

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BACTERIAS TIOSULFATO REDUCTORAS EN LA
CORROSIÓN DE TUBERÍAS ENTERRADAS EN SUELOS DE CAMPOS DE
PRODUCCIÓN DEL ÁREA DE NEIVA**

**ANDREA MILENA BERNAL RODRÍGUEZ
SERGIO ANDRÉS GARRIDO PRADA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FISCOQUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA
ESCUELA DE QUÍMICA
2008**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BACTERIAS TIOSULFATO REDUCTORAS EN LA
CORROSIÓN DE TUBERÍAS ENTERRADAS EN SUELOS DE CAMPOS DE
PRODUCCIÓN DEL ÁREA DE NEIVA**

**SERGIO ANDRÉS GARRIDO PRADA
ANDREA MILENA BERNAL RODRÍGUEZ**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Química e Ingeniería
Metalúrgica.**

**Directores: Rodrigo Torres. Bioquímico. Ph. D.
Custodio Vásquez. Ing. Metalúrgico. Msc.**

**Co-Directora: Neira Gladys Rosero. Ing. Química. Msc.
Instituto Colombiano del Petróleo.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
2008**

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a:

Dios, por ayudarnos a superar todos los obstáculos que permitieron probarnos como profesionales y como seres humanos.

A nuestros padres, familiares y amigos, por creer en todo momento en nuestras capacidades.

A Gladys Rosero Niño, por la confianza depositada en los estudiantes de la Universidad Industrial de Santander.

A Rodrigo Torres Sáez y Custodio Vásquez Quintero, por sus valiosos aportes, por la dedicación y el apoyo que siempre nos demostraron. Y finalmente por enseñarnos a pensar.

A Claudia Ortiz, por su constante preocupación e interés durante el desarrollo del proyecto.

Sincera y afectuosamente

Sergio Garrido y Andrea Bernal

Quiero dedicar este trabajo a:

A Juan y Edi, mis padres; a Emma, Leyla, Jorge y Hernando, tíos; a María E., Juan F. y Esther, abuelos. Quienes con su amor y cariño se convirtieron en hacedores de sueños.

A Susana, quien con su amor, cariño y comprensión ha hecho que mi vida converja hacia ella.

A Andrea, por que tuve la fortuna de encontrarla en la última etapa del camino.

A Cesar G., Juan D., Cesar A., Nazly O., Natalia C., Karen I., Karen A., Ginna A., Ma. Ximena E., Mario Ll., Javier G., Johanna F., Mónica C., Javier G., Laura N., Laura T., Johan G., Juan L., Saul R., Isaac M., Edward P., Alejo A., Betsy M., Daisy P., Cesar B., Marvin G.

Chicos que la vida bañe en vino y perfume sus caminos.

Sergio Andrés Garrido Prada

Quiero dedicar este proyecto a:

Principalmente a mi Madre, porque gracias a ella he culminado otra fase de mi vida, su amor, confianza y su Fe en mí, son los principales sentimientos que me han motivado para salir siempre adelante;

A mi Hermana, mi tío Ludwig, mi Padre y a Camilo por preocuparse tanto por mi bienestar y darme su apoyo en los momentos claves para mi vida;

A Juanes por sus sonrisas, por ser mi distracción favorita y por recordarme la niña que llevo dentro y había dejado a un lado;

A mis amigos (Eli, Duchis, Bala, Litos, Fabi, Rachel, Natys, Nana, Erik, Pitu, Yulieth, Nato, Nañis, etc), porque me enseñaron el verdadero significado de esta palabra, por tener tanta paciencia para tolerarme y hacerme sentir una persona importante para ellos;

A Sergini, por sus chistes flojos que nos hicieron hacer más llevaderos esos momentos complicados, por convertirse en mi compinche, mi confidente, en mi hermano

a Diego por sus palabras, su cariño y apoyo incondicional

Quien los quiere y los llevará en su corazón eternamente...

ANDY

ABREVIATURAS

- **AMP:** Adenosin monofosfato.
- **ANSI:** Approved American National Standard.
- **API:** American Petroleum Institute.
- **APS:** Adenosin Fosfosulfato.
- **ASTM:** American Society for Testing Materials.
- **ATP:** Adenosin Trifosfato.
- **BSR:** Bacteria Sulfato Reductora.
- **BTR:** Bacteria Tiosulfato Reductora.
- **COT:** Carbono Orgánico Total.
- **ECOPETROL:** Empresa Colombiana de Petróleo.
- **EIS:** Electrochemical Impedance Spectroscopy.
- **EPA:** Environmental Protection Agency.
- **EPS:** Sustancias Poliméricas Extracelulares.

- **ICP:** Instituto Colombiano del Petróleo.
- **IGAC:** Instituto Geográfico Agustín Codazzi.
- **ISO:** International Standard Organization.
- **MIC:** (Microbiological Influenced Corrosion) Corrosión Influenciada Microbiológicamente.
- **NADH:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide-H.
- **OCP:** Open Circuit Potential.
- **PSL:** Product Specification Level.
- **PTE:** Procedimiento técnico.
- **R_p:** Resistencia de Polarización.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	3
2.1 Suelos	3
2.2 Bacterias Tiosulfato y sulfato reductoras	10
2.3 Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC)	17
2.4 Biopelícula	20
2.5 Definición y clasificación de aceros API 5L	22
2.6 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)	24
3. METODOLOGÍA	26
3.1 Caracterización de suelos	26
3.1.1 Pre-Tratamiento del suelo	27
3.1.2 Determinación de Humedad a 105 °C.	27
3.1.3 Determinación de Textura de Suelo.	28
3.1.4 Determinación de pH o acidez activa.	28
3.1.5 Determinación de conductividad.	28
3.1.6 Determinación de Carbono Orgánico Total (COT).	28
3.1.7 Determinación de Nitrógeno Total	28
3.1.8 Determinación de Aniones	28
3.1.9 Recuento BTR	28
3.2 Experiencias en cinética bacteriana	29

3.3 Diseño y construcción de una celda anaeróbica	31
3.3.1 Materiales de construcción	32
3.3.2 Manufactura	32
3.3.3 Control de hermeticidad	32
3.4 Evaluación de Corrosión	33
3.4.1 Caracterización metalográfica del material	33
3.4.2 Montaje experimental	33
3.4.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)	34
3.4.4 Microscopía Cofocal	34
3.5 Discusión de resultados	35
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	36
4.1 Caracterización de suelos.	36
4.1.1 Determinación de Humedad a 105 °C.	36
4.1.2 Determinación de Textura.	37
4.1.3 Determinación de pH o acidez activa.	39
4.1.4 Determinación de conductividad.	40
4.1.5 Determinación de Carbono Orgánico y Nitrógeno Orgánico Total.	41
4.1.6 Determinación de aniones.	42
4.1.7 Recuento BTR y BSR.	43
4.2 Crecimiento Bacteriano	46
4.2.1 Activación y estabilización del inóculo de BTR para la segunda cinética.	46
4.2.2 Cinética de BTR.	48
4.3 Diseño y construcción de la celda anaeróbica	54
4.3.1 Diseño	54
4.3.2 Control de hermeticidad	55
4.3.3 Grafico causa – efecto	57
	XIII

4.4 Determinación de la velocidad de corrosión	60
4.4.1 Caracterización Metalográfica	60
4.4.2 Dureza	61
4.4.3 Composición química	62
4.4.4 Análisis superficial	62
4.4.5 Montaje experimental	63
4.4.6 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIE)	64
4.4.7 Microscopia cofocal	71
5. CONCLUSIONES	75
6. RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tamaño de partícula de arena, limo y arcilla.	6
Tabla 2. Grado de corrosión del suelo según su resistividad.	8
Tabla 3. Sistemas que promueven la Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC).	17
Tabla 4. Mecanismos alternativos a la Teoría Clásica de Depolarización Catódica.	19
Tabla 5. Composición química para acero API 5L Grado B PSL 1.	23
Tabla 6. Propiedades mecánicas para acero API 5L Grado B PSL 1.	24
Tabla 7. (%) Humedad de las 15 muestras de suelos.	37
Tabla 8. Textura de las 15 muestras suelos.	38
Tabla 9. Valores de pH de las 15 muestras de suelos.	39
Tabla 10. Conductividad y nivel de corrosión de las 15 muestras de suelos.	40
Tabla 11. Concentración de COT y Nitrógeno Orgánico total de las 15 muestras de suelos.	41
Tabla 12. Concentraciones de Aniones presentes en las 15 muestras de suelos.	43
Tabla 13. Población de BTR y BSR en las 15 muestras de suelos.	44
Tabla 14. Relación de variables en los medios de cultivo.	48
Tabla 15. Conductividad para cada medio de cultivo en la cinética 2.	48
Tabla 16. Composición los medios C y D.	49
Tabla 17. Evaluación de viabilidad de medios y producción de sulfuros.	49
Tabla 18. Recuento de Bacterias en la cinética.	50

Tabla 19. Ensayos de hermeticidad.	56
Tabla 20. Ensayo de Hermeticidad después de aplicar las mejoras.	60
Tabla 21. Resultados del ensayo de dureza para las probetas de acero API 5L Grado B.	62
Tabla 22. Resultados del análisis químico para el acero API 5L Grado B.	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Ciclo del carbono en el suelo y formación de materia orgánica y humus.	4
Figura 2. Ciclo del azufre en el suelo.	9
Figura 3. Diagramas esquemáticos de las membranas celulares.	10
Figura 4. Etapas de colonización de las superficies del suelo por los microorganismos.	11
Figura 5. Biopelícula sobre una superficie metálica.	12
Figura 6. Degradación de la materia Orgánica en el suelo.	13
Figura 7. Metabolismo BSR.	14
Figura 8. Ruta metabólica del azufre en BSR y BTR.	15
Figura 9. Ciclo del Hidrógeno en la BSR.	16
Figura 10. Perfil de concentración del oxígeno en la biopelícula.	20
Figura 11. Desarrollo de MIC (a) Reconocimiento de la superficie. (b)Formación de la colonia. (c) Formación de nódulo.	21
Figura 12. Diagrama de Nyquist.	25
Figura 13. Diagrama de Bode. Módulo de impedancia vs. Frecuencia.	25
Figura 14. Diagrama de Bode. Ángulo de fase vs. Frecuencia.	25
Figura 15. Desarrollo metodológico.	26
Figura 16. Metodología de inoculación en la cinética.	30
Figura 17. Montaje para el ensayo de hermeticidad.	32
Figura 18. Montaje para pruebas de corrosión.	34
Figura 19. Relación C:N para las 15 muestras de suelo.	45

Figura 20. Relación $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ para las 15 muestras de suelo.	46
Figura 21. Procedimiento de preparación de inóculo para desarrollo de experiencias de cinética.	47
Figura 22. Cambio de concentración de sulfato y tiosulfato, después de 6 días.	52
Figura 23. Consumo de sulfato, tiosulfato y lactato para los medios A, B y C.	53
Figura 24. Producción de H_2S durante la cinética.	53
Figura 25. Empaques de caucho utilizados para mejorar la distribución de la fuerza de apriete, Empaque de caucho utilizado para asegurar sello entre teflón-placa metálica.	55
Figura 26. Empaque de caucho utilizado para asegurar sello entre cuerpo de vidrio-teflón.	55
Figura 27. a) Presencia de fugas b) Cuerpo de vidrio agrietado.	57
Figura 28. Mariposas para apriete superior (rojo). Tuercas apriete inferior (Azul).	58
Figura 29. Reducción del diámetro de la pared de vidrio interna.	58
Figura 30. Esquema Causa-Efecto para el agrietamiento de la celda.	59
Figura 31. Inclusiones no metálicas observadas en el material de las muestras P1 y P2. Sin ataque químico. 100X.	60
Figura 32. Microestructura uniforme compuesta por granos equiaxiales de ferrita y de perlita, característicos de aceros al carbono en estado normalizado. Ataque químico Nital 2%.	61
Figura 33. Área de exposición lámina de acero API 5L Gr. B. Probeta P1. 5x.	63
Figura 34. Área de exposición lámina de acero API 5L Gr. B. Probeta P1. 50x.	63
Figura 35. Área de exposición lámina de acero API 5L Gr. B. Probeta P2. 50x.	63
Figura 36. Montaje No. 1 Celda anaeróbica con inoculación de BTR al 10%.	64
Figura 37. Montaje No. 2 Celda sin inoculación de BTR.	64
Figura 38. a) Celda blanco contaminada b) Ensayo Anerobios Totales c) Recuento bacteriano positivo.	65
Figura 39. Gráficos de Nyquist Celda No. 1 en el intervalo de 0 – 110 horas.	65

Figura 40. Gráficos de Nyquist Celda No. 1 En el intervalo de 158 – 278 horas.	66
Figura 41. Variación del potencial de circuito abierto en el rango de tiempo aplicado para los ensayos de EIS.	67
Figura 42. Diagrama de Nyquist, 254 horas.	67
Figura 43. Gráfico de Bode. Celda No. 1, Frecuencias vs impedancias.	68
Figura 44. Gráfico de Bode. Celda No. 1, Frecuencias vs ángulo de fase.	69
Figura 45. Variación de R_p para los diferentes tiempos de ensayos.	70
Figura 46. Variación de la velocidad de corrosión (mpy) para los diferentes tiempos de ensayos.	71
Figura 47. Superficie metálica acero API 5L Grado B expuesta a medio de cultivo inoculado con BTR. 20x.	72
Figura 48. Depósitos de los productos de corrosión acumulados en el perímetro del área expuesta a)100X b) 200X.	72
Figura 49. Presencia de sitios claros indican la formación de biopelícula en el perímetro del área expuesta a)1000X b) 2100X.	73
Figura 50. Perfil de profundidad para lámina de acero API 5L Grado B, Zona periférica.	74

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Método Walkley – Black.	84
Anexo B. Análisis de nitrógeno Kjeldhal.	85
Anexo C. Método de dilución seriada	86
Anexo D. Reactivos utilizados en la caracterización de los suelos y en las experiencias cinéticas	87
Anexo E. Concentraciones de iones lactato, tiosulfato, sulfato y sulfuro de hidrógeno medidos durante el desarrollo de las experiencias cinéticas	88
Anexo F. Planos de la celda anaeróbica	89
Anexo G. Valores de resistencia de polarización, velocidad de corrosión y potenciales de circuito abierto, obtenidos de la aplicación de la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	99

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BACTERIAS TIOSULFATO REDUCTORAS EN LA CORROSIÓN DE TUBERÍAS ENTERRADAS EN SUELOS DE LOS CAMPOS DE PRODUCCIÓN DEL ÁREA DE NEIVA*

AUTORES: GARRIDO PRADA, Sergio Andrés; BERNAL RODRÍGUEZ, Andrea Milena**

PALABRAS CLAVES: Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC), Bacteria Tiosulfato Reductora (BTR), Sulfuro de hidrógeno (H₂S), Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS), Microscopía Cofocal.

RESUMEN

Este proyecto estudió la corrosión influenciada microbiológicamente por bacterias tiosulfato reductoras (BTR) en la superficie externa de tuberías enterradas, construidas en acero API 5L Grado B, utilizadas para el transporte de crudo en los campos de producción de ECOPEPETROL, S.A ubicados en el área de Neiva.

Para comprender el comportamiento de las BTR en los suelos, y su interacción con el acero, se estudiaron algunas de las propiedades fisicoquímicas más relevantes del suelo, para determinar que variables son las más influyentes en el crecimiento y desarrollo metabólico de las BTR. Se realizaron experiencias de crecimiento cinético, utilizando como variables la relación sulfato/tiosulfato, siendo éstos los compuesto utilizados por las BTR como aceptores de electrones en la cadena de transporte de electrones, y la concentración de lactato utilizado como fuente de energía por las BTR; en esta etapa se evaluó la producción de sulfuro de hidrógeno (producto metabólico de las BTR), responsable de desencadenar la MIC al reaccionar con los iones de Fe²⁺ disueltos. Se estudió la velocidad de corrosión implementando espectroscopia de impedancia electroquímica, por un tiempo de 278 horas. Por ultimo, se examinó por medio de Microscopía Cofocal la formación de la biopelícula y los productos de corrosión depositados en la superficie de tubería expuesta a un electrolito con BTR.

A pesar de observar la formación de una biopelícula en la periferia del área expuesta al electrolito con BTR, las velocidades de corrosión fueron mínimas, sin embargo, la deposición de productos de la corrosión indican el principio de la degradación estructural del acero.

* TRABAJO DE GRADO, MODALIDAD INVESTIGACIÓN.

** FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS, ESCUELA DE QUÍMICA; FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS, ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
Director: Ph.D. Rodrigo Torres Sáez, Ing. MsC. Custodio Vásquez Quintero.

TITLE: EVALUATION OF THE EFFECT OF THIOSULPHATE REDUCING BACTERIA ON CORROSION OF BURIED PIPELINES IN SOILS OF PRODUCTION FIELDS IN NEIVA'S AREA.

AUTHORS: GARRIDO PRADA, Sergio Andrés; BERNAL RODRÍGUEZ, Andrea Milena**

KEY WORDS: Microbiology Influenced Corrosion (MIC), Thiosulphate Reducing Bacteria (BTR), Hydrogen sulfur (H₂S), Electrochemical Impedances Spectroscopy (EIS), Cofocal Microscopy.

ABSTRACT

This project studied the Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) generate by Tiosulfate Reducing Bacteria (TRB) and have presented on the buried pipelines surfaces, that was constructed with API 5L Grade B steel, and it is used to oil transport in the ECOPETROL'S production fields, who are located in the Neiva's area.

To understand the behavior of TRB in soils and its interaction with the steel, some of the most important physicochemical properties of the soil were studied, to determine which factors are the most influents in the growing and metabolism of TRB. To continue with this, kinetic growing experiences were done, choosing as factors the sulfate/thiosulfate concentration, being this used as the final acceptor electron in the electron chain, and the lactate concentration as the main energy source of TRB; from this point was determined the sulfur hydrogen production, because it is the metabolic product of TRB and the main responsible to initiate the MIC, at the moment it reacts with the Fe²⁺. The next step was to study the corrosion rate using Spectroscopy Impedance Electrochemical for a period of 278 hours. At the end of the test, was examined the biofilm formation and the corrosion products deposited on the metallic surface using the Cofocal Microscopy Technique.

The results showed that, even with in the presence of the biofilm formation around the exposed area, the corrosion rates were less significant, having no appreciation of the problem of MIC, nonetheless corrosion's products show the start of the damage on surface of the stell.

*UNDERGRADUATE DEGREE WORK

**BASIC SCIENCES FACULTY, CHEMISTRY SCHOOL; PHYSICAL – CHEMICAL ENGINEERING FACULTY, METALLURGICAL ENGINEERING SCHOOL

Directors: Ph.D. Rodrigo Torres Sáez; Eng. MsC. Custodio Vásquez Quintero.

1. INTRODUCCIÓN

La corrosión influenciada microbiológicamente (MIC) es un fenómeno permanente en la industria petrolera, siendo la actividad producida por los microorganismos la responsable de un 30 - 40 % de los problemas totales de corrosión. Por esta razón, se ha convertido en prioridad identificar las causas y diseñar estrategias de control para disminuir costos generados por la acción corrosiva de las bacterias.

Las bacterias reductoras de sulfato (BSR) y tiosulfato (BTR), son los organismos más asociados al fenómeno MIC, siendo el sulfuro de hidrógeno (H_2S), producto metabólico generado por las bacterias, el directo implicado en la degradación de la superficie del metal, disminuyendo la integridad estructural de las tuberías y elementos metálicos mediante reacciones de depolarización catódica causadas por la alteración de potenciales de óxido-reducción del entorno.

Los detalles de los mecanismos de biocorrosión han sido pobremente estudiados. Las BSR y sus rutas metabólicas de síntesis de H_2S son las más conocidas. Sin embargo, las BTR además de degradar el metal, pueden promover una mayor velocidad de penetración en el metal. No obstante, se dispone de muy poca información sobre el comportamiento de las BTR, en especial en suelos, por lo que la identificación de estas bacterias en territorio Colombiano se convierte en un importante tema de estudio. Las similitudes morfológicas y fisiológicas entre las BTR y las bacterias sulfato reductoras (BSR) son altas [12, 44, 47], permitiendo el desarrollo de este trabajo mediante la comparación de las BTR con estudios teóricos y experimentales realizados a las BSR. Estos ensayos incluirán pruebas de crecimiento, pruebas de consumo de sustrato y nutrientes, y la aplicación de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), para evaluar el daño inducido por las BTR en el acero.

La infraestructura de oleoductos de ECOPETROL ha experimentado una degradación en las tuberías enterradas entre una profundidad de 1.10 – 1.40 m en suelos del área Neiva. La identificación de BTR en dichos suelos ha conducido a la hipótesis que dicha corrosión puede ser promovida por la presencia de este tipo de bacterias. Por este motivo el objetivo principal en este trabajo fue evaluar los efectos generados por la presencia de bacterias tiosulfato reductoras sobre la superficie del acero API 5 L.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 SUELOS

Los suelos son materiales complejos que reflejan la variabilidad de la roca madre y los residuos orgánicos que la conforman. Actúan como matriz orgánico-mineral para consorcios de células vivas (macro y microorganismos), los cuales no son constantes en concentración y especie, y varían con el tiempo y el lugar.

Los factores que influyen en la distribución microbiana del suelo pueden ser intrínsecos o extrínsecos. Los valores intrínsecos están relacionados con la estructura y función de los microorganismos. Entre estos se incluyen [11]:

- Mecanismos de presencia.
- Tamaño.
- Motilidad.
- Morfología.
- Cualidades Bioquímicas.

Los factores extrínsecos dependen del suelo y el ambiente, se relacionan con las condiciones generales del entorno físico, entre las cuales se destacan [11]:

- Estructura del suelo.
- Atmósfera del suelo.
- Precipitaciones y agua del suelo.
- pH del suelo.
- Temperatura.
- Humedad relativa.
- Composición de nutrientes.

- **Materia orgánica**

La materia orgánica presente en el suelo está constituida por ácidos orgánicos, hidratos de carbono, ésteres, éteres, alcoholes, resinas y compuestos nitrogenados [9]; incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, así como tejidos y células de organismos vivos [6].

Los efectos que tiene el material orgánico sobre el suelo son [39]:

- Mantener una buena estructura que facilite la retención de agua.
- Retener nutrientes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Nh_4^+ , Mn^{2+} , Fe^{3+} y Cu^{2+} , mediante intercambio catiónico.
- Liberar nitrógeno, fósforo, azufre y trazas de elementos por mineralización.
- Adsorber material orgánico tóxico (pesticidas, residuos industriales, etc.)

Los microorganismos del suelo, la humedad y la temperatura descomponen los materiales orgánicos, abasteciendo la demanda de carbono como fuente de energía o materia prima para la síntesis de biomasa.

En el ciclo del carbono en el suelo (Ver Fig. 1), una vez incorporada la materia orgánica, comienzan su función bio-degradadora los hongos y bacterias, siendo los hongos los microorganismos más eficientes con un 30 – 40 %, comparado con bacterias aeróbicas que presentan una eficiencia entre 5 – 10 % y bacterias anaeróbicas entre 2 – 5 % [11].

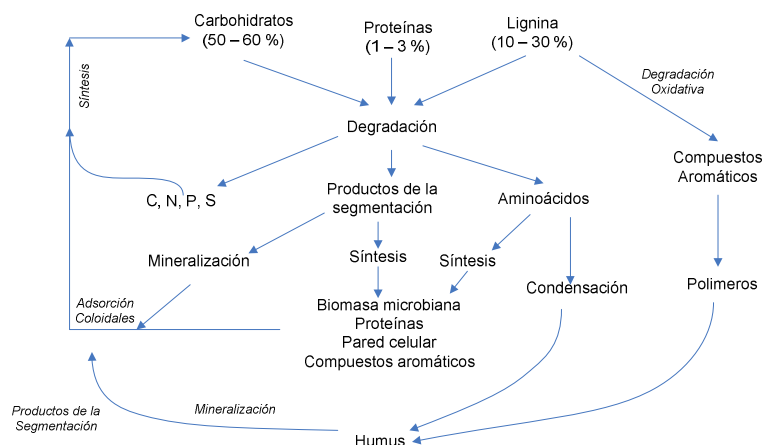


Figura 1. Ciclo del carbono en el suelo y formación de materia orgánica y humus [11].

La mineralización y la inmovilización del carbono y nitrógeno provenientes de la degradación de materia orgánica, ocurren simultáneamente. Dependiendo de la relación carbono – nitrógeno del suelo puede definirse la actividad de los microorganismos frente a estos factores. En una relación C:N baja, hay suficiente nitrógeno para convertir el carbono disponible en biomasa, lo que genera mineralización de materia orgánica; a relaciones C:N altas, los microorganismos no cuentan con la cantidad suficiente de nitrógeno lo que produce inmovilización de nitrógeno [11].

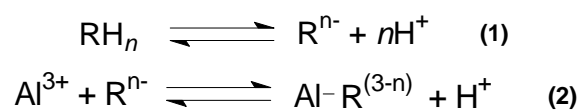
- **Acidez Activa: pH**

La acidez es la mayor limitación en la productividad de un suelo, así mismo juega un papel indispensable en el desarrollo de colonias bacterianas. El proceso de acidificación está determinado por el entorno, prácticas agrícolas, industriales y contaminación ambiental.

El pH sirve de diagnóstico y medida química en suelos. Por evaluación de este parámetro es posible ver los efectos de altas o bajas cantidades de H_3O^+ ó OH^- , sobre microorganismos y plantas. Por lo general entre pH 5.0 – 5.5 se encuentran solubles ciertos metales como Al^{3+} , Mn^{2+} , que pueden convertirse en biológicamente tóxicos. Por el contrario, a pH 7, pueden encontrarse solubles muchos micronutrientes como el Zn^{2+} . El pH alrededor de 8.5 se debe a un intercambio de sodio, mientras que el pH 3 indica generalmente la presencia de metales sulfurados [6].

Una acidez o alcalinidad excesiva hacen del suelo un terreno desfavorable al crecimiento de microorganismos, por lo general, los microorganismos son metabólicamente intolerantes a pH bajo [11].

Los ácidos orgánicos húmicos y fúlvicos, productos de la descomposición de la materia orgánica en el suelo, tienen una alta afinidad por la formación de complejos con el aluminio, razón por la cual son disociados y como resultado de esta reacción disminuye el valor de pH del suelo (ver ecuación 1 y 2) [39].



- **Humedad**

La humedad representa la cantidad de agua contenida en el suelo. Su distribución es de dos formas: agua molecular, la cual es adsorbida de la atmósfera y se deposita en la superficie de las partículas de suelo; la segunda forma es como agua capilar la cual ocupa los microporos entre partículas de suelo debido a la tensión superficial [31].

Las funciones que tiene el agua en el suelo son:

- Estabilizar la estructura (capacidad de formar puentes de hidrógeno).
- Controlar el pH.
- Controlar la temperatura (debido a la alta capacidad calorífica).
- Solubilizar y transportar compuestos (Filtración).
- Controlar el grado de salinidad.
- Ventilar el suelo.

Los factores predominantes que controlan la difusión y movilidad de nutrientes en el suelo son el espesor de la capa de agua y la continuidad de esta capa. A medida que el suelo se seca las capas de agua se adelgazan rápidamente, retardando la difusión. La disminución de la capa de agua genera también una disminución en la movilidad de bacterias y protozoos [11].

- **Textura de suelos**

El material mineral del suelo está compuesto por tres fracciones: arena, arcilla y limo; la distribución de estas fracciones está dada por el tamaño de partícula que las constituye, como se muestra en la Tabla 1 [6].

Tabla 1. Tamaño de partícula de arena, limo y arcilla [6].

Partícula	Tamaño
Arena	0,06-2 mm
Limo (Cieno)	0,002-0,06 mm
Arcilla	< 0,002 mm

La arena, el cieno y la arcilla se unen entre sí y forman agregados, que se caracterizan por no tener un aspecto uniforme. Los espacios entre agregados se denominan poros, los cuales son utilizados como hábitat de microorganismos. Los poros están llenos de agua y gas.

Los gases más importantes de la atmósfera también están presentes en el suelo (N_2 , O_2 , CO_2), pero para el caso del oxígeno, a medida que aumenta la profundidad en el suelo disminuye su concentración. Otros gases como metano, óxido nítrico, etileno y sulfuro de hidrógeno, son el producto de la acción metabólica de microorganismos.

La población microbiana de los agregados está regulada por el agua y el tamaño del poro. Los microorganismos suelen ocupar entre 0.2 y 0.4 % del espacio correspondiente a los poros de los agregados [11].

De las tres fracciones de suelo, las arcillas son las que presentan un papel dominante en los microorganismos, debido a la capacidad de éstas, para modificar el entorno microbiano favorable por medio de interacciones directas microbio-iones. Además, tienen la capacidad de retener nutrientes como K^+ y NH_4^+ . Sin embargo, las arcillas pueden generar efectos negativos en el crecimiento de los microorganismos, debido a la alta retención de agua (el agua adsorbida queda atrapada entre las láminas de arcilla), disminuyendo la movilidad y reduciendo la actividad metabólica [11].

Por lo general, durante el proceso de formación de partículas de suelo, queda atrapada gran cantidad de organismos entre dichas partículas; estos organismos son liberados a través del tiempo por flujo de agua, lo que genera versatilidad en la composición o concentración de microorganismos en los suelos, en un momento determinado.

- **Conductividad de suelos**

La salinidad o concentración de sales disueltas, está directamente relacionada con la conductividad eléctrica, basado en la facilidad con la cual la corriente eléctrica es conducida a través de una solución, siendo proporcional a la cantidad de iones en la solución [39].

La capacidad de transportar corriente por un mol de aniones o cationes se denomina conductancia equivalente, este valor es medido en soluciones diluidas donde las sales están disociadas por completo. En conclusión, la conductancia de un suelo es el resultado de la sumatoria de las conductancias contribuidas por cada especie de las disociadas [39].

Los iones presentes en el suelo son el resultado de procesos como: la mineralización de material orgánico por la acción de microorganismos, el resultado de intercambio catiónico en el interior de las láminas de arcilla o la difusión que genera el movimiento del agua entre poros [39].

El inverso de la conductividad es la resistividad, y es posible clasificar la corrosividad del suelo a partir de los siguientes rangos de resistividad, los cuales son mostrados en la Tabla 2:

Tabla 2. Grado de corrosividad del suelo según su resistividad [16].

Resistividad (Ohm-cm)	Grado de corrosividad
0 – 1000	Muy corrosivo
1000 – 2000	Corrosivo
2000 – 10000	Moderadamente Corrosivo
>10000	Poco Corrosivo

- **Ciclo del azufre en el suelo**

El ciclo del azufre en el suelo es un complejo conjunto de reacciones de óxido-reducción, con depósitos orgánicos, inorgánicos y gaseosos, como se ilustra en la Figura 2. El sulfato es el compuesto inorgánico de azufre que se encuentra principalmente en ambientes aeróbicos; el sulfuro es la forma de azufre inorgánico más importante en ambientes anaeróbicos [11].

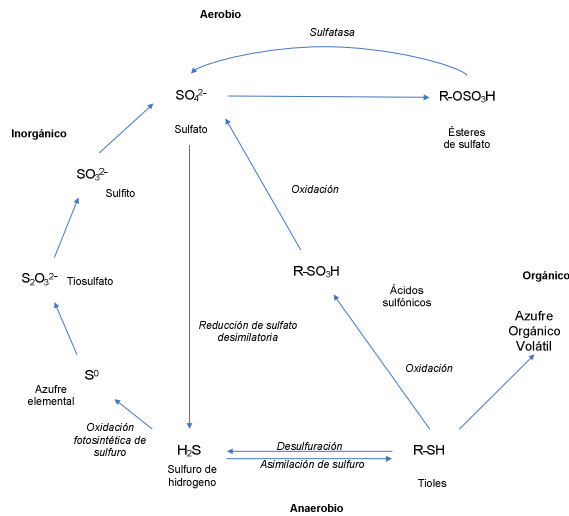
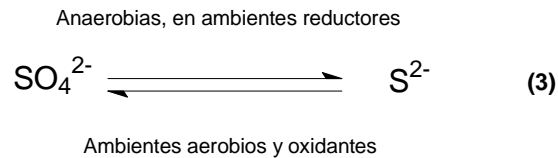


Figura 2. Ciclo del azufre en el suelo [11].

Las transformaciones del azufre en el suelo son [11]:

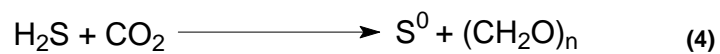
- Transformaciones inorgánicas (ver ecuación 3).

La oxidación del azufre libera energía.



- Transformaciones fotosintéticas (ver ecuación 4) [11]:

En ambientes anaerobios y luminosos el azufre es donador de electrones.



- Transformaciones orgánicas – inmovilización/asimilación (ver ecuación 5):

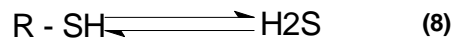
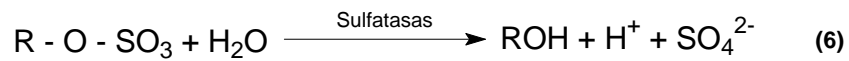
En ambientes aerobios y anaerobios el azufre se transforma de forma inorgánica a orgánica. La asimilación del sulfato es un proceso reductor.



Una vez asimilado por los microorganismos, el azufre ya no está disponible para las reacciones.

- Mineralización (ver ecuación 6,7 y 8). [11]:

La transformación del azufre presente en compuestos orgánicos disponibles para rutas metabólicas de microorganismos se produce mediante la acción enzimática.



2.2 BACTERIAS TIOSULFATO/SULFATO REDUCTORAS

Las bacterias tiosulfato reductoras (BTR) y sulfato reductoras (BSR) son bacterias anaeróbicas, generalmente Gram negativas, Gram positivas (ver figura 3), mesófilicas o termófilas [44] que emplean en su ciclo de respiración el tiosulfato y el sulfato, respectivamente, como aceptores de electrones [32, 51], generando como producto metabólico sulfuro de hidrógeno (H₂S), agente corrosivo en el proceso de MIC (Microbiological Influence Corrosion) [40, 41, 52]

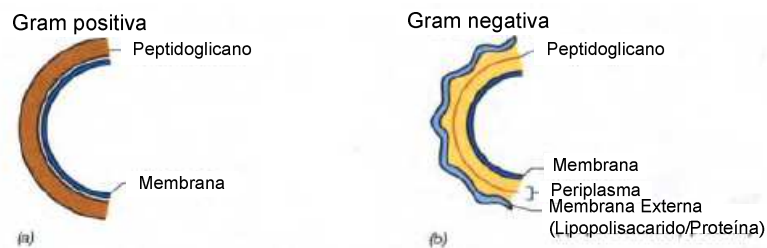


Figura 3. Diagramas esquemáticos de las membranas celulares [7] a) Membrana Gram Positiva b) Membrana Gram negativa

Los microorganismos no están regularmente distribuidos en la superficie de los minerales del suelo, y suelen encontrarse en microcolonias que pueden convertirse en biopelículas. La distribución microbiana no ocurre de forma continua, y tiende a formar bloques metabólicamente activos, tipo oasis, favorables al crecimiento [11].

La formación de biopelículas se puede dividir en cuatro etapas: la primera es el posicionamiento de los microorganismos en la superficie a adherirse; la segunda es la adhesión de los microorganismos, que puede ser reversible entre ellos o irreversible una vez entran en contacto con la superficie a colonizar; la tercera etapa es la fijación, cada organismo tiene su método de fijación, puede ser por medio de sustancias poliméricas excretados EPS [3, 51] o por fibrillas; la cuarta etapa es la colonización, en la cual se forman conglomerados de microorganismos sucesivamente, hasta formar una biopelícula; las etapas de formación de biopelícula se muestran en la figura 4

La adhesión de las bacterias a las superficies sólidas, en especial las BSR, se debe a proteínas que pueden interaccionar con la superficie [57, 59]; una vez adherida la bacteria a la superficie comienza el proceso de colonización. En la actualidad se están desarrollando inhibidores proteicos con el fin de evitar la adhesión de las bacterias, en el caso de tuberías metálicas, este tratamiento busca reducir los efectos de los productos metabólicos (H_2S).

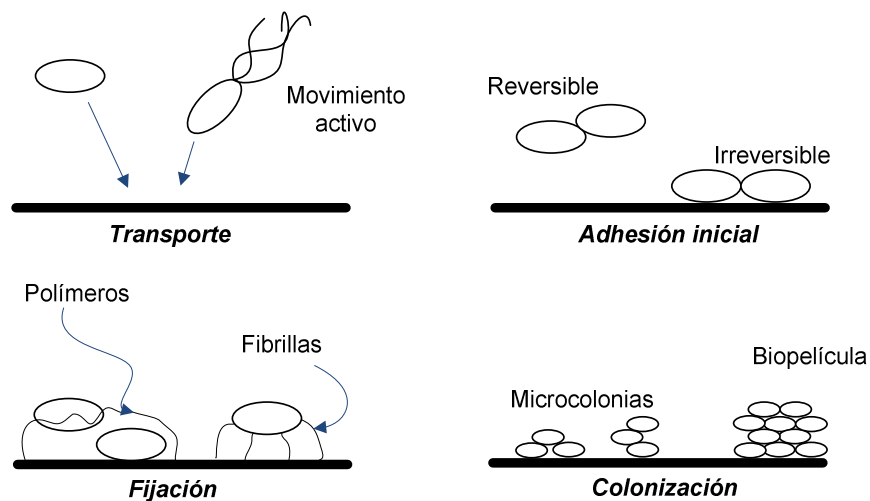


Figura 4. Etapas de colonización de las superficies del suelo por los microorganismos [11]

En el interior de la biopelícula se forman estratificaciones simbióticas donde diferentes clases de microorganismos consumen y generan nutrientes. Las estratificaciones dependen de la concentración de oxígeno en cada una de ellas. En las capas internas, donde existe baja concentración de oxígeno se encuentran las bacterias anaeróbicas, mientras que en las capas intermedias se encuentran bacterias facultativas, con la capacidad de usar oxígeno u otra sustancia como aceptor de electrones. Finalmente, en las capas superiores, donde existen altas concentraciones de oxígeno, se encuentran las bacterias aeróbicas (Ver Figura 5) [32, 33].

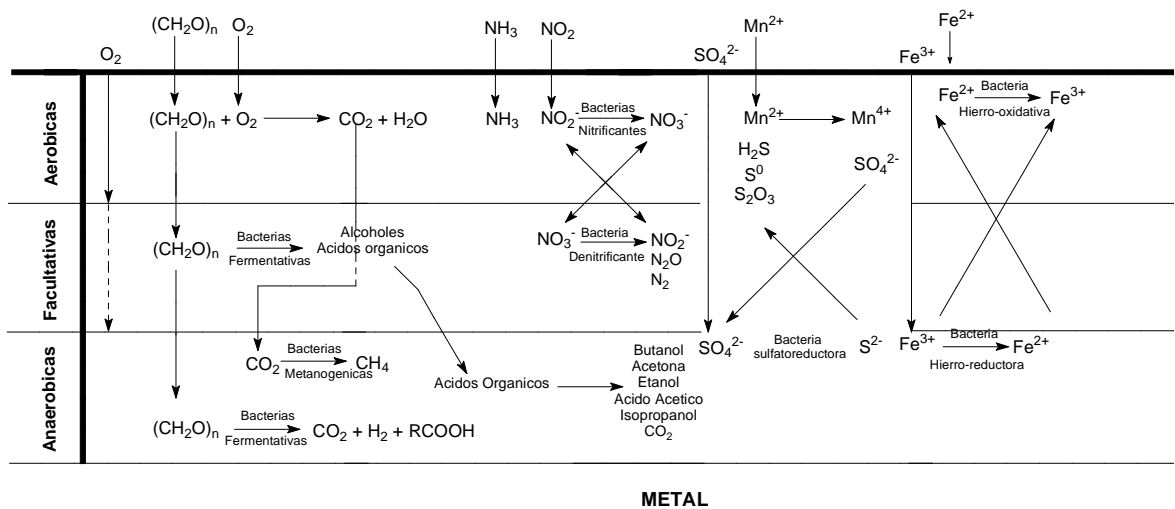


Figura 5. Biopelícula sobre una superficie metálica [33].

Las BTR y BSR son bacterias que tienen la capacidad de formar biopelículas si encuentran un soporte sólido donde adherirse como lo son las partículas de suelo o la superficie metálica de tuberías o materiales enterrados [3, 32, 41].

Existe una cercanía metabólica entre BTR y BSR, con la diferencia que la producción de sulfuro de hidrógeno en las BTR, es a partir de la reducción de tiosulfato y no del sulfato [11, 12, 45, 59], razón por la cual es posible cultivar en laboratorio BTR, en medios de crecimiento para BSR con la sustitución de sulfato por tiosulfato, manteniendo el mismo sustrato (Lactato, por lo general) y micronutrientes para el crecimiento.

Las BTR y las BSR son bacterias heterotróficas especializadas, que crecen en entornos anaeróbicos utilizando como fuente de energía (donador de electrones para la cadena de transporte de electrones) compuestos de carbono de bajo peso molecular, siendo el lactato y el acetato los más utilizados [54, 55]. En el suelo, estos compuestos aparecen por causa de la degradación de materia orgánica por bacterias fermentadoras (Ver Figura 6) [10].

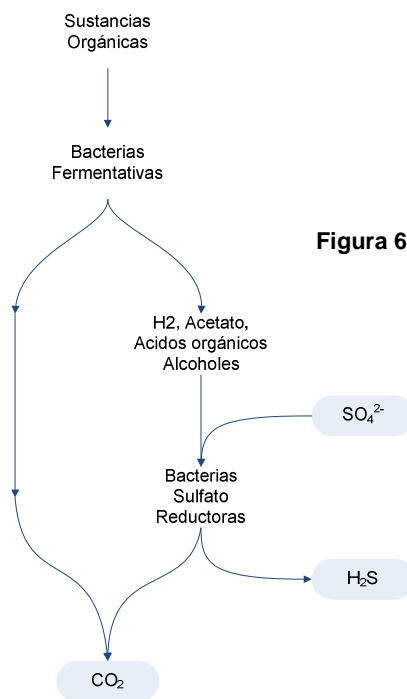


Figura 6. Degradación de la materia Orgánica en el suelo [8].

Algunas clases de BSR utilizan como fuente de energía el H_2 , como aceptor de electrones el sulfato, y como fuente de carbono el CO_2 [34, 55].

El estudio del metabolismo de las BTR y las BSR es muy reducido, siendo el metabolismo de las BSR el único descrito de las dos. Aunque se sabe que la transformación de sustratos a CO_2 y la reducción de sulfato o tiosulfato hasta sulfuro, se produce mediante acción enzimática, la cadena de transferencia de electrones es poco conocida, si se compara con otros modos de respiración anaeróbica como la reducción de nitrato o la metanogénesis. La cadena de transporte de electrones, con el uso de sulfato, muestra grandes diferencias con otros sistemas, ya que los organismos reductores de sulfato no

cuentan con complejos enzimáticos encontrados en otras bacterias, como complejo I (NADH: quinona oxidoreductasa) o complejo *bc1* (quinol: citocromo c oxidoreductasa) [34]. Los componentes de la cadena de transporte de electrones, para las BTR y BSR, asociados con la conservación de la energía no han sido identificados. Contrario a muchos microorganismos, las reductasas finales de los organismos reductores de sulfato se ubican en el citoplasma, por lo tanto no están involucradas directamente en el transporte de electrones a través de la membrana (Ver Figura 7) [38].

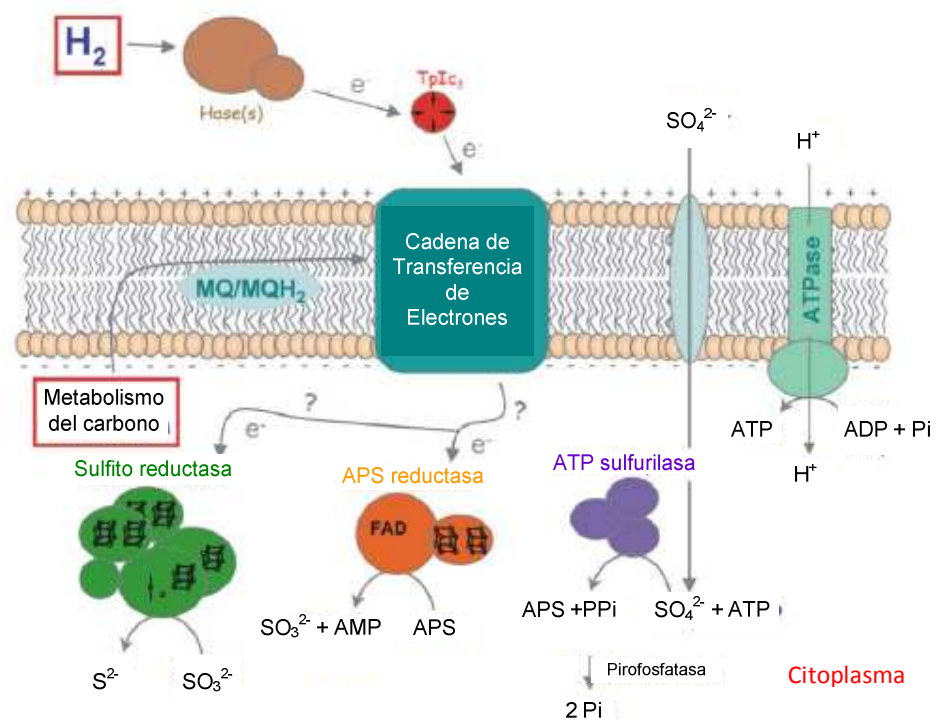


Figura 7. Metabolismo BRS [38].

El sulfato es un aceptor de electrones menos favorable que el oxígeno o el nitrato; a causa del menor rendimiento energético. La producción de biomasa de un microorganismo es menor cuando crece con SO_4^{2-} que cuando crece con oxígeno o nitrato [34]. La reducción de sulfato a H_2S se hace a través de fases intermedias. Así, para ser reducido el sulfato, éste debe primero ser activado primero con ATP produciendo Adenosin Fosfosulfato (APS). Esta reacción es catalizada por la enzima ATP sulfurilasa.

El APS es el primer aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones y es reducido por la APS reductasa a sulfito, el cual es a su vez reducido por la sulfito reductasa. Posteriormente, la cadena reductora continúa con la posible intervención de otras enzimas catalizadoras desconocidas hasta el momento [38, 55]. La figura 8 muestra el ciclo del azufre como sulfato y como tiosulfato dentro de la bacteria. Parte del azufre reducido es excretado como H_2S y parte es conservado en el interior de la célula para formación de biomasa (proteínas) [34].

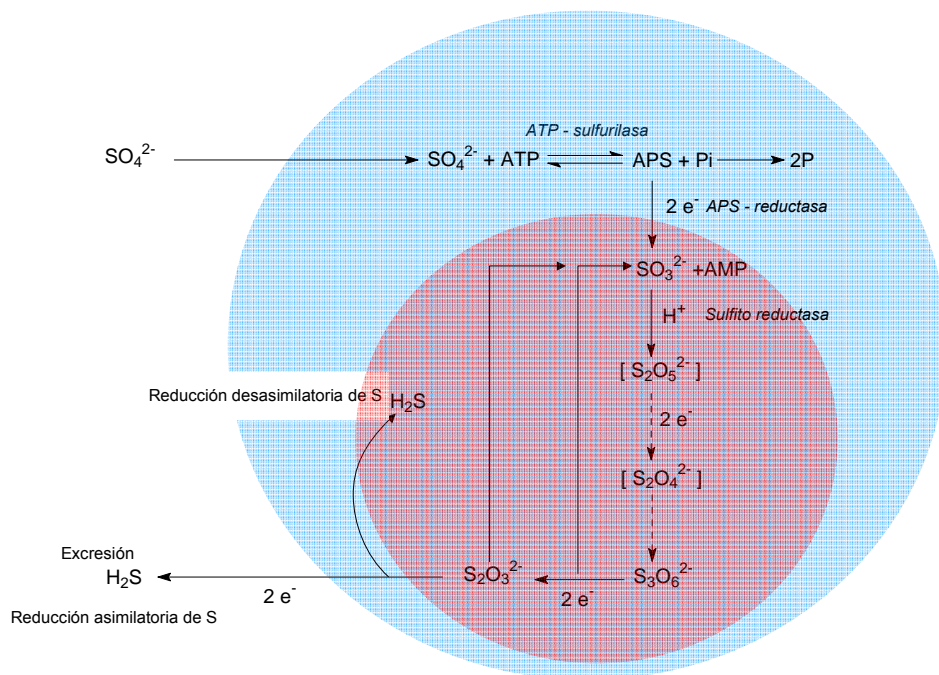


Figura 8. Ruta metabólica del azufre en ■ BSR y ■ BTR [32, 34, 38]

Las bacterias prefieren el uso de tiosulfato como aceptor de electrones debido a que no necesita ser activado con ATP. En entornos con presencia de sulfato y tiosulfato las BSR y BTR prefieren utilizar primero el tiosulfato como aceptor de electrones [55].

La enzima hidrogenasa parece desempeñar un papel esencial en la reducción del sulfato, interviniendo en la transformación de lactato a acetato mediante donación de electrones [60]. El H_2 producido atraviesa la membrana citoplasmática y es oxidado por la hidrogenasa periplasmática iniciando una fuerza motriz protónica. El rendimiento de crecimiento de las BSR, indica que por cada SO_4^{2-} reducido se genera un ATP, y por cada

molécula de lactato o piruvato oxidada a acetato se genera otra molécula ATP [34]. Es por ello que estas son vías por las cuales las bacterias recuperan la energía gastada en la activación del sulfato. La figura 9 explica el ciclo del hidrógeno propuesto por Odom y Peck (1981) acompañados con la oxidación de lactato [38].

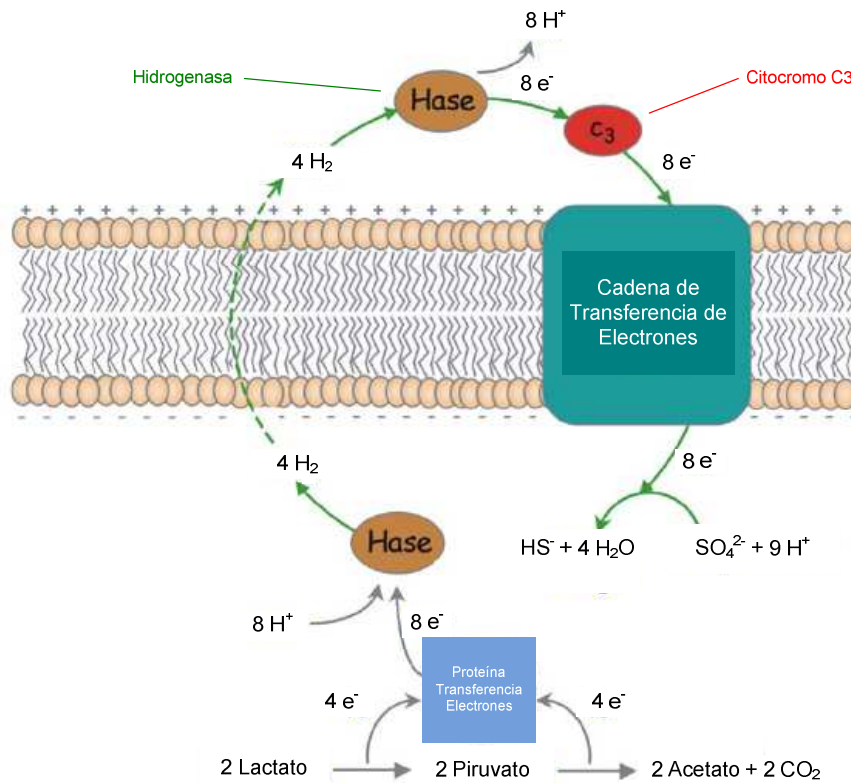


Figura 9. Ciclo del Hidrógeno en la BSR [38].

La presencia de sulfuro de hidrógeno, en entornos bacterianos, no es únicamente determinada por la velocidad de producción por parte de las bacterias, al reducir el sulfato, sino también por el pH del entorno. El sulfuro tiende a precipitar rápidamente con los metales presente y su rápida oxidación química y biológica lo convierte en una sustancia muy lábil. Solo las especies protonadas del sulfuro son volátiles (H_2S), a pH neutro muchos sulfuros están presentes como bisulfuros (HS^-), mientras que los sulfuros (S^{2-}) predominan en condiciones alcalinas.

2.3 CORROSIÓN INFLUENCIADA MICROBIOLÓGICAMENTE (MIC)

Los microorganismos han jugado un papel importante en la evolución industrial durante siglos, convirtiéndose en un tema crucial para la supervivencia humana. Los procesos biohidrometalúrgicos han estado relacionados, desde un punto de vista benéfico, a diferentes áreas, tales como la biolixivación de minerales, desulfuración del coque, de petróleo ó en ciclos geológicos como la meteorización y procesos de formación de minerales, ya que trabajar con microorganismos ha resultado ser un método bastante efectivo y económico. Sin embargo, bajo ciertas condiciones específicas, como las que se mencionan en la Tabla 3, las bacterias atacan todo tipo de materiales orgánicos (ej. polímeros) e inorgánicos, entre los que se encuentran metales ferrosos y no ferrosos, afectando en gran proporción la integridad estructural del material y por ende generando altos costos en la prevención y reparación. Este tipo de daño recibe el nombre de corrosión influenciada microbiológicamente, de siglas en inglés MIC. [21, 58]

Tabla 3. Sistemas que promueven la Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC). [21]

MATERIALES	MEDIO
Metálicos	Agua de mar, agua de grifo, agua de procesamiento
Aluminio y aleaciones de Aluminio	Agua desmineralizada, agua subterránea
Aceros no aleados, Aceros de baja y alta aleación	Agua residual, químicos acuosos
Níquel, cobre, aleaciones de cobre, Estaño y zinc	Productos de condensación acuosa en medios orgánicos y medio biológicos.

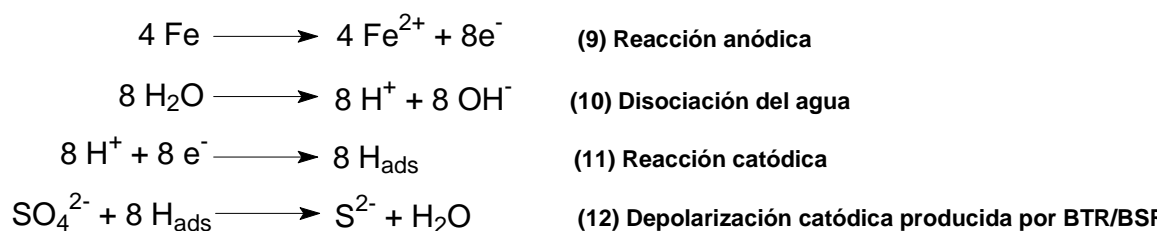
El ataque por MIC en materiales no metálicos se diferencia de otro tipo de materiales, por la producción reacciones netamente químicas, debido a esto, las bases electroquímicas que son utilizadas para investigar los estudios de corrosión en materiales metálicos no son aplicables para materiales cerámicos, plásticos, etc., haciendo la investigación mucho más compleja [21]. Para materiales no ferrosos, la degradación del metal se ve influenciada por la formación de compuestos altamente agresivos como CO_2 , H_2S , NH_3 que atacan la superficie metálica, generando picaduras o una corrosión generalizada [50].

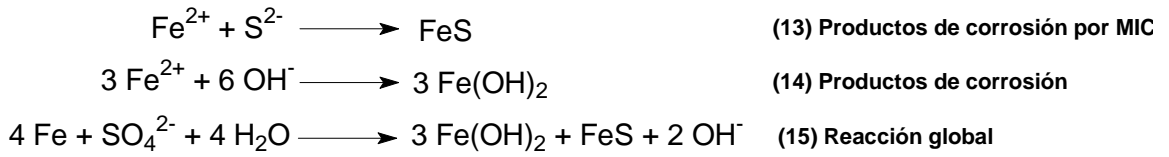
La corrosión microbiana en materiales metálicos se presenta como un proceso electroquímico natural, donde se involucran reacciones de tipo anódico (oxidación del metal a iones metálicos) y catódico (reducción de algún componente en el ambiente corrosivo) [36]. Estudios realizados específicamente sobre este tipo de corrosión, en diferentes tipos de aceros, han demostrado que la MIC no envuelve una nueva forma de corrosión, por lo que se hace de vital importancia estudiar las condiciones electroquímicas para determinar el daño por MIC y para diferenciarlo de otros tipos de corrosión [36, 51].

La MIC se define como una corrosión ocasionada por el ataque de los microorganismos, presentes en el medio, haciendo indispensable determinar la influencia de los parámetros más significantes que controlan el ambiente. Existen diferentes tipos de microorganismos los cuales forman consorcios bacterianos o biopelículas, y se consideran responsables directos de generar el deterioro del material.

Para el presente trabajo, sólo se estudiará un tipo de bacterias anaeróbicas, las bacterias tiosulfato reductoras (BTR); sin embargo para poder cumplir con los objetivos propuestos, se debe partir de la premisa, que consiste en suponer que el metabolismo de las BTR actúa de forma similar al metabolismo de las BSR [12, 45, 48].

Los fundamentos teóricos que actualmente sustentan el mecanismo de la MIC, se inician desde el año de 1934 cuando Von Wolzogen Kuhr y Van der Vulgt propusieron la teoría de depolarización catódica, la cual afirma que los microorganismos anaeróbicos (BSR y BTR), por medio de la enzima 'hidrogenasa', tienen la capacidad de remover los iones de hidrógeno provenientes de la reacción catódica (ver reacción 11) y que se encuentran adsorbidos a la superficie metálica. Estos microorganismos tienen la capacidad de reducir el sulfato/tiosulfato, de acuerdo a las siguientes reacciones [4, 13, 21]:





Sin embargo, esta es una teoría que se mantenía vigente hasta hace unos años, pero ha ido perdiendo validez, ya que nuevos estudios han demostrado que existen otros factores que pueden contribuir al daño por MIC, que no habían sido tomados en cuenta. Entre estos factores se encuentra el efecto de los sulfuros producidos por las BSR/BTR sobre la reacción anódica, el efecto del sulfuro de hidrógeno sobre la reacción catódica, variaciones en las condiciones del ambiente corrosivo e incluso la formación de otros productos metabólicos corrosivos. Estas teorías se exponen en más detalle en la Tabla 4, donde además se menciona el papel de la enzima hidrogenasa sobre cada una de ellas [36].

Tabla 4. Mecanismos alternativos a la Teoría Clásica de Depolarización Catódica [36].

NOMBRE DE REFERENCIA	MECANISMO	PAPEL DE LA HIDROGENASA
Depolarización por sulfuro de hierro	Formación de una celda galvánica Fe/ FeS, que actúan como puntos específicos para la reducción catódica del hidrógeno molecular	Secundario a través de la regeneración de sulfuro de hierro
Depolarización por sulfuro de hidrógeno	Reducción catódica de sulfuro de hidrógeno producido microbiológicamente: $2 \text{H}_2\text{S} + 2\text{e}^- \longrightarrow 2 \text{HS}^- + \text{H}_2$	Secundario a través de la producción de sulfuro de hidrógeno
Azufre Elemental	Formación de una celda de concentración con azufre elemental actuando como reactante	Secundaria a través de la producción de sulfuro elemental

NOMBRE DE REFERENCIA	MECANISMO	PAPEL DE LA HIDROGENASA
Mecanismo de Iverson	Producción de un metabolito volátil y corrosivo de fosfito de hierro.	Sin definir
Acidificación localizada de ánodos	Acidificación localizada de ánodos debido a sulfuro de hierro, producto de corrosión: $\text{Fe}^{2+} + \text{HS}^- \longrightarrow \text{FeS} + \text{H}^+$	Ninguna

(Continuación. Tabla 4. Mecanismos alternativos a la Teoría Clásica de Depolarización Catódica)

2.4 BIOPELÍCULA

La corrosión influenciada microbiológicamente (MIC) se desarrolla sobre una superficie metálica en una biopelícula, dentro de la cual no existe un sólo tipo de bacterias. Estudios han demostrado que las velocidades de corrosión son mucho más altas en presencia de estas colonias mixtas, que para cultivos puros de microorganismos [3]. La región externa de la biopelícula es una región aireada y la reacción catódica predominante es la reducción del oxígeno; en el caso de regiones anóxicas, ubicadas en el interior de la biopelícula, la reacción catódica es usualmente la evolución del hidrógeno. Fig. 10 [3, 32]:

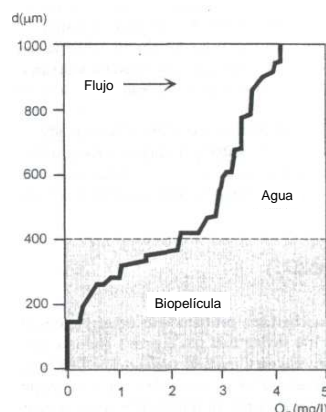


Figura 10. Perfil de concentración del oxígeno en la biopelícula [21].

La biopelícula es analizada como una serie de capas adyacentes a la superficie, que actúa como una interfaz entre el metal y el suelo y/o medio corrosivo, con la capacidad de modificar la cinética de las reacciones anódicas o catódicas presentes. Al igual que la química de cualquier capa pasiva, permitiendo la aceleración o inhibición de la corrosión. Esta biopelícula tiene un papel muy importante en el mecanismo de la corrosión microbiana, pues es aquí donde las BTR desarrollan su actividad metabólica, activando así la producción de sulfuro de hidrógeno que posteriormente reacciona con los iones de hierro para dar lugar a los productos de corrosión, tal como se explicó en las reacciones electroquímicas involucradas en MIC y como se esquematiza en la Figura 11.

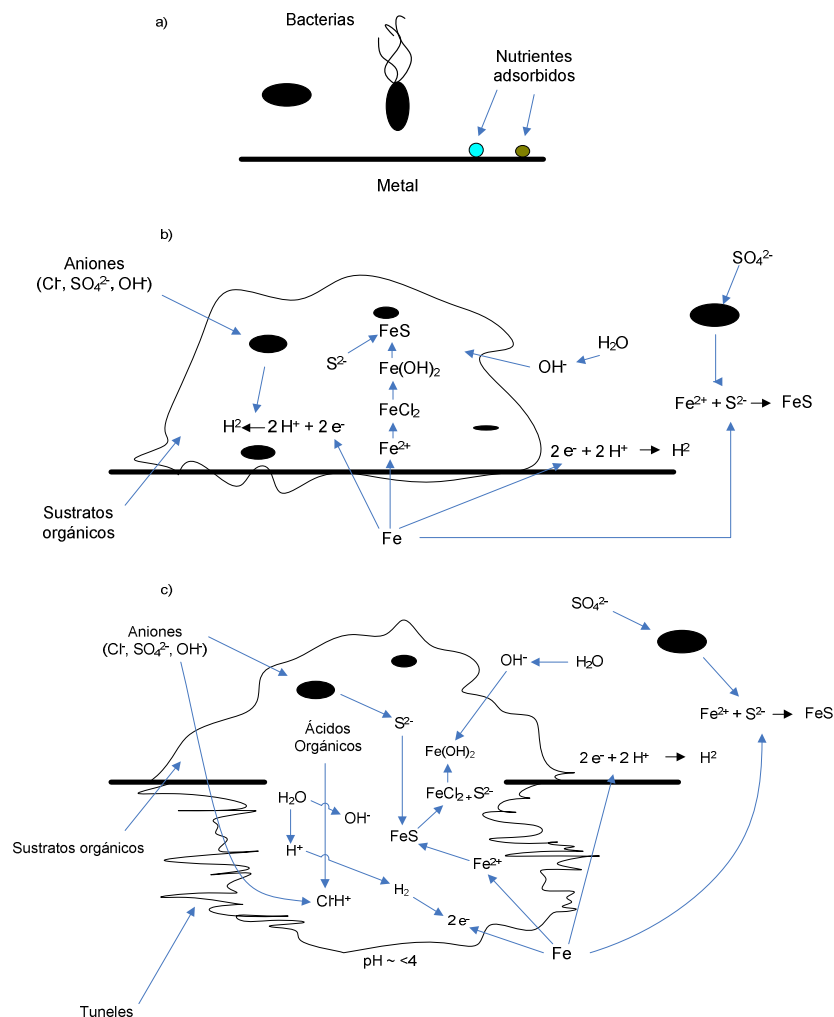


Figura 11. Desarrollo de MIC (a) Fase 1. Reconocimiento de la superficie. (b) Formación de la colonia. (c) Formación de nódulo [21].

La biopelícula es un sistema dinámico donde los procesos de corrosión ocurren en la interfase y a través del metal. El efecto que ésta genera en el entorno circundante al metal puede manifestarse en variaciones de pH (alrededor de 4 en el interior de las picaduras), en los potenciales de óxido-reducción, los cuales están altamente influenciados por la presencia de iones metálicos (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) en la matriz de la biopelícula y que resultan en cambios drásticos de los potenciales de reducción estándar (Ej: Fe (III/II) de +1.2 V a -0.4 V). Otros parámetros afectados por la actividad de la biopelícula son la fuerza iónica (concentración de sales) y oxígeno, sustancias complejas, entre otras, pero que en general son variables que afectan la cinética de los procesos de corrosión en forma aleatoria.

Los microorganismos presentes en dichas biopelículas se encuentran incorporados en una matriz de Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) la cual está compuesta por polisacáridos, proteínas y otras macromoléculas biológicas, caracterizándose por facilitar el desarrollo de las bacterias y por dominar la proporción orgánica de la biopelícula; la composición restante corresponde a un 80-95% de agua y una porción de materia particulada, como arcilla, sustancias húmicas, productos de corrosión, entre otros. La capacidad que tiene la EPS de unir los iones metálicos, es importante para el proceso de MIC, y depende principalmente de las especies bacterianas y del tipo de iones metálicos presentes. [3, 21]

2.5 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE ACEROS API 5L

Los aceros de la gama API 5L son utilizados en la construcción de tuberías soldadas de gran diámetro, para el transporte de hidrocarburos, gases y aguas. Debido a que son metales con microestructuras primordialmente ferríticas, tienen poca templabilidad. Respecto a sus propiedades mecánicas se caracterizan por su elevada ductilidad, buena soldabilidad, elevados valores de tenacidad, resiliencia a bajas temperaturas y buena aptitud al plegado, por lo que se conoce como un material de uso primordial en la industria petrolera.

Teniendo en cuenta la importancia que implica la construcción de gasoductos y oleoductos, no sólo desde un punto de vista económico, sino también de la calidad de los materiales, con el fin que los equipos y tuberías trabajen de manera eficiente, segura y que se vea reflejado en el cuidado de vidas humanas y del medio ambiente, se ha implementado una norma encargada de especificar todo lo relacionado con la correcta construcción de tuberías de línea según la ANSI/API 5L (2007), en cuanto a los procesos de fabricación, criterios de aceptación e inspección de tuberías de línea, por lo que ha tenido en cuenta otras normas relacionadas con el tema como API Spec 5L, ISO 3183-1 (1996), ISO 3183-2 (1996), y ISO 3183-3 (1999), todas relacionadas con los materiales y equipos necesarios en la industria petrolera, petroquímica y de gas natural [1].

Debido a las altas exigencias, en cuanto a las propiedades mecánicas y composición química de los aceros, que la industria petrolera demanda constantemente para el transporte de crudos y gases, la norma API 5L (2007) ha clasificado este tipo de aceros en dos niveles o productos (PSL1 Y PSL2), con requisitos técnicos específicos, dándole más opciones al comprador para que logre suplir sus necesidades. Para el presente proyecto se empleará un acero API 5L GRADO B, el cual se encuentra clasificado en el nivel PSL 1 (Ver Tabla 5) [1].

Tabla 5. Composición química para acero API 5L Grado B PSL 1 [1].

Nombre del acero	Fracción de Masa %							
	C máx.	Mn máx.	P Máx.	min	S máx.	V máx.	Nb máx.	Ti máx.
L245 o B	0,28	1,20	-----	0,030	0,030	d	d	d
TUBERÍAS SOLDADAS								
L245 o B	0,26	1,20	-----	0,030	0,030	c,d	c,d	d

c La suma de Niobio y Vanadio debe ser ≤ 0.06 %

d La suma de las concentraciones de Niobio, Titanio y vanadio deben ser ≤ 0.15 %

f A menos que se requiera de otros acuerdos, la suma de las concentraciones de Niobio, Titanio y vanadio deben ser ≤ 0.15 %

Tabla 6. Propiedades mecánicas para acero API 5L Grado B PSL 1 [1].

Grado de la tubería	Cuerpo de la tubería, con o sin costuras de soldadura		
	Esfuerzo de Fluencia. MPa (psi) Mínimo	Esfuerzo de tensión MPa (psi) Mínimo	Elongación % Mínimo
L245 o B	245 (35 500)	415 (60 200)	C

C La mínima elongación especificada, expresada en porcentaje y aproximada al porcentaje más cercano, debe ser determinado usando la siguiente ecuación:
$$C = \frac{U}{A} \times 100$$

Donde:

C es 1940 usando unidades SI, y 625000 con unidades USC

A Es el área de la sección transversal aplicable a un ensayo de tensión, expresado en milímetros cuadrados.

U es el esfuerzo mínimo de tensión, expresando en Megapascuales (libras por pulgada cuadrada).

Las tuberías PSL 2 cumplen con ciertos requerimientos extras en cuanto a la composición química, dureza y propiedades de tensión que han suplido las necesidades más exigentes en la industria petrolera.

2.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

Es conocida como una técnica electroquímica de corriente alterna, considerada como una prueba pseudo-estacionaria, donde se pueden adquirir datos muy importantes sobre la constitución de la red de elementos resistivos y capacitivos, aplicados sobre las interfases de metal - recubrimiento, electrolito-recubrimiento y metal- electrolito, sin que alcance el estado estacionario, ofreciendo una visión global de los fenómenos de corrosión que trascurren en dichas interfases [5, 37, 42].

La Espectroscopía de Impedancia Electroquímica se caracteriza por proporcionar información sobre las propiedades morfológicas y eléctricas de diferentes estados superficiales, que se producen cuando el metal está en contacto directo con un medio corrosivo como el suelo. En el momento en que ambos elementos interactúan en su interfase, se producen reacciones electroquímicas que aumenta el crecimiento de películas o biopelículas generadas a partir de los productos de corrosión del sistema y que son posibles de analizar por medio de EIS [7, 42].

La práctica de impedancia consiste en una variación sinusoidal de voltaje a varias frecuencias, cercanas al potencial de corrosión (E_{corr}). Los valores obtenidos son analizados con base en datos de unos circuitos equivalentes que permiten obtener una idea precisa sobre la efectividad del recubrimiento sobre la superficie del material. Estos datos equivalentes tienen valores de $10^3 - 10^{10}$ Hz, que corresponden a altas frecuencias e indican un comportamiento capacitivo del recubrimiento. Los valores de $10^{-3} - 10$ Hz corresponde a frecuencias bajas e indican que el metal está expuesto a porosidades o a algún tipo de rompimiento del recubrimiento orgánico protector [37, 42].

Para obtener un registro de los datos obtenidos a partir de la técnica se utilizan los diagramas de Nyquist, Bode y formatos de Admitancia (ver figura 12, 13 y 14).

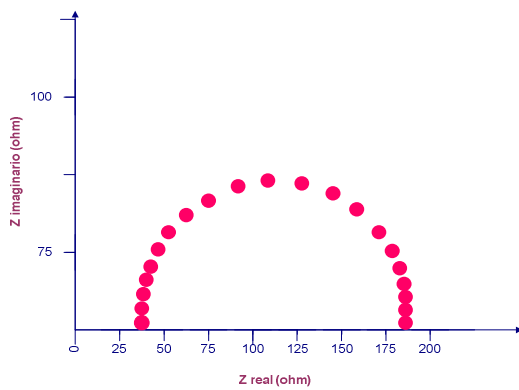


Figura 12. Diagrama de Nyquist [5]

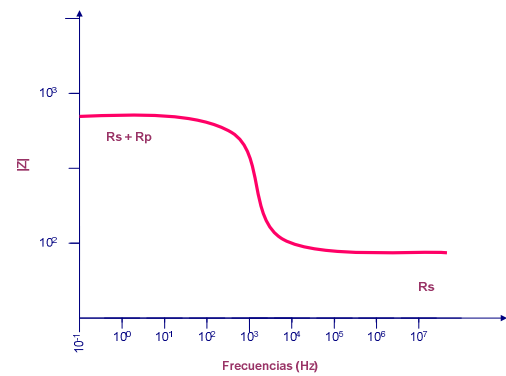


Figura 13. Diagrama de Bode. Módulo de impedancia vs. Frecuencia [5]

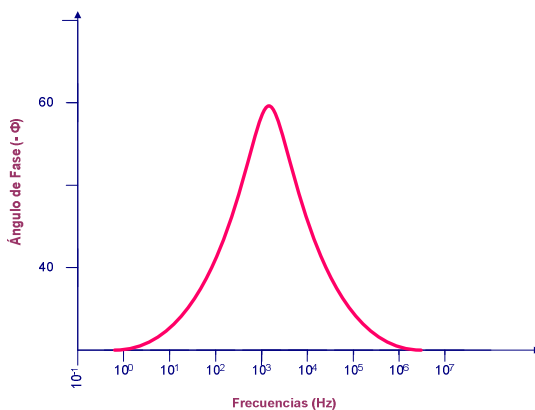


Figura 14. Diagrama de Bode. Ángulo de fase vs. Frecuencia [5]

3. METODOLOGÍA

Este trabajo se realizó en tres etapas, como se muestra en la figura 15: la primera corresponde a una caracterización de las muestras de suelo recolectadas por el ICP en campos de producción del área de Neiva; la segunda etapa fue la elaboración de experiencias de crecimiento bacteriano; por último, aplicación de Espectroscopía de Impedancia electroquímica para mediciones de la velocidad de corrosión.

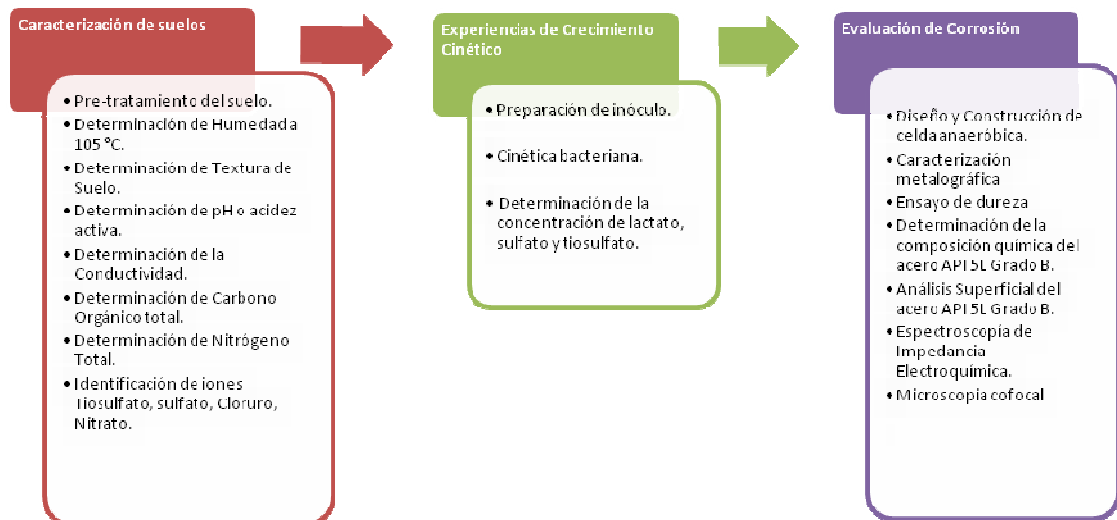


Figura 15. Desarrollo metodológico.

3.1 Caracterización de suelos

Se caracterizaron 15 muestras de suelos provenientes de los campos Dina, Santa Clara, Cebú y Tello, ubicados cerca a Neiva. Estas muestras fueron tomadas a una profundidad entre 1 – 1.40 m a mínimo 1 m de distancia de oleoductos enterrados.

La selección de las propiedades a caracterizar en los suelos se basó en la fisiología de las BTR, que está determinada por los macronutrientes que emplean en mayor porcentaje para producir biomasa, el uso de aceptores de electrones en su ruta metabólica y factores del entorno que afectan la viabilidad de las colonias de microorganismos.

Los análisis llevados a cabo en el laboratorio de aguas y suelos del Instituto Colombiano del Petróleo, fueron los siguientes:

- Pre-tratamiento del suelo.
- Determinación de Humedad a 105 °C.
- Determinación de Textura de Suelo.
- Determinación de pH o acidez activa.
- Determinación de la Conductividad.
- Determinación de Carbono Orgánico total.
- Determinación de Nitrógeno Total.
- Identificación de iones Tiosulfato, sulfato, Cloruro, Nitrato.
- Recuento de BTR y BSR.

La identificación y recuento de bacterias tiosulfato reductoras se desarrolló en el laboratorio de biotecnología del ICP.

3.1.1 Pre-Tratamiento del suelo

Antes de realizar los análisis a las 15 muestras de suelos, estas fueron secadas, molidas, y tamizadas; por último se tomó una muestra por homogenización y cuarteo. PTE 118.112 según ISO 11464.

3.1.2 Determinación de Humedad a 105 °C.

Se determinó la humedad de cada suelo mediante pérdida de peso con calentamiento a 105 °C. PTE 118.113 según IGAC [26].

3.1.3 Determinación de Textura de Suelo.

Se determinaron las proporciones de arena, limo y arcilla que se encuentran en cada una de las muestras de suelo mediante el método de hidrometro de Boyoucos. PTE 128.121 según IGAC [26].

3.1.4 Determinación de pH o acidez activa.

Se determinó el pH o acidez activa mediante método potenciométrico utilizando un electrodo de Ag/AgCl PTE 118.114 según ISO 10390 y EPA 9045 C.

3.1.5 Determinación de conductividad.

Se determinó la conductividad mediante método potenciométrico. PTE 118.115 según IGAC [26].

3.1.6 Determinación de Carbono Orgánico Total (COT).

Se determinó el porcentaje de COT mediante método de Walkley – Black (Anexo A). PTE 128.124 según ISO 14235.

3.1.7 Determinación de Nitrógeno Total

Se determinó el porcentaje de nitrógeno total mediante método Kjeldhal (Anexo B). PTE 128.122 según IGAC, Jackson [28].

3.1.8 Determinación de Aniones

Se determinó la concentración de tiosulfato, sulfato, cloruro y nitrato, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión iónica, utilizando una columna de Polimetacrilato con NH_4^+ como grupo funcional, de dimensiones 4.6 x 75 mm.

3.1.9 Recuento BTR

Los recuentos de BTR y BSR fueron realizados por el laboratorio de Biotecnología para cada una de las 15 muestras de suelos analizadas.

Los reactivos utilizados en la caracterización de suelos se muestran en el anexo C

3.2 EXPERIENCIAS EN CINÉTICA BACTERIANA

Las experiencias de crecimiento bacteriano realizadas se desarrollaron con base a la norma ASTM D 4412, por un tiempo de 7 días. El recuento bacteriano se realizó cada 24 horas. Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología del ICP.

Para el desarrollo de la cinética se tuvieron en cuenta los siguientes factores:

- Relación en ppm Carbono-Nitrógeno
- Relación en ppm Sulfato-Tiosulfato
- Temperatura: 32°C
- pH: 7.10 – 7.40
- Volumen: ~ 10 ml (tubo de ensayo)
- Inoculo: 1×10^4 - 1×10^5 Bacterias/ml
- Conductividad

Se formularon dos medios de cultivo, el medio A fue preparado con las relaciones C:N y $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ altas, 25 y 8 respectivamente; el medio B se preparó con las relaciones C:N y $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ bajas, 5 y 4 respectivamente, determinadas después de la caracterización de suelos. Se utilizó el medio de cultivo empleado por el laboratorio de biotecnología para recuento de BTR, como medio control (C).

Procedimiento de la cinética

- Las bacterias Tiosulfato reductoras fueron aisladas de la muestra de suelo No 2 y No 5, aplicando el PTE 25.024, servicio prestado por parte del laboratorio de Biotecnología del ICP.
- Se activó y estabilizó el inóculo de bacterias aislado, mediante diluciones e incubaciones sucesivas, hasta obtener el título poblacional para la cinética (1×10^5 Bac/mL).
- Después de preparados los medios A y B, se evaluó la viabilidad de cada uno, mediante dilución seriada (Anexo C). La dilución se realizó hasta 1×10^{-8} . Los medios

se incubaron durante cuatro días a una temperatura de 32 y 40 °C, al final del ensayo se determinó la temperatura más favorable al crecimiento de las BTR aisladas.

- Para llevar a cabo las experiencias de crecimiento bacteriano, se empleó un inóculo de 1×10^5 Bac/ml. El inóculo se sembró en una relación 1:10 simultáneamente en 7 tubos de ensayo, que corresponden al tiempo propuesto (7 días) para la realización de la cinética. Para cada medio de cultivo (A, B y C), se realizaron duplicados para los días D_1 y D_6 . ver figura 16.

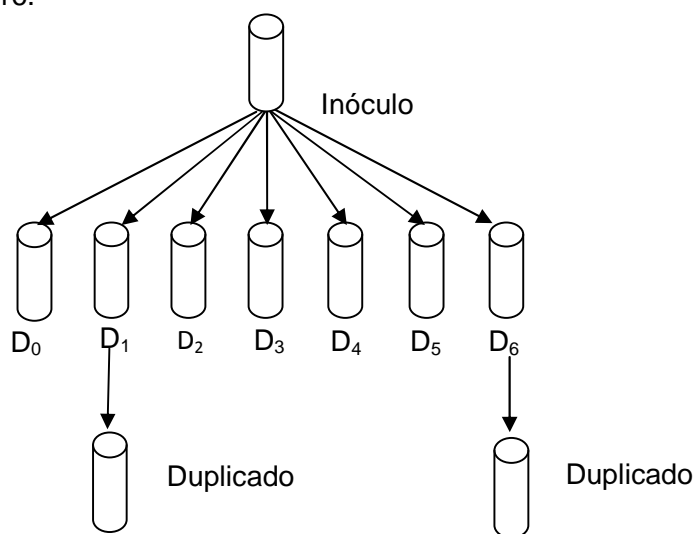


Figura 16. Metodología de inoculación en la cinética.

- La determinación de biomasa se realizó mediante recuentos seriales, PTE 25.024 según ASTM D4412, en el medio de cultivo de control, C. Partiendo de la cinética anteriormente explicada, se procedió a realizar un recuento bacteriano cada 24 horas. Para el día inicial (D_0), el número de diluciones montadas para el recuento bacteriano fue hasta 1×10^{-10} en una relación de 1:10; para los días siguientes las diluciones para el recuento fueron determinadas de forma empírica, basados en los resultados del recuento del día anterior.
- Una vez realizado el recuento bacteriano para cada medio, durante cada día, los tubos de la cinética fueron preservados a una temperatura de 2 °C, con el fin de inhibir el

metabolismo de las BTR [51], y realizar posteriores análisis de concentraciones de sulfato, tiosulfato, lactato y sulfuro, en cada medio de cultivo.

- Para valorar el consumo de Tiosulfato, sulfato y Lactato se tomaron los tubos de ensayo del día D₀ y D₆ y se analizaron por medio de HPLC de exclusión iónica.
- Los ensayos para la determinación de la concentración de H₂S fueron realizados durante los 7 días de la cinética, en el laboratorio de aguas y suelos, para valorar la producción de sulfuro de hidrógeno por las BTR, mediante potenciometría, con un electrodo de Ag/AgCl, con anillo de plata.

Los reactivos utilizados para la preparación de los medios de cultivo, durante el ensayo de crecimiento bacteriano se muestran en el Anexo D.

3.3 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LA CELDA ANAERÓBICA

Se diseñó y construyó una celda hermética, en la que se aseguraran condiciones anaeróbicas para el óptimo crecimiento y actividad metabólica de las BTR, durante el ensayo de Espectroscopía de Impedancia electroquímica [8, 27, 35, 41, 43].

La celda fue diseñada con el propósito de cumplir ciertos requerimientos de control, necesarios al trabajar con microorganismos anaeróbicos, no sólo para el presente proyecto, sino también para investigaciones a futuro, sobre corrosión microbiana.

Las condiciones de ensayo tenidas en cuenta para el diseño de la celda fueron:

- Atmósfera anaeróbica.
- Chaqueta térmica.
- Acceso de Nutrientes.
- Facilidad para la realización de ensayos electroquímicos.
- Versatilidad para el uso de electrolitos líquidos ó sólidos.
- Facilidad en toma de muestras para posterior análisis de consumo de nutrientes.
- Versatilidad para el uso de cupones de aceros con diferentes morfologías.

3.3.1 Materiales de construcción

Los materiales utilizados en la construcción de la celda anaeróbica se caracterizan por tener alta resistencia al ataque por MIC, ocasionado específicamente por Bacterias Tiosulfato Reductoras, (BTR). Por tal motivo los materiales seleccionados fueron:

- Vidrio para el cuerpo de la celda.
- Teflón para las tapas.
- Tornillos, tuercas y arandelas en acero inoxidable galvanizado que garantizan el ajuste de la celda.
- Empaques de caucho que garantizan la hermeticidad de la celda.

3.3.2 Manufactura

El cuerpo de vidrio fue construido por el departamento de Mantenimiento del ICP; las tapas de teflón y los tornillos de acero inoxidable fueron suministrados por un contratista.

3.3.3 Control de hermeticidad

Se verificó la ausencia de fugas en la celda mediante ensayos de hermeticidad, inyectando aire hasta una presión interna de 12 psi la cual fue mantenida por 1 h. Se utilizó una solución jabonosa como indicador, la cual fue esparcida en los sellos entre el cuerpo de vidrio–teflón y teflón–probeta.

El montaje de las pruebas se muestra en la figura 17.

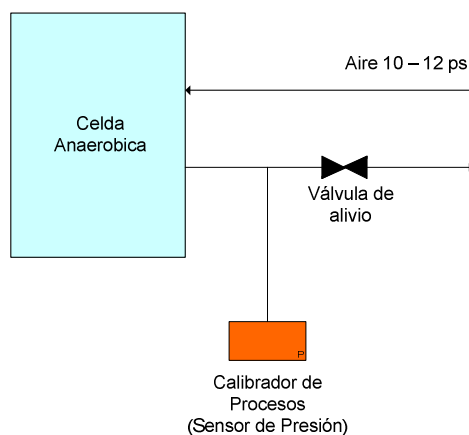


Figura 17. Montaje para el ensayo de hermeticidad

3.4 EVALUACIÓN DE CORROSIÓN

Los ensayos metalográficos del material fueron realizados en el laboratorio de Tecnología de materiales y corrosión del ICP, mientras que la técnica de microscopía cofocal fue realizada por el grupo de Biomateriales de la UIS, en un microscopio Hyrox 7700.

3.4.1 Caracterización metalográfica del material

Se utilizaron dos láminas rectangulares con dimensiones de 7x22 cm y 10x22 cm, fabricadas en acero API 5L Grado B sin recubrimiento. Este material fue sometido a una preparación metalográfica según norma ASTM E3 2001, determinación de dureza según norma ASTM E10 2001 y determinación de composición química por medio de la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica – EEO, siguiendo las especificaciones de la norma ASTM E-415 de 1999. De igual forma las probetas fueron sometidas a un proceso de limpieza superficial, preliminar a la realización de los ensayos, según norma ASTM G1.

3.4.2 Montaje experimental

De los resultados obtenidos en las etapas de caracterización de suelos y crecimiento bacteriano, se analizó cual de los tres medios de cultivo estudiados (A, B, ó C) presentó las condiciones más favorables para el desarrollo metabólico y crecimiento de BTR. El medio seleccionado, fue utilizado para la evaluación de formación de la biopelícula y velocidad de corrosión sobre la superficie metálica del acero API 5L Grado B, por medio de la técnica de impedancias.

El montaje constó de dos celdas herméticamente cerradas; la celda No 1, corresponde a la celda diseñada y construida para este proyecto, la cual contenía el medio de cultivo líquido C y un pool de BTR con un título de 1×10^5 Bac/mL, en contacto directo con el material, utilizando grafito como electrodo de referencia . La celda No. 2, corresponde a una celda plana con el mismo medio de cultivo C, pero sin la presencia de BTR y utilizando grafito como electrodo de referencia. Ambas celdas fueron conectadas a un potencióstato, con el que se llevó a cabo la prueba de EIS, tal como se muestra en la figura 21.

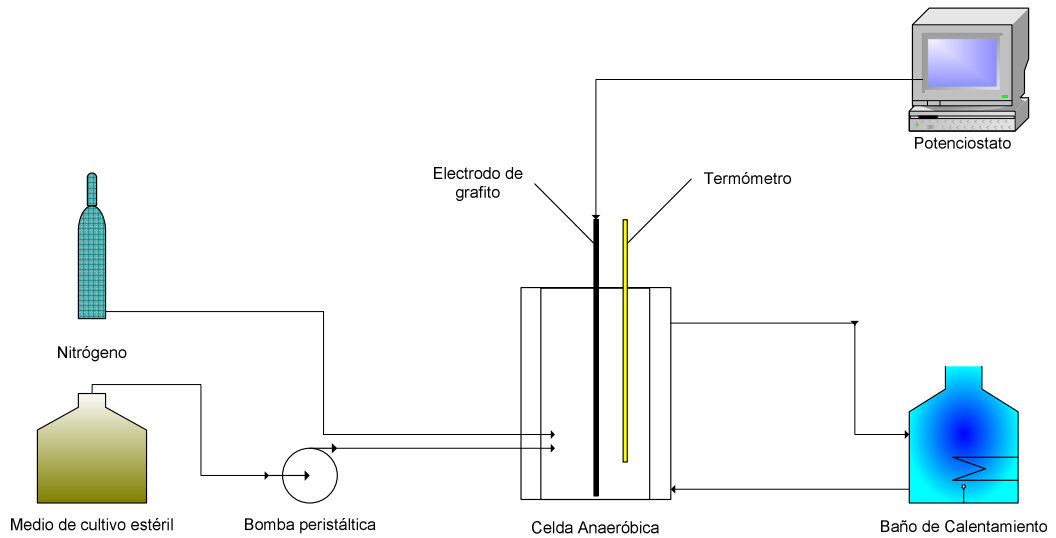


Figura 18. Montaje para pruebas de corrosión.

3.4.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)

Una vez terminado el montaje se procedió a evaluar la velocidad de corrosión y formación de la biopelícula sobre la superficie del acero por medio de EIS, para la celda No. 1 y No. 2. El tiempo del ensayo corresponde a 7 días; de acuerdo con la revisión bibliográfica, es un tiempo suficiente para permitir la formación de la biopelícula de BSR [56, 58], sobre la superficie del metal y poder observar el proceso de degradación del acero.

Las medidas de EIS se realizaron con el objetivo de determinar las características de polarización; para esto potenciales sinusoidales de 10 mV fueron aplicados a frecuencias entre 0.01 Hz y 100 kHz.

3.4.4 Microscopía Cofocal

Las áreas de exposición superficial de las probetas fueron visualizadas por medio de un microscopio cofocal, con el objetivo de observar el estado de cada superficie y la posible formación de biopelículas o daños ocasionados por efecto del proceso de corrosión. Para ello, una vez terminados los ensayos de EIS, estas áreas fueron sumergidas en una

solución de glutaraldehído al 2% durante una hora para fijar la biopelícula a la superficie del metal, luego fueron deshidratadas usando cuatro soluciones de etanol por 15 minutos cada una, con concentraciones de 25, 50, 75 y 100% sucesivamente [24]

3.5 DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó un análisis en cada una de las etapas de la metodología anteriormente planteada relacionando los resultados de una etapa a otra; de esta manera se pudo obtener una idea inicial, sobre el daño ocasionado por las BTR sobre este material específico.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Caracterización de suelos.

La selección de las propiedades extrínsecas de los suelos, determinadas en la caracterización, se basó en la importancia que tiene cada una de ellas en la generación de entornos óptimos para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de microorganismos.

La humedad, textura y pH se determinaron por la influencia que tienen los entornos en la formación de colonias bacterianas.

Debido al alto porcentaje de carbono y nitrógeno utilizados por las bacterias en la formación de biomasa [11] se determinó la concentración de estos dos elementos en las muestras de suelo.

La concentración de sulfato, tiosulfato, nitratos y cloruros fueron determinadas debido a la importancia de estos iones en las rutas metabólicas de las bacterias.

4.1.1 Determinación de Humedad a 105 °C.

En los resultados expuestos en la tabla 7, se observa que no existe una relación directa entre los porcentajes de humedad y los recuentos bacterianos, ya que las mayores poblaciones de BTR se presentaron en un intervalo de humedad entre 4.01 - 8.63 %; por otra parte la menor población de BTR se presentó en una humedad de 6.69 %.

Aunque las bacterias requieren agua para sobrevivir, las diferencias entre los porcentajes de humedad, determinados para cada suelo, respecto a las concentraciones de bacterias en los mismos, sugiere que existen otros factores que intervienen en el desarrollo de estos microorganismos. La disponibilidad de agua no solo es función de su contenido en el medio, es decir de su humedad y sequedad, sino también depende de la concentración

de solutos, debido a que las sustancias disueltas en el suelo tienen afinidad por moléculas de agua, razón por la cual el agua asociada a los solutos no está disponible para los microorganismos [51].

Tabla 7. (%) Humedad de las 15 muestras de suelos.

Muestra	Humedad (%)	Recuento BTR
1	4.94	10000
2	4.01	≥1000000
3	3.11	100000
4	3.90	10000
5	8.63	≥1000000
6	6.06	≥1000000
7	6.43	10000
8	8.11	1000
9	6.66	≥1000000
10	4.24	≥1000000
11	9.87	10000
12	2.04	100
13	2.03	100000
14	6.69	10
15	1.96	1000

La presencia de BTR en suelos con bajos porcentajes de agua, es posible debido a la adaptación de los microorganismos, mediante el aumento de la concentración de iones en el interior del citoplasma, generando osmosis.

4.1.2 Determinación de Textura.

En la tabla 8 se observan los porcentajes de arcilla, limo y arena. Los suelos dos, cinco, seis, nueve y diez, con un porcentaje de arcilla entre 28.62 – 39.97 %, presentaron un recuento bacteriano alto, ≥1000000 Bac/mL, comparado con los suelos 12 y 14 con bajos porcentajes de arcilla donde la población de BTR encontradas fue de 10 y 100

respectivamente, debido a la influencia favorable que presentan las arcillas sobre poblaciones de microorganismo.

Tabla 8. Textura de las 15 muestras suelos.

Muestra	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)	Textura	Recuento BTR (Bac/mL)
1	62.61	33.95	3.44	Franco-arcillo-arenoso	10000
2	35.85	39.97	24.18	Franco-arcilloso	≥1000000
3	45.14	34.98	19.89	Franco-arcilloso	100000
4	37.16	35.41	27.43	Franco-arcilloso	10000
5	49.72	39.33	10.95	Arcillo-arenoso	≥1000000
6	57.31	38.26	4.43	Arcillo-arenoso	≥1000000
7	49.88	42.05	8.07	Arcillo-arenoso	10000
8	49.14	16.42	34.43	Franco	1000
9	44.41	28.62	26.97	Franco-arcilloso	≥1000000
10	36.16	29.8	34.04	Franco-arcilloso	≥1000000
11	49.99	7.18	42.83	Franco	10000
12	84	5.36	10.64	Arenoso-franco	100
13	75.39	11.41	13.2	Franco-arenoso	100000
14	72.61	8.26	19.13	Franco-arenoso	10
15	70.44	21.77	7.79	Franco-arcillo-arenoso	1000

■ Nivel alto de población bacteriana ■ Nivel bajo de población bacteriana

Aunque se ha demostrado la influencia sobre los microorganismo por parte de las arcillas [9], es posible que el efecto de una arcilla específica sobre un organismo particular este enmascarado. Por esta razón, suelos como el 4 y 7 con un alto contenido de arcilla, y suelos como el 8 y 11 de buena humedad, no presenten recuentos de BTR mayores a 10000 Bac/mL, a causa de la capacidad que tienen las arcillas para intercambiar iones y

adsorber entre sus laminas, agua y moléculas usadas por las bacterias como sustrato. Una vez adsorbidos los compuestos, en especial el agua, deja de estar disponible para los microorganismos.

4.1.3 Determinación de pH o acidez activa.

Cada organismo tiene un intervalo de pH dentro del cual es posible el crecimiento. Sin embargo, existe un pH óptimo bien definido en el cual la velocidad de crecimiento es máxima [51]; en general, los ambientes naturales presentan pH entre 5 y 9, por lo que las bacterias pueden sobrevivir en entornos con 2 o 3 valores de pH por encima o por debajo de su pH óptimo de crecimiento.

Tabla 9. Valores de pH de las 15 muestras de suelos.

Muestra	pH	Recuento BTR
1	9.13	10000
2	8.62	≥1000000
3	8.65	100000
4	7.87	10000
5	6.44	≥1000000
6	9.14	≥1000000
7	8.79	10000
8	5.94	1000
9	6.89	≥1000000
10	5.65	≥1000000
11	8.3	10000
12	7.5	100
13	6.9	100000
14	7	10
15	5.5	1000

Aunque los pH observados en la tabla 9, para las 15 muestras de suelo permiten la presencia de BTR, no es posible determinar cuál es el pH que más favorece al crecimiento bacteriano en esta zona.

4.1.4 Determinación de conductividad.

La corrosividad de un suelo está relacionada de forma directa con la capacidad de conducción eléctrica, dependiendo de la presencia de iones aumentará o disminuirá la capacidad de conducción de cada suelo.

Tabla 10. Conductividad y nivel de corrosión de las 15 muestras de suelos.

Muestra	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Corrosividad del suelo	Recuento BTR
1	28	Poco corrosivo	10000
2	73.6	Poco corrosivo	≥ 1000000
3	44.8	Poco corrosivo	100000
4	275	Moderadamente corrosivo	10000
5	108.4	Moderadamente corrosivo	≥ 1000000
6	66.5	Poco corrosivo	≥ 1000000
7	62.1	Poco corrosivo	10000
8	15.42	Poco corrosivo	1000
9	76.2	Poco corrosivo	≥ 1000000
10	24.7	Poco corrosivo	≥ 1000000
11	34.4	Poco corrosivo	10000
12	17.18	Poco corrosivo	100
13	62.6	Poco corrosivo	100000
14	24	Poco corrosivo	10
15	65	Poco corrosivo	1000

En la tabla 10 se muestra el nivel de corrosividad de las 15 muestras de suelo caracterizadas, los suelos 4 y 5 son moderadamente corrosivos, mientras los demás son pocos corrosivos, lo que sugiere que el efecto que puede tener cada suelo, por sí solo, sobre las tuberías de acero no es muy significativo para el proceso de corrosión de estos materiales. Sin embargo, la composición de estos suelos puede ser suficiente para soportar un adecuado crecimiento de BTR, provocando corrosión microbiana.

4.1.5 Determinación de Carbono Orgánico y Nitrógeno Orgánico Total.

En la tabla 11 se observa una tendencia a favorecer poblaciones elevadas de bacterias $\geq 1 \times 10^6$ en suelos donde la presencia de carbono orgánico es alta. Se debe tener presente, que altas concentraciones de carbono no garantiza una suficiencia de sustratos adecuados que cubran la demanda de las BTR (compuestos orgánico de bajo peso molecular). Al comparar los resultados, es posible encontrar suelos con moderada concentración de carbono, de concentraciones de BTR $\geq 1 \times 10^6$ Bac/mL (Suelo 5) y suelos con alta concentraciones de carbono y poblaciones de BTR menores (Suelo 13).

Tabla 11. Concentración de Carbono Orgánico Total y Nitrógeno Orgánico total (COT) de las 15 muestras de suelos.

Muestra	COT (ppm)	N (ppm)	~ C:N	Recuento BTR
1	32.69	195.8	0.1:1	10000
2	12255.96	721.8	17:1	≥ 1000000
3	2136.24	308.5	7:1	100000
4	2350.13	289.5	8:1	10000
5	2708.45	519.7	5:1	≥ 1000000
6	14267.65	500.4	29:1	≥ 1000000
7	1210.20	284.4	4:1	10000
8	216.19	599.2	0.4:1	1000
9	6531.63	547.0	12:1	≥ 1000000
10	5489.85	550.0	10:1	≥ 1000000

Muestra	COT (ppm)	N (ppm)	~ C:N	Recuento BTR
11	2010.91	401.7	5:1	10000
12	93.69	21.1	4:1	100
13	9923.91	554.1	18:1	100000
14	ND	145.8	---	10
15	3472.34	489.3	7:1	1000

(Continuación. Tabla 11. Concentración de Carbono Orgánico Total y Nitrógeno Orgánico total (COT) de las 15 muestras de suelos.)

ND: No detectó ■ Nivel alto de población bacteriana ■ Nivel bajo de población bacteriana

Se observa que concentraciones de nitrógeno de 500 ppm o mayores, favorecen la presencia de poblaciones $\geq 1 \times 10^6$ Bac/mL, las menores poblaciones de BTR determinadas (10 y 100 Bac/mL), se encuentran en los suelos de menor contenido de nitrógeno, suelo 14 y 12 respectivamente.

La relación entre el carbono y nitrógeno en los suelos varía dependiendo de los procesos de mineralización y la demanda de uno u otro factor para la producción de biomasa por parte de las bacterias.

4.1.6 Determinación de aniones.

La tabla 12 muestra altas concentraciones de sulfato frente al tiosulfato en 9 de las 15 muestras de suelo, lo que sugiere que las BTR presentes en estas 9 muestras son capaces de reducir sulfato. Las bajas concentraciones de tiosulfato, pudieron ser ocasionadas por la preferencia de BTR por utilizar como aceptor de electrones, el compuesto energéticamente más favorable, en este caso, tiosulfato frente al sulfato que necesita una previa activación con ATP [38,55].

Los iones cloruros son los más asociados con la conductividad debido a la facilidad que poseen para transportar electrones, los suelos 4 y 5 presentan mayor concentración de iones cloruro, lo que concuerda con su moderada corrosividad, no significa, que suelos con concentraciones de cloruros menores, no puedan generar algún tipo de efecto corrosivo sobre la superficie de las tuberías, aunque este efecto sea bajo.

Tabla 12. Concentraciones de Aniones presentes en las 15 muestras de suelos.

Muestra	S ₂ O ₃ ²⁻ (ppm)	SO ₄ ²⁻ (ppm)	Cl ⁻ (ppm)	NO ₃ ⁻ (ppm)	Recuento BTR
1	<4.10	< 2.498	7.192	11.20	10000
2	<4.43	29.41	13.16	20.63	≥1000000
3	<4.45	<2.499	12.02	4.329	100000
4	<4.26	197	779	1.792	10000
5	<4.43	<2.496	313	9.761	≥1000000
6	<4.27	45.07	9.278	9.726	≥1000000
7	<4.32	45.49	25.0	49.37	10000
8	<4.48	<2.496	23.48	<0.069	1000
9	<4.41	183	14.17	<0.069	≥1000000
10	<4.14	71.00	6.471	31.08	≥1000000
11	<4.31	<2.492	8.534	<0.069	10000
12	<4.13	45.21	13.68	3.097	100
13	<4.48	172	180	53.26	100000
14	<4.45	321	197	13.69	10
15	<4.29	<2.498	9.247	<0.069	1000

4.1.7 Recuento BTR y BSR.

De los recuentos para BTR y BSR presentados en la tabla 13, se observa que las BTR son las bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno, asociadas con la MIC, dominantes en las 15 muestras de suelo.

Los bajos niveles de tiosulfato presentes en los suelos pueden estar asociados al alto número de BTR. Se debe tener presente que la estabilidad y presencia de microorganismos en el suelo es muy variable, y dependen de entornos favorables a su crecimiento. Es posible una variación poblacional de bacterias en el tiempo, cambiando el tipo dominante de bacterias dependiendo de la presencia de nutrientes adecuados para su crecimiento.

Tabla 13. Población de BTR y BSR en las 15 muestras de suelos.

Muestra	Recuento BTR	Recuento BSR
1	10000	10
2	≥1000000	100
3	100000	100
4	10000	10
5	≥1000000	10
6	≥1000000	100
7	10000	1000
8	1000	100
9	≥1000000	100
10	≥1000000	1000
11	10000	10
12	100	<10
13	100000	100
14	10	<10
15	1000	<10

Terminada la caracterización de las muestras de suelo, la comparación entre los valores determinados para cada parámetro con el número de BTR presentes en cada suelo, no indica un patrón que relacione la población de bacterias con las condiciones favorables para su crecimiento. La presencia de bacterias esta relaciona con la concentración y distribución de nutrientes en los suelos. Niveles altos de nutrientes no implica altas concentraciones de bacterias. Es posible encontrar colonias de bacterias distribuidas por una zona de forma homogénea o encontrar colonias aislada en oasis óptimos para el crecimiento bacteriano.

Debido a la aleatoriedad de los resultados obtenidos en la caracterización de los suelos, para los factores propuestos, y a la falta de un patrón completo que explique la población de 1×10^6 Bac/mL para las muestras dos, cinco, seis, nueve y diez frente a las restantes, no se seleccionó un suelo específico para determinar las variables a tener en cuenta

durante el desarrollo de la cinética; se seleccionaron como variables para los ensayos de crecimiento bacteriano, las relaciones entre carbono – nitrógeno, debido al uso de estos elementos en la síntesis de biomasa, y sulfato – tiosulfato, por la utilización de estos aniones en la cadena de transporte de electrones.

Los valores de textura y humedad, determinados para los 15 suelos se excluyeron en el ensayo cinético, debido al manejo de una matriz líquida.

Debido al gran intervalo de pH en el que se encontraban presentes las bacterias en los suelos, se usó un intervalo de pH, reportado por la literatura, entre 7.10 – 7.40 [22], como pH óptimo, para el desarrollo de la cinética.

Las relación de C:N determinada para los suelos, presenta un mínimo de 5:1 y un máximo de 29:1. Debido a la alta cantidad de reactivo requerido en la cinética para alcanzar la relación de 29:1, se utilizó como mayor C:N el valor de 8:1, debido a que las bacterias en el suelo suelen presentar relaciones C:N entre 5:1 a 8:1 [11]. Las concentraciones de carbono y nitrógeno en las paredes celulares de la mayoría de los microorganismos se distribuyen en 45 % C y 6 – 9 % N [11].

La figura 19 muestra la relación C:N para las 15 muestras.

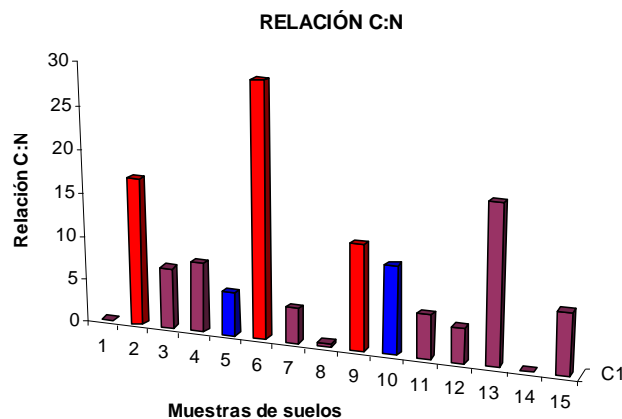


Figura 19. Relación C:N para las 15 muestras de suelo.

■ Relación alta ■ Relación baja para muestras con mayor población de BTR

Debido a las bajas concentraciones de tiosulfato en las muestras de suelo, se seleccionó una relación $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, como variable para el desarrollo de los ensayos de crecimiento cinético. La relación $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ mas alta, determinada para los suelos con mayor concentración de BTR (suelos 2, 5, 6, 9 y 10), es de 41.49; la relación $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ más baja es de 0.6, como se muestra en la figura 20. Sin embargo, debido a la complejidad de la formulación del medio de cultivo y teniendo en cuenta los límites de detección de las técnicas cromatográficas HPLC-exclusión iónica, para la determinación de la concentración de los iones en los medios, los niveles propuestos para el desarrollo de los ensayos de crecimiento son de 5 y 25 $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, niveles que se encuentran dentro del intervalo de relación $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ determinado en los suelos.

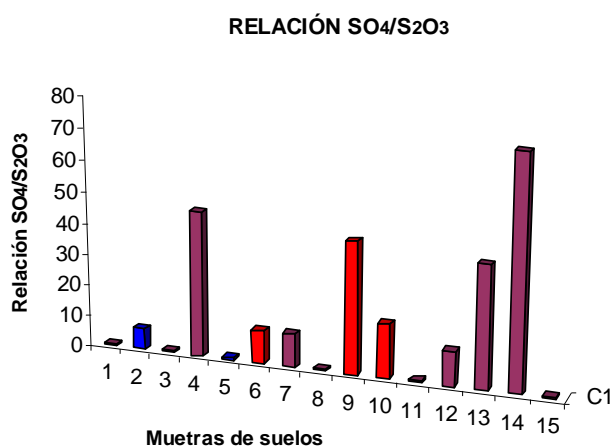


Figura 20. Relación $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ para las 15 muestras de suelo.
 Se resaltan las muestras con mayor población de BTR
■ Relación alta ■ Relación baja

4.2 Crecimiento Bacteriano

4.2.1 Activación y estabilización del inóculo de BTR para la segunda cinética.

Los inóculos A y B, proporcionados por el laboratorio de biotecnología, fueron activados y estabilizados como se muestra en la figura 21.

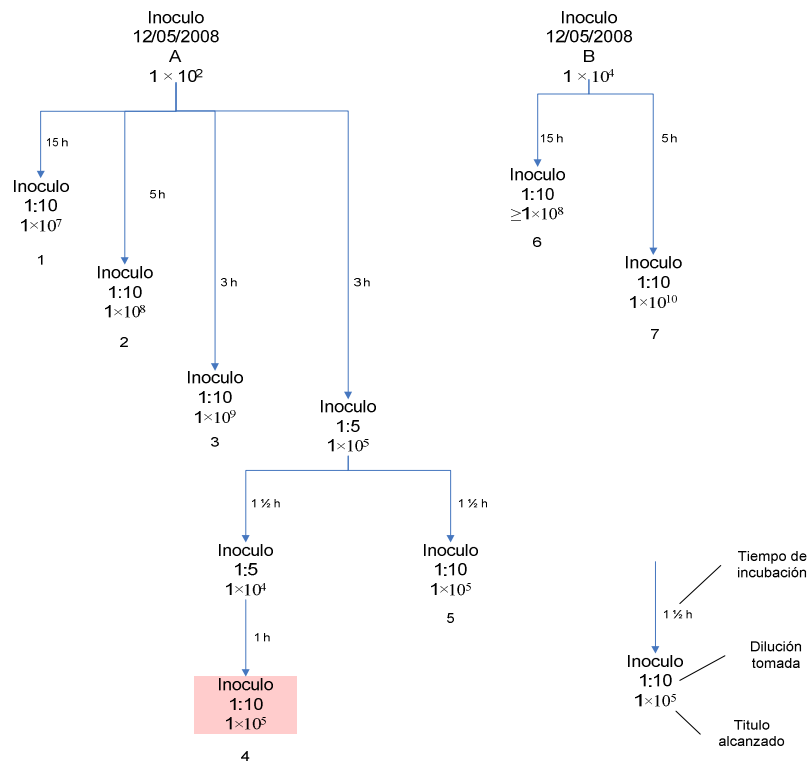


Figura 21. Procedimiento de preparación de inóculo para desarrollo de experiencias de cinética

El crecimiento de las bacterias durante la preparación del inóculo presentó una velocidad de crecimiento alta, ésto se observó para el inóculo A y B, inoculados al 10 %, los cuales después de 15 y 5 h de incubación aumentaron la población bacteriana de 1×10^2 para el medio A y 1×10^4 para el medio B, hasta 1×10^7 y $\geq 1 \times 10^8$ respectivamente. Sin embargo, de los dos inóculos A y B, el inóculo A presentó menor crecimiento en el mismo intervalo de tiempo, razón por la cual fue seleccionado para la obtención del título deseado 1×10^6 Bact/mL, debido a la preferencia para obtener un título poblacional deseado mediante crecimiento por incubación, que mediante dilución .

Una vez seleccionado el inóculo de origen (Inóculo A), se realizaron 7 inóculos con diferentes tiempos de incubación, como se muestra en la figura 16. Después de incubar los 7 inóculos a diferentes concentraciones y durante diferentes intervalos de tiempo, se seleccionó el inóculo 4 para la realización de la cinética.

Es necesario aclarar que el medio utilizado en la activación y estabilización del inóculo para la cinética es el medio de control, utilizado en el recuento bacteriano, sin FeCl₂.

Durante la realización de los recuentos en la preparación del inóculo se observó un ennegrecimiento de los tubos de ensayo, hasta el título alcanzado por cada medio, a partir del tercer día, el cual se mantuvo durante el tiempo de recuento (28 días), lo que sugiere un rápido crecimiento de la cepa de BTR aislada después de ser activada.

4.2.2 Cinética de BTR.

La relación de variables escogidas, al terminar la caracterización de los suelos, para cada medio de cultivo, se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Relación de variables en los medios de cultivo.

Factores	Medio A	Medio B
Sulfato/Tiosulfato	25	5
COT / Nitrógeno	8	4

Con el fin de disminuir la conductividad de los medios, intentando simular la conductividad de los suelos, tres de las sales utilizadas en el medio control C, que tienen el ión cloruro como anión, fueron sustituidas por sales con aniones nitrato y fosfato. La conductividad de cada medio se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Conductividad para cada medio de cultivo en la cinética.

	Medio A (\squares/cm)	Medio B (\squares/cm)	Medio C (\squares/cm)
Conductividad	2746	1850	4500

El medio C, se diferencia de los medios formulados A y B, por la ausencia del anión sulfato en su composición. La adición de sulfato de magnesio, reemplaza una sal con anión cloruro, disminuyendo la conductividad de los medios. La composición de nutrientes de los medios formulados, se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Composición los medios C y D.

Composición	Medio A (g/L)	Medio B (g/L)
NH ₄ NO ₃	0.43	0.43
NaS ₂ O ₃	0.14	0.69
MgSO ₄	3.72	3.72
C ₃ O ₃ HNa	6 mL	3 mL
NaH ₂ PO ₄	1.23	1.23
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5
FeCl ₂	0.36	0.36
C ₆ H ₈ O ₆	0.1	0.1
Extracto de Levadura	1	1

Se evaluó la viabilidad de los medios A y B, a una temperatura de 32 °C y 40 °C. Para corroborar el crecimiento de BTR, se midió la producción de sulfuro de hidrógeno en cada medio al tercer día. Los resultados del ensayo de viabilidad se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Evaluación de viabilidad de medios y producción de sulfuros, cinética.

	Medio	
	A (Bac/mL)	B (Bac/mL)
32 °C	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁴
40 °C	1 × 10 ³	1 × 10 ³
Sulfuros-32 °C (ppm)	53	80

Los medios propuestos fueron viables al crecimiento de BTR. La temperatura escogida fue de 32 °C, debido al favorecimiento del crecimiento bacteriano. La producción de sulfuro de hidrógeno se ve más favorecida en el medio B.

Pasadas 24 horas después de iniciada la cinética, se confirmó el acelerado crecimiento de las BTR, debido al ennegrecimiento de todos los tubos de ensayos, por precipitación de sulfuro de hierro [13], para cada medio. La tabla 18 indica la población de BTR alcanzadas hasta el día 4.

Tabla 18. Recuento de Bacterias en la cinética.

Dilución	Medio A (Bac/mL)	Medio B (Bac/mL)	Medio C (Bac/mL)
D ₀	1 x 10 ³	1 x 10 ³	1 x 10 ³
D ₁	≥1 x 10 ¹⁰	≥1 x 10 ¹⁰	≥1 x 10 ¹⁰
D ₂	≥1 x 10 ¹⁵	≥1 x 10 ¹⁵	≥1 x 10 ¹⁵
D ₃	≥1 x 10 ²⁴	≥1 x 10 ²⁴	≥1 x 10 ²⁴
D ₄	≥1 x 10 ²⁴	≥1 x 10 ²⁴	≥1 x 10 ²⁴
D ₅	---	---	---
D ₆	---	---	---

La disminución de la población de bacterias medida para el D₀ en los tres medios, después de la inoculación, es el resultado de la dilución 1:10 y adaptación de las bacterias al cambio de medio durante la inoculación.

Los títulos alcanzados para los tres medios en los días uno, dos, tres y cuatro, aparentemente sobrepasan los niveles de producción de biomasa esperados para microorganismos anaeróbicos. La energía requerida para realizar el proceso de respiración al usar oxígeno es menor que cuando se utiliza sulfato o tiosulfato como aceptor de electrones, por lo que el crecimiento microbiano de organismos con la capacidad de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones es mayor que el crecimiento de otros organismos [34]. Por tal motivo, los títulos obtenidos en el recuento son producto

de interferencias en el método de diluciones seriadas, producidas por presencia de precipitados de sulfuro de hierro y exceso de sulfuro de hidrógeno disuelto. De todas maneras, es posible obtener concentraciones de biomasa en medios anaerobios, si estos se encuentran en óptimas condiciones de crecimiento.

A diferencia del día D_0 (inicio de la cinética) el muestreo para el recuento diario, para los tres medios, fue tomado a partir de tubos ennegrecidos. El sulfuro de hidrógeno y el sulfuro de hierro que precipitó, fueron arrastrados de una dilución a otra, lo que interfiere con la medida de población. El elevado número de diluciones afectadas, sugiere una elevada producción de sulfuro de hidrógeno por las BTR.

La interferencia causada en la medida del crecimiento de BTR mediante diluciones seriadas, por la alta producción de sulfuro de hidrógeno, se confirmó al realizar un despojo de H_2S con N_2 en cada tubo para el día cuatro [14]. Aunque el recuento para este día presentó elevadas poblaciones, demoró el doble de tiempo en alcanzar el título final, debido a la disminución de sulfuro de hidrógeno que fue arrastrado durante la dilución.

En el día 4 (D_4) se detuvo el ensayo de cinética para la medida de biomasa producida, sin embargo, se continuó la cinética para la medida de producción desulfuro de hidrógeno y consumo de nutrientes.

No es posible retirar el cloruro de hierro para evitar la presencia de precipitado por reacción de Fe^{2+} con sulfuro de hidrógeno, debido a que un exceso de sulfuro de hierro disuelto en el medio genera inhibición metabólica en las BTR, aunque este mecanismo de inhibición es desconocido, se cree que el H_2S puede actuar sobre la membrana celular como un desacoplador energético, de igual manera como lo hacen los ácidos débiles; o por la necesidad de hierro para procesos de biosíntesis de citocromos de hierro en la cadena de transporte de electrones [35].

Las concentraciones de lactato, tiosulfato y sulfato en el día 0 y el día 6, junto con los valores de sulfuros determinados se observan en el Anexo E.

La figura 22 muestra el cambio en la concentración de tiosulfato, sulfato y lactato en los tres medios después de seis días de cinética.

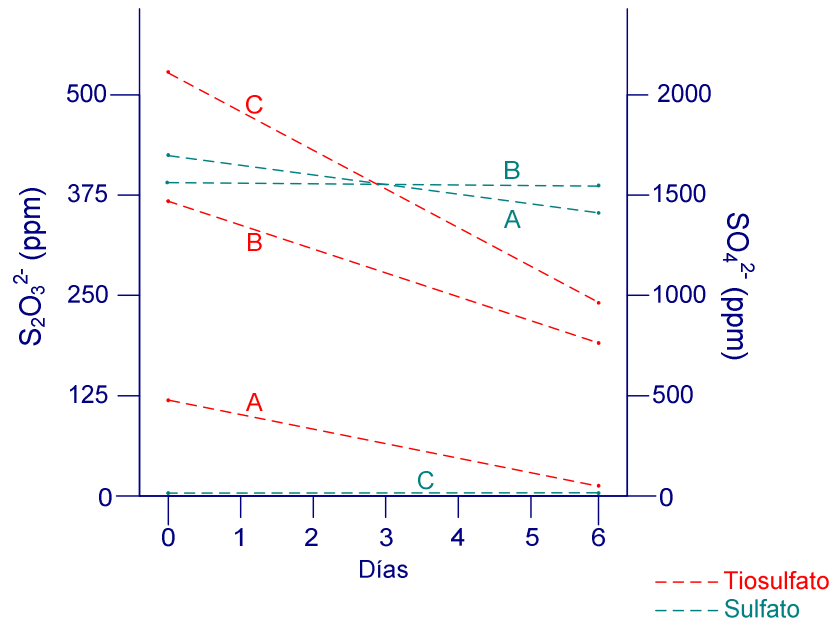
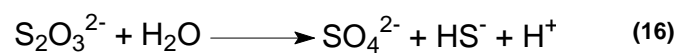


Figura 22. Cambio de concentración de sulfato y tiosulfato, después de 6 días.

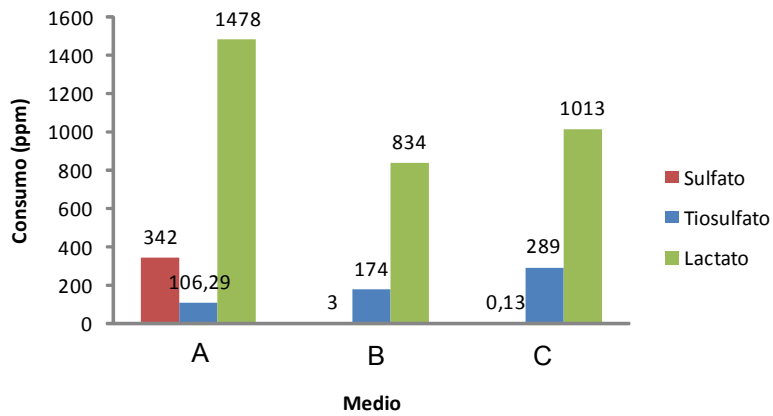
En las figuras 22 y 23, se observa un consumo de sulfato en el medio A, este fenómeno se debe a la mayor disponibilidad, para el consumo bacteriano, de moléculas de sulfato que de tiosulfato. Por otro lado, en los medio B y C, con mayor concentración de tiosulfato, la alta disponibilidad de éste en el medio, disminuyo el consumo de sulfato.

La presencia de sulfato en el medio C (medio control) se cree que proviene de la acción metabólica de las BTR. Es posible que las BTR aisladas sean capaces de oxidar el tiosulfato a sulfato por acción enzimática, este comportamiento se ha observado con anterioridad en bacterias reductoras de sulfato [17, 44]:



Otra forma de explicar la presencia de sulfato e incluso otros aniones como el sulfito y bisulfito, en el medio C, es por reacciones de óxido-reducción inherentes del medio [15]; sin embargo, esta razón es menos confiable, debido a que el todos los medios cuentan con ácido ascórbico como agente reductor.

Consumo de Tiosulfato, Sulfato y Lactato



Figuras 23. Consumo de sulfato, tiosulfato y lactato para los medios A, B y C.

De los datos observados en la figura 22 y 24, se establece que la producción de H₂S esta relaciona con la presencia y consumo de tiosulfato en cada medio [18].

Producción de H₂S

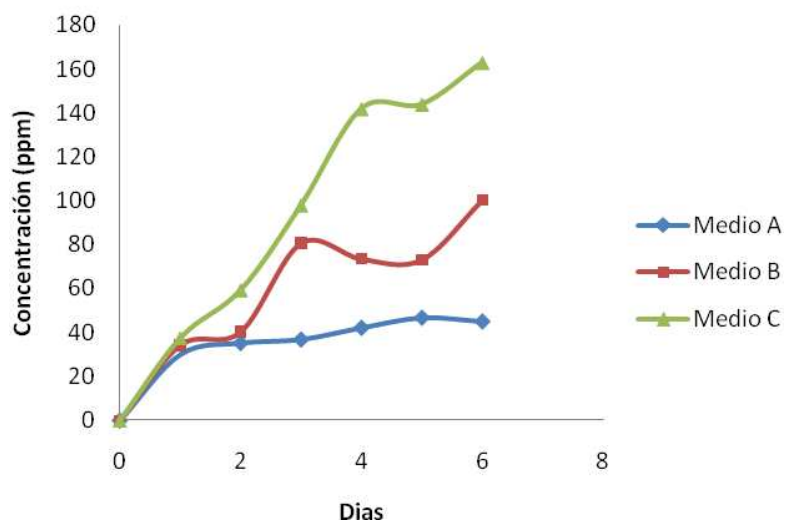


Figura 24. Producción de H₂S durante la cinética.

Durante los seis días de cinética no se observó inhibición en la producción de sulfuro de hidrógeno, sin embargo, la producción de H₂S no es de forma constante, su fluctuación en el quinto día pudo deberse a la disminución de la concentración de tiosulfato.

La concentración de sulfuro de hidrógeno disuelto en los medios de cultivo, necesaria para presentar un precipitado oscuro en los tubos de ensayo fue de 34 ppm, determinados para el medio B.

4.3 Diseño y construcción de la celda anaeróbica

4.3.1 Diseño

Los planos de diseño de la celda anaeróbica en todas las vistas con sus respectivas medidas se muestran en el Anexo F, realizadas con ayuda del software Solid Edge V 12 académico. Al hacer una descripción general de la celda se tiene: un cuerpo de vidrio enchaquetado con tres entradas principales roscadas en la parte superior. La primera entrada fue utilizada para ubicar el electrodo de referencia (grafito), la segunda, para ubicar un termómetro y la tercera entrada utilizada para la inoculación del medio de cultivo. Aunque los ensayos realizados con la celda no requerían control de presión, es posible la implementación de un manómetro diferencial. La celda cuenta además con accesos laterales, para la recirculación de un flujo de agua a través de la chaqueta y otras dos entradas hasta la sección de interior, una para la inyección del medio ó de nutrientes y otra para la inyección de nitrógeno al sistema.

Las placas de teflón y los tornillos de acero inoxidable fueron empleados para montar y cerrar el cuerpo de vidrio y la probeta. Para garantizar la hermeticidad de la celda anaeróbica, se emplearon empaques de caucho que permitieran un sello entre metal-teflón y cuerpo de vidrio-teflón, además se utilizaron empaques de menor diámetro, para distribuir la fuerza de apriete a través de los cuatro tornillos y evitar la flexión de las placas de teflón, ver figuras 25 y 26.

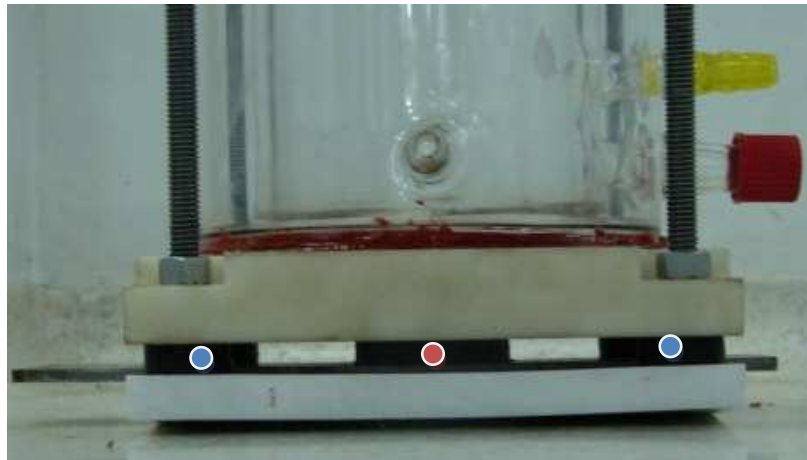


Figura 25. ●Epaques de caucho utilizados para mejorar la distribución de la fuerza de apriete,
●Epaque de caucho utilizado para asegurar sello entre teflón-placa metálica.

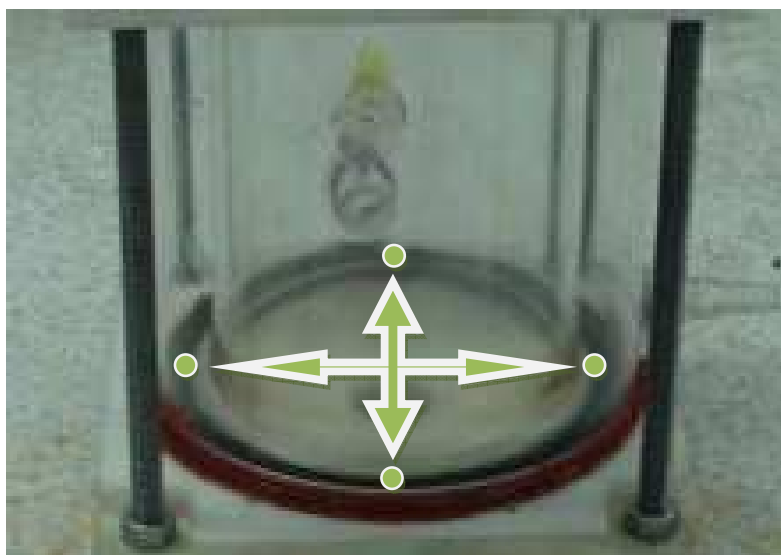


Figura 26. Empaque de caucho utilizado para asegurar sello entre cuerpo de vidrio-teflón.

4.3.2 Control de hermeticidad

La celda anaeróbica, una vez construida fue sometida a una serie de ensayos de hermeticidad, tabla 19. Los valores de presión utilizados se encuentran en un rango de 10-15 psi.

Tabla 19. Ensayos de hermeticidad.

ENSAYO	PRESION (psi)	TIEMPO (minutos)	MEJORAS	OBSERVACIONES
1 (fig 27 a)	15	3	-----	<ul style="list-style-type: none"> • Fugas de aire altas en los contornos entre cuerpo de vidrio-teflón y teflón-acero. Fig 27 (a) • Alto grado de flexión de las placas de teflón. • Los accesos superiores y laterales no presentaron fugas.
2	13.5	15	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor fuerza de apriete en los tornillos 	<ul style="list-style-type: none"> • Fugas de aire moderadas: cuerpo de vidrio-teflón, teflón acero. • Alto grado de flexión de las placas • Accesos no presentaron fugas
3	10.5	90	<ul style="list-style-type: none"> • Arandelas metálicas en cada tornillo para una mejor distribución de la fuerza. • Grasa de vacío por los contornos. • Mayor fuerza de apriete 	<ul style="list-style-type: none"> • No hubo presencia de fugas • Accesos sin fugas • Agrietamiento del cuerpo de vidrio durante el desmontaje del ensayo, figura 27 b).

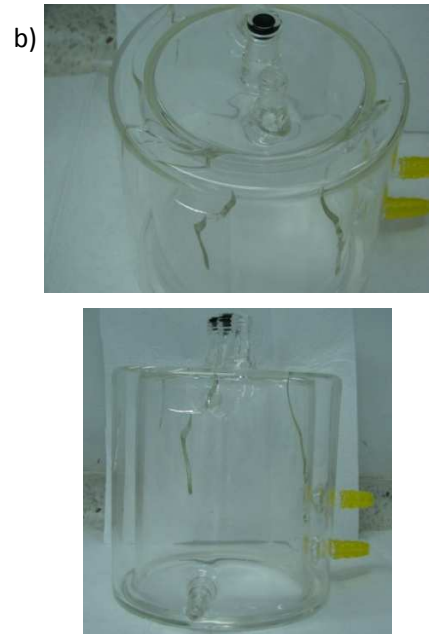
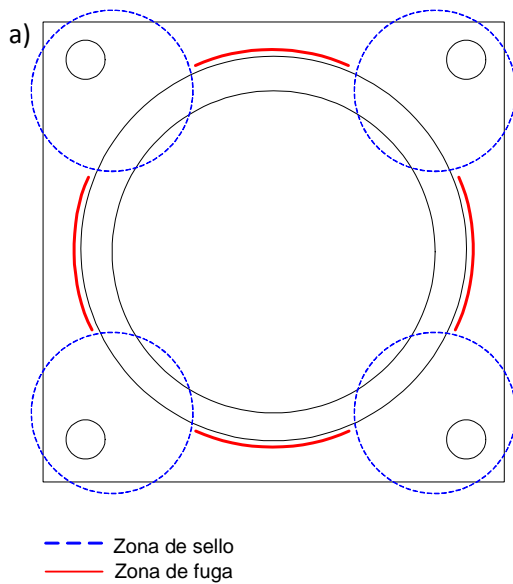


Figura 27. a) Presencia de fugas b) Cuerpo de vidrio agrietado

4.3.3 Grafico causa – efecto

Con el fin de proponer nuevas mejoras para la construcción de la celda anaeróbica, se esquematizó un gráfico de causa-efecto para determinar porque sucedió el agrietamiento de la celda, ver figura 30.

Al identificar las tres causas principales que provocaron este agrietamiento, se propuso como posibles soluciones:

1. Apriete independiente para los elementos vidrio-teflón y teflón-acero. En la figura 28 se muestran tuercas corrientes para el apriete entre el acero y el teflón. Las tuercas tipo mariposa se emplearon para asegurar el sello entre el vidrio y el teflón.



Figura 28. Mariposas para apriete superior (rojo). Tuercas apriete inferior (Azul).

2. Utilización de empaques de caucho no tan blandos para evitar una deformación excesiva al aplicar la fuerza de apriete, pero que puedan proporcionar un sello correcto con la placa de acero.
3. Disminución del diámetro del cilindro de vidrio interior ($\Phi=13$ cm) a un diámetro de 12 cm para aumentar la distancia entre la pared interna y la chaqueta de la celda para dar más estabilidad al montaje, ver figura 29.

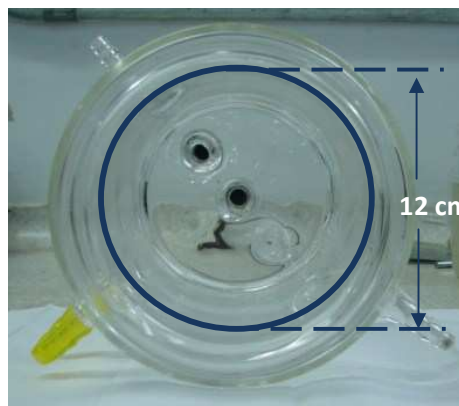


Figura 29. Reducción del diámetro de la pared de vidrio interna.

Figura 30. Esquema Causa-Efecto para el agrietamiento de la celda

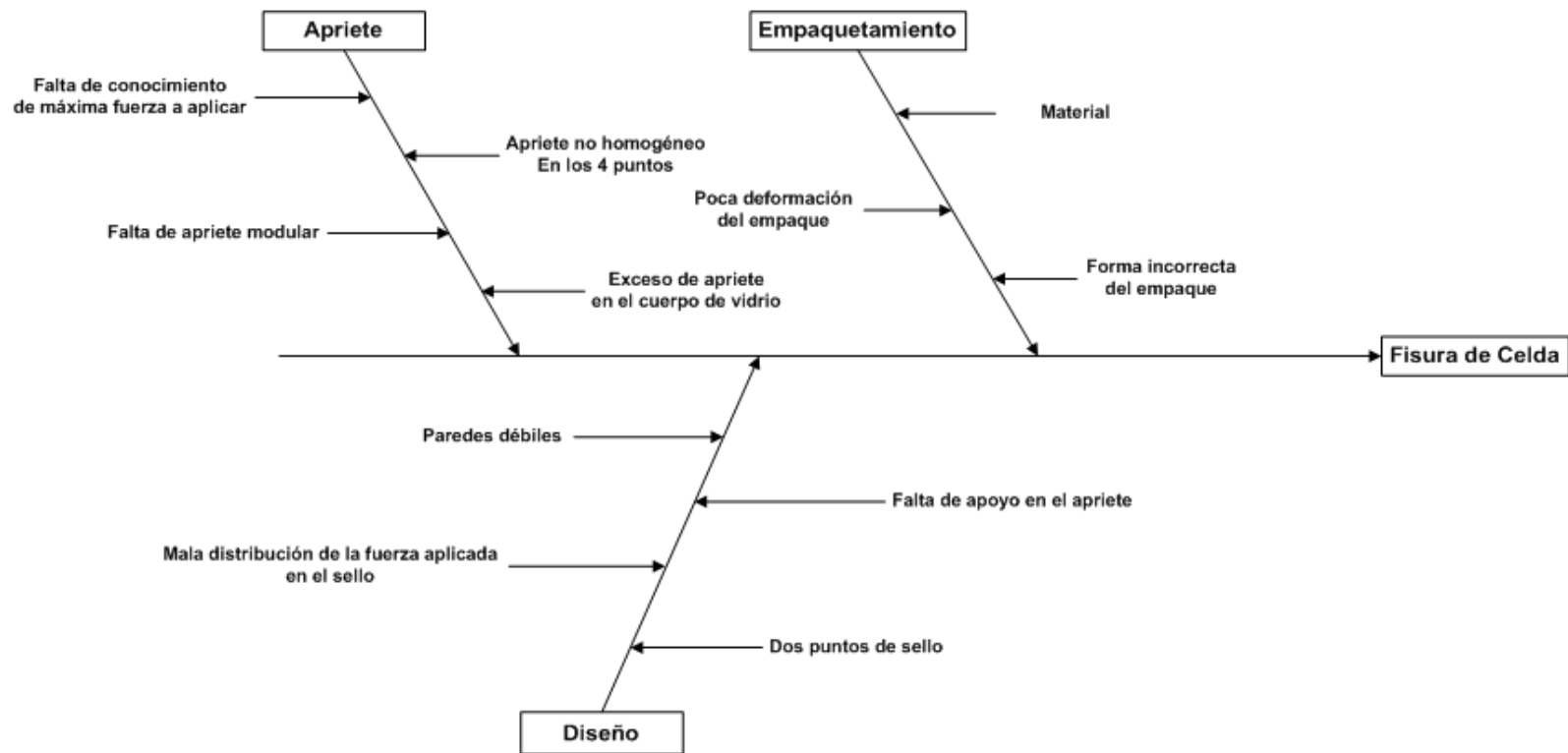


Tabla 20. Ensayo de Hermeticidad después de aplicar las mejoras

ENSAYO	PRESION (psi)	TIEMPO (minutos)	OBSERVACIONES
4	10.3	60	<ul style="list-style-type: none">• Hermeticidad total• Bajo grado de flexión de las placas de teflón.

4.4 EVALUACIÓN DE LA CORROSIÓN

4.4.1 Caracterización Metalográfica

Para el análisis metalográfico del material, se tomó una probeta por cada lámina (P1 y P2); éstas fueron preparadas siguiendo las especificaciones de la norma ASTM E-3 de 2001.

- **Sin ataque químico**

Sobre la sección analizada de las probetas se observó el tipo, tamaño y forma de las inclusiones no metálicas, de acuerdo con las especificaciones de la norma ASTM E-45 de 2001. Las muestras presentaron inclusiones no metálicas de sulfuros, serie fina, nivel de severidad 1 ½ y óxidos globulares, serie fina, nivel de severidad 1. La Figura 31 muestra las inclusiones no metálicas observadas.

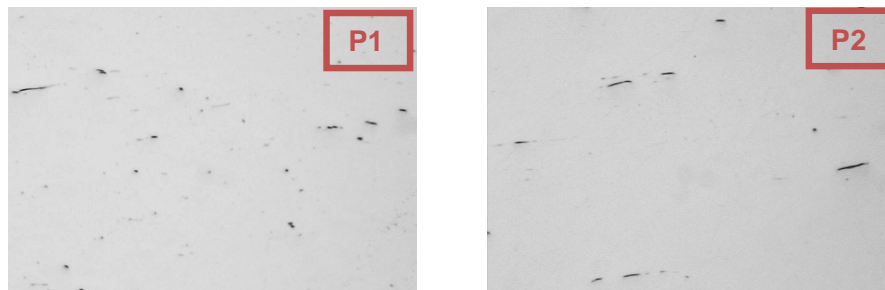


Figura 31. Inclusiones no metálicas observadas en el material de las muestras P1 y P2. Sin ataque químico. 100X.

- **Con ataque químico**

Las probetas fueron atacadas con una solución de Nital 2%, por un tiempo aproximado de 15 segundos, de acuerdo con las especificaciones de la norma ASTM E-407 de 1999.

Las probetas P1 Y P2, tomadas de una tubería, mostraron microestructuras similares, correspondientes a granos equiaxiales de ferrita con granos de perlita, como se muestra en la Figura 32.

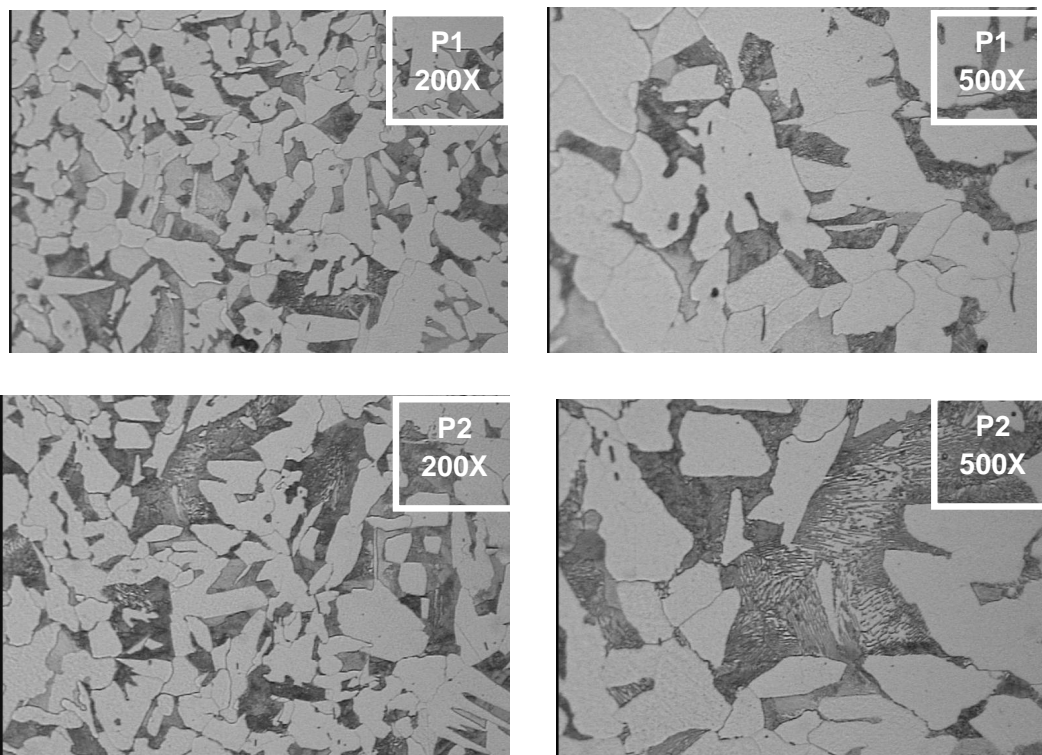


Figura 32. Microestructura uniforme compuesta por granos equiaxiales de ferrita y de perlita, característicos de aceros al carbono en estado normalizado. Ataque químico Nital 2%.

4.4.2 Dureza

Sobre una sección transversal de las muestras P1 y P2 se realizó un barrido de dureza en escala Brinell HB (187.5 Kg. / 2.5 mm), siguiendo las especificaciones de la norma ASTM E-10 de 2001. La Tabla 21 reporta los valores obtenidos y la dureza promedio de cada una de estas muestras.

Tabla 21. Resultados del ensayo de dureza para las probetas de acero API 5L Grado B.

Muestras	1	2	3	4	5	Promedio (HB)
P1	163	162	165	163	164	163.60 ± 0.89
P2	153	155	155	154	155	154.40 ± 0.89

4.4.3 Composición química

Se determinó la composición química a las muestra P1 y P2 por medio de la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica – EEO, siguiendo las especificaciones de la norma ASTM E-415 de 1999. Los resultados obtenidos se reportan en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados del análisis químico para el acero API 5L Grado B.

Elemento %	Muestra P1	Muestra P2	API 5L Grado B
C	0.252 ± 0.0029	0.260 ± 0.0064	0.28 Max
Mn	0.789 ± 0.0017	0.787 ± 0.0193	1.20 Max
P	0.015 ± 0.0013	0.019 ± 0.0133	0.030
S	0.009 ± 0.0038	0.005 ± 0.0025	0.030
Si	0.230 ± 0.0043	0.229 ± 0.0076	---
Cu	0.015 ± 0.0003	0.015 ± 0.0016	---
Ni	0.015 ± 0.0003	0.016 ± 0.0019	---
Cr	0.052 ± 0.0003	0.053 ± 0.0014	---
Mo	0.010 ± 0.0001	0.010 ± 0.0011	---
Nb	0.003 ± 0.0004	0.003 ± 0.0022	---
Co	0.003 ± 0.0001	0.003 ± 0.0008	---
V	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0004	---
Fe	Balance	Balance	---

4.4.4 Análisis superficial

Las áreas de exposición de las láminas de acero API 5L Gr. B (P1 y P2) fueron sometidas a una preparación metalográfica sin etapa de pulido, utilizando lijas 120, 240, 320, 400 y 600, hasta obtener una superficie casi espejo, con el propósito de identificar imperfecciones presentes en la superficie metálica, debido a que estos puntos pueden ser susceptibles al ataque por MIC.

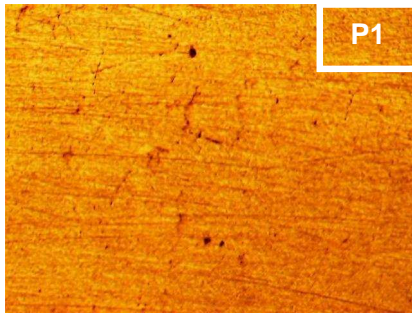


Figura 33. Área de exposición lámina de acero API 5L Gr. B. Probeta P1. 5x

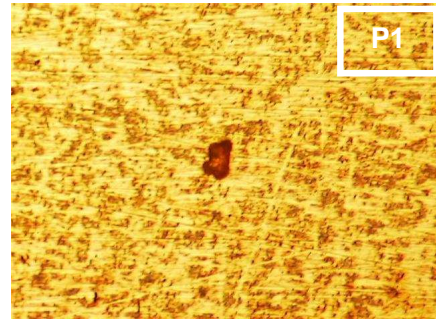


Figura 34. Área de exposición lámina de acero API 5L Gr. B. Probeta P1. 50x

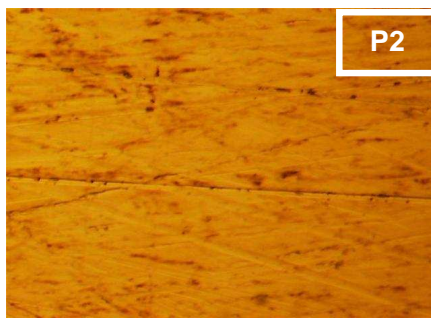


Figura 35. Área de exposición lámina de acero API 5L Gr. B. Probeta P2. 50x

En las figuras 33, 34 y 35, se observa la presencia de inclusiones no metálicas distribuidas heterogéneamente en toda la superficie; las estrías observadas en la probeta P2, se deben al proceso de desbaste a la que fue sometida la probeta. Ambas probetas fueron limpiadas con etanol y secadas con flujo de aire antes de ser colocadas en sus respectivos montajes.

4.4.5 Montaje experimental

Se utilizó el medio de cultivo C para los ensayos de impedancias, ya que favoreció la síntesis metabólica de sulfuro de hidrógeno por las BTR, con producción de 160 ppm de sulfuro en 6 días.

Las figuras 36 y 37 muestran los montajes utilizados en el desarrollo del ensayo de EIS.

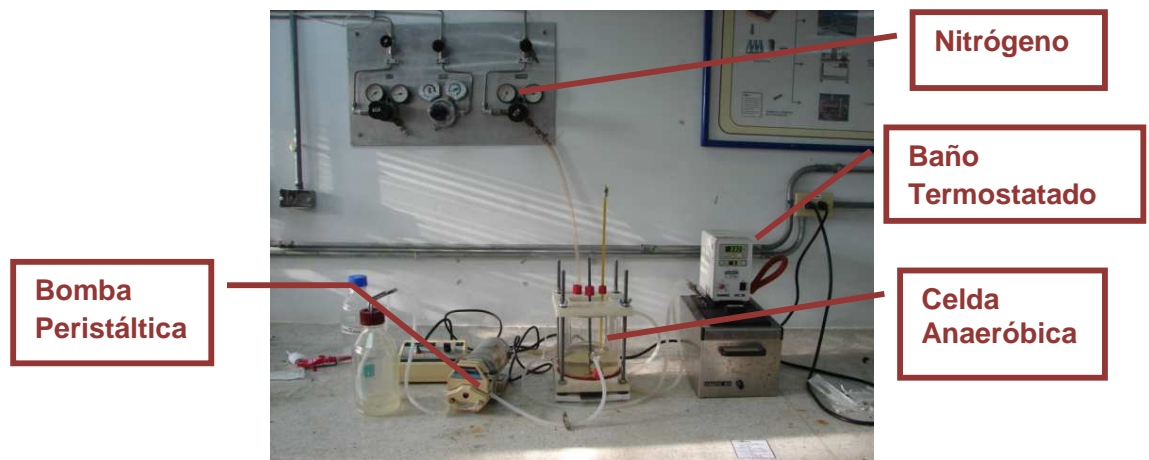


Figura 36. Montaje No. 1 Celda anaeróbica con inoculación de BTR al 10%.

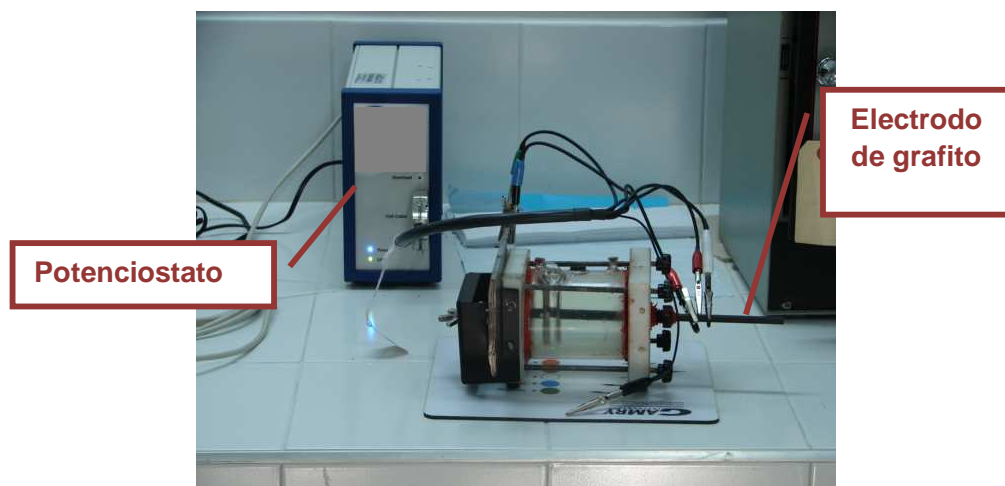


Figura 37. Montaje No. 2 Celda sin inoculación de BTR.

4.4.6 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIE)

Los resultados presentados a continuación corresponden al ensayo de espectroscopía de impedancia electroquímica, obtenidos del montaje número 1 (celda anaeróbica) durante un periodo de ensayo de 278 horas (Ver figura 36). Los resultados obtenidos en el montaje No. 2 (celda plana, control sin inocular) se presentan en la figura 37, y no fueron comparables debido a contaminación de la celda con bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno.

La presencia de bacterias en la celda número 2 se comprobó mediante una prueba de anaerobios totales, ver figura 38.

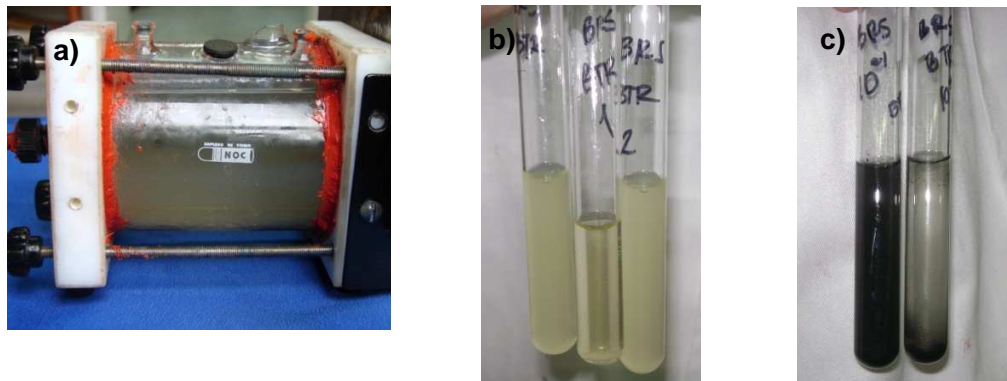


Figura 38. a) Celda blanco contaminada b) Ensayo Anaerobios Totales c) Recuento bacteriano positivo

Las figuras 39 y 40, correspondientes a los diagramas de Nyquist, muestran la variación de los valores de impedancias a diferentes tiempos.

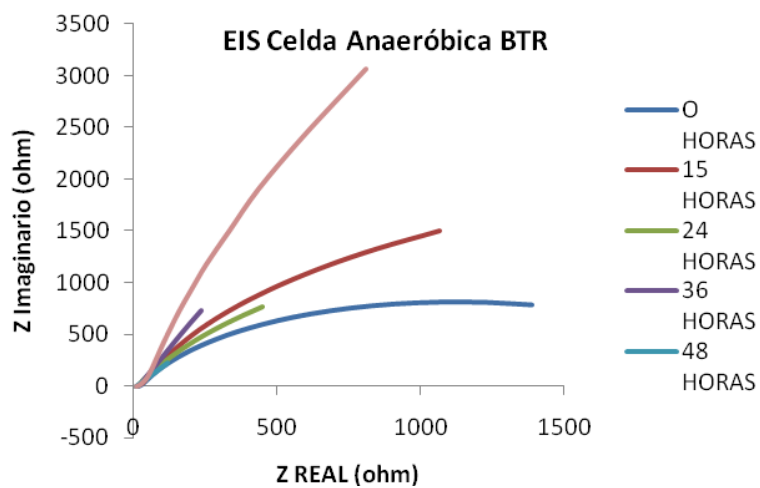


Figura 39. Gráficos de Nyquist Celda No. 1 en el intervalo de 0 – 110 horas

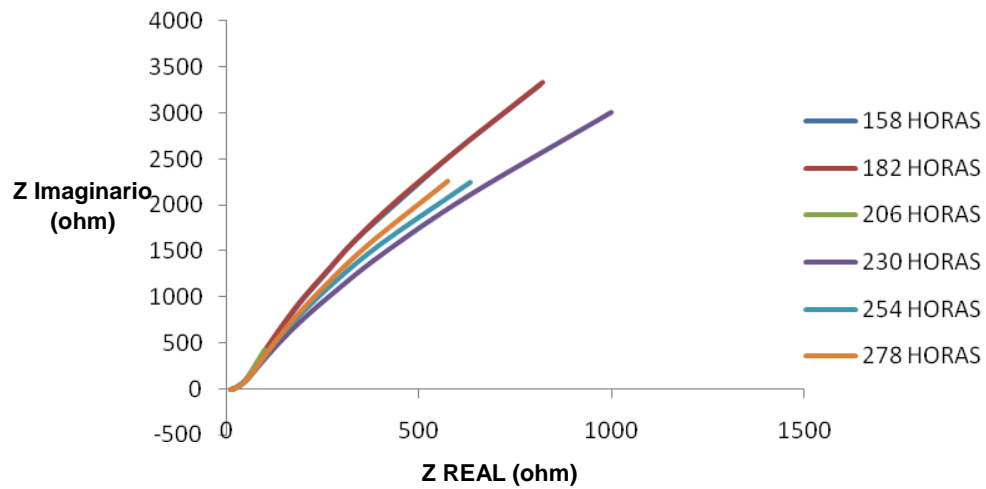


Figura 40. Gráficos de Nyquist Celda No. 1 En el intervalo de 158 – 278 horas

Los resultados de los espectros de Nyquist indican que la interfase entre el acero API 5L Grado B y el medio de cultivo inoculado presentó un comportamiento electroquímico diferente y dependiente del tiempo de ensayo. En la figura 39 se observa que la resistencia a la polarización (R_p), obtenida a un tiempo inicial (cero horas) es un valor relativamente alto, a pesar que se obtuvieron valores de R_p mayores, a tiempos de ensayo prolongados. La disminución en los valores de resistencia a la polarización presentados en el intervalo de 15 a 110 horas, hacen suponer que el proceso de corrosión se incrementa, posiblemente a la alta corrosividad del medio, rompiendo la capa pasiva formada en el acero durante este intervalo de tiempo.

En el ensayo de impedancias a 110 horas, la resistencia a la polarización aumentó considerablemente en comparación a los valores obtenidos a 0 horas, lo que pudo ser causado por la formación de una capa o biopelícula con carácter protector sobre el acero [25, 29] Los valores de R_p medidos para 134, 143, 158 y 182 tienden a un estado estable, fig. 58, que se comprueba también con la figura 41, que indica la variación del potencial de circuito abierto (OCP) con el tiempo. La tendencia del sistema hacia un estado estable de corrosión, puede ser originada por el establecimiento de un equilibrio dinámico entre la formación de una película protectora y su disolución.

Aunque los valores de resistencias a la polarización obtenidos son elevados, haciendo despreciables las velocidades de corrosión, la teoría habla de un “enoblecimiento” de potencial, el cual consiste en un desplazamiento de los potenciales de corrosión hacia valores más positivos, generando un aumento en la susceptibilidad a corrosión por picaduras causada por la actividad microbiana dentro de la biopelícula en la interfase metal-entorno. A su vez, el fenómeno de corrosión se ve enaltecido por la presencia de iones cloruro en el medio de cultivo, que pueden disminuir el pH del electrolito en los depósitos formados, provocando una corrosión localizada [29].

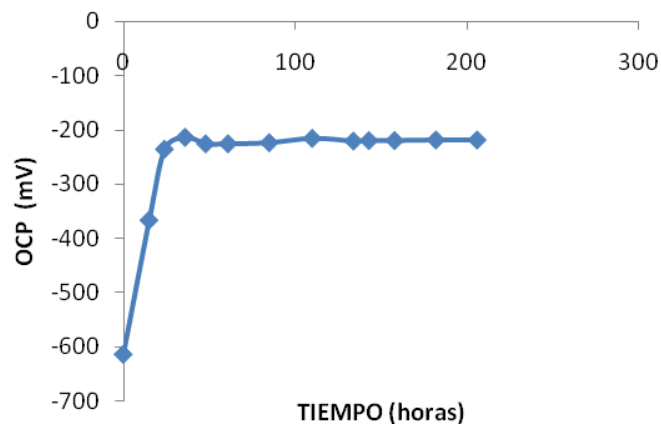


Figura 41. Variación del potencial de circuito abierto en el rango de tiempo aplicado para los ensayos de EIS.

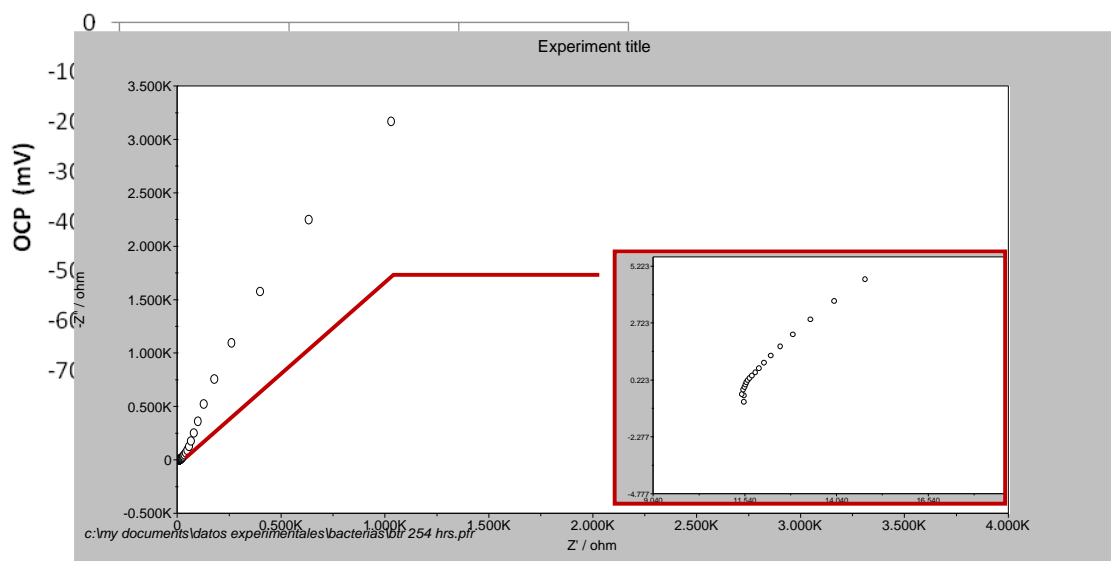


Figura 42. Diagrama de Nyquist, 254 horas

En el diagrama de Nyquist presentado en la figura 42 se observan dos semicírculos, uno pequeño a altas frecuencias, que es originado posiblemente a los altos contenido de sulfuros, y otro en el rango de 100 Hz - 10 mHz, que está relacionado con la transferencia de carga que experimenta el sistema [25].

El semicírculo a altas frecuencias apareció entre las 15-24 horas de exposición, lo cual es confirmado por los resultados obtenidos en los ensayos de cinética donde las BTR muestran una producción de 37.6 ppm de sulfuro de hidrógeno después de 24 horas de incubación.

El sulfuro de hidrógeno producido por las BTR en el medio de cultivo C, reaccionó con los iones Fe^{2+} oxidados para formar sulfuro de hierro, el cual puede encontrarse en diferentes estructuras (reacción 1 y 2), que podrían proporcionar un carácter protector ó agresivo, dependiendo de la concentración de iones ferrosos presentes en el sistema [25]. Teniendo en cuenta este análisis, es posible sugerir que la concentración de sulfuros fue relativamente alta en comparación a la concentración de iones ferrosos, razón por la cual se favoreció la pasivación el acero. El fenómeno de pasivación es a su vez confirmado por un incremento hacia valores nobles de potencial de circuito abierto (Ver figura 41) y un incremento en los valores de resistencia a la polarización (Ver figura 43).

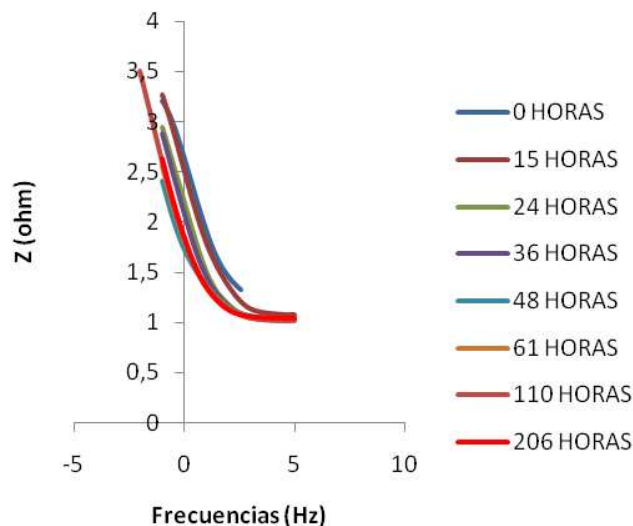
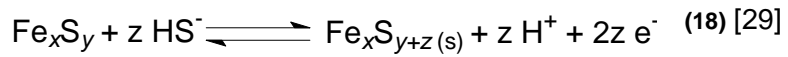
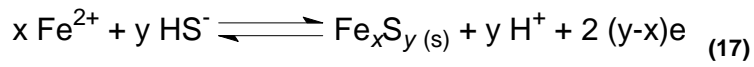


Figura 43. Gráfico de Bode. Celda No. 1, Frecuencias vs impedancias



Existen otros factores que pudieron favorecer la formación de una película protectora, como lo es la presencia de iones fosfato, que al combinarse con el sulfuro de hierro formado, den origen a depósitos más adherentes y delgados. [29]

Estudios realizados a sistemas BSR – metal mediante EIS, indican que incrementos del ángulo de fase a bajas frecuencias son el resultado de productos metabólicos (principalmente H₂S) generados por las bacterias [23]. De igual forma, las BTR aisladas de los suelos provenientes de los campos de producción del área de Neiva, generaron un incremento en el ángulo de fase medido, en zonas de baja frecuencia, evidenciando el efecto de sus productos metabólicos, en el sistema (Medio de cultivo – API 5L G. B), (Ver figura 44).

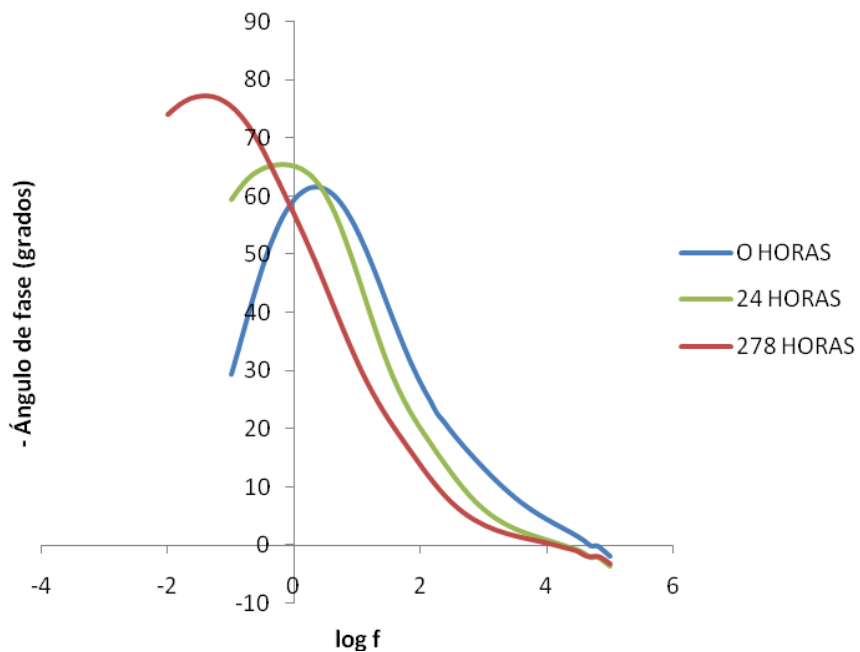
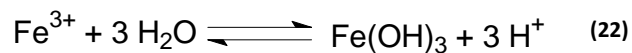
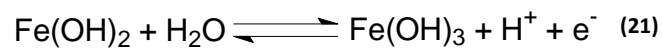
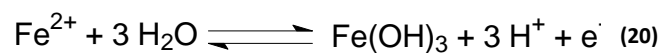


Figura 44. Gráfico de Bode. Celda No. 1, Frecuencias vs ángulo de fase.

Las figuras 45 y 46 muestran marcadas variaciones en los valores de resistencia a la polarización (R_p) y velocidades de corrosión, obtenidos a partir de la aplicación de la técnica de espectroscopía de impedancias electroquímicas, en el intervalo de 0-278 horas. En las primeras 100 horas se aprecia una disminución en la R_p , debido posiblemente a las reacciones producidas por el electrolito (19, 20, 21, 22) [30], que se manifiestan en la interfase con el metal, provocando corrosión uniforme.



En general, los productos de la corrosión (hidróxidos de hierro y sulfuros de hierro) junto con la biopelícula, tienden a formar una capa pasiva a partir de las 100 horas. El punto de inflexión observado en la figura a 206 horas, puede ser ocasionado por el efecto de los iones cloruros, que tienen la capacidad de penetrar esta capa pasiva disminuyendo la resistencia a la polarización [29]. Sin embargo, las resistencias de polarización obtenidas a tiempos mayores a 206 horas, alcanzaron valores altos, revelando una posible protección de la superficie metálica.

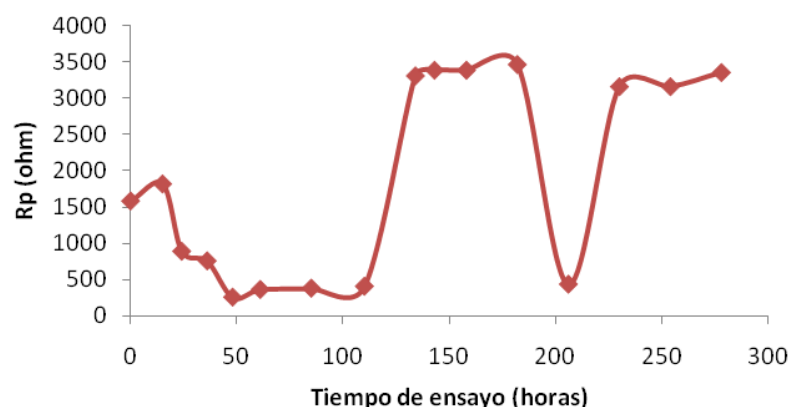


Figura 45. Variación de R_p para los diferentes tiempos de ensayos.

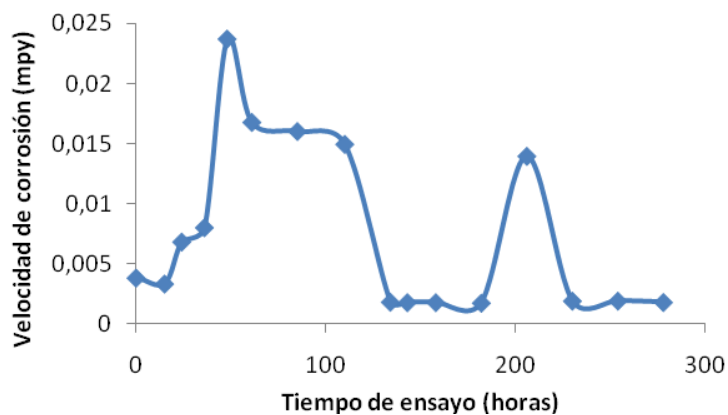


Figura 46. Variación de la velocidad de corrosión (mpy) para los diferentes tiempos de ensayos.

4.4.7 MICROSCOPIA COFOCAL

Una vez concluido el ensayo de EIS, la superficie metálica expuesta, fue preparada según lo descrito en la metodología y analizada por medio de microscopía confocal, con el propósito de observar los productos de corrosión depositados y la formación de la biopelícula durante el tiempo de ensayo.

En la figura 47, se observa una capa de óxido homogénea, de color rojizo característico de la formación de óxidos e hidróxidos de hierro, que cubre la mayor parte del área expuesta al electrolito. Esto confirma los resultados obtenidos a partir de los espectros de impedancias, donde se observó la formación de una capa pasiva que brinda una protección parcial al acero.

La actividad microbiana se desarrolló en las rendijas formadas entre el empaque de caucho, utilizado para asegurar el sello de la celda anaeróbica, y la lámina de acero; estos sitios se caracterizan por contener una alta concentración de energía, lo que facilita la adherencia de las BTR en las uniones del acero y el caucho.

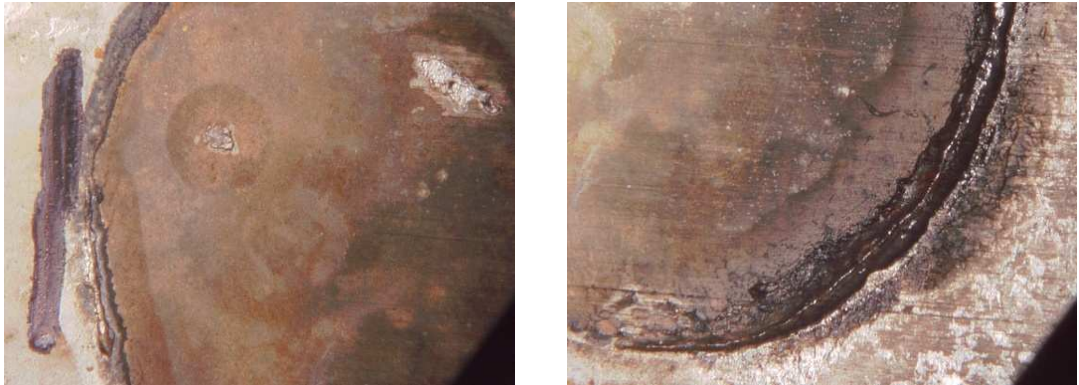


Figura 47. Superficie metálica acero API 5L Grado B expuesta a medio de cultivo inoculado con BTR. 20x

Las zonas blancas presentes en la figura 48, corresponde a residuos de bacterias y sus productos metabólicos (exopolímeros) [2, 56, 57], adheridos a zonas oscuras que corresponden a los productos de corrosión, principalmente sulfuros de hierro; los puntos rojos que se observan corresponden a óxidos formados por la interacción metal – electrolito [47]. Todas estas zonas conforman el entorno característico para desencadenar un ataque por corrosión microbiana. La interrelación entre Fe_xS_y – biopelícula, se debe a la presencia de puntos de nucleación en la estructura de la biopelícula, que favorece la formación de cristales de Fe_xS_y [29].

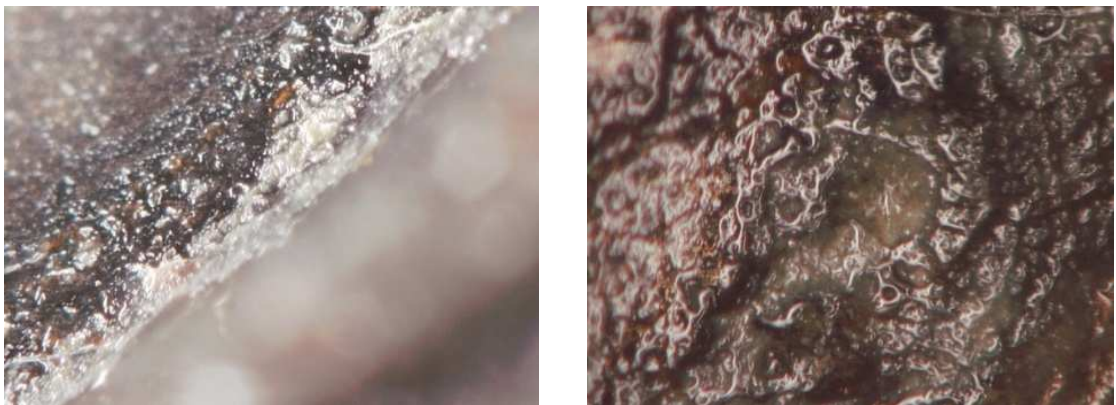


Figura 48. Depósitos de los productos de corrosión acumulados en el perímetro del área expuesta a)100X b) 200X

En la figura 49, se observan zonas claras correspondientes a la matriz polimérica de la biopelícula [46, 47, 56]. Debido a la complejidad del sistema y al corto tiempo de ensayo, es difícil predecir que tan protector puede llegar a ser esta biopelícula ó que tan agresiva pueda convertirse, para el sistema estudiado. Esta biopelícula tiene una estructura no-uniforme en la cual es posible que se establezcan gradientes de concentración que favorezcan una corrosión localizada [29].

Este tipo de estructuras se caracterizan también por permitir el flujo de materia y gases que dan lugar a puntos con bajas ó altas concentraciones de compuestos químicos, originando la formación de celdas de aireación diferencial con puntos anódicos y catódicos, donde los sitios anódicos se manifestarán por medio de picaduras.

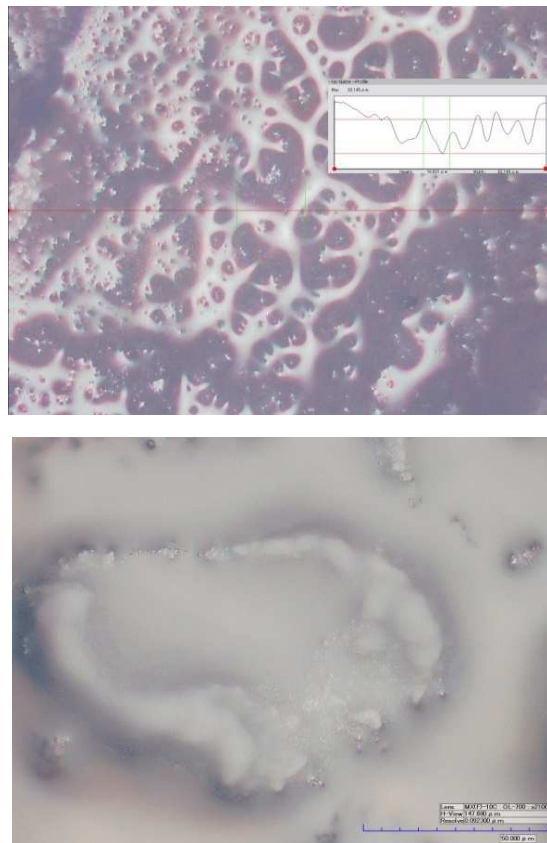


Figura 49. Presencia de sitios claros indican la formación de biopelícula en el perímetro del área expuesta a)1000X b) 2100X

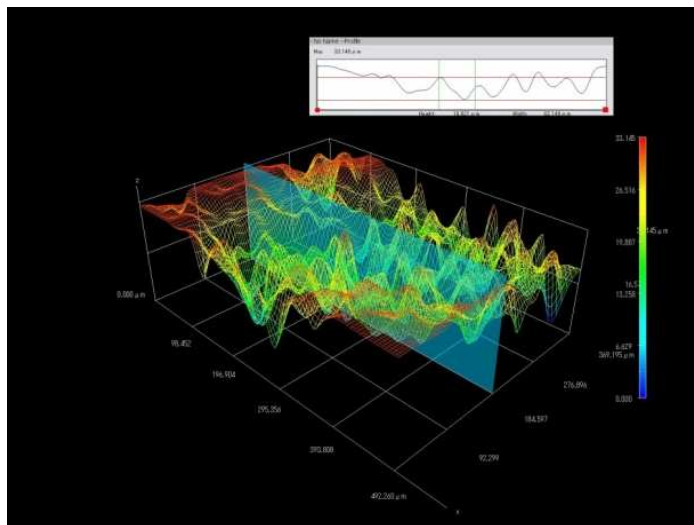


Figura 50. Perfil de profundidad para lámina de acero API 5L Grado B, Zona periférica.

En la figura 50, las zonas rojas tienen una profundidad máxima de 33.165 μm en la biopelícula; estas zonas corresponden a los depósitos de sulfuro de hierro (color negro) (ver Fig. 48) y a la matriz de la biopelícula (ver Fig. 49), observados en la periferia del área de exposición de la lámina de acero. [47]

Hacia el centro del área expuesta, las profundidades se muestran relativamente homogéneas debido a la formación de la capa de óxidos mostrados en la figura 47, y que induce el ataque de una corrosión uniforme.

5. CONCLUSIONES

- Debido a la aleatoriedad de los resultados obtenidos para las propiedades propuestas, en la caracterización de los suelos, no fue posible determinar cual o cuales de las propiedades caracterizadas, favorecen la presencia de bacterias tiosulfato reductoras en los campos de producción: Dina, Santa Clara, Cebú y Tello.
- Las bacterias tiosulfato reductoras aisladas de suelos provenientes de los campos: Dina, Santa Clara, Cebú y Tello, ubicados en el área de Neiva, son capaces de utilizar el anión sulfato como aceptor de electrones, en la cadena de transporte de electrones.
- La producción de sulfuro de hidrógeno por las bacterias tiosulfato reductoras aisladas de suelos provenientes de los campos de producción, ubicados en el área de Neiva, es menor al utilizar el sulfato como aceptor de electrones, en lugar de tiosulfato.
- El método de diluciones seriadas, empleado para la medida de biomasa durante la cinética, no es el adecuado para evaluar el crecimiento de la población de las bacterias tiosulfato reductoras aisladas, debido a las interferencias causadas en el método por la elevada producción metabólica de sulfuro de hidrógeno durante las primeras 24 horas, y por el precipitado generado como producto de la reacción entre H_2S y Fe^{2+} . Una concentración de 37 ppm de sulfuro de hidrógeno disuelto, es suficientes para generar interferencia en el método de diluciones seriadas.
- Se diseñó y construyó una celda anaeróbica, capaz de simular diferentes ambientes que favorecen el crecimiento bacteriano, permitiendo el estudio de los agentes que desencadenan la corrosión influenciada microbiológicamente.

- Las velocidades de corrosión del acero API 5L grado B, expuesto a un electrolito altamente conductor e inoculado con las bacterias tiosulfato reductoras, presentó valores bajos en un tiempo de exposición de 278 horas. Sin embargo, existe la posibilidad que a mayores tiempos de exposición las velocidades de corrosión alcancen valores críticos que puedan afectar integridad estructural de los oleoductos enterrados.
- El tiempo de exposición de la lámina de acero API 5L Grado B en contacto directo con el medio de cultivo C, no fue el suficiente para apreciar la formación de picaduras sobre la superficie metálica, a pesar que se observaron indicios de la formación de una biopelícula adheridos a depósitos de productos de corrosión, como se evidenció en las micrografías obtenidas por microscopia cofocal.
- La presencia de los productos de corrosión característicos de una degradación por efecto de microorganismos (sulfuros de hierro), fueron evidenciados por los resultados obtenidos en los ensayos de EIS y microscopia cofocal, mostrando la acción de metabolitos de BTR en el sistema y permitiendo predecir un efecto más agresivo e incluso crítico, a tiempos de exposición mayores a los empleados en este proyecto.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización de suelos teniendo en cuenta los micronutrientes (Mg, Mo, Ca,) empleados por las bacterias tiosulfato reductoras, que complementen los resultados obtenidos en este trabajo, con el propósito de identificar los parámetros del suelo que favorecen el crecimiento bacteriano.
- Utilizar un método alternativo para las medidas de producción de biomasa de las BTR que no sea susceptible a interferencias por altas concentraciones de sulfuros de hidrógeno y sulfuro de hierro.
- Realizar un diseño de ensayos cinéticos a intervalos de tiempo menores, con el propósito de evaluar el comportamiento de las BTR en medios propuestos, antes de que ocurra una producción mínima de 37 ppm de sulfuro de hidrógeno disuelto en el medio de cultivo.
- Diseñar accesorios para la celda anaeróbica, que permita la utilización de cupones de acero curvos.
- Diseñar un montaje experimental que facilite la adición de nutrientes al medio de cultivo y permita estudiar a mayores tiempos, el comportamiento corrosivo del electrolito inoculado con BTR en contacto directo con la superficie del acero API 5L Grado B.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE (API), Specification for Line Pipe, API 5L, Ed 44th, Washington, API Publishing services, 2007.
- [2] AMMAN, R, et al. Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-Reducing Bacteria in Multispecies Biofilms. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 58, No 2, (1992) p. 614 – 623.
- [3] BEECH, Iwona; SUNNER, Jan. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. En: Current Opinión in Biotechnology [En línea]. N° 15 (2004) <www.sciencedirect.com> [citada 02 Octubre 2007]
- [4] BIEZMA, Victoria; The Role of hydrogen in microbiologically influenced corrosion and stress corrosion cracking. En: International Journal of Hydrogen Energy, No 26 (2001) p. 515-520.
- [5] BOADA LOPEZ, Jairo Andrés. Degradación electrolítica de recubrimientos de ácido poli l-láctico sobre sustratos Ti-6Al-4V en solución sanguínea simulada. Tesis de Grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. 2007.
- [6] BORNEMISZA, E. Introducción a la química de suelos. Washigton D.C.: Organización of American States. 1982. p 21.
- [7] CABRERA SIERRA, Román, et al. La utilización de la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) para identificar diferentes estados superficiales en el proceso de corrosión del acero al carbono en medios amargos. En: Sociedad Química de México, vol. 1(1), págs. 32-41, ISSN 1870-1809.
- [8] CAMPAIGNOLLE, X; CROLET, J. Method for Studying Stabilization of localized Corrosion on Carbon Steel by Sulfate-Reducing Bacteria. En: Corrosion Science. Vol 53, No 6, (1997) p. 440 – 446.

- [9] CIFUENTES OSORIO, Gabriel. Estudio de la materia orgánica presente presentes en los suelos de la vereda la hoya Tunja. Trabajo de grado (Especialista en química ambiental). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2006
- [10] CORD-RUWISCH, R. et al. Sulfate-Reducing Bacteria and Their activities in Oil Production. En: Journal of Petroleum Technology. (1987). p. 97-106
- [11] COYNE, Mark. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid: Paraninfo. 2000. p. 128 ISBN 84-283-2648-7
- [12] CROLET, J; et al. *Dethiosulfovibrio peptidovorans* den. Nov., sp. Nov., a New Anaerobic, Slightly Halophilic, *Thiosulfate-Reducing Bacterium* from Corroding Offshore Oil Wells. En: International Journal of Systematic Bacteriology. Vol 43, No 3. (1997). p. 818-824.
- [13] DELWICHE, M, et al. Detection of Microbial Sulfate-reduction Associated with buried Stainless Steel Coupons. En: NACE Corrosion. Paper No 07520, (2007).
- [14] DEMAIN, Arnold. Manual of industrial Microbiology and Biotechnology. Washington: American Society for Microbiology. 1986. p. 84 – 92.
- [15] DHAWALE, S. Thiosulfate: An Interesting Sulfur Oxidation That Is Useful in Both Medicine and Industry - But Is Implicated in Corrosion. En: Journal of Chemical Education. Vol 70, No 1, (1993) p. 12 – 14.
- [16] DURR, C. L.; BEAVERS, J. A. Techniques for Assessment of Soil Corrosivity. En: Corrosion. Nº 667; p1-20 [En línea]. (1998). <<http://proquest.umi.com/pqdweb>> [citado julio de 2007] Disponible en ProQuest.
- [17] ESCOFFIER, S, et al. Evidence and quantification of thiosulfate reducers unable to reduce sulfate in ricefield soils. En: Eur. J. Soil Bio. Vol 34, No 2, (1998) p. 69 – 74.
- [18] FARDEAU, M. H₂ oxidation in the presence of thiosulfate, by *Thermoanaerobacter* strain isolated from an oil-production well. En: FEMS Microbiology Letters. No 13, (1993) p. 327-332.

- [19] GARCÍA, J; Ballesteros, M. Evaluación de parámetros de calidad para la determinación de carbono orgánico en suelos. En: Revista Colombiana de Química. Vol 34. No 2 (2005). p. 201-209.
- [20] HARRIS, D. Quantitative chemical análisis. New York: W.H. Freeman and Company. 2000. p. 152. ISBN 0-7167-2881-8
- [21] HEITZ, E; FLEMMING, H.C, et al. Microbially Influenced Corrosion of Materials, Ed Springer, Germany, 1996.
- [22] HERNÁNDEZ, G. Aislamiento y caracterización de Bacterias Tiosulfato Reductoras no Sulfato Reductoras en digestores anaerobio mesofílicos. V Taller y Seminario Latinoamericano TRATAMIENTO ANAEROBIO Y AGUAS RESIDUALES. Octubre (1998). Viña del Mar, Chile.
- [23] HALLOCK, P, et al. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. En: App microbial Biotechnol. Vol 52, (1999) p. 267 – 275.
- [24] HERNÁNDEZ GAYOSSO M.J, et al. Microbial consortium influence upon steel corrosion rate, using polarisation resistance and electrochemical noise techniques. En: Science Direct, Electrochimica Acta 49 (2004) 4295–4301.
- [25] HILBERT, L.H, et al. When can electrochemical techniques give reliable corrosion rates On carbon steel in sulfide media?. Dep. of Manufacturing Engineering and Management. Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark.
- [26] Instituto Geográfico Agustín Codazzi . Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Subdirección Agrológica. 5ª Edición. Bogotá 1990.
- [27] ISMAIL, Kh, M, et al. The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel. En: Electrochimica Acta 44 (1999) págs. 4685–4692.
- [28] JACKSON M, L. Análisis Químico de Suelos. 4ª Edición. Barcelona: Ediciones Omega S.A.

- [29] JAVAHERDASHTI, Reza. Microbiologically Influenced Corrosion. An Engineering Insight. Ed Springer, 2008.
- [30] JONES, D; AMY, P. A Thermodynamic Interpretation of Microbiologically Influenced Corrosion. En: Corrosion Science. Vol 58, No 8, (2002) p. 638 – 645.
- [31] JURY, William; HORTON, Robert. Soil physics. New Jersey: Jhon Wiley & sons, INC. 2004. p. 74
- [32] LITTLE, B.J, et al. Relationship Between Corrosion and the Biological Sulfur Cycle: A Review. En: Corrosion, Vol 56, No 4 (2000).p. 433-443.
- [33] LITTLE, B; WAGNER, P. Myths related to Microbiologically Influenced Corrosion. En: Chemical Treatment. (1997) p. 40 – 44.
- [34] MANDIGAN, Michael, et al. Brock of Biology of Microorganisms. New York: Pearson Prentice Hall, 2000.
- [35] MARCHAL, R; CHAUSSEPIED, B. Effect of ferrous ion availability on growth af a corroding sulfate-reducing bacterium. En: International Biodeterioration & Biodegradation. No 47, (2001) p. 125 – 131.
- [36] MARCUS, Philippe. Corrosion Mechanisms in Theory and Practice. Ed Marcel Dekker, Inc. ed 2th, New York, 2002. Pág 563-596.
- [37] MATEUS BARRAGAN, Miguel. Utilización de técnicas electroquímicas aceleradas en el estudio del comportamiento de los recubrimientos orgánicos tipo epóxico aplicados sobre acero al carbono. Trabajo de grado (Magíster en Ingeniería Metalúrgica). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica.2004
- [38] MATIAS, P; PEREIRA, I. Sulfate Respiration from Hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 89 (2005). p. 239-329.
- [39] McBRIDE, Murria. Environmental Chemistry of Soils. New York: Oxford University Press. 1993. p. 57 . ISBN 0-19-507011-9

- [40] MIRANDA, E, et al. Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexican oil field separator. En: Corrosion Science. No 48, (2006) p. 2417 – 2431.
- [41] OCANDO, Lisseth, et al. Evaluation of pH and H₂S on biofilms generated by Sulfate reducing Bacteria: Influenced of Ferrous Ions. En: Nace Corrosion, paper No. 07528, (2007)
- [42] ORAZEM, Marck. Electrochemical Impedance Spectroscopy. New Jersey: John Wiley & Sons. 2008. ISBN 978-0-470-04140-6
- [43] PEREZ, J de J, et al. Diseño experimental para evaluar la corrosión microbiológica del acero estructural 1010. En: Revista Cubana de Química. Vol. 13, Nº 1 (2001), p.68-81
- [44] RABOT, G; MAGOT, M. Thiosulfate Reduction, an Important Physiological Feature Shared by Members of the Order *Thermatogales*. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61, No 5, (1995) p. 2053 – 2055.
- [45] RUBIO, Celine; et al. Sulfato/Thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. En: Journal of Microbiology Methods, Elsevier, No 64, (2006) p. 287-296.
- [46] SANTEGOEDS, C, et al. Structural and Functional Dynamics of Sulfate-Reducing populations in Bacterial Biofilms. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 64, No 10, (1998) p. 3731 – 3739.
- [47] STEWART, P, et al. Biofilm structural heterogeneity visualized By three microscopic methods. En: Elsevier Science Ltd. Vol. 29, No. 8 (1995), p. 2006-2009.
- [48] SURKOV, Alexander V, et al. *Dethiosulfovibrio russensis* sp. Nov., *Dethiosulfovibrio marinus* sp.nov. and *Dethiosulfovibrio acidaminovorans* sp. Nov., novel anaerobic, thiosulfate and sulfur reducing bacteria isolated from 'Thiodendron' sulfur mats in different saline environments. En: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, No 51, (2001) p. 327-337.

- [49] SCHUMACHER, B. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. Review. United States Environmental Protection Agency Environmental Sciences Division National Exposure Research Laboratory. 2002.
- [50] VALCARCE, María Beatriz. Corrosión de cobre y aleaciones de cobre en aguas potables. En: Asociación Argentina de Materiales, N^oISSN 1668-47 88.
- [51] WERNER, S.E. Pitting of type 304 stainless steel in the presence of a biofilm containing Sulphate Reducing Bacteria. En: Corrosion Science, Vol. 40, No. 2/3, pp. 465-480, (1998) Published by Elsevier Science.
- [52] VIDELA, A; HERRERA, L. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. En: International Microbiological. No 8 (2005). p. 169-180
- [53] VOORDOUW, G. From the molecular biology of *Desulfovibrio* to a novel method for defining bacterial communities in oil field environments. En: Fuel Processing Technology. No 40, (1994), p. 331 – 338.
- [54] VOORDOUW, G. The Genus *Desulfovibrio*: The Centennial. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 61, No 8, (1995), p. 2813 – 2819.
- [55] Liamleam, W; Annachhatre, A. Electron donors for biological sulfate reduction. En: Biotechnology Advances. No 25, (2007). p. 452–463
- [56] Sheng, X, et al. The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. En: Corrosion Science. No 49, (2007) p. 2159 – 2176.
- [57] Sheng, X, et al. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. En: Journal of Colloid and Interface Science. No 321, (2008) p. 256–264
- [58] Kuang, F, et al. Effects of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of carbon steel. En: Electrochimica Acta. No 52, (2007) p. 6084–6088
- [59] Anonimo.
- [60] Aubert, ; et al. A sequential electron transfer from hydrogenases to cytochromes in sulfate-reducing bacteria. En: Biochimica et Biophysica. Acta 1476. (2000). p. 85-92

ANEXO A

Método Walkley – Black

La determinación de carbono orgánico total (COT) mediante el método de Walkley – Black implica la oxidación del suelo con una solución de $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 , suministrando energía por calentamiento durante aproximadamente 30 minutos a una temperatura entre 130 – 150 °C para garantizar la máxima oxidación de carbono [48].



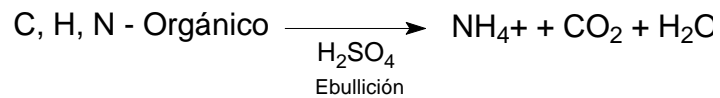
La determinación final de carbono se realiza mediante titulación por retroceso con una solución de sulfato ferroso utilizando difenilamina como indicador, o por colorimetría, cuantificando la intensidad de la coloración verde del ión Cr^{3+} ya reducido en un espectrómetro UV-VIS a una $\lambda = 585$ nm [19]; la absorbancia de la solución es proporcional a la materia orgánica que reacciona.

Al implementar la técnica calorimétrica se puede utilizar sacarosa u otra fuente de carbono para la realización de curvas de calibración.

ANEXO B

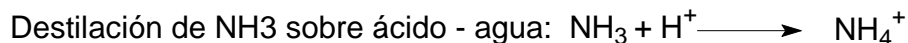
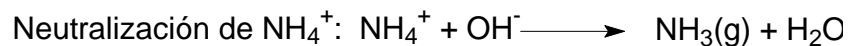
Análisis de nitrógeno Kjeldhal

Método utilizado para la determinación de nitrógeno en sustancias orgánicas. Los sólidos son digeridos por ebullición con H_2SO_4 , el cual convierte el nitrógeno a ión amonio NH_4^+ y oxida otros elementos presentes [20]:



Mercurio, cobre y selenio son utilizados como catalizadores. El punto de ebullición del H_2SO_4 es de 338 °C una vez adicionado el catalizador.

Completa la digestión, la solución contiene NH_4^+ que es liberado como NH_3 mediante destilación en medio básico y recolectado en una solución ácido - agua, el exceso de ácido es titulado con NaOH estándar determinando la cantidad de ácido que fue consumido por el NH_3 [20].



ANEXO C

Método de dilución seriada

En muchos casos interesa contar únicamente las células vivas, con este propósito se han desarrollado métodos para evaluar el número células viables (células con la capacidad de duplicarse y formar descendencia). Con el fin de obtener el número apropiado de células normalmente se diluye la muestra. el montaje del método se lleva a cabo en tubos de ensayo (medio líquido) o cajas de petri (medio sólido) y se puede realizar las diluciones que se deseen, ver figura 1.

Si se trabaja con microorganismos anaeróbicos se debe garantizar que el tubo (solución y atmósfera) esté libre de oxígeno, esto se consigue mediante desplazamiento de oxígeno con nitrógeno o CO_2 .

Para el caso específico de las BTR la solución en cada tubo de ensayo es medio de cultivo optimo para el crecimiento, el cual contiene Fe. El Fe funciona como indicador al precipitado como FeS cuando reacciona con el H_2S generado metabólicamente por las bacterias. La concentración de bacterias en la muestra es igual al inverso de la dilución alcanzada (último tubo ennegrecido) en los tubos de ensayo.

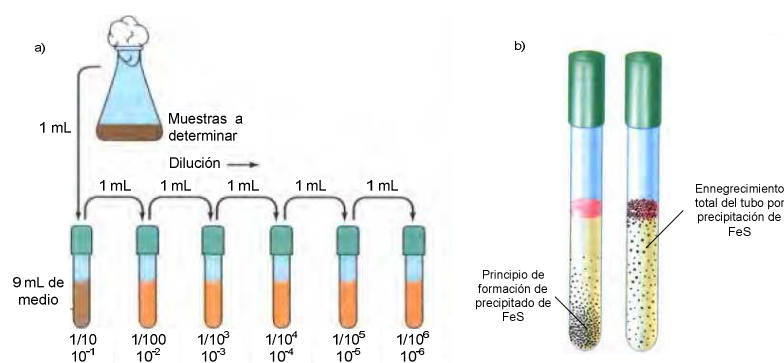


Figura C 1. a) Montaje diluciones seriadas b) positivo al crecimiento de bacterias productoras de H_2S

ANEXO D

Reactivos utilizados en la caracterización de los suelos y en las experiencias cinéticas

Tabla D.1. Lista de reactivos usados en la caracterización de suelos.

REACTIVO	MARCA	PUREZA (%)
$K_2Cr_2O_4$	Merck	99.9
H_2SO_4	Merck	95 – 97
Glucosa	Merck	100
Tabletas Kjeldhal	Merck	---
NaOH	Merck	99
H_3PO_4	Analitical L.S.	95
$Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$	J.T. Baker	99.9
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck	99.5
KCl	Merck	99.5

Tabla D.2. Lista de reactivos usados en las experiencias de cinéticas.

REACTIVO	MARCA	PUREZA (%)
KH_2PO_4	Merck	99.5
NaH_2PO_4	Merck	99
NH_4Cl	Merck	99.8
NH_4NO_3	Merck	99
$Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$	J.T. Baker	99.9
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck	99.5
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck	99
NaCl	Merck	99.5
$FeCl_2$	Merck	Comercial
L(+) $C_6H_6O_6$	Merck	99.7
Extracto de levadura	Merck	---
Lactato de sodio	Merck	50

ANEXO E

Concentraciones de iones lactato, tiosulfato, sulfato y sulfuro de hidrógeno medidos durante el desarrollo de las experiencias cinéticas

Tabla E.1. Concentración de iones lactato, tiosulfato y sulfato en los medios de cultivo, en los días 0 y 6.

Medio	Concentración Lactato (ppm)	Concentración Sulfato (ppm)	Concentración Tiosulfato (ppm)
A D ₀	3302	1707	120
B D ₀	2139	1554	368
C D ₀	2219	9.82	529
A D ₆	1824	1365	13.41
B D ₆	1305	1551	194
C D ₆	1206	9.69	240

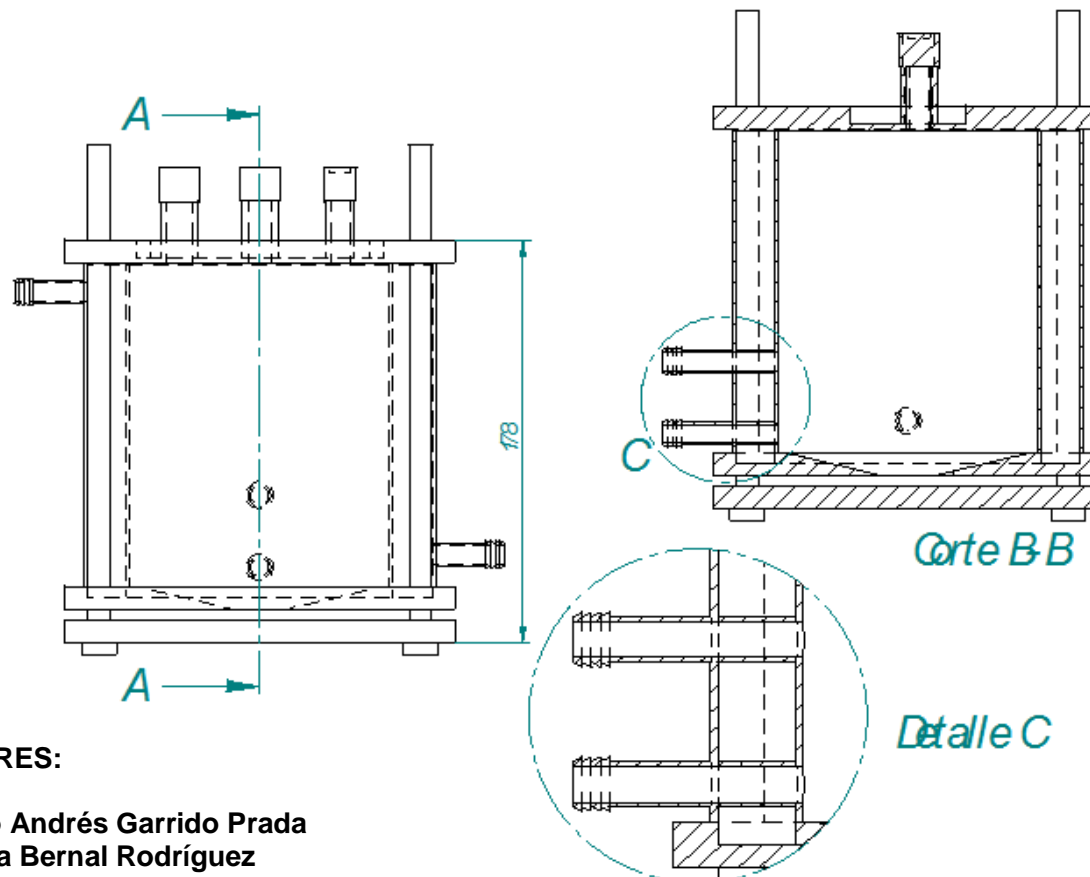
Tabla E.2. Concentración de sulfuro de hidrógeno disuelto.

Día	Medio A (ppm)	Medio B (ppm)	Medio C (ppm)
D ₀	N.D.	N.D.	N.D.
D ₁	N.D.	34.2	37.6
D ₂	35.2	40.3	59.4
D ₃	36.8	80.6	98.1
D ₄	42.1	73.4	142
D ₅	46.7	73	144
D ₆	45	100	163

ANEXO F

Planos de la celda anaeróbica

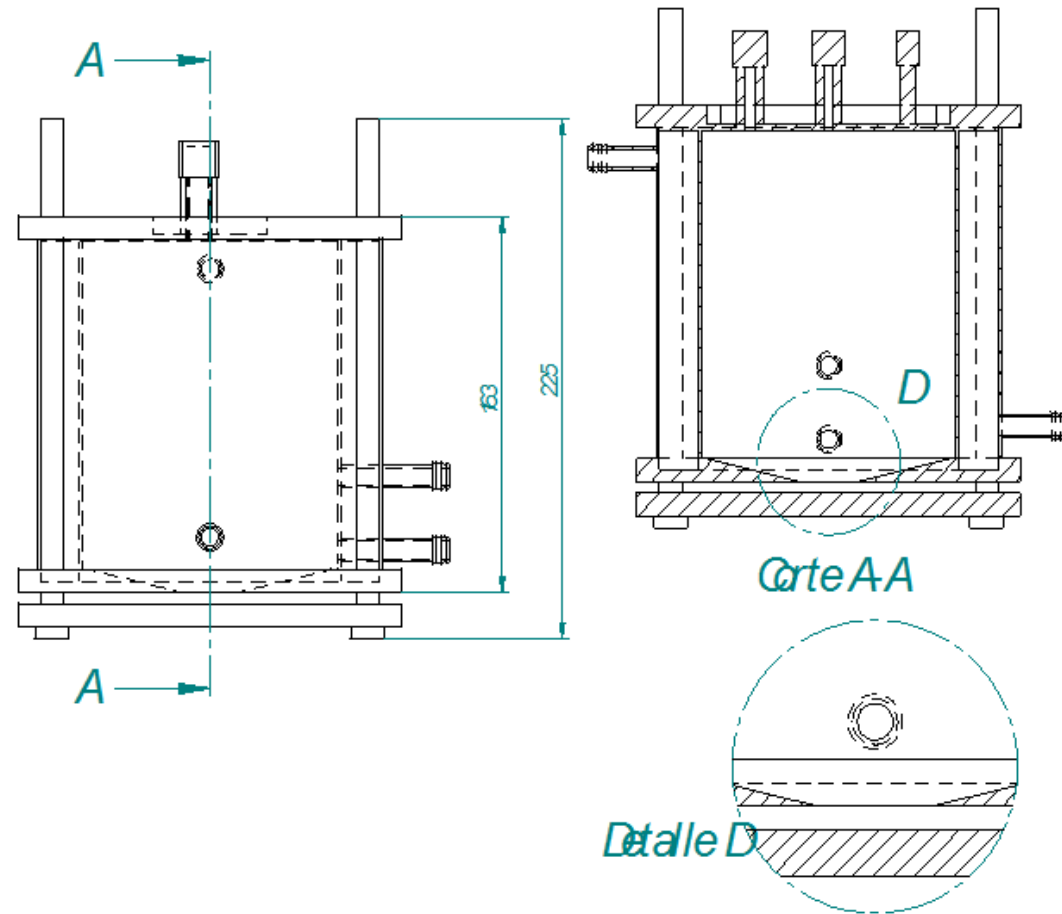
Figura F.1. Plano de diseño celda anaeróbica. Vista frontal



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

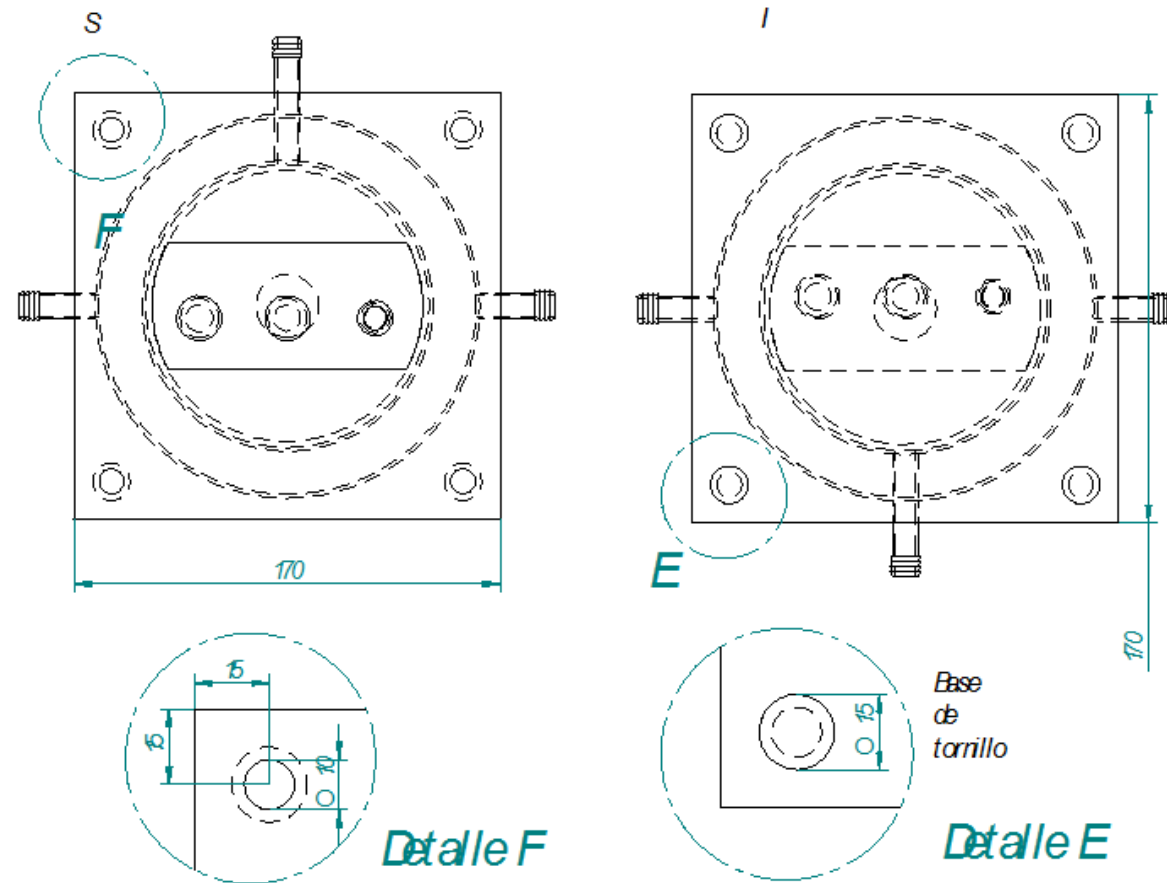
Figura F.2. Plano de diseño. Vista lateral derecha



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

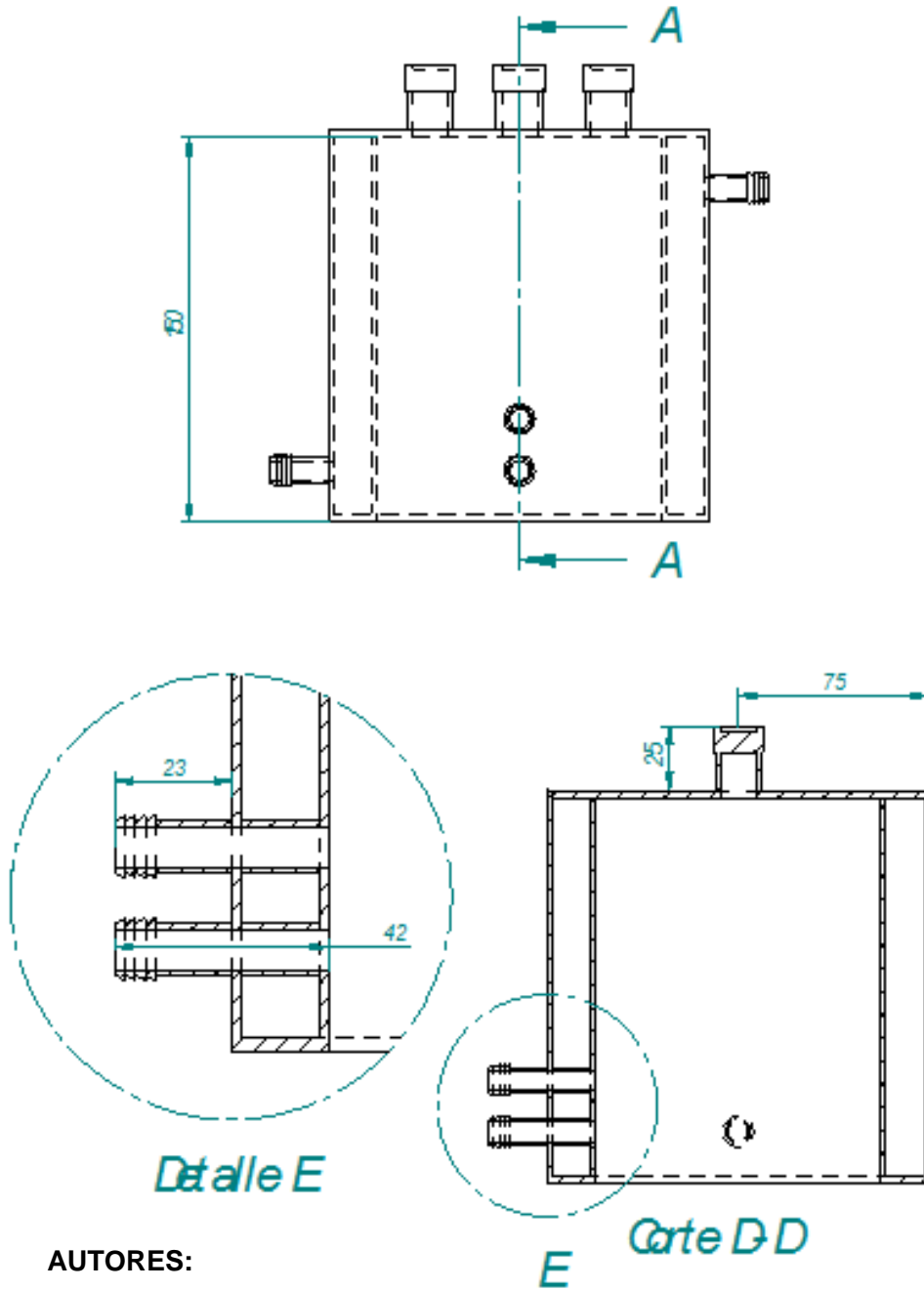
Figura F.3. Plano de diseño celda anaeróbica. A) Vista Superior, B) vista inferior



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

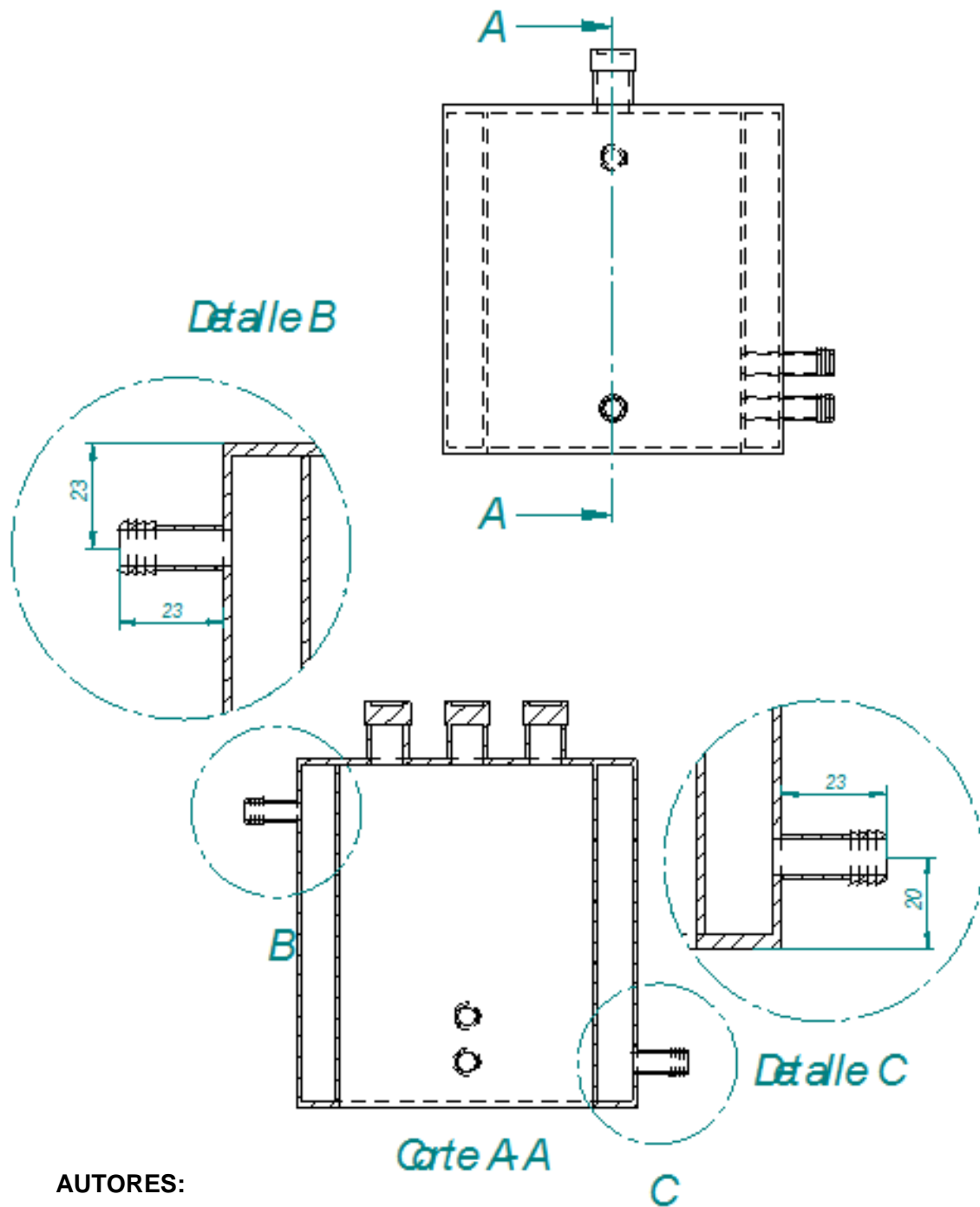
Figura F.4. Plano de Cuerpo de vidrio. A) Frontal



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

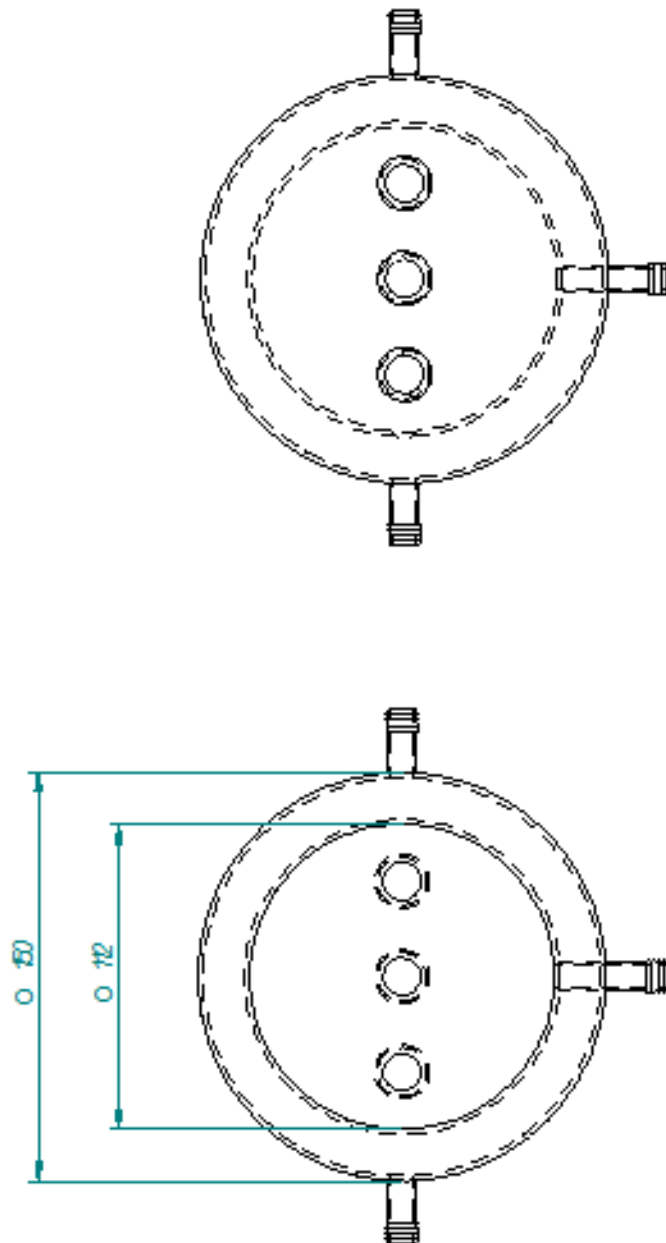
Figura F.5. Plano de Cuerpo de vidrio. A) Vista lateral derecha



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

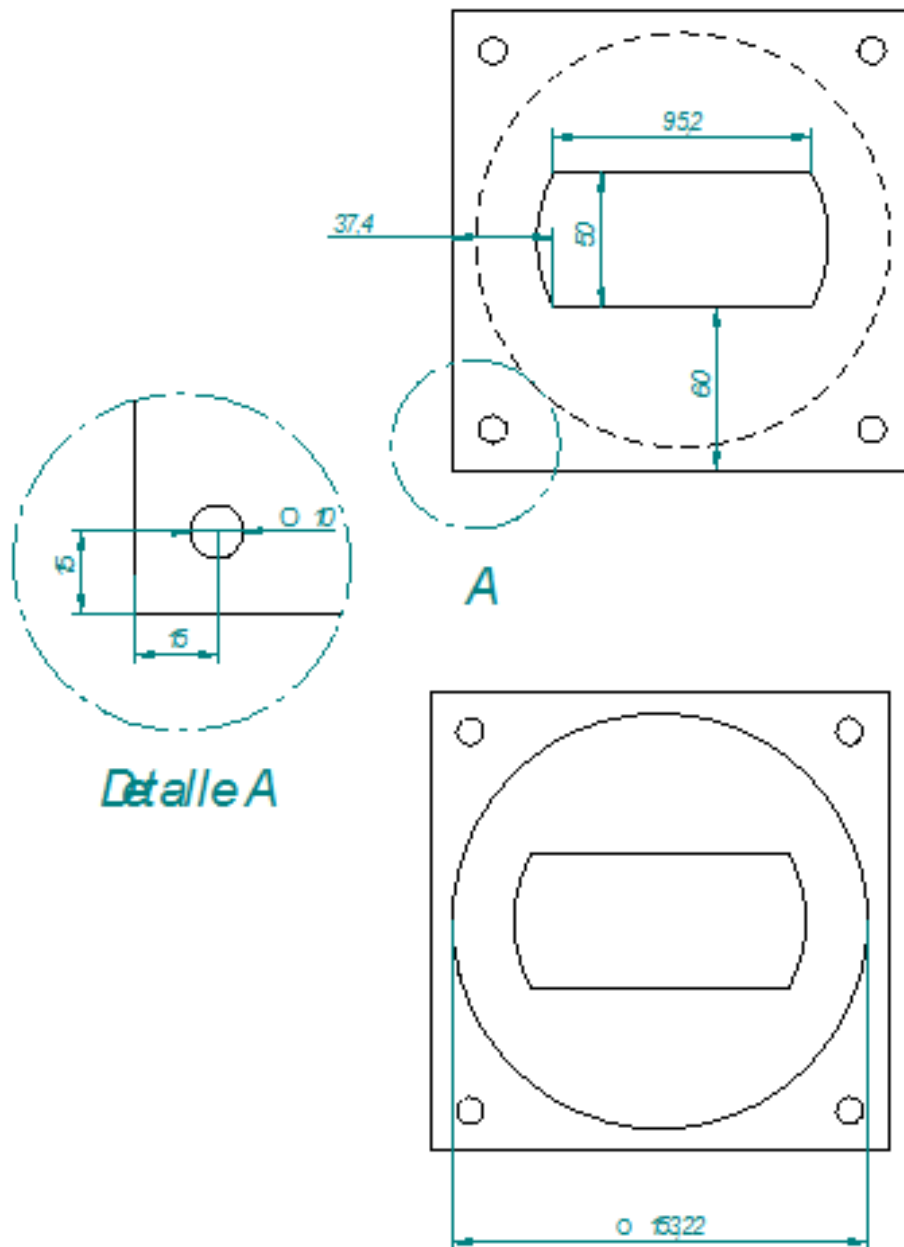
Figura F.6. Plano de Cuerpo de vidrio. A) Vista Superior B) Vista Inferior.



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

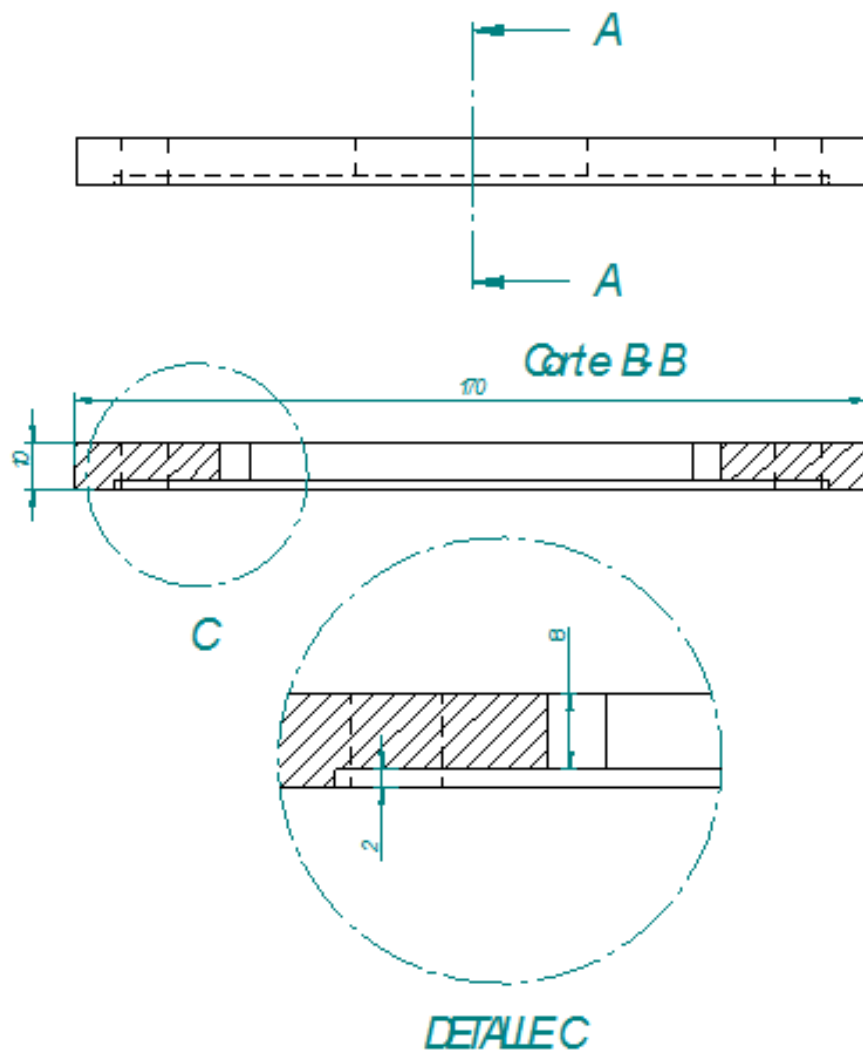
Figura F.7. Plano de Tapa superior. A) Vista exterior. B) Vista Inferior



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

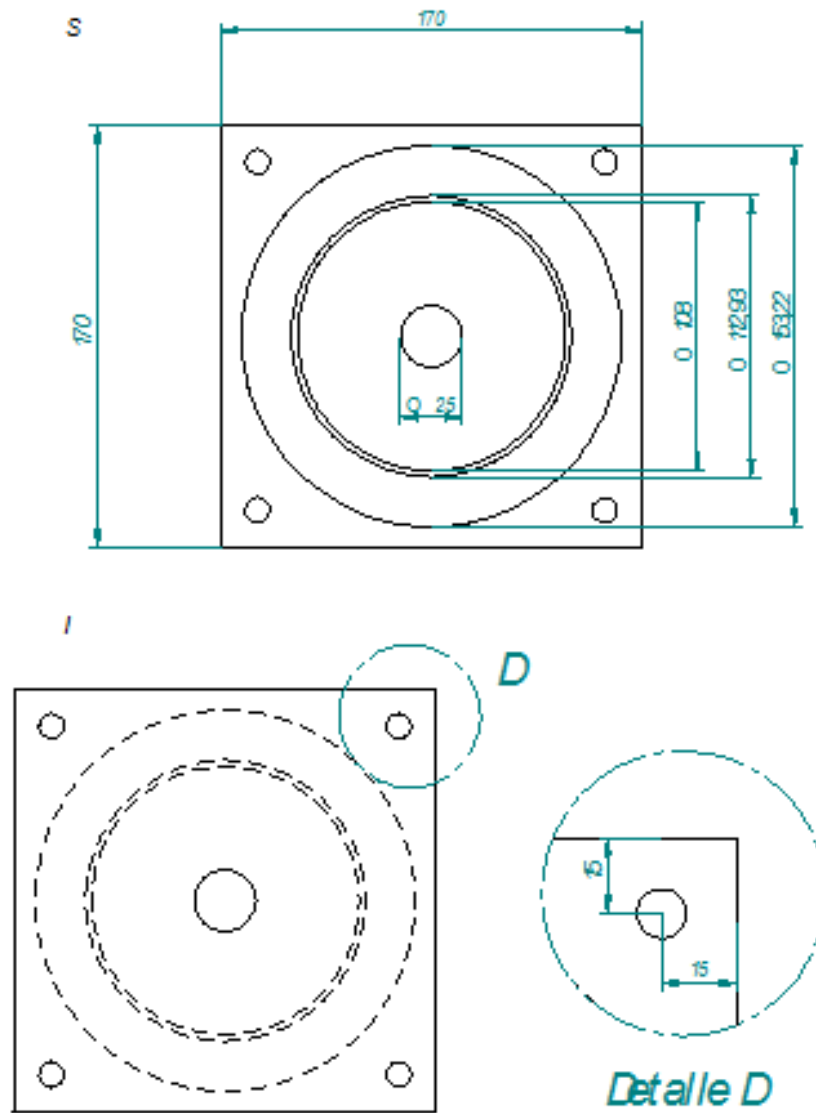
Figura F.8. Plano de Tapa superior. Vista Lateral derecha



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

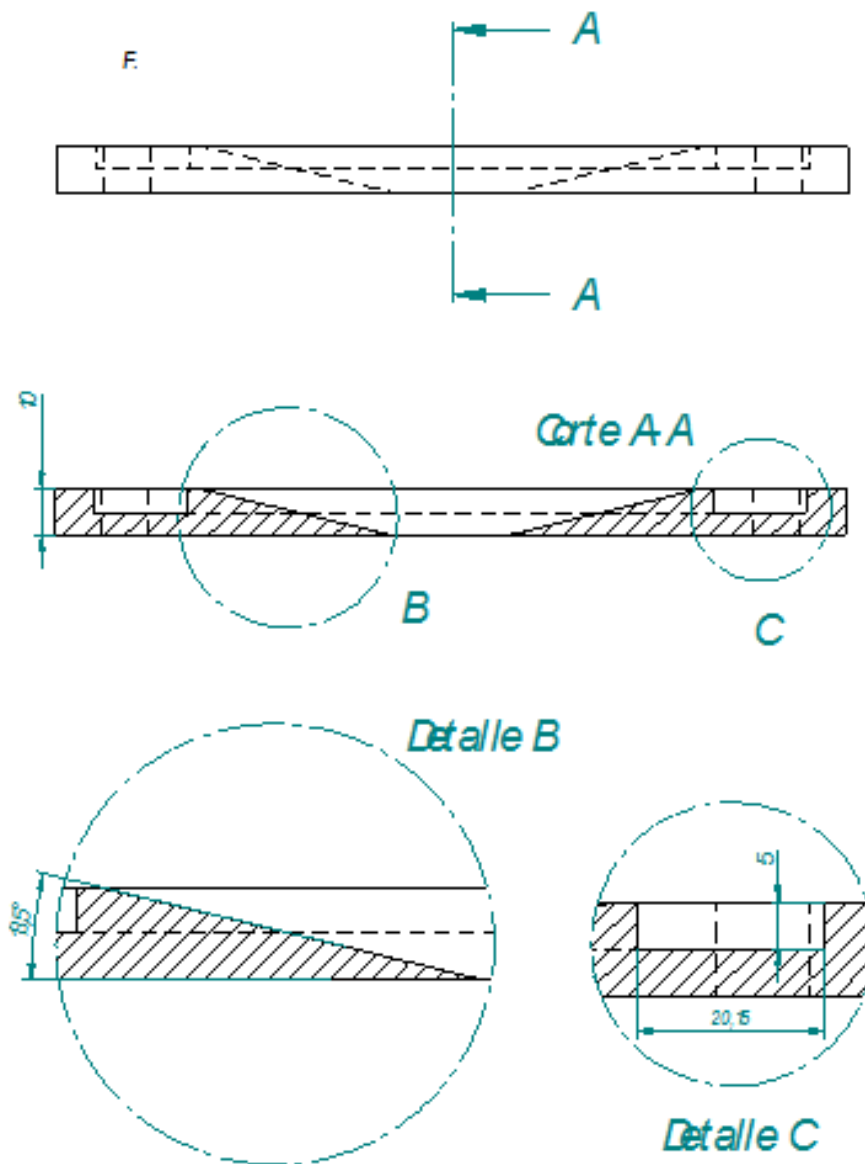
Figura F.9. Plano de tapa de teflón intermedia. Vista Superior



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

Figura F.10. Plano de Tapa superior. Vista Lateral derecha



AUTORES:

Sergio Andrés Garrido Prada
Andrea Bernal Rodríguez

ANEXO G

Valores de resistencia de polarización, velocidad de corrosión y potenciales de circuito abierto, obtenidos de la aplicación de la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Tabla G.1 Valores de Resistencia a la polarización y velocidad de corrosión obtenidos por EIS

ENSAYO	RS+ R1 (ohm)	Rp (ohm)	Rtotal (ohm)	Velocidad de corrosión (mm/y)
0	17.7827	1584.8931	1567.1104	1,64598E-05
15	17.7827	1819.7008	1801.9181	1,43359E-05
24	15.3992	891.2509	875.8517	2,92701E-05
36	15.3992	758.5775	743.1783	3,43893E-05
48	13.1825	257.0395	243.857	0,00010149
61	13.8038	363.0780	349.2742	7,18495E-05
85	12.5892	380.1893	367.6001	6,86157E-05
110	10.7152	407.3802	396.665	6,40359E-05
134	10.9647	3311.3112	3300.3464	7,87814E-06
143	13.049	3388.4415	3375.3925	7,69881E-06
158	13.8542	3388.4415	3374.5872	7,69881E-06
182	15.8489	3467.3685	3451.5196	7,52356E-06
206	12.789	436.5158	423.7268	5,97618E-05
230	16.9824	3162.2776	3145.2952	8,24942E-06
254	13.8038	3162.2776	3148.4737	8,24942E-06
278	16.2181	3357.3761	3341.1579	7,77004E-06

Tabla G.2 Variación del potencial de circuito abierto con el tiempo

TIEMPO (h)	OCP (mV)
0	-614
15	-367
24	-236
36	-214
48	-226
61	-226
85	-224
110	-216
134	-221
143	-220
158	-220
182	-219
206	-219
230	0
254	0
278	0
