



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LA CORROSIÓN CAUSADA POR
MICROORGANISMOS DE LOS GÉNEROS *Aspergillus*
sp. y *Penicillium sp.* EN ACERO 1010 USADO EN
TUBERÍAS DE AGUA POTABLE**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA

MECÁNICA - METALMECÁNICA

P R E S E N T A:

ING. MARTHA ELENA DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ

TUTORA:

DRA. FRIDA MARÍA LEÓN RODRÍGUEZ

2011





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. ARMANDO AGUILAR MÁRQUEZ

Secretario: M. I. MIGUEL DE NAZARETH PINEDA BECERRIL

Vocal: DRA. FRIDA MARÍA LEÓN RODRÍGUEZ

1^{er}. Suplente: DR. RICARDO GAITAN LOZANO

2^o. Suplente: M. I. JUAN CARLOS AXOTLA GARCÍA

Lugar donde se realizó la tesis:

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

TUTOR DE TESIS:

DRA. FRIDA MARÍA LEÓN RODRÍGUEZ

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Aguilar Márquez, por los comentarios, el apoyo y la confianza que me ha ofrecido tanto en este trabajo, como en mi vida profesional.

A la Dra. Frida María León Rodríguez, por el tiempo dedicado a la dirección de esta tesis y por la ayuda incondicional durante mis estudios.

A la M. en C. María del Yazmín Cuervo Usán, por compartirme sus conocimientos y por esa ayuda invaluable y desinteresada para llevar a cabo una parte de este proyecto.

Al Dr. Ricardo Gaitán Lozano y los Maestros Miguel de Nazareth Pineda Becerril y Juan Carlos Axotla García, por los comentarios para mejorar el trabajo.

A Verónica Monter Bolaños, Silvia Estrada Alcantar, María de Lourdes Maya Chávez, Noé Cortés Guerrero y Juan José García Ruíz por toda la ayuda para realizar la parte experimental del trabajo.

A mi familia y amigos, por todo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	9
<i>Objetivo general</i>	9
<i>Objetivos particulares</i>	9
CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA	10
<i>Mecanismos de corrosión microbiológica</i>	11
<i>Efecto del biofilm en la superficie metálica</i>	12
<i>Métodos de evaluación de la corrosión microbiológica</i>	15
<i>Curvas de Tafel</i>	16
<i>Prevención y control de la corrosión microbiológica</i>	18
<i>Importancia económica de la corrosión microbiológica</i>	18
<i>Clasificación de microorganismos que participan en fenómenos de corrosión</i>	20
<i>Corrosión microbiológica causada por Penicillium sp. y Aspergillus sp.</i>	22
<i>Género Penicillium sp.</i>	23
<i>Género Aspergillus sp.</i>	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
<i>Toma de muestras de suelo</i>	26
<i>Preparación de muestras</i>	27
<i>Dilución de suelo serial</i>	27
<i>Preparación de medios de cultivo</i>	29
<i>Aislamiento de microorganismos</i>	30
<i>Obtención de cepas</i>	31
<i>Identificación</i>	32
<i>Identificación de estructuras</i>	33

<i>Propagación y mantenimiento de cepas</i>	35
<i>Material metálico</i>	36
<i>Selección de los microorganismos</i>	36
<i>Diseño de Tratamientos</i>	36
<i>Celdas de trabajo</i>	38
<i>Preparación de unidades experimentales</i>	38
RESULTADOS	40
<i>Determinación de las pendientes de Tafel y velocidad de corrosión</i>	40
<i>Curvas de Tafel por tratamiento</i>	41
<i>Velocidad de corrosión</i>	56
<i>Determinación de pérdida de masa</i>	57
<i>Observación de superficie metálica</i>	58
<i>Observación microscópica del crecimiento del biofilm</i>	67
ANÁLISIS DE RESULTADOS	70
<i>Velocidad de Corrosión</i>	70
<i>Pérdida de masa</i>	74
<i>Evaluación del efecto corrosivo sobre las probetas expuestas a diferentes tratamientos</i>	78
CONCLUSIONES	82
REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Costos de corrosión estimados por sector en EUA.</i>	19
<i>Tabla 2. Condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de microorganismos corrosivos.</i>	21
<i>Tabla 3. Composición del medio de cultivo Papa - Dextrosa – Agar.</i>	29
<i>Tabla 4. Propiedades mecánicas del acero 1010</i>	36
<i>Tabla 5. Descripción de tratamientos</i>	37
<i>Tabla 6. Velocidad de corrosión</i>	56
<i>Tabla 7. Pérdida de masa</i>	58
<i>Tabla 8. ANOVA para velocidad de corrosión</i>	71
<i>Tabla 9. ANOVA para pérdida de masa</i>	75

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 . Formación del biofilm en la superficie metálica.</i>	13
<i>Figura 2. Pendientes anódica y catódica</i>	16
<i>Figura 3. Estructuras características del género Penicillium. Conidio (a), fiálides (b), métula (c) y rama (d).</i>	24
<i>Figura 4. Estructuras características del género Aspergillus. Conidio (a), cabeza conidial (b), conidióforo(c) y vesícula (d).</i>	25
<i>Figura 5. Zona de toma de muestras de suelo</i>	26
<i>Figura 6. Preparación de muestras de suelo en contacto con tubería.</i>	27
<i>Figura 7. Dilución en serie modificada.</i>	28
<i>Figura 8. Colonias de Penicillium sp. y Aspergillus sp.</i>	31
<i>Figura 9. Cepas puras de Aspergillus sp.</i>	31
<i>Figura 10. Cepas puras de Penicillium sp.</i>	32
<i>Figura 11. Preparación de las tinciones</i>	33
<i>Figura 12. Microscopios utilizados para la identificación de microorganismos</i>	33
<i>Figura 13. Género Penicillium sp.</i>	34
<i>Figura 14. Género Aspergillus sp.</i>	35
<i>Figura 15. Incubadora para mantenimiento de cepas puras</i>	35
<i>Figura 16. Celdas de trabajo</i>	38
<i>Figura 17. Probetas de acero 1010</i>	39
<i>Figura 18. a) Celda de trabajo, b) Disposición de los electrodos c) Vista de la pantalla de Gamry Framework</i>	40
<i>Figura 19. Generación de curvas Tafel</i>	41
<i>Figura 20. PDA sin microorganismos con 8 días de exposición.</i>	41
<i>Figura 21. Penicillium sp. con 8 días de exposición.</i>	42
<i>Figura 22. Aspergillus sp. con 8 días de exposición.</i>	43
<i>Figura 23. PDA sin microorganismos con 16 días de exposición.</i>	43
<i>Figura 24. Penicillium sp., con 16 días de exposición</i>	44
<i>Figura 25. Aspergillus sp. con 16 días de exposición.</i>	45
<i>Figura 26. PDA sin microorganismos con 24 días de exposición.</i>	45
<i>Figura 27. Penicillium sp. con 24 días de exposición.</i>	46
<i>Figura 28. Aspergillus sp. con 24 días de exposición.</i>	46
<i>Figura 29. PDA sin microorganismos con 32 días de exposición.</i>	47
<i>Figura 30. Penicillium sp. con 32 días de exposición.</i>	48
<i>Figura 31. Aspergillus sp. con 32 días de exposición.</i>	48
<i>Figura 32. PDA sin microorganismos con 40 días de exposición.</i>	49
<i>Figura 33. Penicillium sp. con 40 días de exposición.</i>	49
<i>Figura 34. Aspergillus sp. con 40 días de exposición.</i>	50

<i>Figura 35. PDA sin microorganismos con 48 días de exposición.</i>	51
<i>Figura 36. Penicillium sp. con 48 días de exposición.</i>	51
<i>Figura 37. Aspergillus sp. con 48 días de exposición.</i>	52
<i>Figura 38. PDA sin microorganismos con 56 días de exposición.</i>	53
<i>Figura 39. Penicillium sp. con 56 días de exposición.</i>	53
<i>Figura 40. Aspergillus sp. con 56 días de exposición</i>	54
<i>Figura 41. PDA sin microorganismos con 64 días de exposición.</i>	55
<i>Figura 42. Penicillium sp. con 64 días de exposición.</i>	55
<i>Figura 43. Aspergillus sp. con 64 días de exposición.</i>	56
<i>Figura 44. Balanza para obtención de masa inicial y masa final en cada probeta</i>	57
<i>Figura 45. Vista frontal y posterior de cajas de petri con 16 días de exposición</i>	59
<i>Figura 46. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante ocho días.</i>	60
<i>Figura 47. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 16 días</i>	61
<i>Figura 48. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 24 días.</i>	62
<i>Figura 49. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 32 días.</i>	63
<i>Figura 50. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 40 días.</i>	64
<i>Figura 51. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 48 días.</i>	65
<i>Figura 52. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 56 días.</i>	66
<i>Figura 53. Efecto del contacto de PDA, Penicillium y Aspergillus con el metal expuesto durante 64 días.</i>	67
<i>Figura 54. Secuencia de crecimiento del biofilm de cada microorganismo en los diferentes tiempos de exposición.</i>	69
<i>Figura 55. Probeta en contacto con Aspergillus sp. con 16 días de exposición</i>	79
<i>Figura 56. Probeta en contacto con Aspergillus sp. durante 64 días</i>	79
<i>Figura 57. Probeta en contacto con Penicillium sp., durante 32 días</i>	80
<i>Figura 58. Probeta en contacto con Penicillium sp., durante 48 días</i>	80
<i>Figura 59. Probeta en contacto con Penicillium sp., durante 56 días</i>	81

ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1. Polinomio de interpolación para la velocidad de corrosión en probetas expuestas a PDA.</i>	72
<i>Gráfico 2. Polinomio de interpolación para la velocidad de corrosión en probetas expuestas a Penicillium sp.</i>	73
<i>Gráfico 3. Polinomio de interpolación para la velocidad de corrosión en probetas expuestas a Aspergillus sp.</i>	74
<i>Gráfico 4. Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas en contacto con PDA.</i>	76
<i>Gráfico 5. Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas en contacto con Penicillium sp.</i>	77
<i>Gráfico 6. Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas en contacto con Aspergillus sp.</i>	78

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó la determinación del efecto corrosivo de microorganismos de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. sobre acero 1010 usado para fabricación de tuberías conductoras de agua potable. Para ello, se colonizaron probetas de acero con cultivos de los microorganismos antes mencionados, observándose su desarrollo mediante la comparación microscópica de superficies metálicas; así mismo, se determinó la pérdida de masa en las probetas y se evaluó la velocidad de corrosión, a través de curvas Tafel.

Se evaluó el efecto de los microorganismos en el tiempo, utilizando un diseño factorial de 3 x 8, Los factores estudiados fueron el microorganismo, con tres niveles, y el tiempo de exposición, con ocho niveles.

Los resultados indicaron que, para probetas en contacto con PDA, la velocidad de corrosión promedio para los primeros ocho tratamientos fue de 11.96 milipulgadas•año⁻¹. En probetas que estuvieron en contacto con medio de cultivo colonizado por *Penicillium* sp., con tiempos de exposición que variaron de ocho hasta 64 días, se reportó que el promedio de velocidad de corrosión fue de 12.7837 milipulgadas•año⁻¹.

En probetas que estuvieron en contacto con medio de cultivo colonizado por *Aspergillus*, con tiempos de exposición que variaron de ocho hasta 64 días, se reportó que la velocidad de corrosión promedio fue de 6.9402 milipulgadas•año⁻¹.

En los tres medios de cultivo se reporta un potencial de corrosión negativo lo que favorece los procesos de corrosión, sin embargo, este comportamiento cambia a lo largo del tiempo reportando incrementos y disminuciones en cada tratamiento. Esto indica que en todos los casos el metal presentó fenómenos de pasivación, sin embargo al romperse la película protectora se presentaron nuevos ataques.

La pérdida de peso indica que los microorganismos pueden utilizar al metal como fuente de nutrientes, principalmente de hierro. El daño observado en la superficie metálica se incrementa con el tiempo de exposición, por tanto, es importante considerar que los microorganismos tendrían posibilidad de generar corrosión por picaduras, alterar la interfase metal - suelo y favorecer otro tipo de ataques.

El género *Penicillium* sp., forma una biopelícula más compacta, esto genera un daño mayor en la zona de contacto comparado con el daño por *Aspergillus* sp., y el PDA sin microorganismos.

Dentro del rango de variabilidad estudiado, se determinó que el tiempo, de manera individual y en conjunto con el microorganismo, es el factor que más afecta a la velocidad de corrosión y al efecto corrosivo de los microorganismos en el metal.

ABSTRACT

The corrosive effect of *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. on 1010 steel, used in water piping, was evaluated. In order to do so, test tubes were inoculated with cultures of the above mentioned microorganisms and their growth was monitored by microscopically comparing the metallic surfaces, also, the rate of corrosion and weight loss were determined, the first using Tafel curves.

The effect of these microorganisms in different periods of time was evaluated, using a factorial design 3x8. The studied factors were: microorganism, at three levels, and exposure time, at eight levels.

The results indicated that, for test tubes in contact with PDA, the average corrosion rate for the first eight treatments was 11.96 mili-inches-year⁻¹. For test tubes in contact with a *Penicillium* sp. colony, with exposure times ranging from 8 to 64 days, the average rate was 12.7837 mili-inches•year⁻¹.

In the case of test tubes in contact with a *Penicillium* sp. colony, with exposure times ranging from 8 to 64 days, the average rate was 6.9402 mili-inches•year⁻¹.

In all three culture media, a negative corrosion potential was found, which favours all corrosion processes, however, this behavior changes in time, increasing and decreasing in each treatment, seeming to indicate a passivation phenomenon in the metal.

The metal loss of weight in the metal, indicates that the microorganisms use it as a source of nutrients, iron mainly. The damage observed in the surface increases with time and, therefore, it is important to consider that the presence of *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. may cause pitting corrosion, change the metal-soil interface and allow other attacks.

The genus *Penicillium* sp. forms a compact biofilm, which generates a greater damage in the contact zone, compared to the damage caused by *Aspergillus* sp. and PDA without microorganisms.

Within the range of variability considered, time, individually and combined with the mold, is the most affecting factor in the rate of corrosion and corrosive effect.

INTRODUCCIÓN

La corrosión, ha sido aceptada por el hombre como un fenómeno inevitable, sin embargo, en los últimos tiempos se han tratado de minimizar los costos y efectos que este proceso ocasiona; en el reporte de Uhlig publicado en 1949, se menciona que el costo de la corrosión para cualquier nación es grande, por ejemplo, en Estados Unidos el costo para ese año representó el 2.1% del producto interno bruto. En estudios realizados por otros países como Inglaterra, Japón, Australia, Kuwait, Alemania, Finlandia, India y China; se reporta que las pérdidas por corrosión van del uno al cinco por ciento del producto interno del país (Roberge, 2008).

En Estados Unidos, de acuerdo con la American Waterworks Association (AWWA), el costo anual de la corrosión en sistemas de agua potable y drenaje se estiman en 36 billones de dólares. Estos costos incluyen el reemplazo de tubería vieja, fugas, inhibidores de corrosión, recubrimientos de mortero, así como el costo de cubiertas externas y protección catódica.

Estudios realizados sobre el impacto de la corrosión sostienen que de 1999 a 2001, Estados Unidos tuvo un total anual de costos directos de aproximadamente 276 mil millones de dólares, cantidad que representa aproximadamente el 3.1% del PIB. En Perú para el año 2000 las pérdidas por corrosión representaron el 8% del PIB, aproximadamente 1200 millones de dólares. (Orozco *et. al.*, 2007).

Los microorganismos están presentes en casi todo tipo de ambientes, incluso en aquellos donde las condiciones ambientales no permiten la existencia de otros seres vivos; esto hace que, una vez que aparecen son capaces de crecer exponencialmente y de manera casi imperceptible, lo que genera que muchos de los metales y aleaciones utilizados por el hombre, como el acero, el aluminio, el cobre, y otros materiales como polímeros y el concreto, sean susceptibles de sufrir ataques por microorganismos. Por lo anterior, el

estudio de la corrosión microbiológica ha sido importante para el hombre; sin embargo, la investigación sobre el tema no es tan extensa como la hecha para otros tipos de corrosión.

La interpretación de los fenómenos de corrosión microbiológica cobra fuerza a mediados de la década de los sesenta, la única excepción fue un trabajo publicado por von Wolzogen Kuhr y von del Flugt en 1934; que es considerado el primer acercamiento para interpretar la corrosión microbiológica con un enfoque electroquímico. Entre 1960 y 1970 los trabajos publicados se volcaron sobre el estudio de las bacterias sulfatorreductoras en hierro.

Las revisiones sobre aspectos microbiológicos de la corrosión fueron desarrolladas principalmente por el Instituto del Petróleo, la Sociedad de Metales y Biodeterioro de Reino Unido, la NACE y la ASTM, en la década de los ochentas; durante este periodo se logra una interpretación bioelectroquímica del proceso de corrosión microbiológica en acero al carbono en ambientes anaerobios, asimismo, se desarrollan técnicas para el monitoreo de la corrosión microbiológica como: ATP-fotometría, radiorespirometría, además de técnicas electroquímicas como las curvas de Tafel.

En la década de los noventa, surgen varias técnicas de análisis que permiten definir el efecto de los sulfuros bióticos y abióticos sobre el acero expuesto a medios salinos, los trabajos de investigación se centraron sobre estudios con cepas de *Desulfovibrio* sp., género que agrupa muchas de las llamadas bacterias sulfatoreductoras; durante esta década se determinó el comportamiento como inhibidores de la corrosión en algunos microorganismos, esto debido a la neutralización de la acción corrosiva de algunas sustancias presentes en el ambiente o bien por la formación o establecimiento de cubiertas protectoras en la superficie metálica. En este periodo se determinó que una de las formas de prevenir la corrosión es mantener limpios los sistemas; para el caso de sistemas de conducción de agua potable se utilizaron sustancias biocidas que permitían controlar el bioensuciamiento.

Actualmente, se han desarrollado técnicas moleculares que involucran el trabajo con el ADN y ARN de los microorganismos, principalmente bacterias, esto permite identificar las

especies dominantes en el sistema, facilitan el cálculo de la proporción en que cada microorganismo del complejo participa en procesos de corrosión y facilitan la identificación de la susceptibilidad o resistencia del microbio a agentes antimicrobianos; asimismo, permiten obtener muestras que no son afectadas por factores como el tiempo y el transporte para la posterior realización de estudios (Videla, 2005).

Con la información anterior, es posible verificar que los estudios sobre corrosión microbiológica realizados se centran en el efecto de bacterias sobre material utilizado para sistemas de conducción; por ello, en el presente trabajo se evalúa el efecto corrosivo de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., sobre material metálico usado para tuberías conductoras de agua potable.

En México se pierde entre el treinta y cuarenta por ciento del agua potable por fugas en las tuberías, la primera causa de falla en las tuberías de agua y drenaje es la corrosión; esto representa aproximadamente diez mil millones de pesos anuales, a pesar de la importancia económica, no se han realizado estudios sobre los costos de la corrosión, pero datos generados por otros países permiten obtener una idea general sobre la importancia de este fenómeno.

La corrosión en tuberías metálicas utilizadas en los sistemas de distribución de agua potable puede causar problemas como: taponamiento, desarrollo de condiciones favorables para patógenos oportunistas, olores desagradables, disminución de la resistencia a la presión; lo cual genera problemas en el suministro y puede acelerar el deterioro de la calidad del agua con lo cual se incrementan los riesgos a la salud. (Teng, F., Y.T. Guan & W.P. Zhu, 2008)

En países desarrollados se ha prohibido el uso de tuberías de hierro fundido por los problemas antes mencionados; en países como México se siguen utilizando por razones económicas, las cuales impiden la sustitución inmediata por tuberías plásticas o de acero inoxidable. Es por ello importante estudiar los tipos de corrosión que se presentan con el

fin de proponer soluciones viables que disminuyan los efectos negativos de este fenómeno.

La corrosión de un material metálico puede incrementarse con la formación del biofilm, ya que la presencia de esta película modifica la interfase metal – medio afectando la velocidad de corrosión. Considerando que el biofilm modifica la velocidad de corrosión, se espera que, la película generada por *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., modifique la velocidad de corrosión.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de microorganismos de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., con el fin de determinar su potencial corrosivo sobre acero 1010 usado para fabricación de tuberías conductoras de agua potable.

Objetivos particulares

- Obtener las curvas de Tafel para conocer la velocidad de corrosión del acero 1010 en contacto con medio de cultivo colonizado con microorganismos de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.
- Observar el desarrollo del biofilm generado por microorganismos de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. sobre acero 1010, mediante la comparación microscópica de superficies metálicas.
- Determinar la pérdida de masa en probetas de acero 1010 en contacto con medio de cultivo colonizado con *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. mediante el cálculo de la diferencia entre masa inicial y masa final.

CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA

La corrosión microbiológica, biocorrosión o corrosión influenciada por microorganismos; es un conjunto de fenómenos de corrosión electroquímica que tienen lugar en presencia de microorganismos como bacterias, hongos y microalgas; este fenómeno es reconocido como una fuente de fallas estructurales en sistemas de conducción de fluidos e industrias.

Este tipo de corrosión incluye todos los fenómenos de destrucción metálica en los cuales los microorganismos intervienen actuando sobre la superficie metálica o cambiando el entorno en algunas zonas, con lo cual se favorecen procesos que en ausencia de microorganismos no sucederían. La corrosión ocasionada por microorganismos es de naturaleza electroquímica, por ello, se presenta una zona anódica, donde se produce un proceso de oxidación que conduce a la disolución del metal, y una zona catódica donde se lleva a cabo la reducción del metal.

Los microorganismos que participan en este proceso habitan en condiciones ambientales muy diversas, puede decirse que, salvo en aquellos casos en que las características físicoquímicas del medio son incompatibles con la vida, por ejemplo, altas temperaturas, pH bajo, concentración salina inhibitoria; es factible encontrar casos de corrosión microbiana. El crecimiento de microorganismos se puede dar en ambientes tan diferentes como suelos, agua dulce, sistemas de enfriamiento, tanques de almacenaje de combustible o estructuras de piedra.

Bacterias, hongos y microalgas son los microorganismos que participan de manera habitual en estos procesos. Las bacterias son las más importantes ya que tienen tamaños cercanos a $1\mu\text{m}$, esto permite su presencia y participación en fenómenos de corrosión localizada; además se reproducen con gran facilidad y rapidez, de manera que una bacteria puede transformarse en una colonia de un millón en aproximadamente 10 horas, con lo que la interfase metal-solución puede sufrir modificaciones muy importantes en períodos de tiempo cortos y los fenómenos de corrosión inducidos por su presencia, a

través de diversos mecanismos pueden aumentar la velocidad de corrosión de entre 3 y 5 órdenes de magnitud.

Las colonias de microorganismos situadas sobre la superficie metálica húmeda y los productos derivados de su metabolismo o descomposición constituyen el bioensuciamiento o “biofouling”, el cual modifica las condiciones corrosivas del medio, propiciándolas a través de distintos procesos.

Mecanismos de corrosión microbiológica

En todos los casos se encuentra una zona anódica donde se produce un proceso de oxidación que conduce a la disolución del metal; mientras transcurre simultáneamente la reducción de algún otro componente del medio a través de la correspondiente reacción catódica. Los microorganismos participan del proceso en forma activa sin modificar la naturaleza electroquímica del fenómeno.

El biofouling favorece el proceso corrosivo por las siguientes circunstancias:

- Aportación de iones como el S^{2-} (bacterias sulfatorreductoras en medio anaerobio); Fe^{3+} (bacterias ferroxidantes en medios aerobios).
- Modificación del pH del medio por formación de pequeñas cantidades de H_2SO_4 o ácidos orgánicos. Esto favorece la formación de un microclima ácido en picaduras, lo que podría cambiar la reacción de reducción de O_2 a reducción de H^+ con la consiguiente despolarización catódica.
- Aportación o reducción del contenido de O_2 en la interfase, lo que modificaría el factor de polarización de difusión para la reacción de reducción del oxígeno.
- En fenómenos de corrosión por picadura en medios con un determinado carácter oxidante el ión NO_3^- puede actuar como inhibidor en el ataque de acero inoxidable y aluminio en presencia de cloruros.
- En materiales metálicos pasivables, como el acero inoxidable, puede ocurrir que en un medio determinado, en presencia de anión agresivo, el material trabaje a un potencial de corrosión inferior al de picadura.

Las circunstancias antes descritas, pueden actuar de manera simultánea y su efecto puede potenciarse mutuamente al tratarse de factores que actúan tanto en la reacción anódica como en la catódica; el resultado puede ser un aumento notable en la velocidad de corrosión. Además del efecto catalítico del biofouling, también se puede originar una reducción considerable del coeficiente de transferencia de calor en un intercambiador, lo cual favorece de manera indirecta la inducción de fenómenos locales de corrosión-fatiga térmica.

Existen procedimientos de protección contra corrosión microbiológica, su utilización requiere identificar las características del medio para asegurarse de que es posible la existencia de microorganismos y determinar cuáles pueden desarrollarse. Con esta identificación es posible determinar el nivel de participación que tienen los microorganismos para posteriormente establecer las medidas de protección.

Entre las medidas más comunes están:

- a) Uso de recubrimientos protectores de tipo asfáltico o de polietileno que no son atacados por los microorganismos.
- b) Protección catódica, trabajada a un potencial 100mV inferior al habitual.
- c) Adición de sustancias biocidas al medio para destruir o inhibir el crecimiento y actividad metabólica del microorganismo responsable del ataque.
- d) Modificación de las características ambientales donde se desarrolla el proceso de corrosión para impedir el adecuado desarrollo de los microorganismos perjudiciales.

Efecto del biofilm en la superficie metálica

El biofilm o biopelícula puede definirse como una matriz gelatinosa de material segregado por los microorganismos, con un elevado contenido de agua, células microbianas y dendritos inorgánicos diversos. La formación de biopelículas se puede dividir en cinco etapas, en la primera y segunda etapas, las células del microorganismo presentan una

asociación leve y débil al sustrato, más tarde se presenta una fuerte adhesión; la tercera y cuarta etapa se caracterizan por la agregación celular en microcolonias seguido por la maduración de la biopelícula. En la quinta etapa, las células que conforman el biofilm se desprenden de la colonia y se dispersan para formar nuevas colonias. En la figura 1 se muestra el proceso descrito anteriormente.

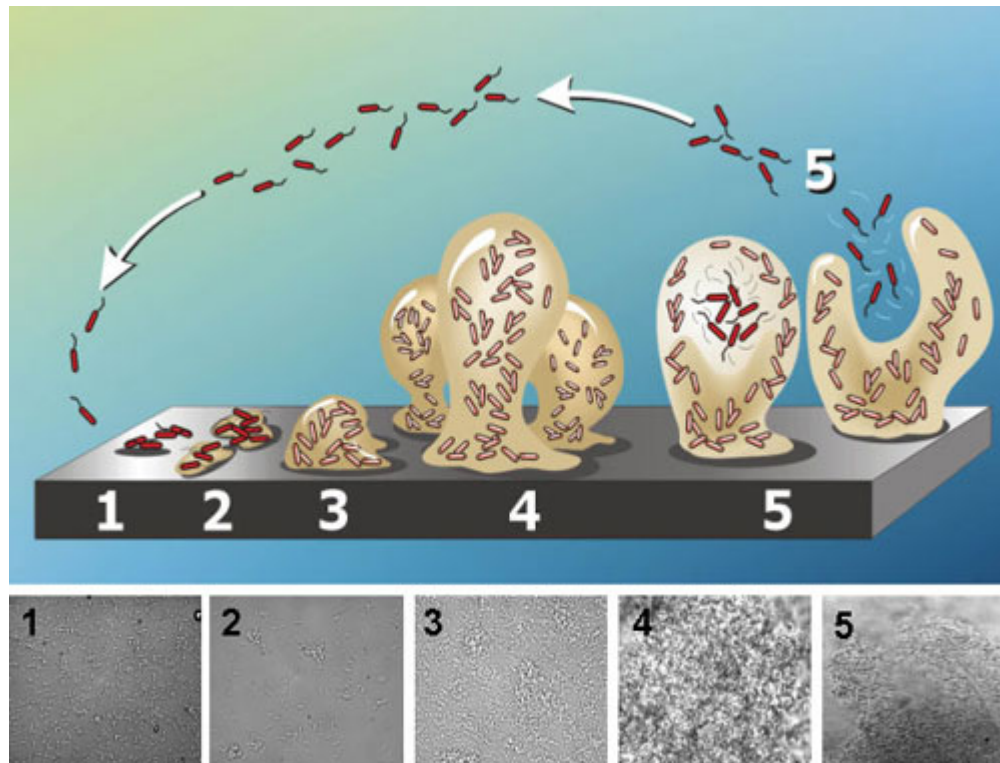


Figura 1 . Formación del biofilm en la superficie metálica.

Fuente: www.primary-plus.com/.../2009/12/biofilm.jpg

Las reacciones que ocurren entre los metabolitos microbianos y la superficie metálica, tiene lugar por debajo de la biopelícula o dentro de su estructura. Por ello un factor clave para la modificación de las condiciones fisicoquímicas en la superficie metálica es la formación de la biopelícula. Para implementar medidas de prevención y control adecuadas en sistemas industriales, es necesario conocer el efecto de los biofilms sobre la reacción de corrosión. (Ferrari, 1995)

Un efecto de la presencia de biopelículas, es la modificación de la energía libre superficial en la interfase por la adsorción espontánea de películas macromoleculares que adecuan la superficie para una colonización posterior. El movimiento de las bacterias en un medio líquido se da por organelos de la célula o por corrientes del fluido, sin embargo, cerca de la superficie intervienen fuerzas de corto alcance como son fuerzas de hidrofobicidad, coulómbicas o van der Waals, capaces de retener a los microorganismos sobre la superficie en una etapa denominada adsorción reversible. (Potekhina, 1999). Las bacterias pueden fijarse tenazmente, y con cierta especificidad, mediante una red de fibras constituidas por polisacáridos de molécula ramificada. Las bacterias que se fijen permanentemente presentan el fenómeno denominado adherencia no específica. Los procesos de adherencia son el requisito previo necesario para las relaciones simbióticas entre micro y macroorganismos. La corrosión de los metales en ambientes naturales será función de las características propias del metal y de factores ambientales como la temperatura, velocidad y composición química del agua presente en el ecosistema.

En los procesos de corrosión, la formación de biopelículas tiene dos facetas diametralmente opuestas; por una parte se ha formulado la teoría de la formación de celdas de aireación diferencial provocadas por la adherencia de la biopelícula en la superficie metálica creando zonas anódicas bajo la biomasa y zonas catódicas alrededor de la misma. La otra faceta de la biopelícula es servir como protección a la superficie metálica evitando la difusión de componentes agresivos o cambiando la naturaleza de dichos componentes convirtiéndolos en elementos pasivos.

El establecimiento de una población microbiana es capaz de generar cambios en la superficie del metal modificando con esto los procesos que ahí ocurren. Como se ha mencionado anteriormente, los microorganismos alcanzan una superficie; se adhieren a ella, se adaptan, crecen y forman conglomerados que provocan una anomalía en la superficie.

Los microorganismos, en su ambiente, forman consorcios microbianos o comunidades mixtas en el espesor de las películas que producen efectos sinérgicos incapaces de ser

originados por especies de forma aislada, la coexistencia de especies aeróbica y anaeróbicas sobre superficies de acero al carbono, permite que bacterias capaces de reducir los compuestos férricos a ferrosos produzcan la disolución de capas pasivantes del hierro constituidas predominantemente por óxidos e hidróxidos férricos. De esta manera se facilita el acceso a la superficie metálica de los sulfuros y otros productos corrosivos generados por bacterias reductoras de sulfato que conforman consorcios microbianos en el espesor de la biopelícula.

El impacto de los metabolitos excretados por los microorganismos sobre la reacción de corrosión se ve intensificado en las zonas de contacto entre los microbios y la superficie metálica. Por ejemplo, en aleaciones de aluminio de uso aeronáutico, los metabolitos ácidos de los contaminantes fúngicos de turbo- combustibles, ocasionan ataques corrosivos localizados en el lugar de fijación del micelio a la superficie metálica.

Métodos de evaluación de la corrosión microbiológica

Existen distintos métodos que permiten medir la velocidad de corrosión, entre los más utilizados está el de medida de la pérdida de masa; este método consiste en determinar la pérdida de masa que ha experimentado un metal o una aleación en contacto con un medio corrosivo, la pérdida de peso se mide en miligramos decímetro cuadrado día (mdd), milímetros por año ($\text{mm}\cdot\text{año}^{-1}$), o pulgadas por año o milipulgadas por año. Este método es utilizado para casos de corrosión generalizada o uniforme. En los últimos años se han utilizado diversas técnicas electroquímicas en el estudio de la biocorrosión; entre las más utilizadas están el monitoreo del potencial de corrosión, la polarización cíclica, la impedancia electroquímica y las curvas de polarización.

Curvas de Tafel

La técnica de extrapolación de Tafel tiene fundamento en la aplicación de curva de polarización de tipo potencioestática para obtener velocidades de corrosión de un metal sumergido en una solución; la polarización se considera de alto campo, ya que se aplican sobrepotenciales de 250 a 300 mV tanto en sentido anódico como en catódico. La extrapolación de las rectas de Tafel correspondientes a una reacción de corrosión, permite determinar la densidad de corriente de corrosión (i_{corr}) en el potencial $E = E_{\text{corr}}$.

Las rectas anódicas y catódicas están descritas por la ecuación de Tafel:

$$\eta_a = a + b \log i$$

$$\eta_c = a - b \log i$$

Donde b es la pendiente de Tafel, en una representación gráfica de η contra $\log i$, el lugar geométrico obtenido es una recta; a y b son constantes; η_a y η_c representan la diferencia de potencial anódico y catódico a una corriente i , respectivamente. Las pendientes de Tafel anódicas y catódicas, en la Figura 2 se observa como las pendientes de Tafel se pueden determinar de las ramas anódicas y catódicas.

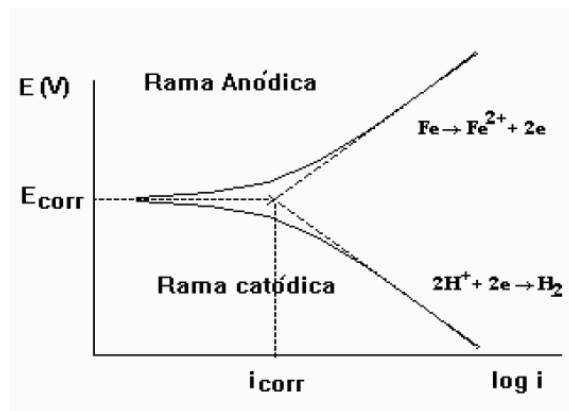


Figura 2. Pendientes anódica y catódica

Las pendientes de Tafel anódica y catódica, pueden determinarse de las ramas anódicas y catódicas de la representación gráfica η vs $\log i$, que por lo general se expresan en unidades de mV/década. La ecuación de Tafel es una aproximación de la ecuación general de una reacción electroquímica controlada por el proceso de transferencia de carga. Las curvas de polarización pueden obtenerse en el estado estacionario, en condiciones galvanostáticas o potencioestáticas, polarizando el electrodo hasta potenciales η mayores de RT/F .

La velocidad de corrosión puede calcularse de acuerdo con la Ley de Faraday:

$$M = \frac{Mit}{nF}$$

Donde:

t: tiempo de reacción

M: masa del material depositado o corroido

F: constante de Faraday

i: cantidad de corriente

n: cambio de valencia en la reacción electroquímica

Calculando la velocidad de corrosión en milipulgadas por año se tiene:

$$V_{corr}(cm \cdot s^{-1}) = \frac{iEm}{AdF}$$

i/A : densidad de corriente (i_{corr} , $mA \cdot cm^{-2}$)

d: densidad, $g \cdot cc^{-1}$

E_m : peso equivalente

La densidad de corriente se obtiene de la curva de medición potencioestática al potencial 0.

Prevención y control de la corrosión microbiológica

Una de las mejores formas para prevenir y controlar la corrosión es mantener el sistema limpio, sin embargo, esto a veces no es posible más que al inicio del funcionamiento, por ello es importante considerar algunos aspectos para prevenir la biocorrosión (Ferrari y Videla, 1995):

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

En los sistemas de agua potable se utiliza el cloro como biocida, sin embargo, los iones de este elemento pueden favorecer fenómenos de corrosión. La aplicación de cloro se hace en el agua, por lo que los microorganismos que no están en contacto con el líquido pueden seguir activos y generar biodeterioro.

Importancia económica de la corrosión microbiológica

En varios estudios, los costos de la corrosión se separan en dos partes: los costos debidos al control del fenómeno y los costos que genera la investigación sobre el tema. El primer rubro participa del 10 al 40 por ciento del costo total; en conjunto el impacto de la corrosión en los sectores económicos fue de 137.9 billones por año; en la tabla 1 se muestra, de acuerdo con Roberge, la información de los costos totales y por sector en los Estados Unidos.

Tabla 1. Costos de corrosión estimados por sector en EUA.

Categoría	Sector Industrial	Billones \$	Porcentaje %
Infraestructura	Puentes	8.3	37
	Tuberías	7	27
	Puertos	0.3	1
	Almacenes de residuos peligrosos	7	31
	Aeropuertos		
	Vías		
	Subtotal	22.6	100
Servicios	Distribución de gas	5	10
	Agua potable y alcantarillado	36	75
	Electricidad	6.9	14
	Telecomunicaciones		
	Subtotal	47.9	100
Transporte	Vehículos	23.4	79
	Buques	2.7	9
	Aeronaves	2.2	7
	Ferrocarriles	0.5	2
	Transportes de material peligroso	0.9	3
	Subtotal	29.7	100
Producción y manufactura	Exploración y producción de gas y petróleo	1.4	8
	Extracción	0.1	1
	Refinería	3.7	21
	Química, Petroquímica y farmacéutica	1.7	10
	Papelera	6	34
	Agrícola	1.1	6
	Procesamiento de comida	2.1	12
	Electrónica		
	Hogar	1.5	9
	Subtotal	17.6	100
Gobierno	Defensa	20	99.5
	Nuclear	0.1	0.5
	Subtotal	20.1	100
	Total	137.9	

Fuente: Roberge, 2008

La importancia económica de la corrosión microbiológica es grande, se estima que alrededor del 10% de los casos de corrosión son de este tipo. En estructuras enterradas el porcentaje se incrementa hasta el 50%. El hierro, acero, aluminio y sus aleaciones, cobre,

zinc, plomo y sus aleaciones; son altamente susceptibles de ser atacados por microorganismos; asimismo en materiales no metálicos como hormigón, caucho y polímeros.

El primer reporte sobre corrosión microbiológica fue publicado por Garret, quien encontró que la corrosión en cables enterrados se atribuía a la acción del amonio, nitritos y nitratos generados por bacterias; a finales del siglo XIX se sugirió que las bacterias intervenían en procesos de corrosión. En 1895 Beijerinck descubrió la existencia de bacterias sulfato-reductoras, posteriormente Gaines discutió la posibilidad de que este tipo de bacterias podían corroer el hierro. Asimismo, en 1934 Von Wolzogen Kühn y Van der Vlugt resaltaron la intervención de las bacterias sulfato-reductoras en procesos de corrosión de metales ferrosos.

El costo de la corrosión microbiológica es muy significativo, estimaciones realizadas en Estados Unidos y en el Reino Unido; Iverson, reportó que el costo anual de la corrosión microbiológica en tuberías enterradas en Estados Unidos fue de entre \$500 y \$2000 millones de dólares. Por otra parte Booth reportó que el 50% de la corrosión de las tuberías enterradas se debe a la acción de microorganismos.

Clasificación de microorganismos que participan en fenómenos de corrosión

Existe una gran cantidad de microorganismos que participan en fenómenos de corrosión, entre los microorganismos que habitualmente se encuentran ligados a estos procesos se encuentran las algas, los hongos y las bacterias (Potekhitina, 1999). En la tabla 2 se presentan las condiciones de temperatura y pH necesarias para el desarrollo de las especies más representativas de cada grupo:

Tabla 2. Condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de microorganismos corrosivos.

Tipo de Microorganismo	Ejemplo	Intervalo de temperatura (°C)	Intervalo de pH
Algas			
Verdes	<i>Chlorella</i>	30 - 35	5.5 - 9.0
Verde-azuladas	<i>Anneystis</i>	35 - 40	6.0 - 9.0
Diatomeas	<i>Diatomea</i>	18 - 36	5.5 - 9.0
Hongos			
Filamentosos	<i>Penicillium</i>	0 - 38	2.0 - 8.0
Levaduras	<i>Saccharomyces</i>	0 - 38	2.0 - 8.0
Basidiomicelos	<i>Peniophom</i>	0 - 38	2.0 - 8.0
Bacterias			
Aeróbicas no esporuladas	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	20 - 40	4.0 - 8.0
Aeróbicas esporuladas			
Aeróbicas oxidantes del azufre	<i>Bacillus subtilis</i>	20 - 40	5.0 - 8.0
Aeróbicas oxidantes del hierro	<i>Thiobacillus thio-oxidans</i>	20 - 40	0.5 - 6.0
Aeróbicas reductoras del azufre	<i>Gallionella</i>	20 - 40	7.4 - 9.5
	<i>Desulfovibria</i>	20 - 40	4.0 - 8.0

Fuente: Otero, 2001.

La actividad fotosintética de las algas propicia el aporte de O₂ al medio, lo que facilita la despolarización de la reacción catódica en procesos de corrosión en las que participa este elemento como reactivo catódico.

Los hongos tienen actividad fundamentalmente en presencia de hidrocarburos de cadenas lineales de 10 a 18 átomos de carbono, los cuales sirven de nutriente a los microorganismos. A través de su metabolismo las cadenas hidrocarbonadas se degradan a ácidos grasos que favorecen un descenso del pH hasta valores entre 2 y 4 en la fase acuosa, la acidez local y las condiciones oxidantes generadas por los microorganismos facilitan el ataque local originándose picaduras que progresan con gran rapidez.

Las bacterias provocan ataques que una vez iniciados son difícil controlarlos aunque se produzca la muerte de la colonia, esto debido a que el proceso corrosivo continuaría por

el funcionamiento de pilas de aireación diferencial y la presencia de bacterias sulfatorreductoras que facilitan el mantenimiento de estas pilas. Las ferrobacterias provocan habitualmente daños en instalaciones de acero al carbono o acero inoxidable martensítico en contacto con el agua, por ejemplo en cañerías, presas para la producción hidroeléctrica y depósitos. Este tipo de microorganismos son los más comunes y representan el mayor peligro para procesos de corrosión microbiológica; esto debido a su tamaño y rapidez en la reproducción.

Corrosión microbiológica causada por *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

Los géneros *Penicillium* sp. Link ex Gray y *Aspergillus* sp. Micheli, son hongos mitospóricos de la familia Trichocomaceae, División: Ascomycota, Orden: Eurotiales (Samson & Pitt, 2000). Las especies de estos géneros son saprobias ubicuas y sus conidios se distribuyen fácilmente a través de la atmósfera (Raper & Fenell, 1977; Pitt, 1979; Domsch *et al.*, 1993).

El género *Aspergillus* sp., suele presentarse con mayor frecuencia en regiones cálidas, mientras que el género *Penicillium* sp., se encuentra con mayor frecuencia en zonas templadas. (Domsch *et al.*, 1993). Estos géneros han sido muy estudiados debido a:

- 1) Su distribución, ya que son cosmopolitas
- 2) Su ubicuidad, se presentan en diferentes tipos de sustratos y ambientes
- 3) Su importancia industrial, ya que producen metabolitos secundarios de relevancia económica
- 4) Su importancia médica, debido a las especies toxígenas y patógenas oportunistas
- 5) La facilidad de manejo en condiciones de laboratorio
- 6) Su participación en fenómenos de corrosión localizada, ya sea inhibiendo o acelerando el proceso.

Género *Penicillium* sp.

El género *Penicillium* sp. contiene especies de amplia distribución, sus conidios se encuentran en el aire o en cualquier tipo de suelo, las especies presentan un conidióforo constituido por un pedicelo y un cepillo o peine (penicilios) con un patrón de ramificaciones diverso. Pueden ser monoverticilados, biverticilados, triverticilados, cuadriverticilados o poliverticilados, donde se incluyen estructuras tales como ramas, ramillas, métulas, fiálides y conidios. Es quizá el género más ubicuo de todos, con gran cantidad de especies, la mayoría de las cuales son saprobias, algunas patógenas de importancia médica y otras de importancia industrial o económica (Pitt, 1979). Entre las especies más comunes están: *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. janthinellum*, *P. notatum*, *P. viridicatum* y *P. purpurogenum* (Patterson & Mc Ginnis, 2007). *P. chrysogenum* y *P. notatum* son utilizadas para la producción de antibióticos.

En promedio, los hongos del género *Penicillium* sp., pueden representar hasta el 35% de la microbiota del suelo, donde la diversidad generalmente alcanza más de 75 especies por gramo de tierra (Christensen, 1981, 1989).

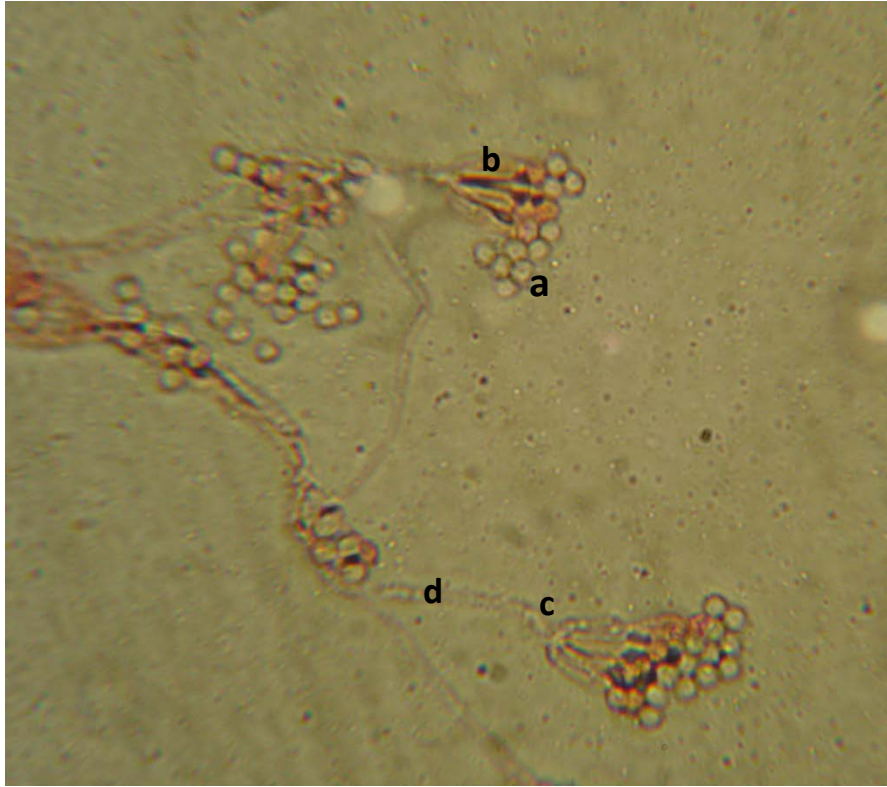


Figura 3. Estructuras características del género *Penicillium*. Conidio (a), fiálides (b), métula (c) y rama (d).

Género *Aspergillus* sp.

El género *Aspergillus* sp., se caracteriza por presentar un conidióforo con célula pie que termina en una cabezuela conidial, constituida por una vesícula cubierta parcial o totalmente por una o dos series de células, la uniseriada únicamente presenta fiálides, y la biseriada presenta métulas y fiálides. Los conidios pueden formar cadenas largas. Este género representa uno de los hongos más ubicuos, con distribución cosmopolita y con gran cantidad de especies saprobias, algunas parásitas y otras son toxígenas (Raper & Fennell, 1977).

Entre los géneros de hongos filamentosos, *Aspergillus* sp., es el que se ha aislado con más frecuencia de infecciones invasivas; alrededor de 20 especies, de un total de 185, han sido

registradas como agente causal de infecciones oportunistas en el hombre conocidas como aspergilosis, y ocupa el segundo lugar como agente causal de micosis, después del género *Candida*. Las especies *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* son las más conocidas como patógenas; *A. clavatus*, *A. flavipes*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. ustus* y *A. versicolor* incluyen algunas patógenas oportunistas (de Hoog & Guarro, 1995; Patterson & McGinnis, 2007) y junto con las anteriores, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* y *A. giganteus* entre otras, son productoras de micotoxinas.



Figura 4. Estructuras características del género *Aspergillus*. Conidio (a), cabeza conidial (b), conidióforo(c) y vesícula (d).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Micología de la carrera de Ingeniería Agrícola y en el Centro de Asimilación Tecnológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Las muestras de suelo utilizadas provienen del municipio de Ahuazotepec, Puebla.

Toma de muestras de suelo

Las muestras de suelo se colectaron en el municipio de Ahuazotepec, Puebla; cuyas coordenadas geográficas son: 20°00'06" – 20°07'06" de latitud norte y 98°03'42", 98°10'24" de longitud oeste.



Figura 5. Zona de toma de muestras de suelo

Se colectaron tres muestras tomando suelo del área en contacto con la tubería de acero 1010 de 6 pulgadas. Esta tubería forma parte de la red de distribución principal de agua potable del municipio de Ahuazotepec.

Preparación de muestras

Las muestras del suelo se extendieron sobre papel en una superficie plana, rompiendo los agregados grandes de forma manual para facilitar el secado, que se hizo al aire libre. Las muestras se molieron con un mazo de madera y se pasaron a través de un tamiz de 2mm. (Valencia y Hernández, 2002).



Figura 6. Preparación de muestras de suelo en contacto con tubería.

Dilución de suelo serial

La técnica de dilución serial o del número más probable permite calcular la densidad microbiana sin una enumeración directa, el crecimiento de los organismos empieza después de la inoculación de volúmenes conocidos en series de diluciones decimales de suelo en medio de cultivo nutritivo, es importante que el inóculo contenga una o más células. Enseguida se mencionan los pasos de la dilución en serie de acuerdo con Maya (2009).

1. Pesar 1g de suelo y se agrega a un tubo de ensayo que contenga 10 ml de agua destilada estéril.
2. Agitar manualmente durante 1 minuto aproximadamente, se toma una alícuota de 1 ml con una pipeta y se agrega a otro tubo de ensayo que contenga 9 ml de agua destilada estéril y se agita nuevamente durante 1 minuto.
3. Se repite la operación hasta llegar a la dilución deseada.

4. De cada dilución se toma una alícuota de 1 ml, la cual se siembra en las placas con medio de cultivo PDA y se distribuye uniformemente, se sella cada caja con parafilm y se incuban en posición invertida a una temperatura de 26°C durante 10 días.
5. Al transcurrir 10 días se realiza la identificación de las colonias presentes.
6. Se llevan a cabo las resiembras de las colonias para obtener cepas puras.

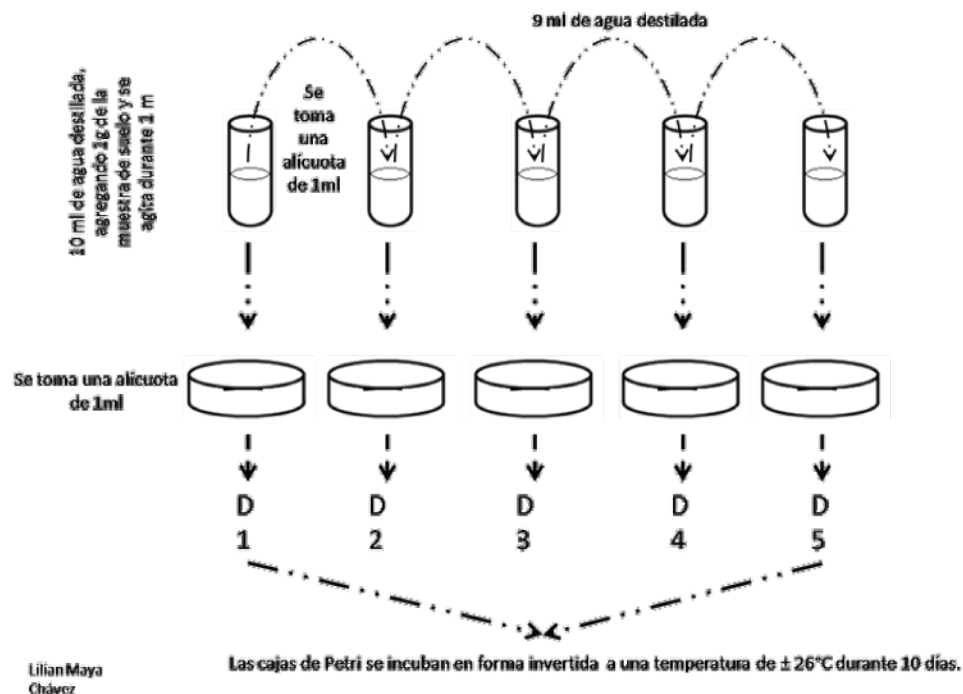


Figura 7. Dilución en serie modificada.

Fuente: Maya (2009)

En el presente trabajo se utilizaron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , para cada una de las muestras. Se inocularon cinco cajas de cada dilución para obtener la mayor cantidad de microorganismos presentes en el suelo que está en contacto con la tubería. En todas las diluciones y muestras se encontraron colonias diversas, tanto de hongos como de bacterias, para el estudio de corrosión microbiológica que se planteo en el trabajo, se aislaron únicamente colonias de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

Preparación de medios de cultivo

Los organismos requieren de sustancias nutritivas o nutrientes para sintetizar su material celular, generar energía y llevar a cabo su fisiología; los medios de cultivo son mezclas de agua, sustancias orgánicas e inorgánicas en cantidades variables que tratan de simular la composición química de las células y los nutrientes que requieren para su desarrollo. Los principales nutrientes son el hidrógeno, oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo y azufre en orden decreciente; además de algunos cationes de sales inorgánicas como el potasio, calcio, magnesio y hierro; y en requerimientos pequeños el manganeso, cobalto, cobre, molibdeno y zinc (Ramírez-Gama, *et al.* 2003). La mayoría de los medios de cultivo contienen un extracto de una fuente de carbohidratos y otros nutrientes como papa, harina de maíz, habas o extracto de malta y se les agrega agar para que solidifique y se favorezca el desarrollo de los microorganismos.

Los medios de cultivo pueden ser muy variados, por tanto, la selección de alguno dependerá del microorganismo que se desea aislar. El medio de cultivo utilizado fue Papa Dextrosa Agar (PDA) marca BD DIFCO. El PDA es una base para el cultivo de levaduras y mohos a partir de productos alimentarios y lácteos, cumple con las especificaciones USP/EP/JP.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo Papa - Dextrosa – Agar.

Composición por litro de PDA	
Almidón de papa (infusión)	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g
El pH final es de 5.6 ±0.2	

El medio de cultivo se preparó en matraces Erlenmeyer de un litro, colocando 39g de PDA en un litro de agua destilada, posteriormente se esterilizaron en autoclave a 120°C y a 15

libras de presión durante 20 minutos; al enfriarse se vaciaron en cajas de petri en forma aséptica en un lugar libre de corrientes de aire y polvo.

Aislamiento de microorganismos

Para realizar un diagnóstico de los microorganismos presentes en el suelo o en tejidos vegetales, es necesario observarlos al microscopio, pero como se encuentran mezclados con una gran variedad de organismos o contaminantes es necesario aplicar diferentes métodos para aislar el o los microorganismos deseados a fin de llevar a cabo un estudio de sus características, hábitos, reproducción, entre otras. Para realizar el aislamiento es necesario llevar a cabo los procedimientos siguientes:

Los hongos constituyen gran parte de la masa microbiana total. Los hongos filamentosos poseen un micelio con hifas independientes, pueden ser septadas o no septadas; las hifas son vegetativas y fértiles, producen esporas sexuales o asexuales (Herrera, 1990).

En medios de cultivo el micelio es incoloro, pero las esporas asexuales están coloreadas notoriamente, su tamaño, forma de crecimiento y estructura en cultivos ayudan a conocer la ubicación taxonómica de manera relativamente fácil.

El aislamiento se hizo utilizando la dilución en suelo serial, de cada dilución se utilizó un mililitro el cual se colocó en una caja de petri con PDA, que después fue sellada con parafilm e incubada a 26°C durante 10 días. Una vez seleccionado el hongo deseado se realizaron cortes del medio de cultivo colonizado, estos cortes se colocaron en cajas de petri para obtener cepas puras. En las fotografías siguientes se presentan cepas puras de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

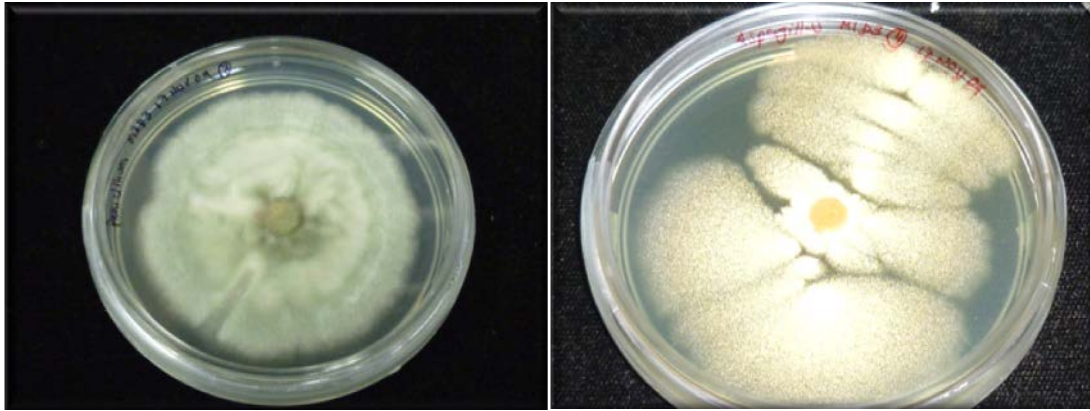


Figura 8. Colonias de *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

Obtención de cepas

Las cepas puras se obtuvieron después de hacer aislamientos sucesivos hasta lograr colonias de un solo hongo. En las figuras 8 y 9 se muestran colonias puras de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.



Figura 9. Cepas puras de *Aspergillus* sp.



Figura 10. Cepas puras de *Penicillium* sp.

Identificación

La identificación de los microorganismos se realizó mediante la observación al microscopio de preparaciones montadas mediante tinciones directas. En un portaobjetos se colocó una gota de colorante y se tomó una muestra de cada caja de petri fijando en cinta adhesiva una porción de la colonia deseada.

Los microorganismos tienen un protoplasma con índice de refracción cercano al agua, se requiere de tinciones biológicas para visualizar sus estructuras internas. Las tinciones se llevaron a cabo con colorantes, azul de algodón y rojo congo con el fin de obtener coloración en los microorganismos. Se realizaron tinciones simples que consisten en aplicar colorante para observar la morfología de los microorganismos.



Figura 11. Preparación de las tinciones

Identificación de estructuras

La identificación de los microorganismos se realizó mediante la técnica microscópica. En un microscopio Leica se colocó la preparación observándola con el objetivo de menor aumento y sucesivamente hasta llegar al aumento máximo o bien hasta donde se pudieron observar las estructuras buscadas.



Figura 12. Microscopios utilizados para la identificación de microorganismos

Las figuras 13 y 14 muestran las estructuras observadas en el microscopio, se identificaron hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

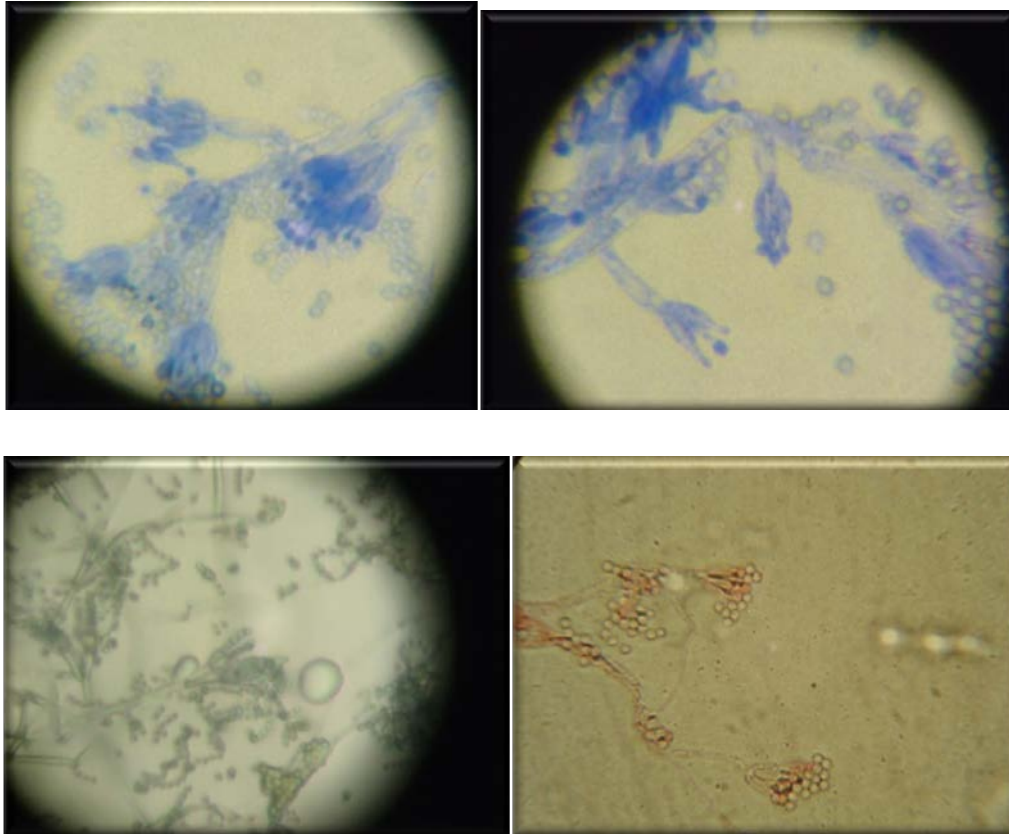


Figura 13. Género *Penicillium* sp.

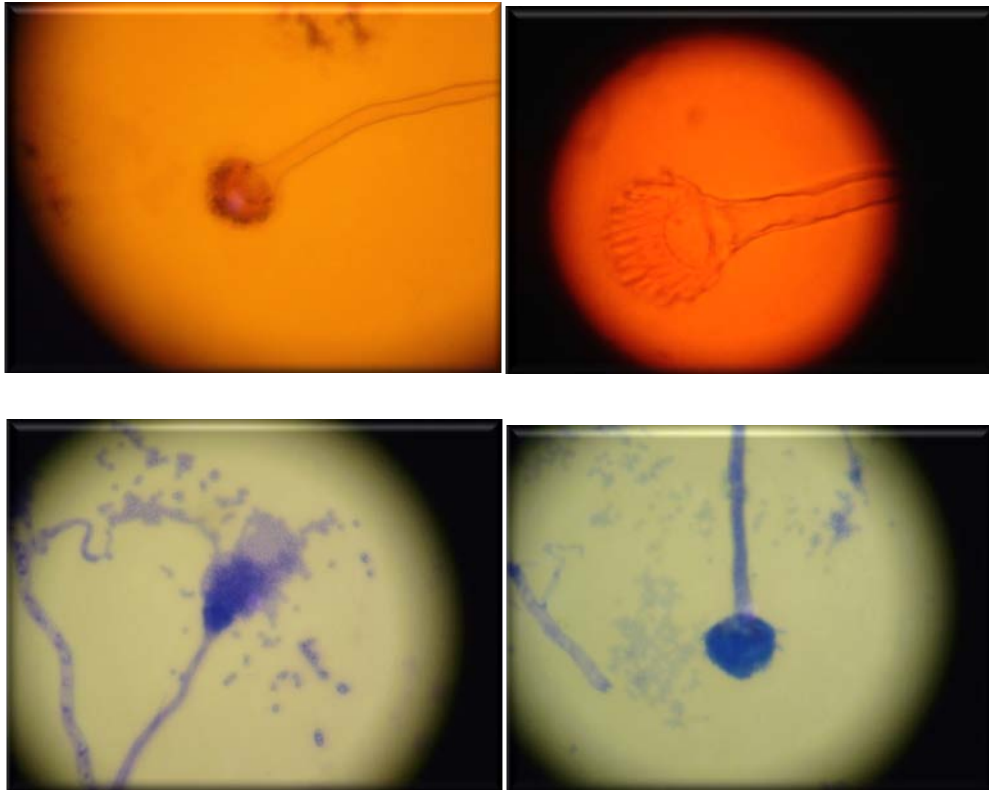


Figura 14. Género *Aspergillus* sp.

Propagación y mantenimiento de cepas

Las cepas se propagaron para utilizarlas en los tratamientos definidos; se mantuvieron en la incubadora a una temperatura de 26°C, en condiciones estériles.



Figura 15. Incubadora para mantenimiento de cepas puras

Material metálico

El material metálico utilizado fue acero 1010 de bajo carbono, rolado en caliente. Este material contiene 0.10% de contenido nominal de carbono, en la tabla 4, se mencionan sus propiedades mecánicas.

Tabla 4. Propiedades mecánicas del acero 1010

Nº SAE o AISI	1010
Resistencia a la tracción Rm	
Kgf/mm ²	40.0
Mpa	392.3
Límite de fluencia Re	
Kgf/mm ²	30.2
Mpa	292.2
Alargamiento en 50 mm (%)	39
Dureza Brinell	109

Selección de los microorganismos

Los microorganismos utilizados son *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., estos se seleccionaron por ser considerados dentro de los géneros de mayor abundancia en el suelo, por su distribución y fácil manejo en condiciones de laboratorio.

Diseño de Tratamientos

El experimento se realizó utilizando un diseño factorial de 3 x 8, con 3 repeticiones por tratamiento. Los factores estudiados fueron el microorganismo, con tres niveles, y el tiempo de exposición, con ocho niveles. Las unidades experimentales utilizadas fueron probetas cilíndricas de acero 1010. En la tabla 5 se muestra la descripción de cada tratamiento.

Tabla 5. Descripción de tratamientos

Tratamiento	Microorganismo	Tiempo de exposición (días)
1	PDA sin microorganismos	8
2	PDA sin microorganismos	16
3	PDA sin microorganismos	24
4	PDA sin microorganismos	32
5	PDA sin microorganismos	40
6	PDA sin microorganismos	48
7	PDA sin microorganismos	56
8	PDA sin microorganismos	64
9	<i>Penicillium</i> sp.	8
10	<i>Penicillium</i> sp.	16
11	<i>Penicillium</i> sp.	24
12	<i>Penicillium</i> sp.	32
13	<i>Penicillium</i> sp.	40
14	<i>Penicillium</i> sp.	48
15	<i>Penicillium</i> sp.	56
16	<i>Penicillium</i> sp.	64
17	<i>Aspergillus</i> sp.	8
18	<i>Aspergillus</i> sp.	16
19	<i>Aspergillus</i> sp.	24
20	<i>Aspergillus</i> sp.	32
21	<i>Aspergillus</i> sp.	40
22	<i>Aspergillus</i> sp.	48
23	<i>Aspergillus</i> sp.	56
24	<i>Aspergillus</i> sp.	64

Adicionalmente se colocó una probeta metálica en una caja de petri que contenía medio de cultivo inoculado previamente, con el objetivo de observar el efecto directo del microorganismo sobre el metal, considerando también tiempos de exposición desde ocho hasta 64 días.

Celdas de trabajo

La celda de trabajo consistió en un frasco de plástico de 500ml con 350 ml de medio de cultivo Papa – Dextrosa – Agar (PDA) estéril. El medio se dejó solidificar durante 24 horas para hacer las inoculaciones con *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., de acuerdo con el diseño de tratamientos.

Las celdas se dejaron incubando durante 10 días en forma invertida para favorecer el crecimiento de las colonias, una vez finalizado este período se colocaron 3 unidades experimentales en cada celda.



Figura 16. Celdas de trabajo

Preparación de unidades experimentales

Las unidades experimentales utilizadas son probetas de acero al carbón 1010, este metal es utilizado en sistemas de transporte de agua, gas y derivados del petróleo.

Las probetas, utilizadas como unidades experimentales, se fabricaron con acero 1010, de acuerdo con la norma ASTM F-746. Para la fabricación de cada probeta se utilizó un redondo de acero de media pulgada de espesor sobre el cual se realizó un desbaste de la sección longitudinal en un tomo horizontal hasta obtener el diámetro principal, se roscó uno de los extremos con un machuelo de 3 milímetros para unir la extensión que sirvió

para conectar el electrodo de trabajo. Cada probeta se limpió con arena a presión para eliminar la capa de óxido superficial y una vez limpias se identificaron con un número en la parte inferior.



Longitud: 2.0 cm

Diámetro de la base: 0.954 cm

Área total de exposición: 5.96 cm²

Densidad: 7.87 g·cm⁻³

Figura 17. Probetas de acero 1010

RESULTADOS

Las pruebas realizadas a las probetas de cada uno de los tratamientos fueron: determinación de pendientes de Tafel, pérdida de masa y observación microscópica de la superficie metálica en contacto con los microorganismos. Con estas pruebas fue posible determinar velocidad de corrosión, pérdida de masa y crecimiento del biofilm.

Determinación de las pendientes de Tafel y velocidad de corrosión

La determinación de las pendientes de Tafel se hizo con un potenciostato de la marca Gamry Instruments con los software Gamry Framework y ChemAnalysis.



Figura 18. a) Celda de trabajo, b) Disposición de los electrodos c) Vista de la pantalla de Gamry Framework

La velocidad de corrosión se determinó con ayuda del software Chemanalysis utilizando los datos de las pendientes de Tafel.

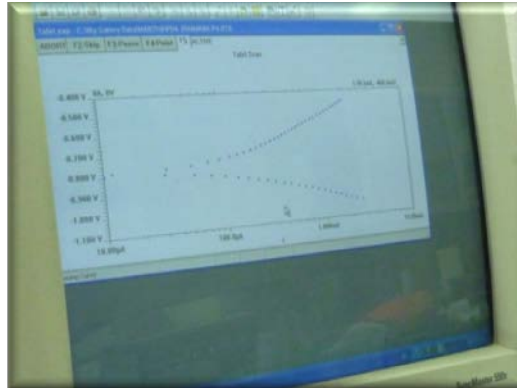


Figura 19. Generación de curvas Tafel

Curvas de Tafel por tratamiento

Las curvas de polarización de Tafel se obtuvieron para ejemplares de acero 1010 expuestos al contacto con PDA, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., en tiempos que variaron de ocho hasta sesenta y cuatro días, en el anexo 1 se presenta el total de datos. La figura 20 muestra una curva de Tafel para probetas en contacto con PDA durante ocho días; los datos indican un potencial de corrosión promedio de -867mV, mientras que la intensidad de corrosión promedio reportada fue de 145.4μA.

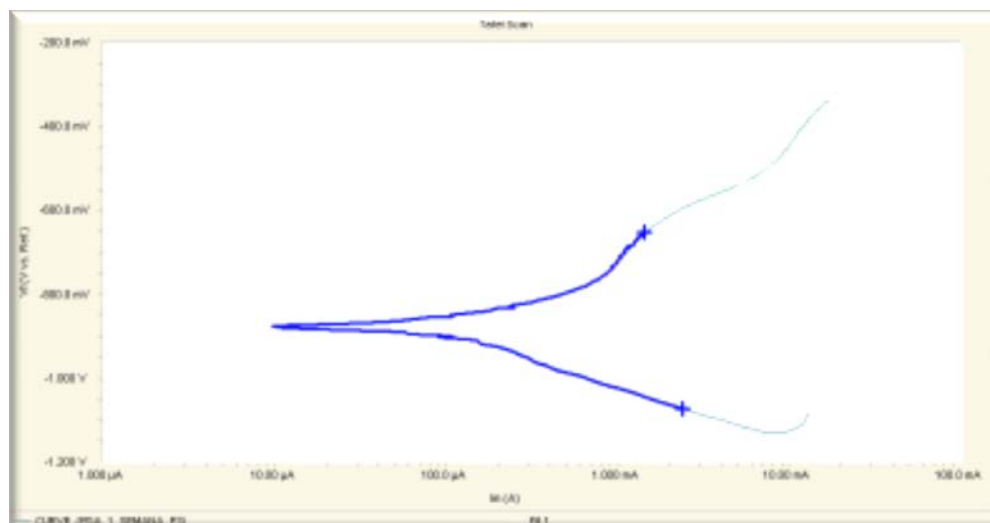


Figura 20. PDA sin microorganismos con 8 días de exposición.

El tratamiento 9, correspondiente a probetas expuestas a ocho días en contacto con *Penicillium* sp., presenta un potencial de corrosión promedio de -822.22 mV, y una intensidad de corrosión de 522.66 μ A, una curva de Tafel obtenida se muestra en la figura 21.

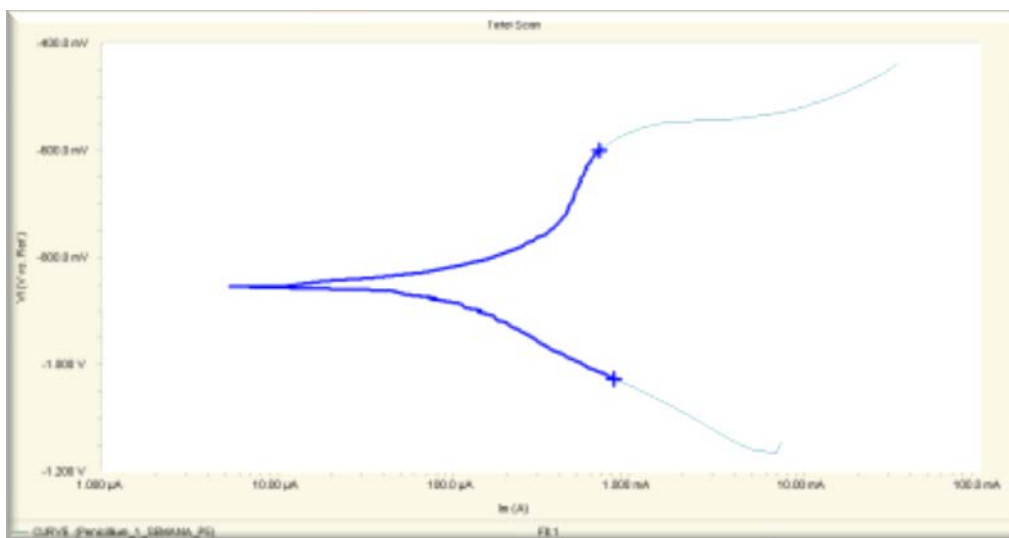


Figura 21. *Penicillium* sp. con 8 días de exposición.

En probetas que estuvieron en contacto con *Aspergillus* sp., durante ocho días; el potencial de corrosión reportado fue de -756.66 mV y la intensidad de corrosión promedio fue de 152.23 μ A, la figura 22 muestra una de las curvas de Tafel que permiten obtener dichos datos.

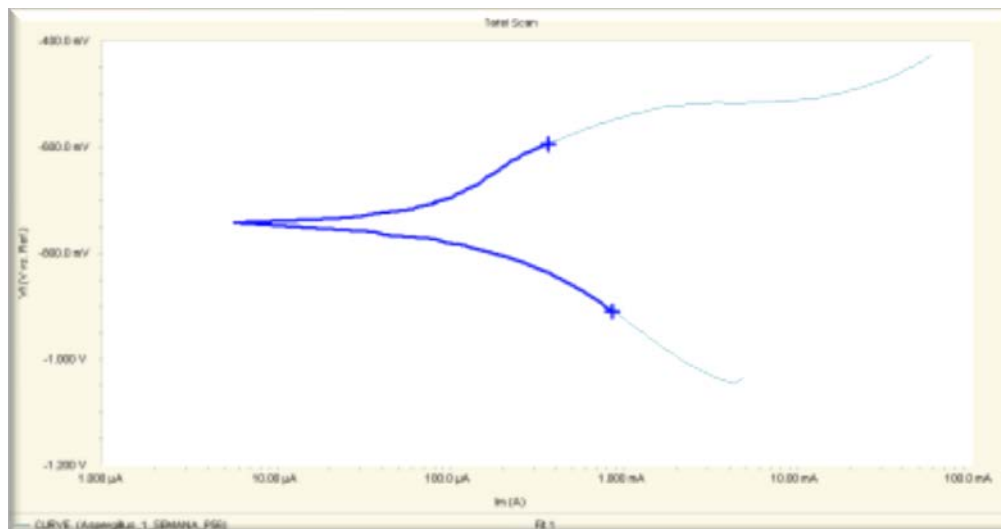


Figura 22. *Aspergillus* sp. con 8 días de exposición.

En probetas que estuvieron en contacto con PDA durante dieciséis días; el potencial de corrosión promedio reportado fue de -818.33 mV y la intensidad de corrosión promedio fue de 74.4 μA; la figura 23 muestra los resultados obtenidos para una probeta sometida a este tratamiento.

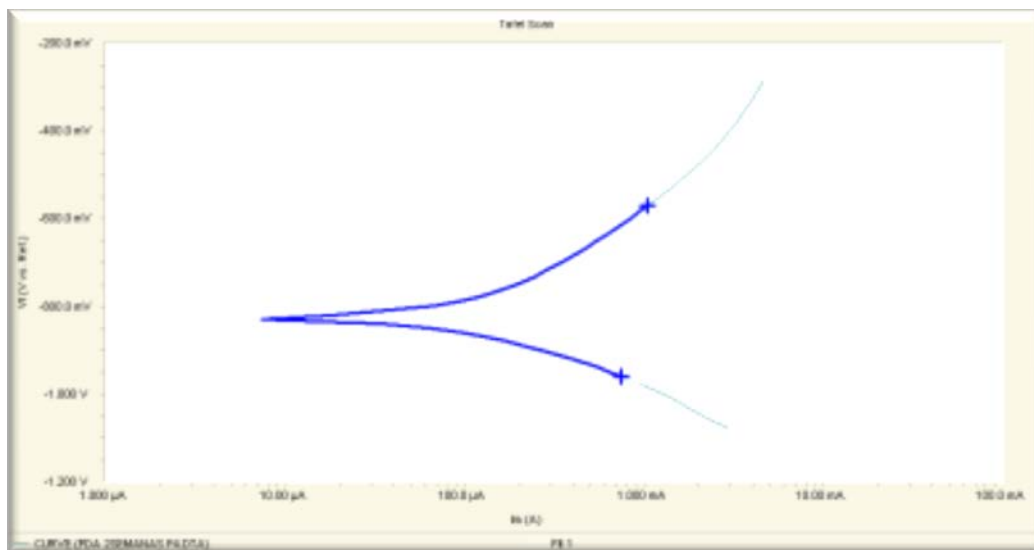


Figura 23. PDA sin microorganismos con 16 días de exposición.

Las probetas en contacto con *Penicillium* sp., durante 16 días tienen una intensidad de corrosión promedio de $142.22\mu\text{A}$, mientras que el potencial de corrosión fue de -799 mV . En la figura 24 se muestran una de las curvas de Tafel generadas por este tratamiento.

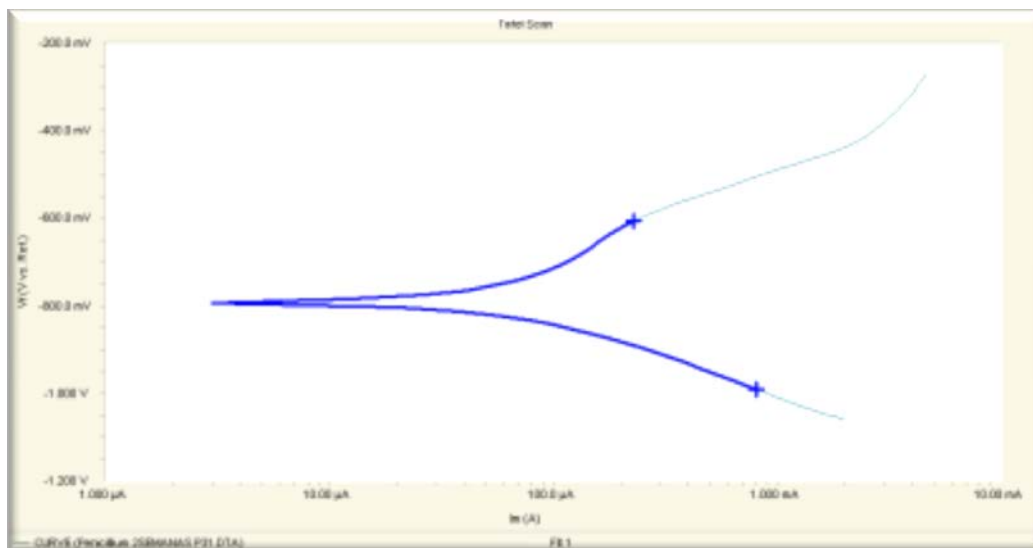


Figura 24. *Penicillium* sp., con 16 días de exposición

Las probetas en contacto con *Aspergillus* sp., durante 16 días tienen una intensidad de corrosión promedio de $59.5\mu\text{A}$, mientras que el potencial de corrosión fue de -748 mV . En la figura 25 se muestran las curvas generadas por una probeta.

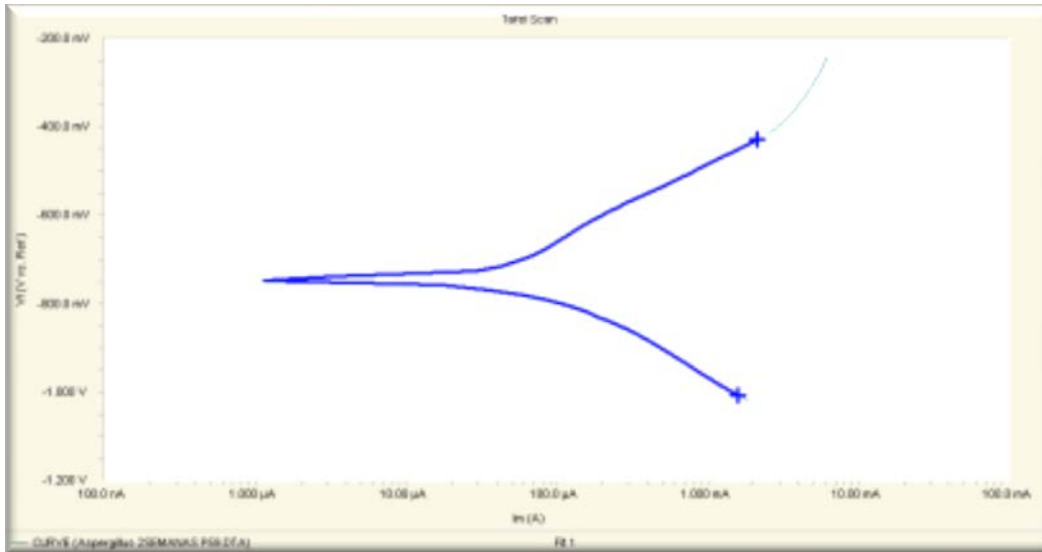


Figura 25. *Aspergillus* sp. con 16 días de exposición.

En la figura 26, se muestran las curvas de Tafel obtenidas en una probeta en contacto con PDA, durante 24 días. El potencial de corrosión promedio es de -611.33 mV, mientras que la intensidad de corrosión es de 127.33 μ A.

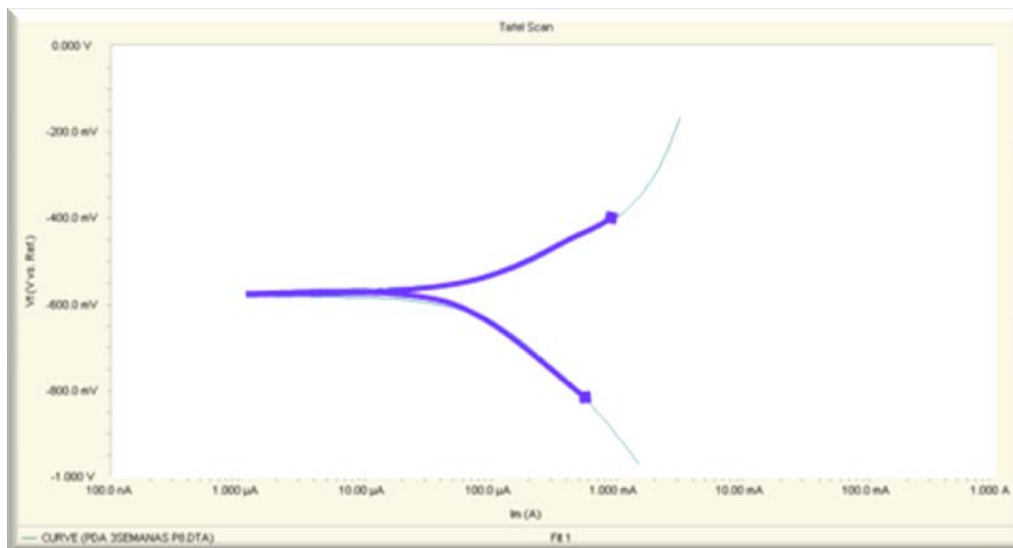


Figura 26. PDA sin microorganismos con 24 días de exposición.

El potencial de corrosión promedio en probetas expuestas al contacto con *Penicillium* sp. durante 24 días, fue de -732.22 mV; la intensidad de corrosión reportada fue de 112.9 μ A. Las curvas potencioestáticas de una probeta se muestran en la figura 27.

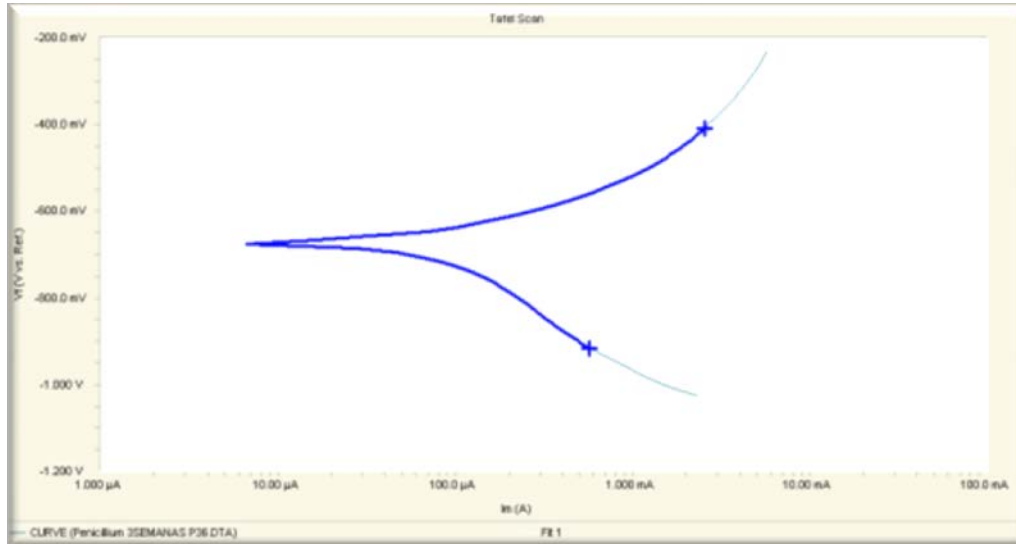


Figura 27. *Penicillium* sp. con 24 días de exposición.

En la figura 28 se presentan las curvas obtenidas para una probeta que estuvo en contacto con *Aspergillus* sp., la intensidad de corrosión reportada fue de 86 μ A, mientras que el potencial de corrosión fue de -680.33 mV.

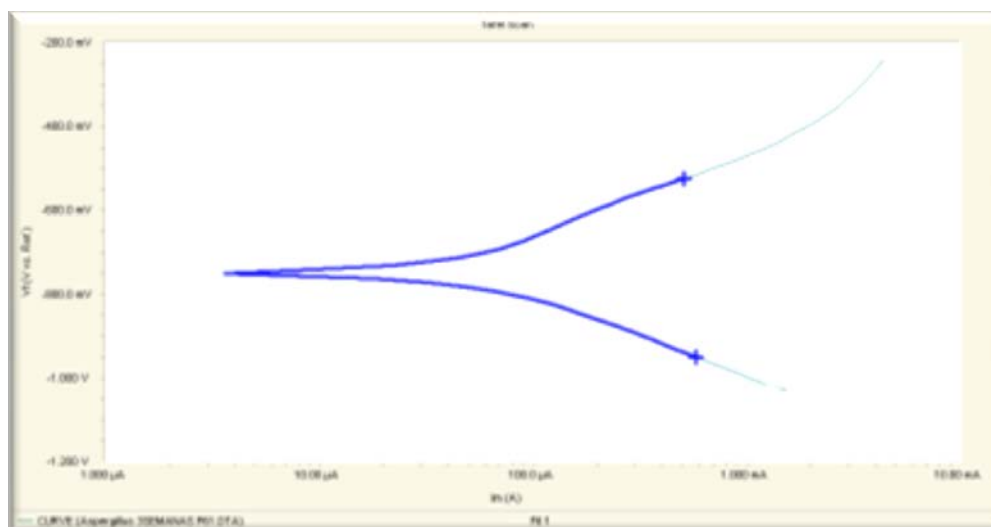


Figura 28. *Aspergillus* sp. con 24 días de exposición.

En probetas que estuvieron en contacto con PDA durante 32 días se obtuvieron potenciales de corrosión promedio de -738.66 mV e intensidades de corrosión de 65.43 μ A. En la figura 29 se muestran las curvas de Tafel obtenidas en una unidad experimental.

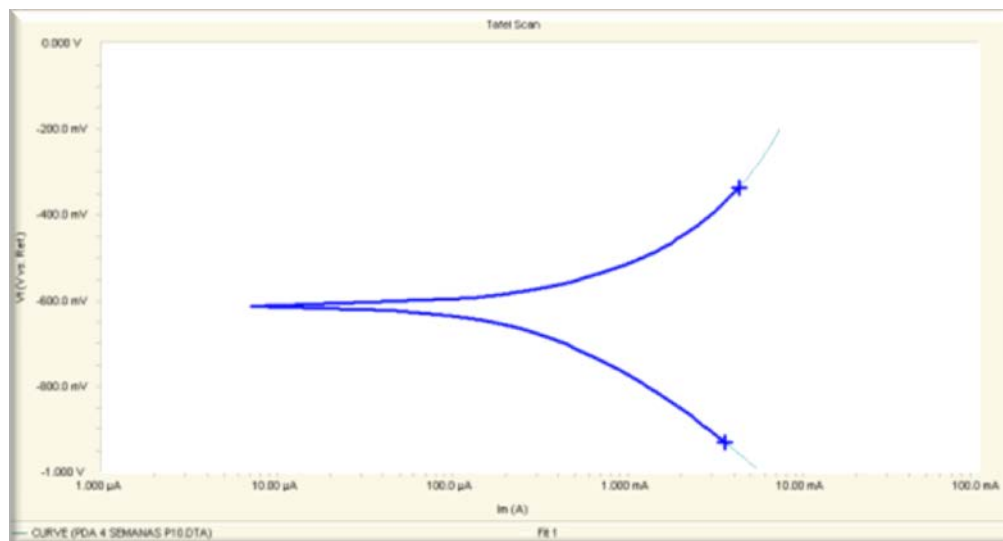


Figura 29. PDA sin microorganismos con 32 días de exposición.

En probetas expuestas al contacto con *Penicillium* sp., durante 32 días, se reportaron potenciales de corrosión promedio de -623mV en intensidades de corrosión de 255.67 μ A. En la figura 30 se muestran las curvas de Tafel obtenidas en una probeta de este tratamiento.

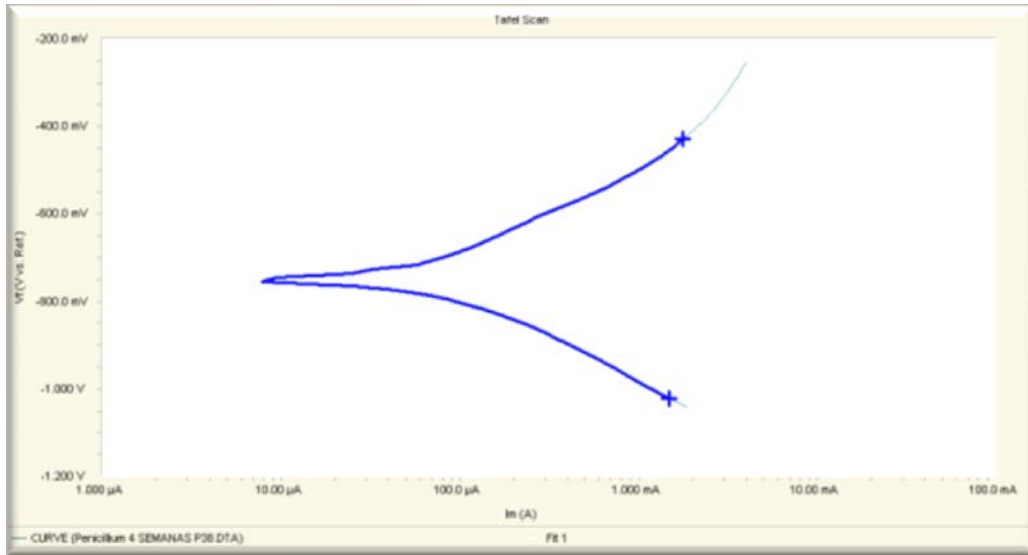


Figura 30. *Penicillium* sp. con 32 días de exposición.

En la figura 31, se muestran las curvas de tafel obtenidas para una probeta que estuvo expuesta al contacto con *Aspergillus* sp., durante 32 días. El potencial de corrosión promedio obtenido fue de -738.67mV, mientras que la intensidad de corrosión reportada fue de 65.43μA.

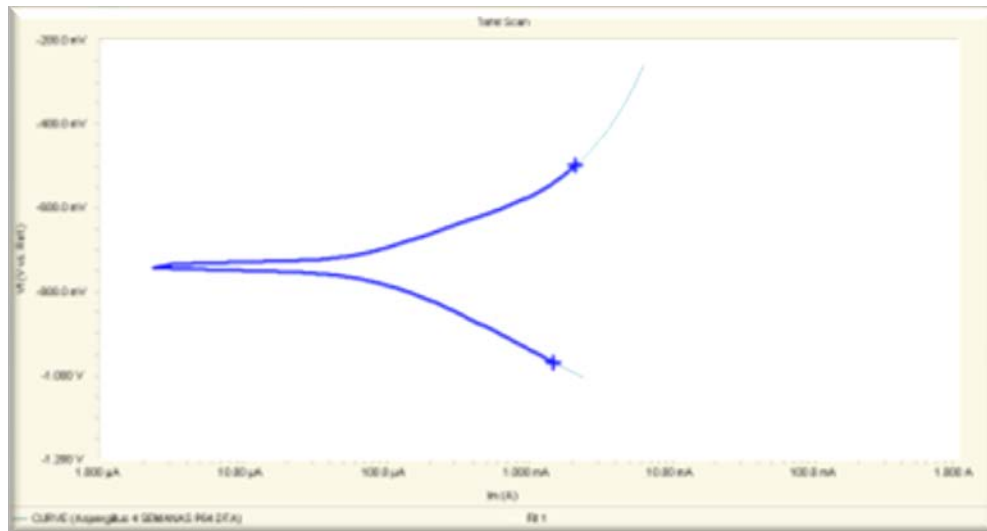


Figura 31. *Aspergillus* sp. con 32 días de exposición.

En la figura 32, se muestran las curvas de Tafel obtenidas en una probeta expuesta al contacto con PDA durante 40 días; la intensidad de corrosión reportada fue de $138.23 \mu\text{A}$, mientras que el potencial de corrosión obtenido fue de -790mV .

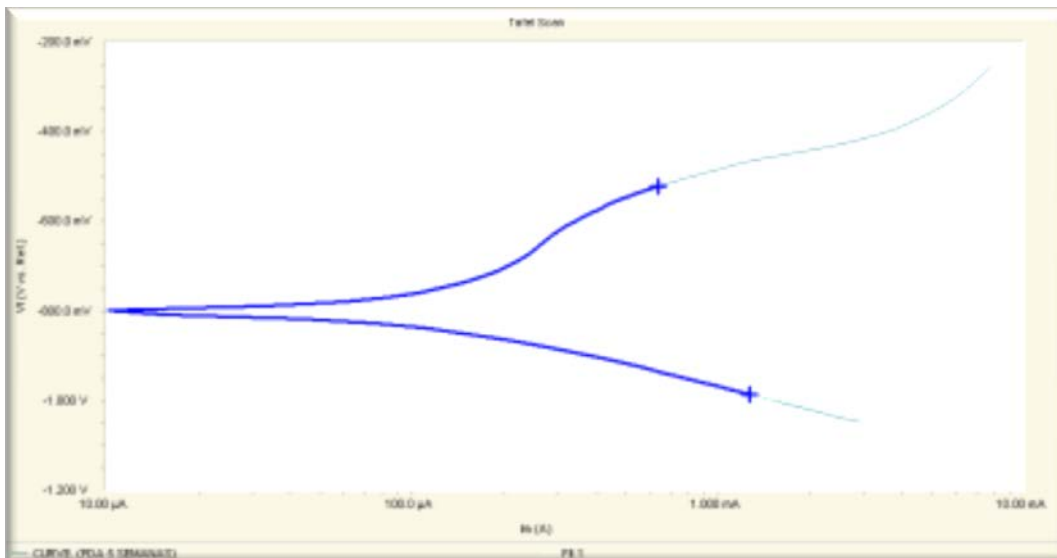


Figura 32. PDA sin microorganismos con 40 días de exposición.

Las probetas expuestas al contacto con *Penicillium sp.*, durante 40 días tienen un potencial de corrosión de -857.67 mV , y una intensidad de corrosión de $64.06 \mu\text{A}$; la figura 33 muestra las curvas generadas por una probeta de este tratamiento.

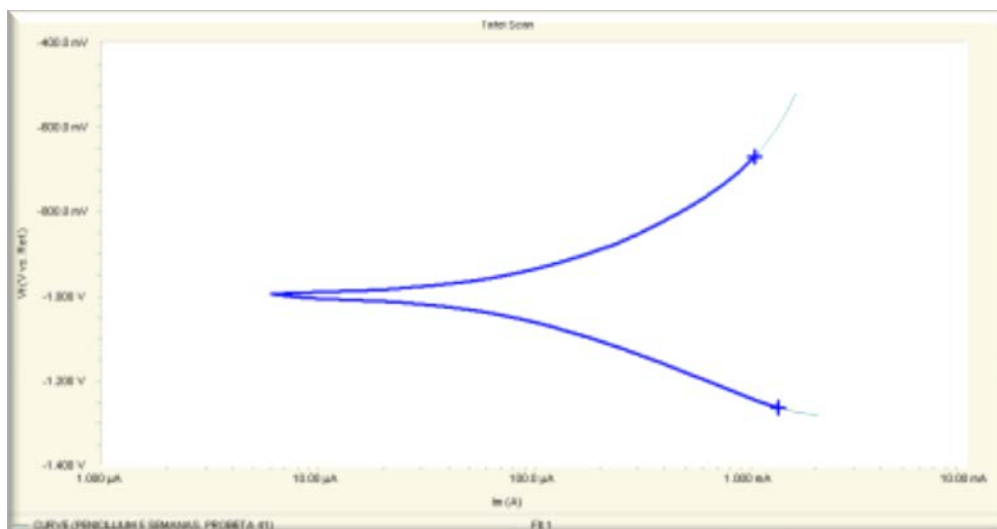


Figura 33. *Penicillium sp.* con 40 días de exposición.

En la figura 34 se muestran las curvas anódicas y catódicas generadas por una probeta expuesta al contacto con *Aspergillus* sp., durante 40 días. El potencial de corrosión promedio en este tratamiento fue de -786.33mV, y la intensidad de corrosión reportada fue de 47.46μA.

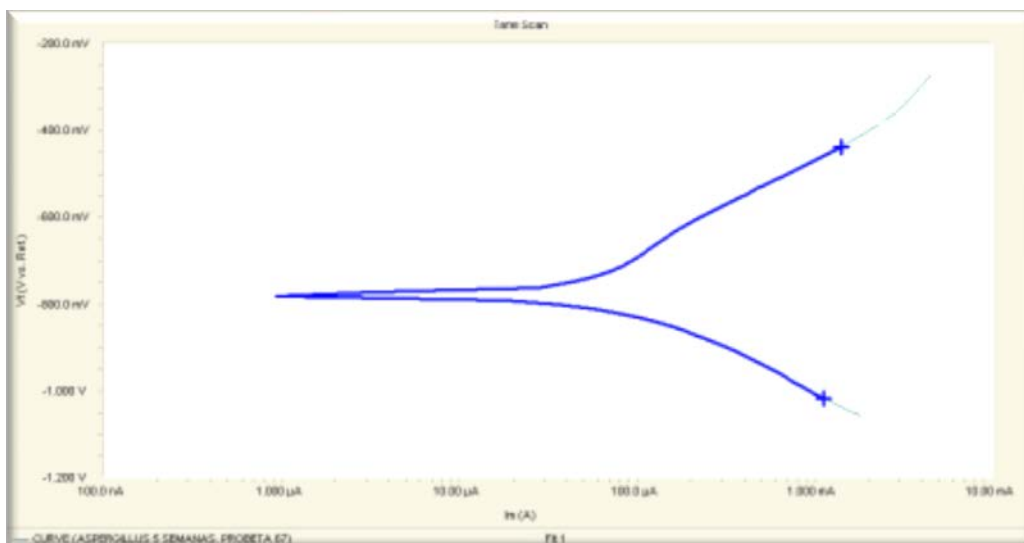


Figura 34. *Aspergillus* sp. con 40 días de exposición.

Las probetas expuestas al contacto con PDA durante 48 días generaron potenciales de corrosión promedio de -650.33mV e intensidades de corrosión de 195.67μA. Las curvas generadas por una probeta se muestran en la figura 35.

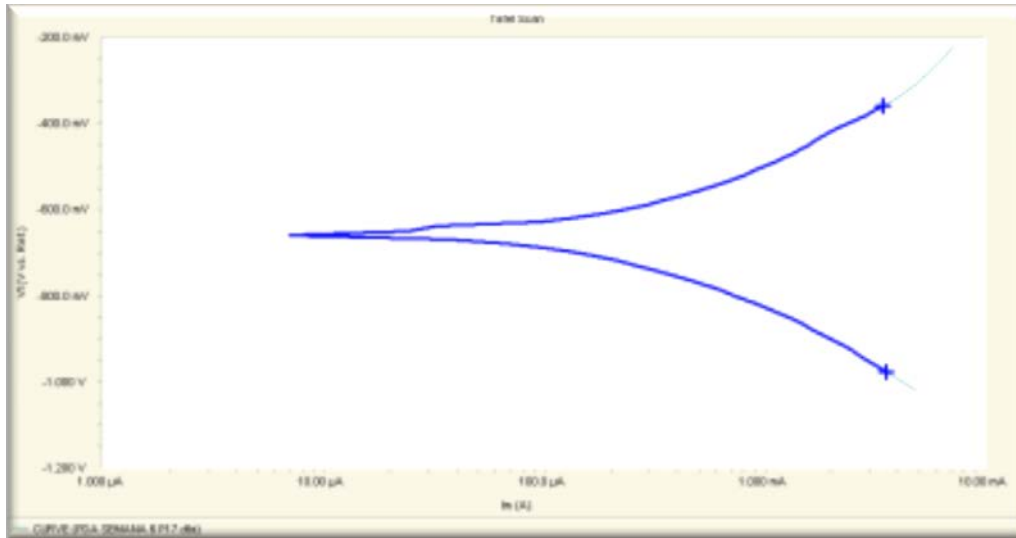


Figura 35. PDA sin microorganismos con 48 días de exposición.

En la figura 36, se muestran las curvas de Tafel para una de las probetas que estuvieron 48 días en contacto con *Penicillium sp.*, entre los datos generados se encuentran el potencial y la intensidad de corrosión, cuyos promedios fueron -779.67mV y $54.66\mu\text{A}$, respectivamente.

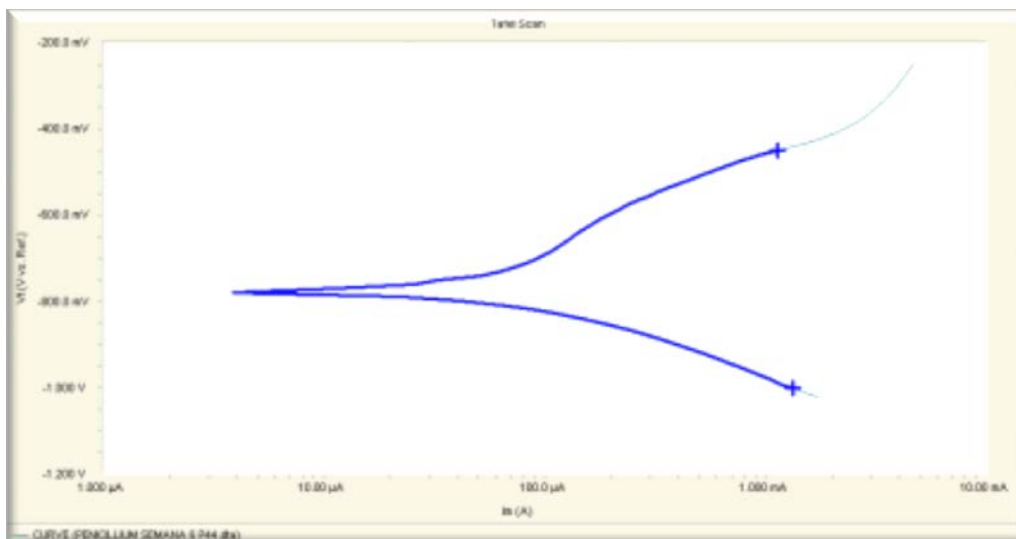


Figura 36. *Penicillium sp.* con 48 días de exposición.

En la figura 37 se muestran las curvas de Tafel para una probeta que estuvo en contacto con *Aspergillus* sp., durante 48 días. Este tratamiento tuvo potencial de corrosión promedio de -799.67 mV e intensidad de corrosión de 69.97 μ A.

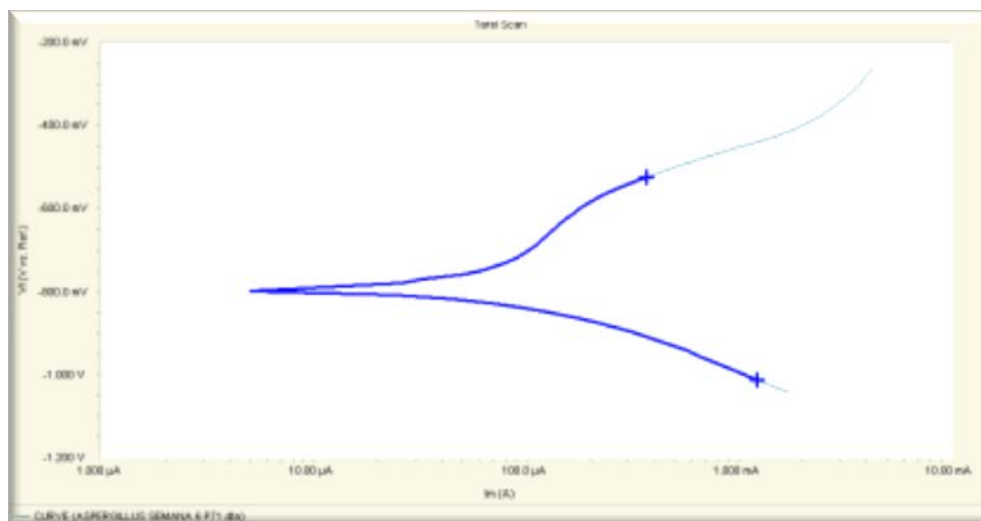


Figura 37. *Aspergillus* sp. con 48 días de exposición.

Las probetas expuestas al contacto con PDA durante 56 días tuvieron un potencial de corrosión promedio de -820.33mV y una intensidad de corrosión de 140.1 μ A. Las curvas anódicas y catódicas obtenidas en una de las probetas se presentan en la figura 38.

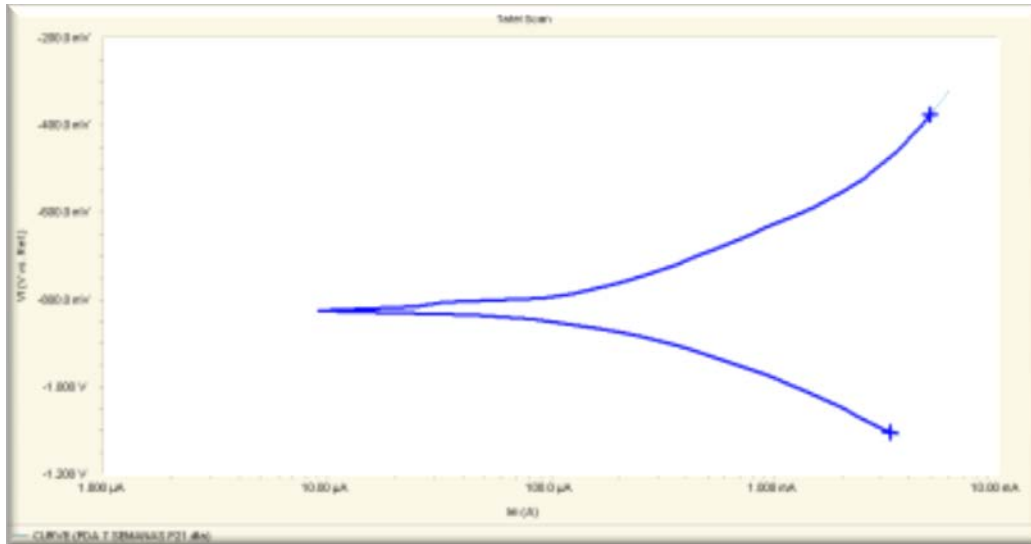


Figura 38. PDA sin microorganismos con 56 días de exposición.

En la figura 39 se muestran las curvas de Tafel para una de las probetas expuestas al contacto con *Penicillium* sp., durante 56 días. El potencial de corrosión promedio fue de -848.33mV, y la intensidad de corrosión fue de 150μA.

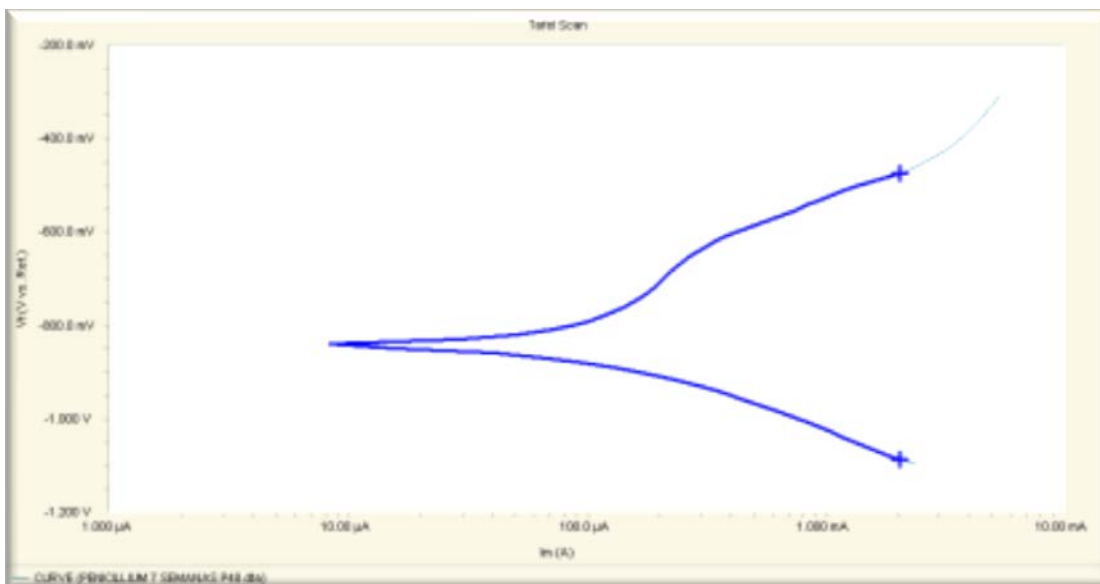


Figura 39. *Penicillium* sp. con 56 días de exposición.

Las probetas expuestas al contacto con *Aspergillus* sp., durante 56 días tuvieron potenciales de corrosión de -834.33mV e intensidades de corrosión de 215.33μA. Las curvas obtenidas en una de las unidades experimentales se presentan en la figura 40.

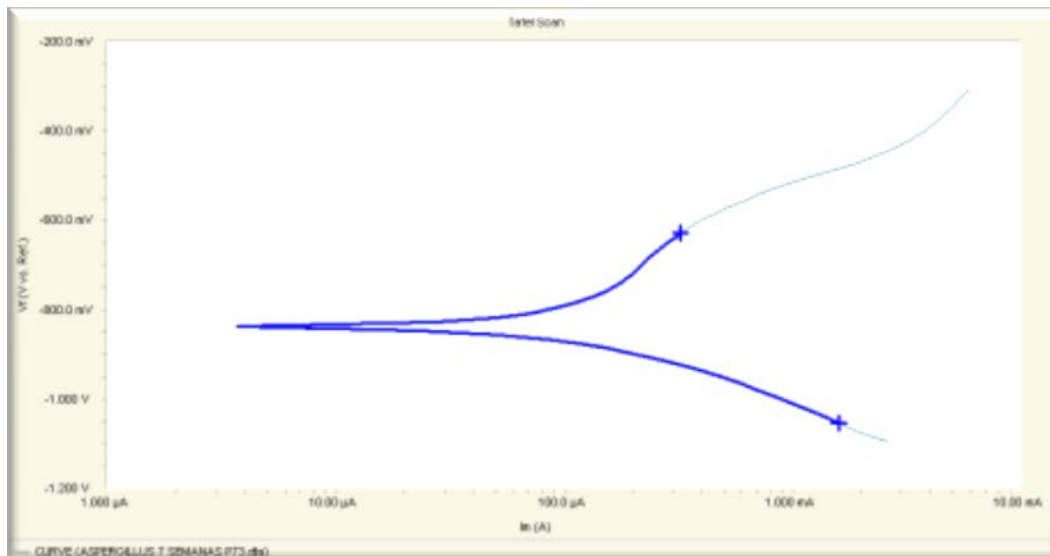


Figura 40. *Aspergillus* sp. con 56 días de exposición

En la figura 41 se muestran las curvas potencioestáticas obtenidas para una probeta expuesta durante 64 días al contacto con PDA. El potencial de corrosión promedio fue de -767.33mV, mientras que la intensidad de corrosión fue de 91.87μA.

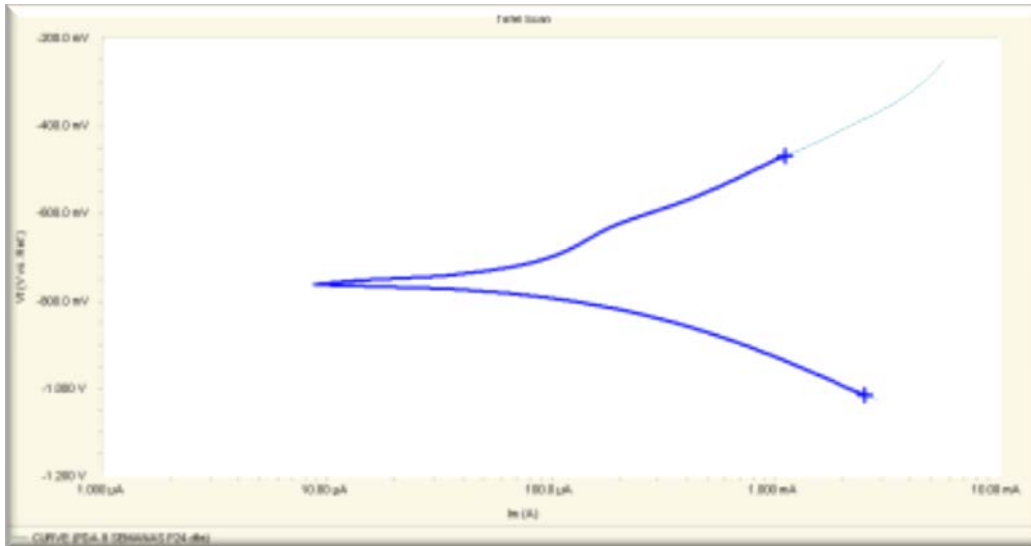


Figura 41. PDA sin microorganismos con 64 días de exposición.

Las probetas en contacto con *Penicillium* sp., durante 64 días tuvieron un potencial de corrosión de -744mV y una intensidad de corrosión de $219.43 \mu\text{A}$. En la figura 42 se presentan las curvas de Tafel obtenidas para una unidad experimental de este tratamiento.

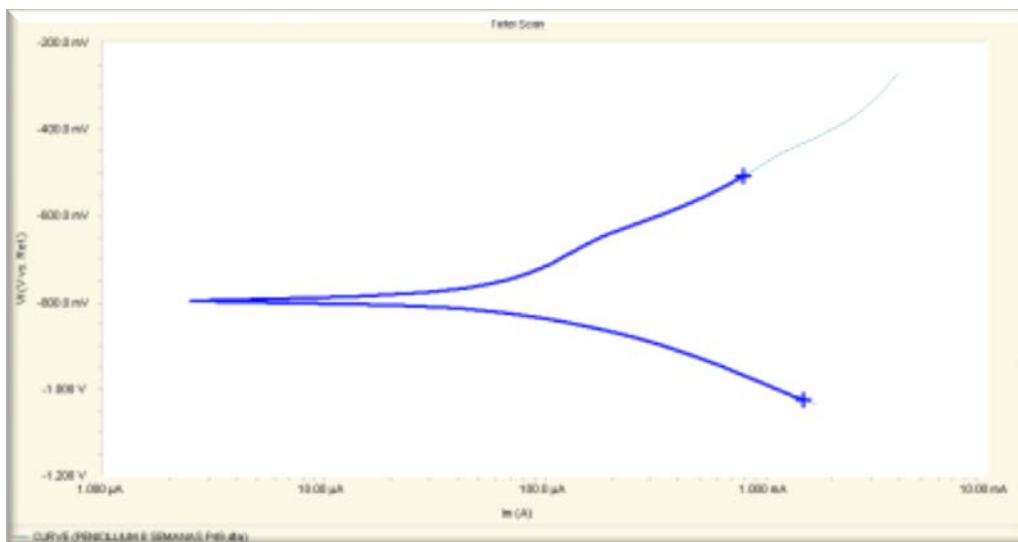


Figura 42. *Penicillium* sp. con 64 días de exposición.

En la figura 43 se muestran las curvas de Tafel obtenidas de una de las probetas que estuvieron en contacto con *Aspergillus* sp., durante 64 días. La intensidad de corrosión calculada fue de 118.13µA y el potencial de corrosión promedio fue de -776.67mV.

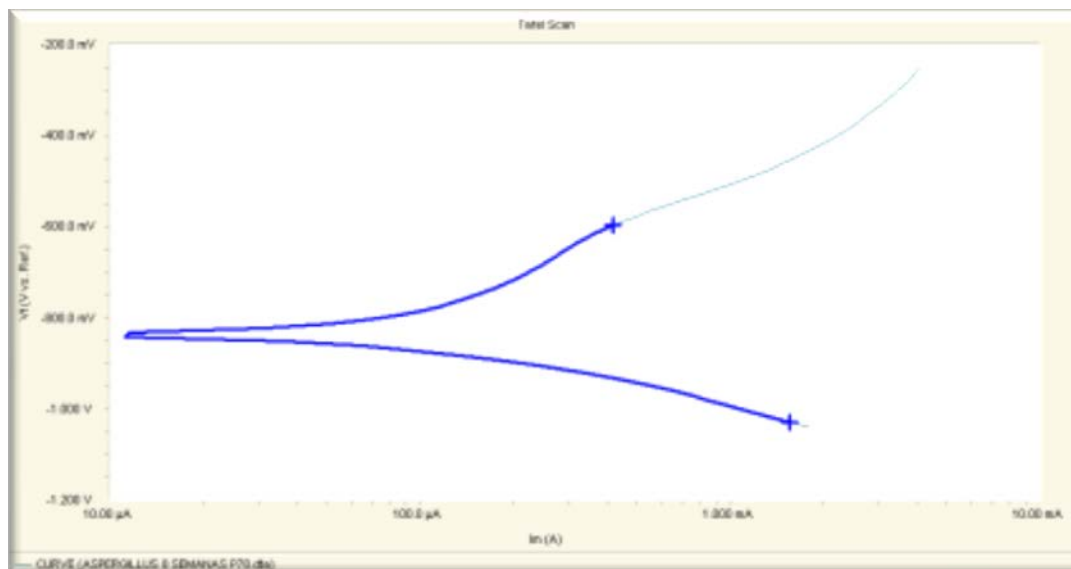


Figura 43. *Aspergillus* sp. con 64 días de exposición.

Velocidad de corrosión

La tabla 6 muestra la velocidad de corrosión calculada con el software *Chemanalysis*:

Tabla 6. Velocidad de corrosión

Tratamiento	Velocidad de corrosión promedio (milipulgadas·año ⁻¹)	Desviación estándar
1	11.16	6.29
2	5.70	3.50
3	9.76	8.33
4	19.59	3.30
5	10.61	3.70
6	14.99	2.48
7	10.73	4.11
8	7.04	3.78
9	40.09	31.88
10	10.90	4.43
11	8.66	2.79

Tratamiento	Velocidad de corrosión promedio (milipulgadas·año ⁻¹)	Desviación estándar
12	5.20	0.59
13	4.91	1.92
14	4.18	1.50
15	11.52	3.27
16	16.81	18.75
17	11.74	6.54
18	4.56	2.36
19	6.61	5.46
20	5.02	4.37
21	3.64	1.63
22	5.36	2.50
23	16.51	1.74
24	9.07	8.53

Determinación de pérdida de masa

Las probetas fueron pesadas en una balanza Gebr Bosch S200 Feinwaagnfabrik, se determinó la masa inicial y la final en cada unidad, esto se realizó únicamente para las probetas de las celdas de trabajo.



Figura 44. Balanza para obtención de masa inicial y masa final en cada probeta

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para pérdida de masa, expresados en gramos.

Tabla 7. Pérdida de masa

Tratamiento	Pérdida de masa promedio (gramos)	Desviación estándar
1	0.0098	0.0020
2	0.0119	0.0035
3	0.0236	0.0119
4	0.0056	0.0031
5	0.0205	0.0044
6	0.0237	0.0173
7	0.0370	0.0104
8	0.0417	0.0155
9	0.0033	0.0031
10	0.0020	0.0010
11	0.0101	0.0026
12	0.0219	0.0359
13	0.0144	0.0019
14	0.0065	0.0048
15	0.0166	0.0014
16	0.0240	0.0036
17	0.0007	0.0005
18	0.0044	0.0004
19	0.0097	0.0050
20	0.0024	0.0024
21	0.0127	0.0041
22	0.0112	0.0075
23	0.1218	0.1859
24	0.0321	0.0078

Observación de superficie metálica

En cajas de petri, con los tratamientos definidos y una incubación en forma invertida durante 10 días, se colocaron probetas cilíndricas de acero 1010, una en cada caja, para observar el crecimiento del biofilm en la superficie metálica, éstas se mantuvieron en una incubadora a 26°C; en la figura 45 se muestra una secuencia de las cajas 16 días después de colocar las probetas:

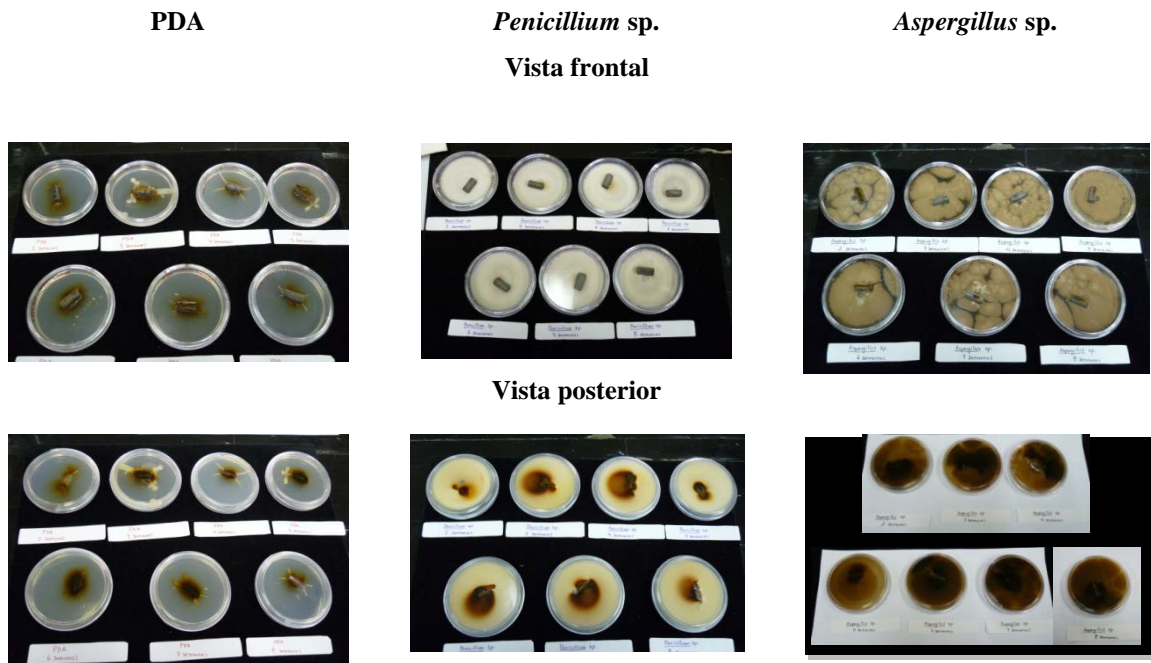


Figura 45. Vista frontal y posterior de cajas de petri con 16 días de exposición

Las cajas de petri se establecieron con tiempos de exposición diferentes, desde ocho hasta 64 días, una vez pasado el tiempo, las probetas se observaron con un microscopio.

En la figura 46 se muestra una secuencia de fotografías de las probetas con ocho días de exposición a los diferentes medios; se observaron signos leves de corrosión en la superficie de la probeta, el mayor daño se presentó en el área que estuvo en contacto con el medio de cultivo o la colonia, según el tratamiento. La presencia de óxidos fue mayor en cajas que contenían colonias de hongos, presentando la mayor cantidad en las cajas con *Penicillium* sp., por lo que se concluye que hubo mayor actividad microbiana.

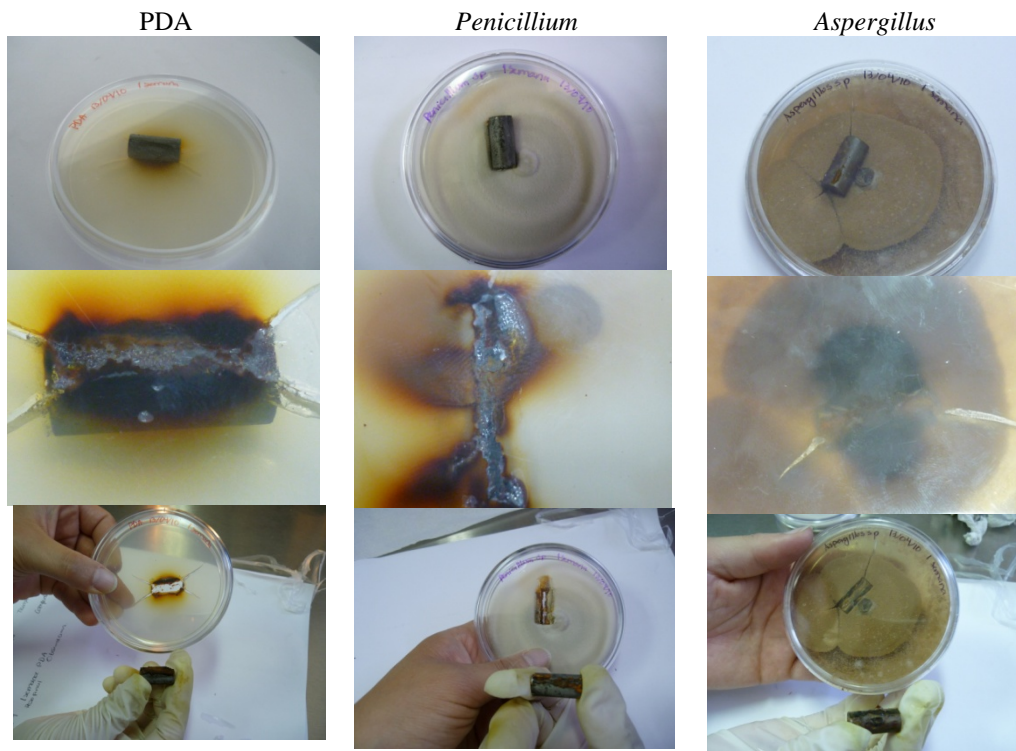


Figura 46. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante ocho días.

Las probetas expuestas al contacto con PDA, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. durante 16 días se muestran en la figura 47; la presencia de óxidos se incrementó presentando cambios de coloración en las colonias de hongos y en el medio de cultivo; el daño a las probetas fue mayor en contacto con los microorganismos que con el PDA; se observó presencia de esporas de *Aspergillus* sp. sobre la superficie metálica.

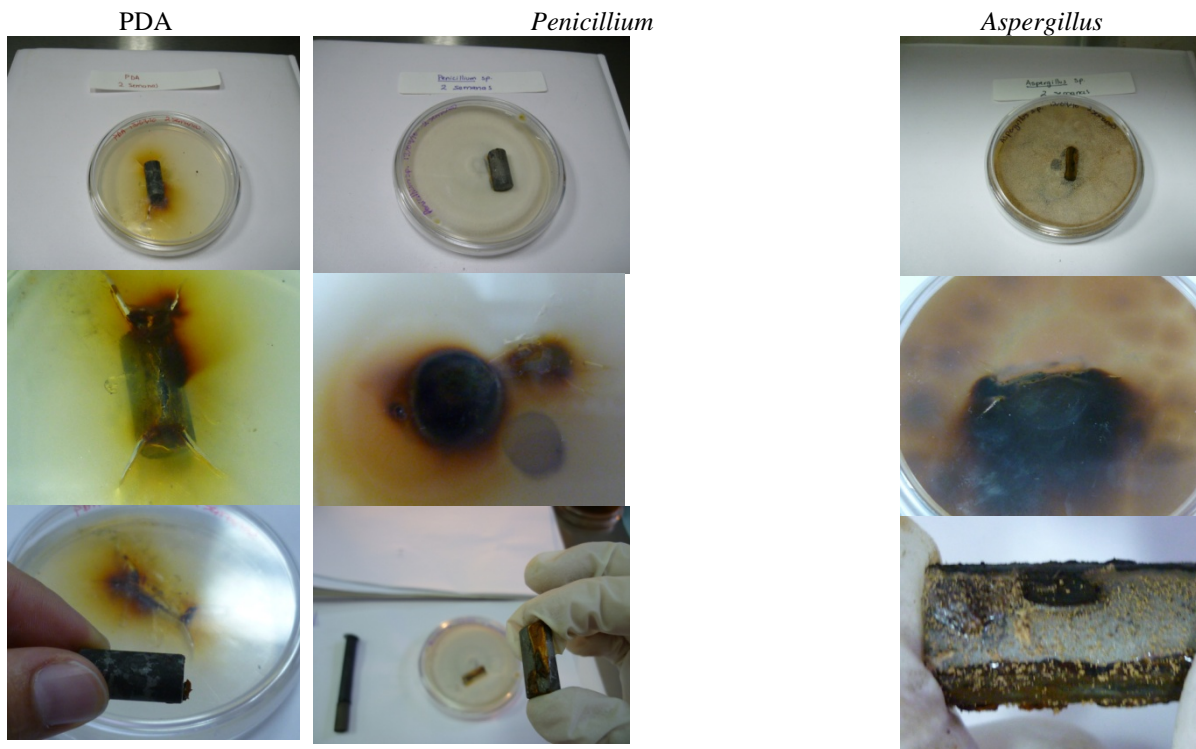


Figura 47. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 16 días

En tratamientos con 24 días de exposición se observó crecimiento del biofilm en todos los ejemplares. Uno de los cambios detectados es el incremento en la adherencia de la película formada por *Penicillium* sp., en comparación con las biopelículas formadas por *Aspergillus* sp. y PDA; la constitución de los biofilms genera una diferencia en los daños en de la superficie metálica, estos son más severos en probetas en contacto con *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. que en aquellas en contacto con PDA, como se observa en la figura 48.

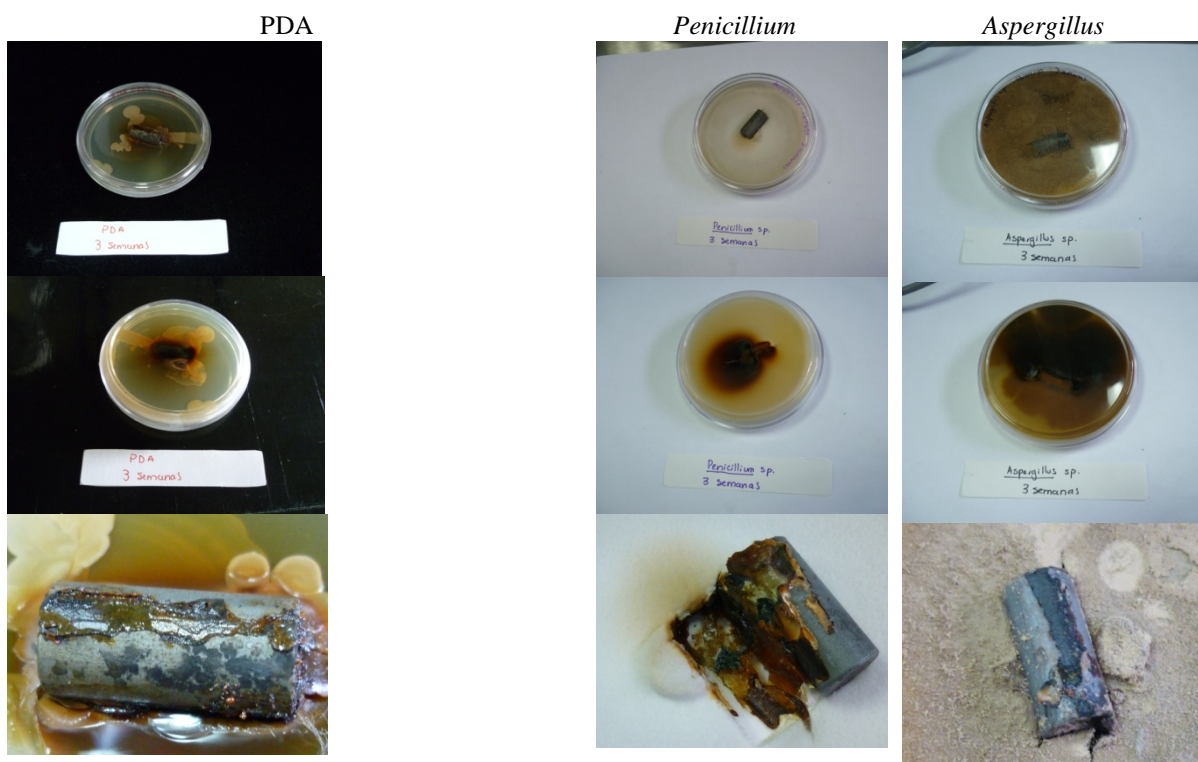


Figura 48. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 24 días.

La presencia de óxidos en probetas con 32 días de exposición se incrementó en tratamientos con *Aspergillus* sp., como se puede observar en la secuencia de fotografías de la figura 49; en tratamientos con *Penicillium* sp., y PDA el comportamiento es similar al de probetas con 24 días de exposición, sin embargo, la adherencia de la biopelícula genera un desprendimiento de capas superficiales del metal que se observa al limpiar las probetas.

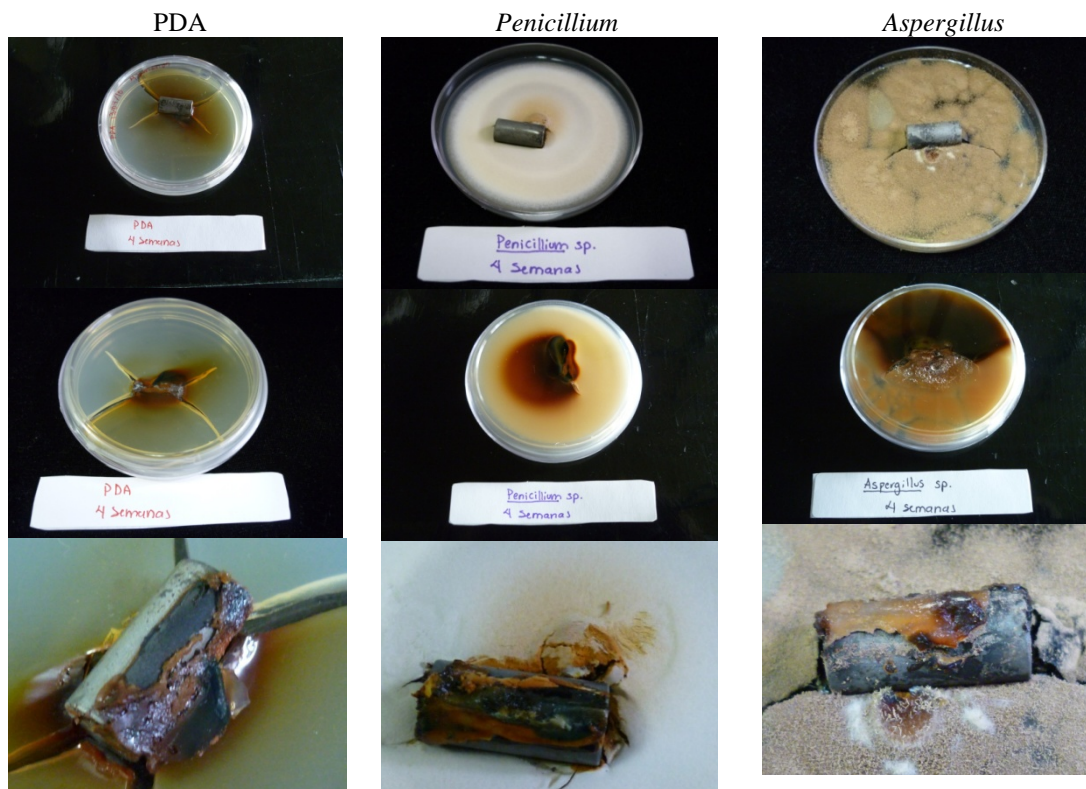


Figura 49. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 32 días.

La figura 50 muestra una secuencia fotográfica de probetas en contacto con PDA, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. durante 40 días de exposición; se observó que la cantidad de óxidos en tratamientos con *Penicillium* sp. fue menor, lo que indica una disminución en la actividad microbiana sobre el metal.

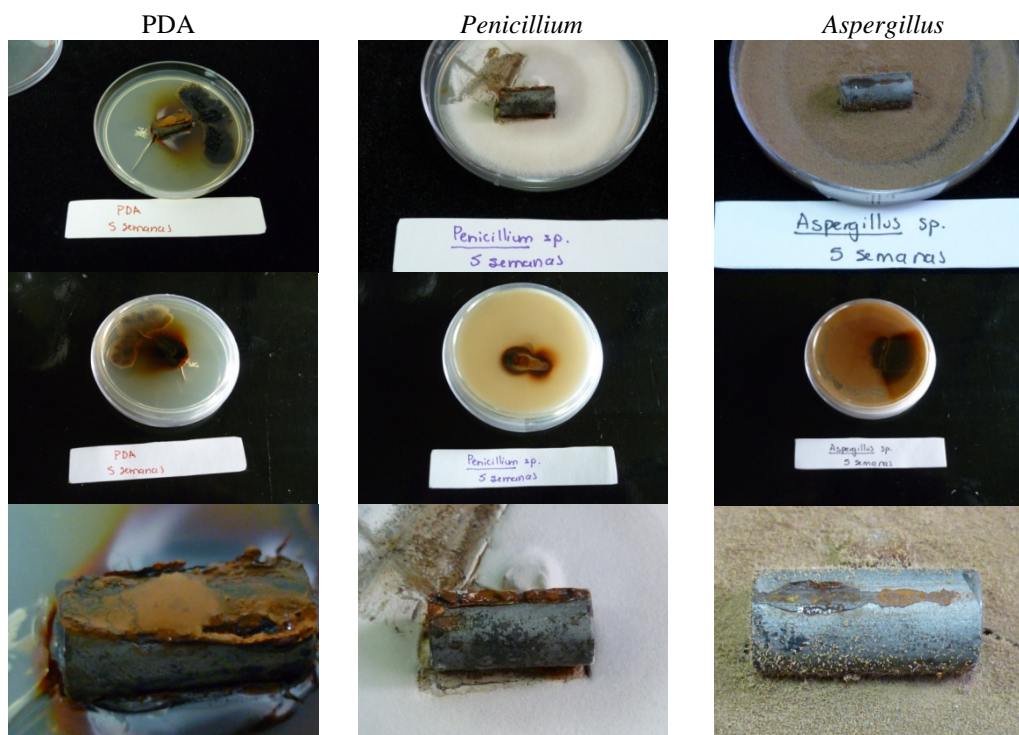


Figura 50. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 40 días.

El ataque en probetas expuestas 48 días al contacto con PDA sin microorganismos, es más intenso que a los 40 días, sin embargo, es menor que en probetas que están en contacto con microorganismos. La adherencia de la película formada por *Penicillium sp.*, es mayor y se observó un desprendimiento de la capa superficial del metal al momento de limpiar el ejemplar. La probeta en contacto con *Aspergillus sp.*, presenta crecimiento de esporas en la superficie. La figura 51 muestra una secuencia fotográfica de los tres medios de cultivo con exposición de 48 días.

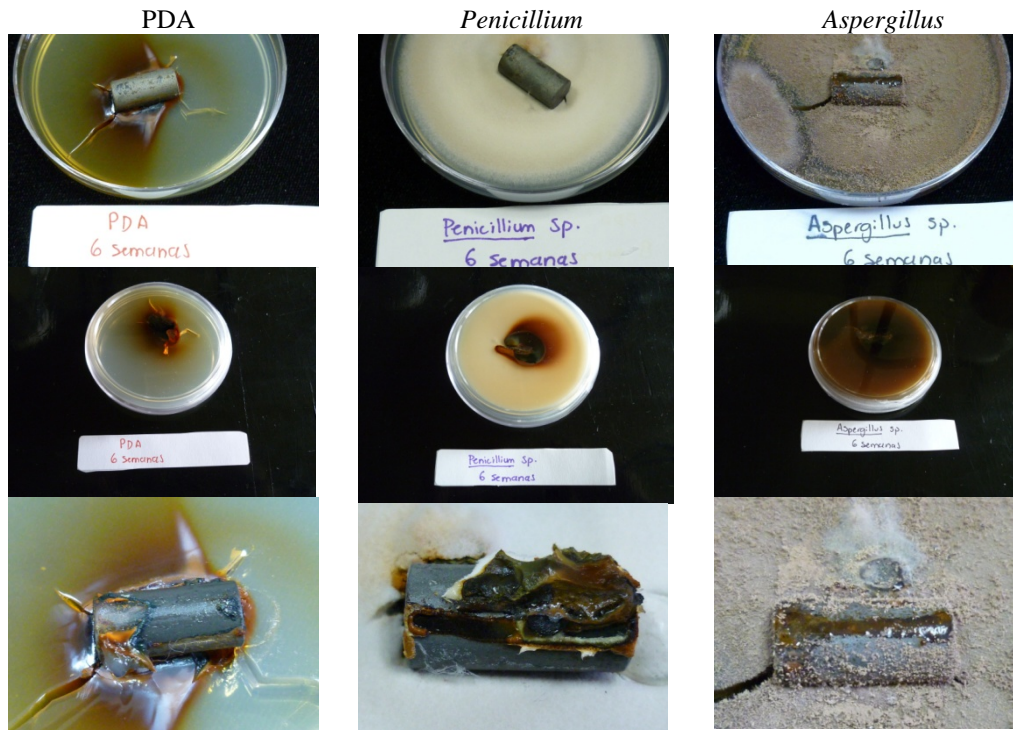


Figura 51. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 48 días.

A los 56 días de exposición, como se puede observar en la figura 52; se reportó un incremento en la actividad microbiana, derivado de esto se aumentó la cantidad de óxidos visibles en el medio de cultivo y en las colonias de hongos. Las probetas en contacto con *Aspergillus* sp., están totalmente cubiertas por esporas y hay desprendimiento de la capa superficial del metal al momento de efectuar la limpieza de los ejemplares.

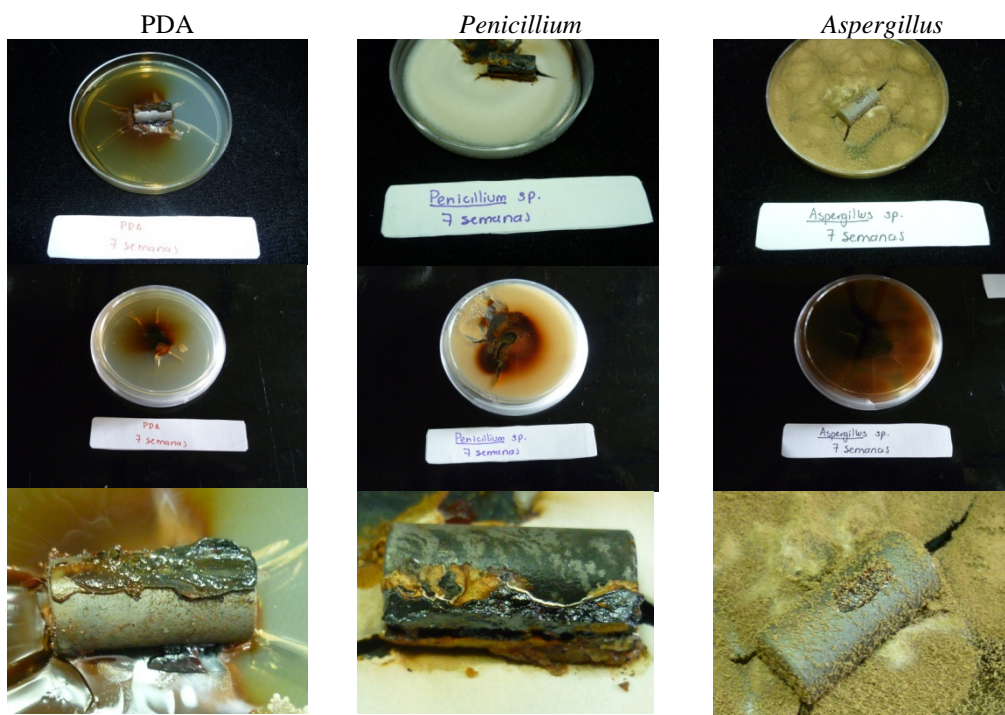


Figura 52. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 56 días.

En probetas con tiempo de exposición de 64 días, el daño causado por el contacto con *Penicillium sp.*, es mayor en el área de contacto directo con el medio, observándose formación de estrías en la superficie de la probeta; en los tratamientos con *Aspergillus sp.*, se reportó un incremento en la presencia de óxidos en sin embargo el daño sobre el metal fue menos severo que a los 56 días de exposición, esto se muestra en la figura 53.

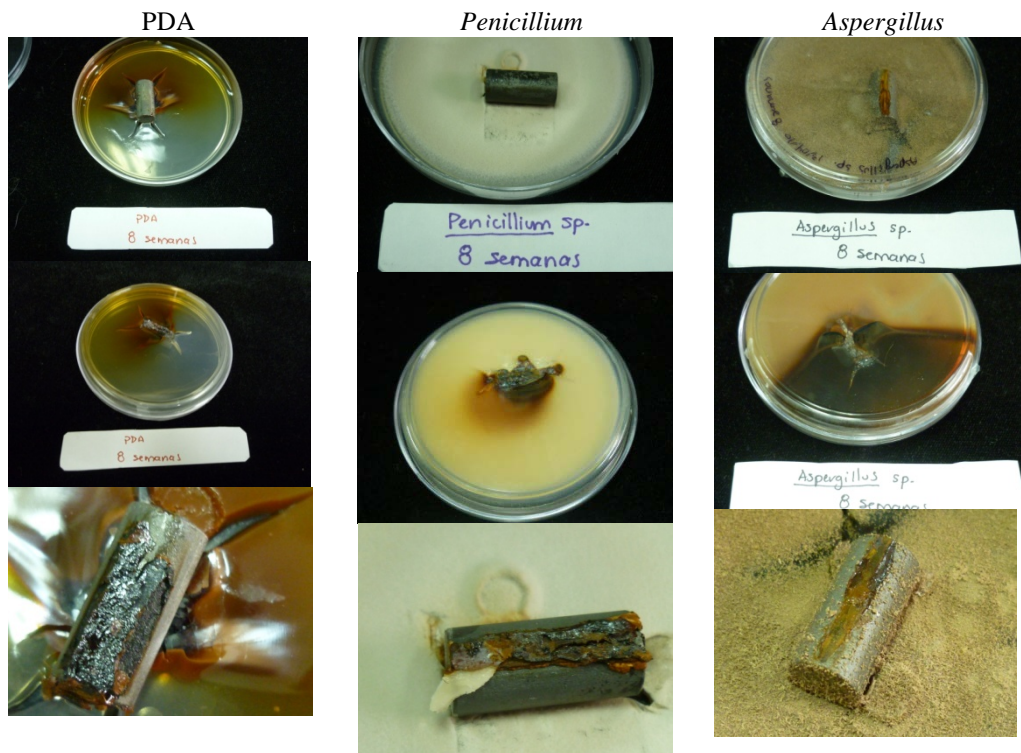


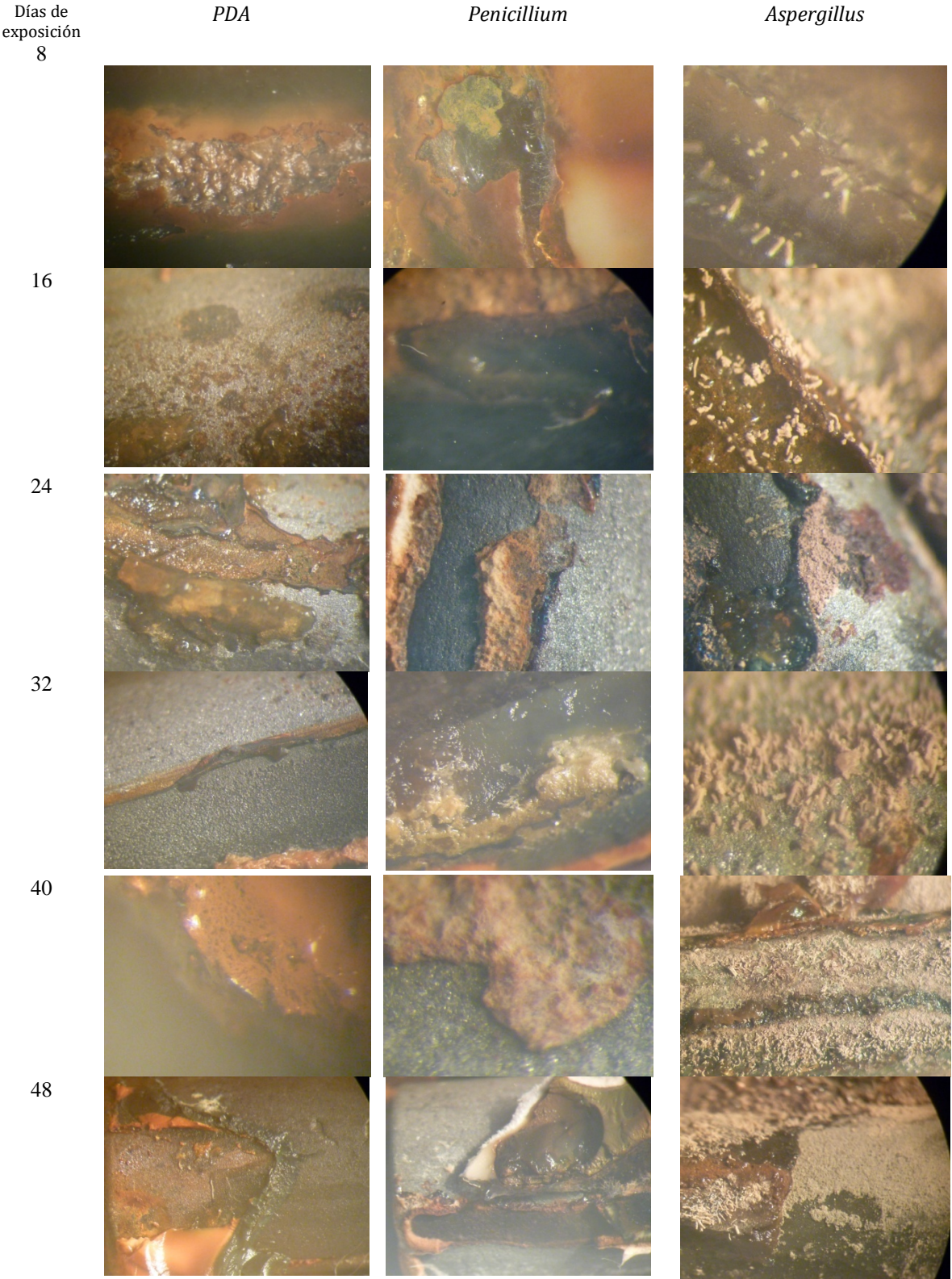
Figura 53. Efecto del contacto de PDA, *Penicillium* y *Aspergillus* con el metal expuesto durante 64 días.

Observación microscópica del crecimiento del biofilm

El desarrollo del biofilm ocurrió en los 24 tratamientos, en el caso de los tratamientos con *Aspergillus* sp., se observa el crecimiento de la colonia en toda la superficie del metal, manifestándose en forma de esporas, el crecimiento de la biopelícula se incrementó en proporción directa con el tiempo. Para tratamientos con *Penicillium* sp., el crecimiento inició en la parte en contacto con la colonia, en la fotografías se aprecia que la película es más compacta y por tanto tiene mayor adherencia a la superficie metálica.

Los tratamientos con PDA, presentan una película semejante a la formada por bacterias, es decir, la matriz es más acuosa y no tiene buena adherencia, por ello el daño generado es más superficial que el ocasionado por colonias microbianas.

La secuencia de fotografías mostrada en la figura 29 permite apreciar el desarrollo del biofilm en cada tratamiento durante los 64 días de exposición.



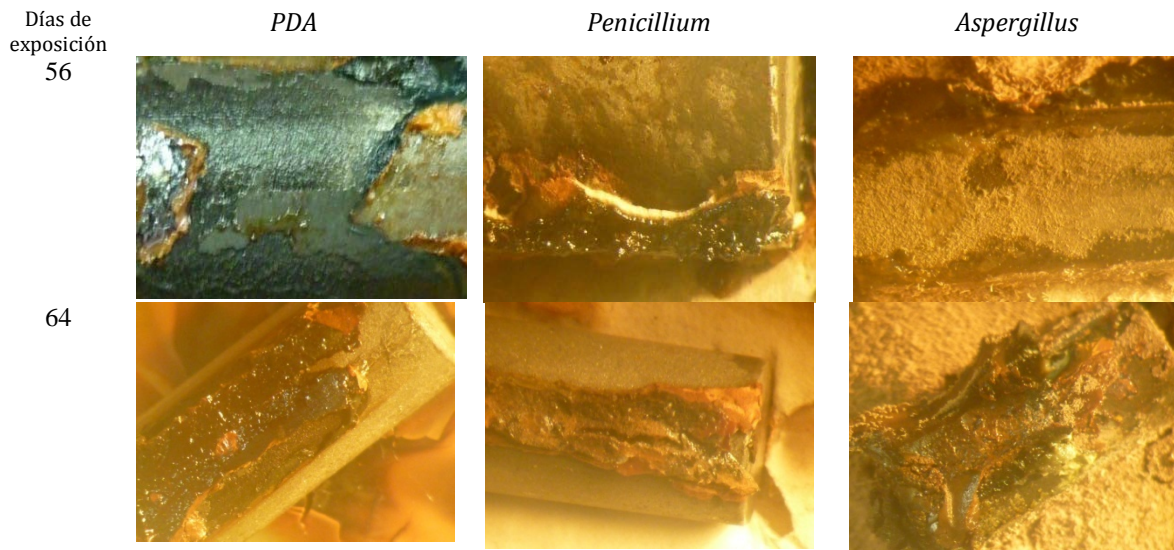


Figura 54. Secuencia de crecimiento del biofilm de cada microorganismo en los diferentes tiempos de exposición.

La velocidad de crecimiento de la biopelícula es mayor en tratamientos con *Aspergillus sp*, ya que la forma en que se desarrollan las colonias del microorganismo favorece la producción elevada de esporas, las cuales se depositan en toda la superficie de la probeta haciendo fácil el desarrollo de nuevas colonias; esto, en contraste con la forma en que se desarrollan las colonias de *Penicillium sp.*, hace que la biopelícula tenga un crecimiento más lento, sin embargo este microorganismo genera películas más compactas y con mayor adherencia a la superficie metálica, lo que deriva en un daño más severo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Velocidad de Corrosión

La velocidad de corrosión se determinó mediante el software *ChemAnalysis*. La tabla 6 muestra una síntesis de los datos obtenidos durante la evaluación realizada durante 64 días en probetas que estuvieron en contacto con PDA, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Los resultados indican que, para probetas en contacto con PDA, la velocidad de corrosión mínima reportada fue de 1.301 milipulgadas·año⁻¹, a los 24 días; mientras que la máxima velocidad se reportó a los 32 días con 22.83 milipulgadas·año⁻¹. El promedio para los primeros ocho tratamientos fue de 11.96 milipulgadas·año⁻¹.

En probetas que estuvieron en contacto con medio de cultivo colonizado por *Penicillium* sp., con tiempos de exposición que variaron de ocho hasta 64 días, se reportó que la velocidad de corrosión mínima fue de 2.459 milipulgadas·año⁻¹ y la máxima fue de 72.8; a los 48 y 8 días, respectivamente. El promedio de velocidad de corrosión fue de 12.7837 milipulgadas·año⁻¹.

En probetas que estuvieron en contacto con medio de cultivo colonizado por *Aspergillus*, con tiempos de exposición que variaron de ocho hasta 64 días, se reportó que la velocidad de corrosión promedio fue de 6.9402 milipulgadas·año⁻¹ con máximo de 19.22 milipulgadas·año⁻¹ a los 8 días y velocidad mínima 1.687 milipulgadas·año⁻¹ a los 64 días.

En los tres medios de cultivo se reporta un potencial de corrosión negativo lo que favorece los procesos de corrosión, sin embargo, este comportamiento cambia a lo largo del tiempo reportando incrementos y disminuciones en cada tratamiento. Esto indica que en todos los casos el metal presentó fenómenos de pasivación, sin embargo al romperse la película protectora se presentaron nuevos ataques.

Los datos obtenidos se estudiaron estadísticamente con un análisis de varianza realizado con el software *Minitab 15*, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8. El análisis

de varianza indica que existe significancia para el tiempo y para la interacción entre el tiempo y el microorganismo, siendo la interacción la más significativa.

Tabla 8. ANOVA para velocidad de corrosión

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Microorganismo	2	309.46	309.46	154.73	2.09	0.135
Tiempo	7	1397.88	1397.88	199.70	2.70	0.019
Microorganismo * Tiempo	14	2346.67	2346.67	167.62	2.26	0.018
Error	48	3554.43	3554.43	74.05		
Total	71	7608.44				

El tiempo, de manera individual y en conjunto con el microorganismo, es el factor que más afecta a la velocidad de corrosión. Aplicando la prueba de medias de Tukey a los datos obtenidos, se tiene que la exposición de las probetas a tiempos de 8 días es estadísticamente significativa con respecto a los tiempos de 16 y 40 días. En el caso de probetas expuestas a PDA la velocidad disminuye a los 16 días y aumenta nuevamente a los 40 días. Las probetas expuestas a *Penicillium* sp., a los 16 y 40 días de exposición tienen un comportamiento decreciente; para las probetas expuestas a *Aspergillus* sp., el comportamiento es similar.

En la interacción de los dos factores, microorganismo y tiempo; hay diferencia significativa entre los tratamientos con PDA de 8, 16, 24, 40, 56 y 64 días, y el tratamiento *Penicillium* sp., con ocho días de exposición; la velocidad promedio de este último tratamiento es de 40.09 milipulgadas·año⁻¹, también, hay diferencia significativa entre este tratamiento y los tratamientos de *Penicillium* sp., con tiempos entre 16 y 56 días.

La velocidad de corrosión reportada en los tratamientos con *Aspergillus* sp., presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al tratamiento de *Penicillium* sp., con ocho días de exposición.

Es posible concluir que el tratamiento que presenta la velocidad de corrosión mayor es el de *Penicillium* sp., con ocho días de exposición; el promedio reportado es de 40.09 milipulgadas·año⁻¹. Las gráficas siguientes presentan una curva polinomial de ajuste

obtenida con el método de Newton para cada microorganismo, en el eje x se grafica el tiempo de exposición y en el eje y se grafica la velocidad de corrosión.

Velocidad de corrosión de probetas en contacto con PDA

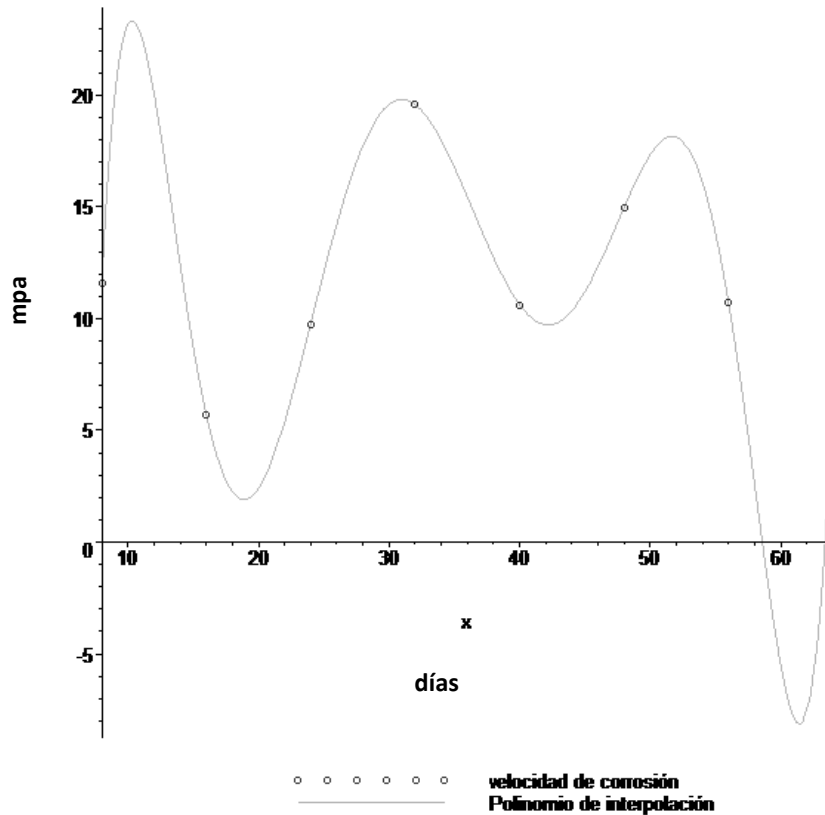


Gráfico 1. *Polinomio de interpolación para la velocidad de corrosión en probetas expuestas a PDA.*

La ecuación polinomial que describe el comportamiento del acero 1010 en contacto con PDA es:

$$y = 0.3636 \cdot 10^{-7} x^7 - 0.9142 \cdot 10^{-5} x^6 + 0.0009 x^5 - 0.0502 x^4 + 1.5051 x^3 - 24.8571 x^2 + 205.9289 x - 638.2999$$

La velocidad de corrosión para probetas en contacto con *Penicillium* tiene un comportamiento descrito por el polinomio:

$$y = -0.1055 \cdot 10^{-7} x^7 + 0.2686 \cdot 10^{-5} x^6 - 0.0002 x^5 + 0.0157 x^4 - 0.5053 x^3 + 9.2608 x^2 - 89.9505 x + 369.7499$$

Velocidad de corrosión de probetas en contacto con *Penicillium*

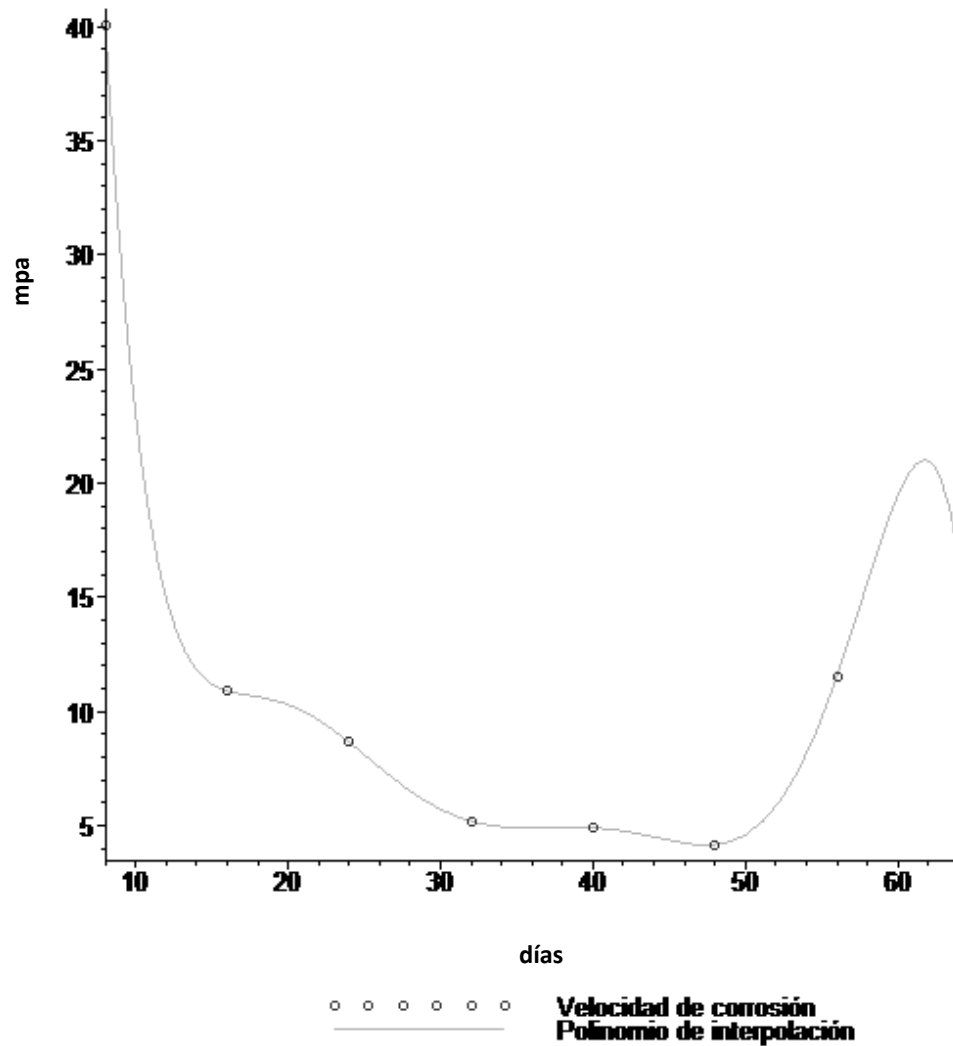


Gráfico 2. Polinomio de interpolación para la velocidad de corrosión en probetas expuestas a *Penicillium* sp.

El comportamiento de la velocidad de corrosión en probetas en contacto con *Aspergillus* es descrito por el polinomio:

$$y = -0.6081 \cdot 10^{-8} x^7 + 0.1479 \cdot 10^{-6} x^6 - 0.0001x^5 + 0.0081x^4 - 0.2549x^3 + 4.5668x^2 - 42.5702x + 161.7700$$

Velocidad de corrosión de probetas en contacto con *Aspergillus*

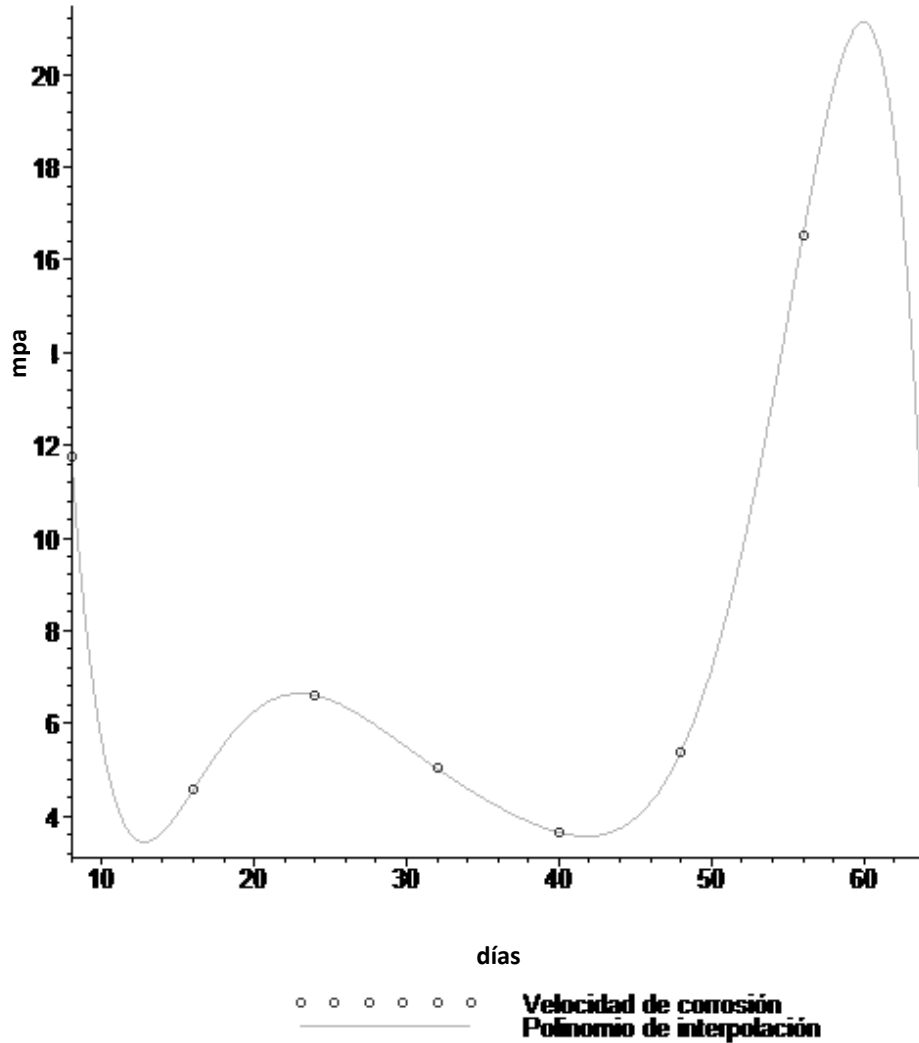


Gráfico 3. Polinomio de interpolación para la velocidad de corrosión en probetas expuestas a *Aspergillus* sp.

Pérdida de masa

La pérdida de masa se determinó calculando la diferencia entre la masa inicial y la masa final. En probetas que estuvieron en contacto con PDA sin microorganismos, la información indica que la pérdida mínima de peso fue de 0.0023 gramos, a los 32 días;

mientras que la máxima pérdida se reportó a los 64 días con 0.0521 gramos. El promedio para los primeros ocho tratamientos fue de 0.0217 gramos.

En probetas que estuvieron en contacto con medio de cultivo colonizado por *Penicillium* sp., con tiempos de exposición que variaron desde 8 hasta 64 días, se reportó que la pérdida mínima fue de 0.0008 gramos y la máxima fue de 0.0633; ambos datos a los 32 días. El promedio de pérdida de peso fue de 0.0123 gramos.

En probetas que estuvieron en contacto con medio de cultivo colonizado por *Aspergillus* sp., se reportó que, la pérdida de masa promedio fue de 0.0243 gramos con máximo de 0.3363 gramos a los 56 días y pérdida mínima de 0.0003 gramos a los 8 días.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con *Minitab 15*, utilizando un análisis de varianza para un experimento factorial de 3 x 8. En este análisis se indica que el efecto de los factores y de la interacción no estadísticamente significativo; sin embargo, es posible verificar que el tiempo es el factor que favorece la pérdida de masa en las probetas expuestas a los diferentes tratamientos.

Tabla 9. ANOVA para pérdida de masa

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Microorganismo	2	0.001921	0.001921	0.000960	0.62	0.540
Tiempo	7	0.020272	0.020272	0.002896	1.88	0.093
Microorganismo * Tiempo	14	0.019110	0.019110	0.001365	0.89	0.576
Error	48	0.073769	0.073769	0.001537		
Total	71	0.115072				

Las gráficas siguientes muestran los polinomios de interpolación, obtenidos con el método de Newton, para describir el efecto del tiempo sobre la pérdida de masa para cada uno de los microorganismos estudiados.

Polinomio de interpolación para probetas en contacto con PDA en diferentes tiempos de exposición:

$$y = -0.5989 \cdot 10^{-10} x^7 + 0.1538 \cdot 10^{-7} x^6 - 0.1617 \cdot 10^{-5} x^5 + 0.0001x^4 - 0.0028x^3 + 0.0479x^2 - 0.4149x + 1.3699$$

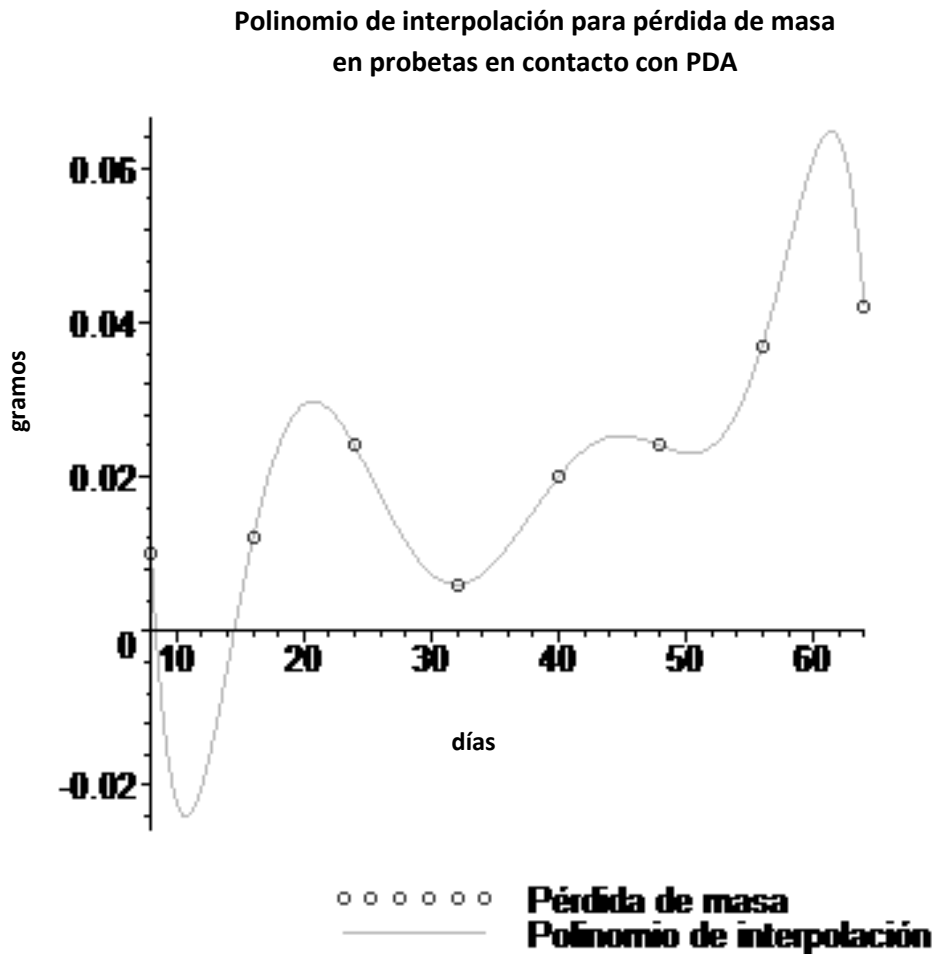


Gráfico 4. Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas en contacto con PDA.

La pérdida de masa en probetas que estuvieron en contacto con PDA desde 8 hasta 64 días reporta un comportamiento creciente, con excepción de las probetas expuestas durante 32 días.

Polinomio de interpolación para pérdida de peso en probetas en contacto con *Penicillium*

$$y = 0.1059 \cdot 10^{-10} x^7 - 0.2946 \cdot 10^{-8} x^6 + 0.3305 \cdot 10^{-6} x^5 - 0.00002x^4 + 0.0006x^3 - 0.0105x^2 + 0.0893x - 0.284$$

**Polinomio de interpolación para pérdida de masa
en probetas en contacto con *Penicillium***

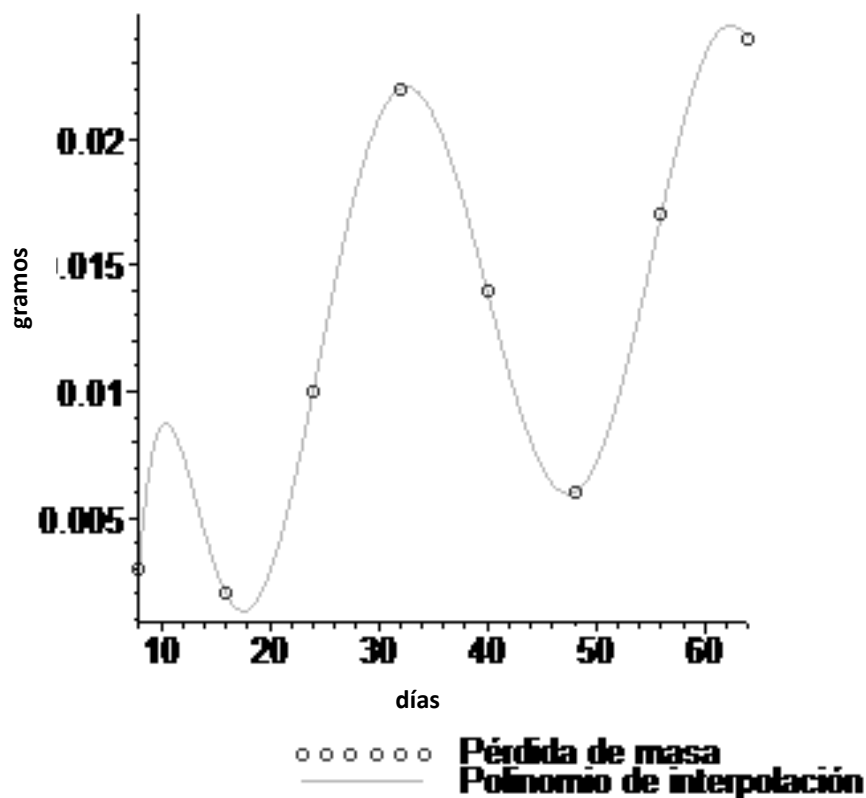


Gráfico 5. Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas en contacto con *Penicillium* sp.

La pérdida de masa en tratamientos con *Penicillium* tiene un comportamiento creciente y decreciente a lo largo del tiempo del experimento, reportando la mayor pérdida con tiempos de exposición de 32 y 64 días.

Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas que estuvieron en contacto con *Aspergillus*.

$$y = -0.1096 \cdot 10^{-9} x^7 + 0.2635 \cdot 10^{-7} x^6 - 0.2589 \cdot 10^{-5} x^5 + 0.0001x^4 - 0.0039x^3 + 0.0639x^2 - 0.5290x + 1.6800$$

**Polinomio de interpolación para pérdida de masa
en probetas en contacto con *Aspergillus***

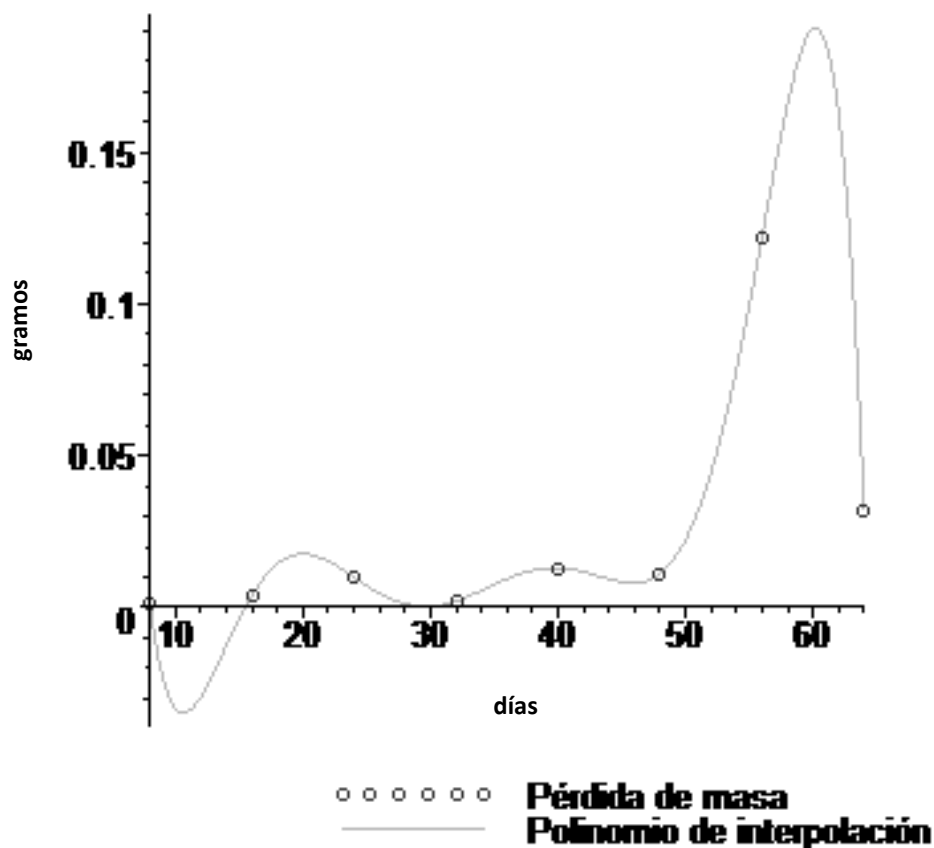


Gráfico 6. Polinomio de interpolación para pérdida de masa en probetas en contacto con *Aspergillus* sp.

En tratamientos con *Aspergillus*, la pérdida de masa presenta un comportamiento con poca diferencia, hasta el tiempo de exposición de 56 días donde se reporta la mayor pérdida.

Evaluación del efecto corrosivo sobre las probetas expuestas a diferentes tratamientos

Las probetas de los 24 tratamientos presentaron signos de corrosión evidentes, sin embargo, se observaron diferencias en los daños ocasionados por cada microorganismo. Con ocho días de exposición se observó, para los tres microorganismos evaluados, la presencia de óxidos que colorearon el medio de cultivo y las colonias. Los daños más

notorios sobre la superficie metálica se presentaron en la parte que estuvo sobre las colonias y el medio, la parte superior de las unidades presentó signos leves de corrosión.

En tiempo de exposición de 16 días, la presencia de óxidos se incrementó, presentando daños más severos en las probetas en contacto con *Aspergillus* sp., se observaron esporas del hongo sobre toda la superficie del metal, en la figura 55 se presenta la superficie de una probeta sujeta a este tratamiento.



Figura 55. Probeta en contacto con *Aspergillus* sp. con 16 días de exposición

La probeta en contacto con *Aspergillus* sp., durante 64 días presentó desprendimiento de una capa de óxido dejando la superficie del metal limpia, como se puede observar en la figura 56.



Figura 56. Probeta en contacto con *Aspergillus* sp. durante 64 días

La película formada por *Aspergillus* sp., no es tan compacta comparada con la formada por *Penicillium* sp., esto genera una diferencia notoria en el daño causado sobre la superficie. En la secuencia siguiente se muestran algunas probetas expuestas a medio colonizado con *Penicillium* sp., se observa un desgaste de la superficie en las áreas que estuvieron en contacto con el micelio. El ataque de *Penicillium* sp., sobre probetas de acero 1010 se puede observar en las figuras 57,58 y 59.

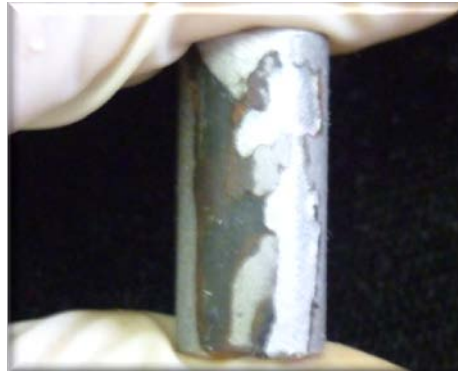


Figura 57. Probeta en contacto con *Penicillium* sp., durante 32 días



Figura 58. Probeta en contacto con *Penicillium* sp., durante 48 días



Figura 59. Probeta en contacto con *Penicillium* sp., durante 56 días

CONCLUSIONES

La diferencia en la velocidad de corrosión, obtenida con el potencióstato, puede deberse a cambios en el biofilm que afectan la interfase metal – medio, dicho cambio en las velocidades de corrosión en los tres medios, permite establecer que el metal sufre fenómenos de pasivación durante el tiempo de exposición al medio de cultivo con y sin microorganismos. En el caso de los tratamientos con PDA sin microorganismos se observa que, la película de óxidos que se forma se rompe constantemente generando nuevos ataques; en los tratamientos con *Penicillium* sp., el ataque inicial es muy severo, pero la película que se forma se mantiene hasta 48 días, periodo donde se reportan nuevos incrementos a la velocidad. Las probetas en contacto con *Aspergillus* sp., inician con un ataque que forma una película protectora que se mantiene durante 64 días, tiempo en el que el metal es nuevamente atacado.

La pérdida de peso indica que los microorganismos pueden utilizar al metal como fuente de nutrientes, principalmente de hierro y carbono, y, en el caso de probetas que estuvieron en contacto con PDA sin microorganismos la disminución de peso se debe al efecto del medio de cultivo sobre el metal.

El daño observado en la superficie metálica se incrementa con el tiempo de exposición, por tanto, es importante considerar que los microorganismos tendrían posibilidad de generar corrosión por picaduras, alterar la interfase metal - suelo y favorecer otro tipo de ataques en condiciones reales.

El género *Penicillium* sp., forma una película protectora más compacta, esto genera un daño mayor en la zona de contacto comparado con el daño generado por *Aspergillus* sp., y el PDA sin microorganismos.

Los suelos estudiados tienen un bajo contenido de materia orgánica, por tanto se puede esperar que en suelos con mayor contenido de materia orgánica el ataque por microorganismos sea mayor.

REFERENCIAS

- [1]. Agrios, G.N. 1996. *Fitopatología*. Ed. Limusa. México
- [2]. Bilurbina, A.L., F. Liesa, Iribarren, J.L. 2003. *Corrosión y Protección*. Ediciones UPC.
- [3]. Booth, G. H. 1964. *Bacterial Corrosion*. Discovery 6.
- [4]. Cappuccino, J.G., Sherman N. 2002. 6a Ed. *Microbiology a Laboratory Manual*. Benjamin Cumminys.
- [5]. Domsh, K.H., W.G. Gams, T. H. Anderson. 1993. *Compendium of soil fungi*. V.I.IHW-Verlag, Londres.
- [6]. Espino del Castillo, R.A. 2009. *Diversidad de micromicetes de los géneros Penicillium y Aspergillus (trichocomaceae) y levaduras, asociada al suelo de la cueva de los riscos, Jalpan, Querétaro, México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [7]. Fontana, M.G, N.D. Greene. 1978. *Corrosion Engineering*. Mc Graw Hill. Estados Unidos.
- [8]. García, T.A. 1991. *Experimentos en microbiología de suelos*. Ed. C.EC.S.A. México.
- [9]. Garret, J.C. 1891. *The Action of Water on Lead*. H.K. Londres.
- [10]. Hoog, G.S., J. Guarro. 1995. *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira I Virgili. Baarn.
- [11]. Iverson, W.P. 1972. *Biological Corrosion, Advances in Corrosion Science and Technology*. (Fontana, M.G., Staehle, R.W., Eds). Plenum. Londres.
- [12]. Juzeliunas, E. R. Ramanauskas. 2005. *Microbially influenced corrosion acceleration and inhibition. EIS study of Zn and Al subjected for two years to influence of Penicillium frequentans, Aspergillus niger and Bacillus mycoides*. Electrochemistry Communications.
- [13]. Maya, C. L. 2009. *Comparación in vitro del antagonismo de una cepa comercial y una cepa endémica de Trichoderma sp. contra Alternaria sp. en brócoli en tres localidades de Guanajuato*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [14]. Orozco, C.R., E.M. Martínez, R. Galván, J.L. Ramírez, I. Fernández. 2007. *La Ciencia y el hombre*. Vol XX, número 2. Disponible en <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol20num2/articulos/corrosion/>.
- [15]. Otero, H.E. 2001. *Corrosión y degradación de materiales*. Síntesis. España.

- [16]. Patterson, T.F., M.R. McGinnis. 2007. *Doctor Fungus website*. www.doctorfungus.org. Septiembre 2009.
- [17]. Perotti, E.B.R., Menendez, L.T., Gaia, O.E. et al. *Supervivencia de Pseudomonas fluorescens en suelos con diferente contenido de materia orgánica*. Rev. Argent. Microbiol. [online]. abr./jun. 2005, vol.37, no.2 [citado 13 Junio 2009], p.102-105. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412005000200011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0325-7541.
- [18]. Pitt, J.I. 1979. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press. Londres.
- [19]. Ramírez-Gama, R.M., B., Luna Millán, A.M. Chávez, O.V. Madrazo, G. Tsuzuki Reyes, L.V. García, L.H. Gómez, I. Mügggenburg. 2003. *Manual de prácticas de Microbiología general*. Facultad de Química. UNAM. México.
- [20]. Raper, K.B., D.I. Fennell. 1977. *The genus Aspergillus*. Robert E Krieger. Publishing Company Huntington. Nueva York.
- [21]. Roberge, P.R. 2008. *Corrosion Engineering. Principles and practice*. McGraw Hill. USA.
- [22]. Samson, R.A., J.I. Pitt. 2000. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam.
- [23]. Teng, F., Y.T. Guan, W.P. Zhu. 2008. *Effect of biofilm on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution system: Corrosion scales characterization and microbial community structure investigation*. Corrosion Science.
- [24]. Valencia I.C. y Hernández B.A. 2002. *Muestreos de Suelos, Preparación de muestras y guía de campo*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [25]. Videla, H. y Herrera, L. 2005. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*.
- [26]. Von Wolzogen, C.A.H, Van der Vlugt, I.S. 1934. *The Graphitization of Cast Iron as an Electrochemical Process in anaerobic soils*. Water 18.
- [27]. Watanabe, T. 2001. 2 ed. *Pictorial Atlas of Soil and Seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC Press. Londres.

[28]. Yuan, S.J, S.O. Pehkonen. 2009. *AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by Pseudomonas NCIMB 2021 and Desulfovibrio desulfuricans in simulated seawater.* Corrosion Science.

