



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio de la corrosión por bacterias sulfato reductoras (BSR)  
aisladas de un gasoducto**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

Patricia Gómez Lamadrid

**MÉXICO, D. F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 según el tema:

Presidente	Lilia Vierna García
Vocal	Biserka Sveshtarova Pekarkova
Secretario	María del Pilar Granada Macías
1er. Suplente	Víctor Manuel Luna Pabello
2do. Suplente	Norma Trejo Medina

Sitio donde se desarrollo el tema: Instituto Mexicano del Petróleo

Asesor del Tema: Dr(a). Biserka Sveshtarova \_\_\_\_\_  
Pekarkova

Sustentante: Patricia Gómez Lamadrid \_\_\_\_\_

# **Agradecimientos**

Al **Instituto Mexicano del Petróleo** por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A **mi asesora la Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova** por todo su apoyo, consejos, aportaciones y sugerencias para la elaboración de la presente.

A **mis profesores** por sus conocimientos transmitidos para mi formación profesional.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** por darme la oportunidad de formar parte de ella para lograr mi proyecto de vida.

“Por mi raza hablara mi espíritu”

# Dedicatoria

Dedico esta tesis a:

**DIOS** por estar a mi lado en todo momento y por permitirme cumplir con una de mis metas.

Mis padres Lucia e Ismael para agradecerles el esfuerzo realizado para brindarme lo necesario en mis estudios, por su confianza depositada en mí y por que los quiero mucho.

Mi mamá Melia por su gran cariño y comprensión de toda la vida.

Mi esposo Hervery por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su inmenso amor y por ser la persona que llena de gratos momentos mi vida.

Paty chiquita porque quiero ser un buen ejemplo en su vida y por inspirarme a superarme cada día más.

Mi amiga Norma por impulsarme a concluir esta meta.

Y a todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

# **Índice**

---

	Página
I. Introducción .....	1
II. Objetivos .....	7
III. Generalidades .....	9
1. Corrosión .....	10
2. Corrosión Causada por Microorganismos .....	11
3. Microorganismos que intervienen en la corrosión .....	13
3.1. Bacterias Sulfato Reductoras .....	13
3.2. Sulfo bacterias .....	15
3.2.1. Sulfo bacterias fototrofas anóxicas .....	16
3.2.2. Sulfo bacterias quimiolitotrófas aerobias .....	17
3.3. Bacterias de hierro y manganeso .....	18
3.4. Bacterias formadoras de limo .....	19
3.5. Bacterias reductoras de metal .....	20
3.6. Hongos .....	20
3.7. Algas .....	21
4. Formación de la Biopelícula .....	22
5. Mecanismo de la Corrosión Biológica .....	26
6. Métodos para determinar la velocidad de corrosión .....	34
6.1. Técnica Gravimétrica (Pérdida de peso) .....	34
6.1.1. Preparación de las muestras metálicas .....	34
6.1.2. Exposición de las muestras metálicas .....	35
6.1.3. Limpieza de las muestras metálicas .....	36
6.1.4. Cálculo de la velocidad de corrosión .....	36
6.2. Técnica Electroquímica (Resistencia a la Polarización) .....	36
7. Microscopia Electrónica .....	41
7.1. Microscopio Electrónico de Transmisión .....	42
7.2. Microscopio Electrónico de Barrido .....	43
IV. Materiales y Métodos .....	44
1. Muestreo .....	45
2. Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras .....	46

---

3. Estudio de la cinética de un consorcio de bacterias presentes en el gasoducto .....	47
3.1. Curva de crecimiento .....	47
3.2. Determinación de consumo de sulfato .....	48
3.3. Determinación de la producción de sulfuro .....	49
3.3.1. Preparación de la solución patrón .....	49
3.3.2. Determinación de la concentración de sulfuro de sodio en la solución patrón .....	50
3.3.3. Preparación de las soluciones estándar .....	50
3.3.4. Preparación de la curva de calibración .....	51
4. Determinación de la velocidad de corrosión .....	51
4.1. Pérdida de peso .....	51
4.2. Resistencia a la Polarización .....	53
5. Microscopio Electrónico de Barrido .....	55
V. Resultados y Discusión .....	57
1. Muestreo .....	58
2. Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras .....	58
3. Estudio de la cinética de un consorcio de bacterias presentes en el gasoducto .....	60
4. Determinación de la velocidad de corrosión .....	65
4.1. Pérdida de peso .....	65
4.2. Resistencia a la Polarización .....	67
5. Microscopio Electrónico de Barrido .....	73
VI. Conclusiones .....	81
VII. Bibliografía .....	83
Apéndice .....	90

## **I. Introducción**

A lo largo de la historia el hombre en su afán de lograr mejores condiciones de vida, ha usado constantemente su ingenio. Para lograr tal objetivo, ha usado metales que ahora forman parte de nuestra vida cotidiana, pues desde muy temprano por la mañana se hace uso del metal que está presente en los grifos del agua, en los utensilios de la cocina (tales como los sartenes, cuchillos, cucharas, etc.), en los medios de transporte (como autobuses, coches, trenes, aviones, etc.), en las estructuras de los edificios, casas y en las instalaciones de las industrias como por ejemplo reactores, tanques de almacenamiento, bombas, tuberías, etc.

Por todo esto se puede decir, sin temor a equivocarse, que vivimos en una civilización basada en el metal y que por lo tanto requerimos que los materiales metálicos, en los cuales está basada dicha civilización sean estables en la atmósfera terrestre y que sus propiedades mecánicas y decorativas no sean alteradas durante un periodo prolongado (Genesca J. y Avila M., 1986).

En la naturaleza los metales se encuentran combinados con otros elementos como el oxígeno, azufre, cloro o carbono, formando minerales. En esta forma los metales obtienen un estado de menor energía y por lo tanto son más estables en la atmósfera terrestre.

Para que el hombre pueda utilizar los metales en la vida diaria (uso doméstico, industrial, etc.) necesita separar los metales de los demás elementos con los que se encuentra combinado en la naturaleza. Para realizar dicho proceso se invierten grandes cantidades de energía ya sea térmica, eléctrica o de cualquier otro tipo.

Una vez que el metal es extraído, y se encuentra libre posee una elevada energía por lo que tiende a estabilizarse reaccionando con el medio ambiente que lo rodea para regresar a su forma original, a este fenómeno se le conoce como **corrosión**. Se puede decir, como una generalización, que cuanto mayor haya sido la cantidad de energía suministrada en la extracción de un metal a partir de su mineral, mayor será la tendencia a combinarse con otros elementos para regresar a su forma anterior (Genesca J. y Avila M., 1986).

Cuando el metal reacciona con el medio ambiente se forman algunos compuestos sobre su superficie, como los óxidos; estos compuestos por lo general son frágiles, de mal aspecto

y fácilmente desprendibles), originando una transformación continua del metal al repetirse periódicamente el proceso de oxidación. Sin embargo, existen diversas formas por las cuales un metal o aleación deja de ser útil a consecuencia de su inestabilidad frente al medio que lo rodea.

El metal puede disolverse lentamente y llegar a transformarse totalmente en otra especie (corrosión uniforme); o bien bajo ciertas condiciones se pueden formar grietas y romperse catastrófica y súbitamente al estar sujetos a un medio agresivo y a un esfuerzo mecánico moderado. También pueden sufrir de fatiga con la consecuente pérdida de resistencia cuando son sometidos a esfuerzos periódicos (corrosión por fatiga) o fragilizarse súbitamente y ser inoperativos (fragilidad por hidrógeno).

Los metales también pueden ser atacados por microorganismos de manera localizada formando así pequeños agujeros profundos que avanzan rápidamente, llegando a perforar gruesas secciones de estructuras metálicas, haciéndolas deficientes en sus propiedades mecánicas e inutilizándolas por completo (Corrosión Microbiológica) (Genesca J. y Avila M., 1986).

Es entonces cuando todos los conocimientos que se tienen sobre la lucha contra la corrosión deben ser aplicados para que un metal o aleación perdure durante periodos largos en servicio, sin transformarse rápidamente en formas combinadas, con el fin de evitar pérdidas económicas e incluso de vidas humanas.

A veces los daños causados por la corrosión pueden ser muy amplios, por ejemplo, la reparación de la falla de un oleoducto de crudo resultante de problemas de corrosión interna o externa. A parte del costo inherente de la sustitución del tramo de tubería dañada, se debe tener en cuenta el daño causado por el aceite derramado al terreno, el posible paro de la refinería y los consiguientes problemas de desabastecimiento que puede llegar a ocasionar. Por lo tanto los problemas ocasionados por la corrosión se dejan sentir en tres vertientes:

- 1) Económica (pérdidas directas e indirectas)
- 2) Conservación de recursos (agotamiento de las reservas naturales)

3) Seguridad humana (fallos fatales en medios de transporte, corrosión de bidones que contienen residuos radioactivos, escapes en tuberías de refrigeración de plantas nucleares, etc.) (Genesca J. y Avila M., 1986)

Un ejemplo de esto es lo sucedido en Guadalajara en abril de 1992 cuando explotó una alcantarilla causando la muerte de 215 personas y los costos estimados fueron de 75 millones de dólares (ver figura 1). (<http://www.corrosion-doctors.org/Localized/sewer.htm>)



**Figura 1.** Daño de la alcantarilla. (Foto de José M. Malo, Instituto de Investigación Eléctrica, México)

La importancia económica de la corrosión microbiana es grande ya que se ha estimado que alrededor del 10% de los casos de corrosión son atribuibles a la actividad microbiana.

Numerosas industrias se ven afectadas por problemas de corrosión microbiana como la industria química, extractiva del petróleo, del papel, de la alimentación, aeronáutica, naval, etc.

En México, la empresa más afectada es Petróleos Mexicanos (PEMEX) debido a que mantiene en operación un sistema de ductos terrestres de alrededor de 54 mil kilómetros y dos mil kilómetros más localizados en zonas submarinas por donde transporta petróleo crudo, gas natural, gas amargo, gas dulce, gasolinas, diesel y otros productos refinados, los

cuales se encuentran sometidos a altas temperaturas y presiones, así como a factores ambientales (cambios climáticos, lluvias, salinidad), a lo cual se suma una intensa erosión causada por los propios componentes de los hidrocarburos. Estos componentes son el ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) contenidos en los hidrocarburos, los cuales paulatinamente debilitan las paredes de los tubos que, a su vez, están sometidos a considerables esfuerzos mecánicos debido a la presión generada para bombear el fluido; además, se han encontrado microorganismos (14 nuevos tipos de bacterias desconocidas por la literatura científica que podrían contribuir a la corrosión del acero) (Greenpeace, 2005, IMP s.f.).

Las tuberías marinas enfrentan un problema más severo, pues el mar es el hábitat de cepas bacterianas que solas o en consorcio forman colonias altamente corrosivas y éstas pueden llegar a perforar un ducto a una velocidad de un centímetro por año. En el suelo hay también bacterias corrosivas con iguales consecuencias, a lo que debe añadirse que algunos suelos en que se entierran los ductos contienen elementos muy salinos que son de igual medida corrosivos. Por ejemplo en la sonda de Campeche en donde se tienen detectados problemas de corrosión microbiológica y salinidad, ya se han identificado cerca de 20 cepas bacterianas distintas causantes de corrosión (Los caminos del petróleo, 2000).

Cerca de la mitad de los ductos tienen más de 30 años de operación, por lo que en los últimos años se han registrado varias catástrofes en los estados de Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Campeche. Se tienen datos de que PEMEX es el responsable del 57% de las emergencias ambientales a nivel nacional con sustancias peligrosas (1,470 desastres ambientales de 1997 al 2001), siendo Veracruz el número uno con 502 desastres, Campeche con 419 y Tabasco con 391. En estos tres estados es donde ocurre el 88% de los desastres ambientales a nivel nacional (Greenpeace, 2005). Además se atribuye el 50% de los casos de corrosión en las tuberías de conducción subterráneas a la corrosión provocada por microorganismos; lo mismo ocurre con la mayoría de los problemas detectados en los circuitos de refrigeración, cascos de barcos, tanques de almacenamiento de combustibles, etc.

El hierro y el acero, el aluminio y sus aleaciones, el cobre, el zinc, el plomo y sus aleaciones son los metales más susceptibles de ser atacados por microorganismos. Los microorganismos que participan comúnmente en estos procesos son bacterias aerobias y anaerobias, hongos y microalgas, aunque sin duda las bacterias anaerobias son las más importantes (Otero Huerta E.,1997). Las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) pertenecen al grupo de las bacterias anaerobias y en recientes revisiones se ha enfatizado el incremento de la importancia de éstas como organismos claves en los problemas de corrosión, así como en la ecología microbiana, biodeterioro y biodegradación. Éstas bacterias se conforman por varios géneros y especies, variando la habilidad de influir en el deterioro del metal, por lo cual resulta importante reportar el género y especie de las bacterias involucradas en los problemas de corrosión. Se puede decir que el orden apropiado para evaluar el riesgo de la corrosión causada por las BSR dentro de un ambiente determinado es establecer el tipo de bacterias presentes y estudiar su fisiología y actividad metabólica (M. J. Feio et al., 1998).

El presente trabajo tiene como propósito determinar el efecto del consorcio de microorganismos en el cual están presentes bacterias sulfato reductoras en la corrosión de metales. Para realizar este estudio se utilizó una muestra obtenida de un gasoducto de PEMEX que transporta gas dulce del centro petroquímico Atasta hasta Cd. Pemex.

## **II. Objetivos**

- Determinar la presencia de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en la muestra obtenida del interior de un gasoducto de PEMEX.
- Determinar la cinética fisiológica del consorcio de microorganismos obtenido.
- Aislar las bacterias sulfato reductoras.
- Determinar la velocidad de corrosión.
- Analizar el daño causado por el consorcio.

## **III. Generalidades**

## 1. Corrosión

La **Corrosión** es un deterioro que sufre una sustancia (usualmente un metal) o sus propiedades debido a la reacción que tiene con su ambiente. De acuerdo con la Asociación Nacional de Ingeniería de la Corrosión (NACE), la **corrosión** es la deterioración de un material de construcción o sus propiedades como resultado de la exposición al ambiente. (S.W. Borenstein, 1994)

Para que se lleve a cabo la corrosión de un metal en un ambiente acuoso se debe contar con 4 elementos básicos que son:

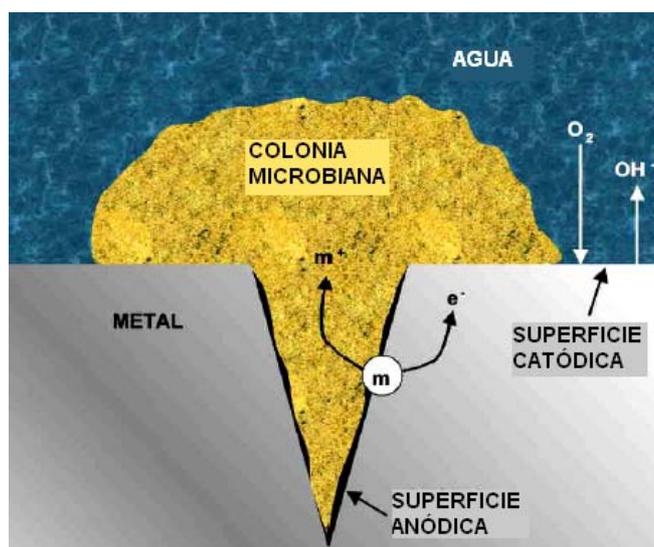
- Un ánodo
- Un cátodo
- Un electrolito y
- Un flujo de corriente (circuito)

donde el ánodo es el área del metal corroído, el cátodo es el área del metal no corroído, el electrolito es el líquido en donde está sumergido dicho metal y el circuito es el flujo de electrones que hay entre los dos electrodos.

Cuando un metal es expuesto a un ambiente acuoso la corrosión ocurre casi inmediatamente ya que en ese entorno se encuentran reunidos los cuatro elementos básicos. En algunos casos los microorganismos participan en el proceso de corrosión de manera directa o indirecta, acelerando la velocidad de corrosión y por lo tanto incrementando el daño en el sistema (Figura 2).

Para poder comprender, resolver y mitigar los problemas ocasionados por la corrosión sobre un metal o sus aleaciones se necesita tener conocimientos de la química del agua, metalurgia, electroquímica y microbiología.

La química del agua permite conocer el contenido de oxígeno, gas carbónico (CO<sub>2</sub>) y otros elementos como: iones metálicos, nitrógeno, fósforo, azufre, hierro, manganeso, calcio, etc., que pueda contener el agua; la metalurgia nos señalará las características de los metales o aleaciones; la electroquímica explicará el mecanismo de la corrosión y la microbiología proporcionará una descripción fisiológica y morfológica de los distintos microorganismos que producen corrosión en los metales (J. Chantereau, 1985; S.W.Borenstein, 1994).



**Figura 2.** Corrosión acuosa en presencia de microorganismos. Tomado de: Explosion Risk Reduction Chemical Munitions through Corrosion Enhancement, 1999. pag. 16

## 2. Corrosión Causada por Microorganismos

La corrosión puede ser ocasionada por factores no biológicos y/o factores biológicos. Cuando se trata de factores biológicos la corrosión es conocida como: **Corrosión influenciada por microorganismos** o **Corrosión causada por microorganismos**, la cual se define como una corrosión iniciada o acelerada por microorganismos (S.W.Borenstein, 1994).

La corrosión causada por microorganismos incluye todo un fenómeno de destrucción en el cual éstos pueden actuar directamente o por medio de las sustancias provenientes de su metabolismo, desempeñando un papel importante al acelerar un proceso ya establecido o al crear las condiciones favorables para que se produzca dicho fenómeno (J. Chantereau, 1985).

La Corrosión influenciada por microorganismos (MIC) afecta numerosos sistemas, y puede encontrarse en cualquier lugar donde exista un ambiente acuoso; pero no es exclusivo de los sistemas basados en agua, ya que la corrosión también ocurre en sistemas de combustibles y lubricación como se muestra en la tabla 1. (Lane Richard A., 2005)

Sistemas / Aplicación	Componentes / Áreas Problema	Microorganismos
Tuberías / Tanques de almacenamiento (agua, aguas residuales, gas y aceite)	Áreas de estancado en el interior Exterior de tuberías y tanques enterrados, especialmente en ambientes de arcilla húmeda	Aerobios y anaerobios productores de ácidos Bacterias sulfato reductoras Bacterias oxidantes de hierro/manganeso Bacterias oxidantes de azufre
Sistemas de enfriamiento	Torres de enfriamiento Intercambiadores de calor Tanques de almacenamiento	Bacterias aerobias y anaerobias Bacterias oxidantes de metal Bacterias formadoras de limo Algas Hongos
Muelles, malecones y otras estructuras acuáticas	Zonas donde salpica el agua Áreas bajo la marea	Bacterias sulfato reductoras
Tanques de combustible de vehículos	Áreas de estancado	Hongos
Plantas de generación de energía	Intercambiadores de calor Condensadores	Bacterias aerobias y anaerobias Bacterias sulfato reductoras Bacterias oxidantes de metal
Sistemas de riego	Áreas de estancado	Bacterias anaerobias Bacterias sulfato reductoras

**Tabla 1.** Sistemas con problemas persistentes de Corrosión influenciada por microorganismos

### 3. *Microorganismos que intervienen en la corrosión*

Los microorganismos asociados con los problemas de corrosión están clasificados como:

- Bacterias anaerobias que producen metabolitos que resultan corrosivos.
- Bacterias aerobias que producen ácidos minerales corrosivos.
- Hongos que pueden generar sustancias corrosivas como producto de su metabolismo, tales como ácidos orgánicos.
- Bacterias capaces de degradar metales y sus aleaciones.
- Bacterias formadoras de limo, que favorecen una concentración celular en la superficie del metal afectado.
- Algas.

(<http://www.corrosion-dotors.org/Microbial/Introduction.htm>)

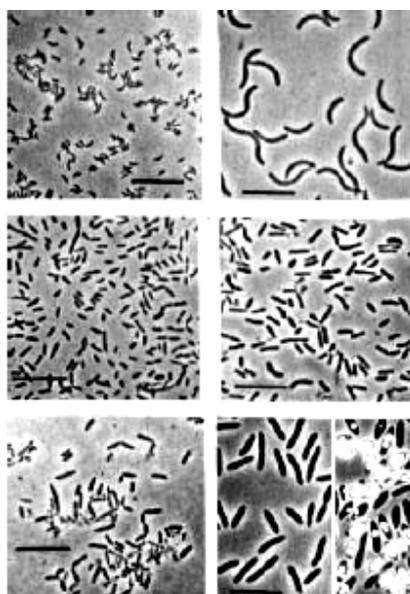
#### 3.1 *Bacterias Sulfato Reductoras*

En el grupo de las bacterias anaerobias se encuentran en primer lugar de acuerdo con el orden de importancia las **Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)**. Estas bacterias son anaerobias estrictas y no sólo requieren de la ausencia de oxígeno para su crecimiento, sino también necesitan un potencial redox bajo aproximado de 0 a -100mV (Torres, Rocio, 2000). Y su importancia reside en la reducción desasimilatoria de los sulfatos en ambientes reducidos (anaerobios) tales como sedimentos salinos, lodos anaerobios, ambientes acuáticos hipersalinos, acuíferos contaminados por hidrocarburos de petróleo y tracto gastrointestinal del hombre y animales (Jutta Kleilemper, 2000; George T. Macfarlane, 1991).

Las BSR pueden vivir asociadas en superficies sólidas o suspendidas en el agua. Las bacterias adheridas a la superficie son llamadas bacterias sesiles, cuando están suspendidas en el agua se denominan bacterias planctónicas. Generalmente se encuentran formando parte de consorcios con las bacterias productoras de exopolímeros, las cuales contribuyen a la generación de biopelículas. Una vez integradas, la biopelícula se convierte en un micronicho donde el metabolismo de los microorganismos aerobios presentes ocasiona una

disminución importante del oxígeno, provocando un ambiente anóxico, propicio para el desarrollo de las BSR (Oviatta, et al. 2003).

La morfología de estas bacterias puede ser esférica, ovoide, espiral, forma de bastón, o forma de vibrio; normalmente miden de 0.4 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran aislados, en pares y rara vez en agregados (Figura 3). Estos microorganismos son móviles o no móviles, su movilidad se debe a la presencia de flagelos polares o peritricos y/o filamentos. En su mayoría son Gram negativos, filamentosos y algunos son formadores de esporas los cuales son Gram positivos. Pocas especies contienen vacuolas de gas (Bergey's Manual, 1994).



**Figura 3.** Diversidad de bacterias sulfatorreductoras a) *Desulfovibrio desulfricans* b) *D. gigas* c) *D. baculatus* d) *Desulfomonas pigra* e) *Desulfotomaculum nigricans* f) *Desulfotomaculum acetoxidans* (células vegetativas y con esporas). Escala línea = 10 $\mu\text{m}$ .

El lactato, piruvato, etanol y en algunos casos malato y fumarato son utilizados como fuente de carbono y energía así como el hidrógeno molecular ( $\text{H}_2$ ) (Friedrich Widdel and Friedhelm Back, 1992).

Las bacterias sulfato reductoras comprenden varios grupos de bacterias que utilizan el sulfato como agente oxidante, reduciéndolo a sulfuro. Muchos pueden oxidar compuestos de azufre como sulfitos y tiosulfatos, o azufre elemental. Este proceso se conoce como metabolismo desasimilatorio, ya que no es asimilado en ningún compuesto orgánico. Estas bacterias son distribuidas en varias líneas filogenéticas. Tres de estas líneas son incluidas entre las proteobacterias en el subgrupo  $\delta$ :

1. **Desulfobacteriaceae**
2. **Desulfovibrionaceae**
3. **Syntrophobacteriaceae**

El cuarto grupo incluye los termófilos, que tienen su propio phylum *Thermodesulfobacteria*.

Otros microorganismos sulfato reductores son incluidos con otras bacterias entre las *Nitrospirae* y los Gram positivos *Peptococaceae*, por ejemplo *Thermodesulfovibrio* y *Desulfatomaculum*, respectivamente. También hay un género de la *Hechea*, capaz de reducir sulfatos, *Hecheacofolobus*.

La familia **Desulfobacteriaceae** contiene varios géneros, entre los cuales se encuentran: *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfomonile tredjei*, *Desulfonema limicolo* y *Desulfosarcia variabilis* (Friedrich Widdel and Friedhelm Back, 1992, Bergey's Manual, 1994).

Dentro de la familia **Desulfovibrionaceae** se encuentran los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium*, cuyas especies más representativas son: *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfomicrobium baculatum*.

También existen otros géneros de bacterias sulfato reductoras pertenecientes a las arqueobacterias termófilas capaces de desarrollarse en un intervalo de temperaturas entre los 65 a 70°C. El microorganismo más común es: *Thermodesulfobacterium commune* (Bergey's Manual, 1994). Éstas bacterias además de su participación en la corrosión también intervienen en la degradación de hidrocarburos (Jutta Kleilemper, 2000).

### 3.2 *Sulfobacterias*

Las **sulfobacterias** o bacterias oxidantes del azufre se dividen en dos grupos: las sulfobacterias fotótrofas anóxicas (sulfobacterias púrpuras y verdes) y las sulfobacterias quimiolitótrofas aerobias conocidas como sulfobacterias sin color.

### 3.2.1 *Sulfobacterias fotótrofas anóxicas*

Este tipo de bacterias se encuentra en el grupo de bacterias anaerobias que producen sustancias corrosivas (por ejemplo  $H_2SO_4$ ). Su morfología puede ser esférica, de espiral, de bastón o de vibrio; normalmente miden de 0.3 a 6.0  $\mu m$  de diámetro; se encuentran aislados o en agregados de forma regular o irregular. Son Gram negativos inmóviles o móviles, su movilidad es por flagelos monótricos o peritricos (Bergey's Manual, 1994).

Contienen pigmentos fotosintéticos localizados en la membrana citoplasmática, en los sistemas de membrana-intra citoplasmáticos o en cromosomas; comúnmente todas las especies contienen bacterioclorofilas y pigmentos carotenoides. Estas bacterias pueden ser fotoautótrofas o fotoorganótrofas bajo condiciones anaerobias o microaerobias. En contraste con la fotosíntesis oxigénica de la cianobacteria, la fotosíntesis anoxigénica depende de un donador de electrones externo como compuestos de azufre reducido, hidrógeno molecular ( $H_2$ ) o compuestos orgánicos.

Muchas especies son capaces de desarrollarse como quimioautótrofos o quimioorganótrofos bajo condiciones aerobias o microaerobia, excepto por el género *Chlorobium*; pueden utilizar ácidos grasos, ácidos orgánicos y/o alcoholes como donadores de electrones o como fuente de energía.

Estas sulfobacterias se pueden encontrar en lugares de tierra húmeda, ambientes acuáticos como agua dulce, agua salada, agua marina y ambientes hipersalinos.

Este tipo de bacterias se encuentran conformadas por las siguientes familias: **Rhodospirillaceae** (bacterias púrpura de "no sulfuradas"), **Chromatiaceae** y **Ectothiorhodospiraceae** (bacterias púrpuras), **Chlorobiaceae** (bacterias verdes), **Chloroflexaceae** (bacterias verdes filamentosas) y **Heliobacteriaceae**, así como el género *Erythrobacter* que es aerobio (Elena N. Kondratieva, 1992).

Las especies más representativas de cada familia son: *Rhodospirillum rubium*, *Chromatium okenii*, *Ectothiorhodospira mobilis*, *Chlorobium limicola*, *Heliobacillus mobilis*, *Heliobacterium chlorum* y *Erythrobacter longus*.

### 3.2.2 *Sulfobacterias quimiolitótrofas aerobias*

Las **sulfobacterias incoloras** son del tipo de bacterias aerobias que producen ácidos minerales corrosivos; son Gram negativas, quimiolitótrofas, no contienen bacterioclorofila y pueden ser quimiolitótrofas obligadas o facultativas (Bergey's Manual, 1994).

Estas bacterias utilizan el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y compuestos reducidos de azufre para su metabolismo, oxidándolos hasta ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). En algunas especies el azufre elemental es el producto final de la oxidación y es almacenado dentro de éstas como reserva energética (Jean Chantreau, 1985).

Las sulfobacterias incoloras incluyen once géneros que son los siguientes: *Sulfolobus*, *Acidithiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Achromatium*, *Macromonas*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thioploca* (Jan W. M. La Rivière, 1992).

El género *Sulfolobus* se caracteriza por su morfología aislada, su crecimiento estrictamente aerobio, aunque bajo condiciones microaerófilas puede utilizar  $Fe^{3+}$  y  $MnO_4^{-2}$  como aceptores de electrones. Produce ácido sulfúrico y es capaz de oxidar azufre elemental en un rango de pH de 1 a 6 y a temperaturas de  $55^\circ$  a  $87^\circ C$ , por lo que se trata de un género de bacterias termófilas. La especie tipo es *Sulfolobus acidocaldarius*.

Las bacterias de los géneros *Acidithiobacillus* y *Thiomicrospira* son Gram negativas, pueden ser móviles por tener flagelos polares o ser inmóviles. Su energía la obtienen a partir de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre como: sulfuros, azufre elemental y tiosulfato. El producto final de la oxidación es el sulfato, aunque es posible que se acumule azufre elemental en el medio. Las especies tipo de cada género son: *Acidithiobacillus thioparus* y *Thiomicrospira pelophila* respectivamente.

Los géneros *Macromonas*, *Acidithiobacterium*, *Thiospira* y *Thiovulum* se caracterizan por ser de tamaño relativamente grande y por contener azufre intracelular. Las especies más conocidas son: *Macromonas mobilis*, *Thiobacterium bovista*, *Thiospira winogradskyi* y *Thiovulum majus*.

Las sulfobacterias de los géneros *Achromatium*, *Beggiatoa*, *Thioploca* y *Thiothrix* son filamentosas y se caracterizan por ser flexibles y encorvados. Son móviles por deslizamiento, depositan el azufre internamente en presencia de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y

de tiosulfato. Su nutrición puede ser quimiorganótrofa o quimiolitótrofa y se encuentran en ambientes acuáticos de agua de dulce y agua marina.

Las **especies tipo** son: *Achromatium oxaliferum*, *Beggiatoa alba*, *Thioploca schmidles*, y *Thiothrix nivea* (Bergey's Manual, 1994).

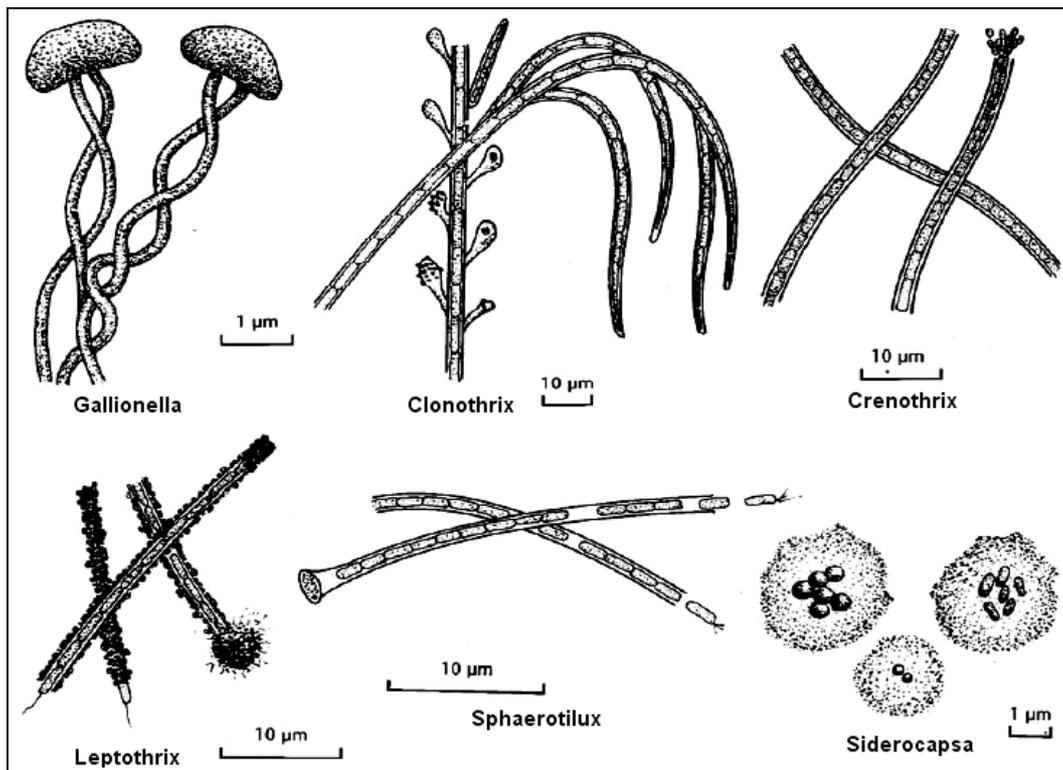
### **3.3 Bacterias de Hierro y Manganeso**

La morfología de estas bacterias es diversa la principal característica entre ellas es la facilidad con que forman agregados con óxidos férricos o de manganeso; generalmente los óxidos precipitados son evidentes en alguna estructura extracelular como cápsulas, vainas, y tallos, por lo que también se les conoce como Bacterias que Depositán Metal (MDB en inglés). La mayoría de estas bacterias no son móviles cuando están cubiertas por óxidos, pero poseen etapas de movilidad, en su mayoría son microaerofílicas aunque algunas se desarrollan con niveles de oxígeno atmosférico (Bergey's Manual, 1994).

Las bacterias de hierro oxidan el ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ); los géneros que integran a este grupo de bacterias son: *Siderocapsa*, *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Crenothrix* y *Clonothrix*. Estas bacterias también participan en la biotransformación de los óxidos de hierro y manganeso ya que son capaces de oxidar iones manganeso a iones mangánicos depositándolos en forma de dióxido de manganeso. Ver figura 4 (S.W. Borenstein, 1994, I.B. Beech, 1999).

El género *Gallionella* se caracteriza por la formación de apéndices, son Gram negativas, móviles por flagelo polar, aerobias estrictas y microaerofílicas, quimiolitóautótrofas y sólo utilizan al ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) como donador de electrones. La especie tipo es: *Gallionella ferruginea*.

Las bacterias de los géneros *Clonothrix*, *Crenothrix*, *Leptothrix* y *Sphaerotilus* son aerobias, Gram negativas, crecen en cadenas de células filamentosas y se encuentran en vainas. Las vainas pueden ser de color amarillo hasta café oscuro por los óxidos de hierro y manganeso que son depositados en ellas.



**Figura 4.** Morfología de las Bacterias de Hierro

Las cepas purificadas de estas bacterias son aerobias, quimioheterótrofas porque utilizan ácidos orgánicos y azúcares como fuente de carbono. Algunas depositan óxidos de hierro y manganeso dentro o fuera de su vaina y pueden llevar a cabo la oxidación de Fe(II) y Mn(II). Las especies más conocidas de cada género son: *Clonothrix fusca*, *Crenothrix polyspora*, *Leptothrix ochracea* y *Sphaerotilus natans* (Bergey's Manual, 1994).

### 3.4 Bacterias formadoras de Limo

Las **bacterias formadoras de limo** son un grupo diverso de bacterias aerobias, integrado por varios géneros, entre los que destacan las bacterias de hierro (por ejemplo *Gallionella*), *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* y *Bacillus*. Estas bacterias son importantes en la corrosión porque producen polímero extracelular que forma una capa en la superficie del metal, que se conoce como **limo** (Gregory Kobrin, 1993).

El crecimiento de los formadores de limo sobre la superficie del metal es en forma de parches, por lo cual pueden ser buenos eliminadores de oxígeno y crean sitios ideales para el desarrollo de bacterias anaerobias como las BSR. Además contienen varias enzimas capaces de interceptar y degradar sustancias tóxicas (como biocidas) y convertirlas en nutrientes para las bacterias (Gregory Kobrin, 1993).

### ***3.5 Bacterias reductoras de metal***

Estos microorganismos son conocidos como promotores de la corrosión de hierro y sus aleaciones a través de la disolución de la película de óxido metálico resistente a la corrosión que se encuentra sobre la superficie del metal. Lo que ocurre en la capa protectora es la reducción de los iones metálicos, por ejemplo en el acero inoxidable los óxidos metálicos se pierden o reemplazan por sus iones metálicos reducidos haciendo menos estable la película protectora, por lo tanto, disminuye el tiempo de vida útil en el metal y en la actualidad estas bacterias no son consideradas de gran importancia en la corrosión de metales.

Existen numerosos tipos de estas bacterias, entre ellas se incluyen los géneros *Pseudomonas* y *Shewanella* que son capaces de reducir los óxidos de manganeso y/o hierro y tienen que ser consideradas en las reacciones que influyen en la corrosión. Esto fue demostrado cuando se expuso un cultivo de *Shewanella putrefaciens* en contacto con una superficie de óxido de hierro y redujo el metal; la velocidad de la reacción depende del tipo de óxido metálico de la película (Beech I.B., 1999).

### ***3.6 Hongos***

Los **hongos** son organismos heterótrofos, aerobios que se desarrollan en medios ácidos y poco húmedos. La actividad de éstos se da fundamentalmente en presencia de hidrocarburos de cadenas lineales de 10 a 18 átomos de carbono (querosenos) que sirven de nutriente a los microorganismos; a través de su metabolismo éstos son degradados a ácidos

orgánicos como por ejemplo ácido cítrico, oxálico, glucónico, favoreciendo un descenso en el pH de valores hasta de 2 a 4 en la fase acuosa (Otero Huerta Enrique, 1997).

Habitualmente los hongos actúan simbióticamente con determinados tipos de bacterias, principalmente *Pseudomonas*. El hongo más estudiado es *Hormoconis* (clasificado anteriormente como *Cladosporium*) *resinae* por su participación en procesos de corrosión de materiales metálicos en contacto con hidrocarburos.

Además de *Hormoconis resinae*, también los hongos de los géneros *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Peniophom* se encuentran ligados con procesos de corrosión (Otero Huerta Enrique, 1997, Beech I.B., 1999).

### 3.7 Algas

Las **algas** son organismos autótrofos que se desarrollan en presencia de luz y humedad, que requieren de compuestos de nitrógeno inorgánico para crecer, aunque no son capaces de fijar N<sub>2</sub>; sólo las llamadas “algas azules” son capaces de fijar nitrógeno, actualmente se clasifican con las bacterias en el grupo de las cianobacterias. El color de las algas es determinado por la presencia de clorofila y pigmentos (por ejemplo algas verdes, rojas, o cafés). Las algas excretan ácidos orgánicos y otros compuestos orgánicos como producto final de su metabolismo, sólo excretan CO<sub>2</sub> cuando se desarrollan en ausencia de luz (R. W. Cahn, P. Haasen, E. J. Kramer (edit)).

Su participación en los procesos de corrosión es gracias a su actividad fotosintética ya que propicia el aporte de O<sub>2</sub> al medio, facilitando la despolarización de la reacción catódica en procesos de corrosión en las que participa este elemento como reactivo catódico (Otero Huerta, Enrique, 1997).

Por otra parte, las algas conducen a la formación de lodos o sedimentos que pueden favorecer el desarrollo de las bacterias anaerobias (Jean Chantereau, 1985).

Las algas habitualmente ligadas a la corrosión son: algas verdes *Chlorella*, verde-azuladas *Anneystis* y diátomeas *Diatomea* (Otero Huerta, Enrique, 1997).

#### 4. Formación de la Biopelícula

Cuando un metal es expuesto a un ambiente acuoso, la corrosión puede iniciar de manera casi inmediata por la **biopelícula** que empieza a formarse en la superficie del metal (Watkins Borenstein S., 1994).

La **biopelícula** esta compuesta por células inmovilizadas y por polímeros extracelulares, y sus características pueden cambiar con el tiempo (Gregory Kobrin, 1993).

La película se forma en 5 etapas que se describen a continuación:

1. *Acondicionamiento de la superficie.* Es la adsorción de macromoléculas orgánicas inertes a la superficie del metal formando una película delgada; como se muestra en la figura 5a

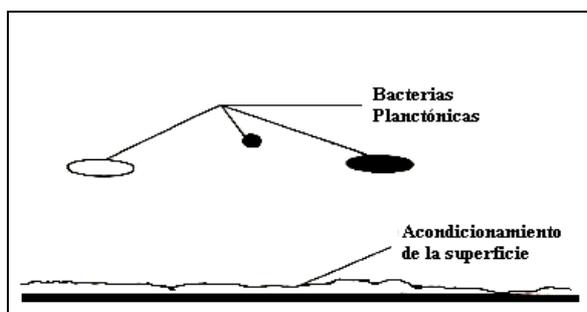


Figura 5a

2. *Adhesión de bacterias pioneras.* Las primeras bacterias planctónicas son unidas entre ellas mismas por la atracción electrostática y las fuerzas físicas. Algunas de estas células pueden adherirse permanentemente a la superficie con su polímero extracelular. Ver figura 5b

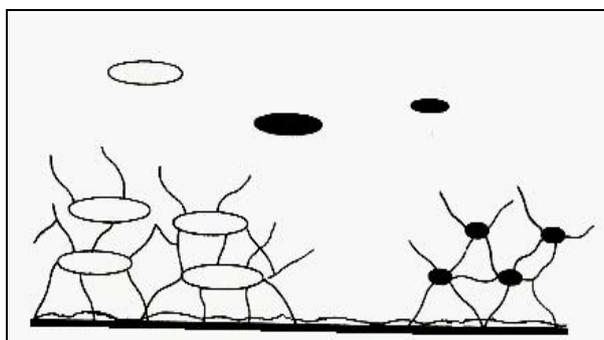


Figura 5b

3. *Formación de limo.* Algunas de las bacterias atadas producen polímero extracelular que sirve para reforzar su unión al metal y también como un sistema de intercambio de iones para atrapar y concentrar elementos traza a partir del agua. Con la acumulación de nutrientes, las células pioneras se reproducen y sus células hijas son capaces de producir su propio exopolímero, incrementando el sistema de intercambio en la superficie, de esta manera muy pronto las colonias de bacterias prosperan. Como se ilustra en la figura 5c

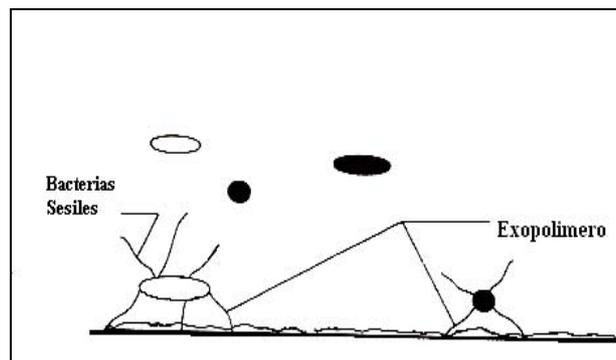


Figura 5c

4. *Segundos colonizadores.* Junto a los nutrientes presentes en la red formada por exopolímeros son atrapados otros microorganismos debido a la fuerza de la atracción electrostática. Estos segundos colonizadores metabolizan los desechos de las bacterias pioneras y además producen su propio desecho que es metabolizado a su vez por otros microorganismos. Ver figura 5d.

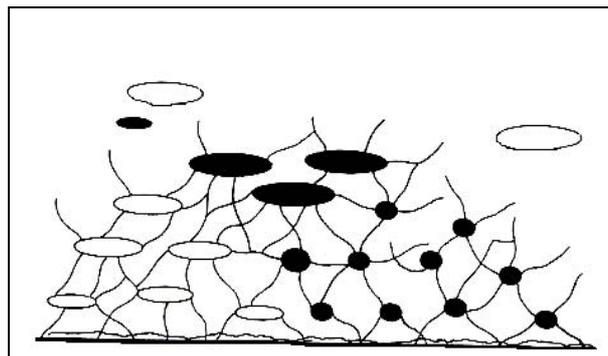
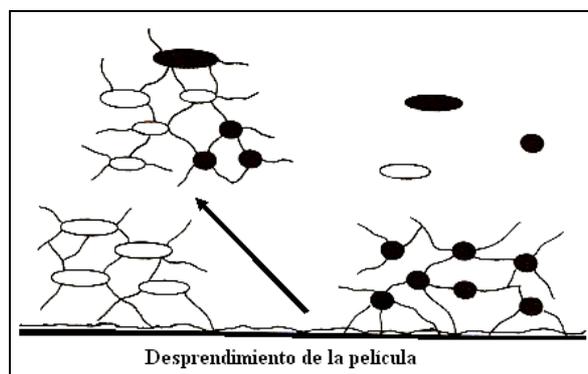
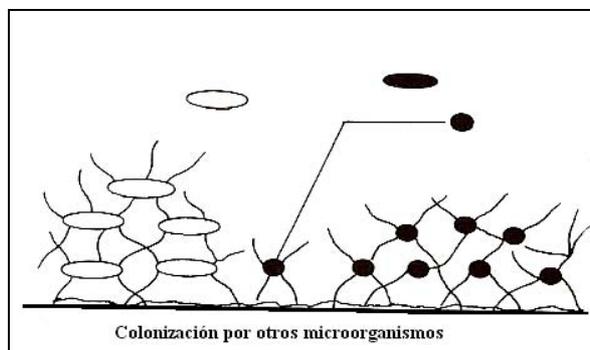


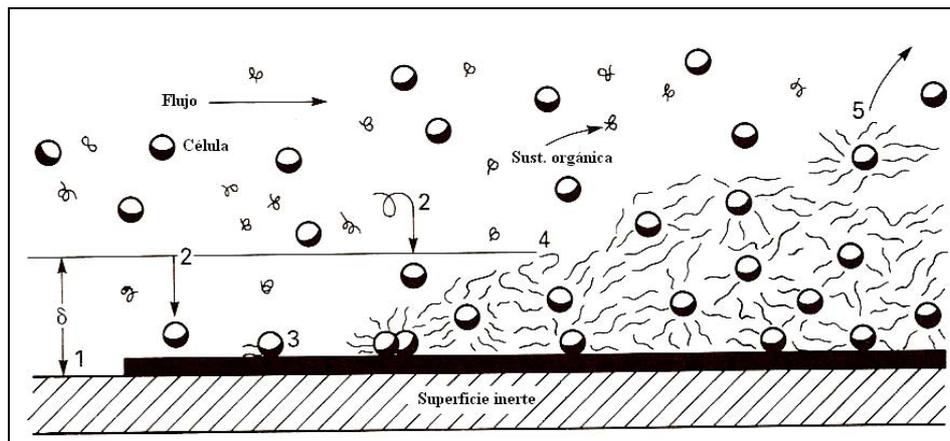
Figura 5d

5. *Funcionamiento completo de la biopelícula.* La biopelícula madura se comporta como un tejido vivo en la superficie de la tubería. Esta película es una comunidad metabólica cooperativa hecha de diferentes especies viviendo en un nicho, en donde

es posible desarrollar una capa anaerobia bajo la biopelícula aerobia. La película crece engrosándose lo que permite que se extienda a través de zonas de menor flujo de la tubería y cuando llega a las zonas en donde el flujo es mayor algunas células son desprendidas, y las áreas libres son nuevamente colonizadas por otros microorganismos y sus exopolímeros son entrelazados con la red de polímeros existente. Este fenómeno de inestabilidad ocurre cuando las condiciones físicas del área son inconstantes como se muestra en las figuras 5e y 5f (Gregory Kobrin, 1993).

**Figura 5e****Figura 5f**

El desarrollo de una biopelícula madura puede tardar desde varias horas hasta varias semanas, dependiendo del sistema y de los microorganismos colonizadores presentes (Gregory Kobrin, 1993). Por otro lado Susan Watkins Borenstein, describe la formación de biopelícula en 4 etapas, ilustradas en la figura 6.



**Figura 6.** Pasos de la formación de la biopelícula. La formación es iniciada cuando pequeñas moléculas orgánicas empiezan a ser atraídas a la superficie inerte (1) y los microorganismos son adsorbidos a la capa formada (2) Las células colocan hacia el exterior sus exopolímeros para alimentarse de la materia orgánica (3), aumento de la capa (4) Separación del agua de la película formada (5), producción y equilibrio de la capa (Tomado de: ASM Metals Handbook, 1987, Vol. 13, Corrosion, ASM International, Metals, Park, OH, p. 492).

La diferencia que existe entre ambas descripciones es que en el primer caso en la etapa 3 se menciona la formación de limo y Susan Watkins Borenstein no lo menciona en su explicación de la formación de biopelícula.

De acuerdo con Marisol Betancourth (2004) las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen.

El conocimiento de la interacción que existe entre los diferentes microorganismos que componen y habitan una biopelícula, es un área muy estudiada por el momento pues *in vitro* se ha visto que al bloquear las moléculas involucradas en la adherencia y comunicación celular puede inhibir el desarrollo de ellas.

Las biopelículas en el campo industrial están implicadas en diversos ámbitos constituyéndose en un enemigo cuando están involucradas en el *bioensuciamiento* o en un aliado cuando se utilizan en bioremediación. El bioensuciamiento genera la corrosión de equipos, cascos de barcos, tuberías y de campos petroleros. La corrosión de los metales por biopelículas es ocasionada por la actividad metabólica de consorcios bacterianos formados

en muchos casos por BSR y por las características propias de la superficie del material que permite su crecimiento. Durante la extracción y almacenamiento de petróleo las biopelículas compuestas por BSR producen grandes cantidades de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y hace que el crudo sea un producto de menor rendimiento. En los oleoductos y en general, en todas las tuberías, la formación de biopelículas ocasiona taponamiento de filtros y orificios de estas estructuras produciendo traumatismos al fluido normal.

Biofouling es la contaminación de un sistema producido por la actividad microbiana de la biopelícula, mientras que la bioremediación utiliza las biopelículas para mejorar las condiciones de un sistema contaminado (Betancourth, Marisol, 2004).

Los problemas de biofouling afectan económicamente a la industria papelera por el desarrollo de complejos microbianos sobre la maquinaria y a las plantas que poseen torres de enfriamiento, donde todo el sistema puede ser obstruido.

## ***5. Mecanismos de la Corrosión Biológica***

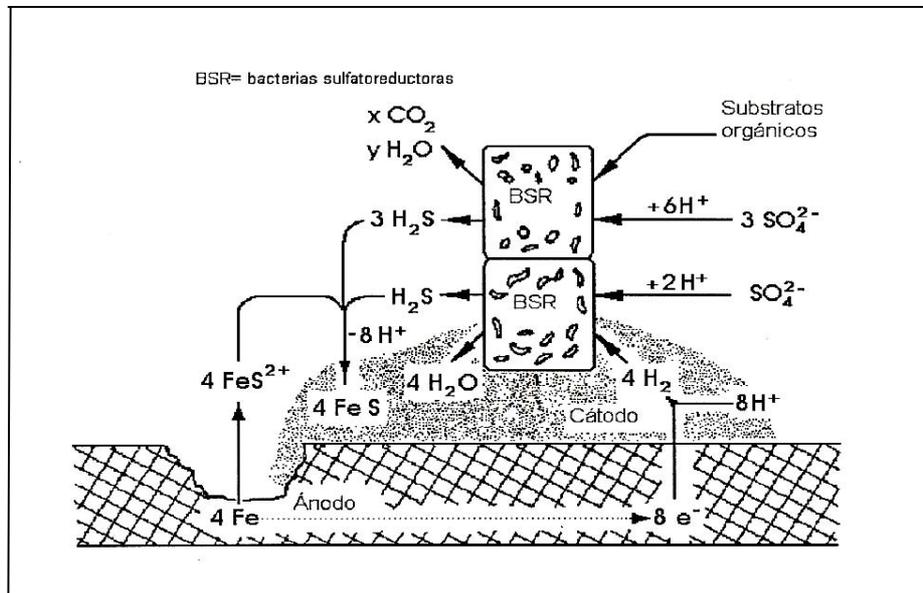
El **mecanismo de la corrosión** trata de explicar la participación de las bacterias más importantes en este proceso como son: las bacterias sulfato reductoras, sulfobacterias y bacterias de hierro. En la actualidad el mecanismo de corrosión aceptado está fundamentado en la teoría electrónica, esta teoría es en efecto racional y ofrece una explicación satisfactoria en relación con la mayor parte de los procesos de corrosión (Jean Chantereau, 1985).

A continuación se describirá brevemente la participación de cada una de las bacterias antes mencionadas, para comprender mejor el mecanismo de la corrosión.

➤ **Acción de las bacterias de hierro:** estas bacterias obtienen la energía necesaria para su síntesis a partir de la transformación 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 alterado el cual se encuentra 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 gracias al oxígeno y al gas carbónico disueltos, en general, el fenómeno se detiene ahí, pero cuando están presentes las ferrobacterias en el punto en que el metal ha sufrido el ataque ocasionan la movilización de los iones ferrosos y su transformación en sales férricas. Esto se produce con rapidez siempre que el medio contenga iones ferrosos, de esta manera se observa la formación de densas masas de “herrumbre” conteniendo los cuerpos bacterianos, a esa formación sigue la disolución ininterrumpida del metal (Jean Chantereau, 1985).

- **Acción de las bacterias sulfato reductoras:** En 1923, Von Wolzogen Kühr describió el importante papel que desempeñan estas bacterias, que más adelante será detallado. Las bacterias sulfato reductoras transforman los sulfatos en ácido sulfhídrico, el cual se combina con las sales ferrosas para dar un sulfuro de coloración negra, además el ácido sulfhídrico ejerce una acción corrosiva especial en las tuberías de plomo independientemente de que éstas se encuentren o no bajo tierra (Jean Chantereau, 1985). Ver figura 7.



**Figura 7.** Teoría de la despolarización catódica propuesta como mecanismo de la corrosión microbiana anaerobia (Von Wolzogen Kühr y van der Vlugt, 1934)

Estas bacterias ocasionan serios problemas de corrosión al reducir los sulfatos a sulfuro y sulfuro. Cuatro tipos de problemas pueden resultar de la actividad de reducir el sulfato:

1. Las BSR participan directamente en la reacción de corrosión y pueden causar directamente picadura en la base de la biopelícula producida por la colonia bacteriana.
2. La generación de H<sub>2</sub>S por parte de las BSR puede incrementar la corrosividad del agua.
3. La presencia de BSR en un sistema originalmente libre de H<sub>2</sub>S crea la posibilidad de agrietamiento por acción del sulfuro y aparición de picaduras.
4. La corrosión ácida resulta en la formación de sulfuro de hierro soluble que es un excelente material de taponamiento.

Debido a la incidencia de los problemas que ocasionan estas bacterias en diversos ramos industriales en la tabla 2 se muestran varios modelos que tratan de explicar el mecanismo de cómo las bacterias sulfato reductoras influyen en la corrosión de los aceros.

Procesos/sustancia corrosiva	Referencia(s)
Despolarización catódica por la hidrogenasa	Von Wolzogen Kühn and van der Vlugt, 1934; Bryant et al., 1991.
Despolarización anódica	Salvarezza and Videla, 1984; Daumas et al., 1988; Crolet, 1992.
Sulfuro	Little, et al., 1998.
Sulfuro de hierro	King y Wakerley, 1973.
Compuesto de fósforo volátil	Iverson y Ohlson, 1983.
Exopolimero con hierro	Beech y Cheung, 1995; Beech et al., 1996,1998, 1999.
Corrosión en forma de grietas, por la presión inducida por el sulfuro	Edyvean et al., 1998.
Grietas o ampollas inducidas por hidrogeno	Edyvean et al., 1998.

**Tabla 2.** Mecanismos sugeridos de la corrosión del metal por las BSR (I.B. Beech, 1999)

Para el control de las BSR se pueden utilizar agentes químicos, como por ejemplo glutaraldehído solo o en combinación con sales cuaternarias de amonio, ya que el consorcio bacteriano asociado a las BSR le confiere a estas bacterias la capacidad para adaptarse a través del desarrollo de películas resistente a un biocida en particular después de un prolongado período de tratamiento. Por lo tanto en muchos casos la mejor elección es la utilización de más de un biocida (Ovietta, et al. 2003).

Otras estrategias para el control de estas bacterias es limitar el acceso de la materia orgánica y nutrientes al sistemas, otra es la exclusión de aguas con sulfatos. También se puede mantener el control creando condiciones ambientales desfavorables para las bacterias, como sería la oxigenación del medio, cambiar el pH con ácido Clorhídrico a 5 o también creando una alcalinización en el agua, ambas soluciones tienen sus inconvenientes, la acidificación puede favorecer una corrosión química y la alcalinización induce la formación de precipitados inorgánicos no deseados (Torres, Rocio, 2000).

Angell y White (1995) proponen como mecanismos de remediación el empleo de molibdato de sodio, ya que tiene una doble acción, actúa como biocida y al mismo tiempo como un inhibidor de la corrosión. También se usa contra la corrosión ocasionada por las BSR la protección catódica del fierro sacrificando ánodos o aplicando una fuerza electromotriz externa.

➤ **Acción de las bacterias de azufre:** Estas bacterias metabolizan el azufre a partir de compuestos azufrados reducidos y los expulsan al medio ambiente o lo almacenan dentro de su célula o bien, lo oxidan hasta la formación de ácido sulfúrico. Cuando almacenan el azufre ocurre la formación de lodos, pero cuando oxidan el azufre hasta ácido sulfúrico producen una acidificación corrosiva modificando el pH del medio (Jean Chantereau, 1985).

De acuerdo con el mecanismo propuesto por Jean Chantereau, cuando un metal presenta áreas con imperfecciones se forman diferencias de potencial las cuales provocan el paso de corriente a través del líquido que se encuentra entre esas diferentes partes del metal, en realidad se forman pequeños elementos primarios.

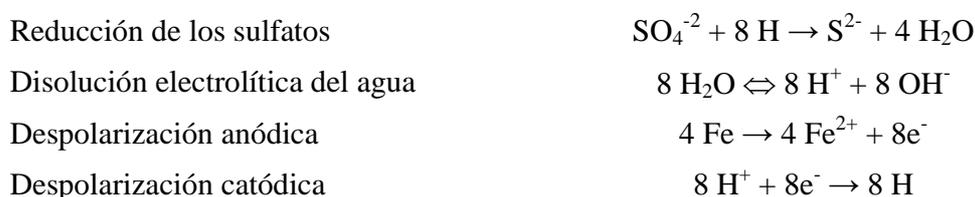
En las zonas anódicas la corriente pasa del metal al líquido y por el contrario, en las zonas catódicas, la corriente pasa del líquido al metal; de este modo se observa una disolución del metal en el ánodo y la formación de hidrógeno en el cátodo. En condiciones normales al desprenderse el hidrógeno catódico, permanece suspendido en la superficie del metal en forma de película y de este modo crea un potencial de oposición suficiente para neutralizar “la pila”; este fenómeno corresponde a la polarización.

De esta manera al principio se produce una ligera corrosión anódica con disolución del hierro en forma de sales ferrosas que pronto se oxidan en sales férricas por efecto del oxígeno del agua.

Al polarizarse los elementos sin embargo, la corrosión se suspende, en esta etapa del proceso se observa una ligera capa de herrumbre que no afecta al metal y dicho estado de equilibrio puede durar mucho tiempo, en tanto que el oxígeno no movilice el hidrógeno catódico. De hecho, toda sustancia o mecanismo que utilice el hidrógeno catódico despolarizará el sistema y la corrosión ocurrirá de nuevo.

Es al llegar a esta etapa cuando intervienen las bacterias de hierro y las bacterias sulfato reductoras. En la parte correspondiente al ánodo las bacterias de hierro obtienen su energía de la transformación de sales ferrosas en sales férricas y provocan la formación acelerada de herrumbre, con lo cual se rompe en forma continua el equilibrio por despolarización anódica y catódica simultáneamente. Este proceso produce la disolución continua del metal y llega hasta la perforación del mismo.

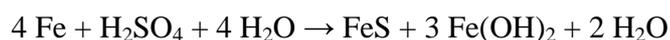
En la parte correspondiente al cátodo las bacterias sulfato reductoras movilizan el hidrógeno y provocan una despolarización catódica de la siguiente forma:



Los iones sulfuro van a reaccionar a la altura del ánodo con una parte de los iones ferrosos puestos en solución  $\text{S}^{2-} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{FeS}$ .

Otra parte de los iones ferrosos se combinan con los iones oxidrilos  $\text{Fe}^{2+} + 2 \text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2$ .

En consecuencia se puede escribir de una manera global:



En la figura 8 se ilustran todas las reacciones debidas a las bacterias de hierro y a las bacterias sulfato reductoras, pero las reacciones provocadas por las sulfobacterias no intervienen directamente en el proceso de corrosión, aunque sí modifican el medio ambiente (Jean Chantreau, 1985).

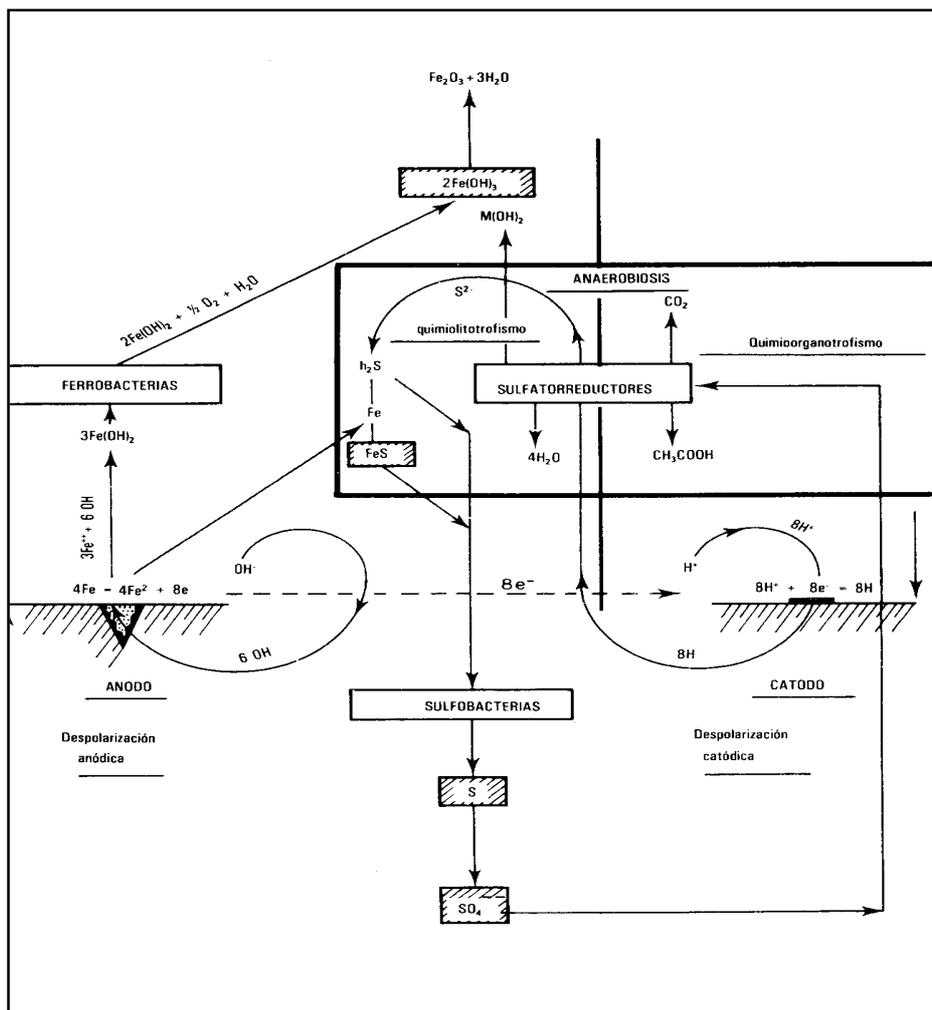


Figura 8. Ciclo de la Corrosión Biológica. Tomado de: Jean Chantereau, 1985.

Cuando la corrosión ocurre en el interior de las tuberías además de la acción de las ferrobacterias y de las sulfato reductoras, también participan las bacterias que oxidan el hidrógeno elemental, el representante de estas es *Hydrogenomonas flava*, la cual es una bacteria autótrofa.

Estas bacterias utilizan el hidrógeno y lo oxidan para obtener de él la energía para sus síntesis internas a partir del gas carbónico. Razón por la cual al movilizar el hidrógeno catódico llega a despolarizar el sistema ya descrito.

Cualquiera que sea el origen de esa despolarización, siempre es simultánea a una acelerada formación de herrumbre. En el punto afectado del metal se forma una especie de pústula de hidróxido de hierro hidratado que pronto se transformará en una gran vesícula

mucosa, gelatinosa, que puede llegar a obstruir por completo la luz del conducto si no es que antes se produce la perforación de éste (Figura 9). El hidróxido férrico más tarde se transformará en óxido de hierro duro y compacto. Ver la figura 10 (Jean Chantereau, 1985).



**Figura 9.** Corrosión en el interior de la tubería. Tomado de: Clarke, Bruce H. Microbiologically Influenced Corrosion. Fire Protection Engineering, 2001, No. 9, pag. 16

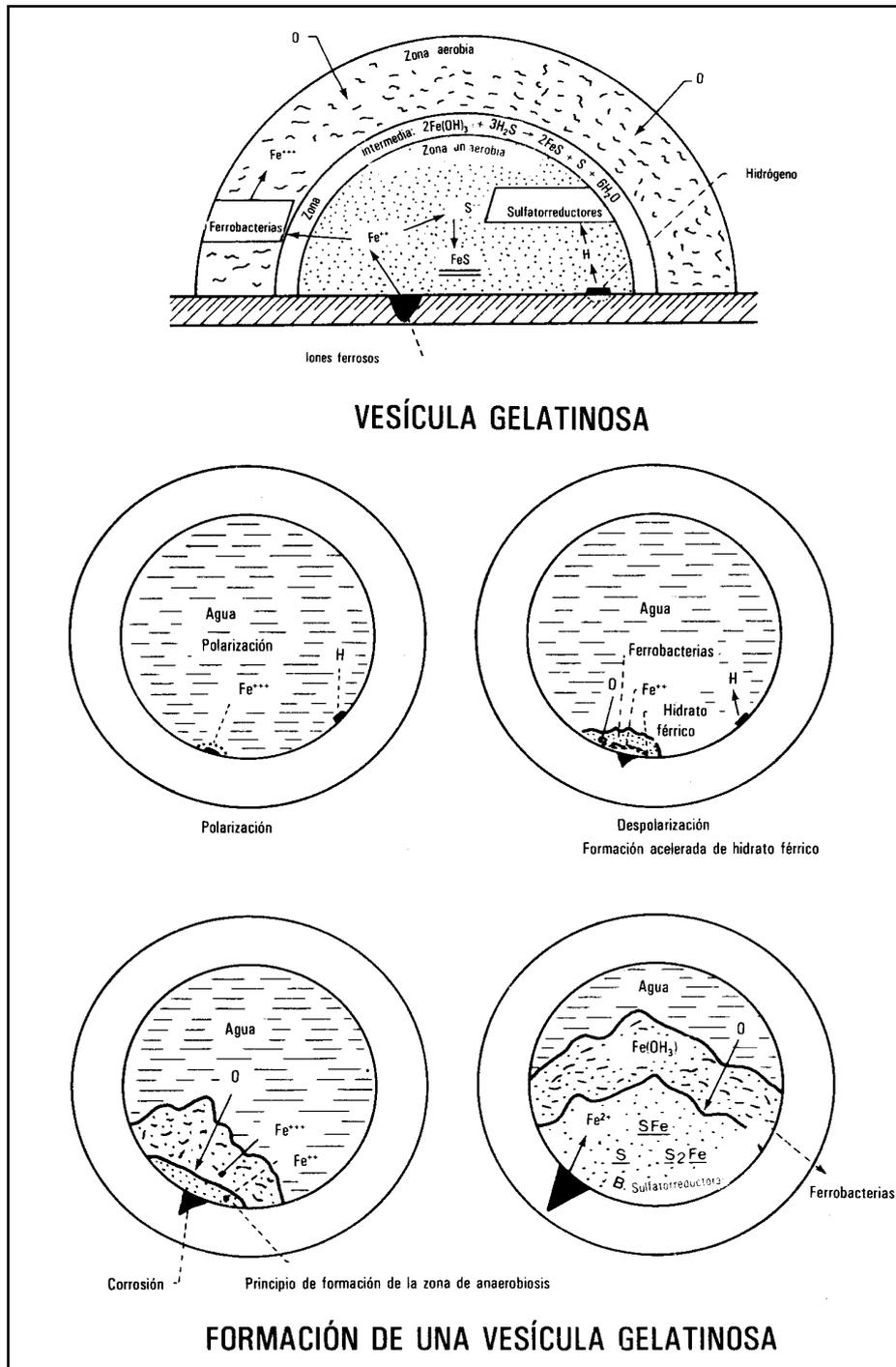


Figura 10. Corrosión Microbiológica en el interior de ductos. Tomado de: Jean Chantereau, 1985.

## **6. Métodos para determinar la velocidad de corrosión**

La corrosión causada por bacterias se puede evaluar determinando su velocidad, mediante el uso de dos métodos: gravimétricos y electroquímicos.

### **6.1 Técnica Gravimétrica (Pérdida de Peso)**

La técnica gravimétrica consiste en determinar la pérdida de peso que presenta el metal después de ser expuesto a los microorganismos durante un tiempo determinado. De acuerdo al estándar TM-01-77 de la National Association of Corrosion Engineers (NACE) el tiempo de exposición suficiente es de 30 días para observar cambios (Fontana, 1987).

Esta técnica se puede realizar en la industria o en el laboratorio. Cuando se realiza la técnica en el laboratorio se obtienen varias ventajas como que es más flexible, menos expansiva y no ocurren modificaciones o interrupciones debido a los procesos de la planta; aunque es casi imposible simular las condiciones exactas de la planta en el laboratorio (Denny A. Jones, 1992).

El desarrollo de esta técnica consiste en varias etapas:

- Preparación de las muestras metálicas
- Exposición de las muestras metálicas
- Limpieza de las muestras metálicas
- Cálculo de la velocidad de corrosión

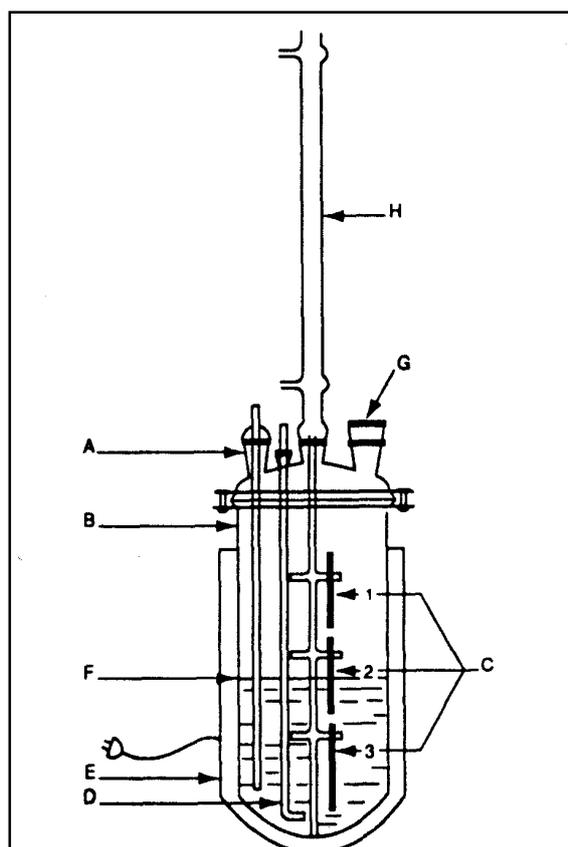
#### **6.1.1 Preparación de las muestras metálicas**

Las muestras metálicas son fabricadas a partir de una placa patrón, disponible para la construcción de aleaciones comunes. Las muestras son usualmente rectangulares o redondas. Cada muestra debe ser identificada de manera legible y permanente por medio de sellos. Enseguida se deben eliminar las impurezas de la superficie de las muestras con el fin de que sean homogéneas (Denny A. Jones, 1992).

### 6.1.2 Exposición de las muestras metálicas

Los métodos y aparatos para montar las muestras en el ambiente corrosivo esta limitado por la imaginación del investigador. El contenedor es seleccionado de acuerdo con el ambiente corrosivo y con el número de muestras. En la figura 11 se muestra un reactor de laboratorio típico que facilita controlar la temperatura, aeración y flujo de vapor para prevenir la pérdida de la solución por evaporación.

Después de la fabricación y preparación de la superficie, las muestras son pesadas, expuestas al ambiente corrosivo, lavadas para eliminar los productos de corrosión y pesadas nuevamente para determinar la pérdida de peso. El tiempo de exposición debe ser el adecuado para generar suficiente pérdida de peso para que la medición sea exacta (Denny A. Jones, 1992).



**Figura 11.** Matraz para hacer las pruebas de inmersión de las muestras. A, entrada del termómetro, B, cubierta de resina del matraz; C, muestras suspendidas (C-1 vapor, C-2 inmersión parcial, C-3 inmersión completa); D, burbujeo de gas, E, cámara de calentamiento; F, limite del líquido; G, entrada extra; H, condensador de reflujo (Tomado de D. O. Sprowls, *Metals Handbook*, Vol 13, Corrosion, 9th ed, ASM International, Metals Park, OH, pp.222-225, 1987. Reprinted by permission, ASM International).

### **6.1.3 Limpieza de las muestras metálicas**

La limpieza de las muestras se realiza por medio de métodos químicos y mecánicos, o por ambos para eliminar los productos de corrosión.

### **6.1.4 Cálculo de la velocidad de corrosión**

La velocidad de corrosión en milipulgadas de penetración por año (mpy en ingles) puede ser calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Vel. Corrosión} = (K \times W)/(A \times T \times D) \text{ en donde:}$$

K es una constante de conversión de unidades ( $3.45 \times 10^6$ )

T es el tiempo de exposición en horas

A es el área en  $\text{cm}^2$

W es la pérdida de peso en gramos y

D es la densidad del metal en  $\text{g/cm}^3$

(ASTM G1-90)

La velocidad de corrosión en el área de ingeniería frecuentemente es reportada como unidad de penetración por unidad de tiempo. También es reportada como unidad de perdida de peso por unidad de área por unidad de tiempo, las unidades utilizadas mas frecuentemente son miligramo por decímetro cuadrado por día (mdd), esta forma de reportar la velocidad es utilizada algunas veces en el área de investigación. Para la conversión de unidades se emplea la siguiente fórmula de acuerdo con Denny A. Jones:

$$1 \text{ mpy} = 1.44 \text{ (mdd)/gravedad específica}$$

## **6.2 Técnica Electroquímica (Resistencia a la Polarización)**

Dos métodos son disponibles para medir la velocidad de corrosión por polarización electroquímica:

- Extrapolación de Tafel
- Resistencia a la polarización

El método de la Resistencia a la polarización es el más importante, debido a que tiene mayor utilidad en el área de investigación (Denny A. Jones, 1992)

El método de Resistencia a la polarización presenta varias ventajas sobre la Técnica gravimétrica (pérdida de peso) ya que sólo requiere de pocos minutos para determinar la velocidad. Además se pueden obtener mediciones semicontínuas que son muy útiles en los estudios de cinética o en el monitoreo de procesos de plantas. Las mediciones de polarización no son destructivas y pueden ser repetidas numerosas veces para medir consecutivamente la velocidad en la misma muestra (Denny A. Jones, 1992).

Este método se puede aplicar debido a que en presencia de un medio acuoso, la corrosión es de naturaleza electroquímica. Tal corrosión es un proceso espontáneo que denota la existencia de una zona anódica, una zona catódica y un electrolito, siendo imprescindible la presencia de estos tres elementos para que este tipo de corrosión pueda existir, asimismo requiere contacto eléctrico entre la zona anódica y la catódica y que exista un potencial eléctrico entre las dos zonas (ánodo y cátodo) (Genesca Joan, 1986).

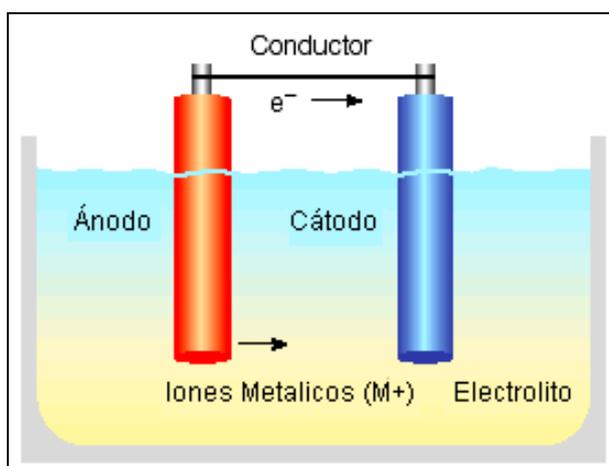
La **zona anódica** también conocida como **ánodo** describe aquella porción de la superficie metálica en donde tiene lugar la corrosión y en la cual se liberan electrones como consecuencia del paso del metal en forma de iones al electrolito. En esta zona se llevan a cabo las reacciones de oxidación del metal, por ejemplo:



La **zona catódica** (conocida como **cátodo**) es la porción del metal en la cual los electrones producidos en el ánodo se combinan con determinados iones presentes en el electrolito. Las reacciones catódicas (de reducción) más comunes en presencia de agua son:



En esta zona la corriente eléctrica sale del electrolito para entrar al metal, como se ilustra en la figura 12, cerrando el circuito eléctrico a través de un conductor metálico externo.



**Figura 12.** Dirección del flujo de corriente entre un ánodo y un cátodo en una celda de corrosión. Tomado de: Brondel Denis, Edwards Randy, et al, Corrosion in the Oil Industry

El **electrolito** es el medio acuoso en el cual está sumergido el metal, en caso de que el metal se encuentre expuesto al ambiente, el electrolito será el agua de condensación de la atmósfera.

Cuando las condiciones mencionadas arriba se cumplen la corrosión del metal se lleva a cabo, en la figura 13 se muestra la dirección del flujo de corriente en la tubería y las reacciones que se llevan a cabo en el ánodo y cátodo, pero lo que se quiere es medir la velocidad a la cual ocurre el proceso.

Para medir la velocidad de corrosión de un metal se requiere conocer otros términos como: la **energía potencial** de un metal, que es la energía que poseen todos los metales antes de corroerse y de acuerdo con el valor de la energía potencial de cada metal será la tendencia a que un metal se oxide. A la enumeración de estos potenciales (energía potencial) se le conoce como Serie Galvánica, en donde el arreglo de los metales depende del electrolito seleccionado; existe otra serie llamada “Serie electromotriz de potenciales estándar de electrodo” en donde las condiciones de medida son más rígidas, ya que se toman en cuenta los valores de temperatura, de presión y de concentración de los electrolitos.

Cuando un metal es corroído existe una intensidad de corriente en el proceso anódico (reacción 1) y otra intensidad de corriente en el proceso catódico (reacciones 3 y 4); estas intensidades son iguales entre sí e iguales a la **intensidad de corrosión** ( $i_{\text{corr}}$ ) cuando no existe ninguna influencia externa; dentro de este equilibrio eléctrico el metal se corroe a un

potencial característico de su naturaleza y de la del medio conocido como **Potencial de corrosión** ( $E_{\text{corr}}$ ).

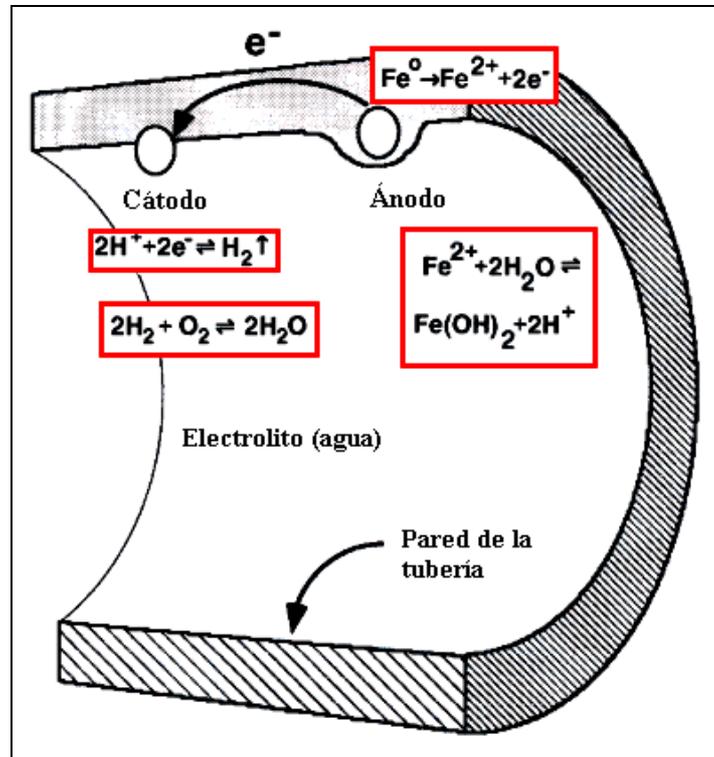


Figura 13. Dirección del flujo dentro de la tubería. Tomado de: Lesson 19.

La intensidad de corrosión ( $i_{\text{corr}}$ ) es una magnitud eléctrica que puede usarse como medida de la velocidad de corrosión (Andrade, 1991).

Concluida la explicación de los parámetros más relevantes, el siguiente paso es explicar el fundamento del método de Resistencia a la Polarización ( $R_p$ ).

Cuando un metal se está oxidando, posee un Potencial de corrosión ( $E_{\text{corr}}$ ) conocido y a causa de la electroneutralidad de la materia, los procesos de oxidación y reducción se compensan y externamente no se aprecia ninguna corriente porque como las intensidades de corriente anódica ( $i_a$ ) y catódica ( $i_c$ ) son de distinto signo se anulan y la intensidad de corriente de corrosión ( $i_{\text{corr}}$ ) no se puede medir directamente:

$$i_a = |i_c| = i_{\text{corr}} \quad (5)$$

Por lo que es necesario romper el equilibrio por alteración del sistema con una perturbación, por ejemplo, imposición de un potencial distinto al de corrosión, obteniendo una intensidad externa global:

$$i_T = i_a - |i_c| \quad (6)$$

Ambas magnitudes  $i_T$  o intensidad neta que se mide y el potencial aplicado (su diferencia con el potencial de equilibrio define la polarización  $\eta$ ) se encuentran relacionados entre sí por la ley cinética de Butler-Volmer:

$$i_T = i_{corr} \left[ \exp \frac{\alpha n F}{RT} \eta - \exp \frac{-\beta n F}{RT} \eta \right] \quad (7)$$

La representación gráfica de esta expresión se hace graficando una curva de polarización ( $i/E$ ) intensidad de corriente ( $i$ ) Vs potencial  $E$ .

Ahora bien, el método de resistencia a la polarización consiste en la simplificación de la ecuación 6 de Butler-Volmer, siempre que las polarizaciones sean muy pequeñas.

Así para el caso límite en que  $\eta \rightarrow 0$  y teniendo en cuenta que, en el límite para  $x \rightarrow 0$ ,  $e^x = 1+x$  y  $e^{-x} = 1-x$ , la expresión de Butler-Volmer se transforma en:

$$i_T = i_{corr} \left( \frac{\beta n F}{RT} + \frac{\alpha n F}{RT} \right) \eta \quad (8)$$

De donde, considerando los valores de las pendientes de Tafel, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\beta_a = \frac{2.303 RT}{\alpha n F} \quad (9)$$

$$\beta_c = \frac{2.303 RT}{\beta n F} \quad (10)$$

Cabe escribir:

$$i_{corr} = \frac{1}{2.303 \left( \frac{1}{\beta_a} + \frac{1}{\beta_c} \right)} \times \frac{d_{i_T}}{d\eta} = \frac{\beta_a \beta_c}{2.303 (\beta_a + \beta_c)} \times \frac{d_{i_T}}{d\eta_{\eta \rightarrow a}} \quad (11)$$

A través de la medida del cociente  $\frac{d\eta}{d_{iT}} = \frac{\Delta E}{\Delta I}$

La pendiente de la curva de polarización para  $E \rightarrow E_{\text{corr}}$ , se llega a la determinación de  $i_{\text{corr}}$ .

Como la pendiente de la curva de polarización tiene las dimensiones de una resistencia, el método es conocido como “Resistencia de polarización, **R<sub>p</sub>**”. De este modo, la expresión simplificada de la  $i_{\text{corr}}$  es:

$$i_{\text{corr}} = \frac{B}{R_p} \quad (12)$$

Donde el valor de la constante B puede variar entre límites relativamente estrechos y su valor es accesible por distintos procedimientos, ya sea cálculo experimental de la pendientes de Tafel o empíricamente por comparación con datos obtenidos a partir de pérdidas de peso (Andrade, Ma. Carmen, 1991).

## 7. Microscopía Electrónica

En la microscopía electrónica se pueden observar partículas pequeñas (0.2 $\mu\text{m}$ ) como virus o estructuras internas de la célula. El microscopio electrónico utiliza un haz de electrones en vez de luz, los cuales viajan a través de ondas. El poder de resolución de este microscopio es muy grande en comparación con el poder de resolución de los microscopios de luz, contraste de fase, y fluorescente. El mejoramiento de la resolución es debido a que la longitud de onda de los electrones es aproximadamente 100,000 veces más corta que la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico utiliza lentes electromagnéticos en lugar de lentes de vidrio, para enfocar el haz de electrones en el espécimen. Existen dos tipos de microscopio electrónico: el de transmisión (TEM) y el de barrido (SEM) (Madigan, et al., 2000).

### **7.1 Microscopio Electrónico de Transmisión**

El Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) utiliza lentes electromagnéticas para controlar la iluminación, el enfoque y los aumentos. La muestra es colocada en una rejilla de cobre. El haz de electrones pasa a través del espécimen y después a través de las lentes electromagnéticas del objetivo, el cual amplía la imagen. Finalmente, los electrones son enfocados por las lentes electromagnéticas de un proyector sobre una pantalla fluorescente o una placa fotográfica. La imagen final, llamada micrografía electrónica de transmisión, aparece con zonas claras y oscuras debido al número de electrones absorbidos por las diferentes áreas del espécimen.

En la práctica este microscopio puede resolver puntos tan próximos como 2.5 nm, y ampliar un objeto de 10,000 a 100,000 veces. Debido a que varios especímenes microscópicos son muy delgados, el contraste entre sus ultraestructuras y el fondo es débil y ese contraste se puede mejorar mediante el uso de tinciones que absorben los electrones y producen una imagen más oscura en la región teñida. Las sales de varios metales pesados como plomo, osmio, tungsteno y uranio son usados en las tinciones. Estos metales pueden ser fijados en el espécimen (tinción positiva) o usados para incrementar la opacidad del campo que rodea el espécimen (tinción negativa). La tinción negativa es útil para el estudio de especímenes muy pequeños como partículas vírales, flagelos bacterianos y moléculas de proteínas.

En adición a la tinción positiva y negativa el microorganismo puede ser observado mediante la técnica de sombreado. En este procedimiento el metal pesado como el platino y el oro son rociados en un ángulo de 45° de manera que golpea al microorganismo por un lado, en donde el metal se acumula y el área no sombreada al lado opuesto del microorganismo deja atrás de sí un área clara como sombra. Esto le da un efecto tridimensional al microorganismo y provee de una idea general sobre su morfología y tamaño.

El microscopio electrónico de transmisión tiene alto poder de resolución y es extremadamente útil para analizar las diferentes capas de los microorganismos. Sin embargo tiene algunas desventajas. Debido a que los electrones tienen un poder de penetración limitado, solamente una sección delgada del microorganismo (alrededor de

100nm) puede ser estudiada efectivamente. Entonces el microorganismo no tiene un aspecto tridimensional. En adición, el microorganismo puede ser fijado, deshidratado y observado bajo vacío para prevenir el esparcimiento de los electrones. Estos tratamientos no solamente matan al microorganismo, sino que también causan arrugamiento y distorsión, de manera que a veces pueden aparecer como estructuras adicionales conocidas como artefactos (Madigan, et al., 2000).

## ***7.2 Microscopio Electrónico de Barrido***

El microscopio electrónico de barrido (SEM) soluciona el problema de seccionar la muestra, y provee una vista tridimensional del espécimen.

Este microscopio tiene un cañón de electrones que produce un haz de electrones (llamado haz primario de electrones) que sirve para enfocar, estos electrones atraviesan lentes electromagnéticas y son dirigidos sobre la superficie del espécimen. El haz primario de electrones arranca nuevos electrones de la superficie de la muestra y estos electrones secundarios son transmitidos hasta un colector de electrones, amplificados y utilizados para formar una imagen sobre una pantalla o sobre una placa fotográfica.

El microscopio electrónico de barrido es especialmente útil en el estudio de estructuras superficiales de células intactas y virus. En el estudio de la corrosión ayuda a analizar el daño causado por las bacterias y determinar el tipo de corrosión. En la práctica puede resolver puntos tan próximos como 20 nm y suele aumentar los objetos de 1,000 a 10,000 x (Madigan, et al., 2000).

## **IV. Materiales y Métodos**

Para el estudio de la corrosión de un gaseoducto de PEMEX se realizaron las siguientes actividades:

1. Muestreo
2. Aislamiento de bacterias sulfato reductoras
3. Estudio de la cinética de un consorcio de bacterias presentes en el gaseoducto
4. Determinación de la velocidad de corrosión
5. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

## ***1. Muestreo***

Las muestras utilizadas en este estudio se tomaron de un gaseoducto de PEMEX que transporta gas dulce del centro petroquímico Atasta hasta Cd. Pemex para bombeo neumático. El gaseoducto mide 36 pulgadas de diámetro y 92 km de longitud y fue construido en 1980, el mismo opera a una temperatura de 40°C.

El gas transportado es un gas residual obtenido de un proceso petroquímico el cual se somete a un proceso de endulzamiento para eliminar el ácido sulfhídrico mediante lavados con dietiletanolamina (DEA) o MEA, posteriormente se deshidrata en su totalidad para evitar la formación de hidratos de carbono y por último se pasa a plantas criogénicas en donde a través de la aplicación de bajas temperaturas y presión se licua y se separan los gases tales como heptano, hexano y pentano. Estos gases se condensan y posteriormente se licua el etano quedando como gas residual únicamente el metano.

## ***2. Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras***

El aislamiento de las bacterias sulfato reductoras se realizó por medio de tres métodos:

**a)** El primer método consiste en aislar a las bacterias sulfato reductoras a partir de la muestra, la muestra es inoculada por estría en cajas petri que contienen agar API R38 e incuban en jarra de anaerobiosis a 37°C durante 5 días.

**b)** En el segundo método las bacterias son aisladas utilizando agar Postgate E y se incuban en jarra de anaerobiosis a una temperatura de 37°C durante 5 días.

**c)** El tercer método se realizó en dos etapas que se describen a continuación:

Etapa 1. Se utilizan medios líquidos de enriquecimiento como son el medio API y el medio Postgate B, recomendados por Postgate. (Postgate, 1979)

Etapa 2. Se utiliza el medio selectivo Postgate E.

Procedimiento: la muestra se inocula en los medios enriquecidos API y Postgate B e incuba a 37°C durante 48 horas. A continuación se hacen diluciones (hasta  $10^{-10}$ ) e inocula de cada dilución en el medio selectivo Postgate E en el cual las bacterias sulfato reductoras producen colonias negras, debido a la formación de sulfuro ferroso. Para este aislamiento se utilizan tubos de 15cm x 1cm para evitar la aerobiosis (Postgate, 1979).

Las colonias negras aisladas se extraen con una pipeta Pasteur estéril, después de cortar los tubos asépticamente a la altura de la colonia y depositan en un vial con el medio API, e incuba a 37°C durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se realiza una inspección microscópica para verificar la pureza del cultivo y además se determina la presencia de contaminantes aerobios y anaerobios (Postgate, 1979).

Los contaminantes aerobios se determinan inoculando el cultivo puro en cajas petri con agar nutritivo e incubando a 37°C durante 48 horas en condiciones aerobias. La presencia de colonias después de haber transcurrido este tiempo indica una contaminación por microorganismos aerobios (Postgate, 1979).

Para la detección de los contaminantes anaerobios se hacen 5 diluciones en solución isotónica a la cual se añade nitrógeno para eliminar el oxígeno presente. De las diluciones se inocula en agar peptona-glucosa adicionado de una solución estéril de sulfato ferroso

amoniacal al 0.5%. El pH se ajusta entre 7 - 7.6 y el medio se distribuye en 5 tubos estériles de 15 x 1 cm. La incubación se realiza a 37°C durante 4 o 5 días. El cultivo se considera puro si no aparecen colonias blancas después del período de incubación (Postgate, 1979).

### ***3. Estudio de la cinética de un consorcio de bacterias presentes en el gaseoducto***

Para determinar la cinética del consorcio se hizo la curva de crecimiento del mismo y se determinó el consumo de iones sulfato y la generación de ácido sulfhídrico. Ver el diagrama 1.

#### ***3.1 Curva de Crecimiento***

La curva de crecimiento del consorcio se construyó monitoreando la proliferación celular en dos viales de 100 ml sellados herméticamente y burbujeados con nitrógeno gaseoso mediante el uso de una aguja, con la finalidad de obtener condiciones anaerobias, el vial contiene el medio Postgate C; uno de los viales contenía un clavo desengrasado con acetona previamente. La incubación se realizó a 37°C con agitación a 30 rpm durante 3 días. La densidad óptica se midió a 660 nm en un espectrofotómetro HACH tomando muestras cada 3 horas (Feio, Maria J., 1998).

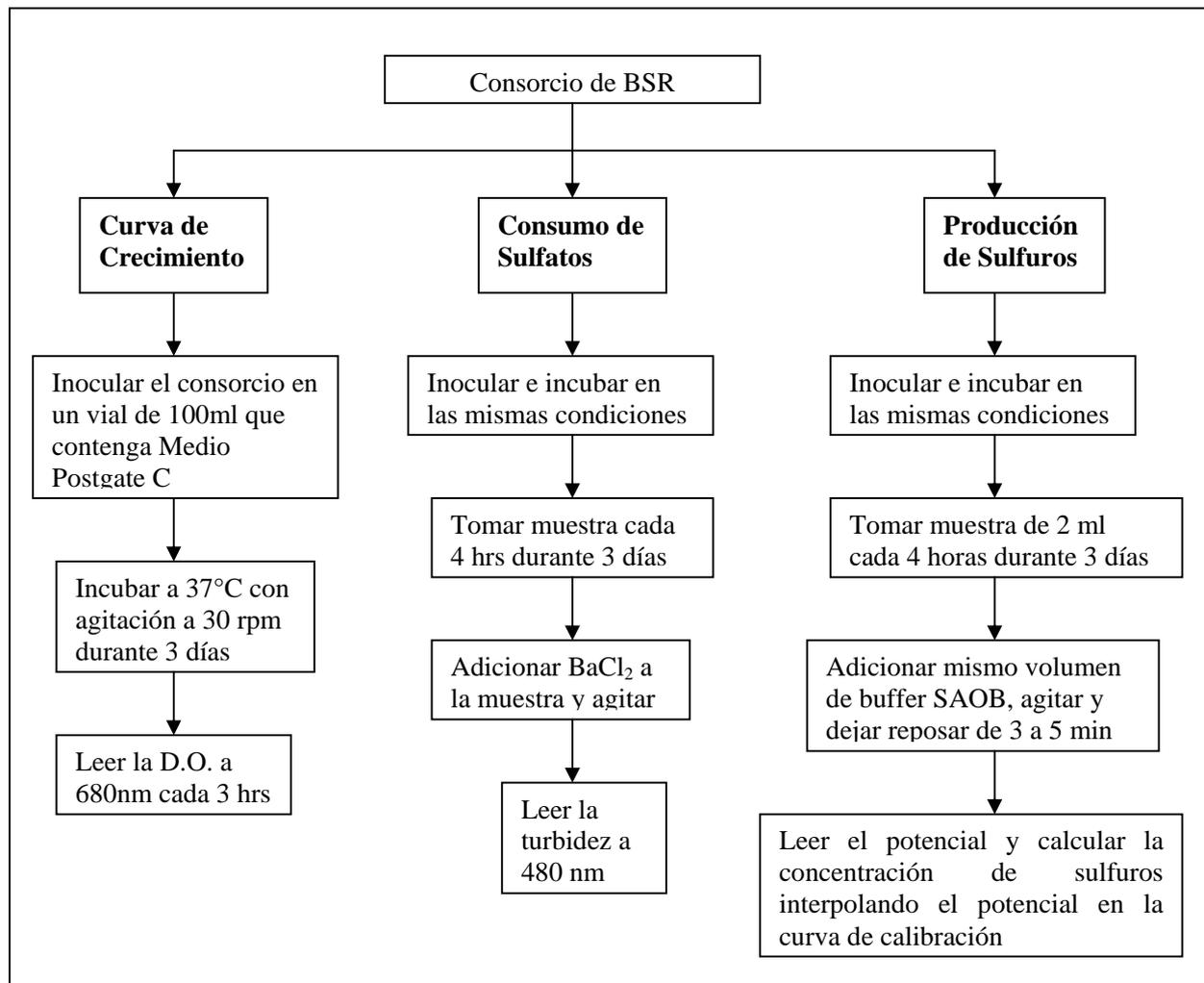


Diagrama 1

### 3.2 Determinación de consumo de Sulfato

Para determinar el consumo de iones sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) el consorcio se inoculó en las mismas condiciones señaladas anteriormente. Los iones sulfato se detectaron mediante técnica espectrofotométrica, la cual consiste en precipitar los sulfatos contenidos en el medio Postgate C con cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) y determinar la turbidez ocasionada por la formación del sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ). La medición se realizó a una longitud de onda de 480 nm tomando lecturas cada 4 horas durante 72 horas (Manual HACH, 1998).

### ***3.3 Determinación de la producción de Sulfuros***

Para determinar la producción de iones sulfuro ( $S^{2-}$ ) el consorcio se inocula en las mismas condiciones señaladas anteriormente. Los iones sulfuro ( $S^{2-}$ ) son determinados potenciométricamente mediante el uso de dos electrodos: un electrodo selectivo de ión sulfuro y uno de referencia (electrodo de calomel). Los potenciales se miden en milivoltios (mV). Se utilizó un multímetro digital modelo MUL-040 marca STEREN.

Procedimiento:

Del vial que contiene el cultivo se toma una muestra de 2 ml cada 4 horas durante 72 horas. A la muestra se le adiciona un volumen igual de buffer antioxidante de sulfuros (SAOB), con la finalidad de elevar el pH a niveles alcalinos y garantizar que todos los sulfuros presentes se encuentran en forma de ion sulfuro y además retardar la oxidación del mismo por medio del ácido ascórbico contenido en la solución buffer SAOB. A continuación se agita con la ayuda del vortex y se deja reposar de 3 a 5 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se sumergen ambos electrodos en la muestra y se toma la lectura cuando el potencial se estabiliza. Por último se determina la concentración del ión sulfuro interpolando el potencial registrado en la curva de calibración (ASTM D4658-92).

A continuación se describirá como se forma la curva de calibración:

#### ***3.3.1. Preparación de la solución patrón***

Para preparar la solución patrón se pesan aproximadamente 100 g de sulfuro de sodio hidratado ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) y disuelven en 100 ml de agua destilada. La solución se agita y deja reposar durante la noche. De esta solución saturada se toma 1 ml y se adicionan 50 ml de buffer SAOB y se ajusta a 100 ml con agua destilada en un matraz volumétrico.

#### ***3.3.2. Determinación de la concentración de sulfuro de sodio en la solución patrón***

La concentración de Sulfuro de Sodio en la solución patrón es determinada mediante titulación potenciométrica, de la siguiente manera:

Tomar 50 ml de solución patrón de sulfuro de sodio, adicionar 25 ml de buffer SAOB y 25 ml de agua destilada. Titular con una solución de nitrato de cadmio 0.1 M y utilizar el par de electrodos para detectar el punto final de la titulación.

Calcular la concentración de sulfuro de sodio mediante la fórmula señalada en la norma ASTM D4658-92:

$$S = (\text{volumen en ml de la sol. de nitrato de cadmio 0.1 M consumidos}) \times (64.12)$$

S = cantidad de sulfuro de sodio en mg/l

### **3.3.3. Preparación de las soluciones estándar**

Las soluciones estándar se preparan en matraces volumétricos de 100 ml de la siguiente forma:

- Solución Estándar A: tomar 5 ml de la solución patrón, 45 ml de buffer y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Solución Estándar B: tomar 1 ml de la solución patrón, 50 ml de buffer y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Solución Estándar C: tomar 2 ml de la solución estándar A, 50 ml de buffer y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Solución Estándar D: tomar 1 ml de la solución estándar A, 50 ml de buffer y aforar a 100 ml con agua destilada.

Las concentraciones de las soluciones estándares están dadas en mg/l y son calculadas a partir de la concentración de sulfuro de sodio determinada por la titulación de la solución patrón.

### **3.3.4. Preparación de la curva de calibración**

La curva de calibración se prepara sumergiendo el par de electrodos en cada solución estándar empezando con la concentración mas diluida, tomando lectura cuando el potencial se estabiliza. Con los datos obtenidos se construye la gráfica en papel semilogarítmico, graficando las concentraciones del ion sulfuro en la escala logarítmica y los potenciales registrados en la escala lineal. (ASTM D4658-92)

#### ***4. Determinación de la Velocidad de Corrosión***

Para determinar la velocidad de corrosión causada por el consorcio se utilizaron dos métodos. El primer método determina la pérdida de peso del metal después de ser expuesto al consorcio durante 30 días. El segundo método determina la velocidad de corrosión midiendo diariamente durante 30 días la resistencia a la polarización ( $R_p$ ) que presenta el metal.

##### ***4.1 Pérdida de Peso***

La pérdida de peso es un método gravimétrico que sirve para determinar la velocidad de corrosión.

Para desarrollar este experimento se realiza un tratamiento previo a las muestras de metal; este tratamiento consta de varias etapas descritas a continuación:

Etapa 1. Marcar las muestras metálicas con números.

Etapa 2. Eliminar las impurezas de la superficie del metal. La eliminación de éstas se hace por medio de un desgaste de la superficie con lijas de varios grosores empezando con las de mayor a menor grosor. En seguida las muestras son lavadas con agua destilada, enjuajadas con acetona, y secadas. Por último son almacenadas en desecadores durante 24 horas.

Etapa 3. Determinar las dimensiones y el peso de las muestras metálicas. Las dimensiones de las muestras son medidas por medio de un vernier y pesadas en una balanza analítica (ASTM G1-90).

Terminado el tratamiento previo de las muestras, se procede a iniciar el experimento, el cual consiste en sumergir 3 muestras metálicas en un matraz erlenmeyer de 500 ml que contiene medio Postgate C, en seguida se inocula el consorcio, se burbujea gas nitrógeno y finalmente se cierra herméticamente para evitar el intercambio de gases (nitrógeno-oxígeno). El matraz se incuba a temperatura ambiente (20-22°C) durante 30 días. El medio se renueva cada 7 días.

Como testigo se utilizan 3 muestras iguales a las anteriores que se sumergen en el mismo medio, sin inocular los microorganismos e incubar en las mismas condiciones.

Transcurrido el tiempo de incubación las muestras son extraídas y sometidas a una limpieza química con el propósito de eliminar los productos de corrosión presentes en su superficie. Esta limpieza consiste en sumergir las muestras en una solución de ácido inhibido\* durante 5 minutos, posteriormente se sumergen en una solución de bicarbonato de sodio saturada, se enjuagan con agua de la llave y tallan con un cepillo con cerdas no metálicas. Finalmente se enjuagan nuevamente con agua, después con acetona, se secan y posteriormente se almacenan en el desecador durante 48 horas.

Finalmente las muestras se pesan para determinar la pérdida de peso y calcular la velocidad de corrosión por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de Corrosión} = (K \times W)/(A \times T \times D)$$

En donde:

K = constante ( $3.45 \times 10^6$ )

T = tiempo de exposición en horas

A = área en  $\text{cm}^2$

W = pérdida de peso en gramos y

D = densidad del metal en  $\text{g}/\text{cm}^3$

(ASTM G1-90)

\*Ver apéndice

#### **4.2 Resistencia a la Polarización**

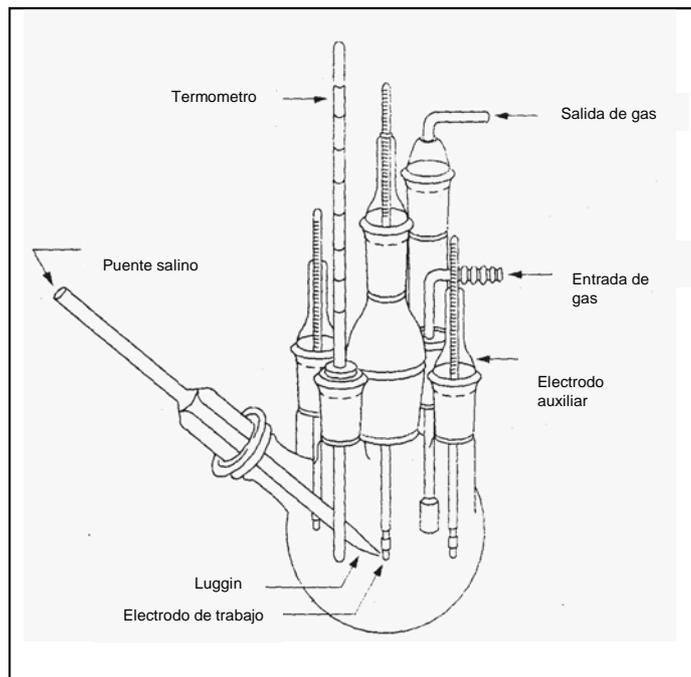
La Resistencia a la Polarización (Rp) es una técnica electroquímica que sirve para determinar la velocidad de corrosión. Consiste en medir diariamente el valor de Rp que

presenta el metal expuesto al consorcio en el medio Postgate C incubado a temperatura ambiente (20-22°C) durante 30 días.

Para medir la resistencia a la polarización se requiere de:

- a) un potenciostato marca GIL, modelo AC conectado a una computadora
- b) un capilar (conocido como Luggin) que contiene solución saturada de Cloruro de potasio (KCl) para conectar el electrodo de referencia con el medio
- c) una celda electroquímica (matraz de bola de 1L)
- d) un difusor
- e) 3 electrodos que son: un electrodo de trabajo (muestra del metal), un electrodo de referencia (electrodo de calomel) y un electrodo auxiliar (electrodo de grafito) (ASTM G5-94)

La figura 14 muestra el equipo necesario para realizar la medición de la Resistencia a la polarización.



**Figura 14** Reactor de pruebas electroquímicas

El procedimiento para realizar este experimento se describe a continuación:

- Preparación del electrodo de trabajo:

La muestra de metal recibe un tratamiento previo igual al que recibieron las muestras de la prueba de pérdida de peso con el fin de eliminar las impurezas y obtener una superficie homogénea.

- Preparación del medio Postgate C y de la solución saturada de KCl.
- Esterilización del medio, de la solución saturada de KCl, del electrodo auxiliar y del difusor.
- Preparación del capilar: Llenar en condiciones de asepsia el capilar con la solución saturada de KCl, evitando que en el interior queden burbujas de aire e insertar el electrodo de referencia.

- Preparación de la celda con sus aditamentos:

Colocar en condiciones de asepsia los electrodos de trabajo y auxiliar, el capilar y en seguida inocular el consorcio, burbujear gas nitrógeno y sellar con cinta parafilm las conexiones para evitar el intercambio de gases del interior al exterior y viceversa.

- Mediciones de la resistencia a la polarización:

Verificar que el circuito formado en la celda se encuentre cerrado midiendo el potencial de corrosión con un multímetro. En seguida conectar los 3 electrodos al potencióstato y medir el valor de  $R_p$  cada 24 horas y calcular la velocidad de corrosión con la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de Corrosión} = i_{\text{corr}} * F$$

En donde:

$$i_{\text{corr}} = \frac{\beta}{R_p * \text{área}}$$

$\beta$  = Constante

$R_p$  = Resistencia a la polarización

F = factor de conversión (mpy)

Es necesario hacer un testigo siguiendo el mismo procedimiento pero sin inocular los microorganismos e incubar en las mismas condiciones.

Por último se grafican la velocidad de corrosión de ambos experimentos contra el tiempo para observar el comportamiento de la velocidad en ambos.

## ***5. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)***

La microscopia electrónica de Barrido es utilizada para analizar el daño que causan los microorganismos en la superficie del metal así como para ver la morfología de los mismos.

A continuación se describe el procedimiento para analizar las muestras del metal:

Las muestras son lavadas con buffer de Cacodilato 0.15M a pH 7.4, en seguida se fijan con una solución de Glutaraldehído al 2%, se dejan reposar 1 hora, después se lavan 3 veces con el mismo buffer esperando 10 min. entre cada lavado. Se fijan nuevamente con solución de OsO<sub>4</sub> al 2% y se dejan reposar 3 horas, se lavan 2 veces con el buffer y se deshidratan utilizando soluciones de alcohol-agua en varias concentraciones. Después son secadas por medio de la técnica de secado a punto crítico, finalmente las muestras son ionizadas con oro y se observan al microscopio.

Para observar la morfología de los microorganismos se utilizó un cultivo en medio API de 24 horas de incubación. En un tubo con el fijador de glutaraldehído al 2% se vierten 10 gotas del cultivo, se agita suavemente durante 30 minutos. Después se centrifuga a 3000 rpm durante 3 min, se lava 3 veces con buffer de cacodilato 0.15 M a pH 7.4, después se fijan con solución de OsO<sub>4</sub> al 1%, se centrifuga en las mismas condiciones y se lava 3 veces con el mismo buffer y después se deshidrata con soluciones de alcohol-agua a varias concentraciones. Después se seca con óxido de propileno, por último se ioniza con oro y se observa al microscopio.

## **V. Resultados y Discusión**

## ***1. Muestreo***

La muestra estudiada fue obtenida del proceso de limpieza que se realizó en el interior de un gasoducto de PEMEX que transporta gas dulce del centro petroquímico Atasta hasta Cd. Pemex.

Este gasoducto mide 36 pulgadas de diámetro y 92 km de longitud, fue construido en 1980 y opera a una temperatura de 40°C.

Para la determinación de BSR se siguió la Norma API RP-38 en la cual se especifica la preparación del medio de cultivo para las BSR y la inoculación de las mismas.

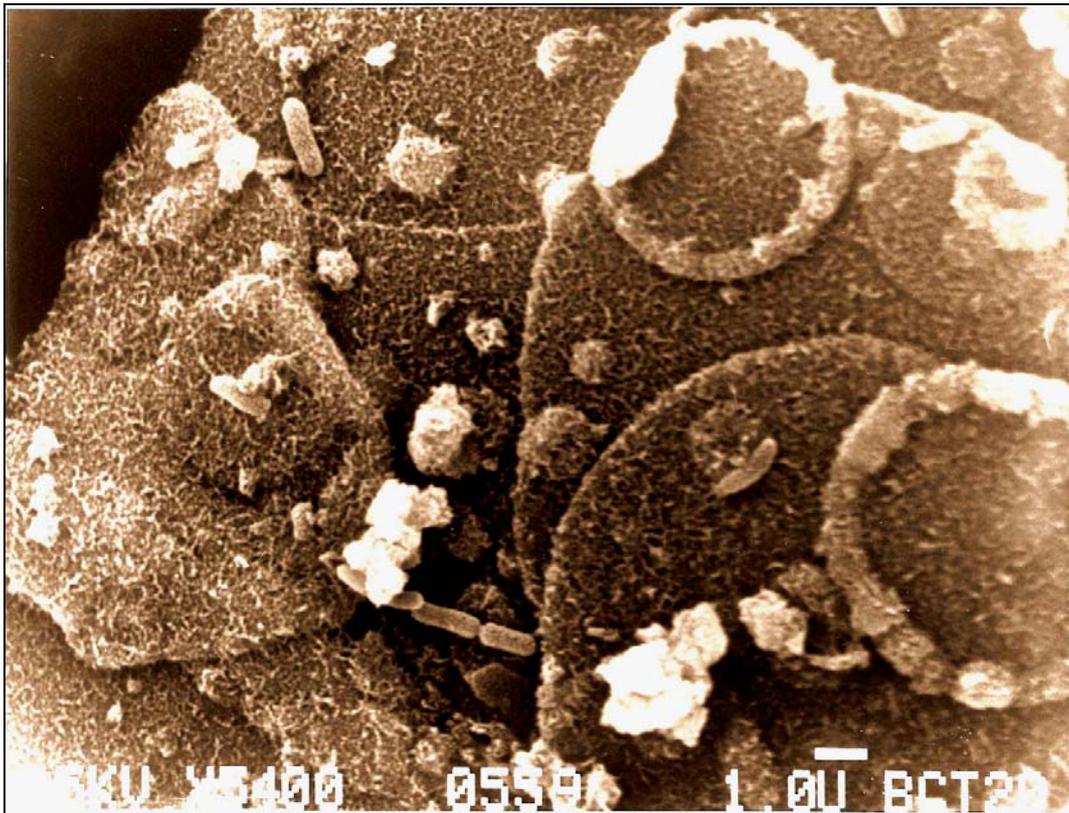
La muestra se cultivó en viales que contenían medio API R-38 nitrogenado para mantener las condiciones de anaerobiosis y se incubó a una temperatura de 37°C. Después de 24 horas el medio presenta una coloración negra debida a la producción de sulfuro de hierro, lo cual indica el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras.

La muestra se conservó por medio de resiembras en medio API R-38 cada mes, incubando a 37°C.

## ***2. Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras***

El aislamiento de las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) se realizó por medio de 3 métodos descritos en el capítulo anterior.

Los resultados obtenidos en los tres métodos demuestran que no fue posible aislar a las bacterias sulfato reductoras porque se trata de microorganismos que forman un consorcio como se comprobó por medio de un análisis por microscopía electrónica de barrido en donde se observan varios tipos de microorganismos: bacilos largos y aislados, bacilos curvos agrupados formando círculos y aislados y bacilos cortos. Ver figura 15.



**Figura 15.** Consorcio de bacterias presentes en el gasoducto.

De acuerdo con Iwona B. Beech estos consorcios de bacterias asociadas a la corrosión de metales se encuentra integrado por bacterias productoras de ácido (BPA), bacterias sulfato reductoras (BSR) y bacterias metanogénicas, ya que los ácidos que producen las BPA les sirven como nutrientes a las BSR y a las metanogénicas. Dowling et al. (1992) compararon la velocidad de corrosión en presencia y ausencia de bacterias acetogénicas, *Eubacterium limosum* y la mezcla de BSR (*Desulfovibrio sp.* y *Desulfobacter spp.*); encontraron que la velocidad de corrosión en presencia de *E. limosum* y BSR es mayor.

También se ha encontrado en la biopelícula de metales corroídos un consorcio integrado por bacterias que depositan metal y bacterias sulfato reductoras (Beech B. Iwona and Gaylarde Christine C. 1999).

### ***3. Estudio de la cinética de un consorcio de bacterias presentes en el gasoducto***

Para el estudio de la cinética del consorcio de bacterias sulfato reductoras se empleó el medio de Postgate C por varias razones:

- Contiene una pequeña cantidad de hierro para evitar la formación de sulfuro de hierro (FeS) ya que le proporciona un ennegrecimiento al medio y esto interviene en la determinación de la densidad óptica.
- Contiene citrato de sodio que es un agente quelante que incrementa la solubilidad del hierro.
- Contiene iones de  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$  y  $PO_4^{3-}$  que forman una sal doble insoluble de carácter alcalino contrarrestando la acidez producida por el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ). (Postgate, 1979)
- La composición del medio es similar a la empleada por Maria J. Feio (M. J: Feio et al., 1998), ya que ambos medios de cultivo emplean lactato de sodio como fuente de carbono, extracto de levadura, sulfuro de hierro (FeS) en pequeña porción y se encuentran presentes los iones  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$  y  $PO_4^{3-}$ .

Para determinar la curva de crecimiento del consorcio de las bacterias presentes en el gasoducto se utilizó el medio de Postgate C con y sin clavo. Los viales se incubaron a  $37^\circ C$  con agitación a una velocidad de 30 rpm. La proliferación celular se midió en un espectrofotómetro HACH tomando lecturas de densidad óptica a 660 nm cada 3 horas, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Los resultados señalados en la tabla 1 son el promedio de 5 experimentos y demuestran que el crecimiento de las bacterias es mayor en el vial que contiene el clavo, debido al potencial redox ( $E_h$ ) obtenido; porque de acuerdo con Postgate (1979) el medio de cultivo debe tener un potencial redox alrededor de -100 mV para que las condiciones sean favorables para el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras y el clavo funciona como un agente reductor. Otros agentes reductores que se podrían adicionar son la ditionita de sodio, el tioglicolato y el ascorbato (Padilla Viveros América, 1999). (Ver gráfica 1).

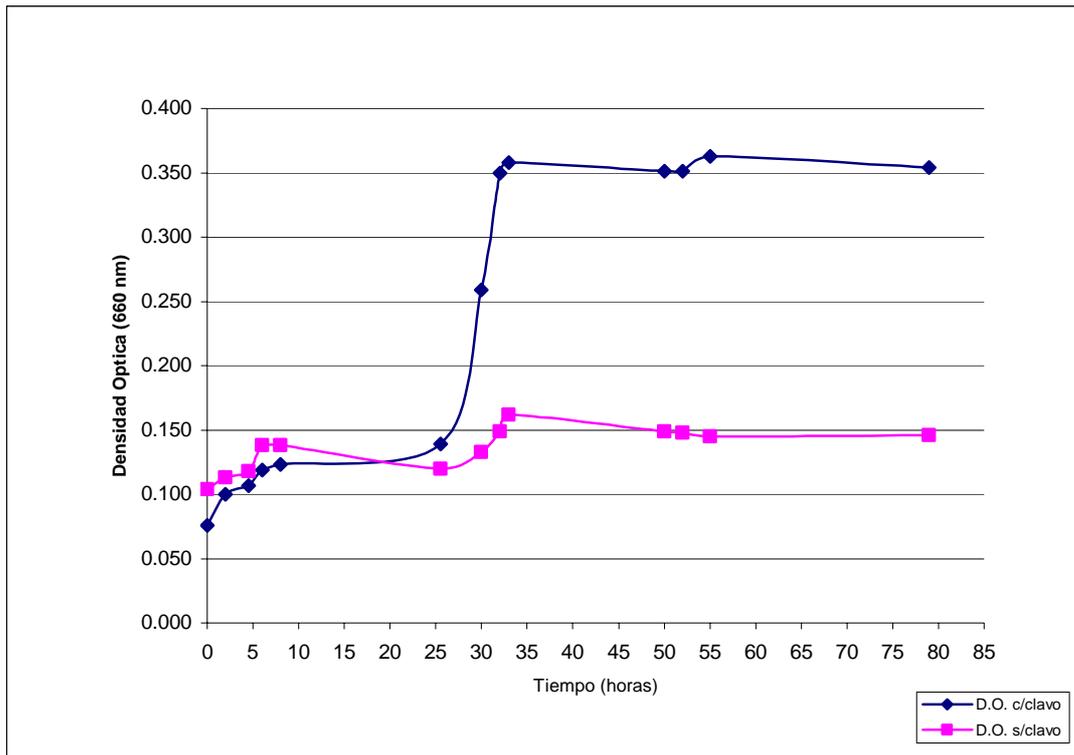
Al hacer la grafica de proliferación celular (Densidad óptica a 660nm) contra tiempo se observa que al inicio la velocidad de crecimiento de las bacterias es lento debido a la adaptación al medio, después se incrementa la velocidad de crecimiento de manera exponencial porque el hierro que se encontraba en forma insoluble se empieza solubilizar por la presencia del agente quelante, que en este medio es el citrato de sodio (Ver gráfica 1). Los resultados obtenidos de la curva de crecimiento son similares a los obtenidos por otros investigadores que estudiaron la cinética de crecimiento de bacterias sulfato reductoras en un medio de cultivo donde la fuente de carbono y donador de electrones era lactato y como aceptor de electrones el sulfato y las condiciones de incubación son similares. (M. J. Feio et al, 1998 y López- Jiménez, 2001)

Para complementar el estudio de la cinética de crecimiento de estas bacterias se determino el consumo de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y la producción de sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ). Los resultados se muestran en la tabla 1 y se observa que la producción de sulfuros es lenta en las primeras horas y después aumenta de manera exponencial (ver gráfica 2). Así mismo el consumo de sulfatos es lento en un principio y después aumenta de la misma forma en que se producen los sulfuros. Las gráficas del consumo de sulfatos y producción de sulfuros es congruente con la gráfica de crecimiento, es decir, que si la velocidad de crecimiento es lento en un principio esperamos que la producción de sulfuros sea lenta al igual que el consumo de sulfatos.

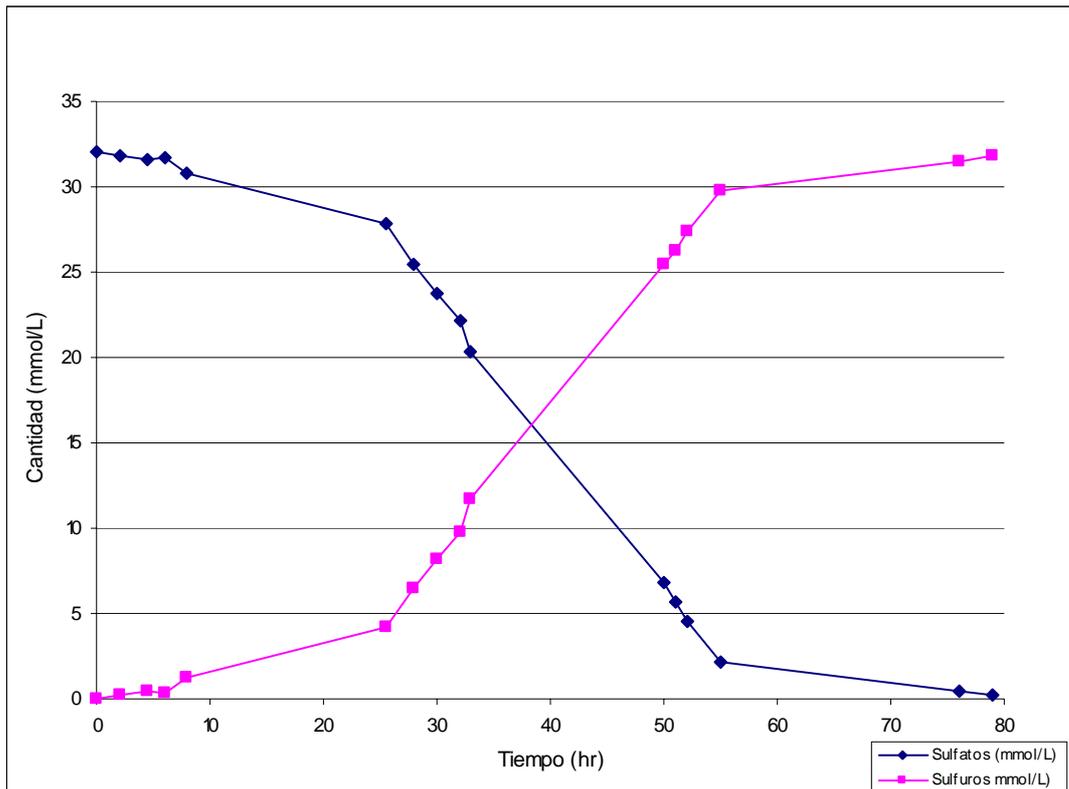
**Tabla 3.** Cinética del consorcio de bacterias

Fecha	Hora	Tiempo (hr)	D.O. C/clavo	D.O. S/clavo	Sulfatos (mmol/L)	Sulfuros (mmol/L)
10/06/2002	09:00	0	0.076	0.104	32	0
	11:00	2	0.100	0.113	31.8	0.2
	13:30	4.5	0.107	0.118	31.6	0.4
	15:00	6	0.119	0.138	31.7	0.3
	17:00	8	0.123	0.138	30.8	1.2
11/06/2002	10:30	25.5	0.139	0.120	27.8	4.2
	13:00	28			25.5	6.5
	15:00	30	0.259	0.133	23.8	8.2
	17:00	32	0.350	0.149	22.2	9.8
	18:00	33	0.413	0.162	20.3	11.7
12/06/2002	11:00	50	0.332	0.149	6.8	25.5
	12:00	51			5.7	26.3
	13:00	52	0.351	0.148	4.6	27.4
	16:00	55	0.363	0.120	2.2	29.8
13/06/2002	13:00	76			0.5	31.5
	16:00	79	0.354	0.146	0.2	31.8

Gráfica 1. Cinética de crecimiento del consorcio de bacterias presentes en el gasoducto.



**Gráfica 2.** Cinética de consumo de sulfatos y producción de sulfuro de las bacterias presentes en el gasoducto.



#### 4. Determinación de la Velocidad de Corrosión

#### 4.1 Pérdida de peso

Para determinar la velocidad de corrosión causada por el consorcio de bacterias presentes en el gasoducto por el método de pérdida de peso, los experimentos fueron realizados en matraz erlenmeyer sellado y manteniendo las condiciones anaerobias constantemente. Cupones metálicos fueron utilizados para este propósito. Se sumergieron 3 cupones metálicos en un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenía medio Postgate C, pesados previamente, enseguida se inoculó el consorcio, se burbujeó nitrógeno para mantener las condiciones favorables para el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras y finalmente se selló herméticamente para evitar el intercambio de gases. El matraz se incubó a temperatura ambiente (20-22°C) durante 30 días y el medio se renovó cada 7 días.

Los cupones metálicos sumergidos en el medio inoculado, fueron comparados con los sumergidos en los medios sin inocular, utilizados como controles. La velocidad del fluido, la temperatura, la presencia de oxígeno y iones ferrosos son factores importantes para la forma física y formación de la biopelícula.

Al terminar el tiempo de incubación las muestras se extrajeron, se sometieron a una limpieza química para eliminar los productos de corrosión presentes en la superficie y finalmente se pesaron para determinar la pérdida de peso y calcular la velocidad de corrosión por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de Corrosión} = (K \times W)/(A \times T \times D)$$

En donde:

K = constante ( $3.45 \times 10^6$ )

T = tiempo de exposición en horas

A = área en  $\text{cm}^2$

W = pérdida de peso en gramos y

D = densidad del metal en  $\text{g/cm}^3$

(ASTM G1-90)

Las unidades en que se expresa la velocidad de corrosión son en milipulgadas de penetración por año (mpy).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Los datos demuestran que aun en ausencia del consorcio se presenta corrosión en el cupón metálico debido a que el proceso

de corrosión es de naturaleza electroquímica y al encontrarse el metal en un ambiente acuoso la corrosión es de manera casi inmediata debido a que los 4 elementos básicos: ánodo, cátodo, electrolito y flujo de corriente necesarios están presentes. (Capítulo dos).

También se observa que la velocidad de corrosión es mayor en los experimentos que contienen el consorcio de bacterias debido a varios factores:

- A que el proceso biológico generalmente se lleva a cabo por películas de microorganismos adheridas al metal (biofilms), estas películas están compuestas por una microbiota heterogénea que abarca comunidades aeróbicas, microaerofílicas y anaerobias como se muestra en las figuras 19 y 20.
- La velocidad de corrosión aumenta debido a los microorganismos presentes; la explicación más aceptada se basa en la teoría de la despolarización catódica de von Wolzogen Kühn y van der Vlugt: el metal se polariza en el agua por la pérdida de sus iones positivos, mientras se establece un equilibrio, el hidrógeno molecular liberado permanece en la superficie metálica. Este hidrógeno entonces es utilizado como sustrato por las bacterias sulfato reductoras que lo remueven de manera permanente a través de su oxidación con el sulfato (despolarización catódica), por lo tanto se presenta una oxidación neta del metal. Si además en el medio están presentes compuestos orgánicos como donadores de electrones continua la sulfato reducción que conduce a formar más ácido sulfhídrico, así que todo el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) puede precipitar como sulfuro ferroso ( $\text{FeS}$ ). Como se explico en el capitulo 2 tema 5. Ver figura 4 (Capitulo 2).
- También aumenta la velocidad de corrosión debido a la presencia de la enzima hidrogenasa presente en las bacterias sulfato reductoras por que cataliza la oxidación del hidrógeno, activando la despolarización catódica (Rongjun Zuo, 2004).

**Tabla 4.** Datos obtenidos de la velocidad de corrosión por pérdida de peso.

Experimento	Cupón	Área Total ( $\text{cm}^2$ )	Peso perdido (g)	Tiempo (hr)	Vel. Corr. (mpy)
Testigo	1	6.8512	0.0125	1968	0.4069
	2	7.0284	0.0134	1968	0.4252
	3	6.9102	0.0146	1968	0.4712

Prueba	4	6.9102	0.0376	1968	1.2136
	5	6.9102	0.0176	840	1.3309
	6	6.4327	0.0239	1128	1.4457

La formación de la biopelícula y el análisis de la corrosión se determinaron mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (MEB) que más adelante se detallara.

#### 4.2 Resistencia a la Polarización

La Resistencia a la Polarización (Rp) es una técnica electroquímica que sirve para determinar la velocidad de corrosión. Consiste en medir diariamente el valor de Rp que presenta el metal expuesto al consorcio en el medio Postgate C incubado a temperatura ambiente (20-22°C) durante 30 días. En este experimento se utilizó como control el metal sumergido en el medio Postgate C, incubado en las mismas condiciones.

El procedimiento de este método se describió más detalladamente en el capítulo 3.

La velocidad de corrosión se calculó empleando la siguiente formula:

$$\text{Velocidad de Corrosión} = i_{\text{corr}} * F$$

En donde:

$$i_{\text{corr}} = \frac{\beta}{R_p * \text{área}}$$

$\beta$  = Constante

Rp = Resistencia a la polarización

F = factor de conversión (mpy)

Los resultados de la velocidad de corrosión del experimento control se muestran en la tabla 3. Los datos obtenidos del control demuestran que la velocidad de corrosión al inicio de la prueba es alta, puede ser debido al cambio del potencial que sufre el metal para determinar la Resistencia a la polarización (Rp), pero después la velocidad de corrosión varía muy poco, se puede decir que en general se mantiene constante y además la velocidad

de corrosión es baja y similar a la determinada por el método de pérdida de peso. (Ver gráfica 3)

En cambio, los resultados de la velocidad de corrosión que presenta el metal expuesto al consorcio de bacterias es mayor (ver tabla 4) y además se incrementa conforme transcurre el tiempo porque el crecimiento del consorcio de bacterias también aumenta, es decir, la velocidad de corrosión aumenta conforme aumenta la reproducción de las bacterias, ya que también se empieza a formar la biopelícula sobre la superficie del metal, es por eso que de repente se registran valores bajos y altos en la velocidad de corrosión. (Ver gráfica 4).

Otra de las causas por las que se registren valores bajos y altos en la velocidad de corrosión es que cambian constantemente el pH, la concentración de oxígeno e hidrógeno así como la composición de los electrolitos alrededor de la picadura que se encuentra debajo de la biopelícula (Borenstein 1994).

**Tabla 5.** Datos obtenidos de la medición de la Resistencia a la polarización (control)

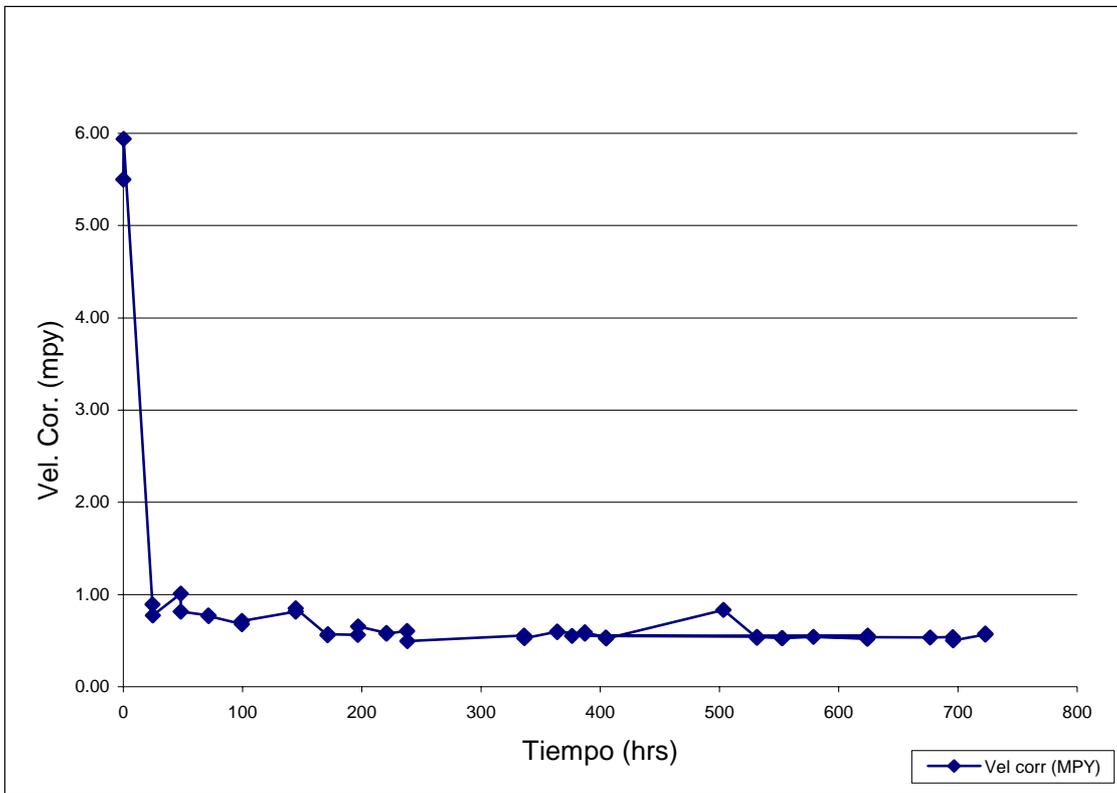
Día	Tiempo (hr)	Rp	icorr	Vel corr (MPY)
1	0.000	488	1.19997E-05	5.5016
1	0.166	452	1.29554E-05	5.9397
2	24.583	3001	1.9513E-06	0.8946
2	24.666	3464	1.69049E-06	0.7750
3	48.083	2656	2.20477E-06	1.0108

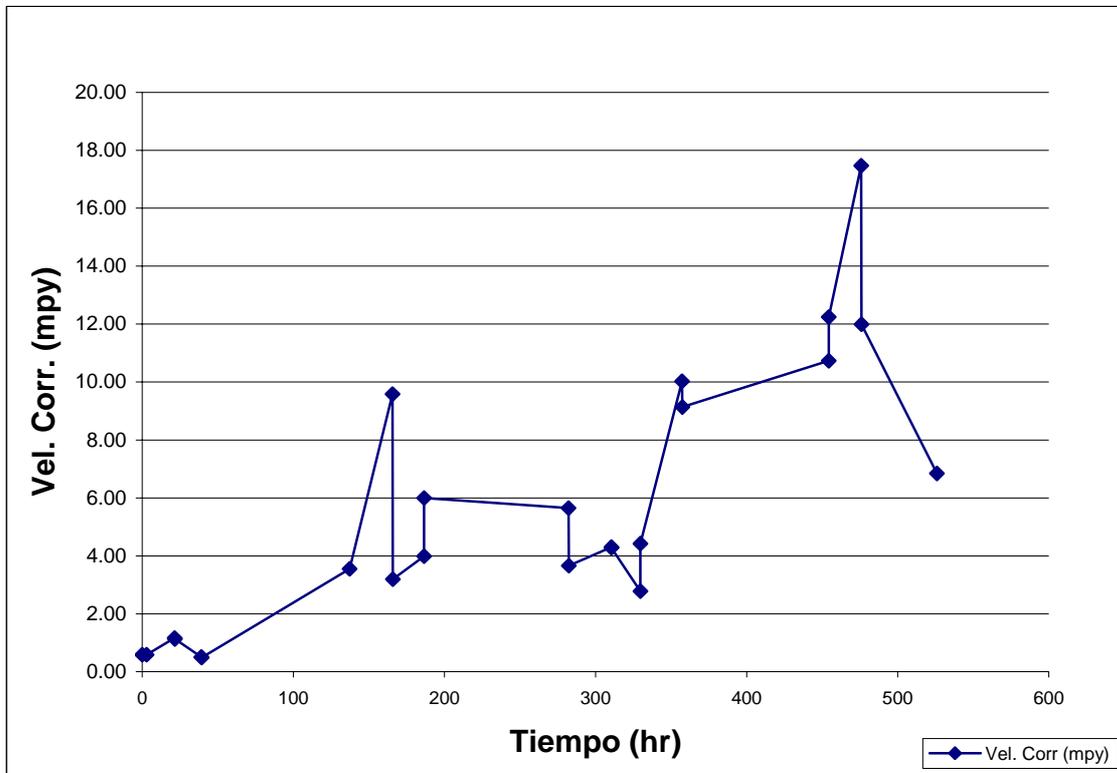
3	48.166	3285	1.7826E-06	0.8173
4	71.416	3474	1.68562E-06	0.7728
4	71.500	3500	1.6731E-06	0.7671
5	99.333	3946	1.484E-06	0.6804
5	99.416	3756	1.55907E-06	0.7148
7	144.583	3293	1.77827E-06	0.8153
7	144.666	3154	1.85664E-06	0.8512
8	171.383	4802	1.21946E-06	0.5591
8	171.500	4726	1.23907E-06	0.5681
9	196.716	4764	1.22919E-06	0.5636
9	196.833	4101	1.42791E-06	0.6547
10	220.633	4600	1.27301E-06	0.5836
10	220.733	4666	1.25501E-06	0.5754
11	238.116	4442	1.31829E-06	0.6044
11	238.233	5421	1.08022E-06	0.4953
15	336.116	4822	1.2144E-06	0.5568
15	336.250	5093	1.14979E-06	0.5271
16	363.850	4497	1.30217E-06	0.5970
16	363.996	4509	1.2987E-06	0.5954
17	387.016	4659	1.25689E-06	0.5763
17	387.133	4535	1.29126E-06	0.5920
18	404.766	5007	1.16953E-06	0.5362
18	404.900	5129	1.14171E-06	0.5234
22	503.216	3217	1.82028E-06	0.8346
23	531.283	5049	1.15981E-06	0.5317
23	531.400	4972	1.17777E-06	0.5400
24	552.450	5101	1.14798E-06	0.5263
24	552.583	5079	1.15295E-06	0.5286
25	578.716	4972	1.17777E-06	0.5400
27	624.100	5173	1.132E-06	0.5190
27	624.216	4818	1.21541E-06	0.5572
28	376.416	4852	1.2069E-06	0.5533
28	676.533	5028	1.16465E-06	0.5340
29	695.683	4979	1.17611E-06	0.5392
29	695.816	5343	1.09599E-06	0.5025
30	722.783	4727	1.23881E-06	0.5680
30	722.916	4650	1.25932E-06	0.5774

**Tabla 4.** Datos obtenidos de la medición de la Resistencia a la polarización en presencia del consorcio bacteriano

Día	Tiempo(hr)	Rp	icorr	Vel. Corr (mpy)
1	0.000	4676	1.29114E-06	0.5920
1	3.000	4752	1.27049E-06	0.5825
2	21.483	2371	2.54635E-06	1.1674
2	21.633	2443	2.4713E-06	1.1330
3	39.166	5378	1.12261E-06	0.5147
3	39.283	5634	1.0716E-06	0.4913
7	137.200	778	7.76014E-06	3.5578
8	165.733	289	2.08906E-05	9.5778
8	165.850	866	6.97158E-06	3.1963
9	186.466	695	8.68689E-06	3.9827
9	186.583	462	1.30679E-05	5.9913
13	282.116	490	1.23212E-05	5.6490
13	282.233	756	7.98596E-06	3.6614
14	310.433	643	9.3894E-06	4.3048
14	310.550	647	9.33135E-06	4.2782
15	329.666	995	6.06772E-06	2.7819
15	329.783	626	9.64439E-06	4.4217
16	357.366	276	2.18746E-05	10.0289
16	357.483	303	1.99254E-05	9.1353
20	454.266	258	2.34007E-05	10.7286
20	454.383	226	2.67141E-05	12.2477
21	475.866	158.5	3.80908E-05	17.4636
21	475.983	230.8	2.61585E-05	11.9930
23	525.950	404.5	1.49256E-05	6.8430

Grafica 3. Velocidad de Corrosión del Control



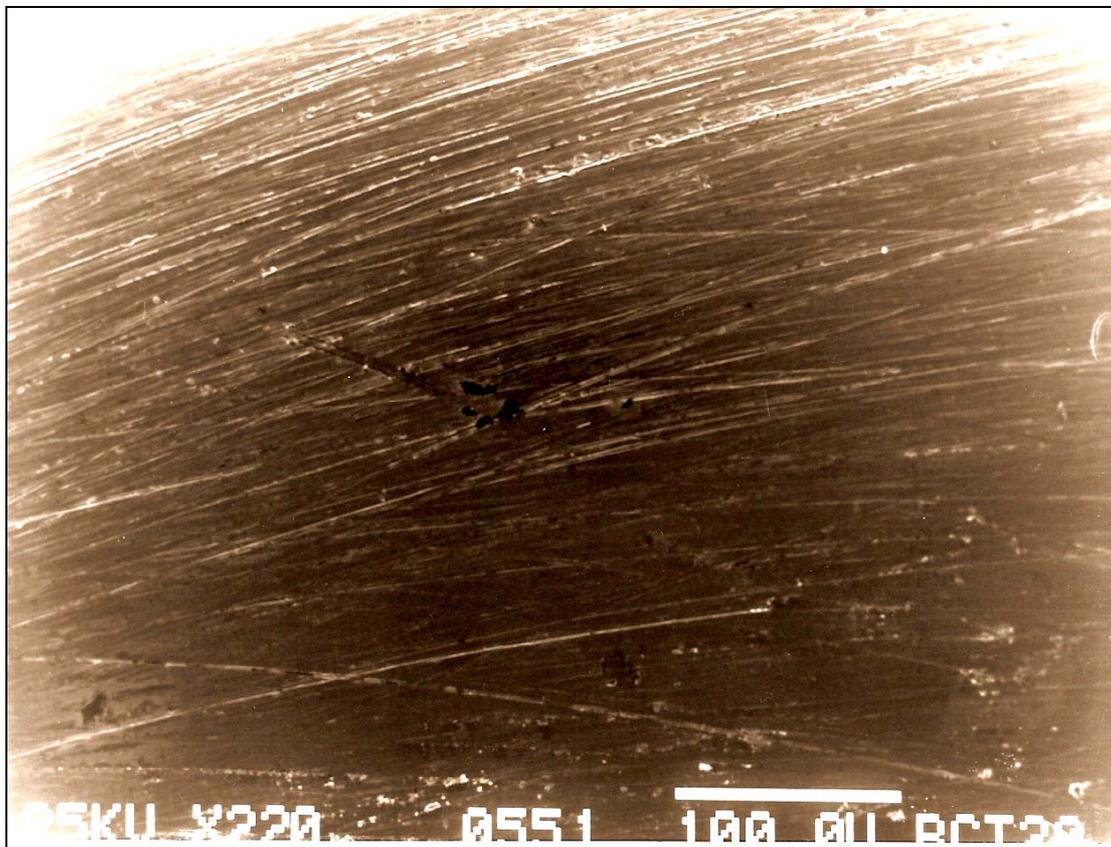
**Grafica 4.** Velocidad de corrosión del metal expuesto al consorcio de bacterias

## 5. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La microscopia electrónica de Barrido (MEB o SEM en inglés) se utilizó para analizar el daño que causan los microorganismos en la superficie del metal así como para ver la morfología de los mismos.

Para analizar el deterioro que sufre el metal al ser expuesto al consorcio bacteriano se emplearon cupones metálicos expuestos al consorcio en medio Postgate C incubado a temperatura ambiente durante 30 días. Después de transcurrido ese tiempo las muestras son tratadas para poder observarlas al microscopio (Procedimiento descrito en el capítulo 3). También se analizó un cupón sin exponerse al consorcio, como control.

La figura 16 muestra la superficie del metal del control, en ella se observa que la superficie no presenta ningún daño, solo presenta ralladuras debidas al tratamiento que se le dio al metal antes de realizar el experimento.



**Figura 16.** Superficie del metal.

El daño que causan los microorganismos en el metal se muestra en las figuras 17, 18 y 19. En la figura 17 se observa la formación de la biopelícula formada por el consorcio que contiene bacterias sulfato reductoras, esta biopelícula se compone en su mayoría de exopolimero extracelular. En la fotografía se observa el desprendimiento de la biopelícula y el desgaste que causa en la superficie del cupón comparada con la figura 16 se observan

cavidades formadas por el consorcio. La formación de la biopelícula es similar a la que reportan Xiang Y. Zhu, John Lubeck and John J. Kilbane (2003) y Zoibet Duque, (2004). El daño provocado en el metal es similar al que muestran los autores Iwona B. Beech and Christine C. Gaylarde (1999).



**Figura 17.** Biopelícula formada en la superficie del metal.

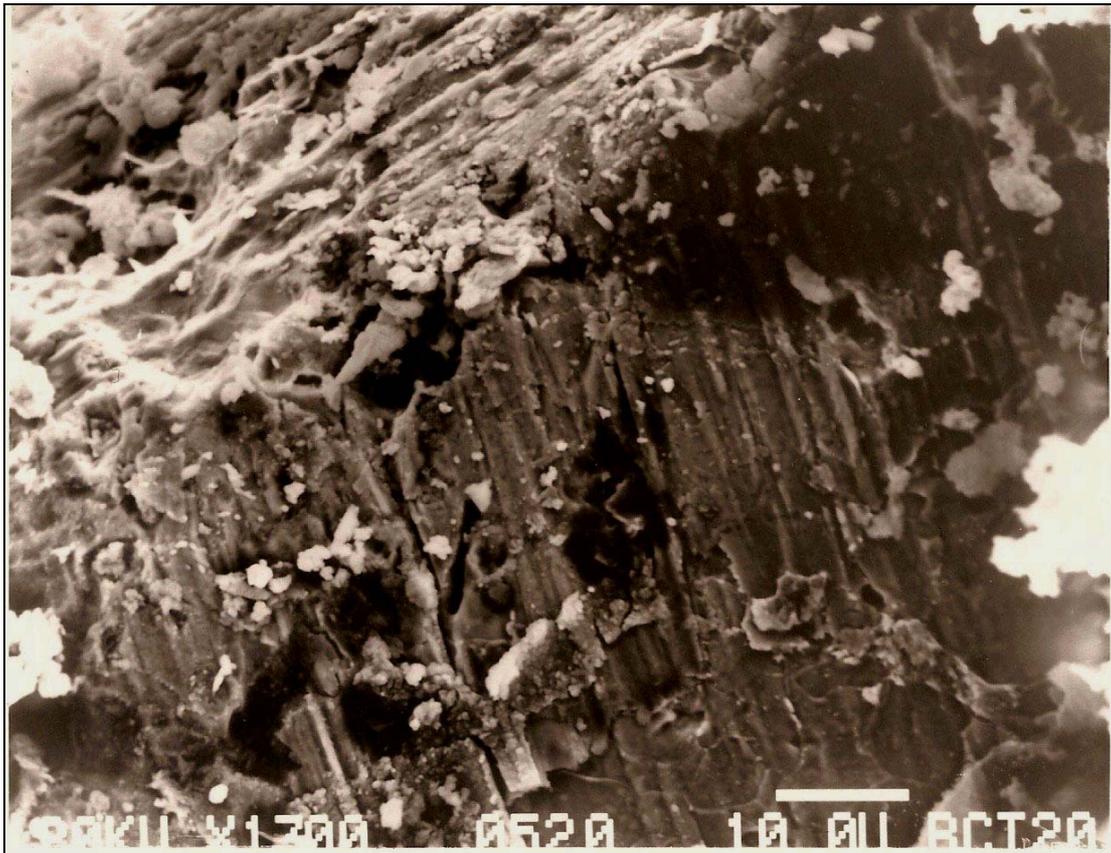
En la figura 18 se observa que la biopelícula que formó el consorcio bacteriano presenta una forma amorfa parecida a la que reportan Iwona B. Beech and Christine C. Gaylarde (1999), Robert Jeffrey and Robert E. Melchers (2002), Santana Hernández Francisco J. y Ferry Ann Else (2003).

El consorcio bacteriano provoca picaduras en la superficie del metal como se observa en la figura 19, este daño es similar al reportado por otros autores como Iwona B. Beech and Christine C. Gaylarde (1999).

El daño que provocan las bacterias sulfato reductoras (BSR) es mayor que el provocado por otros microorganismos, según lo reportó Zoibet Duque, Eduardo Chicote (2004); es por eso que se observa en la figura 19 varias picaduras sobre la superficie del metal, ya que el consorcio contiene BSR y son similares a las imágenes del daño que muestran estos autores en su trabajo.



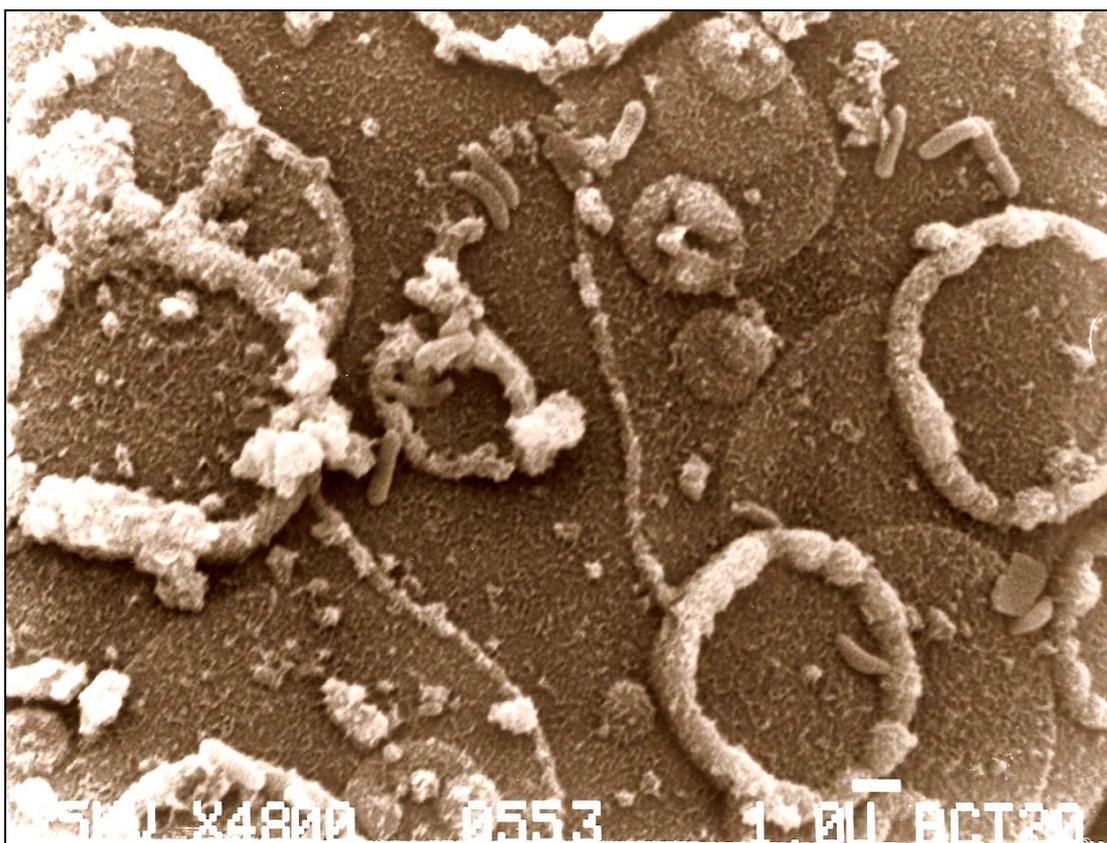
**Figura 18.** Biopelícula formada en la superficie del metal.



**Figura 19.** Acercamiento de la biopelícula.

Para observar la morfología del consorcio que contiene bacterias sulfato reductoras se utilizó un cultivo en medio API de 24 horas de incubación, el cual recibió un tratamiento especial descrito en el capítulo 3 para observarlo al microscopio electrónico de barrido (MEB).

En las figuras 15, 20, 21 y 22 se observa que el consorcio está integrado por diferentes bacterias, se observan varios tipos de microorganismos: bacilos largos y aislados, bacilos curvos agrupados formando círculos y aislados y bacilos cortos.



**Figura 20.** Consorcio de bacterias presentes en el gasoducto.

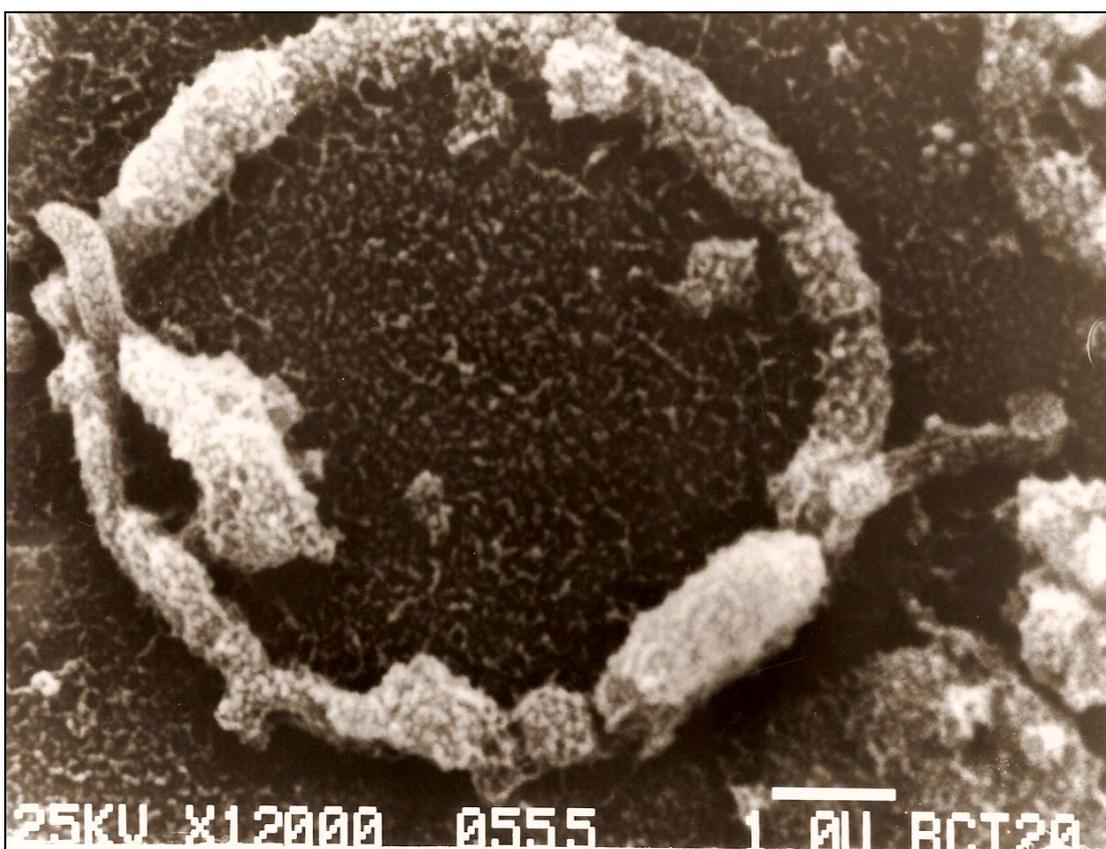
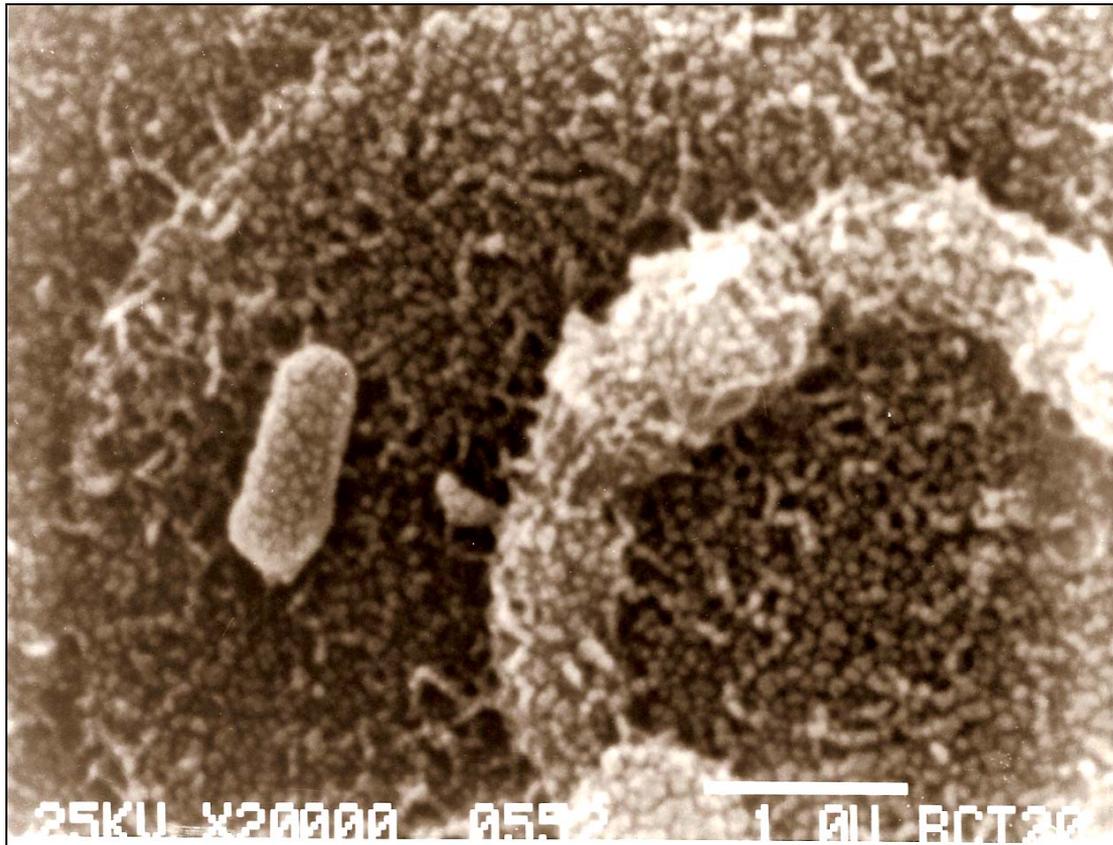


Figura 21. Acercamiento del consorcio.



**Figura 22.** Acercamiento del consorcio.

Este consorcio se presume que contiene bacterias sulfato reductoras (BSR) por que cuando se inoculan en medio API-R38 o Postage B, los cuales contienen hierro en su formulación para indicar la producción del ión sulfuro indicativo de la presencia de BSR, el medio se ennegrecía. Y además al observar la figura 23 y comparar las formas de vibrio que reporta Iwona B. Beech en la biopelícula formada por bacterias sulfato reductoras, las formas son semejantes.

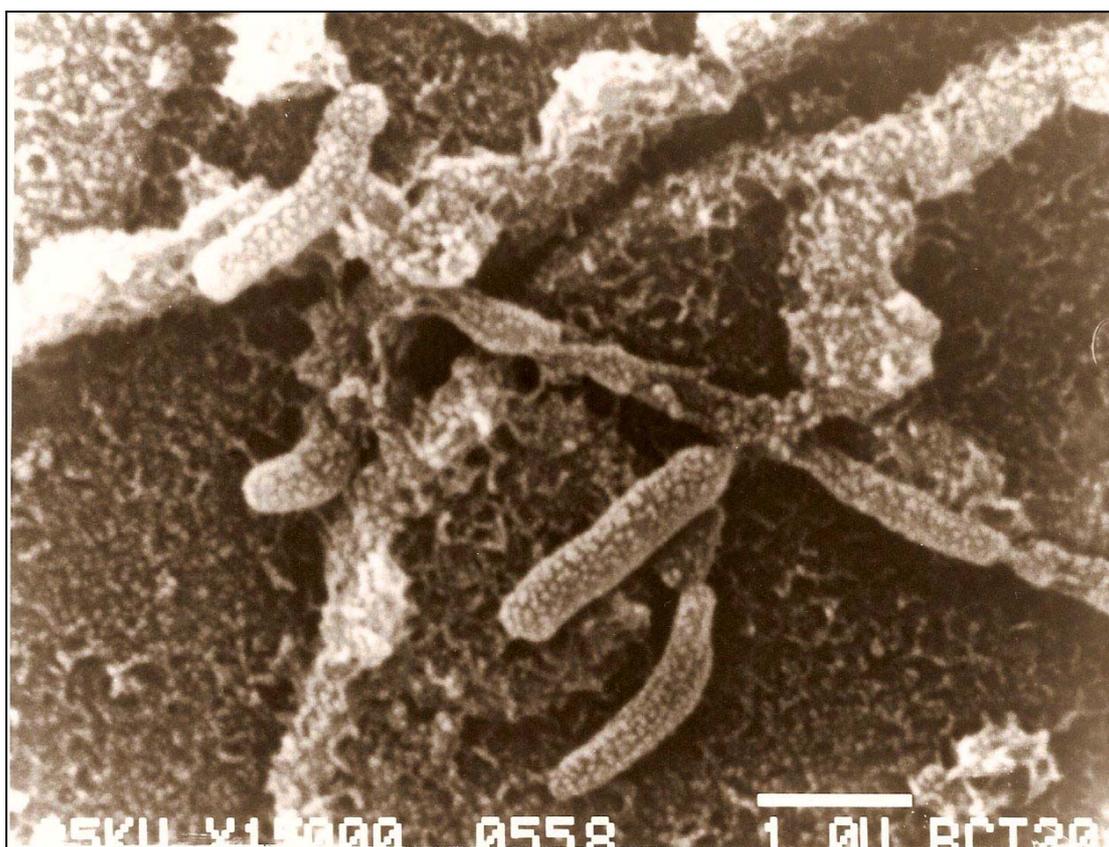


Figura 23. Acercamiento del consorcio.

## **VI. Conclusiones**

Bacterias sulfato reductoras (BSR) están presentes en la muestra.

Las BSR no se pudieron aislar debido a que forman parte de un consorcio.

La cinética de crecimiento del consorcio presenta tres fases de desarrollo: la fase de adaptación donde el crecimiento es lento, la fase exponencial y la fase estacionaria.

En cuanto al consumo de sulfatos y producción de sulfuro, se observa que conforme se consumen los sulfatos, la producción de sulfuro es mayor.

Este consorcio se encuentra integrado por diversas bacterias ya que en la microscopía electrónica de barrido se observan varias morfologías: bacilos largos y aislados, bacilos curvos agrupados formando círculos y aislados y bacilos cortos. Por lo cual se puede suponer que este consorcio pueden estar presentes bacterias del grupo *Desulfovibrio* y/o *Desulfotomaculum*.

El consorcio acelera la velocidad de corrosión en el metal.

## **VII. Bibliografía**

- 
- ATLAS, Ronald M. Microbiología: Fundamentos y Aplicaciones. Trad. Tay, Zavala Jorge, México, Cía. Editorial Continental, 1990, pp. 69-74.
  - BASTIDAS, José Ma. y MACIAS, Ma. Angeles, Técnicas electroquímicas. En: ANDRADE, Ma. Carmen y FELIU, Sebastián, Corrosión y protección metálicas, vol. II, España, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1991, pp. 155-163.
  - BEECH, I. B. y GAYLARDE, Christine C. Recent advances in the study of biocorrosion: an overview. Revista de Microbiología. [en línea] July/Sept. 1999, vol. 30, no. 3 [fecha de consulta: 4 Noviembre 2005], pp. 117-190. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-3714999000300001&Ing=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-3714999000300001&Ing=en&nrm=iso)
  - BEECH, Iwona; BERGEL, Alain; MOLLICA, Alfonso, et al Microbially influenced corrosion of industrial materials [en línea] 2000, Biocorrosion network [fecha de consulta: 3 Noviembre 2005] Disponible en: [http://www.corr\\_institute.se/english/Web\\_DT/files/BR99-02b.pdf](http://www.corr_institute.se/english/Web_DT/files/BR99-02b.pdf)
  - BETANCOURTH, B. Sc. Marisol, BOTERO, O. D. Javier, RIVERA, B. Sc. Sandra. Biopelículas : una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia Médica [en línea] 2004, Vol. 35, no. 3 (supl 1) [fecha de consulta: 7 Octubre 2005] p. 34-39 Disponible en: <http://colobiamedica.univalle.edu.co/Vol35No3supl/pdf/biopeliculas.pdf>
  - *Biocorrosion*. Tecnología de procesos industriales: gerencia técnica [fecha de consulta: 30 Noviembre 2005] Disponible en: <http://www.tpi.cl/pdf/biblioteca/industrial/biocorr.pdf>
  - BORENSTEIN, S. W. Microbiologically influenced corrosion handbook, USA, Industrial Press, 1994.
  - BUNCE, Nigel y HUNT, Jim. Sulfate Reducing Bacteria. The Science Corner. Recuperado el: 3 Febrero 2002 de: <http://www.physics.voguelph.ca/summer/scor/articles/scor210.htm>
  - CAHN, R. W.; HAASEN, P. y KRAMER, E. J. (ed) Materials Science and Technology: a comprehensive treatment. En su: Corrosion and Environmental Degradation, vol. I, pp. 178-179.
  - CHANTEREAU, J. Corrosión bacteriana, México, Edi. Limusa, 1985

- 
- CHATTERJEE, U. K. y BOSE, S. K. Environmental Degradation of metals, USA, Marcel Dekker, 2001.
  - DEAN, S. W.; FRANCE, W. D. y KETCHAM S. J. Electrochemical methods. En: AILOR, W. H. Handbook on corrosion testing and evaluation. USA, John Wiley and sons. 1971, pp. 171-185.
  - DENNY, Jones A. Principles an prevention of corrosion. Rep. Singapore, 1992.
  - Desulfobrio desulfuricans (s. f.) Recuperado el 9 Noviembre 2005 de [http://fenome.jfi-psf.org/finished\\_microbes/desde/desde.home.html](http://fenome.jfi-psf.org/finished_microbes/desde/desde.home.html)
  - *Documentos internos de PEMEX revelan que 25,000 kilómetros de ductos son obsoletos* [en línea] Greenpeace, 5 Enero 2005 [fecha de consulta: 3 Noviembre 2005] Disponible en: <http://www.greenpeace.org/mexico/press/releases/documentos-internos-de-pemex-r>
  - DOWLING, Nicholas J. E. and GUEZENNEC, Jean. Microbiologically influenced corrosion En: Christon J. Hurst eds. Manual of Environmental Microbiology. Washington, D. C. ASM Prees, 1997, pp. 842-855.
  - DROFFELAAR, H. Van y ATKINSON, J.T.N. Corrosion and its control: an introduction to the sujet. Texas, NACE, 1995, pag. 174-179
  - DUQUE, Zoilabet, CHICOTE, Eduardo, SARRO, M. Isabel et al. Corrosivity of H<sub>2</sub>S-producing bacteria isolated from formation waters used in secondary crude-oil recovery. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia [en línea] Agosto 2004, vol. 27, no. 2 [fecha de consulta: 18 Noviembre 2005] p. 83-92. Disponible en: <[http://www.scielo.org.e/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0254-07702004000200003&Ing=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.e/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702004000200003&Ing=es&nrm=iso)>
  - El fenómeno de la biocorrosión. Centro de Tecnologías Electroquímicas. Febrero 2005 <<http://www.eidetec.es/media/archivos/Corrosión6Febrero2005.pdf>>
  - ELSE, Terry Ann, PANTLE, Curtis R. y AMY, Penny S. Boundaries for biofilm formation: Humidity and temperature. Applied and Environmental Microbiology [en línea] 2003, vol. 69, no. 8 [fecha de consulta: 21 Octubre 2005] p. 5006-5010. Disponible en: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=169083&blobtype=pdf>>
  - FANG, Herbert H. P.; XU, Li-Chong; CHAN, Kwong-Yu. Effects of toxic metals

- and chemicals on biofilm and biocorrosion, Elsevier Science [en línea] 2002, No. 36 [fecha de consulta: 21 Octubre 2005] p. 4709-4716. Disponible en: <<http://gillchair.lamar.edu/Clases/Spring%20-%202003/Industrial%20ElectroChemistry/Electrolyte/science4.pdf>>
- FEIO, Maria J.; BEECH, Iwona B.; CAREPO, Martha; et al Isolation and characterization of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* Genus. *Anaerobe* [en línea] 1998, No. 4 [fecha de consulta: 30 Noviembre 2005] p. 117-130. Disponible en: <<http://www.sci.port.ac.uk/spm/anaerobe.pdf>>
  - FONTANA, Mars G. Corrosion Engineering, 3era. ed. Singapore, Edi. Mc. Graw-Hill, 1987.
  - GENESCA, Joan y AVILA, M. Javier Más allá de la herrumbre, México, Fondo de Cultura Económica, 1986.
  - HOLT, John G. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 9a. ed. USA, Williams and Wilkins, 1994.
  - Introduction to Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) (s. f.). Recuperado el 12 Febrero 2002 de: <http://www.corrosion-doctors.org/Microbial/Introduction.htm>
  - JEFFREY, Robert y MELCHERS, Robert E. Bacteriological influence in the development of iron sulphide species in marine immersion environments. *Corrosion Management* [en línea] Mayo 2002 [fecha de consulta: 24 Octubre 2005] Disponible en: <[http://www.corp.indgalv.com.au/mmagazine/0502/0502-3\\_11.pdf](http://www.corp.indgalv.com.au/mmagazine/0502/0502-3_11.pdf)>
  - KLEIKEMPER, Jutta; SCHROTH, Martin, H.; et al, Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 4, pp. 1516-1523, 2000.
  - KONDIATIEVA, Elena N. y PFENNIG, Norbert, The Phototrophic. *En: The Prokaryotes*, 2da. ed. USA, Springer-Verlay, 1992, vol.1, cap. 13, pp. 320-323.
  - LA RIVIÉRE, Jan W. M. y SCHAMIDT, Karin, Morphologically Conspicuous : Sulfur Oxidizing Eubacteria. *En: The Prokaryotes*, 2da. ed. USA, Springer-Verlay, 1992, vol. 4, cap. 218, pp. 3932-3942.
  - LANE, Richard A. Under the Microscope: understanding, detecting, and preventing microbiologically influenced corrosion. *The AMPTIAC Quarterly* [en línea] Vol. 9, No. 1 [fecha de consulta: 10 Noviembre 2005] p. 3-8. Disponible en:

- <[http://amptiac.alionscience.com/pdf/AMPQ9\\_1.pdf](http://amptiac.alionscience.com/pdf/AMPQ9_1.pdf) >
- Lectura 26. Microbial Influenced Corrosion (s.f.) Recuperado el 5 Marzo 2002 de:  
[http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect\\_26/lect\\_26.htm](http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect_26/lect_26.htm)
  - LÓPEZ, Jimene G., LEBORGNE, S., et al Biofilms and adhesion protein in anaerobe bacteria isolated from mexican gas pipelines [en línea] 2001 [fecha de consulta: 23 Octubre 2005] Disponible en: <[http://ipcc.utulsa.edu/Conf2001/lopez-jimenez\\_28.pdf](http://ipcc.utulsa.edu/Conf2001/lopez-jimenez_28.pdf)>
  - *Los caminos del petróleo*. Investigación y Desarrollo: Periodismo de Ciencia y Tecnología. Febrero 2000 [fecha de consulta: 3 Noviembre 2005] Disponible en: <<http://www.invdes.com.mx/anteriores/Febrero2000/htm/imp81.html>>
  - MACFARLANE, George T. y GIBSON, Glenn. Sulphate-reducing bacteria En: LEVETT, P. N. eds. *Anaerobic Microbiology a Practical Approach*, Great Britain, Information Press Ltd. Eynsham, 1991, pp. 201-222.
  - Mechanisms of microbiologically induced corrosion (s.f.) Recuperado el 25 Octubre 2005 de <http://www.intercorr.com/mic.html>
  - MERCER, E. H. y BIRCECK, M. S.C. Manual de microscopia electrónica para biólogos, 3era. ed. Londres, Edi. Blume, 1971, pp. 1-19.
  - No corrieron EL DIABLO: desataron EL INFIERNO. Diario Presente, 11 Julio 2005. Disponible en:  
[http://www.diariopresente.com.mx/Portal/Seguimiento.php?tema\\_id=29&FormArticles\\_Page=7](http://www.diariopresente.com.mx/Portal/Seguimiento.php?tema_id=29&FormArticles_Page=7)
  - Office of Prevention, Pesticidas and Toxic Substances, *Report on the Corrosion of Certain Alloys* [en línea] United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C. July, 2001 [fecha de consulta: 3 Noviembre 2005]. Disponible en: <<http://www.epa.gov/tri/lawsandregs/alloys/alloyreport.pdf>>
  - OTERO, Huerta Enrique, *Corrosión y degradación de materiales*, España, Edi. Síntesis, 1997.
  - PERKINS, Allan. Corrosion Monitoring. En: PHILIP, A., SCHWEITZER, P. E. *Corrosion Engineering Handbook*, USA, Marcel Dekker, 1996, pp. 634-643.
  - Pipeline Corrosion Problem (s. f.) Recuperado el 5 Marzo 2002 de:  
<http://www.corrosion-doctors.org/Pipeline/Introduction.htm>

- POPE, H. Daniel, DUQUETTE, J. David, et al. Microbiologically influenced corrosion of industrial alloys Materials Performance pp. 14-18 Abril 1984.
- Programa de Investigación y desarrollo de Ductos, (s.f.) Recuperado el 24 de Noviembre del 2005 de: <http://www.imp.mx>
- RHEINHEIMER, Gerltar, Microbiología de las aguas. Trd. Muñoz de Arenilla, J. España, Edi. Acribia, 1987, pp. 259-260.
- SANCHEZ, J. M. y MUÑOZ, M. A. Bacterias sulfatorreductoras y corrosión. Recuperado el 4 Octubre 2005 de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros54/bacterias.html>
- SANTANA, Hernández Francisco Javier. Estudio comparativo de la corrosión microbológica de aceros inoxidables en agua de mar. Vector Plus [en línea] [fecha de consulta: 23 Noviembre 2005] Disponible en: [http://www.fulp.ulpgc.es/newweb/publicaciones/vectorpluls/articulos/vp13\\_06\\_articulos05.pdf](http://www.fulp.ulpgc.es/newweb/publicaciones/vectorpluls/articulos/vp13_06_articulos05.pdf)
- *Sewer Explosion due to Corrosion* (s.f.) Recuperado el 30 Noviembre 2005 de <http://www.corrosion-doctors.org/Localized/sewer.htm>
- SIVERMAN, D. C. Practical corrosion prediction using electrochemical techniques En su: Uhlig's Corrosion Hndbook, 2da. ed. USA, R. Winston Revre John Willey an Sons, 2000, pp. 1197-1202.
- Standard Practice for calculation of corrosion rates and related information from electrochemical measurements. ASTM G102-89.
- Standard Practice for preparing cleaning, and evaluating corrosion test specimens. ASTM G1-90.
- Standard Reference Test Method for marking potentiostatic and potentiodynamic anodic polarization measurements. ASTM G5-94.
- Standard Test Method for conducting potentiodynamic polarization resistance measurements. ASTM G59-97.
- Standard Test Method for sulfide ion in water. ASTM D4658-92.
- Sulfate Reducing Bacteria (s. f.) Recuperado el 3 Febrero 2002 de: <http://www.chemtexcorp.com/techttopics/TT-006-0692.html>
- TORRES, A. Rocío. Ácido sulfhídrico, el olor a huevo podrido y algo más...

- ContactoS [en línea] 2000, No. 35 [fecha de consulta: 30 Septiembre 2005] p. 44-53.  
Disponible en: <<http://www.iztapalapa.uam.mx/contactos/n35ne/pdf/sulfhi.pdf>>
- TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R. y CASE, Christine L. Microbiology and introduction, 7a. ed. USA, Addison Wesley Longman, 2001, pp. 64-68.
  - TRETHERWEY, Kenneth R. y CHAMBERLAIN, John. Corrosion for students of science and engineering, Hong Kong, Edi. Longman Scientific and Technical, 1998, pp. 82-85.
  - VÁZQUEZ, Nin Gerardo, ECHEVERRÍA, Olga. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México, Fondo de Cultura Económica de México, 2000, pp. 108-117.
  - VIDELA, Héctor A. y HERRERA, Liz K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. International Microbiology [en línea] 2005, No. 8 [fecha de consulta: 4 Noviembre 2005] p. 169-180. Disponible en: <<http://www.im.micobios.org/0803/0803169.pdf>>
  - WIDDEL, Friedrich y BACK, Friedhelm Gram- Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria: the Prokaryotes, 2da. ed. USA, Springer-Verlay, 1992.
  - ZHU, Xiang Y.; LUBECK, John y KILBANE II, John J. Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. Applied and Environmental Microbiology [en línea] 2003, vol. 69, no. 9, 12 Marzo 2003 [fecha de consulta: 23 Septiembre 2005] p. 5354-5363. Disponible en: <[http://www.gastechnology.org/webroot/app/xn/xd.aspx?it=enweb&xd=1researchcp\1\\_4environsci\micconferencepaper.xml#abstract](http://www.gastechnology.org/webroot/app/xn/xd.aspx?it=enweb&xd=1researchcp\1_4environsci\micconferencepaper.xml#abstract)>
  - ZUO, Rongjun y WOOD, Thomas K. Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using gramicidin-S-producing biofilms. Appl Microbial Biotechnol [en línea] 2004, No. 65 [fecha de consulta: 17 Noviembre 2005] p. 747-753. Disponible en: <<http://www.engr.uconn.edu/~twood/pdf/SRBFeOxgramicidin.pdf>>

## **Apéndice**

**Medio Postgate E**

Composición por litro

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
CaCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	1 g
MgCl <sub>2</sub> 7 H <sub>2</sub> O	2 g
Lactato de sodio	3.5 g
Extracto de levadura	1 g
Ácido ascorbico	0.1 g
Ácido tioglicólico	0.1 g
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaCl	15 g
Agar	20 g
pH 7.6	

**Medio Postgate B**

Composición por litro:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
CaSO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	2 g
Lactato de sodio	3.5 g
Extracto de levadura	1 g
Ácido ascorbico	0.1 g
Ácido tioglicólico	0.1 g
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
NaCl	15 g
pH 7.0 - 7.5	

**Medio Postgate C**

Composición por litro:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5 g
CaCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	0.06 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.06 g
Lactato de sodio	6 g
Extracto de levadura	1 g
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.004 g
Citrato de sodio 7 H <sub>2</sub> O	0.3 g
NaCl	15 g
pH 7.5 ± 0.2	

**Medio API RP 38**

Composición por litro

Lactato de sodio 60%	8.0 ml
Extracto de Levadura	2.0 g
Ácido ascórbico	0.2 g
MgSO <sub>4</sub>	0.4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02g
Fe(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	10.0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0.4 g
Azul de metileno	0.2 ml
Agua destilada	1000 ml

**Solución Buffer Antioxidante de Sulfuros**

Composición por litro

NaOH	80 g
Ácido ascórbico	35 g
EDTA disódico	67 g
Agua destilada	1000 ml

### **Ácido Inhibido**

Composición por litro

HCl conc	1000 ml
Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	20 g
SnCl <sub>2</sub>	30 g

### **Agar Nutritivo**

Composición por litro

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g
Agar	15.0 g

pH 6.8 ± 0.2