



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
Ingeniería Química – Corrosión

***“Influencia de las Bacterias Sulfato Reductoras (BSRs) sobre la
Protección Catódica en Líneas que Transportan Hidrocarburos”***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:

RAFAEL GARCÍA ESQUIVEL

Dr. José María Malo Tamayo
Programa de Doctorado en
Ingeniería

Dr. Gerardo Zavala Olivares
Programa de Doctorado en
Ingeniería

Dr. Juan Genescá Llongueras
Facultad de Química



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Francisco Javier Rodríguez Gómez

Secretario : Dr. Gonzalo Galicia Aguilar

1 er Vocal : Dr. Gonzalo Gonzáles Rodríguez

2 do Vocal: Dr. Gerardo Zavala Olivares

3 er. Vocal: Dr. José María Malo Tamayo

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto Mexicano del Petróleo.

Asesor:

Supervisor técnico:

Dr. José María Malo Tamayo

Dr. Gerardo Zavala Olivares

Sustentante:

M. en C. Rafael García Esquivel

Dedicado

A Dios y a la Naturaleza.

Por ser maravillosamente perfectos.

A mi madre Gloria que me dio la vida y que a pesar de la penumbra de la pobreza, tuvo la fortaleza para brindarme los peldaños de mi formación base de lo que ahora soy.

A mi hermosa esposa Ma. Guadalupe que por su paciencia y dedicación que en silencio en cada momento en cada instancia me aportaba la energía y fortaleza para llevar a cabo uno de los objetivos de mi vida.

A mis hijos José Daniel y Luis Fernando, escritores de mi vida, que desde su nacimiento sonrieron y dieron fortaleza, felicidad y alegría en mi hogar, base y motivo para superar los proyectos de mi vida.

A mis maestros y sinodales que me prestaron parte de su tiempo y dedicación en la revisión con sentido y esmero para mejorar los conceptos de este trabajo.

Resumen

En este trabajo se presenta una investigación para determinar si el potencial de protección catódica de $-950\text{ mV Vs Cu/CuSO}_4$, establecido como criterio normativo para la protección de estructuras metálicas enterradas o sumergidas, es suficiente en presencia de microorganismos, tales como bacterias sulfato reductoras (BSRs).

Para conocer el efecto de los microorganismos sobre la superficie del acero (API XL52) protegida catódicamente, así como la influencia de los potenciales de protección sobre la colonización de la superficie por microorganismos, se realizaron pruebas físicas, químicas, electroquímicas, microbiológicas y se realizaron análisis de superficie mediante electrónica de barrido ambiental.

Para cada uno de los experimentos realizados en la celda electroquímica de evaluación (CEE), al término de cada prueba, el electrodo de trabajo cubierto con biopelícula y productos de corrosión, fue analizado mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental, a fin de determinar la presencia de microorganismos en la matriz de la biopelícula. De igual forma, la superficie metálica se analizó para detectar el tipo de daño por corrosión.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los potenciales de protección aplicados y la alcalinidad generada, no lograron inhibir el crecimiento de los microorganismos de prueba. Solamente en el potencial de -1100 mV , se observó un pleomorfismo en la forma de las BSRs. Así mismo, se observó que en algunos de ellos se generaron formas de resistencia o de protección (endosporas).

Los resultados del análisis de superficie de los electrodos de trabajo, evidencian daños por corrosión generalizada y localizada. Por la forma, tamaño y tipo de corrosión se observó que estos se ven afectados por la densidad de corriente de protección, este efecto se visualiza por la disminución en la densidad, profundidad y la morfología de la corrosión localizada. En este sentido, en los potenciales de -850 , -900 -950 mV , se denotó el mayor daño por este tipo de corrosión; mientras que en los potenciales de -1000 a -1100 mV , la corrosión localizada disminuye en densidad y profundidad.

Palabras clave: *Corrosión inducida por microorganismos, protección catódica, bacterias sulfato reductoras*

Contenido

Dedicado.....	2
Resumen.....	3
Contenido.....	4
Lista de Figuras.....	15
Lista de tablas.....	22
Lista de símbolos y acrónimos.....	25
1. Introducción.....	30
1.1 Hipótesis de trabajo.....	31
1.2 Objetivo general.....	31
1.2.1 Objetivos específicos.....	31
2. Antecedentes.....	33
2.1 Bacterias Sulfato reductoras (<i>BSRs</i>).....	35
2.2 Características fenotípicas del grupo de bacterias sulfato reductoras.....	35
2.3 Filogenia de las Bacterias Sulfato reductoras (<i>BSRs</i>).....	36
2.4 Interrelación del ecosistema de las <i>BSRs</i> con los procesos de protección catódica aplicada a la infraestructura de transporte.....	37
2.4.1 Medio ambiente.....	38
2.4.2 Efectos suelo-tubería.....	41
2.5 Protección catódica.....	42
2.5.1 Modalidades de la protección catódica.....	42
2.5.2 Ánodos de sacrificio.....	43
2.5.3 Desprendimiento catódico.....	43
2.5.4 Criterio de los 950 mV _{Cu/CuSO4}	44
3. Elementos teóricos y experimentales de sustentación.....	46

3.1 Corrosión.....	47
3.2 Fundamento electroquímico de la protección catódica	49
3.3 Diagramas de Evans	49
3.4 Diagrama de potencial $-pH$	51
3.5 Ecuación de Nernst.....	53
3.6 Condiciones favorables para el desarrollo de <i>BSRs</i>	55
4. Actividad bacteriológica en procesos de corrosión.....	55
4.1 Actividad enzimática –colonización de superficies.....	56
4.1.1 Actividad enzimática-utilización de hidrógeno molecular	56
4.2 Actividad metabólica	59
4.2.1 Consumo de sulfatos y producción de ácido sulfhídrico	59
4.2.1.1 Proceso de sulfato-reducción y ruta de desasimilación	60
4.2.1.2 Rutas de asimilación o metabólicas del azufre.....	60
4.2.2 Características físicas y químicas del ácido sulfhídrico biogénico	61
4.2.2.1 Mecanismos de reacción del ácido sulfhídrico.....	63
4.2.2.2 Mecanismos de reacción del ion sulfhídrico	64
4.2.2.2.1 Alternativa de la reacciones del H_2S , en el área catódica	66
4.2.3 Mackinawita	67
4.3 Biopelículas.....	70
4.3.1 Composición de las biopelículas.....	70
4.3.2 Función de las biopelículas.....	71
4.3.3 Biopelículas en los procesos de corrosión	72
5. Materiales y métodos	74
5.1 Aislamiento de microorganismos	74
5.1.1 Conformación de un consorcio de <i>BSRs</i>	75
5.1.1.1 Purificación y selección de <i>BSRs</i>	76
5.1.1.2 Método de estrías cruzadas.....	76

5.1.1.3 Método de Tubo rolado.....	77
5.1.1.4 Clasificación y asignación de viales con crecimiento purificado de BSRs.	78
5.2 Caracterización biológica del consorcio	79
5.2.1 Caracterización biológica por Clonación del Gen 16S rDNA	79
5.2.2 Extracción del DNA.....	80
5.2.3 Ampliación del Gen.....	81
5.2.4 Purificación del Gen Amplificado	83
5.2.5 Ligación	83
5.2.6 Transformación.....	84
5.2.7 Recuperación de clonas	85
5.2.8 Obtención del plásmido	85
5.2.9 Recuperación del inserto	85
5.2.10 Análisis rflp's.....	86
5.2.11 Secuenciación del inserto.....	87
5.2.12 Análisis de la secuenciación	87
5.3 Preparación y montaje de las Celdas Electroquímicas experimentales (<i>CEE</i> y <i>CER</i>).	88
5.3.1 Preparación y esterilización de celdas y medios de cultivo.	88
5.3.2 Preparación y acondicionamiento de los elementos y sensores de medición de las celdas <i>CEE</i> y <i>CER</i>	89
5.3.3 Actividades mixtas para el montaje de las celdas electroquímica.....	90
5.3.4 Programación de pruebas y determinaciones vía húmeda en la <i>CEE</i> a potencial de $-850\text{ mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$	93
5.3.4.1 Tratamiento de los electrodos de trabajo al término de los ensayos.	94
5.3.5 Programación de pruebas y determinaciones de vía húmeda en <i>CER</i> a diferentes potenciales programados.	94

5.3.5.1 Tratamiento de los electrodos de trabajo	95
6. Resultados y discusión.....	96
6.1 Resultados de la caracterización del consorcio de <i>BSRs</i> , usando la técnica de Clonación del Gen <i>16S rDNA</i>	96
6.2 Potencial de protección de $-850\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	97
6.2.1 Parámetros Físicos	97
6.2.1.1 Comportamiento de <i>pH</i>	97
6.2.1.2 Comportamiento del potencial redox (<i>Eh</i>).....	100
6.2.2 Parámetros Bacteriológicos	102
6.2.2.1 Densidad poblacional (<i>D_p</i>)	103
6.2.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico	105
6.2.3 Parámetros químicos	107
6.2.3.1 Alcalinidad	108
6.2.3.2 Hierro (<i>Fe²⁺</i>).....	109
6.2.4 Parámetros electroquímicos	114
6.2.4.1 Técnica gravimétrica.....	114
6.2.4.1.1 Determinación de la velocidad corrosión del acero <i>API XL-52</i> protegido con $-850\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$ en los sistemas <i>CEE</i> y <i>CER</i>	114
6.2.4.1.2 Cálculos para determinar velocidad de corrosión.	114
6.2.4.2 Resistencia a la polarización Lineal (<i>R_p</i>).....	116
6.2.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a $-850\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	116
6.2.4.2.2 Celda electroquímica de evaluación (<i>CEE</i>).....	118
6.2.4.2.3 Celda electroquímica de referencia (<i>CER</i>).....	119
6.2.4.2.4 Celda electroquímica de evaluación (<i>CEE</i>).....	119
6.2.4.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (<i>EIS</i>).	121
6.2.4.3.1 Resultados de la Impedancia electroquímica en <i>CEE</i> a $-850\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	121

6.2.4.3.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a - 850 mV _{Cu/CuSO4}	130
6.2.4.4 Corriente de protección (<i>i_p</i>).....	137
6.2.4.4.1 Descripción del comportamiento de <i>ip</i> en CEE a - 850 mV _{Cu/CuSO4}	138
6.2.4.4.2 Descripción del Comportamiento de <i>ip</i> en CER a - 850 mV _{Cu/CuSO4}	139
6.2.5 Análisis de superficies expuestas a – 850 mV _{Cu/CuSO4}	139
6.2.5.1 Análisis de superficie de biopelículas, BSRs y productos de corrosión sobre el electrodo de trabajo en la CEE.....	140
6.2.5.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.	142
6.2.5.3 Análisis de superficie del daño por corrosión al electrodo de trabajo de la CER.	143
6.3. Potencial de protección de –900 mV _{Cu/CuSO4}	145
6.3.1 Parámetros Físicos	145
6.3.1.1 Comportamiento del pH.....	145
6.3.1.2 Comportamiento del potencial redox (<i>E_h</i>).....	147
6.3.2 Parámetros Bacteriológicos	148
6.3.2.1 Densidad poblacional (<i>D_p</i>)	148
6.3.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico	149
6.3.3 Parámetros químicos	151
6.3.3.1 Alcalinidad	152
6.3.3.2 Hierro (<i>Fe²⁺</i>).....	154
6.3.4 Parámetros electroquímicos	155
6.3.4.1 Técnica gravimétrica.....	155
6.3.4.2 Resistencia a la Polarización Lineal (<i>R_p</i>).	157
6.3.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en CEE y CER a - 900mV _{Cu/CuSO4}	157
6.3.5 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).	159

6.3.5.1	Resultados de la Impedancia Electroquímica en CEE a - 900 mV _{Cu/CuSO4}	159
6.3.5.1.1	Diagrama de Nyquist.....	159
6.3.5.1.2	Diagrama de ajustes	161
6.3.5.1.3	Datos de los elementos de Ajuste	162
6.3.5.1.4	Datos de Resistencia a la polarización, corriente corrosión y velocidad de corrosión.	164
6.3.5.2	Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a - 900 mV _{Cu/CuSO4}	164
6.3.5.2.1	Diagrama de impedancias de Nyquist.....	165
6.3.5.2.2	Diagrama de ajustes	166
6.3.5.2.3	Datos de los elementos de Ajuste	166
6.3.5.2.4	Datos de R_p, i_{corr}, v_{corr}	167
6.3.5.2.5	Relación del comportamiento entre CEE y CER.....	168
6.3.6	Corriente de protección ($i_{prot.}$).....	169
6.3.6.1	Descripción del comportamiento de i_{pen} en CEE.....	169
6.3.6.2	Descripción del comportamiento de i_{pen} en CER a - 900 mV _{Cu/CuSO4}	170
6.3.7	Análisis de superficies expuesta a - 900mV _{Cu/CuSO4}	170
6.3.7.1	Análisis de superficie de biopelículas, BSRs y productos de corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.	171
6.3.7.2	Análisis de superficie dañada por corrosión del E_t de la CEE.....	172
6.3.7.3	Análisis de superficie del daño de la superficie del E_t de la CER.	174
6.4	Potencial de protección de -950 mV _{Cu/CuSO4}	176
6.5.1	Parámetros Físicos	176
6.3.1.1	Comportamiento de pH.....	176
6.3.1.2	Comportamiento del potencial redox (E_h).....	178
6.3.2	Parámetros Bacteriológicos	179
6.3.2.1	Densidad poblacional (D_p).....	179
6.3.2.2	Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico	180

6.3.3	Parámetros químicos	182
6.3.3.1	Alcalinidad	183
6.3.3.2	Hierro (Fe^{2+}).....	184
6.3.4	Parámetros electroquímicos	186
6.3.4.1	Técnica gravimétrica.....	186
6.3.4.2	Cálculo para determinar velocidad de corrosión	187
6.3.4.2	Resistencia de Polarización Lineal (R_p).....	188
6.3.4.2.1	Resultados de la Polarización Lineal en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a -950 mV _{Cu/CuSO4}	188
6.3.4.2.1	Cálculos para determinar velocidad de corrosión	188
6.3.4.2.2	Celda electroquímica de evaluación <i>CEE</i>	189
6.3.4.2.3	Celda electroquímica de evaluación <i>CER</i>	189
6.3.4.3	Espectroscopia de Impedancia electroquímica (<i>EIS</i>).	190
6.3.4.3.1	Resultados de la Impedancia electroquímica en <i>CEE</i> a - 950mV _{Cu/CuSO4}	190
6.3.4.3.1.1	Diagrama de Nyquist.....	191
6.3.4.3.1.2	Diagrama de ajustes	192
6.3.4.3.1.3	Datos de los elementos de Ajuste	192
6.3.4.3.1.4	Datos de Resistencia a la polarización, corriente corrosión y velocidad de corrosión.	194
6.3.4.3.2	Resultados de la Impedancia electroquímica en <i>CER</i> a - 950 mV _{Cu/CuSO4}	195
6.3.4.3.2.1	Diagrama de impedancias de Nyquist.....	195
6.3.4.3.2.2	Diagrama de ajustes	196
6.3.4.3.2.3	Datos de los elementos de Ajuste	197
6.3.4.3.2.4	Datos de R_p, i_{Corr}, V_{Corr}	198
6.3.4.3.2.5	Relación del comportamiento entre <i>CEE</i> y <i>CER</i>	199
6.3.4.4	Corriente de protección (<i>ip</i>).....	201

6.3.4.4.1	Descripción del comportamiento de i_p en <i>CEE</i>	201
6.3.4.4.2	Descripción del comportamiento de i_p en <i>CER</i>	202
6.3.4.5	Análisis de superficie expuestas a 950 mV. _{Cu/CuSO4}	202
6.3.4.5.1	Análisis de superficie de biopelículas, <i>BSRs</i> y productos de corrosión del electrodo de trabajo de la <i>CEE</i>	203
6.3.4.5.2	Análisis de superficie dañada por corrosión del E_t de la <i>CEE</i> ...	204
6.3.4.5.3	Análisis de superficie del electrodo de la <i>CER</i> dañado por corrosión.....	206
6.4.	Potencial de protección de $-1000\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	208
6.4.1	Parámetros Físicos	208
6.4.1.1	Comportamiento del <i>pH</i>	208
6.4.1.2	Potencial redox (E_h).....	210
6.4.2	Parámetros bacteriológicos	211
6.4.2.1	Densidad poblacional (D_p)	211
6.4.2.2	Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico por <i>BSRs</i>	212
6.4.3	Parámetros químicos	214
6.4.3.1	Alcalinidad	215
6.4.3.2	Hierro (Fe^{2+}).....	216
6.4.4	Parámetros electroquímicos	218
6.4.4.1	Técnica gravimétrica.....	218
6.4.4.1.1	Cálculo para determinar velocidad de corrosión	219
6.4.4.2	Resistencia de Polarización Lineal (R_p).....	220
6.4.4.2.1	Resultados de la Polarización Lineal en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	220
6.4.4.2.2	Cálculos para determinar velocidad de corrosión	220
6.4.4.2.3	Comportamiento de la v_{corr} en <i>CEE/CER</i>	221
6.4.4.3	Espectroscopia de Impedancia electroquímica (<i>EIS</i>).	222
6.4.4.3.1	Resultados de la Impedancia electroquímica en <i>CEE</i> a $1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	223

6.4.4.3.2	Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a -1000mV _{Cu/CuSO4}	228
6.4.4.4	Corriente de protección (<i>ip</i>).....	234
6.4.4.4.1	Descripción del comportamiento de <i>ip</i> en CEE.....	234
6.3.4.4.2	Descripción del comportamiento de <i>ip</i> en CER.	235
6.4.4.5	Análisis de superficie expuesta a - 1000 mV _{Cu/CuSO4}	236
6.4.4.5.1	Análisis de superficie de biopelículas, BSRs y productos de corrosión	236
6.4.4.5.2	Análisis de superficie dañada por corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.....	239
6.4.4.5.3	Análisis de superficie del daño de la superficie del electrodo de trabajo de la CER.....	240
6.5.	Potencial de protección de -1100 mV _{Cu/CuSO4}	242
6.5.1	Parámetros Físicos	242
6.5.1.1	Comportamiento del pH.....	243
6.5.1.2	Comportamiento del potencial redox (<i>E_h</i>).	244
6.5.2	Parámetros bacteriológicos	245
6.5.2.1	Densidad poblacional (<i>D_p</i>)	245
6.5.2.2	Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico por BSRs.....	246
6.5.3	Parámetros químicos	248
6.5.3.1	Comportamiento de la alcalinidad.....	249
6.5.3.2	Hierro (<i>Fe²⁺</i>).....	251
6.5.4	Parámetros electroquímicos	253
6.5.4.1	Técnica gravimétrica.....	253
6.5.4.1.1	Calculo para determinar velocidad de corrosión	253
6.5.4.2	Resistencia a la polarización lineal (<i>R_p</i>).....	254
6.5.4.2.1	Resultados de la Polarización Lineal en CEE y CER a -1100mV _{Cu/CuSO4}	254
6.5.4.2.2	Cálculos para determinar velocidad de corrosión	254

6.5.4.2.3 Causas de incremento en velocidad de corrosión en CER....	255
6.5.4.2.4 Celda de evaluación CEE	256
6.5.4.3 Espectroscopia de Impedancia electroquímica (EIS)	256
6.5.4.3.1 Resultados de la Impedancia electroquímica en CEE a -1100mV _{Cu/CuSO4}	257
6.5.4.3.1 Diagrama de Nyquist.....	257
6.5.4.3.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a -1100mV _{Cu/CuSO4}	266
6.5.4.4 Corriente de protección (<i>ip</i>).....	270
6.5.4.4.1 Descripción del comportamiento de CEE a -1100mV _{Cu/CuSO4}	271
6.5.4.4.2 Descripción del comportamiento de CER a -1100mV _{Cu/CuSO4}	271
6.5.4.5 Análisis de superficie expuesta a -1100 mV _{Cu/CuSO4}	272
6.5.4.5.1 Análisis de superficie de biopelículas, BSRs y productos de corrosión	273
6.5.4.5.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.....	276
6.5.4.5.3 Análisis de superficie del daño de la superficie del electrodo de trabajo de la CER.....	278
7. Conclusiones.....	282
8. Recomendaciones y Trabajos futuros.....	284
9. Referencias.....	285
Anexo I. Medios de cultivos.....	289
Anexo II Caracterización Filogenética	292
Anexo III. Apéndice Grafico.....	296
Ajuste de gráficos correspondientes a -850mV en CEE.....	297
Ajuste de gráficos correspondientes a -900mV en CEE.....	298
Ajuste de gráficos correspondientes a -950mV en CEE.....	299

Ajuste de gráficos correspondientes a -1000mV en <i>CEE</i>	300
Ajuste de gráficos correspondientes a -1100mV en <i>CEE</i>	301

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del potencial mixto, base electroquímica de la protección catódica.....	50
Figura 2. Diagrama de Potencial <i>pH</i> del hierro y zona de estabilidad del agua. ...	51
Figura 3. Esquema de transporte de Hidrógeno y sulfatos a través de la membrana celular.....	57
Figura 4. Esquemas de reacciones de asimilación y desasimilación de sulfatos....	61
Figura 5 Esquema que muestra la interactividad en la interfase de una superficie metálica protegida catódicamente y la membrana celular con la sulfato reducción y la remoción enzimática del hidrógeno.	69
Figura 6. Detalle del montaje del electrodo de trabajo	90
Figura 7. Celda electroquímica de evaluación (<i>CEE</i>) y sus elementos de monitoreo, después de 24h de haber sido inoculada.	92
Figura 8.Comportamiento del <i>pH</i> en el tiempo en el medio de cultivo a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$	99
Figura 9. Comportamiento del <i>Eh</i> en el tiempo en el medio de cultivo a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$	101
Figura 10. Relación de condiciones de <i>Eh</i> y densidad poblacional de <i>BSRs</i> en el tiempo a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$	102
Figura 11. Densidad poblacional en el tiempo de <i>BSRs</i> en <i>CEE</i> a – 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$	104
Figura 12. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por <i>BSRs</i> en el tiempo durante la prueba en <i>CEE</i> a –850 $mV_{Cu/CuSO_4}$	107
Figura 13. Comportamiento de la alcalinidad en el tiempo en los sistemas <i>CEE</i> y <i>CER</i> a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$	108
Figura 14. Variación de la concentración de Fe^{2+} referente al tiempo en el medio, debido a la oxidación del acero <i>API XL-52</i> , en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$..	112
Figura 15. Esquema de un electrodo de trabajo, en el que ilustra en parte las líneas de flujo en el área protegida y la acumulación de diferentes capas de biopelículas (<i>EPS</i>) y la heterogeneidad de la superficie.....	113

Figura 16. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero <i>API XL-52</i> en <i>CEE</i> y <i>CER</i> , a - 850 mV _{Cu/CuSO4}	118
Figura 17. Variación de la impedancia en el diagrama de Nyquist a diferentes tiempos, determinadas sobre el acero <i>API XL52</i> en la <i>CEE</i> , a -850mV _{Cu/CuSO4} ..	122
Figura 18. Circuito Equivalente para simular los datos Nyquist para el sistema de corrosión en la <i>CEE</i>	123
Figura 19. Ajustes a los valores de los elementos del circuito Randles, a las curvas de impedancia del día 1 de prueba.	125
Figura 20. Variación de la impedancia en el diagrama de Nyquist a distintos tiempos, determinadas sobre el acero <i>API XL52</i> en <i>CER</i> -850mV _{Cu/CuSO4}	131
Figura 21. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 5 en <i>CER</i>	133
Figura 22. Comportamiento en el tiempo de la corriente de protección en la <i>CEE</i> y <i>CER</i> a - 850 mV _{Cu/CuSO4}	139
Figura 23. Muestra cúmulos de biopelículas y microorganismos	141
Figura 24. Muestra morfología de microorganismo y presencia productos de corrosión.....	141
Figura 25. Muestra el daño por corrosión de la superficie del metal expuesta a – 850 mV _{Cu/CuSO4}	142
Figura 26. Daño por corrosión localizada de la superficie expuesta a – 850 mV _{Cu/CuSO4}	143
Figura 27. Superficie sin daño aparente.....	144
Figura 28. Superficie con zonas con corrosión generalizada sin daño por corrosión localizado	144
Figura 29. Comportamiento del <i>pH</i> referente al tiempo en el medio de cultivo a - 900 mV _{Cu/CuSO4}	146
Figura 30. Comportamiento del <i>Eh</i> en relación al tiempo en el medio de cultivo a - 900 mV _{Cu/CuSO4}	148
Figura 31. Relación de condiciones de <i>Eh</i> y Densidad poblacional de <i>BSRs</i> en el tiempo a - 900 mV _{Cu/CuSO4}	149

Figura 32. Bioconversión de SO_4^{2-} – a H_2S por <i>BSRs</i> referente al tiempo en que la prueba se llevó a cabo a - 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	151
Figura 33. Comportamiento de la alcalinidad en el tiempo en los sistemas <i>CEE</i> y <i>CER</i> a - 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	153
Figura 34. Variación en la concentración de Fe^{2+} en el tiempo en los sistemas <i>CEE</i> y <i>CER</i> debido a la oxidación del acero <i>API XL-52</i> protegido a - 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	155
Figura 35. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero <i>API XL-52</i> en <i>CEE</i> y <i>CER</i> , a -900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	158
Figura 36 Diagrama de Nyquist en el tiempo muestra las Impedancia determinadas sobre el acero <i>API XL52</i> en la <i>CEE</i> a -900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	160
Figura 37. Ajustes a los valores de los parámetros del circuito equivalente a datos de la curva de impedancia correspondiente al día 1 de prueba	161
Figura 38. Variación del diagrama de Nyquist en el tiempo, muestra las Impedancia determinadas sobre el acero <i>API XL52</i> en <i>CER</i> a – 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	165
Figura 39. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en <i>CER</i>	166
Figura 40. Comportamiento de la corriente de protección en el tiempo en la <i>CEE</i> y <i>CER</i> a – 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	170
Figura 41. Muestra ruptura de película y somas de microorganismos	172
Figura 42. Muestra morfología de microorganismo y presencia productos de corrosión.....	172
Figura 43. Muestra el daño por corrosión de la superficie.....	173
Figura 44. Daño por corrosión localizada de la superficie	173
Figura 45. Superficie sin daño aparente.....	174
Figura 46. Superficie con zonas con corrosión generalizada	175
Figura 47. Comportamiento del <i>pH</i> respecto al tiempo en el medio de cultivo a - 950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	177
Figura 48. Comportamiento del <i>Eh</i> en función al tiempo en el medio de cultivo a - 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$	179
Figura 49. Densidad poblacional de <i>BSRs</i> en relación al tiempo en <i>CEE</i> a – 950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	180

Figura 50. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por <i>BSRs</i> durante la prueba en <i>CEE</i> a - 950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	182
Figura 51. Alcalinización del medio por actividad de <i>BSRs</i> y protección catódica sobre el acero API XL52 a - 950. $mVCu/CuSO_4$	184
Figura 52. Variación de la concentración de Fe^{2+} respecto al tiempo en el medio, debido a la oxidación del acero API XL- 52, en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a - 950 $mVCu/CuSO_4$	186
Figura 53. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero <i>API XL-52</i> en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a - 950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	189
Figura 54. Variación de las impedancias en el diagrama de Nyquist en el tiempo, determinadas sobre el acero <i>API XL52</i> en la <i>CEE</i> a -950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	191
Figura 55. Ajustes de valores a los valores de los elementos del circuito equivalente a los datos de la curvas de impedancia del día 1 en <i>CEE</i>	192
Figura 56. Variación de las impedancias en el diagrama de Nyquist en el tiempo, determinadas sobre el <i>API XL52</i> en <i>CER</i> a -950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	195
Figura 57. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en <i>CER</i>	197
Figura 58. Comportamiento de la corriente de protección en el tiempo, en los sistemas <i>CEE</i> y <i>CER</i> , a - 950 $mV_{Cu/CuSO_4}$	202
Figura 59. Muestra ruptura y pliegue de la biopelícula y somas de microorganismos	204
Figura 60. Muestra morfología de microorganismo y sobre posición capas de sulfuros.....	204
Figura 61. Muestra el daño por corrosión de la superficie expuesta	205
Figura 62. Daño por corrosión localizada de la superficie expuesta	206
Figura 63. Superficie sin daño aparente.....	207
Figura 64. Superficie con zonas con corrosión generalizada	208
Figura 65. Comportamiento del <i>pH</i> respecto al tiempo en el medio de cultivo a -1000 $mV_{Cu/CuSO_4}$	210
Figura 66. Comportamiento del <i>Eh</i> en función al tiempo en el medio de cultivo a - 1000 $mV_{Cu/CuSO_4}$	211

Figura 67. Relación de condiciones de E_h y Densidad poblacional en el tiempo de BSRs a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	212
Figura 68. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por BSRs durante la prueba en el sistema CEE a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	214
Figura 69. Comportamiento de la alcalinidad respecto al tiempo en los sistemas CEE Y CER a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	216
Figura 70. Variación en la concentración de Fe^{2+} en el medio debido a la oxidación del acero API XL-52 protegido a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	218
Figura 71. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo, sobre el acero API XL- 52 en CEE y CER, a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	221
Figura 72. Variación de las impedancias en el Diagrama de Nyquist, determinadas sobre el acero API XL52 en CEE a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	224
Figura 73. Ajustes a los valores de los elementos del circuito equivalente a las curvas de impedancia al día 1 de prueba.....	225
Figura 74. Variación de las impedancias en el Diagrama de Nyquist, determinadas sobre el acero API XL52 en CER, a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	229
Figura 75. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en CER.....	230
Figura 76. Comportamiento de la corriente de protección en el tiempo en los sistemas CEE y CER a $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	235
Figura 77. Muestra ruptura de capa y somas de microorganismos.....	237
Figura 78. Muestra morfología de microorganismo y capas de sulfuros.....	238
Figura 79. Muestra el daño por corrosión uniforme y localizada.....	240
Figura 80. Morfología y tipo de daño por corrosión localizada.....	240
Figura 81. Superficie con corrosión uniforme y sin daño por corrosión localizada.....	241
Figura 82. Superficie con zonas con corrosión generalizada.....	241
Figura 83. Comportamiento del pH respecto al tiempo en el medio de cultivo a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	243
Figura 84. Comportamiento del E_h en relación al tiempo en el medio de cultivo a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	245

Figura 85. Relación de condiciones de E_h y densidad poblacional de <i>BSRs</i> referente al tiempo a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	246
Figura 86. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por <i>BSRs</i> durante la prueba a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	248
Figura 87. Comportamiento de la alcalinidad referente al tiempo en los sistemas <i>CEE</i> y <i>CER</i> a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	250
Figura 88. Variación de la concentración del Fe^{2+} referente al tiempo en el sistema <i>CEE</i> debido a la oxidación del acero <i>API XL52</i> protegido a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	252
Figura 89. Variación de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero <i>API XL-52</i> , en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	255
Figura 90. Variación de la impedancia en el diagrama de Nyquist, registradas sobre el acero <i>API XL52</i> en <i>CEE</i> , a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	257
Figura 91. Ajustes a los valores de los elementos del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 de prueba.	258
Figura 92. Circuito equivalente utilizado para los ajuste de las curvas de impedancia correspondiente a los días 10, 15 y 20.	259
Figura 93. Ajustes de los valores de los elementos del circuito equivalente a la curva de impedancia del día 10 de prueba.....	259
Figura 94. Circuito equivalente utilizado para los ajuste de las curvas de impedancia correspondiente a los días 25 y 30.	260
Figura 95. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 25 en <i>CEE</i>	260
Figura 96. Variación de las impedancias en el diagrama de Nyquist, determinadas sobre el acero <i>API XL52</i> en <i>CER</i> , a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	266
Figura 97. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en <i>CER</i>	267
Figura 98. Comportamiento de la corriente de Protección en el tiempo en <i>CEE</i> y <i>CER</i> a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	272
Figura 99. Muestra contorno del relieve y el perfil de una película con aglomerados de microorganismos en su interior.	274

Figura 100. Se observan estructuras diversas de la biopelícula (cúmulos de biopelículas, micro poros y diferentes formas bacilares.	274
Figura 101. En esta imagen, se aprecia la morfología bacilar de las <i>BSRs</i> , en algunos somas se define formas de resistencia o estructuras de esporulación así como pleomorfismo bacilar.....	275
Figura 102. Superficie con diferente forma y grado de corrosión localizada.	277
Figura 103. Morfología del daño por corrosión localizada.	277
Figura 104. Corrosión localizada tipo picadura de forma cónica, en cuyo fondo se alcanza a preciar la iniciación de otro proceso.....	278
Figura 105 Superficie con escasos puntos de corrosión superficial y ralladuras.	279
Figura 106. Superficie con zonas con corrosión generalizada y uniforme.....	279
Figura 107. Corrosión generalizada con puntos de corrosión localizada incipiente.	281

Lista de tablas

Tabla 1. Relación del pH y estado de ionización de la molécula de H_2S	63
Tabla 2. Composición y rango de concentración del EPS [54, 55]	71
Tabla 3. Composición y contenidos porcentuales del EPS [56]	71
Tabla 4, Contenido de reactivos para la amplificación	82
Tabla 5. Valores de K	115
Tabla 6. Velocidad de corrosión (V_{corr}) mediante técnica gravimétrica a -850 mV	115
Tabla 7. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente para las diferentes pruebas de impedancia realizadas en la CEE a $-850\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	126
Tabla 8. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para CEE a $-850\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	129
Tabla 9. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en CER a $-850\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	133
Tabla 10. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, en CER a $-850\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	135
Tabla 11. Comportamiento de los parámetros de R_p y V_{corr} en los sistemas de evaluación CEE y CER a $-850\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	136
Tabla 12. Velocidad de corrosión V_{corr} mediante técnica gravimétrica -900mV ..	156
Tabla 13. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente para las pruebas realizadas a de la CEE a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	162
Tabla 14. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para CEE a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	164
Tabla 15. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en CER a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	167
Tabla 16. Valores de i_{corr} y V_{corr} Procedente de los parámetros de ajuste del circuito equivalente en CER a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	168
Tabla 17. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y V_{corr} de ambos sistemas de evaluación CEE y CER a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$	168

Tabla 18. Velocidad de corrosión sobre el acero <i>API XL 52</i> mediante técnica gravimétrica protegido con $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	187
Tabla 19. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en <i>CEE</i> a $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	193
Tabla 20. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para <i>CEE</i> a $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	194
Tabla 21. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en <i>CER</i> a $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	197
Tabla 22. Valores de i_{corr} y v_{corr} Procedente de los parámetros de ajuste del circuito equivalente en <i>CER</i> a $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	199
Tabla 23. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y V_{corr} de ambos sistemas de evaluación <i>CEE</i> y <i>CER</i> , con potencial de $-950\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	199
Tabla 24. Velocidad de corrosión sobre el acero <i>API XL 52</i> , mediante técnica gravimétrica protegido con $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	219
Tabla 25. Datos de ajustes de los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en <i>CEE</i> a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	225
Tabla 26. Valores de i_{corr} y v_{corr} procedentes de las interrelación de la transferencia de carga y la resistencia a la polarización, para <i>CEE</i> a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	227
Tabla 27. Datos del ajuste a los parámetros del circuito equivalente a las impedancias correspondientes a la <i>CER</i> a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	231
Tabla 28. Se presentan los Valores de i_{corr} y v_{corr} procedente de los parámetros de ajuste del circuito equivalente en <i>CER</i> a $-1000\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	232
Tabla 29. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y v_{corr} en los sistemas de evaluación <i>CEE</i> y <i>CER</i> a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	233
Tabla 30. Velocidad de corrosión en el acero <i>API XL 52</i> , mediante técnica gravimétrica protegido con $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	253
Tabla 31. Datos de ajustes de los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en <i>CEE</i> a $-1100\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	261
Tabla 32. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para <i>CEE</i> a $-1100\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	264

Tabla 33. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a las impedancias correspondientes a la CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	268
Tabla 34. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, en CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	269
Tabla 35. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y v_{corr} en los sistemas de evaluación CEE y CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$	270
Tabla 36. Medio de cultivo API modificado para BSRs	289
Tabla 37. Preparación de Medio Bold Basal Modificado (MBBM)	290

Lista de símbolos y acrónimos

pH Potencial de Hidrógeno

PC Protección Catódica

BSRs Bacteria Sulfato Reductoras

mV Milivolts

i_p Corriente de protección

SPC Sistemas de Protección Catódica

V Voltaje

NACE Asociación Nacional de Ingenieros en Corrosión

NACE RP Asociación Nacional de Ingenieros en Corrosión Practicas Recomendadas

DNV RP Det Norske Veritas Practicas Recomendadas

ISO Organización Internacional para Estandarización

I_{corr} Corriente de corrosión

E_{corr} Potencial de corrosión

E- pH Relación de Potencial pH

g gramos

l litros

°C Grados Celsius

$E_{prot.}$ Potencial de Protección

EPS Sustancia Polimérica Extracelular

NAD Nicotinamida Adenin Dinucleótido

NADP Nicotinamida adenin Dinucleótido Fosfato

ATP Adenosin Trifosfato

APS Adenosin Fosfo Sulfato

AMP Adenocin Monofosfato

ADP Adenocin difosfato

PP_i Difosfato inorgánico

PAP Adenocin Fosfo Fosfato

K Constante de disociación del ácido sulfhídrico

C_{H_2S} Contante de ionización para el ácido sulfhídrico

C_{H_2S} Constante de ionización del ion sulfhídrico

C_{H_2S} contante de ionización del ion sulfuro

KDa Unidad de Masa Atómica o Dalton

CCF Fracción Combinada Corrosiva

CIM Microorganismos que Inducen Corrosión

h horas

API Instituto Americano del Petróleo

CR Cepa de Referencia

CM Cepa de Mantenimiento

CT Cepa de Trabajo

Topota-TA Kit para eficientar la clonación de la Taq polimerasa

DNA Ácido Deoxiribonucleico

RNA Ácido Ribonucleico

rDNA Ácido Deoxiribonucleico Ribosomal

16s Subunidad de nucleótidos del 32s del ribosoma de los Prokariotes

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

DNTP'S Dinucleótidos elementales Adenina- Timina y Guanina –Citocina que se adhieren, al sitio activo de la DNA polimerasa.

NVZ1 Oligonucleótidos o iniciadores o primers usados para ampliar una región en16s

Tag DNA polimerasa Enzima termoestable aislada del bacilo *Thermus aquaticus* que se utiliza en la replicación del ADN

QIAgen Equipo utilizado para purificación rápida del ADN

Fago T4 Bacteriófago de enterobacterias que se utiliza en la replicación del ADN

E.coli Nombre de la enterobacteria *Escherichia coli*

LB + ampicilina + IPTG + X-Gal Medio selectivo para seleccionar bacterias con plásmido

ECO RI Enzima de restricción o endonucleasa

PB Pares de Bases

RFLP'S Longitud del Fragmento de Restricción Polimorfismo

HhaI Enzima que corta cada 4 pb, fue aislada de *Haemophilus haemoliticus*.

Progect-II RPD-II Base de datos del Programa Ribosomal

NCBI Centro Nacional de Biotecnología de la Información

Fast Prep®. Equipo para lisis de células y tejido celular

µl Microlitros

BSA Albumina de Suero de Bobino

EDTA Etilen Diamin Tetraacético

PSB Buffer de Fosfato Salino

rpm revoluciones por minuto

TOC Carbón Orgánico Total

OCP Potencial a Circuito Abierto

km kilómetro

CER Celda de Electroquímica de Referencia

CEE Celda de Electroquímica de Evaluación

DO Densidad Óptica

API XL-52 Especificación del acero utilizado en el transporte de hidrocarburos

Eh Potencial de oxidación reducción

UV Rayos ultravioleta de longitud de onda específica utilizada para esterilización de superficies

Rp Resistencia a la Polarización

EIS Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

MEBA Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental

Dp Densidad poblacional

mpa Milésima de pulgada por año

V_{corr} Velocidad de corrosión

K Constante cuyo valor determina las unidades de velocidad de corrosión

A Área de exposición a evaluar (cm^2)

δ Densidad del metal a evaluar expresado en g/cm^3

T Tiempo de exposición del metal en el medio (Hs)

B Coeficiente de Stern Geary

R_p Resistencia a la polarización

E_q Peso equivalente

Z_r Impedancia real (Z')

Z_i Impedancia imaginaria (Z'')

EFC Elemento de Fase Constante

R_s Resistencia a la solución

R_{tc} Resistencia a la transferencia de carga

C_{dl} Capacitancia de la doble capa

C_{dl-t} Elemento de fase constante asociado a la capacitancia

C_{dl-p} Elemento de fase constante asociado al grado de desfaseamiento de las curvas del diagrama de Nyquist

R_{pc} resistencia de los productos de corrosión

W Elemento de Warburg del circuito equivalente en procesos controlados por difusión

W_{1-T} y W_{1-P} Parámetros asociados con la capacitancia de la doble capa en el circuito con elemento de Warburg

W_i Peso inicial

W_f peso final

ΔW diferencia en peso

En la presente sección se muestra una secuencia del estudio, comenzando por una introducción a la problemática, hipótesis y objetivos en lo cual se fundamenta este proyecto de investigación. La sección 2, presenta los antecedentes sobre el tema y se identifican las principales áreas temáticas a considerar. En la sección 3 describe los métodos experimentales y materiales requeridos para este trabajo. En la sección 4 se presenta los resultados y se realiza un análisis y discusión de estos. En la sección 5 se lista las conclusiones generales. Las recomendaciones y trabajos futuros son abordados en la sección 6. Las referencias que dan soporte al trabajo de investigación son presentadas en la sección 7.

1. Introducción

El deterioro del recubrimiento anticorrosivo en estructuras enterradas o sumergidas trae como consecuencia que se incremente el potencial a fin de satisfacer la demanda de corriente de protección. Sin embargo, el incremento desmedido y sostenido en potencial, puede traer consecuencias graves en el sistema de protección mediante corriente impresa, debido al desprendimiento catódico del recubrimiento anticorrosivo por alcalinización local y acumulación de hidrógeno reducido. La concentración de hidrógeno puede dar lugar a la migrar hacia el interior de la red cristalina del metal y ocasionar problemas físicos en la estructura de los materiales con pérdidas en la ductilidad. Por otra parte, la acumulación del hidrógeno reducido o la forma molecular del hidrógeno, se atrae del entorno de la tubería a las bacterias sulfato reductoras por efecto denominado quimiotactismo. La presencia de estos microorganismos en estos sitios complica la situación, ya que modifican el ambiente de la interfase por cambios en pH , incremento en la movilidad de gases e intercambio de iones del electrolito del suelo, de esta forma y de manera local se logra perturbar a la protección catódica y además, se inducen la corrosión debido a la producción de ácido sulfhídrico sobre la superficie del metal.

1.1 Hipótesis de trabajo

Para el presente estudio, se han elaborado una serie de presunciones que en conjunto ayudan a entender la mecánica de interacción entre los procesos de *PC*, *BSRs* y efectos sobre el metal.

- La corriente que proporciona el potencial de $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, es insuficiente para controlar la corrosión localizada inducida por las *BSRs*.
- El efecto de alcalinización en la superficie del metal debido a la actividad de la *PC*, no es factor determinante para inhibir la actividad de las *BSRs*.
- En los procesos de *PC*, la actividad de las *BSRs* incrementa la demanda de i_p .
- La utilización de hidrógeno molecular por la actividad microbiana, intensifica la despolarización catódica.
- Los procesos de corrosión localizada tipo picadura, están inducidos por la actividad del sulfuro de hidrógeno biogénico y la inestabilidad de películas de sulfuros de hierro.

1.2 Objetivo general

- Determinar si el criterio normativo que fija los $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, protege eficientemente a las estructuras metálicas enterradas o sumergidas, en presencia de bacterias sulfato- reductoras.

1.2.1 Objetivos específicos

- Conformar y caracterizar un consorcio de *BSRs* mediante técnicas tradicionales y biología molecular, que permitan desarrollar las pruebas en los potenciales de $-850, -900, -950, -1000$ y $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.
- Evaluar el efecto existente entre la interrelación de población de bacterias sulfato- reductoras y la protección catódica.

- Conocer la cinética microbiana y fisiológica de la población de bacterias-sulfato reductoras, a fin de conocer la influencia de potencial de protección sobre la población.
- Determinar el grado y tipo de corrosión que se produzca mediante técnica gravimétrica y electroquímicas, apoyados en el análisis de superficie.
- Aportar evidencias para apoyar o reconvencer el criterio que actualmente se ha establecido para los SPC en presencia de *BSRs*.

2. Antecedentes

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en donde se han adaptado a su medio ambiente, adquiriendo características propias del sitio. En este entorno, propician condiciones favorables para su desarrollo, generando mecanismos complejos para la adquisición de nutrientes. En estos procesos, los microorganismos hacen asociaciones de simbiosis entre ellos y otros grupos, desarrollando flujos energéticos o cadenas nutricionales, en donde cada población se beneficia[1].

Las comunidades de microorganismos se organizan y conforman grados de especialización, que están influenciados por su entorno y los suministros de fuentes nutricionales contenidas en el suelo para su desarrollo.

El suelo se considera como la capa de espesor variable más superficial de la corteza terrestre, que resulta de la descomposición de las rocas por actividad atmosférica, acción hidrológica y la reconfiguración de los seres vivos. La extensión del suelo está en contacto dinámico con la atmósfera; es diverso en cuanto a texturas, composición química y condiciones físicas del terreno. Asimismo, contiene una diversidad muy rica en organismos y microorganismos (actinomicetos, algas, hongos y bacterias, entre otros).

El estudio de un suelo se hace a través de un corte vertical o bien mediante la perforación de este para la obtención de núcleos; a estos cortes se les conoce como perfil de un suelo. El perfil exhibe diferentes capas conocidas como horizontes, las cuales se deben a la actividad biológica que degrada a la materia orgánica en diferentes niveles, creando matices de color del suelo y llegando hasta la mineralización e incorporación de la materia inorgánica [2, 3].

En el perfil de un suelo, se produce un gradiente de concentración de oxígeno, debido a la gran demanda que realizan los organismos y microorganismos que se encuentran profusamente distribuidos en la franja aeróbica del suelo. De esta manera, en la parte más profunda del perfil el oxígeno se agota y escasea,

generando condiciones de microaerofilia. A las poblaciones de microorganismos que se desarrollan bajo estas condiciones se les denominan facultativas, ya que generan mecanismos alternos de respiración y dependiendo de las circunstancias, se activa uno u otro sistema de respiración.

En la parte profunda e inferior del perfil del suelo, se localiza una franja de espesor variable de anaerobiosis (ausencia de oxígeno); ésta, también se encuentra en lagos, lagunas, ríos, lechos marinos y aguas sulfurosas y/o termales. Aquí, la actividad biológica está conformada exclusivamente por comunidades de microorganismos anaerobios, entre los que se encuentran: bacterias nitrato y nitrito reductores; bacterias reductoras del hierro y del manganeso (archeas), bacterias sulfato reductoras, entre otras.

Las bacterias anaerobias se caracterizan por su metabolismo y tener receptores de electrones (e^-) diferentes a los que se tienen para el oxígeno en la respiración aerobia. En el sistema anaerobio, receptor se obtiene a partir de la reducción del compuesto o elemento que va funcionar como aceptor final electrones, ejemplo son los nitratos (NO_3^-) al reducirse su estado de oxidación cambia a nitritos con cambio de valencia del nitrógeno, en las sales inorgánicas puede usarse al hierro (Fe^{3+}) y manganeso (Mn^{2+}) y en los sulfatos (SO_4^{2-}), se utiliza al azufre, entre otros [1, 4].

El sistema de respiración anaerobia es menos eficiente que el aerobio para la obtención de energía; por tal motivo, el metabolismo y crecimiento de los microorganismos es más lento. Sin embargo les permite desarrollarse bajo condiciones completamente anóxicas.

2.1 Bacterias Sulfato reductoras (BSRs)

El grupo de bacterias sulfato reductoras, dentro del contexto anaerobio, tiene gran relevancia en diferentes mecanismos o procesos que involucran a los compuestos de azufre en la naturaleza, como son los siguientes [5]:

- La reintegración de los sulfatos en el ciclo del azufre,
- La alteración de la geoquímica del agua bajo suelo, debido a la transformación de los sulfatos a sulfuros,
- La sedimentación geológica por la depositación masiva de sulfuros,
- El saneamiento de cuerpos de agua (en tratamiento o digestores anaerobios), bajo condiciones anóxicas
- En procesos de corrosión bajo condiciones libres de oxígeno,

2.2 Características fenotípicas del grupo de bacterias sulfato reductoras

Este grupo de microorganismos, en principio estuvo constituido por 5 especies: *D. desulfuricans*, *D. vulgaris*, *D. Solexigens*, *D. gigas* y *D. africanus*. Sin embargo, hoy en día se ha visto incrementado notablemente por la incorporación de otras bacterias. Las BSRs presentan diversas características, tales como:

- Tienen formas de *vibrios* y/o *bacilos* (en ocasiones llegan a formar cadenas y filamentos),
- Generalmente son *Gram* negativos,
- Su tamaño de varía de 1 a 3 μm de largo y 0.5 μm de ancho,
- Son móviles por flagelo *monotríco* o *lofotrícom*,
- Pueden generar formas de resistencia o esporas,
- Pueden ser *mesofílicas*, *termofílicas* o termorresistentes, *psicrofílicas*,
- Pueden ser *barofílicas* y osmofílicas,
- Desarrollan características alimenticias del tipo: heterotróficas, autotróficas o quimiotróficas,
- Crecen en una amplio rango de *pH* (4 a 10),

Presentan la habilidad de conversión de sulfatos a sulfuro; en esta transición se dan varios eventos de óxido-reducción, tanto en su entorno como a nivel de

membrana celular. A la par se establece un flujo de electrones que se utilizan para generar energía y efectuar su respiración. El aceptor final de electrones en este proceso es el sulfuro, que reacciona con los protones de hidrógeno (H^+) circundantes para formar el sulfuro de hidrógeno (H_2S), producto que es expulsado al exterior de la célula[6].

2.3 Filogenia de las Bacterias Sulfato reductoras (BSRs).

Hoy en día, el grupo de bacterias sulfato reductoras ha sido tratado como un grupo fenotípico, junto con otras bacterias reductoras del azufre. Para propósitos de identificación, éstas se encuentran en algunas líneas filogenéticas, debido a algunas diferencias encontradas y se han incluido tres líneas en el grupo de *proteobacterias*:

- *Desulfobacterales*
- *Desulfovibrionales*
- *Syntrobacterales*

A este grupo se les agregaron las bacterias termófilas, que tienen la habilidad de reducir a los sulfatos para disponer al sulfuro como aceptor de electrones; estas bacterias tienen su propia filogenia denominada *termofilobacteria* [7].

Al igual que las bacterias sulfato reductoras, hay otros grupos de bacterias que usan al sulfato como agente oxidante y lo reducen hasta sulfuro. A este tipo de metabolismo se le conoce como desasimilación y consiste en reducir a los sulfatos hasta sulfuros (S^{2-}), los cuales funcionan como aceptores de electrones en la cadena respiratoria. En el transcurso de dicho proceso, se genera la energía necesaria para la activación de procesos vitales de los microorganismos.

Por otra parte, se tiene la reducción de sales minerales (NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) y CO_2 para su incorporación al interior de la célula, como elementos estructurales de la misma, tales como: carbohidratos, proteínas y lípidos, entre otros compuestos. A este proceso metabólico se le conoce como asimilación.

2.4 Interrelación del ecosistema de las *BSRs* con los procesos de protección catódica aplicada a la infraestructura de transporte.

Bajo el contexto descrito acerca de las características de los microorganismos y su distribución en el perfil del suelo y zonas lacustres, se presenta una interrelación de las bacterias sulfato-reductoras, con las diversas estructuras metálicas enterradas o sumergidas, utilizadas por las diversas actividades industriales realizadas por el ser humano.

En este ámbito y por seguridad, de manera general todas las líneas de transporte y distribución de fluidos se encuentran a una profundidad de por lo menos 1.20 m. Bajo este ambiente, los sistemas se encuentran expuestos a los efectos de la actividad del entorno (humedad, gases disueltos, salinidad, *pH* y microorganismos, entre otros la aireación diferencial).

Dado que la longitud de las líneas de transporte es variable, durante su trayectoria las tuberías pueden estar en contacto con diferentes tipos de suelos, de diversas características físicas, químicas y microbiológicas. Así, se tiene ambientes que pueden ser amigables o adversos a los sistemas.

Con la finalidad de proteger a los sistemas de transporte de un medio ambiente agresivo y extender en lo mayor posible la vida útil de las estructuras, éstas se encuentran protegidas con diferentes tipos de recubrimientos anticorrosivos. Adicionalmente, se implementan sistemas de protección catódica, ya sea mediante corriente impresa o bien con ánodos galvánicos.

Se han desarrollado recubrimientos anticorrosivos de naturaleza orgánica e inorgánica, que permiten aislar y proteger eficazmente las instalaciones de transporte y cualquier otra estructura metálica que esté inmersa en agua o enterrada, garantizando con esto un menor riesgo de falla, así como un mayor

tiempo de servicio. Los recubrimientos mantienen a las estructuras libres de la agresividad del medio ambiente que les rodea.

No obstante al advenimiento de nuevas tecnologías en recubrimientos aplicados en sistemas de transporte, en varias regiones del mundo se cuenta con grandes inventarios en infraestructura de recolección, transporte y distribución de hidrocarburos que llevan funcionando por varias décadas e inclusive algunas rebasan el límite en tiempo de vida útil.

En gran parte de estos inventarios, el recubrimiento anticorrosivo que fue aplicado, presenta diferentes grados de deterioro y las anomalías más comunes que han sido reportadas consideran la biodegradación, deformación, agrietamiento, pérdida de adherencia y desprendimiento del recubrimiento. Todas estas fallas, llegan a permitir la exposición de áreas del metal al medio que le rodea, provocando con esto una condición más agresiva del medio ambiente y estableciendo la necesidad de un ajuste en los parámetros de control proporcionados por los sistemas de protección catódica utilizados.

La gran infraestructura de recolección, transporte y distribución de hidrocarburos existentes en el país, generalmente se encuentra protegida del entorno con recubrimientos anticorrosivos del tipo esmaltes de brea de alquitrán de hulla, asfaltenos y cintas plásticas. Estos recubrimientos con el tiempo han sido deteriorados por diferentes factores ambientales (intemperización), lo que ocasiona que el metal presente contacto con el medio ambiente que le rodea.

2.4.1 Medio ambiente

Se considera al medio ambiente como aquel que rodea parcial o total a un cuerpo y/o sistema y este puede ser gaseoso (atmósfera), líquido (agua) y sólido (suelo). El ambiente está influenciado por factores físicos, químicos y biológicos; estos pueden interactuar de manera directa o indirecta con el sistema y viceversa, creándose relaciones sencillas o complejas, ejemplo de ello, son las estructuras metálicas enterradas y sumergidas que están sujetas a diversos factores

ambientales que interaccionan y deterioran las propiedades del sistema de protección anticorrosiva y exponen al ambiente la estructura metálica.

Las anomalías por las cuales un recubrimiento anticorrosivo expone al metal a su medio ambiente pueden ser de origen o bien por intemperización del recubrimiento durante su vida útil.

Las fallas de origen son aquellas que se ocasionaron durante la aplicación del recubrimiento a la tubería, siendo las más comunes: preparación inadecuada de la superficie, calidad del recubrimiento y daños durante el transporte e instalación, entre otros.

En la preparación de superficie y aplicación del recubrimiento, un elemento que influye en la falla de un recubrimiento es el polvo y la humedad. El polvo en su forma, tamaño y contenido es muy diverso; generalmente dentro de este se alojan pequeñas cantidades de gases (O_2 , CO_2 , SO_2 entre otros), partículas de arcilla hidratadas, sales inorgánicas, humedad e impurezas. Cuando estos tipos de corpúsculos quedan atrapados entre la película del recubrimiento y el metal, la humedad retenida en las partículas del polvo, desarrolla una serie de cambios tanto físicos como químicos entre las partículas, metal y sustrato orgánico, que ocasionan un incremento en volumen y pérdida de adherencia del recubrimiento de manera local. A este fenómeno se le conoce como ampollamiento y puede llevarse a cabo en dos formas:

Entre las capas del recubrimiento, logrando desarrollar valores de pH entre 6.5 a 8.0, además de hidrólisis parcial en los grupos ésteres y epóxidos de las resinas, lo cual ocasiona reblandecimiento, desprendimiento entre las capas y degradación.

Así mismo, se presenta un ampollamiento entre el recubrimiento y el sustrato metálico, en donde se llega a desarrollar valores de *pH* que llegan a ser de 3 a 4. Esta acidez localizada provoca daños al recubrimiento como a la estructura

metálica, razón por la cual este tipo de ampollamiento es considerado el más riesgoso y común.

El crecimiento del ampollamiento se origina por las reacciones que se llevan a cabo al interior del mismo. Esto causa una presión osmótica tanto del interior como del exterior del recubrimiento, originando una pérdida de adherencia y formando una ámpula o deformación, debido a cambios en la elasticidad y permeación de la malla orgánica del recubrimiento, hasta llegar en ocasiones al rompimiento del sustrato [8, 9].

La presencia de ampollamiento en los recubrimientos adheridos a estructuras metálicas, facilita y promueve el intercambio con el medio ambiente y es en esta etapa cuando se abre una de las posibilidades de migración de microorganismos del medio entorno hacia la interfase metal – recubrimiento.

La degradación del recubrimiento por intemperismo es otra de las fallas que se presenta en la inspección de estructuras enterradas o sumergidas, esta es promovida por factores físicos, químicos y biológicos. La degradación química es dada por sustancias presentes en el medio que interfieren en el deterioro de las propiedades anticorrosivo, mientras que la degradación microbiológica se origina debido a la capacidad enzimática de algunos microorganismos del suelo y agua (hongos y bacterias), para degradar a moléculas complejas presentes en el alquitrán de hulla y los asfaltenos, para obtener moléculas más sencillas que pueden ser metabolizadas por estos microorganismos. Para este caso no se tiene definido cuando un proceso se inicia primero o bien si ambos interactúan en tiempo.

Esta degradación es lenta pero constante, llegando a consumir gran parte del grosor original del recubrimiento. Este deterioro ha sido confirmado a nivel laboratorio como en campo durante la detección e inspección de anomalías externas de algunos tramos de tubería, donde el revestimiento ha perdido gran parte del espesor original, encontrando capas muy delgadas o solamente vestigios

de recubrimiento y afectando la superficie del metal [10], este es otra mecanismo por el cual el medio ambiente circundante se pone en contacto con la tubería.

Otro tipo de recubrimiento encontrado en gran parte de restauraciones son las cintas plásticas asfálticas o de polipropileno; estas presentan mayor resistencia a la biodegradación. Sin embargo los aditivos que proporcionan adhesividad y elasticidad a las cintas, presentan vulnerabilidad al ataque por hongos y algunas bacterias originando pérdida de adherencia, flexibilidad y endurecimiento de las cintas. El deterioro en estas partes de las cintas, da lugar también a la posible accesibilidad del entorno al sustrato metálico.

2.4.2 Efectos suelo-tubería

Dentro de las fallas que presentan los revestimientos de asfaltenos y alquitrán de hulla son las deformaciones y agrietamientos. Las deformaciones se producen por adhesión y peso del suelo (soil stress), sobre las capas del alquitrán de hulla durante el proceso de aplicación. Cuando la aplicación del recubrimiento no se realiza de manera adecuada, entonces se presentan escurrimientos, dejando espesores delgados en la parte superior de las tuberías y más gruesos en las partes bajas.

Otra interactividad es la deformación y agrietamiento del recubrimiento, que se producen por adhesión del suelo al recubrimiento y el deslizamiento horizontal de la tubería[11], a consecuencia de este efecto se provocan irregularidades en el espesor y genera áreas delgadas y agrietamientos, en los cuales se debilita la protección anticorrosiva ante la acción electrolítica del suelo y la actividad microbiana. Los agrietamientos pueden ser los más riesgosos, ya que la anomalía crece en longitud y profundidad, llegando en ocasiones hasta el sustrato metálico, donde el factor ambiental del suelo puede penetrar e interactuar con la estructura.

Aún y cuando un recubrimiento anticorrosivo es aplicado de manera adecuada, generalmente se considera que deja un pequeño porcentaje de área descubierta,

la cual debe ser protegida contra los efectos del medio ambiente, mediante técnicas complementarias, tales como la protección catódica (*PC*).

El principio de operación de la *PC*, establece una serie de parámetros de control, entre los que se encuentran la demanda de corriente y el potencial de la estructura a proteger. Estos parámetros dependen en gran medida de la cantidad de superficie libre expuesta al medio ambiente.

De esta manera, la presencia de fallas en los recubrimientos da lugar a que exista una mayor demanda de corriente de protección, hasta lograr estabilizar los requerimientos mínimos establecidos en el diseño correspondiente. Sin embargo, los ajustes en el sistema no siempre resultan ser tan sencillos, ya que si no se tiene un control adecuado, se incurre en el riesgo de generar reducciones sustantivas de especies químicas del electrolito del suelo, con desprendimiento de hidrógeno o bien generación de iones oxidrilo (OH^-), cuando el oxígeno está presente.

El complemento de protección anticorrosiva se lleva a cabo a través de la *PC*, la cual considera dos modalidades: por corriente impresa y/o mediante ánodos galvánicos de sacrificio (magnesio, aluminio y zinc).

2.5 Protección catódica

La protección catódica es una técnica que basa su principio en la electroquímica y consiste en aplicar una corriente eléctrica a una estructura metálica y polarizar su superficie a fin de que esta funcione como cátodo y colocarla en una zona inmune al fenómeno de corrosión ($-850mV_{Cu/CuSO_4}$).

2.5.1 Modalidades de la protección catódica

a) La *PC* presenta dos modalidades de aplicación, la primera de ella se realiza mediante corriente directa, que consiste en una fuente de corriente, rectificador, estructura metálica a proteger y un ánodo, estos elementos conectados adecuadamente, se aplica la protección catódica mediante corriente impresa.

b) La segunda modalidad es un sistema sencillo que consiste en colocar camas anódicas (serie de ánodos galvánicos) en puntos selectivos y que se conectan eléctricamente a la estructura a proteger (cátodo).

2.5.2 Ánodos de sacrificio

Los ánodos de galvánicos tienen la propiedad de ser más electroactivos que el hierro (-0.441V), tal es el caso de magnesio (-1.866V), aluminio (-1.67 V) y zinc (-0.762V), lo que permite establecer que haya una diferencia de potencial a fin de que el flujo de electrones drenados por los ánodos de sacrificio fluyan hacia la estructura de acero que requiere ser protegida o funcione como un cátodo.

2.5.3 Desprendimiento catódico

Cuando el recubrimiento comienza a fallar, los parámetros de control de la *PC* requieren ser ajustados para mantener en operación al sistema. Sin embargo cuando los procesos de ajuste de potenciales se prolongan, los sitios donde el sustrato metálico está en contacto con la humedad del suelo (electrolito) o lecho acuoso, la reducción de las especies químicas (H^+ , O_2 y H_2O), reaccionan con mayor velocidad, de tal manera que los productos no alcanzan a difundir o reaccionar en su entorno y se acumulan localmente. El hidrógeno molecular formado, puede generar pérdida de adherencia al recubrimiento alrededor del daño; este proceso es común y se le conoce como desprendimiento catódico del recubrimiento. Aquí, si el oxígeno está presente retoma $4e^-$ del flujo corriente de protección catódica, produciendo 4 *hidroxilos* libres ($4OH^-$). Cuando esta reacción ocurre, se inicia una saponificación de los grupos funcionales de la polimerización de la resina del recubrimiento y comienza el ablandamiento o degradación del mismo; además de alcalinizar la superficie del metal y difundir al medio de manera local, lo que trae como consecuencia cambios en el *pH*, pérdida de adherencia y fragilización del recubrimiento [12].

Gran parte de este escenario expuesto, ha sido el común denominador en las diferentes fallas por corrosión en líneas de transporte de hidrocarburo [13], donde

el factor biológico ha estado presente no solo en los diferentes estudios de campo [14], sino también en los efectuados a nivel laboratorio [15], y en la mayor parte de las fallas históricas por corrosión exterior.

En base en estos hechos históricos, la NACE ha generado el criterio de los -950 mV_{Cu/CuSO4} [16], a fin de satisfacer la demanda de corriente de protección en sitios críticos, este criterio en principio, fue propuesto solamente bajo consideraciones termodinámicas, sin tener una sustentación practica y fue hasta los estudios hechos [17] que le brindaron un soporte de validación, este se llevó a nivel laboratorio mediante ensayos con placas metálicas protegidas con potencial de – 950 mV_{Cu/CuSO4} y sumergidas en contenedores con cieno marino procedente del mar del norte con y sin bacterias sulfato reductoras, bajo condiciones libres de oxígeno.

2.5.4 Criterio de los 950 mV_{Cu/CuSO4}

Hoy en día, NACE International sugiere aplicar este criterio a través del Standard Recommended Practice RP0169-02, indistintamente a la eventualidad que se esté ocasionando la demanda de corriente de protección en el sistema de transporte de hidrocarburo, (temperaturas elevadas, desprendimiento catódica del recubrimiento, aislante térmicos, encamisados, contaminación inusual del electrolito, ataque por bacterias). Este criterio también lo establecen la normatividad ISO 15589-1 y la DNV-RP-B401 [18]. La aplicación de esta medida se debe a que el incremento en -100 a los -850 mV estipulados para protección catódica sea satisfactoria y suficiente para cubrir la demanda de corriente de protección causada por cualquiera de las eventualidades mencionadas, ya que aleja al acero del potencial natural y lo coloca en una zona más segura e inmune al proceso de corrosión, de acuerdo a diagramas potencial – pH [19].

En relación a lo anterior, se ha dicho que es difícil establecer un criterio de potencial de protección para un sistema o una estructura determinada bajo condiciones específicas, debido a que no se puede medir con exactitud el

potencial de dicha estructura y por lo tanto no puede determinarse con precisión la demanda de corriente necesaria para su protección. En esta parte, se han establecido diferentes críticas y se han realizado varios estudios para verificar si el citado potencial es suficiente para brindar protección.

Para el caso específico del “ataque” por microorganismos descrito en citado estándar (RP0169-02), se han llevado a cabo varios estudios tanto de campo como de laboratorio estableciendo que el incremento en potencial de -100 mV, es insuficiente para controlar o mitigar el problema de corrosión microbiológica y determinan que el incremento debería de ser de -200 o -300 mV al potencial de -850 mV_{Cu/CuSO4} [14, 20-25].

A este respecto se conoce que el criterio de los -950 mV_{Cu/CuSO4}, solamente controla los problemas de corrosión uniforme o generalizada, sin embargo otros procesos superficiales de la corrosión no son regulados en su totalidad. Pero por otra parte, el incremento de 200 o 300 mV, como lo indican los diferentes estudios realizados, podría ocasionar problemas en la adherencia del recubrimiento por la acumulación de hidrógeno reducido, este hidrógeno puede ser utilizado como fuente de energía para las *BSRs* o bien puede migrar hacia la estructura de la red cristalina y ocasionar fragilización por hidrógeno en el metal.

De acuerdo a lo anterior, hoy en día no se tienen aún estudios contundentes que garanticen o desapruében la interrelación de las *BSRs*, la corriente de protección de los diferentes potenciales sobre la población de estos microorganismos y por otra parte, pese a la aplicación de programas de protección catódica, inexplicablemente sigue habiendo fallas por corrosión exterior en sistemas de transporte de hidrocarburos, donde en algunos casos aún se continua encontrando la huella de la corrosión microbiológica.

Dado toda esta secuencia de escenarios y referencias, se propone realizar el presente estudio a fin de ayudar a conocer y entender la interrelación entre las bacterias sulfato-reductoras, la protección catódica y el efecto posible en el deterioro del metal.

3. Elementos teóricos y experimentales de sustentación

En la naturaleza son contados los metales que se encuentran en estado elemental, la mayoría de ellos se encuentran en forma de minerales (metálicos, no metálicos), esta forma se considerada como la más estable en la mayoría de los metales y para regresarlos a su estado elemental, se requiere de varios procesos metalúrgicos y un gran gasto de energía, uno de estos elementos es el hierro (Fe°).

El hierro es la base principal de los aceros, estos se consideran aleaciones de hierro carbono, con un contenido de carbono menor al 2%, además contienen diferentes elementos de aleación a distintos porcentuales de agregación, los cuales le confieren propiedades mecánicas específicas para su distinta utilización en la industria. Los productos férreos con más de 2% de carbono se denominan Fundiciones de hierro.

Los aceros por su composición pueden catalogarse en 5 grupos principales: aceros al carbono (baja, media y alta aleación), aceros aleados, aceros ultra resistentes, aceros inoxidable y aceros de herramientas; además los aceros por su proceso se conocen como: Bessemer, Thomas, horno eléctrico y al crisol. Así mismo los aceros por uso se clasifican en: aceros estructurales, acero para herramientas, aceros para resortes y aceros especiales con alto contenido de cromo [26].

Los aceros estructurales al bajo carbono, constituyen la base para el acero *API 5L grado X52*. Esta especificación de metal presenta características importantes tanto en composición química, física y mecánica, dentro de las que destacan: elevada ductilidad, buena soldabilidad, elevados valores de tenacidad y resiliencia (magnitud que cuantifica la cantidad de energía por unidad de volumen que almacena un material al deformarse elásticamente debido a una tensión aplicada) a bajas temperaturas, bajo en impurezas y buena aptitud al plegado. Debido a estas características este acero se utiliza en la elaboración de diferentes

infraestructuras tales como: vasijas de separación, filtros, tanques de almacenamiento, sistemas de transporte de hidrocarburos, entre otros.

Uno de los parámetros que se ha considerado en la selección de materiales (acero), es que éste ofrezca resistencia a la corrosión, entre otros factores que son necesarios dentro del criterio de selección, tales como: diseño, aplicación, funcionalidad, propiedades químicas y mecánicas, especificaciones de calidad, disponibilidad costos y beneficios.

Dada la trascendencia de la corrosión en la selección de materiales metálicos, es conveniente conocer su naturaleza y desarrollo de ésta en los aceros.

3.1 Corrosión

La corrosión se define como el deterioro de un metal a consecuencia de una interacción electroquímica con su entorno. De manera más usual, puede entenderse como la tendencia general que tienen los materiales a buscar su forma más estable o de menor energía interna. Siempre que la corrosión esté originada por una reacción electroquímica (oxidación), la velocidad a la que tiene lugar dependerá de alguna forma de la medida de la temperatura, *pH*, humedad, gases disueltos, salinidad del ambiente en contacto con el metal y de las propiedades del metal en cuestión, dicha reacción siempre se acompaña por una reacción de reducción que retoma los electrones liberados por oxidación del metal.

La corrosión es conocida como un proceso espontáneo que muestra la existencia de dos zonas una anódica y otra catódica, además de un electrolito. Estos tres elementos son imprescindibles para que el fenómeno de corrosión pueda existir, así mismo se requiere de un conductor eléctrico entre estas dos zonas, que muy a menudo suele ser la misma estructura, la vía de transferencia de los electrones.

El término de ánodo, hace referencia al sitio donde un átomo hierro abandona la red cristalina del metal y pasa al medio acuoso como ion (Ecuación 1), en esta transición el hierro pierde dos electrones, estos viajan hacia la superficie del metal

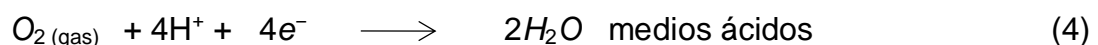
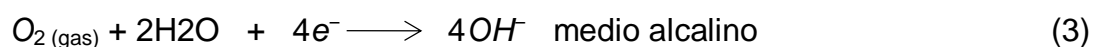
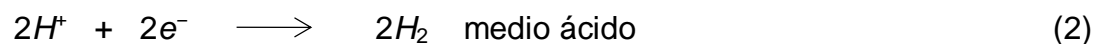
hacia zonas adyacentes denominada cátodo (ubicado en la interfase metal solución), en este sitio se encuentran especies químicas en estado de oxidación (H^+) que se reducen al tomar los electrones liberados por el hierro (Ecuación 2). A esta sucesión de eventos elementales se le conoce como proceso de corrosión.

Las reacciones que se llevan a cabo en la zona de corrosión son de óxido-reducción, ocurren de manera simultánea y son complementarias, sin embargo estas pueden describirse en forma separada como reacciones de media celda, una que se efectúa en el ánodo (oxidación) y otra que se lleva a cabo en el cátodo (reducción).

La reacción catódica de media celda, dependerá del metal que se oxide y entre en proceso de corrosión, para este caso, es el hierro del acero de acuerdo a la siguiente reacción:



Mientras que las reacciones de reducción que tienen lugar en la interface metal solución en el área catódica, pueden variar de acuerdo al medio en que se desarrolle:



De manera general, estas son las reacciones básicas del proceso de corrosión y sin olvidar que hay factores que predisponen y favorecen para que este se lleve a cabo, esto pueden ser de la propia metalurgia de los metales (heterogeneidad de la superficie), gases disueltos, variedad y concentración de iones en el electrolito presencia de microorganismos, así como factores físicos.

Dado que los procesos de la corrosión son electroquímicos, estos pueden ser gradualmente suprimidos cuando al metal se le aplica protección catódica mediante una corriente eléctrica externa, donde toda las zonas anódicas se reviertan y toda la superficie expuesta al medio se transforme y actúe como un cátodo, este proceso es conocido como polarización catódica.

En dicho proceso se favorece a la reacción catódica, debido al flujo de electrones (e^-) en la superficie del metal, que son promovidos por la corriente de protección, facilitan las reacciones de reducción del hidrógeno en la interfase metal-solución (Ecuación 2). Mientras que en las zonas anódicas, las reacciones de oxidación del hierro son suprimidas, en este estado solamente algunos átomos de hierro logran oxidarse y pasar a la interfase en estado iónico.

3.2 Fundamento electroquímico de la protección catódica

3.3 Diagramas de Evans

Con base a los diagramas de Evans de potencial-corriente que se muestra en la Figura 1, en el cual se presentan las curvas de las reacciones anódica y catódica de un metal en contacto con un electrolito, en el punto de intercepción de estas, se tiene que en el eje de las abscisas el valor correspondiente a la corriente de corrosión (i_{corr}), mientras que en las ordenadas corresponde al potencial de corrosión (E_{corr}), en este punto se considera que ambos procesos de reacción se encuentran en equilibrio, si polarizamos catódicamente al sistema hasta E_1 , observamos una disminución de i_{corr} , en este potencial, se han suprimido gran parte de las celdas anódica, sin embargo aún quedan algunas celdas activas y por lo tanto aún hay posibilidad de corrosión, cuando el potencial se desplaza catódicamente hasta el punto E_2 , observamos que la densidad de corriente es

prácticamente cero, en este estado, el metal queda completamente protegido y el proceso de corrosión queda controlado.

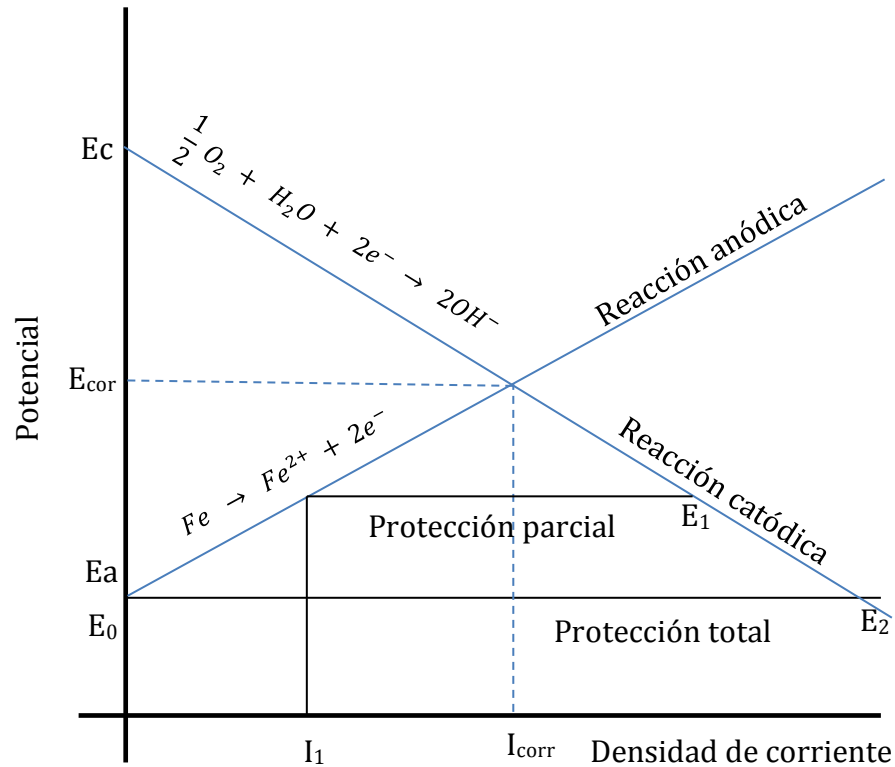


Figura 1. Esquema del potencial mixto, base electroquímica de la protección catódica.

Bajo este potencial de protección se establece que el metal queda en un estado de inmunidad al proceso de corrosión, esta condición la estableció Marcel Pourbaix en sus diagramas Potencial-pH que se muestran en la Figura 2, relativos a los sistemas metal-agua y metal solución acuosa y establece que la concentración de iones metálicos deberá ser menor o igual a 10^{-6} g/l [27].

La postura de estado de inmunidad para un metal a través de los diagramas de potencial $E-pH$, ofrecen soporte al conocimiento para el potencial de protección, considerado a este como un parámetro de singular importancia para el diseño de la protección catódica.

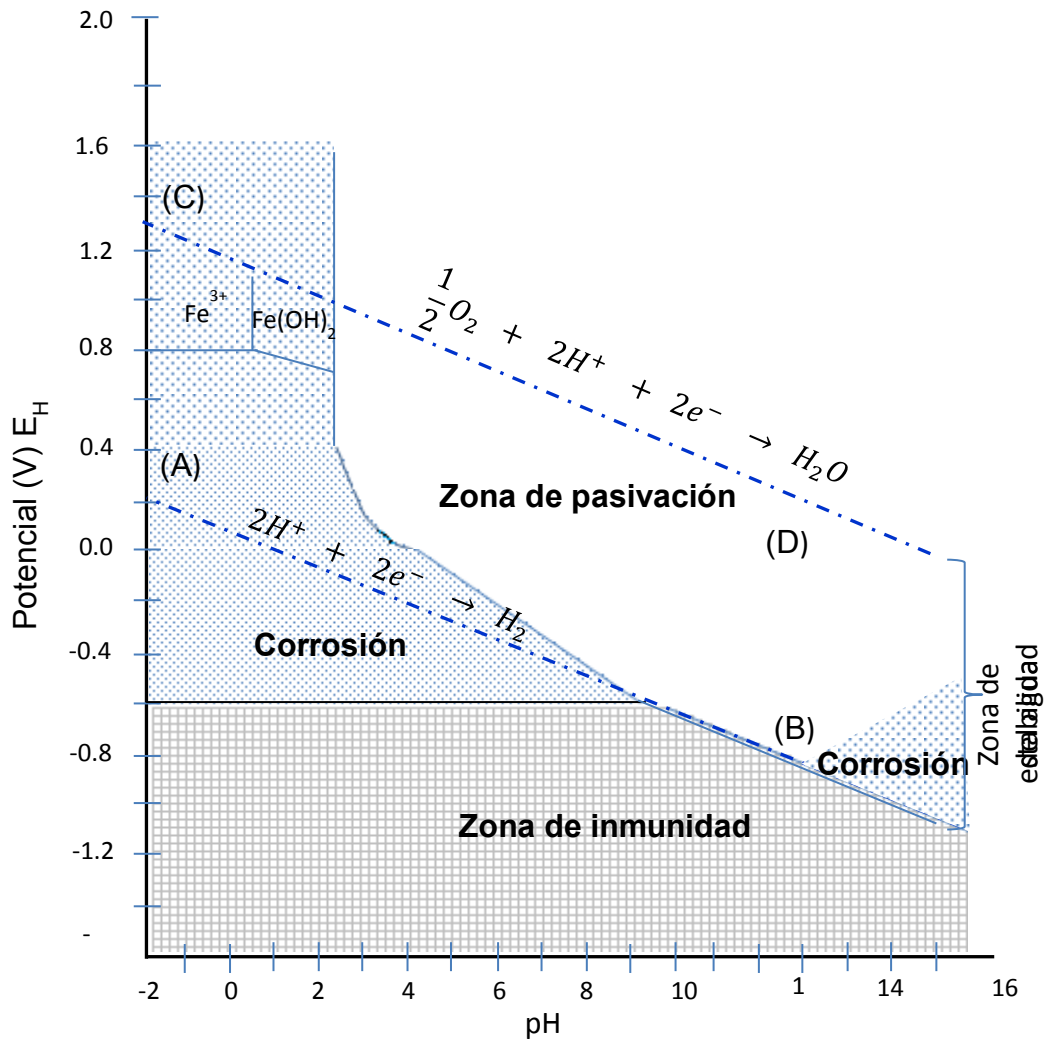


Figura 2. Diagrama de Potencial pH del hierro y zona de estabilidad del agua.

3.4 Diagrama de potencial -pH

En estos diagramas contienen información termodinámica del comportamiento del metal en solución acuosa, para este caso, la relación que guarda el metal a diferentes potenciales, donde se observan tres regiones, una de pasivación en el cual el metal fue corroído pero por la formación películas o capas estables de productos de corrosión, el metal pueden alcanzar el estado pasivo, caso típico es la capa densa e impermeable de óxidos de aluminio sobre la superficie y el óxido de cromo formados sobre la superficie de los aceros inoxidables.

Otra región es la de corrosión, aquí en mayor o menor grado el hierro del acero entra en disolución para corroerse, esta región está delimitada por el potencial y el pH , observando que hay dos zonas, una que se localiza entre los $-0.600 V_{ENH}$ y se extiende por encima de los $1.6 V_{ENH}$ y pH desde -2 , hasta valores localizados por debajo de las 10 unidades de pH , la segunda zona se localiza en potenciales negativos (-0.925 a $-0.800V$) y pH alcalinos (desde 12 hasta 16).

La otra región que denota este diagrama potencial- pH es el de inmunidad donde el metal esta resguardado del proceso de corrosión debido a niveles energéticos en que se encuentra el metal, esta región está en su mayor parte está controlada por el potencial, sin embargo al mismo potencial pero a pH alcalinos el acero alcanza a corroerse tal como se observa en la Figura 2.

Otra información de los diagramas son los equilibrios químicos entre metal solución acuosa efectuados a $25^{\circ}C$ relacionados a potenciales y pH .

En los diagramas se presentan franjas o líneas formadas entra (A) y (B), en el cual se indica que por encima de (B), el oxígeno es liberado y por debajo (A), se libera hidrógeno. Así mismo la amplitud de la franja indica la estabilidad del agua en procesos electroquímicos.

Los diagramas potencial- pH también dan información para predecir la condición en que se encuentra el metal (Corrosión, pasivación o inmunidad). Por otra parte también indican las reacciones oxido-reducción que ocurren, debido a que cada línea de los diagramas corresponde a una reacción química, electroquímica o mixta, además y quizás la más importante es que permiten seleccionar que cambios pueden realizarse al medio o al potencial del electrodo para controlar la condición en que se encuentra.

Estos diagramas potencial- pH , tienen algunos inconvenientes, uno de ellos es que los diagramas de equilibrios están esquematizados y en ocasiones difieren de los prácticos o reales.

Los metales en el estado pasivo pueden o no estar protegidos, ya que dependen de las características de la capa pasiva y que esta sea densa, impermeable y homogénea en el área.

Esto indica en que situaciones puede corroerse un metal, pero no indica a qué velocidad ocurre la transformación.

Como ya se ha mostrado a través de los diagramas de Potencial-*pH* y de Evans, en el que desplazando el potencial de equilibrio del metal hacia potenciales más negativos, se puede disminuir y controlar el proceso de corrosión, pero esta debe superar un determinado nivel de protección, en la práctica es importante conocer este nivel, que en teoría corresponde a la polarización a circuito abierto del metal. Sin embargo no se ha establecido con certeza, la polarización catódica del metal hasta potencial circuito abierto debido a que se desconoce el valor del potencial de la reacción anódica, ya que al medir el potencial en electrolitos complejos como son el suelo y el agua de mar, existen en ellos especies susceptible a reducirse, por lo que el efecto no solo sería del metal, sino también de las especies que se están reduciendo y lo que se estaría midiendo es un potencial mixto y no el potencial del metal.

3.5 Ecuación de Nernst

Para conocer este nivel de protección, se recurre a la ecuación de Nernst que se presenta a continuación [28]:

$$E = E^0 + \frac{0.059}{n} \log[\text{Me}^{n+}] \quad (5)$$

Para la reacción anódica de disolución del acero (hierro)



Sustituyendo el valor de E^0 (0.44V) y el de n (2) en la ecuación de Nernst, se tiene que:

$$E = -0.44 + \frac{0.059}{2} \log[Fe^{2+}] \quad (7)$$

Esta ecuación utiliza la concentración o actividad del ion metálico en el medio agresivo utilizado por Pourbaix en sus equilibrios termodinámicos, donde se establece que un metal es invariable cuando la actividad de sus iones no llega o está por debajo del valor de 10^{-6} iones g/l. Este dato presenta cierta justificación, debido a que el metal se está disolviendo, sus iones entran en solución por difusión y las concentraciones que se alcanzan son tan pequeñas, que el metal solo sufre un ligero desgaste con respecto al tiempo, esto fue ratificado por la ley de Fick o de difusión [29].

Con base en el comentario, se toma la concentración de 10^{-6} iones g/l para sustituirla en la ecuación de Nerst, quedando como sigue:

$$E_{prot.} = -0.44^* + (0.0295) \log[10^{-6}] \quad (8)$$

* Potencial estándar del Hierro (Fe^{2+}/Fe) fue tomado de tablas de potenciales de reducción.

Convirtiendo el logaritmo de la concentración de iones en el electrolito se tiene que:

$$E_{prot.} = -0.44 + (0.0295) (-6) \quad (9)$$

Realizando las operaciones de la ecuación se tiene que:

$$E_{prot.} = -0.617 V_{.ENH} \quad \text{cerrando la cantidad se tienen que } E_{prot.} = -0.62V_{.ENH}$$

Este valor permite ubicarse en el límite inferior de la frontera donde el metal se encuentra en la zona de inmunidad termodinámica. Este valor equivale a $-0.850V_{.Cu/CuSO4}$

Dado a las dificultades que derivan de la aplicación de criterios termodinámicos y cinéticos validados sobre parámetros fundamentales y metales puros, se han desarrollado diversos criterios prácticos que han mostrado su validez satisfactoria en sistemas de protección catódica. Esto en base a una gran cantidad de

desarrollos experimentales en laboratorio y aplicaciones prácticas de velocidades de corrosión en metales expuestos a medios y condiciones diversas y con la aplicación de diferentes grados de polarización catódica, es como a través de estos, se ha logrado estimar potenciales mínimos para una protección adecuada. Así de esta manera, se propusieron los criterios de protección para el hierro y el acero, en ambientes aerobios, los potenciales de $-0.850 \text{ V}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, mientras que para entornos anaerobios, se estableció aplicar los $-0.950 \text{ V}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

3.6 Condiciones favorables para el desarrollo de BSRs

Bajo el contexto anterior, las condiciones ambientales anaerobias se caracterizan por baja concentración de oxígeno o anóxicos, pH que oscilan alrededor del neutro, humedad relativas mayores al 70% [30], potenciales redox alrededor de los -180 mV [31], salinidad moderada. Territorios con estas condiciones se les consideran riesgosos, debido a la alta probabilidad de hospedar a bacterias sulfato- reductoras, microorganismos que se les relaciona con un gran historial de problemas de corrosión bajo dichas condiciones. Motivos por los cuales, instalaciones metálicas enterradas o sumergidas en estos sitios se les protege bajo el criterio de los $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

4. Actividad bacteriológica en procesos de corrosión

Es del conocimiento general que las bacterias sulfato reductoras se les ha relacionado en distintos ámbitos industriales con problemas de corrosión, donde han generado pérdidas económicas considerables. Es por ello, que estos microorganismos han sido objeto de diversos estudios, enfocados a cubrir diferentes tópicos de la corrosión, dentro de estos la corrosión exterior, estos procesos pueden ser vinculados esencialmente con:

- Actividad enzimática
- Actividad metabólica
- Producción de biopelículas

4.1 Actividad enzimática –colonización de superficies.

Los primeros acercamientos de estos microorganismos a superficies metálicas protegidas catódicamente es la colonización, esta constituyen una atracción para las *BSRs* y otros microorganismos, debido a que migran de su entorno bajo la influencia del quimiotactismo hacia estas superficies, ya que estas ofrecen condiciones necesarias para el soporte de vida microbiana, además de una fuente sustentable de hidrógeno.

En el proceso de migración y colonización, las *BSRs* buscan adherirse a las superficies del metal, en primera instancia por la producción de adhesinas y en segundo orden por la segregación de sustancias poliméricas (*EPS*) o exopolímeros que le sirven de anclaje y matriz de alojamiento al microorganismo, a este efecto se le conoce como un estado sésil de las bacterias. Bajo estas condiciones estos microorganismos empiezan a reactivar sus funciones metabólicas en su nuevo entorno.

4.1.1 Actividad enzimática-utilización de hidrógeno molecular

Algunas especies de *BSRs* tienen la facultad de utilizar al hidrógeno exógeno y lo realizan a través de enzimas deshidrogenasas que se localizan en el periplasma de la bacteria, estas enzimas remueven y oxidan a la molécula del hidrógeno ($H_2/2H^+ + 2e^-$) y descargan tanto protones (H^+) como electrones (e^-) a un sistema de coenzimas que se localizan a nivel de membrana citoplásmica [6] [1], Estos receptores pueden ser fijos o móviles y se encuentran en la forma oxidada tal como NAD^+ (Nicotinamida Adenin Dinucleótido oxidado) o $NADP^+$ (Nicotinamida Adenin Dinucleotido fosfato oxidado), estos receptores al momento de transferencia de carga y masa, pasan a un estado de reducción ($NADH$ y $NADPH$), bajo este estado químico, estos transportadores pueden tomar dos vías: en la primera, el transporte esta direccionado hacia el interior de la membrana y difundir a diversos puntos del citoplasma para transferir tanto masa como carga en aquellas reacciones bioquímicas que se les requiera con diversos propósitos

celulares. Las moléculas transportadoras recuperan su estado de oxidación y pueden retornar a nivel de membrana recargarse nuevamente.

Aquí es importante distinguir la función de estos dos transportadores ($NAD^+/NADP^+$), ya que a pesar de que presentan potenciales de reducción muy similares, estos operan en distintas funciones en la célula, así el par $NAD^+/NADH$ funciona en aquellas reacciones redox que generan energía del proceso catabólico, mientras que el par $NADP^+/NADPH$, opera en reacciones redox destinadas fundamentalmente a la biosíntesis o anabolismo de moléculas biológicas [1].

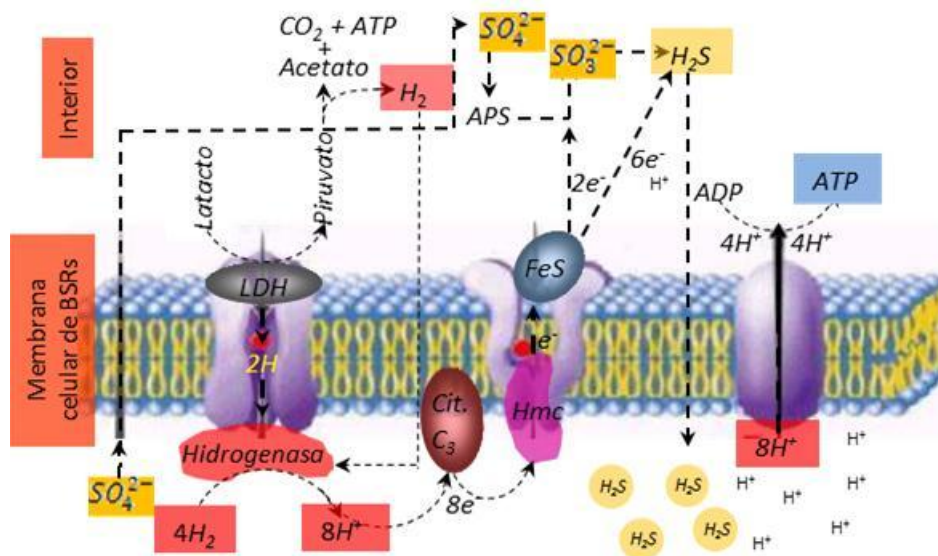
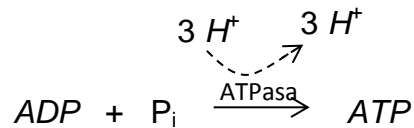


Figura 3. Esquema de transporte de Hidrógeno y sulfatos a través de la membrana celular

Respecto a la segunda vía, la actividad enzimática de la deshidrogenasa es la fuente tanto de transferencia de masa (H^+), como de carga (e^-) a los receptores primarios del Hidrógeno ($NAD^+/NADP^+$), que generalmente se encuentran fijados en la membrana, lugar donde el hidrógeno que es oxidado genera un gradiente en concentración a nivel de membrana, capaz de activar a las enzimas ATP sintetasa

(ATPasa), estas enzimas catalizan la reacción de fosfato inorgánico (P_i) y el adenosin difosfato (ADP), para generar Adenosin Trifosfato (ATP), compuesto energético, utilizado por la célula para almacenamiento y transferencia de energía destinada a procesos de biosíntesis orgánica (Figura 3) [1].



La generación de moléculas de ATP se dice que está influenciada por la diferencia de potencial entre el donador inicial y el aceptor final y de este diferencial será el grado de la energía liberada y transformada en forma de ATP . Para el caso de la respiración aerobia, el $\Delta G = - 237 \text{ kJ}$; mientras que en la respiración anaerobia, el $\Delta G = - 146.64 \text{ kJ}$ caso específico, las bacterias sulfato-reductoras, razón por el cual el metabolismo de estos microorganismos es más lento y la tasa de reproducción es más baja que la aerobia, sin embargo, cuando se usan donadores de e^- que favorecen a las moléculas NAD^+ y $NADP^+$, se dice que se dispone de suficiente energía para generar ATP [1].

En relación al flujo de carga (e^-) de la segunda vía o ruta, es trasladada a un receptor oxidado (NAD^+) y se reduce $NADH$ debido a la transferencia de carga, esta molécula constituye el inicio de una serie de reacciones redox de los compuestos que componen la cadena respiratoria, donde el transporte de (e^-) va de mayor a menor potencial, finalmente esta cadena descarga a un receptor final que es la molécula de azufre, llevándola al máximo estado de reducción que es el ion sulfuro (S^{2-}).

Con base en lo anterior, se evidencia la importancia del sistema enzimático de la deshidrogenación que presentan las $BSRs$, ya que al interior de la célula bacteriana, promueven todos los elementos precisos para que se efectúen las reacciones oxido-reducción, necesarios para la síntesis orgánica de biomoléculas estructurales, para los procesos de respiración y la generación de moléculas de

alto contenido energético. Hacia el exterior de la célula, se promueve la remoción masiva de hidrógeno catódico en superficies metálicas protegidas [32] [33, 34] [34] [35], lo que se ocasiona que haya mayor difusión de protones hacia la interfase para su reducción, se acelere la reacción de reducción del hidrógeno y en consecuencia se incremente la demanda de corriente de protección de manera local (Figura 5).

4.2 Actividad metabólica

4.2.1 Consumo de sulfatos y producción de ácido sulfhídrico

Otro mecanismo que relacionan a las *BSRs* con procesos de corrosión y despolarización catódica [36], es la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S). Este compuesto es producto de la sulfato reducción que efectúan estos microorganismos en la respiración anaerobia, en la cual utilizan a los sulfatos que se encuentran en su máximo estado de oxidación (+6) y los reducen hasta su mínimo estado reducción (-2), mostrando una capacidad de recepción de carga de $8e^-$.

En estos microorganismos la reducción de sulfatos involucra dos rutas que se llevan a cabo de manera paralela y que se llaman procesos de asimilación y desasimilación de los sulfatos [37]. La ruta de asimilación o anabolismo la llevan a cabo estas bacterias y una gran variedad de organismos y la utilizan para incorporar al azufre inorgánico a la síntesis de algunos aminoácidos y proteínas que contienen moléculas de azufre (metionina, cisteína y cistina). Mientras que la desasimilación de los sulfatos es un proceso exclusivo de las bacterias sulfato-reductoras y que es utilizada como aceptor de electrones (e^-) en el proceso respiratorio.

En el proceso de sulfato-reducción, la fuente de hidrógeno ($\frac{1}{2}H_2$) es proporcionado por el sistema enzimático de hidrogenación, ya que este sistema le proporciona H^+ y electrones (e^-) necesarios en el proceso de la sulfato-reducción. El mecanismo de aportación puede ser interno o externo

4.2.1.1 Proceso de sulfato-reducción y ruta de desasimilación

La sulfato-reducción se inicia por la activación de los sulfatos mediante la enzima *ATP* sulfurilasa que cataliza el enlace del SO_4^{2-} con el *ATP* para formar el Adenosin-fosfo-sulfato (*APS*), la parte del sulfato de esta molécula se reduce a sulfito (SO_3^{2-}), esta reducción es catalizada por la enzima *APS* reductasa, liberando al Adenocin Mono Fosfato (*AMP*), la última fase de conversión de sulfito (SO_3^{2-}), a sulfuro de hidrógeno (H_2S), aún no está bien establecido de acuerdo a Neilands [6], pero según el trabajo de Madigan [1], ésta etapa está catalizada por la enzima sulfito reductasa. El ácido sulfhídrico generado gran parte es expulsado al exterior de la célula, mientras que otra pequeña concentración es utilizada por la ruta de la reacción o ruta de asimilación.

4.2.1.2 Rutas de asimilación o metabólicas del azufre.

En la ruta asimilatoria el *APS* reacciona con el *ATP* y se le adiciona un fosfato para formar el *PAPS*, la formación de este compuesto tiene la función de reducir el sulfato a sulfito y descargarlo, el sulfito al igual es reducido por la enzima sulfito reductasa y lo transfiere hasta sulfuro de hidrógeno. Solo que aquí este compuesto (Figura 4), sigue una ruta de biosíntesis de aminoácidos que incorporan al azufre a procesos de biosíntesis de algunos aminoácidos y proteínas

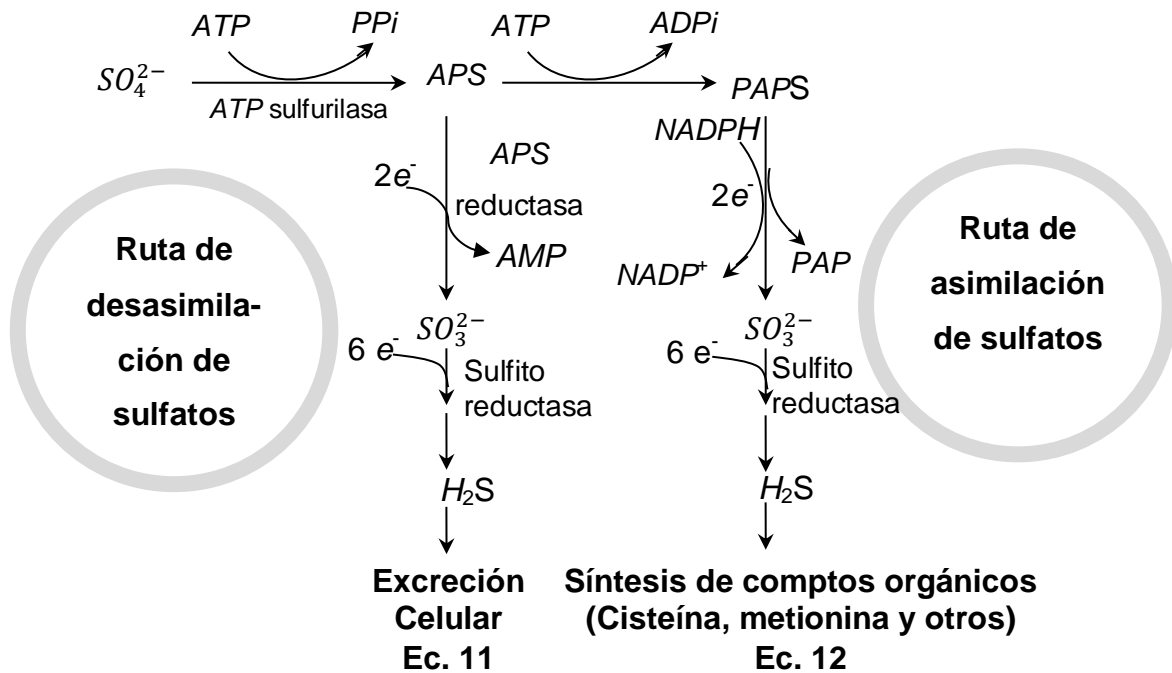
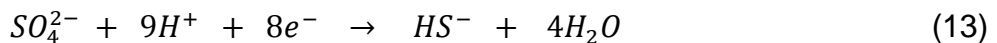


Figura 4. Esquemas de reacciones de asimilación y desasimilación de sulfatos

El proceso de respiración de las *BSRs* mediante la reducción de los sulfatos como aceptor de electrones, se puede representarse de forma global mediante la ecuación 13.

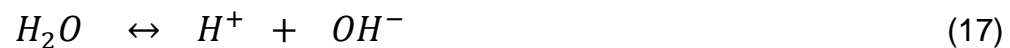
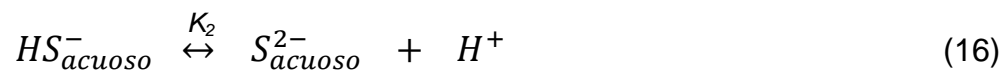


4.2.2 Características físicas y químicas del ácido sulfhídrico biogénico

El ácido sulfhídrico (H_2S) excretado por las *BSRs* (Ec. 12), se lleva a cabo en la fase acuosa de la interfase metal-soma celular de la bacteria, donde la concentración de este gas en el medio, dependerá de la actividad metabólica y densidad poblacional de estos microorganismos sobre la superficie metálica.

El H_2S biogénico se considera bastante soluble, por lo que depende de la concentración de gas en disolución en un determinado tipo y volumen de líquido (agua), este está directamente relacionado a la presión parcial del gas en equilibrio con ese líquido, esto a temperatura constante (ley de Henry) [38].

Con base en dicha ley, la disolución acuosa del H_2S está relacionada a la presión parcial del gas en el medio acuoso, donde pueden presentarse varios estados de disociación que se describen a continuación [39]:



Donde K_1 y K_2 son constantes de disociación del sulfuro de hidrógeno.

$$K_1 = 9.632 \times 10^{-8}, \text{ en tanto } K_2 = 1.33 \times 10^{-13}$$

Las reacciones 14 y 15 representan la transferencia del estado gaseoso al líquido de la molécula de H_2S , llevándose a cabo la disolución y la primera disociación $K_1 = 1.039 \times 10^{-7}$, mientras que en la ecuación 16, se muestra el segundo estado de disociación con una $K_2 = 6.43 \times 10^{-16}$, el cálculo de esta última constante presentó variabilidad en su resultado, por lo que se muestra un promedio.

En tanto la ecuación 17 muestra el estado de disociación de la molécula del agua, donde se lleva a cabo la disolución y la disociación del sulfhídrico.

El grado de disociación y la actividad de las especies disociadas, depende de la concentración del sulfuro de hidrógeno y el pH en el medio acuoso. En la región ácida la molécula del H_2S exhibe baja disociación, mientras que alrededor de la zona neutral, la molécula presenta una disociación que va del 47.10 al 96.6 % y en

la región alcalina, se presenta el mayor grado de disociación de la molécula del H_2S , tal como se muestra en la Tabla 1 [40].

Tabla 1. Relación del pH y estado de ionización de la molécula de H_2S

Estados de ionización	pH								
	4	5	6	7	7.5	8	8.5	9	10
% C_{H_2S}	99.9	98.9	91.8	52.9	26	10.1	3.4	1.1	0.1
% C_{HS^-}	0.1	1.1	8.2	47.1	74	89.9	96.6	98.99	99.9
% $C_{S^{2-}}$	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.1

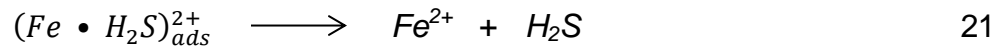
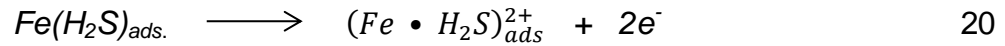
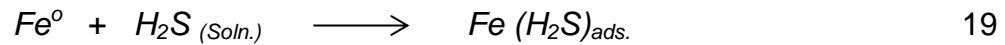
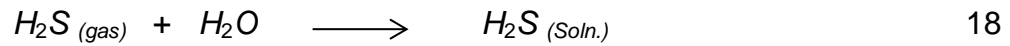
Considerando el estado de disociación del sulfhídrico y el rango de pH de crecimiento de las $BSRs$, el H_2S que se libera a la fase acuosa en la interfase metal-soma de la bacteria-solución, presenta un rango de disociación amplio que pudiera ir de 8.2% hasta 89.9%. Por lo tanto se espera que en dicho rango de pH , el H_2S puede encontrarse en ambos estados, molecular y ionizado.

En relación a los estados de ionización de la molécula de H_2S y la interrelación con los procesos de corrosión, se han desarrollado varios mecanismos que han descrito las diferentes formas de interacción con el metal, por lo que aquí se presentaran los mecanismos más cercanos al ambiente de la actividad de las bacterias sulfato-reductoras.

4.2.2.1 Mecanismos de reacción del ácido sulfhídrico

Uno de los mecanismos está orientado al uso de la molécula de H_2S sin disociarse para que interactúe con las reacciones anódicas de la corrosión del metal. Este mecanismo se lleva a cabo mediante la formación de un intermediario $(Fe[H_2S])_{ads}$,

el cual se forma en el proceso físico de quimiadsorción del sulfhídrico sobre la superficie del metal, de acuerdo al siguiente patrón de ecuaciones:



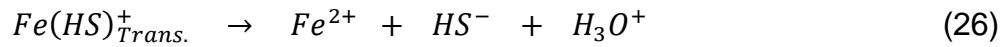
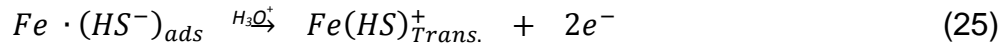
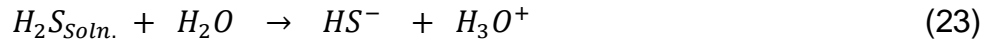
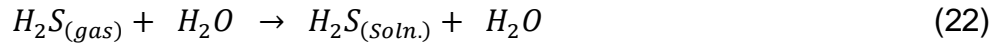
El H_2S excretado por las *BSRs*, en forma de gas, entra en disolución acuosa (Ec.18), éste viaja bajo la influencia de gradiente de concentración o difusión a la superficie del metal, donde la molécula de H_2S se adhiere, conforme a la Ec.18.

La molécula del sulfhídrico sin disociarse, inicia el proceso de quimiadsorción sobre el metal, con la formación de un enlace físico mediante el cual se logra dislocar al hierro de su estructura y pasa a formar parte del complejo hierro-sulfhídrico, en su transición el hierro pierde $2e^-$ y pasa al estado iónico de acuerdo a la Ec.20 y 21.

El complejo formado $(Fe \cdot H_2S)_{ads}^{2+}$ se torna inestable y por lo tanto su transición es momentánea y descarga a la molécula de hierro (Fe^{2+}) en la solución y se recupera la molécula del ácido sulfhídrico, éste puede volver a la superficie del metal e iniciar nuevamente el ciclo (Ec.21).

4.2.2.2 Mecanismos de reacción del ion sulfhídrico

En referencia al estado iónico del sulfhídrico, se presenta el mecanismo propuesto por Iofa [41], este establece que la molécula de H_2S debe de estar ionizada para interactuar con la superficie del metal y promover la reacción anódica del hierro, esta se inicia a través de una inducción física a la superficie del metal, basándose en el siguiente patrón de ecuaciones.



Este mecanismo se inicia por los pasos 22 y 23, donde la molécula de sulfhídrico entra en disolución y dependiendo de las condiciones de pH del medio, la molécula de ácido sulfhídrico puede disociarse, dejando al ion hidrógeno libre y que es adsorbido por la molécula del agua, quedando esta momentáneamente con carga positiva, lo que ocasiona cierta acidificación al medio circundante.

El ion sulfhídrico biogénico difunde del seno de la solución, hacia la superficie del metal, donde el ion sulfhídrico alinea el par de electrones libres hacia la superficie del metal, quedando esta adsorbida. (Ec.24).

En la ec.25, el ion sulfhídrico induce a una interacción física o la formación de un enlace físico que puede ser capaz de dislocar al hierro de su estructura cristalina e iniciar la transición a la fase acuosa.

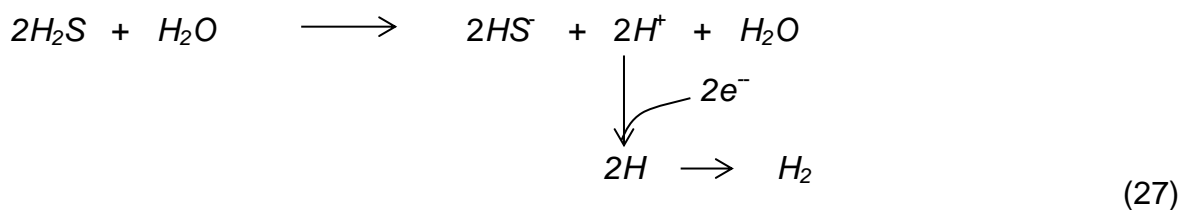
El complejo formado en la ecuaciones 25 y 26, se torna inestable en medio ácido debido al incremento de H^+ , liberando al ion ferroso (Fe^{2+}) en la fase acuosa, recuperándose la molécula de H_2S , el par de electrones liberados de la oxidación del hierro viajan a la superficie del área catódica donde son requeridos por las especies químicas que se están reduciendo.

Este proceso puede tornarse también auto catalítico al volver a reiniciar la secuencia de reacciones dadas, cabe mencionar que estos procesos están regulados esencialmente por la concentración del sulfhídrico en el medio, pH y temperatura [40, 42].

4.2.2.2.1 Alternativa de la reacciones del H_2S , en el área catódica

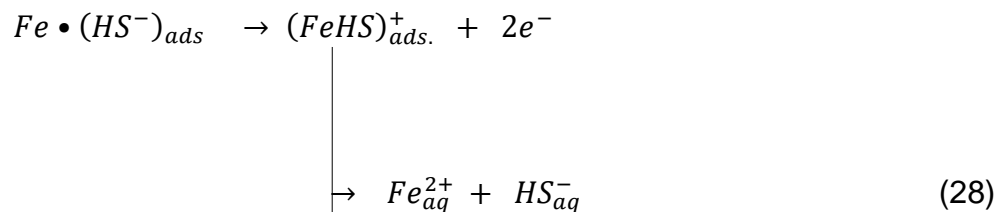
El desarrollo de este mecanismo y por la disociación acuosa de las moléculas de H_2S (Ec.23), se puede contribuir al incremento en la concentración de especies oxidadas en la superficie de la región catódica.

El incremento de especies oxidadas (H^+) en los procesos catódicos, demandan de mayor cantidad de electrones provenientes de la oxidación del hierro del área anódica (Ec.25), o bien de la corriente de protección catódica, así mismo la concentración de protones le confiere a la solución acuosa de la interfase cierta acidez.



La generación de hidrógeno molecular (27) puede tener varias funciones, en la interfase acuosa metal-soma celular, una de ellas, es que lo utilicen las enzimas deshidrogenasas presentes en las *BSRs*, como una fuente de energía para reacciones oxido-reducción en los procesos vitales. La otra es que el hidrógeno atómico puede migrar hacia el interior del metal y ocasionar fragilización por hidrógeno, esto dependerá del desarrollo de condiciones que sean favorables al proceso. Pero si la acumulación de hidrógeno es alta, este puede llegar a acumularse en la forma molecular sobre la superficie del metal y difundir al exterior ocasionando problemas de desprendimiento del recubrimiento del metal formando ampollamiento del mismo.

El ácido sulfhídrico biogénico en los proceso de corrosión del metal se forman diversos productos intermediario que tienen tiempos cortos de formación y que de acuerdo a las condiciones prevalecientes pueden transformarse en otros compuestos más estables tales como los que se muestran en la siguiente ecuación. [43]



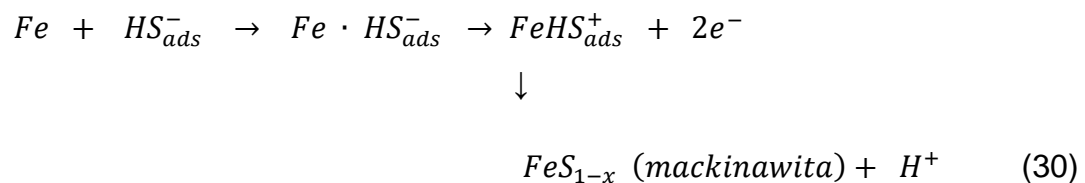
El compuesto intermediario $(Fe(HS)^+)$, puede trascender a través de dos rutas que pueden llevarse a cabo de manera simultánea, la primera es donde se libera el ion ferroso en la fase acuosa y ion sulfhídrico (Ec.28), el sulfhídrico puede reiniciar el proceso y tornar auto catalítico al proceso de corrosión.

La segunda ruta está dada por la Ec.29, en donde el compuesto intermediario $Fe(HS)^+$, en su inestabilidad en la interfase, se reduce y libera a un protón de hidrógeno y el sulfuro de hierro adsorbido en la superficie conduce a la formación de una película de producto de corrosión, este en su fase inicial de transición produce a la mackinawita, este producto, se vincula con la actividad de las BSRs [44] [45] [46].

4.2.3 Mackinawita

La mackinawita presenta una estructura tetragonal deficiente en hierro (FeS_{1-x}), se produce en una fase inicial de transición de acuerdo a la secuencias de reacciones que se presentan en la Ec, 29. La formación de la mackinawita es favorecida por

la acumulación de iones hidrógeno, bajo una concentración continua del ion sulfhídrico (HS_{aq}^-). Además estas condiciones promueven que la película de sulfuro de hierro sea porosa e inestable[47]. La porosidad de la película de mackinawita, permite que el ion sulfhídrico viaje hasta a la superficie del metal, bajo la influencia de un gradiente en concentración, lugar donde el ion sulfhídrico es adsorbido en la superficie e induciéndose la formación de un enlace físico entre este y el átomo de hierro (Ecs.24 y 25), esta inferencia, logra dislocar al hierro de su estructura cristalina y dar lugar a la formación de un compuesto inestable en transición ($FeHS_{ads}^+$). (Ec.24), en la transición metal-solución el hierro se oxida (Ec. 26), los electrones desprendidos viajan a la superficie metálica donde son requeridos por las especies en proceso de reducción ($2H^+ + 2e^- / 2H$, ec.27), mientras que el complejo formado en la interfase para su estabilización descarga al medio protones de hidrógeno, dando lugar a la formación de una nueva película de sulfuro de hierro (*mackinawita*), el crecimiento y la maduración de esta segunda película, genera presión sobre la película vieja de sulfuro, logrando ruptura y resquebrajamiento de esta, dejándose exhibir la nueva película, pero más abajo de la superficie metálica inicial, así que las películas de sulfuros formadas y en proceso de formación son irregulares, porosas e inestables. La acidez prevaleciente en el medio y la concentración de sulfhídrico, facilitan que las reacciones se repita y se torne cíclico el proceso. En dicho caso, cabe la posibilidad de generarse estados activo - pasivo del metal, debido a la formación y destrucción de la película [48-50]. La secuencia cíclica de dichos procesos logra que se favorezca la corrosión localizada del tipo picadura que avanza transversal a la superficie del metal [42] [48-50].



Con base a lo descrito, el efecto de la mackinawita se considera como un mecanismo adyacente de las reacciones de superficie del ácido sulfhídrico con el hierro del acero.

En este contexto, la coexistencia de ambos mecanismos pueden ocurrir en el proceso de corrosión localizada, ya que los factores que controlan la formación de estos productos de corrosión (mackinawita o troilita) se dan en la interfase metal BSRs (biopelículas).

En la Figura 5 se esquematiza la compleja interactividad que se lleva a cabo en la interfase de una superficie metálica protegida catódicamente y la actividad de la sulfato reducción, así como la remoción enzimática del hidrógeno a nivel de membrana.

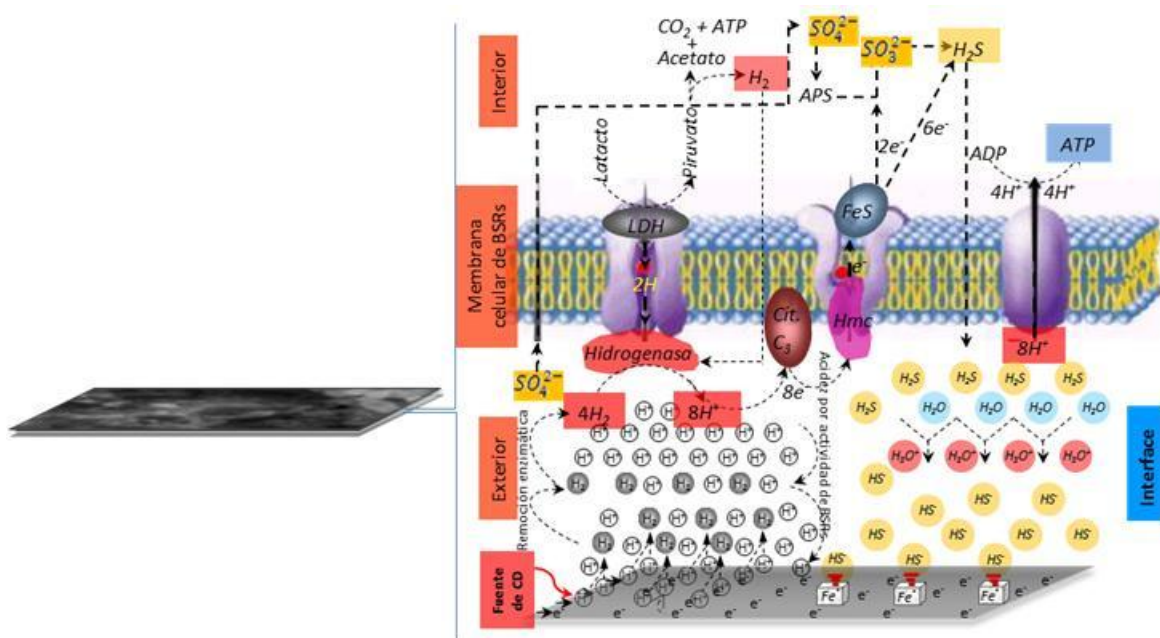


Figura 5 Esquema que muestra la interactividad en la interfase de una superficie metálica protegida catódicamente y la membrana celular con la sulfato reducción y la remoción enzimática del hidrógeno.

4.3 Biopelículas

Las biopelículas son estructuras externas que son codificadas genéticamente y sintetizadas por enzimas, estas estructuras han sido estudiadas en diferentes áreas de la ciencia, además se han asociado con problemas de corrosión. Las biopelículas se consideran como agregados poliméricos de polisacáridos en que se encuentran alojados los microorganismos.

La matriz orgánica está constituida principalmente de polisacáridos, de peso molecular de 10 a 30 KDa (Unidad de Masa Atómica o Dalton), los polisacáridos pueden ser lineales o ramificados, lineales o con cadenas laterales de disacáridos o polisacáridos, a esta serie de compuestos orgánicos se le conocen como Sustancias Poliméricas Extracelulares y por sus siglas en inglés como *EPS*. Los polisacáridos están constituidos por monosacáridos que están formados por la unión de hexosa ($C_6H_{12}O_6$) y pentosa ($C_5H_{10}O_5$). En estos polímeros se encuentran algunos iones de Ca^{++} , Mg^{++} y metales (*Fe*, *Mn*, *Co* y *Ni*), que le imparten estabilidad química y térmica, a estas estructuras orgánicas, además les sirven para el intercambio iónico, entre otras [51].

4.3.1 Composición de las biopelículas

La composición de las biopelículas llegan a ser muy diversas y complejas debidas a las posibles combinaciones de los polisacáridos, así como las variaciones en posición y tamaño de las ramificaciones y algunas inclusiones proteicas, esto aunado a que cada microorganismo presente en la matriz, puede contribuir con polisacáridos con secuencias distintas. Todo esto promueve que el *EPS* pueda tener composición química compleja y heterogénea [52]. A este respecto, también se indica que factores externos (nutrientes, temperatura, *pH*, edad de las películas, entre otros), influyen en la composición y cantidad del *EPS* segregado [53]. Una composición cercana de biopelículas maduras fue establecida [54, 55].

Tabla 2. Composición y rango de concentración del EPS [54, 55]

Componente	% en contenido en EPS
Polisacáridos	40-95
Proteínas	<1-60
Ácidos nucleicos	<1-10
Lípidos	<1-40

Otra composición más específica sobre la composición de las biopelículas aisladas de sistemas acuosos fue dada por Jost, [56].

Tabla 3. Composición y contenidos porcentuales del EPS [56]

Componente	% en contenido en EPS
<i>Fe</i>	29
TOC (Total Organic Carbon)	19
<i>Na</i>	10
Proteínas	10
Sustancias Húmicas	10
Carbohidratos	7
Ácido irónico	4

4.3.2 Función de las biopelículas

Las biopelículas sirven principalmente de matriz de anclaje a superficies sólidas, alojamiento a los microorganismos huéspedes, brindan protección de factores ambientales externos y proporcionan un hábitat para su desarrollo. Hoy en día se conocen otros atributos de estos exopolímeros tales como puentes de comunicación, intercambiadores iónicos o agentes quelantes, fuente de nutrientes

por si mismos o bien por atrapamiento de sedimentos orgánicos e inorgánico, etc [57] [58].

La variabilidad en la naturaleza química del EPS, le imparten ciertas características físicas, dentro de estas, destacan la apariencia, consistencia, adherencia y viscosidad, propiedades que le ayudan a la matriz del polisacárido, ser una estructura dinámica y tener una arquitectura que le permitan la formación de densidades diferenciales, poros y micro canales por el que hay un transporte convectivo de líquidos y otras sustancias que fluyan en el interior de las biopelículas y debido a su viscosidad, se logra atrapar una gran variedad de partículas de naturaleza orgánica e inorgánica que funcionan como complementos nutricionales de los microorganismos albergados en las redes poliméricas del EPS [54] [58].

4.3.3 Biopelículas en los procesos de corrosión

El conocimiento de las biopelículas ha sido fortalecido por los diversos estudios realizados, que van desde caracterización de sus estructuras hasta la funcionalidad de las mismas.

A estas estructuras presentes en las biopelículas de las *BSRs*, se les ha asociado con los procesos de corrosión de una manera directa. Esto debido a la presencia de algunas macromoléculas (proteínas, enzimas algunos nucleótidos), incluidas en las biopelículas [50][54, 59], que tienen la facultad de actuar como agentes oxidantes, formar enlaces físicos e intercambio iónico. Esto aunado a la actividad de los microorganismos (actividad enzimática y procesos de sulfhidración) que conducen a modificar las propiedades de las superficies de los metales, que se ven afectadas en diferente grado, así mismo generan cambios que facilitan los procesos de corrosión [60] [61].

La interacción de las biopelículas indirectas con la superficie del metal, se originan por los gradientes físicos y químicos que se forman dentro de la biopelícula, transporte de gases y líquidos a través de los poros y canales de la biopelículas,

que influyen notablemente en la modificación de las superficies, donde se marcan y activan pequeñas celdas en la interfase de los metales.

Las proteínas y enzimas que están presentes en las biopelículas, se indican que actúan como agentes reductores y que pueden inducir a enlaces físicos y oxidar al átomo de hierro, esto puede ocurrir en las biopelículas bajo condiciones de aerobiosis y en consecuencia ocurre un cambio en el potencial de corrosión donde este se acerca al potencial de picado en acero inoxidable y aleaciones donde ocurra pasivación.

En relación a las *BSRs*, se dice que éstas tienen baja injerencia en el cambio del potencial a circuito abierto (*OCP*), principalmente por la acidez y la anaerobiosis que se desarrolla en la cercanía de la superficie del metal y bajo estas condiciones el potencial a circuito abierto tiende a decaer, debido a este cambio los metales pasivos y aceros inoxidables pueden lograr su pasivación. Sin embargo el biofilm que desarrollan las *BSRs* en la superficie de los materiales metálicos bajo condiciones anaerobias, presentan características que coadyuvan a los proceso de corrosión localizada.

No obstante, estudios recientes sobre aislados del *EPS* en bacterias sulfato reductoras indican que las biopelículas pueden actuar como agentes oxidantes capaces de aceptar electrones, propiedad que llevó a aislar y purificar la biopelícula, una solución de concentración conocida de biopelícula, esta solución fue sometida a pruebas electroquímicas para determinar la posible corrosión localizada, obteniéndose hasta cinco veces mayor la velocidad de corrosión respecto a una solución blanco sin biopelícula de *BSRs* [62].

Otro estudio de biopelículas estuvo orientado a la separación y purificación de biopelículas y fueron sometidos a cromatografías, encontrando una fracción denominada *CCF* (Combinated Corrosiva Fractions of *EPS*). Presentó características que inducen al proceso de corrosivas [60].

Hasta el momento se han descrito de una manera general los diferentes mecanismos que están asociados al crecimiento y desarrollo de las *BSRs* y que

interaccionan con las superficies metálicas ocasionando daños por corrosión de grandes magnitudes económicas en diferentes ramos de la industria.

5. Materiales y métodos

El desarrollo de la parte experimental del presente trabajo fue diseñado para llevarlo a cabo en tres grandes grupos de trabajo:

- Aislamiento, purificación y selección de consorcios de microorganismos en campo.
- Identificación de microorganismos perteneciente al grupo de bacterias sulfato reductoras, mediante técnicas de biología molecular.
- Evaluación de la interrelación de la actividad de las *BSRs* sobre los diferentes potenciales de la protección catódica de estructuras metálicas.

5.1 Aislamiento de microorganismos

Es de conocimiento general que el suelo ofrece la mayor variedad de microorganismos presentes en la naturaleza, en estos nichos ecológicos los microorganismos desempeñan relaciones complejas de mutualismo, simbiosis, sinergismo, dentro de una cadena productiva y continua, donde estos no solo se adaptan al medio ambiente físico, sino que, por la acción concertada en los ecosistemas, adoptan y adaptan al medio geoquímico a sus necesidades biológicas [63].

Conociendo y aprovechando las características que ofrecen los microorganismos nativos y su potencialidad, se optó por trabajar con bacterias sulfato reductoras nativas de campo y no usar cepas de referencia, para ello fue seleccionada una línea de transporte de gas residual, de diámetro de 36" y extensión de 92 Km, esta línea está protegida con recubrimiento anticorrosivo y protección catódica, la mayor parte de su extensión está sumergida a ± 2.50 m de profundidad, en un canal de agua dulce que se alimenta del escurrimiento de los pantanos Centla.

En esta línea en el km 54 + 000, se diagnosticaron anomalías en el exterior de la tubería mediante equipo instrumentado, el daño por corrosión fue asociada a microorganismos (*C/M*), este tramo de línea, fue reparada y puesta en operación en su momento. Debido a este antecedente, este sitio fue elegido como estación de trabajo, para ello fue necesario fijar la ubicación geográfica en el área (Lat.:18°10'41.78" N y long.:92°17'45.59" O) y realizar un reconocimiento y hacer un levantamiento físico y químico del lugar, así como la toma de una serie de muestras del cieno de la parte baja de la periferia de la tubería (posición 6h horario técnico).

Las muestras de cieno acuoso fueron recolectadas en viales de 90 ml, se inyectó nitrógeno a los viales para lograr las condiciones anaeróbicas necesarias, estos fueron sellados con tapa de neopreno y retapa de aluminio, para su traslado a laboratorio.

5.1.1 Conformación de un consorcio de *BSRs*

El Aislamiento y densidad poblacional de microorganismos del grupo de sulfato reductoras se llevó a cabo a partir de las muestras recolectadas en campo y este se llevó a cabo por la técnica de dilución por extinción, usando serie de 6 viales con 9 ml de medio *API**.

- a) En la aplicación y desarrollo de la técnica se usó jeringa de 3 ml estéril, mediante esta se tomó 1 ml del cieno de la muestra y fue inyectado al primer vial de la serie de seis unidades, se agitó perfectamente y con nueva jeringa estéril, se tomó 1ml y se inoculó al segundo vial de la serie, este se agitó vigorosamente y con nueva jeringa, fue extraído 1 ml y fue transferido al tercer vial, este proceso se llevó de igual manera hasta el último vial, donde fue extraído 1ml y se desechó.
- b) Los viales de las diferentes series hechas por la técnica de dilución por extinción, se desinfectó la superficie pinchada y fueron selladas con película de esmalte. Los viales se llevaron a incubación a $\pm 30^{\circ}\text{C}$ por periodo de 72 h.

- c) Después del periodo de incubación de las diferentes series de viales, se estimó las poblaciones de bacterias anaerobias y bacterias sulfato-reductoras. De aquí fueron seleccionados los viales donde el crecimiento y el ennegrecimiento del medio fueron francos, además se realizaron microscopías en fresco y tinciones de gram. Los medios de cultivo donde se observaron bacilos rectos y curvos gram negativos fueron separados.
- d) En los viales seleccionados, nuevamente se realizaron diluciones por extinción, a fin de diluir o eliminar la mayor parte de bacterias anaerobias y fortalecer a la población de las bacterias sulfato reductoras, este proceso fue repetido las veces necesarias, hasta lograr un cultivo franco y vigoroso de *BSRs* en los cultivos.

5.1.1.1 Purificación y selección de *BSRs*

5.1.1.2 Método de estrías cruzadas

Este proceso se llevó a cabo con los cultivos seleccionados del proceso anterior y mediante el método de estría cruzada y tubo rolado [64, 65].

- a) La técnica de estría cruzada, se llevó a cabo en cámara de anaerobiosis y esta consistió en descargar pequeñas cantidades de inóculo de *BSRs* sobre la superficie del agar *API*, con asa estéril, se extendió sobre un cuarto superficie de la placa.
- b) Se esterilizó el asa a la flama y se enfría en el agar, se arrastra el asa tocando los extremos del estriado anterior y se extendió de la orilla hacia el centro de la placa en otro cuarto de área de la placa.
- c) Se esterilizó a la flama nuevamente el asa, se enfrió en el agar y repitió el proceso de estriado en el siguiente cuarto de la placa se tocó el extremo de la anterior se extendió por el área del agar, finalmente se esterilizó, se enfrío y se toca el extremo anterior y se jaló la estría con el asa hacia el centro de la placa. Este ensayo se realizó para cada vial seleccionado.

- d) Las placas con agar *API* resultantes de estos ensayos, se colocaron en la misma cámara de anaerobiosis con atmosfera de nitrógeno 30°C por 72 h.

5.1.1.3 Método de Tubo rolado

- a) Preparación de medio de cultivo *API* base agar en tubos roscado estériles manteniéndolos a $\pm 42^{\circ}\text{C}$ (agar líquido).
- b) De cada uno de los viales seleccionados, se agitaron y se tomó un pequeño inóculo con jeringa de aguja larga estériles y fueron transferido y descargados en tubos roscados con agar líquido.
- c) A todos los tubos inoculados se les reemplazó el aire con nitrógeno estéril, se taparon y fueron sellados perfectamente
- d) Los tubos se colocaron en forma inclinada en el equipo y fueron rodados a velocidad constante para la homogenización del inóculo en el medio hasta la solidificación del agar.
- e) Los tubos se colocaron levemente inclinados con la tapa hacia abajo a 30°C durante 72 h en la incubadora.
- f) Las placas fueron revisadas en la cámara de anaerobiosis y fueron separadas las placas donde se obtuvo un aislamiento de colonias de color negro, este mismo procedimiento se realizó con los tubos rodados.
- g) A las colonias negras se les revisó la morfología colonial (color, tamaño, forma, elevación y consistencia).
- h) Se seleccionaron las colonias negras tanto de cajas como de tubos, que presentaron morfología similar. Estas actividades se desarrollaron en cámara de anaerobiosis.
- i) Las colonias con morfología similar fueron transferidas a un solo vial con medio de cultivo líquido *API* y atmosfera de nitrógeno, los viales resultantes se sacaron de la cámara de anaerobiosis y se llevaron a disgregación en baño ultrasónico por 10 minutos para obtener una buena homogenización de los inóculos en los cultivo.

- j) Los viales fueron transferidos a la cámara de anaerobiosis para llevar la extracción del inóculo y descargarlo en la superficie de placas y llevar a cabo por triplicado la separación colonial mediante el uso de estriado en placas con agar API base, esto con la finalidad de tener menor presencia de bacterias anaerobias en la población del grupo de *BSRs*.
- k) Las placas estriadas con inóculo fueron colocadas en la misma cámara de anaerobiosis con atmósfera de nitrógeno 30°C por 72 h.
- l) Al término del periodo de incubación, en la misma cámara de anaerobiosis, se revisaron las placas y se ratificó la morfología de las colonias de color negro.
- m) Con asa estéril se removieron las distintas colonias negras seleccionadas y se transfirieron a un vial de 45 ml de medio de cultivo *API* bajo condiciones estrictas de anaerobiosis. Este vial fue sometido por 10 min a baño ultrasónico a fin de tener un concentrado de bacterias sulfato reductoras lo más homogéneo posible.
- n) A partir del concentrado de *BSRs*, se transfirieron 0.1 ml a tres viales de 50 ml con medio *API* estéril, estos se llevaron a incubación a 30 °C con agitación para su propagación masiva (*CR*, *CM*, *CT*.)

5.1.1.4 Clasificación y asignación de viales con crecimiento purificado de *BSRs*.

Los viales con crecimiento masivo de *BSRs*, se destinaron en los siguientes conceptos:

- Consorcio de *BSRs* de Referencia (*CR*)
 - Consorcio de Mantenimiento (*CM*)
 - Consorcio de Trabajo (*CT*)
- a) El vial con concentrado de *BSRs* denominado consorcio de referencia (*CR*) se mantuvo en proceso de refrigeración y con programa de 45 días para rehabilitación, mantenimiento y viabilidad de los microorganismos, el desarrollo

de estas actividades fueron muy estrictos a fin de no contaminarla o perder la cepa.

- b) El consorcio de mantenimiento (*CM*), se conservó activo en incubación estacionaria, en el transcurso se reemplazó de medio de cultivo viejo por cultivo fresco durante periodos de 30 días, dicho proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad, libre de cualquier contaminante o pirógeno en el medio de cultivo de reposición.
- c) A través de la cepa *CT*, se suministraron los inóculos utilizados para los ensayos de biología molecular (*CT-A*) y electroquímicos (*CT-B*).

5.2 Caracterización biológica del consorcio

El vial *CT-A* con 50 ml de medio *API* con *BSR*, fue destinado para los diferentes ensayos en la identificación de microorganismos mediante análisis metagenómico, usando el kit Topota-TA®.

5.2.1 Caracterización biológica por Clonación del Gen 16S rDNA

Para esta parte del trabajo, se consideró conveniente aplicar la técnica de **Clonación del Gen 16S rDNA**, para identificar a los microorganismos implicados en el consorcio que se utilizó para determinar la interacción de *BSRs* sobre los diferentes potenciales usados para la protección catódica en líneas de transporte.

La técnica seleccionada ha sido usada para la elaboración de esquemas filogenéticos e identificación de una gran variedad de microorganismos, debido a su universalidad y alta conservación en estructura, ya que las secuencias nucleotídicas del *rDNA 16S*, se han mantenido constantes respecto al tiempo y en cuanto a su función, esta además ofrece confiabilidad debido a las secuencias de los genes que codifican para el *rDNA*, así mismo, esta se encuentran dentro de las más altamente conservadas e identificadas). El manejo de la técnica no es compleja y la confiabilidad en los resultados son aceptables [66].

Identificación de bacterias presentes en el consorcio *CT-A*, por Clonación del Gen *16S (rDNA)*, aplicando el Kit TOPOTA-TA

5.2.2 Extracción del DNA

- a) A partir del vial *CT-A*, se extrajo un volumen del cultivo fresco de *BSRs* y a partir de éste se colocaron 1.5 ml en tubos eppendorff estériles y se llevaron a centrifugación a 10,000 rpm por 3 minutos, este paso se repitió varias veces hasta que se obtuvo un buen botón celular.
- b) Al botón celular, se retiró el sobrenadante y se le agregó una solución *PSB* (Buffer de Fosfatos Salino) y *EDTA*, se pasó a un tubo de rosca resistente pertenecientes al equipo Fast Prep®.
- c) Los tubos con la suspensión celular se llevaron al equipo Fast Prep®, para llevar a cabo la ruptura mecánica de las células.
- d) Los tubos con la suspensión celular rotas se llevaron a centrifugación a 14,000 rpm, el sobrenadante se transfiere nuevo tubo y se le agregó 125 μ l de acetato de potasio 3M para la precipitación de proteínas y se volvió a centrifugar a 14,000 rpm, al término de esta, se obtuvo nuevamente el sobrenadante en un nuevo tubo, a este se le agregó en frío una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico para la precipitación del *DNA*, se homogenizó lentamente y se dejó reposar por 5 min, enseguida se centrifugó a 14,000 rpm, por 5 min, al término se obtuvo el sobrenadante en un nuevo tubo y se le agregó alcohol absoluto y se dejó reposar a -20°C por más de 12hrs. (En este paso se obtuvo el *DNA* genómico del consorcio de BSR a partir del vial *CT-A*.)
- e) Al termino de las 12 Hs de reposo, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, al finalizar se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con alcohol al 70%, nuevamente se decantó y se dejó secar al aire las hebras de *DNA*, finalmente se le agregó 20 μ l de agua desionizada y se aguarda a -20°C el *DNA* genómico del *CT-A*.

5.2.3 Ampliación del Gen

- a) Al DNA aislado y purificado fue sometido a la etapa de amplificación mediante *PCR* (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica fue desarrollada en 1986 por *Kary Mullis* [67], el cual se fijó como propósito obtener un gran número copias de un fragmento de *DNA*, para este caso en particular, fue para amplificar y tener numerosas copias del gen *16S rDNA* del consorcio de *BSRs*. La reacción de la *PCR* se realizó con los siguientes componentes:
- b) Después se colocó al *DNA* con los reactivos que se indican en la tabla anterior en orden y concentración en tubos especiales, estos se llevaron al equipo termociclador (aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa para amplificación del *DNA*. Las condiciones de reacción incluyeron una etapa de desnaturalización (5 *min* a 92°C), programándose los 35 ciclos (1 min a 92°C, 1 min a 53°C, 2.5 *min* a 72°C) y una etapa final de polimerización de 10 min 72°C.
- c) Para verificar que se obtuvo el amplificado se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se puso un marcador de 1 *kb* de referencia y el tamaño de los fragmentos del gen amplificado fueron de aproximadamente *PM* (Peso Molecular) de 1500 pb (par de bases), considerado como la unión por puentes de hidrógeno de nucleótidos en hebras opuestas de una cadena de *DNA* o *RNA* complementarios).
- d) Cuando se obtuvo la medida especificada del amplificado se corrió nuevamente otra electroforesis de geles de agarosa, pero ahora con todo el producto de la reacción de *PCR*, en la cual se obtuvo el total de la porción de *DNA* amplificado durante la reacción.

Tabla 4, Contenido de reactivos para la amplificación

Reactivo	Cantidad (μ l)
Agua	13.3
Buffer para <i>PCR</i>	2.5
$MgCl_2$	1
<i>BSA</i> (Inhib. de la <i>PCR</i>)	1
<i>DNTP'S</i> ¹	2
OLIGO <i>NVZ1</i>	1
OLIGO <i>NVZ2</i>	1
Taq <i>DNA</i> Polimerasa	0.2
<i>DNA</i> molde de (<i>BSRs</i>)	3

¹Mezcla de deoxinucleotidos de trifosfato: *dATP*, *dCTP*, *dGTP* y *dTTP*

NVZ1: (5'-*GCGGATCCGCGGCCGCTGCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG*-3') hacia adelante

NVZ2: (5'-*GGCTCGAGCGGCCGCCCGGGTTACCTTGTTACGACTT*-3') hacia atrás

5.2.4 Purificación del Gen Amplificado

- a) La purificación de los productos de la *PCR*, se realizó a partir de los geles de agarosa del punto anterior y se llevó a cabo con el Kit de QIAgen®, (Este usa tecnología avanzada de membranas de silicato para purificar rápidamente *DNA* celular total sin usar extracciones orgánicas ni precipitación con etanol), entre estos elementos se efectúa el lavado elución y una solución buffer para promover la unión del *DNA* a la columna de giro, este mecanismo fue totalmente automatizado.
- b) Los fragmentos purificados con el sistema QIAgen®, estuvieron listos para su utilización directa en todas las aplicaciones subsecuentes de ligaduras y transformaciones, restricciones, etiquetado, transcripciones, marcadores moleculares. Hecha la primera corrida de purificación estas estuvieron libres de impurezas.
- c) En el proceso de purificación, la porción amplificada del *DNA* pudo haberse perdido y para ello, se confirmó mediante una corrida electroforética en agarosa. En caso de pérdida del *DNA*, se vuelve a la etapa 2 de amplificación.

5.2.5 Ligación

Verificado la presencia de los amplificados del gen *16S rDNA*, se llevó a cabo el proceso de ligación o intercepción del gen *16S rDNA* con el plásmido pCR®2.1-Topo®, utilizando TOPO-TA® Cloning Kit (Invitrogen life technologies Carlsbad, CA), este proceso se dejó en reposo o incubación por 30 min a Temperatura ambiente.

Para la unión de moléculas de *DNA*, se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. La reacción se llevó a cabo añadiendo 3 U de *DNA*-ligasa del fago *T4* (Promega)®, el tampón de ligación, así como las concentraciones adecuadas del *DNA* en volumen de 10-15 aforado con H_2O . La mezcla de reacción se incubó a $15^{\circ}C$ durante 12 Hs. Después, se utilizó esta mezcla para transformar células competentes de *E. coli*.

5.2.6 Transformación

- a) En esta etapa, el proceso consistió en introducir el plásmido (cósmido) con el inserto (gen *16S rDNA_{BSR}*) a células de *E. coli* competente (células capaces de recibir *DNA* extraño), este paso se realiza por electroporación
- b) La electroporación o electropermeabilización es un significativo aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado externamente. Es habitual en biología molecular la forma de introducir diferentes sustancias a las células, como por ejemplo sondas moleculares, un fármaco que puede cambiar las funciones celulares o un fragmento de *DNA* codificante, como puede ser un plásmido.
- c) La electroporación se llevó a cabo en un equipo llamado electroporador. La suspensión de bacterias de 50 μL , se mezcló con los plásmidos que se quieren transformar y se dispusieron en una cubeta de plástico o vidrio con electrodos de aluminio en los costados.
- d) La cubeta se insertó en el electroporador, se seleccionó el voltaje en el equipo (1800 voltios).
- e) Inmediatamente después de la electroporación se añadió 1 ml de medio sock (glicerol al 10%) a las bacterias de la cubeta y fueron incubadas a la temperatura óptima de las bacterias durante 1.5 *Hs* o más, para que después se les agregó medio selectivo *LB* + ampicilina + *IPTG* + *X-Gal*. El inculo de bacterias se extendió en placas y fueron incubadas a 37 °C por 20 *Hs*.

La ampicilina selecciona o permite distinguir a las bacterias a las que se logró introducir el plásmido, de las que no fue posible introducir el plásmido, las colonias competentes son sensibles a la ampicilina y con el plásmido adquirieron la resistencia.

Por otra parte, la *IPTG* + *X-Gal* selecciona o diferencia a las células bacterianas que no tienen el inserto que fueron coloreadas de color azul, mientras que las células que lo tuvieron desarrollan un color blanquecino.

5.2.7 Recuperación de clonas

- a) Las placas con las colonias blanquecinas fueron picadas con palillos estériles para transferirse a tubos que contenían medio de cultivo *LB* líquido + 1 μ l de ampicilina.
- b) Los tubos se incubaron a 37 °C por 24 Hs. Los tubos que presentaron crecimiento fueron resistentes a la penicilina y fueron estos microorganismos donde el inserto del plásmido con la fracción del *DNA* tuvo éxito.
- c) Los medios con crecimiento positivo, fueron separados en dos tubos, estos fueron sometidos a centrifugación, se retiró parte del sobrenadante y uno de ellos fue para conservar en glicerol, mientras que el otro se usó para la obtención del plásmido.

5.2.8 Obtención del plásmido

- a) El tubo con botón celular o biomasa, se lleva al equipo mini PREP®, para la ruptura celular y la extracción del *DNA*, el proceso de extracción fue similar al que se desarrolló en el paso (Extracción de *DNA*).
- b) La purificación del *DNA*, se desarrolló de manera similar al proceso que se efectuó en el paso (secuencia de extracción de *DNA*).
- c) Al *DNA* purificado, se le corrió electroforesis en agarosa, para confirmar la presencia del plásmido en el inserto del *DNA* purificado.

5.2.9 Recuperación del inserto

- a) En el *ADN* purificado, se realizó una digestión enzimática mediante la enzima de restricción *ECO RI* (Una enzima de restricción (o endonucleasas de restricción) es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de *DNA* y es producida por *E.coli*) (en tubos de microcentrífuga, se colocó 10 μ l de *DNA*, 7 μ l de agua, 1 μ l de enzima de restricción *Eco RI* y 2 μ l de la solución tampón 10X para enzimas de restricción *Eco R1* y mezclar y centrifugar).

- b) Los tubos con el centrifugado, se incubaron durante (12 horas) a 37°C.
- c) Se recupera el centrifugado y se corrió una electroforesis en gel de agarosa, en el cual se verificó la presencia del inserto, mediante la observación de 2 bandas cuyos pesos moleculares sumaron 3000pb.

Es conveniente señalar que una enzima de restricción (endonucleasas de restricción) es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de *DNA* y cortar el *DNA* en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción. Los sitios de restricción cuentan con 4 a 12 pares de bases, con las que son reconocidas.

Los fragmentos de *DNA* obtenidos por la digestión enzimática, pueden ser unidos por la actividad de las enzimas llamadas ligasas. Así de esta manera conoceremos el *DNA* vector, que sería aquel que es capaz de replicarse independientemente del *DNA* de la célula anfitriona en la cual crece. Dentro de este grupo de *vectores* están los plásmidos, moléculas circulares de *DNA* halladas en las bacterias.

5.2.10 Análisis rflp's

RFLP'S (Restriction Fragment Length Polymorphism), son enzimas endonucleasas de restricción que se caracterizan por reconocer sitios del *ADN* con 4 pares de bases (pb).

- a) El *DNA* vector recuperado con el inserto de cada uno de los microorganismos presente en el consorcio.
- b) Se realizó una digestión enzimática con el mismo desarrollo efectuado en el paso (recuperación del inserto del inciso a) 8.1, pero con la enzima *HhaI* (aislada de *Haemophilus haemoliticus*) que corta cada 4 pb.
- c) El producto de digestión se dispuso en gel agarosa, para tener un patrón de bandas, esto fue de utilidad ya que sirve para conocer cuáles clonas fueron iguales, es decir si tuvieron el mismo inserto, o cuales fueron diferentes, el

resultado que se obtuvo con el número de bandas y se esperó a que fueran igual al número de microorganismos diferentes que se tuvieron en el consorcio *CT-A

5.2.11 Secuenciación del inserto

La secuenciación es una sucesión exacta de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de un segmento *ADN* o banda, con la capacidad de transportar información.

Las secuencias de los genes *16S rDNA* obtenidas en este trabajo fueron analizadas a través de CHIMERA-CHECK del Programa Ribosomal Database Project-II *RPD-II* (<http://35.8.164.52/chimera.cgi?su=SSU>) [68] [69].

5.2.12 Análisis de la secuenciación

- a) Cada una de las secuencia fueron asignadas a una jerarquía taxonómica a través del programa *BLAST* versión 2.2.3 (Altschul, 1997) y con *RPD-II* Analysis Tools of Ribosomal Database Project-II Release [69]. Posteriormente, las secuencias relacionadas para el gen *16S rDNA*, se colectaron en la base de datos *NCBI* Taxonomy Homepage (TaxBrowser) y se realizó un análisis de alineamiento múltiple utilizando el programa *Clustal X* (20). Así mismo, para calcular los sitios informativos parsimoniosos y el índice de transversión/transición, se utilizó el método a distancias empleando el modelo de Tamura – Nei. (19) y los resultado de los alineamientos para el número de bases sustituidas entre secuencias pareadas, fueron determinadas con el programa *MEGA2 v.2.1* (35) [70].
- b) Los árboles filogenéticos se construyeron por el [71]. La evaluación de los árboles obtenidos se realizó mediante 1000 remuestreos, Bootstrap (13). La similitud se calculó a partir de las secuencias variables entre secuencias pareadas como se muestra a continuación:

$$\text{Similitud} = \left\{ \left[(\text{No. de nuclótidos}_{tot.}) - (\text{No. nucleótidos variables}) \right] (\text{No nucleótidos}_{tot.}) \right\} * 10 \quad (31)$$

- c) La asignación taxonómica para establecer el nivel de especie debe de guardar una similitud mayor del 97.5 %, mientras que la identificación a nivel de género se requiere del 95 % con la mejor secuencia relacionada (31) y la similitud debajo de este valor se posiciona a nivel de familia.
- d) Mediante programas computacionales y de estadística se realizó un análisis filogenético de las secuencias para obtener los árboles y sus nombres de los microorganismos que fueron identificados.
- e) Se realizó una Electroforesis en un gel de gradiente desnaturalizante, para esto, se amplificó la región 3 variable del gen *16S rDNA*, el cual se sometió a una electroforesis en un gel que presentó un gradiente de acrilamida y de formamida, se desnaturalizó a 60°C, se cargaron las muestras y se dejaron durante 14 horas a un voltaje de 200 volts, al término de la corrida, se realizó una tinción de plata al gel. Esta electroforesis permitió separar moléculas de *DNA* con un nucleótido de diferencia, así mismo ayudó a conocer el tipo número de microorganismos que se tuvieron en el consorcio, mediante las diferencias del gen *16S rDNA* y si una banda fue notable en todos los consorcios puede indicarse que se tuvo un organismo que fue común en todos.

5.3 Preparación y montaje de las Celdas Electroquímicas experimentales (CEE y CER).

Las actividades experimentales para las celdas electroquímicas (*CEE* y *CER*), se agruparon y se llevaron a cabo por módulos y se describen a continuación.

5.3.1 Preparación y esterilización de celdas y medios de cultivo.

- a) A partir de *CT-B*, se preparó un cultivo joven de *BSRs*.
- b) En la celda electroquímica se prepararon 800 ml de medio mineral base de cultivo de Bold modificado (ver anexo 1)* de *pH* 7.0 ± 0.5 y adicionando una barra magnética de agitación. Las entradas de la celda (juntas esmeriladas), fueron lubricadas perfectamente con grasa de silicón, selladas y esterilizadas a 120°C por 15 *min*.

- c) Preparación de medio de cultivo *API* modificado en viales (ver anexo 1)*, en pilas 6 de unidades para la curva de crecimiento.
- d) Preparación de medio de cultivo en tubo calibrado, inoculado con una densidad poblacional conocida de *BSRs*, determinando la *DO* (Densidad Óptica), para tener una referencia para que ésta y las demás celdas de evaluación, la población inoculada sea constante.
- e) Esterilización de la cámara de transferencia a 120°C por 15 *min*

5.3.2 Preparación y acondicionamiento de los elementos y sensores de medición de las celdas *CEE* y *CER*.

- a) La superficie del electrodo de trabajo de acero al carbón (*API XL-52*), fue preparada hasta lija 600, a fin de remover óxidos y tener un perfil de anclaje para una adecuada colonización de microorganismos, al término de este proceso, los electrodos de trabajo fueron lavados a fin de eliminar residuos metálicos, se desengrasaron con acetona anhidra para eliminar residuos de grasa y humedad, se flamearon instantáneamente para evitar contaminación biológica. Los electrodos se envolvieron con papel especial y se dispusieron en desecador (hasta alcanzar el peso constante), para determinar su peso.
- b) Se preparó y se esterilizó a 120°C por 15 *min*, una solución saturada de cloruro de potasio (*KCl*).
- c) El electrodo de referencia (ECS) fue desinfectado con alcohol yodado, mientras que el capilar - luggin se esterilizó vía seca a 80°C por 1*h*, la punta de *Vcorr* se dispuso en alcohol etílico por 60 *min.*, se montó el luggin y se rellenó con solución saturada y estéril de *KCl*, todo ello bajo condiciones de esterilidad.
- d) El contraelectrodo de *Pt* y portaelectrodo, fueron esterilizado vía húmeda a 120°C por 15 *min*.
- e) Una vez calibrados los electrodos de *pH* y *Eh*, se desinfectó la superficie mediante una solución de alcohol yodado, estos junto con los electrodos de trabajo y de referencia, fueron colocados dentro de la campana de flujo laminar a rayos *UV* por 30 *min*.

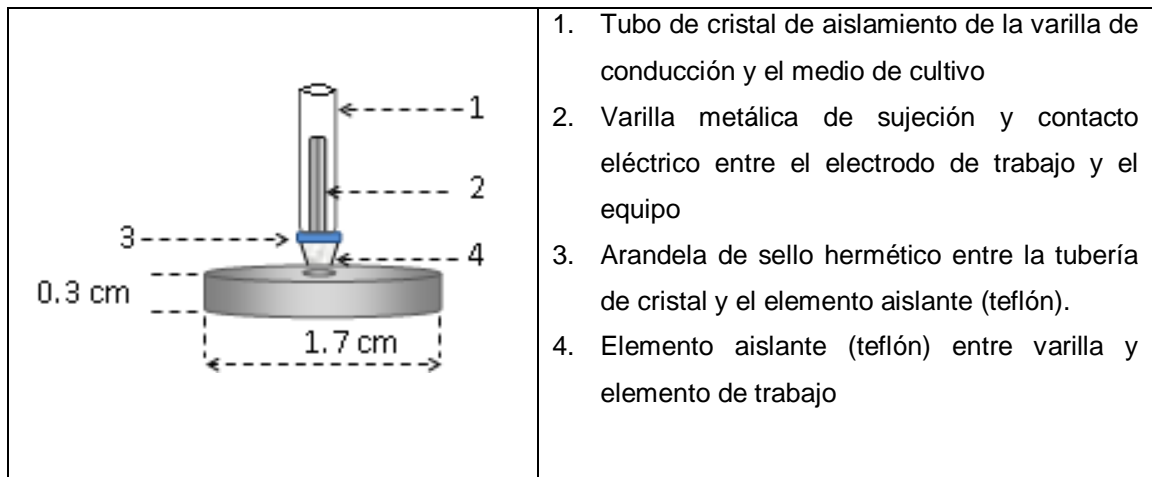


Figura 6. Detalle del montaje del electrodo de trabajo

5.3.3 Actividades mixtas para el montaje de las celdas electroquímica.

En este módulo se realizó actividades de naturaleza física, electroquímica y microbiológica en las celdas.

- a) Las celdas electroquímicas con el medio de cultivo estéril, se colocaron en un área de esterilidad.
- b) La incorporación de cada uno de los elementos a las celdas electroquímicas, se realizó bajo condiciones estrictas de esterilidad y de anaerobiosis.
- c) El electrodo de trabajo se colocó a una altura media de la columna del medio.
- d) El electrodo de referencia acoplado a la extensión de luggin, se incorporó a la celda, colocando que la punta vicorr se mantuviera aproximadamente a 3mm de la cara lateral del electrodo de trabajo.
- e) El electrodo auxiliar de platino fue colocado a la altura del electrodo de trabajo y del lado opuesto al electrodo de referencia.
- f) Los electrodos de pH y de Eh , fueron colocados en el seno del medio de cultivo y adyacente al electrodo de trabajo.
- g) La punta de la cámara de transferencia fue colocada a la altura media de la columna del medio cultivo.

- h) El difusor de nitrógeno fue colocado cerca de la barra de agitación. En la corriente de alimentación de nitrógeno se colocó un filtro de $0.20 \mu m$ de poro, para prever contaminación al medio de cultivo.
- i) Fueron selladas cada una de las uniones de las celdas con los diferentes elementos de medición mediante parafilm, a fin de asegurar la hermeticidad en cada punto.
- j) Las celdas con sus elementos fueron montadas en una parrilla de agitación, se inició la remoción de oxígeno del medio de cultivo con nitrógeno, así mismo se comenzó la medición de Eh . La nitrogenación fue suspendida en las celdas cuando se alcanzó los $-380 mV$ de Eh .
- k) En forma paralela a dichas actividades, en el potencióstato (Solartron 1280B) se programó el protocolo para cada una de los barridos a realizar (R_p , EIS , P_c y I_p).
- l) Se verificó el funcionamiento del potencióstato con la *dummycell*, efectuándose curva de calibración.
- m) Se cambió a protocolo de protección y se fijó el potencial a $-850 mV_{Cu/CuSO_4}$, las celdas CEE y CER, se dejaron en reposo por un término de 12 h, con la finalidad de asegurar la esterilidad del medio cultivo, celdas y los elementos.
- n) La celda electroquímica de evaluación cargada con el medio de cultivo y con todos los elementos de medición (Fig.7), se dejaron en reposo por término de 12, a fin de verificación del estado de esterilidad del medio de cultivo y la celda en general.

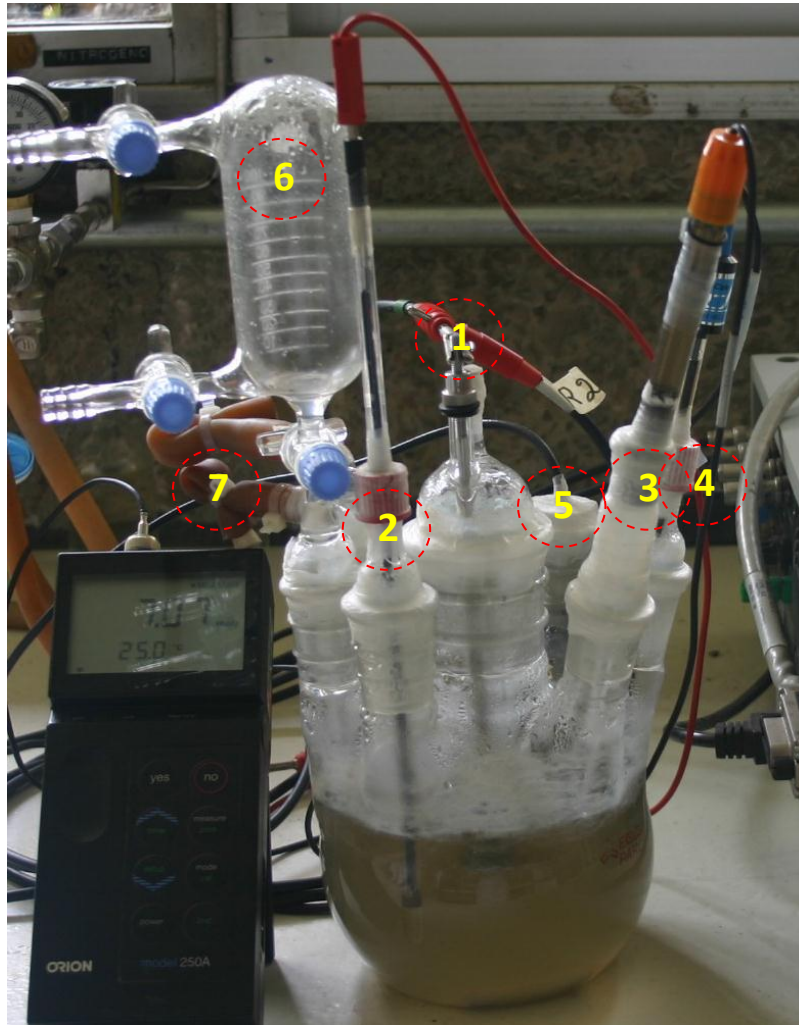


Figura 7. Celda electroquímica de evaluación (CEE) y sus elementos de monitoreo, después de 24h de haber sido inoculada.

Elementos de la celda electroquímica de evaluación y referencia:

1. Electrodo de trabajo
2. Contraelectrodo de platino
3. Electrodo de referencia
4. Electrodo de pH
5. Electrodo de Eh
6. Cámara de transferencia
7. Difusor de nitrógeno (entrada y salida)

5.3.4 Programación de pruebas y determinaciones vía húmeda en la CEE a potencial de $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Si el aseguramiento de esterilidad del medio y la celda electroquímica se llevaron a cabo con éxito, se continuó con el programa de actividades, que a continuación se describen:

- a) Preparación del inóculo de BSRs. En una celda del espectrofotómetro con solución salina estéril, se fue adicionando con jeringa estéril el concentrado de BSRs procedente del vial *CT-B*, hasta alcanzar la densidad óptica seleccionada que contiene aproximadamente (10^6 cels./ml).
- b) El inóculo de microorganismos preparado fue depositado en la cámara de transferencia y llevado al seno del cultivo al interior de la CEE bajo condiciones de esterilidad y anaerobiosis.
- c) Homogeneizado el inóculo de BSRs en la celda de evaluación, se procedió a realizar las primeras mediciones programadas.
- d) Se suspendió la *PC* al electrodo de trabajo y se dejó estabilizarse por lapso de 10 a 15 *min*, a fin de retornar al potencial de corrosión (E_{corr}).
- e) Se cambió de protocolo al potenciotato para llevar a cabo los barridos de *Rp* y *EIS*, este proceso se llevó tres veces al día y cinco días a la semana.
- f) Al término de cada barrido, se cambió en el set up al protocolo de *PC* y i_p , procedimiento que se mantuvo los 30 días de pruebas excepto los 10 o 15 *min* de reposo para alcanzar el potencial de corrosión (E_{corr}).
- g) Las lecturas de *pH* y *Eh* se realizaron cada 24h, a fin de registrar cualquier cambio en el medio que pudieran dañar al crecimiento de las BSRs.
- h) Las determinaciones de SO_4^{2-} , H_2S , Fe^{2+} , Alcalinidad y densidad poblacional (D_p), se programaron llevarlas a cabo cada 72 h. La densidad poblacional se llevó a cabo mediante el método de extinción por dilución.
- i) La reposición de medio de cultivo con incremento en la concentración de sulfatos, fue programado llevarlos a cabo 48 h.
- j) La duración del desarrollo experimental para cada potencial de protección, fue de alrededor 30 *días*. El montaje de la celda de evaluación con sus elementos se muestra en la Figura 7.

5.3.4.1 Tratamiento de los electrodos de trabajo al término de los ensayos.

Al final de cada una de las pruebas tanto de las celdas *CCE* y *CER*, se retiraron los electrodos de trabajo para llevar a cabo las siguientes actividades:

- Análisis de superficie en fresco mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental *MEBA*.
- Descarga biológica de los electrodos de trabajo.
- Lavado físico y químico de los electrodos de trabajo
- Determinación del peso de los electrodos de trabajo después de someterlos a peso constante.
- Análisis de superficie libres de bioensuciamiento mediante *MEBA*.

La limpieza física y química de los electrodos de trabajo de cada una de las pruebas se llevó a cabo en base a lo establecido en el *ASTM - G 1- 03* y la limpieza química se aplicó la designación C.3.1 de la tabla A1.1 (procedimiento para la limpieza química y remoción de productos de corrosión) [72].

5.3.5 Programación de pruebas y determinaciones de vía húmeda en *CER* a diferentes potenciales programados.

Para la serie de pruebas en *CER*, se siguió el mismo protocolo que en *CEE*, en el cual hubo un aseguramiento de esterilidad del medio y celda electroquímica y si este se llevó a cabo con éxito, se continuó con el programa de actividades, que consistió con el desarrollo de las siguientes actividades:

a) Las lecturas de *pH* y *Eh* se realizaron cada 72 h, a fin de registrar cualquier cambio en el medio de cultivo debido a la actividad de la *PC*.

b) Las determinaciones de Fe^{2+} y alcalinidad se programaron llevarlas a cabo cada 72 h a la semana.

c) No se realizaron actividades microbiológicas en este set de pruebas.

5.3.5.1 Tratamiento de los electrodos de trabajo

Al término de cada una de las pruebas de las celdas *CER*, se retiraron los electrodos de trabajo para llevar a cabo las siguientes actividades:

- Análisis de superficie en fresco mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental *MEBA*.
- Descarga biológica de los electrodos de trabajo.
- Lavado físico y químico de los electrodos de trabajo
- Determinación del peso de los electrodos de trabajo después de someterlos a peso constante.
- Análisis de superficie libres de bioensuciamiento mediante *MEBA*.

La limpieza física y química de los electrodos de trabajo de cada una de las pruebas se llevó a cabo en base a lo establecido en el *ASTM - G 1- 03* y la limpieza química se aplicó la designación C.3.1 de la tabla A1.1 (procedimiento para la limpieza química y remoción de productos de corrosión) [72].

6. Resultados y discusión

6.1 Resultados de la caracterización del consorcio de *BSRs*, usando la técnica de Clonación del Gen *16S rDNA*.

En el anexo de este trabajo, se presentan los árboles filogenéticos, en la pp 1779 en la Figura 2, se exhiben los clones p-m13F y t-M13F con un 99% de similitud a *Desulfovibrio desulfuricans* (AF354664), mientras que en la Figura 3 de la pp 1780, se muestran los clones q y s con una semejanza del 100% a *Clostridium perfringens* (M69264).

En la pp 1782, en la Tabla 1, contiene la secuencia bacteriana del *16S rRNA* obtenida de los diferentes consorcios evaluados, entre estos se encuentra la muestra 14 (ES) perteneciente al consorcio de *BSRs* aislado del exterior de la línea de transporte. En esta tabla presentan los clones representativos, el patrón de *RFLP*, la relación filogenética (la especie más cercana en la bases datos del GenBank), % de similitud y grupo microbiano de afiliación [73].

Con base a la información descrita en el párrafo anterior se indica la identificación de las dos especies de microorganismos que fueron *Desulfovibrio desulfuricans* y *Clostridium perfringens* y que se denominan en el presentes trabajo como *BSRs*.

En lo referente a los diferentes ensayos que se llevaron a cabo para determinar la interrelación existente entre las *BSRs* con los diferentes potenciales de protección catódica, se fijó el propósito de ordenar y procesar la información experimental, en su forma y secuencia en que fue encausada, a fin de facilitar el análisis e interpretar la información mediante representaciones en tablas y gráficas.

Los resultados de los parámetros determinados tanto en la *CEE*, como en la *CER*, estuvieron en función a cada uno de los potenciales establecidos, por tal motivo se manejaran dos grupos de resultados (con *BSRs* y sin *BSRs*) para un solo potencial de los programados.

Por otra parte, la información que se generó durante el desarrollo experimental, se consideró que fue demasiada, sin embargo necesaria, debido a que a través de

ella se logró conocer que los procesos biológicos no fue perturbado por la carencia de nutrientes u otro factor que pudo haber incidido, además de esta manera se registraron posibles cambios en el medio de cultivo, generados por la corriente eléctrica de la protección catódica aplicados al electrodo de trabajo y ésta de qué forma impactan en la actividad de las *BSRs*.

Por tal motivo, de la información generada en el transcurso de la experimentación, se consideró conveniente seleccionar y procesar la información que se originó en el inicio de prueba, la generada en los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días.

Por otra parte, a fin de analizar el comportamiento y trascendencia de los parámetros de la celda electroquímica de evaluación y de referencia se mostraran de manera comparativa en tablas y gráficos.

6.2 Potencial de protección de $- 850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

Los resultados de la Celda Electroquímica de Evaluación (*CEE*), como los de la Celda Electroquímica de Referencia (*CER*), se han agrupados en parámetros Físicos, bacteriológicos, químicos, electroquímicos y análisis de superficie.

6.2.1 Parámetros Físicos

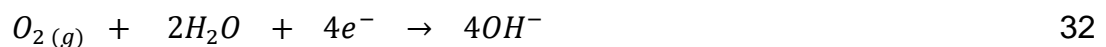
Los parámetros físicos estuvieron conformados por mediciones de *pH* y *Eh* en las dos celdas de evaluación (*CEE* y *CER*), a fin de detectar algún cambio significativo en el medio que afectara el desarrollo y desempeño de las *BSRs* en el sistema de evaluación.

6.2.1.1 Comportamiento de *pH*

Dentro del programa experimental, todas las pruebas desarrolladas se llevaron a cabo a condiciones normales de presión y temperatura, esto debido a que las condiciones que requieren reproducir se llevan a cabo bajo estas condiciones pero con ausencia de oxígeno.

En este sentido, se le dio seguimiento a este parámetro durante la prueba, a fin de registrar cambios significativos en *pH* en el medio de cultivo, debidos a la actividad de las *BSRs* o bien a las posibles reacciones que hayan ocurrido en la superficie del electrodo de trabajo debido a la protección catódica.

Generalmente las reacciones que se atribuyen a la actividad de la *PC*, son tres reacciones de reducción:



Dado que el oxígeno es el iniciador de las reacciones 32 y 33, estas pueden quedar descartadas, de llevarse a cabo en las celdas experimentales (*CEE* y *CER*), debido a que estas estuvieron bajo condiciones libres de oxígeno, por lo que solo la primera reacción de reducción fue la factible de llevarse a cabo o algún otro compuesto capaz de reducirse que estuviera presente en ambas celdas experimentales.

Por lo tanto, las especies químicas que estuvieron disponibles en la solución fueron los iones hidrógeno y que pudieron reducirse bajo la influencia del flujo de electrones de la corriente de protección (i_p), ya que dicha reacción solo requiere del estado iónico del hidrógeno. Esta reacción también pudo regular la ligera acidez desarrollada en el medio.

Respecto a la actividad de las *BSRs*, en algunas rutas metabólicas, generan expulsiones de iones hidrógeno al exterior de la célula, creando cierta acidez entorno a las células y sería una de las fuentes que estaría contribuyendo al abastecimiento de iones hidrógeno a la interfase de la solución (medio) para la reducción del mismo, en este sentido si la concentración de protones es alta en la interfase estos pueden migrar al seno del medio y llegar a contribuir, por otra parte se debe considerar que hay microorganismos en el seno del medio (planctónicos) que también pueden contribuir con la aportación de protones que ayuden de

mantener al pH en el rango registrado durante la experimentación, esto también explicaría la diferencia en pH entre los sistemas con y sin $BSRs$. En el gráfico de la Figura 8, se presenta el comportamiento del pH , registrado en el medio de cultivo de las celdas electroquímicas (CEE y CER) que fue registrado durante el desarrollo de las pruebas.

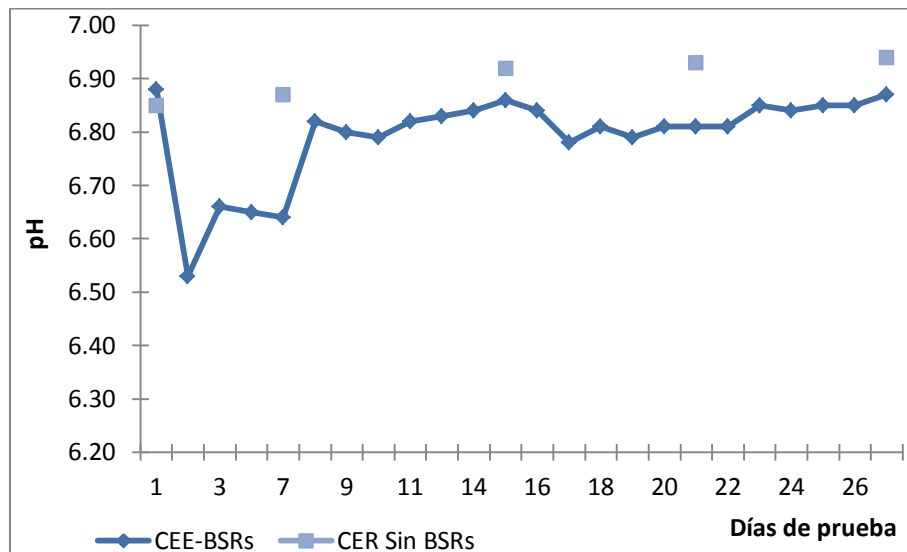


Figura 8. Comportamiento del pH en el tiempo en el medio de cultivo a $-850\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

El comportamiento del pH en el seno del medio de CEE , osciló de 6.53 a 6.87, teniendo pequeñas variaciones al inicio de la prueba y se mantuvo en alrededor de 6.8 durante la prueba, mientras que este parámetro en la CER , se mantuvo alrededor de los 6.89 durante la prueba. El pH en la CER se mantuvo ligeramente por arriba del desarrollado en la CEE .

6.2.1.2 Comportamiento del potencial redox (Eh).

El potencial redox es un valor relativo al punto "0" del electrodo normal de hidrógeno u otro electrodo secundario como el de plata ($Ag/AgCl$), que permite conocer la capacidad de oxidación o reducción de un medio o sistema dado.

En la naturaleza el potencial redox (Eh), regula el comportamiento de reacciones y compuestos químicos en suelo y cuerpos de aguas naturales, en este sentido, sucede algo similar en el entorno de los microorganismos como al interior de los mismos, donde muchas de las reacciones que se llevan a cabo están sujetas a un régimen redox.

Dado la importancia que reviste este parámetro, se consideró importante llevar a cabo un registro del potencial redox (Eh) en las celdas electroquímicas, para determinar si las condiciones ambientales en dichos sistemas presentaron las condiciones mínimas necesarias para el desarrollo de las *BSRs*, esto debido a que en estudios realizados, determinaron que estos microorganismos se desarrollan mejor en ambientes anaerobios con potenciales de óxido-reducción (Eh) que van de -150 a los -350 mV . [74]

El medio de cultivo se ambientó en las celdas experimentales (*CEE* y *CER*) desde el inicio con potenciales a redox de -290 y -299 mV respectivamente.

El comportamiento del Eh en la *CER* al inicio tuvo un comportamiento irregular, sin embargo posteriormente durante la prueba mantuvo una fuerte tendencia a la reducción que se alcanzó potenciales de Eh de hasta -295 mV . Al final de la prueba. Las modificaciones en Eh , posiblemente estuvieron sujetos a algunos cambios fisicoquímicos en el medio de cultivo, debido al potencial aplicado al electrodo de trabajo, ya que como se conoce que la corriente de protección puede modificar las constantes de solubilidad de algunas especies presentes en el medio de cultivo, no obstante el Eh en la celda, se logró recuperar su condición inicial (Figura 9).

En tanto en la *CEE*, se presenta el comportamiento que tuvo este parámetro, en el cual se observa un pico debido a la disminución que se tuvo en Eh (decae el

potencial de - 290 hasta -117 mV), en el séptimo día de prueba, un segundo pico se localizó en el doceavo día bajando solamente a - 223.7 mV (Figura 9), estos decaimientos probablemente estuvieron relacionados con a la reposición del medio de cultivo que pudieron contener residuos de oxígeno, ya que del día 12 en adelante la curva tendió a disminuir de forma paulatina hasta el final de la prueba los - 447.6 mV . A excepción de los primeros días de prueba, se puede establecer que las condiciones fueron propicias para la actividad de las *BSRs*.

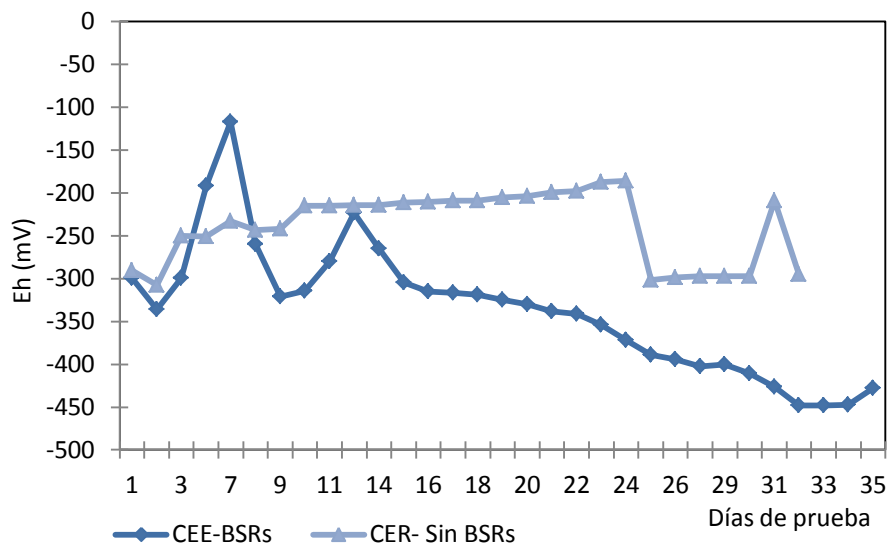


Figura 9. Comportamiento del Eh en el tiempo en el medio de cultivo a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$

Las condiciones ambientales que se lograron en la *CEE*, fortalecieron el crecimiento de las *BSRs* en el sistema, en donde el electrodo de trabajo se mantuvo a - 850 $mV_{Cu/CuSO_4}$ en todo el transcurso de la prueba.

En el gráfico de la Figura 10, se presenta el comportamiento de la densidad poblacional de las *BSRs* acoplado a los registros de potencial redox, en estos se observan dos zonas en la cual hay vinculación de ambos parámetros de evaluación, la primera región se observa en los primeros días de prueba, donde el Eh disminuye y la población baja, aquí el intervalo de tiempo es corto y el efecto

se observa ligeramente desfasado, sin embargo, en la segunda región que comienza el día 12 de prueba, se observa que a medida que el Eh tiende a ser más negativo, la población de $BSRs$ presentó mayor crecimiento celular, este efecto extrínseco es el que se describe en la literatura antes referida .

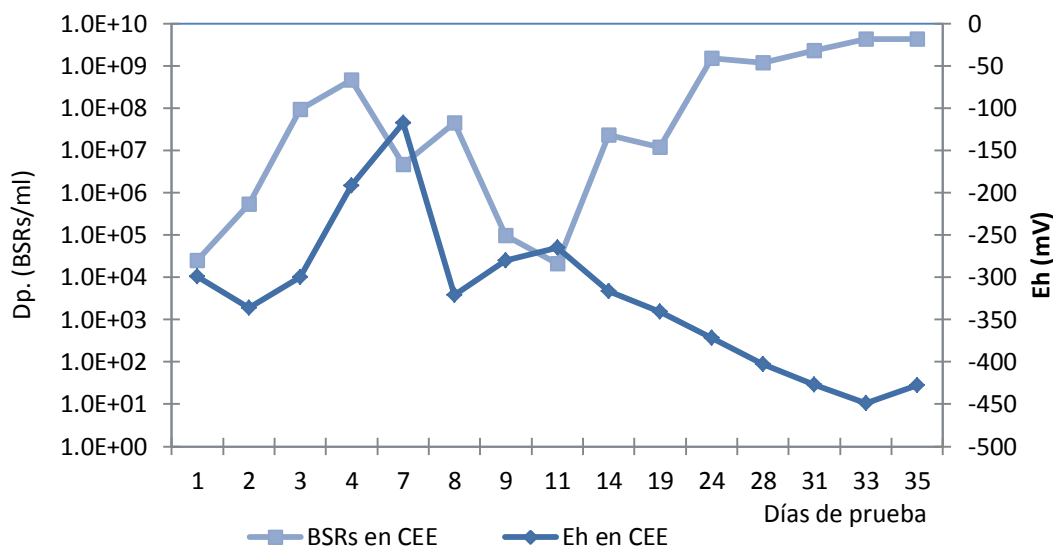


Figura 10. Relación de condiciones de Eh y densidad poblacional de $BSRs$ en el tiempo a $-850\text{ mV} \cdot \text{Cu/CuSO}_4$

6.2.2 Parámetros Bacteriológicos

Dentro de los parámetros que se consideraron en la experimentación de este estudio fueron la densidad poblacional de las $BSRs$, concentración de iones sulfato y concentración de sulfuro de hidrógeno en el medio. El primer parámetro, está asociado con la viabilidad y el número de microorganismos presentes en el sistema, mientras que el segundo y tercer parámetro, se consideran como un indicador de la actividad metabólica, debidos que están relacionados directamente con los procesos respiratorios y metabólicos de estos tipos de microorganismos.

6.2.2.1 Densidad poblacional (D_p)

Para lograr unos de los objetivos de este estudio, fue el mantener por tiempos prolongados la viabilidad y vitalidad de los microorganismos en el sistema, a fin de establecer en parte el posible daño de la corriente eléctrica de los potenciales de protección sobre las *BSRs* y por otra parte, determinar si la actividad metabólica y enzimática de los mismos, afecta a los procesos de la *PC* y para ello fue necesario mantener hasta por 30 días el crecimiento de estos microorganismos. Esto se logró mediante el uso de cultivo continuo que consistió en remplazar un volumen de medio de cultivo viejo, por el mismo volumen de cultivo fresco o nuevo, con una concentración adecuada de sulfatos; además de determinar el comportamiento de la D_p el sistema mediante el método de dilución por extinción, todo esto bajo condiciones estrictas de anaerobiosis.

Los resultados obtenidos del comportamiento de la densidad poblacional de las *BSRs* en la *CEE*, se muestran en la Figura 11, en este gráfico se observa la trascendencia que presentaron las *BSRs* durante el desarrollo de la prueba, al inicio de la prueba, la población manifestó un crecimiento con tendencia exponencial, sin embargo después del día 4 de prueba, ésta presentó una disminución de la densidad, llegando prácticamente a la fase inicial de D_p , este comportamiento posiblemente fue influenciado por varios factores, el primero está relacionado con la disminución en *Eh* en el medio, ya que éste registró una caída en este lapso de tiempo y pudo haber afectar a la población de microorganismos. La segunda, se relaciona con el agotamiento de sulfatos o algún otro elemento nutricional en el medio, que dio lugar a un decaimiento en la tasa de crecimiento de las *BSRs* en el sistema.

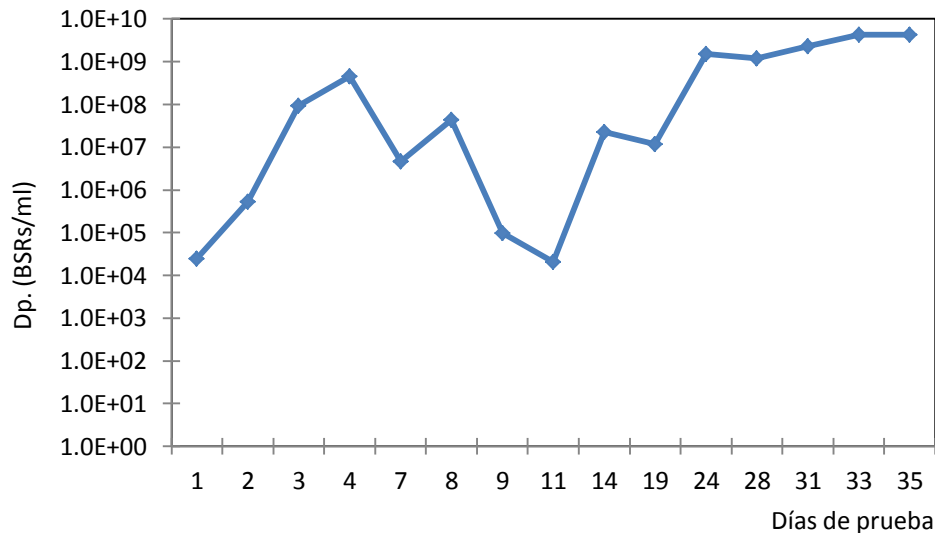


Figura 11. Densidad poblacional en el tiempo de *BSRs* en *CEE* a $-850mV_{Cu/CuSO_4}$

No obstante, después de este periodo la población logró recuperarse y mantener su tasa de crecimiento hasta el final de la prueba, en este último periodo no se observa perturbación alguna por algún efecto extrínseco en el sistema, por lo que se espera que su actividad metabólica haya funcionado correctamente.

Dado que el comportamiento de la densidad poblacional se llevó en el seno del medio de cultivo de la *CEE*, en donde se encuentran inmersos los sensores de medición y dentro de ellos está el electrodo de trabajo protegido con un potencial de $-850mV_{Cu/CuSO_4}$, este ofrece una superficie aproximada de 6.016 cm^2 , que fue colonizado desde el inicio de la prueba por las *BSRs*, esto en parte, debido a la naturaleza sésil de estos microorganismos y en parte al quimiotactismo debido a la generación de moléculas de H_2 que se produce por el proceso de reducción de especies químicas a consecuencia de la corriente de la *PC* y que son aprovechadas por estos microorganismos como fuente de energía.

En este mismo contexto, se sabe que en estas superficies los nutrientes llegan ser mayores a las establecidas en el seno del medio o de la solución. En consecuencia la densidad poblacional de *BSRs* deben de ser en número diferente a la monitoreada en el seno del medio de cultivo en la *CEE* [1].

Por otra parte, se conoce que la colonización de superficies sólidas por *microorganismos*, generan polisacáridos (*EPS*), estos polimerizan y forman verdaderas mallas o redes donde se alojan y se adhieren dichos microorganismos al metal, bajo estas condiciones estos forman racimos o micro colonias dentro de las películas.

6.2.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico

La actividad metabólica de las *BSRs* está sujeta a las condiciones ambientales, disposición de nutrientes y concentración de iones SO_4^{2-} en el medio de cultivo o en solución, así mismo esta relación está moderada por la actividad respiratoria y metabólica de estos microorganismos.

La ruta que incorpora y activa a los SO_4^{2-} se lleva a cabo a nivel de membrana celular y se llama desasimilación de sulfatos. La activación de los sulfatos se realiza por la enzima *ATP*sulfurilasa, formando un complejo denominado adenosin fosfo sulfato (*APS*), las reducciones intermediarias (sulfitos) las controla la enzima *APS*- reductasa y la parte que conducen a la producción de S^{2-} , se controla por la sulfito- reductasa. Este sistema enzimático esta acoplado a otro sistema denominado hidrogenasas que remueven e incorporan a moléculas de H_2 tanto a nivel de membrana como al interior de la célula, los hidrógenos son oxidados por esta enzima que actúa como agente reductor y donadores de e^- en el proceso respiratorio, proceso descrito en el marco teórico.

En dicho proceso involucra la transferencia de hasta de 8 e^- que son utilizados en la reducción de los SO_4^{2-} hasta sulfuro, en esta secuencia de óxido reducción, la acumulación de iones hidrógeno generan una concentración de protones (H^+) conocida como fuerza motriz protónica, capaz de inducir a la enzima *ATP*asa para llevar a cabo la síntesis de *ATP* celular [1]. La reacción global de reducción de sulfatos se da por la ecuación 13.

En la Figura 12, se muestra el comportamiento de la concentración de SO_4^{2-} y de H_2S con respecto al tiempo, en este gráfico se observa que la curva de los sulfatos, en principio presentó una fuerte inestabilidad debida principalmente a los

intercambios de cultivo viejo por nuevo que se realizaron en la *CEE*, ya que en cada reposición lleva una concentración de sulfatos adicional. Por lo que en dicha Figura se aprecia que a altas concentraciones de sulfatos, el tiempo de residencia de estos fue muy corto debido a la alta actividad microbiana, además el consumo de sulfatos es mayor y la concentración retorna a estado basal (360 mg/l), esta eventualidad se repite hasta los días 13 y 15 de la prueba. Después de este periodo el comportamiento se modera y tiende a homogeneizarse, este comportamiento posiblemente se debió a una estabilidad metabólica de estos microorganismos, ya que los intercambios de medio se sostuvieron bajo programa en el transcurso de la prueba. Esto a fin de que los sulfatos en el medio no representen un factor limitante en el proceso biológico de las *BSRs*.

En tanto que la curva de producción de H_2S , la concentración del ion sulfhídrico en principio fue baja pero con una ascendencia continua y constante y es hasta los días 18 y 20 donde la producción de sulfhídrico se hizo constante posiblemente debido a un decaimiento en concentración de sulfatos, ya que después se incrementa los sulfatos en el medio e inmediatamente la concentración de sulfhídrico se incrementa, al final de la prueba la producción de sulfhídrico prácticamente se volvió constante.

Parte del ácido sulfhídrico que se valora en esta prueba, proviene de bacterias planctónicas que se encuentran en el seno del medio y parte de la concentración de sulfhídrico proviene de *BSRs* sésiles que se encuentran adheridas a la superficie del electrodo de trabajo.

La cantidad de ácido sulfhídrico determinada por la metodología no se considera total, ya que esta determina solo las moléculas que están libres, ya que parte del sulfhídrico reacciona con el ion Fe^{2+} presente en el medio, para formar un precipitado de color negro. En la región de la interfase y en las biopelículas el sulfhídrico producido por bacterias sésiles se utiliza en la retroalimentación de reacciones cíclicas de superficie de naturaleza anódica como catódica y solamente una parte del sulfuro de hidrógeno, es liberado al medio bajo un gradiente diferencial en concentración. Esto podría explicar la diferencia en

concentración determinada entre la reducción de sulfatos y la producción de sulfuro de hidrógeno. Esta diferencia se puede apreciar en la Figura 12.

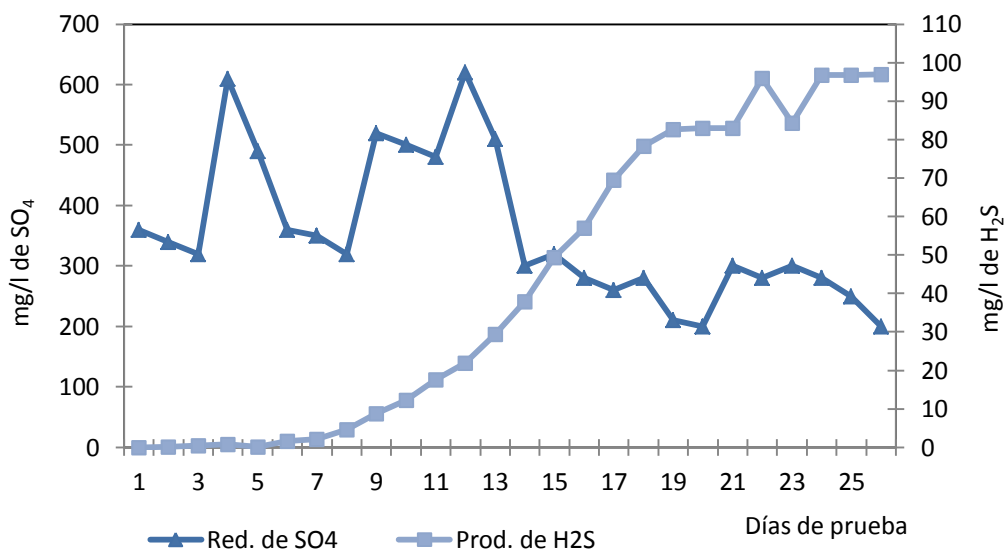


Figura 12. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por BSRs en el tiempo durante la prueba en CEE a $-850\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

6.2.3 Parámetros químicos

Los parámetros considerados para el monitoreo en esta parte experimental del estudio, fueron la concentración del ion ferroso (Fe^{2+}) y la alcalinidad desarrollada en el medio de cultivo durante el transcurso de la prueba. El primer parámetro, registra cualquier concentración de hierro en el medio a consecuencia de oxidaciones que puedan llevarse a cabo en la superficie del electrodo de trabajo. Mientras que la protección catódica, puede generar cierta alcalinidad en el medio debido a la reducción de especies químicas, produciendo cambios en pH , concentración de HCO_3^- y la probabilidad de afectar la viabilidad y el número de microorganismos presentes en el sistema [75].

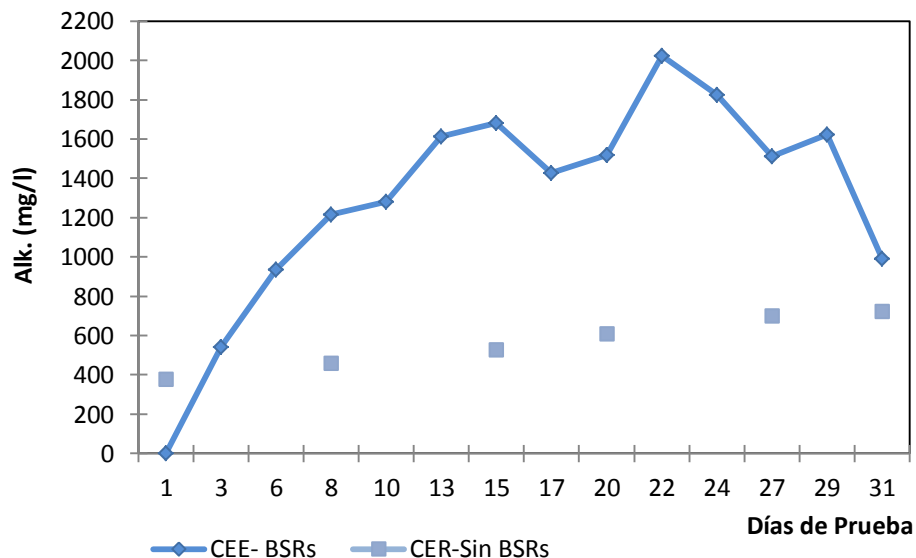


Figura 13. Comportamiento de la alcalinidad en el tiempo en los sistemas *CEE* y *CER* a - $850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

6.2.3.1 Alcalinidad

La alcalinidad en un sistema está dado por su capacidad para neutralizar ácidos o aceptar protones y está regulada por diferentes especies (HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^-) que pueden estar presentes en el sistema y de acuerdo a la concentración que predomine de dichas especies, sería el tipo de alcalinidad que se esté desarrollando en el sistema [76].

Para este caso en *CEE* y de acuerdo al *pH* registrado, se estaría indicando que el predominio, se encuentra como sigue $\text{HCO}_3^- \gg \text{CO}_3^{2-}$, donde los iones bicarbonatos son los que regularon al sistema seguidos de posibles y pequeñas concentraciones de $\text{H}_2\text{CO}_{3(l)}/\text{CO}_3^{2-}$. Generalmente en estos sistemas se encuentran pequeñísimas concentraciones del precursor como de la especie subsecuente del ion bicarbonato predominante.

El ácido carbónico precursor del ion bicarbonato, pudo haber procedido de la actividad metabólica de los microorganismos en el sistema, pero considerando el *pH* desarrollado en el medio, la producción de este ácido solo fue momentánea, transfiriéndose todo a bicarbonatos con liberación de protones ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) en el

sistema (*CEE*), lo cual dio lugar a que se mantuvieron el *pH* en los registros presentados y bajo este esquema, la alcalinidad generada fue promovida por el ion bicarbonato [76].

La alcalinidad que se registró en la *CER*, fue mucho menor que la desarrollada en la *CEE* (Figura 13), esto posiblemente se originó debido a que en *CER* no se tuvo actividad metabólica, por lo tanto solo se registró la alcalinidad generada por los iones bicarbonatos en el sistema.

6.2.3.2 Hierro (Fe^{2+})

Se propuso evaluar al ion ferroso (Fe^{2+}) en el transcurso de las pruebas llevadas a cabo a potenciales de $-850mV_{Cu/CuSO_4}$ en los dos sistemas de evaluación (*CEE* y *CER*), a fin de determinar la eficiencia de la *PC* en presencia y ausencia de *BSRs*, ya que este ion procede de la primera de oxidación del hierro liberado de la estructura cristalina de la superficie del metal (Electrodo de trabajo).

En el proceso de montaje de los elementos de las celdas electroquímicas de evaluación y de referencia, los electrodos de trabajo se mantuvieron sumergidos en el medio de cultivo (exento de Fe^{2+}), por el término de 45 a 90 minutos sin protección catódica, lapso de tiempo necesario para ambientar a la celdas con nitrógeno hasta obtener las condiciones de *Eh* iguales o mayores a los -350 mV establecidos para mantener las celdas libres de oxígeno.

Los electrodos de trabajo de ambas celdas al momento de sumergirlos en el medio de cultivo (Electrolito) se revistieron con una carga circundante negativa, lo que trajo a consigo una reorientación de las moléculas de agua del medio, iones solvatados y libres que estuvieron presentes en el límite de fase del electrolito, este arreglo molecular generó un exceso de carga, lo que promovió a que en el límite de fase se desarrollara una fuerza o campo eléctrico.

En este sentido y dada la heterogeneidad que presentan las superficies de los metales, donde la estructura cristalina de algunos átomos de hierro muestran

diferentes grados de estabilidad, en el cual los átomos con mayor energía residual presentan mayor inestabilidad, estos átomos son propensos a oxidarse y perder electrones, los electrones fluyen en respuesta al campo eléctrico formado en la interfase metal-electrolito y los iones metálicos de las estructuras cristalina pasa a la fase del electrólito, este paso se considera lento [77].

Trasponiendo dichas eventualidades a los sistemas de evaluación, donde la superficie del metal sumergida, fue factible que se activaran momentáneamente generando microceldas anódicas y catódicas, en las cuales el flujo de electrones generados en las reacciones de oxidación y fue de la misma magnitud al flujo de electrones consumidos por la reacciones de reducción de especies en la interfase líquida, en consecuencia se estableció una diferencia de potencial (E_{corr}), que permitiera un flujo neto de electrones de las zonas anódicas a las catódicas, propiciando que dichas reacciones de superficie se alejara del equilibrio y con ello se creara un proceso de corrosión. Esto debido a que las reacciones suscitadas en cada zona no estuvieron limitadas y en consecuencia el proceso fue continuo, de tal manera que el sistema pudo alejarse de su equilibrio y el metal en zonas anódicas entrara en disolución libre.

Dicho proceso pudo haber ocurrido en la superficie de los electrodos de trabajo, mientras que se logró adquirir las condiciones ambientales de anaerobiosis en ambas sistemas evaluación.

Los sistemas de evaluación bajo condiciones de anaerobiosis, a los electrodos de trabajo se les aplico el potencial de protección de $-850 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$, en este proceso, ocurrió un barrido mediante flujo de corriente o electrones en toda la superficie metálica, polarizando de manera paulatina para que todas las zonas que actuaban como anódicas, revertirlas a catódicas de tal forma que toda la superficie de evaluación se transformara en cátodo, a este proceso se le conoce como barrido catódico (Polarización catódica) y puede variar de acuerdo al potencial aplicado.

En la aplicación del potencial, se realizó un barrido catódico de la superficie, en la cual se rebaso a la zona de inmunidad establecida para hierro en los diagramas potencial-*pH*, quedando más catódica que la zona de inmunidad, en esta situación, la superficie de los electrodos quedaría inmune al proceso de la corrosión durante el período de la prueba.

Bajo este escenario, se recuerda que el sistema *CEE* fue inoculada con *BSRs*, mientras que el sistema *CER* permaneció sin microorganismos bajo condiciones de esterilidad y anaerobiosis durante la prueba. En la *CEE*, los microorganismos se desarrollaron tanto en el seno del medio como en la superficie del electrodo de trabajo, en esta parte, se hace hincapié en los diferentes mecanismos que incidieron en el proceso de desestabilización de la corriente de protección y en consecuencia la oxidación y liberación del ion Fe^{2+} en algunos puntos de la superficie de los electrodos de trabajo.

Dentro de estos mecanismos, en su fase inicial, está el proceso de colonización que alteraron a los fenómenos de superficie del metal y posiblemente las líneas de flujo de corriente de la *PC*.

En la fase intermedia, están los mecanismos de despolarización catódica promovidos por el sistema enzimático que remueve los hidrógenos reducidos y los transporta a nivel de membrana y al interior de la célula para diversas funciones metabólicas de las *BSRs*.

Así mismo en esta fase, también se encuentra la actividad del H_2S que interactúa como molécula o como ion sulfhídrico (HS^-) en los mecanismos de corrosión del metal o bien en procesos catódicos por la generación de H^+ , ya descritos, o bien como sulfuro de hierro (mackinawita), que en conjunto con el ion sulfhídrico interactúan y aceleran los procesos de corrosión localizada del tipo picadura, mismos que fueron también descritos con anterioridad en el marco teórico.

En fase terminal, se encuentra la producción y acumulación de biopelículas de *EPS* que dan lugar a la formación de barreras permeables y heterogéneas que pueden permitir la transferencia parcial o total de sustancias o iones del medio al

interior de las biopelículas y del interior de estas hacia el exterior o al seno del medio. Dentro de este proceso de transporte se encuentra la liberación de algunos gases tales como H_2 , H_2S , CO_2 , así como iones Fe^{2+} . Estos iones fueron monitoreados en el transcurso de la prueba como una manifestación de un proceso de oxidación en la superficie del metal.

En la Figura 14, se muestra la trascendencia del ion ferroso Fe^{2+} , tanto en *CEE* como en la *CER*, en esta última se observa que la mayor parte de los valores registrados están por debajo de la unidad, mientras que los valores registrados en la *CEE*, los valores en concentración del ion ferroso fueron en ligeros incrementos en cuanto transcurrió la prueba, alcanzando el máximo nivel al final de esta, este comportamiento guarda una similitud con los registro de la producción H_2S .

Es muy probable la existencia de una interrelación de parámetros que manifiestan una incidencia en la desestabilización de la densidad de corriente de la *PC* y en consecuencia en los procesos de corrosión del electrodo de trabajo protegido.

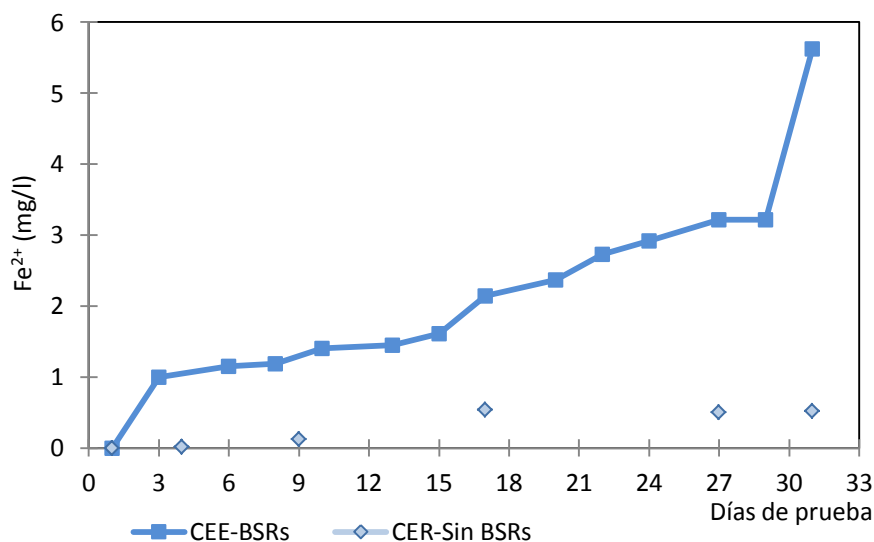


Figura 14. Variación de la concentración de Fe^{2+} referente al tiempo en el medio, debido a la oxidación del acero *API XL-52*, en *CEE* y *CER* a $-850 mV_{Cu/CuSO_4}$

En la Figura 15, se esquematiza la distribución de la corriente de protección sobre la superficie metálica protegida, así mismo, se dejan ver las diferentes películas que componen al grosor de la capa. Esta se considera heterogénea, de espesor variable y que está compuesta por una matriz polimérica de polisacáridos con diversos depósitos de sulfuros de hierro. En la parte superior se muestra una superficie vista en fresco mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA), donde se alcanza a observar los somas de algunas BSRs que se distinguen por ser bacilos cortos de forma recta o curvos, así mismo se aprecia la discontinuidad de la capa con algunos relieves de sulfuros de hierro.

Debido a la alta actividad en el interior de las biopelículas se transfieren a la solución o medio cultivo algunos productos metabólicos y de oxidación como H_2S , CO_2 y Fe^{2+} ; que fueron monitoreados en el transcurso de la prueba.

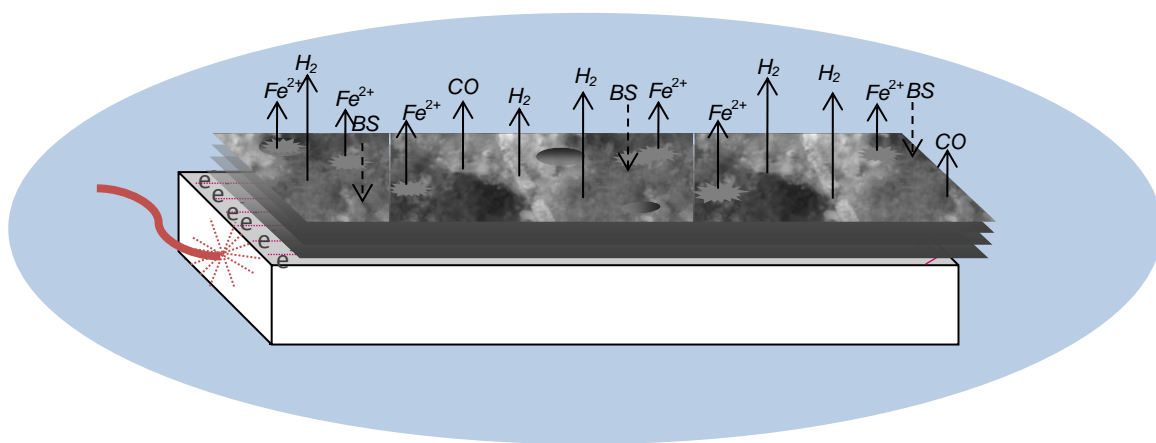


Figura 15. Esquema de un electrodo de trabajo, en el que ilustra en parte las líneas de flujo en el área protegida y la acumulación de diferentes capas de biopelículas (EPS) y la heterogeneidad de la superficie.

Hasta el momento, se ha argumentado como la superficie protegida del metal pudo haber sido oxidada y entrar como ion divalente (Fe^{2+}) al seno de la solución, sin embargo no se tiene la información de la cinética con la que transcurrió dichas eventualidades, es por ello que en esta parte del estudio, se enfocara a determinar con que velocidad la superficie del metal del electrodo de trabajo se estuvo oxidando tanto en la celda de evaluación como en la celda de referencia (*CEE* y *CER*). Para ellos se utilizaron tres técnicas de evaluación, gravimétrica y dos electroquímicas: la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (*EIS*) y la Resistencia a la Polarización (R_p).

6.2.4 Parámetros electroquímicos

Dentro de los parámetros de medición de la velocidad de corrosión se incluyó a la técnica gravimétrica, debido a la información que proporciona acerca del proceso de corrosión.

6.2.4.1 Técnica gravimétrica

6.2.4.1.1 Determinación de la velocidad corrosión del acero *API XL-52* protegido con $-850 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$ en los sistemas *CEE* y *CER*.

La técnica gravimétrica, basa su principio en determinar la pérdida de metal por procesos de corrosión de manera uniforme, al interactuar el electrodo de trabajo con su medio ambiente durante el período de prueba, la relación entre pérdida de material respecto al tiempo, nos determina una velocidad de corrosión (V_{corr}), que generalmente se considera como un promedio de los procesos que se llevaron a cabo en la superficie de evaluación. Esta relación se da tanto en milésimas de pulgada por año (*mmpa*) o bien de milímetro por año (*mmpa*).

6.2.4.1.2 Cálculos para determinar velocidad de corrosión.

Para calcular la velocidad de corrosión por esta técnica, se aplica la siguiente ecuación [78] [72].

$$V_{corr.} = \frac{\Delta W \times K}{A \times T \times D} \quad (34)$$

Dónde:

V_{corr} = Velocidad de Corrosión

K = constante cuyo valor determina las unidades de V_{corr} a usar, ver Tabla 5.

Tabla 5. Valores de K

Valor de k	Unidades de V_{corr}
$3.45 \cdot 10^6$	mpa (milésimas de pulgada por año)
$8.76 \cdot 10^4$	mpa (milímetros por año)

ΔW = Diferencia de peso del E_t (peso inicial- peso final)

A = Área del electrodo de trabajo

T = Tiempo de prueba

D = densidad del metal (7.86 g/cm^3)

Los datos experimentales que se obtuvieron para la *CER* y *CEE*, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Velocidad de corrosión (V_{corr}) mediante técnica gravimétrica a – 850 mV.

W_i (g)	W_f (g)	DW (g)	Área (cm^2)	Densidad (g/cm^3)	Tiempo Hs	V_{corr} (mpa)	V_{corr} (mma)
Celda Electroquímica de Referencia							
5.3929	5.3905	0.0024	6.01615	7.86	672	0.2606	0.0066
Celda Electroquímica de Evaluación							
5.0660	5.0581	0.0079	6.01615	7.86	840	0.6867	0.0174

La velocidad de corrosión detectada por esta técnica fue relativamente baja, ya que en ambos casos estuvieron por debajo de la unidad de corrosión, sin embargo la velocidad de corrosión para el electrodo de trabajo en la *CEE*, puede indicarse que se tuvo hasta un 62 % en velocidad de corrosión por encima del valor

registrado en el electrodo de trabajo de la *CER*. Esta relación puede ser atribuida a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras en el sistema.

Por otra parte, la velocidad de corrosión registrada por esta técnica, se considera como un promedio de las eventualidades de corrosión ocurridas en la superficie del electrodo de trabajo, que estuvo protegido con $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, por lo tanto, la pérdida de material con respecto al tiempo se considera que se llevó a cabo de forma longitudinal a la superficie y no transversal como sucede con la corrosión localizada, es decir que se asume corrosión generalizada o uniforme.

6.2.4.2 Resistencia a la polarización Lineal (R_p)

En un sistema en cual fluye cierta corriente bajo un potencial, se van generando alteraciones entre las partes que se constituye el sistema (electrodo/electrolito), provocando disminución del potencial entre un punto y otro, e incrementando la resistencia al transporte de masa y en consecuencia el de transferencia de carga, el grado de incremento de la resistencia de este fenómeno en la superficies, es medido por esta técnica.

La técnica de Resistencia a la Polarización Lineal (R_p), se utilizó para determinar la velocidad de corrosión del acero *API XL-52*, en presencia y ausencia de *BSRs*.

La R_p se considera una técnica de bajo campo, además es complementaria y ampliamente utilizada en estudios de corrosión, ya que se caracteriza por su rapidez, sencillez y seguridad. Esta se realiza con una amplitud de barrido de -30 a 30 mV , con velocidad de barrido de 0.1667 mV/seg . [79], esta se considera no destructiva y la perturbación al sistema es mínima, debido a que se encuentra desfasado fuera del potencial del equilibrio o de E_{corr} [80].

6.2.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en *CEE* y *CER* a $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

La R_p se determinó mediante la pendiente de la curva, considerada como la medida directa de la resistencia que ofrece la interfase metal biopelícula - *BSRs*- medio de cultivo al paso de la corriente. Con el valor de la pendiente se calculó la corriente de corrosión (i_{corr}) mediante la siguiente ecuación (Stern and Geary).

Cálculos para determinar velocidad de corrosión

$$i_{corr} = \frac{B}{R_p}, \text{ donde:} \quad 35$$

i_{corr} = Densidad de corriente de corrosión en el sistema

R_p = Resistencia de polarización

B = El coeficiente de Stern Geary (0.026V)

El coeficiente de Stern and Geary asume en su aplicación reacciones de corrosión controladas por activación, además está relacionado con las pendientes de Tafel mediante la siguiente relación.

$$B = \frac{b_a * b_c}{2.303(b_a + b_c)} \quad \text{Dónde:} \quad 36$$

b_a y b_c , son las pendientes anódicas y catódicas de Tafel

B = Constante de Stern-Geary

La velocidad de corrosión estuvo relacionada con la densidad de corriente (i_{corr}), mediante la siguiente ecuación.

$$V_{corr} = K \frac{i_{corr}}{\delta} E_q, \quad \text{donde:} \quad 37$$

K constante que define las unidades de velocidad de corrosión.

δ Densidad del hierro del electrodo de la muestra 7.86 (g/cm³)

E_q Peso equivalente del hierro 27.92 (g)

Usando la ecuación 35 y aplicándola a los resultados de R_p , se obtuvo la información de i_{corr} , así mismo estos datos fueron aplicados a la ecuación 37 para obtener los datos correspondientes de V_{corr} , que se visualizan en la Figura 16. El

La aplicación de la ecuación y la constante de Stern-Geary, asume que las reacciones de óxido reducción en las interfases metal medio, en las dos celdas de evaluación se está llevando a cabo por procesos de activación.

Los resultados de la conversión de R_p a V_{corr} se presentan en la Figura 16, de la celda electroquímica de evaluación y de la celda electroquímica de referencia, que fueron registrados durante el desarrollo experimental.

6.2.4.2.2 Celda electroquímica de evaluación (CEE)

En la Figura 16, se muestran los resultados de las velocidades de corrosión en milésimas de pulgada por año (mpa), obtenidas en los electrodos de las celdas electroquímicas de evaluación y de referencia, observando que la V_{corr} en CEE vario desde 0.456 hasta 5.912 mpa , mientras la V_{corr} en la CER, prácticamente se mantuvo constante ya que la variaciones durante el desarrollo de la prueba fueron mínimas (1.014 a 0.786 mpa).

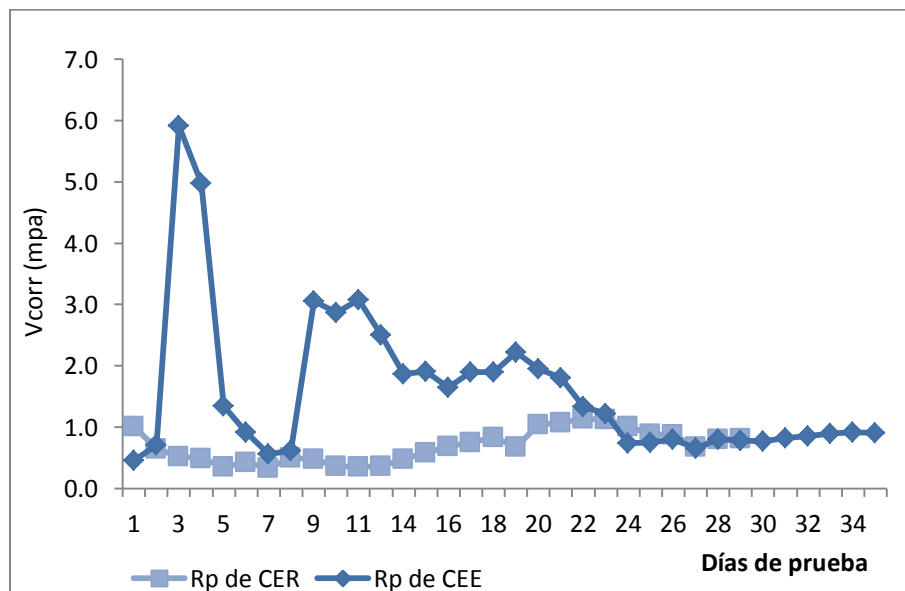


Figura 16. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero *API XL-52* en CEE y CER, a $-850 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$.

6.2.4.2.3 Celda electroquímica de referencia (*CER*)

En la *CER*, se mantuvieron todas las condiciones ambientales similares a la *CEE*, así como la aplicación del potencial de $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$ al electrodo de trabajo, solo que sin *BSRs*.

Los registros en velocidad de corrosión estuvieron alrededor de la unidad, durante todo el periodo de prueba, esto a pesar que se mantuvo la protección catódica. La V_{corr} detectada, posiblemente se debió a la actividad de algunas especies químicas presentes en la formulación del medio de cultivo o bien a la probable inestabilidad de compuestos orgánicos en presencia del potencial aplicado.

6.2.4.2.4 Celda electroquímica de evaluación (*CEE*)

En las primeras 48 h, la velocidad de corrosión fue baja (0.704 mpa), esta velocidad estuvo más influenciada por el efecto del medio de cultivo, que por la función de las *BSRs*, ya que esta se inicia por la colonización de las superficies y en esta estancia la actividad enzimática y metabólica aún no se ven reflejados en los procesos de corrosión del electrodo de trabajo.

Sin embargo después de las 48 h de prueba, se registró un incremento súbito en velocidad de corrosión (5.912 mpa), este puede relacionarse con la actividad enzimática y producción de sulfuro de hidrógeno que se llevó a cabo en la superficie del metal.

A esta altura de la prueba, es probable que la colonización de la superficie se ha totalizada y logrado su estabilización, los microorganismo bajo esta circunstancia tienden a optimizar su crecimiento, en la que probablemente el metabolismo y la actividad enzimática fueron continuas, logrando mayor movilidad electrolítica en la superficie y en los procesos de corrosión, en esta situación es muy probable que la generación de biopelículas fue escasa y discontinua permitiendo sin dificultad alguna el tráfico electrolítico.

Posterior al incremento en velocidad de corrosión, sobrevino un descenso de la misma, esta disminución puede ser atribuida a dos factores, el primero que está vinculado a una escasez de nutrientes y sustratos (SO_4^{2-}) en el medio, lo que trajo consigo un descenso en la actividad celular y esta repercutió en la dinámica enzimática y metabólica de las *BSRs*, esta situación es probablemente la que haya inferido en la V_{corr} , (0.567 *mpa*). El otro factor que pudo haber ocurrido y contribuido en la disminución del proceso de corrosión de este período y subsecuentes, fue la formación de biopelículas sobre la superficie del metal, donde estas a pesar de ser porosas o discontinuas (heterogéneas), dificultan en diferente grado al transporte de especies químicas que participan en las reacciones de reducción que se llevan a cabo en la interfase, así como transferencia de algunos iones (Fe^{2+}) y otros componentes metabólicos (H_2S) de los microorganismos en las biopelículas.

De esta manera la obstaculización del flujo iónico o corriente iónica afecta al circuito de corriente de la protección catódica, por lo que esta pudo haberse afectada en aquellos sitios donde la densidad de las biopelículas fue mayor y proteger aquellas áreas donde el espesor de la biopelícula fue escasa o delgada.

6.2.4.2.4.1 Actividad de los sulfuros

Por otra parte, de manera inherente al proceso de colonización, el crecimiento produce aglomeración celular o formación de colonias sobre pequeñas áreas del metal, en dicha estancia se generan microambiente con saturación de sulfuro de hidrógeno que acidifica localmente la interfase entre las *BSRs* y el metal.

En este escenario, los sulfuros de hierro formados en la superficie del metal exhibieron diferentes grados de estabilidad, los sulfuros cuya película es adherente, densa, continua y uniforme, llegan a pasivar la superficie del metal y disminuir los procesos de corrosión, sin embargo hay sulfuros cuya película es inestable, amorfa, discontinua y permeable, que ocasiona serios problemas de corrosión localizada, ya que está en su proceso de formación permite la difusión del ion sulfhídrico (HS^-) hacia el metal, donde éste reacciona con el metal y se forma una nueva película con las mismas características que la anterior, que al

crecer se expande y ejerce cierta presión sobre la película inmediata superior haciendo que esta se fragilice y se destruya, esta secuencia puede tornarse cíclica, si las condiciones de concentración del sulfhídrico y pH persisten en el medio, dicho mecanismo conduce a la formación de corrosión localizada.

En el desarrollo de este tipo de corrosión, la pérdida de material se considera muy baja debido a que el proceso de corrosión ocurre en áreas muy pequeñas, pero su avance es transversal a la superficie de la estructura.

Estas diferentes actividades posiblemente contribuyeron en cierto grado a ocasionar daño por corrosión localizada a pesar que las velocidades de corrosión obtenidas fueron bajas.

6.2.4.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).

La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica es una técnica utilizada en estudios de corrosión y en otras áreas de la ciencia. Esta se basa en la aplicación de un pequeño estímulo en potencial sinusoidal (E) de baja amplitud a un electrodo, midiendo su respuesta en corriente sinusoidal (I), pero desfasada y con amplitud proporcional al módulo de la impedancia a diferentes frecuencias.

Aunque existe la posibilidad de aplicar una pequeña señal en corriente y medir la respuesta en potencial en el sistema. Así, los equipos electrónicos usados procesan las mediciones de potencial - tiempo y corriente - tiempo, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada, denominados espectros de impedancia [81].

6.2.4.3.1 Resultados de la Impedancia electroquímica en CEE a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

La EIS se utilizó para determinar los procesos de óxido-reducción que se llevaron a cabo en la interfase metal-biofilm-BSRs-medio de cultivo, las mediciones de impedancia se realizaron a diferentes tiempos durante el transcurso de la experimentación, los datos obtenidos se presentan en el diagrama de Nyquist de la Figura 17 y corresponden a la CEE, para el potencial de $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

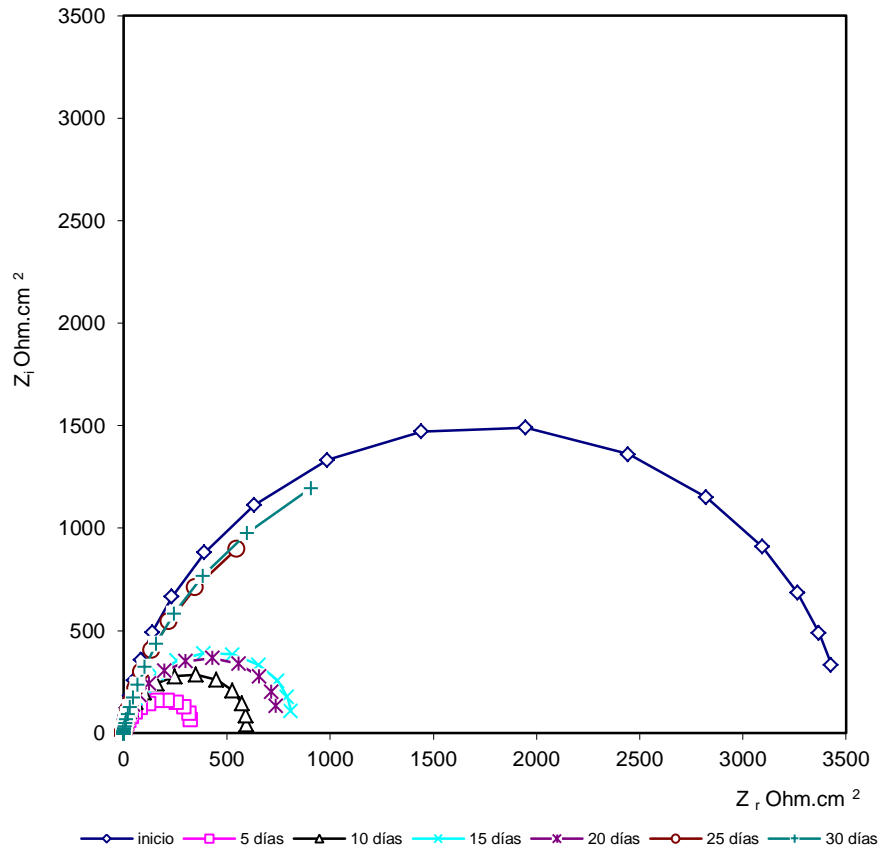


Figura 17. Variación de la impedancia en el diagrama de Nyquist a diferentes tiempos, determinadas sobre el acero *API XL52* en la *CEE*, a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

6.2.4.3.1.1 Diagrama de impedancias de Nyquist

En el diagrama de Nyquist de la Figura 17, se muestran los diferentes espectros de impedancia obtenidos en el transcurso del desarrollo experimental, en esta misma, se observa que las curvas con mayor impedancia correspondieron a los días 1, 25 y 30, respectivamente. Mientras que las impedancias de menor magnitud, se alcanzaron en los día 5, 10, 15 y 20 de prueba.

En este set de pruebas, la impedancia con mayor magnitud fue la del día 1, donde su comportamiento estuvo influenciado por las condiciones iniciales de la prueba (ausencia de especies agresivas, *pH* cercano al neutro y anaerobiosis).

Respecto a las impedancias registradas los días 5, 10, 15 y 20, se puede indicar que fueron menores a los 1000 ohms.cm⁻² y además mostraron un incremento en magnitud durante este período de prueba. Este comportamiento puede relacionarse con una colonización de la superficie, alto desarrollo celular con actividad enzimática y metabólica, así como la generación de biopelículas.

Mientras que las impedancias de los días 25 y 30 pueden llegar a ser mayores a la impedancia del día 1 y estas estuvieron influenciadas por una densificación, estabilización y maduración de las capas de biopelículas, que en conjunto dificultaron en mayor medida al transporte de especies electrolíticas del seno de la solución al interior de las películas y del interior de las mismas hacia el seno de la solución, ocasionando mayor impedancia de acuerdo al diagrama de Nyquist de la Figura 17.

Con los datos experimentales de la Figura 17, se inició la simulación numérica mediante el programa *Zview 2*[®], para determinar el circuito eléctrico análogo al sistema físico que se tuvo a nivel de interfase, lugar donde se llevó a cabo el proceso de corrosión. El arreglo del circuito que se obtuvo para esta serie de pruebas se presenta en la Figura 18, éste presentó tres componentes identificadas como: R_s , R_{tc} y C_{dl} .

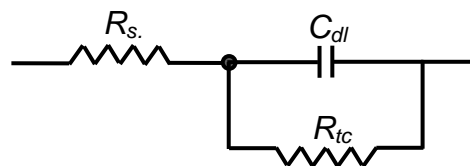


Figura 18. Circuito Equivalente para simular los datos Nyquist para el sistema de corrosión en la CEE.

Dado que el circuito equivalente asemeja en detalle a la interfase metal solución (medio de cultivo), es necesario conocer los características y la funcionalidad de los elementos que lo componen.

- La R_s , relaciona la caída óhmica existente entre el electrodo de trabajo y de referencia debida al medio de cultivo (resistencia de la solución).
- La R_{tc} simula los procesos de las reacciones de oxidación y reducción que se llevan a cabo en los límites de la superficie del electrodo y del medio de cultivo (solución), así como las funciones de transferencia de carga y masa que se involucran en el proceso.
- La C_{dl} es la capacitancia de la doble capa formada en los límites de las fases del metal y el líquido, esta trabaja en la acumulación de cargas y descarga del capacitor en función de la frecuencia y la influencia de un potencial. Para el estudio, en vez del capacitor se utilizó a un elemento de fase contante (EFC), considerado como un componente del circuito que modela el comportamiento de la doble capa que actúa como un capacitor imperfecto.

El elemento de fase contante presentó dos variables, identificadas como C_{dl-T} y C_{dl-P} ; la primera está asociada con la capacitancia, mientras que la segunda, se relaciona con el ángulo de desplazamiento de las impedancias de Nyquist.

En el simulador los electrones producto de las reacciones de oxidación-reducción llevadas a cabo en la superficial del metal, fluirán a través del elemento que presente menor resistencia y en consecuencia menor caída de potencial. En este sentido, si la corriente circula por la R_{tc} , se dice que el sistema es resistivo y por lo tanto la interfase estará activa, permitiendo el paso de corriente.

Cuando la R_{tc} adquiere valores mayores de impedancia, la corriente circulará por C_{dl} , entonces la corriente se le denominara capacitiva, pero cuando existe acumulación de cargas, en ambos lados del capacitor, la transferencia de carga en la interfase tiende a ser lenta y llegar a ser pasiva, en consecuencia se produce baja velocidad en las reacciones redox del sistema.

6.2.4.3.1.2 Diagrama de ajustes

Por otra parte y a fin de conocer los parámetros del circuito equivalente, se realizaron varios ajustes a los valores obtenidos de cada uno de los parámetros del circuito respecto los datos de las curvas de impedancia del diagrama de Nyquis (Figura 17). El mejor ajuste entre ambos sistemas se presenta a manera de ejemplo en la Figura 19, en esta se presentan en la parte inferior del gráfico los datos del ajuste de cada uno de los elementos del circuito. El semicírculo incompleto corresponde a los datos experimentales, mientras que el semicírculo completo corresponde al ajuste hecho por el simulador.

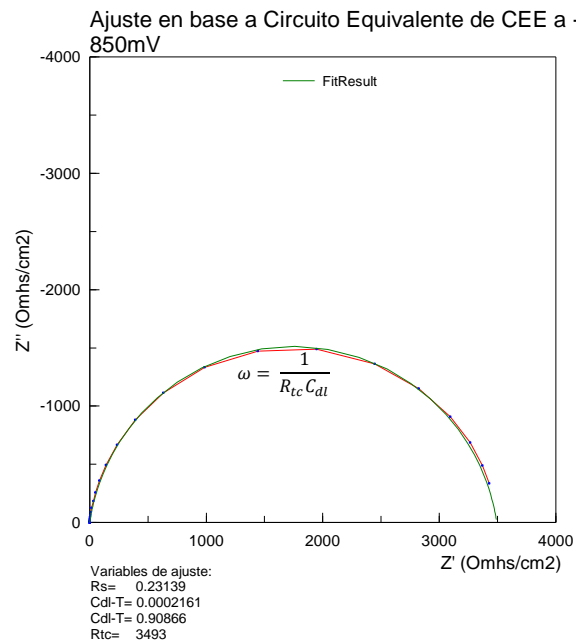


Figura 19. Ajustes a los valores de los elementos del circuito Randles, a las curvas de impedancia del día 1 de prueba.

6.2.4.3.1.3 Datos de los elementos de Ajuste

El proceso de ajuste realizado para cada una de las curvas correspondientes a las determinaciones de impedancia que se llevaron a cabo en el transcurso de la prueba efectuada a $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$. Los ajuste en todos los casos fueron apropiados y los valores obtenidos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente para las diferentes pruebas de impedancia realizadas en la CEE a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Datos del ajuste:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
$R_s (\Omega \cdot \text{cm}^2)$	0.23139	0.32998	0.62381	0.3465	0.37251	0.31913	0.18449
C_{dl-T} (farad)	0.0002161	0.0003918	0.000991	0.000996	0.000302	0.000984	0.000126
C_{dl-P}	0.90866	0.90047	0.9402	0.9504	0.9441	0.868	0.86152
$R_{tc} (\Omega \cdot \text{cm}^2)$	3493	374.7	624	843	785.3	3111	3470

En relación a los valores correspondientes a la resistencia de la solución (R_s) exhibidos en la Tabla 7, comprenden los valores de resistencia que se registraron en el medio de cultivo. Estos valores se consideran de baja magnitud, manteniendo una ligera variación de 0.1844 a 0.62381 $\text{ohm} \cdot \text{cm}^2$, en estos se observan algunos altibajos durante la prueba variaciones, posiblemente influenciados por reposición de ingredientes al medio y la presencia de microorganismos en el medio. Dada la baja resistencia de los valores, estos no fueron objeto para reducir el transporte del seno de la solución a la interfase activa.

Los parámetros (C_{dl-T} y C_{dl-P}) proporcionados por el circuito equivalente están asociados con la capacitancia a nivel de interfase.

Los valores obtenidos de la simulación para la C_{dl-T} fueron de magnitud pequeña, sin embargo estos en el transcurso de la prueba, presentaron algunos altibajos en sus valores durante la prueba, sin embargo se mantuvieron dentro del orden de 0.000126 a 0.000996 farads. Los valores de parámetro se asocian con la capacitancia y características morfológicas de las películas formadas.

En tanto que la C_{dl-P} , presentó un comportamiento más homogéneo cuyos valores estuvieron del orden de 0.85664 a 0.95024, con pequeñas variaciones a lo largo de la prueba, este parámetro se le relaciona con el ángulo de desfasamiento del diagrama de Nyquist, además proporciona información del estado físico de la superficie del metal, tal como la rugosidad de la superficie.

El parámetro de R_{tc} está vinculado a los movimientos de transferencia de carga y masa, que se estuvieron desarrollando a nivel de la interfase activa que administraron a los procesos de óxido-reducción implicados durante el transcurso de la prueba. Además este parámetro se relacionó con la formación, movimiento y deterioro de películas sobre la superficie del metal, entre otros fenómenos que se involucran en el proceso.

6.2.4.3.1.4 Datos de Resistencia a la polarización, corriente corrosión y velocidad de corrosión.

En la Tabla 7, se presentan datos relacionados con este parámetro (R_{tc}), en los cuales se observa que la mayor magnitud de este grupo de pruebas, se presentó al inicio ($3493 \text{ ohms}\cdot\text{cm}^2$) para el día 1, la alta impedancia determinada a este tiempo de prueba, se asocia más a la influencia de las condiciones de carga de las celdas (ausencia de especies agresivas para el metal, pH cercano al neutro y anaerobiosis).

Mientras que el valor de menor magnitud ($374.7 \text{ ohms}\cdot\text{cm}^2$) se presentó al día 5, y se mantuvieron en el orden de las centenas hasta día 20, este periodo se relaciona con alta actividad metabólica y enzimática de las *BSRs*, así como un crecimiento heterogéneo de las películas de polisacáridos (*EPS*) en el entorno, características que incrementaron la afluencia de electrolitos del seno al interior de las biopelículas e interfase.

En las dos últimas lecturas de R_{tc} se registró un incremento sustancial en este parámetro, resultando mayores a los $3000 \text{ ohms}\cdot\text{cm}^2$, este comportamiento se asocia a la densidad y maduración de las biopelículas sobre el metal, en la cual se presentó una disminución del transporte iónico hacia el interior de las películas y hacia el exterior de las misma, repercutiendo directamente en las reacciones a nivel de interfase.

Por otra parte, tomando en consideración que la Z_r comprende a las componentes (R_s y R_{tc}) y que la R_p demarca el límite en baja frecuencia a las impedancias en el

diagrama de Nyquist, entonces puede establecerse las siguientes relaciones que se marcan en la ecuación (ec.38)

$$Z_r = R_s + R_{tc}; \text{ por lo tanto } R_p = R_{tc} - R_s \quad (38)$$

En este sentido, debe considerarse que la R_s se mantuvo más o menos uniforme durante el proceso y que la magnitud de esta con respecto a la R_{tc} fue pequeña, por lo tanto, la aportación fue baja y por consiguiente, puede guardarse la siguiente igualdad.

$$Z_r = R_{tc} = R_p \quad (39)$$

De esta forma, los datos de impedancia y de R_{tc} pueden relacionarse con la con los procesos de corrosión mediante la R_p .

6.2.4.3.1.4.1 Cálculos de corriente de corrosión y velocidad de corrosión

La R_p puede referirse con la densidad de corriente de corrosión mediante la ecuación de Stern- Geary. [82]

$$i_{corr} = \frac{(b_a * b_c)}{2.3 (b_a + b_c)} * \frac{\Delta i}{\Delta E} = \frac{B}{R_p} \quad (40)$$

Dónde:

b_a b_c son las pendientes de Tafel de las reacciones anódicas y catódicas de corrosión de manera respectiva.

Δi Diferencial de corriente de corrosión

ΔE Diferencial del potencial de corrosión

B Constante de Stern and Geary

6.2.4.3.1.5 Datos de R_p , i_{corr} , V_{corr}

Con base al seguimiento de las relaciones de ecuaciones propuestas y el uso de las ecuaciones 7 y 40, se calcularon los datos de i_{corr} y V_{corr} que se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para CEE a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

ajuste de Datos:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	3529.768	374.370	623.376	842.635	784.627	3110.681	3469.815
i_{corr} ($\text{A} \cdot \text{cm}^2$)	7.366E-06	6.945E-05	4.171E-05	3.085E-05	3.314E-05	8.3583E-06	7.49319E-06
V_{corr} (mpa)	0.5595	5.2759	3.1684	2.3439	2.5172	0.6349	0.5692

En base a los parámetros presentados en las Tablas 7 y 8, se contemplan diferentes escenarios en donde a través de la R_p se observa como al inicio de la prueba, esta registró la mayor lectura ($3529.768 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$) y está relacionada con las condiciones que prevalecieron en el momento de la prueba (ausencia de especies químicas, anaerobiosis total y protección del metal), sin embargo se obtuvo una V_{corr} 0.5595 mpa . El efecto de resistencia a la polarización y la V_{corr} detectada obedecen primordialmente a las condiciones iniciales de prueba.

Para el día 5 de prueba, se observa una disminución en la R_p hasta ($374.370 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$), y dado que este parámetro guarda una relación inversa con la V_{corr} , en la que se detectó el mayor valor de corrosión registrado (5.2759 mpa) para este conjunto de pruebas. Los valores en R_p como los de corrosión para este punto de evaluación, se relacionan con los procesos de colonización de la superficie del metal por bacterias sulfato reductoras, producción tanto enzimática como de ácido sulfhídrico y la generación de biopelículas heterogéneas de *EPS*.

Los valores subsecuentes de R_p al día 5, muestran un incremento gradual, hasta día 20. Este comportamiento de esta variable se asocia con la actividad

enzimática y metabólica de estos microorganismos en la superficie del metal, formación de estructuras poliméricas de biopelículas, así como el crecimiento amorfo y heterogéneo de las mismas.

Respecto a la V_{corr} en este periodo de tiempo, se mantuvo entre 0.5595 a 5.2758 mpa. En el período de 20 al 30, la velocidad de corrosión disminuye notablemente bajando de 2.5172 a 0.5692 mpa. Es notorio como la formación y crecimiento de biopelículas sobre la superficie, disminuye el transporte iónico y perturba al proceso de corrosión en la interfase.

Las lecturas de resistencia a la polarización para los días 25 y 30 logran valores máximos en este parámetro. En este lapso de tiempo, las biopelículas se conformaron de manera progresiva en barreras y logran mayor estabilización. En esta situación, estas barreras permitieron que el transporte de intercambio de iones fuera más lento, esto hizo que se afectara la disponibilidad de especies químicas que puedan reducir en el límite de fase, afectando sustancialmente a la i_{corr} de las reacciones de óxido-reducción de la interfase metal solución (Tabla 8).

Es interesante como la variable de R_p se fue moviendo respecto al funcionamiento progresivo de las *BSRs* durante el desarrollo experimental, y en consecuencia como se afectaron a los datos de i_{corr} y V_{corr} .

6.2.4.3.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en *CER* a - 850 mV_{Cu/CuSO₄}.

Con relación a los resultados de la impedancia electroquímica obtenidos en la celda electroquímica de referencia (*CER*), se muestran de manera gráfica a través del diagrama de Nyquist en la Figura 20.

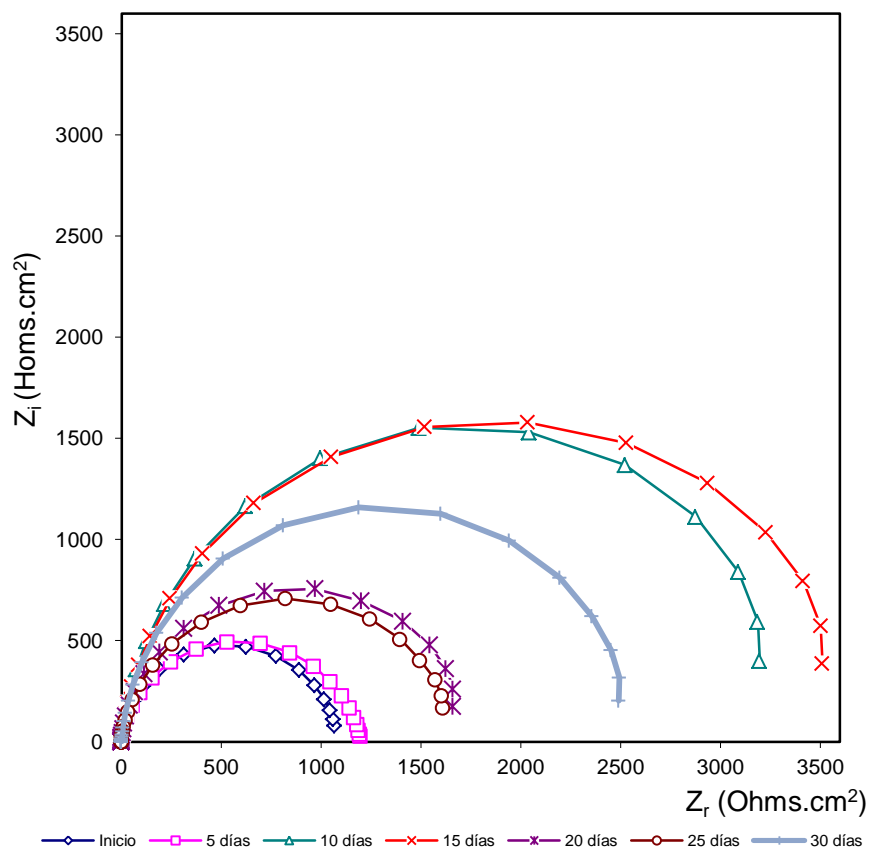


Figura 20. Variación de la impedancia en el diagrama de Nyquist a distintos tiempos, determinadas sobre el acero *API XL52* en *CER -850mV_{Cu/CuSO4}*.

6.2.4.3.2.1 Diagrama de impedancias de Nyquist

En este gráfico se presentan las diferentes curvas de impedancias que obtuvieron de la influencia medio de cultivo hacia el electrodo de trabajo en el transcurso de la experimentación para *CER*. Así mismo, se observa el comportamiento de esta variable respecto al tiempo; cómo en los primeros 5 días, se presenta un ligero incremento en impedancia, respectos a la inicial, a los 10 y 15 días se logran las máximas impedancias registradas para esta prueba (3200 a 3500 ohms•cm²), en el lapso del 20 a los 25 días de prueba, los valores de impedancia bajaron hasta los 1700 ohms.cm², pero al día 30 la impedancia volvió a incrementarse llegando cerca a los 2000 ohms•cm².

Los valores de impedancia y la variación de estos en el transcurso de la prueba, revelan la presencia de una película con diferentes eventualidades de reacomodos sobre la superficie del metal.

Por otra parte, con base a las impedancias mostradas en la Figura 20 y mediante el circuito equivalente que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes necesarios a los valores obtenidos en cada uno de los parámetros del circuito con respecto a cada una de las curvas de impedancia obtenidas durante la experimentación y que se presentan en la Figura 20.

6.2.4.3.2.2 Diagrama de ajustes

En la Figura 21 y a manera de ejemplo, se exhibe el ajuste de los parámetros del circuito equivalente respecto a las diferentes impedancias obtenidas y presentadas en la Figura 20. Así mismo se presentan los valores obtenidos durante la simulación. El ajuste logrado para los diferentes parámetros del circuito fue adecuado para todas las impedancias de la prueba.

La información obtenida de la adecuación o ajustes para todas las curvas correspondientes a *CER*, se presenta en la Tabla 9.

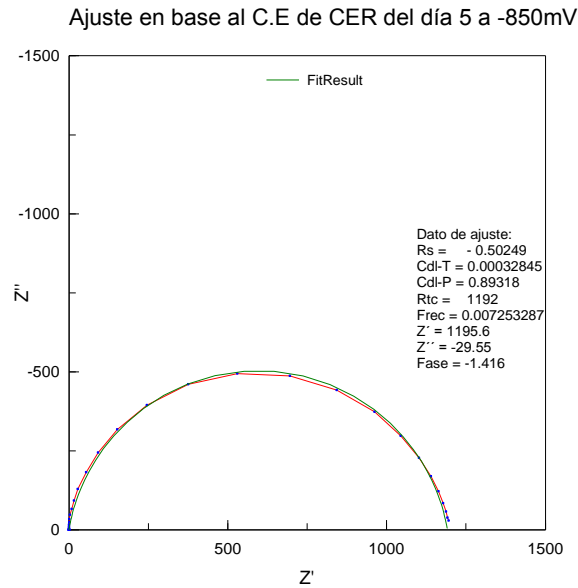


Figura 21. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 5 en *CER*.

6.2.4.3.2.3 Datos de los elementos de Ajuste

La información obtenida de los ajustes realizados mediante el circuito equivalente, respecto a las impedancias obtenidas en el transcurso de la prueba, se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en *CER* a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

variables del circuito equivalente	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
Rs (ohms•cm ²)	0.0432	-0.50249	-0.11495	0.49368	0.49365	0.11184	0.7668
Cdl-T (Farads)	0.0003354	0.00032845	0.00032948	0.00030444	0.0004724	0.0005637	0.0004325
Cdl-P	0.9072	0.89318	0.943	0.9103	0.943	0.9012	0.941
Rtc (ohms•cm ²)	1163	1192	3991	3683	1763	1674	2572

En esta Tabla de datos, se puede ver la resistencia de la solución (R_s), en la que no presenta cambios significativos en magnitud, ya que estas oscilaron de 0.0432 a 0.49365 ohms \cdot cm² y con la presencia de valores negativos. Dicha variabilidad posiblemente estuvo influenciada por cambios en el medio de cultivo. Por otra parte dicho valores debido a su magnitud, no presentaron obstáculo para que se llevara a cabo el transporte de masa del seno de la solución a la interfase metal-medio, por lo cual no se tuvo inferencia en los procesos de corrosión.

Por otra parte, la magnitud de la R_s no presentó influencia en los valores de la R_{tc} cuando estos fueron sustraídos para obtener los valores de R_p en las diferentes curvas de impedancia.

En tanto que los parámetros relacionados con la capacitancia de la doble capa (C_{dl-T} y C_{dl-P}), para el primero sus magnitudes oscilaron de 0.0003044 a 0.0005637 farads, mientras que el segundo parámetro varió de 0.89318 a 0.943, dada dichas cifras se puede indicar que no presentaron variaciones trascendentales en sus valores.

En relación a los valores registrados para la R_{tc} , estos presentaron algunas variaciones interesantes, ya que en las primeras tres lecturas registran incrementos irregulares, posteriormente las lecturas siguientes presentan una disminución también irregular, finalmente en la última lectura, se logra ver una tendencia de incremento en magnitud de este parámetro. Este comportamiento está indicando de la formación y reacomodamiento de alguna posible película de material inorgánico formada en la superficie del material.

6.2.4.3.2.4 Datos de R_p , i_{corr} , V_{corr}

En la tabla 10, se presenta la información de i_{corr} y V_{corr} , que fueron deducidas a partir de la resistencia a la polarización (R_p) y la relación de Stern-Geary (ec.40)[83, 84]. Mientras que los cálculos de la V_{corr} . Se utilizó la ecuación 37.

Tabla 10. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, en CER a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Transcurso de la prueba en días							
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	1162.957	1192.502	3991.115	3682.506	1762.506	1673.888	2571.233
i_{corr} ($\text{A} \cdot \text{cm}^2$)	2.2357E-05	2.1803E-05	6.5145E-06	7.0604E-06	1.4752E-05	1.5533E-05	1.0112E-05
V_{corr} (mpa)	1.698343	1.656265	0.494874	0.536346	1.120620	1.179947	0.768153

En relación a los datos que se presentan en la tabla anterior, se presenta la interrelación hecha para obtener los parámetros de proceso de corrosión. En estos se puede indicar que a medida que se incrementa la R_p , disminuye tanto la i_{corr} como la V_{corr} , este movimiento está en función al transporte de masa y de carga que hacen que las reacciones sean lentas y la velocidad de corrosión disminuya tal como se aprecia en los valores que se presentan la Tabla 10.

De acuerdo a los valores registrados, se indican que se presentaron dos periodos en los que la velocidad de corrosión fue alta para la prueba y estos fueron los primeros 5 días y posteriormente del 20 al 25. En el primer período la velocidad de corrosión registrada posiblemente estuvo influenciada a las condiciones iniciales de prueba, donde vestigios de especies agresivas estuvieron incidiendo en dicho proceso. Mientras que en el segundo período, es posible que la velocidad de corrosión estuvo asociado con algún reacomodo o desprendimiento de película de la superficie del metal.

6.2.4.3.2.5 Relación del comportamiento entre CEE y CER

Por otra parte y con la finalidad de conocer el desempeños de los microorganismos sobre la superficie metálica protegida catódicamente con $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, se conjuntaron la información de las dos celdas de evaluación (*CEE* y *CER*), a fin encontrar diferencias en los procesos de corrosión.

Para tal fin en la Tabla 11, se presentan los valores de R_p y V_{corr} de ambos sistemas, esto a fin de comparar comportamientos en estas variables en presencia y ausencia de *BSRs*.

Tabla 11. Comportamiento de los parámetros de R_p y V_{corr} en los sistemas de evaluación *CEE* y *CER* a $-850\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

		Transcurso de la prueba en días						
ajuste de Datos:		1	5	10	15	20	25	30
<i>CER</i>	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	1162.957	1192.502	3991.115	3682.506	1762.506	1673.888	2571.233
	V_{corr} (mpa)	1.698343	1.656265	0.494874	0.536346	1.120620	1.179947	0.768153
<i>CEE</i>	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	3529.768	374.370	623.376	842.635	784.627	3110.681	3469.815
	V_{corr} (mpa)	0.5595	5.2759	3.1684	2.3439	2.5172	0.6349	0.5692

En relación a los valores de R_p de *CER* y *CEE* que se presentan en dicha Tabla, puede indicarse que en ambos sistemas de evaluación se evidencia la formación de películas sobre la superficie del metal pero de origen diferente, ya que la película en *CER*, se forma posiblemente de material fino que precipitó y se fue depositando y adhiriendo a la superficie del metal formando finas películas. Mientras que las películas formadas en *CEE*, se iniciaron por una colonización por microorganismos y estos segregaron polisacáridos conformando las biopelículas, estas fueron heterogéneas, y presentaron crecimiento, movimientos, maduración, entre otras características. Por estas cualidades la afectación a R_p fue diferente en mecanismo y magnitud, para los dos sistemas de evaluación.

En relación al parámetro de V_{corr} , se observa que este fue mayor en el sistema *CEE* que en *CER*, ya que este parámetro oscilo de 0.5595 hasta 5.2759 mpa en *CEE*, mientras que en *CER*, la velocidad de corrosión varió de 0.494874 a 1.698343 mpa.

En la celda de evaluación el máximo valor de V_{corr} se registró el día 5 y los valores de este parámetro fueron disminuyendo hasta el final de la prueba. Este comportamiento se asocia con los procesos de colonización, crecimiento celular, actividad enzimática y metabólica, así como la generación de las primeras biopelículas que se caracterizaron por ser permeables, amorfas y heterogéneas.

Estas eventualidades que se dieron sobre la superficie protegida del electrodo de trabajo promovieron que el transporte de carga y masa fuera más activo y las velocidades de reacción a nivel de interfase no presentaron alguna restricción, motivo por el cual se dio el proceso de corrosión en el lapso del día 5 al día 20. Sin embargo, después del 20 y hasta el día 30, la V_{corr} descendió, esto posiblemente se debió a que estas alturas de la prueba, el grosor de las capas de las biopelículas haya aumentado, debido a la incorporación de microorganismos y productos de corrosión en las intercapas, volviéndose más densas y compactas (proceso de maduración), lo que trajo como consecuencia, que el transporte electrolítico del seno de la solución a la interfase y de la interfase a la solución haya disminuido, reflejándose en una caída de la velocidad de corrosión.

Respecto a este parámetro (V_{corr}) en la *CER* el comportamiento fue más homogéneo, ya que solamente se tuvieron dos periodos en donde la velocidad de corrosión fue mayor, el primero se tuvo del día 1 al día 5 alcanzando 1.6983 mpa, esta V_{corr} registrada estuvo dada por las condiciones de montaje de la celda, donde posiblemente reminiscencias de alguna especie agresiva reacciono, provocando la corrosión registrada.

El segundo periodo en que la corrosión ascendió a 1.17995 mpa, fue del 20 al 30. Esta velocidad en corrosión posiblemente estuvo asociada algún movimiento o ruptura de la película formada.

Es notorio el comportamiento de la velocidad de corrosión en los dos sistemas de evaluación, en la cual se ve la influencia de BSRs sobre los procesos de corrosión y refleja la deficiencia de la protección catódica para el control de la corrosión en el sistema.

6.2.4.4 Corriente de protección (i_p)

Otra prueba diseñada para este estudio fue la corriente de protección para cada uno de los sistemas de ensayo *CEE* y *CER*.

6.2.4.4.1 Descripción del comportamiento de i_p en *CEE* a $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

Esta prueba se basó en el registro de la corriente suministrada a los electrodos trabajo de cada una de las celdas de evaluación, cuando se aplicó un potencial de $-850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, dado que los sistemas son similares y solamente se diferencian por la presencia o ausencia de *BSRs* en el sistema, así que cualquier variación registrada en demanda de corriente será atribuida a la actividad bacteriológica.

En la Figura 22, se muestra de manera gráfica el comportamiento de la corriente de protección (i_p) que se aplicó al electrodo de trabajo de cada celda (*CEE* y *CER*), durante el transcurso de las pruebas, se observó que en *CEE* el suministro de corriente al sistema por el potencial de protección se inició con $2.0\text{E}-05 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ y presentó algunos altibajos hasta el día 18, de aquí en adelante la i_p decae paulatinamente hasta el término de la prueba.

Los movimientos que tuvo este parámetro en el transcurso de la experimentación, se relacionan con la actividad que tuvieron las *BSRs*, ya que el potencial de protección suministró la corriente necesaria solamente para proteger la superficie del electrodo, pero si la actividad microbiana a través del sistema enzimático y metabólico removió mayor cantidad hidrógeno reducido en el límite de la interfase, entonces se logró generar una despolarización momentánea, que fue cubierta con mayor suministro de corriente o flujo de electrones, motivo por el cual se haya registrado estas variaciones en demanda de corriente durante la experimentación, así mismo se observa una disminución paulatina de este parámetro en la tercer semana, esta disminución obedece a la formación, crecimiento de biopelículas y depósitos de sulfuros y otros sedimentos que en conjunto disminuyen el transporte de masa y flujo de corriente e incremento en la R_{tc} y R_p en el sistema.

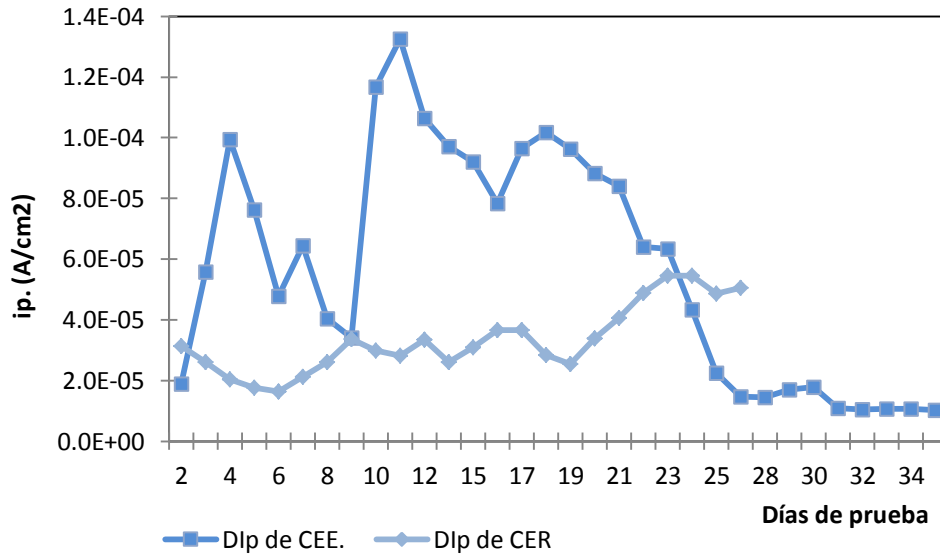


Figura 22. Comportamiento en el tiempo de la corriente de protección en la CEE y CER a - 850 mV_{Cu/CuSO4}

6.2.4.4.2 Descripción del Comportamiento de i_p en CER a - 850 mV_{Cu/CuSO4}

Por otra parte, con respecto a la curva de la i_p en la CER, esta estuvo oscilando entre los 0.02 a los .04 mA•cm⁻², encontrándose por debajo de la curva presentada por la CEE, este parámetro mostró también una leve variabilidad en su comportamiento en el transcurso de la experimentación, esto posiblemente fue debido a la formación de una película de sedimentos sobre la superficie del electrodo que ocasiono pequeños ajustes en la demanda de corriente por la actividad química del sistema, al final de la prueba, se manifestó una tendencia de incremento, esta demanda en i_p , posiblemente se debió a un proceso de corrosión, originado por algún movimiento o rompimiento de la posible película formada.

6.2.5 Análisis de superficies expuestas a - 850 mV_{Cu/CuSO4}

El análisis de superficie y los barridos se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA), este tipo de microscopía permite observar

directamente a los microorganismos “*in situ*” sin dañar tanto a los microorganismos como a las biopelículas y los productos de corrosión que se formaron en la superficie del electrodo de trabajo.

Se realizaron dos tipos de análisis, el primero se aplicó al electrodo recuperado de cada experimentación a fin de observar *BSRs*, biopelículas y productos de corrosión en la superficie del biopelícula formada.

El segundo análisis se practicó a la superficie del electrodo para determinar grado y tipo de daño de la superficie, para ello fue necesario retirar depósitos y lavar químicamente la superficie de los electrodos de trabajo.

6.2.5.1 Análisis de superficie de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión sobre el electrodo de trabajo en la CEE.

El análisis de superficie *in situ* se llevó a cabo a través de varios barridos a diferentes ampliaciones, a fin de encontrar evidencias de estructuras de biopelículas como la que se presenta en la Figura 23, en la que se alcanzan apreciar los cúmulos elevados de porciones de biopolímero y que en su interior y alrededor se alcanzan a distinguir algunos somas de *BSRs*. En la Figura 24, es un barrido que llevó a cabo a 3000 X, en la cual se denota la morfología básica del microorganismos (bacilos curvos y rectos de 3 a 6 μm), los cúmulos o densidades de estos y además en la base o fondo se observa una capa “sólida” de sulfuros y el agrietamiento que da idea del grosor o profundidad de la biopelícula.

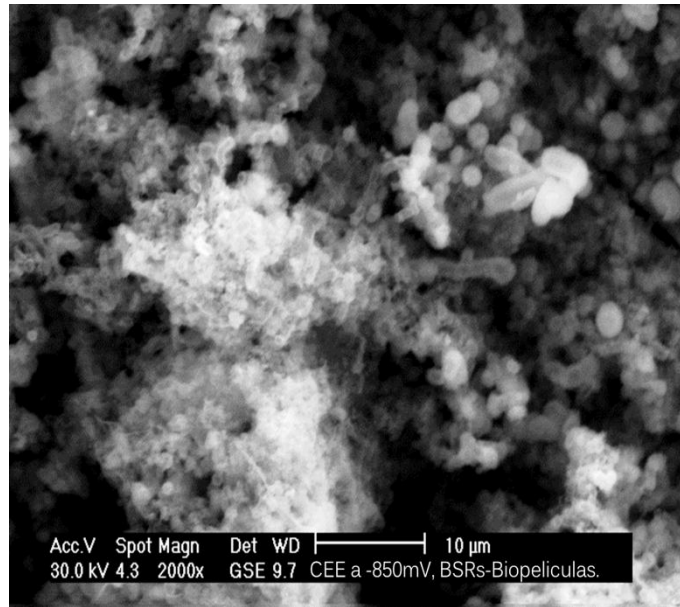


Figura 23. Muestra cúmulos de biopelículas y microorganismos

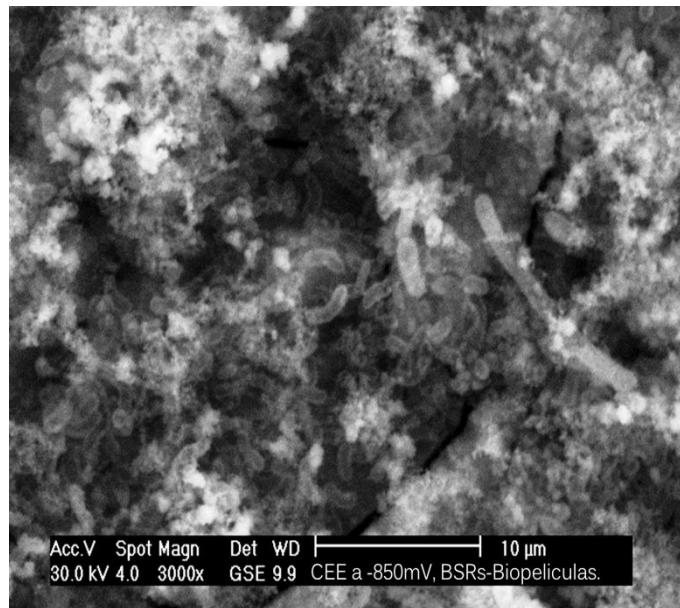


Figura 24. Muestra morfología de microorganismo y presencia productos de corrosión.

6.2.5.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.

En las Figuras 25 y 26, se muestran dos ampliaciones del área dañada por corrosión localizada, en la primera (Fig. 25) se tomó a 300x, a fin de tener una mayor visualización del área dañada, mientras que en la Figura 26, se presenta una ampliación de 1000x, en esta se aprecia tanto el grado y forma de corrosión que presentó la superficie del electrodo de acero *API XL52*, protegido con $-850\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$ y que estuvo inmerso en medio de cultivo con *BSRs* por un periodo de 30 días de prueba.



Figura 25. Muestra el daño por corrosión de la superficie del metal expuesta a $-850\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

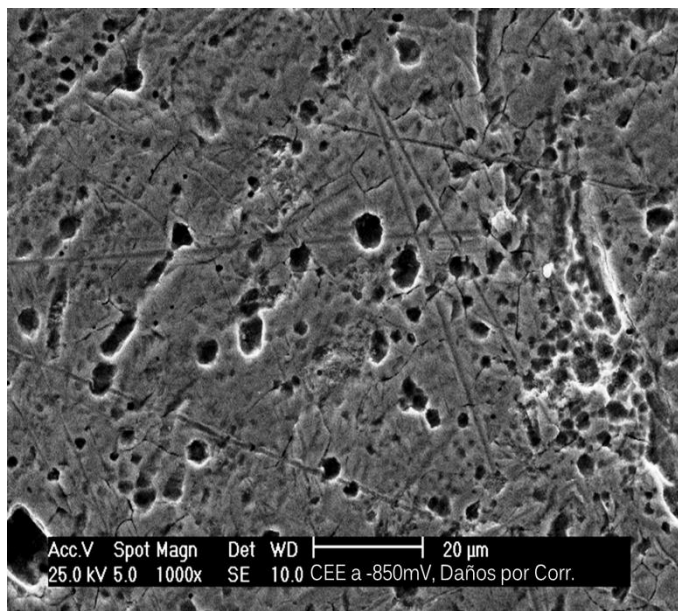


Figura 26. Daño por corrosión localizada de la superficie expuesta a $-850\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

6.2.5.3 Análisis de superficie del daño por corrosión al electrodo de trabajo de la CER.

En la Celda electroquímica de referencia solamente se presentan las imágenes de la superficie del electrodo de Acero *API XL52* que estuvo inmersa en medio de cultivo y protegido con $-850\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$. Debido a la ausencia de *BSRs* en el sistema, no se consideró conveniente el análisis *in situ*.

En las Figuras 27 y 28, se muestran dos ampliaciones de las áreas que estuvieron expuestas al medio de cultivo por un periodo de 30 días, en ampliación de 300x se observa las ralladuras del lijado y pequeños puntos de indicios de posible corrosión localizada. En la ampliación de 1000 x, se observa las ralladuras acompañadas por corrosión generalizada que se distingue por zonas poco profunda, así mismo se diferencian puntos de corrosión localizada que no prosperaron.

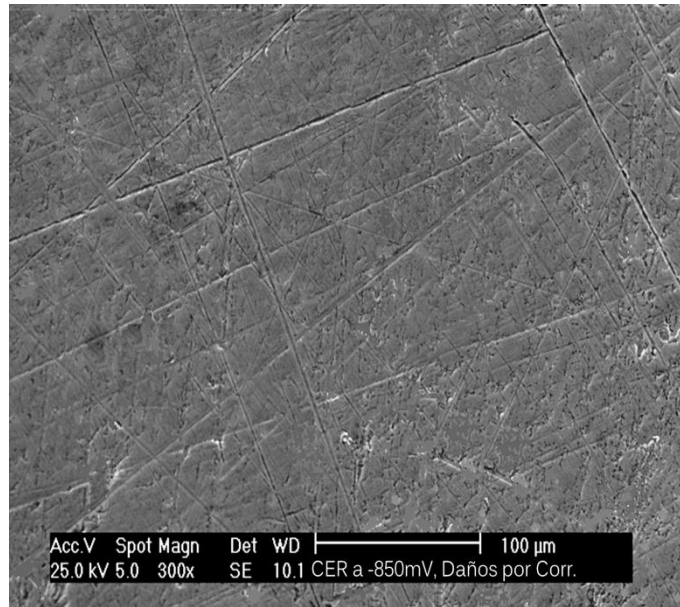


Figura 27. Superficie sin daño aparente por corrosión

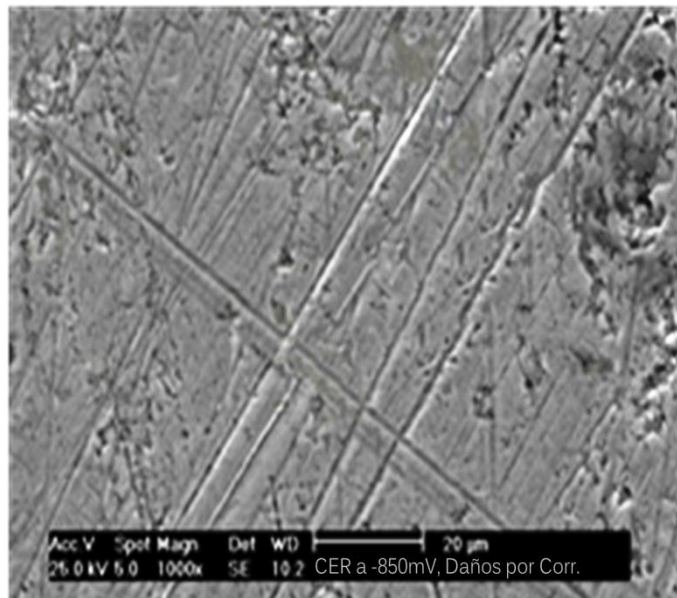


Figura 28. Superficie con zonas con corrosión generalizada sin daño por corrosión localizado

6.3. Potencial de protección de $-900 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

La información experimental de la celda electroquímica de evaluación (*CEE*), como de la celda electroquímica de referencia (*CER*), han sido agrupados en parámetros físicos, bacteriológicos, químicos, electroquímicos y análisis de superficie.

6.3.1 Parámetros Físicos

Los parámetros físicos están compuestos por las mediciones de *pH*, y *Eh* que fueron registrados tanto en *CEE* como en *CER*, a fin de detectar algún cambio significativo que afectara el desarrollo y desempeño de las *BSRs* en el sistema de evaluación.

6.3.1.1 Comportamiento del *pH*

En el gráfico de la Figura 29, se presenta los registros de *pH* en función del tiempo en el medio de cultivo de las celdas *CEE* y *CER*, evaluado durante el desarrollo de la prueba, a fin de registrar cambios significativos en *pH* inherentes a la actividad de las *BSRs* o bien al generado debido a las posibles reacciones de superficie que hayan ocurrido por la protección catódica sobre el electrodo de trabajo, estas fueron descritas en el set experimental del potencial de $850 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

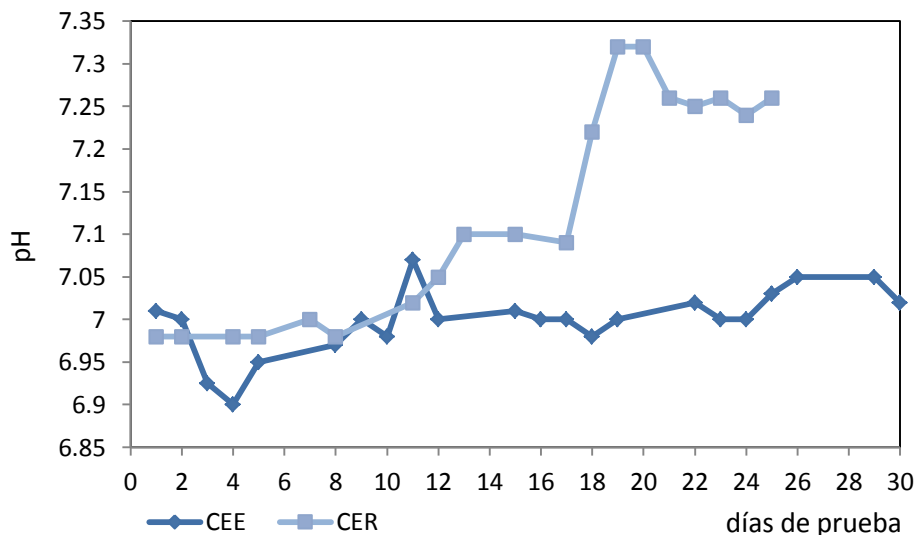


Figura 29. Comportamiento del *pH* referente al tiempo en el medio de cultivo a $-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

En la *CEE*, se observa que el *pH* del medio no presentó gran variación, ya que este oscilo de 6.90 a 7.1, excepto por una la ligera disminución ocurrida entre el día 3 y 7, que pudo haber estado influenciado por el crecimiento súbito de la población de *BSRs* que ocurrió en ese período de tiempo, aunque en el *pH* no se vio reflejado en toda su intensidad, esto debido a que el medio de cultivo puede interactuar como una especie de amortiguador para este parámetro.

En relación a esta variable en las celdas, se observa que en la *CEE* este parámetro se mantuvo en la zona ácida, con el desarrollo de ligeramente acidez. La acidez detectada posiblemente fue generada por la actividad microbiana, debido al dióxido de carbono, bicarbonato, sulfhídrico, entre otros iones que pueden aportar cierto grado de acidez.

En tanto que el *pH* en la *CER*, mostro una tendencia hacia la zona alcalina, esto debido al posible efecto de la actividad de la protección catódica sobre el electrodo de trabajo, esta alcalinización ha sido reportada en la literatura debido a la posible formación de iones oxhidrilo, con subsecuentes reacciones de precipitaciones de carbonatos [85].

6.3.1.2 Comportamiento del potencial redox (*Eh*).

En este set de pruebas efectuadas a -900 mV , se indicó que el ambiente donde se desarrollaron las *BSRs*, se caracterizó por ser proveedor de electrones al electrodo normal de hidrógeno conociéndose como media celda con potencial redox negativo.

La importancia de este parámetro radica en la regulación de muchos compuestos químicos presentes en cuerpos de agua naturales, así mismo sucede en el entorno de los microorganismos como al interior del mismo, donde gran parte de las reacciones que llevan a cabo están sujetas a un régimen de esta naturaleza.

En relación a lo anterior, el *Eh* se consideró de gran interés llevar a cabo registros de potencial redox (*Eh*), a fin de conocer las condiciones ambientales en las celdas experimentales para que estas fueran favorables al desarrollo de las *BSRs*.

Las celdas experimentales (*CEE* y *CER*), fueron ambientadas desde el inicio con potenciales redox de -425 y -418 mV respectivamente. Durante los primeros 15 días en la *CEE*, el potencial *Eh* se fue incrementando hasta alcanzar los -523 mV , posteriormente tendió a volver a su origen, manteniendo al medio de cultivo dentro del rango de 418 a 454 mV . Motivo por el cual se consideró que las condiciones en las celdas de evaluación fueron propicias para el desarrollo de las *BSRs*.

Mientras que las condiciones redox en la *CER*, se tuvo una tendencia a la baja en los primeros días de prueba, alcanzando un mínima (-235 mV), no obstante después se logró recuperarse, manteniéndose alrededor de los 400 mV hasta el final de la prueba, este comportamientos en potencial redox se muestran en la Figura 30.

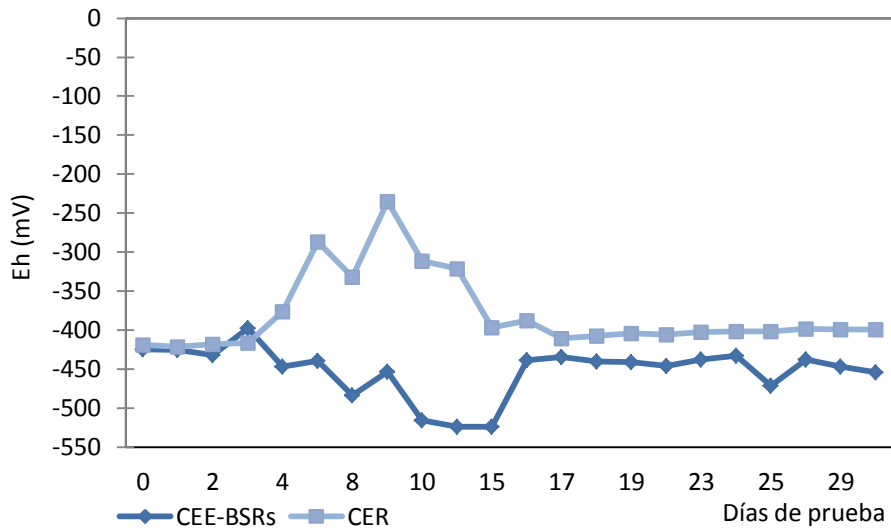


Figura 30. Comportamiento del *Eh* en relación al tiempo en el medio de cultivo a $-900\text{ mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$

6.3.2 Parámetros Bacteriológicos

6.3.2.1 Densidad poblacional (D_p)

En este set de pruebas se logró mantener más homogéneo la densidad poblacional de *BSRs*, ya que esta se inició con crecimiento logarítmico que se mantuvo durante los primeros 7 días de prueba, al octavo día se detectó una ligera caída influenciada por el agotamiento de nutrientes, ya que esta después del noveno día, se logró restablecer la densidad poblacional, posteriormente se alcanzó un equilibrio en la densidad de microorganismos y esta se mantuvo hasta el final de la prueba, punto en el cual la población de microorganismo bajó ligeramente, tal como se puede apreciar en la gráfica de la Figura 31.

Es importante señalar que en todos los registros de la densidad poblacional de *BSRs* que se llevaron a cabo en el transcurso de la prueba, no se logró detectar daño alguno sobre la población de *BSRs* debidas al potencial de $-900\text{ mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$ aplicado al electrodo de trabajo durante la prueba.

En este gráfico se incorporó la curva de *Eh*, con la finalidad de visualizar la interdependencia del desarrollo de *BSRs* con respecto a las condiciones de (*Eh*).

Por otra parte, se aplicó la técnica de cultivo continuo [86], con el propósito que la curva de crecimiento se mantuviera durante la prueba en fase log de crecimiento, esto se logró guardando un equilibrio entre el desarrollo de microorganismos y la reposición de nutrientes al sistemas, cuidando siempre entre otros factores al pH , Eh y la hermeticidad del sistema.

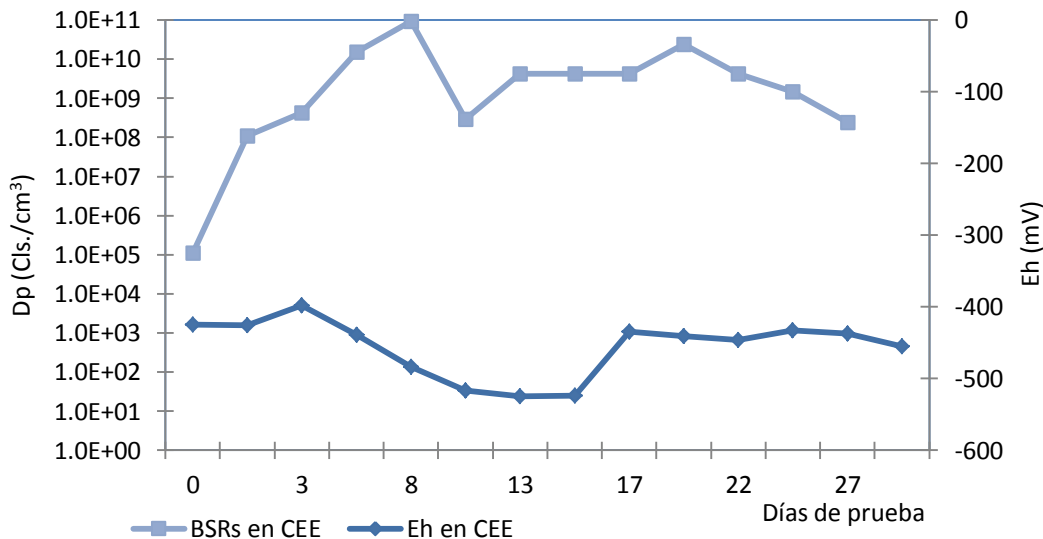


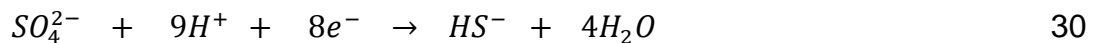
Figura 31. Relación de condiciones de Eh y Densidad poblacional de $BSRs$ en el tiempo a $-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$.

6.3.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico

Es de conocimiento común que el ion sulfato es un compuesto que se encuentra con mayor estado de oxidación, por lo tanto de menor energía y el de mayor estabilidad de la serie de compuestos de azufre. Por lo anterior, las $BSRs$ para su incorporación tienen que activarlo y para ello utilizan a un sistema enzimático que lo conducen a subsecuentes estados de reducción hasta alcanzar la máxima reducción (S^{2-}), esta actividad se lleva a cabo a nivel de membrana celular en concordancia con el sistema enzimático de hidrogenasas que se encargan de transportar al hidrógeno que actúa como proveedor de electrones en los diferentes estadios de reducción del azufre. Al término de la cadena respiratoria el ion sulfuro reacciona con parte de los protones acumulados, para formar al ion sulfhídrico

(HS^-) o bien al sulfuro de hidrógeno (H_2S) que es expulsados al exterior de la célula. La otra parte de la acumulación de iones hidrógeno a nivel de membrana, origina gradientes en concentración conocida como fuerza motriz protónica, capaz de inducir al sistema enzimático ATPasa para llevar a cabo la síntesis de ATP [1].

En este sentido el proceso de la sulfatoreducción se involucra en la transferencia de hasta $8 e^-$, que son utilizados en la reducción de los SO_4^{2-} de acuerdo a la reacción global que se presenta en la ecuación 30.



En algunos estudios de la microbiología [1] [87], se toma a la velocidad de respiración como una medida y un parámetro indicador de la actividad celular, así el consumo de oxígeno evidencia la actividad bacteriana y la vez un indicador en los sistemas aeróbicos, para este estudio el parámetro indicador fue el consumo de sulfatos que manifiesta la actividad metabólica de las $BSRs$. En la Figura 32, se muestran las concentración de SO_4^{2-} y H_2S con respecto al tiempo.

La curva de sulfatos compuesta por diferentes grados de concentración, manifiesta una tendencia de consumo de sulfatos extraordinario, lo cual refleja una actividad metabólica eficiente de las $BSRs$ en la celda CEE , esto a pesar de las reposiciones programadas de cultivo viejo por nuevo al sistema, que no lograron satisfacer totalmente la demanda sulfatos por la población.

Generalmente en desarrollos microbianos existe una relación entre crecimiento y consumo de sustratos y para este caso se nota que a mayor población mayor es el consumo de sulfatos.

Generalmente se indica ([4, 34, 88]) que hay una relación estrecha entre la reducción de sulfatos con la producción de sulfhídrico, sin embargo esta relación no es tan estrecha, ya que parte de los sulfatos son usados para satisfacer la demanda de azufre estructural de la célula y la otra la utiliza como un receptor electrones en la cadena respiratoria. No obstante, en el gráfico 32 la producción de sulfhídrico es muy irregular pero se observa una tendencia en incrementar su

concentración en el medio, esto a pesar que parte del sulfhídrico producido es captada por el hierro en una reacción de precipitación.

Con base en los datos de los parámetros registrados (D_p , SO_4^{2-} y H_2S), a lo largo del desarrollo experimental, no se logró detectar alguna discontinuidad debida a la injerencia del potencial ($-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$), esto se puede apreciar en las Figuras 31 y 32.

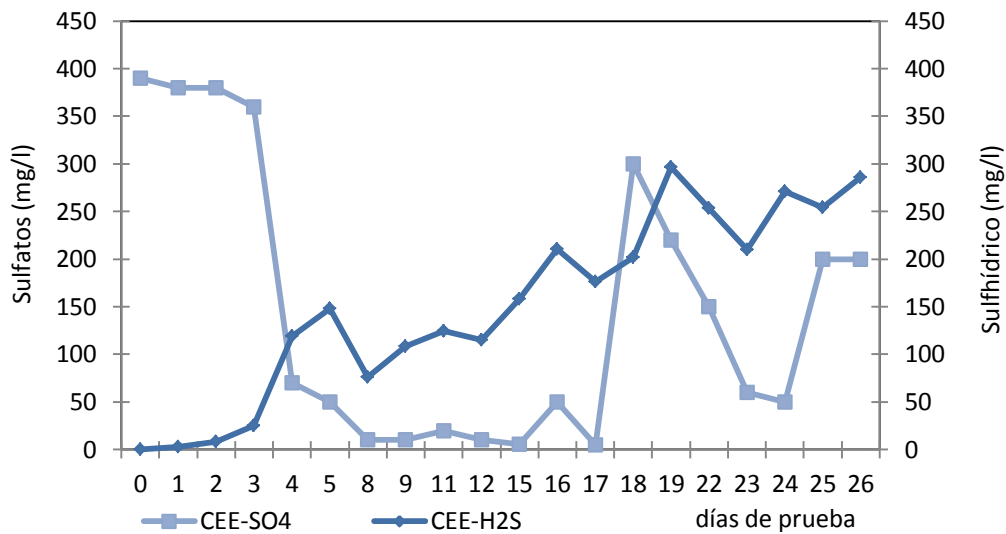


Figura 32. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por *BSRs* referente al tiempo en que la prueba se llevó a cabo a $-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

6.3.3 Parámetros químicos

Los parámetros considerados en este esquema, fueron la alcalinidad y la concentración del ion ferroso (Fe^{2+}). La alcalinidad registrada puede proceder de la actividad de los microorganismos por de las *BSRs* y la generada por la *PC* aplicada al electrodo de trabajo.

La alcalinidad fue considerada debido a que en la protección catódica, puede generar cierta alcalinidad en la superficie protegida y difundir en el entorno donde se aplica, esta alcalinidad se genera debido a la reducción de especies químicas presentes en el sistema o por cambios en el *pH* hacia la zona alcalina [89].

En base al potencial aplicado, la alcalinidad puede tornarse severa y afectar la viabilidad y el número de microorganismos presentes en el sistema[1].

En relación al ion ferroso (Fe^{2+}), se consideró este parámetro a fin de registrar cualquier concentración de este ion en el medio a consecuencia de posibles oxidaciones que puedan llevarse a cabo en la superficie del electrodo de trabajo protegido catódicamente y con base a su presencia, tener evidencia de la eficiencia de la protección o de la influencia de las *BSRs*.

6.3.3.1 Alcalinidad

Como ya se ha comentado que la alcalinidad está en función del *pH* en el sistema y en base a este se conoce la especie o las especies químicas que están regulando el grado de la alcalinidad en el sistema *CEE*. Para este caso y de acuerdo a esta variable, el *pH* promedio registrado en este sistema fue de 6.96. En base a este valor, se puede indicar que el ion bicarbonato (HCO_3^-) fue la especie química que reguló al *pH* en la celda.

La alcalinidad generada en la *CEE* y que se muestra en la Figura 33, se observa que en la mayor parte de la curva, presenta incrementos moderados en su concentración, esto posiblemente se debió a la liberación de CO_2 debido por la actividad metabólica, el dióxido de carbono soluble y reacciona con el agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3), este es muy reactivo e inmediatamente reacciona y se transforma con algunas sales del medio, dando lugar a diferentes bicarbonatos (sodio, potasio, calcio e inclusive con hierro), además el ion bicarbonato funcionó como un regulador o buffer de *pH*. En este sentido, fue el bicarbonato quien promovió la alcalinidad en el medio. La alcalinidad generada por la actividad microbiana no presentó algún efecto que ocasionara problemas sobre el crecimiento de la densidad poblacional de *BSRs*.

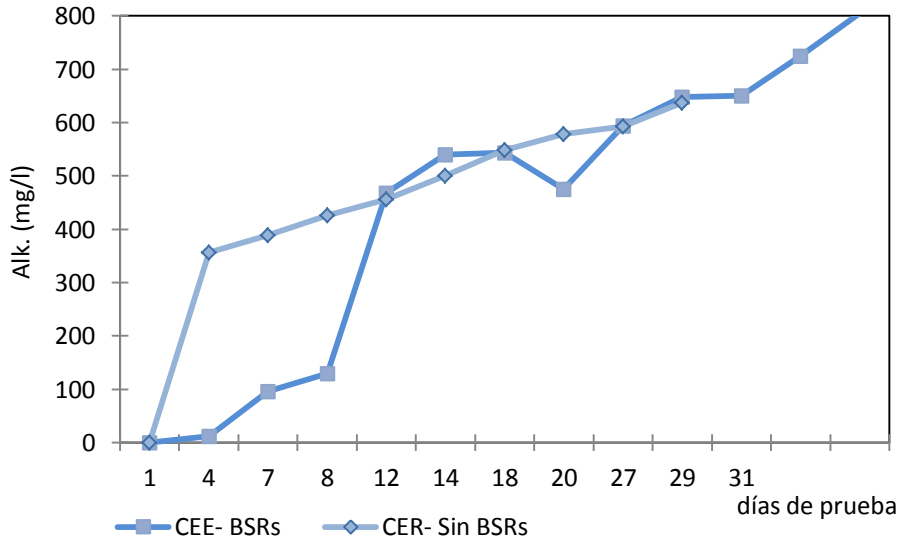


Figura 33. Comportamiento de la alcalinidad en el tiempo en los sistemas *CEE* y *CER* a $-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

Por otra parte, en la curva de *CER*- sin *BSRs*, se observó una fuerte alcalinización desde el principio debida a la protección de los $-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$ al electrodo de trabajo, la alcalinización en el sistema posiblemente se debió al consumo de restos de oxígeno presentes en el sistema y consumidos por reacciones catódicas, dando lugar formación de iones oxhidrilo en el sistema de acuerdo a la reacción que se da a continuación:



Sin embargo la formación de estas moléculas en el sistema es momentánea ya que estas en presencia de bicarbonatos del medio neutralizan la actividad de los iones oxhidrilo, formando iones carbonato de acuerdo a siguiente reacción.



En base al pH local (7.22) los iones carbonatos permanecieron en solución, ya que estos precipitan en pH de 10. [85].

De acuerdo a los resultados de este parámetro en ambos sistemas (*CEE* y *CER*), la alcalinidad desarrollada en la *CER* fue ligeramente mayor a la desarrollada en *CEE*, sin embargo en la celda *CEE*, no se observó alguna disminución en la densidad poblacional por daños de dicha alcalinidad.

6.3.3.2 Hierro (Fe^{2+})

La propuesta de evaluar al ion ferroso (Fe^{2+}) en el transcurso de las pruebas llevadas a cabo a potenciales de $-900 mV_{Cu/CuSO_4}$ en los dos sistemas de evaluación (*CEE* y *CER*), a fin de conocer el control de los procesos de corrosión por la actividad de la *PC* en presencia y ausencia de *BSRs*. Considerando que este ion procede de la primera de oxidación del hierro liberado de la estructura cristalina de la superficie del metal, que permaneció protegido catódicamente en el transcurso de la prueba.

En la Figura 34, se muestra los resultados del análisis del ion ferroso tanto en la *CEE* como en *CER* durante el desarrollo experimental, en la curva *CEE- Fe*, en principio la concentración de este ion fue muy similar al liberado en la *CER*, sin embargo después del octavo día, se incrementó la concentración del Fe^{2+} y ascendió de 0.65 hasta 1.95 mg/l, diferenciándose notablemente de la curva de referencia, del onceavo día hasta el día 27, el incremento del ion ferroso fue en constante incremento. Del 27 hasta el término de la prueba, la concentración del ion ferroso se mantuvo constante (3.7 mg/l). En tanto que en la *CER* la evaluación de este ion se mantuvo ligeramente por encima del valor de la unidad (1.15 mg/l), hasta que finalizó la prueba.

Las diferencias en concentraciones de este ion en ambas celdas (*CEE* y *CER*), estuvo dado por las diferentes estancias de la actividad directa e indirecta de las *BSRs*, sobre la superficie del acero *API XL 52*, las cuales estuvieron protegidas con el potencial de $-900 mV_{Cu/CuSO_4}$. El proceso de desestabilización de la *PC* por

la actividad de las *BSRs*, ya fueron dadas y comentadas tanto en marco teórico como en la discusión de resultados del set de pruebas correspondiente a -850 mV.

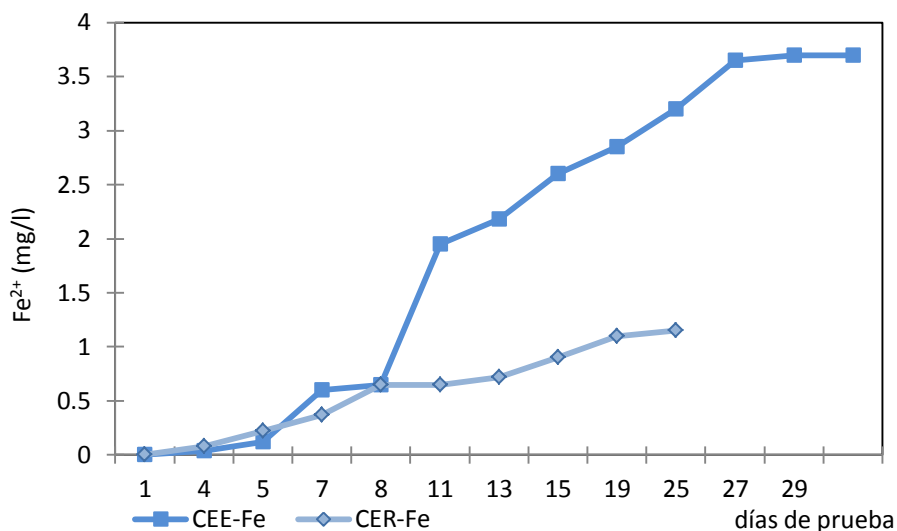


Figura 34. Variación en la concentración de Fe^{2+} en el tiempo en los sistemas *CEE* y *CER* debido a la oxidación del acero *API XL-52* protegido a $-900 mV_{Cu/CuSO_4}$

Hasta el momento, se han revisado los diferentes parámetros físicos (ambientales), químicos y microbiológicos en que estuvieron expuestos los electrodo de trabajo que fueron protegidos con - 900 mV, a continuación se presentan las diferentes pruebas que fueron utilizadas para determinar el posible daño y la velocidad en la que ocurrieron en la superficie del acero *API XL 52* por la inferencias de dichos factores.

6.3.4 Parámetros electroquímicos

6.3.4.1 Técnica gravimétrica

Esta técnica es utilizada para determinar la velocidad de corrosión que presentaron los electrodos al ser sumergidos en el medio de cultivo con y sin microorganismos y no está contemplada dentro de las técnicas electroquímicas, pero proporciona soporte de la tendencia de los procesos de corrosión.

6.3.4.2.1 Cálculos para determinar velocidad de corrosión.

El cálculo de la velocidad de corrosión por esta técnica se llevó a cabo aplicando la fórmula de la ecuación 34 y aplicando los datos físicos correspondientes al electrodo de trabajo (E_t). Los datos de corrosión obtenidos se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Velocidad de corrosión V_{corr} mediante técnica gravimétrica -900mV.

W_i (g)	W_f (g)	ΔW (g)	Área (cm^2)	Densidad (g/cm^3)	Tiempo (Hrs)	V_{corr} (mpa)	V_{corr} (mma)
Celda Electroquímica de Referencia (CER).							
5.5031	5.5006	0.0025	6.01615	7.86	840	0.2171	0.00551
Celda Electroquímica de Evaluación (CEE).							
5.0564	5.0513	0.0051	6.01615	7.86	792	0.4698	0.01193

La velocidad de corrosión detectada por esta técnica fue relativamente baja, ya que en ambos casos estuvieron por debajo de la unidad de corrosión, sin embargo la velocidad de corrosión para el electrodo de trabajo en la *CEE*, puede indicarse que se tuvo hasta un 46% en velocidad de corrosión por encima al valor registrado en el electrodo de trabajo de la *CER*. Este valor porcentual puede ser atribuido a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras en el sistema.

Por otra parte, la velocidad de corrosión registrada por esta técnica, se considera como un promedio de las eventualidades de corrosión ocurridas en la superficie del electrodo de trabajo, que estuvo protegido con 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$. Por esta razón, la pérdida de material con respecto al tiempo, se llevó a cabo de forma longitudinal a la superficie y no transversal, es decir que dicha la técnica solo registró corrosión generalizada o uniforme.

Dentro del ámbito de evaluación del impacto a la superficie del electrodo de trabajo por la actividad microbiana, se utilizó la técnica de Resistencia a la polarización R_p y la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (*EIS*), aunada con análisis de superficies mediante *MEBA*.

6.3.4.2 Resistencia a la Polarización Lineal (R_p).

A fin de determinar los cambios que se estuvieron llevando a cabo en la interfase metal-biopelícula-BSRs-medio de cultivo, se consideró a la técnica electroquímica de R_p para determinar la velocidad de los procesos de oxidación y reducción en dicha interfase en los electrodos de ambas celdas experimentales (CEE y CER).

La técnica de R_p consiste en la aplicación de un sobre potencial, respecto al potencial de equilibrio, lo suficiente pequeño para no alterar al sistema, pero el necesario (± 20 mV), para conocer el comportamiento de los procesos de corrosión en la superficie del electrodo. Esta técnica es complementaria y ampliamente utilizada en diferentes estudios de corrosión y su aplicación depende del conocimiento de sus características.

6.3.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en CEE y CER a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$.

Mediante la pendiente de la curva (potencial- corriente), fue determinada la R_p , considerada como la medida de la resistencia que ofrece la superficie de metal al paso de la corriente.

6.3.4.2.1.1 Cálculos para determinar velocidad de corrosión

Los valores obtenidos de la pendiente (R_p), se aplican en la ecuación 35, para calcular la densidad de corriente de corrosión (i_{corr}), considerando el coeficiente Stern-Geary.

Los datos de (i_{corr}) obtenidos en la ecuación 35, se sustituyen en la ecuación 37, para obtener la velocidad de corrosión (V_{corr}) en cada una de las lecturas que fueron obtenidas en el transcurso de la prueba y que se presentan en forma gráfica en la Figura 35.

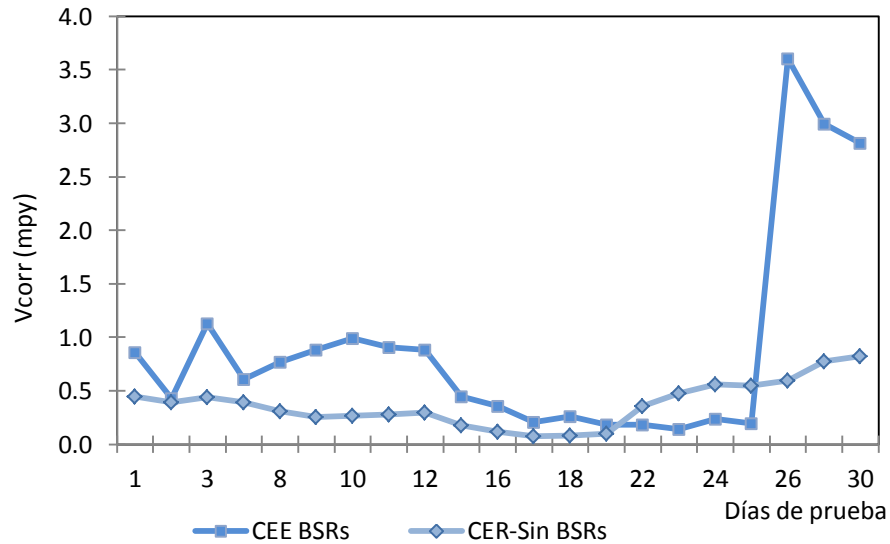


Figura 35. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero *API XL-52* en *CEE* y *CER*, a $-900 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$.

6.3.4.2.1.2 Celda electroquímica de evaluación CEE

En la Figura 35, se muestran los resultados de las velocidades de corrosión en milésimas de pulgada por año (mpa), obtenidas en los electrodos de las celdas electroquímicas de evaluación y de referencia, observando que la V_{corr} en *CEE* vario desde 0.182 hasta 3.602 mpa, mientras la V_{corr} en la *CER*, la variación se dio 0.0733 hasta 0.6410 mpa, se registró velocidades de corrosión por debajo de la unidad.

6.3.4.1.2.3 Celda electroquímica de evaluación CER

El electrodo que se expuso en la *CER*, estuvo bajo condiciones anaerobiosis extremas, *pH* cercano al neutro, ausencia de especies químicas (CO_2 , H_2S y O_2) y solo se presentan algunas sales minerales (cloruros, sulfatos, etc), que posiblemente estuvieran incidiendo en la oxidación de la superficie y promover la baja corrosión registrada. De estas sales las que pudieran aceptar electrones y reducirse bajo ciertas condiciones, son los cloruros de acuerdo al siguiente par de ecuaciones.



En relación a la V_{corr} en la CEE, esta registro baja velocidad de corrosión por esta técnica, posiblemente fue debido la formación temprana de biopelícula y capa de sulfuros sobre la superficie del metal, lo que ocasionó cierto trastorno en el transporte de carga y masa a través de la interfase y en consecuencia disminuyeron las reacciones oxidación y reducción del proceso de corrosión, reflejando toda esta actividad en la V_{corr} determinada, sin embargo después del día 25, la magnitud de este parámetro cambio de 0.193 a 3.602 *mpa*, este cambio posiblemente se debió a un reacomodo de las capas, originando una posible apertura que facilito el movimiento de masa y carga a través de la interfase, provocando incremento en velocidad de las reacciones redox del proceso de corrosión.

6.3.5 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).

6.3.5.1 Resultados de la Impedancia Electroquímica en CEE a - 900 $mV_{Cu/CuSO_4}$

La técnica de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica fue utilizada para determinar los procesos de óxido-reducción que se llevaron a cabo en la interfase metal-biofilm-BSRs, está se aplicó para conocer y determinar las impedancias que se realizaron a diferentes tiempos durante el transcurso de la experimentación.

6.3.5.1.1 Diagrama de Nyquist

Los datos obtenidos de impedancia se presentan en el diagrama de Nyquist de la Figura 36.

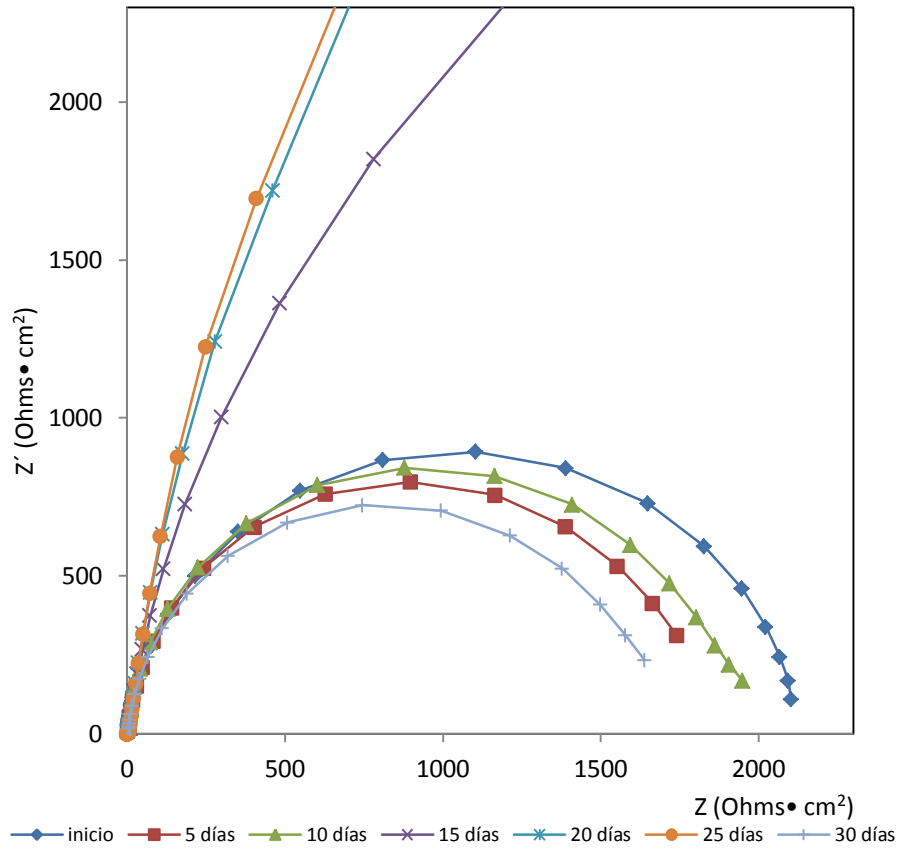


Figura 36 Diagrama de Nyquist en el tiempo muestra las Impedancia determinadas sobre el acero *API XL52* en la *CEE* a $-900 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

En la Figura 36, se muestran las diferentes magnitudes de impedancia que se obtuvieron a lo largo de la experimentación, en esta se puede observar que la impedancia de inicio se localiza por arriba de la impedancia del décimo día, por debajo de esta, se localiza las impedancias del día 10, 5 y 15; por arriba de esta se encuentran las impedancias del día 30, 25 y 20. La localización esta por orden de magnitud.

Por otra parte, se puede observar que las primeras cuatro curvas presentan achatamiento debido al desfase del ángulo de fase, las tres curvas que se muestran por arriba de la curva del primer día, no se alcanza apreciar esta característica, debido a la magnitud que presentan.

Por otra parte, con base a las impedancias mostradas en la Figura 36 y mediante el circuito equivalente que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes necesarios a los valores obtenidos en cada uno de los parámetros del circuito con respecto a cada una de las curvas de impedancia obtenidas durante la experimentación y que se presentan en la Figura 37.

6.3.5.1.2 Diagrama de ajustes

En la Figura 37 y a manera de ejemplo, se exhibe el ajuste de los elementos del circuito equivalente respecto a la impedancia obtenida el día 1 y presentada en la Figura 36, en la misma se presentan los valores obtenidos en la simulación. El ajuste de los elementos del circuito con las demás impedancias fueron los apropiados y similares a los que se presentan en la Figura 37, los valores de estos ajustes se muestran en la Tabla 13.

El semicírculo incompleto corresponde a los datos experimentales, mientras que el semicírculo completo corresponde al ajuste hecho por el simulador.

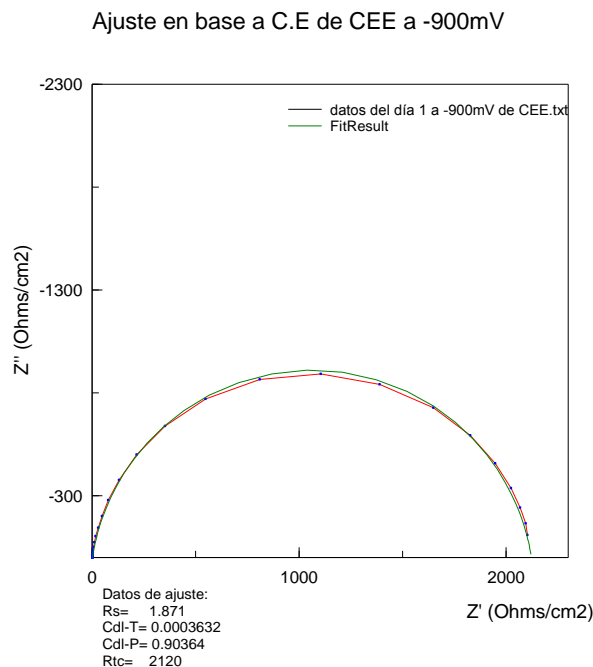


Figura 37. Ajustes a los valores de los parámetros del circuito equivalente a datos de la curva de impedancia correspondiente al día 1 de prueba

6.3.5.1.3 Datos de los elementos de Ajuste

Del proceso de ajuste realizado para cada una de las curvas correspondientes a las impedancias realizadas en la CEE, los valores obtenidos se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente para las pruebas realizadas a de la CEE a $-900\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Datos del ajuste:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
$R_s (\Omega \cdot \text{cm}^{-2})$	0.871	0.50018	0.6602	0.6682	0.6873	0.7174	0.6993
C_{dl-T} (farad)	0.0003163	0.0006046	0.0008893	0.000998	0.000464	0.000994	0.000988
C_{dl-P}	0.89464	0.90951	0.923	0.906	0.891	0.90046	0.9085
$R_{tc} (\Omega \cdot \text{cm}^{-2})$	2132	1944	1803	1670	8664	17953	16751

Con relación a los valores correspondientes a R_s mostrados en la Tabla 13, se consideran de baja magnitud, respecto a la R_{tc} , su comportamiento se mantuvo del orden de 0.50018 a 0.871 ohms.cm², registrando al inicio una variación y después se mantuvo con ligeros incrementos. Esta variabilidad en la R_s posiblemente obedezca al programa de reposiciones de nutrientes durante la prueba o bien a la presencia de microorganismos en el seno de la solución y de sulfuros. No obstante, estas variaciones no presentaron influencia para que se llevaran cabo las reacciones de óxido-reducción en la interfase activa.

Los parámetros (C_{dl-T} y C_{dl-P}) proporcionados por el circuito equivalente están asociados con la capacitancia a nivel de interfase, los valores obtenidos de la simulación para la C_{dl-T} fueron muy bajos, sin embargo los primeros 15 días de prueba, presentaron un incremento notable y solo el 20, se observó un decremento, no obstante las dos últimas lecturas lograron reubicarse y se mantuvieron con leves cambios hasta el final de la prueba. Este parámetro se coliga con algunas propiedades eléctricas y morfológicas de las películas.

El otro parámetro del capacitor (C_{dl-P}), presentó un comportamiento homogéneo, ya que prácticamente no presentaron variaciones a lo largo de la prueba, además proporciona información del estado físico de la superficie del metal, tal como la rugosidad de la superficie.

En relación a la R_{tc} al inicio de la prueba fue alta (2132 ohms.cm²), ésta está asociada a las condiciones iniciales de la prueba, mientras que los valores obtenidos del 5, 10 y 15. Estos valores disminuyen respecto al valor inicial, esta disminución facilitó el movimiento iónico, dando lugar a las reacciones de óxido-reducción en la interfase metal solución, motivada por la colonización de superficies, crecimiento de bacteriano, actividad enzimática y metabólica, así como la generación de biopelículas.

Generalmente cuando un microorganismos coloniza una superficie, el entorno se empieza a modificarse, el transporte iónico y otros elementos comienzan ser más activos. Por lo que esta fase en tiempo y forma se caracterizó por ser muy dinámica.

Con relación a los valores de R_{tc} obtenidos del 20 al 30, estos comienzan a incrementarse notablemente, llegando al final de la prueba con valor elevado de (16751 ohms.cm²). Como ya se ha mencionado estos valores están asociados con el crecimiento celular en las intercapas, incremento en densidad y espesor de las biopelículas, proceso conocido como maduración de la capa de biopelículas. Este proceso trae como consecuencia reducción sustancial en los procesos de transporte y en consecuencia abatimiento de las reacciones de óxido-reducción en la interfase.

Por otro lado y a fin de obtener la R_p , se consideró a la ec. 40, para relacionar la información de impedancia con los procesos de corrosión ocurridos en el límite de fase, además se presenta la información que se desprende de la interrelación de la R_p con la I_{corr} (ec.40) y la V_{corr} se obtuvo aplicando la ec.37, los datos se presentan en la Tabla 14.

6.3.5.1.4 Datos de Resistencia a la polarización, corriente corrosión y velocidad de corrosión.

Tabla 14. Valores de I_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para CEE a $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$.

ajuste de Datos:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	2130.129	1943.511	1802.3398	1699.332	8663.313	17952.283	16750.301
I_{corr} ($\text{A} \cdot \text{cm}^2$)	1.2206E-05	1.3378E-05	1.4426E-05	1.5575E-05	3.0012E-06	1.4483E-06	1.5522E-06
V_{corr} (mpa)	0.92722072	1.01625928	1.07673602	1.18316772	0.22798435	0.11001942	0.11791429

Con base a la información que se muestra en la Tabla 14, se observa la relación inversa que guardan los parámetros de I_{corr} y V_{corr} respecto a la R_p . En este sentido cuando la R_p alcanza valores bajos, la corriente de corrosión, así como la velocidad de corrosión se incrementan, esto debido a la facilidad que las capas de biopelículas en ese momento, permiten al transporte de masa y de carga hacia la fase activa y que no delimitaron a los procesos de óxido-reducción que se llevan a cabo en dicha fase.

La velocidad de corrosión registrada se observa que esta fue baja y se dio desde al inicio, pero esta se incrementó en los primeros 15 días de prueba y alcanza su máximo valor al quinceavo día. Posteriormente se presenta una disminución súbita que se mantuvo hasta el final de la prueba. Estas velocidades en corrosión estuvieron relacionadas a los procesos microbianos descritos.

6.3.5.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a $-900\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

Respecto a la información que se obtuvo de los ensayos de la prueba de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica en la celda electroquímica de referencia (CER), se muestran de manera gráfica a través del diagrama de Nyquis en la Figura 38.

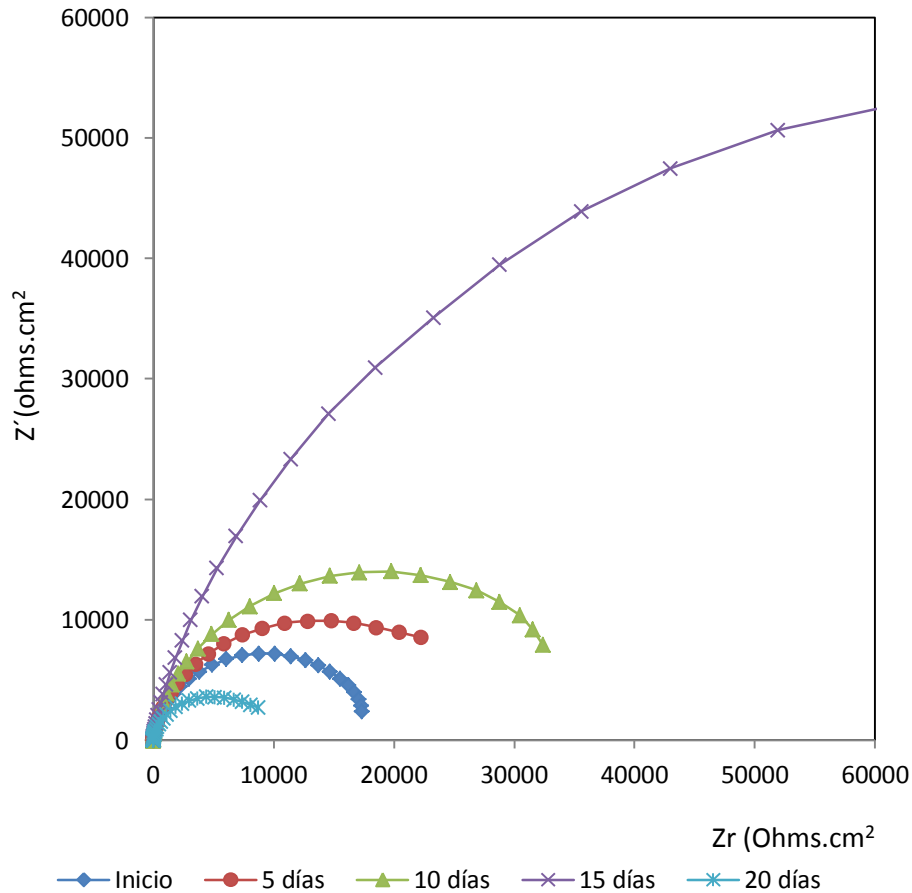


Figura 38. Variación del diagrama de Nyquist en el tiempo, muestra las Impedancia determinadas sobre el acero *API XL52* en *CER* a $-900\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

6.3.5.2.1 Diagrama de impedancias de Nyquist

En el diagrama de Nyquist de la Figura 38, se muestran las diferentes impedancias que se registraron durante los 20 días de prueba. La curva de la impedancia del inicio de la prueba (día 1), se localiza por arriba de la curva correspondiente al día 20, en orden progresivo, se ubican las impedancias de los días 5, 10 y 15. En este sentido, la impedancia de menor valor se obtuvo para el día 20, mientras que el valor máximo de impedancia se obtuvo para el día 15.

Por otra parte, en base a las impedancias mostradas en la Figura 38 y mediante el circuito equivalente que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes

necesarios a los valores obtenidos en cada uno de los parámetros del circuito, ajustándose a cada una de las curvas de las impedancias.

6.3.5.2.2 Diagrama de ajustes

En la Figura 39, se presenta a manera de gráfico el ajuste entre ambos sistemas (parámetros del circuito equivalente e impedancias), así mismo se presentan sus valores. La información obtenida de la adecuación o ajustes para todas las curvas correspondientes a *CER*, se presenta en la Tabla 15.

Los ajustes realizados en las demás impedancias, presentaron ajustes adecuados y similares a los de la Figura 39.

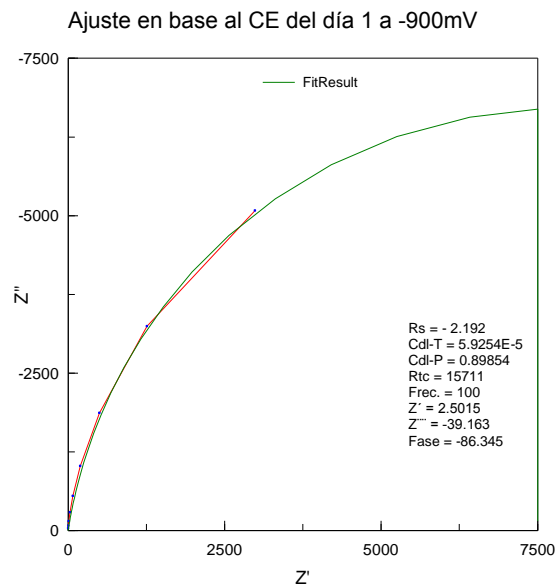


Figura 39. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en *CER*.

6.3.5.2.3 Datos de los elementos de Ajuste

En la Tabla 15, contiene la información de obtenida de los ajustes realizados a los elementos del circuito equivalente, respecto a las impedancias obtenidas en el transcurso de la prueba.

Tabla 15. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en CER a $-900\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

variables del circuito equivalente	Transcurso de la prueba en días					
	1	5	10	15	20	25
R_s ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	-2.192	-2.192	-0.8483	-1.265	0.53957	0.115
C_{dl-T}	5.9254E-5	5.2628E-5	6.0032E-5	6.178E-5	0.000103E-5	0.000361
C_{dl-P} (Farads)	0.89854	0.91232	0.90633	0.92334	0.87917	0.8413
R_{tc} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	15711	26031	19406	46798	7993	119640

En la resistencia de la solución (R_s) que se presentan en la Tabla 15, se puede indicar que fueron pequeños respecto a los valores obtenidos para la R_{tc} , sin embargo presentaron ciertas variaciones que pudieron estar atribuidos a cambios en el medio, pero que no infirieron en los procesos de transporte.

En tanto que los valores de relacionados con la capacitancia de la doble capa, sus magnitudes registradas no presentaron cambios trascendentales y estuvieron oscilando en C_{dl-T} de 5.2628E-5 a 35.295E-5 farads. Mientras que para el parámetro C_{dl-P} , este se mantuvo entre 0.8413 a 0.92334.

En relación a los valores registrados para la R_{tc} , estos presentaron variaciones significativas que van desde 7993 hasta 119640 ohms.cm⁻², observando que estos valores tuvieron una tendencia a incrementar la R_{tc} del sistema, con excepción de los valores obtenidos los días 10 y 20, que tuvieron una disminución en sus registros respecto los valores que les precedieron. Los incrementos obedece a la posible formación de una película fina, compacta y que se fortaleció hasta el final de la prueba y en consecuencia los resultados altos en la R_{tc} , en tanto que los valores que tuvieron decrementos, probablemente se debieron algún reacomodo de las películas y que cedieron pase al transporte de masa y carga en la interfase.

6.3.5.2.4 Datos de R_p , i_{corr} , V_{corr}

Por otra parte, se presenta la información de i_{corr} y V_{corr} que fueron deducidas a partir de R_p y la relación de Stern-Geary (ec.40), mientras que la V_{corr} se obtuvo aplicando la ec. 37, los registros se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de i_{corr} y V_{corr} Procedente de los parámetros de ajuste del circuito equivalente en CER a $-900\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Transcurso de la prueba en días							
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	15713.192	26033.192	19406.8483	46799.265	7992.46043	119639.885	-
i_{corr} ($\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	1.6547E-06	9.9873E-07	1.3397E-06	5.56E-07	3.2531E-06	2.1732E-07	-
V_{corr} (mpa)	0.12569691	0.07586852	0.10177334	0.04220365	0.24712036	0.01650871	-

En base a la información que se presenta en la Tabla 16, se puede indicar que los valores de R_p parten de una cifra elevada que se obtuvo al inicio de la prueba, además se guarda proporcionalidad con los valores de R_{tc} . Esta alta resistencia a la polarización se debe a la posible formación de una capa fina y compacta que se formó sobre la superficie del metal, teniendo como consecuencia valores de i_{corr} y V_{corr} muy bajos, estos se pueden apreciar en la citada Tabla. La formación y las características de la película descrita posiblemente se ocasiono por la desnaturalización paulatina de algún compuesto orgánico, que al precipitar sobre la superficie se conformó dicha película.

6.3.5.2.5 Relación del comportamiento entre CEE y CER

Relacionando los valores que se obtuvieron en la celda de evaluación como de la celda de referencia, se presentan los datos a manera de comparación de ambos sistemas en la Tabla 17.

Tabla 17. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y V_{corr} de ambos sistemas de evaluación CEE y CER a $-900\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Transcurso de la prueba en días								
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30	
CER	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	15713.192	26033.192	19406.8483	46799.265	7992.46043	119639.885	-
	V_{corr} (mpa)	0.12569691	0.07586852	0.10177334	0.04220365	0.24712036	0.01650871	-
CEE	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	2130.129	1943.511	1804.3398	1699.332	8663.313	17952.283	16750.301
	V_{corr} (mpa)	0.92722072	1.01625928	1.07673602	1.18316772	0.22798435	0.11001942	0.11791429

En esta Tabla se presenta la información que se determinó en cada celda (*CEE* y *CER*), con la finalidad de comparar el comportamiento de las variables de R_p y V_{corr} de cada celda, observando la función inversa de estas.

Con relación a la velocidad de corrosión entre ambos sistemas se observa una gran diferencia marcada por la actividad de las *BSRs*, ya que los registros de V_{corr} fueron diferentes en cada una de las etapas de desarrollo de estos microorganismos. Ya que en la celda de referencia este parámetro tuvo baja actividad y solo se observó una disminución paulatina en los valores de la V_{corr} . (0.1257 a 0.01651 mpa).

6.3.6 Corriente de protección ($i_{prot.}$)

La demanda de corriente de protección, se realizó mediante la medición de la corriente que demanda el sistema en evaluación cuando se aplicó un potencial de protección al electrodo de trabajo. El seguimiento de este parámetro se realizó para conocer la necesidad de corriente protección frente a la actividad de la poblacional de *BSR*, así mismo, esta necesidad de corriente se hizo en ausencia de estos microorganismos.

En la Figura 40, se muestra de manera gráfica la demanda de corriente de protección ($i_{prot.}$) que presentaron en ambas celdas de evaluación (*CEE* y *CER*).

6.3.6.1 Descripción del comportamiento de i_p en *CEE*

En el desempeño de las pruebas se observa algunos altibajos en corriente que posiblemente obedecen a demanda o consumo de corriente por el sistema y a los diferentes grados de reposición de flujo de electrones por el potencial aplicado, tendiendo a estabilizar al sistema *CEE*.

Estos altibajos registrados pueden estar relacionados con los movimientos de electrones debidos a la reducción de especies en la interfase y las constantes remociones de hidrógeno o depolarización catódica hecha por el sistema enzimático de esto microorganismos.

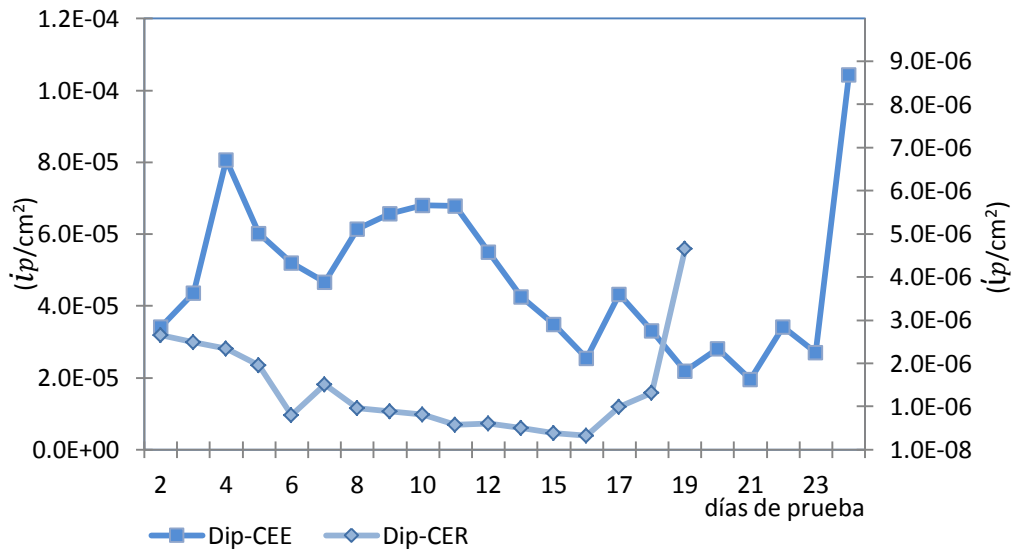


Figura 40. Comportamiento de la corriente de protección en el tiempo en la CEE y CER a $-900mV_{Cu/CuSO_4}$

6.3.6.2 Descripción del comportamiento de i_p en CER a $-900 mV_{Cu/CuSO_4}$

Por otra parte, con respecto a la curva de la $i_{prot.}$ en CER, la demanda de corriente para mantener el potencial de $-900 mV$ fue muy pequeña, motivo por el cual fue necesario ampliar el rango del eje a fin de observar su comportamiento, este fue con tendencia catódico en la mayor parte de prueba, pero al final del ensayo presentó una pequeña incremento tal como se observa en la Figura 40. Esta demanda en $i_{prot.}$, posiblemente se debió a una ruptura o reacomodo de la capa o de la película formada sobre la superficie del electrodo.

6.3.7 Análisis de superficies expuesta a $-900mV_{Cu/CuSO_4}$

El análisis de superficie y los barridos que se realizaron a la superficie del electrodo de trabajo, se llevó a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA), este tipo de microscopio permite observar directamente a los microorganismos "in situ" sin dañar tanto a los microorganismos como a las

biopelículas y productos de corrosión que se formaron en la superficie del electrodo de trabajo.

Se realizaron análisis a la superficie tanto al electrodo de evaluación como de referencia, en el primero el análisis se hizo a fin de observar *BSRs*, biopelículas y productos de corrosión en la superficie de las biopelículas formado.

En el electrodo de referencia se realizó el análisis con el propósito de determinar el grado y tipo de daño ocasionado por el medio de cultivo a la superficie protegida con -900 mV, expuesta al medio de cultivo sin microorganismos, para ello fue necesario retirar los depósitos y lavar químicamente la superficie de los electrodos de trabajo.

6.3.7.1 Análisis de superficie de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.

El análisis de superficie in situ se llevó a cabo a través de varios barridos a diferentes amplitudes, a fin de encontrar evidencias de estructuras de biopelículas como la que se presenta en la Figura 41, la imagen del barrido de un campo amplificado a 2000x, en él se alcanza apreciar la ruptura de la película superficial posiblemente de sulfuros, en la que deja ver alguna estructura blanquecina posiblemente de la biopelícula, así mismo en la vecindad se alcanzan a observar los somas de *BSRs* (4 a 7 μm) y algunos otras estructuras. En la Figura 42 se presenta la imagen del barrido de un campo amplificado a 4000x, en el cual se denota la morfología básica de los microorganismos, estructuras finas de cúmulos de biopelículas y la heterogeneidad de su forma y distribución.

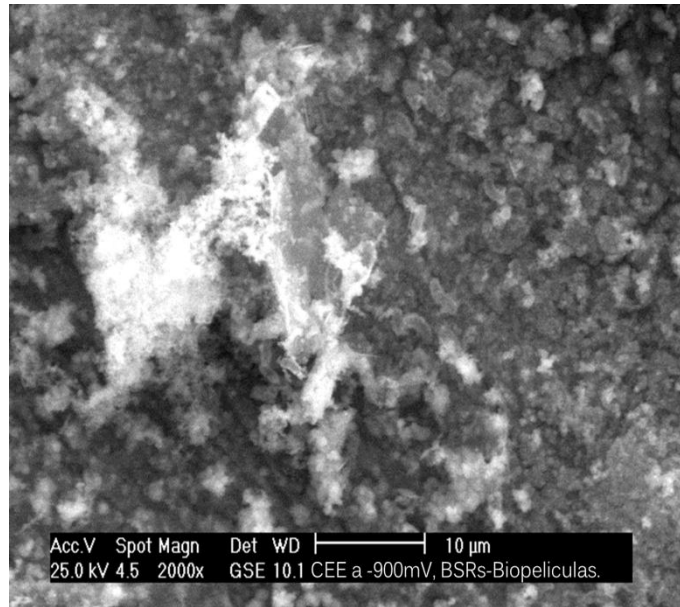


Figura 41. Muestra ruptura de película y somas de microorganismos

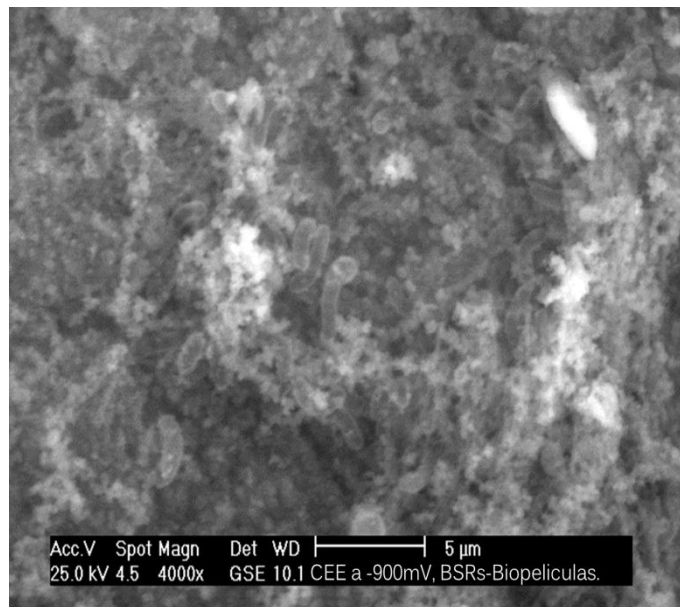


Figura 42. Muestra morfología de microorganismo y presencia productos de corrosión.

6.3.7.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del E_t de la CEE.

En las Figuras 43 y 44, se muestran las imágenes del barrido de dos campos, la primera presenta una magnificación a 300x del área dañada por corrosión localizada, a fin de observar el tipo y la densidad del daño ocasionado por corrosión localizada. En tanto que en la segunda imagen presenta una

magnificación de 4000x en la que se aprecia la corrosión tipo picadura cuyo diámetro oscila de 7.23 a 7.44 μm , en el cual se observa la corrosión en diferentes avances de penetración, así mismo en áreas adyacentes la superficie limpia del metal típico de la corrosión localizada

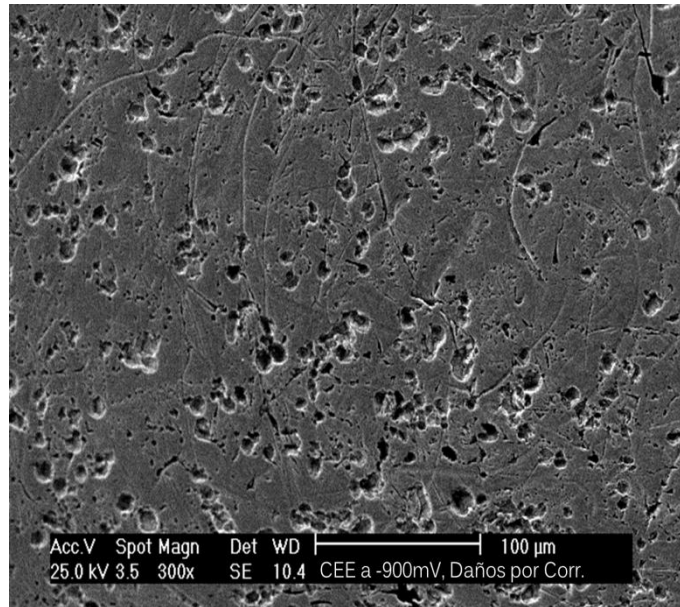


Figura 43. Muestra el daño por corrosión de la superficie

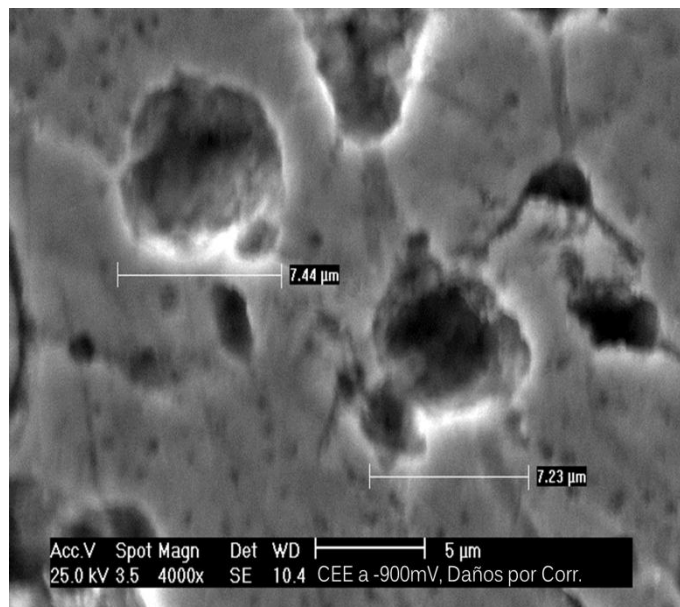


Figura 44. Daño por corrosión localizada de la superficie

6.3.7.3 Análisis de superficie del daño de la superficie del E_t de la CER.

De la Celda electroquímica de referencia (CER), solamente se presentan las imágenes de la superficie del electrodo de Acero *API XL52* que estuvo inmersa en medio de cultivo y protegido con $-900 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$. Debido a la ausencia de *BSRs* en el sistema, por lo que no se consideró conveniente el análisis in situ de la superficie protegida.

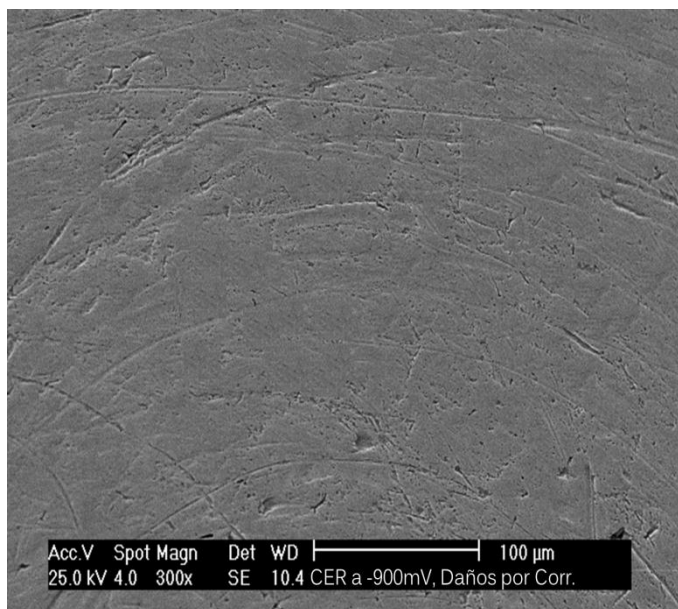


Figura 45. Superficie sin daño aparente por corrosión

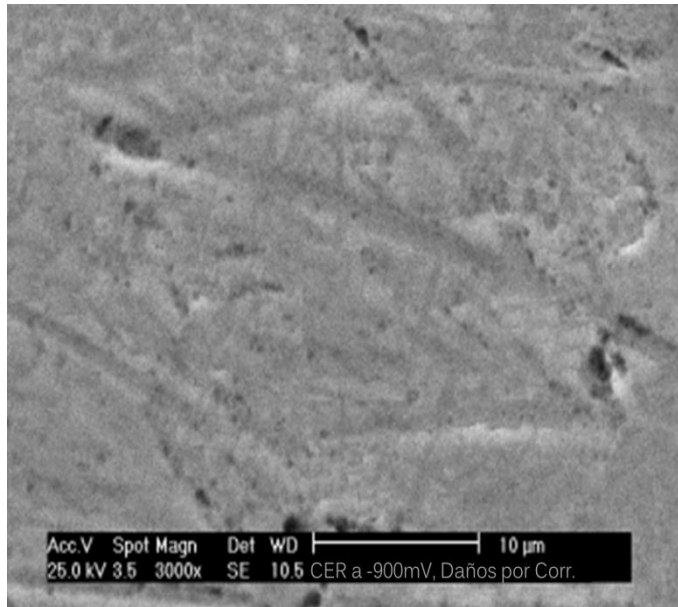


Figura 46. Superficie con zonas con corrosión uniforme y generalizada

En las Figuras 45 y 46, se muestran las imágenes del barrido de dos campos, la primera presentó una magnificación a 300x del área expuesta al medio de cultivo, a fin de observar algún tipo de daño por corrosión, la superficie analizada presenta algunas ralladuras producto de la preparación de superficie inicial, así mismo algunos pequeños puntos y la mayor parte de la superficie sin daño por corrosión localizada, solo se alcanza a preciar un ligero desgaste por corrosión uniforme. La segunda imagen presenta una magnificación de 3000x, se analizó campo debido a que se alcanzaba la definición de algunos puntos, sin embargo la amplificación presentada se observa que la superficie está libre de corrosión tipo picadura y de corrosión localizada, sin embargo se denota un ligero desgaste por corrosión uniforme, sobre todo en los contornos de las líneas de lijado.

6.4 Potencial de protección de $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

Los resultados obtenidos de la celda electroquímica de evaluación (*CEE*), como de la celda electroquímica de referencia (*CER*), se han ordenado en parámetros físicos, bacteriológicos, químicos, electroquímicos y análisis de superficie.

6.5.1 Parámetros Físicos

Los parámetros físicos comprenden las mediciones de temperatura, *pH*, y *Eh* que se registraron tanto en la *CEE* como en la *CER*, a fin de detectar algún cambio significativo que afectara el desarrollo y desempeño de las *BSRs*.

Dentro de los factores físicos que se registraron en los sistemas, se encuentra la temperatura, considerada como temperatura ambiental, esto debido a que los procesos que se quieren reproducir se llevan a condiciones normales de presión y temperatura de campo.

6.3.1.1 Comportamiento de *pH*

Dado que este parámetro proporciona el índice de la actividad y la concentración de los iones de hidrógeno en el seno del medio de cultivo o solución y además la injerencia en los procesos de corrosión, en consecuencia la importancia de conocer el comportamiento durante el transcurso de la prueba. Con esta filosofía se llevó a cabo un seguimiento que se ilustra en la Figura 47.

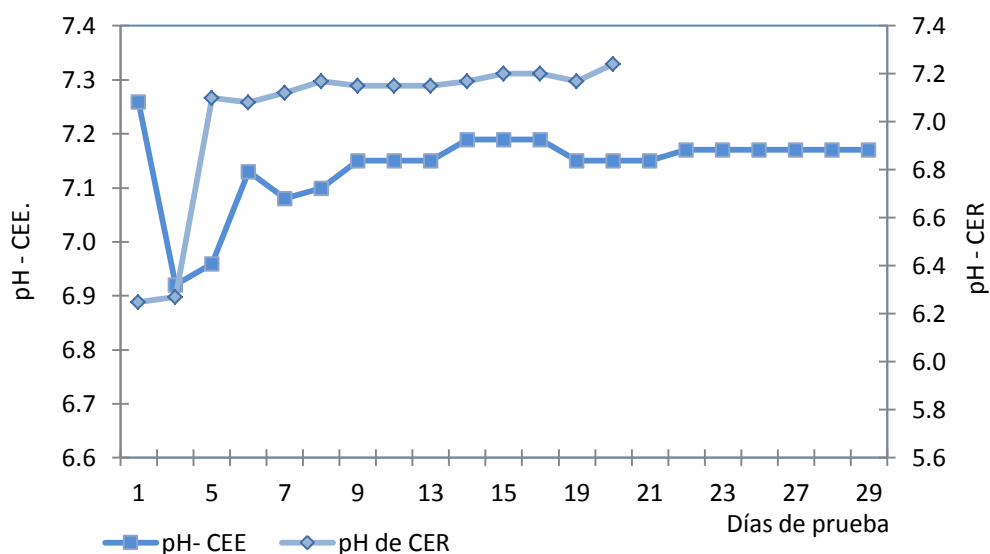


Figura 47. Comportamiento del *pH* respecto al tiempo en el medio de cultivo a - 950 mV_{Cu/CuSO4}

En el gráfico de la Figura 47, se presenta los registros de *pH* en el medio de cultivo contenido en las celdas *CEE* y *CER*, a fin de detectar cambios significativos en *pH* inherentes a la actividad de las *BSRs* o bien a las posibles reacciones de superficie que hayan ocurrido por la protección catódica sobre los electrodos de trabajo.

En la *CEE*, el *pH* prácticamente se mantuvo con pequeñas oscilaciones en el transcurso de la prueba (6.92 a 7.19), este rango se consideró óptimo para el desarrollo de estos microorganismos. Por otra parte, cambios súbitos no se tuvieron, esto posiblemente se debió a la actividad descrita para el ion bicarbonato.

En tanto que el *pH* en la *CER*, se desarrolló con una tendencia orientada a la alcalinidad, esto debido al posiblemente influenciado por la actividad de la protección catódica sobre el electrodo de trabajo, esta alcalinización detectada, se ha reportada en la literatura debido a la formación de iones carbonatos u oxhidrilo con consecuentes reacciones de precipitaciones de carbonatos, sin embargo para

el estudio posiblemente se formaron estos iones pero reaccionaron con los iones bicarbonatos para formar compuestos de carbonatos de acuerdo a reacciones descritas sobre este caso. La formación de estos iones difícilmente precipitan debido a que se mantuvieron en solución por el *pH* desarrollado (6.25 a 7.24).

6.3.1.2 Comportamiento del potencial redox (*Eh*).

En el set de pruebas efectuadas para los -950 mV, se puede indicar que el ambiente en el cual se desarrollaron las *BSRs*, presento características con poder oxidación o con posibilidad de ceder electrones al electrodo normal de hidrógeno, forma conocida como media celda con potencial redox negativo.

La importancia de este parámetro se extiende en varios ámbitos en los cuales se moderan muchos compuestos químicos presentes tanto en la atmósfera como en cuerpos de agua naturales, así mismo en el entorno de los microorganismos como al interior de estos, donde grandes partes de las reacciones que llevan a cabo están sujetas a un régimen redox.

El ambiente propicio para el desarrollo de las *BSRs* es alrededor de los – 380 mV, por lo que se consideró importante llevar a cabo registros de potencial redox (*Eh*) en el transcurso de la prueba, para conocer que las condiciones en las celdas experimentales fueron favorables para el desarrollo de dichos microorganismo.

Las celdas experimentales (*CEE* y *CER*), desde el inicio fueron ambientadas con potenciales redox de – 442 y – 421 mV respectivamente. En la *CEE*, este parámetro durante los primeros 7 días, el potencial se incrementó hasta alcanzar los – 470 mV, posteriormente tiende a su origen y se mantuvo en el rango de 400 a 418 mV en el medio de cultivo, por lo que las condiciones redox fueron propicias para el desarrollo de las *BSRs*. Mientras que en la *CER*, las condiciones redox presentaron una tendencia a la baja en los primeros días, alcanzando un mínima (-235 mV), no obstante después logró su recuperación y se mantuvo en alrededor de los 400 mV hasta el final de la prueba. Dichos comportamientos del potencial redox se muestran en la Figura 48.

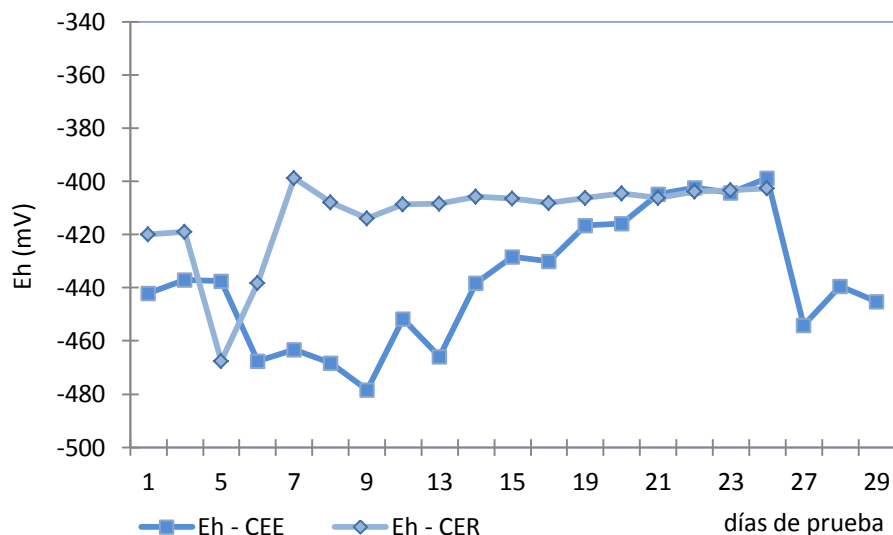


Figura 48. Comportamiento del E_h en función al tiempo en el medio de cultivo a $-900 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

6.3.2 Parámetros Bacteriológicos

6.3.2.1 Densidad poblacional (D_p)

Dentro de este set de pruebas se consideró incluir a la densidad poblacional de microorganismos, este parámetro se inició con un crecimiento logarítmico que se alcanzó en los primeros 7 días de prueba, después se mantuvo solo con algunas variaciones en el crecimiento de las *BSRs* durante la prueba, estas variaciones posiblemente estuvieron influenciadas por la falta de nutrientes o por las reposición de medio de cultivo nuevo por viejo (técnica de cultivos continuos).

Con base a la curva de crecimiento la D_p , no presentó ninguna inflexión en su curva poblacional que estuviera asociado al potencial aplicado ($-950 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$) o bien a la alcalinización generada por dicha protección.

En el gráfico de la Figura 49, se presenta el comportamiento de D_p durante la prueba y se acompaña por la curva de E_h , a fin de determinar de alguna irregularidad que viera afectado al crecimiento de *BSRs*.

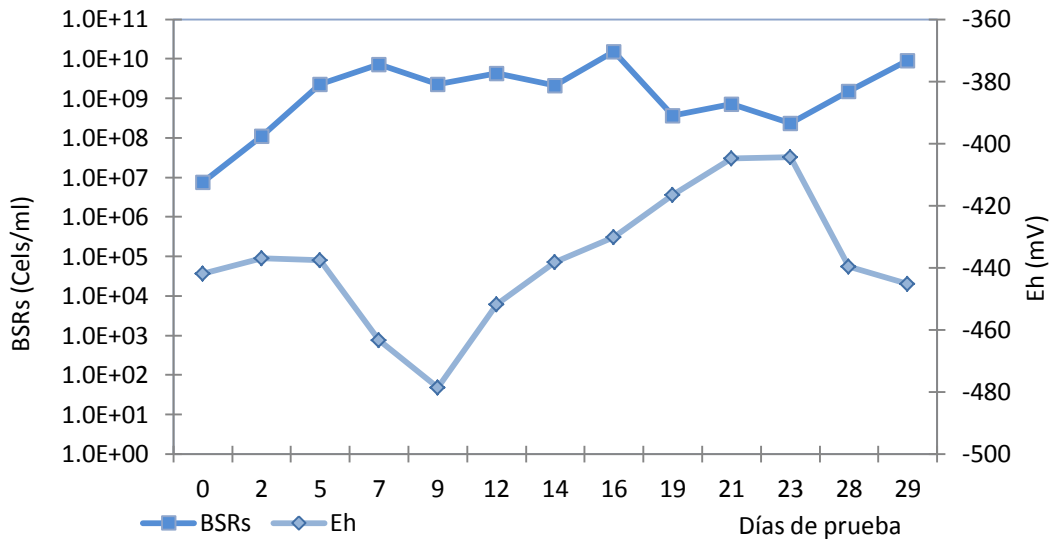


Figura 49. Densidad poblacional de *BSRs* en relación al tiempo en *CEE* a $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

6.3.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico

Como ya ha sido comentado anteriormente, que en la respiración de las *BSRs* intervienen enzimas que logran la activación y llevar a cabo las reducciones sucesivas de los sulfatos y transferirlo hasta sulfuro (S^{2-}), de manera conjunta, otro sistema enzimático (hidrogenasas), suministran al hidrógeno como fuente de donación de electrones, necesarios para las diferentes reducciones de los sulfatos. De este proceso, se produce el ion sulfhídrico (HS^-) o bien sulfuro de hidrógeno (H_2S), que son excretados por las *BSRs* al exterior.

En consecuencia a esta serie de actividades enzimáticas, se forma un alto gradiente en concentración protones de hidrógeno que son utilizada para la activación de la enzima ATP asa que cataliza la formación de ATP[1].

En actividades de la Microbiología, se ha tomado a la respiración de como un parámetro indicador de la actividad celular, así la velocidad con la que se consume de oxígeno es evidencia de la función vital y de la cantidad de microorganismos aerobios presentes en el sistema. De la misma manera, se practica en la parte

anaerobia donde el consumo de sustratos como el sulfato se utiliza como parámetro indicador de la vitalidad y cantidad de *BSRs* en el sistema en estudio.

En la Figura 50, se muestran las concentración de SO_4^{2-} y H_2S con respecto al tiempo. La curva de sulfatos compuesta por las diferentes concentraciones registradas, manifiesta una alta actividad en la celda debida al consumo extraordinario de sulfatos, lo cual refleja una actividad metabólica vigorosa de las *BSRs* en la celda.

Parte de esta respuesta sobre el consumo de sulfatos, se debió a las reposiciones programadas de cultivo viejo por nuevo al sistema que cubrieron la demanda sulfatos por la población de *BSRs* durante la parte experimental.

Como se ha mencionado de la interrelación de parámetros en el sistema, aquí se manifiesta una estrecha relación entre el consumo de sulfatos, la producción de ácido sulfhídrico en el sistema y la densidad poblacional (D_p).

En relación a la curva de ácido sulfhídrico, se observa que después del séptimo día, registró su máxima concentración en el medio, este parámetro decae y se mantuvo oscilando entre los 116 a los 156 $mg.l^{-1}$, hasta el término del ensayo. En el monitoreo de este parámetro se esperaría registrar igual o similar concentración que la de sulfatos, sin embargo existen diferentes factores intracelulares como extracelulares que intervienen y modifican esta relación.

En base a los parámetros registrados (D_p , SO_4^{2-} y H_2S), a lo largo del desarrollo experimental, no fue posible detectar alguna discontinuidad debida a la injerencia del potencial de protección de los $-950 mV_{Cu/CUSO_4}$ aplicados al electrodo de trabajo. Dichos comportamientos de sulfatos y sulfhídrico se pueden apreciar en la Figura 50.

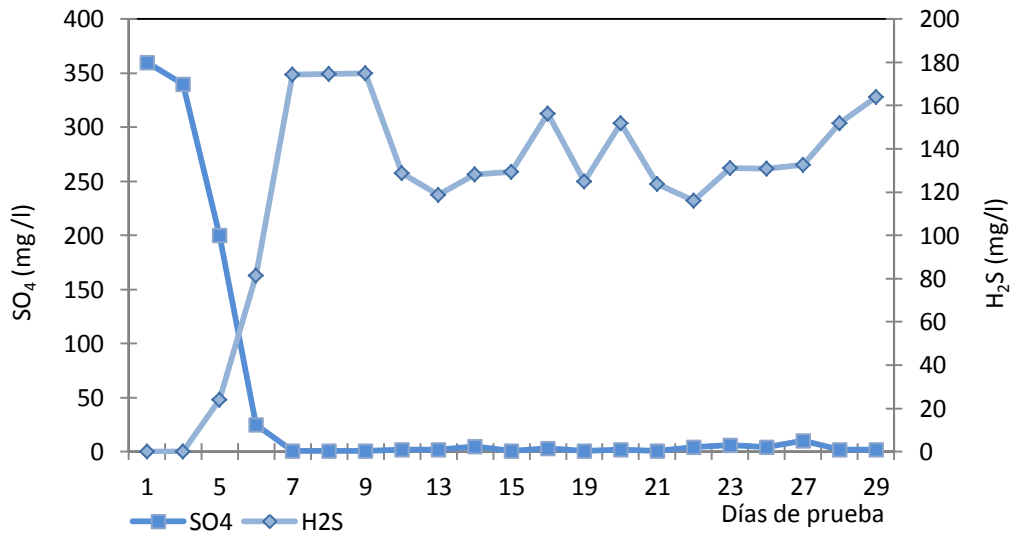


Figura 50. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por *BSRs* durante la prueba en *CEE* a $-950\text{ mV}_{.Cu/CuSO_4}$

6.3.3 Parámetros químicos

Los parámetros considerados en este esquema, fueron la alcalinidad y la concentración del ion ferroso (Fe^{2+}). La alcalinidad registrada durante el desarrollo de las pruebas, se determinó para diferenciar su origen e injerencia en la inhibición celular.

La aplicación de la protección catódica, genera cierta alcalinidad en el entorno donde se aplica y esta se produce debido a las reacciones de reducción de especies químicas presentes en el sistema, la alcalinidad producida puede ocasionar cambios en pH y pasar de una zona ácida a zona alcalina, con posibilidad de afectar la viabilidad y el número de microorganismos en el sistema.

En relación al ion ferroso (Fe^{2+}), se consideró importante incluir a este parámetro a fin de registrar cualquier concentración de hierro en el medio a consecuencia de posibles oxidaciones que pudieron llevarse a cabo en la superficie del electrodo de trabajo que estuvo protegido catódicamente a $-950\text{ mV}_{.Cu/CuSO_4}$.

La presencia y la detección progresiva de la concentración de este ion en el medio, proporciona sustentación y evidencia de la eficiencia de la *PC* y la influencia de las *BSRs* en el sistema de protección.

6.3.3.1 Alcalinidad

Como ya se ha explicado en los sets de pruebas anteriores que la alcalinidad está en función del *pH* en el sistema y en base a este, se conoce la especie o las especies químicas que están regulando dicho parámetro en el sistema. Para este caso y de acuerdo al *pH* promedio registrado en la *CEE* fue de 7.14, para este valor en *pH* se puede indicar que el ion bicarbonato (HCO_3^-) es el que reguló la alcalinidad en el sistema.

El comportamiento de la alcalinidad en el medio, en los primeros 6 días de prueba se alcanzó la máxima concentración, después del séptimo día, este parámetro comienza a regularse y permanece oscilando ligeramente hasta el término de la prueba.

La alcalinidad registrada en los primeros 6 días, estuvo influenciados por el crecimiento de las *BSRs* en el medio, ya que estos microorganismos durante su desarrollo liberaron CO_2 , este compuesto es soluble y reacciona para formar ácido carbónico (H_2CO_3), este a su vez reacciona con algunas sales para formar el bicarbonato correspondiente. Es en esta fase donde el ion bicarbonato funciona como un moderador o buffer de *pH* y promueve cierta alcalinidad al medio.

Por otro lado la alcalinidad generada por el sistema de protección catódica no afectó a la densidad poblacional de *BSRs*.

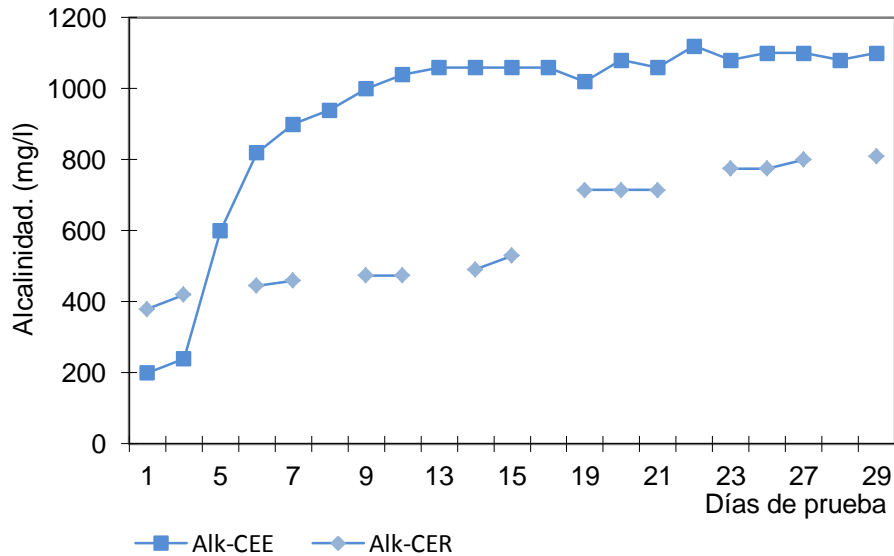


Figura 51. Alcalinización del medio por actividad de *BSRs* y protección catódica sobre el acero API XL52 a $-950. mV_{Cu/CuSO_4}$

Los registros de este parámetro en *la CER* se muestran en la Figura 51, la prueba se inició con una alcalinidad de 380 mg/l, esta se mantuvo con ligeros incrementos en el valor de alcalinidad, sin embargo al día 20 se registró un ascenso ubicarse por arriba del nivel de concentración que se venía registrando. Después del día 21, la alcalinidad se mantuvo constante hasta el final de la prueba. Esta actividad en alcalinidad es derivada directamente de la actividad de protección de la PC.

Por otra parte, la alcalinidad desarrollada en la *CEE* fue mayor que la desarrollada en *CER*, sin embargo este parámetro no influyo en el desarrollo de la densidad poblacional de las *BSRs*.

6.3.3.2 Hierro (Fe^{2+})

En la Figura 52, se presentan los registros del análisis del ion ferroso tanto en la *CEE* como la *CER* en el desarrollo experimental, en la curva *Fe-CEE*, en su generalidad este parámetro mostro dos facetas, en la primera se presenta una de incrementos hasta el día 7 (aproximadamente 48 mg/l), los registros subsecuentes prácticamente permanecen constantes hasta el día 14.

La segunda faceta comenzó a partir del 16 y se inicia con incrementos irregulares que se extiende hasta el día 27 de la prueba, en este punto se logra determinar la máxima concentración del ion ferroso (aproximadamente 134 mg/l), las lecturas finales de la concentración del ion ferroso presentaron una declinación.

En la curva de la *CER*, en los primeros 15 días de prueba, mostró ligero incremento en la concentración de este ion (aproximadamente 48 mg/l de Fe^{2+}), los registros posteriores prácticamente permanecieron constantes hasta el término de la prueba.

De manera general se observa que la celda que presenta a las BSRs, presento los registros con mayor concentración del ion ferroso (1.34mg/l). Mientras la celda con menor contenido de este ion fue la de referencia (0.48 mg/l de Fe^{2+}).

Las diferencias en concentraciones de este ion en ambas celdas (*CEE* y *CER*), estuvo dada por las diferentes estancias de actividad directa e indirecta de las BSRs, sobre la superficie del acero *API XL 52*, las cuales estuvieron protegidas con el potencial de $-950\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$. En la medida que se dieron la actividad microbiológica y el proceso de desestabilización de la PC, se fue liberando y registrando la concentración de este ion (Fe^{2+}).

En el caso de la *CEE*, el registro de la concentración de este ion estuvo siempre supeditado al ion libre, ya que parte de este ion reacciono con el sulfuro de hidrógeno del medio, sin embargo da idea de la intensidad en que el hierro estructural es oxidado y pasa a solución.

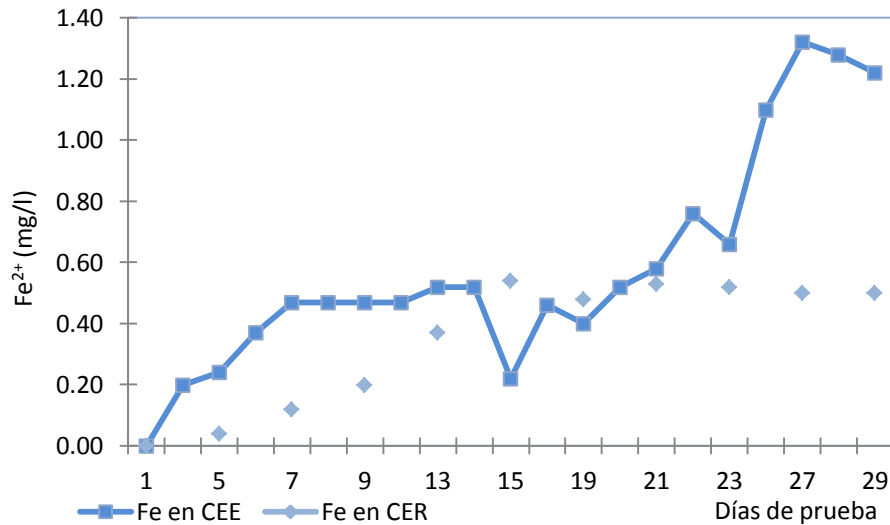


Figura 52. Variación de la concentración de Fe^{2+} respecto al tiempo en el medio, debido a la oxidación del acero API XL- 52, en CEE y CER a $-950 mV_{Cu/CuSO_4}$

Se han revisado los diversos parámetros físicos (ambientales), químicos y microbiológicos en que estuvo expuesto el electrodo de trabajo que fue protegido con $-950 mV$, a continuación se presentan las diferentes pruebas que fueron utilizadas para determinar el posible daño a la superficie del acero API XL 52 por injerencia de dichos factores.

6.3.4 Parámetros electroquímicos

6.3.4.1 Técnica gravimétrica

Esta técnica se utiliza para determinar la velocidad de corrosión que presentaron los electrodos al ser sumergidos en el medio de cultivo con y sin microorganismos, la diferencia de pérdida de peso que se registró se considera un promedio de las eventualidades que interactuaron con la superficie del metal durante el periodo experimental.

6.3.4.2 Cálculo para determinar velocidad de corrosión

El cálculo de la velocidad de corrosión por esta técnica se llevó a cabo aplicando la fórmula de la ecuación 34 y aplicando los datos físicos correspondientes al electrodo de trabajo (Et). Los datos de corrosión obtenidos se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Velocidad de corrosión sobre el acero *API XL 52* mediante técnica gravimétrica protegido con $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

W_i (g)	W_f (g)	ΔW (g)	Área (cm^2)	Densidad (g/cm^3)	Tiempo (Hrs)	V_{corr} (mpa)	V_{corr} (mma)
Celda Electroquímica de Referencia (CER).							
5.2388	5.231	0.0007	6.01614963	7.86	648	0.0078	0.0020
Celda Electroquímica de Evaluación (CEE)							
5.3748	5.3715	0.0033	6.01614963	7.86	696	0.3459	0.0088

La velocidad de corrosión determinada por esta técnica fue relativamente baja, ya que en ambas celdas estuvieron por debajo de la unidad de corrosión, sin embargo la velocidad de corrosión para el electrodo de trabajo en la *CEE*, puede indicarse que se tuvo hasta un 68% en velocidad de corrosión por encima del valor registrado en el electrodo de trabajo de la *CER*. Esta relación puede ser atribuida a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras en el sistema.

Por otra parte, la velocidad de corrosión registrada por esta técnica, se considera como un promedio de las eventualidades de corrosión ocurridas en la superficie del electrodo de trabajo, que estuvo protegido con $950\text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$. Así mismo, la pérdida de material con respecto al tiempo, se considera que se llevó a cabo de forma longitudinal a la superficie y no transversal, es decir solo registró corrosión generalizada o uniforme.

Dentro del ámbito de evaluación del impacto a la superficie del electrodo de trabajo por la actividad microbiana, además se utilizaron la técnica de Resistencia a la polarización R_p y la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica, aunada con análisis de superficies mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (*MEBA*).

6.3.4.2 Resistencia de Polarización Lineal (R_p).

Con el propósito de determinar los cambios que se estuvieron llevando en la superficie del metal, se consideró conveniente utilizar la técnica electroquímica de R_p a fin de conocer la velocidad de los procesos de oxidación y reducción en la superficie en los electrodos de ambas celdas experimentales (*CEE* y *CER*).

6.3.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en *CEE* y *CER* a $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Los valores registrados por esta técnica durante el periodo de prueba para las dos celdas, fueron sometidos a tratamientos transferencias y conversiones que se muestran a continuación.

6.3.4.2.1 Cálculos para determinar velocidad de corrosión

Mediante la ecuación 35 y considerando el coeficiente de Stern-Geary, se aplicaron los valores de R_p , para calcular la corriente de corrosión (i_{corr}).

Los datos de (i_{corr}) obtenidos en la ecuación 35, fueron sustituidos en la ecuación 37, para obtener la velocidad de corrosión (V_{corr}) en cada una de las lecturas que fueron obtenidas en el transcurso de la prueba y que se presentan en forma gráfica en la Figura 53

En la Figura 53, se presentan los resultados de la conversión de R_p a V_{corr} tanto de la celda electroquímica de evaluación, como de la celda electroquímica de referencia, valores que se obtuvieron durante el desarrollo experimental.

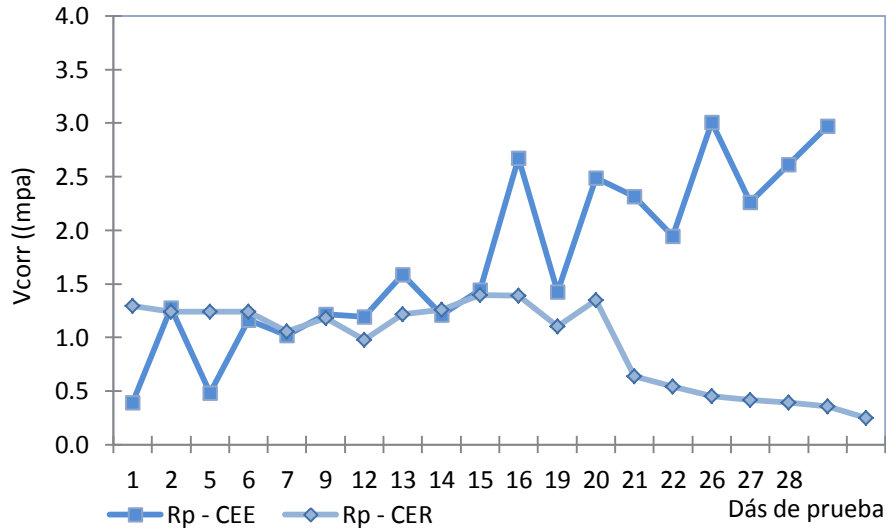


Figura 53. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero *API XL-52* en CEE y CER a $-950 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

6.3.4.2.2 Celda electroquímica de evaluación CEE

Las velocidades de corrosión obtenidas mediante esta técnica se presentan en la Figura 53, observando que la V_{corr} en el electrodo de trabajo de la CEE varió desde 0.390 hasta 3.01 *mpa*, a pesar del comportamiento irregular, se observa una tendencia de incremento en este parámetro hasta el final de la prueba.

6.3.4.2.3 Celda electroquímica de evaluación CER

El electrodo expuesto en la CER, estuvo bajo condiciones anaerobiosis extremas, *pH* cercano al neutro (7.14), ausencia de especies químicas (CO_2 , H_2S y O_2). Sin embargo se logró detectar velocidad de corrosión bajo este estado, donde posiblemente algunas compuestos puedan reducirse y aceptar los electrones de la oxidación.

En relación a la V_{corr} en el electrodo de la CEE, esta fue muy irregular debido a que en parte mostró una tendencia de incremento en corrosión, aunque está en ocasiones los incrementos fueron cortos o largos e inclusive algunas veces con decrementos. Esta irregularidad seguramente se debió a la inestabilidad los

sulfuros formados o bien al comportamiento de las biopelículas que de alguna manera ocasionó ciertas perturbaciones en el transporte de carga y masa a través de la interfase, disminuyendo las reacciones oxidación y reducción del proceso de corrosión que ocurrieron en el sitio. Reflejando toda esta actividad en el comportamiento de la V_{corr} determinada.

6.3.4.3 Espectroscopia de Impedancia electroquímica (EIS).

La técnica Espectroscopia de Impedancia Electroquímica, consiste en aplicar una perturbación sinusoidal de potencial eléctrico de frecuencia variable al material estudiado y registrar su respuesta en corriente dentro de la celda electroquímica.

6.3.4.3.1 Resultados de la Impedancia electroquímica en CEE a $-950\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$.

Con base en lo anterior, se midieron los espectros de impedancias que se realizaron a diferentes tiempos durante el transcurso de la experimentación. Los datos obtenidos se presentan en el diagrama de Nyquist de la Figura 54, correspondientes a la CEE.

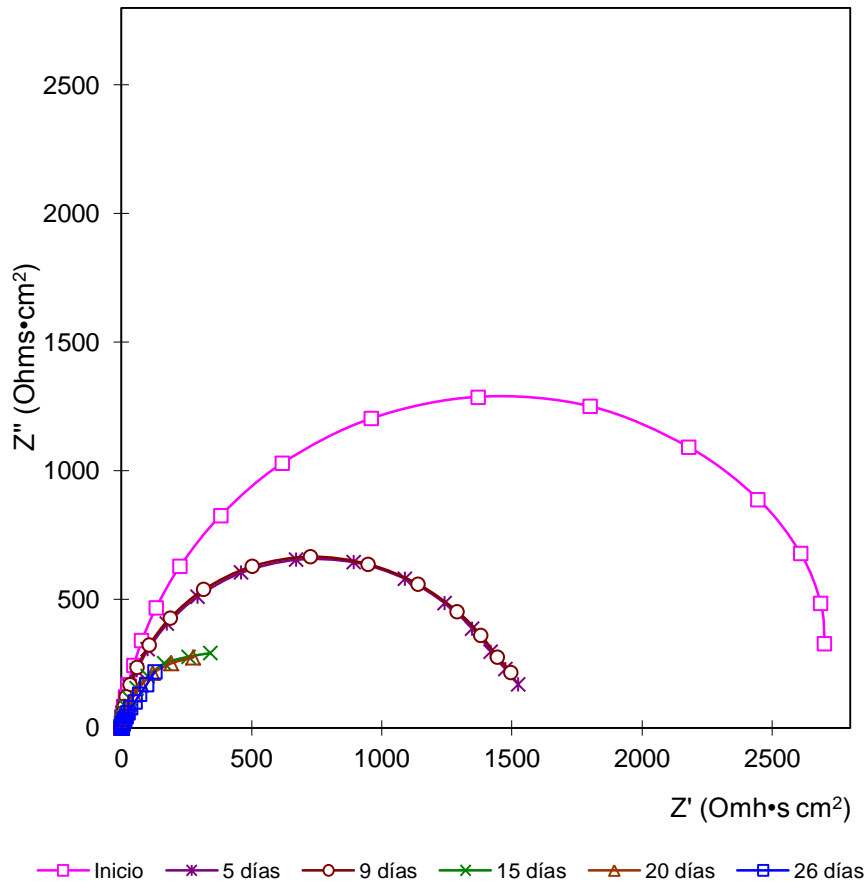


Figura 54. Variación de las impedancias en el diagrama de Nyquist en el tiempo, determinadas sobre el acero *API XL52* en la *CEE* a $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

6.3.4.3.1.1 Diagrama de Nyquist

En la Figura 54, se muestran las diferentes magnitudes de impedancia que se registraron a lo largo de la experimentación y en estas se puede observar que la impedancia de inicio, fue la que presentó el valor más alto de impedancia y se asocia principalmente a las condiciones iniciales de prueba, seguido por las mediciones hechas a los 5 y 10 días, registrando impedancias por arriba de los 1500 ohms.cm² y por último las registradas los días 26, 15 y 20, respectivamente que son las curvas que presentaron las menores impedancias (< a los 1500 ohms.cm²). La descripción se realizó en el orden de la magnitud de la impedancia.

6.3.4.3.1.2 Diagrama de ajustes

Por otra parte, con base a las impedancias mostradas en la Figura 54 y mediante el circuito equivalente que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes prudentes a los valores obtenidos en cada uno de los parámetros del circuito respecto a cada una de las curvas de impedancia obtenidas durante la experimentación y que se muestran en la Tabla 19 y a manera de ejemplo se presenta de manera gráfica los ajustes correspondientes al día 1 en la Figura 55.

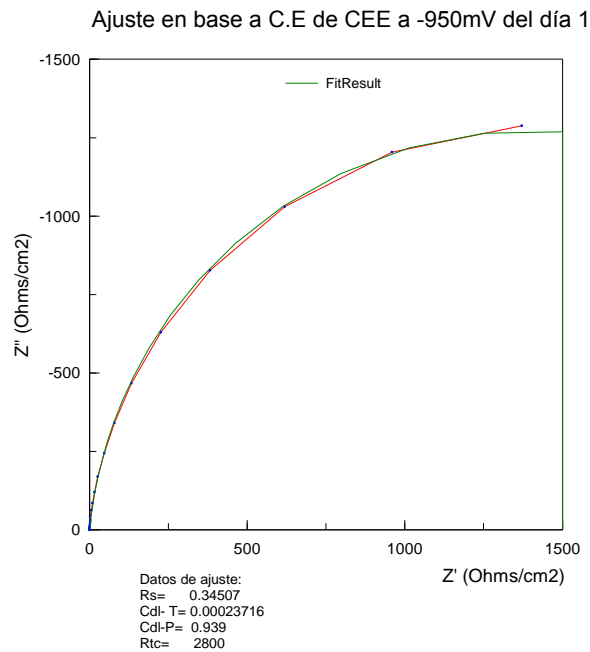


Figura 55. Ajustes de valores a los valores de los elementos del circuito equivalente a los datos de la curvas de impedancia del día 1 en *CEE*.

6.3.4.3.1.3 Datos de los elementos de Ajuste

Respecto a los ajustes de los elementos del circuito de la Figura 18, con las curvas de impedancias restantes, se consideran que fueron adecuados y solo se presentan los valores obtenidos de la adecuación para cada una de las curvas en la Tabla 19.

Tabla 19. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en CEE a $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Transcurso de la prueba en días						
variables del circuito equivalente	1	5	10	15	20	25
R_s ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	0.34507	0.47586	0.38298	0.28948	0.72903	0.8772
Cdl-T(Farads)	0.0002372	0.0005994	0.0009439	0.000634	0.000516	0.000416
Cdl-P	0.939	0.938	0.9432	0.92344	0.86043	0.7972
R_{tc} ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	2800	1447	1442	810	1200	815.2

En relación a los parámetros presentados en la Tabla 19, se puede indicar que la variación en R_s fue pequeña con respecto a los registros obtenidos para R_{tc} . Estos oscilaron entre 0.28948 y 0.8772 ohms.cm⁻². Las variaciones registradas pueden estar asociadas varios factores como la reposición de medio de cultivo, presencia de microorganismos y formación de nuevas especies tales como ion ferroso (Fe^{2+}) y sulfuro de hidrógeno (H_2S). No obstante estas variaciones en R_s no fueron significativas para ser obstáculo al transporte.

Con respecto a los parámetros de capacitancia, estos tuvieron también ciertos movimientos en C_{dl-T} los cuales presentaron tendencia al incremento en los primeros 10 días de la prueba (de 0.0002372 a 0.000943 farads), después del 10, este parámetro tendieron a disminuir hasta el final de la prueba, llegando hasta 416 farads. En tanto que el parámetro C_{dl-P} , estos se mantuvieron prácticamente sin variación en los primeros 15 días de prueba, después de este día, las lecturas registradas presentaron una ligera disminución hasta al final de la prueba.

En relación a los resultados en R_{tc} , se puede observar que sus valores comienzan a disminuir desde su inicio (2800 ohms.cm²) hasta el día 15, obteniéndose el valor más bajo de la R_{tc} (810 ohms.cm²), después de este día se mantuvieron en promedio a los 1000 ohms.cm² hasta el final de la prueba.

6.3.4.3.1.4 Datos de Resistencia a la polarización, corriente corrosión y velocidad de corrosión.

Una vez obtenida la información de R_{tc} , se realizó las interrelaciones entre este parámetro y la R_p , a fin de obtener mediante cálculos la información de i_{corr} y V_{corr} mediante la relación de Stern-Geary (ec.40) y la ec. 37 para la velocidad de corrosión. Los resultados de esta serie de aplicaciones, se presentan en la Tabla 20

Tabla 20. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para CEE a $-950\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$.

ajuste de Datos:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
$R_p (\Omega \cdot \text{cm}^2)$	2799.6549	1446.5241	1441.617	809.710	1199.271	814.3228	-----
$i_{corr} (\text{A} \cdot \text{cm}^2)$	9.2869E-06	1.7974E-05	1.8035E-05	3.211E-05	2.168E-05	3.1928E-05	-----
$V_{corr} (\text{mpa})$	0.70547971	1.36541084	1.37005856	2.43926649	1.64691699	2.42545061	-----

En base a los resultados presentados en la tabla 20, se observa una relación recíproca e inversa entre R_p y la corriente de corrosión y la velocidad de corrosión, en esta relación se conjuga las diferentes etapas de desarrollo de la actividad bacteriana durante el periodo de prueba, en los cuales se facilitó el transporte de masa y de carga en diferente grado, logrando afectar a los procesos de óxido-reducción que se estuvieron llevando en la superficie del metal.

La velocidad de corrosión registrada, comienza a manifestarse a los 5 día (1.36541 mpa), y se logra un máximo a los 15 días de prueba de 2.5670 mpa y se mantiene hasta el final de la experimentación excepto por la lectura del día 20 donde V_{corr} disminuyó a 1.6469 mpa . Al respecto, se puede indicar que los resultados en V_{corr} se ven ligeramente desfasados en tiempo, ya que en potenciales de -850 y $-900\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$ la corrosión ocurrió en primeros quince días de prueba, tiempo en el cual ocurrieron una serie de eventualidades que propiciaron el proceso de corrosión. En este set experimental el proceso de corrosión se dio en este lapso de tiempo, pero la corrosión con mayor intensidad

se alcanzó en los días 15 y 25, esta situación posiblemente se debió a movimiento o desprendimiento de las películas de biofilm, que permitió que el movimiento electrolítico y de carga se llevara a cabo sin restricción alguna.

6.3.4.3.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a $-950\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$.

6.3.4.3.2.1 Diagrama de impedancias de Nyquist

Con respecto a la información que se obtuvo de los ensayos de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica en la celda electroquímica de referencia (CER), en la Figura 56 se muestran las lecturas de impedancias tomadas en el transcurso de la prueba mediante los diagramas de Nyquist.

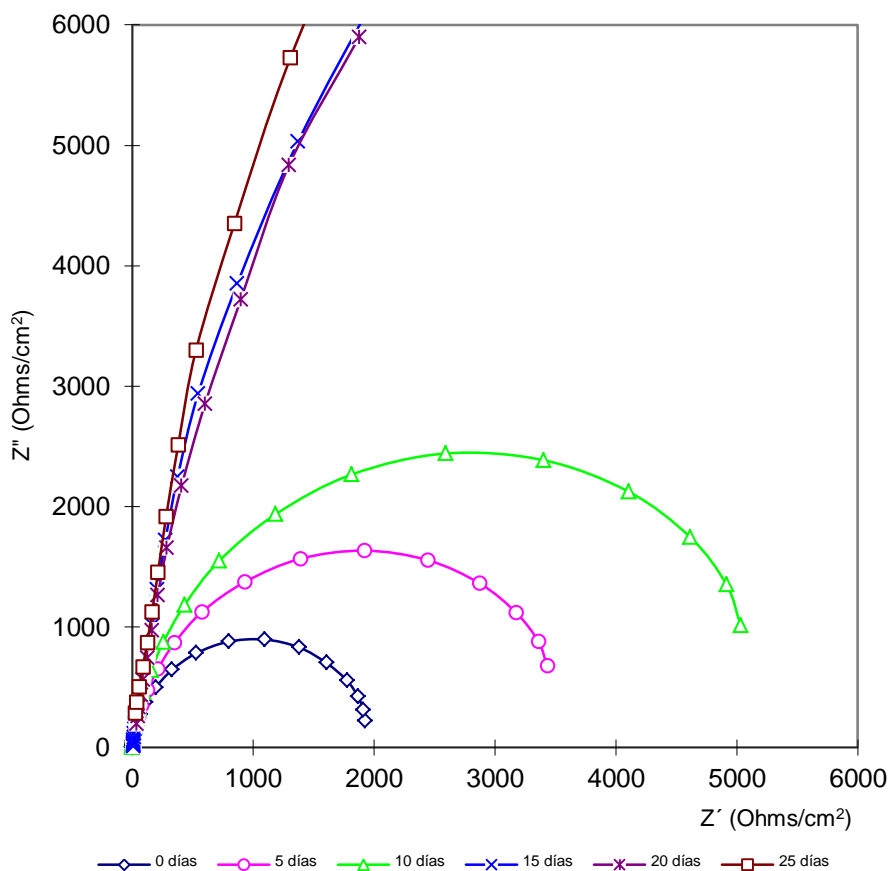


Figura 56. Variación de las impedancias en el diagrama de Nyquist en el tiempo, determinadas sobre el $API\ XL52$ en CER a $-950\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$

En la Figura 56 se presentan las diferentes impedancias que fueron registradas en el transcurso de la prueba. Al inicio de la prueba se determinó un valor cercano a los 2000 ohms.cm², en tanto que las demás lecturas tuvieron un incremento progresivo de impedancia, tal como se puede apreciar en el citado gráfico. Para la lectura inicial se ha argumentado que la impedancia está asociada con las condiciones iniciales de la prueba (*pH* cercano al neutro, ausencia de especies agresivas y condiciones de anaerobiosis total), mientras que las impedancia sucesivas éstas estuvieron relacionadas con la posible sedimentación de material degradado sobre la superficie del metal, conformando películas sobre la superficie del metal, que promovieron impedimento para el transporte de masa y carga a nivel de interfase y por lo tanto disminución sustancial de los procesos de corrosión.

6.3.4.3.2.2 Diagrama de ajustes

Con base a las impedancias mostradas en la Figura 56 y mediante el circuito equivalente que se mostró en la Figura 18, se realizaron los ajustes necesarios a los valores obtenidos en cada uno de los parámetros del circuito, respecto a cada una de las curvas de impedancia obtenidas durante la experimentación. En la Figura 57, se presenta a manera de ejemplo uno de los ajustes realizadas. Para este caso se muestran los ajustes a la curva de impedancia del día 1 (inicio).

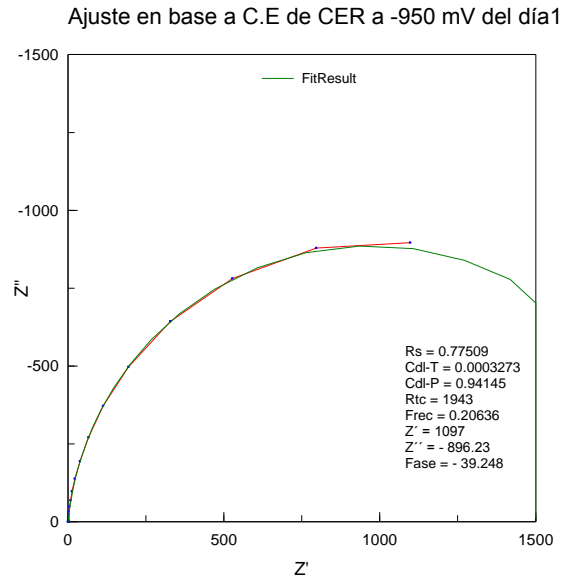


Figura 57. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en *CER*

6.3.4.3.2.3 Datos de los elementos de Ajuste

La información obtenida de los ajustes del circuito para cada una de las curvas de las impedancias de la Figura 56 fue similar al presentado en la Figura 57. Los datos se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en *CER* a $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Transcurso de la prueba en días						
variables del circuito equivalente	1	5	10	15	20	25
Rs ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	0.77509	2.951	0.95478	8.422	8.971	3.664
Cdl-T (Farads)	0.0003273	0.00037408	0.0003919	9	0.00023006	7.7559E-5
Cdl-P	0.94145	0.93116	0.9323	0.93801	0.89006	0.80234
Rtc ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	1943	3549	5293	43734	54926	124430

Los datos de R_s que se presentan en la Tabla 21, se puede ver, que se presentaron algunas pequeñas variaciones en el transcurso de la prueba, pero que estas no fueron significativas, estos movimientos pueden relacionarse con presencia de microorganismos, iones ferroso y sulfhídrico en el medio. Las variaciones en R_s , no presentaron obstáculo alguno para el movimiento iónico del medio.

En relación a los valores que se asocian con la capacitancia de la doble capa, para los valores de C_{dl-T} en los primeros 10 día tuvieron ligeros incrementos ascendentes (32.73E-5 a 39.199E-5 farads), mientras que del día 15 al día 25 los valores tuvieron un descenso más prolongado (23.006E-5 a 8.64E-5 farads). Los valores de esta variable, están asociados con los efectos capacitivos y con lo que ocurren en la superficie del metal, tales como fenómenos de adsorción y desorción.

Con respecto a la C_{dl-P} , sus magnitudes registradas no presentaron cambios trascendentales y estuvieron oscilando entre 0.80234 a 0.94145, esta variable se asocia con el grado el grado de rugosidad, porosidad y otros fenómenos físicos.

En relación a los valores registrados para la R_{tc} , estos presentaron variaciones significativas que van desde 1943 hasta 124430 ohms.cm⁻², observando que estos valores tuvieron una tendencia a incrementar la R_{tc} del sistema, en las tres últimas lecturas se observa un elevado incremento del valor (124430 ohms.cm⁻²). Los incrementos obedecen a la posible formación de película delgada que se fue compactando hasta el final de la prueba y como consecuencia los resultados altos valores en la R_{tc} . La formación de películas altamente densas dificulta al transporte de carga y masa a nivel de interfase y por lo tanto a la velocidad de corrosión.

6.3.4.3.2.4 Datos de R_p , i_{corr} , V_{corr}

En la En la Tabla 22, se presenta la información de i_{corr} y V_{corr} que fueron deducidas a partir de R_p y la relación de Stern-Geary (ec.40), mientras que la V_{corr} se obtuvo a partir de la ec. 37, los resultados se presentan en dicha Tabla.

Tabla 22. Valores de i_{corr} y V_{corr} Procedente de los parámetros de ajuste del circuito equivalente en CER a $-950\text{mV}_{.Cu/CuSO_4}$.

Transcurso de la prueba en días							
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	1942.22491	3546.049	5292.04522	4365.578	54917.029	1244426.34	-
i_{corr} ($\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	1.3387E-05	7.3321E-06	4.913E-06	5.9557E-6	4.7344E-07	2.0893E-08	-
V_{corr} (mpa)	1.01692637	0.55698602	0.37322049	0.45242571	0.03596516	0.00158716	-

Con relación a los resultados que se presentan en tabla de datos anterior, se observa un incremento en la R_p paulatino en los primeros 15 días, después de este día se incrementa los valores de este parámetro, siendo notable el incremento al final de la prueba, esto debido a la compactación de las capas de sedimentos inorgánicos sobre la superficie, que dificulta el transporte de especies electrolíticas hacia el interior de dichas capas.

6.3.4.3.2.5 Relación del comportamiento entre CEE y CER

Relacionando los valores que se obtuvieron en la celda de evaluación como de la celda de referencia, se presentan los datos a manera de comparación de ambos sistemas en la Tabla.

Tabla 23. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y V_{corr} de ambos sistemas de evaluación CEE y CER, con potencial de $-950\text{ mV}_{.Cu/CuSO_4}$.

Transcurso de la prueba en días								
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30	
CER	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	1942.22490	3546.049	5292.04522	4365.578	54917.029	1244426.34	-
	V_{corr} (mpa)	1.01692637	0.55698602	0.37322049	0.45242571	0.03596516	0.00158716	-
CEE	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	2799.65493	1446.52414	1441.61702	553.71052	977.2134	8151.1228	16838.902
	V_{corr} (mpa)	0.70547971	1.36541084	1.37005856	3.56702584	2.02115498	0.24231014	0.11729386

En esta Tabla se presenta la información que se determinó en cada celda (*CEE* y *CER*), con la finalidad de comparar el comportamiento de las variables de R_p y V_{corr} de cada celda, observando la función inversa de estas.

En relación a los datos de R_p , en la cual nos indica el comportamiento y las características de las películas y capas que se formaron en la superficie de cada electrodo en ambas celdas. Sin embargo los datos en *CER*, se tornaron demasiados elevados, esto posiblemente se debió a la naturaleza y compactación de la posible película que se formó por la depositación de partículas finas sobre la superficie del metal a lo largo de la prueba, las películas formadas presentaron alta resistencia al transporte iónico y en consecuencia a las reacciones de superficie.

En relación a los datos de R_p obtenidos en *CEE*, los valores se apegan más a las diferentes etapas de desarrollo y actividades que tuvieron las *BSRs* en el transcurso de la prueba, donde después del día 20 de ensayo se elevó esta variable debido a la maduración y densificación de las capas de biopelículas formadas de exopolisacáridos, sin embargo al final de la prueba se registra una disminución de este parámetro, esto debido a la movilidad o heterogeneidad de las películas formadas sobre la superficie del metal.

En relación a la velocidad de corrosión se puede indicar que esta estuvo sujeta a al comportamiento de R_p , en ambas celdas de evaluación, resultando que en *CER* la velocidad de corrosión fue baja y vario de 0.00169 a 1.01693 mpa, obteniendo el valor más alto al inicio de la prueba, con disminución hasta el final de la prueba donde se alcanzó el valor mínimo de corrosión.

En relación a este parámetro en *CEE* se observa que se incrementó desde el inicio hasta el día 15 donde alcanzó su máximo nivel (2.4393 mpa) después de este día, la velocidad de corrosión presentó una disminución al día 20, después logra recuperarse y registrarse una velocidad similar a la del día 15 (2.4254 mpa). Este parámetro se relacionó y se ajustó a las diferentes etapas de desarrollo y actividad de los procesos microbianos registrados sobre la superficie del metal.

En base a estos resultados que se han analizados se denota la actividad de las bacterias sulfato reductoras en los proceso de corrosión que ocurrieron en la superficie del metal protegido con $-950\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

6.3.4.4 Corriente de protección (i_p)

La demanda de corriente de protección, se basa en medir la corriente requerida por unidad de área del electrodo en evaluación cuando se aplica un potencial de protección. El seguimiento de este parámetro se realizó para conocer la necesidad de corriente protección frente a la actividad de la poblacional de *BSR* y en ausencia de estos microorganismos (*CEE* y *CER*).

6.3.4.4.1 Descripción del comportamiento de i_p en *CEE*

En la Figura 58, se exhibe de manera gráfica la corriente de protección (i_p) que presentaron ambas celdas de evaluación (*CEE* y *CER*), durante el desempeño de las pruebas, se observó que las magnitudes registradas en cada sistema fueron diferentes, ya que en *CEE* el suministro de corriente por la *PC* presentó dos facetas, la primera se presentó del día 1 al día 14, en se observa que la corriente que suministra el potencial no fue suficiente y por lo tanto el suministro fue en constante crecimiento. La otra faceta está compuesta por una fuerte demanda de corriente ocurrida del 15 al día 17 y de este día al día 27, se logra estabilizar con ligeros altibajo en suministro de corriente, manteniéndose en esta hasta el final de la prueba. Los movimientos que tuvo este parámetro en el transcurso de la experimentación, se relacionen con la actividad de las *BSRs*, ya que el potencial de protección suministró la corriente necesaria para llevar a cabo cualquier reacción de reducción de especies químicas (molécula de hidrógeno) en el límite de la interfase. En base a este indicador, cuando las moléculas de hidrógeno reducido se retiran con mayor frecuencia, ocasiona que se incremente la corriente de protección. Estos retiros o barridos de hidrógeno lo realizan las *BSRs* en la interfase.

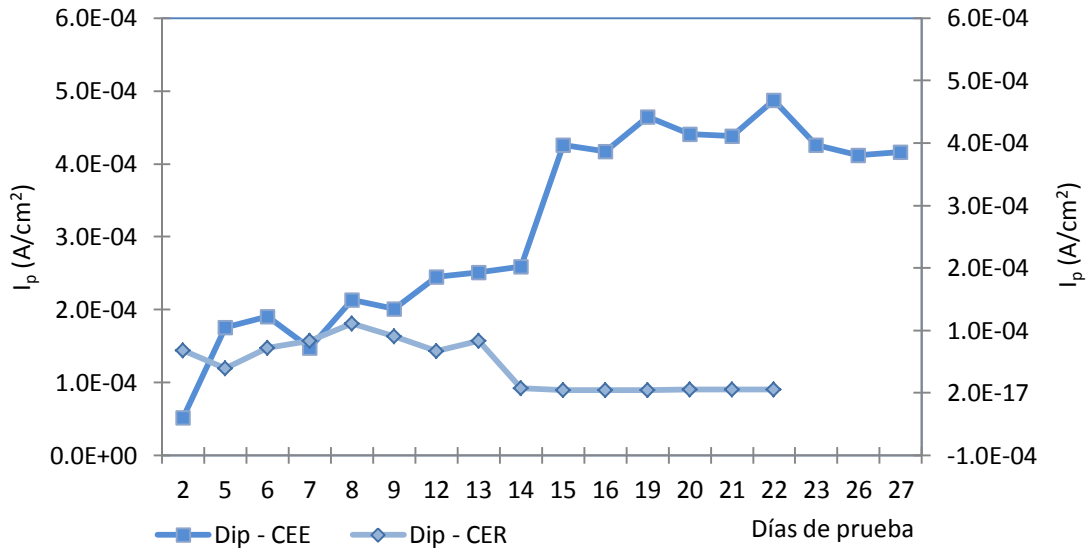


Figura 58. Comportamiento de la corriente de protección en el tiempo, en los sistemas *CEE* y *CER*, a -950 mV. *Cu/CuSO4*

6.3.4.4.2 Descripción del comportamiento de i_p en *CER*.

Por otra parte, con respecto a la curva de la \hat{i}_p en la *CER*, la demanda de corriente para mantener el potencial de -950 mV fue muy pequeña, motivo por el cual fue necesario ampliar el rango de su eje a fin de observar su comportamiento, este tuvo pequeñas variaciones en los primero 13 días, después en la mayor parte de prueba presentó una estabilización en la \hat{i}_p hasta el final del ensayo, tal como se observa en la Figura 58. Esta tendencia en la curva fue en decremento de la demanda de \hat{i}_p , posiblemente se debió a una homogeneidad del ensuciamiento y deposición de partículas orgánicas e inorgánicas sobre la superficie del metal protegido.

6.3.4.5 Análisis de superficie expuestas a 950 mV. *Cu/CuSO4*.

El análisis físico y químico de superficies es bastante extenso debido a que muchos fenómenos que ocurren tienen lugar en superficies. Para el estudio resulta importante esta parte, debido a que a nivel de superficie ocurre la *PC* en la que se

establece una corriente de protección, en esta misma, se lleva a cabo los procesos de colonización de *BSRs* y que pueden interactuar con estos procesos.

El análisis de superficies está orientado a la observación de microorganismos, capas de biopelículas, depósitos de sulfuros y otros tipos de sedimentos. Así mismo observar la morfología de las *BSRs* y posibles daños por corrosión que ocurrieron en dicha superficie.

El análisis de superficie se hizo a través de los barridos hechos a diferentes ampliaciones de la superficie de los electrodos de trabajo, llevados a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (*MEBA*).

En el electrodo de referencia, se realizó el análisis *MEBA* con la finalidad de determinar el grado y tipo de daño ocasionado a la superficie por el medio de cultivo. Para el electrodo de evaluación el análisis *MEBA* se llevó a cabo para observar *BSRs*, biopelículas y depósito de materiales

6.3.4.5.1 Análisis de superficie de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión del electrodo de trabajo de la *CEE*.

En las Figuras 59 y 60 se muestra imágenes que se obtuvieron en los barridos que llevaron a cabo a 1500x, en la cual se distingue un relieve diagonal, en la parte bajo, se alcanza a observar una planicie de biopelícula conteniendo gran cantidad de somas de microorganismo, mientras que en el alto relieve se distinguen las capas de sulfuros, así como la dispersión de microorganismos sobre la superficie de dichas capas, así como algunos cúmulos de polisacáridos.

En la Figura 59, se muestra imágenes que se obtuvieron en los barridos que llevaron a cabo a 4000x, en la cual se observa una ruptura de la capa de sulfuro, dejando entrever en su interior una gran cantidad de microorganismos de forma bacilar, ligeramente curvos de tamaño de 4 a 7 μm , así como pequeños florecimientos de polisacáridos.

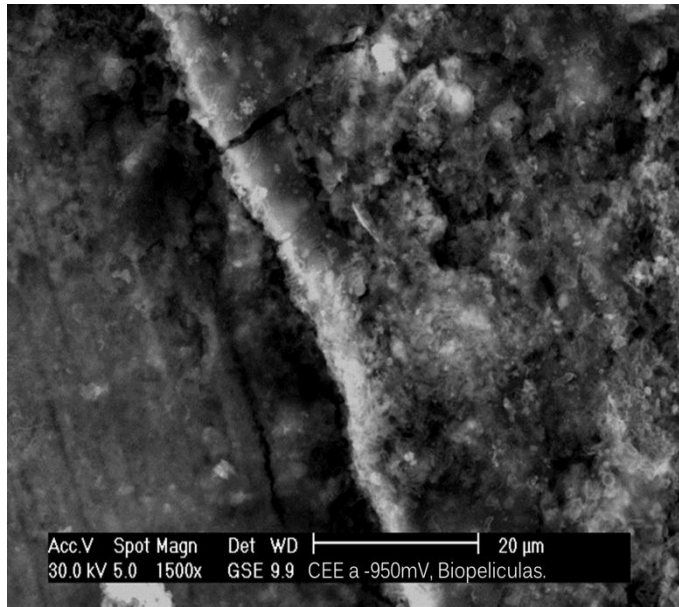


Figura 59. Muestra ruptura y pliegue de la biopelícula y somas de microorganismos

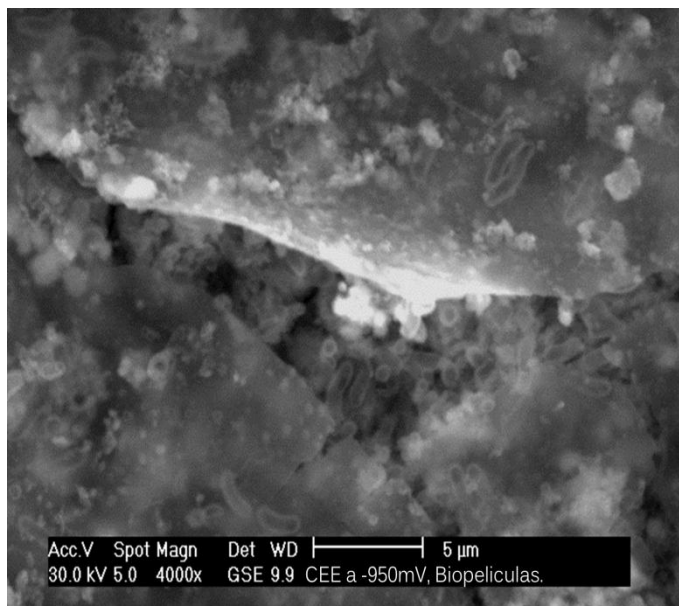


Figura 60. Muestra morfología de microorganismo y sobre posición capas de sulfuros

6.3.4.5.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del E_t de la CEE

En las Figuras 61 y 62, se presentan las imágenes del barrido de dos campos, en la primera imagen se realizó a una magnificación de 300x del área dañada por

corrosión localizada, a fin de observar la densidad y el tipo de daño ocasionado por este tipo de corrosión. En tanto que la segunda imagen correspondió a un barrido realizado a 6000x y que muestra el daño por corrosión localizada del tipo picadura cuyo diámetro fue de $\sim 5.11\mu\text{m}$. No se logra observar su profundidad debido a la acumulación de productos de corrosión en su interior. En ambas imágenes muestran corrosión uniforme debido a la atenuación de las ralladuras en la preparación de la superficie del electrodo de trabajo.

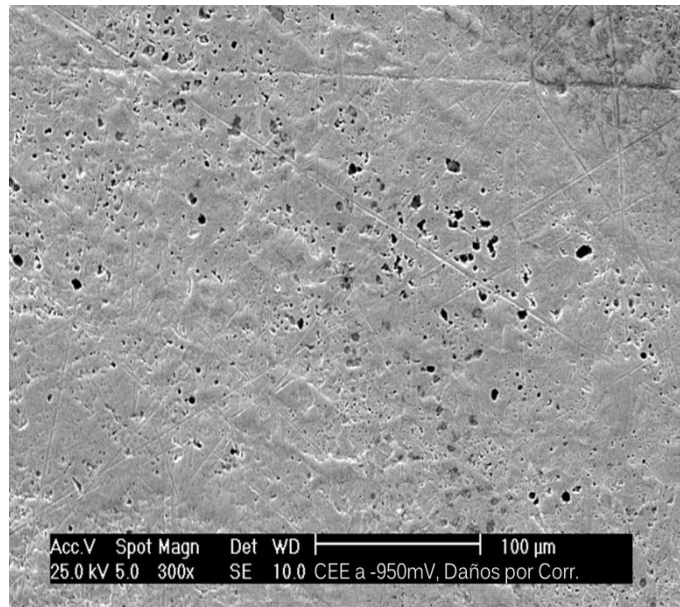


Figura 61. Muestra el daño por corrosión uniforme y localizada de la superficie expuesta al medio.

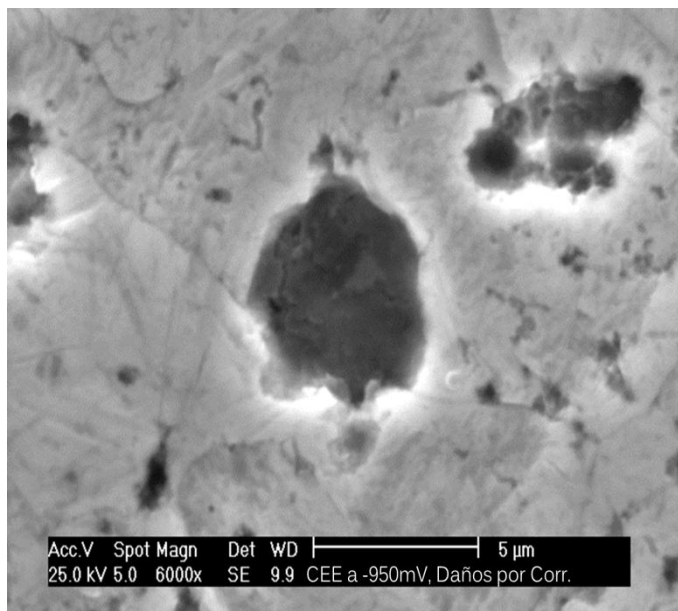


Figura 62. Daño por corrosión localizada de la superficie expuesta al medio.

6.3.4.5.3 Análisis de superficie del electrodo de la CER dañado por corrosión

En la Celda electroquímica de referencia (CER), solamente se presentan las imágenes de la superficie del electrodo de Acero *API XL52* que estuvo inmersa en medio de cultivo y protegido con $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$. Debido a la ausencia de *BSRs* en el sistema, no se consideró conveniente realizar el análisis in situ de la superficie protegida y por lo que solamente se aplicó la limpieza y el tratamiento químico.

En las Figuras 63 y 64, se muestran las imágenes que se obtuvieron del barrido de dos campos. La primera imagen (Figura 63) se obtuvo a una amplificación de 300x, a fin de tener una mayor área de revisión para encontrar daños por corrosión, en esta superficie solo se observan las ralladuras del preparado de la superficie, así mismo se alcanzan a distinguir pequeños puntos en la mayor parte de la superficie.

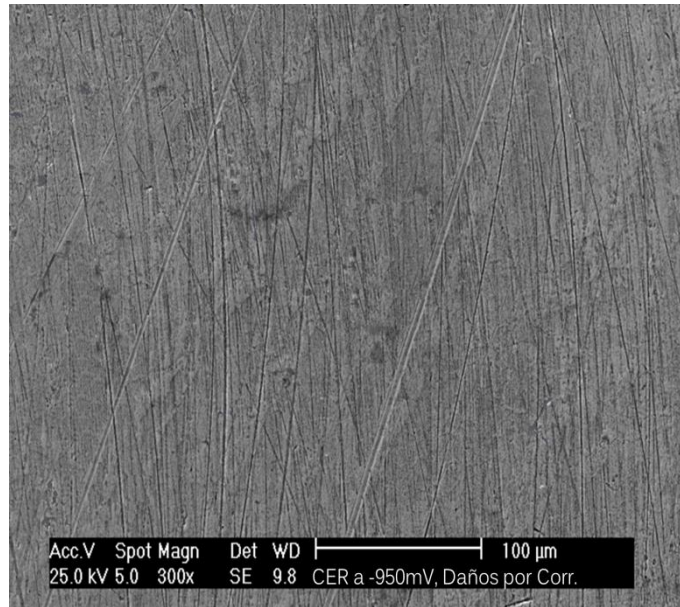


Figura 63. Superficie sin daño aparente por corrosión al medio.

En la imagen de la Figura 64, se presenta un barrido a 1000x, esta se realizó para verificar que los puntos observados a 300x no fueran de corrosión localizada. En esta imagen se observa nuevamente la huella del preparado de superficie con diferente profundidad, solo se puede apreciar una ligera corrosión uniforme pero no se observar corrosión localizada.

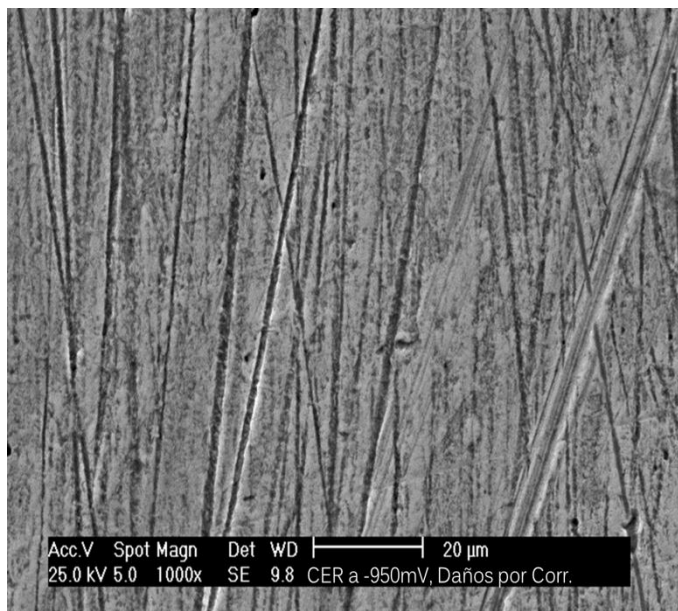


Figura 64. Superficie con zonas con corrosión generalizada al medio.

6.4. Potencial de protección de $-1000 \text{ mV} \cdot \text{Cu}/\text{CuSO}_4$

La información experimental de las celdas *CEE* y *CER*, han sido ordenadas para su estudio en parámetros físicos, bacteriológicos, químicos, electroquímicos y análisis de superficie.

6.4.1 Parámetros Físicos

Los parámetros físicos están conformados por las mediciones de *pH*, y *Eh* que fueron registrados tanto en la *CEE* como en la *CER*, a fin de detectar algún cambio significativo que afectara el desarrollo y desempeño de las *BSRs* en el sistema de evaluación.

6.4.1.1 Comportamiento del *pH*

En la Figura 65, se muestra la trascendencia del *pH* en el medio de cultivo en las celdas electroquímicas de evaluación y de referencia, a fin de registrar cambios significativos en *pH* inherentes a la actividad de las *BSRs* o bien al generado

debido a las posibles reacciones de superficie que hayan ocurrido por la protección catódica sobre los electrodo de trabajo y que fueron descritas en el set experimental del potencial de $850 \text{ mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$.

En el citado gráfico, se muestra el comportamiento del pH en el medio de cultivo de las celdas electroquímicas. Observando que la curva de pH perteneciente a la *CEE*, se mantuvo oscilando entre 6.63 a 6.78 durante la prueba, manteniéndose debajo del área de baja acidez, el desarrollo de este parámetro se considera que esta dentro del parámetro del rango propicio para el crecimiento de estos microorganismos.

En tanto que el pH registrado en la *CER*, mostro cierta actividad que se inició en la zona de ligera alcalinidad, manteniendo ciertos altibajos hasta el día 12, después del día 13 al 14, se presenta una ligera elevación en el valor de pH , después de esta eventualidad, se logra estabilizar en la zona de ligera alcalinidad manteniéndose en este estado hasta el final de la prueba. Este comportamiento puede ser asociado con los procesos de alcalinización generado en el entorno de la superficie protegida por la *PC*.

Por otra parte, cambios significativos no se tuvieron, esto posiblemente debido a que algunos ingredientes del medio de cultivo pudieron actuar como especies amortiguadoras de pH .

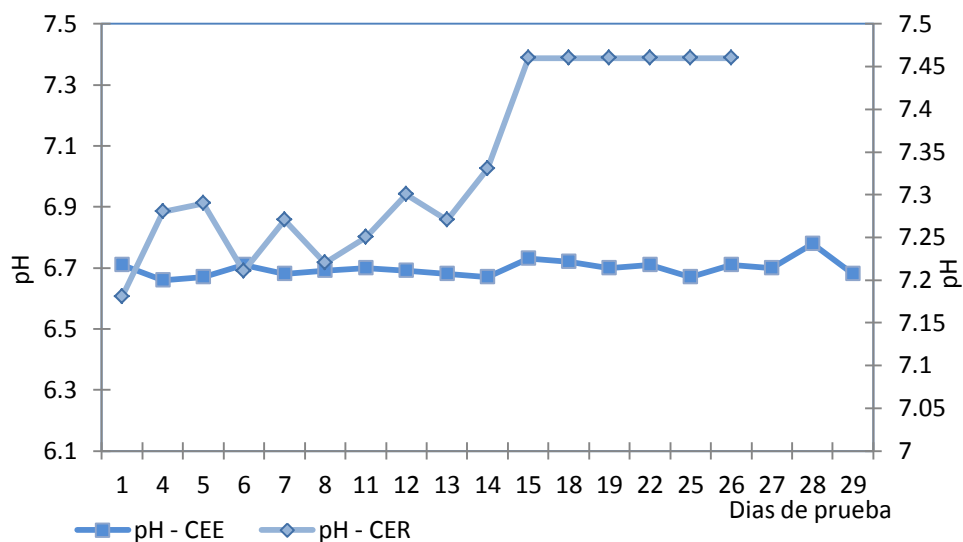


Figura 65. Comportamiento del pH respecto al tiempo en el medio de cultivo a $-1000\text{ mV}_{\text{-Cu/CuSO}_4}$

6.4.1.2 Potencial redox (E_h).

La importancia de este parámetro se extiende a varios ámbitos, en los cuales se moderan muchos compuestos químicos presentes tanto en la atmósfera, cuerpos de agua naturales, así como en el entorno de los microorganismos y al interior de los mismos. Donde gran cantidad de reacciones que se llevan a cabo están sujetas a un régimen redox.

Las celdas experimentales (CEE y CER), se ambientaron en su inicio con potenciales E_h de -418 y -407 mV respectivamente. En la CEE , este parámetro presentó algunas oscilaciones (-400 a -428), no obstante, el rango aseguró las condiciones ambientales para el buen desempeño de estos microorganismos en el sistema durante el periodo de prueba.

En la CER , las condiciones de E_h , en su inicio fue de -330 mV, pero al cuarto día se logró la estabilización, aunque este presentó ligeras oscilaciones en sus registros (± 418.2 mV), en el transcurso de la prueba. En esta celda no se logró detectar ninguna perturbación externa y solamente se tuvo injerencia debidas a la aplicación de la PC . Dichos comportamientos se muestran en la Figura 66.

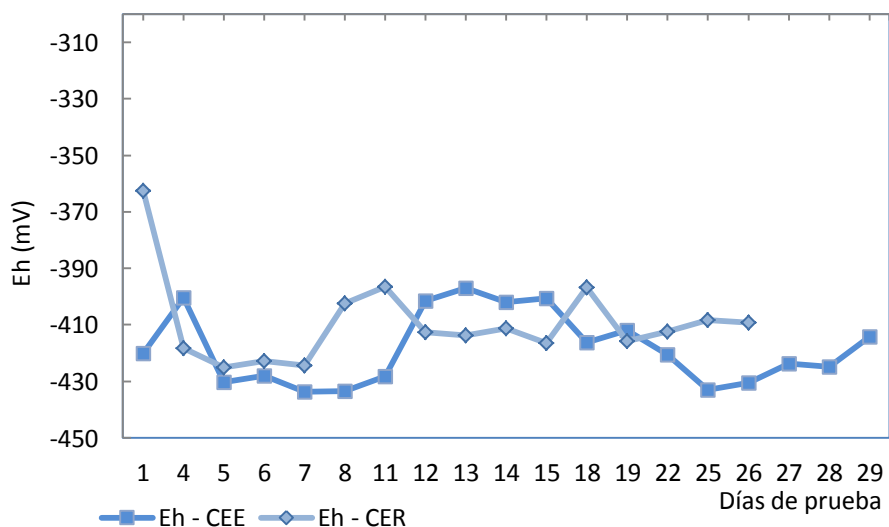


Figura 66. Comportamiento del E_h en función al tiempo en el medio de cultivo a -1000 mV._{Cu/CuSO4}

6.4.2 Parámetros bacteriológicos

6.4.2.1 Densidad poblacional (D_p)

La densidad poblacional de *BSRs* para este set de pruebas, se mantuvo en crecimiento exponencial de estos microorganismos hasta el sexto día en el cual se alcanzó la D_p máxima. Después se aprecia un decremento en población influenciado probablemente por la demanda de nutriente, ya que las lecturas de los días 24 y 26, se logra la mayor D_p de la prueba, después de estos días se registra un decaimiento que posiblemente estuvo influenciado por dos factores, el primero por la competitividad por los nutrientes debido a la alta densidad de microorganismos y el otro por la escases de nutrientes y la acumulación de detritos celulares en el sistema.

Revisando los registros que componen al gráfico de la Figura 67, se puede apreciar que la densidad poblacional registrada, en ninguno de los puntos evaluados, las *BSRs* se vio afectadas por el potencial de protección de -1000 mV _{Cu/CuSO4} aplicado al electrodo de trabajo.

Respecto a la curva de E_h que se acopló para observar cierta corresponsabilidad entre este parámetro y la D_p , debido a que a cuando se alcanza el crecimiento exponencial de estos microorganismos, se obtuvo el mayor ambiente reductor, así mismo, antes de finalizar la prueba el E_h baja y la D_p decae ligeramente, sin embargo hay otros factores que posiblemente presentaron mayor injerencia en el comportamiento de la densidad poblacional tal es caso de los nutrientes o bien el exceso de población y la acumulación de detritos celulares.

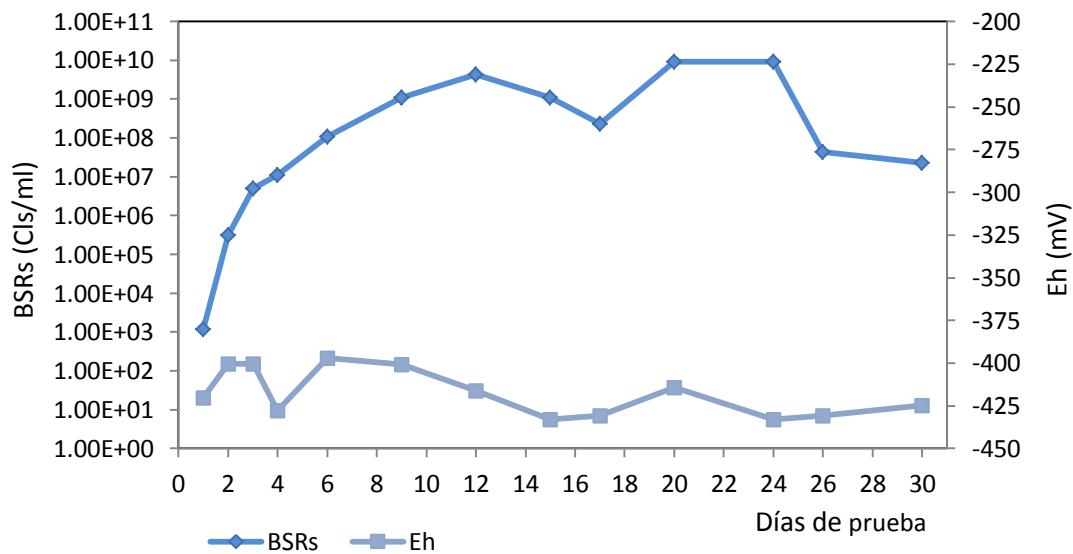


Figura 67. Relación de condiciones de E_h y Densidad poblacional en el tiempo de BSRs a $-1000\text{ mV} \cdot \text{Cu/CuSO}_4$

6.4.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico por BSRs

Como ya se ha indicado, que en el proceso de respiración de las BSRs intervienen enzimas que logran activar a los sulfatos para iniciar la reducción, mientras que otro sistema enzimático (hidrogenasas) suministran hidrógeno como donador de electrones, los cuales son usados para las diferentes reducciones de los sulfato y como resultado se produce por una parte al ion sulfhídrico (HS^-) o bien sulfuro de hidrógeno (H_2S), que son excretados al exterior de la célula y por otra parte, la acumulación de iones hidrógeno (H^+) a nivel de membrana, originan gradientes que inducen al sistema enzimático ATPasa para llevar a cabo la síntesis de ATP [1].

En el campo de la microbiología se ha tomado a la respiración como un parámetro indicador de la actividad celular, así en sistemas aerobios el consumo de oxígeno es evidencia de la actividad celular aerobia. Mientras que el consumo de nitratos, sulfatos, entre otros, se han tomado como parámetros indicadores vitales de los sistemas anaerobiosis. Para el caso particular de las BSRs, se ha usado a los sulfatos como indicador de la actividad celular.

En la Figura 68, se muestran las concentración de SO_4^{2-} y H_2S con respecto al tiempo. La curva de sulfatos compuesta por las diferentes concentraciones registradas, revela buena actividad de estos microorganismos en la celda, debida al consumo extraordinario de sulfatos, reflejando un metabolismo eficiente de las *BSRs* en la celda.

Gran parte del mantenimiento en crecimiento en fase log fue motivado por las reposiciones programadas de cultivo viejo por nuevo al sistema, que cubrieron las necesidades básicas de sulfatos y nutrientes por la población de *BSRs*. En la curva de sulfatos en varios puntos de monitoreo se logró mantener un residual de sulfatos en el medio lo que origino mantener a la población activa.

Respecto a la curva de ácido sulfhídrico, se observa que al sexto día, se registró su máxima concentración en el medio, posteriormente este parámetro se mantuvo en constante incremento en la producción de sulfhídrico hasta el día 19, y de aquí al término del ensayo los registros en concentración se mantuvieron más o menos constantes.

En base a los parámetros registrados en (D_p , SO_4^{2-} y H_2S), a lo largo del desarrollo experimental, no se logró detectar alguna discontinuidad de estos, debida a la injerencia del potencial de $-1000\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$. Esto también puede apreciar en las Figuras 67 y 68.

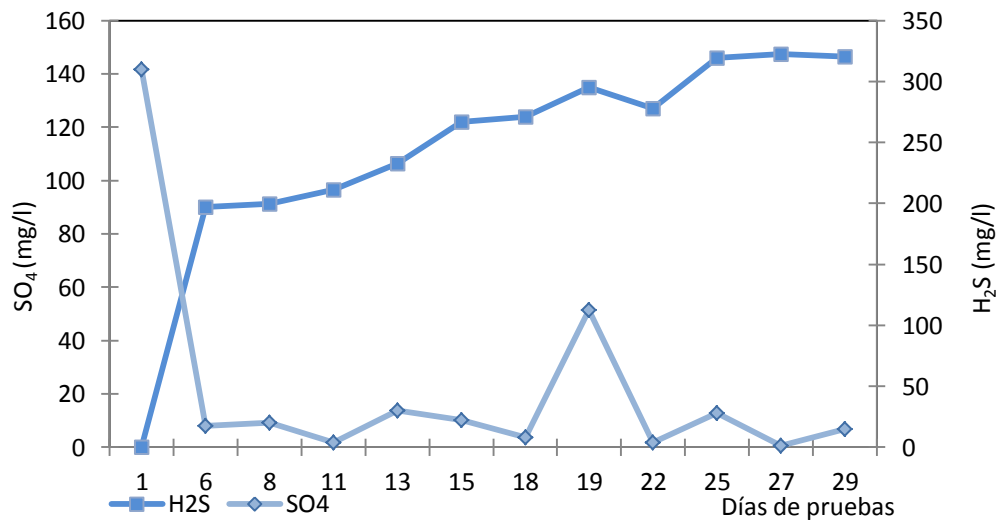


Figura 68. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por *BSRs* durante la prueba en el sistema *CEE* a $-1000 mV_{Cu/CuSO_4}$

6.4.3 Parámetros químicos

En este esquema se consideraron solo dos parámetros, alcalinidad e ion ferroso (Fe^{2+}). La alcalinidad, puede tener dos orígenes, la asociada a la actividad de las *BSRs* y la generada por la actividad de la *PC* aplicada al electrodo de trabajo.

La alcalinidad fue considerada, debido a que la protección catódica, genera cierta alcalinidad en el medio donde se aplica, debido a la posible reducción de especies químicas (O_2), obteniendo radicales libres de OH^- y en consecuencia el *pH* puede moverse hacia la zona alcalina y posiblemente afectar la viabilidad de microorganismos presentes en el sistema.

Otro los parámetros de interés al trabajo fue el ion ferroso (Fe^{2+}), se consideró registrar su presencia y evolución en el medio de las celdas, ya que su procedencia de este es el metal y cualquier incremento en concentración nos relaciona a un proceso de desgaste por corrosión que esté ocurriendo en la superficie del electrodo de trabajo, que está protegido catódicamente y de esta manera tener evidencia del proceso de corrosión, y en consecuencia de la influencia de las *BSRs* sobre la protección catódica.

6.4.3.1 Alcalinidad

Como es de conocimiento que la alcalinidad está en función del *pH* en el sistema y en base a este, se conoce la especie o las especies químicas que están regulando este parámetro en el sistema.

La alcalinidad generada en la *CEE* y mostrada en la Figura 69, esta se inició con incremento alto en concentración, posteriormente estos incrementos disminuyeron en contenido de alcalinidad hasta el final de la prueba. Cabe mencionar que en esta celda se registró indiscriminadamente tanto la alcalinidad generada por el propio crecimiento como la producida por la *PC* aplicada al electrodo de trabajo.

La alta alcalinidad registrada en los primeros días, estuvo influenciado por el crecimiento exponencial de las *BSRs*, ya que estos microorganismos en su desarrollo pueden liberar CO_2 , y este al reaccionar con el agua y las sales, se producen los bicarbonatos correspondientes, es en esta fase donde el ion bicarbonato funciona como un regulador o buffer de *pH* y promueve cierta alcalinidad al medio, asimismo este parámetro es regulado por la actividad microbiana del sistema.

Por otra parte, no se observó alguna afectación por la alcalinización del medio, que ocasionara problemas sobre la densidad poblacional de *BSRS*.

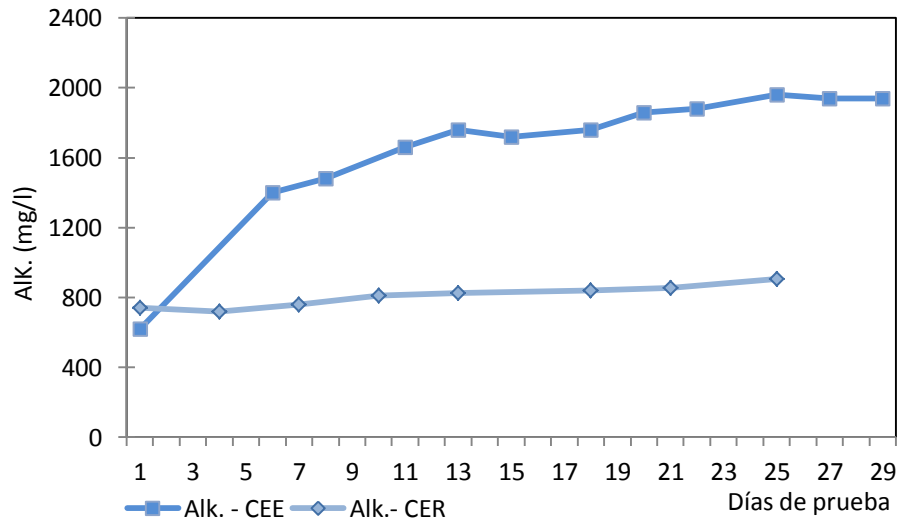


Figura 69. Comportamiento de la alcalinidad respecto al tiempo en los sistemas CEE Y CER a $-1000 mV_{Cu/CuSO_4}$

Por otra parte, el comportamiento de este parámetro en la CER, se muestran en la Figura 69, en el cual la alcalinidad presento una concentración de 740 mg/l y su trascendencia en el transcurso de la prueba, solo se registraron ligeros incrementos en concentración de alcalinidad del medio hasta el final de la prueba.

Del gráfico se observa que la alcalinidad desarrollada en la CEE fue mayor que la desarrollada en CER, sin embargo este parámetro tuvo influencia en el desarrollo de la densidad poblacional de las BSRs.

6.4.3.2 Hierro (Fe^{2+})

Uno de los propósitos en esta serie de pruebas es evaluar al ion ferroso (Fe^{2+}) en el transcurso de las pruebas llevadas a cabo tanto en CEE como en CER, a potenciales de $-1000 mV_{Cu/CuSO_4}$ a fin de conocer la influencia de las BSRs sobre la actividad de la PC, ya que esta suministra un flujo de electrones y suprime a los electrones procedentes de la oxidaciones del metal.

Respecto a lo anterior se presupondría no encontrar iones de hierro y en caso de determinar su presencia estas permanecerían invariables en su concentración durante la prueba, sin embargo sus registros tanto en la CEE como CER, estas

tuvieron incrementos en concentración tal como se muestran en forma gráfica de la Figura 70.

En la Figura 70, se muestra los resultados del análisis del ion ferroso tanto en la *CEE* como la *CER*, ambas curvas presentan comportamiento similar, difiriendo solo en concentración donde la concentración del ion hierro oscilo de 0 a 1.22 mg/l, mientras que en *CER* este se encontró desde 0 a 0.44 mg/l.

Las diferencias en concentraciones de este ion en ambas celdas (*CEE* y *CER*), estuvo regulado por la actividad directa e indirecta de las *BSRs*, sobre la superficie del acero *API XL 52*, las cuales estuvieron protegidas con $-1000 \text{ mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$. En la medida que se dio la actividad microbológica y el proceso de desestabilización de la *PC*, se fue dando la contribución de electrones procedentes de la oxidación del hierro, este flujo de electrones fueron incorporadas a la demanda por el sistema y la transferencia del ion ferroso a la fase acuosa se fue dando durante este proceso. El ion ferroso (Fe^{2+}) liberado fue el que se estuvo registrando en ambas celdas de evaluación.

Para la *CEE*, el registro de la concentración de este ion estuvo siempre supeditado al ion libre, ya que parte de este ion reacciona con el sulfuro de hidrógeno del medio, sin embargo da idea de la intensidad en que el hierro estructural se está oxidando y pasar a solución.

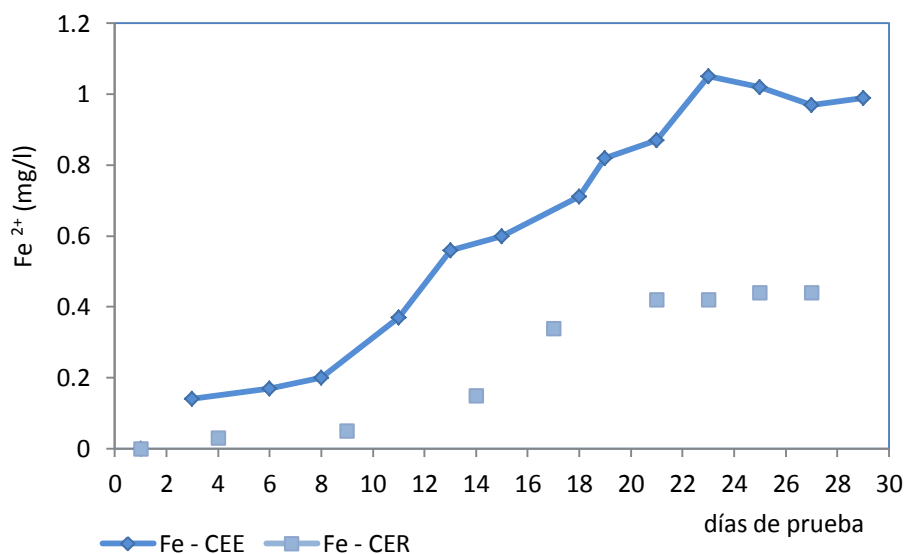


Figura 70. Variación en la concentración de Fe^{2+} en el medio debido a la oxidación del acero *API XL-52* protegido a $-1000 mV_{Cu/CuSO_4}$

Hasta el momento, se han evaluado revisado los diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos en que estuvieron expuestos los electrodos de trabajo y protegidos con $-1000 mV$. A continuación se presentan las diferentes pruebas programadas para determinar y evaluar el posible daño a la superficie del acero *API XL 52* por inferencias de dichos factores.

6.4.4 Parámetros electroquímicos

Aunque la técnica gravimétrica no está contemplada en el dominio de la electroquímica, esta se consideró necesario utilizarla como una medida complementaria para el estudio.

6.4.4.1 Técnica gravimétrica

Esta técnica se utiliza para determinar la velocidad de corrosión que presentaron los electrodos al ser sumergidos en el medio de cultivo con y sin microorganismos, la diferencia de pérdida de peso que se registró se considera un promedio de las eventualidades que interactuaron con la superficie del metal durante el periodo experimental.

6.4.4.1.1 Cálculo para determinar velocidad de corrosión

El cálculo de la velocidad de corrosión por esta técnica se llevó a cabo aplicando la fórmula de la ecuación 34 y aplicando los datos físicos correspondientes al electrodo de trabajo (Et). Los datos de corrosión obtenidos se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Velocidad de corrosión sobre el acero *API XL 52*, mediante técnica gravimétrica protegido con $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

W_i (g)	W_f (g)	ΔW (g)	Área (cm^2)	Densidad (g/cm^3)	Tiempo (Hrs)	V_{corr} (mpa)	V_{corr} (mma)
Celda Electroquímica de Referencia (CER).							
5.0545	5.0542	0.0003	6.01614963	7.86	840	0.0261	0.00060
Celda Electroquímica de Evaluación (CEE)							
5.3748	5.3715	0.0033	6.01614963	7.86	696	0.3459	0.0088

La velocidad de corrosión determinada por esta técnica para este set de pruebas fue relativamente baja, ya que en ambas celdas estuvieron por debajo de la unidad de corrosión, sin embargo la velocidad de corrosión para el electrodo de trabajo en la *CEE*, puede indicarse que se tuvo hasta un 92.45% en velocidad de corrosión por encima del valor registrado en el electrodo de trabajo de la *CER*. Esta relación puede ser atribuida a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras en el sistema.

Por otra parte, la velocidad de corrosión registrada por esta técnica, se considera como un promedio de las eventualidades de corrosión ocurridas en la superficie del electrodo de trabajo, así mismo, la pérdida de material con respecto al tiempo, se supone que se llevó a cabo de forma longitudinal a la superficie y no transversal, es decir solo se contempla corrosión generalizada o uniforme.

Por otro lado, dentro del ámbito de evaluación del impacto a la superficie de los electrodos de trabajo por la actividad microbiana, además se utilizaron la técnica de Resistencia a la polarización R_p y la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (*EIS*), aunada con análisis de superficies mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA).

6.4.4.2 Resistencia de Polarización Lineal (R_p).

Con el propósito de determinar los cambios que se estuvieron llevando a cabo en la superficie del metal, se consideró conveniente utilizar a la técnica electroquímica de R_p para conocer la velocidad de los procesos de oxidación y reducción en la superficie de los electrodos de trabajo de las celdas experimentales (*CEE* y *CER*).

Como ya ha sido mencionado, la técnica de R_p consiste en la aplicación de un barrido de potencial, cercano al potencial de equilibrio, lo suficiente pequeño para no alterar al sistema, pero lo suficiente para conocer el comportamiento de los procesos de óxido reducción llevados a cabo en la superficie del electrodo.

6.4.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en *CEE* y *CER* a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

La R_p , se determinó como la medida de la resistencia que ofrece la superficie metálica en proceso corrosión al paso de la corriente.

6.4.4.2.2 Cálculos para determinar velocidad de corrosión

Con el valor de la pendiente de la curva (R_p), se calculó la corriente de corrosión (i_{corr}), usando la ecuación 35 y considerando el coeficiente de Stern-Geary.

Los datos de i_{corr} , fueron aplicados a la ecuación 37 para obtener la velocidad de corrosión en cada uno de los puntos de los ensayos. Estos datos se encuentran graficados en la Figura 71.

En dicha Figura, se observa el comportamiento de V_{corr} determinada en ambas celdas de evaluación, donde esta variable fue mayor en *CEE*, que la registrada en *CER*.

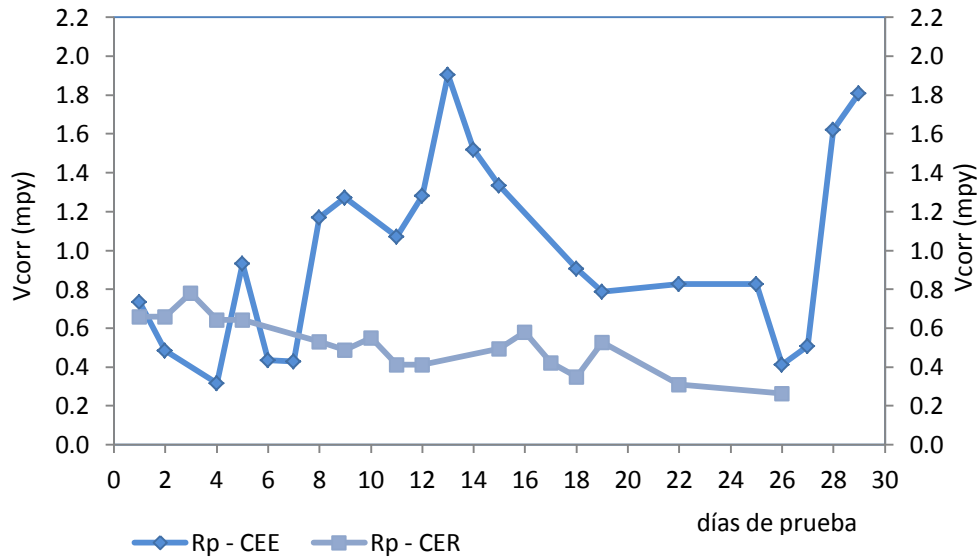


Figura 71. Comportamiento de la V_{corr} en el tiempo, sobre el acero *API XL- 52* en *CEE* y *CER*, a $-1000\text{mV}_{Cu/CuSO4}$.

6.4.4.2.3 Comportamiento de la V_{corr} en *CEE/CER*

La velocidad de corrosión registrada en el electrodo de trabajo de la *CEE*, tuvo una variación de 0.3175 hasta 1.9062 mpa, mientras que la V_{corr} en el electrodo de la *CER*, la oscilación fue de 0.26393 hasta 0.78232 mpa. A pesar de que los datos en velocidad de corrosión registrados en *CEE* tuvieron un comportamiento irregular, se observa que en la mayor parte de las regiones del gráfico, los valores de corrosión estuvieron por arriba de los valores registrados en *CER*.

De acuerdo al gráfico la V_{corr} en el electrodo de la *CEE*, esta tuvo un comportamiento muy irregular, ya que se dieron eventos donde el transporte de carga como el de masa estuvieron activos y dieron lugar a incrementos en el proceso de corrosión (V_{corr}), pero cuando se formó alguna biopelícula en la superficie, dicho transporte se vio obstaculizado y se incrementó la R_p y por lo tanto disminuyó la V_{corr} . Este comportamiento se vio reflejado hasta el final de la prueba pero con diferentes intensidades. En este gráfico se puede observar que los día 28 y 30, disminuyó notablemente la R_p y se incrementó la V_{corr} a estas alturas de la experimentación, adonde comúnmente la biopelículas son estables y

densificadas, se logró una caída en R_p , dando lugar a incremento en corrosión, este movimiento estuvo reflejado por desprendimientos de las capas de películas de los polisacáridos, dando lugar a espacios [52], que comunican con la superficie y propiciando una comunicación del electrolito con la superficie metálica, ocasionando que las reacciones de superficie se restituyan y los procesos de corrosión vuelvan a su nivel.

La sucesión de eventos descritos y registrados por el comportamiento de la V_{corr} , también pueden apegarse al mecanismo de $HS^-/Fe_{1+x}S$ que ha sido descrito, donde la mackinawita formada sobre la superficie del metal, se realiza generando una película o matriz porosa e inestable, que permite difundir al interior de esta al ion sulfhídrico que reacciona con la estructura del metal, formando una nueva película de mackinawita, esta al crecer ejerce presión sobre película vieja, fragilizándola y la rompe. Esta sucesión de eventos pueden volverse cíclicos, si las condiciones de pH y tensión de sulfhídrico no cambian, lo que se permite que se den eventos de formación y disolución de películas (activo pasivo), ocasionando corrosión localizada del tipo picadura.

En relación a los resultados en CER, se puede indicar que la velocidad de corrosión registrada estuvo por debajo de la unidad y que estuvo controlada por la corriente protección o bien por escases de especies químicas que pudieran reducirse en la interfase.

6.4.4.3 Espectroscopia de Impedancia electroquímica (EIS).

La técnica Espectroscopia de Impedancia Electroquímica, consiste en aplicar una perturbación senoidal de potencial eléctrico de frecuencia variable al material estudiado y registrar su respuesta en corriente dentro de la celda electroquímica, de aquí se puede indicar que la impedancia es un cociente de la relación potencial aplicado y la intensidad de la corriente medida a la salida, teniendo en cuenta que la impedancia varia con la frecuencia del potencial aplicado y que esta es característico para materiales y sistemas electroquímicos.

6.4.4.3.1 Resultados de la Impedancia electroquímica en *CEE* a $1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.
Con base a lo descrito anteriormente, se determinaron los espectros de impedancias que se realizaron a diferentes tiempos durante el transcurso de la experimentación. Los datos obtenidos se presentan en el diagrama de Nyquist de la Figura 72 y que corresponden a la *CEE*.

6.4.4.3.1.1 Diagrama de Nyquist

En base en el diagrama de Nyquist, se puede indicar que la curva con menor impedancia, se presentó al primer día de prueba, mientras las subsecuentes se fueron incrementando con respecto al tiempo en que se tomaron las lecturas, este orden se encontró hasta el día 25, la impedancia del día 30, no está bien definida, sin embargo puede estar por debajo de la impedancia del día 15.

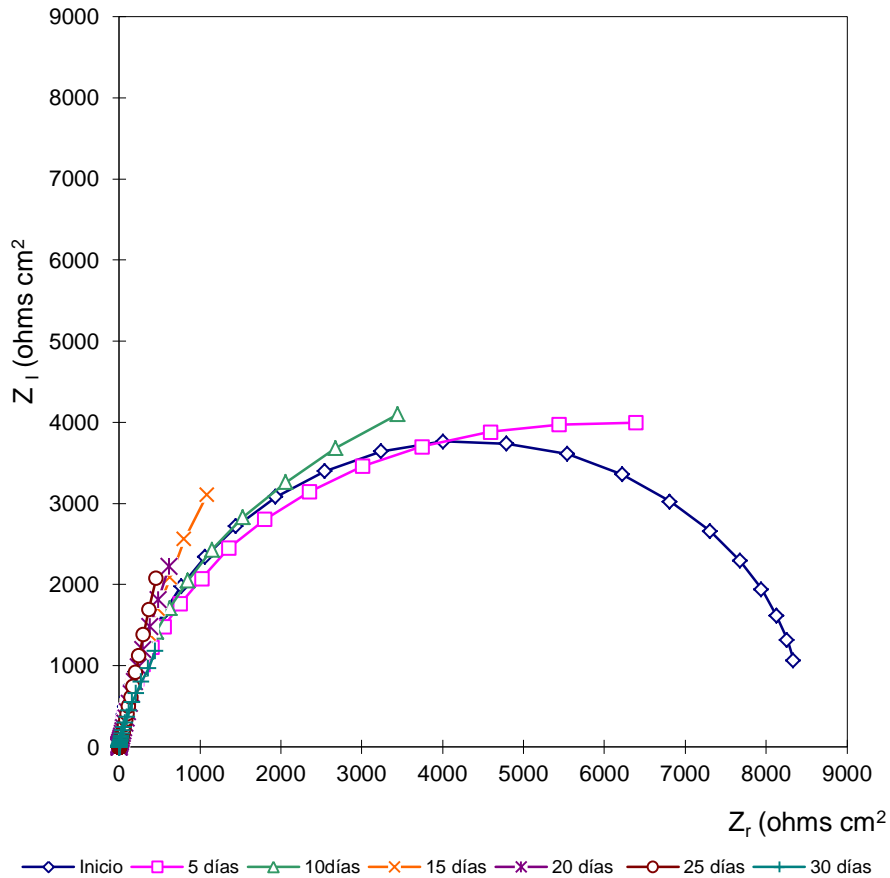


Figura 72. Variación de las impedancias en el Diagrama de Nyquist, determinadas sobre el acero API XL52 en CEE a $-1000\text{mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$.

6.4.4.3.1.2 Diagrama de ajustes

Por otra parte, con base a las impedancias mostradas en la Figura 72 y mediante el circuito equivalente que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes convenientes a los valores obtenidos en cada uno de los parámetros del circuito, respecto a cada una de las curvas de impedancia obtenidas durante la experimentación. A manera de ejemplo se presenta en la Figura 73, el ajuste de los elementos del circuito con respecto a la curva de impedancia del día 1, así mismo se presentan los valores obtenidos en dicho ajuste.

Por otra parte el ajuste de los elementos del circuito a las demás curvas de impedancia no se presentan, pero el ajuste logrado es similar al que se presenta

en la Figura 73. Los datos que derivaron de esta operación se presentan en la Tabla 25

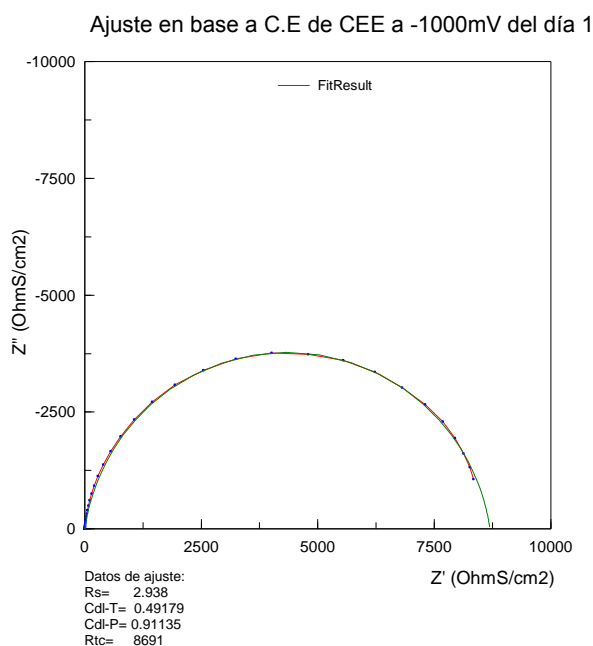


Figura 73. Ajustes a los valores de los elementos del circuito equivalente a las curvas de impedancia al día 1 de prueba.

6.4.4.3.1.3 Datos de los elementos de Ajuste

La información obtenida de la adecuación o ajustes que se llevaron a cabo para cada una de las curvas, tuvieron un ajuste similar al de la Figura 73, los datos de cada ajuste, se presentan en la Tabla 25.

Tabla 25. Datos de ajustes de los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en CEE a -1000mV_{Cu/CuSO4}.

variables del circuito equivalente	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
Rs ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	2.938	2.382	2.257	2.018	1.984	2.45	2.191
Cdl-T (Farads)	0.00049179	0.000469	0.000944	0.000999	0.000899	0.000964	0.0050706
Cdl-P	0.91135	0.80652	0.87654	0.9031	0.8972	0.883	0.85349
Rtc ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	8691	11042	10759	13720	22357	46686	18402

Con relación al parámetro R_s que presentan en la Tabla 25, se observa que los valores registrados tuvieron una variación de 1.984 a 2.938 ohms•cm² considerada de bajo valor respecto a los de R_{tc} , en estos valores se aprecia una tendencia a disminuir hasta el día 20, después de este día esta variable presenta un ligero incremento respecto a los valores anteriores y al final disminuye ligeramente respecto al anterior. Este movimiento en la disminución de este parámetro posiblemente se debió a la generación de sulfuros y la precipitación de sulfuro ferroso en el medio y al final de la prueba.

Con respecto a los parámetros de capacitancia (C_{dl-T}), este parámetro se mantuvo con ligeras variaciones durante la prueba y solamente al día 30 se elevó hasta 0.00507 farads, esta variable puede relacionarse con el crecimiento de las biopelículas. En relación a los valores registrados en C_{dl-P} , estos tuvieron una variación ligeros altibajos durante la prueba de 0.80652 a 0.91135. Este parámetro se relaciona con procesos del estado físico de la superficie y otros efectos que ya se han indicado con anterioridad.

Con respecto a la variable R_{tc} en el sistema, refleja la actividad que se estaba llevando a nivel de interfase en el momento que se realizaron las lecturas. El orden cronológico de sus registros fueron en principio con incrementos paulatinos hasta el día 15, después de este día y hasta el día 25 esta variable se incrementó notablemente llegando hasta 46686 ohms•cm² del 25 al día 30 la R_{tc} disminuyo hasta 18402 ohms•cm². En los primeros quince días de prueba donde los incrementos fueron irregulares, se asocian con la colonización y crecimiento bacteriano sobre la superficie, además la formación heterogéneas de las primeras capas de biopelículas, en esta etapa las biopelículas el grosor aun es bajo, lo que permite que los electrolitos fluyan del seno del medio a la superficie del metal y viceversa del metal al seno del medio, permitiendo que las reacciones de óxido reducción se lleven a cabo con baja restricciones.

6.4.4.3.1.4 Datos de Resistencia a la polarización, corriente corrosión y velocidad de corrosión.

Por otra parte y utilizando la información de la R_{tc} , se realizó la transferencia de datos de R_{tc} a R_p y mediante la ecuación de Stern-Geary se obtuvo la información de i_{corr} , los valores obtenidos de este parámetro fueron sustituidos en la ec.40, para obtener la variable de v_{corr} .

Los datos de i_{corr} se sustituyen en la ec. 37 para obtener la información de la V_{corr} que se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26. Valores de i_{corr} , y v_{corr} procedentes de las interrelación de la transferencia de carga y la resistencia a la polarización, para CEE a -1000mV_{Cu/CuSO4}.

Transcurso de la prueba en días							
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	8688.062	10997.618	10367.73	9487.982	36498.016	19762.55	18399.809
i_{corr} ($\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)	2.9926E-06	2.3641E-06	2.5078E-06	2.7403E-06	7.1237E-07	1.3156E-06	1.4131E-06
V_{corr} (mpa)	0.2273349	0.17959341	0.19050455	0.20816858	0.05411526	0.09994196	0.10734349

En base a los resultados presentados en la tabla 26, se observa que cuando la R_p se mantuvo en el orden de los 8000 a los 10000 ohms $\cdot\text{cm}^2$ hasta el día 15 de la prueba, del 15 al día 20 esta variable presentó un incremento sustancial (36498 ohms $\cdot\text{cm}^2$), para que del 20 al término del ensayo la R_p descendió hasta los 18402 ohms $\cdot\text{cm}^2$. El comportamiento inicial de este parámetro es peculiar al desarrollo de las capas de biopelículas y el incremento observado al día 20, es muy probable que se deba al incremento en la densidad de las biopelículas. La disminución en el valor la R_p , suele suceder que haya habido desprendimiento o reacomodo de las capas de las biopelículas, dando lugar el adelgazamiento del espesor en algunas zonas de la superficie, donde evidentemente facilito el movimiento de iones de carga de las reacciones de corrosión en la interfase.

Los procesos de corrosión en la interfase dependerá de varios factores y uno de ellos es el transporte de especies químicas hacia la interfase y este estará supeditado por las características y naturaleza física y química de las películas que se formen sobre la superficie del metal y en consecuencia dicho factor afectara a la velocidad de corrosión.

En este sentido, la velocidad de corrosión registrada, se considera que fue baja, sin embargo presentó ligera oscilación en su comportamiento, donde al inicio (día 01), se manifestó la mayor velocidad de corrosión (0.22733 mpa), seguido en orden de magnitud la del día 15, 10, 5 en los cuales la velocidad de corrosión fue disminuyendo.

En esta información se observa el periodo en la cual se detectaron los procesos de corrosión (01 al día 15); asociadas a la colonización, actividad enzimática y metabólica. Así mismo, el periodo del 20 al 30 que se caracterizó por las altas resistencias, debido a la estabilización y maduración de las capas de las biopelículas de los microorganismos.

Es importante destacar que la corrosión registrada se encontró bastante atenuada, posiblemente por actividad de la *PC* en el sistema.

6.4.4.3.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en *CER* a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

6.4.4.3.2.1 Diagrama de impedancias de Nyquist

En relación a la información que se obtuvo de la prueba de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica en la celda electroquímica de referencia (*CER*), se presentan en la Figura 74 mediante diagramas de Nyquist, las impedancias tomadas en el transcurso de la prueba.

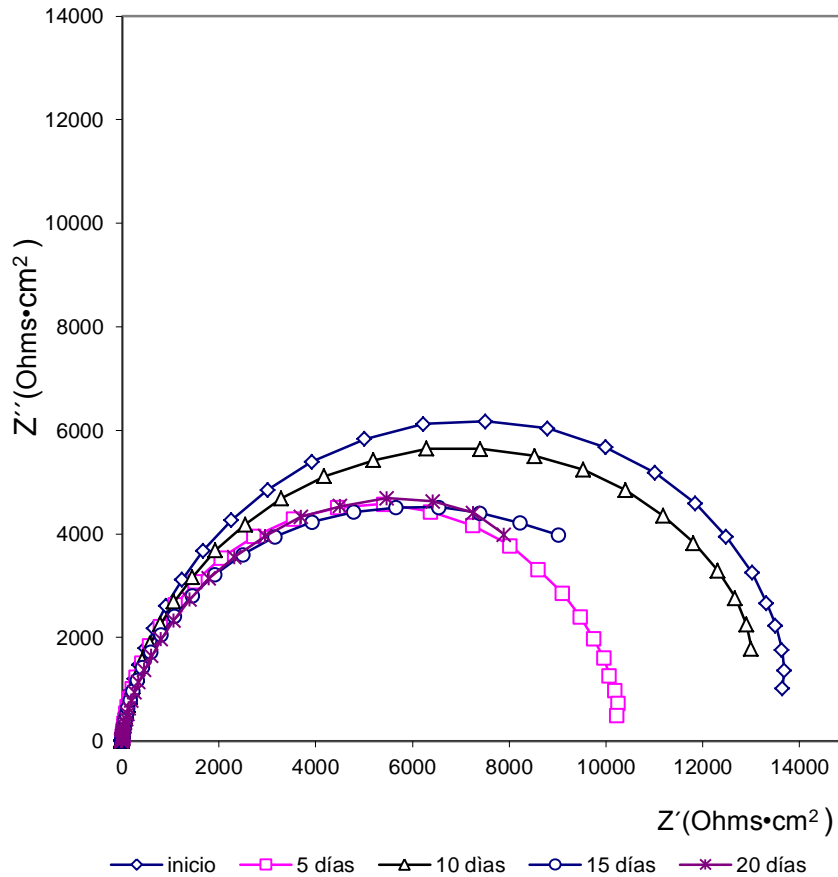


Figura 74. Variación de las impedancias en el Diagrama de Nyquist, determinadas sobre el acero API XL52 en CER, a $-1000 \text{ mV}_{Cu/CuSO4}$

En esta Figura se muestra las diferentes magnitudes de las impedancias registradas, estas tuvieron un comportamiento irregular, debido a que la mayor impedancia se presentó al día 15, seguida por la registrada el día 1, la subsecuente fue la del día 10, continuada por la del día 20 y finalmente la menor impedancia se registró el día 5.

Esta heterogeneidad en la impedancia posiblemente se debió a la inestabilidad de la película que se estuvo formando en la superficie del electrodo de trabajo, lo que también repercutió en la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}).

6.4.4.3.2.2 Diagrama de ajustes

Por otra parte, en base a las impedancias mostradas en la Figura 74 y mediante el circuito equivalente que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes necesarios a los valores obtenidos en cada uno de los elementos del circuito, respecto a cada una de las curvas de impedancia obtenidas durante la experimentación y que se presentan en la Figura 75.

En la Figura 75, se presenta a manera de ejemplo el gráfico con los ajustes entre ambos sistemas (elementos del circuito equivalente e impedancias), así mismo en la misma figura se presentan sus valores. Los ajustes para las demás impedancias fueron similares al presentado en la Figura 75.

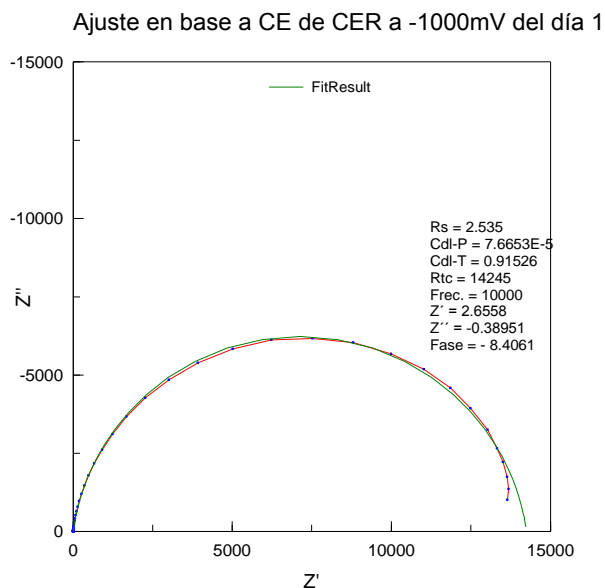


Figura 75. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en *CER*.

6.4.4.3.2.3 Datos de Ajuste a los elementos del circuito

En la Tabla 27, se presenta la información obtenida de la adecuación o ajustes hechos a los elementos del circuito, respecto a cada una de las curvas correspondientes a *CER*.

Tabla 27. Datos del ajuste a los parámetros del circuito equivalente a las impedancias correspondientes a la *CER* a -1000mV. *Cu/CuSO4*.

Transcurso de la prueba en días						
variables del circuito equivalente	1	5	10	15	20	25
R_s ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	2.536	2.637	2.707	2.632	2.694	-
C_{dl-T} (Farads)	7.6653E-5	8.7318E-5	0.0001114	0.00012291	0.0001257	-
C_{dl-P}	0.91576	0.92476	0.87037	0.74745	0.88123	-
R_{tc} ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	14245	10368	13963	14453	11125	-

En relación a la variable R_s , esta tuvo poca variación en el transcurso de la prueba, ya que sus valores oscilaron entre 2.533 a 2.707 ohms $\cdot\text{cm}^{-2}$, presentando un diferencial de 0.171 ohms $\cdot\text{cm}^{-2}$, esto indica que el medio no presento cambios significativos que reflejen problemas de transporte electrolítico en este sistema. Algunos autores ([90]), asocian a la R_s a la resistencia de la solución electrolítica y la transferencia de carga en la red cristalina.

Con respecto a los valores obtenidos de la capacitancia de la doble capa, las magnitudes registradas en C_{dl-T} , variaron de 7.6653E-5 hasta 12.576E-5 farads, estos valores guardaron un orden incremental desde el inicio y hasta el final de la prueba.

En tanto que los valores de C_{dl-P} , estos mantuvieron un comportamiento irregular, ya que los dos primeros valores presentan un ligero incremento, mientras que los valores subsecuentes muestran una disminución con respecto a su antecesor y en la lectura final se observa un ligero incremento, tendiendo a recuperar el valor inicial. Esta variable presentó un diferencial entre el valor más alto y el más bajo de 0.17731; además se indica que este parámetro se relaciona con el ángulo

desfasamiento del eje real del diagrama de Nyquist y con la altura del semicírculo así como fenómenos de rugosidad y porosidad.

En relación a los valores de R_{tc} , presentan también un comportamiento irregular, esto debido a que el valor registrado al comienzo de la prueba fue alto, valor que se asocia a las condiciones iniciales de la prueba, mientras que los registros posterior a esta lectura (del 5 al día 15), presentaron un incremento y del día 15 al 20 tuvo un descenso. Este comportamiento puede relacionarse a la posible formación de película que se generó por la precipitación de partículas sobre la superficie del electrodo de trabajo a lo largo de la prueba.

6.4.4.3.2.4 Datos de R_p , i_{corr} , V_{corr}

Por otra parte, se presenta la información de i_{corr} y V_{corr} que fueron deducidas a partir de R_p y la relación de Stern-Geary (ec.40), mientras que la V_{corr} se obtuvo aplicando la ec. 37, los registros se presenta en la Tabla 28.

Tabla 28. Se presentan los Valores de i_{corr} y V_{corr} procedente de los parámetros de ajuste del circuito equivalente en CER a -1000 mV. Cu/CuSO₄.

ajuste de Datos:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	14242.464	29615.3229	39886.5514	41286.7657	31778.0171	-	-
i_{corr} ($\text{A} \cdot \text{cm}^2$)	1.82553E-6	8.77924E-7	6.51849E-7	6.29742E-7	8.18176E-7	-	-
V_{corr} (mpa)	0.1386768	0.0666918	0.0495179	0.0478386	0.0621530	-	-

Con base a la relación inversa que guardan los parámetros de R_p y i_{corr} y V_{corr} , se observa, que la R_p , desde el inicio al día 15, presento un incremento sostenido pero al día 20 el valor de R_p bajo tuvo un comportamiento irregular. Generalmente se asocia con las condiciones iniciales de la prueba. El incremento en esta variable posiblemente se debió a conformación paulatina de una capa partícula

finas. La disminución en lectura al final de la prueba posiblemente se debió a una posible ruptura de la misma.

Los valores de i_{corr} y V_{corr} , los valores que exhibieron estas dos variables fueron bajos en todo el transcurso de la prueba y muy probablemente estuvieron influenciados por la falta de especies agresivas en el sistema y en parte por el control de la corrosión promovido por el potencial de -1000 mV respecto a la celda de Sulfato de cobre.

6.4.4.3.2.5 Relación del comportamiento entre CEE y CER

Con la finalidad de establecer una relación entre los dos sistemas en evaluación (*CEE* y *CER*) y determinar cómo se mueven estos parámetros frente a la ausencia y presencia de la actividad de estos microorganismos, se presentan sus datos en la Tabla 29.

Tabla 29. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y V_{corr} en los sistemas de evaluación *CEE* y *CER* a $-1000\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

		Transcurso de la prueba en días						
ajuste de Datos:		1	5	10	15	20	25	30
CER	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	14242.464	29615.3229	39886.5514	41286.7657	31778.0171	-	-
	V_{corr} (mpa)	0.1386768	0.0666918	0.0495179	0.0478386	0.0621530	-	-
CEE	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^2$)	8688.062	10997.618	10367.73	9487.982	36498.016	19762.467	18399.809
	V_{corr} (mpa)	0.2273349	0.17959341	0.19050455	0.20816858	0.05411526	0.09994196	0.10734349

En base al análisis de R_p , se puede establecer que las lecturas fueron mayores para la *CER*, esto nos da idea de la naturaleza física de la película delgada y altamente compacta formada por deposición de partículas finas en el transcurso de la prueba. Dadas las posibles características físicas de la película, explicaría las altas impedancias que fueron registradas, que dieron lugar fuertes restricciones al transporte y en consecuencia la escasa corrosión que detecto, debido a la lentitud con que se dieron las reacciones de óxido reducción.

Con respecto a la información de R_p que se obtuvo en *CEE*, se observa que los registros fueron menores a los determinados en *CER*, dicha diferencia posiblemente se debió a la naturaleza orgánica de las biopelículas (*EPS*), siendo estas hidrofílicas, heterogéneas. Estas películas logran madurar y estabilizarse con respecto al tiempo a las condiciones prevalecientes en el sistema de evaluación.

En relación a la información que se obtuvo en los dos sistemas de evaluación se denota rápidamente que los datos de este parámetro fueron mayores a los presentados en la celda de referencia, notándose su actividad e injerencia de los microorganismos tanto en los procesos de corrosión como en el sistema de protección catódica.

En el análisis de estos datos de velocidad de corrosión que fue registrado en las dos celdas de evaluación, se deja ver en ambos sistemas el control que ejerció la PC sobre la velocidad de corrosión.

6.4.4.4 Corriente de protección (i_p)

La demanda de corriente de protección (i_p), se basa en medir la corriente requerida por unidad de área de los sistemas de evaluación, cuando se aplica un potencial de protección. El seguimiento de este parámetro en el transcurso de la prueba, se realizó a fin de conocer la necesidad de corriente protección frente a la actividad de la poblacional de *BSR*, así como en ausencia de estos microorganismos (*CEE* y *CER*).

6.4.4.4.1 Descripción del comportamiento de i_p en *CEE*

En la Figura 76, se muestra de manera gráfica la demanda de corriente de protección (i_p) que presentaron ambas celdas de evaluación (*CEE* y *CER*), durante el desempeño de las pruebas. En la *CEE*, la trascendencia de la curva de

i_p , se observó algunos movimientos cíclicos (suministro, estabilización, suministro), esto movimientos se deben a la necesidad de cubrir la demanda de flujo de electrones requerida por la actividad enzimática, metabólica y posiblemente por las reacciones de los sulfuros ($HS^-/Fe_{x+1}S$) en el sistema.

6.3.4.4.2 Descripción del comportamiento de i_p en CER.

En tanto que la curva perteneciente al E_t de la CER, se observa que la tendencia es plana y no se manifiesta cambios significativos ni demanda de corriente, indicando que la corriente suministrada fue suficiente y constante para controlar el proceso de corrosión en la superficie de dicho electrodo.

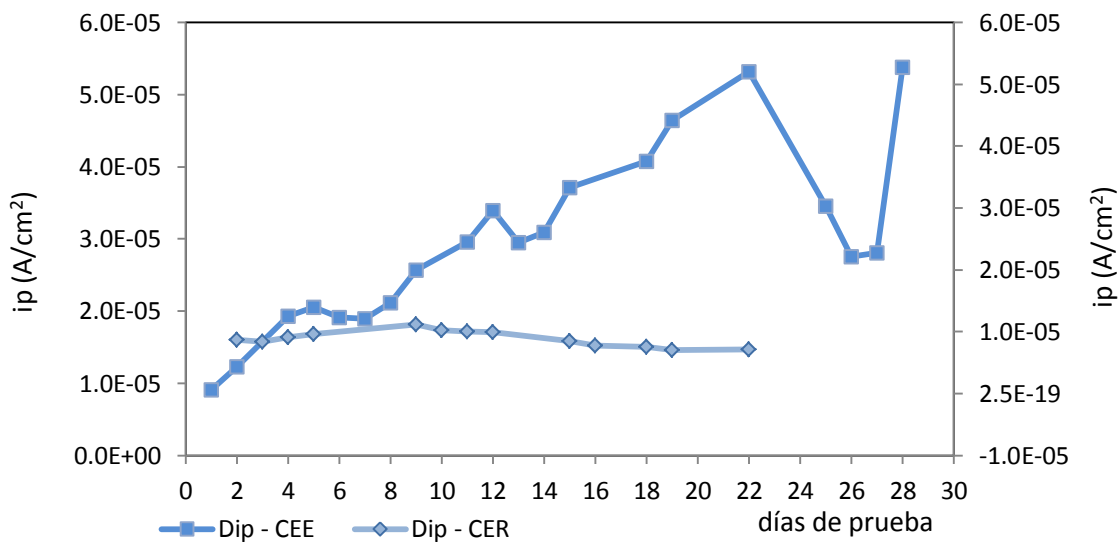


Figura 76. Comportamiento de la corriente de protección en el tiempo en los sistemas CEE y CER a $-1000 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

Por otra parte, con respecto a la curva de la i_p en la CER, para mantener el potencial de $-1000 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$, la corriente protección fue muy pequeña motivo por el cual fue necesario ampliar el rango de su eje a fin de ver su comportamiento, este fue en la mayor parte de prueba de tendencia catódica y al final del ensayo presentó un pequeño incremento o tendencia catódica, tal como se observa en la

Figura 76. Esta tendencia en la curva fue en decremento de la demanda de i_p , posiblemente se debió a una homogeneidad del ensuciamiento deposición de productos orgánicos o inorgánicos sobre la superficie del metal protegido.

6.4.4.5 Análisis de superficie expuesta a - 1000 mV._{Cu/CuSO4}

El análisis físico de superficie se considera extenso y profundo, debido a que una gran cantidad de fenómenos que ocurren, tienen lugar en superficies, para el estudio resulta de interés de manera sencilla conocer cómo actúa y aplica a nivel de superficie la *PC*, así mismo como actúan los microorganismos en los procesos de colonización y como impactan la actividad y metabolismo a las superficies.

6.4.4.5.1 Análisis de superficie de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión

Con base a lo anterior, el análisis de superficie se orientó a la observación de microorganismos desarrollados en la superficie del electrodo de trabajo, a través de las diferentes capas o biopelículas y sulfuros formados en la superficie. Así mismo observar la morfología de los posibles daños por corrosión que ocurrió en dicha superficie.

El análisis de superficie y los diferentes barridos realizados a la superficie de los electrodos de trabajo de las celdas *CEE* y *CER*, se llevaron a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (*MEBA*).

En el E_t de la *CEE*, el análisis a la superficie consistió en observar *BSRs*, biopelículas y productos de corrosión en la superficie de las biopelículas formadas, así como el tipo y forma del daño por corrosión.

Mientras que en el E_t de la *CER*, este solo consistió en determinar el grado y tipo de daño ocasionado por el medio de cultivo a la superficie protegida con -1000 mV _{Cu/CuSO4}, para ello fue necesario retirar los depósitos o ensuciamiento y lavar químicamente la superficie de los electrodos de trabajo.

Para la celda de evaluación (*CEE*), se realizaron dos sesiones de microscopía, la primera se llevó a cabo para observar el crecimiento de *BSRs* y biopelículas. El segundo para observar posible daño por corrosión.

Análisis de superficie *in situ* de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión sobre el electrodo de trabajo de la *CEE* (Fig. 77 y 78).

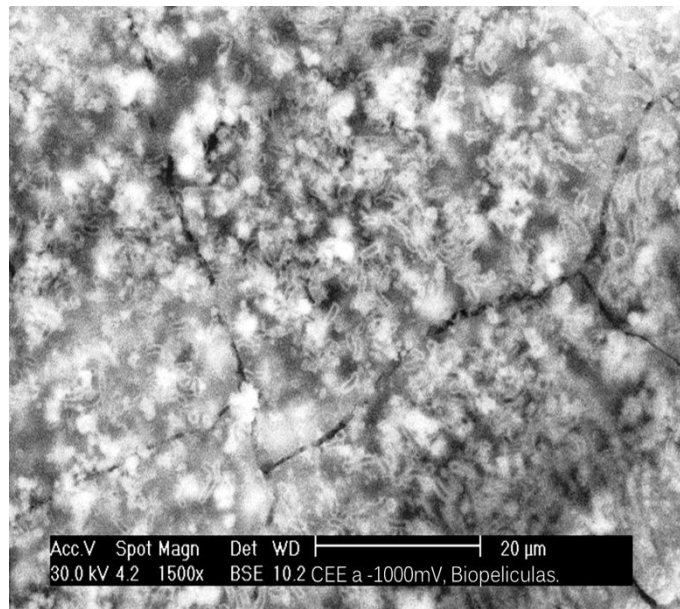


Figura 77. Imagen que muestra ruptura de capa y somas de microorganismos

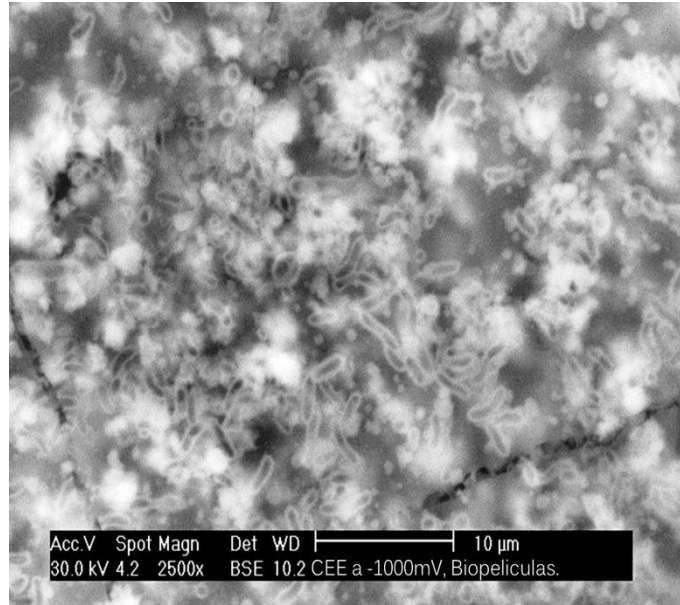


Figura 78. Muestra morfología de microorganismo y capas de sulfuros.

El análisis de superficie in situ se llevó a cabo a través de varios barridos a diferentes amplitudes, a fin de encontrar evidencias de estructuras de biopelículas o capas como la que se presentan en la Figura 77, la imagen corresponde a un barrido de un campo amplificado a 1500x, en la que se alcanza apreciar al fondo una capa con diferentes cuarteaduras debido a deshidratación, así como algunos pequeños cúmulos de biopelículas y en forma dispersa o en grupo algunas somas de microorganismos.

En la Figura 78, muestra la imagen del barrido que se llevó a 2500x, en la cual se aprecia al fondo ruptura de capa de posibles sulfuros, en su superficie una gran cantidad de microorganismos, mostrando forma y tamaño bien definida de las *BSRs* (bacilos cortos y curvos y otros rectos de $\pm 3 \mu\text{m}$), así como alguna estructura blanquecina posiblemente de la biopelícula y algunos hoyos en la biopelícula.

6.4.4.5.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.

En las Figuras 79 y 80, se presentan las imágenes del barrido de dos campos, la primera presenta una magnificación a 300x del área dañada por corrosión localizada, esta amplificación fue tomada a fin de observar el tipo y la densidad del daño ocasionado por este tipo de corrosión, a este respecto, se observan algunos daños de morfología irregular y poco profundos, además se observan algunos puntos de corrosión localizada de diferente magnitud. En tanto que en la segunda imagen corresponde a un daño por corrosión localizada tipo picadura cuyo diámetro fue irregular, con una magnificación de 4000x. Se logra observar en la parte izquierda parte del relieve de la pared de la “picadura” con dos oquedades opuestas, así como su profundidad alcanzando a observar parte fondo, ya que en ella se alcanza a apreciar la formación de otra cavidad con acumulo de productos de corrosión.

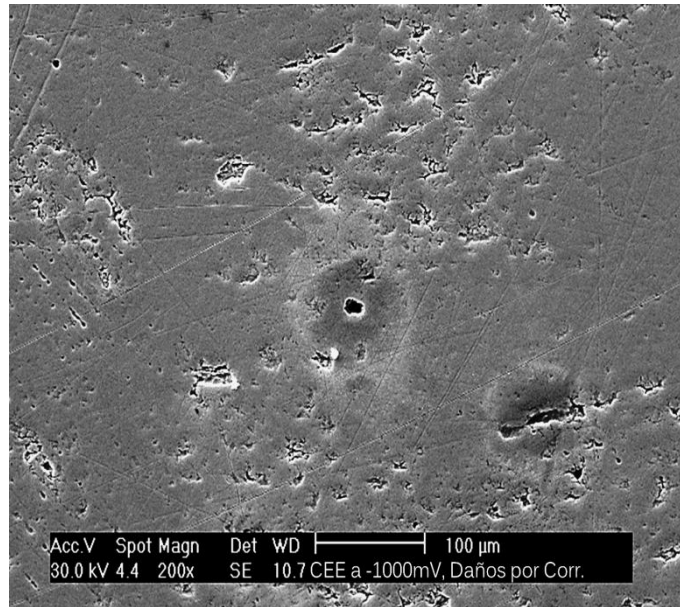


Figura 79. Muestra el daño por corrosión uniforme y localizada .

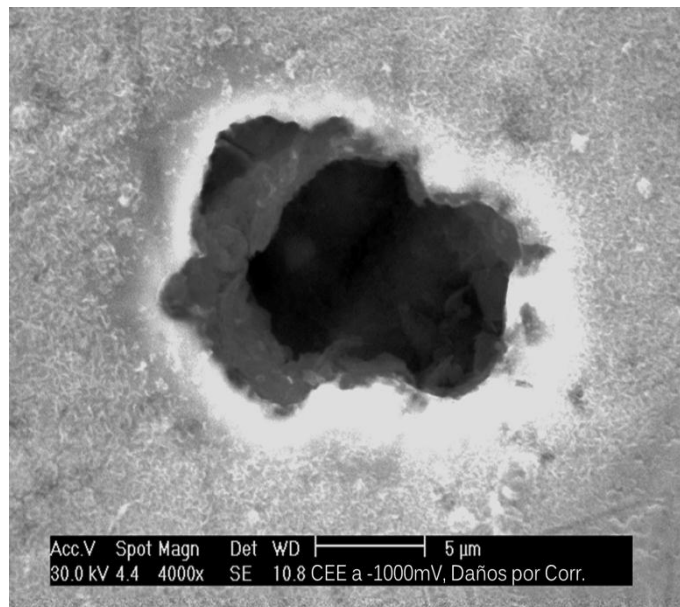


Figura 80. Morfología y tipo de daño por corrosión localizada

6.4.4.5.3 Análisis de superficie del daño de la superficie del electrodo de trabajo de la CER.

La Celda electroquímica de referencia (CER), solamente se presentan las imágenes de la superficie del electrodo de Acero API XL52 que estuvo inmersa en

medio de cultivo y protegido con $-1000\text{ mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$. Debido a la ausencia de *BSRs* en el sistema, no se consideró conveniente realizar el análisis in situ de la superficie protegida y por lo que solamente se aplicó la limpieza y el tratamiento químico.

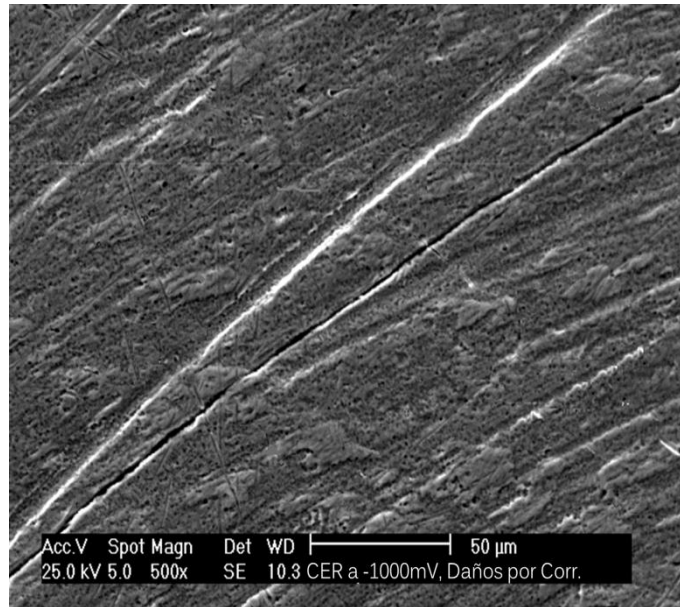


Figura 81. Superficie con corrosión uniforme y sin daño por corrosión localizada

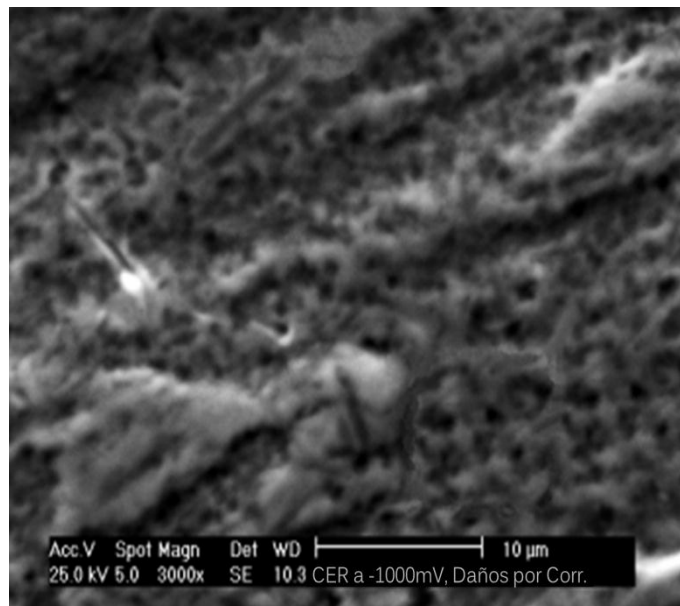


Figura 82. Superficie con zonas con corrosión generalizada

En las Figuras 81 y 82, se presentan las imágenes del barrido de dos campos, la primera presenta una magnificación a 500x, esta se hizo con el propósito de tener mayor área para observar algún tipo de daño por corrosión, esta imagen solo se observó las líneas de la lija atenuadas por el proceso de corrosión uniforme así mismo se alcanzan a definir algunas áreas de desgaste y la formación de algunos puntos de posible daño localizado.

La imagen de la Figura 82, presenta una magnificación de 3000x de la superficie analizada y a fin de definir sí lo observado en la amplificación anterior podría ser daño por corrosión localizada, sin embargo, a esta resolución se definió que los puntos carecen de profundidad alguna, por otra parte, se alcanzaron a ver cúspide y valles evidenciando de un posible desgaste por corrosión uniforme y generalizada.

6.5. Potencial de protección de $-1100\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

Los resultados obtenidos de las celdas experimentales *CEE* y *CER*, han sido ordenados en parámetros físicos, bacteriológicos, químicos, electroquímicos y análisis de superficie, a fin de lograr un análisis objetivo de ellos.

Los parámetros físicos comprenden las mediciones de temperatura, *pH*, y *Eh* que se registraron en ambas celdas (*CEE* y *CER*), a fin de detectar algún cambio significativo que pudiera afectar el desarrollo y desempeño de las *BSRs* en el sistema de evaluación.

6.5.1 Parámetros Físicos

Dentro de las medidas físicas registradas se encuentra la temperatura, a esta se le considero en toda la experimentación como temperatura ambiental, esto debido a que los procesos que se quieren reproducir en las celdas se llevan a condiciones normales de presión y temperatura de campo.

6.5.1.1 Comportamiento del pH

Este parámetro se considera importante en la naturaleza, ya que en base a este los microorganismos pueden ser clasificados como acidófilos, neutrófilos y alcalófilos debido a los microorganismos tienen cierta predilección a este ambiente.

En la Figura 83, se muestra el comportamiento del pH en el medio de cultivo de las celdas electroquímicas de evaluación y de referencia.

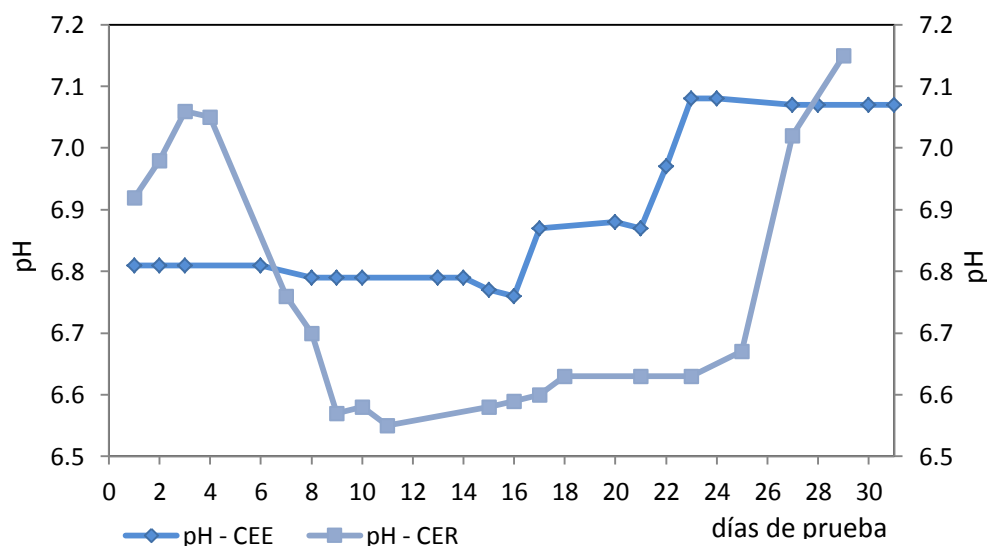


Figura 83. Comportamiento del pH respecto al tiempo en el medio de cultivo a $-1100\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

En el gráfico de la Figura 83 se presenta las lecturas de pH en el medio de cultivo contenido en las celdas *CEE* y *CER*. Se dio seguimiento al monitoreo de este parámetro, con el propósito de detectar cambios significativos en pH inherentes a la actividad de las *BSRs* o bien a las posibles reacciones de superficie que hayan ocurrido debido a la actividad de la protección catódica sobre el electrodo de trabajo.

El pH en la *CEE* prácticamente se mantuvo con pocos cambios, el más significativo es el registrado al final de la prueba, donde se acerca cambia de la

región ácido a la región de ligera alcalinidad. No obstante el pH óptimo para el desarrollo de estos microorganismos se encuentra en esta región. Por otra parte cambios súbitos en pH no se tuvieron, esto porque no existieron causas que los ocasionaran o bien debido a que algunas sales minerales ($NaHCO_3$) que pudieron regular dichos cambios en pH .

El pH en la *CER*, tuvo un comportamiento algo extraño, ya que su tendencia en pruebas anteriores era migrar de la región ácida a la alcalina, esto por las posibles reacciones que se tuvieron a nivel de superficie debidas a la actividad de la *PC* sobre el E_t , sin embargo, en esta prueba se observa que al día 3, cruza de la región de alcalinidad ligera a la región de acidez ligera y se permanece del 9 hasta el día 25 en esta región, del 26 en adelante, se logra la migración de este parámetro a la región de alcalinidad ligera (Figura 83).

6.5.1.2 Comportamiento del potencial redox (E_h).

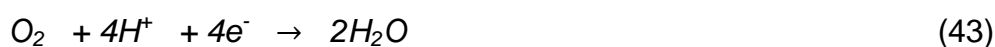
Las *BSRs* para su desarrollo requiere necesariamente de condiciones anóxicas o libres de oxígeno y para fue necesario generar las condiciones reductivos de al menos -150 mV de E_h , a los medios de cultivo de las celdas de evaluación.

En relación a lo anterior, las celdas experimentales (*CEE* y *CER*), se ambientaron en su inicio con potenciales redox -399.6 y -320.0 mV respectivamente. En la *CEE*, este parámetro presentó algunas oscilaciones, posiblemente debidas a las reposiciones de cultivo que se hicieron en el transcurso de la experimentación, no obstante el valor de E_h que se estableció, aseguró el desarrollo y buen desempeño de estos microorganismos en el sistema.

En la *CER*, las condiciones redox, en su inicio comenzaron en -320.0 mV, este parámetro presento fuertes cambios en parte del transcurso de la experimentación, ya que se registraron medidas hasta de -63 mV (ver gráfico), esto se debió muy probablemente alguna interrupción en la anaerobiosis y por ende posible entrada de oxígeno al sistema, ya que al ser consumido el oxígeno, el sistema de anaerobiosis y E_h se restablecieron después del día 20, logrando

que al cierre de la prueba, se haya logrado recuperarse el sistema *CER* (– 370 mV.). Esta perturbación en redox o E_h , probablemente repercutirá en los procesos de corrosión en la superficie del electrodo de trabajo, esto a pesar del sistema de protección por *PC*.

El comportamiento del E_h en la *CER*, podría ser notoria la pérdida de anaerobiosis y la posible entrada de oxígeno, que reacciono de acuerdo al *pH* registrado (6.72), bajo este esquema el oxígeno pudo haber reaccionado de acuerdo a la ecuación 42



El comportamiento tanto en el sistema *CEE* como en *CER*, se presenta en la Figura 84.

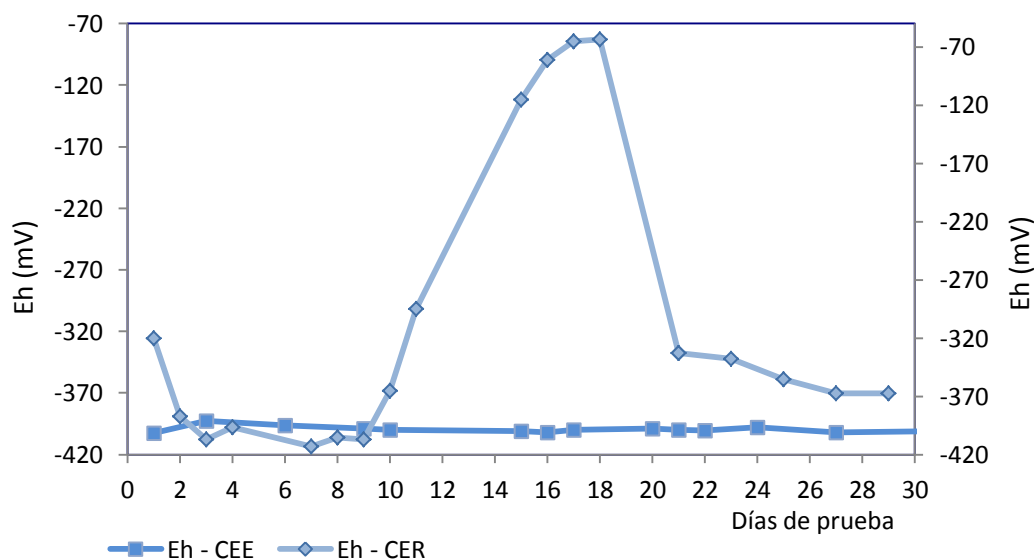


Figura 84. Comportamiento del E_h en relación al tiempo en el medio de cultivo a - 1100 mV._{Cu/CuSO4}

6.5.2 Parámetros bacteriológicos

6.5.2.1 Densidad poblacional (D_p)

La densidad poblacional de *BSRs* para esta serie de pruebas, se mantuvo en crecimiento de manera exponencial hasta el décimo día de prueba llegando a una D_p máxima, después de este período, la densidad población presentó algunas

irregularidades en la densidad poblacional debidas a la demanda de nutrientes o bien a la sobrepoblación de microorganismos, ya que bajo estas circunstancias no solo presentó competencia nutricional si no también efecto por acumulación de detritos celulares con presencia liso enzimas que actúan sobre la población en general. No obstante, la población persistió con tendencia al crecimiento hasta el final de la prueba.

Por otra parte, En revisión a los registros de la densidad poblacional de *BSRs* en el gráfico de la Figura. 85, se apreciar que no se vio afectada por el potencial de protección de $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Respecto a la curva de E_h de la celda *CEE*, se observa cierta correspondencia entre estas dos variables, debido a que a cuando se alcanzó el crecimiento exponencial, se obtuvo el mayor ambiente reductor.

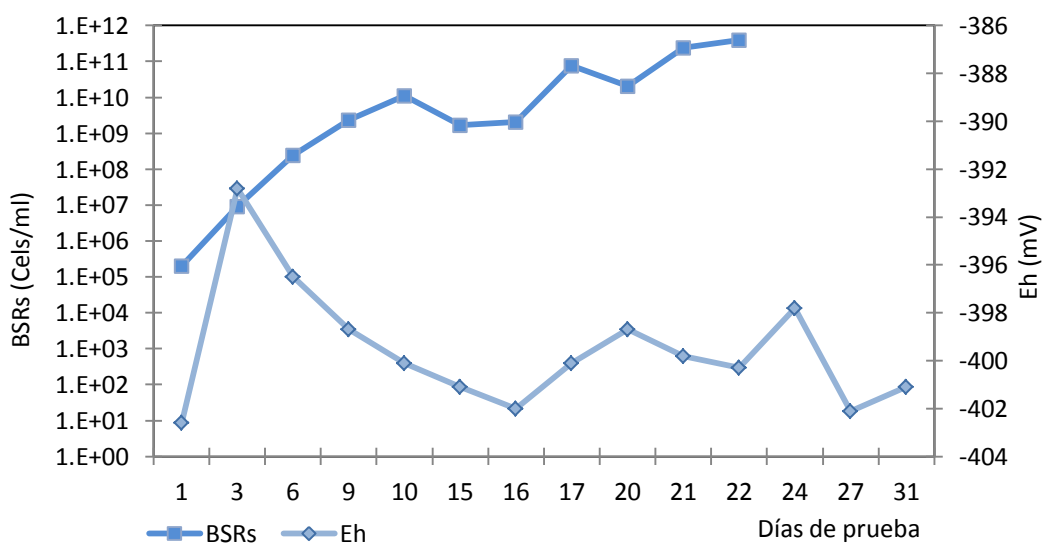


Figura 85. Relación de condiciones de E_h y densidad poblacional de *BSRs* referente al tiempo a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

6.5.2.2 Bioconversión de sulfatos a ácido sulfhídrico por *BSRs*

En los procesos de respiración de las *BSRs* intervienen enzimas que indujeron la activación de los sulfatos para el proceso de reducción y enzimas hidrogenasas

que suministran hidrógeno como donador de electrones para las múltiples reducciones del sulfato.

Como resultado del procesos de respiración, se produce en parte, ion sulfhídrico (HS^-) o sulfuro de hidrógeno (H_2S), que es excretado al exterior de la célula. Por otra parte, la acumulación de iones hidrógeno (H^+) a nivel de membrana, originan gradientes en concentración de H^+ , conocida como fuerza motriz protónica, capaz de activar al sistema enzimático ATPasa para llevar a cabo la síntesis de *ATP*.

Por otra parte, en el campo de la microbiología se ha tomado a la respiración como un indicador de la actividad celular, así el oxígeno se convierte parámetro indicador de la actividad celular en sistemas aeróbicos y en anaerobiosis y en especial para el grupo de BSRs, se considera que los sulfatos se toman como parámetro indicador de la actividad de este grupo de microorganismo.

En la Figura 86, se muestran las concentración de SO_4^{2-} y H_2S con respecto al tiempo. En la curva de sulfatos compuesta por las diferentes concentraciones registradas, la concentración de 350 mg/l disminuye al octavo día, después de este día la concentración tiende a ser asintótica hasta el final de la prueba. Dicho comportamiento se asocia con una actividad vigorosa de la actividad metabólica de estos microorganismos en la celda.

En base a las primeras lecturas de SO_4^{2-} y funcionaron como una retroalimentación para la programación de la reposición de cultivo nuevo por viejo, sin embargo las reposiciones rayaron en el límite de carencia de nutrientes como se muestra en la Figura 86.

Respecto a la curva de ácido sulfhídrico, la producción de sulfhídrico presentó una producción súbita en los primeros tres días de prueba (120 mg/l), a los 10 días se alcanza la máxima concentración detectada (160 mg/l), esta concentración permanece constante hasta el día 16. Al día 20 se presentó deflexión en la concentración (100 mg/l). Del 22 al 30 la concentración (122mg/l), se hizo e asintótico.

El comportamiento de la curva de sulfhídrico estuvo sujeto al metabolismo de las *BSRs* y la reposición de nutrientes, ya que deflexión del 16 al 20, se debió a la reposición de medio al sistema. La falta de nutrientes en sulfatos tuvo repercusiones tanto en la actividad enzimática como metabólica en las *BSRs*.

Por otra parte, revisando la trayectoria de los parámetros registrados (D_p , SO_4^{2-} y H_2S), a lo largo del desarrollo experimental, no se logró detectar alguna discontinuidad de estos, debida a la injerencia de los $-1100\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$.

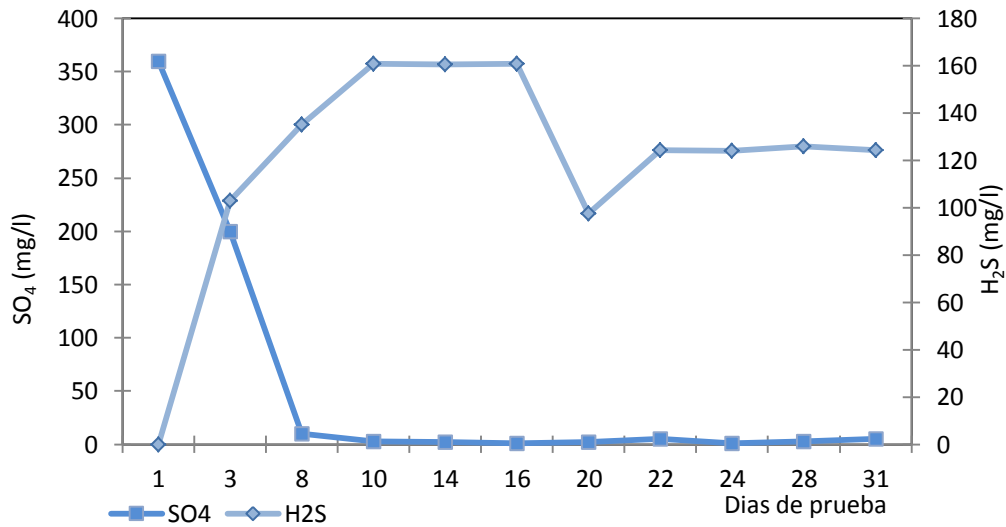


Figura 86. Bioconversión de SO_4^{2-} a H_2S por *BSRs* durante la prueba a $-1100\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

6.5.3 Parámetros químicos

Respecto a este punto, la alcalinidad como la concentración del ion ferroso (Fe^{2+}), fueron considerados de interés para el estudio. El primero es por los comentarios expresados que la alcalinidad generada por la aplicación de la *PC*, inhibe o limitan a las poblaciones de microorganismos dentro de estos a las *BSRs* a colonizar superficies protegidas.

El ion ferroso (Fe^{2+}), fue considerado ya que el registrar su presencia y evolución de su concentración en el medio de cultivo en las celdas, nos da evidencia que se está llevando a cabo el proceso de corrosión en las superficies de los electrodos de evaluación.

6.5.3.1 Comportamiento de la alcalinidad

Como se ha comentado anteriormente la alcalinidad está en función de la presencia de ciertos iones (HCO_3^{-1} , CO_3^{-2} y OH^{-}) en solución y el predominio y grado, está en función a la concentración estas en la solución y el pH es una medida global de estas.

La alcalinidad en la *CEE*, puede tener dos orígenes, la asociada a la actividad de las celular y la generada por la actividad de la *PC* aplicada al electrodo de trabajo.

La alcalinidad generada en la *CEE* y mostrada en la Figura 87, esta se inició con incremento alto en concentración (600mg/l) y posteriormente se tuvo ligeros incrementos en concentración en alcalinidad hasta el final de la prueba (1600 mg/l), donde se mantuvo prácticamente sin cambios. Cabe mencionar que en esta celda se registró indiscriminadamente tanto la alcalinidad generada por el propio crecimiento como la producida por la *PC* aplicada al electrodo de trabajo.

La alta alcalinidad registrada en los primeros días, estuvieron primordialmente influenciado por el crecimiento exponencial de las *BSRs*, ya que estos microorganismos en su desarrollo pueden liberar CO_2 , este se solubiliza y reacciona con el agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3), este reacciona con algunas sales del medio, e inclusive con hierro para formar el bicarbonato correspondiente, es en esta fase es donde el ion bicarbonato funciona como un regulador o buffer de pH y promueve cierta alcalinidad al medio, asimismo este parámetro es regulado por la actividad microbiana del sistema.

De la información analizada, no se ha observado alguna afectación extrínseca que ocasione problemas a la densidad poblacional de *BSRs*.

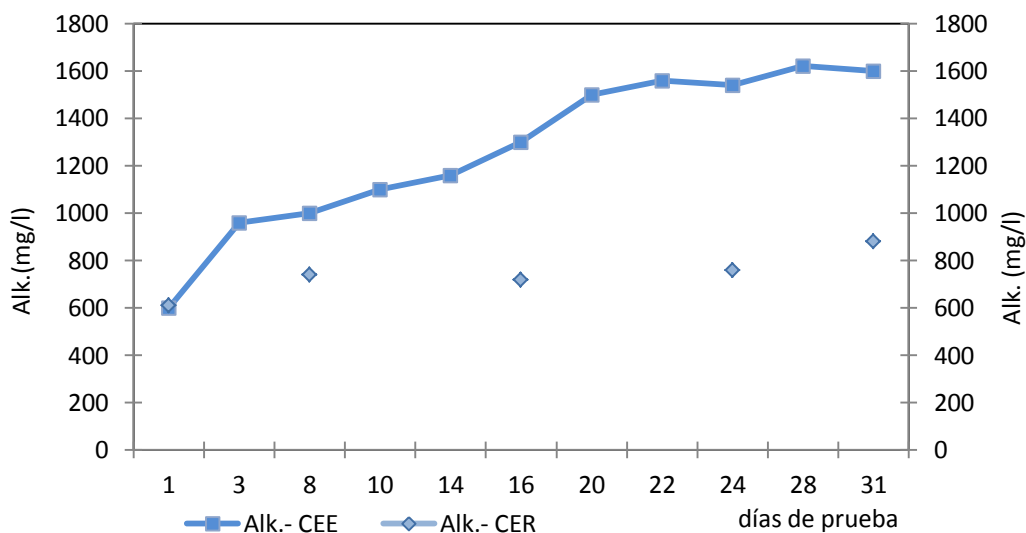


Figura 87. Comportamiento de la alcalinidad referente al tiempo en los sistemas CEE y CER a $-1100 \text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$

En esta serie de pruebas pertenecientes al potencial de protección a 1100 mV, se puede observar que la alcalinidad de la CEE se localiza por encima de la alcalinidad de la CER, esto es posible si se considera por una parte, que la alcalinidad registrada en CEE, comprende a la alcalinidad generada por la actividad metabólica y la generada por la PC y por otra parte, de considerarse el comportamiento de pH registrado, ya que este tránsito de la parte alcalina hacia la ácida a la alcalina en la parte final de la prueba. Posiblemente la contaminación registrada en la celda de referencia, influyo a que la alcalinidad asociada a la actividad a la PC permaneciera por debajo de la asociada a las BSRs.

Respecto a los registros de alcalinidad perteneciente a la CER y que se muestran en la Figura 87. Este parámetro varío de 610 a 880 mg/l de alcalinidad y durante su trascendencia no se detectaron cambios significativos en el medio, inducidos por la actividad de la PC. Sin embargo se observa que dentro del periodo del día 8 hasta el 20 la alcalinidad aparentemente se mantuvo estable y por debajo de los valores determinados para la alcalinidad en CER, subiendo ligeramente al final de la prueba.

6.5.3.2 Hierro (Fe^{2+})

Uno de los propósitos en esta serie de pruebas es evaluar al ion ferroso (Fe^{2+}) en el transcurso de las pruebas llevadas a cabo en *CEE* y *CER*, a fin de evidenciar y evaluar de manera indirecta la posible oxidación del metal protegido con $-1100\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$.

En relación a lo anterior, se presentan los registros de *CEE* y *CER* en el gráfico de la Figura 88, ambas curvas presentan comportamiento diferente y distante entre las concentraciones de este ion en ambas curvas, ya que en la *CEE* la variación de fue de 0.0 a 2.17 mg/l, mientras que en *CER* esta variación fue de 0 a 0.45 mg/l de ion ferroso, estos a pesar de la posible contaminación ambiental a la celda.

La diferencia en concentración de este ion en ambas celdas (*CEE* y *CER*), puede relacionarse con las diferentes estancias de la actividad de *BSRs*, de manera directa e indirecta sobre la superficie del acero *API XL 52*, las cuales estuvieron protegidas con $-1100\text{ mV}_{Cu/CuSO_4}$. En la medida en que se fue dando la actividad microbiológica, se inició el proceso de desestabilización de la *PC*, bajo este concepto, se fue dando la contribución de electrones procedentes de la oxidación del hierro, para cubrir la corriente faltante y ser incorporada al flujo de la corriente de protección, durante este proceso se liberaron átomos de hierro de la estructura cristalina y pasaron a la solución como ion ferroso, cuya presencia en el medio se fue registrando la concentración de este ion (Fe^{2+}) en las celdas, dando lugar a las curvas presentadas en la Figura 88.

La curva perteneciente a la *CEE*, se observa un incremento sustancial en los primeros 16 días de prueba, mientras que el resto de la prueba los incrementos fueron bajos con tendencia a ser asintóticos, esta curva se relaciona o se alinea con el comportamiento de la densidad poblacional registradas para las *BSRs*.

Para la *CEE*, el registro de la concentración de este ion siempre estuvo relacionado al ion libre, ya que parte de este ion reacciona con el sulfuro de

hidrógeno en el medio, sin embargo da idea de la intensidad en que el hierro estructural se está oxidando y pasando a solución.

En contraste con la curva del ion ferroso perteneciente a la *CER*, se observa que aunque se registran incrementos en concentración estos son sumamente bajos, lo que da idea que el proceso de corrosión en la superficie del electrodo de trabajo estuvo controlado por la *PC* aplicada, esto a pesar de las irregularidades registradas en *Eh* y *pH*.

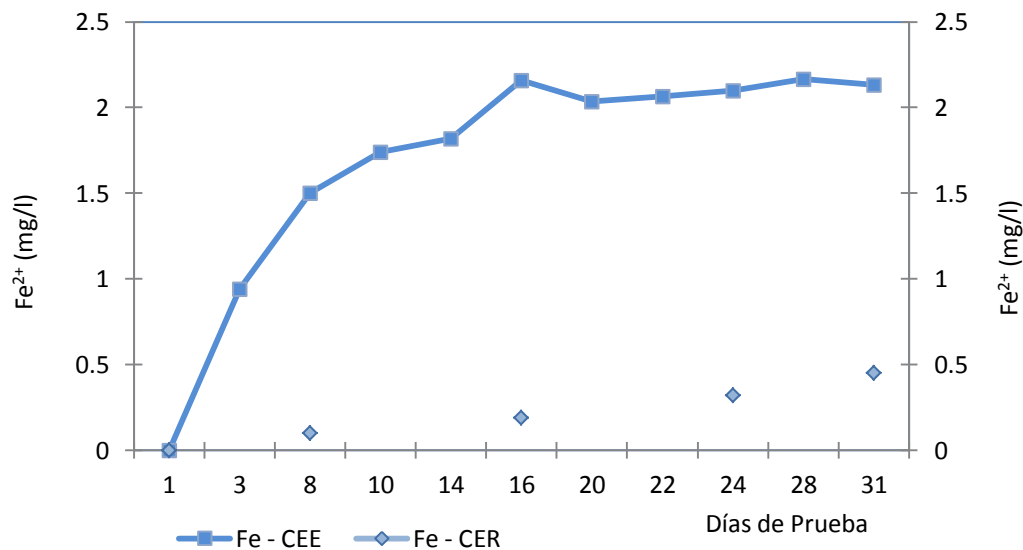


Figura 88. Variación de la concentración del Fe^{2+} referente al tiempo en el sistema *CEE* debido a la oxidación del acero *API XL52* protegido a $-1100 mV_{Cu/CuSO_4}$

Hasta el momento, se han evaluado y revisado los diversos parámetros físicos (ambientales), químicos y microbiológicos en que estuvieron expuestos los electrodos de trabajo y protegidos con $-1100mV_{Cu/CuSO_4}$. A continuación se presentan las diferentes pruebas programadas para determinar y evaluar el posible daño a la superficie del acero *API XL 52* por injerencias de dichos factores.

6.5.4 Parámetros electroquímicos

Dentro de las técnicas a utilizar para determinar el posible daño por corrosión a los electrodos expuestos al medio con microorganismos y sin ellos, está la técnica gravimétrica, aunque esta no esté dentro del dominio del campo de la electroquímica, sin embargo se consideró complementaría su información.

6.5.4.1 Técnica gravimétrica

Esta técnica fue utilizada para determinar la velocidad de corrosión que se presenta en la superficie los electrodos al ser sumergidos en medio de cultivo con y sin microorganismos, la diferencia de pérdida de peso registrada se consideró un promedio de las eventualidades que interactuaron con la superficie del metal durante el periodo experimental.

6.5.4.1.1 Calculo para determinar velocidad de corrosión

La velocidad de corrosión, se llevó a cabo aplicando la fórmula de la ecuación 34 y aplicando a esta los datos físicos correspondientes al electrodo de trabajo (E_t). Los datos de corrosión obtenidos se presentan en la Tabla 30.

Tabla 30. Velocidad de corrosión en el acero *API XL 52*, mediante técnica gravimétrica protegido con -1100mV.Cu/CuSO_4

W_i (g)	W_f (g)	ΔW (g)	Área (cm^2)	Densidad (g/cm^3)	Tiempo (Hrs)	V_{corr} (mpa)	V_{corr} (mma)
Celda Electroquímica de Referencia (CER).							
5.4849	5.4846	0.0003	6.01614963	7.86	840	0.0261	0.00060
Celda Electroquímica de Evaluación (CEE)							
5.1229	5.1222	0.0007	6.01614963	7.86	744	0.0686	0.002

Para esta serie de pruebas, la velocidad de corrosión determinada por esta técnica fue sumamente baja, ya que en ambos celdas las velocidades obtenidas estuvieron por debajo de la unidad de corrosión, sin embargo la velocidad de corrosión para el electrodo de trabajo en la *CEE*, se determinó que se tuvo hasta un 61.95% en velocidad de corrosión por encima del valor registrado en el electrodo de trabajo de la *CER*, en consecuencia se puede establecer que dicho

porcentaje es atribuida a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras en el sistema.

Por otra parte, la velocidad de corrosión registrada por esta técnica, es considerada como un promedio de las eventualidades de corrosión ocurridas en la superficie del electrodo de trabajo y se conoce que la pérdida de material con respecto al tiempo, se llevó a cabo de forma longitudinal a la superficie y no transversal, es decir que solo contempla corrosión generalizada o uniforme.

Continuando con la evaluación del impacto a la superficie del electrodo de trabajo por la actividad microbiana, se utilizaron la Resistencia a la polarización R_p , la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) y el análisis de superficies mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA), en este sentido se tiene el uso de la siguiente técnica.

6.5.4.2 Resistencia a la polarización lineal (R_p).

La técnica de R_p consiste en la aplicar un sobre potencial, respecto al potencial de equilibrio, lo suficiente pequeño para no alterar al sistema, pero lo suficiente para conocer el comportamiento de los procesos de óxido reducción en la interfase del electrodo.

La R_p , se determinó como la medida de la resistencia que ofrece la interfase metal biopelícula- BSRs- medio de cultivo al paso de la corriente. La corriente resultante es graficada en función al barrido de potencial realizado, de esta relación Potencial- corriente, se determina el valor de la pendiente.

6.5.4.2.1 Resultados de la Polarización Lineal en CEE y CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

6.5.4.2.2 Cálculos para determinar velocidad de corrosión

Con el valor de la pendiente de la curva (R_p), se calculó la corriente de corrosión (i_{corr}), usando la ecuación 35 y considerando el coeficiente de Stern-Geary.

Los datos de i_{corr} , fueron aplicados a la ecuación 37 para obtener la velocidad de corrosión en cada uno de los puntos de los ensayos. Estos datos se encuentran graficados en la Figura 89.

En este gráfico, contrasta los resultados en V_{corr} determinada en ambas celdas, mostrando que la V_{corr} en *CEE* fue menor que la registrada en *CER*. En este sentido la velocidad de corrosión tuvo un comportamiento muy irregular y amplio que osciló de 0.43845 a 3.0276 mpa en *CER*. Mientras que en *CEE*, el comportamiento de la velocidad de corrosión fue mucho más baja y homogénea, ya que sus valores se ubicaron en una variación más estrecha, y está varió de 0.26393 a 0.78232 mpa.

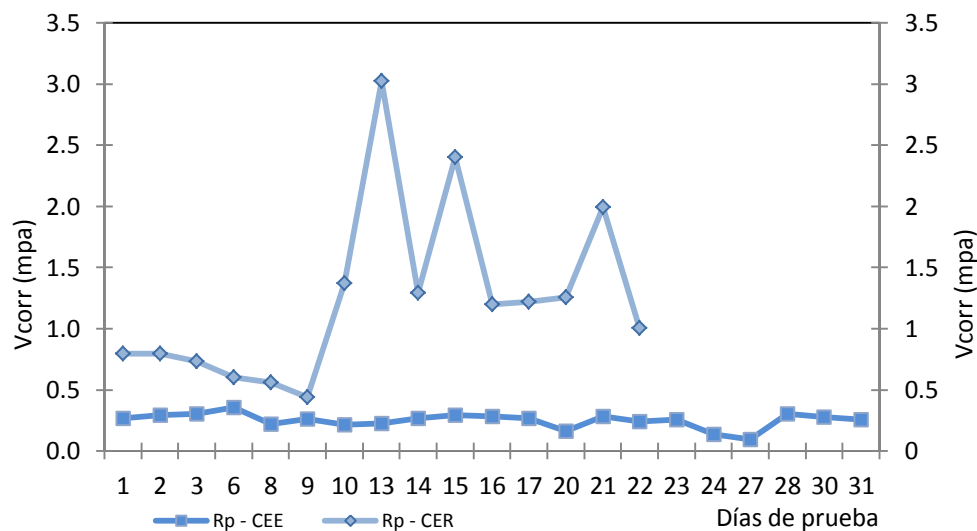


Figura 89. Variación de la V_{corr} en el tiempo sobre el acero *API XL-52*, en *CEE* y *CER* a $-1100\text{mV}_{Cu/CuSO_4}$.

6.5.4.2.3 Causas de incremento en velocidad de corrosión en *CER*

El electrodo expuesto en la *CER*, estuvo bajo condiciones anaerobiosis no muy seguras, debido a que se registraron valores de E_h cercanas a los -100 mV , esto fue indicativo de una posible contaminación o pérdida de la anaerobiosis, así mismo el pH registrado fue ligeramente ácido (≈ 6.72), no se descarta la presencia de especies químicas tales como CO_2 , y O_2 . La posibilidad de contaminación del medio por microorganismos del medio externo, da lugar a la presencia de CO_2 como producto metabólico de su actividad y la presencia de esta especie podría justificar la ligera acidez detectada en el medio. Por otra parte, la entrada de oxígeno a la celda, fue detectada por la disminución del E_h que se mostró en su gráfico, en caso de haber tenido este caso, entonces fue posible en que se

desarrollara la ecuación 42. Esta ecuación bajo condiciones de acidez, se consume $4e^-$ que pudieron ser aportados por la corriente de protección o bien aportados por la estructura metálica, así mismo esta reacción requirió de $4H^+$, para finalmente formar agua. Ambas fuentes pudieron haber impactado a la superficie del E_t de la CER, motivo por el cual se registraron valores de V_{corr} mayores a la unidad, como se puede apreciar en la Figura 89.

6.5.4.2.4 Celda de evaluación CEE

Con respecto a la V_{corr} en el electrodo de la CEE, esta fue homogénea sin manifestar alguna peculiaridad en sus registros, esto posiblemente fue debido a que los procesos de transporte tanto de carga como de masa a través de la interfase fueron lentos y en consecuencia se manifestaron en valores bajos de V_{corr} en el sistema, pero también existió la posibilidad de la polarización de la corriente de la protección catódica sobre el E_t .

Dado que en la V_{corr} no se logró percibirse cambios significativos, es muy probable que el mecanismo de $HS^-/Fe_{1+x}S$ que ha sido descrito, haya sido el que logró dar origen a la corrosión localizada del tipo picadura. En este sentido el proceso la velocidad de corrosión se torna baja, y la pérdida del material también es baja, debido al desgaste que ocurre es transversal al espesor y no horizontal a la superficie.

6.5.4.3 Espectroscopia de Impedancia electroquímica (EIS)

La técnica Espectroscopia de Impedancia Electroquímica, consiste en aplicar una señal senoidal de potencial eléctrico de frecuencia variable al material estudiado y registrar su respuesta en corriente dentro de la celda electroquímica, de aquí se puede indicar que la impedancia es un cociente de la relación potencial aplicado y la intensidad de la corriente medida a la salida, por lo tanto tomando en consideración que la impedancia varía con la frecuencia del potencial aplicado y que esta variación es característica para materiales y sistemas electroquímicos.

6.5.4.3.1 Resultados de la Impedancia electroquímica en CEE a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.
 Con base en lo anterior, se midieron los espectros de impedancias que se registraron a diferentes tiempos durante el transcurso de la experimentación.

Los datos obtenidos se presentan en el diagrama de Nyquist de la Figura 90, correspondientes a la CEE.

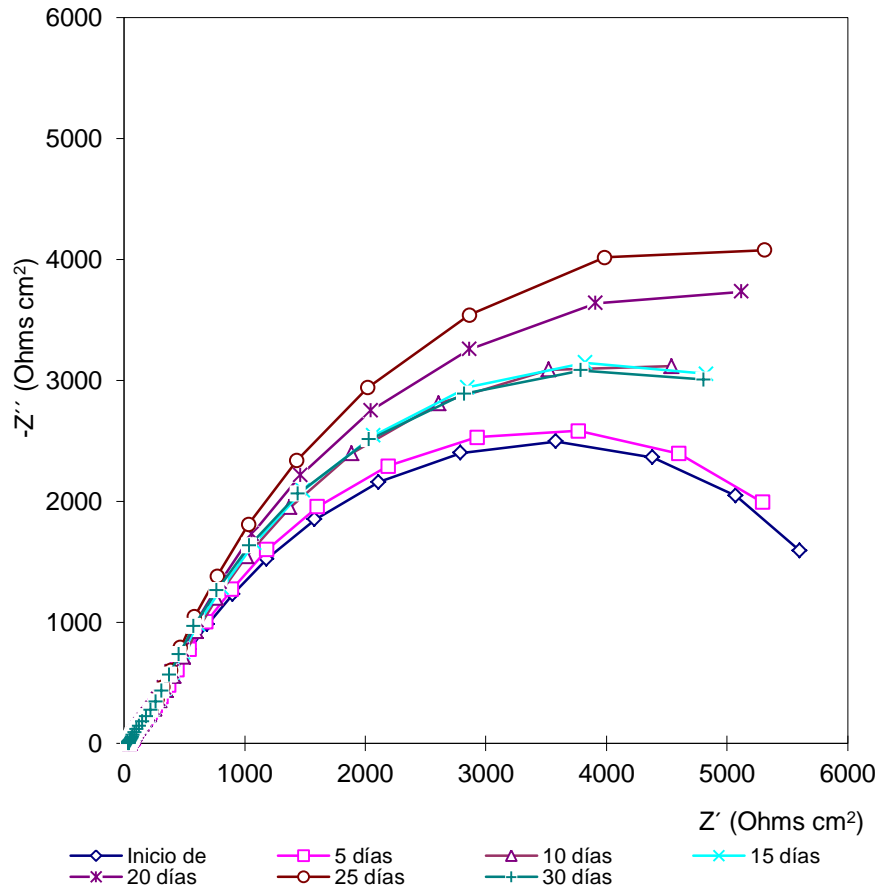


Figura 90. Variación de la impedancia en el diagrama de Nyquist, registradas sobre el acero API XL52 en CEE, a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

6.5.4.3.1 Diagrama de Nyquist

En la Figura 90, muestran las 7 curvas de impedancia con diferentes magnitudes que se obtuvieron a lo largo de la experimentación, las cuales se incrementaron gradualmente en el transcurso de la prueba, de esta manera la menor impedancia se presentó en el día 1 (7701 ohms.cm^{-2}), mientras que la mayor se dio a los 30

días de prueba ($120021 \text{ ohms.cm}^{-2}$). En la tabla 31, a través de la resistencia a la transferencia de carga, se presenta dicha distribución.

6.5.4.3.1.1 Diagrama de ajustes mediante el circuito de Randles

Por otra parte, con base a las impedancias mostradas en la Figura 90 y mediante los parámetros del circuito equivalente, que se muestra en la Figura 18, se realizaron los ajustes convenientes, para cada uno de los parámetros del circuito, este proceso solo se pudo aplicar para las curvas de impedancia de los días 1 y 5.

A manera de ejemplo en la Figura 91, se presenta el ajuste de los parámetros del circuito a la curva de impedancia correspondiente al día 1.

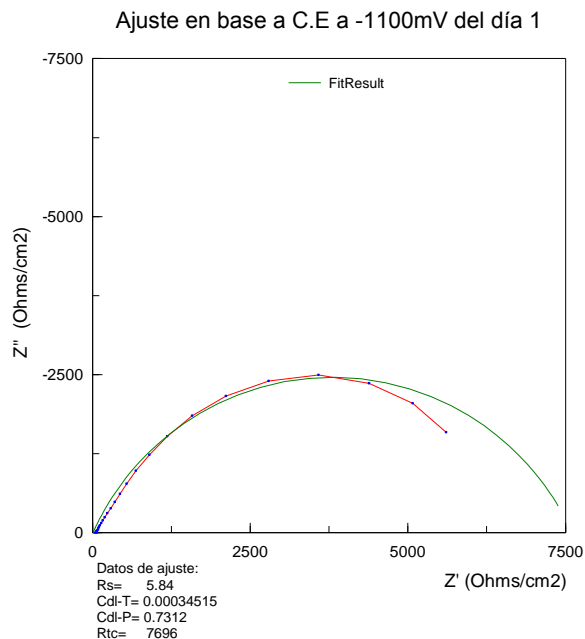


Figura 91. Ajustes a los valores de los elementos del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 de prueba.

Los valores obtenidos de los ajustes que se realizaron respecto a las curvas de impedancia de los días 1 y 5, se presentan en la Tabla 31.

6.5.4.3.1.2 Circuito equivalente complementario

En la Figura 92, se presenta el segundo circuito equivalente que se utilizó para realizar los ajustes necesarios a los parámetros del circuito, sobre las curvas de impedancia registradas los días 10, 15 y 20. A manera de ejemplo se presentan en la Figura 93, los ajustes hechos a los elementos del circuito, sobre la curva de impedancia del día 10.

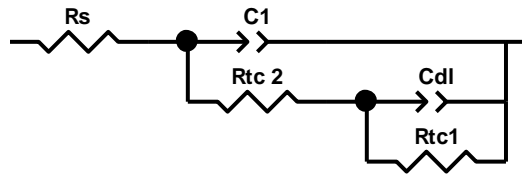


Figura 92. Circuito equivalente utilizado para los ajuste de las curvas de impedancia correspondiente a los días 10, 15 y 20.

6.5.4.3.1.3 Diagrama de ajustes de datos

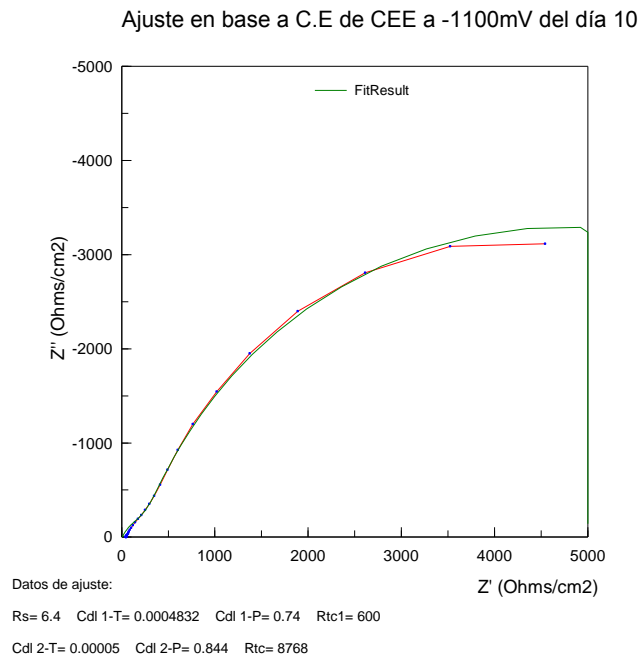


Figura 93. Ajustes de los valores de los elementos del circuito equivalente a la curva de impedancia del día 10 de prueba

Los valores que se obtuvieron de los ajustes que se realizaron a las curvas de impedancia de los días 10, 15 y 20, se presentan en la Tabla 31.

6.5.4.3.1.4 Circuito equivalente complementario con elemento de Warburg

En la Figura 94, se presenta el tercer circuito equivalente el cual incluyen un elemento de Warburg utilizado para realizar los ajustes de sobre las curvas de impedancia de los días 25 y 30. Mientras que a manera de ejemplo en la Figura 95, se muestran los ajustes realizados a la curva del día 25.

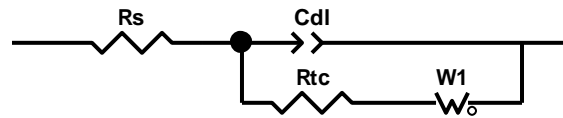


Figura 94. Circuito equivalente utilizado para los ajuste de las curvas de impedancia correspondiente a los días 25 y 30.

6.5.4.3.1.5 Diagrama de ajuste de datos

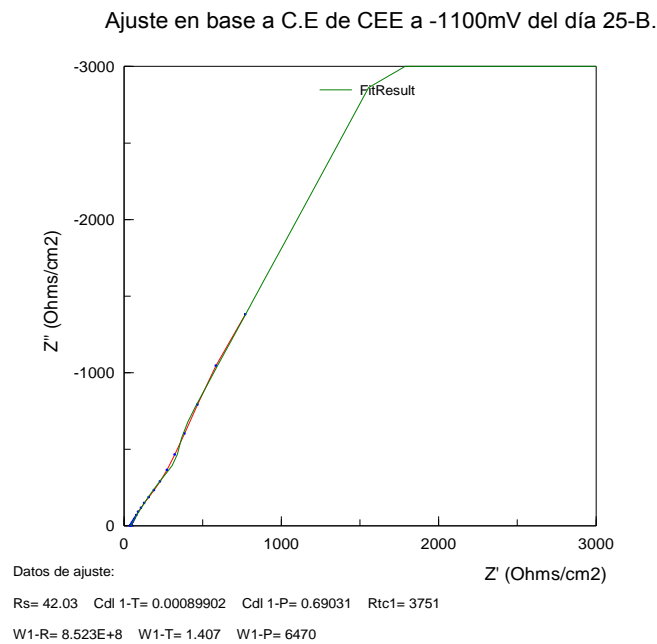


Figura 95. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 25 en CEE.

La información recabada por el circuito equivalentes de la Figuras 94, se muestran en la Tabla 31.

6.5.4.3.1.6 Datos de ajusten de los diferentes circuitos utilizados para las diferentes impedancias registradas en el diagrama de Nyquist.

Tabla 31. Datos de ajustes de los parámetros del circuito equivalente a partir de las impedancias realizadas en CEE a -1100 mV. $Cu/CuSO_4$.

Variables del circuito equivalente	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
$R_s (\Omega \cdot cm^{-2})$	5.84	7.893	-----	-----	-----	-----	-----
Cdl-T (Farads)	0.00034515	0.0004832	-----	-----	-----	-----	-----
Cdl-P	0.7312	0.74022	-----	-----	-----	-----	-----
$R_{tc} (\Omega \cdot cm^{-2})$	7696	7923	-----	-----	-----	-----	-----
$R_s (\Omega \cdot cm^{-2})$	-----	-----	6.454	6.457	43.127	-----	-----
Cdl-T (Farads)	-----	-----	0.0004831	0.04832	0.0005767	-----	-----
Cdl-P	-----	-----	0.7400	0.745	0.77149	-----	-----
$R_{pc} (\Omega \cdot cm^{-2})$	-----	-----	600	600	745	-----	-----
C1-T (Farads)	-----	-----	0.0005	0.00005	0.00005	-----	-----
C1-P	-----	-----	0.8440	0.8447	0.8125	-----	-----
$R_{tc} (ohms \cdot cm^{-2})$	-----	-----	8768	8779	10320	-----	-----
$R_s (\Omega \cdot cm^{-2})$	-----	-----	-----	-----	-----	42.03	42.43
Cdl-T (Farads)	-----	-----	-----	-----	-----	0.00089902	0.00089902
Cdl-P	-----	-----	-----	-----	-----	0.69031	0.67581
$R_{tc} (\Omega \cdot cm^{-2})$	-----	-----	-----	-----	-----	3751	3731
W1-R	-----	-----	-----	-----	-----	8.523E+8	8.523E+08
W1-T (Farads)	-----	-----	-----	-----	-----	1.407	1.057
W1-P	-----	-----	-----	-----	-----	6470	6470

Con relación a la R_s , se observa que los valores registrados presentan una tendencia a incrementar la resistencia de la solución en cada una de la instancias en que se aplicó un circuito equivalente diferente, posiblemente debido a los cambios en la conductividad del medio a consecuencia del incremento de la presencia de BSRs, a formación de compuestos insolubles (sulfatos, carbonatos,

sulfuros, entre otros); que pueden ocasionar incremento en la resistencia del medio. La presencia de estos elementos puede reducir el transporte iónico de la solución y tornarlo a lento.

Con respecto a los parámetros de capacitancia, estos tuvieron ciertos movimientos, en caso de C_{dl-T} :

En las impedancias del 1 al día 5, Los valores para esta variable presentaron un ligero incremento entre ellos; de $34.515E-5$ a $48.32E-5$ farads.

En las impedancias de los días 10, 15 y 20, los valores correspondientes al segundo circuito equivalente, variaron notablemente de $48831.0E-5$, $4832.0E-5$ y $57.67E-5$ farads.

En tanto que las impedancias de los días 10, 15 y 20, los valores obtenidos con el tercer circuito con elemento de Warburg, fueron del orden a los del primer circuito, presentando también ligero incremento ($57.67E-5$ y $89902E-5$ farads.)

El comportamiento de los valores de la variable C_{dl-P} , que se registraron en los tres circuitos que se usaron para este set de pruebas a $1100mV_{Cu/CuSO_4}$, se describen a continuación:

En las impedancias de los días 1 y 5, Los valores para el circuito de Randles, estuvieron del orden de 0.7312 a 0.74022 , se presentando un ligero incremento.

Para las impedancias de los días 10, 15 y 20, los valores correspondientes al segundo circuito equivalente, se mantuvieron del mismo orden (0.7400 , 0.745 y 0.77149).

Mientras que los valores de impedancias correspondientes a los días 25 30 y que se obtuvieron con el tercer circuito que contiene al elemento de Warburg, sus valores fueron: 0.69031 y 0.67581 respectivamente.

Con relación a los valores expresados de la variable C_{dl-P} , se puede decir que los registros no tuvieron gran variación entre los diferentes circuitos que se usaron.

Los parámetros C_{dl-T} y C_{dl-P} están asociados a la capacitancia de la doble capa y la relación que se guarda con la desviación que presentaron las impedancias experimentales con respecto a la impedancia ideal, asimismo nos da información del estado que guardan las superficies de trabajo.

Con respecto a los resultados de R_{tc} procedentes del circuito de Randles (circuito equivalente que describe una reacción electroquímica sencilla), solamente fue utilizado para las impedancias registradas en los días 1 y 5, las cuales tuvieron de 7696 a 7923 ohms.cm⁻² respectivamente. El circuito utilizado para el ajuste para estas dos impedancias, fue el mismo que se estuvo utilizando en los potenciales de 850, 900, 950 y 1000mV_{Cu/CuSO₄}, donde se realizó el análisis y discusión de los resultados.

Respecto al segundo circuito equivalente utilizado (Figura 92), para realizar los ajustes de las curvas correspondientes a las impedancias registradas los días 10,15 y 20 días, la cual presentó dos variables de resistencias. La primera está relacionada con la resistencia a la transferencia de carga ocasionada por productos adheridos a la superficie, tales como productos de corrosión u otros productos (denominada como R_{tc2}). Generalmente esta variable no se ha relacionado con procesos de corrosión si no con productos adheridos a la superficie tales como productos de corrosión u otros productos.

La segunda variable de resistencia identificada como R_{tc1} , esta estuvo relacionada con la resistencia a la transferencia de carga a través de las capas de biopelículas y en consecuencia con los procesos de corrosión. Su trascendencia en estos tres puntos fue en incremento de 8768 a 10320 ohms.cm⁻² durante el periodo del día 10 al 20. Esta R_{tc} estuvo relacionada con la velocidad de las reacciones óxido-reducción en la interfase, además estuvieron mediadas por procesos de activación, donde el transporte de especies a reducirse fue factor determinante para el desarrollo de la velocidad de reacción.

En el ajuste de variables del circuito equivalente para los registros de impedancia del 25 al 30, se consideró el uso de un elemento de Warburg, el cual indica que el

procesos de óxido reducción en la interfase deja de ser regulado por activación, para ser controlado por procesos de difusión, donde las especies a reducirse en la interfase comienzan a difundir a través de la densa capa de biopelículas, por lo tanto la velocidad de reacción se hace lenta y dependiente de este proceso.

6.5.4.3.1.7 Datos de Resistencia a la polarización, corriente de corrosión y velocidad de corrosión.

Tabla 32. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, para CEE a -1100 mV._{Cu/CuSO4} .

Transcurso de la prueba en días							
ajuste de Datos:	1	5	10	15	20	25	30
Rp ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	7690.160	7915.107	8761.546	8772.543	10292.620	12053.970	11942.930
i_{corr} ($\text{A} \cdot \text{cm}^2$)	3.3809E-06	3.2849E-06	2.9653E-06	2.9616E-06	2.5194E-06	2.16E-06	2.177E-06
V_{corr} (mpa)	0.2568347	0.249535	0.225262	0.224980	0.1913866	0.168355	0.165378

De la información de la Tabla 31 y de las conversiones hechas de la R_{tc} a V_{corr} , se presenta en la Tabla 32, los datos de velocidad de corrosión que se obtuvieron en la CEE en el transcurso de la prueba.

En base a los diferentes registros de variables que se obtuvieron durante la prueba, se asume que existe un entorno adecuado para el desarrollo de las bacterias sulfato-reductoras. Así mismo, la actividad metabólica no se observó disminuida, debido a la actividad de la PC sobre el electrodo de trabajo. Por el contrario, se identificó un crecimiento vigoroso, tomando en cuenta el consumo de sulfatos y la producción de sulfhídrico.

Como ya se ha indicado, durante el desarrollo de la prueba se detectaron dos grandes etapas en las que los microorganismos se pueden relacionar con los procesos de corrosión: la primera se registra los primeros 15 días, que se caracterizaron por colonización de superficies, crecimiento, producción de

cantidades de sulfhídrico y producción de polisacáridos con formación de biopelículas heterogéneas; en esta etapa se observa el mayor impacto de los procesos de corrosión las superficies de evaluación.

La otra etapa se caracterizó por la continuidad de la actividad metabólica de estos microorganismos y de la conformación de las diversas capas de biopelículas y estabilización y maduración de las mismas. Dicho proceso de maduración y estabilización promueve que los microtunelamientos y movimiento de fluidos al interior se vean disminuidos. Lo anterior provoca que el transporte activo de especies hacia el interior y viceversa se vea afectado y en consecuencia se notifica una disminución en la velocidad de las reacciones de óxido reducción en la interfase.

En este sentido se observa que los valores en velocidad de corrosión a nivel de superficie fueron disminuyendo a medida en que trascendió la prueba.

En todas las pruebas realizadas a potenciales de -850 a $1000 \text{ mV}_{\text{Cu/CUSO}_4}$ y durante los primeros días de prueba a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CUSO}_4}$, se utilizó el circuito básico de Randles, para el ajuste de las curvas de impedancia. Sin embargo en la parte media de la experimentación a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CUSO}_4}$, se adicione una constante de tiempo (combinación en paralelo de un resistor y un capacitor o EFC), lo cual indica que a estas alturas de la prueba se pudieron presentar algunas modificaciones en las características de las biopelículas formadas en la superficie del metal, así como también posibles adherencias tales como algunas formaciones de sulfuros o precipitaciones de productos de calcio[85].

En la parte final de la prueba, al circuito equivalente se modificó para incorporar un elemento de Warburg, lo que indica que los procesos de transporte y en consecuencias las reacciones de fase, estuvieron controlados por difusión. De esta manera los procesos de corrosión se tornan dependientes de la velocidad a la que las especies químicas llegan a la interfase y son más lentos.

De acuerdo a lo anterior, se puede indicar que existe la posibilidad de que a potenciales de protección muy negativos se coadyuve a la desestabilización de

especies químicas en solución, provocando una precipitación de las mismas. De esta manera, las biopelículas formadas pueden adquirir una mayor densificación, debida a los compuestos precipitados.

6.5.4.3.2 Resultados de la Impedancia electroquímica en CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

En relación a los resultados obtenidos de la técnica de espectroscopia de Impedancia electroquímica en la celda de referencia, en la Figura 96 se presentan las diferentes impedancias registradas en el transcurso de la prueba.

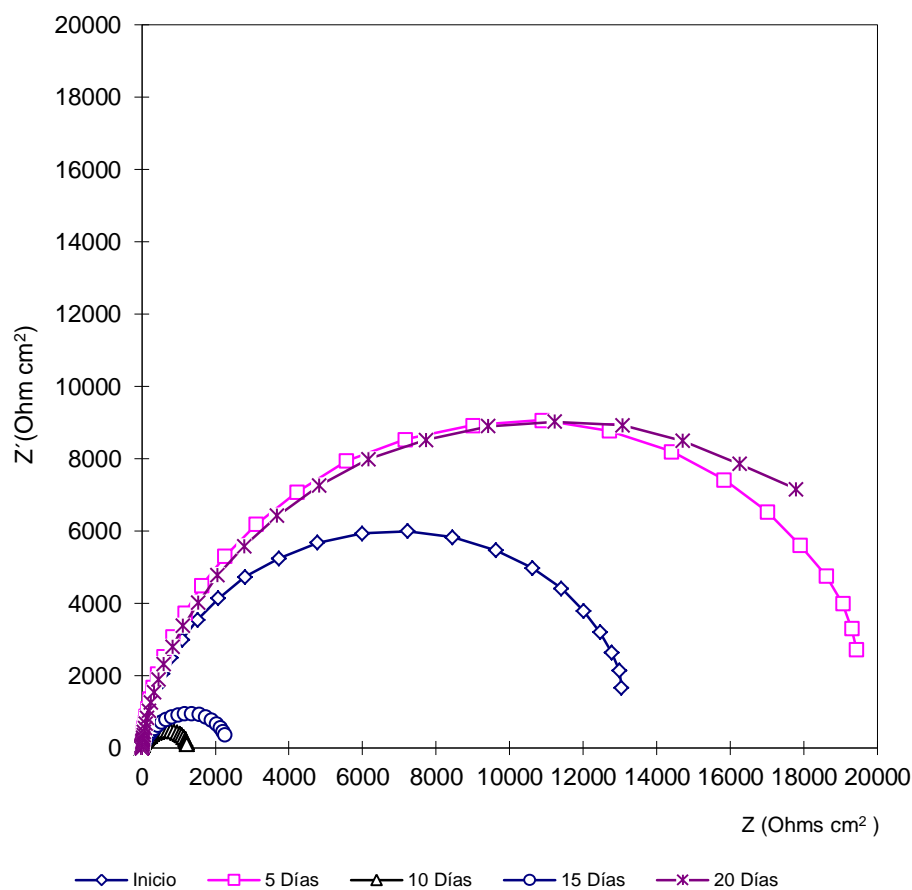


Figura 96. Variación de las impedancias en el diagrama de Nyquist, determinadas sobre el acero API XL52 en CER, a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

6.5.4.3.2.1 Diagrama de Nyquist

Durante el desarrollo experimental en ausencia de BSRs, observó que las mayores magnitudes de impedancia, se presentaron al inicio de la prueba, así como a los días 5 y 20. Mientras que las de menor impedancias se registraron a los días 10 y 15 de prueba.

6.5.4.3.2.2 Diagrama de ajuste

El circuito equivalente utilizado para el ajuste de las curvas se muestra en la Figura 18 y que corresponde a un circuito de Randles. Se realizaron los ajustes correspondientes de los parámetros del circuito, sobre las curvas de impedancia de la experimentación. A manera de ejemplo, Figura 97 se presentan los realizados sobre la impedancia registrada el día 1.

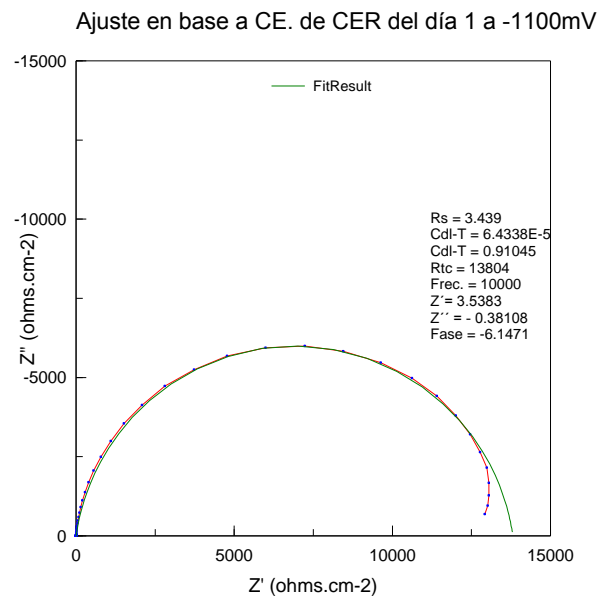


Figura 97. Ajustes de valores del circuito equivalente a los datos de la curva de impedancia del día 1 en *CER*.

6.5.4.3.2.3 Datos de ajuste

Los valores obtenidos del ajuste, se presentan en la Tabla 33

Tabla 33. Datos de ajustes a los parámetros del circuito equivalente a las impedancias correspondientes a la CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

Variables del circuito equivalente	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
R_s ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	3.439	3.118	2.879	3.095	3.101		
Cdl-T (Farads)	6.4338E-5	6.6762E-5	0.00017876	0.00050741	0.00018198	-----	-----
Cdl-P	0.91045	0.93194	0.8232	0.83405	0.88123	-----	-----
R_{tc} ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$)	13804	20349	1307	2472	21933	-----	-----

De acuerdo a la información recabada del ajuste para las 5 lecturas de impedancia y presentadas en la Tabla 33, la variable R_s en las primeras tres lecturas tiende a disminuir. Este incremento en solubilidad esté relacionado con el comportamiento del pH del medio debido a la probable contaminación registrada en el medio, ya que la ligera acidez pudo haber ayudado a incrementar la ionización y solubilidad de algunos compuestos, dando lugar a la disminución de la R_s . Después del día 10, el valor de esta variable tiende a recuperar al valor inicial, al final de la prueba y la R_s tiende a restablecerse los valores de origen.

Respecto a la variables asociadas con la capacitancia, la primera variable (C_{dl-T}), estos en la transición de la prueba presentaron fuerte impacto desde el inicio de la prueba hasta el final, ya que sus valores variaron de 6.4338E-5 hasta 18.198E-5 farads, en tanto que la variable C_{dl-P} , sus valores en el transcurso de la prueba, solo mostraron pequeñas fluctuaciones de sus valores, con cambios de 0.8232 a 0.93194. Este elemento del circuito se le ha asociado con los valores de n ($n=0$ para R_{tc} ; $n=1$ para capacitancia y $n=0.5$ para la impedancia de Warburg).

En relación a la variable R_{tc} de la Tabla 33, esta presentó un comportamiento irregular, ya que del 1 al día 5, se aprecia un incremento, que posiblemente se debió alguna sedimentación de partículas en la superficie del electrodo, lo que promovió esta tendencia en las lecturas de esta variable. Sin embargo después del quinto día, se observó una disminución bastante considerable en la R_{tc}

influenciada por una posible contaminación en la celda. Esta disminución dio lugar a un incremento en el transporte de especies hacia la interfase, agilizando las reacciones de óxido- reducción. Este proceso se mantuvo hasta antes del día 20, después del cual esta variable recuperó su nivel de actividad que venía exhibiendo inicialmente.

En base al aspecto de la celda y las lecturas de Eh y pH , se vio la necesidad suspender la evaluación electroquímica en esta celda después del día 20.

Tabla 34. Valores de i_{corr} y V_{corr} procedentes de los parámetros de ajuste del circuito equivalente, en CER a $-1100mV_{Cu/CuSO_4}$.

ajuste de Datos:	Transcurso de la prueba en días						
	1	5	10	15	20	25	30
R_p ($\Omega \cdot cm^{-2}$)	13800.561	20345.882	1304.121	2468.905	21929.899	-----	-----
i_{corr} ($A \cdot cm^{-2}$)	1.884E-06	1.2779E-06	1.9937E-05	1.0531E-05	1.1856E-06	-----	-----
V_{corr} (mpa)	0.143117	0.097076	1.514506	0.799990	0.090064	-----	-----

En base a los resultados del ajuste de los parámetros de los elementos del circuito equivalente y las sucesivas transformaciones de R_p a i_{corr} y v_{corr} mediante las ecuaciones que han sido mencionadas para el caso, se observa la trascendencia de resistencia a la polarización, y su relación relación inversa tanto con la corriente de corrosión y como con la velocidad de corrosión. La mayor velocidad de corrosión se manifestó entre los 10 y 15 días de prueba se observa que la mayor velocidad de corrosión se manifestó entre los 10 y 15 días de la prueba. En base al aspecto que presentó la celda y las lecturas de Eh y pH , se vio la necesidad suspender la evaluación electroquímica en esta celda después del día 20.

6.5.4.3.2.4 Relación del comportamiento del comportamiento de las celdas CEE y CER

Tabla 35. Comportamiento de los parámetros de R_p , i_{corr} y V_{corr} en los sistemas de evaluación CEE y CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$.

		Transcurso de la prueba en días						
ajuste de Datos:		1	5	10	15	20	25	30
CER	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	13800.561	20345.882	1304.121	2468.905	21929.899	-	-
	V_{corr} (mpa)	0.143117	0.097076	1.514506	0.799990	0.090064	-	-
CEE	R_p ($\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$)	7690.160	7915.107	8761.546	8772.543	10292.620	12053.970	11942.930
	V_{corr} (mpa)	0.256835	0.249535	0.225262	0.224980	0.191387	0.168355	0.165378

En la Tabla 35, se presentan los resultados de la técnica de Impedancia Electroquímica de ambas celdas de evaluación. Debido a las características que presentó la celda CER y dadas las mediciones tanto físicas como electroquímicas, no es posible establecer una relación de los procesos y comparación de datos entre los sistemas de evaluación. Así mismo los circuitos equivalentes propuestos fueron diferentes para cada celda, ya que para CER, solo se utilizó el circuito de Randles y para La CEE se utilizaron 3 circuitos equivalentes, por lo tanto hay procesos diferentes.

6.5.4.4 Corriente de protección (i_p)

La determinación de la corriente de protección (i_p), se basó en medir la corriente requerida por unidad de área del sistema en evaluación, cuando se aplica un potencial de protección. El seguimiento de este parámetro a través de la prueba, se realizó para conocer la necesidad de corriente protección frente a la actividad de la población de BSRs y en ausencia de estos microorganismos (CEE y CER).

6.5.4.4.1 Descripción del comportamiento de CEE a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

En la Figura 98, se muestra de manera gráfica la demanda de corriente de protección (I_p) que presentaron ambas celdas de evaluación (CEE y CER), durante el desempeño de las pruebas. En la CEE , en la trascendencia de la curva I_p , se observa algunos movimientos cíclicos irregulares (suministro, estabilización, suministro), esto movimientos pueden deberse a la necesidad de cubrir los requerimientos de flujo de electrones demandados por la actividad enzimática, metabólica y posiblemente por las reacciones de los sulfuros ($HS^-/Fe_{x+1}S$) en el sistema, sin embargo a partir del monitoreo del día 9, los segmentos de cambios comenzaron a ser mayores y este efecto se va acrecentando hasta antes de terminar el período de prueba, dentro de estos cambios llama la atención el presentado en la medición hecha el 17, donde la demanda baja sustancialmente, debido a que en ese lapso de tiempo el sistema no tuvo la necesidad de corriente, esto debido probablemente a la formación momentánea de alguna capa que dificulto el transporte en la interfase y en consecuencia disminuyo la demanda de corriente en ese lapso de tiempo.

6.5.4.4.2 Descripción del comportamiento de CER a $-1100\text{mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

Respecto a la curva perteneciente al E_t de la CER (Figura 98), se observa con tendencia ligeramente plana, en la que no se manifiesta cambios significativos, sin embargo se observa un ligero incremento en demanda de corriente después del monitoreo de los 10 días, manteniéndose este hasta el final de la prueba, es probable que este incremento obedezca a la problemática de corrosión por problemas de contaminación que se registró en la superficie del E_t , y si dicho incremento en corriente fue suficiente, ya que la velocidad de corrosión disminuyo después de los 20 días de prueba.

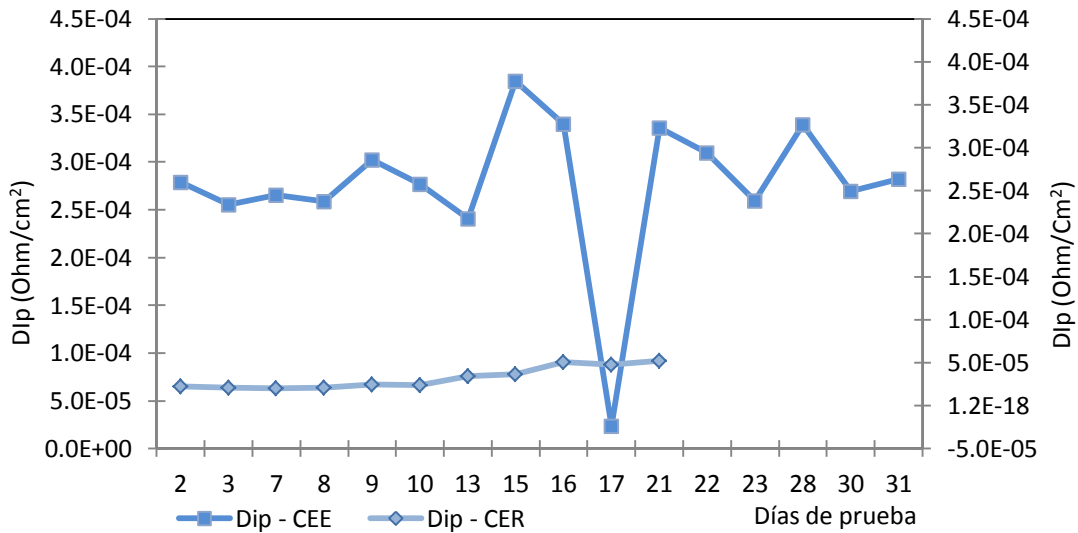


Figura 98. Comportamiento de la corriente de Protección en el tiempo en CEE y CER a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

Por otra parte, se observa que una diferencia entre el comportamiento de ambas celdas muy distante entre sí, esto a pesar del problema de contaminación registrado en CER. La V_{corr} que se detectó en esta celda, se vio atenuada por la actividad de la PC.

6.5.4.5 Análisis de superficie expuesta a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$

El análisis físico de superficie es considerado un campo extenso y profundo debido a que muchos fenómenos conocidos tienen lugar en superficies, para el estudio resulta de interés de manera sencilla, ya que permitirá observar las superficies que estuvieron protegidas catódicamente, así mismo, se observarán los posibles daños por corrosión promovidos por los microorganismos en los procesos de colonización, actividad enzimática y metabólica de superficies protegidas.

En relación al análisis de superficies, este se focalizó a la observación de microorganismos, biopelículas desarrolladas con diferentes capas de sulfuros

formados en la superficie del electrodo de trabajo. Así mismo observar la morfología de los posibles daños por corrosión que ocurridos en dicha superficie.

Mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (*MEBA*), se realizó el análisis a diferentes barridos de la superficie a los electrodos de trabajo de las celdas *CEE* y *CER*.

6.5.4.5.1 Análisis de superficie de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión

En el E_t de la *CEE*, el análisis a la superficie consistió en observar *BSRs*, biopelículas y productos de corrosión en la superficie del biofilm formado, estas observaciones se hicieron en “fresco”.

Mientras que en E_t de la *CER*, este solo consistió en determinar el grado y tipo de daño ocasionado por el medio de cultivo a la superficie protegida con -1100 mV $Cu/CuSO_4$, para ello fue necesario retirar los depósitos y lavar químicamente la superficie de los electrodos de trabajo.

En las Figuras 99, 100 y 101, se muestran el análisis de superficie *in situ* de biopelículas, *BSRs* y productos de corrosión del electrodo de trabajo de la *CEE*.

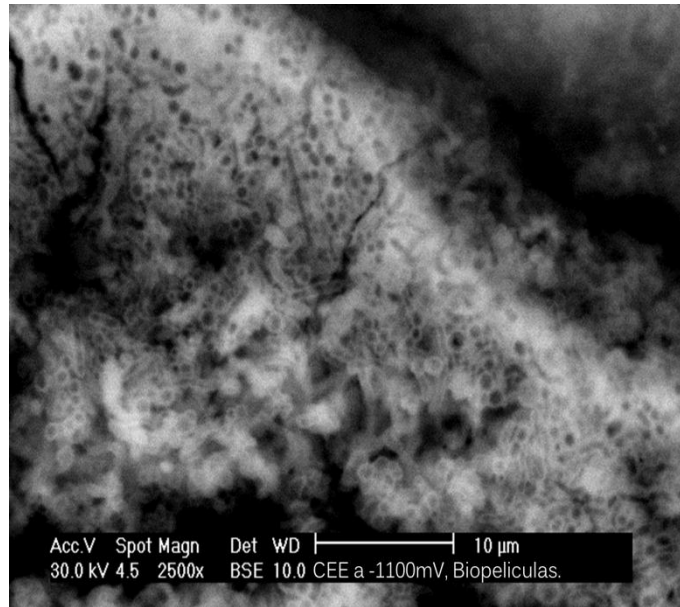


Figura 99. Muestra contorno del relieve y el perfil de una película con aglomerados de microorganismos en su interior.

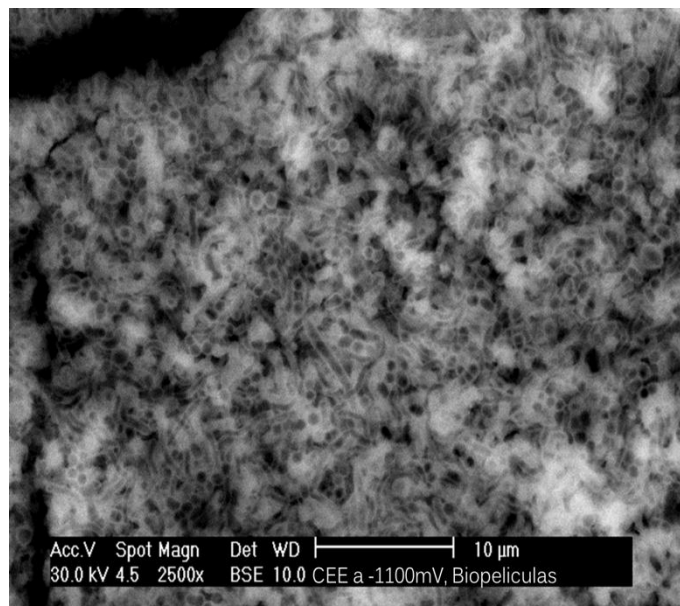


Figura 100. Se observan estructuras diversas de la biopelícula (cúmulos de biopelículas, micro poros y diferentes formas bacilares).

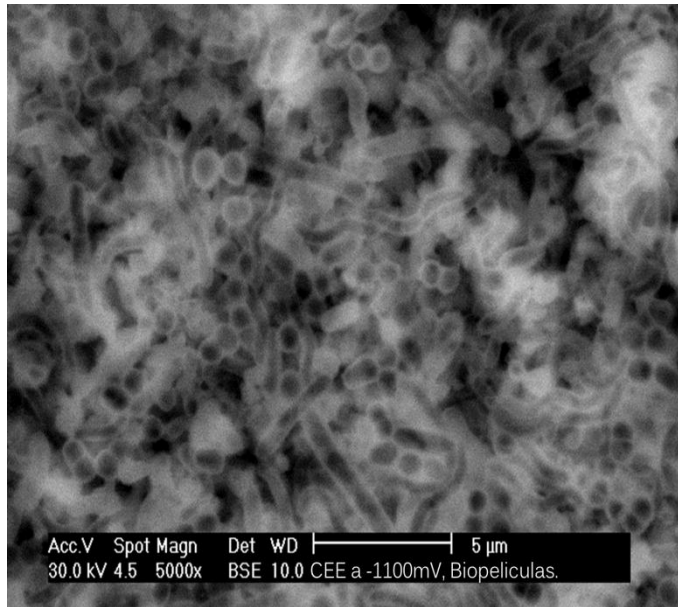


Figura 101. En esta imagen, se aprecia la morfología bacilar de las *BSRs*, en algunos somas se define formas de resistencia o estructuras de esporulación así como pleomorfismo bacilar.

El análisis de superficie in situ se llevó a cabo a través de varios barridos a diferentes amplitudes, a fin de encontrar evidencias de estructuras de biopelículas o capas como la que se presentan en la Figura 99, la imagen corresponde al barrido de un campo amplificado a 2500x, en la que permite observar el contorno de un relieve de una biopelícula, en ella se aprecia algunos puntos oscuros que posiblemente sean micro poros o bien el soma con esporas de microorganismos, en la base del relieve se alcanzan apreciar algunas estructuras reticulares de la biopelícula, dejando ver algunos huecos que funcionan como micro canales dentro de la estructura de la biopelícula, en la parte superior del relieve, se observa un bajo plano con algunas formas irregulares o microcanales, así como una nube fina de una biopelícula.

En la Figura 100, se presenta la imagen de un barrido llevada a cabo a 2500x, en esta se permite observar grandes aglomeraciones de microorganismos y su morfología bacilar, así mismo se aprecia gran cantidad de puntos oscuros que al parecer son pequeños poros, en la parte izquierda de la imagen se observa un

micro canal transversal a la imagen. Por otro lado, se alcanza a distinguir en la parte superior de la matriz amorfa, algunos cúmulos (blanquecinos) de películas finas en formación.

La Figura 101. Es una imagen que se obtuvo del barrido efectuado a 5000x, en esta permite observar la morfología bacilos rectos, helicoidales y curvos, también se pueden apreciar formas bacilares (2 a 6 μm) con formas de endoesporas; así mismo se alcanzan a distinguir algunas películas blanquecinas en formación. Lo que llama la atención en esta imagen es el cambio en la forma y tamaño de los microorganismos observados, esto se conoce como pleomorfismo que presentan los microorganismos a ambientes extremos y es muy probable que la morfología expresada por estos microorganismos fue causada por el potencial de 1100 $\text{mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$ a que estuvieron expuestos durante el desarrollo experimental.

6.5.4.5.2 Análisis de superficie dañada por corrosión del electrodo de trabajo de la CEE.

En las Figuras 102 y 103, se presentan las imágenes del barrido de dos campos, la primera presenta una magnificación a 300x, la segunda corresponde a un barrido 2000x del área protegida con 1100 $\text{mV}_{\text{Cu}/\text{CuSO}_4}$ y expuesta a la colonización y crecimiento de *BSRs* por un periodo de prueba, a fin de observar forma tipo de daño ocasionado.

La imagen de la Figura 102, corresponde a un barrido del área a 300x, a esta amplificación se tuvo mayor superficie para evaluar los daños por corrosión, para este caso, se observan los daños por corrosión localizada de diferente magnitud.

Del campo revisado fueron seleccionados varios puntos de corrosión, dentro de estos se focalizó el que se presenta en la imagen de la Figura 103, este daño por corrosión localizada cuyo diámetro fue de 19 μm , la profundidad no se pudo determinar debido a que en su interior aún hay material de corrosión, a fuera de esta y en su alrededor se observa desgaste por corrosión en el límite de grano,

además de corrosión uniforme, debido a que las líneas lijado se observa atenuadas. La magnificación del campo fue a 2000x.

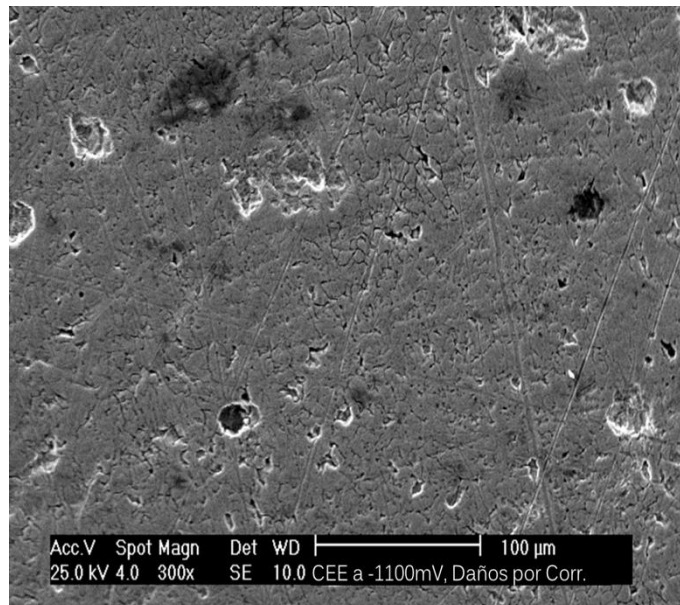


Figura 102. Superficie con diferente forma y grado de corrosión localizada.

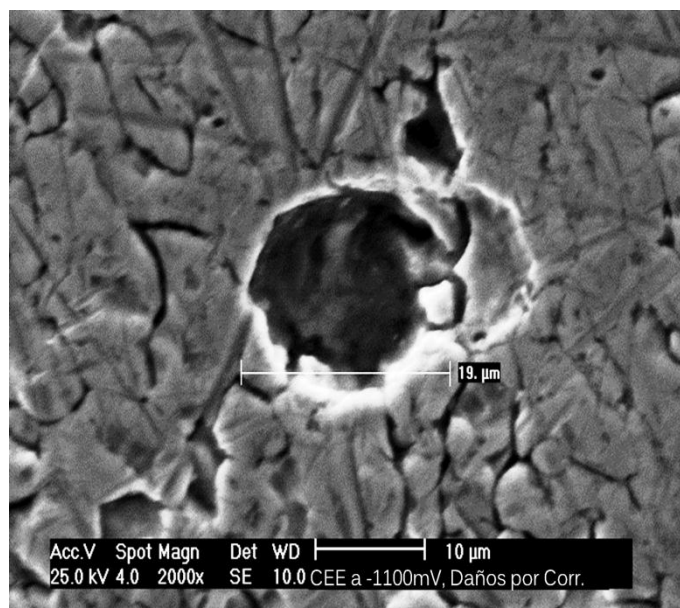


Figura 103. Morfología del daño por corrosión localizada.

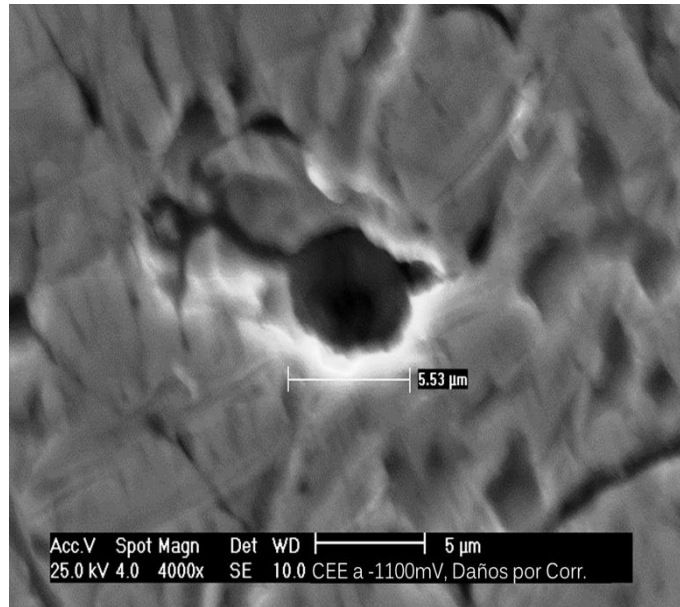


Figura 104. Corrosión localizada tipo picadura de forma cónica, en cuyo fondo se alcanza a preciar la iniciación de otro proceso.

La imagen de la Figura 104, pertenece a un barrido que se realizó a 4000x, en esta se presenta daño por corrosión localizada tipo picadura de diámetro fue de 5.53 μm . el daño que se observa, se inició con dos procesos, el primero no prospero (a un lado), pero se alcanza a ver corrosión en límite de grano, la segunda se caracteriza por su redondez con pared limpia en su primera fase pero en segunda se observa aún residuos de corrosión y al fondo de esta se alcanza a ver la iniciación de un nuevo proceso de corrosión.

6.5.4.5.3 Análisis de superficie del daño de la superficie del electrodo de trabajo de la CER.

La Celda electroquímica de referencia (*CER*), solamente se presentan las imágenes de la superficie del electrodo de trabajo del Acero *API XL52* que permaneció inmersa en medio de cultivo y protegido con $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$. Debido a la ausencia de *BSRs* en el sistema, no se consideró conveniente realizar

el análisis in situ de la superficie protegida, por lo que solamente se aplicó la limpieza y el tratamiento químico, para llevarse a cabo el análisis de superficie mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA).

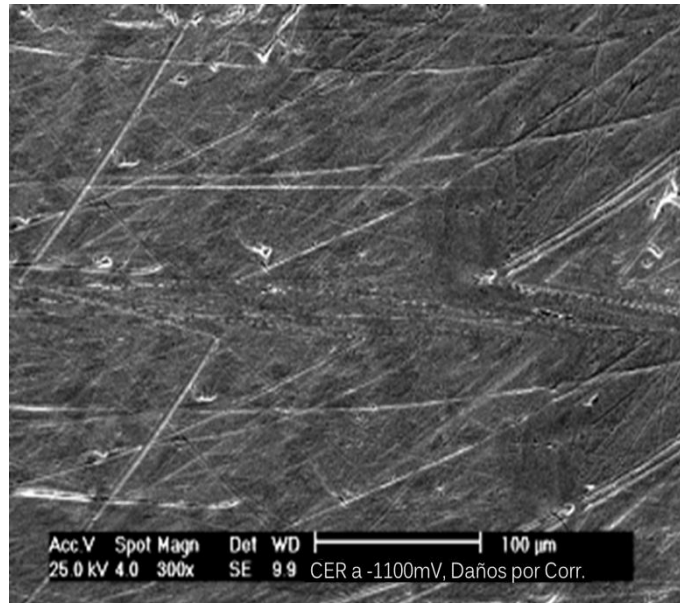


Figura 105 Superficie con escasos puntos de corrosión superficial y ralladuras



Figura 106. Superficie con zonas con corrosión generalizada y uniforme

En las Figuras 105 y 106, se presentan las imágenes del barrido de dos campos, la primera presenta una magnificación a 500x, la segunda imagen corresponde a una amplificación de 2000x. Las áreas en observación, estuvieron expuestas al medio de cultivo.

Es importante indicar que el área en estudio se le registró corrosión en algunas lecturas mayor a 1 mpa a través de las técnicas de R_p e I_{ES} . Sin embargo en la imagen a 300x, solo se observa algunos puntos y rasgones de corrosión localizada superficial (no profunda), y algunas manchas donde se alcanza a observar corrosión uniforme, así como las líneas de la lija atenuadas por este proceso.

En la imagen de la Figura 106, presenta un barrido a 2000x, en esta se alcanza a observar el grado de corrosión generalizada al centro, donde además se aprecia la atenuación de bordes, áreas y en la parte superior de la ralladura. Además algunas ralladuras se denotan un dentado y un poco más profunda debido al proceso de corrosión que fue registrado en esta celda de referencia. En esta área también se alcanzan distinguir algunos puntos oscuros que podrían ser corrosión localizada, fue por ellos que se realizó un barrido a mayor magnificación que se presenta en la Figura 107.

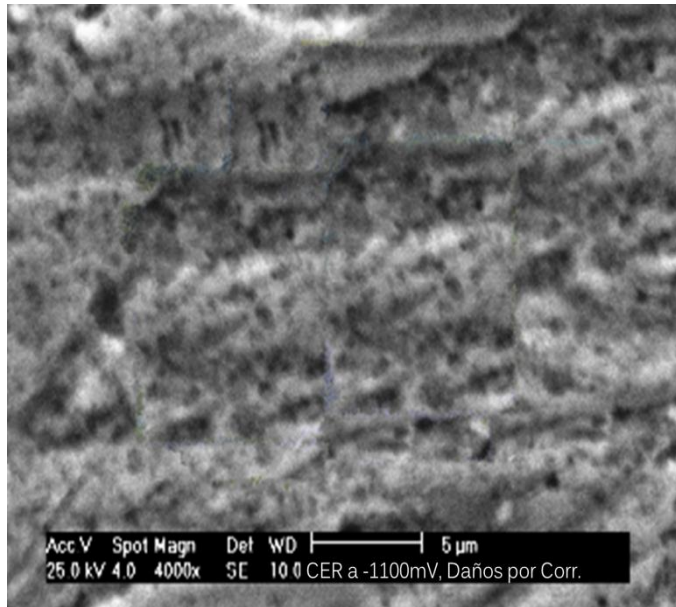


Figura 107. Corrosión generalizada con puntos de corrosión localizada incipiente.

En la imagen de la Figura 107, se presenta un barrido a 4000x y corresponde a la zona donde se aprecia corrosión generalizada con algunos puntos de corrosión localizada, en esta en micrografía se confirma el proceso de corrosión generalizada y los puntos de corrosión localizada fueron en un estado incipiente. Por lo que la corrosión detectada por las técnicas de R_p y EIS fue tipo generalizado.

7. Conclusiones

El potencial de $-950 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$ que fija el criterio normativo, es insuficiente para controlar el proceso de corrosión inducido por bacterias sulfato-reductoras en estructuras metálicas enterradas o sumergidas bajo condiciones libres de oxígeno.

El proceso de alcalinización generado en torno a superficies protegidas mediante protección catódica, no constituye factor limitante para la colonización por bacterias sulfato-reductoras y otros microorganismos.

La corriente de protección suministrada por los potenciales -850 , -900 , -950 , -1000 y $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, se determina que funciona como fuente de energía para promover a diferente nivel, diversas funciones enzimáticas y metabólicas al interior de las BSRs.

En la serie experimental llevada a cabo a $-1100 \text{ mV}_{\text{Cu/CuSO}_4}$, se determinó que fisiológicamente el potencial de protección no presentó efecto alguno, ya que la densidad poblacional y los parámetros de $\text{SO}_4/\text{H}_2\text{S}$, no se vieron perturbados por la corriente de protección, sin embargo en el análisis de superficie llevado a cabo por MEBA en las biopelículas, se observó cambios en la morfología de los microorganismos.

Con base en los diferentes potenciales experimentales de evaluación y de referencia se observa una diferencia en velocidad de corrosión entre los electrodos de trabajo de las celdas electroquímicas de evaluación y de referencia que puede ser atribuible completamente a las bacterias sulfato reductoras en la superficie.

En relación a los diferentes potenciales experimentales de evaluación y de referencia se observa una tendencia en disminuir la velocidad de corrosión en ambas celdas, aunque a distinta velocidad. Sin embargo la corrosión localizada, se detectó hasta el último potencial experimental, aunque este tipo corrosión presentó ciertas restricciones en cuanto a densidad y morfología.

A través de la serie experimental de evaluación, se deja entrever a la actividad enzimática, metabólica, formación y estabilidad de las biopelículas en la influencia de la corriente de protección y en los procesos de corrosión localizada.

Es incierto hasta que potencial podría ser tolerable y aprovechable para el desarrollo fisiológico de la población de la población de BSRs que colonizan superficies protegidas.

El consorcio de microorganismos usado para este estudio fue caracterizado por la técnica de Clonación del Gen *16S rDNA* de biología molecular, encontrándose que el consorcio estuvo consolidado por dos microorganismos *Desulfuvibrio desulfuricans* (AF354664) y *Clostridium Perfringens* (M69264).

8. Recomendaciones y Trabajos futuros

En relación al trabajo desarrollado, se han encontrados áreas muy interesantes para complementar el presente estudio.

La primera área de investigación está dada por el papel que juega el sistema enzimático de las hidrogenasas en la remoción del hidrógeno reducido en las superficies protegidas catódicamente a diferentes potenciales (despolarización catódica).

La segunda área de investigación está orientada a identificar si los productos de corrosión como la malina conformada en la superficie del metal, podrían tornarse porosas e inestables a *pH* ácidos y alta concentración de sulfhídrico y desarrollar procesos de corrosión localizada.

Otra área de interés es monitorear la superficie del electrodo de trabajo con microelectrodos a fin de realizar un registro del *pH* desarrollado desde la colonización hasta la formación y maduración de biopelículas, con la finalidad de conocer la acidez real en la superficie y bajo biopelícula.

Determinar de manera específica el papel que juega la formación de biopelículas sobre la regulación del proceso de transporte iónico y afectación del proceso de corrosión.

En un sistema recubrimiento protección catódica, mediante un daño simulado e inmerso en medio de cultivo con BSRs, determinar el posible efecto de quimiotactismo ejercido por la reducción de hidrógeno catódico.

9. Referencias

1. Madigan T. Michel, M.M.J., Parker Jack.,, *Brock, Biología de los Microorganismos* Décima ed. 2004, Madrid: Pearson Educación
2. Durán, E.A. and I.S.F.M.S.-. Velang., *Procesos de Formación de un Suelo*. . Microbial Ecology 1997.
3. Zamora, B.L.R.C.A. *Los suelos [Online]*. <http://www.Monografias.com>. 2006.
4. Davis J. B., ed. *Petroleum Microbiology*. 1967., Elsevier Publishing Co.: Texas.
5. Chapelle, F.H., *The significance of microbial processes in hydrogeology and geochemistry*. Hydrogeology 2000. **8**: p. 41-46.
6. Neilands, J.B., *Microbial Iron Metabolism*,. A Comprehensive Treatise. 1974. , Berkeley California: Academic Press Inc.
7. Dexter Dyer, Betsey. *Sulfate-reducing bacteria, A Field Guide to Bacteria* in *Wikipedia, the free encyclopedia*. 2003. Ithaca and London: Comstock Publishing
8. Grundmeier, G., Schmidt, W., Stratmann, M., *Corrosion protection by organic coatings: electrochemical mechanism and novel methods of investigation*. Electrochimica Acta, 2000(45): p. 2515-2533.
9. Sykes, Z.S.S.J.M., *Investigation of Blister formed on Coated Mild Steel Using Scanning Kelvin Probe*. Journal Teknologi 2011. **56**: p. 139-154.
10. García Esquivel R., Rodea Irma P., Romero Domínguez. J. M., *Biodegradación del material bituminoso, utilizado como recubrimiento anticorrosivo externo en ductos enterrados*. Revista del Instituto Mexicano del Petróleo, 1990. **22**(3): p. 32,42.
11. Talesnick Mark., *Measuring Soil Contact Pressure on a Solid Boundary and Quantifying Soil Arching*. Geotechnical Testing Journal, 2005. **Vol. 28**(No. 2): p. 1, 9.
12. Beavers J.A., T.N.G., *Corrosion Beneath Disbonded Pipeline Coatings*. Material Performance, 1997. **04**: p. 13, 19.
13. Pikas Joseph L., *Case Histories of External Microbiologically Influenced Corrosion Underneath Disbonded Coatings*. Corrosion, 1996(Paper No. 198): p. 198/1, 198/7.
14. Worthingham R. G., J.T.R., McD. Francis,, *External Corrosion of Line Pipe. Part I: Identification of Bacterial Corrosion in the Field* Nova, AN Alberta Corporation Station M Calgary Alberta Canada T2P 2N6
15. Jack T. R., M.F., *External corrosion of Line Pipe, Part II: Laboratory Study of Cathodic Protection in the Presence of Sulfate-Reducing bacteria* Nova/Husky Research Corporation LTD. p. 339, 350.
16. NACE., N.I., Item No. 21001, . *Standard Recommended Practice in RP 0169-02*. 2002, NACE: Houston Tx.
17. Fischer, K.P., *Cathodic Protectio Criteria for Saline Mud Coating Sulfate-Reducing Bacteria (At Ambient and a Higher Temperature)*. 1981.
18. DNV, *Recommended Practice DNV-RP-B401-05 in Cathodic Protection Design*. 2005., Det Norske Veritas: Norways. p. 1, 28.
19. Kelly G. Robert, M.J.P., *Electrochemical Techniques in Corrosion Engineering* 1998, Virginia: Center for Electrochemical Science and Engineering University of Virginia.
20. Barlo, T.J. *Field testing the criteria for cathodic protection of buried pipelines*. in *14th ASME et al. Offshore Mech. & Arctic Eng. Int. Conf*. 1995.
21. Barlo, T.J. and W.E. Berry, *An Assessment of the present Current Crieteria for Cathodic Protection of Buried Steel Pipelines*. Materials Performance, 1984. **23**(9): p. 9-16.

22. De Romero, M., O. De Rincon, and L. Ocando. *Cathodic protection efficiency in the presence of srb: State of the art.* in *Corrosion 2009, March 22, 2009 - March 26, 2009*. 2009. Atlanta, GA, United states: National Assoc. of Corrosion Engineers International.
23. Dexter S. C., M.L.N., Lucas K. E., , *On Mechanism of Cathodic Protection*. *Corrosion*, 1984(Paper No. 334): p. 334/1, 334/17.
24. Gummow, R.A., *Cathodic protection potential criterion for underground steel structures*. *Materials Performance*, 1993. **32**(11): p. 21-30.
25. Jack, T.R., *Biological Corrosion Failures*. ASMINT, 2002. **104738/6072**.
26. Albitier H. Apolinar, C.C.A., *Materiales Metálicos*. 2005, IMP: México. p. 10-35.
27. Morcillo Linares Manuel y Feliu Matas Sebastián. *Teoría y práctica de la lucha contra la corrosión -Protección catódica-* 1984, Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Centro de Investigaciones Metalúrgicas.
28. <http://www.science.uwaterloo.ca/~cchieh/cact/c123/nernsteg.html>, *Nerst equation*. 7 de agosto de 2012.
29. <http://www.sc.ehu.es/sbweb/fisica/transporte/difusion/difusion.htm>. *Difusión. Ley de Fick*. 2009.
30. Genescá, L.J., *Corrosión atmoferica*, in *Más allá de Herrumbre III*, Omega, Editor. 2002, Fondo Cultural económico: México. p. 1-17.
31. Stoecker, J.G., *Guide for the investigation of microbiologically induced corrosion*. *Material Performance*, 1984. **23**(8): p. 48-55.
32. Czechowski M. H., C.C.F.G., Libert-Coquempot, Lespinat P. A. Berlie Y. Le Gall J., , *Utilization of cathodically-produced hydrogen from mild steel by Desulfovibrio species with different types of hydrogenases* *Industrial microbiology* 1990. **6**: p. 227, 234.
33. Pankhania I. P., M.A.n., Hamilton W. A., *Utilization of Cathodic Hydrogen by Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough)*. *General Microbiology*, 1986. **132**: p. 3357, 3365.
34. Guezennec Jean., M.T., *Influence of Cathodic Protection of Mild Esteel on the Growth of Sulfate-Reducing bacteria at 35°C in Marine Sediments*. *Biofouling*, 1991. **03**: p. 339, 348.
35. Jardy J. A., *Utilization of cathodic Hydrogen by Sulphate-Reducing Bacteria* *Br. Corrosion*, 1983. **18**(4): p. 190, 193.
36. Sequeira C. A. C., *Microbial Corrosion* Vol. 29. 2001, London: European Federation of Corrosion Publications. 373.
37. Rabus, R., *Dessimilatory Sulfate- and Sulfur- Reducing Prokaryotes*. . *Prokaryotes*, 2006. **2**: p. 659-768.
38. Maron, H.S., Prutton, Carl F. , *Fundamentos de Fisicoquímica*. Primera edición ed, ed. E. Limusa. 1977, México.
39. Carrol, J.J., *Adiscusión of the Effect of pH on the Solubility of Hydrogen Sulfide. Software for Phase Equilibria in Natural Gas Water Systems*. . AQUAlibrium, (1998).
40. Rozenfeld I. L., *Corrosion Inhibitors*. 1981, New York: McGraw-Hill International Book Company.
41. Iofa, Z.A., *Mechanisms of intensification of hydrogen-sulfide corrosion*. *Zashchita metallov*, 1970. **6**(5): p. 491,.
42. Sherar B.W.A., P.I.M., Keech P.G., Mitlin S., Southam G., Shoesmith D.W., *Characterizing the effect of carbon steel exposure in sulfide containing solutions to microbially induced corrosion*. *Corrosion Science*, 2011. **53** p. 955-960.
43. Tiller A.K., *A Review of the European Research Effort on Microbial Corrosion Between 1950 and 1984*. 1984, National Corrosion Service, National Physical laboratory p. 8, 29.
44. Stoecker, G.J., *Microbiologically Influenced Corrosion*. Vol. 2. 2001, Houston Tx: NACE INTERNATIONAL. 9.

45. Taylor, P., *The stereochemistry of iron sulfides—a structural rationale for the-crystallization of some metastable phases from aqueous solution*. American Mineralogist, 1980. **65**: p. 1026, 1030.
46. Little Brenda, P.R., Ray Richard, *Localized Corrosion and Bacterial Attraction Determined by Surface Analytical Techniques*. corrosion, 2000(Paper No. 00395).
47. Murowchick, B.J.a.B.L.H., *Formation of cubic FeS*. American Mineralogist, 1986. **71**: p. 1243-1246.
48. Fushao, L.M.A., *EFFECT OF SULFATE-REDUCING BACTERIA ON THE PITTING CORROSION BEHAVIOR OF 18-8 STAINLESS STEEL*. Acta Metalurgica Sinica, 2009(5): p. 536- 540.
49. Morse, W.J., Millero J. Frank, Jeffrey Cornwell, *The Chemistry of the Hydrogen Sulfide and Iron Sulfide Systems in Natural Waters*. Earth-Science Reviews, 1987. **24**: p. 1-42.
50. Fushao, L.M.A., *Effect of sulfate-reducing bacteria on the pitting corrosion behaviour of 18-8 stainless steel*. Acta Metalúrgica Sinica, 2009. **5**: p. 536- 540.
51. Flemming H. C, a.W., *Water Science Technology* 2001. **43**(6): p. 1-8.
52. Lewandowski Z., *MIC and Biofilm Heterogeneity*. corrosion, 2000(Paper No. 00400): p. 1, 7.
53. Bhaskar V.P, N.B.B., *Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes*. CURRENT SCIENCE, 2005. **VOL. 88**(NO. 1): p. 45-53.
54. Fleming, H.C.a.W., *Relevance of microbial extracelular polymeric substances (Epsc) - Part I: Structural and ecological aspects*. Water Science Technology, 2001. **43**(6): p. 1- 8.
55. Costerton J. W, L.Z.e., al. , *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbial., 1995. **49**: p. 711-741.
56. Wingender Jost, N.R.T., Flemming Curt Hans, *Microbial extracelular polymeric substances: Characterization, structure, and function* 1999, Berlin, New York: Springer. 258.
57. Bhaskar, P.V., * Bhosle B. Narayan *Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes*. CURRENT SCIENCE, 2005. **88**(1): p. 45, 53.
58. Flemming H. C., W.J., *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects*. . Water Science and Technology 2001. **43**(6): p. 1- 8.
59. Beech, B.I.S.J., *Biocorrosion: towards Understanding Interactions between biofilm and metals* Environmental Biotechnology, 2004. **15**: p. 181, 186.
60. Beech, I.B., *Direct Involvement of an Extracelular Complex Produced by a Marine Sulfate-Reducing Bacterium in Deterioration of Steel*. Geomicrobiology Journal, 1998. **15**: p. 121 - 134.
61. Beech B. Iwona, S.J., *Biocorrosion: towards Understanding Interactions between biofilm and metals* Environmental Biotechnology, 2004. **15**: p. 181, 186.
62. Kwong, Y.C.L.C.X.a.F.H.P.H., *Anaerobic Electrochemical Corrosion of Mild Steel in the Presence of EPS produce by SRB*. . Environ Science technology 2002. **36**: p. 1720 1727.
63. Ecology, I.S.f.M., *Microbial Ecology* Vol. 37. 1974: Springer- Velang.
64. Aquiahuatl, R.M.d.I.A., *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General*, P.C.M.d. Lourdes, Editor. 2004, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Ixtapalapa: México D.F.
65. Hungate, R.E., *A roll the method for cultivatio of strict anaerobes*. , in J. R. Norris and Ribbons.,eds *Methods in Microbiology* A. Press, Editor. 1969, Academic Press: New York. p. 117-132.
66. Benjamin, L., *Genes VI*. Vol. Part I. 1997, Oxford: University Oxford Press.
67. Mullis, K., *PCR Polymerase Chai REaction / "The unusual origin of the polymerase chain reaction"*. . Scientific American, 1986. **262**(4): p. 56-61, 64-5.
68. Radwan, M.H.A., Zan Jindong, Hill Russell T. , *Bacterial Community Analysis of Two Red Sponges*. Marine Biotechnology 2010. **12**(3): p. 350-360.

69. Cole, J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A; Chandra S. McGarrell, D. M., Et. Al, *The Ribosomal date base proyect (RDP-II): previiewing nucleic acid research.*, 2001. **1**(31(1)): p. 442-443.
70. Kumar S., Tamura K., JaKobsen I.B., *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*. Bioinformatics, 2001. **Vol. 17**(12): p. 1244-1245.
71. Olivares, P.A.N., *Sistema Molecular del Género Fissurella en el Pacífico sudooriental*. 2007, Santiago de Compostela: Universidad de santiago de Compostela.
72. ASTM, *Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Corrosion Test Specimens, in designation: G 1 - 03*. 2003, ASTM: USA. p. 1-9.
73. Roblero Jan Janet, P.B.A., García Esquivel Rafael, Zavala Díaz Javier, Hernández Rodriguez Cesar., *Phylogenetic Charcterization of bacterial consortia obtained of corroding gas pipeline in Mexico* World J Microbiol Biotechnol, 2008. **24**: p. 1775-1784.
74. Stoecker, J.G., *Guide for the investigation of microbiologically induced corrosion. Material Performance.*, 1984. **23**(8): p. 48-55.
75. Odum, P.E., *Ecología*. Tercera ed. 1972, México: Editorial Interamericana.
76. IGME, *Química del ácido carbónico del agua*. Isotopos ambientales en el ciclo hidrológico, 2009. **9**: p. 101-111.
77. Bockris, M.J.O., *Electroquímica Moderna*. Vol. 2. 1980, New York: Plenum Publishing Corporation.
78. Pemex, *Testigos y Probetas Corrosimétricas* 2007, Pemex: México. p. 23.
79. ASTM, *Standard Test Method for Conductiing Potentiodynamic Polarization Resistance Measurements*. 2009.
80. Princenton, A.R., *Basics of Corrosion Measurements* A.I. Group, Editor. 1982, PAR: USA. p. 1-12.
81. Mendoza Flores Juan; Romero Durán Romero y Juan Genescá Llongueras., *Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en Corrosión*. 2003, UNAM: México. p. 1-33.
82. Lorenz, W.J. a.M.F., *Determination of corrosion rates by electrochemical DC and AC Methods*. Corrosion Science, 1981. **21**(09): p. 647 a 672.
83. Rodríguez Gómez Francisco J, *Técnicas electroquímicas de corriente directa para la medición de la velocidad de corrosión*, in - *Resistencia a la Polarización*-, R.G.F. J., Editor. 2006, UNAM: México. p. 1-9.
84. Frankel Gerald S, *Electrochemical Techniques in Corrosion: Status, limitations, and Needs*. ASTM International, 2008. **5**(2): p. 1-27.
85. Little J Brenda., W.A.P., *The Interrelationship Between Marine Biofouling and Cathodic Protection*. Corrosion, 1993(Paper No. 525): p. 525/1, 525/7.
86. Hung J. Paul and Lee J. Philip, e.a., *Biothechnology and Bioengineering*, ed. W.o.I. library. Vol. 89. 2005, New York. 1-12.
87. Alejandrina, M.J., *Efecto de Temperatura en la Eficiencia de Crecimiento y Respiración en Bacterias Marinas Heterotróficas* 2004, Universidad Autonoma de Baja California Ensenada, B. C p. 83.
88. Neilands, J.B., *Microbial Iron Metabolism.*. A Comprehensive Treatise. 1974 Berkeley California: Academic Press Inc.
89. Pérez Méndez Leticia R., *Vida util residual de estructuras de ormigón armado afectadas por corrosión*, in *Ingeniería Civil (Construcción)*. 2010, Universidad Politécnica de Madrid: Madrid España. p. 107.
90. Piratoba, M.U., *Aspectos Básicos en la interpretación de diagramas de Impedancia Electroquímica Dyna* 2010. **162**: p. 13-19.

91. API, *Recommended Practice for Biological analysis of Subsurface Injection Waters*, in *Recommended Practice*. 1965, American Petroleum Institute: New York. p. 1-7.

Anexo I. Medios de cultivos

Medio de cultivo API*

El medio de cultivo API [91] se considera un medio diferencial debido a que en su formulación contiene nutrientes orgánicos e inorgánicos apropiados para el crecimiento y diferenciación de bacterias sulfato reductoras, dentro de las sales minerales, se encuentran el sulfato ferroso amoniacal, que se caracteriza en parte por la aportación de sulfatos al medio de cultivo y que este por actividad de las BSRs, son reducidos hasta sulfuro de hidrógeno, este producto al ser excretado al medio por estos microorganismos, da lugar a que se lleva a cabo la reacción de precipitación con el ion ferroso que es proporcionado por esta sal, que se encuentra disuelta en el seno del medio. El sulfuro de hierro de color negro, determina la presencia de estos microorganismos y los diferencia de los demás anaerobios debido a la formación de colonias negras en agar API base. La formulación del API modificado, se presenta a continuación:

Tabla 36. Medio de cultivo API modificado para BSRs

Ingrediente:	Cantidad (g)	Volumen (ml)
Lactato de sodio		8
Extracto de levadura	2	
Ácido ascórbico	0.2	
Sulfato de magnesio	0.4	

Fosfato de potasio bibásico	0.02	
Cloruro de sodio	45	
Cisteína	0.5	
Sulfato ferroso*	0.2	
Sulfito de sodio*	0.4	
Indicador Rezasurina	5 gotas	
Agua bidestilada		1000

Nota: Los ingredientes marcados con asterisco, se deben de agregar al final del resto de los ingredientes. La modificación a formulación se hizo para fortalecer el crecimiento y esta se realizó en cuanto a ingredientes y cantidad.

Tabla 37. Preparación de Medio Bold Basal Modificado (MBBM)

Componente	Sustrato	Cantidad (g)
Solución 1	NaNO ₃	25
Solución 2	MgSO ₄ •7H ₂ O	7.5
Solución 4	K ₂ HPO ₄	7.5
Solución 5	KH ₂ PO ₄	17.5
Solución 6	CaCl ₂ •2H ₂ O	2.5
Solución 7*	ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.82
	MnCl ₂ •4H ₂ O	1.44
	MoO ₃	0.71
	CuSO ₄ •5H ₂ O	1.57

	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.49
Solución 8	H_3BO_3	11.4
Solución 9	EDTANa_2	50.0
	KOH	31.0

*Puede ser necesario introducir en autoclave para disolver

a) Para preparar 1 litro de medio de cultivo; colocar en 900 ml de agua desionizada:

Soluciones 1, 2, 4, 5, 6	10.0 ml de cada una
Soluciones 7, 8, 9	1.0 ml de cada una

b) Además de las soluciones anteriores, se adicionaran los siguientes reactivos:

Ingrediente	Cantidad
Lactato de sodio	8 ml
Cloruro de sodio	10.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Sulfito de sodio	0.4 g
Sulfato de magnesio	0.32 g
Cisteína	0.5 g
Resazurina	2.0 gotas

c) Finalmente completar a 1000 ml con agua desionizada;

En caso de requerirse que el medio de cultivo sea sólido agregar 15 g de agar por cada litro de medio. Esterilizar en autoclave a 15 libras durante 15 minutos a 121°C.

Anexo II Caracterización Filogenética

Resultados de la Caracterización Filogenética del consorcio de BSRs, utilizado en este estudio, se presenta en forma de árbol Figura 3, 4 y Tabla 1, tomados del artículo “Phylogenetic characterization of bacterial consortia obtain of corroding gas pipelines in Mexico”.

Fig. 2 Phylogenetic relationship between the 16S rDNA sequences of the ribosomal library clones. Phylogenetic tree of the *Desulfovibrio*-related clones. *Butyrivibrio fibrisolvens* was used as a bacterial outgroup. Bootstrap values >50% are indicated in the main nodes in a bootstrap analysis of 1000 replicates, the scale bar represents the expected number of substitutions averaged over all sites analyzed

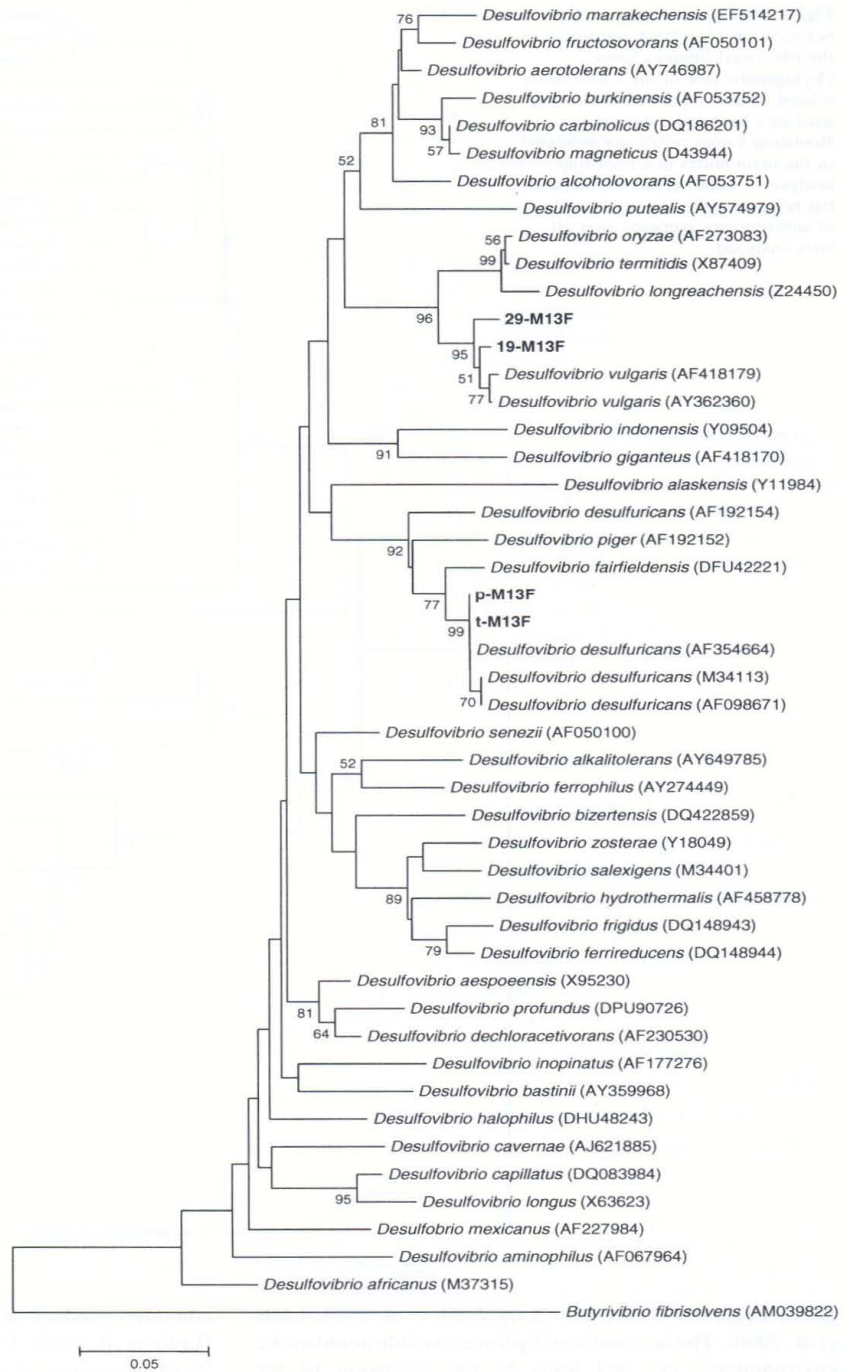
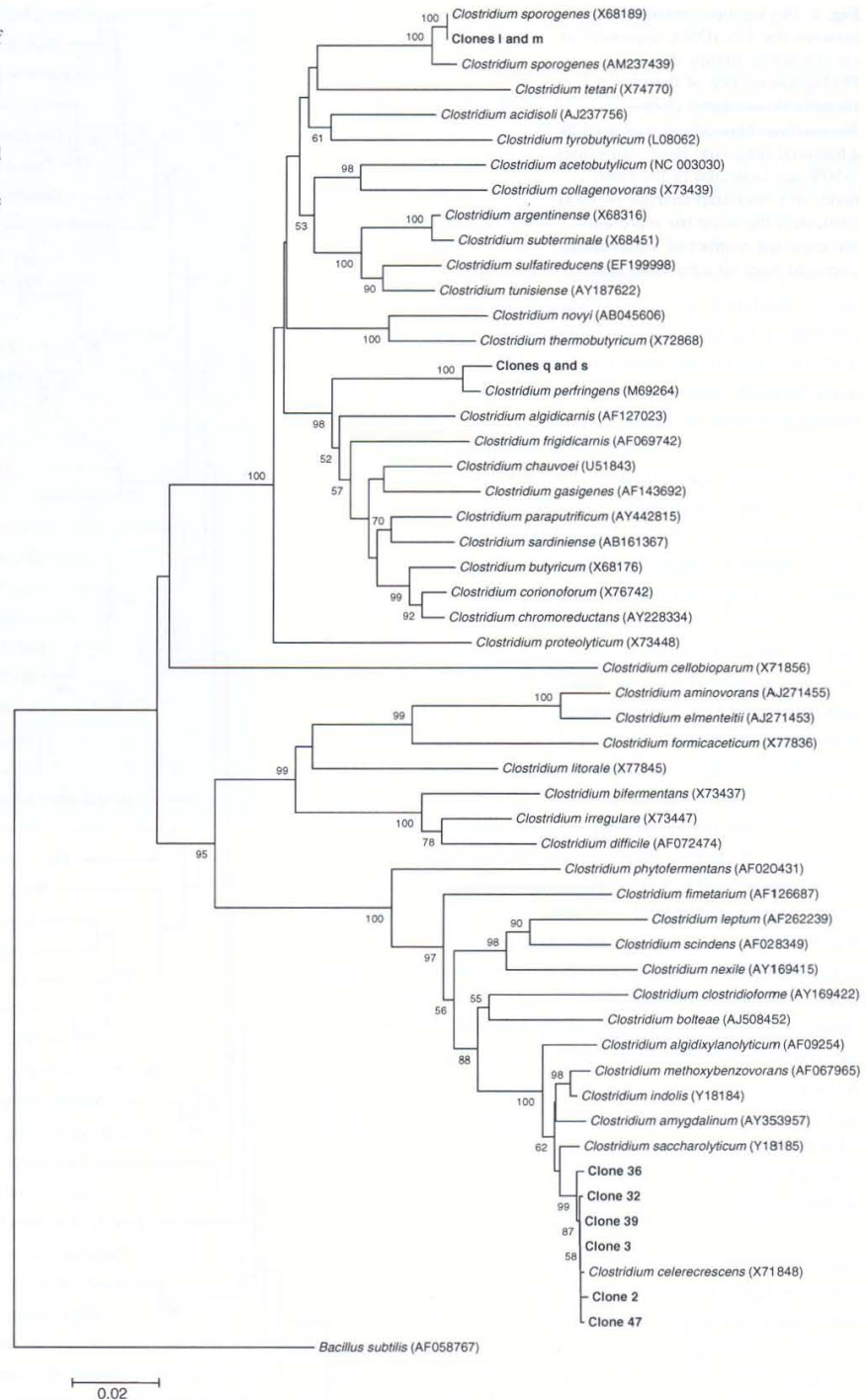


Fig. 3 Phylogenetic relationship between the 16S rDNA sequences of the ribosomal library clones. Phylogenetic tree of the *Clostridium* related clones. *Bacillus subtilis* was used as a bacterial outgroup. Bootstrap values >50% are indicated in the main nodes in a bootstrap analysis of 1000 replicates, the scale bar represents the expected number of substitutions averaged over all sites analyzed



Beech et al. 1994; Hamilton 2003; Dinh et al. 2004; Little et al. 2000). The accumulated hydrogen sulfide acidifies the environmental pH and leads to the formation of the

corrosion product, ferrous sulfide, on the metallic surface (Little et al. 2000). Particularly, the metal corrosion capacity of *Desulfovibrio desulfuricans* and *D. vulgaris* isolated

Table 1 Bacterial 16S rRNA sequences obtained from the consortia

Representative clones	RFLP patterns ^a	Phylogenetic relationship		
		Closest species in GenBank	Similarity (%)	Microbial group affiliation
Sample SC100 (BF)				
Clone 19, Clone 29	A, B	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (AY362360)	98.4, 99.0	<i>D. vulgaris</i>
Clone 8, Clone 22	C, D	<i>Cetobacterium somerae</i> (AJ438155)	97.9	<i>C. somerae</i>
Sample 48 (ES)				
Clone t, Clone p	E, F	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (AF354664)	99.4	<i>D. desulfuricans</i>
Clone q, Clone s	G, H	<i>Clostridium perfringens</i> (M69264)	98.5	
Sample 14 (BF)				
Clone 4, Clone 23	I	<i>Citrobacter freundii</i> (DQ517285)	99.1	<i>C. freundii</i>
Clone 7, Clone 33	J	<i>Citrobacter freundii</i> (AY259630)	99.1, 99.8	<i>C. freundii</i>
Clone 27	K	<i>Citrobacter freundii</i> (AB210978)	99.5	<i>C. freundii</i>
Sample 12 (BF)				
Clone 3	L	<i>Clostridium celerecrescens</i> (X71848)	99.5	<i>C. celerecrescens</i>
Clone 2	M			
Sample 1 (BF)				
Clone l, Clone m	N, O	<i>Clostridium sporogenes</i> (X68189)	99.8	<i>C. sporogenes</i>
Sample 7 (BF)				
Clone 36, Clone 32	L	<i>Clostridium celerecrescens</i> (X71848)	99.1, 99.3	<i>C. celerecrescens</i>
Clone 39, Clone 47	M		99.5, 99.4	

Samples SC100, 14, 12, 1 and 7 corresponded to biofilm samples (BF), and sample 48 corresponded to external surface sample (ES) of the pipeline

^a RFLP patterns were defined with the endonuclease *HhaI*

pitting corrosion reaction on steel in seawater (Bermont-Bouis et al. 2007). Possibly, the coexistence and synergistic relationship between the facultative anaerobic Enterobacteriaceae and SRB might accelerate the corrosion phenomenon in steel surfaces. Thus, Enterobacteria would contribute to the synthesis of the polysaccharidic matrix during biofilm formation, generating anoxic conditions propitious for SRB and *Clostridium* growth by oxygen consumption, and providing fermentation primary metabolites (organic acids) that can be utilized by SRB as oxidizable substrate to corrode directly the metal surface. However, further studies will have to be performed to demonstrate this potential relationship.

Besides, we detected *Cetobacterium somerae*, a gram-negative, microaerotolerant, non-spore-forming bacteria belonging to the Fusobacteria that produce acetic acid as the major end product of metabolism of peptides and carbohydrates (Finegold et al. 2003). No information concerning to their possible role in corrosive biofilms is available and this is the first report, as far as we know, detecting this species outside the clinical environment.

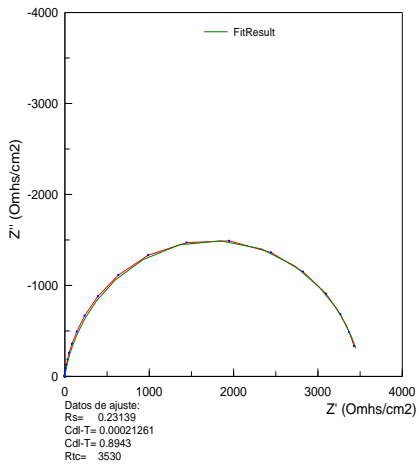
Several endospore-forming, chemo-organotrophic, fermentative, strictly anaerobic strains including, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium celerecrescens* and *Clostridium perfringens* were cultured and detected in several samples exhibiting internal or external corrosion signs. Depending

on the fermentable substrate and species, *Clostridium* spp. produce predominantly solvents (acetone, propanol, butanol and ethanol), organic acids (acetic, butyric, propionic, iso-butyric and iso-valeric acids), hydrogen and carbon dioxide. Particularly, organic acids can accelerate the corrosion by dissolving oxides from the metal surface and accelerating the cathodic reaction rate (Iyer et al. 2004). Generally, *Clostridium* species do not reduce sulfate by a dissimilatory pathway, although several species can produce sulfide from the fermentation of cysteine (Cato et al. 1986). However, some *Clostridium* species have a sulfate or thiosulfate reduction capacity accumulating sulfide (Hollaus and Sleytr 1972; Hernández-Eugenio et al. 2002), a corrosive agent of steel and other materials. The species detected in this work were not closely related taxonomically with sulfate reducing clostridia; however, the hydrogen produced might be used by SBR (Badziong and Thauer 1978). Similarly to our study, other studies, performed with marine biofilms attached to corroded steel pipelines found a bacterial community dominated by *Desulfovibrio* species in coexistence with members of the *Clostridium* group (Zhang and Fang 2001; Leu et al. 1998; Zhu et al. 2003). *Clostridium sporogenes* and *C. celerecrescens* were widely detected in our enrichment cultures and libraries and they also coexisted with several *Desulfovibrio* species. The role of the *Clostridium-Desulfovibrio*

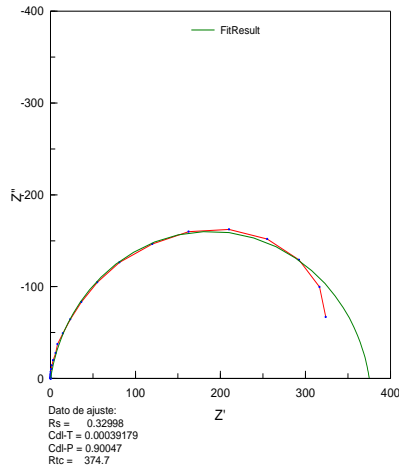
Anexo III. Apéndice Grafico

Ajuste de gráficos correspondientes a -850mV en CEE

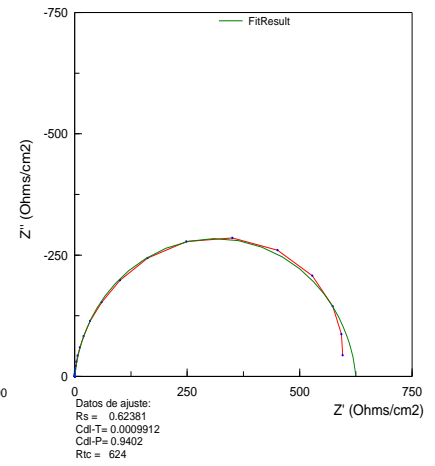
Ajuste en base a C. E de CEE a -850mV del día 01



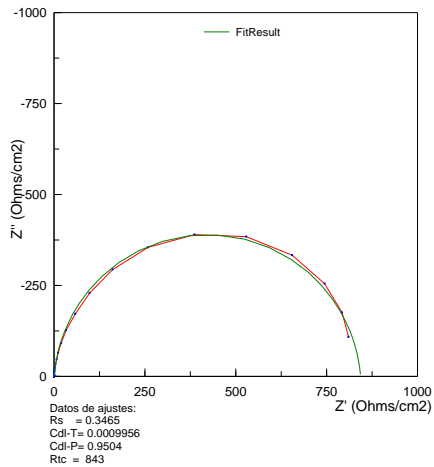
Ajuste en base al C.E de CEE del día 5 A a -850mV



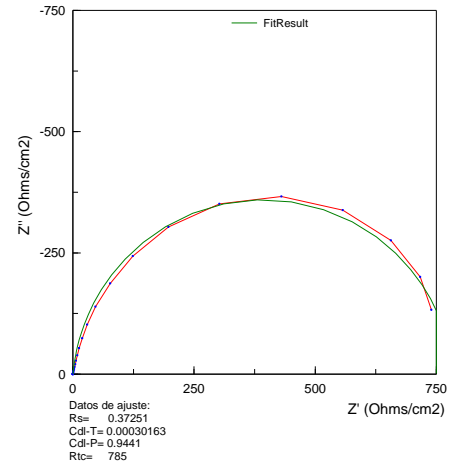
Ajuste en base a CE del día 10 a -850mV



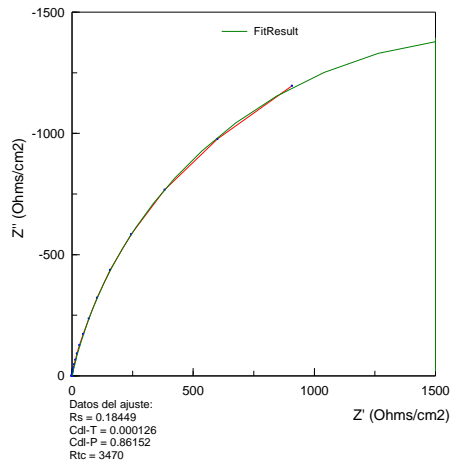
Ajuste en base a C.E del día 15 a -850mV



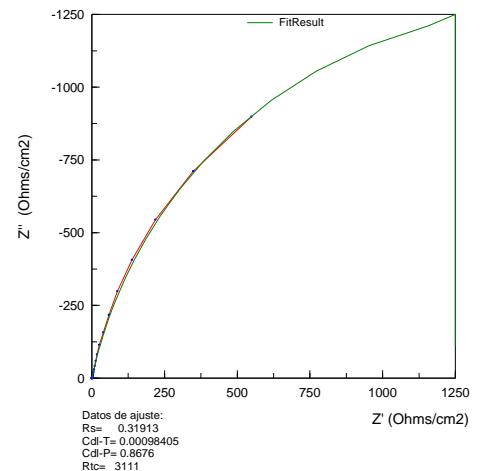
Ajuste en base a C.E del día 20 a -850mV



Ajuste en base a C.E a -850mV del día 30 en CEE

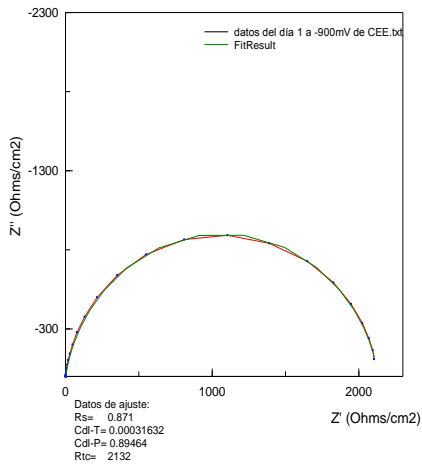


Ajuste en base a C.E del día 25 a -850mV

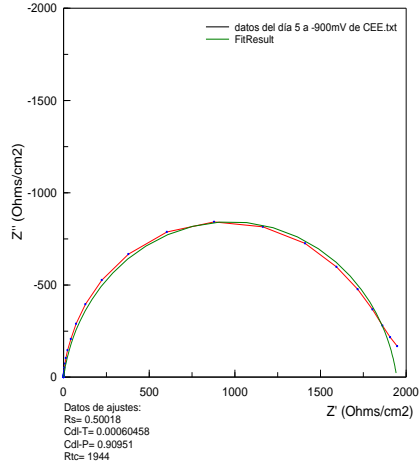


Ajuste de gráficos correspondientes a -900mV en CEE

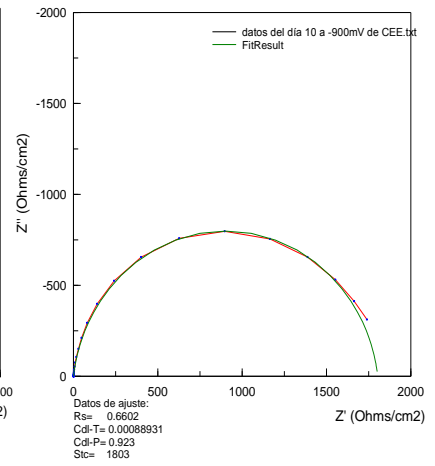
Ajuste en base a C.E de CEE a -900mV del día 01



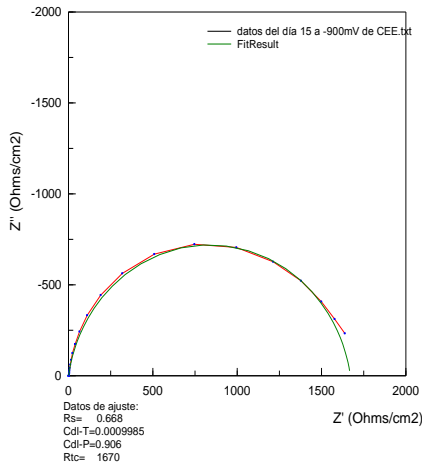
Ajuste en base a C.E de CEE a -900mV



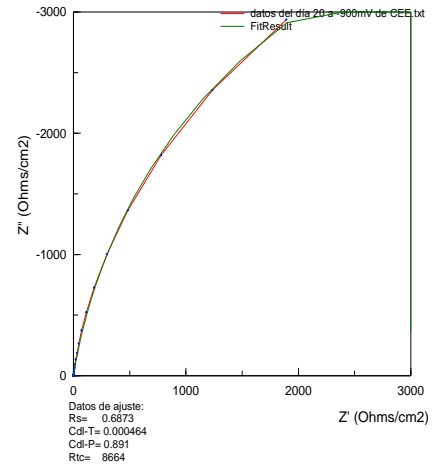
Ajuste en base a C.E de CEE a -900mV del día 10



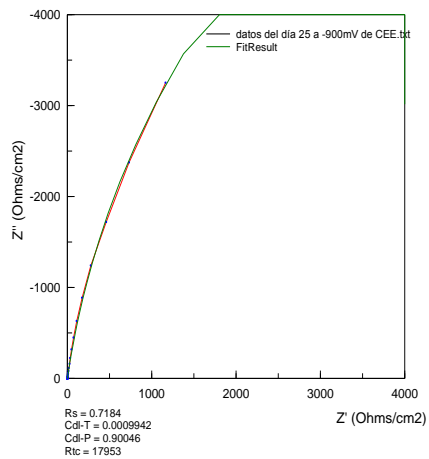
Ajuste en base C.E de CE a -900mV del día 15



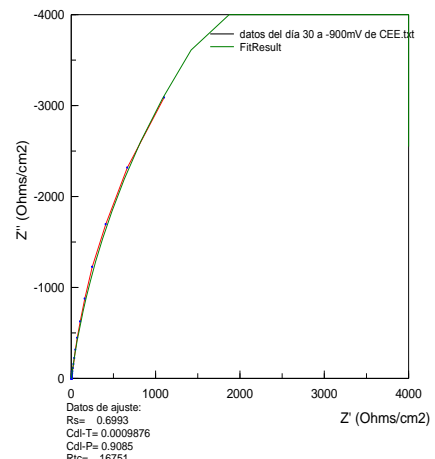
Ajuste en base a C.E de CEE a -900mV del día 20



Ajuste en base a C.E de CEE a -900mV del día 25

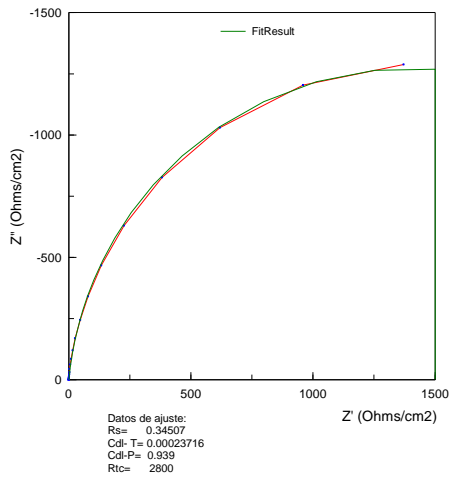


Ajuste en base a C.E de CEE a -900mV del día 30

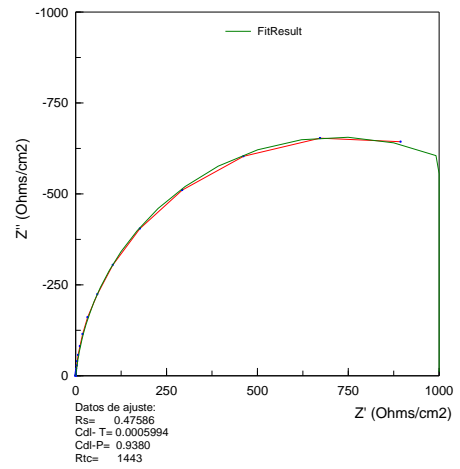


Ajuste de gráficos correspondientes a -950mV en CEE

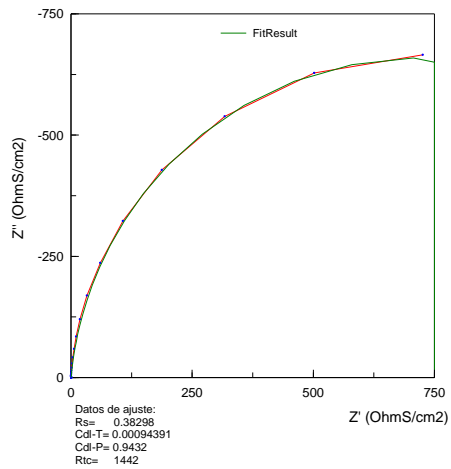
Ajuste en base a C.E de CEE a -950mV del día 1



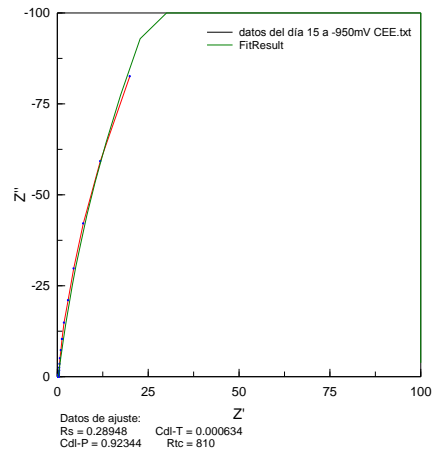
Ajuste en base a C.E de CEE a -950mV del día 5



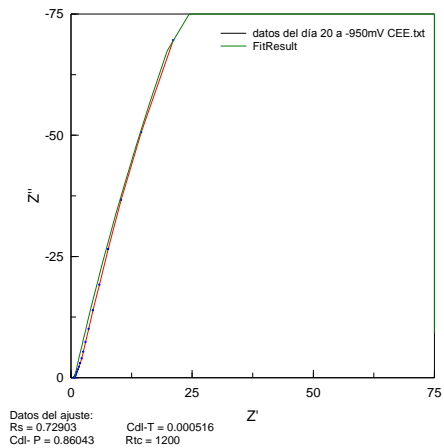
Ajuste en base a C.E de CEE a 950mV del día 10



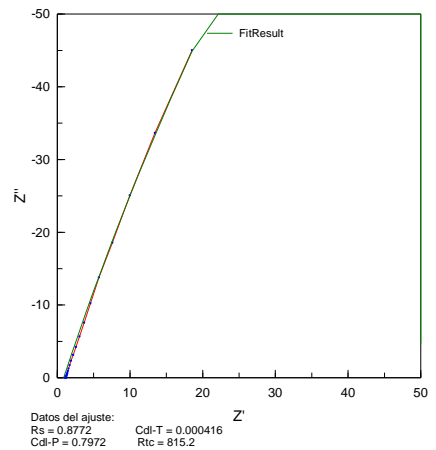
Ajuste en base a C.E de CEE a 950 mV del día 15



Ajuste en base C.E de CEE a 950mV del día 20

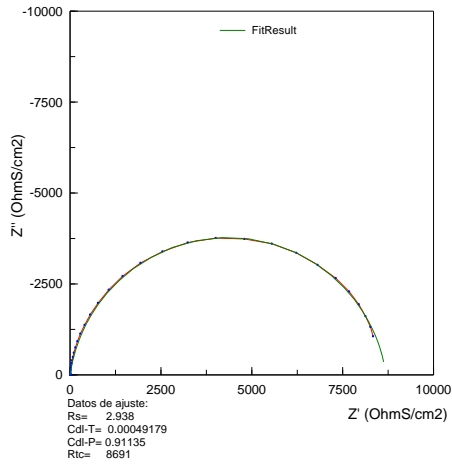


Ajuste en base a C.E de CEE a - 950mV del día 25

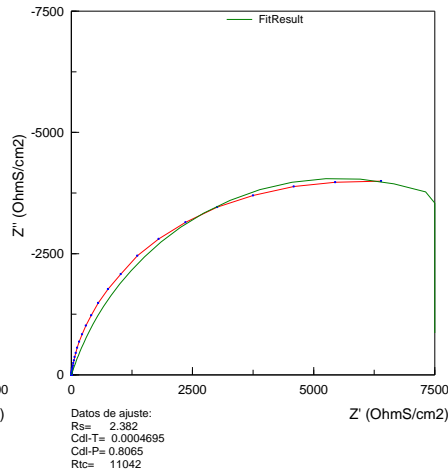


Ajuste de gráficos correspondientes a -1000mV en CEE

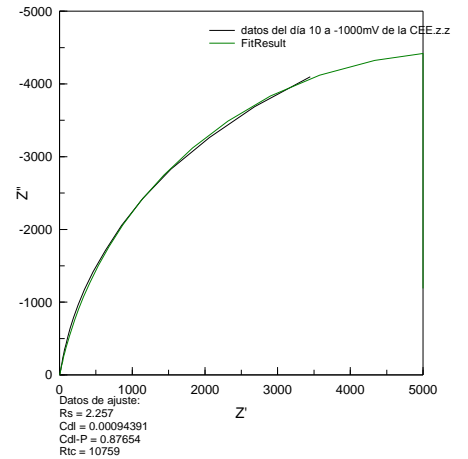
Ajuste en base a C.E de CEE a -1000mV del día 1



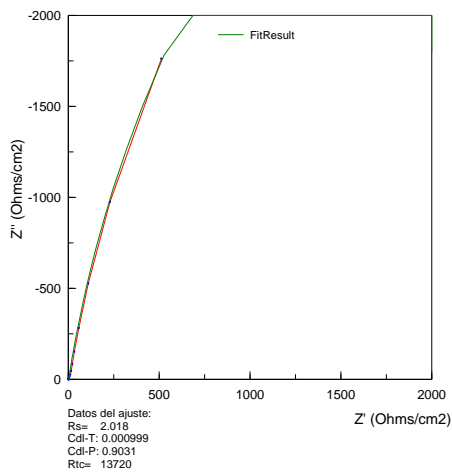
Ajuste en base a C.E de CEE a -1000mV del día 5



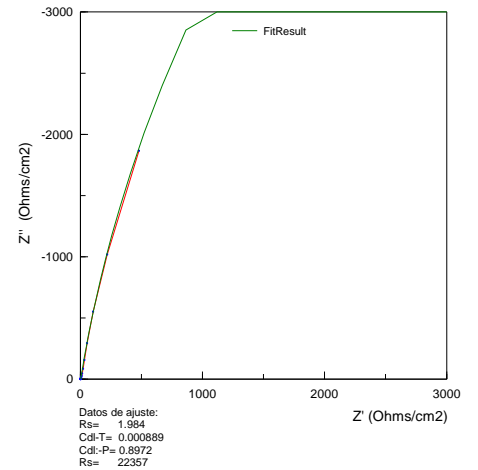
Ajuste en base a C.E a -1000mV. del día 10 en CEE



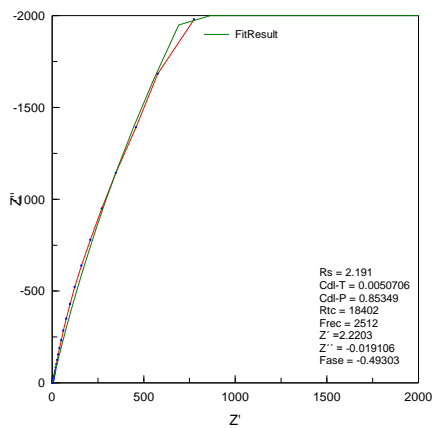
Ajuste en base a C.E de CEE a -1000mV del día 15



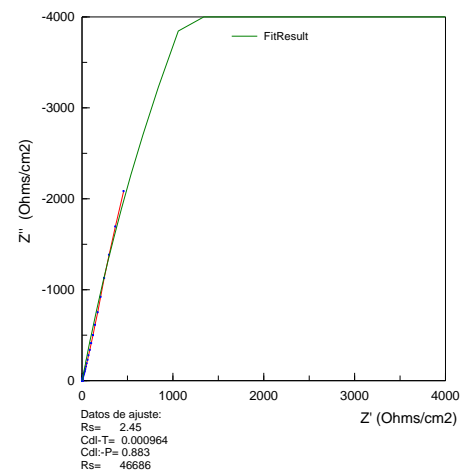
Ajuste en base a C.E a -1000mV del día 20



Ajuste en base a C.E de CEE a - 1000 mV del día 30



Ajuste en base a C.E a -1000mV del día 25



Ajuste de gráficos correspondientes a -1100mV en CEE

