

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA  
DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO (BPA) ALOJADAS EN  
AGUAS DE PRODUCCIÓN DE UN CAMPO PETROLERO**

**LAURA MARCELA GÓMEZ CASTELLANOS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGIA  
BUCARAMANGA  
2009**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA  
DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO (BPA) ALOJADAS EN  
AGUAS DE PRODUCCIÓN DE UN CAMPO PETROLERO**

**LAURA MARCELA GÓMEZ CASTELLANOS**

**Proyecto de Grado para optar el título de Bióloga**

**Director  
Jorge Hernández Torres, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGIA  
BUCARAMANGA  
2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jorge Hernández Torres por su confianza, su ayuda y por permitirme ser parte de este proyecto.

Al CINBIN, por acogerme y brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A la CIC, por abrirme las puertas y por facilitarme los elementos necesarios para la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo y al Laboratorio de Microbiología y Toxicología ambiental de la UIS por su apoyo y colaboración para la realización del proyecto.

A Lina Marcela por su colaboración

A Nedy, Cristina, Carolina y Mavy por su colaboración durante este trabajo.

A mi Mamá por brindarme todo su amor y su apoyo incondicional.

A todas aquellas personas que de una manera u otra contribuyeron con este trabajo.

## **CONTENIDO**

|                                                      | <b>Pág.</b> |
|------------------------------------------------------|-------------|
| <b>INTRODUCCION</b>                                  | <b>1</b>    |
| <b>1. MARCO TEORICO</b>                              | <b>3</b>    |
| 1.1 Corrosión influenciada microbiológicamente (CIM) | 3           |
| 1.2 Pérdidas económicas causadas por la Biocorrosión | 4           |
| 1.3 Bacterias productoras de ácido (BPA)             | 5           |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                  | <b>7</b>    |
| 2.1 Objetivo general                                 | 7           |
| 2.2 Objetivos específicos                            | 7           |
| <b>3. METODOLOGÍA</b>                                | <b>8</b>    |
| 3.1 Sitio de muestreo                                | 8           |
| 3.1.1 Toma de muestras                               | 8           |
| 3.2 Aislamiento primario de las BPA                  | 9           |
| 3.3 Caracterización morfológica                      | 10          |
| 3.3.1 Identificación macroscópica                    | 10          |
| 3.3.2 Identificación microscópica                    | 10          |
| 3.4 Caracterización bioquímica                       | 11          |
| 3.5 Preservación bacteriana                          | 14          |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b>                     | <b>15</b>   |
| 4.1 Sitio de muestreo                                | 15          |
| 4.1.1 Toma de muestras                               | 15          |
| 4.2 Aislamiento primario                             | 16          |
| 4.3 Caracterización morfológica                      | 16          |
| 4.3.1 Identificación macroscópica                    | 16          |
| 4.3.2 Identificación microscópica                    | 20          |
| 4.4 Caracterización bioquímica                       | 22          |
| 4.5 Clasificación de las BPA aisladas                | 32          |

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>4.6 Preservación bacteriana</b> | <b>35</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>                | <b>37</b> |
| <b>RECOMENDACIONES</b>             | <b>38</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>                | <b>39</b> |
| <b>ANEXOS</b>                      | <b>44</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                | <b>Pág.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Fig. 1 Picadura de corrosión causada por la CIM sobre un tubo galvanizado (flecha roja)</b> | <b>4</b>    |
| <b>Fig. 2 Descripción morfológica de la cepa 233A</b>                                          | <b>17</b>   |
| <b>Fig. 3 Descripción morfológica de la cepa 234A</b>                                          | <b>17</b>   |
| <b>Fig. 4 Descripción morfológica de la cepa 236A</b>                                          | <b>17</b>   |
| <b>Fig. 5 Descripción morfológica de la cepa 236B</b>                                          | <b>18</b>   |
| <b>Fig. 6 Descripción morfológica de la cepa 237B</b>                                          | <b>18</b>   |
| <b>Fig. 7 Descripción morfológica de la cepa 239A</b>                                          | <b>18</b>   |
| <b>Fig. 8 Descripción morfológica de la cepa 239B</b>                                          | <b>19</b>   |
| <b>Fig. 9 Descripción morfológica de la cepa 241A</b>                                          | <b>19</b>   |
| <b>Fig. 10 Descripción morfológica de la cepa 241B</b>                                         | <b>19</b>   |
| <b>Fig. 11 a) Cepa 233A b) Cepa 234A c) Cepa 236A</b>                                          | <b>21</b>   |
| <b>Fig. 12 a) Cepa 236B b) Cepa 237B c) Cepa 239A</b>                                          | <b>22</b>   |
| <b>Fig. 13 a) Cepa 239B. b) Cepa 241A c) Cepa 241B</b>                                         | <b>22</b>   |

## **LISTA DE TABLAS**

|                                                                                | <b>Pág.</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Tabla 1. Valores de temperatura y pH de las muestras colectadas</b>         | <b>15</b>   |
| <b>Tabla 2. Características microscópicas de las cepas aisladas</b>            | <b>20</b>   |
| <b>Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas</b>            | <b>25</b>   |
| <b>Tabla 4. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas</b>            | <b>27</b>   |
| <b>Tabla 5. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas</b>            | <b>29</b>   |
| <b>Tabla 6. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas</b>            | <b>32</b>   |
| <b>Tabla 7. Clasificación de las BPA aisladas</b>                              | <b>33</b>   |
| <b>Tabla 8. Características morfológicas y bioquímicas de las BPA aisladas</b> | <b>36</b>   |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**(CIM): Corrosión influenciada microbiológicamente**

**(BSR): Bacterias sulfato reductoras**

**(BPA): Bacterias productoras de ácido**

**(DRF): Dextrosa rojo de fenol**

**(LB): Medio Luria bertani**

**(RM-VP): Rojo de metilo - Voges Proskauer**

## **LISTA DE ANEXOS**

|                                                                                                                                            | <b>Pág.</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ANEXO 1. Medio líquido DRF (Dextrosa rojo de fenol) para Bacterias Productoras de Ácido (Según la norma NACE Standard TM0194, 2004)</b> | <b>45</b>   |

## RESUMEN

**TITULO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO (BPA) ALOJADAS EN AGUAS DE PRODUCCIÓN DE UN CAMPO PETROLERO\***

**AUTOR: GÓMEZ CASTELLANOS, LAURA MARCELA\*\***

**PALABRAS CLAVES:** Bacterias productoras de ácido, Biocorrosión, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* y *Erwinia* sp.

### DESCRIPCIÓN:

La identificación fisiológica como grupo de las Bacterias Productoras de Ácido (BPA) aún no está bien definida. A partir de muestras provenientes del campo petrolero la Cira-Infantas, se realizó el aislamiento en medio DRF y la caracterización morfológica de 9 cepas productoras de ácido. Para la caracterización bioquímica de las BPA se realizaron pruebas microbiológicas como rojo de metilo, actividad catalasa y oxidasa, crecimiento en KCN, motilidad, descarboxilación de ornitina y reducción de nitratos. Las 9 cepas identificadas presentan coloración Gram negativa, morfología bacilar recta y corta. Emplearon el acetato y el citrato como única fuente de carbono, producen gas y ácido a partir de la fermentación de glucosa, sacarosa, sorbitol y manitol. Los géneros *Escherichia* sp. y *Erwinia* sp., no fermentan la lactosa. Se evidenció la producción de sulfuro sólo en el género *Citrobacter* sp. Dentro de los aislados, el género más predominante fue *Enterobacter* sp. Las bacterias identificadas en este estudio fueron de tipo mesófilo, resultado acorde con la temperatura y el pH de las muestras analizadas. Con la realización de este proyecto, se pretendió conocer más acerca de las características morfológicas y metabólicas, que resultan de gran importancia en la producción de ácidos, taponamiento y formación de consorcios de bacterias causantes de Biocorrosión, dentro de las biopelículas alojadas sobre las superficies metálicas.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernández Torres, Ph. D.

## ABSTRACT

**TITULO: ISOLATION AND MORFOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ACID PRODUCING BACTERIA (APB) COMMING FROM OILFIELD WATER.**

**AUTOR: GÓMEZ CASTELLANOS, LAURA MARCELA\*\***

**KEY WORDS:** Acid producing bacteria, Biocorrosion, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* y *Erwinia* sp.

### DESCRIPTION:

Physiological identification, as a group, of acid producing bacteria (APB) is not clearly defined at the moment. Isolation in DRF medium and morphological characterization of 9 acid-producing strains collected from the oil fields of 'La Cira-Infantas' was carried out. Biochemical characterization of APB consists of microbiological tests such as Methyl Red, Catalase and Oxidase Activity, growth in KCN, motility, Ornithine decarboxylation and nitrate reduction. The 9 identified strains present gram-negative stain and straight and short bacillum morphology. Acetate and citrate were the only source of carbon utilized. Gas and acid production results from Glucose, Sucrose, Sorbitol and Mannitol fermentation. *Escherichia* and *Erwinia* genus do not ferment lactose. There was evidence of sulfur production only for the genus *Citrobacter*. Within isolates the more predominant genus was *Enterobacter*. The types of bacterias identified in this study were of the mesophilous type, which were concurred with the temperature and pH of the analyzed samples. The goal of this study was to gather and understand morphological and metabolic characteristics of these bacterias which are of great importance in the production of acids, which cause a blockage and form consorts of bacterias that cause biocorrosion within biofilms located on metallic surfaces.

---

\* Research Project.

\*\* Sciences Faculty, Biology Department, Directed by Jorge Hernández Torres, Ph. D.

## INTRODUCCION

La corrosión influenciada microbiológicamente (CIM) es el resultado de las interacciones entre la superficie del metal, los productos de corrosión abiótica y los microorganismos, acelerando las reacciones parciales en los procesos corrosivos y conduciendo a un daño en el metal (Beech *et al.*, 1999; Beech *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2005). Las bacterias han recibido mayor atención por su influencia en la CIM de metales tales como hierro, cobre, aluminio y sus aleaciones (Beech *et al.*, 2004). Entre ellas se encuentran las bacterias sulfato reductoras (BRS), las bacterias oxidadoras y reductoras de hierro y las bacterias productoras de ácido (BPA) (Beech *et al.*, 1999).

Las BPA comprenden una variedad de bacterias heterotróficas que comparten la habilidad común de producir ácidos orgánicos, cuando se desarrollan bajo condiciones reductoras. Las BPA son bacterias de tipo aerobio o anaerobias facultativas. Los ácidos producidos por estas bacterias, se concentran en la superficie del metal, contribuyendo a la corrosión y generando pérdidas en la producción y calidad de los hidrocarburos (Borenstein, 1994; Beech *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2003; Droycon, 2006). Generalmente, la industria petrolera emplea el medio Dextrosa Rojo de Fenol (DRF) para la identificación de las BPA.

Las BPA pueden proporcionar nutrientes a las BSR, ya que usualmente son encontradas en asociación (Jack, 2002). Las BPA liberan ácidos orgánicos mediante procesos de fermentación microbiana. Estos ácidos, además de actuar como agentes corrosivos, sirven como fuente de carbono para las

BSR y acidifican el pH del ambiente, incrementando el nivel de agresividad de las BSR (Borenstein, 1994; NACE, 2005).

La realización de este estudio amplía la información acerca de las características fisiológicas de las BPA que circulan en los sistemas de conducción de hidrocarburos colombianos y de los posibles miembros que conforman este grupo. Esto con el fin de elaborar estrategias de control microbiano más específicas, que mitiguen su efecto corrosivo.

Este trabajo de grado se enmarca en un proyecto de investigación financiado por el banco de la República, que busca controlar los focos de corrosión con la ayuda de bacteriófagos. La primera etapa consiste en determinar los géneros que contribuyen a la corrosión mediante la producción de ácidos orgánicos.

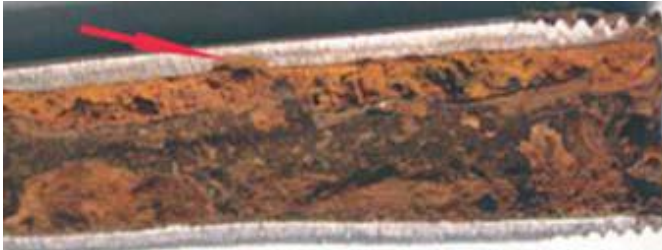
## **1. MARCO TEÓRICO**

La corrosión metálica es un proceso electroquímico en el cual los metales se disuelven, liberando iones metálicos y electrones (reacción anódica). Estos electrones reducen especies químicas presentes en el ambiente (reacción catódica) (Beech *et al.*, 1999; Borgne *et al.*, 2004). En ambientes anoxigénicos, el oxígeno es reemplazado por iones hidrógeno o agua como un reactante catódico (Videla, 1996). La corrosión requiere de 4 entidades: ánodo, cátodo, metal y electrolito.

### **1.1 Corrosión influenciada microbiológicamente (CIM).**

El deterioro causado por la actividad metabólica de los microorganismos sobre los materiales metálicos es denominado corrosión influenciada microbiológicamente (CIM) o Biocorrosión (Borgne *et al.*, 2004). La CIM tiene un impacto potencial sobre un amplio rango de ambientes industriales, comprometiendo la integridad de los materiales usados en instalaciones y procesos (Figura 1). Para que ocurra la CIM, es indispensable que haya una fuente de energía, una fuente de carbono, un donador de electrones (cátodo), un aceptor de electrones (ánodo) y agua (Beech *et al.*, 2000; Beech *et al.*, 2004). Las bacterias causantes de la CIM pueden ser sésiles y planctónicas que requieren sitios de inclusión y recepción, nódulos (tubérculos) y propagación por picadura (Videla, 1996; Srikanth *et al.*, 2005).

**FIG. 1. Picadura de corrosión causada por la CIM sobre un tubo galvanizado (flecha roja).**



**Fuente:** Evans *et al.*, 1994.

La colonización microbiana sobre los metales expuestos conforma una biopelícula compuesta de bacterias, exopolisacáridos (EPS) y agua, principalmente. Los exopolisacáridos son importantes para la estructuración de la biopelícula y también para la protección de las bacterias, disminuyendo la eficiencia de biocidas y el desprendimiento de las células (Donlan *et al.*, 2002; Videla, 2002; Carvalho, 2007). La actividad fisiológica de diversas especies microbianas dentro de la biopelícula conduce a un ataque localizado del metal. Este incluye el consumo de oxígeno, producción de ácidos, sulfuros y enzimas que promueven el establecimiento de un gradiente químico localizado en la superficie del metal (Beech *et al.*, 2004).

## **1.2 Pérdidas económicas causadas por la biocorrosión**

La corrosión metálica representa una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria de hidrocarburos (Neria *et al.*, 2006). Hacia la década de los 50s, los costos asociados a la CIM en la reparación y reposición de material de tuberías usadas en diferentes tipos de servicios en los Estados Unidos fueron estimados alrededor de \$ 0.5-2 billones de dólares por año. Cerca del 40% de la corrosión interna de las tuberías en la industria del gas ha sido atribuida a la corrosión microbiana (Zhu *et al.*, 2003). En las

tuberías de gas del Reino Unido se han gastado 250 millones de libras esterlinas por año, equivalentes a 475 millones de dólares (Beech *et al.*, 1999).

En 2001, se estimó que el costo anual de todas las formas de corrosión de las industrias petroleras y de gas era de \$ 13.4 billones de dólares, de los cuales \$ 2 billones de dólares se atribuyen a la CIM (Koch *et al.*, 2001). El gasto total directo debido a la corrosión metálica para el año 2002 fue estimado en \$ 276 billones de dólares, en los Estados Unidos de América (Virmani, 2002; Jan *et al.*, 2008)

### **1.3 Bacterias productoras de ácido (BPA).**

Desde el siglo pasado, se ha considerado a las BSR como las principales bacterias causantes de la corrosión, por la acción electrolítica del  $H_2S$  producto de su metabolismo (Beech *et al.*, 1999; Videla, 2002; Beech *et al.*, 2004). Mientras la corrosión fue considerada esencialmente electrolítica, en otros casos se estimó de tipo acidulítica y causada por bacterias capaces de generar ácidos orgánicos débiles (Srikanth *et al.*, 2005). En el campo Lost Hills de los Angeles (California, EU) donde se explota crudo, la presencia de BRS y BPA ha sido muy notoria en los sistemas de inyección de agua (Ulman *et al.*, 2000). Hoy es aceptado que las BPA contribuyen significativamente a los procesos corrosivos de los metales, a través de su disolución paulatina bajo condiciones ácidas creadas (Droycon, 2006).

Las BPA son encontradas en condiciones reductoras dentro de biopelículas, limos, incrustaciones, nódulos y tubérculos. Algunas veces, su actividad puede no ser percibida como una erosión lateral de la superficie del metal. Muchas de las BPA están localizadas en la interface biomasa-metal; en tal caso, la superficie parecería tener un patrón irregular de depresiones poco

profundas (Droycon, 2006). Por el contrario, el impacto de las BRS es mayor porque su acción está enfocada hacia formas de picadura y cavitación dentro del metal (Videla, 1996; Little *et al.*, 2007; Moos *et al.*, 2008).

Las BPA producen biopelículas como un mecanismo de defensa contra agentes externos (pH, biocidas, cambios de temperatura, etc.) y facilitan la acumulación de sustancias orgánicas e inorgánicas indispensables para el crecimiento bacteriano. Las BSR y las BPA pueden coexistir en las biopelículas, usualmente en consorcios capaces de afectar los procesos electroquímicos por medio de un metabolismo cooperativo (Beech *et al.*, 1999). Adicionalmente, los ácidos orgánicos proporcionan donadores de electrones para el metabolismo energético y actúan como fuente de carbono y energía para las BSR (Pope *et al.*, 1988; Brossia, 2002; Srikanth *et al.*, 2005; Droycon, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Aislar y caracterizar bioquímica y morfológicamente bacterias productoras de ácido alojadas en aguas de producción de un campo petrolero colombiano.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Aislar bacterias productoras de ácido alojadas en los sistemas industriales para la conducción de hidrocarburos del campo la Cira-Infantas.
- Caracterizar las bacterias aisladas mediante pruebas bioquímicas y morfológicas conforme los estándares microbiológicos vigentes.
- Preservar las bacterias identificadas en medio líquido para futuros análisis.

### 3. METODOLOGÍA

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Parque Tecnológico de la Universidad Industrial de Santander, en la sede de Guatiguará en Piedecuesta, Santander. Las pruebas se efectuaron en colaboración entre el Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC).

#### 3.1. Sitio de muestreo

El campo la Cira-Infantas está ubicado en el corregimiento El Centro, en el valle del Magdalena Medio, al oriente del río Magdalena y al sur del río Sogamoso. Comprende un área de 160 km<sup>2</sup>. Se caracteriza por tener las mayores reservas de petróleo “*in situ*” de Colombia, estimadas en 3.500 millones de barriles.

En la actualidad se han perforado en el área 1.703 pozos, de los cuales 572 son productores y 60 son inyectoros de agua (ECOPETROL, 2003). Hacia 2005, El campo producía 5.400 barriles por día, que equivalían a cerca del 1% de la producción total del país (ECOPETROL, 2005).

**3.1.1. Toma de muestras.** Las muestras fueron recolectadas de acuerdo con el protocolo de “*Recolección y transporte de muestras líquidas de sistemas industriales para análisis microbiológico*” desarrollado por la Corporación para la Investigación de la Corrosión. Las muestras fueron tomadas por duplicado en 6 cabezas de pozo; se rotularon de la siguiente manera: 233,

234, 236, 237, 239 y 241 (cada muestra se tomó por duplicado y se referenció como A y B).

En el campo de muestreo, las facilidades fueron purgadas durante 1 min para que drenara el líquido y luego se tomaron las muestras en frascos Schott™ con capacidad de 100 ml. De cada muestra se tomaron estos datos: punto de muestreo, fecha, hora, coloración, temperatura y pH. Las muestras se transportaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (neveras plásticas); luego, fueron procesadas para evitar que trascurrieran 48 h luego de colectadas.

### **3.2. Aislamiento primario de las BPA**

De cada muestra de agua se inoculó 1 ml en 9 ml de medio líquido dextrosa rojo de fenol (DRF, Anexo 1) (NACE, 1994) y se incubó a 37 °C por 24 h. El medio DRF (sólido y líquido) contiene rojo de fenol ( $C_{19}H_{14}O_5S$ ), un indicador de pH que muestra una transición gradual de color amarillo a rojo sobre un rango de pH de 6.6 a 8.0. Cuando el pH cae por debajo de 6.8 debido a la acidificación del medio, éste se torna amarillo (Koneman et al., 1988; Msds, 2007).

Luego de realizar los repiques sucesivos en medio líquido DRF, se tomó una alícuota de 0.1 ml y se inoculó por la técnica de siembra por agotamiento en medio sólido DRF. Las colonias que mostraron una morfología variada, se sembraron en cajas de Petri con medio sólido DRF y se repicaron hasta obtener colonias puras.

### **3.3. Caracterización morfológica**

**3.3.1. Identificación macroscópica.** A partir del aislamiento primario de las BPA, se realizó siembra por agotamiento sobre medio sólido DRF con incubación a 37 °C por 24 h. En seguida, se examinaron las colonias teniendo en cuenta los siguientes parámetros: color, tamaño, forma, margen, consistencia, lustre y superficie (Carreño *et al.*, 2005).

**3.3.2. Identificación microscópica.** La tinción de Gram se hizo de acuerdo con Koneman *et al.*, (1988). Se dispuso una colonia de cada cepa bacteriana sobre una lámina portaobjeto con una gota de solución salina al 0.85%. Se dejó secar y se adicionaron consecutivamente los reactivos para la tinción de Gram.

### **3.4. Caracterización bioquímica**

La caracterización bioquímica de las BPA se realizó según las pruebas bioquímicas sugeridas por el manual de Benson (2001) y el Manual de Bergey's, (Brenner *et al.*, 2005). Las siguientes pruebas fueron procesadas por duplicado:

**Movilidad:** Para esta prueba se empleó medio LB-agar en caja de Petri y en tubos de ensayo. Los tubos se inocularon por picadura y las cajas con una línea recta en el centro del medio de cultivo. Ambos medios se incubaron a 37 °C por 24 h (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005).

**Actividad catalasa:** En la determinación de la actividad catalasa se tomó un inóculo proveniente de medio LB-agar, se colocó en una lámina portaobjeto,

seguidamente se le adicionó una gota de 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Koneman *et al.*, 1988).

**Actividad oxidasa:** Para cada cepa se tomó una colonia con un palillo estéril y se depositó en tiras del kit de determinación Bactident oxidasa de Merck respectivamente (Koneman *et al.*, 1988).

**Utilización de citrato:** Se inocularon cajas de Petri con agar citrato Simmons por siembra superficial y tubos de ensayo tapa rosca con agar inclinado por estría. Se Incubó a 37°C por 48 h (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005).

**Rojo de metilo - Voges Proskauer (RM-VP):** Se prepararon tubos de ensayo tapa rosca con 10 ml de caldo RM-VP (Oxoid, 2007). Se inocularon con los aislados y se incubaron a 37 °C. Luego de 24 h de incubación se tomó una alícuota de 5 ml de cada cepa y se sirvieron en tubos tapa rosca estéril. De inmediato, a cada tubo se adicionaron 3 ml de una solución de 5% α-naftol y 1 ml de 40% KOH; cada tubo se agitó para oxigenar y se dejó reposar por 15 min, para observar la aparición del color rojo, el cual indica un resultado positivo. Los 5 ml restantes que quedaron en el cultivo se incubaron por 24 h más para revelar la prueba de Rojo de metilo, que tiene un tiempo de incubación total de 48 h; transcurrido este tiempo se le adicionó a cada cepa 5 gotas de una solución de rojo de metilo. La generación inmediata y constante de un color rojo se considera positiva (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005).

**Fermentación de Lactosa:** A partir de medio sólido DRF los tubos de ensayo tapa rosca con caldo lactosa se inocularon con los aislados y se incubaron por 48 h a 37 °C. La producción una coloración amarilla en el

medio por el viraje del indicador de rojo de fenol muestra un resultado positivo (Sánchez, 1998; Oxoid, 2007).

**Actividad ureasa.** Se preparó caldo base de Christensen y después del autoclavado se adicionaron 5 ml/100 ml de una solución de 40% urea. Tubos de ensayo con este medio se inocularon con los aislados y se incubaron a 37 °C por 24 h. A partir de 6 h de incubación se inspeccionaron los tubos en espera de una coloración rosada que indica una reacción positiva (Oxoid, 2007).

**Relación de oxígeno:** Las cepas se sembraron por agotamiento en caja de Petri con medio DRF sólido; en seguida fueron introducidas en una jarra de anaerobiosis (2,5 L). Una tira indicadora de anaerobiosis y un sobre de Anaerogen™, revelaron las condiciones de anoxigenia (Oxoid, 2007). Las cajas se incubaron 24 h a 37 °C.

**Crecimiento con KCN:** Al caldo base para KCN previamente esterilizado en autoclave a 121°C por 15 min, se le adicionaron 15 ml/L de una solución 0.5% KCN. Tubos con KCN y sin KCN (controles) se inocularon con el jugado del asa y se incubaron a 37 °C por 48 h (Sánchez, 1998).

**Reducción de nitrato:** Los tubos con caldo nitrato se inocularon con los aislados y se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente se le adicionó el reactivo de Gries-Ilosvays para detectar la aparición de un color rojo que muestra si hubo reducción de nitrato (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005).

**Prueba de agar hierro triple azúcar (TSI):** Para esta prueba se emplearon tubos de ensayo tapa rosca con 5 ml de medio de cultivo agar hierro triple

azúcar (glucosa, lactosa, sacarosa), se inocularon por picadura y por estría superficial con una asa recta (Koneman *et al.*, 1983; Carreño *et al.*, 2005).

**O-F: Oxidación-fermentación de carbohidratos (glucosa y sacarosa):**

Para desarrollar esta prueba se preparó medio basal O-F de Hugh y Leifson para cada uno de los carbohidratos. Previamente estéril el medio, se adicionó cada carbohidrato a una concentración final de 1%. Se sirvió cada medio en tubos de ensayo estériles, inmediatamente se separaron en dos lotes para rotularlos de la siguiente manera: una serie de tubos con una capa de aceite mineral estéril para impedir el intercambio del medio con el oxígeno atmosférico, estos se denominaron “tubos cerrados”; la otra serie de tubos tapa rosca sin aceite se designaron como: “tubos abiertos” (Koneman *et al.*, 1988).

**Utilización de acetato:** Los tubos de ensayo con agar-acetato fueron inoculados por estría superficial y se incubaron a 37 °C por 3 días (Merck, 1982).

**Utilización de Malonato - Desaminación de la Fenilalanina:** Cada cepa fue sembrada en tubos de ensayo tapa rosca con caldo malonato-fenilalanina y se incubaron por 24 h a 37 °C. Para revelar la prueba de desaminación de la fenilalanina en primer lugar se adicionó 5 gotas de una solución 0,1 N HCl, luego se agregaron 4 gotas de una solución acuosa de 10% cloruro férrico (no se agita el tubo) (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005).

**Descarboxilación de ornitina:** Se empleó caldo base ornitina descarboxilasa de Moeller, que se mezcló con 5 g/L de ornitina después de autoclavado. Se utilizó una serie de tubos de ensayo tapa rosca con ornitina

y otra como control sin ornitina; se inocularon y recubrieron con parafina líquida espesa estéril (Koneman *et al.*, 1988).

#### **Fermentación de carbohidratos: sorbitol, glucosa, sacarosa y manitol.**

Para determinar la fermentación de carbohidratos, se preparó por caldo base rojo de fenol por separado para cada uno de los carbohidratos; luego de esterilizado el medio se agregaron 10 g/L de cada carbohidrato. Se sembró cada cepa con el juagado del asa y se incubó a 37 °C por 24 h (Sánchez, 1998).

### **3.5. PRESERVACIÓN BACTERIANA**

La preservación de las cepas bacterianas se hizo de acuerdo con el procedimiento de Simmione (1998). Las bacterias a conservar se sembraron en medio líquido DRF, empleando como preservante 10% y 30% glicerol. Las cepas bacterianas se conservaron en refrigeración a -20 °C y -70 °C.

Para verificar la óptima preservación de las cepas después de un mes de conservadas, se hizo la recuperación de acuerdo con el siguiente procedimiento, tomado de Simmione (1998).

1. Las cepas se pasaron gradualmente de -70 °C. a 10 °C y luego se incubó en un baño maría hasta que la temperatura subiera a 37 °C y se descongelara por completo.
2. Seguidamente, se inocularon en 9 ml de medio DRF líquido.
- 3 Se incubaron a 37 °C por 2 días.
4. Se verificó el crecimiento por el cambio de coloración del medio de cultivo, de rojo a amarillo y por el aumento de la turbidez.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Sitio de muestreo

Para el aislamiento de las BPA alojadas en aguas de producción de un campo petrolero se eligió el campo Cira-Infantas por las siguientes razones:

1. Conocer las bacterias que posiblemente promuevan los procesos corrosivos en este campo petrolero.
2. Generar nuevas alternativas en el control de la corrosión que ayuden a mejorar la calidad y condiciones de explotación, producción y almacenamiento de crudo.

**4.1.1. Toma de muestras.** Las muestras colectadas presentaron dos fases: una acuosa turbia y una líquida orgánica (crudo). La temperatura y el pH de las muestras colectadas se relacionan en la Tabla 1. La temperatura y el pH son considerados óptimos para el crecimiento de bacterias mesófilas (Mandigan *et al.*, 1999) como las encontradas en este estudio.

**Tabla 1. Valores de temperatura y pH de las muestras colectadas.**

| Muestra | Temperatura | Punto de muestreo | pH |
|---------|-------------|-------------------|----|
|---------|-------------|-------------------|----|

|     |         |            |     |
|-----|---------|------------|-----|
| 233 | 38.2 °C | Pozo C2PP2 | 7,3 |
| 234 | 28.3 °C | Pozo 1053  | 7,2 |
| 236 | 35.2 °C | Pozo 1118  | 7,3 |
| 237 | 35.1 °C | Pozo 1110  | 7,1 |
| 239 | 34.9 °C | Pozo 1127  | 7,3 |
| 241 | 34,9 °C | Pozo 2030  | 7,2 |

## 4.2 Aislamiento primario.

El medio DRF es comúnmente utilizado en la industria petrolera para el aislamiento de bacterias productoras de ácido de acuerdo con la norma NACE (2004).

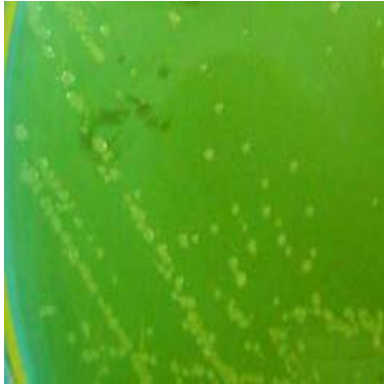
El crecimiento de BPA a 37 °C en los medios DRF líquido y sólido se evidenció por la disminución del pH, debido a la producción de ácidos orgánicos. Como consecuencia de la acidez el pH cae por debajo de 6.8; por tanto el color del indicador (rojo de fenol) vira de rojo a amarillo (Koneman *et al.*, 1983). El cambio de coloración se empezó hacer visible a partir de 8 h de incubación. El tiempo máximo de incubación en el medio sólido fue de 25 h; a partir de ese momento, el medio empezó a tornarse fucsia-rojizo.

A partir de las muestras de agua provenientes de la Cira-Infantas, se aislaron 9 cepas. Las cepas aisladas procedieron de las muestras 233A, 234A, 236A, 236B, 237B, 239A, 239B, 241A y 241B.

## 4.3. Caracterización morfológica.

**4.3.1 Identificación macroscópica.** El aspecto de las colonias bacterianas aisladas en medio DRF sólido y su descripción macroscópica se observan en las Figuras 2 a 12.

**Fig. 2.** Descripción morfológica de la cepa 233A.



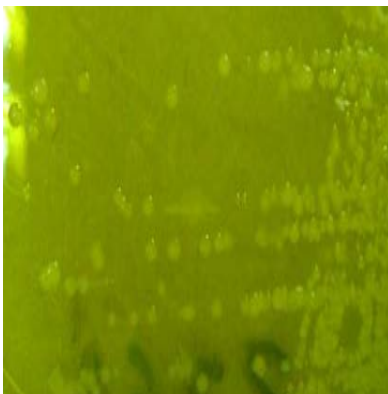
|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| <b>COLOR</b>        | Crema blancuzca |
| <b>FORMA</b>        | Circular        |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa            |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana           |
| <b>MARGEN</b>       | Entero          |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremosa         |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante       |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña         |

**Fig. 3.** Descripción morfológica de la cepa 234A.



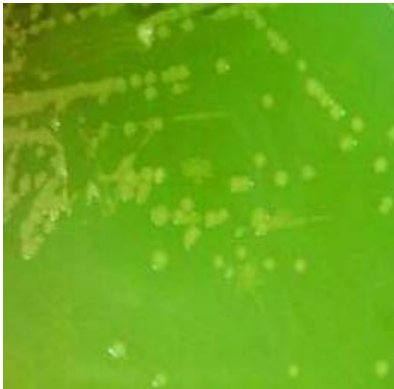
|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>COLOR</b>        | Crema     |
| <b>FORMA</b>        | Circular  |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa      |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana     |
| <b>MARGEN</b>       | Entero    |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremosa   |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña   |

**Fig. 4.** Descripción morfológica de la cepa 236A.



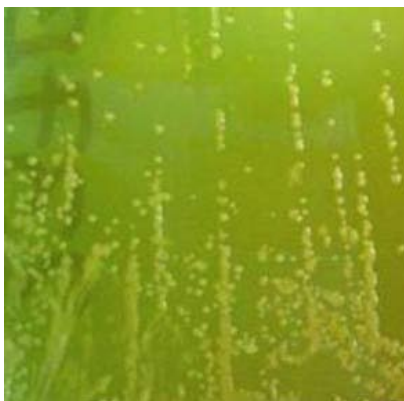
|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| <b>COLOR</b>        | Crema-hialina       |
| <b>FORMA</b>        | Circular            |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa                |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Ligeramente elevada |
| <b>MARGEN</b>       | Entero              |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremosa             |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante           |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña             |

**Fig. 5.** Descripción morfológica de la cepa 236B.



|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>COLOR</b>        | Crema     |
| <b>FORMA</b>        | Circular  |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa      |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana     |
| <b>MARGEN</b>       | Entero    |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremosa   |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña   |

**Fig. 6.** Descripción morfológica de la cepa 237B.



|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>COLOR</b>        | Crema     |
| <b>FORMA</b>        | Circular  |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa      |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana     |
| <b>MARGEN</b>       | Entero    |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremosa   |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña   |

**Fig. 7.** Descripción morfológica de la cepa 239A.



|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>COLOR</b>        | Crema     |
| <b>FORMA</b>        | Circular  |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa      |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana     |
| <b>MARGEN</b>       | Entero    |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremosa   |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña   |

**Fig. 8.** Descripción morfológica de la cepa 239B.



|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>COLOR</b>        | Crema     |
| <b>FORMA</b>        | Circular  |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa      |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Elevada   |
| <b>MARGEN</b>       | Entero    |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Cremoso   |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña   |

**Fig. 9.** Descripción morfológica de la cepa 241A.



|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| <b>COLOR</b>        | Crema blancuzca |
| <b>FORMA</b>        | Circular        |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa            |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana           |
| <b>MARGEN</b>       | Entero          |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Creмоса         |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante       |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña         |

**Fig. 10.** Descripción morfológica de la cepa 241B.



|                     |           |
|---------------------|-----------|
| <b>COLOR</b>        | Crema     |
| <b>FORMA</b>        | Circular  |
| <b>SUPERFICIE</b>   | Lisa      |
| <b>ELEVACIÓN</b>    | Plana     |
| <b>MARGEN</b>       | Entero    |
| <b>CONSISTENCIA</b> | Creмоса   |
| <b>LUSTRE</b>       | Brillante |
| <b>TAMAÑO</b>       | Pequeña   |

Para todas las colonias se hizo evidente la producción de ácidos, en conformidad con el cambio de coloración del indicador. Todas las colonias fueron de tamaño pequeño. En algunas cepas, la forma de todas las colonias fue plana; para otras, ligeramente elevadas. Una sola cepa mostró apariencia elevada. Las características más notorias fueron lustre brillante, consistencia cremosa y superficie lisa.

El color dominante de las colonias fue crema, en tanto que otras adquirieron color blancuzco. La cepa 236A se tornó de color crema-hialino. El margen fue entero en la mayoría de las cepas. No obstante, en colonias maduras de todas las cepas se observó una forma levemente ondulada.

**4.3.2 Identificación microscópica.** Las características microscópicas de las cepas aisladas se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características microscópicas de las cepas aisladas.

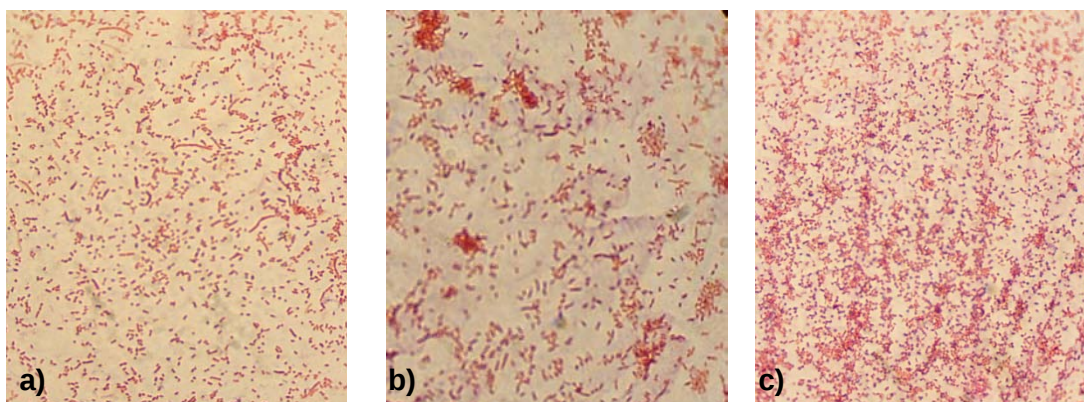
| CEPA | CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS                                                     |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 233A | Bacilos rectos y muy cortos<br>Gram negativas<br>Disposición individual, pares.   |
| 234A | Bacilos rectos y pequeños<br>Gram negativas<br>Disposición individual, pares.     |
| 234B | Bacilos cortos y rectos<br>Gram negativas<br>Disposición individual, pares.       |
| 236A | Bacilos rectos cortos<br>Gram negativos<br>Disposición individual, pares.         |
| 236B | Bacilos rectos pequeños<br>Gram negativos<br>Disposición individual o en pares.   |
| 237B | Bacilos rectos y pequeños<br>Gram negativos<br>Disposición individual o en pares. |
| 239A | Bacilos cortos rectos<br>Gram negativos                                           |

|      |                                                                                 |
|------|---------------------------------------------------------------------------------|
|      | Disposición individual o en pares.                                              |
| 239B | Bacilos cortos y rectos<br>Gram negativos<br>Disposición individual o en pares. |
| 241A | Bacilos rectos y cortos<br>Gram negativos<br>Disposición individual o en pares. |
| 241B | Bacilos rectos y pequeños<br>Gram negativos<br>Disposición individual, pares.   |

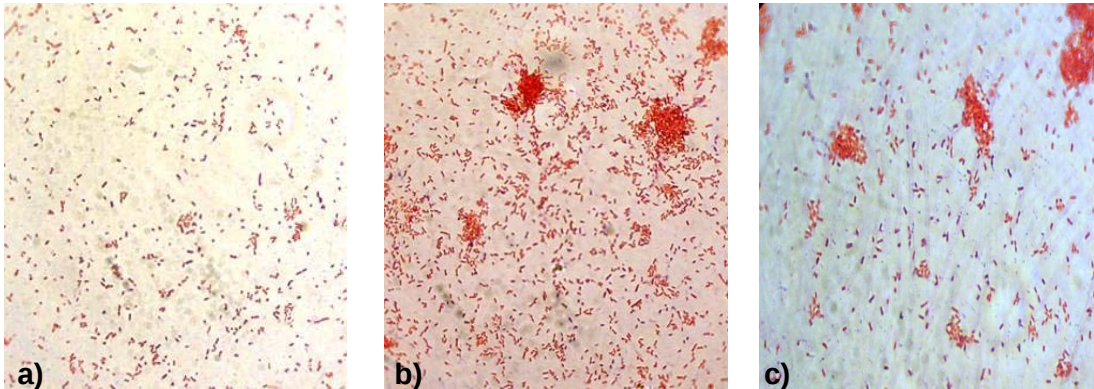
Las células bacterianas de las cepas aisladas presentaron tinción de tipo Gram negativo. En la observación al microscopio con ocular de 10X y aumento de 40X no fue posible diferenciar las células, por lo que su observación se realizó con aumento de 100X; las células bacterianas presentaron morfología bacilar de tipo recto y de tamaño corto y pequeño. La disposición de las células bacterianas fue individual o en pares y no formaron agregados.

La morfología de cada una de las cepas aisladas, observadas al microscopio se puede observar en las Figuras 11 a la 13.

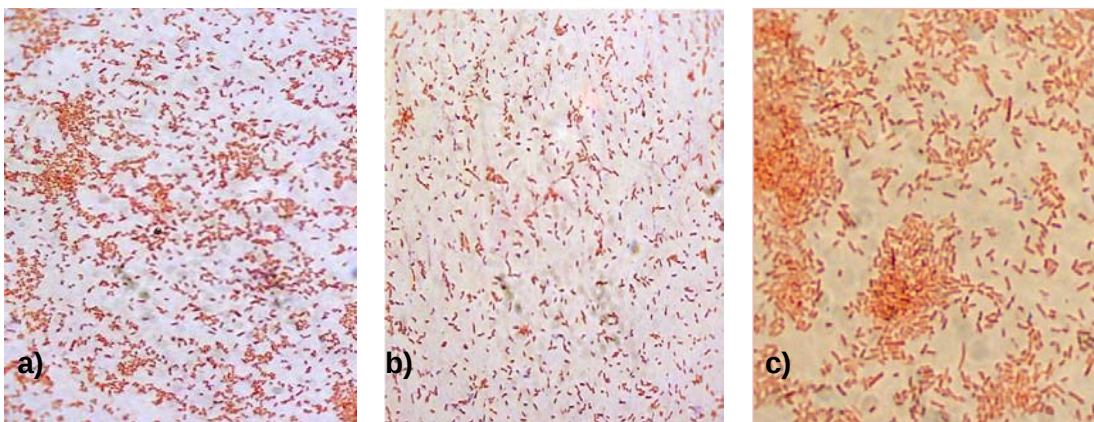
**Fig. 11.** Morfología de las cepas a) 233A b) 234A c) 236A (Aumento 100X)



**Fig. 12.** Morfología de las cepas a) 236B b) 237B c) 239A (Aumento 100X)



**Fig. 13.** Morfología de las cepas a) 239B b) 241A c) 241B (Aumento 100X)



#### **4.4 Caracterización bioquímica**

Las BPA no están definidas como grupo y por tanto no se conocen las especies que las conforman; estas se caracterizan principalmente por producir ácidos orgánicos y ser de tipo aerobia y/o anaerobia facultativas. De acuerdo a las características morfológicas descritas anteriormente se relacionan las cepas aisladas con las Enterobacterias. Para determinar la

actividad metabólica y el género de los aislados dentro de la batería de pruebas bioquímicas se seleccionaron las enunciadas a continuación:

**Movilidad:** Algunas bacterias se desplazan con la ayuda de flagelos. La presencia de flagelos les permite a las Enterobacterias el movimiento (Brenner *et al.*, 2005). Las cepas evidenciaron una motilidad positiva, por la turbidez y la difusión en el medio a partir de la línea de inoculación, tanto en las cajas de Petri como en los tubos de ensayo (Tabla 3).

**Actividad catalasa:** Un resultado positivo indica que un aislado posee la enzima catalasa, una hemoproteína con cuatro átomos de hierro en estado reducido. El  $H_2O_2$  surge como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los carbohidratos; es letal para la célula bacteriana, si se acumula. La catalasa transforma el  $H_2O_2$  en  $O_2$  burbujeante y  $H_2O$  (Koneman *et al.* 1988; Koneman *et al.*, 1983) y la aparición de burbujas se interpreta como un resultado positivo. Todas las cepas exhibieron una reacción catalasa positiva; en algunas cepas la actividad catalasa fue más notoria y prolongada, como por ejemplo en la cepa 236A (Tabla 3).

**Actividad oxidasa:** La citocromooxidasa es una enzima presente en algunas bacterias; es la encargada de activar la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular. El oxígeno es el aceptor final de hidrógeno y produce  $H_2O_2$  y  $H_2O$  (Koneman *et al.*, 1983).

El colorante de *p*-fenilendiamina presente en las tiras de Bactident oxidasa<sup>TM</sup> actúa como aceptor artificial de electrones, sustituyendo al oxígeno. En presencia de citocromo oxidasa de la bacteria y de oxígeno atmosférico la *p*-fenilendiamina se oxida y se torna de incolora a una coloración azul-púrpura que indica una reacción positiva (Koneman *et al.*, 1988; Merck, 1994).

Todas las Enterobacterias son oxidasa-negativo a diferencia de las Pseudomonas que son por lo general oxidasa-positivo (Koneman *et al.*, 1988; Mandigan *et al.*, 1999). Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio, en el cual todas las cepas fueron actividad oxidasa negativa (Tabla 3).

**Utilización del citrato:** Algunas bacterias pueden obtener su energía del citrato como única fuente de carbono. Esta prueba es importante para identificar los géneros de la familia Enterobacteriaceae y diferenciarlas de bacterias gram negativas y de bacterias no fermentadoras (Koneman *et al.*, 1988).

En esta prueba, el citrato es una sal sódica que las bacterias utilizan como única fuente de carbono y el fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. La conversión de amoníaco a hidróxido de amonio provoca la alcalinización ( $\text{pH} > 7,6$ ) cambiando el color del medio de verde a azul por el indicador de azul de bromotimol, lo que se considera un resultado positivo (Koneman *et al.*, 1988; Koneman *et al.*, 1983).

Luego de 24 h de incubación todas las cepas crecieron en el medio de cultivo y en casi todas, el medio viró de color verde a color azul, excepto la cepa 239B. (Tabla 3).

**Rojo de metilo (RM):** En esta prueba, la glucosa es metabolizada a través de la vía de fermentación de ácidos mixtos, proporcionando productos ácidos que bajan el pH del medio. Los ácidos producidos son: acético, succínico, láctico etc. Distingue a las Pseudomonas RM-negativas y a ciertos géneros de las bacterias entéricas como *Klebsiella* RM (-) de *Citrobacter* RM (+) (Koneman *et al.*, 1988; Mandigan *et al.*, 1999; Benson, 2001). Un resultado positivo ocurre cuando aparece un color rojo permanente en la superficie al agregar 5 gotas de solución de Rojo de metilo; en este caso las cepas 236A

y 239B mostraron una reacción positiva. Para las demás cepas la superficie del medio se tornó amarillo (Tabla 3).

**Voges porskauer (VP):** Esta prueba revela la utilización de la vía de la fermentación del 2,3 butilenglicol para producir acetoina y butanodiol por algunos géneros como *Enterobacter*, *Serratia* y algunas especies de *Bacillus* y *Aeromonas* (Koneman *et al.*, 1988, Benson, 2001). Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron las soluciones reveladoras y se espero entre 10-15 min. La generación de un color rojo en la superficie pasado este tiempo, indica una reacción positiva. Las cepas 233A, 234A, 236B, 237B, 239A, 241A y 241B fueron VP positivas, mientras que las cepas 236A y 239B fueron de un color cobrizo (Tabla 3).

**Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas**

| Cepa | Motilidad | Catalasa | Oxidasa | Citrato | RM | VP |
|------|-----------|----------|---------|---------|----|----|
| 233A | +         | +        | -       | +       | -  | +  |
| 234A | +         | +        | -       | +       | -  | +  |
| 236A | +         | +        | -       | +       | +  | -  |
| 236B | +         | +        | -       | +       | -  | +  |
| 237B | +         | +        | -       | +       | -  | +  |
| 239A | +         | +        | -       | +       | -  | +  |
| 239B | +         | +        | -       | -       | +  | -  |
| 241A | +         | +        | -       | +       | -  | +  |
| 241B | +         | +        | -       | +       | -  | +  |

**Fermentación de Lactosa:** El indicador rojo de fenol del caldo lactosa se torna de color rojo a amarillo cuando la lactosa es fermentada, lo que indica

un resultado positivo (Oxoid, 2007). El cambio de color del indicador fue visible en todas las cepas, excepto 233A, 241A y 239B (Tabla 4). Esta prueba es importante para distinguir géneros no fermentadores de lactosa como *Erwinia* y *Proteus*, de otros géneros de las enterobacterias (Benson, 2001).

**Actividad ureasa:** Ciertos tipos de bacterias como el género *Proteus* muestran una degradación rápida de la urea (aproximadamente en 8 h), al igual que algunos grupos de *Salmonella* y *Shigella*, en tanto que ciertas especies de *Klesiella* presentan actividad ureasa lenta (Benson, 2001). Si la cepa bacteriana tiene actividad ureasa, la enzima hidroliza la urea (diamida del ácido carbónico) con liberación de amoníaco y CO<sub>2</sub>. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciendo la alcalinización del medio; el pH es tan alto (pH > 8.0) que el rojo de fenol cambia a color rosado-rojizo lo que se considera como positivo (Koneman *et al.*, 1988; Benson, 2001). La actividad ureasa fue negativa para todas las cepas. Las cepas crecieron en el caldo, pero el medio permaneció amarillo (Tabla 4).

**Relación de oxígeno:** Si los aislados son aerobios estrictos, no crecen en condiciones de anaerobiosis y si son anaerobios facultativos, presentarán crecimiento positivo (Mandigan *et al.*, 1999). En jarra de anaerobiosis, el sobre de Anaerogen™ absorbe rápidamente el O<sub>2</sub> atmosférico, generando a la vez CO<sub>2</sub>. La disminución del O<sub>2</sub> se revela por el cambio de color de rosado a blanco del indicador (Oxoid, 2007). En todas las cepas se observó crecimiento y presentaron cambio de coloración en el medio, lo que indica que estas bacterias son de tipo anaerobio facultativo (Tabla 4).

**Crecimiento KCN:** El KCN es un compuesto inorgánico que bloquea el flujo de electrones y por tanto la síntesis de ATP, uniéndose a los citocromos e impidiendo el crecimiento de las bacterias como en el caso del género *Escherichia*, a diferencia del otros géneros como *Shigella* y *Enterobacter* (Mandigan *et al.* 1999). Un resultado positivo indica que el crecimiento de las cepas no fue inhibido por el KCN. En los tubos de ensayo control sin KCN hubo un crecimiento positivo y en los tubos con KCN no creció la cepa 239B, lo que indica que las demás cepas resisten el KCN (Tabla 4).

**Reducción nitrato:** Algunos microorganismos en condiciones de anaerobiosis reducen los nitratos para formar nitritos, nitrógeno molecular u oxido nítrico (Koneman *et al.*, 1983). La aparición de un color rojo al adicionar el reactivo de Griess-Ilosvay (Merck, 1994) muestra una reacción positiva (Benson, 2001). No se notó en ninguna cepa la aparición de este color, porque este reactivo detecta sólo los nitritos. Para comprobar si la reacción era completamente negativa, se adicionó una pequeña cantidad de polvo de zinc. Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos y el desarrollo de un color rosado-rojizo indica la presencia de nitratos y confirma que la reacción es completamente negativa. Si el medio permanece gris, sin la formación de la coloración rosado-rojiza la prueba se considera positiva (Koneman *et al.*, 1988; Merck, 1994), en las cepas aisladas no se observó la formación de esta coloración, indicando una reacción positiva (Tabla 4). Todas las enterobacterias a excepción de ciertas especies de *Serratia* y *Yersinia* reducen nitratos (Koneman *et al.*, 1988)

**Tabla 4. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas**

| CEPA | Lactosa | Ureasa | Relación<br>O <sub>2</sub> | KCN | Nitrato |
|------|---------|--------|----------------------------|-----|---------|
| 233A | -       | -      | AF                         | +   | +       |

|      |   |   |    |   |   |
|------|---|---|----|---|---|
| 234A | + | - | AF | + | + |
| 236A | + | - | AF | + | + |
| 236B | + | - | AF | + | + |
| 237B | + | - | AF | + | + |
| 239A | + | - | AF | + | + |
| 239B | + | - | AF | - | + |
| 241A | - | - | AF | + | + |
| 241B | + | - | AF | + | + |

AF: Anaerobia facultativa

**Prueba de agar hierro triple azúcar (TSI): Para determinar la fermentación de carbohidratos y producción de sulfuro.** La producción de ácido por la fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa, genera una reacción ácida/ácida (A/A). Ésta se evidencia por la aparición de un color amarillo (cambio del indicador de rojo de fenol) en el medio de cultivo, que indica una reacción positiva (Koneman *et al.*, 1983; Sánchez, 1998). En todas las cepas aisladas se evidenció una reacción A/A (Tabla 5).

La formación de sulfuro se dio solamente en la cepa 236A. Este compuesto se forma a partir del tiosulfato de sodio (fuente de azufre, contiene el agar TSI) que libera sulfuro por acción enzimática de la bacteria. Este sulfuro ( $S^{-2}$ ) se acopla con el  $H_2$  para formar gas  $H_2S$ , que es detectado mediante el sulfato ferroso (presente en el agar TSI), con la formación de un precipitado negro insoluble (Koneman *et al.*, 1983; Sánchez, 1998; Mandigan *et al.*, 1999).

La producción de gas ( $H_2$  y  $CO_2$ ) (Koneman *et al.*, 1983; Sánchez, 1998) se evidenció por las burbujas en el fondo del tubo de todas las cepas, en tanto que en las cepas 239A, 234B y 241B hubo desplazamiento del agar hacia la tapa del tubo.

El agar con hierro y triple azúcar permite diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae de bacterias no fermentadoras como las *Pseudomonas*

que muestran una reacción alcalina/alcalina (K/K), por la utilización de las peptonas (Koneman *et al.*, 1983; Mandigan *et al.*, 1999)

#### **O-F: Oxidación-fermentación de carbohidratos (glucosa y sacarosa).**

Algunas bacterias como las *Pseudomonas* generan ácidos débiles a partir de la degradación oxidativa de la glucosa, en tanto que las *Enterobacterias* fermentan la glucosa para producir ácidos mixtos fuertes. La utilización de un tubo de ensayo abierto (sin recubrimiento de aceite) indica un metabolismo oxidativo y el tubo de ensayo cerrado que está cubierto con aceite mineral determina el metabolismo fermentativo. El medio contiene azul de bromotimol como indicador de pH que vira de verde (pH = 6.9) a amarillo (pH < 6.6) cuando se acidifica el medio (Koneman *et al.*, 1988). El tipo de metabolismo presente en todas las cepas fue fermentativo; ya que hubo crecimiento tanto en el tubo de ensayo cerrado como en el tubo de ensayo abierto en el medio basal O-F para cada uno de los carbohidratos (Glucosa y sacarosa) (Tabla 5).

**Utilización de acetato:** El acetato es utilizado por algunas bacterias como *Escherichia*, *Salmonella* y *Klebsiella* como única fuente de carbono y como fuente de nitrógeno, las sales de amonio que liberan amoníaco. De esta manera aumenta el pH y el medio se alcaliniza para producir un viraje del indicador azul de bromotimol que pasa de color verde a azul, lo cual indica una reacción positiva (Koneman *et al.*, 1988; Merck 1982). Todas las cepas utilizaron acetato como única fuente de carbono (Tabla 5).

**Tabla 5. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas**

| CEPA | TSI | Sulfuro (TSI) | Acetato | O-F     |          |
|------|-----|---------------|---------|---------|----------|
|      |     |               |         | Glucosa | Sacarosa |
| 233A | +   | -             | +       | +       | +        |

|      |   |   |   |   |   |
|------|---|---|---|---|---|
| 234A | + | - | + | + | + |
| 236A | + | + | + | + | + |
| 236B | + | - | + | + | + |
| 237B | + | - | + | + | + |
| 239A | + | - | + | + | + |
| 239B | + | - | + | + | + |
| 241A | + | - | + | + | + |
| 241B | + | - | + | + | + |

**Utilización de Malonato- Desaminación de la Fenilalanina:** En esta prueba se puede determinar si el malonato de sodio es utilizado como única fuente de carbono al mismo tiempo que emplea el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Esto incrementa la alcalinidad del medio por la formación de hidróxido de sodio y bicarbonato de sodio. Una reacción positiva se da cuando el indicador de pH azul de bromotimol vira de verde a azul por el aumento del pH en el medio. Los grupos *Klesbsiella-Enterobacter emplean acetato* como única fuente de carbono a diferencia de géneros como *Citrobacter* y *Erwinia* (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005). Las cepas 234A, 236B, 237B, 239A y 241B utilizan el malonato como única fuente de carbono

Cuando se adiciona una solución 0,1 N HCl, el medio se torna amarillo e inmediatamente se le añade una solución acuosa de 10% cloruro férrico. El medio vira a verde en el plazo de 3 min lo que indica una reacción positiva. Este color revela la presencia de ácido fenilpirúvico (cetoácido) producido por la desaminación de la fenilalanina. La enzima desaminasa está presente sólo en los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* (Koneman *et al.*, 1988; Carreño *et al.*, 2005). Al agregar la solución 0,1 N de HCl todos los tubos con el medio cambiaron a color amarillo; luego de adicionar el cloruro férrico no

se produjo viraje de amarillo a verde. Lo que permite concluir que las cepas aisladas no formaron ácido fenilpirúvico, ya que carecen de la enzima fenilalanina desaminasa (Tabla 6).

**Descarboxilación de ornitina:** Las bacterias fermentan la glucosa presente en el medio provocando un leve descenso en el pH, que permite activar la enzima descarboxilasa. Esto hace que en las primeras horas de incubación el medio cambie de púrpura a amarillo por el indicador de púrpura de Bromocresol. Este viraje debe visualizarse tanto en el tubo control como en el tubo que contiene la Ornitina. Cuando la Ornitina es descarboxilada, el pH aumenta por encima de 6.8 por la formación de aminas alcalinas y se produce un cambio de color de amarillo a violeta en el medio generando una reacción positiva de lo contrario el medio permanece amarillo. Esta prueba diferencia *Shigella* (-) de algunas especies de *Proteus* y de *Escherichia* (+) (Koneman *et al.*, 1988; Merck, 1982). La descarboxilación de la Ornitina se observó en la mayoría de las cepas a excepción de las cepas 233A y 241A (Tabla 6).

**Fermentación de carbohidratos:** A partir de la fermentación de carbohidratos se produce ácido que hace que la coloración del medio pase de rojo a amarillo (viraje del indicador de rojo de fenol), lo que se considera como una reacción positiva de fermentación. La degradación de los carbohidratos es importante para determinar las bacterias que son fermentadoras como la familia Enterobacteriaceae y algunas especies como *Flavobacterium*, *Commamonas* que son fermentadoras para manitol y celobiosa (Koneman *et al.*, 1983; Sánchez, 1998). La fermentación de carbohidratos tales como manitol, glucosa, sacarosa y sorbitol fue positiva para todas las cepas (Tabla 6).

**Tabla 6. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas**

| CEPA | M/F | ORNITINA | Fermentación Carbohidratos |          |          |         |
|------|-----|----------|----------------------------|----------|----------|---------|
|      |     |          | Glucosa                    | Sacarosa | Sorbitol | Manitol |
| 233A | -/- | -        | +                          | +        | +        | +       |
| 234A | +/- | +        | +                          | +        | +        | +       |
| 236A | -/- | +        | +                          | +        | +        | +       |
| 236B | +/- | +        | +                          | +        | +        | +       |
| 237B | +/- | +        | +                          | +        | +        | +       |
| 239A | +/- | +        | +                          | +        | +        | +       |
| 239B | -/- | +        | +                          | -        | +        | +       |
| 241A | -/- | -        | +                          | +        | +        | +       |
| 241B | +/- | +        | +                          | +        | +        | +       |

M/F: Malonato/Fenilalanina

#### 4.5 Clasificación de las BPA aisladas.

A partir de los resultados obtenidos de la caracterización morfológica y la batería de pruebas bioquímicas ejecutadas (Tabla 8) se concluyó que las 9 cepas aisladas del campo la Cira-Infantas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Brenner *et al.*, 2005)

Las cepas 234A, 236B, 237B, 239A y 241B se diferencian de las demás, por su capacidad de utilizar malonato como única fuente de carbono, degradan lactosa y utilizan la vía de la fermentación del 2,3-butilenglicol (VP +) lo que indica probablemente corresponden al género *Enterobacter* (Tabla 7).

Las características de la cepa 239B son acordes con las del género *Escherichia* (Tabla 7). Éste se caracteriza por ser móvil, oxidasa negativo,

crecimiento inhibido por KCN, utiliza acetato como única fuente de carbono y no produce sulfuro (Brenner *et al.*, 2005)

La cepa 236A, que probablemente sea del género *Citrobacter* (Tabla 7), es lactosa positiva, produce sulfuro (TSI) y utiliza la vía de fermentación de los ácidos mixtos. Una cepa de *Citrobacter* fue encontrada y asociada con el deterioro de una estructura de una tubería de acero (Angelez-Chavez *et al.*, 2002).

Las cepas 233A y 241A pertenecen al género *Erwinia* (Tabla 7). Son lactosa negativa, ornitina descarboxilasa negativa, carecen de actividad ureasa y no desaminan la fenilalanina. Estas características son similares a las reportadas por el Bergey's para este género.

De las BPA no hay información de su fisiología ni de los miembros que componen su grupo. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que algunos de los géneros de la familia Enterobacteriaceae hacen parte de este grupo bacteriano. Su amplia distribución en agua tierra y plantas, manifiestan que es posible encontrarlas en aguas de producción de un campo petrolero.

Ciertos miembros de la familia Enterobacteriaceae fueron aislados de una biopelícula corroída, extraída de una tubería de gas; pero no hay una clara evidencia sobre su implicación directa en la biocorrosión. Sin embargo, algunos de sus géneros son reportados por estar presentes en este tipo de ambientes, miembros de esta familia tales como *Citrobacter sp.*, *P. mirabilis*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella planticola* fueron identificados en biofilms maduros y nativos (Jan *et al.*, 2004, Bermont *et al.*, 2007)

**Tabla 7. Clasificación de las BPA aisladas.**

| <b>Genero</b>           | <b>Cepa</b> |
|-------------------------|-------------|
| <i>Erwinia sp.</i>      | 233A        |
|                         | 241A        |
| <i>Citrobacter sp.</i>  | 236A        |
| <i>Escherichia sp.</i>  | 239B        |
| <i>Enterobacter sp.</i> | 234A        |
|                         | 236B        |
|                         | 237B        |
|                         | 239A        |
|                         | 241B        |

En cuanto a la relación de oxígeno de las bacterias aisladas en este estudio se pudo comprobar que son anaerobias facultativas, acorde con Brenner *et al.* (2005); es decir pueden consumir el oxígeno disponible en el ambiente para crear un nicho anaerobio en la biopelícula, permitiendo que éste sea colonizado por bacterias anaerobias estrictas (como las BRS). En las cepas aisladas se observó formación de burbujas lo que indica una producción de gas (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>), siendo más notoria en medio DRF líquido que en el sólido; igualmente en el medio TSI fue posible evidenciar la formación de vacíos en medio del agar, o el levantamiento del agar hacia la parte superior del tubo. Las cepas 237B, 239A, 241B exhibieron una alta producción de gas. Este gas al igual que los productos formados a partir del metabolismo de los carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol) puede servir como sustrato para las BRS; ya que éstas pueden utilizar el lactato, Piruvato, H<sub>2</sub> como donadores de electrones (Mandigan *et al.*, 1999; Beech, 2003)

#### **4.6 PRESERVACIÓN DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO**

El tiempo de conservación de las cepas aisladas en 10% y 30% glicerol fue óptimo.

Se pudieron recuperar todos los aislados, el tiempo de crecimiento en el medio DRF líquido fue de 18 h y el máximo de 25 h e igualmente el crecimiento fue evidente por el cambio de coloración del medio de rojo a amarillo y por la turbidez.

**TABLA 8. Características morfológicas y bioquímicas de las BPA aisladas.**

| CARACTERISTICAS                    | 233A         | 234A         | 236A         | 236B         | 237B         | 239A         | 239B         | 241A         | 241B         |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Morfología celular                 | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto | Bacilo recto |
| pH                                 | 7,3          | 7,3          | 7,3          | 7,3          | 7,3          | 7,3          | 7,3          | 7,3          | 7,3          |
| Motilidad                          | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Catalasa                           | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Oxidasa                            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            |
| VP                                 | +            | +            | -            | +            | +            | +            | -            | +            | +            |
| Ureasa                             | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -            |
| Descarboxilación Ornitina          | -            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | -            | +            |
| Malonato/Fenilalanina              | -/-          | +/-          | -/-          | +/-          | +/-          | +/-          | -/-          | -/-          | +/-          |
| Citrato                            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | -            | +            | +            |
| Acetato                            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Crecimiento KCN                    | +            | +            | +            | +            | +            | +            | -            | +            | +            |
| Reducción Nitrato                  | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| TSI                                | A/A          | A/A          | A/A          | A/A          | A/A          | A/A          | A/A          | A/A          | A/A          |
| Sulfuro (TSI)                      | -            | -            | +            | -            | -            | -            | -            | -            | -            |
| <i>Oxido-Fermentación de:</i>      |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
| Glucosa                            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Sacarosa                           | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| <i>Fermentación Carbohidratos:</i> |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
| Glucosa                            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Sacarosa                           | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Manitol                            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |
| Sorbitol                           | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            | +            |

## CONCLUSIONES

Del campo la Cira Infantas se aislaron 9 cepas de Bacterias Productoras de ácido. Exhibieron un crecimiento óptimo en medio DRF sólido y líquido, la morfología en la mayoría de las colonias fue pequeña, de color crema, superficie lisa, con forma plana, elevada o ligeramente elevada; en la identificación microscópica se observaron bacilos Gram negativos,

A partir de la caracterización morfológica y bioquímica se identificaron los siguientes géneros: *Enterobacter sp.* (5), *Citrobacter sp.* (1), *Escherichia sp.* (1) y *Erwinia sp.* (2) todos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

En este trabajo se da a conocer más acerca de las condiciones de crecimiento, los aspectos morfológicos y metabólicos y el tipo de bacterias que conforman las BPA. Además de la composición microbiana de los pozos petroleros en Colombia.

Las cepas resultaron viables después de preservación en glicerol 10 y 30%

## RECOMENDACIONES

- ❖ A partir de los resultados obtenidos en este estudio es conveniente utilizar muestras procedentes de diversos campos petroleros, para conocer más acerca de la función que cumplen las bacterias productoras de ácido en la corrosión influenciada microbiológicamente. Y de esta manera determinar el tratamiento adecuado para disminuir la acción de este tipo de bacterias
- ❖ Realizar una identificación con nuevas pruebas bioquímicas y moleculares para identificar a nivel de especie los miembros que conforman las BPA y conocer más acerca de sus aspectos fisiológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

Angeles, C., Mora, J.L., Garcia, R., Padilla, A.A., Perez R., Flores, O., Martinez, L. 2002. Microbiologically influenced corrosion by *Citrobacter* in sour gas pipelines. *Mater Perform*, 41:50–55

Beech, I. & Gaylarde, C. 1999. Recent advances in the study of biocorrosión – an overview. *Revista de microbiología*. 30: 177-190.

Beech, I. 2003. Sulfate reducing bacteria in biopelículas on metallic materials and corrosion. *Microbiology today*. 30:115-117.

Beech, I. & Sunner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biopelículas and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:181–186

Bermont-Bouis, D., Janvier, M., Grimont, P.A., Dupont, I., Vallaey T. 2007. Both sulfate-reducing bacteria and Enterobacteriaceae take part in marine biocorrosion of carbon steel. *J Appl Microbiol* 102:161–168

Borenstein, S. 1994. *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*. Woodhead Publishing.20.

Borgne, S., Jan, J., García, J.L., Amaya, M., Romero, J. 2004. Initial developments of a database of bacteria involved in microbiologically influenced corrosion. *Corrosion*, 1-8.

Brenner, D., Krieg, N., Staley, J., Garrity, G. 2005. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Volumen 2: Parte B *Gammaproteobacteria* Berlin: Springer-Verlag Publishers.

Brossia, S. 2002. Evaluation of possible microbial activity leading to Barge corrosion. 1-36

Carvalho, C.C. 2007. Biofilms: Recent Developments on an Old Battle. *Recent Patents on Biotechnology*, 1: 49-57

Donlan RM., Costerton JW. 2002. Biofilms survival mechanism relevant microorganism. *Clinical microbial review*, 15: 167-193

Droycon Bioconcepts. 2006. APB-BART Protocol, DBASOPO. 1-7

ECOPETROL, 2003. Carta Petrolera: El regreso de la Cira. Edición 108. [En línea]: <http://www.ecopetrol.com>

ECOPETROL, 2005. Nuevo aire para la cira. Boletín del 2005. Bogotá, Septiembre 6. [En línea]: <http://www.ecopetrol.com>

Evans, S & Kent, R. 1994. Metallurgical and Microbial Aspects of Microbiologically Influenced Corrosion (MIC). [En línea]: <http://www.mde.com>

Jack, T. R. & NOVA CHEMICALS LTDA. 2002. Biological corrosion failures. PAG 1-19.

Jan, R. J., Posadas, A., Zavala, D.S. J., García, R., Hernández, R. C. 2008. Phylogenetic characterization of bacterial consortia obtained of corroding gas pipeline in Mexico. *World journal microbiology technology*, 24: 1775 -1784

Koch, G. H., M. Brongers, N. G. Thompson, Y. Virmani, and J. H. Payer. (2001). Corrosion costs and preventive strategies in the United States. FHWA-RD-01-156. [En línea.] Federal Highway Administration, Washington, D.C. <http://www.corrosioncost.com/>.

Koneman, A., Dowell, J., Sommers, W. 1988. Diagnóstico microbiológico.

Koneman, E., Allen S., Dowell, V.R., Sommers H. 1983. Diagnóstico microbiológico. Primera edición.

Little, B., Lee, J. 2007. Microbiologically Influenced Corrosion. New Jersey. John Wiley & Sons.

Mandigan, M., Martinko, J & Parker, J. 1999. Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice hall iberia. Madrid.

Merck, E. 1994. Darmstadt, Alemania.

Merck, E. 1982. Darmstadt, Alemania.

Miranda, E., Bethencour, M., Botana, F.J., Cano, M.J., Sanchez, J.M., Corzo, A., García, J., Fardeau, M., Ollivier, B. 2005. Biocorrosion of carbon steel alloys by a hydrogenotrophic sulphate reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexican oil field separator. Corrosion science. Article in Press.

Moos O., Gümpel, P. 2008. Comparison of the microbiological influence on the electro-chemical potential of stainless steel between macro- and micro-areas of specimens. *Electrochimica Acta* 54: 53–59.

Msd. 2007. Material safety data sheet. [En línea]: [www.jtbaker.com/msds](http://www.jtbaker.com/msds)

NACE international TMO194-94. 1994. Standard test method. 11 pag.

NACE international Tg237. 2005. Detection, Testing, and Evaluation of Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) on External Surfaces of Buried Pipelines.

Neria, I., Wang, E.T., Ramirez, F., Romero, J., Hernandez, C. 2006. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe*, 12: 122-133.

OXOID. 2007. Preparación de medios de cultivo. [En línea] [www.oxid.com](http://www.oxid.com)

Pope, D., Zintel, T.P., Kuruvilla, A.K., Siebert, O.W. (1988). Organic Acid Corrosion of Carbon Steel: A Mechanism of Microbiologically Influenced Corrosion. *Corrosion*, paper no. 7 (Houston, TX: NACE, 1988).

Simione, Frank P. 1998. Cryopreservation manual Nalge Nunc International. M.S. of the American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp. [En línea]: <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf>

Srikanth, S., Sankaranarayanan, T., Gopalakrishna, K., Narasimhan, B., Das, T., Swapna Kumar Das. (2005). Corrosion in a buried pressurised water pipeline. *Engineering Failure Analysis*, 12: 634–651.

Ulman, S. & Kretsinger, M. 2000. A Continued Case History of Microbial Influences in the Lost Hills Oilfield, Kern County, California [En línea] [www.variancereduction.com](http://www.variancereduction.com)

Valic, N., Celar, F., Kosmelj, K. & Gril, T. 2007. Evaluating the efficacy, corrosivity and phytotoxicity of some disinfectants against *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. using a new statistical measure. J. Plant Diseases and Protection, 114 (2), 49–53,

Videla, H. 2002. Prevention and control of biocorrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49: 259-270.

Videla, H. 1996. Manual of Biocorrosión. Lewis Publisher.

Virmani Y. Paul. 2002. Corrosion costs and preventive strategies in the United States U.S. Federal Highway administration (FHWA) U.S. Federal Highway Administration (FHWA) (2002), Report FHWA-RD-01–156, National Technical Information Service. 5285 Port Royal Road, Springfield, VA 22161

Zhu, X., Lubeck J., Kilbane, J. 2003. Characterization of Microbial Communities in Gas Industry Pipelines. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69: 5354–5363.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### **Medio líquido DRF (Dextrosa rojo de fenol) para Bacterias Productoras de Ácido (Según la norma NACE Standard TM0194, 2004)**

| <b>Composición</b>  | <b>g/l</b> |
|---------------------|------------|
| Peptona             | 10         |
| Extracto de carne   | 1          |
| Glucosa             | 5          |
| NaCl                | 5          |
| Rojo de fenol       | 0.018      |
| Agua destilada      | 1000 ml    |
| Ajusta el pH a 7,3. |            |

Esterilizar a 15 libras de presión y 121 °C durante 15 min. Dispensar 9 ml en tubos de ensayo, que se sellan corchos de silicona y tapa rosca.