

Evaluación del Efecto de las Bacterias Sulfato Reductoras en la Corrosión del Acero N-80
Empleando Técnicas Electroquímicas

María Paula Castellanos Rivera, Juan Felipe Porras Lozada

Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

Viviana Sánchez Torres

Ingeniera Química, Ph.D.

Codirectores

William Villamizar Suárez

Químico Dr.

Dionisio Antonio Laverde Catano

Ingeniero Metalúrgico, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2019

A Dios, por regalarme una familia maravillosa y con ella la oportunidad de aprender y prepararme en una excelente universidad. Soy muy afortunada de tenerlos.

A mi nonito Pedro, por cada vez que me decía: tome hija para el tintico y por encender una vela en cada parcial que debía presentar. Gracias Nonito, por enseñarme que amor se paga con amor.

A mi nonita Nelfa, por preocuparse siempre por mi salud física y emocional, si desayunó hija? tome lleve fruta, aliméntese bien, descanse.

A mi papi, por consentirme siempre pero sin llegar a malcriarme. Por hacer de mi vida universitaria una experiencia más fácil, por su amor sin límites, desde la UIS hasta el PTG.

A mi mami, por sacrificar su descanso para hacerme el desayuno cada mañana y por cada traspasada esperando que llegara bien a casa. Gracias mami por todo tu amor y apoyo en los momentos más difíciles.

A mi hermana Valentina, por ser mi cómplice y mi compañía infinita. Por fingir que escuchaba cada exposición una y otra vez así no entendiera nada. Soy una hermana mayor orgullosa.

A Eduardo, mi mejor casualidad, por estar y permanecer. Gracias por tanto amor, buenos consejos y apoyo a pesar de las circunstancias. Qué bonito se siente cuando confían en ti.

A los lindos, mis amigos de toda la vida, a las Badgirls, las mejores amigas que me dejó la universidad, a los que son, por ser unos excelentes compañeros de estudio, al CEIQ por regalarme las mejores experiencias como estudiante y en especial a Porritas, mi compañero de tesis y de lucha, por tanta paciencia y buenos momentos.

Lo logré familia, lo logramos, los amo mucho.

María Paula Castellanos Rivera

A Dios por permitirme vivir esta experiencia de aprendizaje y estar rodeado de tantas personas que quieren lo mejor para mí.

A mí Mamá por ser esa persona cálida y siempre preocuparse por mi bienestar físico y emocional.

A mí Papá por estar siempre para mí e impulsarme a buscar soluciones cada vez que surge un problema.

A mi abuelo Luis Alejandro y mis abuelas Carlina y Ernestina por todo el tiempo que me dedicaron cuando mis padres no podían.

A Mireya, Luisa, Sebastián y María Alejandra por enseñarme el valor de compartir en familia.

A grupo de estudio, a spoilers sin jazoún y los que son por mostrarme que no hay barreras para lograr lo que uno quiere. A AIChE-UIS Student Chapter una familia más allá de los proyectos estudiantiles y asistir a clases.

Y por supuesto a Mapis porque sin su comprensión conmigo, determinación y actitud positiva, realizar este proyecto no hubiera sido posible.

Espero algún día devolverles todo lo que han hecho por mí.

Juan Felipe Porras Lozada

Agradecimientos

En primer lugar, gracias a Dios por la vida y las oportunidades brindadas.

A la Universidad Industrial de Santander, por ser nuestra alma máter y otorgarnos el honor de ser llamados Ingenieros Químicos.

A la escuela de Ingeniería Química y a todos los docentes que pertenecen a ella, por su entrega y dedicación durante todo el proceso. A don Eduardo, a Linita y a Martica por su ayuda incondicional y desinteresada.

Al grupo de investigación en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente (GIMBA), a Yury, Estefany y Alexander, por ser nuestros mentores en el laboratorio. A todos sus integrantes por la acogida y hacer de nuestra estancia una experiencia agradable.

Al Parque Tecnológico Guatiguará (PTG), especialmente al laboratorio de microscopía y al profesional Carlos Villareal, por los servicios prestados para la realización de nuestro proyecto de investigación.

Al Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) y a nuestro codirector William Villamizar Suárez, por el apoyo y la orientación brindada.

A Pau Rivera, Jaime, Adrián, Angélica y Ana, por su ayuda incondicional en cada momento. Los mejores deseos para ustedes.

A la profesora Mabel Juliana Torres, por todas las enseñanzas brindadas a lo largo de la carrera y por permitirnos hacer uso del laboratorio de microbiología.

Y sobre todo a nuestra directora Viviana Sánchez Torres, por su disposición, compromiso y entrega durante la realización de nuestro proyecto de investigación. Gracias a todos. Sin ustedes este sueño no se hubiera hecho realidad.

Tabla de contenido

Introducción	16
1. Marco Teórico.....	17
1.1 Corrosión Electroquímica	17
1.1.1 Tipos de corrosión.....	18
1.2 Bacterias Sulfato Reductoras (SRB).....	20
1.3 Estado del arte	21
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. Metodología	23
3.1 Preparación del medio de cultivo.....	23
3.2 Preparación del electrodo de acero N-80	24
3.3 Montaje de las celdas electroquímicas.....	24
3.4 Pruebas de caracterización química	25
3.5 Pruebas electroquímicas.....	26
3.5.1 Potencial de Circuito Abierto (OCP)	27
3.5.2 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).....	27
3.5.3 Resistencia a la Polarización Lineal (Rp)	27
3.6 Medición de sulfuros.....	28
4. Resultados y discusión	28
4.1 Potencial de Circuito Abierto.....	28

4.2 Resistencia a la Polarización Lineal	30
4.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica	32
4.4. Cuantificación de sulfuros y pH en el medio biótico.....	38
4.5. Análisis de interfaz: morfología y composición	40
5. Conclusiones	45
Referencias Bibliográficas	47

Lista de tablas

Tabla 1 Resumen peso elemental electrodo sistemas Abiótico y Biótico	42
--	----

Lista de figuras

Figura 1 E_{corr} (mV) con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl saturado vs tiempo (h).	29
Figura 2 (A) Valor R_p vs tiempo (B) Valor T_{corr} vs tiempo	31
Figura 3 Ensayo abiótico (A) Nyquist 0-328 h (B) Nyquist 328-496 h (B.1, B.2) Zoom Nyquist 328-496 h (C) Ángulo de fase 0-328 h (D) Ángulo de fase 328-496 h	34
Figura 4 Circuitos equivalentes (A) Ensayo abiótico < 328h y biótico <160h (B) Ensayo abiótico $\geq$ 328h (C) Ensayo biótico $\geq$ 160h	34
Figura 5 Ensayo biótico (A) Nyquist 0-160 h (B) Nyquist 160-424 h (B.1, B.2) Zoom Nyquist 160-424 h (C) Angulo de fase 0-160 h (D) Ángulo de fase 160-424 h	36
Figura 6 (A) Concentración de sulfuros vs tiempo (B) Valores de pH ensayo biótico	39
Figura 7 Imágenes SEM acero N-80 transcurridos 21 días de exposición en medio Starkey (A) Abiótico SEM 200x (B) Biótico SEM 200x (C) Abiótico SEM 800x (D) Biótico SEM 800x	42
Figura 8 Imágenes SEM acero N-80 transcurridos 21 días de exposición en medio Starkey con SRB (A) 6000x (B) 12000x (C) 25000x (D) 25000x	43
Figura 9 Imágenes SEM electrodo abiótico y biótico sin productos de corrosión (A) Abiótico 200x (B) Biótico 200x (C) Abiótico 800x (D) Biótico 800x	45
Figura 10 Transferencia de electrones en SRB	61
Figura 11 Electrodo de acero N-80	64
Figura 12 Unión electrodos de trabajo en celda electroquímica	64
Figura 13 Celda electroquímica con llave acoplada, para ensayo biótico	65
Figura 14 Celdas electroquímicas para ensayo abiótico y biótico	65
Figura 15 Gráfica de Nyquist	67

Figura 16 Gráfica de Bode	68
Figura 17 Gráfica de R_p	69

Lista de apéndices

Apéndice A Tipos de MIC y mecanismos de corrosión que describen el comportamiento de las SRB.....	57
Apéndice B Medio de cultivo Starkey modificado.....	63
Apéndice C Montaje experimental	64
Apéndice D Parámetros, cálculos y consideraciones especiales de las técnicas electroquímicas	66
Apéndice E Método yodométrico	71
Apéndice F Zoom origen Nyquist ensayo abiótico y biótico	73
Apéndice G Resultados SEM-EDS para ensayo biótico y abiótico.....	75

Lista de abreviaturas

ATP Trifosfato de Adenosina

APB Bacterias Productoras de Ácido

BCSR Teoría Biocatalítica de Reducción de Sulfato Catódico

BSE Detector de Electrones Retro dispersados

CDT Teoría de la Despolarización Catódica

DET Transferencia Directa de Electrones

Ecorr Potencial de corrosión

EIS Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

E-MIC MIC por transferencia extracelular de electrones

EPS Sustancia Polimérica Extracelular

Icorr Corriente de Corrosión

MET Transferencia Mediada de Electrones

M-MIC MIC por Metabolitos

MIC Corrosión Microbiológicamente Influenciada

OCP Potencial de Circuito Abierto

Rp Resistencia a la Polarización Lineal

SE Detector de Electrones Secundarios

SEM Microscopía Electrónica de Barrido

SRB Bacterias Sulfato Reductoras

Tcorr Tasa de Corrosión

Resumen

Título: Evaluación del Efecto de las Bacterias Sulfato Reductoras en la Corrosión del Acero N-80 Empleando Técnicas Electroquímicas*

Autores: Castellanos Rivera, María Paula; Porras Lozada, Juan Felipe**

Palabras clave: SRB, MIC, OCP, R_p , EIS, SEM-EDS.

Descripción: Los aceros al carbono de baja aleación tienen una gran aplicación en la industria del petróleo y gas. Por lo tanto, se evaluó el efecto de un consorcio de Bacterias Sulfato Reductoras, en la corrosión del acero al carbono N-80, a partir de la aplicación de las siguientes técnicas electroquímicas: Potencial de Circuito Abierto, Resistencia a la Polarización y Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.

La evaluación y el comportamiento electroquímico se llevaron a cabo en una muestra de acero N-80 en condiciones bióticas y abióticas durante 21 días cada una. Como medio electrolítico se utilizó medio de crecimiento con la concentración de cloruros de un campo de producción de petróleo. Se consideró la formación de sulfuros como indicador de crecimiento bacteriano y su influencia en la formación de productos de corrosión. El análisis de las muestras a partir de Microscopía Electrónica de Barrido, permitió observar detalladamente la formación de una biopelícula compuesta por Sustancia Polimérica Extracelular, así como las bacterias adheridas a una capa porosa de productos de corrosión y el daño con morfología de picadura diferente al asociado al proceso de corrosión abiótico. La Espectroscopia de Energía Dispersiva, reveló una composición elemental mixta entre compuestos orgánicos, fosfuros, cloruros, sulfuros y óxidos con el hierro.

Por último, a partir de las técnicas electroquímicas se compararon los cambios en la cualidad redox de la interface medio de cultivo-superficie metálica por medio de sus valores de PCA. Además, la EIE permitió detallar en tiempo real el paso de un mecanismo de corrosión controlado por transferencia de carga a uno por difusión y junto con la Resistencia a la Polarización, la disminución en la resistencia a la corrosión ofrecida por las muestras con y sin biopelícula, confirmando que la presencia de una carga microbiana, induce la biocorrosión de las tuberías de acero.

*Proyecto de Grado

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D Viviana Sánchez Torres; Codirector: Ph.D Dionisio Antonio Laverde Catano, Dr. William Villamizar Suárez.

Abstract

Title: Evaluation of the Effect of Sulfate-Reducing Bacteria on Corrosion Behavior of Steel (N-80) Using Electrochemical Techniques*

Authors: Castellanos Rivera, María Paula; Porras Lozada, Juan Felipe**

Key words: SRB, MIC, OCP, R_p , EIS, SEM-EDS.

DESCRIPTION: Low alloy carbon steels have great utilization in the oil and gas industry. This research project assessed the effect of a Sulfate Reducing Bacteria consortia in microbiologically induced corrosion (MIC) of N-80 carbon steel, by use of electrochemical techniques: Open Circuit Potential (OCP), Linear Polarization Resistance (R_p) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS).

The assessment and electrochemical behavior took place in an N-80 carbon steel sample exposed to biotic and abiotic surrounds for 21 days each assay. As electrolyte, it was used growth medium with chloride concentration of water from an oil production field. It was considered the sulfide production as bacterial growth indicator and its influence in corrosion products. The analysis of the samples by Scanning Electron Microscopy (SEM) allowed a detailed observation of the biofilm, with Extracellular Polymeric Substances (EPS) and the bacteria attached to a porous layer of corrosion products and the related damage to the biocorrosion process. Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) revealed a biofilm based on a mixture of elemental composition between organic components, phosphides, chlorides, sulfides and oxides with iron.

Finally, through the techniques it was compared the redox quality of the growth medium and the metal's surface thanks to its OCP values. In addition, EIS allowed to detail how the corrosion mechanism went controlled by charge transfer to a diffusion one and with R_p follow the decrease of the sample's polarization resistance with and without biofilm, confirming that with bacterial presence MIC takes place in carbon steel pipe.

*Bachelor Thesis

**Physicochemical Engineering Department. Chemical Engineering School. Advisor: Ph.D Viviana Sánchez Torres; Coauthors: Ph.D Dionisio Antonio Laverde Catano, Dr. William Villamizar Suárez.

Introducción

Desde finales del siglo XX ha aumentado notablemente la demanda de petróleo y gas, y con esto el crecimiento de dicha industria, para la cual se ha hecho indispensable el desarrollo de un sistema de transporte efectivo y a la vanguardia para todas sus actividades económicas, materias primas, productos, subproductos y desechos. En pro de cumplir este fin, se han empleado aceros de gran resistencia y baja aleación para la fabricación de tuberías teniendo en cuenta los requerimientos de cada aplicación industrial (AlAbbas, et al., 2013). Sin embargo, la corrosión de las tuberías del proceso es un problema que causa una pérdida financiera anual de 4 billones de dólares a nivel mundial, la mitad de los cuales se debe a daños por corrosión y el resto a costos de medidas de prevención de la misma (Li, et al., 2018). Se debe tener en cuenta que la tasa y el tipo de corrosión que afecta a los metales, dependerá del ambiente al que estén expuestos (Flores, Sosa, Ramírez, González, & Monroy). Varios estudios han demostrado que alrededor del 20% del daño por corrosión de las tuberías es debido a microorganismos, ya que este tipo de ambiente propicia el desarrollo de una biopelícula bacteriana, que generalmente acelera el proceso corrosivo del material (Dall'Agnol & Moura, 2014; Guan F. , et al., 2017). En el caso puntual de la industria del petróleo y gas, se presentan daños severos por corrosión, causados principalmente por la presencia de iones en medio acuoso y de bacterias que participan en el ciclo del azufre (Flores, Sosa, Ramírez, González, & Monroy). Es por esto que, dentro de las principales responsables de la Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC por sus siglas en inglés Microbiologically Influenced Corrosion), se encuentran las Bacterias Sulfato Reductoras (SRB por sus siglas en inglés Sulfate-Reducing Bacteria), las cuales obtienen energía a partir de la oxidación de ciertos compuestos orgánicos o hidrógeno, y a su vez, reducen el sulfato y otros compuestos de azufre como sulfito o tiosulfato a sulfuros (Zhai, et al., 2017). Esto genera la formación de una biopelícula

microbiana, compuesta por un consorcio de bacterias y su Sustancia Polimérica Extracelular (EPS por sus siglas en inglés Extracellular Polymeric Substance), la cual induce o acelera el proceso biocorrosivo debido al intercambio de nutrientes y energía con la superficie metálica a la cual se adhiere (Li, et al., 2018).

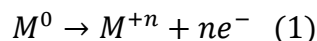
En conclusión, la formación de la biopelícula bacteriana es la causante de que en la industria del petróleo y gas se generen consecuencias que amenazan el valor agregado de los productos y la seguridad tanto de los empleados como de los civiles (Beech, Szttyler, Gaylarde, Smith, & Sunner, 2014), así como pérdidas económicas sustanciales (Medina Custodio, 2006). De este modo, con la gran aplicación de los aceros en la industria petrolera, es importante estudiar con detenimiento los mecanismos de daño por corrosión y los productos de la MIC, pues se prevé será un problema siempre presente que necesita un mayor entendimiento (AlAbbas, et al., 2013). Por lo tanto, la siguiente investigación evaluó el efecto de las SRB en el mecanismo de daño por corrosión del acero al carbono N-80, empleando técnicas electroquímicas no destructivas como la Resistencia a la Polarización Lineal (R_p por sus siglas en inglés Linear Polarization Resistance), el Potencial de Circuito Abierto (OCP por sus siglas en inglés Open Circuit Potential) y la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS por sus siglas en inglés Electrochemical Impedance Spectroscopy). También, estudiar mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy), la morfología de la biopelícula bacteriana, la superficie del acero, y la composición elemental de los productos de corrosión con Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS por sus siglas en inglés Energy Dispersive Spectroscopy).

1. Marco Teórico

1.1 Corrosión Electroquímica

La corrosión es un fenómeno electroquímico basado en la oxidación del metal y la reducción de especies químicas, caracterizada por dos tipos de reacciones, una anódica y otra catódica, respectivamente. El conjunto de condiciones físicas y mecánicas propias del medio en el que se encuentra el metal, influyen dichas reacciones ocasionando su deterioro (Santander Morales, 2008). Para que ocurra dicho fenómeno son imprescindibles tres elementos: una especie química que cede electrones y sufre la corrosión (ánodo), otra especie química hacia la cual migran dichos electrones (cátodo) y un electrolito que es un medio que permite el transporte de iones entre ambas especies. Por último, debe existir una buena unión eléctrica entre los dos primeros para que exista el paso de electrones (Santander Morales, 2008).

La reacción anódica de oxidación que tiene lugar durante la corrosión electroquímica en el metal es:

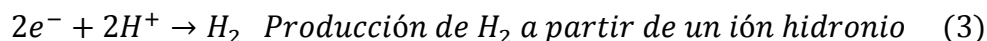
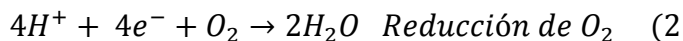


Donde M^0 = Metal de valencia n , M^{+n} = Forma iónica del metal,

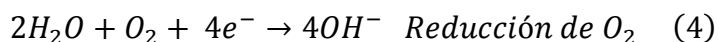
ne^- = Número de electrones cedidos por el metal

El entorno del metal condiciona las reacciones catódicas que puedan ocurrir (Santander Morales, 2008):

En medio acuoso ácido, $\text{pH} < 7$:



En medio acuoso básico o neutro, $\text{pH} \geq 7$:



1.1.1 Tipos de corrosión. La corrosión se puede definir como el deterioro de un material, generalmente un metal, resultante de una reacción química o electroquímica con el entorno (NACE/ASTM G, 2017).

Corrosión uniforme: Es la forma más común de corrosión. Se caracteriza por presentarse como un ataque uniforme en la superficie del metal debido a que el ambiente corrosivo tiene igual acceso a todas las partes.

Corrosión localizada: Se caracteriza por ataques en áreas concretas o localizadas y se divide en varios tipos según la caracterización de dichas áreas. A continuación, se define el tipo más relevante para la investigación:

Corrosión por picadura (Pitting): Se aprecia que la tasa de corrosión causada por picadura es mayor en algunas áreas puntuales. El ataque se centra en pequeñas áreas discretas, que actúan como ánodos y el resto de área intacta como cátodo (Jones, 1992).

Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC)

La MIC, también llamada biocorrosión, hace referencia al rol de los microorganismos en la aceleración del deterioro de los materiales (Roberge, 2008). La cinética de los procesos de corrosión, en este caso de las reacciones redox en la corrosión electroquímica, son influenciadas por la capacidad de estos organismos de adherirse a la superficie de los metales (Beech, et al., 2000). Para que la corrosión pueda ser influenciada por la presencia y actividad de microorganismos, además de agua, es fundamental: una fuente de energía, luz o sustancias químicas, una fuente de carbono, y un donante y receptor de electrones (Beech, et al., 2000).

Tanto las bacterias como arqueas y hongos son capaces de influenciar la corrosión, sin embargo, las SRB se han investigado en una mayor proporción debido a que el sulfato se encuentra en muchos ambientes salinos y de agricultura, además de ser las que tienen mayor influencia en

campos de extracción de petróleo. Es común que la presencia de estas bacterias esté acompañada de corrosión por picadura, consumo de sulfatos y generación de sulfuros (Li, et al., 2018).

Los microorganismos se adhieren a la superficie del metal, formando comunidades de una o varias especies, acumulándose, reproduciéndose e iniciando una matriz tridimensional de EPS, la cual consta de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos. El conjunto de todo lo anterior se denomina biopelícula (Beech, Sztyler, Gaylarde, Smith, & Sunner, 2014). Las biopelículas afectan las características fisicoquímicas del ambiente cercano a la superficie de corrosión, como la concentración de sales, el valor de pH, la conductividad, la concentración de sulfatos, cloruros y oxígeno disuelto y el potencial redox. Los tipos de MIC, así como los mecanismos de corrosión influenciados por actividades metabólicas de las SRB, se detallan en el Apéndice A.

1.2 Bacterias Sulfato Reductoras (SRB)

Las SRB se encuentran tanto en entornos acuáticos como en terrestres. Afectan principalmente a la industria del aceite, minera, gas, petrolera y naval, por la corrosión anaeróbica del acero (Cordas, Guerra, Xavier, & Moura, 2008; Beech, et al., 2000). Específicamente, estas bacterias pueden utilizar compuestos de azufre tales como sulfatos, sulfitos, tiosulfitos, tetracionatos y azufre elemental como aceptor final de electrones en los procesos de respiración anaerobia y así producir sulfuro de hidrógeno como subproducto metabólico, el cual es un compuesto altamente corrosivo (Santander Morales, 2008; Beech, et al., 2000; Zhai, et al., 2017). Dentro de las principales fuentes de carbono y donantes de electrones, en los pozos de gas natural y petróleo se pueden encontrar ácidos grasos volátiles como el lactato y el acetato (Torrado Rincón, Calixto Gómez, Sarmiento

Caraballo, & Panqueva Álvarez, 2008), incluso alcoholes, carboxilatos, fenoles, hidrocarburos alifáticos y aromáticos (De Turris S., de Romero, Sankara, & Ocando, 2013).

Las SRB pueden crecer en un rango de pH de 4.0 a 9.5, toleran una presión de hasta 500 atm y existen en un rango de temperatura de 25-60 °C (AlAbbas, et al., 2013; Javaherdashti, 2017). Su presencia se reconoce en el medio ambiente por el olor característico del sulfuro de hidrógeno (H₂S), así como por la coloración negra, efecto de la precipitación de sulfuros metálicos poco solubles (De Turris S., de Romero, Sankara, & Ocando, 2013).

1.3 Estado del arte

El rol de las SRB en la MIC a lo largo de los años ha sido de gran interés dentro de la comunidad científica. Alabbas, Williamson, Bhola, Spear, Olson, Mishra y Kakpovbia (2013), estudiaron la influencia de SRB provenientes de un campo petrolero en Louisiana, USA en un acero de baja aleación, por medio de OCP, EIS y Rp, encontrando que en presencia bacteriana la tasa de corrosión aumentó hasta 6 veces más que en medio abiótico. Además, lograron correlacionar la producción de sulfuros a partir de sulfatos con el crecimiento bacteriano y la formación de sulfuro de hierro como un compuesto altamente corrosivo. También, evidenciaron la formación de nanofilamentos en las bacterias en contacto con el metal corroído como mecanismo de obtención de electrones en escasez de fuentes de carbono.

Dec, Michał Mosiałek, Sochab, Jaworska-Kikc, Simkad, Michalska (2016) encontraron que el acero inoxidable en presencia de *Desulfovibrio desulfuricans* sufrió mayor corrosión (uniforme y localizada), y presentó formación de sulfuros de hierro debido a la presencia de una biocapa.

Analizando la MIC en electrodos de acero al carbono, tanto en medios selectivos para SRB como en agua de mar artificial, Domínguez-Benetton y Castaneda (2005; 2008) encontraron dos

similitudes, la primera fue una capa de productos de corrosión compuesta de fósforo, sin importar la presencia bacteriana, y segundo, que en el proceso corrosivo en medio abiótico predominó una naturaleza de degradación del hierro, mientras que el sistema biótico fue controlado por difusión.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un consorcio de Bacterias Sulfato Reductoras, en la corrosión de un acero al carbono N-80, a partir de la aplicación de técnicas electroquímicas de corriente directa y de corriente alterna.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el comportamiento de la corrosión sobre un acero N-80 en condiciones bióticas y abióticas a partir de pruebas electroquímicas.
- Establecer el efecto de las Bacterias Sulfato Reductoras en la Corrosión Influenciada Microbiológicamente de un acero al carbono N-80.
- Realizar la caracterización cualitativa y de morfología de la biopelícula y los productos de corrosión, en condiciones bióticas y abióticas.

3. Metodología

3.1 Preparación del medio de cultivo

Las SRB se cultivaron en medio Starkey (ver Apéndice B), modificando su concentración de cloruros de acuerdo a la composición del agua de inyección de un campo de producción. Todos

los componentes fueron calculados para un litro de agua desionizada. Se ajustó el pH del medio entre 7.2 y 7.5 con bicarbonato de sodio NaHCO_3 (20%).

3.2 Preparación del electrodo de acero N-80

Los electrodos o muestras de trabajo se elaboraron en acero N-80 mecanizadas de 2cmx2cm. Estas muestras fueron encapsuladas en baquelita no conductora, dejando únicamente una cara expuesta de área superficial igual a 4 cm². Para integrar los electrodos de trabajo a la celda electroquímica, la baquelita y la muestra metálica fueron horadadas para unir el porta-electrodos con un extremo de la muestra metálica y así favorecer la conexión eléctrica. Las muestras se pulieron con papel de carburo de silicio desde grano 240 hasta grano 600. Posteriormente, para desengrasar y esterilizar la muestra, esta fue sometida al siguiente procedimiento: se sumergió en acetona en un baño de ultrasonido por 20 minutos, seguido de 20 minutos de ultrasonido en etanol al 96% en un limpiador ultrasónico Branson 1510. Para finalizar con la esterilización, se sumergieron durante 24 horas en etanol al 96% y se secaron en el horno a 70° C durante 2 horas.

3.3 Montaje de las celdas electroquímicas

Se utilizaron celdas electroquímicas, las cuales constaban de dos electrodos de trabajo, uno para ser perturbado con las pruebas electroquímicas y otro para observar los cambios en SEM-EDS, un electrodo de referencia Ag/AgCl (CHI111, China) y un contraelectrodo de grafito de 10 cm de largo y 0.5 cm de diámetro; estos se esterilizaron junto a las celdas de vidrio, tapas y tapones en

autoclave a 121° C y 15 psi por 20 minutos. Los termómetros y los tapones de caucho, se esterilizaron sumergiéndolos durante 24 horas en etanol.

Se utilizaron dos celdas electroquímicas, una para el ensayo abiótico y otra para el biótico, ambas con puente salino relleno de una solución acuosa saturada de KCl; estas contenían 750 mL y 900 mL de medio Starkey modificado respectivamente, con pH inicial de 7.2 a 7.5. La celda biótica tenía más volumen para poder tomar muestras del medio y así realizar la cuantificación de sulfuros.

El montaje se realizó dentro de una cámara de bioseguridad. El puente salino se posicionó aproximadamente a 2 mm del electrodo de trabajo (Jones, 1992). Se ubicó el termómetro, la barra de grafito y se sellaron los demás orificios con cintas de parafina. Se agregó la cantidad de medio Starkey en cada celda y se sellaron con silicona los orificios para evitar filtraciones de líquido. A la celda biótica, se le inyectaron 9 mL de inóculo de SRB, que correspondían al 1% del volumen total, la celda abiótica no se inoculó. El inóculo de SRB era un cultivo en medio Starkey de las aguas de producción proporcionadas. Las celdas se mantuvieron en planchas de calentamiento a $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se purgaron con nitrógeno a una velocidad de 5 L/min durante 30 minutos, para establecer una atmósfera anaerobia al interior de la celda. Cada celda se dejó en operación durante 21 días (ver Apéndice C).

3.4 Pruebas de caracterización química

Los productos de corrosión formados en la superficie del acero N-80, se examinaron luego de 21 días de inmersión en las celdas biótica y abiótica. La biopelícula formada en el electrodo biótico se fijó para su análisis SEM, sumergiéndola en glutaraldehído al 2% durante 1 horas.

Posteriormente, se realizó una etapa de deshidratación y se sumergió en etanol al 25%, 50%, 75% y 96% en intervalos de 15 minutos por cada solución (AlAbbas, et al., 2013). El cupón para SEM del ensayo abiótico fue sometido al mismo tratamiento de deshidratación con etanol. A partir del análisis SEM-EDS, se analizaron los cambios estructurales y composicionales en la superficie del acero N-80. Luego, la película fue removida según el siguiente procedimiento: los electrodos se sometieron a un limpiador ultrasónico Branson 1510 con solución del HCl al 15%, agua, bicarbonato de sodio saturado, agua y etanol, durante 1 minuto por sustancia, todo esto para observar con mayor detalle el daño asociado al proceso corrosivo del metal.

Las muestras se posicionaron sobre stubs metálicos con cinta adhesiva de carbón. Para la captura de imágenes, se utilizó un microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 650 de pistola de emisión de campo del laboratorio de Microscopía del Parque Tecnológico Guatiguará. Las imágenes fueron tomadas a alto vacío, con un voltaje de aceleración de 15kV. Para observar la morfología de la película formada, se utilizó un detector de electrones secundarios (SE por sus siglas en inglés Secondary Electrons) y para observar las variaciones de composición, se empleó un detector de electrones retrodispersados (BSE por sus siglas en inglés Back Scattered Electrons). El análisis EDS se realizó a partir de un detector EDAZ APOLO X de resolución 126.1 eV y voltaje de aceleración de 25kV.

3.5 Pruebas electroquímicas

Para la realización de las pruebas electroquímicas, se utilizó un Potenciostato Gamry 600. Todos los parámetros ingresados para simular condiciones utilizadas durante los ensayos se encuentran

descritos en el Apéndice D. Para el análisis de los resultados obtenidos, se utilizó el software Zview 3.2b.

3.5.1 Potencial de Circuito Abierto (OCP). Para evaluar la resistencia a la corrosión de un material, el primer paso es determinar su valor de OCP (Vázquez Gutiérrez, 2007). Este indica la evolución en el tiempo del potencial del electrodo de trabajo con respecto a uno de referencia, sumergidos en un electrolito sin flujo de potencial o circulación de corriente a través del sistema (ASTM, G. International, 2004). Se midió el potencial de circuito abierto del sistema durante 30 segundos antes de aplicar la técnica EIS.

3.5.2 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS). La EIS es una técnica de corriente alterna mediante la cual se aplica un potencial de naturaleza sinusoidal y baja amplitud a un electrodo (Niño, Peña, Reyes, & Dugar-Zhabon, 2013), bajo la influencia de un electrolito determinado. El ángulo de desfase entre la corriente resultante y el potencial aplicado es medido en un rango de frecuencias característico (Falex Litigations Technical Investigations, s.f.). Al relacionar los resultados de EIS de sistemas electroquímicos con un circuito equivalente (Princeton Applied Research, s.f.), se puede obtener información de la cinética de transferencia de carga, capacitancia del electrodo y cómo se ven afectadas las resistencias concernientes a la interfaz electrodo-solución debido a las reacciones electroquímicas que toman lugar en la superficie del metal. El barrido de frecuencias para la espectroscopia fue realizado de 10^5 a 10^{-2} Hz con amplitud AC de 5 mV.

3.5.3 Resistencia a la Polarización Lineal (R_p). La R_p permite calcular la tasa de corrosión (T_{corr}) de un espécimen, de manera alterna a la medición por pérdida de peso (Princeton Applied Research, s.f.). Para R_p , el barrido de potencial se realizó en un rango de ± 10 mV con referencia al OCP y una velocidad de barrido de 0.2 mV/s (ASTM G International, 2009). Previo a la técnica

R_p , se aplicó un tiempo de espera de 25 minutos para permitir la estabilización de la muestra metálica de las condiciones aplicadas en la EIS.

3.6 Medición de sulfuros

Para monitorear el crecimiento de SRB, se realizaron mediciones del nivel de sulfuro producido, a partir de la aplicación del método yodométrico (APHA, 1989) (ver Apéndice E). Se tomaron muestras de 20 mL de medio a las 0, 48, 120, 264 y 496 horas, realizándose 4 réplicas por medición. Las muestras se obtuvieron por medio de la llave acoplada a la celda biótica.

4. Resultados y discusión

4.1 Potencial de Circuito Abierto

En la Figura 1 se presentan los valores de potencial de corrosión (E_{corr}), obtenidos en función del tiempo para los ensayos en medio biótico y abiótico. De acuerdo con los datos de E_{corr} del sistema abiótico, durante las primeras 16 horas, el E_{corr} cambió de -461 mV vs Ag/AgCl hacia valores más negativos de aproximadamente -695 mV vs Ag/AgCl estabilizándose un poco más hacia la dirección positiva de esa zona del gráfico (-681 mV vs Ag/AgCl) hasta las 384 horas aproximadamente. Al final del ensayo, E_{corr} tuvo una leve disminución hacia un valor de -705 mV vs Ag/AgCl.

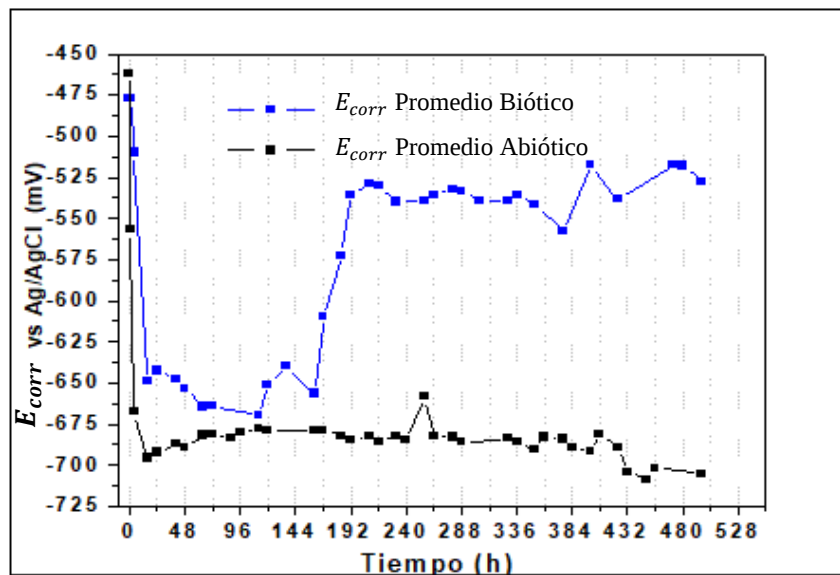


Figura 1 E_{corr} (mV) con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl saturado vs tiempo (h)

Teniendo en cuenta el trabajo realizado por Dec et al. (2016), el cuál consistió en la aplicación de pruebas electroquímicas a electrodos de acero inoxidable expuestos a medio Postgate B estéril e inoculado con *Desulfovibrio desulfuricans* para estudiar el efecto en la pasividad y picadura del material; se puede afirmar que, la estabilización observada en los valores de E_{corr} desde las 16 hasta las 384 horas hacia la dirección positiva se atribuye a la acumulación de compuestos del medio de cultivo utilizado, en este caso fosfatos, sulfatos, cloruro de sodio, magnesio y compuestos orgánicos (derivados del lactato) en la superficie del electrodo.

Por otra parte, en cuanto al sistema biótico, durante las primeras 16 horas de inmersión del electrodo, se presentó una variación del E_{corr} desde -477 mV vs Ag/AgCl hacia valores más negativos de aproximadamente -650 mV vs Ag/AgCl, para estabilizarse y oscilar entre los -635 y -669 mV hasta las 160 horas aproximadamente. Durante las siguientes 36 horas, se presentó un cambio del E_{corr} hacia la dirección positiva hasta alcanzar un valor de -535 mV vs Ag/AgCl a las 192 horas de experimentación. Alcanzado este potencial de corrosión, se presentó una

tendencia a la estabilización del potencial E_{corr} durante las siguientes horas de experimentación hasta las 384 horas aproximadamente, para luego tender a crecer levemente y estabilizarse en aproximadamente -525 mV vs Ag/AgCl.

A partir de las 192 horas de inmersión de los electrodos, se observa que hay una diferencia de aproximadamente +140mV vs Ag/AgCl en los valores de E_{corr} para el ensayo biótico con respecto al abiótico. Este cambio de potencial en la dirección positiva ha sido reportado en un trabajo anterior, al comparar la actividad de los microorganismos en el agua de mar y la formación de una biopelícula en materiales que tienden a pasivarse como el acero 1Cr18Ni9Ti y aceros con alto Mo, con la misma agua en condiciones estériles (Wang, Wang, Wu, Xu, & Li, 2004). Adicionalmente, Albbas et al. (2013) en investigaciones con acero al carbono de baja aleación en medio Baar estéril y con presencia de SRB, asociaron dicho cambio a distintos factores como la presencia de polímeros extracelulares, la acumulación de compuestos orgánicos e inorgánicos, los depósitos de células microbianas y la obtención directa de electrones del acero por parte de las SRB. Por otro lado, Liu, Liu, Hu, Zhou y Zheng (2009) en experimentación con acero al carbono expuesto a medio de cultivo con y sin inóculo de SRB, correlacionaron cambios en los valores de E_{corr} en la dirección positiva con las fases de crecimiento de dichas bacterias. Sin embargo, pese a la diversidad de estudios realizados en el tema, el mecanismo de actividad microbiana causante de la variación en los valores de E_{corr} , no ha sido explicado completamente.

4.2 Resistencia a la Polarización Lineal

La variación de R_p para el ensayo biótico y abiótico con respecto al tiempo, se presenta en la Figura 2A. Durante las primeras 160 horas el sistema abiótico tuvo un rápido aumento en su valor de R_p , desde 1584 a 11946 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ para luego oscilar entre 8792 y 11453 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ hasta las 240

horas. Después de este periodo, a las 376 horas, los valores de R_p aumentaron hasta $18195 \Omega \cdot \text{cm}^2$, seguidos de una breve disminución y una aparente estabilización alrededor de $13000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ hasta el final del ensayo. Asimismo, el sistema inoculado con SRB tuvo un comportamiento similar durante las primeras 160 horas con valores de R_p desde 3757 hasta $12643 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y finalmente, una disminución gradual hasta $4123 \Omega \cdot \text{cm}^2$ hacia las 496 horas del ensayo.

La relación entre los valores de R_p y la tasa de corrosión (T_{corr}) es inversamente proporcional (ver Figura 2B). Durante las primeras 96 horas, el valor de T_{corr} del sistema abiótico fue mayor que en el biótico, y hasta las 216 horas los valores en ambos ensayos oscilan alrededor de 1 mpy, justo en los mismos tiempos donde se registraron cambios hacia la dirección positiva en el E_{corr} para el sistema biótico (ver Figura 1). Durante las siguientes horas hasta el final de los ensayos, T_{corr} en el sistema con SRB fue 3 veces la calculada para el sistema abiótico.

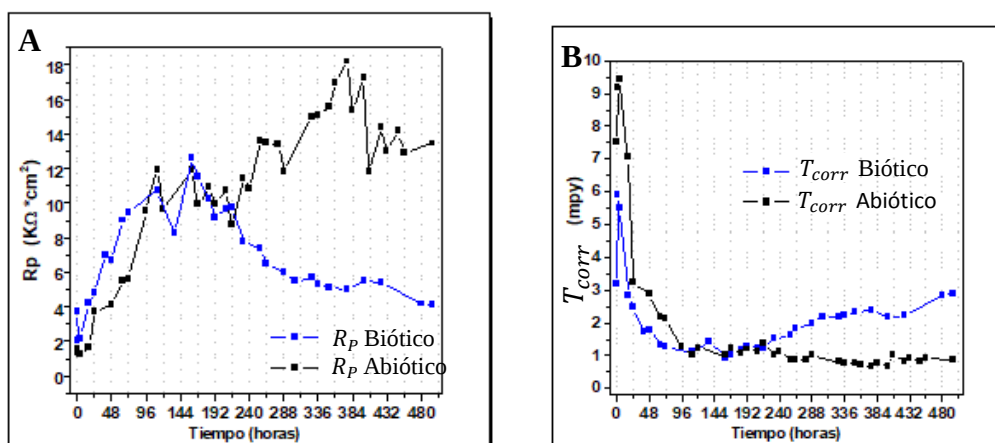


Figura 2 (A) Valor R_p vs tiempo (B) Valor T_{corr} vs tiempo

La formación de la matriz de macromoléculas de EPS de la biopelícula sobre la superficie del metal crea un ambiente agresivo que favorece el incremento en los valores de T_{corr} en el acero expuesto al medio inoculado con bacterias (AlAbbas, et al., 2013).

4.3 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

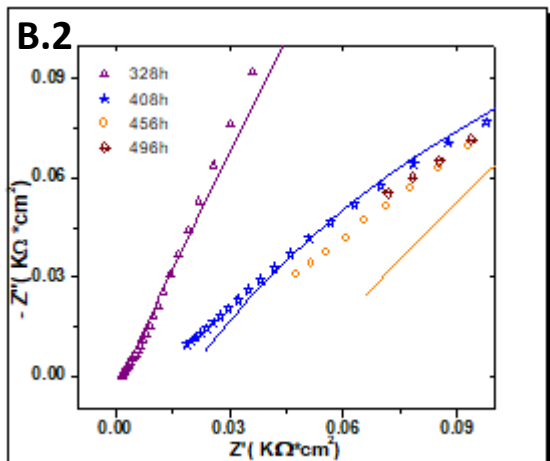
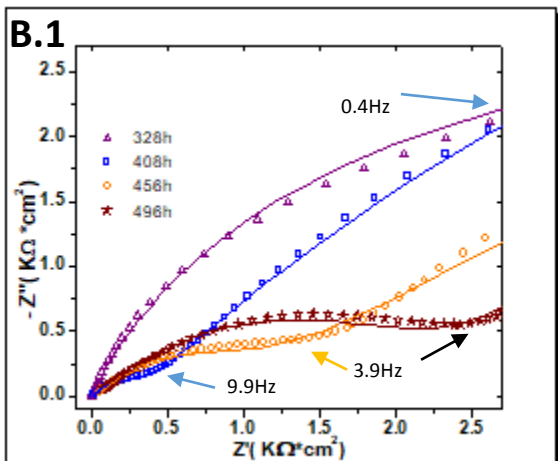
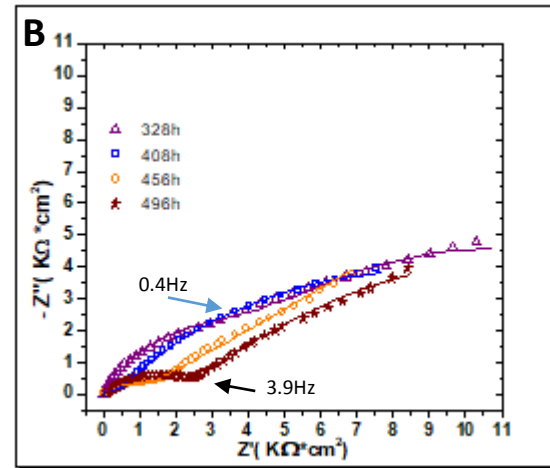
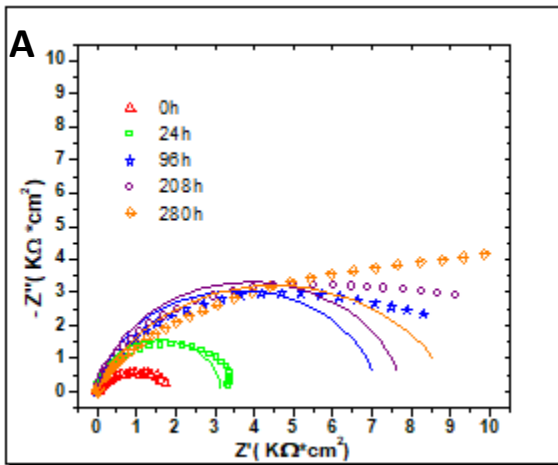
La Figura 3A-D muestra el diagrama en el plano complejo (Diagrama de Nyquist) y el diagrama de Bode-fase respectivamente para el ensayo abiótico, donde las líneas sólidas representan los ajustes de la simulación con el software ZView Solartron 3.2b para ambos diagramas. Para el ensayo biótico, se usó EIS cada 4 horas durante las primeras 24 horas. Después del primer día, las mediciones se realizaron cada 24 horas durante 21 días consecutivos. Sin embargo, las gráficas presentan únicamente los tiempos en los cuales se producen cambios apreciables.

El diagrama en el plano complejo presenta una característica común para tiempos de 0 a 280 horas, el crecimiento del diámetro es continuo con el tiempo de inmersión del electrodo. En los diagramas, se muestra la formación de un semicírculo achatado en el plano complejo con su centro bajo el eje real (Z') a los diferentes tiempos de evaluación. No obstante, a altas frecuencias no se observa la formación de otro semicírculo (ver Figura 3B.2) y, por tanto, los diagramas de Nyquist muestran una sola constante de tiempo.

El incremento en el diámetro del semicírculo indica un aumento en los valores de resistencia a la transferencia de carga (R_{ct}) y por tanto una disminución de T_{corr} , como se evidenció también mediante la técnica de Resistencia a la Polarización Lineal (ver Figura 2A-B). El cambio en la magnitud de estos valores de R_{ct} a bajas frecuencias representa los cambios en la transferencia de carga del proceso en la interface metal-solución durante este tiempo. Después de este periodo de inmersión, el semicírculo capacitivo muestra un leve decrecimiento en su diámetro y a partir de las 328 horas, se observa la formación de otro semicírculo (más definido a las 408 horas). En ese momento, ocurre una transición en el mecanismo de corrosión, este disminuye su control por transferencia de carga y aumenta su control por difusión debido a la formación de una capa no homogénea y porosa de productos de corrosión, que de acuerdo al SEM-EDS se compone de

fosfuros como Fe_2P (Castaneda & Domínguez-Benetton, 2008), hidróxidos de hierro, magnesio y algunos compuestos orgánicos. Como se evidencia en las curvas en el plano complejo, los valores de impedancia aumentan hasta las 328 horas por formación de alguna película de depósitos, luego tienden a decrecer al tratarse de una capa porosa, pero protectora.

Los diagramas de Bode muestran un aumento en el ángulo de fase hasta las 24 horas, seguido de una disminución hasta las 280 horas. Esto es un indicativo de que no hubo formación de una capa estable de protección.



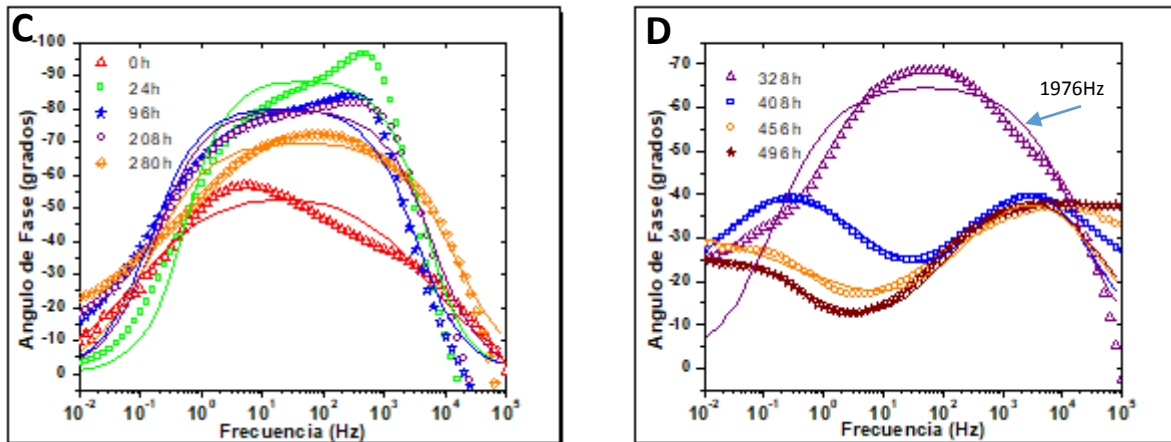


Figura 3 Ensayo abiótico (A) Nyquist 0-328 h (B) Nyquist 328-496 h (B.1, B.2) Zoom Nyquist 328-496 h (C) Ángulo de fase 0-328 h (D) Ángulo de fase 328-496 h

Alrededor de las 328 horas el ángulo de fase continúa disminuyendo y se observa la aparición de otro elemento de fase a frecuencias cercanas a 1976 Hz hasta mostrar 2 constantes de tiempo a las 408 horas, manteniéndose así hasta el final del ensayo.

Para el ensayo abiótico, los datos se ajustaron a los circuitos en la Figura 4A-B, de las 0 a las 280 horas y de las 280 hasta las 496 horas de inmersión del electrodo en el medio. El ajuste de los datos experimentales incluye elementos de fase constante y resistores, R_s es la resistencia de la solución, C_{dl} es la capacitancia de la doble capa en la interface metal-solución, R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga del metal, y R_f y C_f son respectivamente la resistencia y la capacitancia de la capa de los productos de corrosión.

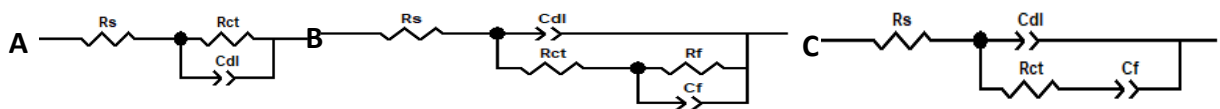
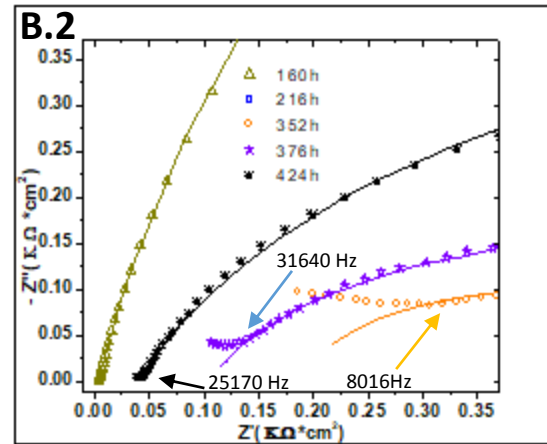
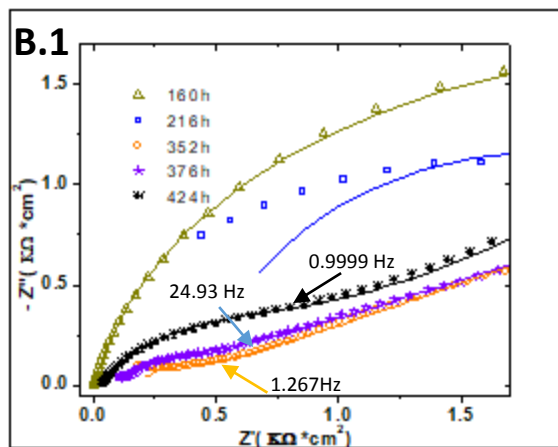
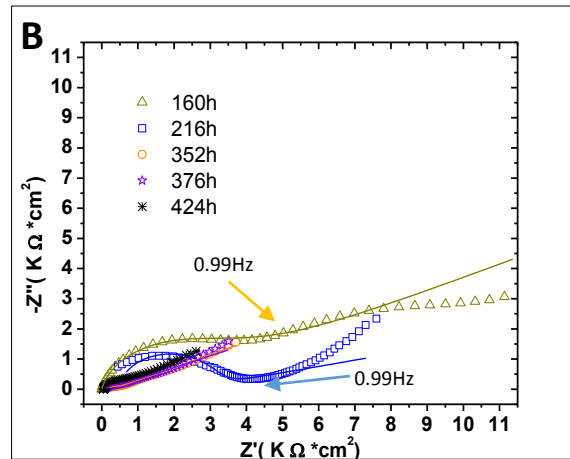
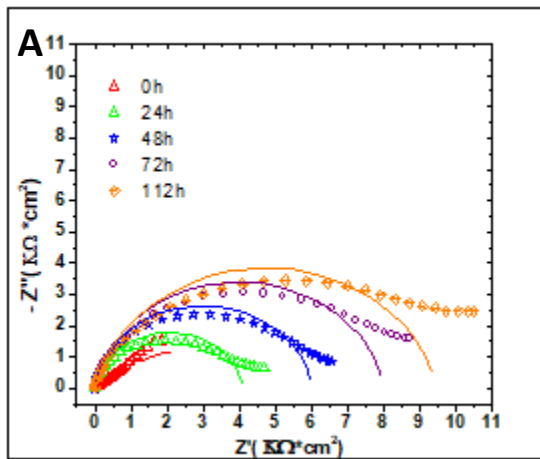


Figura 4 Circuitos equivalentes (A) Ensayo abiótico < 328h y biótico < 160h (B) Ensayo abiótico ≥ 328 h (C) Ensayo biótico ≥ 160 h

La Figura 5A-D muestra el diagrama de Nyquist y el de Bode-fase respectivamente para el ensayo en medio biótico, donde las líneas sólidas representan los ajustes de la simulación con el

software Zview Solartron 3.2b. Para el ensayo biótico se aplicó la técnica EIS cada 4 horas durante las primeras 24 horas, y a partir del primer día, las mediciones se realizaron cada 24 horas durante 21 días consecutivos. Sin embargo, en las gráficas se presentan los tiempos cuyos cambios fueron significativos.



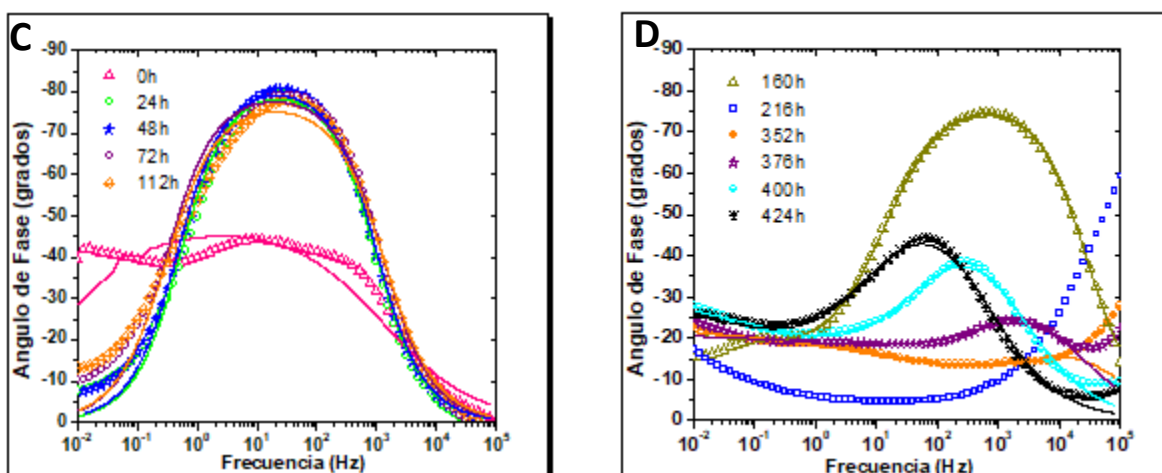


Figura 5 Ensayo biótico (A) Nyquist 0-160 h (B) Nyquist 160-424 h (B.1, B.2) Zoom Nyquist 160-424 h (C) Ángulo de fase 0-160 h (D) Ángulo de fase 160-424 h

Para el diagrama en el plano complejo al igual que en el sistema abiótico, el crecimiento del diámetro fue continuo con el tiempo de inmersión del electrodo, esta característica es común para tiempos de 0-112 horas. La forma también es de semicírculo achatado en el plano complejo con su centro bajo el eje real (Z') a los diferentes tiempos de evaluación. A altas frecuencias no se observa la formación de otro semicírculo (ver Figura 5B.2) y por tanto, los diagramas de Nyquist muestran una sola constante de tiempo. El incremento en el diámetro del semicírculo con el tiempo indica un incremento en los valores de R_{ct} y por tanto una disminución de T_{corr} como se evidenció también con la experimentación por la técnica de Resistencia a la Polarización Lineal (ver Figura 2A-B).

Seguido a este periodo de inmersión, el semicírculo capacitivo muestra un sustancial decrecimiento en su diámetro para tiempos de 160 a 352 horas, paralelo con la formación de otro semicírculo a frecuencias bajas (ver Figura 3B-B.1). El diagrama de Nyquist revela la existencia de una capa de productos de corrosión, probablemente similar a la formada en condiciones abióticas, combinada con una matriz de EPS generada por actividades bacterianas (Castaneda &

Domínguez-Benetton, 2008). La magnitud del valor de R_{ct} disminuye, debido la difusión de iones de la solución hacia la superficie del metal. Esta capa no homogénea y porosa, permite que el mecanismo de corrosión tenga un mayor control por difusión que por transferencia de carga (Castaneda & Domínguez-Benetton, 2008). Posteriormente, a partir de las 376 horas de inmersión, los dos semicírculos siguen decreciendo en diámetro (ver Figura 3B.2, más detalle en el Apéndice F) y a bajas frecuencias se observa una recta con pendiente de aproximadamente 1. Debido a una interferencia en el puente salino, no se pudo obtener los espectros con tiempos posteriores a 424 horas.

El gráfico de Bode permite observar que de las 160 hasta las 352 horas ocurrió un desplazamiento del ángulo de fase hacia altas frecuencias y ahora se registran valores cercanos a cero durante todo el barrido de frecuencias, mostrando un comportamiento más resistivo que capacitivo. Lo anterior ocurre durante el periodo que los valores de E_{corr} se acercan hacia la dirección positiva (ver Figura 1) y que T_{corr} permaneció aproximadamente constante (ver Figura 2B). Hacia las 376 horas y hasta el final del ensayo, las gráficas de Bode muestran de nuevo una constante de tiempo, el ángulo de fase tiene ahora valores cercanos a -45 grados y se desplaza hacia frecuencias bajas (10 Hz), es decir hacia la zona izquierda del gráfico.

De acuerdo a experimentaciones previas realizadas por Castaneda y Domínguez-Benetton (2008) con acero al carbono en aguas de mar artificiales estériles y en presencia de *Desulfovibrio gabonensis* y *D. capillatus*; esta contribución en el ángulo de fase a bajas frecuencias es un comportamiento característico de procesos de control por activación interfacial, es decir, la interface metálica se vuelve más activa químicamente, esto puede ser debido a la formación de una capa inestable a base de componentes orgánicos e inorgánicos (biopelícula). De acuerdo a lo anterior, la disminución acelerada de R_{ct} y el aumento en T_{corr} (ver Figura 2B) pueden estar

relacionados con actividades de naturaleza biocatalíticas causadas por la existencia de una biopelícula bacteriana (AlAbbas, et al., 2013; Wang, Wang, Wu, Xu, & Li, 2004).

Para el ensayo biótico, los datos se ajustaron a los circuitos en la Figura 4A-C, de las 0 a las 160 horas y de las 160 hasta las 424 horas de inmersión del electrodo en el medio. Se incluyeron elementos de fase constante, resistores, R_s es la resistencia de la solución, C_{dl} es la capacitancia de la doble capa en la interface metal-solución, R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga del metal, C_f es referente a la capa de productos de corrosión y de EPS, como una alternativa para representar en Zview los efectos difusivos de una impedancia de Warburg (Zview Solartron 3.2b).

4.4. Cuantificación de sulfuros y pH en el medio biótico

Al observar la Figura 6A, se evidencia que durante las primeras 264 horas del ensayo, se produce un aumento en la cantidad de sulfuros producidos y finaliza con una disminución de estos hacia las 496 horas. El comportamiento anterior, según investigaciones previas realizadas por Albbas et al (2013), estaría influenciado por el crecimiento celular, donde la alta producción de sulfuros se comporta como un indicador indirecto de la actividad metabólica de las bacterias en su fase exponencial. Aunque no existe una estabilización de la cantidad de sulfuros producidos, horas más tarde se registra una disminución en su nivel, lo cual sugiere una disminución de la actividad de las BSR producto de la ausencia de nutrientes y la acumulación de productos metabólicos de desecho. Cabe resaltar que, a las 160 horas, tiempo en el cual la concentración de sulfuros en el medio fue mayor, los valores de R_p comienzan a disminuir (ver Figura 2A), confirmando por medio de la técnica EIS que los valores de R_{ct} decrecen y aumenta el control por difusión en el mecanismo de corrosión. En este orden de ideas, se puede plantear una relación del aumento en la

actividad bacteriana, con los cambios en el mecanismo de corrosión del electrodo expuesto a medio biótico.

Por otra parte, la Figura 6B muestra la variación del pH a lo largo del ensayo biótico. Durante las primeras 48 horas, el pH disminuye hasta un valor de 7.06. Transcurridas 120 horas del ensayo, el pH llega a un valor de 7.4 y continúa en ascenso hasta un valor final de 8.83.

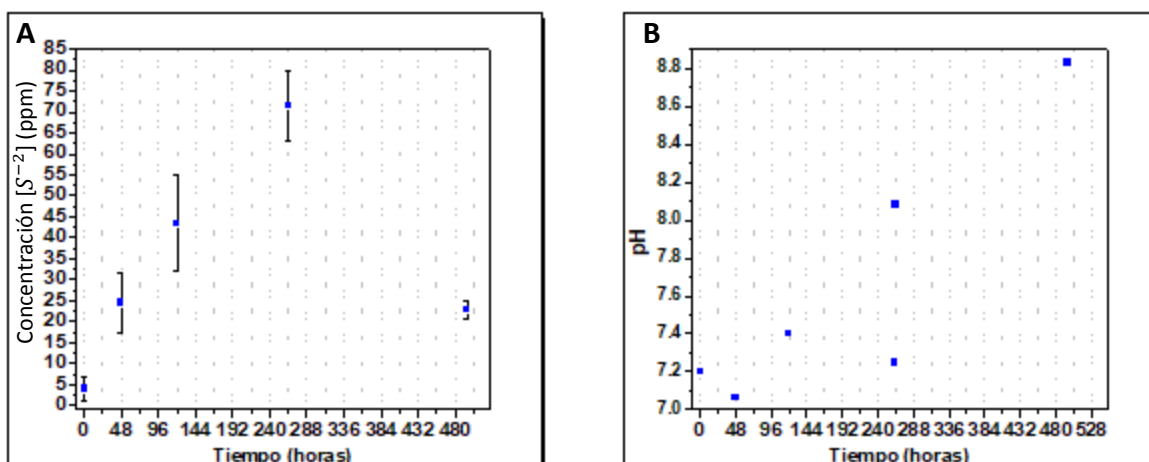
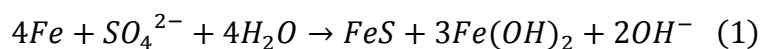


Figura 6 (A) Concentración de sulfuros vs tiempo (B) Valores de pH ensayo biótico*

Nota: *La incertidumbre graficada es la suma de todos los aportes de fuentes de error (instrumentos de aforo, balanzas, pipetas, patrón de Na_2S utilizado y errores de los analistas) y se basa en los valores finales de concentración calculados por titulación.

Con base en la literatura, a causa de la actividad metabólica de los microorganismos en la biopelícula, el pH local puede variar en al menos 3 unidades, y es directamente en la interface metal-biopelícula en donde ocurre este cambio (Beech, et al., 2000). De acuerdo a lo anterior, las mediciones de pH de las muestras obtenidas del medio de cultivo pueden diferir en gran magnitud con respecto al pH local. En este caso, el pH del medio cambió de neutro a básico mientras que la producción de sulfuros aumentó, sugiriendo una disminución de pH a nivel local.

Guan, Zhai, Duan, Zhang, y Hou (2016) en investigaciones previas sobre la influencia de la polarización catódica en acero EQ70 expuesto a medio Postgate C estéril e inoculado con *Desulfovibrio caldoniens* atribuyen el aumento de pH a la formación de OH^- (ver Ecuación 1) como producto global de MIC por SRB (ver mecanismos de corrosión en Apéndice A) que puede ser resultado de despolarización catódica por protones del medio adheridos a las superficie del metal (CDT por sus siglas en inglés Cathodic Depolarization Theory) y del consumo de electrones de las bacterias hacia el metal (BCSR por sus siglas en inglés Biocatalytic Cathodic Sulfate Reduction Theory).



4.5. Análisis de interfaz: morfología y composición

Para analizar los cambios en la superficie de los electrodos de acero al carbono N-80, por efecto del medio biótico y abiótico, se empleó la técnica SEM-EDS. La Figura 7A y 7C, muestra los resultados obtenidos durante el análisis SEM para el sistema abiótico, es decir las características morfológicas de la película formada. Se distinguió una capa gruesa y homogénea, conformada por cristales de diferentes tamaños en forma de prismas. Se formaron zonas con mayor cantidad de cristales, por lo tanto, se realizó un análisis EDS general y uno puntual a 200x aumentos, demostrando que ambas zonas se caracterizaron por la formación de óxidos de hierro, fosfatos y cloruros, además de compuestos a base de carbono (ver Apéndice G).

La presencia de sulfuros en la película abiótica fue menor en comparación con el resto de los compuestos. Por otra parte, las características y la composición de la biopelícula formada por el consorcio de SRB, se puede detallar en la Figura 7B y 7D. En la Figura 7B, se diferenciaron dos

zonas; una conformada por cristales triclinicos, pues no son simétricos de un extremo a otro, de distintos tamaños, la cual poseía grandes cantidades de compuestos a base de oxígeno, fósforo, magnesio y carbono. La composición química de la zona rugosa, al igual que la película del sistema abiótico, se caracterizó por la presencia de óxidos de hierro, compuestos a base de calcio, fosfatos, magnesio y bajas cantidades de cloruros, pero en mayor proporción, ya que provenían principalmente de la membrana celular bacteriana y la matriz de EPS (Zhai, et al., 2017). Según varios estudios del tema, generalmente los productos de EPS ocupan entre el 75% y 95% del volumen total de la biopelícula, mientras que las células bacterianas ocupan el restante (AlAbbas, et al., 2013; Castaneda & Domínguez-Benetton, 2008). La formación de fosfuros de hierro cristalinos y amorfos estaría directamente relacionada con la presencia de fosfato dipotásico, un componente del medio de cultivo (AlAbbas, et al., 2013; Castaneda & Domínguez-Benetton, 2008)

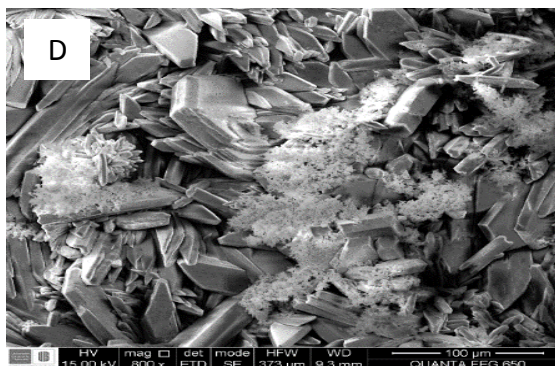
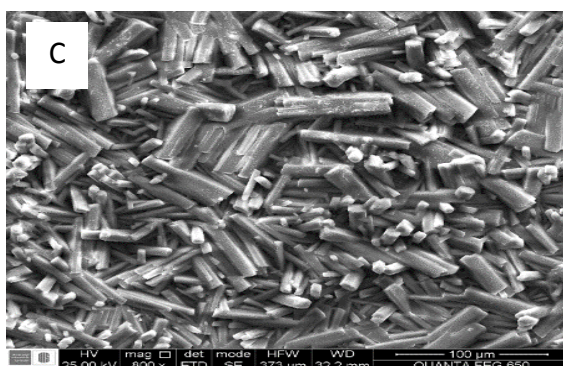
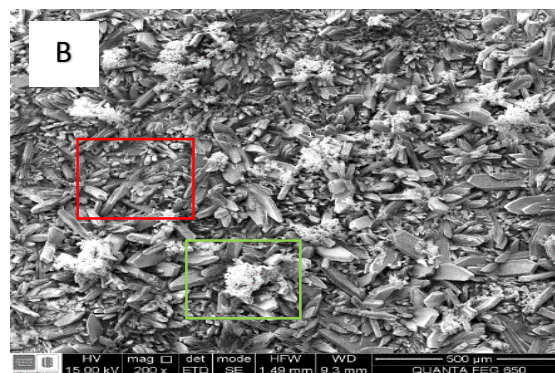
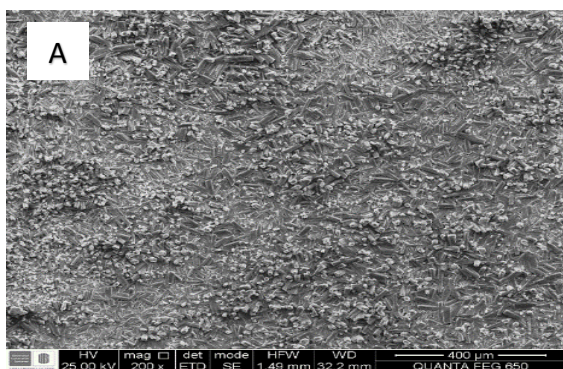


Figura 7 Imágenes SEM acero N-80 transcurridos 21 días de exposición en medio Starkey (A) Abiótico SEM 200x (B) Biótico SEM 200x (C) Abiótico SEM 800x (D) Biótico SEM 800x

Las diferencias que existen en la composición elemental de la película y biopelícula formada, así como diferencias en la distribución de los productos de corrosión mencionados anteriormente, se pueden ver en la Tabla 1 y con mayor detalle en el Apéndice G. La película abiótica muestra una distribución uniforme de textura rígida, mientras que la biopelícula biótica exhibe dos zonas, una zona de textura dura y otra de aspecto blando cuya naturaleza es polisacárida y viscoelástica (ver Figura 7D) (Castaneda & Domínguez-Benetton, 2008).

Tabla 1 Resumen peso elemental electrodo sistemas Abiótico y Biótico

% Peso Elemento	C	O	Na	Mg	Fe	S	Cl	P	Ca	K	TOTAL
<i>Sistema Abiótico</i>											
Zona Puntual	5,63	31,03	0,7	10,37	29,26	0,13	0,57	22,31	0	0	100
Zona General	5,88	38,39	2,88	11,38	27,98	0,13	1,85	11,15	0	0,36	100
<i>Sistema Biótico</i>											
Zona Cristales	1,78	15,5	0,5	4,88	60,49	0,09	0,01	11,93	3,58	1,24	100
Zona Rugosa	14,59	51,1	0,92	16,1	0	0	1,85	15,44	0	0	100

Las imágenes SEM a aumentos de 25000x, confirmaron la adherencia de las bacterias al acero. En la Figura 8A-B se observó que grandes cantidades de bacterias hacían parte de la biopelícula en agrupaciones con forma de red (Castaneda & Domínguez-Benetton, 2008). La morfología de las bacterias encontradas comprende distintas formas y tamaños, alargadas y ovaladas en forma de varilla y entre 2 y 7 μm de longitud (ver Figura 8C), algo que es de esperarse debido a que el inóculo de bacterias utilizado, fue tomando directamente de las aguas de inyección, lo que sugiere la presencia de varias cepas de bacterias anaerobias, incluidas las SRB.

También, se apreció que las bacterias se encontraban firmemente unidas a la capa de productos de corrosión, algunas poseían nanofilamentos orgánicos (ver Figura 8D, zoom en Apéndice G), como una forma de transferencia directa de electrones (DET por sus siglas en inglés Direct Electron Transfer) (Li, et al., 2018). De acuerdo a Sherar, Power, Mitlin, Southam y Shoesmith (2011) dichas estructuras con forma de flagelo crecen como un mecanismo para capturar los electrones directamente del acero que se corroe en medios con ausencia de una fuente de carbono. Esta afirmación se soporta en un trabajo previo de Castaneda y Domínguez-Benetton (2005) con acero al carbono en aguas de mar artificiales estériles y con *Desulfovibrio gabonensis* y *D. capillatus*; donde establecen que los productos de corrosión encontrados tienen naturaleza semiconductor.

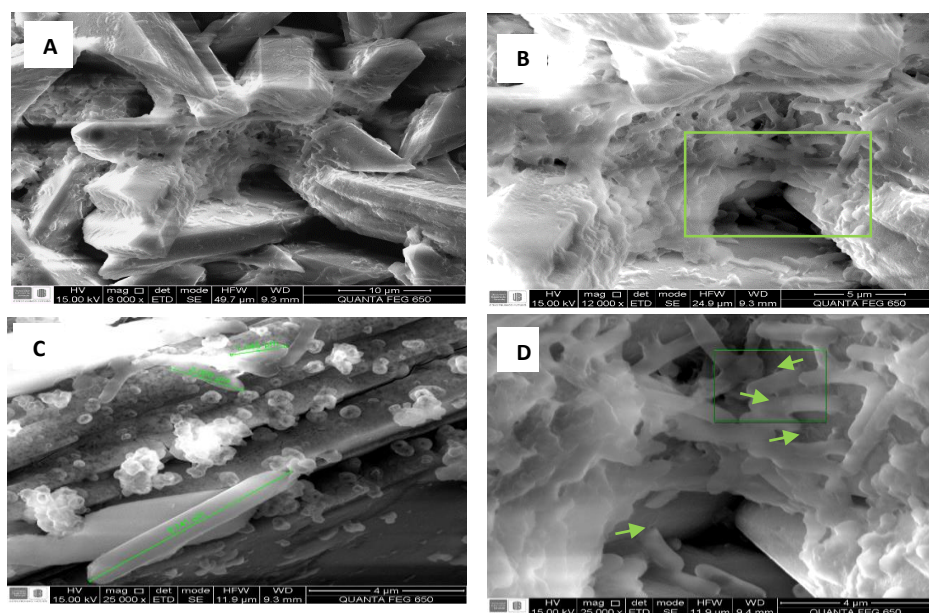


Figura 8 Imágenes SEM acero N-80 transcurridos 21 días de exposición en medio Starkey con SRB (A) 6000x (B) 12000x (C) 25000x (D) 25000x

Teniendo en cuenta lo anterior, y al observar los resultados del análisis EDS para el sistema biótico, es evidente que los sulfuros no fueron el principal producto metabólico bacteriano. Los resultados indicaron una gran proporción de fósforo en los productos de corrosión. Según Iverson

y Olson (1982), la predominancia del producto de corrosión depende de qué tipo de metabolito llega primero a la superficie del hierro.

Cabe destacar que en aguas y medios de cultivo, la presencia de compuestos con fósforo como K_2HPO_4 , KH_2PO_4 (cada uno con concentraciones de 0.3 g/L de agua destilada, similar a la de 0.56 K_2HPO_4 g/L en medio Starkey) promueven la reducción bacteriana de HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$ (fosfatos) a compuestos muy reactivos como el fosfano (H_3P) que al reaccionar con el hierro forman compuestos, como fosfuro de hierro (Fe_3P) o vivianita $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ como producto de corrosión (Enning D. R., 2012; Thuy Hang, 2003). Lo anterior, soportado por experimentos realizados por Weimer, Van Kavelaar, Michel y NG (1988) en cultivos de *Desulfovibrio Desulfuricans* demuestran una correlación entre la tasa de corrosión del hierro y la concentración de PO_4^{3-} (de $1 \cdot 10^{-7}$ hasta $1 \cdot 10^{-4}$ g/L). Según Roels y Verstraete (2001), las rutas para obtener H_3P (es decir reducción de fosfatos) tienen altos requerimientos energéticos, mayores incluso a los que proporcionaría la obtención de electrones vía E-MIC para la reducción de sulfato. Esto permite pensar que sólo si las células se benefician de la formación del H_3P , invertirían energía en la reducción de fosfatos o que la producción del H_3P puede ser resultado de alguna reacción paralela presente en el metabolismo bacteriano.

Después del tratamiento para eliminar la biopelícula y los productos de corrosión, el análisis SEM para el electrodo sumergido en medio abiótico (ver Figura 9A y 9C), presentó una morfología caracterizada por una pérdida uniforme de material en forma de hendiduras irregulares.

Por otro lado, para el caso del electrodo en presencia bacteriana, se observa corrosión localizada, en forma de socavaciones simétricas (ver Figura 9B y 9D) que se presentan en grupos o cúmulos, característico del daño causado por MIC.

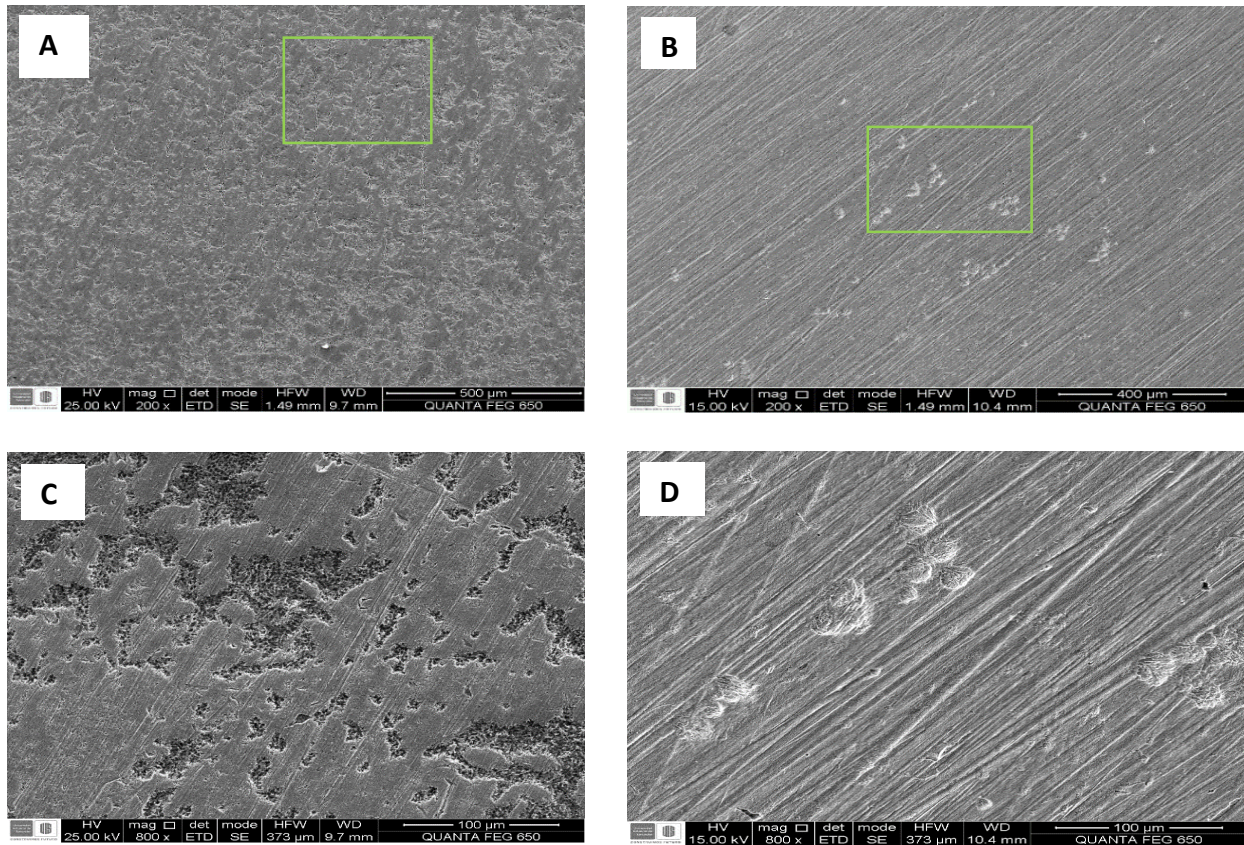


Figura 9 Imágenes SEM electrodo abiótico y biótico sin productos de corrosión (A) Abiótico 200x (B) Biótico 200x (C) Abiótico 800x (D) Biótico 800x

5. Conclusiones

- Los valores de E_{corr} para el electrodo en medio biótico presentaron un cambio de aproximadamente +140mV vs Ag/AgCl en comparación con los registrados para electrodo con exposición a medio abiótico.
- Tanto para el sistema biótico y abiótico, se dio un cambio en la cinética de corrosión de control por transferencia de carga a control por difusión. Para el sistema biótico se dio alrededor de las 160 horas, mientras que para el abiótico hacia las 328 horas de inmersión del electrodo.

- Los valores de T_{corr} se mantuvieron alrededor de 1 mpy para el electrodo expuesto al medio abiótico, mientras que en el biótico aumentaron hasta casi 3 mpy, confirmando que la actividad metabólica de las bacterias ocasiona un aumento en T_{corr} .
- En el sistema biótico se evidencia actividad de las SRB con un aumento en la producción de sulfuros hasta las 264 horas.
- La Microscopía Electrónica de Barrido permitió observar las diferencias en la morfología de las películas formadas. Los electrodos expuestos a sistema abiótico, presentaron una capa gruesa y homogénea, conformada por cristales en forma de prismas, mientras que el biótico permitió observar dos zonas, una caracterizada por la presencia de cristales triclinicos con un consorcio de bacterias adheridas y una capa amorfa, con una mayor cantidad de carbono y oxígeno, lo cual permite afirmar que es EPS.
- La técnica SEM acoplada al detector EDS, permitió comparar las diferencias químicas entre la película del sistema biótico y del abiótico. Ambas películas se caracterizaron por la presencia de óxidos de hierro, compuestos a base de carbono, fosfatos, magnesio y bajas cantidades de cloruros. Sin embargo, en la película biótica, la formación de compuestos a base de oxígeno, carbono y fósforo predominó.
- El daño del electrodo expuesto a medio abiótico se caracterizó por ser uniforme y deslocalizado, mientras que en medio con SRB fue de morfología de socavaciones localizadas propias de MIC.

Referencias Bibliográficas

- AlAbbas, F. M., Williamson, C., Bhola, S. M., Spear, J. R., Olson, D. L., Mishra, B., & Kakpovbia, A. E. (2013). Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 34-42.
- Ammrf. (s.f.). Scanning Electron Microscope-Training module . *Australian Microscopy & Micronalysis research facility*.
- APHA. (1989). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington. USA: APHA.
- ASTM G International. (2009). Standard test method for conducting potentiodynamic polarization resistance measurements. *Annual Book of ASTM Standards*, 3, 237-239.
- ASTM G International. (2010). G3-89 Standard practice for conventions applicable to electrochemical measurements in corrosion testing.
- ASTM G International. (2017). ASTM G1-03 Standard practice for Preparing, Cleaning and Evaluating Corrosion Test.
- ASTM, G International. (2015). G102-89 Standard practice for calculation of corrosion rates and related information from electrochemical measurements. *G102-89, ASTM*.
- ASTM, G. International. (2004). G15-04 Standard Terminology Relating to Corrosion and Corrosion Testing.
- Ávila, J., & Genescá, J. (s.f.). *III Corrosión electroquímica*. Recuperado el 13 de 07 de 2018, de Biblioteca digital Ilce: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/079/htm/sec_6.htm

- Basséguy, R., Délia, M.-L., Erable, B., & Bergel, A. (2014). Electroactive biofilms. In *Understanding Biocorrosion* (pp. 107-143). Woodhead Publishing.
- Beech, I. B., & Sunner, J. (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current opinion in Biotechnology*, 15 (3), 181-186.
- Beech, I., Bergel, A., Mollica, A., Flemming, H.-c., Scotto, V., & Sand, W. (2000). Simple Methods for the Investigation of the Role of Biofilms in Corrosion. *Brite Euram Thematic Network on MIC of Industrial Materials*.
- Beech, I., Szttyler, M., Gaylarde, C. C., Smith, W. L., & Sunner, J. (2014). Biofilms and biocorrosion. En T. Liengen, D. Féron, R. Basséguy, & I. Beech (Edits.), *Understanding Biocorrosion* (págs. 33-56). Woodhead Publishing.
doi:<https://doi.org/10.1533/9781782421252.1.33>
- Calderón, J., Rossa Mattos, Ó., & Esteves Barcia, O. (2006). Análisis de la evolución del potencial de circuito abierto del cobalto en medio levemente alcalino. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 38, 20-30.
- Camacho Medina, B. A. (2015). Evaluación de la resistencia a la corrosión de uniones soldadas de acero inoxidable mediante proceso GTAW y material de aporte tubular. *Pontificia Universidad Católica del Perú*. Obtenido de <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/6073>
- Castaneda, H., & Domínguez-Benetton, X. (2008). SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. *Corrosion Science*, 50(4), 1169-1183.

Celda electroquímica o galvánica. (s.f.). Recuperado el 13 de 07 de 2018, de Educativa: http://educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/4750/4912/html/22_electroquimica_o_galvnica.html

Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3, 133-146.

Cordas, C. M., Guerra, L. T., Xavier, C., & Moura, J. J. (2008). Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. *Electrochimica Acta*, 29-34.

Dall'Agnol, L., & Moura, J. (2014). Sulphate-reducing bacteria (SRB) and biocorrosion. In *Understanding Biocorrosion* (pp. 77-106). Oxford: Woodhead Publishing.

de Romero, M. F., Pérez, O., & Campos, W. (2010). Importancia de la microscopía electrónica de barrido en el mecanismo de acción de las bacterias sulfato-reductoras. *Acta Microscopica*, 19 (1).

De Turris S., A. J., de Romero, M. F., Sankara, P., & Ocando, L. (2013). Efecto sinérgico de las bacterias sulfato-reductoras y el Co₂ en agua de producción sobre la corrosión del acero al Carbono. *Interciencia*, 38(3), 209-214. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33926977007>

Dec, W., Mosialek, M., Socha, R. P., Jaworska-Kik, M., Simka, W., & Michalska, J. (2016). The effect of sulphate-reducing bacteria biofilm on passivity and development of pitting on 2205 duplex stainless steel. *Electrochimica Acta*, 212, 225-236.

Dickinson, W., Caccavo Jr., F., Olesen, B., & Lewandowski, Z. (1997). Ennoblement of stainless steel by the manganese-depositing bacterium *Leptothrix discophora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63.

- Domínguez-Benetton, X., & Castaneda, H. (2005). SRB-Biofilm Growth and Influence in Corrosion Monitoring by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Corrosion* 2005.
- Eaktasang, N., Kang, C. S., Lim, H., Kwean, O. S., Cho, S., Kim, Y., & Kim, H. S. (2016). Production of electrically-conductive nanoscale filaments by sulfate-reducing bacteria in the microbial fuel cell. *Bioresource technology*, 210, 61-67.
- Enning, D. R. (2012). Bioelectrical corrosion of iron by lithotrophic sulfate-reducing bacteria.
- Enning, D., Venzlaff, H., Garrelfs, J., Dinh, H. T., Meyer, V., Mayrhorfer, K., . . . Widdel, F. (2012). Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. *Environmental microbiology*, 14 (7), 1772-1787.
- Falex Litigations Technical Investigations. (s.f.). *Electrochemical Corrosion Test Methods*.
Obtenido de Falex Litigation Technical Investigations: www.FalexInvestigations.com
- Flores, E., Sosa, E., Ramírez, F., González, I., & Monroy, O. (s.f.). CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL ACERO AL CARBONO EN PRESENCIA DE BACTERIAS ANAEROBIAS EN AMBIENTES AMARGOS.
- Gamry Instruments. (s.f.). *Gamry Software Help*. Recuperado el 15 de 1 de 2019, de Gamry Instruments: <https://www.gamry.com/Framework%20Help/HTML5%20-%20Tripane%20-%20Audience%20A/Content/EIS/Theory/Physical%20Electrochemistry%20and%20Circuit%20Elements/Electrolyte%20Resistance.htm>
- Gamry Instruments. (s.f.). *Introduction to Electrochemical Impedance Spectroscopy*. Recuperado el 15 de 1 de 2019, de Gamry Instruments: <https://www.gamry.com/assets/Uploads/Basics-of-Electrochemical-Impedance-Spectroscopy.pdf>

- Gu, J.-D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International biodeterioration & biodegradation*, 52(2), 69-91.
- Gu, T., Xu, D., Zhang, P., Li, Y., & Lindenberger, A. L. (2014). Microbiologically influenced corrosion and its impact on metals and other materials. *Microbiology for Minerals, Metals, Materials and Environment*, 383-408.
- Guan, F., Zhai, X., Duan, J., Zhang, M., & Hou, B. (2016). Influence of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of high strength steel EQ70 under cathodic polarization. *PloS one*, 11(9), e0162315.
- Guan, F., Zhai, X., Jizhou, D., Zhang, J., Li, K., & Hou, B. (2017). Influence of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of 5052 aluminum alloy. *Surface and Coatings Technology*, 316, 171-179.
- Guiñón Piña, V. (2011). ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA POLARIZACIÓN ANÓDICA Y CATÓDICA SOBRE EL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE NÍQUEL, CROMO Y ACEROS INOXIDABLES EN LiBr. *Doctoral dissertation Universitat Politècnica de València*. doi:10.4995/Thesis/10251/14015
- Hamiton, W. A. (2003). Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*, 19 (1), 65-76.
- Hidrogenasa*. (2018). Recuperado el 10 de 08 de 2018, de Esacademic: <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/1309259>
- Iverson, W. P., & Olson, G. J. (1982). *The mechanism of anaerobic (microbial) corrosion*. Washington DC: National Bureau of Standards.
- Iverson, W. P., & Olson, G. J. (1982). *The mechanism of anaerobic (microbial) corrosion*. Washington DC: National Bureau of Standards.

- Jack, T. R. (2002). Biological Corrosion Failures. *ASM Handbook. Failure Analysis and Prevention*, 11, 881-890.
- Javaherdashti, R. (2004). Modeling microbiologically influenced corrosion of N-80 carbon steel by fuzzy calculus. *Metallurgical and Materials Transactions A*, 2051-2056.
- Javaherdashti, R. (2017). *Microbiologically Influenced Corrosion (MIC)*. In *Microbiologically Influenced Corrosion*. Canning Vale: Springer.
- Jones, D. A. (1992). *Principles and prevention of corrosion*. Reno: Macmillan.
- Lantes-Suárez, O., Prieto-Martínez, P., & Martínez-Cortizas, A. (2011). Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido al estudio de los acabados de cerámica antigua de Galicia. *Gallaecia*, 30, 117-125.
- Li, Y., Xu, D., Changfeng, C., Li, X., Jia, R., Zhang, D., . . . Gu, T. (2018). Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: a review. *Journal of Materials Science & Technology*.
- Liengen, T., Basseguy, R., Feron, D., Beech, I., & Birrien, V. (2014). Understanding Biocorrosion: Fundamentals and applications. *Elsevier*.
- Little, B., Wagner, P., & Mansfeld, F. (1992). An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochimica acta*, 37 (12), 2185-2194.
- Liu, T., Liu, H., Hu, Y., Zhou, L., & Zheng, B. (2009). Growth characteristics of thermophile sulfate-reducing bacteria and its effect on carbon steel. *Materials and corrosion*, 60 (3), 218-224.
- Lopes, R. N., Rodrigues, D. M., Allil, R. C., & Werneck, M. M. (2018). Plastic optical fiber immunosensor for fast detection of sulfate-reducing bacteria. *Measurement*, 125, 377-385.

- Medina Custodio, O. (2006). Análisis del deterioro por Corrosión Microbiológica en un Acero de bajo carbono. *Universidad Autónoma de México*.
- Mendoza Flores, J., Durán Romero, R., & Genescá Llongueras, J. (2008). Espectroscopía de impedancia electroquímica en corrosión.
- Mori, K., Tsurumaru, H., & Harayama, S. (2010). Iron corrosion activity of anaerobic hydrogen-consuming microorganisms isolated from oil facilities. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(4), 426-430.
- NACE International. (2013). RP0775 Standard Recommended Practice: Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations. NACE International. *NACE International*.
- NACE/ASTM G. (2017). NACE/ASTM G 193 12d Standard Terminology and Acronyms Relating to Corrosion. 5.
- Niño, E. D., Peña, D. Y., Reyes, M. S., & Dugar-Zhabon, V. (2013). Estudio experimental de la resistencia a la corrosión de un acero al carbono AISI-SAE 1020 implantado con iones de titanio. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 33(1), 138-146.
- Paredes-Dugarte, S. Y., Hidalgo-Prada, B., Guerra, E., & González, A. (2015). Behavior of corrosion of steels grade API J-55, P-110 and N-80 in saline environment with flow CO₂. *Revista Ingenieria UC*, 22(3), 52-61.
- Park, S.-J., & Seo, M.-K. (2011). Interface science and composites. *Interface Science and Technology*, 18, 1-57. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123750495000013>
- Pineau, S., Sabot, R., Quillet, L., Jeannin, M., Caplat, C., Dupont-Morral, I., & Refait, P. (2008). Formation of the Fe (II–III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel

- associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase. *Corrosion Science*, 50(4), 1099-1111.
- Princeton Applied Research. (s.f.). *Application Note AC- 1 : Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy*. Recuperado el 14 de 7 de 2018, de Ametek Scientific Instruments: <https://www.ameteks.com/library/application-notes/princeton-applied-research>
- Princeton Applied Research. (s.f.). *Application Note CORR-1 Basics of Corrosion Measurements*. Recuperado el 14 de 7 de 2018, de Ametek Scientific Instruments: <https://www.ameteks.com/library/application-notes/princeton-applied-research>
- R.K., T., Stackebrand E, & W.A., H. (2007). Energy metabolism phylogenetic diversity of sulphate-reducing bacteria in: *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*. Cambridge University Press, 1-27.
- Rey Ruíz, A. (2014). Estudio de la corrosión electroquímica en los bronce de aluminio con níquel (NAB). *Trabajo Fin de Máster en Nuevos Materiales Universidad de Cantabria y Universidad tecnológica de Viena*.
- Roberge, P. R. (2008). *Corrosion Engineering*. New York: Mc-Graw-Hill.
- Roels, J., & Verstraete, W. (2001). Biological formation of volatile phosphorus compounds. *Bioresource Technology*, 79 (3), 243-250.
- Santander Morales, C. B. (2008). Estudio Experimental de Corrosión en Metales de Uso Industrial por *Desulfovibrio desulfuricans*.
- Sekar, N., & Ramasamy, R. P. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy for microbial fuel cell characterization. *Microbial & Biochemical Technology*, 6 (2). doi:dx.doi.org/10.4172/1948-5948.S6-004

- Sheng, X., Ting, Y.-P., & Pehkonen, S. O. (2007). The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. *Corrosion Science*, 49 (5), 2159-2176.
- Sherar, B. W., Power, I. M., Keech, G., P., Mitlin, S., Southam, G., & Shoesmith, D. W. (2011). Characterizing the effect of carbon steel exposure in sulfide containing solutions to microbially induced corrosion. *Corrosion Science*, 53 (3), 955-960.
- Thuy Hang, D. (2003). Microbiological study of the anaerobic corrosion of iron. Ph.D.-thesis. University of Bremen. Pg. 15.
- Torrado Rincón, J., Calixto Gómez, D., Sarmiento Caraballo, A., & Panqueva Álvarez, J. (2008). Evaluación del molibdato y nitrato sobre bacterias sulfato-reductoras asociadas a procesos de corrosión en sistemas industriales. *Revista argentina de microbiología*, 40(1), 52-62.
- UPV. (s.f.). *Unidad 12. Fundamentos de corrosión y protección*. Recuperado el 13 de 07 de 2018, de Cursos de fundamentos de ciencias de los materiales Universitat Politècnica de València: https://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm12/fcm12_2.html
- Usher, K. M., Kaksonen, A. H., Bouquet, D., Cheng, K. Y., Geste, Y., Chapman, P. G., & Johnston, C. D. (2015). The role of bacterial communities and carbon dioxide on the corrosion of steel. *Corrosion Science*, 98, 354-365.
- Usher, K. M., Kaksonen, A. H., Cole, I., & Marney, D. (2014). Critical review: microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 84-106.
- Vázquez Gutiérrez, J. L. (2007). Empleo de la técnica de espectroscopía de impedancias electroquímicas para la caracterización de biomateriales. Aplicación a una aleación biomédica de Co-Cr-Mo. *TFM Universidad Politécnica de Valencia*.

- Villamizar, W. (2018, Noviembre 15). Comunicación verbal. (F. Porras, & M. Castellanos, Interviewers)
- Wang, W., Wang, J., Wu, J., Xu, H., & Li, X. (2004). Influence of biofilms growth on corrosion potential of metals immersed in seawater. *Materials Corrosion–Werkstoffe Korrosion*, 55, 30-35.
- Weimer, P. J., Van Kavelaar, M. J., Michel, C. B., & NG, T. K. (1988). Effect of phosphate on the corrosion of carbon steel and on the composition of corrosion products in two-stage continuous cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and environmental microbiology*, 386-396.
- Wolicka, D. (2010). Sulphate-reducing bacteria in biological treatment wastewaters. Nova Science Publishers. Obtenido de <http://ebookcentral.proquest.com>
- Xu, D., & Gu, T. (2011). Bioenergetics explains when and why more severe MIC pitting by SRB can occur. *Corrosion 2011*.
- Zhai, X., Li, K., Guan, F., Sun, C., Duan, J., & Hou, B. (2017). Corrosion behavior of the chitosan/zinc composite films in sulfate-reducing bacteria. *Surface & Coatings Technology*. doi:10.1016/j.surfcoat.2018.03.032
- Zview Solartron 3.2b. (n.d.). *Equivalent circuits.Circuit Elements.Zview2 Help*.

Apéndices

Apéndice A Tipos de MIC y mecanismos de corrosión que describen el comportamiento de las SRB

Tipos de MIC:

La corrosión puede tener una influencia directa (E-MIC) o indirecta (M-MIC) por parte de los microorganismos. E-MIC se define como MIC por transferencia extracelular de electrones. Ocurre M-MIC cuando la corrosión es causada por metabolitos secretados, como sulfuros HS^- (ver Figura 10) o iones succinato, que permiten que se formen ácidos en el medio o que vienen directamente de bacterias ácido-productoras (APB por sus siglas en inglés Acid Producing Bacteria). Lo anterior, quiere decir que no hay una biocatálisis por parte de los microorganismos, pues la reducción del oxidante (metabolito) ocurre extracelularmente (Li, et al., 2018; Guan F. , Zhai, Duan, Zhang, & Hou, 2016).

E-MIC se caracteriza por una transferencia extracelular de electrones (EET por sus siglas en inglés Extracellular Electrons Transfer), al interior de la biopelícula. Esta transferencia de electrones puede ser por mediadores redox (MET por sus siglas en inglés Mediated Electron Transfer) (ver figura 10) que funcionan como vehículos que se reducen en la superficie del metal y llevan electrones hacia los microorganismos donde son oxidados. De acuerdo a lo anterior, y si se encuentran solubles en el medio, estas moléculas pueden ser fenazinas, quinonas, óxidos de hierro, hidrógeno molecular [H_2] (Eaktasang, et al., 2016), flavín adenín dinucleótido con riboflavina (vitamina B12) en SRB. Un ejemplo muy particular, son las enzimas hidrogenasas que mediante los anteriores agentes oxidantes catalizan la oxidación reversible de hidrógeno molecular [H_2]

permitiendo la reducción de especies aceptoras de electrones [SO_4^{2-}] y el uso de iones hidronio [H^+] en su metabolismo (Hidrogenasa, 2018; Guan F. , Zhai, Duan, Zhang, & Hou, 2016).

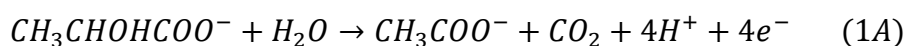
Dentro de E-MIC también ocurre una transferencia de electrones por contacto directo (DET por sus siglas en inglés Direct Electron Transfer), cuando los electrodos se encuentran polarizados (ver Figura 10). Este puede darse por medio de estructuras a base de proteínas en el interior o exterior de la membrana celular como redes de citocromo c para recibir y liberar electrones y almacenar energía en forma de ATP por sus siglas en inglés Adenosine Triphosphate. (Guan F. , Zhai, Duan, Zhang, & Hou, 2016; Li, et al., 2018). Además, el DET puede darse por medio de filamentos conductores a nano escala (Usher, Kaksonen, Cole, & Marney, 2014; Li, et al., 2018), que permiten sustraer electrones del metal o productos de corrosión conductores como la magnetita [$Fe_3 O_4$], mackinawita [$Fe, Ni_{1+x}S$ donde $x = 0$ to 0.11], pirita [FeS_2] y greigita [$Fe_3 S_4$], estos tres son característicos de MIC por SRB en aguas marinas (Pineau, et al., 2008).

Por último, en los tipos de MIC, también polímeros orgánicos como biopolímeros, polímeros recalcitrantes y polímeros naturales modificados químicamente pueden ser degradados por microorganismos como hongos, mediante la secreción de enzimas en un ambiente cálido y húmedo para poder convertir moléculas grandes en unas más pequeñas y fáciles de utilizar (Li, et al., 2018; Gu J.-D. , 2003).

Mecanismos de corrosión microbiológicamente influenciada:

Para proveer energía para su metabolismo, los microorganismos necesitan de un donador y un receptor de electrones. Los hidrocarburos son una excelente fuente de energía y carbono a la vez,

desde alcanos, alquenos de cadenas cortas y largas, incluyendo ácidos grasos como acetato, piruvato, lactato y metanol (Li, et al., 2018) hasta aromáticos (Enning D. R., 2012). La ruta por medio de la cual se lleva a cabo, difiere según el hidrocarburo. En este ejemplo, se utiliza el lactato una fuente de carbono común entre experimentos de laboratorio y es más energético que el formato o el acetato, como se puede confirmar por su mayor potencial redox E^0 , -la notación $-E^0$ indica que la reacción es de oxidación- de acuerdo con Dake Xu y Tingyue Gu (2011).



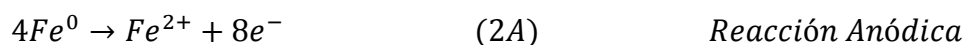
Reacción de Oxidación

$$-E^0 = 430mV$$

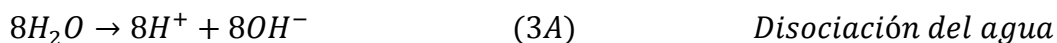
Cuando en el medio escasean las fuentes de carbono y por lo tanto de electrones, se han propuesto dos teorías para entender como las SRB que consumen hidrógeno, satisfacen dicha necesidad y los obtienen de metales como el hierro. Estas son, la Teoría de Despolarización Catódica (CDT) y la de Reducción Biocatalítica del Sulfato Catódico (BCSR).

- **Teoría de Despolarización Catódica (CDT)**

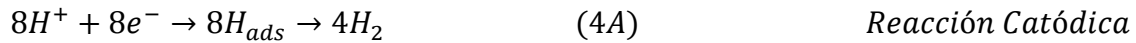
La primera fue propuesta por Von Wolzogen Kuhr y van der Vlugt (Enning, et al., 2012). El hierro se oxida perdiendo electrones, mediante la siguiente reacción, (ver Ecuaciones 2A, 3A, 4A):



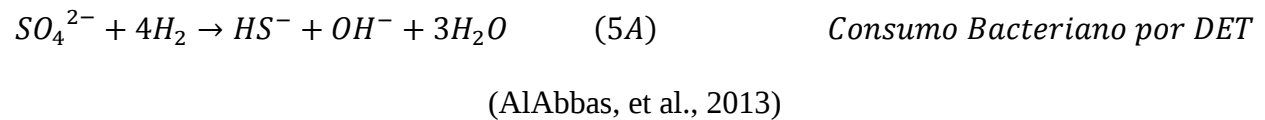
$$-E^0 = 447 mV$$



El acero se encuentra ahora polarizado, lo que causa la adherencia de estos protones (iones hidronio) y una posterior formación de una capa de hidrógeno en la superficie del metal.



Así, las SRB por medio de enzimas hidrogenasas consumen el hidrógeno como fuente de electrones para la reducción del sulfato y el metal queda despolarizado (Sheng, Ting, & Pehkonen, 2007; Enning, et al., 2012)



- **Reducción Biocatalítica del Sulfato Catódico (BCSR)**

Esta teoría fue propuesta por Gu, T., K. Zhao, and S. Nesic. 2009 (Gu, Xu, Zhang, Li, & Lindenberger, 2014), quienes afirman que las SRB para la reducción del sulfato utilizan protones del medio en vez de hidrógeno molecular (ver Ecuación 5A) y obtienen los electrones de la oxidación del hierro mediante una transferencia extracelular de electrones -DET, MET-. Para poder explicar MIC por SRB en el acero se basa en la bioenergética de las reacciones.



$$E^0 = -217\text{mV}$$

Esta reacción, es una reducción biocatalítica de sulfato, ya que toma lugar por la acción de múltiples enzimas en el citoplasma celular de las SRB, que actúa como una especie de biocátodo. Sin embargo, de acuerdo a la teoría bioenergética para MIC de los investigadores Dake Xu y

Tingyue Gu (2011), biopelículas formadas por BSR causarían mayores daños por medio de BCSR, que por CDT en condiciones limitantes de fuentes de carbono para su alimentación. Adicionalmente, en investigaciones adelantadas por Little, B., Wagner, P., y Mansfeld, F. (1992) y Mori, K., Tsurumaru, H., & Harayama, S. (2010) se ha encontrado que la CDT no sería el mecanismo de MIC dominante.

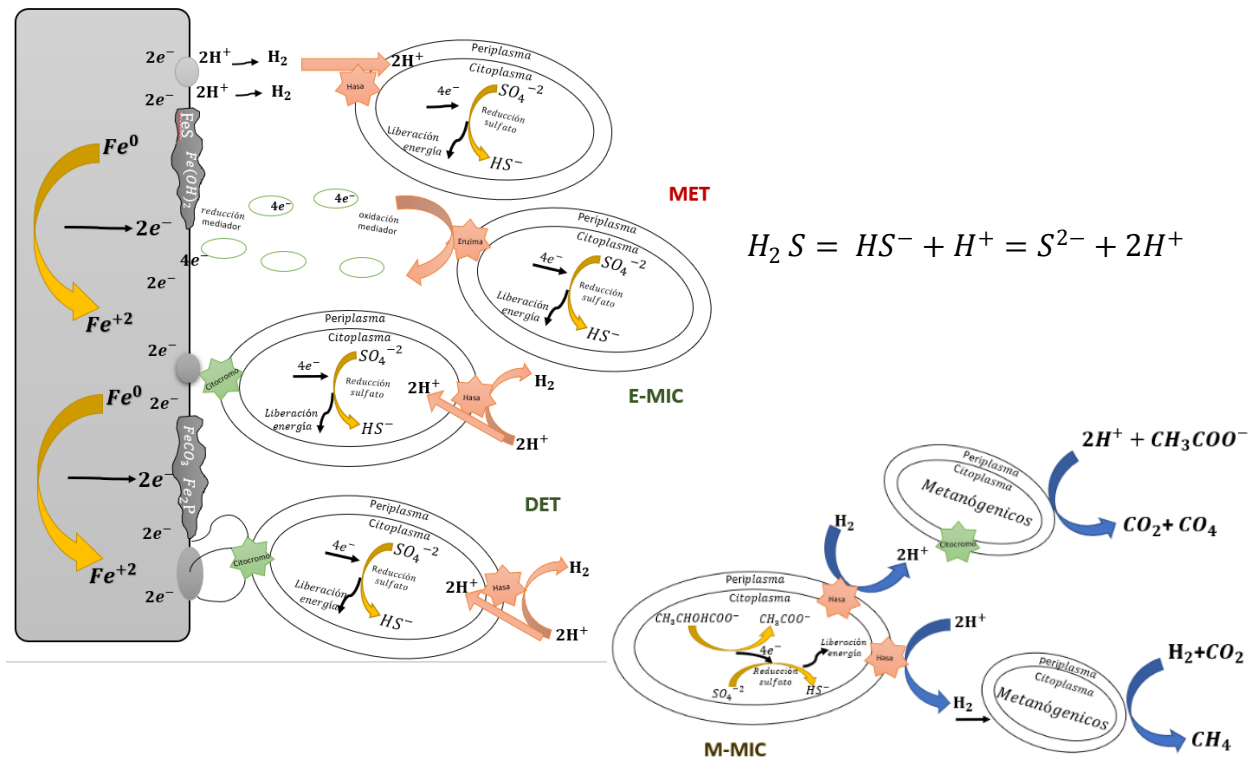
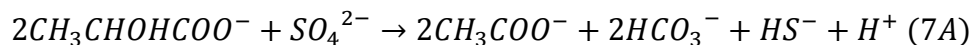


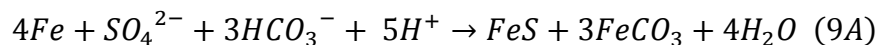
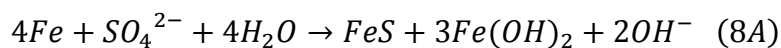
Figura 10 Transferencia de electrones en SRB Adaptada de (Li, et al., 2018; Dall'Agnol & Moura, 2014; Enning D. R., 2012)

Mientras las SRB tengan una fuente de carbono como el lactato, para la reducción del sulfato en su citoplasma, van a tener lugar las reacciones de las Ecuaciones 1A y 6A, para dar lugar la reacción global (ver Ecuación 7A).



Se necesitan 2 moléculas de lactato para cumplir con la demanda de electrones de la reducción del sulfato a sulfuro (ver Ecuación 6A) (Enning D. R., 2012).

De manera global, cuando las SRB cambian de crecimiento organotrófico a litotrófico, por cualquiera de las dos teorías, ya sea CDT (Ecuación 5A) o BCSR (Ecuación 6A), en conjunto con la disolución del hierro (Ecuación 2A), dan lugar a reacciones globales de MIC por SRB:



La precipitación del hierro en ambientes anóxicos puede ser en forma de Fe^{+2} que presenta estabilidad y aún más a $pH < 7$, $3Fe(OH)_2$ a $pH \geq 7$ y $FeCO_3$ en presencia de carbonato o acetato productos del consumo de lactato (Enning D. R., 2012)

Apéndice B Medio de cultivo Starkey modificado

MEDIO DE CULTIVO		STARKEY MODIFICADO
COMPUESTO		CANTIDAD
K₂HPO₄	Fosfato dipotásico	0,56 g
NH₄Cl	Cloruro de amonio	1,10 g
CaCl₂*2H₂O	Cloruro de calcio	0,12 g
Na₂SO₄	Sulfato de sodio	0,56 g
MgSO₄*7H₂O	Sulfato de magnesio	2,20 g
NaCl	Cloruro de Sodio	14,03 g
•	Extracto de levadura	0,50 g
NaC₃H₅O₃	Lactato de sodio	3,8 mL
•	Agua desionizada	1000 mL

Apéndice C Montaje experimental

- **Electrodos de acero N-80:** Electrodos de acero N-80 de 2x2cm pulidos con papel de carburo de silicio desde grano 240 hasta grano 600 y encapsulados en baquelita no conductora, dejando únicamente una cara expuesta (4cm²) para la aplicación de las pruebas electroquímicas.



Figura 11 Electrodos de acero N-80

- **Montaje celda electroquímica:** Las celdas electroquímicas constaban de dos electrodos de trabajo, uno para ser perturbado con las pruebas electroquímicas y otro para observar los cambios en SEM-EDS. Para integrar los electrodos de trabajo a la celda electroquímica, la baquelita y la muestra metálica fueron horadadas para unir el porta-electrodos con un extremo de la muestra metálica y así favorecer la conexión eléctrica.

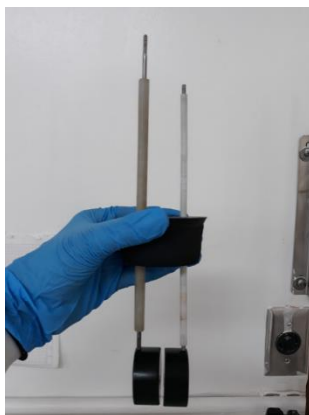


Figura 12 Unión electrodos de trabajo en celda electroquímica

La celda electroquímica utilizada durante el ensayo biótico, contaba con una llave para facilitar la toma de muestra de medio Starkey empleado para la cuantificación de sulfuros.



Figura 13 Celda electroquímica con llave acoplada, para ensayo biótico



Figura 14 Celdas electroquímicas para ensayo abiótico y biótico

Apéndice D Parámetros, cálculos y consideraciones especiales de las técnicas electroquímicas

- **Potencial de Circuito abierto (OCP)**

Como la superficie del electrodo de trabajo es equipotencial, las áreas anódicas y catódicas del sistema se polarizan entre sí, alcanzando un único valor potencial eléctrico (Calderón, Rossa Mattos, & Esteves Barcia, 2006). El electrodo de referencia era estable, para que las variaciones en la medición del OCP, corresponden únicamente a cambios en la interfaz electrodo-solución (Rey Ruíz, 2014).

Potencial de circuito abierto	
Total Time (s)	30
Sample Period (s)	1
Stability (mv/s)	0
Sample Area (cm2)	4

- **Espectroscopia de Impedancia Electroquímica**

Para corriente directa (DC) donde la frecuencia es 0 Hz, si se conoce el potencial aplicado y se mide la corriente resultante se puede calcular la resistencia del sistema por medio de la ley de Ohm (ver Ecuación 1D) (Princeton Applied Research, s.f.). Pero cuando la corriente es función de la frecuencia ($f \neq 0$ Hz) se habla de una ecuación análoga (ver Ecuación 2D).

$$\frac{V \text{ (mV)}}{I \text{ (}\mu\text{A)}} = R \text{ (Ohm)} \text{ Ley de Ohm } (1D) \quad \frac{E \text{ (mV)}}{I \text{ (}\mu\text{A)}} = Z \text{ (Ohm)} (2D)$$

La impedancia se simboliza con la letra Z y se expresa en Ohm, que es el equivalente de la resistencia en corriente alterna (AC). Z, al igual que I y E puede expresarse como un número imaginario (ver ecuación 3D). Además, debido a que en AC no solo los resistores pueden impedir

el paso de la corriente sino también los inductores y capacitores, la parte real corresponde al aporte de los primeros y la imaginaria a la contribución de los dos últimos (Princeton Applied Research, s.f.)

$$Z_{Total} = Z' + Z'' * i ; i = \sqrt{-1} \quad (3D)$$

- *Diagrama de Nyquist*

Su representación más simple es la Figura 11, donde se muestra un semicírculo, resultado de graficar la variación de Z' vs Z'' en un plano de números complejos. Dicho cambio en las impedancias ocurre en función de la frecuencia que va desde su límite más alto en la izquierda al más bajo en la derecha de manera implícita (Princeton Applied Research, s.f.). Por otro lado, es fácil de determinar la resistencia del electrolito R_Ω , debido a que es el intercepto que está más a la izquierda entre el círculo y el eje X, mientras que el siguiente intercepto representa la adición de R_p a la resistencia total ($R_s + R_p$) (ASTM G International, 2010)

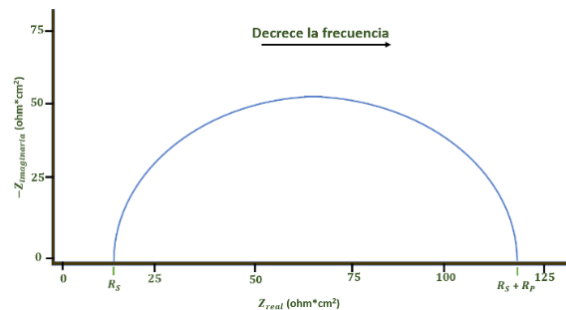


Figura 15 Gráfica de Nyquist

Adaptada de ASTM G3-89 (2010)

- *Diagrama de Bode*

Según la norma ASTM G3-89, este tipo de gráfica se divide en dos presentaciones que muestran la variación de $|Z|$ y de θ_{fase} en el circuito. Para observar la variación de la

magnitud de la impedancia en función de la frecuencia, se grafican ambos ejes en escala logarítmica como lo muestra la Figura 13. (ASTM G International, 2010). Además, al igual que por Nyquist se obtiene el valor de R_Ω y $R_\Omega + R_p$ que son el resultado de leer en el eje de las ordenadas el valor que se alcanza en el límite alto y el bajo de frecuencias respectivamente.

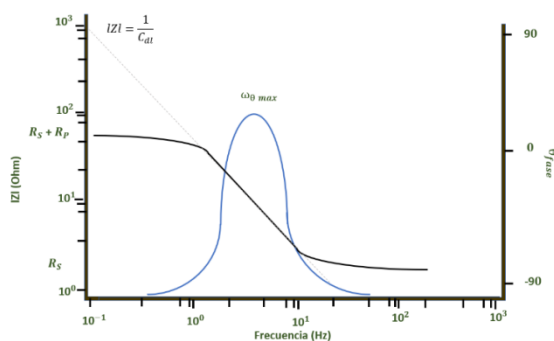


Figura 16 Gráfica de Bode

Adaptada de ASTM G3-89 (2010)

Espectroscopia de impedancia electroquímica

DC Voltage (mV)	0
Initial Freq (Hz)	100000
Final Freq (Hz)	0,01
Points/Decade	10
AC Voltage (mV)	5
Sample Area (cm ²)	4
Estimated Z (ohms)	500

La Figura 13, es un ejemplo de cómo cambia el ángulo de fase en función de la frecuencia. Debido a que el circuito puede comportarse con naturaleza resistiva, capacitiva o inductiva, con

un θ_{fase} que se acerca a 0, -90 o +90 respectivamente (ASTM International, 2010; Princeton Applied Research, s.f.).

- **Resistencia a la polarización:**

Para llevar a cabo esta prueba, se aplica un barrido de potencial en un rango de ± 10 a ± 25 mV con respecto al potencial de corrosión o E_{corr} hallado por OCP (Princeton Applied Research, s.f.).

Generalmente a una velocidad de 10 mV/min o 0,166 mV/s (ASTM G International, 2009).

Dicho potencial y la corriente generada se grafican en el eje de las ordenadas y de las abscisas respectivamente (ver Figura 13). Se evidencia un comportamiento lineal y la pendiente registrada corresponde a R_{total} . A la cuál se le debe restar la resistencia de la solución R_S (obtenida de la técnica EIS) (Gamry Instruments, s.f.), para poder obtener R_p (ver Ecuaciones 4D y 5D), que es el valor de la resistencia que ofrece el espécimen a corroerse (Princeton Applied Research, s.f.).

Sus unidades son ohm según la ley de Ohm (ver Ecuación 1D)

$$\frac{\Delta E}{\Delta i} = R_{total} = R_S + R_p \quad (4D)$$

$$\frac{\Delta E}{\Delta i} = R_p = \frac{\beta_a \beta_c}{2.3 \cdot i_{corr} (\beta_a + \beta_c)} \quad (5D)$$

Ecuación de Stern & Geary (Princeton Applied Research, s.f.)

Donde β_a = Pendiente anódica de Tafel $[\frac{V}{d\acute{e}cada}]$ y β_c = Pendiente catódica de Tafel $[\frac{V}{d\acute{e}cada}]$.

Ambas pueden ser determinadas experimentalmente en una gráfica de Tafel, o usar los valores teóricos para cada material. i_{corr} = valor de la corriente de corrosión [μA] y 2,303=Log natural de

10.

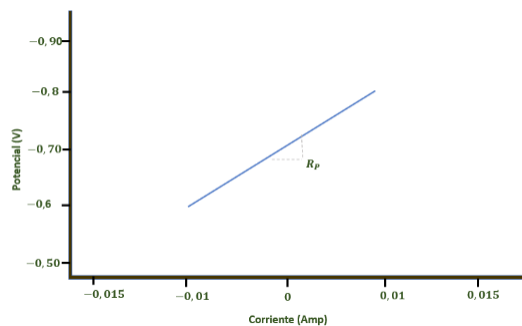


Figura 17 Gráfica de R_p

Adaptada de (Princeton Applied Research, s.f.)

Ahora con el valor de R_p del sistema se despeja i_{corr} para poder calcular la tasa de corrosión (T_{corr}) del espécimen, de acuerdo a la ecuación de Faraday (ver Ecuación 6D):

$$T_{corr}(mpy) = \frac{I_{corr}(E.W.) * K}{\rho} \quad (6D) \quad (\text{ASTM, G International, 2015})$$

Donde $K = 0.1288 \left[\frac{\text{mpy g}}{\mu\text{A cm}} \right]$, E.W= peso equivalente de la especie que se corroe [g], ρ = densidad

de la especie que se corroe $\left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]$ e $I_{corr} = \frac{V_{corr}}{\text{área}} = \text{densidad de corriente de corrosión} \left[\frac{\mu\text{A}}{\text{cm}^2} \right]$.

Resistencia a la polarización	
Initial E (v)	-0,01
Final E (v)	0,01
Scan rate (mv/s)	0,2
Sample Period (s)	1
Sample Area (cm2)	4
Density (g/cm3)	7,86
Equiv WE	27,92
Beta An (v/Dec)	0,12
Beta Cat (v/Dec)	0,12
Equiv Time	0

Apéndice E Método yodométrico

1. Reactivos

- a.** Ácido clorhídrico, HCl 6N: medir 495 ml de HCl al 37%, adicionarlos en agua desionizada y diluir a 1L.
- b.** Solución estándar de yodo, 0.0250 N: Disolver 25 g de yoduro de potasio (KI) en un poco de agua y agregar 3.2 g de yodo. Después de que el yodo se haya disuelto, aforar a 1L y estandarizar contra tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.0250 N, usando solución de almidón como indicador.
- c.** Solución estándar de tiosulfato de sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.0250 N: Pesar 6.205g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en agua destilada. Agregar 1.5 ml de NaOH, 6N y completar volumen a 1L.
- d.** Solución de almidón: pesar 2g de almidón soluble y 0.2g de ácido salicílico, disolverlos en 100ml de agua destilada a 60°C.

2. Procedimiento

- 1. En un Erlenmeyer, adicionar 5ml de solución de yodo 0.0250N.
- 2. Agregar 20 ml agua destilada para llevar el volumen a aproximadamente 25 ml.
- 3. Adicionar 2 ml de HCl 6N.
- 4. Pipetear 10 ml de muestra en el matraz y descargarla debajo de la superficie de la solución. Si el color del yodo desaparece, agregar porciones de 5ml de yodo hasta que el color permanezca, indicando un exceso y registrando el volumen adicional de yodo.
- 5. Titular por retroceso con solución de tiosulfato de sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.0250N, adicionar pequeñas cantidades hasta alcanzar un color amarillo claro.
- 6. Añadir 3 gotas de solución de almidón, y continuar con la titulación hasta que pase de color azul a incoloro.
- 7. Realizar el cálculo de la concentración de mg S^{-2} en la muestra a partir de la ecuación 1E:

$$\frac{\text{mg S}^{-2}}{\text{L}} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16000}{\text{mL sample}} \quad (1E)$$

Donde,

A = ml solución de yodo

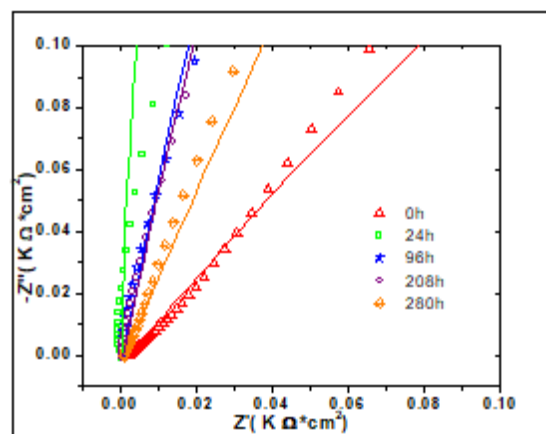
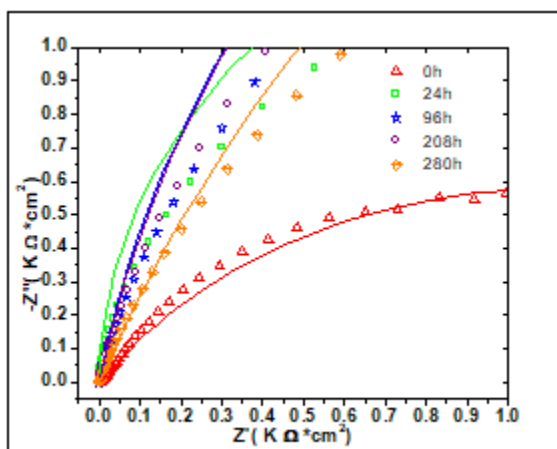
B = normalidad de la solución de yodo

C = ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

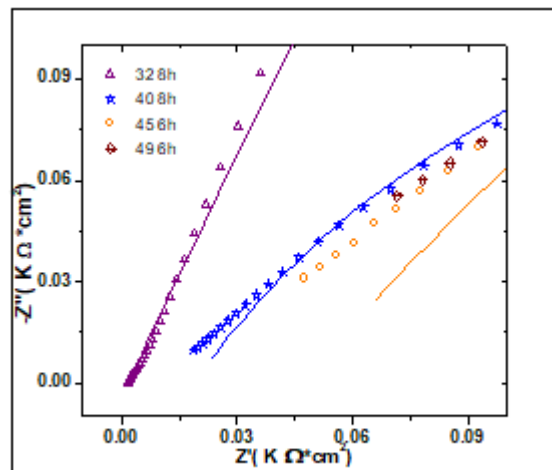
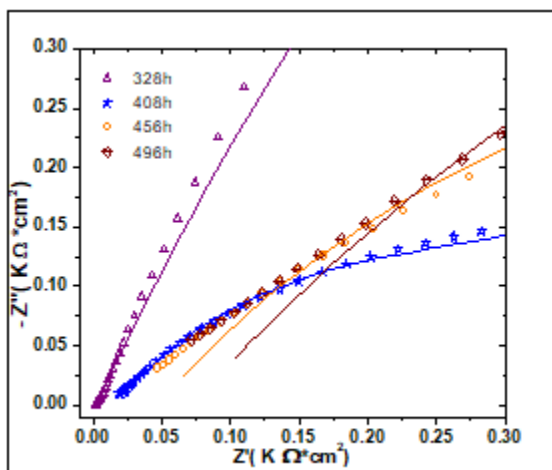
D = normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Apéndice F Zoom origen Nyquist ensayo abiótico y biótico

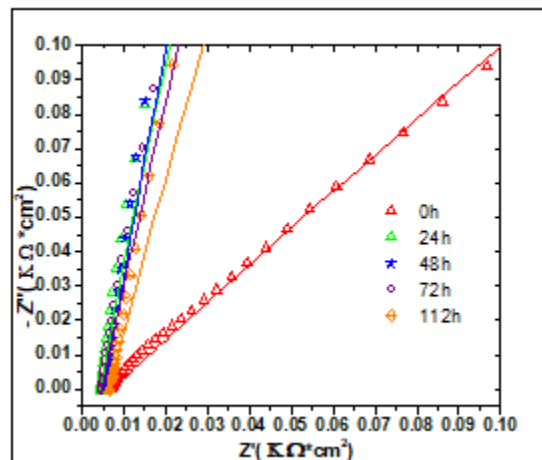
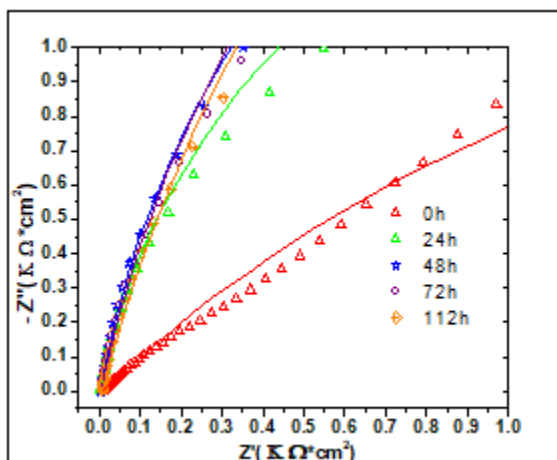
- Sistema Abiótico: Nyquist 0-328horas



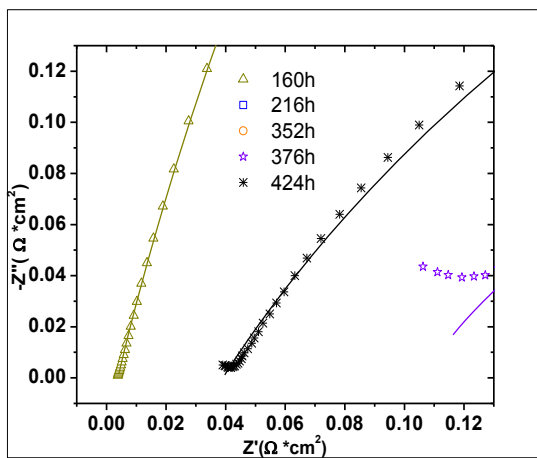
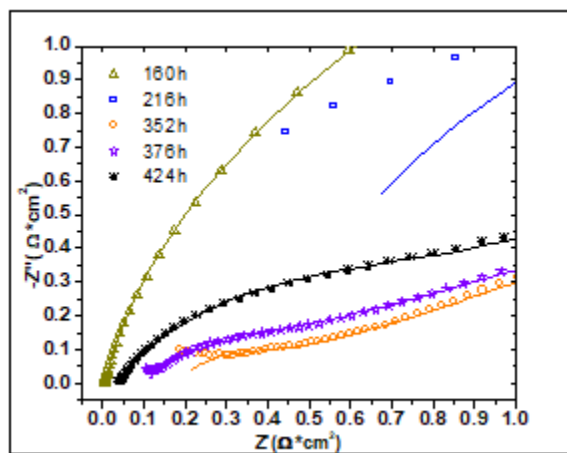
- Sistema Abiótico: Nyquist 328-496horas



- Sistema Biótico: Nyquist 0-112horas

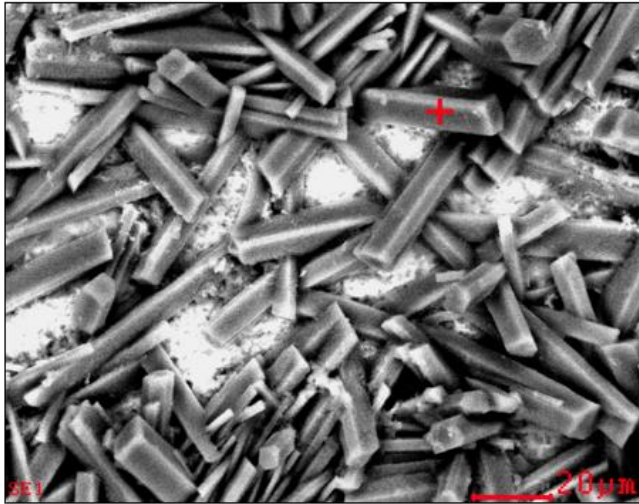


- Sistema Biótico: Nyquist 160-424horas

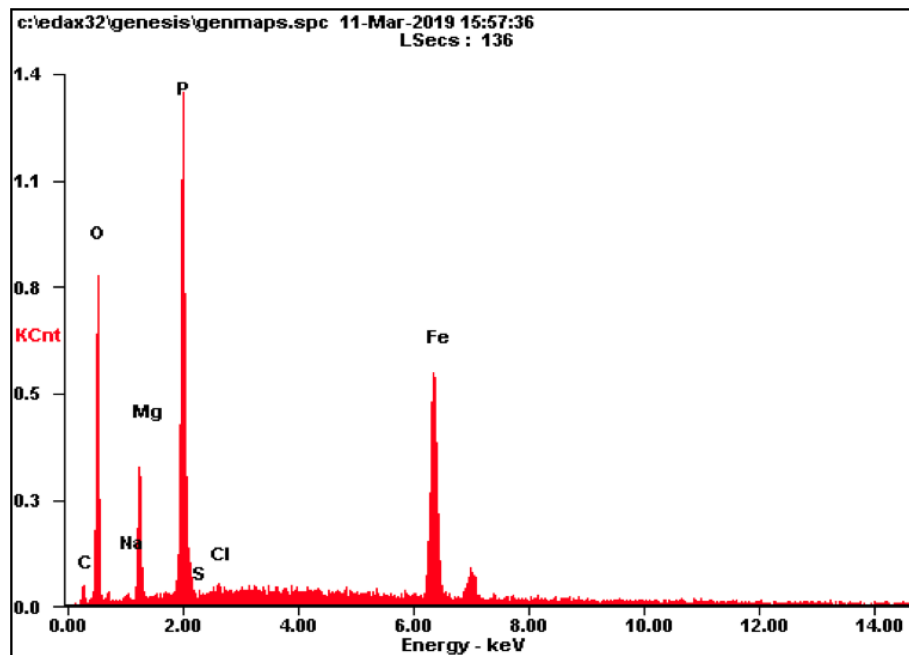


Apéndice G Resultados SEM-EDS para ensayo biótico y abiótico

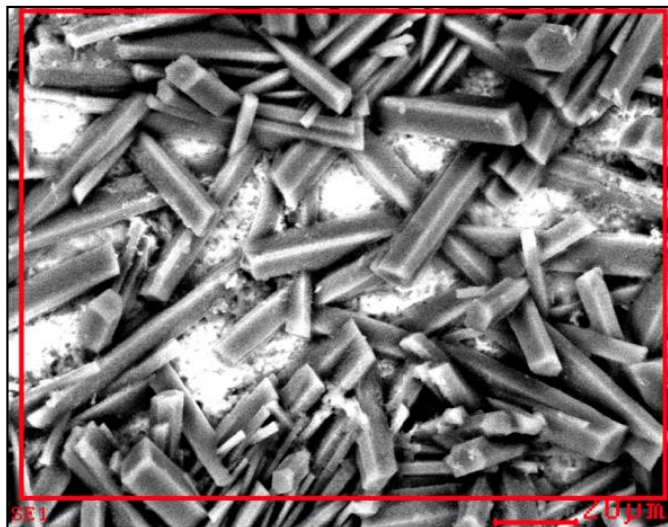
- Sistema Abiótico: Zona puntual.



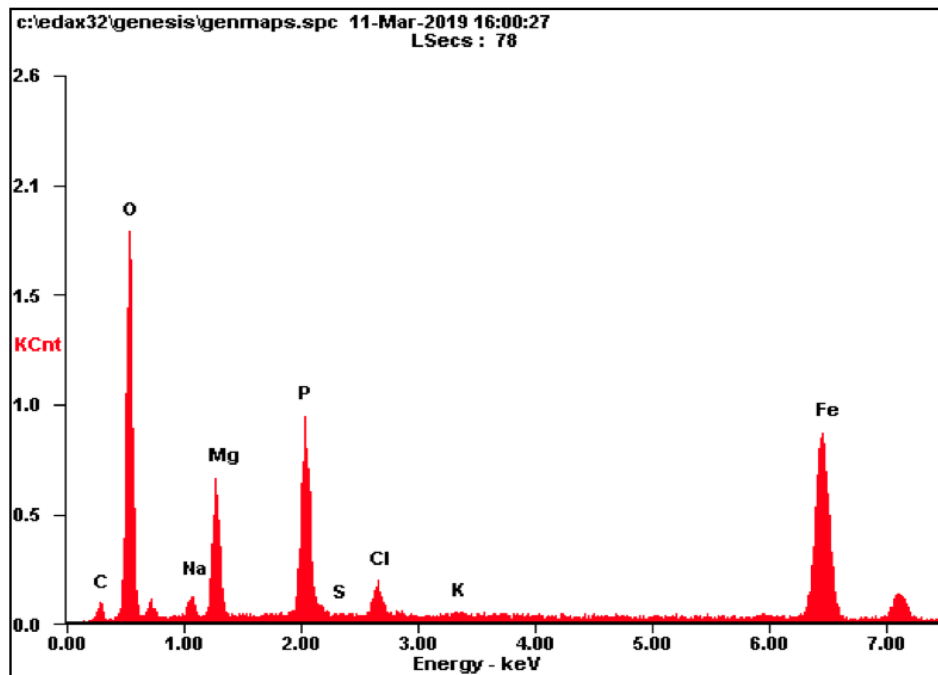
<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>CK</i>	05.63	11.36
<i>OK</i>	31.03	46.96
<i>NaK</i>	00.70	00.74
<i>MgK</i>	10.37	10.33
<i>PK</i>	22.31	17.44
<i>SK</i>	00.13	00.10
<i>ClK</i>	00.57	00.39
<i>FeK</i>	29.26	12.69
<i>Matrix</i>	Correction	ZAF



- Sistema Abiótico: Zona general.



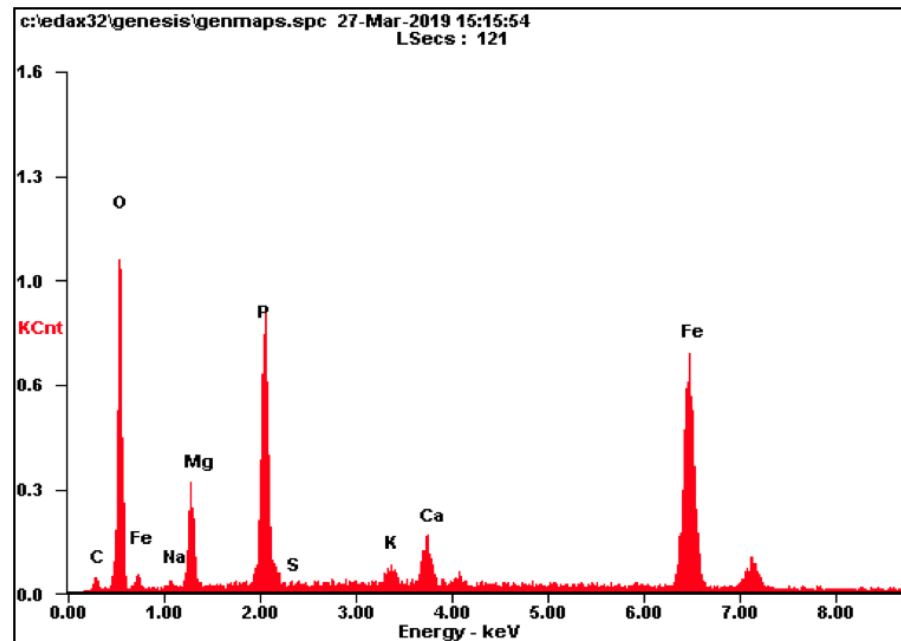
<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>CK</i>	05.88	11.11
<i>OK</i>	38.39	54.42
<i>NaK</i>	02.88	02.84
<i>MgK</i>	11.38	10.61
<i>PK</i>	11.15	08.17
<i>SK</i>	00.13	00.09
<i>ClK</i>	01.85	01.18
<i>KK</i>	00.36	00.21
<i>FeK</i>	27.98	11.37
<i>Matrix</i>	Correction	ZAF



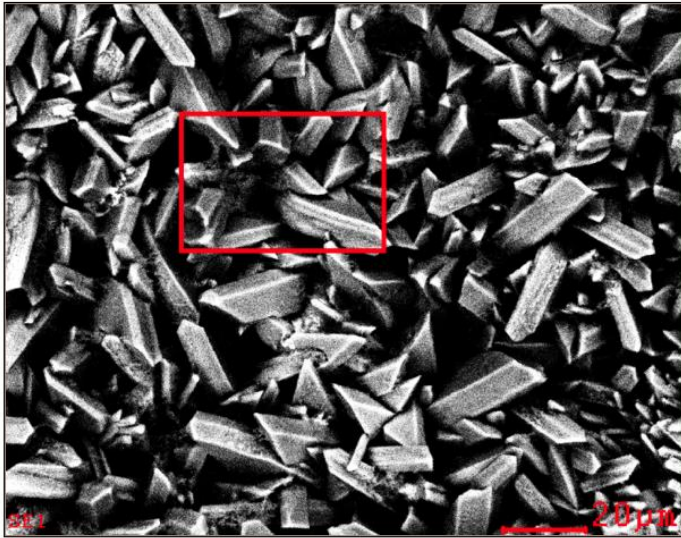
- Sistema Biótico: Zona Rugosa



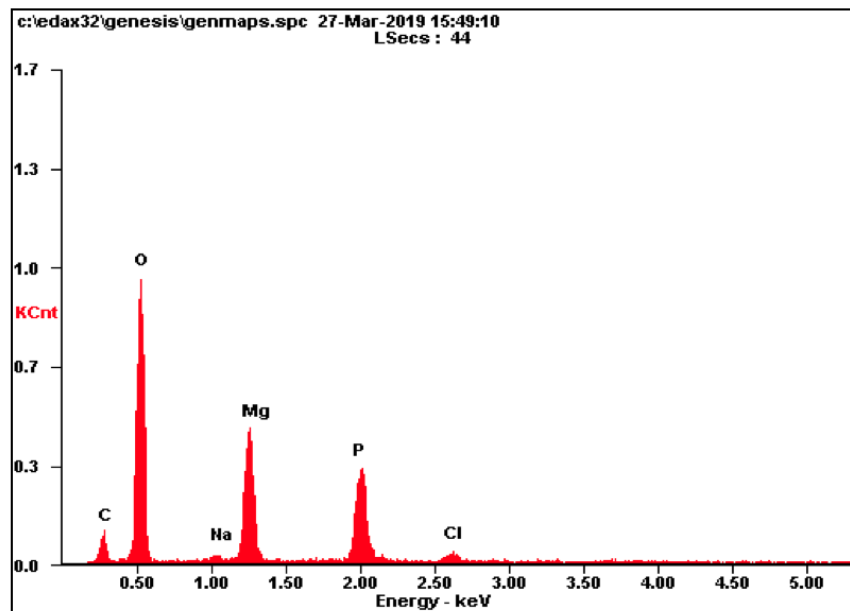
<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>CK</i>	01.78	05.06
<i>OK</i>	15.50	33.05
<i>NaK</i>	00.50	00.75
<i>MgK</i>	04.88	06.85
<i>PK</i>	11.93	13.14
<i>SK</i>	00.09	00.10
<i>KK</i>	01.24	01.08
<i>CaK</i>	03.58	03.04
<i>FeK</i>	60.49	36.94
<i>Matrix</i>	Correction	ZAF



- Sistema Biótico: Zona Cristales



<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>CK</i>	14.59	21.45
<i>OK</i>	51.10	56.42
<i>NaK</i>	00.92	00.70
<i>MgK</i>	16.10	11.70
<i>PK</i>	15.44	08.80
<i>ClK</i>	01.85	00.92
<i>Matrix</i>	Correction	ZAF



- Zoom figura 11D, obtención electrones por nanofilamentos

