

**UN PANORAMA MÁS CLARO DE LA CORROSION INFLUENCIADA
MICROBIOLÓGICAMENTE: LA RELACIÓN ENTRE LA AGRESIVIDAD DEL
SUELO Y LA COMUNIDAD MICROBIANA RESIDENTE**

CINDY NATHALIA ESPITIA JAIMES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2012

**UN PANORAMA MÁS CLARO DE LA CORROSION INFLUENCIADA
MICROBIOLÓGICAMENTE: LA RELACIÓN ENTRE LA AGRESIVIDAD DEL
SUELO Y LA COMUNIDAD MICROBIANA RESIDENTE**

CINDY NATHALIA ESPITIA JAIMES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga

Director

DR. JORGE HERNÁNDEZ TORRES

Codirector

GENIS ANDRÉS CASTILLO VILLAMIZAR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2012

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1.1 ESTUDIO DE LA CORROSIVIDAD DEL SUELO	13
1.1.1 Sitios de estudio y toma de muestras.....	13
1.1.2 Caracterización fisicoquímica del suelo.	14
1.1.3 Estimación de la agresividad global del suelo.....	14
1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	15
1.2.1 Recuentos microbiológicos.	15
1.2.2 Amplificación microbiana en medios selectivos.	16
1.2.3 Extracción del DNA genómico total.....	16
1.2.4 Amplificación por PCR del gen 16S rDNA.....	17
1.2.5 Clonación y Secuenciación.	18
1.3 ANÁLISIS DE DATOS	18
2. RESULTADOS	20
2.1 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SUELO EN LOS PUNTOS DE MUESTREO	20
2.2 CÁLCULO DE LA CORROSIVIDAD GLOBAL DE LOS SUELOS	21
2.3 RECuento MICROBIOLÓGICO DE CADA MUESTRA DE SUELO	21
2.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA COMUNIDAD BACTERIANA CULTIVABLE SEGÚN MUESTRA DE SUELO	23
3. DISCUSIÓN.....	26
4. CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Mapa de la República de Colombia donde se muestra el trayecto recorrido por el oleoducto central Ocesa, desde Cusiana hasta Coveñas.....	13
Figura 2. Curva de rarefacción que muestra el esfuerzo de muestreo realizado en el estudio.	24
Figura 3. Árbol filogenético construido mediante Neighbor Joining.	25

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los suelos en los puntos de corrosión.	21
Tabla 2. Corrosividad global del suelo	21
Tabla 3. Recuento Microbiológico según muestra de suelo.....	22
Tabla 4. Identificación de las secuencias obtenidas del gen 16S rDNA, analizadas en la base de datos del RDP y BLAST de la NCBI, de cinco muestras del suelo..	23

RESUMEN

TÍTULO: UN PANORAMA MÁS CLARO DE LA CORROSION INFLUENCIADA MICROBIOLÓGICAMENTE: LA RELACIÓN ENTRE LA AGRESIVIDAD DEL SUELO Y LA COMUNIDAD MICROBIANA RESIDENTE*.

AUTOR: CINDY NATHALIA ESPITIA JAIMES[†]

DESCRIPCIÓN:

Las bacterias son capaces de causar eventos corrosivos, produciendo graves daños en la industria. Este fenómeno se conoce como corrosión influenciada microbiológicamente (MIC). Las características fisicoquímicas del suelo y la comunidad bacteriana asociada son fundamentales para predecir la aparición de un daño por MIC. En este estudio, las características fisicoquímicas involucradas en los eventos corrosivos: resistividad eléctrica, pH, potencial Redox, presencia de sulfuros y tipo de suelo; fueron determinadas para cinco muestras de suelo, 548, 549, 550, 553 y 563, tomadas a lo largo de una tubería subterránea de transporte de petróleo en Colombia. Utilizando un método basado en lógica difusa se determinó el estado de agresividad de cada muestra. Una caracterización microbiológica de la comunidad bacteriana cultivable se llevó a cabo por medio de métodos Moleculares (secuenciación parcial del gen 16S rDNA) para 4 grupos poblacionales: bacterias heterótrofas totales (THB), bacterias anaerobias totales (TAnB), bacterias productoras de ácido (APB) y bacterias sulfato reductoras (SRB). El propósito de este trabajo fue determinar de qué manera las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo pueden proveer información para diagnosticar un evento corrosivo en una tubería. De acuerdo al análisis fisicoquímico del suelo, la muestra 549 fue determinada como corrosiva, con un daño en la tubería del 46%. Sin embargo las muestras de suelo restantes fueron determinadas de acuerdo a sus características fisicoquímicas como no corrosivas y la tubería en estos puntos también presentó niveles de daño elevados. La agresividad y metabolismo de algunas bacterias diferentes a las SRB, ha sido subestimada. El género *Clostridium* presente en todos los puntos muestreados podría dar un indicio del daño en la tubería. A medida que la acción de las THB, TAnB, APB y las SRB esté mejor comprendida, es probable que el análisis microbiológico supere al fisicoquímico como prueba diagnóstica de la corrosión.

PALABRAS CLAVES: 16S rDNA, Características fisicoquímicas, Comunidad bacteriana cultivable, MIC, Suelo.

* Proyecto de Investigación

[†] Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Director Dr. Jorge Hernández Torres.
Codirector Genis Castillo Villamizar

ABSTRACT

TITLE: A CLEARER VIEW OF MICROBIOLOGICALLY INFLUENCED CORROSION: RELATIONSHIP BETWEEN SOIL AGGRESSIVENESS AND MICROBIAL RESIDENT COMMUNITY[‡].

AUTHOR: CINDY NATHALIA ESPITIA JAIMES[§]

DESCRIPTION:

Bacteria are capable of causing a corrosive event, causing severe damage to the industry. This phenomenon is known as microbiologically influenced corrosion (MIC). Physicochemical characteristics of soil and associated bacterial community are the main parameters to take into account when predicting the occurrence of damage by MIC. In this study, physicochemical characteristics involved in the most corrosive events: electrical resistivity, pH, redox potential, presence of sulfur and soil type; were determined for five samples of soil, 548, 549, 550, 553 and 563, taken along an underground oil pipeline in Colombia. Using a method based on fuzzy logic, aggressiveness status of each sample was determined. Microbiological characterization of the bacterial community was carried out using molecular methods (partial sequencing of 16S rDNA) for 4 population groups: total heterotrophic bacteria (THB), total anaerobic bacteria (TAnB), acid-producing bacteria (APB) and sulfate-reducing bacteria (SRB). The purpose of this study was to determine how the physicochemical and microbiological characteristics of soil can provide information to diagnose corrosion events in a pipe. According to physicochemical analysis, soil sample 549 was determined as corrosive, with 46% pipe damage. However, the remaining soil samples were determined as non corrosive according to their physicochemical characteristics, despite pipe at these points also showed high levels of damage. The aggressiveness and metabolism of some bacteria other than the SRB that could be heavily involved in the MIC, has been underestimated. The genus *Clostridium*, present in all sampled points, could give an indication of pipe damage. As the action of THB, TAnB, APB and SRB is better understood, it is probable that microbiological analysis could exceed physical-chemical analysis as corrosion diagnosis.

KEYWORDS: 16S rDNA, Cultured bacterial community, MIC, Physical-chemical characteristics, Soil.

[‡] Research Project

[§] Science Faculty. School of Biology. Director Dr. Jorge Hernandez Torres. Codirector Genis Castillo Villamizar

INTRODUCCIÓN

La corrosión se presenta cuando los metales o algunas aleaciones pasan de un estado electroquímico a otro por medio de una ionización. Éste fenómeno ocurre en presencia de un electrolito, por lo que consta de dos reacciones: una anódica, en la que el metal corroído es oxidado dada la pérdida de electrones y una catódica en la que se presenta una reducción y consecuentemente la protección del metal (17).

La adhesión bacteriana y subsecuente formación de un *biofilm* heterogéneo da lugar a complejos sistemas biológicos (9,29). Estos causan cambios químicos en la interfaz metal-*biofilm* contribuyendo a la formación de focos corrosivos en la superficie del metal. Cuando los microorganismos apropiados están presentes, son capaces de iniciar, facilitar y acelerar una reacción de corrosión. Este proceso es bien conocido y documentado como Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC*) (7,31,55).

La MIC se manifiesta de diversas formas que incluyen picadura, grieta, corrosión de depósito y corrosión por quiebre bajo presión (32). Este tipo de deterioro afecta muchas clases de industrias. En el sector petrolero, constantemente se registran rupturas en las tuberías subterráneas por causa de la MIC. (28,57). El suelo que circunda estas tuberías es un ambiente heterogéneo en el cual la tasa de corrosión de los metales varía de acuerdo con las características fisicoquímicas y microbiológicas.

Las Bacterias Sulfato Reductoras (SRB**) han sido identificadas como las responsables de los casos más severos de la MIC (23,25,49). Por esta razón, son

* Microbiologically Influenced Corrosion

** Sulfate Reducing Bacteria

el foco principal de los estudios en los daños a las infraestructuras del gas y del petróleo. Sin embargo, reportes recientes sugieren que no necesariamente las SRB están presentes de manera abundante en todas las comunidades microbianas asociadas a la corrosión (27,57). Por ejemplo, se han reportados casos de MIC en tuberías de diesel y nafta en ausencia de SRB (33,36,43), en los cuales estarían estrechamente relacionadas bacterias aerobias (8,50,54).

Se estima que el 20% o 30% de los daños en las tuberías de transporte de hidrocarburos son catalizadas por microorganismos (34). En Estados Unidos se gastan cientos de millones de dólares en la reparación y prevención de daños causados por la MIC, para la producción, transporte y almacenamiento del petróleo (15). En Colombia, se estima que los costos por corrosión son equivalentes al 2,3% de su PIB. Esta cifra con tendencia a aumentar, favoreció la creación de una entidad de carácter nacional, la Corporación para la Investigación de la Corrosión (51)

Las comunidades bacterianas asentadas en los focos de corrosión han sido caracterizadas de muchas formas. El uso del gen 16S rDNA como marcador molecular para explorar la diversidad y estructura de las comunidades microbianas ha sido aplicado a varios estudios de muestras ambientales tales como suelo (35), agua marina (18), sedimentos (24) y lodo granular anaeróbico (41). El análisis de las secuencias de DNA ribosomal facilitan la identificación bacteriana en muestras ambientales así como el entendimiento de las relaciones filogenéticas microbianas (56).

Para cumplir con el tiempo de vida útil de las tuberías subterráneas (30 a 50 años) y garantizar su fiabilidad, la MIC debe ser controlada y contrarrestada (30). No obstante, cuando se trata de evaluar la corrosividad de un suelo en contacto con tuberías, se concede especial atención a sus características fisicoquímicas. Sin embargo, una visión integral de las comunidades bacterianas asociadas a las

características fisicoquímicas permitiría contrarrestar más eficazmente los focos corrosivos en ambientes específicos. Estudios de este tipo, que profundicen en la relación descrita anteriormente no se realizan.

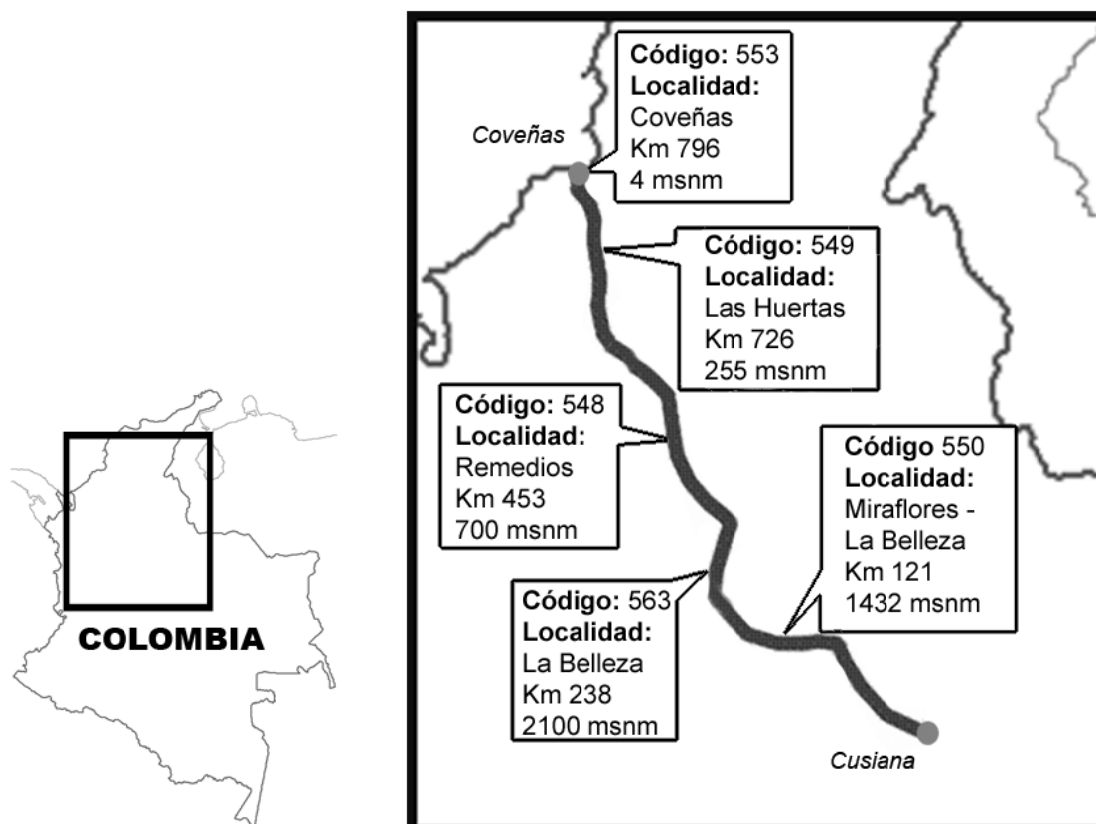
El propósito de este Trabajo de Grado fue el de evidenciar la población de bacterias cultivables predominantes en cinco focos corrosivos de una tubería petrolera, en relación con las características fisicoquímicas del suelo circundante. Los resultados contribuirán al entendimiento de los factores que deben tenerse en cuenta en el momento de abordar un estudio sobre corrosión asociada a la MIC y a la ingeniería para contenerla.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 ESTUDIO DE LA CORROSIVIDAD DEL SUELO

1.1.1 Sitios de estudio y toma de muestras. Las muestras de suelo fueron tomadas en 5 localidades a lo largo del oleoducto central Ocesa S.A. de la empresa Ecopetrol. Ubicado en el territorio colombiano con una longitud de 830 km, se extiende desde el piedemonte llanero hasta la terminal marítima de Coveñas (Fig. 1).

Figura 1. Mapa de la República de Colombia donde se muestra el trayecto recorrido por el oleoducto central Ocesa, desde Cusiana hasta Coveñas. Los recuadros corresponden a los puntos de toma de muestras de suelo.



Cada muestra fue colectada de una zona en estrecho contacto con la tubería averiada por corrosión externa, detectada por medio de una herramienta inteligente. En el caso donde había *biofilm*, fue recolectado mediante hisopos estériles, impregnándolo con la mayor cantidad de muestra e introduciéndolo en tubos de ensayo con medios para el transporte de las muestras: PBS^{††}, dirigido al procesamiento de microorganismos anoxigénicos (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1.44 g/L de NA₂HPO₄ y 0,24 g/L de KH₂PO) y PBA^{‡‡}, dirigido al procesamiento de microorganismos oxigénicos (PBS, 0,1% de albúmina de suero bovino y 0,1% de azida de sodio). Luego de localizar el punto de daño de la tubería, se procedió a la toma de la muestra de suelo continua al daño mediante espátulas estériles. 30 g de cada muestra de suelo se depositaron en 30 ml de PBS y 30 ml de PBA, cada uno almacenado en un frasco de vidrio tapa rosca de cierre hermético con capacidad para 100 ml. De esta manera se procedió con todas las muestras.

1.1.2 Caracterización fisicoquímica del suelo. Se determinaron las siguientes características fisicoquímicas del suelo: pH, presencia de sulfuros, contenido de humedad, potencial redox, resistividad eléctrica y distribución granulométrica. La medición del pH se realizó de acuerdo a la norma ASTM^{§§} G51-95 (3). La presencia de sulfuro se evaluó de manera cualitativa, teniendo en cuenta el viraje a color pardo de una tira de acetato de plomo (formación de PbS). La medición del potencial redox se llevó a cabo siguiendo la norma ASTM G200-09 (6). La resistividad eléctrica de las muestras de suelo se calculó de acuerdo a la norma ASTM G57-95 (5). La distribución granulométrica se determinó en concordancia con la norma ASTM D422-63 (4).

1.1.3 Estimación de la agresividad global del suelo. Se utilizó un método basado en lógica difusa (*Fuzzy Logic*) (40), para evaluar la corrosividad global del

^{††} Phosphate Buffered Saline

^{‡‡} Phosphate Buffered Azide

^{§§} American Section of the International Association for Testing Materials

suelo (45). Por este método se consideraron tres estados de agresividad del suelo: Corrosivo, Moderadamente Corrosivo y No Corrosivo. Cada uno de ellos se determinó para los factores resistividad, pH, potencial redox, sulfuros y granulometría de acuerdo a los valores obtenidos para cada una de las muestras (Tabla 1). Se asignaron pesos acordes con la influencia de cada característica fisicoquímica en los eventos corrosivos, determinada por expertos en corrosión (39) y se construyó una matriz normalizada con los valores obtenidos en cada estado para cada característica, la cual se multiplicó por los pesos anteriormente mencionados y dio como resultado los valores para cada estado de agresividad del suelo (b_c , b_{mc} y b_{nc}). Por medio de un proceso conocido como *desfuzzificación* (12), se determinó el estado de cada suelo, eligiendo el que presentara un mayor valor.

1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

1.2.1 Recuentos microbiológicos. Las muestras recolectadas se sonicaron a una frecuencia de 35 Khz durante 2 min. Posteriormente se mezclaron por inversión 10 veces hasta garantizar su completa homogenización. Con una jeringa estéril se tomó 1 ml de la muestra y se inoculó en 9 ml del medio correspondiente al grupo bacteriano. El tubo inoculado se incubó por un período de 2 a 4 h, transcurrido este tiempo se procedió a hacer diluciones seriadas de la muestra original (1:10), de acuerdo al método del número más probable (MPN^{***}) (13). Cada grupo se cultivó en viales cerrados herméticamente con el medio de cultivo correspondiente, a 32°C (de acuerdo a la temperatura de recolección de la muestra). Se hicieron diluciones seriadas hasta garantizar la ausencia de bacterias en la última dilución. El procedimiento se realizó por duplicado y el resultado se expresó en unidades formadoras de colonia por gramo (CFU/g). Las muestras fueron procesadas antes de 48 h luego de su colecta en campo.

*** Most Probable Number

Se desarrolló un sistema de valoración para atribuir un valor cuantitativo, en función de si el conjunto de grupos bacterianos por muestra es o no corrosivo, por sus características metabólicas y fisiológicas en los procesos corrosivos. Se asignaron pesos relativos a cada grupo bacteriano, SRB: 0,4; APB⁺⁺⁺: 0,3; TAnB⁺⁺⁺: 0,15; THB^{§§§}: 0,15. De acuerdo a la cantidad de bacterias obtenidas, se determinó un peso relativo (0, 1, 2, 3, 4) según la magnitud del recuento (No Detectable, 10^1 - 10^2 , 10^3 - 10^4 , 10^5 - 10^6 , mayor a 10^6 , respectivamente) en base a clasificaciones y criterios que han sido determinados.

1.2.2 Amplificación microbiana en medios selectivos. 1 ml de cada muestra se inoculó en 9 ml del medio correspondiente al grupo bacteriano. Los cultivos mixtos se centrifugaron y los sedimentos bacterianos se usaron para la extracción de DNA metagenómico (ver 2.2.3). Cada grupo bacteriano: Bacterias heterótrofas totales (THB), bacterias anaerobias totales (TAnB), bacterias productoras de ácido (APB) y bacterias sulfato reductoras (SRB) fue sembrado en medios específicos, Luria Bertani (LB), tioglicolato, DRF y Lactato, respectivamente, de acuerdo a lo propuesto en la norma de la Sociedad Internacional de corrosión (NACE) (37). Las bacterias que requerían anoxigenia fueron incubadas en jarras Gas Pack. El período de incubación dependió del grupo bacteriano. Para las THB, TAnB y APB fue de 10 días y para las SRB fue de 28 días. A todas las bacterias se les evaluó su cinética de crecimiento mediante indicadores como la turbidez o cambio de color del medio, a 37°C.

1.2.3 Extracción del DNA genómico total. El DNA metagenómico bacteriano fue extraído de los cultivos bacterianos mixtos, usando un método modificado, originalmente descrito por Ausbell et al. (1992). Las células fueron concentradas por centrifugación a 12.000 g por 2 min y los *pellets* fueron resuspendidos en 567

⁺⁺⁺ Acid Producing Bacteria

⁺⁺⁺ Total Anaerobic Bacteria

^{§§§} Total Heterotrophic Bacteria

μl de Buffer TE. Posteriormente 30 μl de 10% SDS y 3 μl de 20 mg/ml Proteinasa K fueron agregados. La suspensión se incubó a 37°C durante 1 h. Transcurrido el periodo de incubación, se adicionaron 100 μl de 5 M NaCl, luego 80 μl de CTAB-NaCl y se incubó a 65°C por 10 min. Se agregó un volumen igual de cloroformo: alcohol-isoamil (24:1) y la mezcla se centrifugó a 12.000 g por 5 min. Al sobrenadante se le añadió un volumen de fenol cloroformo: alcohol-isoamil (25:24:1) y se repitió la centrifugación anteriormente descrita. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol para la precipitar del DNA; se centrifugó 12.000 g por 5 min y el DNA se lavó con 1 ml de 70% etanol. Finalmente, el DNA se resuspendió en 25 μl de Buffer TE.

1.2.4 Amplificación por PCR del gen 16S rDNA. El gen 16S rDNA fue amplificado del DNA total usando dos *primers* bacterianos universales: EUB338F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG3') y UNIV907R (5'CCGTCCATTCCTTTGAG TTT3') (2). Estos *primers* amplifican 570 pb correspondientes a las regiones hipervariables V3, V4 y V5 de *E. coli* (11). La reacción de PCR se hizo en 25 μl con 50 ng de DNA, 1X Master Mix, 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 0.4 μM de cada *primer* y 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Promega®). Las amplificaciones por PCR^{****} se iniciaron con una desnaturalización a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 61°C y 1 min a 72°C, y una extensión final a 72°C por 5 min en un termociclador MJ Research PTC-100. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de 0,8% agarosa, coloreados con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989). El tamaño de los amplificados fue evaluado en comparación con el marcador de 1 kb (GeneRuler 1kb Plus, 75-20,000 bp). Los productos de PCR fueron purificados con el kit de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA).

^{****} Polymerase Chain Reaction

1.2.5 Clonación y Secuenciación. Los productos de PCR purificados fueron clonados en el vector p-JET 1,2™ (Fermentas) y propagados en células competentes de *E. Coli* JM109 (método con CaCl₂) de acuerdo con el protocolo de transformación descrito por Sambrook et al. (47). Se efectuaron minipreparaciones de DNA plasmídico de acuerdo al método propuesto por Zhou et al. (1990), con modificaciones. Los clones elegidos se pusieron a crecer durante 16 h en 5 ml de medio LB líquido a 180 rpm y 37 °C. Los cultivos se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se centrifugaron por 1 min a 10.000 rpm. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron con vórtex en 100 µl de TE con 20 µg/ml RNAsa. Se adicionaron 200 µl de solución TENS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, y 0.5% SDS) y se agitó por inversión hasta lisar las células. 150 µl de acetato de potasio fueron añadidos y se agitó por inversión 10 veces. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se adicionó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol-isoamil (25:24:1). Los tubos fueron mezclados con breve vórtex y se centrifugaron por 3 min a 12.000 rpm. Dos volúmenes de 100% etanol frío fueron añadidos a cada tubo y se mezclaron por inversión 10 veces. Las minipreparaciones se incubaron por 5 min en hielo y se centrifugaron 12 min a 12.000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* se lavó con 500 µl de 70% etanol frío, invirtiendo el tubo varias veces. Finalmente se centrifugó 4 min a 12.000 rpm; el sobrenadante nuevamente fue descartado y el *pellet* resuspendido en 25 µl de TE. Las minipreparaciones fueron verificadas en geles de 1% agarosa. El servicio de secuenciación se contrató con la empresa Macrogen (Corea).

1.3 ANÁLISIS DE DATOS

Las secuencias recibidas de Macrogen fueron editadas con el software Lasergene™ de DNASTAR (10). La conformación de quimeras se corroboró con *Bellerephon* del software *Chimera Check*™ (26). La atribución de OTUs se realizó por medio de las aplicaciones en línea BlastN del NCBI (1) y *Classifier* del *Ribosomal Database Project* (14). Se consideró una identificación a nivel de

género cuando las secuencias exhibieron una identidad $\geq 95\%$. Las secuencias fueron alineadas con el software *Muscle* (19). La matriz de distancia entre las secuencias nucleotídicas se calculó con el programa DNADist (21). La curva de acumulación de especies se construyó utilizando el software Mothur (48) y finalmente, el neighbor joining fue construido en el programa MEGA 5.0 (52).

2. RESULTADOS

2.1 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL SUELO EN LOS PUNTOS DE MUESTREO

Las características fisicoquímicas de los suelos analizados se muestran en la Tabla 1. Los suelos 548 y 563 evidenciaron un pH ácido, mientras que los tres restantes fueron superiores a la neutralidad. La evaluación cualitativa de sulfuros resultó negativa en todos los casos. El contenido de humedad fue alto para las muestras 548, 549 y 563 (>20%); es decir, los suelos 550 y 553 pueden considerarse no húmedos. La muestra que presentó la resistividad eléctrica más baja fue el suelo 549 (Ω/cm) y por lo tanto propensa a conductividad eléctrica.

Como lo exige la norma ASTM D422-63 (4), para la distribución granulométrica se tomó como referencia un tamaño de grano $> 0,075 \mu\text{m}$. Teniendo en cuenta el porcentaje de retención en esta abertura, la muestra 549 obtuvo el mayor valor y por lo tanto estuvo compuesta de partículas muy finas. De hecho, durante la colecta, el suelo 549 fue valorado como arcilla, marga arcillosa y humus. Como se aprecia en la Tabla 1, los demás suelos exhibieron un tamaño de grano mucho más grande. Las muestras 548 y 553 tuvieron un suelo calcáreo, compuesto principalmente de piedras calizas y arena. La composición de las muestras 550 y 563 fue marga, marga arenosa y arcilla arenosa.

Por otra parte, como se aprecia en la Tabla 1, los valores de potencial redox son relativamente altos; no obstante, la muestra 549 se destacó por ostentar el valor más bajo de todas las muestras de suelo (145,8 mV).

Finalmente, durante la inspección automatizada de la tubería (*Smart Pig*), el dispositivo de detección de daño por pérdida de material debido a la corrosión externa tomó registro para cada uno de los puntos aquí estudiados. Los valores fueron 45% (548), 46% (549), 27% (550), 38% (553) y 14,4% (563). Es decir, el punto de mayor avería por corrosión fue el sitio 549.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los suelos en los puntos de corrosión.

Código	pH	Sulfuros cualitativos	Humedad (%)	Resistividad eléctrica (Ω/cm)	Granulometría > 0,075 μm	Potencial redox (mV vs ENH)
548	5,7	-	23,7	10.000	0,318	193,13
549	7,9	-	30,0	1.300	82,261	145,8
550	8,1	-	11,0	10.000	1,624	333,4
553	7,3	-	19,1	4.100	2,557	384,3
563	5,0	-	24,0	180.000	0,817	334,0

2.2 CÁLCULO DE LA CORROSIVIDAD GLOBAL DE LOS SUELOS

El índice de corrosividad global del suelo es el parámetro cuantitativo más importante porque involucra todos los parámetros considerados en el análisis fisicoquímico, evitando analizar individualmente cada uno de ellos (22). De acuerdo al análisis efectuado en este trabajo (Tabla 2), la muestra de suelo 549 presentó un índice que se clasifica como corrosivo. Esto se ve reflejado en los valores de resistividad eléctrica (1300 Ω/cm), la cual tiene una amplia repercusión en el valor final del índice (45). Además, la distribución granulométrica también influyó en la corrosividad de la muestra. Las muestras de suelo 548, 550, 553 y 563 fueron calificadas como no corrosivas. Obviamente, los valores de resistividad elevados y el mayor tamaño de grano condujeron a ese índice.

Tabla 2. Corrosividad global del suelo

Código	b_c	b_{mc}	b_{nc}
548	0	0,28	0,72
549	0,58	0,28	0,14
550	0	0,28	0,72
553	0	0,28	0,72
563	0	0,28	0,72

b_c : Corrosivo, b_{mc} : Moderadamente corrosivo, b_{nc} : No corrosivo

2.3 RECuento MICROBIOLÓGICO DE CADA MUESTRA DE SUELO

Con el propósito de relacionar la comunidad microbiana alojada en el suelo perimetral de las tuberías averiadas, se seleccionaron 4 grupos poblacionales de bacterias para su identificación molecular, dos de ellos directamente implicados en

la MIC (30). Las categorías poblacionales se agruparon así: Bacterias heterótrofas totales (THB), bacterias anaerobias totales (TAnB), bacterias productoras de ácido (APB) (42) y bacterias sulfato reductoras (SRB) (20). Aunque las APB y las SRB ya están consideradas dentro de las THB y TAnB, fueron tenidas en cuenta como categorías aparte para revelar la presencia de bacterias con metabolismos diferentes que crecieran bajo condiciones similares de las APB y SRB.

Tabla 3. Recuento Microbiológico según muestra de suelo

Código	Grupo Bacteriano	Cantidad [CFU/g]	Peso relativo a la magnitud de aislamiento	Peso relativo del grupo	Corrosividad	Corrosiv. de la Muestra
548	SRB	10^2	1	0.4	0.4	2.8
	APB	10^7	4	0.3	1.2	
	TAnB	10^6	4	0.15	0.6	
	THB	10^7	4	0,15	0.6	
549	SRB	10^5	3	0.4	1.2	3.6
	APB	10^9	4	0.3	1.2	
	TAnB	10^6	4	0.15	0.6	
	THB	10^9	4	0.15	0.6	
550	SRB	10^3	2	0.4	0.8	3.2
	APB	10^8	4	0.3	1.2	
	TAnB	10^9	4	0.15	0.6	
	THB	10^9	4	0.15	0.6	
553	SRB	10^4	2	0.4	0.8	2.9
	APB	10^6	3	0.3	0.9	
	TAnB	10^9	4	0.15	0.6	
	THB	10^{10}	4	0.15	0.6	
563	SRB	10^1	1	0.4	0.4	2.5
	APB	10^6	3	0.3	0.9	
	TAnB	10^9	4	0.15	0.6	
	THB	10^{10}	4	0.15	0.6	

El recuento microbiológico realizado reveló que las SRB no fueron las bacterias más abundantes en los suelos analizados. El mayor conteo de este grupo de bacterias se obtuvo en la muestra 549 con 10^5 cfu/g. Los demás suelos ostentaron valores mucho más bajos (Tabla 3). Interesantemente, el mayor número de APB también se encontró en la muestra 549 con 10^9 cfu/g. La corrosividad de las muestras desde el punto de vista del recuento microbiológico está definida en rangos (38). Un valor $>3,1$ clasifica a la muestra como severamente corrosiva (549 y 550) y un valor en el rango de 2,4 a 3,0 ubica a la muestra en la categoría de

corrosividad alta (548, 553 y 563). Microbiológicamente, según el recuento, todas las muestras de suelo presentaron una agresividad alta. La muestra 563 fue la que tuvo la menor agresividad.

2.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA COMUNIDAD BACTERIANA CULTIVABLE SEGÚN MUESTRA DE SUELO

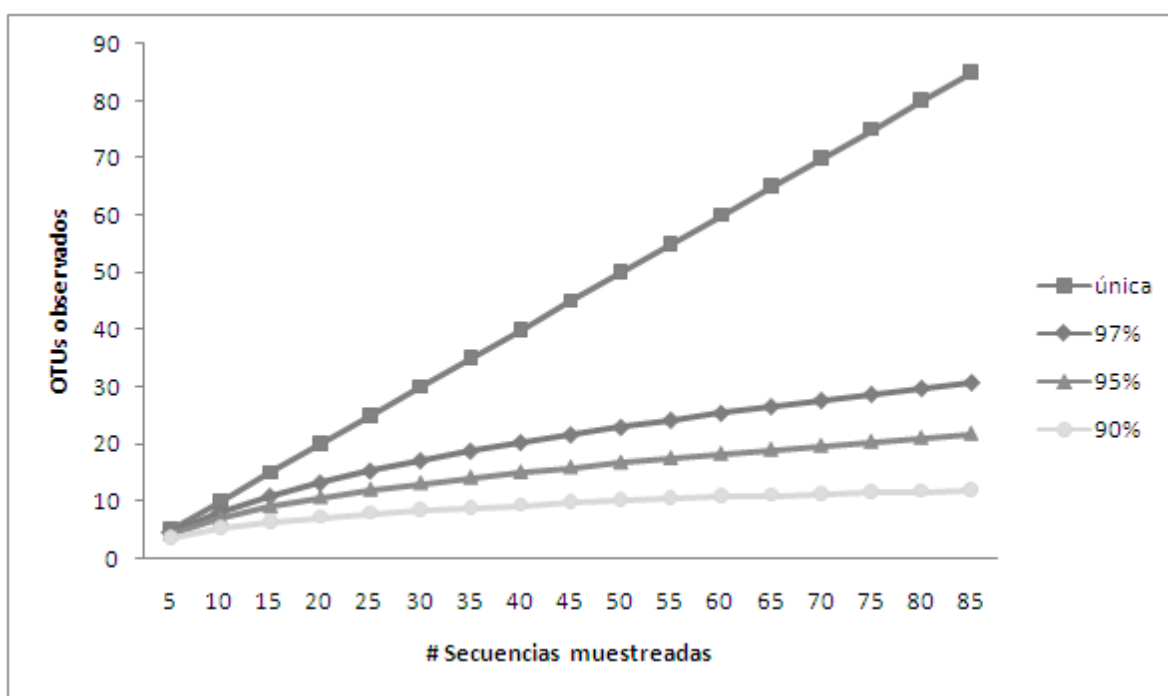
Un total de 108 clones de genes 16S rDNA metagenómicos de todas las categorías (SRB, APB, TAnB y THB) fueron clonados y secuenciados (Tabla 4). Todos los clones presentaron una identidad $\geq 95\%$ con las secuencias encontradas en las bases de datos; aquellos con identidades ≤ 94 fueron considerados ambiguos y no fueron tenidos en cuenta en la Tabla 4. La mayoría de las secuencias (76,9 %) pertenece al phylum Firmicutes y el grupo restante (16,7%) corresponde al phylum Proteobacteria. Cabe destacar que el sitio 549 fue el que mayormente presentó secuencias del género *Desulfovibrio* (7). El género más abundante fue *Clostridium* con 59 clones y los menos presentes fueron *Sporomusa* sp., *Propionispora* sp. y *Desulfoporosinus* con un solo ejemplar. El número de secuencias en conformidad con las categorías establecidas fue de 66 TAnB, 32 APB y 10 SRB.

Tabla 4. Identificación de las secuencias obtenidas del gen 16S rDNA, analizadas en la base de datos del RDP y BLAST de la NCBI, de cinco muestras del suelo.

Cat.	Análisis de Secuencia	GenBank	Phylum	# Secuencias por Suelo					Id. [%]
				548	549	550	553	563	
TAnB	<i>Enterococcus</i> sp.	JQ512015	Firmicutes	5					98
TAnB	<i>Clostridium</i> sp.	JQ512007	Firmicutes	6	9	15	20	9	96
TAnB	<i>Sporomusa</i> sp.	JQ512036	Firmicutes	1					95
TAnB	<i>Propionispora</i> sp.	JQ512004	Firmicutes			1			95
APB	<i>Paenibacillus</i> sp.	JQ512013	Firmicutes	2					97
APB	<i>Bacillus</i> sp.	JQ511993	Firmicutes		6		8		99
APB	<i>Enterobacter</i> sp.	JQ512000	Proteobacteria		6	6			99
APB	<i>Citrobacter</i> sp.	JQ512001	Proteobacteria			4			99
SRB	<i>Desulfoporosinus</i> sp.	JQ512037	Firmicutes	1					99
SRB	<i>Desulfovibrio</i> sp.	JQ511999	Proteobacteria		7			2	99
TOTAL				15	28	26	28	11	

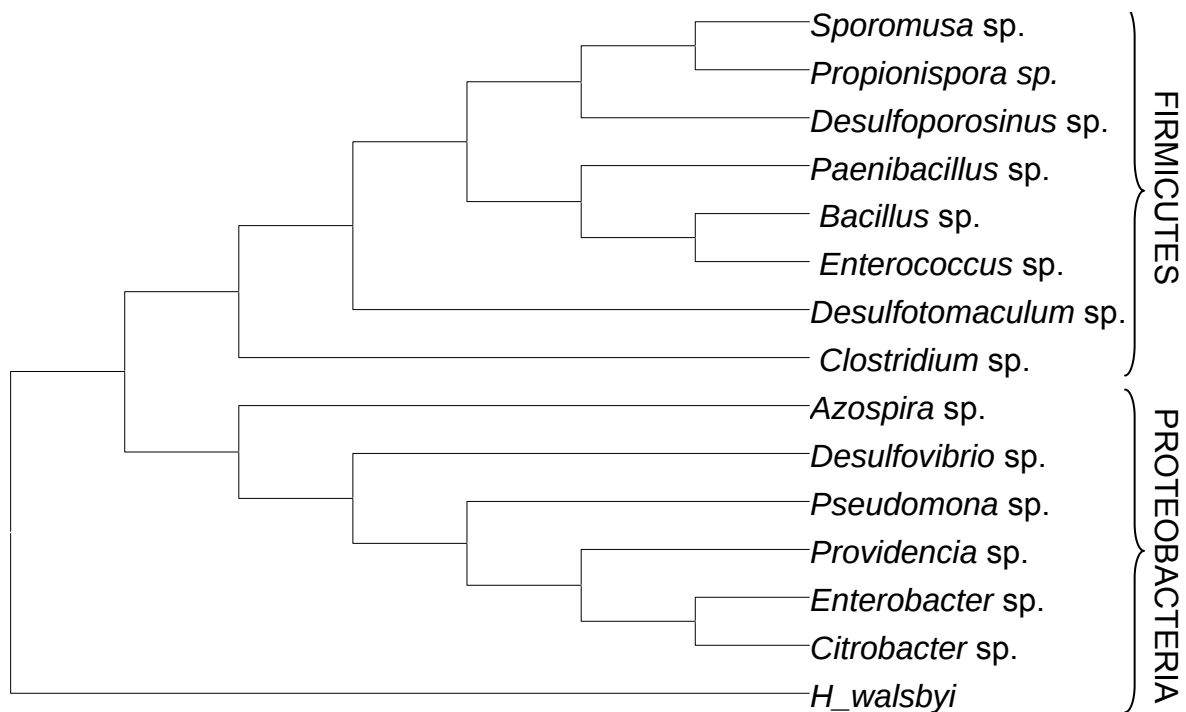
Se calcularon curvas de rarefacción con la aplicación Mothur, para las comunidades microbianas de cada punto de muestreo (Fig. 2). El número de OTUs en relación con el esfuerzo de muestreo muestra que las librerías construidas alcanzan la asíntota, indicando que la comunidad bacteriana fue suficientemente muestreada y que la diversidad es baja por el poco número de especies encontradas.

Figura 2. Curva de rarefacción que muestra el esfuerzo de muestreo realizado en el estudio.



Un árbol filogenético fue construido con secuencias no redundantes entre todos los puntos de muestreo y un conjunto de secuencias de referencia extraídas de Genbank, y pertenecientes a bacterias asociadas a la corrosión, para lograr un mejor agrupamiento (*Desulfotomaculum* No. GenBank: DQ208688.1, *Azospira* No: DQ863512.1, *Pseudomonas* No: EU795302.1 y *Providencia* No: EU660370.1). El *outgroup* utilizado fue una arqueobacteria (*Haloquadratum walsbyi*, No. GenBank: FR746099.1). Como podría esperarse, las secuencias se agrupan en las dos ramas principales, los *Phylum* Firmicutes (7) y Proteobacteria (3).

Figura 3. Árbol filogenético construido mediante Neighbor Joining.



3. DISCUSIÓN

En este Trabajo de Grado pudimos confrontar los resultados de un análisis fisicoquímico, con la caracterización microbiológica de cinco muestras de suelo en contacto directo con focos de corrosión de una tubería subterránea.

Como los resultados lo señalan, la muestra de suelo 549 fue la única que se calificó como corrosiva, lo cual es explicable por diversos factores. El tipo de suelo fue un factor predominante para determinar esta agresividad. El suelo arcilloso, presenta un alto grado de retención de agua, interviniendo en procesos corrosivos en función de su permeabilidad y porosidad. Esto a su vez mantiene en el suelo un contenido alto de humedad que podría determinar la velocidad de la corrosión. Cuando un suelo es húmedo, aumenta la capacidad de disolución de las sales presentes en el mismo, mejorando la eficiencia del electrolito y favoreciendo el desarrollo de algunos microorganismos. Por otro lado, cuando un suelo presenta un valor bajo de resistividad eléctrica, permite el paso de cargas iónicas y eléctricas, que facilitan la corrosión (45).

El Potencial Redox es una de las principales herramientas para hacer predicciones de la agresividad del suelo (16). Un Potencial Redox bajo indica que el suelo propiciará el crecimiento de bacterias anaerobias dado sus requerimientos de anoxigenia. La muestra 549 presentó el valor de potencial Redox más bajo y el mayor número de SRB halladas en el estudio, tanto en el recuento microbiológico, como en la comunidad bacteriana hallada molecularmente. Pese a esto, un potencial Redox como el de la muestra 549 no es lo suficientemente bajo para que sea atribuido como un indicador principal de la agresividad del suelo.

A pesar de que el potencial Redox es medido en los suelos con frecuencia para contrarrestar la MIC, puede ser engañoso y proveer falsas conclusiones. En este estudio fue alto en la mayoría de los suelos indicando que el suelo no facilitaría la

aparición de microorganismos anaerobios. Sin embargo el género *Clostridium* fue el que estuvo mayormente representado en todas las muestras de suelo, siendo una bacteria anaerobia. Es probable que las interacciones bacterianas, como la formación del biofilm nunca puedan ser tenidas en cuenta a la hora de definir la agresividad de un suelo fisicoquímicamente.

Las muestras de suelo 548, 550, 553 y 563, según el análisis global, fueron determinadas con baja corrosividad. El tipo de suelo de estas muestras fue principalmente arenoso, calcáreo y compuesto de piedras calizas. Esta característica conlleva a una limitada capacidad del suelo para almacenar agua, que a su vez se ve reflejada en un contenido de humedad bajo. Los valores de pH en estas muestras y en todo el estudio estuvieron dentro del rango normal del suelo (5,0- 8,0), que no contribuye a un proceso corrosivo, por lo que la corrosión dependió de otros factores. Además, la resistividad eléctrica, reportada como la característica fisicoquímica predominante en la determinación de la agresividad del suelo fue alta.

Preguntamos entonces, ¿De qué manera las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas aportan información útil para diagnosticar los eventos causales que están ocurriendo en un foco de corrosión? En el caso de la muestra 549, podría decirse que todos los factores contribuyeron para que en este punto, el 46% de la tubería presentara una pérdida de material por corrosión externa. El suelo era altamente agresivo, colonizado por SRB (*Desulfovibrio* sp.) y con una variedad de géneros que dadas sus diferentes características fisiológicas y metabólicas, como las APB (*Bacillus* sp. Y *Enterobacter* sp.), pudieron contribuir a la formación de un *biofilm* facilitador de la biocorrosión.

Sin embargo, el mismo panorama no se observa en las muestras 548, 550, 553 y 563 donde el suelo no favorece la corrosión en ningún caso, dadas sus características fisicoquímicas y pese a esto, la tubería en estos puntos adolece de

una pérdida de material del 45%, 27%, 37,94% y 14,4%, respectivamente. La mayoría de los estudios se han centrado en las SRB como principales responsables de los eventos corrosivos. No obstante, el género *Clostridium* ha sido reconocido en estudios previos como facilitador de la corrosión con un ataque ácido similar al de las APB (53). De acuerdo con algunas investigaciones (44), y particularmente con nuestros resultados, *Clostridium* está presente en una gran magnitud en los suelos y podría ser responsable de ataques tan agresivos como el de las SRB. Por otro lado, bacterias que antes no habían sido ampliamente estudiadas como el género *Propionispora*, al cual pertenecen bacterias anaerobias estrictas que no son SRB, hoy tienen un interés renovado debido a que generan bajas presiones parciales de H₂ que aceleran la despolarización catódica de los metales (46).

La corrosividad del suelo puede estar influenciada por dos parámetros principales: las propiedades fisicoquímicas ambientales y la comunidad microbiana asociada. La mayoría de estudios se focalizan en los aspectos fisicoquímicos como lo relevante para una evaluación considerada acertada de la corrosividad de la muestra analizada. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el recuento microbiológico de las categorías que establecimos podría arbitrar conjeturas no concluyentes sobre los factores causantes de corrosión en casos específicos. Sin duda alguna, la participación de cada uno de los miembros de la comunidad microbiana en la evolución del fenómeno corrosivo aún no está suficientemente entendida. A medida que la acción de las SRB, APB, TAnB y las THB esté mejor comprendida, es probable que el análisis microbiológico supere al fisicoquímico como prueba diagnóstica de la corrosión.

Este estudio es un primer panorama del problema de la biocorrosión, que integra el análisis del suelo y el estudio microbiológico, que causa el deterioro de muchas tuberías en el mundo. Como un primer paso, nos centramos en las bacterias cultivables, según la norma (37), que plantea el uso de medios de cultivo para la

determinación de microorganismos asociados a procesos corrosivos en la industria. Se espera, como continuación del estudio proceder con un análisis más profundo de la acción de los microorganismos del suelo para complementarlo.

4. CONCLUSIONES

Estudios prospectivos del suelo antes de construir estructuras metálicas subterráneas deben realizarse para evitar las enormes pérdidas causadas por la MIC. Estos estudios necesariamente deben contener el factor microbiológico para comprender la influencia de ciertas bacterias en procesos corrosivos.

Las características fisicoquímicas y la comunidad microbiológica residente no están directamente relacionadas en todos los casos. Las bacterias son capaces de crecer en medios con requerimientos mínimos por lo que las características fisicoquímicas, ocasionalmente, no predecirán qué bacterias podrían ser halladas en el suelo. Es necesario realizar los dos análisis y no sólo los fisicoquímicos como se reporta hoy en día en la mayoría de las inspecciones de suelos realizadas en la industria.

Para eliminar los vacíos de conocimiento que hay en la MIC, métodos moleculares y microbiológicos viables, confiables y efectivos deben utilizarse e implementarse. De esta manera, el aporte de la biología podrá conjugarse con la velocidad de la industria, y así, se logrará un mayor entendimiento de numerosos fenómenos que aún hoy no están claramente comprendidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *Molecular Biology* **215**:403-410.
2. **Amann, R. L., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D. A. Stahl.** 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:614-623.
3. **ASTM.** 2005. Standard Test Method for Measuring pH of Soil for Use in Corrosion Testing. Pennsylvania.
4. **ASTM.** 2007. Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils. Pennsylvania.
5. **ASTM.** 2009. Standard Test Method for Field Measurement of Soil Resistivity Using the Wenner Four Electrode Method. New York.
6. **ASTM.** 2009. Standard Test Method for Measurement of Oxidation-Reduction Potential (ORP) of Soil. Pennsylvania.
7. **Benjamin, M. M.** 1996. Internal Corrosion of Water Distribution Systems. American Water Works Association Research Foundation.
8. **Bento, M. and C. Gaylarde.** 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **47**:107-112.
9. **Borenstein, S. W.** 1994. Microbiologically Induced Corrosion Handbook. Industrial Press, New York.

10. **Burland, T. G.** 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology* **132**:71-91.
11. **Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. J. Alland.** 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Microbiological Methods* **69**:330-339.
12. **Cheng, C. H. and Y. Lin.** 2002. Evaluating the best main battle tank using fuzzy decision theory with linguistic criteria evaluation. *European Journal of Operation Research* **142**:174-186.
13. **Cochram, W. C.** 1950. Estimation of bacterial densities by means of the Most Probable Number. *Biometrics* **6**:105-116.
14. **Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chau, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje.** 2008. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **37**:141-145.
15. **Costerton, J. W. and J. Boivin.** 1987. Microbially influenced corrosion, p. 56-76. *In*: M. W. Mittleman and G. G. Geesey (eds.), *Biological Fouling of Industrial Water Systems. A Problem Solving Approach*. Water Micro Associates, San Diego CA.
16. **DeLaune, R. D. and K. R. Reddy.** 2004. Redox Potential, *In*: *Encyclopedia of Soils in the Environment*.
17. **Denny, J.** 1996. *Principles and Prevention of Corrosion*. Prentice Hall, New Jersey.

18. **Diez, B., C. Pedros-Alio, and R. Massana.** 2001. Study of genetic Diversity of Eukaryotic Picoplankton in Different Oceanic Regions by Small-Subunit rRNA Gene Cloning and Sequencing. *Appl Environ Microbiol* **67**:2932-2941.
19. **Edgar, R. C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792-1797.
20. **Fauque, G. D.** 1950. Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. *Sulfate-Reducing Bacteria* **6**:217-241.
21. **Felsenstein, J.** 1989. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. *Cladistics* **5**:164-166.
22. **Ferreira, C. A., J. A. Ponciano, D. S. Vaitsman, and D. V. Pérez.** 2007. Evaluation of the corrosivity of the soil through its chemical composition, p. 250-255. *In*: 338 ed.
23. **García Esquivel, R., G. Zabala Olivares, M. J. Hernández Gayosso, and A. Gayosso Trejo.** 2006. Influenced of sulfato reducing bacteria on the chatodic protection potencial of XL52 steel. *Corrosion NACEexpo*.
24. **Gray, J. P. and R. P. Herwig.** 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. **62**:4049-4059.
25. **Hamilton, W. A.** 1985. Sulphate-Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion. *Annual Review of Microbiology* **39**:195-217.
26. **Huber, T., G. Faulkner, and P. Hugenholtz.** 2004. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**:2317-2319.

27. **Jan-Roblero, J., J. M. Romero, M. Amaya, and S. Le Borgne.** 2004. Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:862-867.
28. **Jenneman, G. E., P. Wittenbach, J. S. Thacker, and Y. W. Phillips.** 1985. MIC in a pipeline used for disposal of produced water from a coal seam gas field. *NACE Annual Conference Corrosion* 281-295.
29. **Lewandowski, Z.** 1994. Dissolved oxygen gradients near microbially colonized surfaces, p. 175-188. *In*: G. G. Geesey, Z. Lewandowski, and H. C. Flemming (eds.), *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Lewis Publishers, Boca Raton, CA.
30. **Li, S. Y., Y. G. Kim, K. S. Jeon, Y. T. Kho, and T. Kang.** 2001. Microbiologically Influenced Corrosion of Carbon Steel Exposed to Anaerobic Soil. *Corrosion* **57**:815-829.
31. **Lin, J., M. Ellaway, and R. Adrien.** 2001. Study of corrosion material accumulated on the inner wall of steel water pipe. *Corrosion Science* **43**:2065-2081.
32. **Little, B. J., R. I. Ray, P. A. Wagner, J. JonesGÇÉMeehan, C. C. Lee, and F. Mansfeld.** 1999. Spatial relationships between marine bacteria and localized corrosion on polymer coated steel. *Biofouling* **13**:301-321. doi:doi: 10.1080/08927019909378387.
33. **Maruthamuthu, S., S. Mohanan, A. Rajasekar, N. Muthukumar, S. Ponmarippan, P. Subramanian, and N. Palaniswamy.** 2005. Role of corrosion inhibitor on bacterial corrosion in petroleum product pipelines. *Indian Journal of Chemical Technology* **12**:567-575.

34. **Medina-Custodio, O., A. Ortiz-Prado, V. H. Jacobo-Armendariz, and R. Schouwenaars-Franseens.** 2009. Corrosión Microbiológica en aceros de bajo carbono. Ingeniería. Investigación y Tecnología **10**:9-19.
35. **Muller, A. K., T. Barkay, W. A. Al-Soud, S. J. Sorensen, H. Skov, and N. Kroer.** 2011. Diversity and characterization of mercury-resistant bacteria in snow, freshwater and sea-ice brine from the High Arctic. FEMS Microbiology Ecology **75**:390-401.
36. **Muthukumar, N., S. Mohanan, S. Maruthamuthu, P. Subramanian, N. Palaniswamy, and M. Raghavan.** 2003. Role of Brucella sp. and Gallionella sp. in oil degradation and corrosion. Electrochemistry Communications **5**:421-425.
37. **NACE TM0194.** 2004. Standard Test Method. Field Monitoring of Bacterial Growth in Oil and Gas Systems. Texas.
38. **NACE TM106.** 2006. Standard Test Method: detection, testing, and evaluating of Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) on external surfaces of buried pipelines.
39. **Najjaran, H., R. Sadiq, and B. Rajani.** 2003. Fuzzy expert system to assess corrosivity of cast/ductile iron pipes from backfill properties. Computer-Aided Civil and Infrastructure Engineering.
40. **Novák, V., I. Perfilieva, and J. Mockor.** 1999. Mathematical principles of fuzzy logic. Dodrecht: Kluwer Academic.
41. **Pereira, M. A., K. Roest, A. J. M. Stams, M. Mota, M. Alves, and A. D. L. Akkermans.** 2002. Molecular monitoring of microbial diversity in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid. FEMS Microbiology Ecology **41**:95-103.

42. **Pope, D. H.** 1991. Microbiologically Influenced Corrosion in the Natural Gas Industry. Gas Research Institute Annual Report **92**:59-65.
43. **Rajasekar, A., S. Maruthamuthu, N. Muthukumar, S. Mohanan, P. Subramanian, and N. Palaniswamy.** 2005. Bacterial degradation of naphtha and its influence on corrosion. Corrosion Science **47**:257-271.
44. **Ramos, O. A., M. J. Hernández, N. Ruiz, G. Zavala, and C. Juárez.** 2010. Corrosion of API XL 52 steel in presence of *Clostridium celerecrescens*. Materials and Corrosion **62**:878-883.
45. **Sadiq, R., B. Rajani, and Y. Kleiner.** 2004. Fuzzy-based method to evaluate soil corrosivity for prediction of water main deterioration. Infrastructure Systems **10**:149-156.
46. **Salgar, S.** 2009. Determinación de la corrosividad de una muestra de suelo asociada a la línea de transporte de hidrocarburos de Ocesa a la altura del kilómetro 121. Corporación para la investigación de la Corrosión.
47. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual.
48. **Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber.** 2009. Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology **75**:7537-7541.
49. **Seth, A. D. and R. G. J. Edyvean.** 2010. The function of sulfate-reducing bacteria in corrosion of potable water mains. International Biodeterioration & Biodegradation **58**:108-111.

50. **Shennan, J. L.** 1988. Control of microbial contamination of fuels in storage, p. 248-254. *In*: D. R. Houghton, R. N. Smith, and H. O. W. Egging (eds.), Biodeterioration. 1 ed. Springer, Cambridge.
51. **Sotáquira, R., J. H. Panqueva, and H. H. Andrade.** 1994. Integración de metodologías de modelamiento para una aproximación sistémica a un problema en la macroeconomía colombiana.
52. **Tamura, K., N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**:2731-2739.
53. **The Energy and Resources Institute.** 2010. Detection and control of microbial-induced corrosion in oil and gas pipelines through a biotechnological approach, *In*.
54. **Videla, H. A. and W. G. Characklis.** 1992. Biofouling and microbially influenced corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation* **29**:195-212.
55. **Warren, P. I.** 2001. Research on the mechanisms of anaerobic corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation* **47**:63-70.
56. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**:221-271.
57. **Zhu, X. Y., J. Lubeck, and J. J. Kilbane.** 2003. Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Appl Environ Microbiol* **69**:5354-5363.