehído tiene acción biocida.
- Valorar la eficiencia del Glutaraldehído AQC – 550 comercial utilizado para eliminar un consorcio microbiano causante de la biocorrosión.

III. HIPÓTESIS

- El crecimiento de un consorcio microbiano actuará como un agente inductor del fenómeno de corrosión en un acero.
- El Glutaraldehído comercial obtendrá una eficiencia mayor al 99.9%, lo cual asegura su acción biocida y por tanto será posible controlar la biocorrosión.

IV. INTRODUCCIÓN

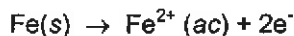
IV.1 CORROSIÓN

Se denomina con el término general de corrosión a la alteración de los materiales provocada por el medio que los rodea (*Chang / 1992*). Cuando se trata de metales se habla de corrosión metálica. De acuerdo a la naturaleza del medio corrosivo, la corrosión metálica comprende la corrosión química y la corrosión electroquímica.

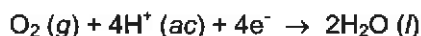
La característica fundamental de este fenómeno, es que sólo ocurre en presencia de un electrolito, ocasionando regiones plenamente identificadas, llamadas estas anódicas y catódicas: una reacción de oxidación es una reacción anódica, en la cual los electrones son liberados dirigiéndose a otras regiones catódicas. En la región anódica se producirá la disolución del metal (corrosión) y, consecuentemente en la región catódica la inmunidad del metal. Los enlaces metálicos tienden a convertirse en enlaces iónicos, lo que favorece que el material pueda en cierto momento transferir y recibir electrones, creando zonas catódicas y zonas anódicas en su estructura (*J.R. Galvele / 1985*).

Tomemos este ejemplo más a fondo para explicar el fundamento de la Corrosión:

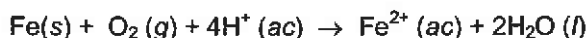
Una región de la superficie del metal funciona como ánodo, donde ocurre la oxidación:



Los electrones liberados por el hierro reducen el oxígeno atmosférico a agua en el cátodo, que es otra región en la superficie del metal:



Siendo la reacción global:



Con los datos de potenciales de reducción:

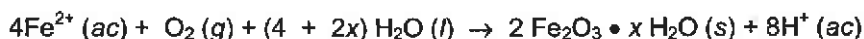
Tabla 1. Potenciales de reducción

Semirreacción	ϵ° (V)
$\text{Fe}^{2+}(ac) + 2e^- \rightarrow \text{Fe}(s)$ -0.44	-0.44
$\text{O}_2(g) + 4\text{H}^+(ac) + 4e^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}(l)$	+1.23

Determinamos la Fem para este proceso:

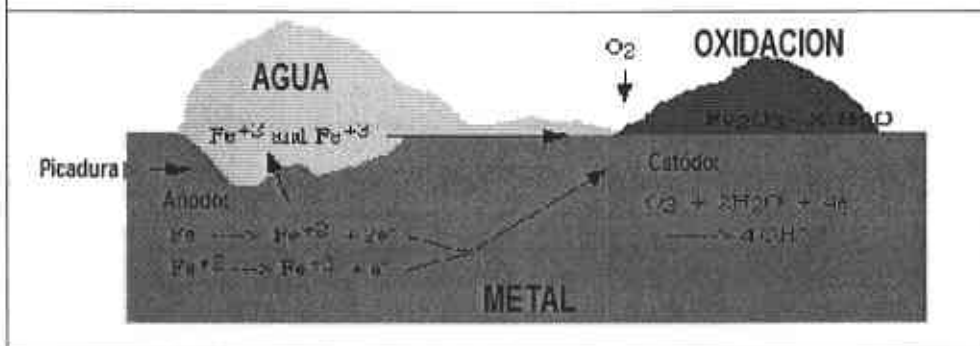
$$\begin{aligned}\epsilon^\circ &= \epsilon^\circ_{ox} + \epsilon^\circ_{red} \\ &= 0.44 \text{ V} + 1.23 \text{ V} \\ &= 1.67 \text{ V}\end{aligned}$$

Como la reacción ocurre en medio ácido; los iones H^+ son aportados por la reacción del dióxido de carbono atmosférico con el agua para formar H_2CO_3 . Los iones Fe^{2+} formado en el ánodo son después oxidados por el oxígeno:



Esta forma hidratada del óxido de hierro (III) se conoce como herrumbre. La cantidad de agua asociada con el óxido de hierro varía, así que se representa la fórmula como $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$. Cabe mencionar que el circuito eléctrico se completa por la migración de electrones y de iones; ésta es la razón por la que la herrumbre se produce en forma tan rápida en agua salada (*J.R. Galvele / 1985*).

Figura 1. Mecanismo general de corrosión



Tomada de: Corrosión / <http://www.monografias.com/trabajos3/corrosión/corrosión.shtml>

La velocidad a que un material se corroe es lenta y continua todo dependiendo del ambiente donde se encuentre, a medida que pasa el tiempo se va creando una capa fina de material en la superficie, que van formándose inicialmente como manchas hasta que llegan a aparecer imperfecciones en la superficie del metal (J.R. Galvele / 1985).

IV.1.1 CLASIFICACIÓN DEL FENÓMENO DE CORROSIÓN

Los procesos de corrosión pueden clasificarse según el medio en el que se desarrollan o según su forma (J.R. Galvele / 1985).

A. Clasificación según el medio

La Corrosión Química comprende el ataque por sistemas no electrolíticos, tales como gases y vapores a temperaturas que impiden su condensación sobre la superficie metálica o por líquidos no conductores de la corriente eléctrica. En resumen se estudian bajo esta denominación todos aquellos casos en que el metal reacciona con un medio no iónico.

La Corrosión Electroquímica comprende a la corrosión atmosférica en aire húmedo, a la producida en suelos o a la corrosión provocada por medios electroquímicos (agua de mar, soluciones ácidas, sales y álcalis) y por sales

fundidas. Es mejor definida como aquella que implica un transporte simultaneo de electricidad a través de un electrolito (J. Genesca / 1992).

Esta clasificación es útil cuando se quiere estudiar los mecanismos de ataque.

B. Clasificación según su forma (J. Moreno / 1991)

B.1 Generalizada:

La Corrosión Uniforme, es aquella donde el ataque se extiende en forma homogénea sobre la superficie metálica, y su penetración media es igual en todos los puntos, este tipo de corrosión nos permite evaluar la vida útil de los materiales expuestos a él. Esta es la forma más benigna de corrosión.

B.2 Localizada:

La Corrosión en Placas, se da cuando el ataque se extiende más en algunas zonas, pero se presenta en forma general, abarca los casos intermedios entre la corrosión localizada y la corrosión uniforme.

La Corrosión por Picado, se da cuando el ataque se localiza en puntos aislados de superficies metálicas pasivas, y se propaga hacia el interior del metal, en ocasiones formando túneles microscópicos. En este tipo de corrosión se encuentra clasificada la llamada corrosión en rendijas, la cual se presenta en uniones e intersticios, donde la renovación del medio corrosivo solo se puede provocar.

La Corrosión Intergranular, se presenta como una franja estrecha de ataque que se propaga a lo largo de los límites de grano.

La Corrosión Fisurante o bajo tensión, se presenta cuando un metal es 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 hasta el interior del metal, hasta que las tensiones se relajan o el metal se fractura.

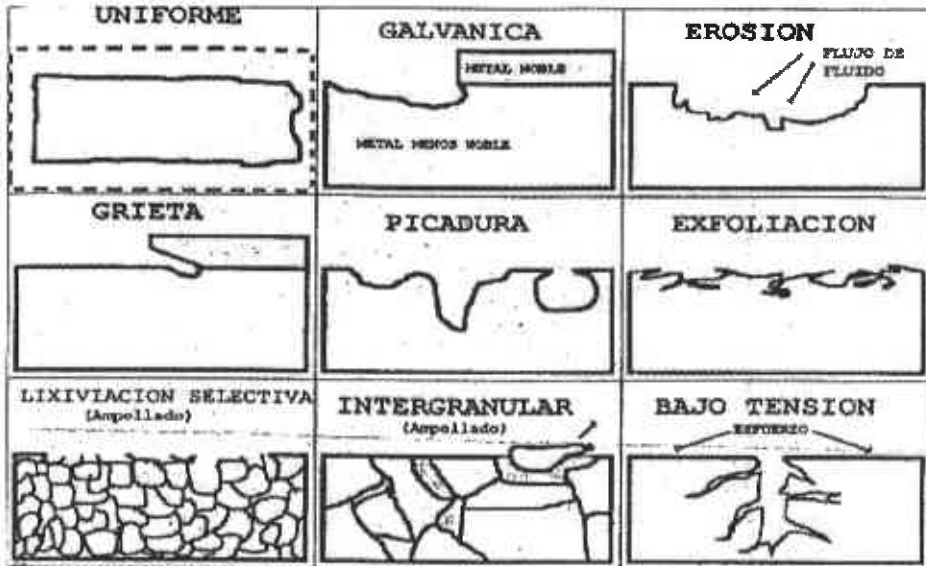
La Corrosión Galvanica, ocurre cuando dos metales diferentes se juntan por una senda conductiva, este tipo de corrosión puede ser de naturaleza uniforme o no uniforme.

La Corrosión de Erosión se da cuando el fluido líquido y materiales lijantes, impiden la formación de una membrana protectora y exponen continuamente el material fresco al ambiente. El rozamiento y la cavitación son formas especiales de este tipo de corrosión.

La Corrosión por Grietas se da en grietas que se encuentran en empaquetaduras, juntas solapadas, tornillos, etc.; o es creada por depósitos de barro o acumulación de productos de corrosión.

Esta es útil cuando se requiera evaluar los daños producidos por la corrosión. Las formas más peligrosas en que puede presentarse la corrosión son la corrosión por picado, la intergranular y la fisurante.

Figura 2. Tipos de corrosión en acero.



Tomada de: Tesis "Detección de problemas de corrosión microbiiológica en instalaciones de PEMEX, exploración y producción" / J. Moreno / 1991.

IV.2 CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA Ó BIOCORROSIÓN

Este es un problema ya conocido desde 1891, año en el que se sugirió, definiéndose en 1910, hoy en día es un campo muy importante de investigación, esto se debe a que ciertos microorganismos que provocan corrosión se encuentran en casi todo ambiente en la industria; en circuitos de enfriamiento, en sistemas de tratamiento de agua, así como en muchos otros equipos (S. Tejada / 2001).

La corrosión microbiiológica puede definirse como el deterioro de un metal como resultado en forma directa o indirecta del metabolismo microbii. La corrosión como resultado de la actividad de las bacterias sulfato reductoras, es debida a que estos microorganismos tienen la habilidad de convertir los sulfatos a ácido sulfhídrico. Por otro lado, la corrosión producida en la vecindad de los depósitos

de lodo bacterianos o "Biopelículas" (Biofilm) como resultado indirectamente de la presencia de microorganismos activos (S. Tejada / 2001).

La corrosión microbiológica es un fenómeno que incluye la corrosión electroquímica y la galvánica, ambos tipos de corrosión están basados en la concentración diferencial de oxígeno. Se ha demostrado que casi todos los metales y aleaciones usadas hoy en día, con la posible excepción de titanio, son susceptibles a la corrosión microbiológica (S. Tejada / 2001).

En investigaciones recientes se han encontrado muchas especies de bacterias que pueden contribuir a la corrosión del metal, aunque hay que recordar que se considera que más del 99% de estos microorganismos presentes *in vivo* no podían cultivarse a través de técnicas microbiológicas estándares (S. Le Borgne / 2002).

IV.2.1 FACTORES E INDICADORES DE LA BIOCORROSIÓN

Los factores por los cuales los microorganismos pueden contribuir a la corrosión dependen de las características fisiológicas de cada microorganismo, pero en general son (S. Tejada / 1994):

- i. Cambio o destrucción en la resistencia de la película del metal a causa del metabolismo o de los productos del metabolismo del microorganismo.
- ii. Creación de un ambiente corrosivo, producción de metabolitos ácidos por los microorganismos pudiendo excretar ácidos orgánicos y/o inorgánicos.
- iii. Por su crecimiento y multiplicación establecen una barrera además de crear una celda de concentración en la superficie del metal.
- iv. Influencia directa en la velocidad de la reacción anódica o catódica.
- v. Consumiendo ciertas sustancias inhibitoras.

Hay una serie de indicadores que nos pueden ayudar a reconocer este tipo de corrosión como son la presencia de:

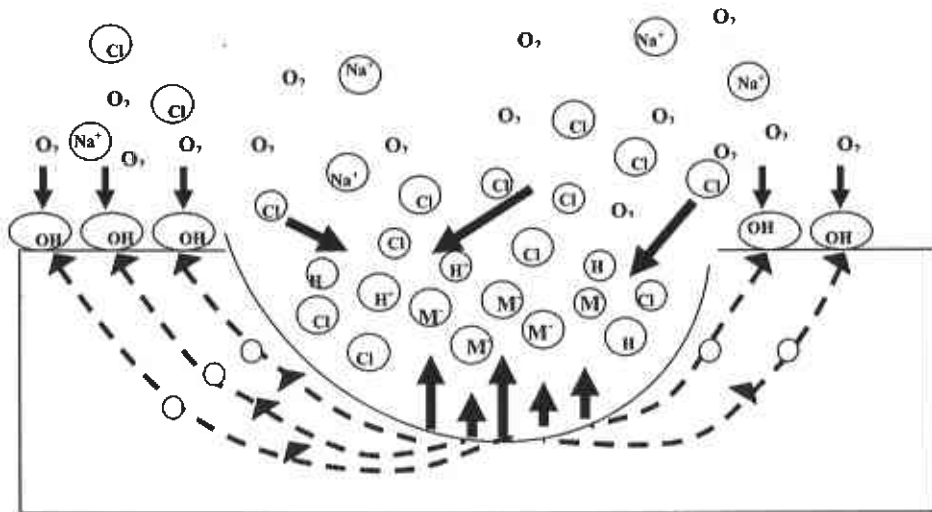
- a) Corrosión en picadura en vez de tipos laterales.
- b) Presencia de masas microbianas o biopelículas.
- c) Ácido sulfhídrico en sistemas anaerobios.
- d) Hidróxido férrico en sistemas aerobios.
- e) Poblaciones extensas de hongos o bacterias.
- f) Circuitos acuosos o no acuosos que permitan acumulación de agua en algunas áreas.
- g) El pH no es un indicador de confianza, ya que la mayor parte de la corrosión microbiológica se presenta en un rango entre 4.0 – 9.0, aunque vale la pena aclarar que existen numerosas excepciones.

Los organismos microscópicos y macroscópicos que producen corrosión se han observado que viven y se reproducen en un intervalo de pH 0 a 11, a temperaturas entre -1°C a 82°C, y bajo presiones de hasta 1000 atmósferas (S. Tejada / 1994).

Estos organismos realizan reacciones químicas, ingieren alimentos (nutrientes) y eliminan productos de desecho (metabolitos). En términos generales se puede decir que los factores que influyen en la corrosión microbiológica son de tres tipos (S. Tejada / 1994):

- El estado en que se encuentra el material.
- La influencia del medio (composición química, temperatura, pH, la luz, etc.).
- La acción de los microorganismos.

Figura 3. Fenómeno de corrosión causada por microorganismos



Tomada de: Biocorrosión / <http://www.monografias.com/trabajos15/biocorrosion/biocorrosion.shtml>

IV.3 MEDICIÓN DE LA BIOCORROSIÓN

Una forma de medir la corrosión producida por un consorcio microbiano es a través de técnicas electroquímicas como la denominada "Resistencia a la polarización". A continuación se describe brevemente los fundamentos de esta técnica (A. Cortés et al / 2005).

IV.3.1 TÉCNICA ELECTROQUÍMICA: POLARIZACIÓN

La polarización es el desplazamiento del potencial de equilibrio o de reposo en una reacción reducción - oxidación (redox). Al sumergir los metales en una solución acuosa éstos adquieren una diferencia de potencial respecto al de equilibrio (E_{eq}). Debido a que se genera una interfase entre el metal y la solución, conocida como doble capa electroquímica, de unas cuantas micras forma cargas positivas y negativas que crean un campo eléctrico. La reacción electroquímica de oxidación que da lugar a la disolución del metal modifica el potencial de equilibrio

del sistema. Con la ayuda de un voltímetro es posible registrar la evolución del potencial sistema metal – solución (A. Cortés et al / 2005):

$$\Delta E_{eq} = E_{metal} - E_{solución}$$

La disolución en el metal da lugar al desarrollo de un proceso de corrosión, alejando el potencial del equilibrio (A. Cortés et al / 2005).

$$\Delta E_{eq} = [E_{metal} - \Delta] - E_{solución} \quad \Delta E_{eq}$$

Este desplazamiento de potencial se conoce como potencial (Δ). Al potencial fuera del equilibrio se le llama potencial de corrosión (E_{corr}), o potencial mixto, donde está involucrado el potencial del metal que se oxida o disuelve (A. Cortés et al / 2005).

$$\Delta E_{eq} = [E_{metal} - \Delta] - E_{solución} = E_{corr} = E_{mixto}$$

IV.3.2 RESISTENCIA A LA POLARIZACIÓN

Una de las técnicas electroquímicas para medir potenciales es la resistencia de polarización (R_p) de Stern – Geary. La técnica consiste en desplazar al sistema de su potencial de equilibrio E_{corr} , a otro valor de potencial ya sea católicamente o anódicamente, registrándose las variaciones de potencial (ΔE) y de corriente (ΔI) en el sistema debido a este desplazamiento (A. Cortés et al / 2005).

La ecuación para el cálculo de la velocidad de corrosión, i_{corr} , a partir de aplicar la R_p se obtiene a través de la ley de Ohm despejando la resistencia (R):

$$E = IR$$

$$R = E/I$$

Donde E es el potencial, I la corriente, y R la resistencia.

La resistencia de polarización se puede definir en función del desplazamiento de potencial:

$$R_p = E / \Delta E / \Delta I$$

A través de esta polarización y de pendientes de Tafel, la velocidad de corrosión se expresa de acuerdo a la ecuación de Stern – Geary:

$$\Delta E / \Delta I = [(b_a \cdot b_c) / (2.3 \cdot (b_a + b_c)) \cdot I_{corr}]$$

Donde B es la constante de Tafel

$$B = [(b_a \cdot b_c) / (2.3 \cdot (b_a + b_c))]$$

Por lo tanto $\Delta E / \Delta I = B / I_{corr}$

$$R_p = B / I_{corr}$$

Si se divide la I_{corr} por unidad de área se obtienen la densidad de corriente de corrosión que es igual a la velocidad de corrosión (A. Cortés et al / 2005).

$$i_{corr} = I_{corr} / \text{área}$$

IV.4 INHIBIDORES

La corrosión microbiológica se conoce desde principios de los 90's, pero un factor importante de su aumento en la investigación fue el cambio en los procedimientos de control de incrustaciones y corrosión. Tradicionalmente para llevar a cabo este

control, se adicionaba ácido (generalmente H_2SO_4), teniendo un intervalo de pH en el que no se formaban incrustaciones. Si el valor se encontraba en el intervalo de $5.5 < pH < 6.5$ en circuitos de enfriamiento, se adicionan además inhibidores de corrosión de metales pesados, por medio de cromatos, que por su toxicidad evitaban la corrosión electroquímica y la microbiológica. Ninguna bacteria sobrevivía a una concentración de 48 mg / L de cromatos, pero esta concentración resulto muy toxica, por lo que se destituyó conservando solo una protección contra la corrosión electroquímica, aumentando con esto la biocorrosión (L. Vazquez / 1992).

El problema hoy en día son los tratamientos con varios biocidas, lo cual da lugar a la selectividad y la investigación de su comportamiento.

Ninguno es realmente efectivo, por lo que se tiene que tener un completo conocimiento del sistema a tratar ya que hay numerosos factores que afectan su efectividad, hay que determinar los parámetros más importantes que tienen influencia sobre el biocida, como los microorganismos presentes en el sistema a tratar, lo cual permite seleccionar un efectivo programa de control microbiológico, ya que cada especie microbiana tiene una respuesta particular a un biocida (S. Tejada / 1994).

IV.4.1 INHIBIDOR

Es un compuesto químico o formulación, ya sea orgánico o inorgánico, que se adiciona al fluido transportado en concentraciones adecuadas para controlar o reducir la corrosión. Las características principales que debe cumplir un inhibidor de corrosión son (J. Moreno / 1991):

1. Debe proteger el sistema de la corrosión adecuadamente.
2. Ser empleado en muy pequeña cantidad.
3. Qué sea económico.

4. No debe alterar el proceso del sistema a proteger.
5. Debe ser fácil en su manejo y almacenamiento.
6. No debe ser tóxico ni contaminante.

Algunas de las consideraciones preliminares que deben tomarse en cuenta para la selección de un inhibidor de corrosión son (PEMEX / 2000):

- a. Conocer la composición del fluido, ya que esta relacionada con la existencia de compuestos corrosivos como el ácido sulfhídrico, bióxido de carbono, determinación de parafinas o asfáltenos, cloruros o bacterias, sustancias que dificultaran el mecanismo de formación de la película del inhibidor entre otros aspectos.
- b. La relación de fluido / volumen, es determinante para calcular la dosificación del inhibidor necesario para proteger adecuadamente de la corrosión interior en un ducto.
- c. Cuando se eleva la relación agua / aceite, el tiempo de contacto de un punto dado del sistema con el agua se incrementa, al igual que la velocidad de corrosión, por lo que, si el contenido de agua o la fase acuosa predomina, el criterio de selección debe ser orientado a un producto soluble en agua.
- d. La temperatura es un factor de importancia en la selección de un inhibidor, ya que a mayor temperatura un inhibidor puede tornarse inefectivo, puede cambiar su solubilidad o degradarse.
- e. Se deben realizar evaluaciones de compatibilidad del inhibidor con el fluido mismo, así como otros productos que se adicionen, además de las pruebas de tendencia a la emulsión, formación de espuma y solubilidad en salmuera, con el fluido que se pretende mezclar.
- f. Considerar las características particulares del fluido, el volumen del producto manejado, antecedentes de fugas por corrosión interior, así como el costo-beneficio.

IV.4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES

Existen varias formas de clasificar los inhibidores de corrosión, de las cuales la más aceptada es debido a su mecanismo de acción. Esta clasificación comprende a los inhibidores pasivadores, convertidores de película, inhibidores de adsorción o filmicos, neutralizantes, secuestrantes y misceláneos. Los primeros tres grupos son los más numerosos y corresponden a compuestos que pueden formar barreras entre el metal y el medio agresivo, mientras que los secuestradores y neutralizadores actúan sobre el medio, eliminando agentes agresivos, tales como el ion hidrógeno o el oxígeno disuelto entre otros (PEMEX / 2000).

De acuerdo a otras formas de clasificación, estos inhibidores pueden clasificarse en anódicos, catódicos o mixtos, de acuerdo a la reacción que inhiben preferentemente, o bien, de acuerdo a su composición química, estos compuestos son de tipo orgánico, al cual pertenece el Glutaraldehído (PEMEX / 2000).

IV.4.3 BIOCIDA

Término que significa "Mata-vida" (*M. Betancourt / 2004*). Este es aplicado a los productos químicos utilizados para destruir organismos vivos que también interfieren o amenazan la salud y las actividades humanas. Entre ellos están los bactericidas, los herbicidas (para controlar malezas), los nematocidas (contra gusanos y similares), los insecticidas (contra las plagas de insectos), los acaricidas (contra los ácaros), los fungicidas (contra hongos y moho), y los raticidas. Generalmente no se incluyen los antibióticos usados en medicina (*R. Chang / 1992*).

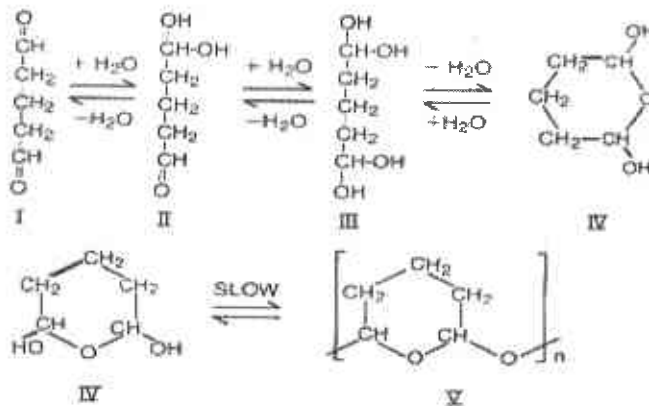
En Corrosión se denomina un biocida un inhibidor de tipo misceláneo; los biocidas son compuestos químicos que se utilizan para disminuir y controlar la población de bacterias. Pueden ser considerados como inhibidores de la corrosión, ya que al

disminuir la población bacteriana, la corrosión ocasionada por la presencia de esta clase de microorganismos, también disminuye (PEMEX / 2000).

IV.4.4 EL GLUTARALDEHÍDO

El glutaraldehído (1,5 – pentanedial) es uno de los microbicidas más eficientes que se conocen. Estructuralmente, el glutaraldehído es un dialdehído lineal de 5 carbonos en el agua, el glutaraldehído existe como una mezcla en equilibrio (Figura 5), la forma cíclica (IV) existe tanto en forma cis como trans, por lo tanto, existen cinco distintas formas del glutaraldehído en solución (Robert G. Eagar et al / 1986).

Figura 4. Formas químicas del Glutaraldehído en agua



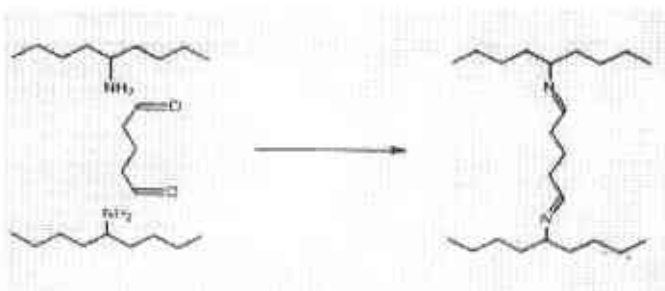
Tomada de: Artículo / "Glutaraldehyde. Impact on Corrosion Causing Biofilms" / R. Eagar et al / 1986.

Como aldehído, el glutaraldehído puede sufrir las reacciones típicas asociadas con los aldehídos tales como la oxidación, reducción y condensación. La principal habilidad de los aldehídos son las reacciones de alquilación. El glutaraldehído puede alquilar a iones sulfhidrilo, hidroxilo y carboxilo; sin embargo, las reacciones más importantes del glutaraldehído ocurren con los residuos amino. Bajo condiciones normales de uso, la reactividad del glutaraldehído con los grupos

amino se limita al amoníaco y a las aminas primarias. Además, la reactividad del glutaraldehído con las aminas, está limitada a aquellas con aminas libres (Robert G. Eagar et al / 1986).

El glutaraldehído es ideal para puentes o cruzamientos con los grupos amino, al tener 5 carbonos en su estructura, la reactividad de su puenteo es la máxima de los aldehídos lineales, además, de que los puentes producidos por el glutaraldehído son mucho más estables a la hidrólisis que aquellos introducidos por otros aldehídos (Robert G. Eagar et al / 1986).

Figura 5. "Puentes" o cruzamiento del Glutaraldehído con los grupos amino



Tomada de: Artículo / "Glutaraldehyde. Impact on Corrosion Causing Biofilms" / R. Eagar et al / 1986.

IV.4.4.1 ACTIVIDAD BIOCIDA DEL GLUTARALDEHÍDO

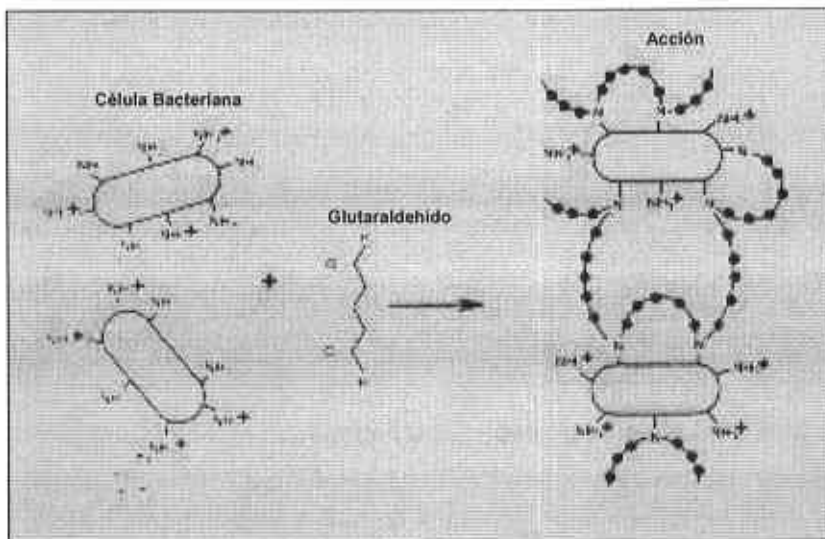
Los factores que influyen en la actividad biocida del Glutaraldehído son el pH, el tiempo de contacto, la temperatura, la concentración en que es usado, matriz y naturaleza del sistema en que se encuentre. Siendo el pH el que tiene una mayor influencia sobre la acción biocida, ya que las aminas del glutaraldehído, al igual que las encontradas en la superficie celular, son influenciadas a la clásica manera ácida-base (Robert G. Eagar et al / 1986).

El pK para las aminas es normalmente alrededor de 9, encontrándose aproximadamente el 50% de las aminas protonadas y el 50% en su forma libre (Robert G. Eagar et al / 1986).

Estas aminas libres o no protonadas sirven para recibir el ataque del glutaraldehído, por consiguiente, cuando el pH se incrementa de ácido a básico, se forma un mayor número de sitios activos de ataque para el glutaraldehído (Robert G. Eagar et al / 1986).

Hasta aquí a un pH ligeramente básico, una distribución de aminas tanto protonadas como libres existirán en la superficie de la célula, según se muestra en la figura 6.

Figura 6. Mecanismo de acción del Glutaraldehído a pH básico.



Tomada de: Artículo / "Glutaraldehyde. Impact on Corrosion Causing Biofilms" / R. Eagar et al / 1986.

Bajo estas condiciones, el glutaraldehído forma rápidamente "puenteos" con la superficie de la célula. El resultado, la célula "puenteada" no podrá transportar

fácilmente los nutrientes hacia su interior, ni podrá arrojar sus excrementos fuera de ella, al final, la célula se irá degenerando hasta sufrir un shock osmótico (Robert G. Eagar et al / 1986).

Si el pH del medio circundante al microorganismo es ácido, existirán pocos residuos amino y por lo tanto habrá pocos radicales libres. Bajo estas condiciones, predomina otra ruta química (Robert G. Eagar et al / 1986).

El glutaraldehído tiene una molécula relativamente pequeña y puede penetrar en la pared de la célula si hay pocos sitios reactivos, ya que los microorganismos mantienen un pH interno cercano a la neutralidad, diferente al pH externo, un razonable porcentaje de grupos aminos internos serán de la forma de aminas libres. El glutaraldehído posee una molécula pequeña que atraviesa la pared celular, por lo cual reaccionará con dichos grupos amino y "punteará" la célula en su interior (Robert G. Eagar et al / 1986).

Por tanto, es de esperarse, que el rango de acción bajo las condiciones básicas sea mucho más rápido, ya que no se quiere penetración celular (Robert G. Eagar et al / 1987).

IV.5 LA CÉLULA MICROBIANA

Para comprender la acción microbicida del glutaraldehído es necesario explicar la estructura de la célula bacteriana (<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm>).

Existen dos tipos básicos de células que son estructuralmente muy diferentes: los procariontes y eucariontes.

Las bacterias son células procariontes. Estas células poseen un cromosoma sin membrana nuclear, que se halla en el citoplasma. Algunos investigadores se refieren a este cromosoma como nucleóide o núcleo primitivo. Otra de las

características principales de las células procariontes es que no poseen organelos rodeados por membranas como retículos endoplásmicos, mitocondrias, aparato de Golgi o lisosomas.

Las bacterias poseen las siguientes características:

- * Presentan una pared celular, con excepción de los Micoplasmas, al exterior de la célula que otorga rigidez y protección en medios osmóticamente inadecuados.
- * La membrana citoplasmática, tiene una estructura trilaminar típica y esta formada por lípidos, proteínas y pequeñas cantidades de hidratos de carbono.
- * Se reproducen por fisión binaria o división simple.
- * No tienen un núcleo verdadero, sino un cromosoma de DNA que se encuentra, más o menos libre en el citoplasma.
- * No poseen organelos rodeados por membranas.
- * Pueden formar una cápsula (glicocalix).
- * Sus ribosomas son 70s formados por las subunidades 30s y 50s.
- * Poseen gránulos citoplasmáticos que son acumulaciones de materiales de reserva como polisacáridos, lípidos y polifosfatos.

Dentro de las bacterias existen tres grupos que pueden ser diferenciados por la estructura de su pared celular.

IV.5.1 BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Las bacterias Gram positivas, son células con una gruesa pared celular de peptidoglicano. Estas células tienen una membrana citoplasmática con fosfolípidos y proteínas. Al exterior de la membrana citoplasmática, se encuentra la pared celular que está compuesta por una ancha capa de peptidoglicano. Este peptidoglicano es una macromolécula gigante formada por cadenas de un dímero compuesto por N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. A su vez, estas cadenas

se encuentran unidas entre sí, mediante péptidos, que son característicos de las distintas bacterias y presentan mayor rigidez cuanto más completo sea el entrecruzamiento, evitando que la célula estalle en medios hipotónicos.

La pared celular Gram positiva también contiene ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos. Los ácidos teicoicos son cadenas de ribitol o glicerol unidas por fosfodiésteres y están unidos covalentemente al peptidoglicano por medio de grupos fosfodiéster en el oxidrilo del C₆ del N-acetilmurámico. Los ácidos lipoteicoicos, se encuentran anclados en la membrana citoplasmática y no están unidos al peptidoglicano. La función de estos compuestos sería estructural, pero existen evidencias que indican que también participarían en la regulación de las enzimas hidrolíticas que renuevan la pared celular (autolisinas) y que serían sitios de fijación de fagos.

IV.5.2 BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram negativas, son células con una delgada capa de peptidoglicano y una segunda envoltura denominada membrana externa.

Las células se encuentran envueltas por una membrana citoplasmática formada por una bicapa fosfolipídica y proteínas. Por arriba de esta membrana se encuentra una fina capa de peptidoglicano que se halla unida covalentemente a unas lipoproteínas de anclaje que fijan la membrana externa por medio de porciones lipofílicas. Entre la membrana citoplasmática y la membrana externa queda delimitado el espacio periplásmico. Este espacio es ocupado por el periplasma que es mantenida mediante los oligosacáridos derivados de membrana, y en la que se hallan componentes catalíticos de suma importancia para la viabilidad celular.

La membrana externa tiene una estructura de bicapa asimétrica en donde la cara externa esta compuesta por el lipopolisacarido y la cara interna por fosfolípidos.

Además, esta membrana es rica en proteínas, algunas de las cuales se denominan porinas.

La membrana externa funciona como una barrera de permeabilidad para ciertas sustancias como antimicrobianos y retrasa la entrada de otros que son inactivados en el periplasma. El lipopolisacárido está formado por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), el polisacárido del centro (KDO) y el lípido A (endotoxina). La presencia del lipopolisacárido en la membrana externa le confiere a la célula una efectiva protección contra enzimas digestivas y detergentes como las sales biliares, y dota a la superficie bacteriana con una fuerte hidrofiliidad que permite a la célula evadir la fagocitosis, tener cierta resistencia al complemento, evitar la respuesta inmune específica por alteración de la superficie antigénica y adherirse a ciertas células del hospedador.

Las porinas son poros o canales proteicos no específicos que pueden ser atravesados por pequeñas moléculas hidrofílicas. En la membrana externa se encuentran otras proteínas que funcionan como canales de difusión específicos y facilitan el paso de oligosacáridos.

IV.5.3 BACTERIAS BAAR

La pared de las Mycobacterias posee un alto contenido de lípidos que la hace impermeable a los agentes hidrofílicos, por lo tanto estos microorganismos no se tiñen adecuadamente con los reactivos utilizados en la coloración de Gram y no pueden ser clasificados como gram positivos o negativos.

Las Mycobacterias son teñidas adecuadamente por el método de Ziehl-Neelsen (tinción ácido rápida) que se utiliza como solución decolorante una mezcla de etanol y ácido clorhídrico. Estos microorganismos una vez colorados son resistente a la decoloración ácido-alcohólica y por eso se denominan Bacilos Ácido Alcohol Resistentes.

Los microorganismos del género *Mycobacterium* contienen una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica. Por encima de esta membrana se encuentra el rígido peptidoglicano que contiene N-glucolilmurámico en lugar de N-acetilglucosamina. Por medio de una unión fosfodiéster, el peptidoglicano se halla unido covalentemente al arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa.

En la porción más distal y externa de las arabinogalactanos se hallan fijados los ácidos micólicos que contienen cadenas carbonatadas (C₆₀ a C₉₀). Los glucolípidos son un grupo de compuestos que se encuentran asociados no covalentemente a los ácidos micólicos y se ubican periféricamente en la red.

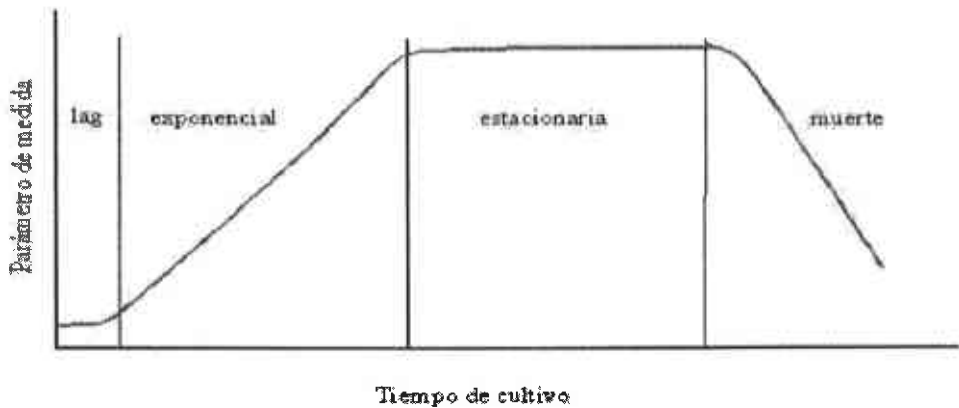
El lipoarabinomanano (LAM), es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática. El LAM es considerado como el equivalente Mycobacteriano del lipopolisacarido de las gram negativas, debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de Mycobacterias más virulentas la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM) a diferencia de las cepas no virulentas no están recubiertas (araLAM). Además, el LAM también podría servir como poro para el paso de los nutrientes a través de la pared celular.

IV.6 CRECIMIENTO MICROBIANO

Un cultivo microbiano simple y homogéneo tiene un ciclo "*in vitro*" de crecimiento como el que se reproduce a continuación:

Este ciclo tiene una morfología y una división de células asincrónica. Se divide en cuatro fases:

Figura 7. Curva de crecimiento microbiano clásico



Tomada de: Modelo matemático del crecimiento de bacterias /

<http://www.monografias.com/trabajos27/crecimiento-bacteriano/crecimiento-bacteriano.shtml>

Se pueden distinguir cuatro fases en el cultivo:

1. La fase de latencia, en la que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder crecer activamente. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo.
2. La fase exponencial, es la fase donde se produce un incremento exponencial del número de microorganismos.
3. La fase estacionaria, en la que no hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros.
4. La fase de muerte, en la que el número de microorganismos vivos disminuye de forma exponencial con una constante k que depende de diferentes circunstancias.

IV.6.1 MEDIDA DEL CRECIMIENTO

El cálculo del número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopía, número de colonias), masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular, turbidimetría) o actividad celular (grado de actividad bioquímica con relación al tamaño de la población). Todos estos métodos se clasifican en dos apartados: métodos directos y métodos indirectos (<http://www.uqr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>).

MÉTODOS DIRECTOS:

- Peso seco celular
- Determinación de nitrógeno o de proteínas totales
- Determinación de DNA

MÉTODOS INDIRECTOS:

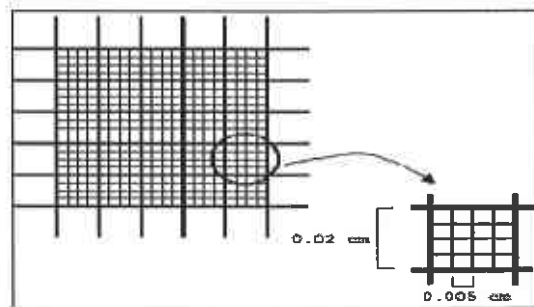
- Recuento de colonias en placa
- Recuento sobre filtro de membrana
- Consumo de oxígeno
- Liberación de dióxido de carbono
- Concentración de un enzima constitutivo
- Decoloración de un colorante
- Incorporación de precursores radiactivos
- Medida de la turbidez

Podemos medir el crecimiento microbiano siguiendo diferentes parámetros físicos, algunos de los cuales se presentan a continuación. No debemos olvidar que en condiciones de crecimiento equilibrado todos los parámetros del cultivo evolucionan de forma proporcional y, por consiguiente, midiendo uno de ellos podemos medir el resto.

Entre los métodos principales de recuento de microorganismos podemos destacar:

1. Las técnicas de recuento microscópico de células sin fijar usando microscopía de contraste de fase. Para ello se cuenta el número de partículas en un volumen determinado usando una cámara de Petroff-Hausser o de Neubauer (portaobjetos modificado en el que una rejilla nos permite conocer el volumen que estamos observando). El procedimiento es rápido y sencillo; pero no permite distinguir células vivas inmóviles de células muertas.

Figura 8. Cámara de recuento de Petroff-Hausser



Tomada de: Ciclo celular y crecimiento bacteriano /
<http://www.uqr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>

Tabla 2. Recuento de Microorganismos

Tipo de cuadro	Área [cm ²]	Volumen [mL]	Factor [1/Volumen]
Cuadrado total	1.00 x 10 ⁻²	2.00 x 10 ⁻⁵	5.00 x 10 ⁴
Cuadrado grande	4.00 x 10 ⁻⁴	8.00 x 10 ⁻⁷	1.25 x 10 ⁶
Cuadrado pequeño	2.50 x 10 ⁻⁵	5.00 x 10 ⁻⁸	2.00 x 10 ⁷

$$\frac{\text{Número total de microorganismos}}{\text{ml}} = \frac{\text{Bacterias contadas} \cdot \frac{1}{\text{dilución}}}{\text{Número de cuadrados contados} \cdot \text{Volumen del cuadrado}}$$

2. Contaje de partículas utilizando sistemas automáticos del tipo Coulter-Counter. La operación de estos sistemas es sencilla (método de empleo) y permite rápidamente determinar el número de partículas presentes en una suspensión y la distribución de sus tamaños. El problema es que no distingue entre células vivas y muertas ni entre células y agregados de material insoluble presente en la suspensión del cultivo.

3. Técnicas de recuento en placa, basadas en colocar en un medio de cultivo adecuado un volumen determinado de muestra. Cada una de las células aisladas dará lugar, después de la incubación correspondiente, a una colonia de forma que el número de estas nos permitirá estimar el número de células presentes en la muestra sembrada.

El sistema es fácil de utilizar en el caso de células aisladas (no sirve en el caso de hongos filamentosos, por ejemplo). Puede realizarse sembrando en superficie (extendiendo un volumen dado de muestra sobre el medio de cultivo sólido) o en profundidad (mezclando un volumen dado de muestra con el medio de cultivo antes que solidifique). Esta última opción permite realizar el recuento de microorganismos microaerófilos que no crecen bien en la superficie de las placas de cultivo. Para que el sistema de recuento en placa tenga validez estadística, es necesario contar entre 30 y 300 colonias con objeto de disminuir el error de la medida.

4. Técnicas turbidométricas basadas en la medida de la turbidez de los medios de cultivo en los que crecen microorganismos unicelulares. La turbidez es proporcional a la masa de las partículas en suspensión (células) y su medida nos permite estimarla. Para ello se utiliza un equipo similar al que se emplea en la medida de la absorbancia de luz por disoluciones coloreadas (colorímetro, por ejemplo). Las medidas se hacen a una longitud de onda adecuada (normalmente en el entorno de 550 nm) y los valores se suelen denominar valores de densidad óptica. La limitación de este sistema, por otra parte muy

sencillo, es que no distingue células vivas de muertas y que normalmente no es capaz de detectar densidades celulares menores a 10.000 células por mililitro.

5. Medida de peso seco. El sistema consiste en la filtración del cultivo a través de una membrana que retenga las células y su posterior desecación hasta peso constante. El sistema, obviamente, no diferencia células vivas de muertas y su sensibilidad es limitada.

6. Medida del ATP. Es una medida relativamente sencilla basada en la emisión de luz por la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) en presencia de O₂ y de ATP. De esta forma se puede medir la concentración de ATP en un volumen dado de cultivo. Esta medida es interesante porque la concentración de ATP decae rápidamente en las células muertas, de forma que esa medida indirecta detecta únicamente las células vivas.

IV.7 CONSORCIO MICROBIANO

Los microorganismos que frecuentemente aparecen involucrados en los procesos de corrosión pueden agruparse en general de la siguiente manera (S. Tejada / 2001):

Algas	
Hongos	
Bacterias	{ Aerobias (Ferrobacterias y Sulfobacterias)
	{ Anaerobias (Sulfatorreductoras)

A continuación se describe cada grupo (S. Tejada / 2001):

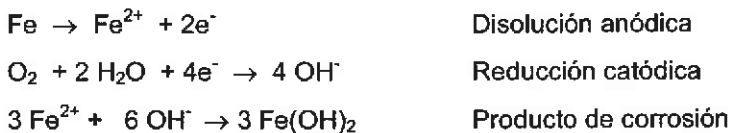
- * Algas: Son organismos litotrofos que proporciona la materia orgánica para el crecimiento de otros microorganismos.
- * Hongos: Estos crean gran daño por su actividad metabólica, versatilidad de fuente de carbono y a que secretan numerosos ácidos orgánicos en el medio.

Un ejemplo de este grupo es Cladosporium resinae el cual es el responsable de la corrosión en aluminio integral de los tanques de combustible de los aviones.

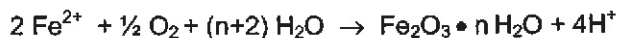
- * Bacterias: Estas generalmente se clasifican de acuerdo a su capacidad para crecer en presencia (aerobios) o ausencia de oxígeno (anaerobios).

Las bacterias aerobias favorecen la corrosión debido a la formación de celdas de aeración diferencial. En este grupo tenemos dos géneros importantes (S. Tejada / 2001):

- * Ferrobacterias: Obtienen la energía necesaria para su crecimiento a partir de la conversión de las sales ferrosas en sales férricas. Ahora bien, en las tuberías de metal ferroso y en un punto de la superficie no-protegido, o alterada que se encuentre en contacto con el agua siempre ocurre un ataque del metal que da lugar a la formación de hidróxido ferroso. En condiciones normales el hidróxido ferroso en esas tuberías rápidamente se transforma en hidróxido férrico y en carbonato debido al oxígeno y al gas carbónico disuelto. Como habíamos visto anteriormente las reacciones anódica y catódica en ausencia de bacterias pueden ser:

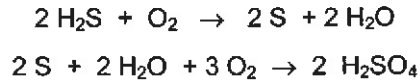


Una vez establecido este proceso de corrosión las bacterias de hierro pueden transformar el ion ferroso en un producto gelatinoso (óxidos férricos hidratados) y crear condiciones favorables para las celdas de aeración diferencial (S. Tejada / 2001).



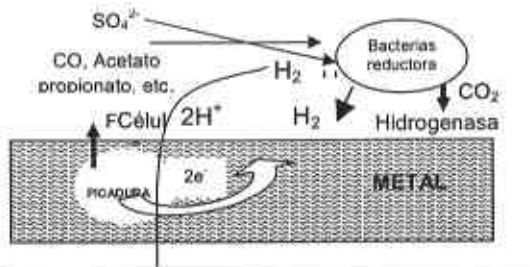
Ejemplo de estas bacterias son los géneros Ferrobacillus, Gallionella, etc.

- * Sulfobacterias: Estas bacterias metabolizan el azufre a partir de compuestos azufrados reducidos (por ejemplo el ácido sulfhídrico) y lo expulsan al medio ambiente o lo almacenan en el interior de su célula, o bien lo oxidan, con formación de productos ácidos (ejemplo ácido sulfúrico), en el primero de estos casos se producirá un sedimento, en el segundo de los casos habrá una acidificación corrosiva con una modificación del pH del medio.



Ejemplos de estas bacterias son los géneros: *Thiobacillus thiooxidans* y/o *ferrooxidans*.

Figura 9. Actividad de bacterias reductoras de sulfato sobre una superficie de aleación, las fuentes carbono estimulan la corrosión biológica que disuelve el metal.

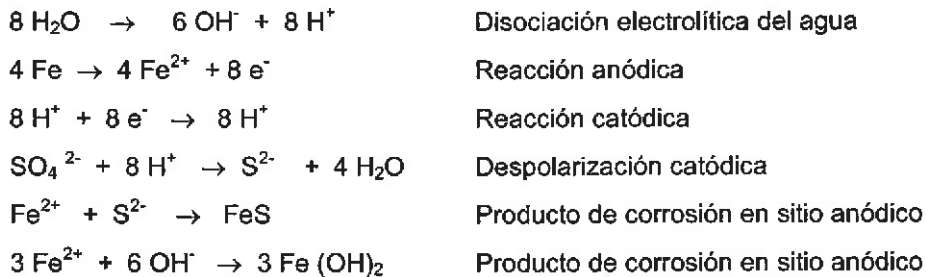


Tomada de: Biocorrosión / <http://www.monografias.com/trabajos15/biocorrosion/biocorrosion.shtml>

Por otra parte, las bacterias anaerobias realizan la llamada corrosión anaerobia, la cual se realiza en un ambiente libre o "casi libre" de oxígeno, cerca de un pH neutro, la cual es el tipo de corrosión más severa. En este grupo tenemos un género muy importante de bacterias las sulfatorreductoras. Estas bacterias son anaerobias obligadas y es posible encontrarlas bajo la herrumbre o bajo sedimentos marinos. Estas bacterias transforman los sulfatos en ácido sulfhídrico,

el cual se combinará con las sales ferrosas para dar un sulfuro negro. El ataque corrosivo causado por este tipo de bacterias es localizado (S. Tejada / 1994).

Algunos autores proponen el siguiente mecanismo para la corrosión producida por bacterias sulfarredutoras:



Ecuación Global



Existen dos géneros de bacterias sulfatorredutoras, la *Desulfovibrio* y la *Desulfotomaculum*. El género más común es el *Desulfovibrio* y la especie más conocida de este es *Desulfovibrio desulfuricans*.

Esta sección (IV.7) presentó en general los microorganismos que constituyen un consorcio microbiano, sin embargo, para conocer las características y géneros específicos de bacterias en asociación que posiblemente integran el consorcio en estudio ver el apéndice I.

IV.8 BIOPELÍCULA

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos recubiertas de un polímero extracelular que les ayuda a retener el alimento y protegerse de agentes tóxicos (P. Watnick et al / 2001).

Se forman espontáneamente en presencia de humedad y pueden vivir con mínimas trazas de nutrientes. Se adaptan a un medio adverso mientras lo cambian a su alrededor y se vuelven a adaptar, esta casualidad se basa en diversos grupos genéticos. A partir de ellos sintetizan numerosas proteínas que necesitan (G. Piera / 2003).

Se fijan fuertemente a una superficie, contra la repulsión inicial, y la modifican mientras captan más nutrientes y nuevas bacterias con las que iniciaran más cambios, por ejemplo, la síntesis del glicocalix, el polímero extracelular de tipo polisacárido que da estructura y protección a la comunidad (G. Piera / 2003).

Una biopelícula desarrollada es muy resistente, y un problema cuando se precisa un entorno limpio y desinfectado. Los microorganismos de las biopelículas pueden significar un reservorio de bacterias e involucrarse en una contaminación cruzada, obturar las conducciones de líquido y poner serias dificultades a la higiene (G. Piera / 2003).

Las actividades de las biopelículas son clasificadas por sus usos y consecuencias en dos grupos:

1. Biofouling: Contaminación producida por la actividad microbiana sobre diferentes superficies, que genera corrosión en equipos, cascos de barcos, tuberías y en sistemas de enfriamiento (Ejemplos: industria petrolera e industria del papel).
2. Biorremediación: Los biopelículas o los líquidos generados para combatir agentes externos dañinos a partir de la descomposición del material orgánico de estos (Biolixiviados), son utilizados para regenerar aguas residuales, suelos y aguas subterráneas.

IV.8.1 DEFINICIÓN

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijas a una superficie, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes (Costerton, 1995 / Kraigsley et al, 2002). Podemos encontrar biopelículas en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo necesitan un medio hidratado y una mínima presencia de nutrientes, por que pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas (Kraigsley et al / 2002). La clase de material de la superficie parece que tiene poca influencia sobre el crecimiento microbiano.

En los últimos veinte años, ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular, planctónica o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se encuentran principalmente formando parte de las biopelículas que acabamos de definir.

La biopelícula bacteriana empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas. Aunque la combinación de los factores que influyen en el desarrollo de la biopelícula depende en principio de la especie, algunas características son comunes a la mayoría de las bacterias estudiadas hasta ahora (G. Piera / 2003).

Después de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie en una monocapa, mientras forma micro colonias. Mientras tanto, las células cambian su comportamiento y dan lugar a la compleja arquitectura de la biopelícula madura. El más evidente de estos cambios es la producción de la matriz de exopolisacáridos que cementará todo el conjunto. Mientras que la biopelícula va creciendo suceden otros cambios. Si las condiciones ambientales lo

permiten, se puede extender hacia áreas no infectadas o liberar algunas células, que recuperan las cualidades planctónicas y actúan como las semillas que reparte el viento, hacia nuevas superficies.

La formación de una biopelícula pues, no es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción. Se han identificado cinco fases (G. Píera / 2003):

1. Adsorción reversible de la bacteria a la superficie.
2. Una unión irreversible
3. Primera fase de maduración con crecimiento y división.
4. Fase de producción exopolímero.
5. El desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras.

A continuación cada fase es descrita:

IV.8.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA SUPERFICIE

Las bacterias son capaces de formar biopelículas sobre muchas superficies bióticas y sobre todas las abióticas probadas (G. Píera / 2003).

La capacidad de unirse a diversos plásticos, cristal y metales, depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices. Los estudios muestran que el acero inoxidable puede ser tan susceptible como el plástico (Pedersen / 1990). La acción del aire o de la humedad sobre el acero inoxidable, poco a poco crea una capa de óxido de cromo sobre el que se pega materia orgánica. Así se pre-acondiciona el sustrato para la adhesión de las bacterias.

La biopelícula puede desarrollarse sobre casi cualquier superficie, gracias a que previamente entra en contacto la materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa orgánica, que cambia las

propiedades químicas y físicas y mejora las posibilidades de fijación de las bacterias.

IV.8.3 ADSORCIÓN Y FIJACIÓN

La adhesión de las células microbianas a un sustrato puede ser activa (por los flagelos, pili, adhesinas, cápsulas y cargas de superficie) o pasiva (por gravedad, difusión y dinámica de fluidos). En condiciones normales, las células bacterianas son repelidas por la superficie ya que presentan cargas eléctricas iguales.

En unos minutos, las bacterias libres que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria. Son atracciones de tipo electrostático o hidrófobo y fuerzas de Van der Waals, sin unión química. Si esta unión se mantiene tiempo suficiente, aparecen nuevas estructuras químicas y físicas que la harán permanente e irreversible.

En casos de gran densidad de población o ante la precariedad de nutrientes que hay en el agua potable, algunos microorganismos son capaces de responder individualmente con alteración de su pared celular para hacerla hidrófoba y, por lo tanto, con más afinidad hacia las superficies (Mallete / 1992). Cuando llegan a la capa base, más próxima a la pared de la tubería y casi sin flujo de agua, son atraídos a la superficie donde tantearán una unión e intentarán fijarse a ella.

Para adaptarse a la vida de la biopelícula, una bacteria ha de sufrir cambios radicales. El cambio del medio donde se encuentran activa diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas. Estos genes y proteínas son los que explican la fijación y la resistencia de las bacterias incluidas en las biopelículas ante los antibióticos o desinfectantes. A partir del año 2000, los avances en proteómica y en genómica han permitido avanzar en el estudio de sistemas complejos como las biopelículas. Se han podido identificar 800 proteínas

que cambian de concentración a lo largo de las cinco fases de desarrollo (Whiteley et al, 2001 / Singht et al, 2002).

IV.8.4 MADURACIÓN: EL GLICOCALIX Ó EXOPOLIMERO

La tranquilidad que reina en este ambiente, favorece el crecimiento y la división de las células y permite iniciar la fabricación de una mezcla de polímeros polianiónicos, limosa y pegajosa, que excreta al exterior para mantener unidas las células, entre ellas con la superficie.

La composición del exopolímero es poco conocida, pero consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares, como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina y otros. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos oleicos (Chmielewski et al / 2003). Se sirven de ellos para retener los nutrientes y para proteger a las bacterias de los diversos biocidas.

El glicocalix de material polimérico se excreta desde la pared celular bacteriana en una formación radicular. Se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes que encuentre (G. Piera / 2003).

Cuando los nutrientes se concentran, las células primitivas se reproducen con menos limitaciones; las células hijas producirán su propio glicocalix y aumentará exponencialmente la superficie de intercambio iónico y el volumen de una próspera colonia bacteriana (G. Piera / 2003).

IV.8.5 COOPERACIÓN ENTRE ESPECIES

Al cabo de pocos días de la primera colonización, otras células bacterianas quedan atrapadas en el glicocalix por captación física y atracción electrostática. Hongos o bacterias sin movilidad propia serán capaces de aprovechar materiales

residuales de los primeros habitantes y de producir sus propios residuos que serán aprovechados por otros microbios, a su vez (G. Píera / 2003).

Desde la biopelícula más simple (por ejemplo, una colonia bacteriana en agar nutritivo) al más complejo (las interacciones de los microorganismos patógenos en las células huésped, o las poblaciones bacterianas que viven naturalmente en el lodo), la comunidad metabólica coopera de una manera compleja, como el tejido vivo de un organismo multicelular. Si una especie genera residuos tóxicos, otra los devorará con avidez. Así se consigue coordinar los recursos bioquímicos de todos los habitantes de la biopelícula; se reúnen las diferentes enzimas de los que disponen numerosas especies de bacterias para abastecerse de aportes nutritivos que ninguna especie sola podría digerir.

Se puede desarrollar un estrato anaeróbico bajo la capa aeróbica.

La estructura se permeabiliza con una red de canales atravesados por agua, residuos bacterianos, enzimas, nutrientes, metabolitos y oxígeno. Los gradientes de iones y moléculas que se establecen entre las diversas zonas, proporcionan el impulso necesario para derivar las sustancias hacia los alrededores de la biopelícula. Es precisamente en la periferia de la estructura donde se localizan la mayoría de células viables, cuyo número se reduce con la edad de la biopelícula; en una biopelícula joven se han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan solo un 50% en una biopelícula antigua (Wimpenny et al / 2000).

IV.8.6 CRECIMIENTO Y DISPERSIÓN

La colonia, en división continua, libera periódicamente unas pocas células que se repartirán corriente abajo. Estos nuevos colonizadores lo tienen más fácil que los iniciales porque desde la biopelícula original se liberan residuos y nutrientes que podrán usar para preparar la nueva superficie con la cubierta orgánica de acondicionamiento y para alimentar otras células (Mayette / 1992). Esta

colonización está relacionada con la evolución y la supervivencia de la bacteria a largo plazo.

IV.8.7 LA PROTECCIÓN: RESISTENCIA A LOS BIOCIDAS

En los diversos medios donde se encuentran los microbios se dan situaciones de abundancia, incluso de exceso de nutrientes, y situaciones de austeridad y falta de nutrientes. Esta última situación se da en el agua potable, especialmente en los sistemas de agua de alta pureza, donde las bacterias activan estrategias propias de cada especie. Unas bacterias cambiarán su cubierta para hacerla más hidrófoba y dirigirse hacia las paredes; otros irán moviéndose directamente con sus flagelos o pili, y otros caerán al fondo por gravedad (G. Piera / 2003).

En la superficie donde lleguen habrá alguna molécula orgánica o mineral que permita un cambio energético mínimo. Las partículas del entorno o las de la misma superficie pueden suministrar el sustrato inicial, puesto que las bacterias han demostrado ser capaces de obtener nutrientes de las tuberías o del revestimiento interno del sistema hídrico. También pueden obtener trazas de metal a partir del acero inoxidable y otros componentes metálicos. Los microorganismos oligotrofos serán pues los primeros en colonizar una superficie, y las seguirán aquellos que han evolucionado para encontrar y unirse a las superficies con tal de incrementar sus posibilidades de captar nutrientes (G. Piera / 2003).

Los primeros colonizadores irán concentrando las formas orgánicas de la superficie y metabolizándolas para fabricar otras nuevas.

A partir de la formación del polímero extracelular, se incrementa notablemente la capacidad de retención de nutrientes a partir del medio. Se entretienen entre la red o se le quedan adheridos. También influye la actividad de intercambio iónico que ahí se desarrolla.

El glicocalix atrapa nutrientes y otros microbios que se mezclaran con los que ya estaban allí y con sus descendientes. Las nuevas bacterias serán capaces de utilizar como nutrientes los que otros rechacen. Finalmente se unirán todos los recursos bioquímicos de las diferentes especies de bacterias, cada una con sus enzimas, para digerir aportes alimentarios que ninguna de ellas podría aprovechar en solitario.

El exopolímero protege a los habitantes de la biopelícula de la dispersión de sustancias nutritivas, del acceso de los biocidas y de la desecación.

Los agentes químicos mejoran la capacidad de arrastre de la suciedad por la propia agua. Allá donde ella no puede, suspenden y disuelven los residuos alimentarios al reducir la tensión superficial, por emulsión de las grasas y la peptización de las proteínas. Pero aún no sabemos como los agentes químicos pueden eliminar el exopolímero asociado a las biopelículas.

Se ha demostrado que las células de la biopelícula pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas correspondientes (Brown et al / 1988). Las biopelículas presentan resistencia a un gran número de antibióticos de amplio espectro y de biocidas oxidantes (cloro, ozono, yodo, etc.). Esta característica los hace muy difícil de eliminar, incluso de controlar, en medicina y en la industria. Por otra parte, en él se han detectado enzimas hidrolíticas del tipo de la β - lactamasa, que serían sintetizados en poca cantidad pero que se mantendrían atrapados y concentrados en la matriz de la biopelícula, lo que contribuiría a su protección (G. Piera / 2003).

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la siguiente tabla se presentan los equipos e instrumentos utilizados para la realización del trabajo experimental:

Tabla 3. Equipos e Instrumentos utilizados en la parte experimental

Equipo & Instrumentos	Características
Incubadora	Marca: Thermolyne Modelo: Type 41900 Incubator No. Inventario UNAM: 1425404
Autoclave Pressure Sterilizer	Marca: All American Modelo: Model No. 1925 X No. Inventario UNAM: 1422800
Microscopio electrónico de barrido	PHILLIPS XL 30 ESEM
Microscopio electrónico	IROSCOPE MG – IIT
Refrigerador	Marca: Fisher Scientific
Espectrofotómetro	Marca: Milton Roy Modelo: Spectronic 20 D ⁺ No. Inventario UNAM: 1483854
Campana de flujo laminar	Marca: Industrias FIGURSA Modelo: CFV - 30 No. Inventario UNAM: 1476240
Baño de Agua	Marca: Lab - line Modelo: AQUABATH No. Inventario UNAM: 1987489
Balanza Analítica	Marca: Mettler Toledo Modelo: PC 400 No. Inventario UNAM: 565578

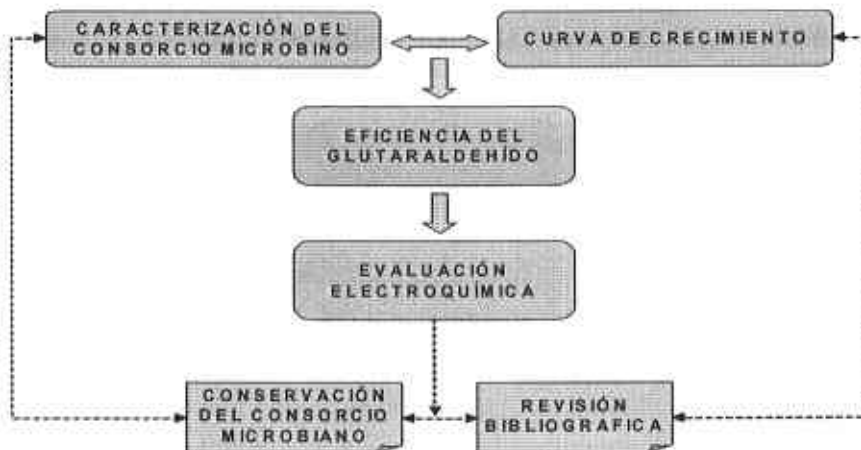
Tabla 3. Equipos e Instrumentos utilizados en la parte experimental. Continuación.

Equipo & Instrumentos	Características	
Potenciostato	Marca: ACM Instruments Modelo: GIIIAC No. Inventario: 1922234 Software: Gillac serie 802	
Micropipetas 250 mL & 1000 mL	Pipetman Gilson L-8523423	Transferpette Merck No. 7031
Cámara Neubauer	The bright linea double Neubauer Improved Ruling	

El desarrollo de este trabajo se realizó en el laboratorio 112 del edificio "B" de Posgrado de la Facultad de Química.

En la figura 10, se presenta un esquema general de las fases en que se dividió el trabajo experimental:

Figura 10. Esquema general del diseño experimental.



Como se observa en la figura anterior el primer paso fue la caracterización del consorcio microbiano, la cual incluía la evaluación del crecimiento microbiano empleando la técnica de cuenta directa para obtener la curva de crecimiento del consorcio microbiano.

Posteriormente, se realizó la evaluación de la eficiencia del glutaraldehído y la medida de corrosión a través de una técnica electroquímica. Paralelamente al desarrollo experimental, se efectuó una revisión bibliográfica y la conservación del consorcio microbiano.

El consorcio microbiano de trabajo fue obtenido de un sistema de enfriamiento secundario; se procedió a caracterizar dicho consorcio microbiano mediante una serie de purificaciones, tinciones, y tiras API sin obtener resultados concluyentes.

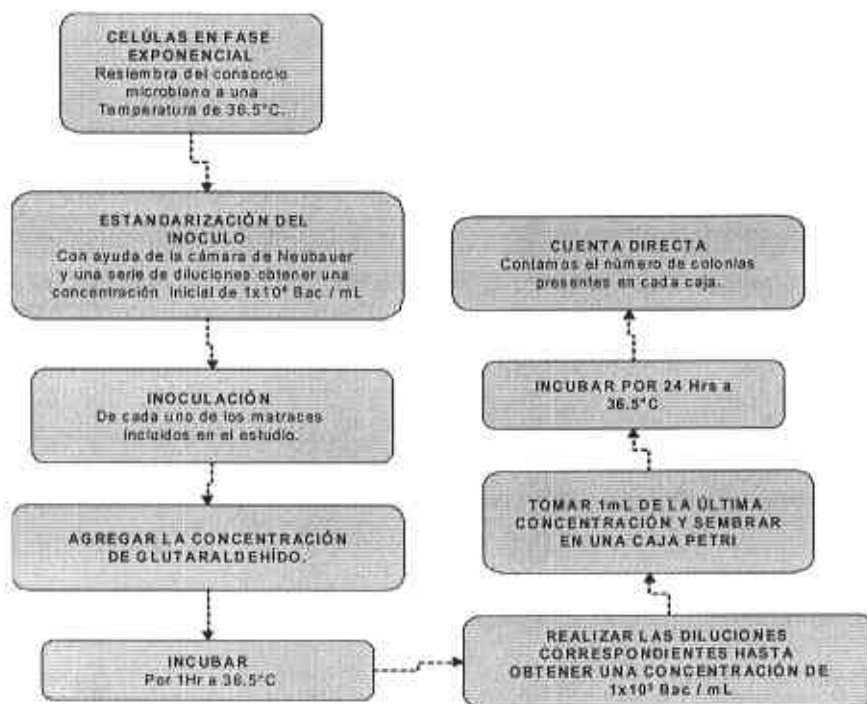
Por otra parte, se realizó el diseño experimental para comprobar la eficiencia del glutaraldehído como biocida, la matriz de trabajo utilizada fue la siguiente:

Tabla 4. Matriz experimental: Eficiencia del Glutaraldehído

Tiempo (Hs)	Concentración (ppm)			
	Control	25	50	75
0	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3	x	x	x	x
4	x	x	x	x
6	x	x	x	x
Experimento	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4

En la figura 11 se muestra el diagrama de trabajo experimental utilizado para determinar la eficiencia del glutaraldehído:

Figura 11. Diagrama de trabajo para comprobar la eficiencia del Glutaraldehído



El método de prueba empleado para determinar la eficiencia del glutaraldehído involucra una serie de diluciones y la subsiguiente incubación en un medio sólido en espera del crecimiento de las colonias microbianas, como se observa en la figura anterior.

Es importante mencionar, que este procedimiento se realizó para cada una de las concentraciones y tiempos de trabajo propuestos en la matriz experimental.

El criterio de aceptación para considerar al glutaraldehído como un biocida, de acuerdo a la técnica planteada es que debe alcanzar un Logaritmo de reducción igual a 4 o un porcentaje de muerte microbiana del 99.99% (Albert & Wilson).

Posteriormente, se ejecutó la evaluación electroquímica de la rapidez de corrosión, a través de la prueba de resistencia a la polarización medida con un potenciostato (voltímetro).

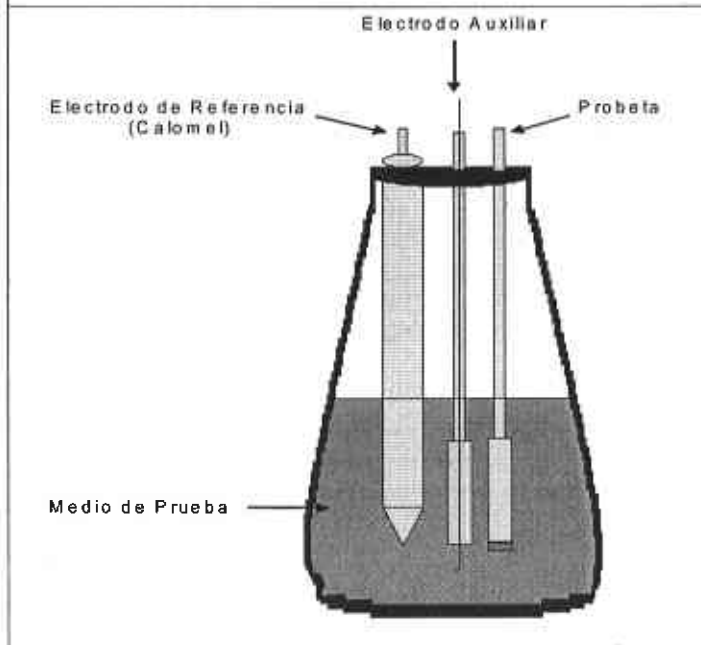
La siguiente matriz experimental muestra el estudio comparativo con las mezclas utilizadas para evaluar la corrosión y la contribución del consorcio microbiano a este fenómeno:

Tabla 5. Matriz Experimental: Medida de la Corrosión.

TIEMPO (Hs)	MEZCLA DE PRUEBA			
	NACE	NACE + CONSORCIO MICROBIANO	NACE + GLUTARALDEHIDO	NACE + CONSORCIO MICROBIANO + GLUTARALDEHIDO
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3	x	x	x	x
4	x	x	x	x
5	x	x	x	x
6	x	x	x	x
Experimento	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4

Se propuso trabajar con un sistema de prueba que consta de un matraz, una probeta de acero y un par de electrodos (Electrodo de referencia "Calomel" & Electrodo auxiliar de platino) conectados al voltímetro, para determinar la acción que cada una de las mezclas en estudio ejercían sobre una probeta de acero:

Figura 12. Sistema electroquímico utilizado



Sistema de medición electroquímico utilizado en la parte experimental /
Laboratorio 112 del Edificio "B" Posgrado. Facultad de Química,

A las siguientes condiciones de trabajo:

Tabla 6. Condiciones Electroquímicas de Trabajo

Condición	Características
Tiempo exposición	6 horas.
Software	GILLAC serie 802
Programa	Secuenciador: Programador de Pruebas Electroquímicas – Metal – Barrido. Programa de ejecución: Core running
Metal	API 5LX-52
Área	$4.4 \text{ E } 10^{-1} \text{ cm}^2$
Intervalo de Potencial	$E = -30 \text{ mV a } 30 \text{ mV}$ (Potencial de barrido)

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

VI.1 CONSORCIO MICROBIANO: CARACTERIZACIÓN

Para este estudio se utilizó un cultivo obtenido de una biopelícula retirada de un sistema de recirculación secundario de agua de un ducto petrolero.

Una muestra del cultivo microbiano fue inoculada en agar y caldo nutritivo para demostrar que efectivamente se trataba de un consorcio microbiano. Es importante mencionar, que la adaptación del consorcio microbiano a estos medios fue imposible, por lo cual, se decidió trabajar con medio NACE para lograr el aumento de la población.

El medio NACE, permite simular el contenido del agua marina, debido a la cantidad de sales inorgánicas que posee, las condiciones nutricionales y el pH cercano a la neutralidad, para conocer su composición ver el apéndice II.

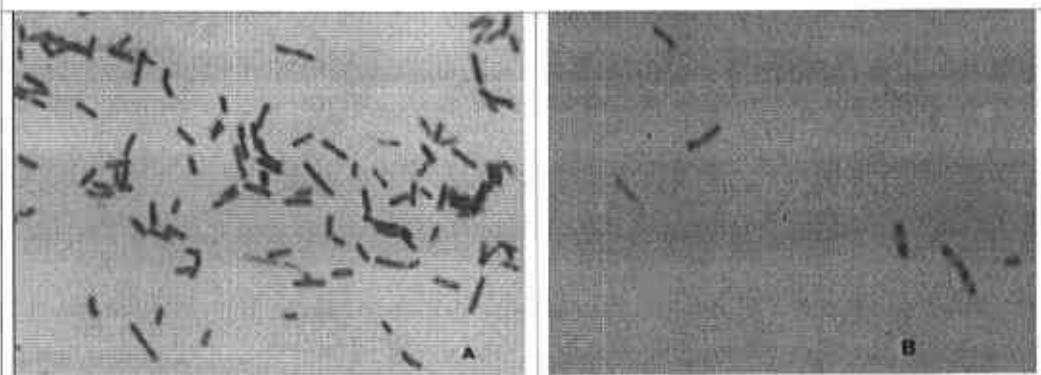
Al realizar observaciones culturales y morfológicas del consorcio microbiano, se encontró que efectivamente se trataba de un cultivo mixto al presentar el agar por lo menos seis diferentes morfologías de colonias, posteriormente se realizó una serie de tinciones Gram para determinar las diferentes características morfológicas, las cuales se presentan en la tabla 7:

Tabla 7. Características morfológicas del consorcio microbiano

Número	Características		
	Macroscópicas	Microscópicas	
A	Colonia beige, redonda de bordes planos.	Bacilos cortos / G -	Bacilos cortos en cadenas / G +
B	Colonia redonda de color amarillo paja.	Bacilos G + con inclusiones	Bacilos cortos G -
C	Colonia blanca aterciopelada, de bordes irregulares.	Bacilos G- con forma lobulares	Cocobacilos G – en cadenas
D	Colonia redonda de color gris.	Bacilos cortos Gram -	
E	Colonia gris crinada.	Bacilos largos G -	Bacilos con forma vibroide G -
F	Colonia puntiforme de color café.	Bacilos largos G- con forma filamentosa	

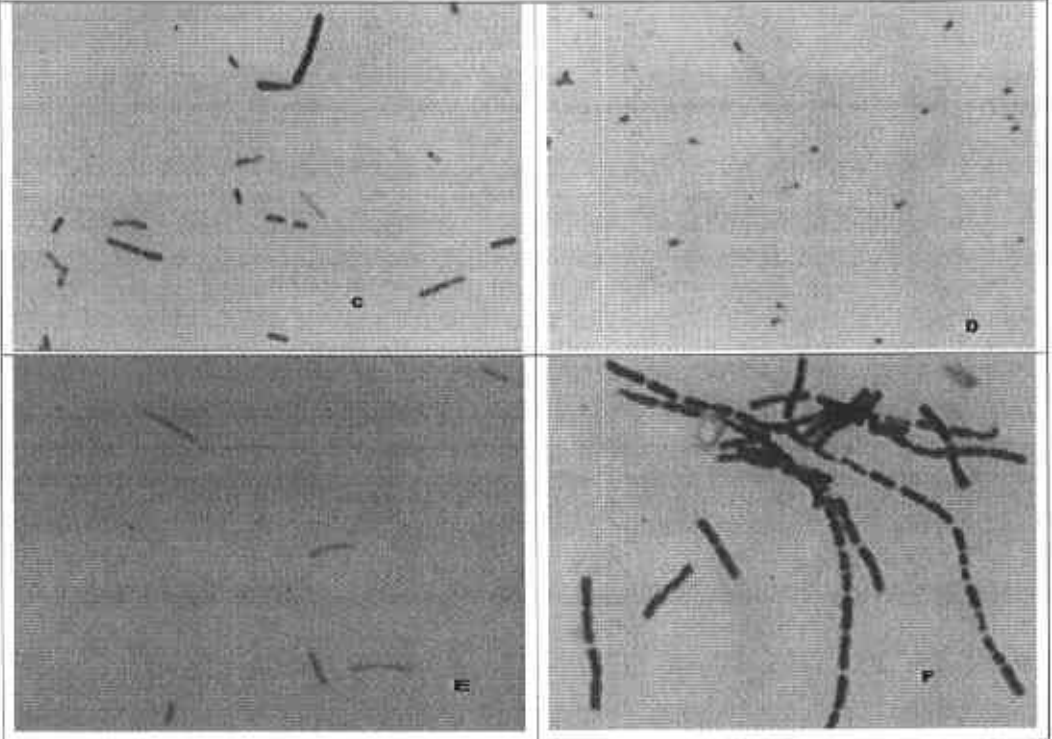
Como se puede observar en la tabla anterior a pesar que únicamente fue tomada una muestra por colonia, en esta había diferentes morfologías microscópicas lo cual nos indica la presencia de un consorcio microbiano, en las siguientes fotografías¹ se puede observar esta tendencia:

Fotografía 1. Tinción de Gram del Consorcio Microbiano I



¹ Estas fotos se realizaron a través de un microscopio IROSCOPE MG - IIT

Fotografía 2. Tinción de Gram del Consorcio Microbiano II



Todas las fotografías fueron tomadas a una resolución de 100x a través de un microscopio electrónico.

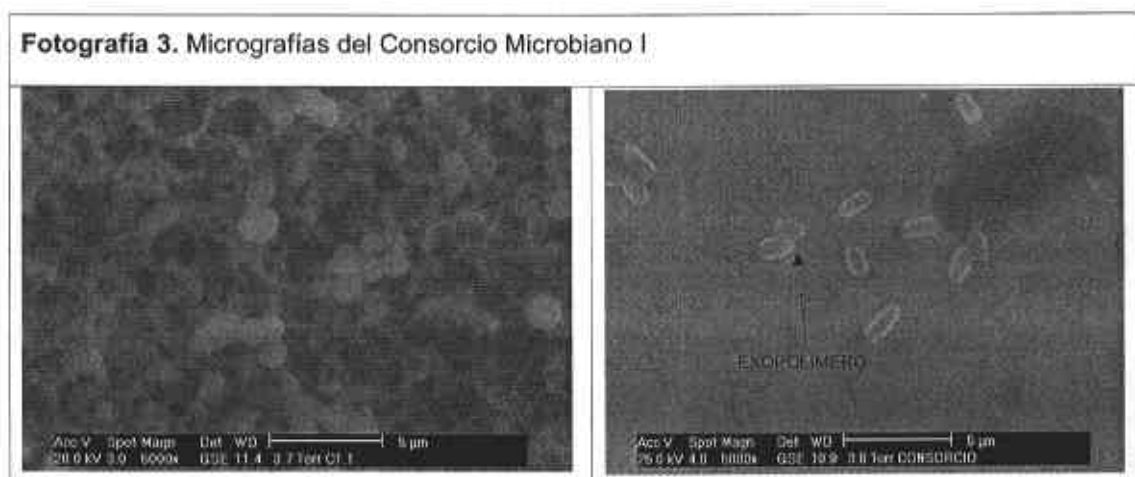
Las siguientes consideraciones fueron tomadas como referencia para iniciar con la caracterización del consorcio microbiano en estudio: únicamente se trabajó en condiciones aerobias, lo cual propicio que el consorcio se formara por microorganismos aerobios o facultativos, el medio de cultivo tiene grandes cantidades de sales inorgánicas, incluyendo cloruro de sodio, la temperatura de trabajo fue de 30 – 40°C y el pH se mantuvo cercano a 7.

En el apéndice I se muestran algunas de las especies que crecen en asociación bajo estas circunstancias.

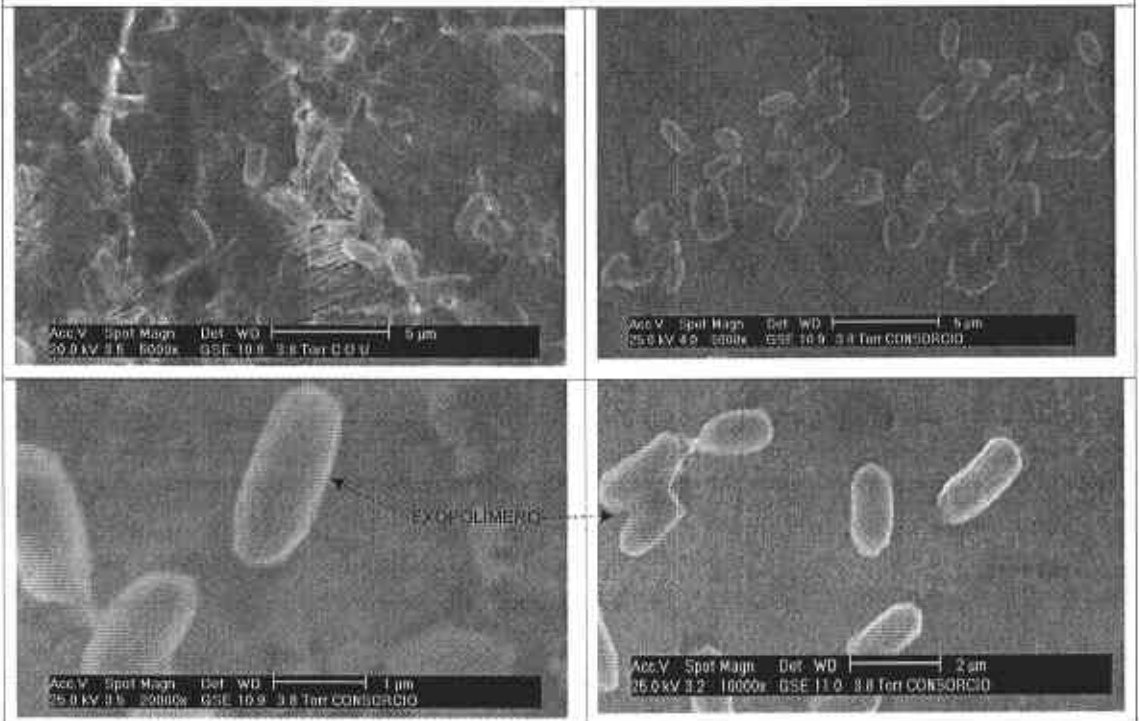
Como parte complementaria a este trabajo se elaboró una técnica microscópica para observar al consorcio microbiano a través de un microscopio electrónico de barrido (Ver apéndice III).

Las micrografías ofrecieron dos ventajas, a través de ellas observamos detalladamente la morfología espacial (formas esféricas, cilíndricas, vibroides, etc.) de cada una de las especies perceptibles en el consorcio y por otra parte esta técnica permitió observar una pequeña capa (probable inicio del exopolímero) necesaria para la formación de la biopelícula.

A continuación se presentan las micrografías del consorcio microbiano en estudio obtenidas de esta técnica:



Fotografía 4. Micrografías del Consorcio Microbiano II



Se trató de caracterizar las especies presentes en el consorcio microbiano, sin embargo, no se logró purificar todas las colonias obtenidas del consorcio microbiano por medios comunes, lo que se comprobó al realizar observaciones microscópicas y encontrar mezcla de microorganismos.

De las colonias D y F que presumiblemente estaban puras se realizó una caracterización a través de un Sistema API (API 20 NE / API 20 E), sin encontrar resultados satisfactorios.

Es importante mencionar, que al momento de realizar este estudio, la estimación de la diversidad microbiana estaba limitada por la falta de medios o condiciones adecuadas para cultivar todas las bacterias provenientes de ambientes naturales.

Se considera que más del 99% de los microorganismos presentes en la naturaleza no podían cultivarse a través de técnicas microbiológicas estándares² (S. Le Borgne et al / 2002).

La caracterización de este consorcio microbiano por medios biomoleculares se estimó dentro de la parte experimental de este estudio, planeando ejecutarlo en colaboración con el IMP, lugar en donde actualmente se trabaja en caracterizar las biopelículas de medios marinos, sin embargo, no se consiguió el acuerdo de colaboración, por lo cual, la caracterización del consorcio microbiano no se realizó.

Por otra parte, el contenido de las especies del consorcio microbiano fue variando intrínsecamente a través del estudio, ya que son muy diferentes las condiciones que permanecen en un biopelícula y en un medio *in vitro* como lo es un medio de cultivo líquido, por lo tanto, son necesarias hacer las siguientes consideraciones:

- El consorcio microbiano en estudio, es un sistema vivo que constantemente esta variando la especie mayoritario.
- Se trabajó únicamente en condiciones aerobias.
- Durante el estudio se realizaron varias resiembras del consorcio microbiano, en medio de cultivo líquido NACE, para mantener un cultivo "joven", y se encontró que las características del consorcio cambiaron: El medio de cultivo NACE es de color amarillo claro inoloro y así se conservó en las primeras resiembras realizadas al inicio del estudio, sin embargo, al final del estudio (parte electroquímica) al realizar la resiembra del consorcio microbiano, esté rápidamente cambiaba el medio de amarillo claro inoloro a color negro con olor a sulfuro, lo cual nos indicó la presencia de un microorganismo capaz de descomponer los aminos sulfurados.
- Como medio de cultivo únicamente se trabajo con medio NACE, el cual simula la composición y pH del agua del mar (pH \cong 7).

² Pickup R.W. 1991.

- Muchas de las especies que se han encontrado en una biopelícula, no crecen en los medios de cultivo "in vitro", solo se desarrollan en el microcosmos que forma la biopelícula.
- Las bacterias del consorcio microbiano en estudio, en general, tienen una fuente de energía quimioautótrofas, afirmación que se comprueba con los componentes del medio de cultivo. Sin embargo, es probable que algunas sustancias de degradación de estas bacterias fueran utilizadas por otras como fuente de energía, dando a lugar a asociaciones lo cual permitió que estas se desarrollaran dentro de nuestras condiciones "in vitro".
- Muchas bacterias crecen en asociación y al tratar de ser purificadas una o ambas se pierden.

Bajo estas condiciones, presumiblemente nuestro consorcio microbiano en estudio podría estar compuesto por especies de bacterias con las siguientes características: Gram negativas, quimioautótrofas, aerobias o aerobias facultativas, halófilas y que en general se encuentran en medios marinos y/o petroleros, como son los géneros Thiobacillus, Thiomicrospira, Pseudomona, Gallionella y Nitrobacter.

La relación bacteriana presente en el biopelícula "original" se eliminó al trabajar de esta manera y formar un consorcio microbiano, ya que el exopolímero se perdió, trayendo como consecuencia que las condiciones anaerobias desaparecieran, así muchos nutrientes del medio y disminuyera la protección de las bacterias al biocida glutaraldehído.

VI.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

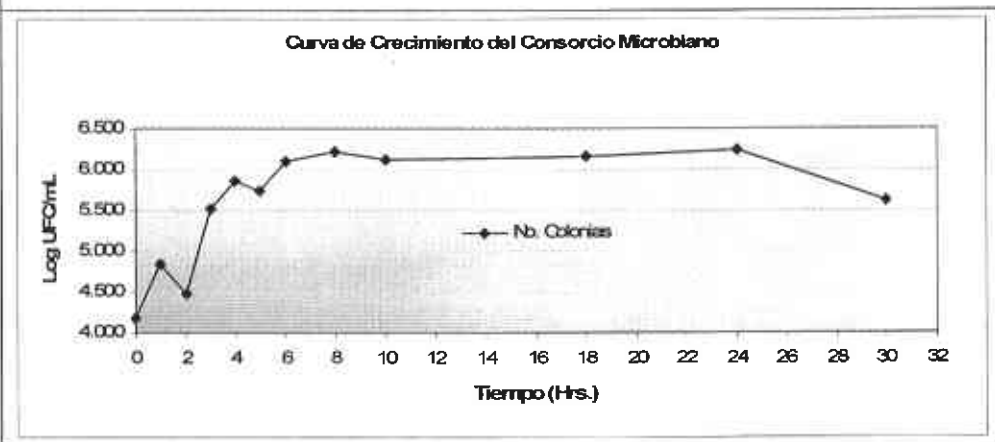
Como medida del crecimiento microbiano se empleó la técnica de cuenta directa en placa y con el logaritmo del número de colonias obtenidas se realizó la curva del consorcio microbiano en estudio, se ejecutaron varias repeticiones en medio

NACE al inicio del estudio, dando un comportamiento similar y consistente entre sí.

Cabe destacar, que paralelamente se intento realizar la curva de crecimiento a través del método turbidimétrico a una absorbancia de 540 nm, pero no se lograron resultados consistentes y reproducibles con este método (Ver apéndice IV).

A continuación se presenta la curva de crecimiento promedio del consorcio obtenida por el método de cuenta directa:

Gráfica 1. Curva de crecimiento del Consorcio Microbiano



De la curva anterior es importante mencionar.

- Es resultado de un grupo de microorganismos, sin embargo, un microorganismo es el mayoritario y el que da la tendencia a la curva de crecimiento.
- La curva de crecimiento del consorcio microbiano en estudio resultante es similar a la curva de crecimiento estándar:

- Fase de Latencia: Esta fase es muy corta y no se aprecia claramente en la grafica obtenida, esto se debe a que el medio utilizado para las resiembras (NACE) químicamente es similar al agua marina, medio original del consorcio en estudio. El utilizar el medio NACE permitió optimizar el crecimiento microbiano para obtener una fase de latencia corta.
 - Fase Exponencial: El crecimiento exponencial de las células componentes de consorcio microbiano en estudio es de aproximadamente de 6 hs.
 - Fase Estacionaria: Esta es la más grande (duración: aproximadamente 16 hs) y como se puede observar en la grafica casi no se registra aumento de microorganismos.
 - Fase de muerte: Se presentó a las 24 hs.
- El predominio de una especie de microorganismo esta en función de la temperatura, del tiempo y la composición del medio y de una relación con los otros nutrientes del consorcio.
 - A partir de la curva de crecimiento obtenida se decidió que el tiempo de prueba para la acción biocida de Glutaraldehído sería de 6 hs, tiempo hasta el cual se presenta la fase exponencial del consorcio microbiano.

VI.3 ACTIVIDAD DEL GLUTARALDEHÍDO

El objetivo de la presente investigación fue comparar la eficiencia (% de mortalidad) del biocida Glutaraldehído utilizado para el control de la corrosión microbiológica en sistemas de recuperación secundaria.

Como modelo se utilizó un consorcio bacteriano y se desarrolló en un medio mineral adicionado con peptona y extracto de levadura (NACE). El medio fue inoculado con un cultivo de 24 hs con una densidad celular estandarizada. La eficiencia del biocida fue determinada utilizando la técnica de cuenta estándar en

placa en tiempos que van de cero a seis horas. El glutaraldehído fue evaluado a distintas concentraciones, las cuales mostraron una disminución de la población, pero no una inhibición total.

El parámetro de pH, factor que tiene mayor influencia sobre la eficiencia biocida del Glutaraldehído, fue controlado durante todo el experimento, ya que el medio NACE proporciona un pH similar al del agua de mar, el cual oscila entre 7.6 y 8.4. Este pH básico favorece el ataque del glutaraldehído.

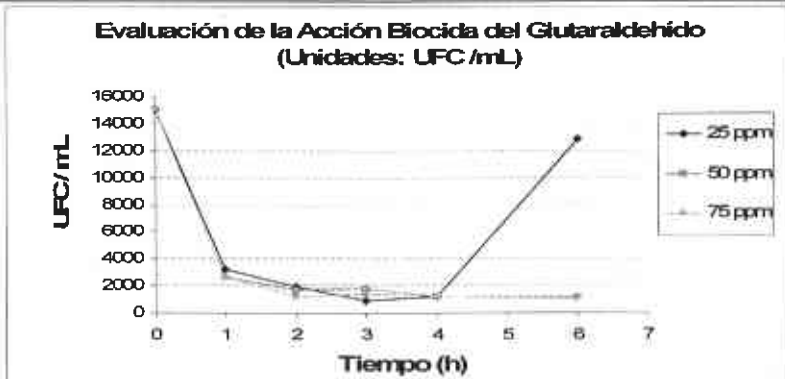
VI.4 ACCIÓN BIOCIDA DEL GLUTARALDEHÍDO

Para determinar el efecto biocida del glutaraldehído, fueron evaluadas 3 diferentes concentraciones (25 ppm, 50 ppm y 75 ppm) a seis diferentes tiempos de exposición, los resultados son presentados a continuación:

Tabla 8. Unidades Formadoras de Colonias por tiempo y concentración

Concentración	25 ppm	50 ppm	75 ppm
Tiempo (h)	UFC / mL	UFC / mL	UFC / mL
0	15000	15000	15000
1	3240	2630	2630
2	1950	1700	1200
3	920	1740	1350
4	1200	1230	1200
6	12900	1100	1070

Gráfica 2. Unidades Formadoras de colonias por tiempo y concentración

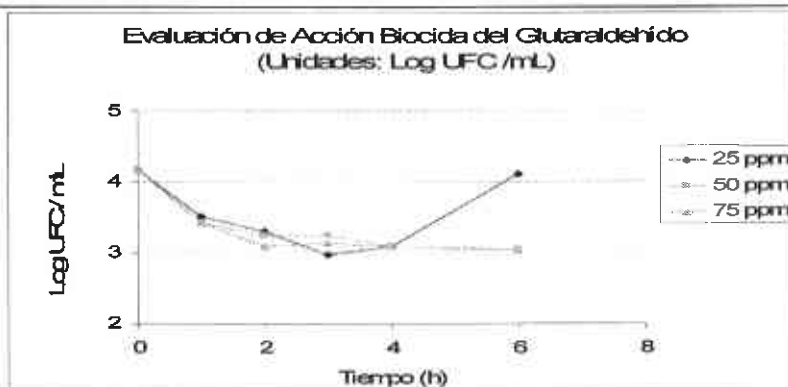


Generalmente los resultados de crecimiento y muerte microbiana se expresan en unidades logarítmicas, por lo cual, a continuación los resultados anteriores son presentados en estas unidades:

Tabla 9. Logaritmo de UFC

Concentración	25 ppm	50 ppm	75 ppm
Tiempo (h)	log UFC / mL	log UFC / mL	log UFC / mL
0	4.17	4.17	4.17
1	3.51	3.42	3.42
2	3.29	3.23	3.08
3	2.96	3.24	3.13
4	3.08	3.09	3.08
6	4.11	3.04	3.03

Gráfica 3. Logaritmo de UFC



Como se puede observar en las tablas y gráficas anteriores, las concentraciones de glutaraldehído a los tiempos de exposición utilizados no actúan como un biocida sino como un inhibidor del crecimiento bacteriano.

La concentración de 25 ppm, es la que logra la disminución más drástica a las tres horas, sin embargo, al agotarse el inhibidor la población bacteriana aumenta rápidamente alcanzando a las 6 horas casi el inoculo inicial. Mientras que las concentraciones de 50 y 75 ppm, tienen un comportamiento similar y consistente entre sí, al bajar la concentración de microorganismos a las 3 hs. y mantenerla constante hasta las 6 hs.

VI.5 EFICIENCIA BIOCIDA DEL GLUTARALDEHÍDO

En la sección anterior se demostró que el glutaraldehído no actúa como un biocida, lo cual se reforzó al sacar la eficiencia biocida ó mejor conocida como el logaritmo de reducción microbiana de este compuesto.

Las colonias son físicamente contadas, registrando la población microbiana viable, expresando los resultados de la cuenta en unidades formadoras por centímetro cúbico.

Fórmulas empleadas para calcular la eficiencia son:

$$\% \text{ Kill} = \frac{(\text{Inicial TVC} - \text{Final TVC}) \times 100}{\text{Inicial TVC}}$$

$$\text{Log Reducción} = \text{Log Inicial TVC} - \text{Log Final TVC}$$

En donde:

TVC = Unidades Formadoras de colonia (cfu / cm³)

El cálculo de eficiencia sirve para conocer el efecto de un tratamiento con un biocida sobre una población microbiana, ya que mide la reducción de la población microbiana, esta generalmente se expresa en términos de porcentaje de muerte o en logaritmo de reducción de población microbiana.

El porcentaje requerido de muerte microbiana para considerarse adecuado depende de las aplicaciones industriales que se requieran, sin embargo, la eficacia típica requerida para denominarse biocida es del 99.99% equivalente a la reducción de 4 Log (*Ver apéndice V*).

Los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones en estudio son:

Tabla 10. Eficiencia del Glutaraldehído a la concentración de 25 ppm

Tiempo	Inicial TVC	Final TVC	% Kill	Log Reducción
1	15000	3240	78.40	0.66
2	15000	1950	87.00	0.88
3	15000	920	93.87	1.21
4	15000	1200	92.00	1.09
6	15000	12900	14.00	0.06

Tabla 11. Eficiencia del Glutaraldehído a la concentración de 50 ppm

Tiempo	Inicial TVC	Final TVC	% Kill	Log Reducción
1	15000	2630	82.46	0.75
2	15000	1700	88.66	0.94
3	15000	1740	88.40	0.93
4	15000	1230	91.80	1.08
6	15000	1100	92.67	1.13

Tabla 12. Eficiencia del Glutaraldehído a la concentración de 75 ppm

Tiempo	Inicial TVC	Final TVC	% Kill	Log Reducción
1	15000	2630	82.47	0.75
2	15000	1200	92.00	1.09
3	15000	1350	91.00	1.04
4	15000	1200	92.00	1.09
6	15000	1070	92.87	1.14

Las concentraciones de 50 ppm y 75 ppm, como anteriormente se mencionó, tienen un comportamiento similar, alcanzado un porcentaje de muerte máximo de aproximadamente 92.00% a las 6 horas.

Sin embargo, la concentración máxima alcanzada por el glutaraldehído se registro a la concentración de 25 ppm a las tres horas de exposición, el valor fue de 93.82% (1.21 Log), el cual se ubica por debajo del valor requerido para ser considerado como un biocida (99.99%).

A pesar, que el glutaraldehído es un compuesto ampliamente utilizado para la desinfección de equipos médicos y sistemas de aire, según los datos obtenidos de este estudio resulto que este compuesto es solo es un inhibidor del crecimiento microbiano (Robert G. Eagar et al / 1987).

Por otra parte hay que mencionar que la bibliografía indica que los microorganismos son más resistentes en Biopelícula, por lo cual se esperaría que microorganismos habitantes de una Biopelícula fueran más resistentes al Glutaraldehído (G. Piera / 2003).

VI.6 EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA

Otra forma de medir la eficiencia del glutaraldehído es evaluar la corrosión producida por el consorcio microbiano en estudio, para ello realizó una técnica electroquímica denominada resistencia a la polarización. Los resultados obtenidos del diseño experimental y del cálculo de la rapidez de corrosión son presentados a continuación en la tabla 13:

Tabla 13. Resultados de la evaluación Electroquímica: Resistencia a la polarización.

TIEMPO (HS)	MEDIO (Ohm · cm ²)			
	NACE	NACE + GLUT	NACE + CONS	NACE+CONS+GLUT
0	789,18	1042,604	564,78	601,559
1	625,63	721,236	600,48	640,451
2	649,67	624,822	772,08	623,323
3	640,15	632,128	2648,61	536,851
4	769,10	648,898	7449,61	453,842
5	582,98	684,033	10157,55	599,339
6	880,98	623,574	11416,1	620,421

Gráfica 4. Resultados de la evaluación electroquímica: Resistencia a la polarización.

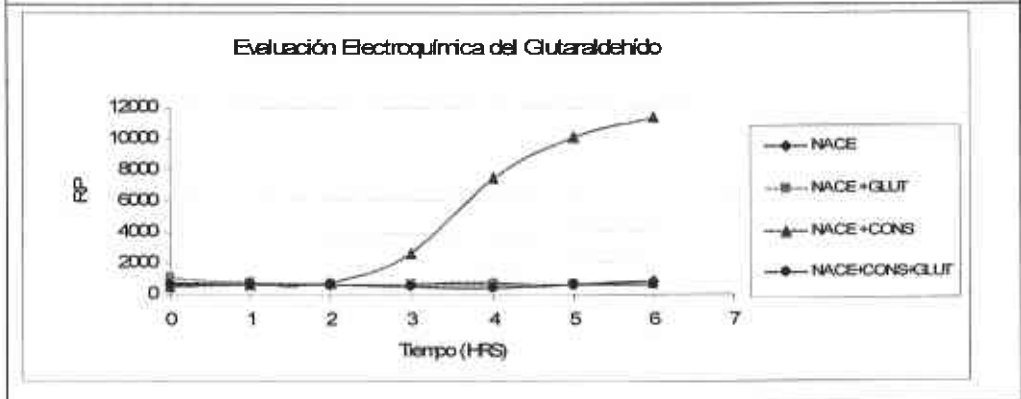
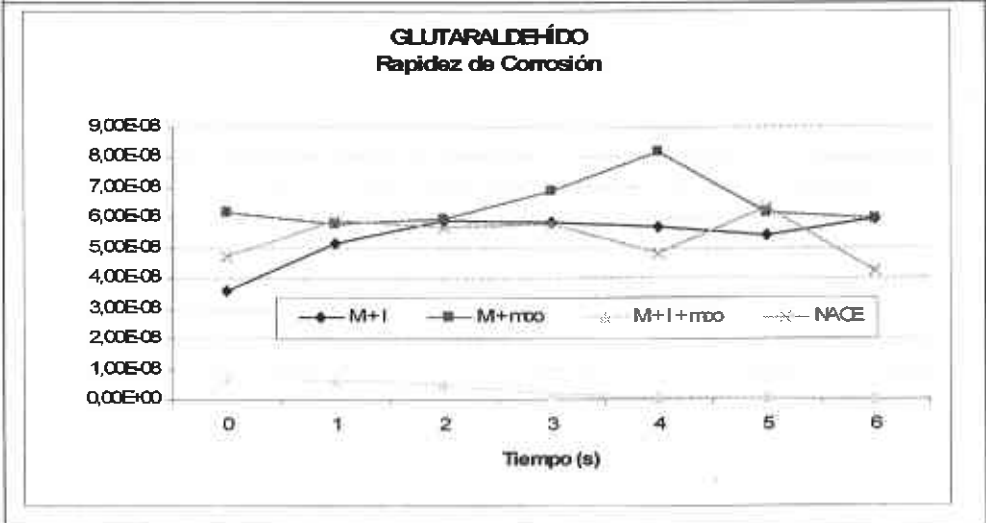


Tabla 14. Resultados de la evaluación Electroquímica: Rapidez de corrosión.

Tiempo	M + I	M + $\mu 00$	M+ I + $\mu 00$	Nace
0	3,5552 E-08	6,1617 E -08	6,8218 E -09	4,6968 E -08
1	5,1393 E -08	5,7876 E -08	6,4162 E -09	5,9247 E -08
2	5,9323 E -08	5,9466 E -08	4,9902 E -09	5,7054 E -08
3	5,8638 E-08	6,9044 E -08	1,4546 E -09	5,7903 E -08
4	5,7122 E -08	8,1673 E -08	5,1718 E -10	4,8195 E -08
5	5,4188 E -08	6,1846 E -08	3,7930 E -10	6,3581 E -08

Gráfica 5. Resultados de la evaluación Electroquímica: Rapidez de corrosión.



Como fue planteado el diseño experimental de la parte electroquímica, no se está evaluando la corrosión producida por una biopelícula, sino la corrosión de una serie de medios, ya que el tiempo de exposición fue muy corto, para que los microorganismos se establecieran en la superficie del metal.

En condiciones normales, se crea una interfase entre el metal y la solución, conocida como doble capa electroquímica que crea un campo eléctrico. La reacción electroquímica de oxidación o/y formación de una biopelícula da lugar a que se modifique el potencial de equilibrio del sistema dando inicio al fenómeno de corrosión.

Sin embargo, la gráfica anterior muestra que la rapidez de corrosión del medio + inhibidor + el consorcio microbiano es menor que la que obtenida del medio + consorcio, lo cual nos indica que la presencia del inhibidor (Glutaraldehído) disminuye la rapidez de corrosión. Cabe destacar, que ya de por sí el medio NACE es corrosivo como se puede observar en las gráficas debido a su composición alta en sales inorgánicas.

VII. CONCLUSIONES

VII.1 CONCLUSIONES GENERALES

* Consorcio Microbiano

No se pudo caracterizar el consorcio microbiano por medios estándares debido a que en el momento de realizar este estudio, la estimación de la diversidad microbiana estaba limitada por la falta de medios o condiciones adecuadas para cultivar todas las bacterias provenientes de ambientes naturales. Para la caracterización adecuada de los microorganismos formadores de una biopelícula es recomendable utilizar técnicas biomoleculares para su completa identificación.

Al plantear el estudio con un consorcio microbiano se perdieron tres características fundamentales de la biopelícula:

1. Las bacterias para adaptarse a la vida de la biopelícula activan diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas, las cuales son las responsables de la fijación y resistencia a inhibidores y biocidas.
2. Los microorganismos en biopelícula son de 100 a 1000 veces más resistentes a los biocidas e inhibidores que las formas libres o planctónicas.
3. Se perdió la formación del exopolímero el cual además de dar las propiedades de fijación y protección, crea condiciones ambientales específicas de nutrientes y cantidad de oxígeno.

Por tanto, muchas especies de microorganismos presentes en el biopelícula desaparecieron, para formar el consorcio microbiano que utilizamos para realizar este estudio.

Para nuevos estudios es recomendable crear un sistema que reproduzca las condiciones ambientales "in vivo" para lograr que la biopelícula se desarrolle y valorar adecuadamente sus características.

× Medida del crecimiento microbiano

La curva de crecimiento por el método de cuenta directa, permito estimar el tiempo de duración de la fase exponencial, tiempo que se utilizó como tiempo de exposición al glutaraldehído.

× Glutaraldehído

El glutaraldehído a las concentraciones utilizadas (25 ppm, 50 ppm y 75 ppm) y los tiempos de exposición utilizados, no actúa como un biocida sino como un inhibidor del crecimiento bacteriano. Lo anterior se reforzó al determinar la eficiencia del glutaraldehído, la cual oscilo de 92.00% a 93.82%, por lo cual esta por debajo del 99.99% requerido para que este compuesto sea considerado como un biocida.

A pesar de los resultados obtenidos, es importante mencionar, que el glutaraldehído es el inhibidor actualmente más utilizado debido a su bajo costo, a que es empleado en pequeña cantidad y no altera el sistema a proteger. Otro punto importante es la protección al medio ambiente y el glutaraldehído lo cumple ya es sencillamente desechado, al ser neutralizada fácilmente su pequeña molécula.

× Medida de la Corrosión

El planteamiento de la evaluación electroquímica de la rapidez de corrosión estuvo erróneo, ya que la corrosión microbiológica, es resultado de forma directa o indirecta del metabolismo microbial de un biopelícula, debido a la actividad de las bacterias sulfarreductoras que convierten los sulfatos a ácidos sulfúricos, a la

destrucción en la resistencia de la película del metal y creando una celda que rompe el equilibrio del potencial entre el metal y el medio.

Sin embargo, el estudio nos permitió evaluar la corrosividad de cada uno de los medios en estudio, encontrando que disminuye la rapidez de corrosión en el medio de consorcio + medio + inhibidor.

VII.2 CONCLUSIONES PARTICULARES

Dado lo anteriormente expuesto, los objetivos de este estudio fueron cumplidos parcialmente, valorando la acción a las distintas concentraciones en estudio del Glutaraldehído, determinando que este tiene acción inhibidora del crecimiento microbiano. Por tanto, la hipótesis inicial de que el glutaraldehído tiene acción biocida fue errónea.

El tercer objetivo no se cumplió ya para valorar la corrosividad del consorcio microbiano sería necesario plantear nuevamente el experimento, en donde se formará un biopelícula sobre el acero y así valorar adecuadamente la influencia de esté en la generación del fenómeno de corrosión.

VIII. RECOMENDACIONES

- * Aplicar técnicas biomoleculares para la caracterización del consorcio en estudio.
- * Para combatir problema de biocorrosión, es indispensable estudiar de manera particular el sistema en donde se presente, para evitar que las bacterias constituyentes del biopelícula, generen resistencia y selectividad hacia los biocidas actualmente utilizados.
- * El Glutaraldehído puede ser utilizado para controlar la presencia microbiana en un sistema, sin embargo, es necesario realizar otro estudio para determinar el tiempo de contacto así como algunas otras condiciones que mejoran su penetración al biopelícula, como puede ser administración de presión o agitación del sistema.
- * El sistema para evaluar la biocorrosión debe permitir la formación de una biopelícula sobre un acero, para realizar lo anterior, son necesarios largos periodos de tiempo de contacto, sin embargo, la metodología sería sencilla, ya que el parámetro de medición sería el peso inicial y final de la probeta.

IX. REFERENCIAS

No.	LIBROS Y ARTÍCULOS
1	Albert & Wilson UK Limited. " <u>Biocides: Technical Bolletin 390</u> ". Bristol, UK. Page 1-2.
2	Betancourt, M. et al. " <u>Biopelículas: Una comunidad microscópica en desarrollo</u> ". Colombia Médica, Volumen 35 No. 3 (Suplemento 1), 2004. Editorial: Corporación Editora Médica del Valle. Pág. 34 – 35.
3	Bergey,s " <u>Manual of determinate bacteriology</u> "; Ninth Edicion; Edit. Williams & Wilkins, 194. Group 12, Pag. 427 – 455.
4	Brown, M.R. et al. " <u>Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: Related effect</u> ". Journal of Antimicrobial (Chemother), 199822 (6): 777 – 780.
5	Chmielewski RAN et al. " <u>Biofilm formation and control in food processing facilites</u> ". Comp. Rev. Food Sci. And Food Saf., 2003. 2:22 – 32.
6	Costerton, J.W. " <u>Overview of microbial biofilms</u> ". J. Indus. Microbial, 1995. 15:137 – 140.
7	Cortés, A. et al. " <u>Evaluación de la resistencia a la corrosión de aleaciones para oleoductos</u> ". Ingenierías, Enero – Marzo, 2005. Volumen VIII No. 26. Editorial: FIME – UANL, México, Pagina 22 – 28.
8	Chang, R. <u>QUÍMICA</u> ; McGraw –Hill Interamericana; México, 1992; Pág.(s).799 –801.
9	Galvele, J. R.; " <u>Corrosión</u> ". Colección de Monografías Científicas. Serie Quimica No. 21. Capítulos 1- 5. OEA, Washington, D.C., 1985.
10	Ganzer, G.A.; Mcllwaine, D.B.; Impact, J.A.; Freid M.; Russo, M.; " <u>Applications of Glutaraldehyde in the control of MIC</u> ". The international Corrosion Forum; Corrosion 2001, Paper number 01281. Copyright by NACE 2001. Houston, Texas.
11	Genescá, J. <u>Corrosión Electroquímica</u> ; Corrosión, Vol.3, Numero 4, México, Marzo 1992, Páginas 1 – 4.
12	Jan, J. y Le Borgne, S.; " <u>Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros</u> ". IMP, Programa de Biotecnología del Petróleo; México, D.F., 2001.
13	Le Borgne, S; Jan, J.; Romero, J.M. and Amaya, M.. " <u>Impact of molecular biology techniques on the detection and characterization of microorganisms and Biofilms involved in MIC</u> ". IMP, Programa de Investigación y desarrollo en Biotecnología del Petróleo; México, D.F., 2002.

No.	LIBROS Y ARTÍCULOS
14	Moreno, J. L. " <u>Detección de problemas de corrosión microbiológica en instalaciones de PEMEX, exploración y producción</u> ". Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico. Tuxtepec, Oax. 1991. p. 5 -16.
15	PEMEX. <u>Protección Interior de ductos con inhibidores</u> . Comité de normalización de Petróleos Mexicanos y Organismos Subsidiarios. N°. de Documento: NRF-005-PEMEX-200. México, Diciembre 18, 2000. Páginas: 1 – 34.
16	Piera, Gloria. " <u>Estudio del Biofilm: Formación y Consecuencias</u> ". Curso de Prevención y Seguridad Integral. Curdo 2002 – 2003, Brasil.
17	Robert G. Eagar, Jr., PH.D., J. Leder, Ph.D. and A.B. Theis, Ph.D. " <u>Glutaraldehyde: Factors Important for Microbiocidal Efficacy</u> ". Union Carbide Corporation, Specialty Chemicals Division, Bound Brook, NJ, 1986. Page 1 -22.
18	Robert G. Eagar, Jr., PH.D., Alan B. Theis, Ph.D & M.H. Turakhia and W.G. Characklis, PH. D. " <u>Glutaraldehyde: Impacto in corrosión causing biofilms</u> ". The international Corrosion Forum; Corrosion 86, Paper number 125. March 17 – 21, 1986. Copyright by NACE. Houston, Texas
19	Robert G. Eagar, Jr., PH.D. and Alan B. Theis, Ph.D. " <u>Control of Microbiological Fouling with Glutaraldehyde</u> ". Union Carbide Corporation, Specialty Chemicals Division, Bound Brook, NJ, Cooling Tower Institute, 1987 Annual Meeting; Technical Paper Number TP 87 -1. Page 1 – 8.
20	Robert G., Edgar, Jr. Ph. D. " <u>Glutaraldehyde</u> "; Un microbicida aplicable en campos petroleros. Presentado en la Conferencia de Corrosión en el Medio Este, Bahrain, Enero 19 – 21, 1981.
21	Singh P.K. et al. " <u>A component of innate immunity prevents bacterial biofilm developement</u> ". Natura, 2002. 417: 552 – 555.
22	Solorza, O., Olivares, L. And Ibáñez, j. " <u>Experimental Demonstration of Corrosion Phenomena</u> "; Journal of Chemical Education, Vol.68, February 199, Page 175.
23	Tejada, S.; " <u>Corrosión Biológica Inducida</u> ". Departamento de Físicoquímica, D.E. Pg. Facultad de Química, U.N.A.M., Agosto 31, 1994.p. 1 – 9.
24	Tejada, S.; " <u>Corrosión Microbiológica</u> ". Con-ciencia. Información Científica y Tecnológica, México, D.F. 2001.
25	Uhlig, H.H.. " <u>The cost of corrosion to the United States</u> ", Chem. Eng. News, 27, 2764 (1949); or Corrosion, 6, 29 (1950).

No.	LIBROS Y ARTÍCULOS
26	Vázquez, L. <u>Corrosión Microbiológica en sistemas de enfriamiento abierto</u> . Corrosión. Volumen 3. Número 4, México, Marzo 1992, Páginas 5 – 9.
27	Watnick, P. and Koller, R.; " <u>Biofilm: City of Microbes</u> ". Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology, Vol. 182, No. 10, May 2000, p. 2675 – 2679.
28	Whiteley, M et al. " <u>Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms</u> ". Antimicrobial Agentes (Chemother), 1996. 40 (11): 2517 – 2522.
29	Wimpenny, J. et al. " <u>Heterogeneity in biofilms</u> ". FEMS Microbial, 2000. Rev 24: 661 – 671.

No.	SITIOS DE INTERNET
1	La pared bacteriana: http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm .
2	Glosario de microbiología: http://www.medioambiente.gov.ar/areas/subordamb/glosario/ver-termino.asp?nro=40
3	Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo: http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol35No3supl/body/cm35n3sa8.htm
4	Modelo matemático del crecimiento de bacterias: http://www.monografias.com/trabajos27/crecimiento-bacteriano/crecimiento-bacteriano.shtml .
5	Corrosión: http://www.monografias.com/trabajos3/corrosion/corrosion.shtml G
6	Ciclo celular y crecimiento bacteriano: http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm
7	Cinética del crecimiento: http://www.monografias.com/trabajos10/cinrec/cinrec.shtml
8	Biocorrosión: http://www.monografias.com/trabajos15/biocorrosion/biocorrosion.shtml
9	Kraigsley, A. et al. "Dynamics of self – propagating fronts of motile bacteria", 2000: http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html
10	Kraigsley, A. et al. "Hydrodynamic influences of biofilm formation and growth", 2002: http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html
11	Mayette, 1992: www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143
12	Pedersen, Suecia, 1990: www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143

X. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS, GRÁFICAS Y FOTOGRAFÍAS

TABLA 1. POTENCIALES DE REDUCCIÓN	9
TABLA 2. RECUENTO DE MICROORGANISMOS	32
TABLA 3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS EN LA PARTE EXPERIMENTAL	46
TABLA 4. MATRIZ EXPERIMENTAL: EFICIENCIA DEL GLUTARALDEHÍDO	48
TABLA 5. MATRIZ EXPERIMENTAL: MEDIDA DE LA CORROSIÓN.	50
TABLA 6. CONDICIONES ELECTROQUÍMICAS DE TRABAJO	51
TABLA 7. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL CONSORCIO MICROBIANO	53
TABLA 8. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS POR TIEMPO Y CONCENTRACIÓN	61
TABLA 9. LOGARITMO DE UFC	62
TABLA 10. EFICIENCIA DEL GLUTARALDEHÍDO A LA CONCENTRACIÓN DE 25 PPM.....	64
TABLA 11. EFICIENCIA DEL GLUTARALDEHÍDO A LA CONCENTRACIÓN DE 50 PPM.....	65
TABLA 12. EFICIENCIA DEL GLUTARALDEHÍDO A LA CONCENTRACIÓN DE 75 PPM.....	65
TABLA 13. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA: RESISTENCIA A LA POLARIZACIÓN.....	66
TABLA 14. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA: RAPIDEZ DE CORROSIÓN.	67
FIGURA 1. MECANISMO GENERAL DE CORROSIÓN.....	10
FIGURA 2. TIPOS DE CORROSIÓN EN ACERO.....	13
FIGURA 3. FENÓMENO DE CORROSIÓN CAUSADA POR MICROORGANISMOS	16
FIGURA 4. FORMAS QUÍMICAS DEL GLUTARALDEHÍDO EN AGUA	22
FIGURA 5. "PUENTEOS" O CRUZAMIENTO DEL GLUTARALDEHÍDO CON LOS GRUPOS AMINO	23
FIGURA 6. MECANISMO DE ACCIÓN DEL GLUTARALDEHÍDO A PH BÁSICO.....	24
FIGURA 7. CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO CLÁSICO.....	30
FIGURA 8. CÁMARA DE RECUENTO DE PETROFF-HAUSER	32
FIGURA 9. ACTIVIDAD DE BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO SOBRE UNA SUPERFICIE DE ALEACIÓN, LAS FUENTES CARBONO ESTIMULAN LA CORROSIÓN BIOLÓGICA QUE DISUELVE EL METAL	36
FIGURA 10. ESQUEMA GENERAL DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	47
FIGURA 11. DIAGRAMA DE TRABAJO PARA COMPROBAR LA EFICIENCIA DEL GLUTARALDEHÍDO	49
FIGURA 12. SISTEMA ELECTROQUÍMICO UTILIZADO	51
GRÁFICA 1. CURVA DE CRECIMIENTO DEL CONSORCIO MICROBIANO.....	59
GRÁFICA 2. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS POR TIEMPO Y CONCENTRACIÓN.....	62
GRÁFICA 3. LOGARITMO DE UFC	63
GRÁFICA 4. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA: RESISTENCIA A LA POLARIZACIÓN.	67
GRÁFICA 5. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA: RAPIDEZ DE CORROSIÓN.	68
FOTOGRAFÍA 1. TINCIÓN DE GRAM DEL CONSORCIO MICROBIANO I	53
FOTOGRAFÍA 2. TINCIÓN DE GRAM DEL CONSORCIO MICROBIANO II	54
FOTOGRAFÍA 3. MICROGRAFÍAS DEL CONSORCIO MICROBIANO I.....	55
FOTOGRAFÍA 4. MICROGRAFÍAS DEL CONSORCIO MICROBIANO II.....	56

XI. APÉNDICES

XI.1 APÉNDICE I

BACTERIAS ASOCIADAS A UNA BIOPELÍCULA CARACTERÍSTICAS GENERALES

Género	Ejemplo del género	Temperatura óptima de crecimiento	pH óptimo	Características Generales / Medio "in vivo"
Macromonas	<i>Macromonas mobilis</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células cilíndricas. • Movilidad por flagelo polar. • Inclusiones de carbonato de calcio algunas veces acompañadas de sulfuro. • No crece en un cultivo puro.
Thiobacterium	<i>Thiobacterium bovista</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas con glóbulos de sulfuro. • Células son embebidas en masas gelatinosas. • No tiene motilidad. • No crece en un cultivo puro.
Thiodendron	<i>Thiodendron latens</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células vibroides. • Motilidad a través de un flagelo. • Tiene depósitos (gránulos) de sulfuro coloidal que resulta en al realizar la oxidación, pero los depósitos de S⁰ no son observados. • El Gram no es conocido. • Requiere H₂S de para crecer • Presumiblemente aerobio y microaerófilo. <p style="text-align: center;">Agua de ríos y depósitos de sulfuro</p>
Thiospira	<i>Thiospira winogradskyi</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células espirales. • Inclusiones de sulfuro. • Motilidad a través de un flagelo polar. • No se crece en un cultivo puro.
Thiovulum	<i>Thiovulum majus</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Gram negativo. • Microaerófilo y catalasa negativa. • No se crece en un cultivo puro.
Thermothrix	<i>Thermothrix thiopara</i>	40 – 80°C. Arriba de 55°C	6.0 – 8.0	<ul style="list-style-type: none"> • Facultativo quimiolitótrofo y anaerobio. • Motilidad por un flagelo polar- • Gram negativos. • En general son bacterias circulares, sin embargo, se producen células filamentosas cuando no se encuentran en el límite de oxígeno óptimo.

Género	Ejemplo del género	Temperatura óptima de crecimiento	pH óptimo	Características Generales / Medio "In vivo"
Thiobacillus	<i>Thiobacillus thioparus</i>	20 – 43°C Por debajo de 55°C.	2.0 – 8.0	<ul style="list-style-type: none"> • Gram negativo. • Pequeñas bacterias circulares. • Algunas bacterias tienen movilidad por un flagelo polar. • Su energía deriva de la oxidación o reducción de algunos compuestos de sulfuro, algunas especies oxidan al Hierro. • Este genero incluye aerobias obligadas y facultativas. • Puede crecer en presencia de CO₂ y reduce compuestos sulfurados. • Halófilo <p>Agua marina, medios petroleros, especialmente donde el sulfuro es abundante</p>
Thiomicrospira	<i>Thiomicrospira pelophila.</i>	20 – 43°C	2.0 – 8.0	<ul style="list-style-type: none"> • Gram negativas. • Bacterias circulares ó en espiral, que forman largas cadenas. • Aerobias. • Su energía es derivada de la oxidación o reducción de compuestos inorgánicos de sulfuro. • Quimiolitótrofos. • Halófilo
Thiosphaera	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas en cadenas, generalmente en pares. • Gram negativa. • Algunas especies son quimiolitótrofas. • Aerobias. • Oxidaba y catalasa positiva.
Pseudomonas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Por debajo de 55°C	-	<ul style="list-style-type: none"> • Bacilos. • Gram negativa • Motilidad por un flagelo polar. • Aerobios o anaerobios • Grupo muy adaptable.
Acidiphilium	<i>Acidiphilium cryptum</i>	31 – 41°C	2.5 – 5.9 Hasta 6.1	<ul style="list-style-type: none"> • Su crecimiento se puede ver estimulado por Fe²⁺, • Aerobico • Catalasa positivo. • Gram negativos. • Motilidad por un flagelo polar o por dos flagelos laterales <p>Frecuentemente se encuentra asociado al <i>Thiobacillus ferroxidans.</i></p>
Sulfolobus	-	Por debajo de 55°C	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas, irregulares en lobulares. • No reduce S°.
Acidianus	-	Por debajo de 55°C	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas, irregulares en lobulares. • Bajo condiciones anaerobias puede reducir el S° en H₂S en presencia de H₂.

Género	Ejemplo del género	Temperatura optima de crecimiento	pH optimo	Características Generales / Medio "in vivo"
Hydrogenobacter	-	Por debajo de 55°C	-	<ul style="list-style-type: none"> • Autótrofo en hidrogeno.
Gallionella	<i>Gallionella ferruginea</i>	-	6.0	<ul style="list-style-type: none"> • Células en forma de riñón. • Secretan hidróxido de fierro coloidal. • Motilidad por un flagelo polar. • Aerobio estricto y microaerofilo. • Autótrofo obligado • Quimioautótrofo. <p>Sistemas de agua y agua marina.</p>
Leptospirillum	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	20 - 60	1.5 - 4.0	<ul style="list-style-type: none"> • Células en espiral ó vibroides. • Gram negativo. • Motilidad por un flagelo polar. • Obligado quimiolitótrofo. • Utiliza el Fe²⁺ <p>Crece en presencia del Thiobacillus.</p>
Metallogenium	<i>Metallogenium symbioticum</i>	-	6.0-8.0	<ul style="list-style-type: none"> • Células en forma de coco. • Contiene incrustaciones de dióxido de magnesio. • Forma estructuras filamentosas. Quimioautótrofo o parásito de los hongos. • Aerobio
Siderocapsa	<i>Siderocapsa treubii</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Variedad morfológica y de cápsula. • Típicamente incrustado con óxidos de FE (III) y/o Mn (IV)
Naumaniella	<i>Naumaniella neustonica</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas o elipsoidales. • Tiene cápsula. • Aerobio. <p>Petróleo.</p>
Siderococcus	<i>Siderococcus limoniticus</i>	-	6.2 - 7.0	<ul style="list-style-type: none"> • Células en forma de coco, presenta cápsula. • Depósitos con hidróxido de fierro. • No crece en cultivos "in vitro". <p>En sedimentos o interfaces de agua.</p>
Ochrobium	<i>Ochrobium tectum</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas con cápsula impregnada con óxidos de acero. • Motilidad por flagelos. • Se encuentran en agregados de 8 células. • Puede crecer en condiciones anaerobias. <p>Agua con bajo contenido de oxígeno</p>

Género	Ejemplo del género	Temperatura óptima de crecimiento	pH óptimo	Características Generales / Medio "in vivo"
Sulfobacillus	<i>Sulfobacillus thermosulfiooxidans</i>	20 - 60	1,1 – 5,0	<ul style="list-style-type: none"> • Células redondas, no tiene motilidad, generalmente se encuentra en parejas o en cadenas cortas. • Gram positivo. • Estrictamente aerobio y autótrofo. Sistemas termales, depósitos de sulfato y en medios corrosivos.
Nitrobacter	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas o pleomórficas. • Pueden tener motilidad a través de un flagelo sub - terminal o lateral. • Gram negativo. • Facultativo quimiolitótrofo. • Halófilo obligado Agua marina
Nitrospina	<i>Nitrospina gracilis</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células circulares. • No tiene motilidad. • Aerobia y quimiolitótrofo obligado. • Halófilo obligado Agua marina
Nitrococcus	<i>Nitrococcus mobilis</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas. • Motilidad a través de dos flagelos. • Aerobio y halófilo obligado. • Quimiolitótrofo. Medios marinos
Nitrospira	<i>Nitrospira marina</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad no observada. • Gram negativa. • Halófilo obligado. Agua marina
Nitrosomonas	<i>Nitrosomonas europaea.</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células en forma de cocos. • Puede presentar motilidad a través de un flagelo. • Gram negativos. • Halófilo obligado Agua marina
Nitrosococcus	<i>Nitrosococcus nitrosus</i>	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Células esféricas o elípticas. • Gram negativa. • Halófilo obligado. Agua marina y Petróleo

XI.2 APÉNDICE II

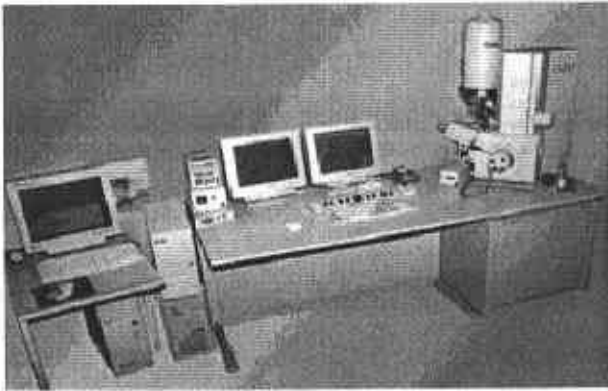
MEDIO DE CULTIVO NACE

COMPOSICIÓN	
INGREDIENTE	CANTIDAD (g)
Peptona	5.00
Extracto de Levadura	1.00
Cloruro de Sodio	19.50
Citrato Ferrico	0.10
Cloruro de Magnesio	8.80
Sulfato de Sodio	3.30
Cloruro de Calcio	1.80
Cloruro de Potasio	0.60
Bicarbonato de Sodio	1.16
Agar	15.00
Aforar a 1L	

XI.3 APÉNDICE III

TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Como anteriormente se expuso, se utilizó esta técnica para observar la morfología de los microorganismos presentes en el consorcio en estudio. En la siguiente tabla se presentan generalidades de esta metodología:

EQUIPO	Microscopio Electrónico de barrido
MARCA	PHILIPS
MODELO	XL 30 ESEM
PROGRAMA	Windows NT / Microscope Control
LUGAR	Laboratorio de Microscopia Electrónica de barrido Laboratorio 009 / IMP
FOTO	

- Descripción del Equipo

La Microscopía de Electrón Ambiental que Explora (ESEM FEG) Philips XL30 ESEM FEG ofrece la línea secundaria de electrones de alta resolución en presiones tan altas como 10 Torr y a temperaturas tan grandes como 1,000 °C.

Este aparato permite trabajar con muestras mojadas, aceitosas, sucias y muestras no conductoras, lo que permite que la muestra sea examinada en su estado natural.

- **Material**

Material & Equipo	Características
Acero	APX – 52 (baquelita)
Aparato para realizar la probeta	PNEUMET PRESS Marca: BUEHLER LTD No. Inventario: 44178
Lija	HANDIMET GRINDER No. Inventario: 370341
Pulidor	BUEHLER LTD Metallurgical Apparatus No. Inventario: 28988
	METASERR Universal Polisher

- **Metodología**

Montaje y Pulido

Realización de la probeta

1. Se agrega 3 ½ cucharadas de baquelita (hasta cubrir el cilindro del aparato PNEUMET PRESS).
2. Se agrega H₂O, se cierra y se deja reposar por 14 min.
3. Al término de este tiempo revisamos la formación de la probeta de no ser así se vuelve a cerrar y se deja por otros 4 min.
4. Retiramos la probeta.
5. Lijamos con lijas del No. 240, 320, 400 y 600 respectivamente.

6. Se procede a realizar el pulido No. 1 usando alumina #10 agregando agua.
7. Se realiza el pulido No.2 con alumina # 0.1 y el pulido final con alumina # 0.05 hasta que este completamente liso con terminación de espejo.
8. Enjugamos la probeta con abundante agua.
9. Finalmente limpiamos la probeta usando un algodón con alcohol y aire para liberar la probeta de partículas metálicas.
10. Almacenar la probeta poniendo un pedazo de algodón en el acabado de espejo y finalmente se guarda en el desecador.

Preparación del cilindro

1. Sumergir en nital 5% (ácido) por 10 – 20 min.
2. Lavar con agua y jabón.
3. Lavar con metanol
4. Secar con aire

Preparación de la muestra

1. En la parte de acabado de espejo se pone una gota de cultivo y se espera a que seque.
2. La muestra se observa bajo el microscopio electrónico de barrido.

XI.4 APÉNDICE IV

MEDIDA DE CRECIMIENTO MICROBIANO MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

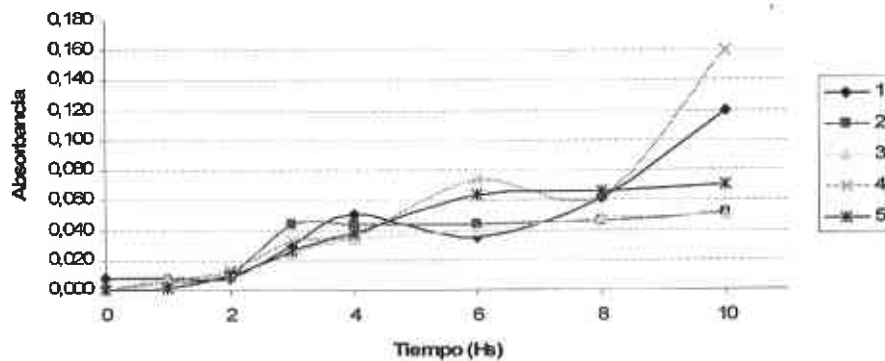
A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del crecimiento del consorcio microbiano en estudio a través del empleo de la técnica turbidimétrica.

De acuerdo a las referencias obtenidas se decidió trabajar a una absorbancia de 540 nm.

TIEMPO (Hs)	MUESTRA ABSORBANCIA (nm)				
	1	2	3	4	5
0	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,008	0,006	0,008	0,005	0,001
2	0,008	0,010	0,010	0,013	0,010
3	0,030	0,044	0,024	0,033	0,026
4	0,051	0,044	0,034	0,036	0,038
6	0,035	0,044	0,040	0,074	0,064
8	0,062	0,046	0,048	0,063	0,066
10	0,120	0,052	0,050	0,160	0,070

Estos resultados se presentan gráficamente en la siguiente figura:

Curva de crecimiento
Método Turbidimétrico



XI.5 APÉNDICE V

INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS DE MUERTE MICROBIANA MÉTODOS DE PRUEBA

La siguiente tabla muestra la relación numérica entre el porcentaje de muerte y el logaritmo de reducción microbiana.

Inicial TVC	Final TVC	Porcentaje de muerte	Log Reducción
1×10^6	1×10^6	0	0
1×10^6	1×10^5	90	1
1×10^6	1×10^4	99	2
1×10^6	1×10^3	99.9	3
1×10^6	1×10^2	99.99	4
1×10^6	1×10^1	99.999	5
1×10^6	1	99.9999	6

El porcentaje de muerte requerido típicamente para que un compuesto sea considerado como un biocida es del 99.99% ó un logaritmo de reducción de 4.

ABREVIATURAS

Log	Logaritmo
IMP	Instituto Mexicano del Petróleo
Fem	Fuerza Electromotriz
Bac	Bacterias
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
ppm	Partes por millón
BAAR	Bacterias ácido alcohol resistentes
Hr	Hora
mL	Milímetro
cm³	Centímetro cúbico
mV	Micro volts
s	Segundo
G	Gram
Vibroide	Bacilo curvo en forma de "coma"