

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y MORFOLÓGICA DE  
BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS) PROVENIENTES DE  
AGUAS DE PRODUCCIÓN DE UN CAMPO PETROLERO**

**DIANA CAROLINA PARRA CHAVEZ**

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

**2008**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y MORFOLÓGICA DE  
BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS) PROVENIENTES DE  
AGUAS DE PRODUCCIÓN DE UN CAMPO PETROLERO**

**DIANA CAROLINA PARRA CHAVEZ**

**Proyecto de grado para optar al título de Bióloga**

**Director:**

**Ph. D. JORGE HERNÁNDEZ TORRES**

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

**2008**

*A Dios por estar en mi vida y guiar cada paso que doy en el camino,  
A mis padres Vilma y Oscar por su amor y apoyo incondicional en todo  
momento,  
A mi hermana Maria Camila por su amor y paciencia,  
A toda mi familia por su apoyo y comprensión.*

*Diana Carolina*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Industrial de Santander por ser mi segundo hogar y por brindarme los conocimientos necesarios para crecer profesionalmente.

Al Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular, CINBIN, por acogerme y brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de éste proyecto.

A la Corporación para la Investigación de la Corrosión, CIC, por suministrarme los materiales y equipos necesarios para la realización de éste trabajo y por acogerme como parte de esa gran familia.

A mi director Jorge Hernández Torres por su confianza y la oportunidad que me brindó en la participación de éste proyecto.

A Mariela Carreño de Arango por despertar en mi el amor por la microbiología y por su amistad.

A Angelo, Tavo, Nedy, Mavy y Marce por su valiosa amistad, su apoyo incondicional en los momentos más difíciles y por compartir esta etapa inolvidable de mi vida.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron con mi formación y que hicieron posible la realización de éste trabajo.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 CORROSION INFLUENCIADA MICROBIOLÓGICAMENTE	18
1.2 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A PROCESOS CORROSIVOS	22
1.3 BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO	26
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GENERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIALES Y METODOS	33
3.1 FASE I	33
3.2 FASE II	39
3.2.3 Identificación Bioquímica.	39
3.3 FASE III	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS	44
4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA	48
4.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	81
4.3.8 Donadores de electrones.	92
4.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO	101
4.5 PRESERVACIÓN DE LAS BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO IDENTIFICADAS	106

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1. Industrias afectadas por la Corrosión Influenciada Microbiológicamente.</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 2. Composición del medio Lactato de Sodio para el aislamiento de las BRS.</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 3. Composición del medio Postgate B.</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 4. Muestras colectadas en el campo La Cira-Infantas.</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 5. Cepas aisladas a partir de las muestras colectadas.</b>	<b>48</b>
<b>Tabla 6. Descripción morfológica de las colonias, cepa 233 A.</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 7. Descripción morfológica de las colonias, cepa 233 A1.</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 8. Descripción morfológica de las colonias, cepa 233 B.</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 9. Descripción morfológica de las colonias, cepa 234 A.</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 10. Descripción morfológica de las colonias, cepa 234 B.</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 11. Descripción morfológica de las colonias, cepa 236 A.</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 12. Descripción morfológica de las colonias, cepa 236 B.</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 13. Descripción morfológica de las colonias, cepa 237 A.</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 14. Descripción morfológica de las colonias, cepa 237 A1.</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 15. Descripción morfológica de las colonias, cepa 237 B.</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 16. Descripción morfológica de las colonias, cepa 239 A.</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 17. Descripción morfológica de las colonias, cepa 239 A1.</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 18. Descripción morfológica de las colonias, cepa 239 B.</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 19. Principales características morfológicas de las células.</b>	<b>77</b>

<b>Tabla 20. Crecimiento de BRS a diferentes temperaturas.</b>	<b>81</b>
<b>Tabla 21. Crecimiento de BRS a diferentes valores de pH.</b>	<b>82</b>
<b>Tabla 22. Motilidad de las BRS aisladas.</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 23. Determinación de indol para BRS aisladas.</b>	<b>84</b>
<b>Tabla 24. Producción de Sulfuro de Hidrógeno en los aislados.</b>	<b>86</b>
<b>Tabla 25. Determinación de catalasa en BRS aisladas.</b>	<b>88</b>
<b>Tabla 26. Determinación de oxidasa para BRS aisladas.</b>	<b>91</b>
<b>Tabla 27. Crecimiento de BRS con diferentes donadores de electrones.</b>	<b>92</b>
<b>Tabla 28. Crecimiento de BRS aisladas con diferentes aceptores de electrones, 10 mM.</b>	<b>94</b>
<b>Tabla 29. Determinación de Desulfovirdina en los aislados.</b>	<b>96</b>
<b>Tabla 30. Determinación de la actividad Hidrogenasa para los aislados.</b>	<b>98</b>
<b>Tabla 31. Carta de colores para detección de actividad hidrogenasa.</b>	<b>100</b>
<b>Tabla 32. Bacterias reductoras de sulfato identificadas.</b>	<b>101</b>
<b>Tabla 33. Características morfológicas y fisiológicas de las bacterias reductoras de sulfato aisladas.</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1. Recolección de muestras en campo a partir de cabezales de pozo.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 2. Siembra de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 3. Jarra de anaerobiosis para incubación de BRS.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4. a) Crecimiento de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido. b) Precipitado de Sulfuro de Hierro.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 5. Crecimiento de BRS en medio sólido. Se observa el sobre el indicador de anaerobiosis.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 6. Crecimiento macroscópico de colonias en medio Postgate, cepa 233 A.</b>	<b>49</b>
<b>Figura 7. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 233 A1.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 8. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 233 B.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 9. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 234 A.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 10. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 234 B.</b>	<b>53</b>
<b>Figura 11. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 236 A.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 12. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 236 B.</b>	<b>55</b>
<b>Figura 13. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 237 A.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 14. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 237 A1.</b>	<b>57</b>

<b>Figura 15. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 237 B.</b>	<b>58</b>
<b>Figura 16. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 239 A.</b>	<b>59</b>
<b>Figura 17. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 239 A1.</b>	<b>60</b>
<b>Figura 18. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 239 B.</b>	<b>61</b>
<b>Figura 19. Observación microscópica de las células de la cepa 233 A. a) Agregados de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>64</b>
<b>Figura 20. Observación microscópica de las células de la cepa 233 A1. a) Agregados de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>65</b>
<b>Figura 21. Observación microscópica de las células de la cepa 233 B. a) Partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 22. Observación microscópica de las células de la cepa 234 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>67</b>
<b>Figura 23. Observación microscópica de las células de la cepa 234 B. a) Agregados de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 24. Observación microscópica de las células de la cepa 236 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hidrógeno, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>69</b>
<b>Figura 25. Observación microscópica de las células de la cepa 236 B. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 26. Observación microscópica de células de la cepa 237 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>71</b>
<b>Figura 27. Observación microscópica de células de la cepa 237 A1. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>72</b>
<b>Figura 28. Observación microscópica de las células de la cepa 237 B. a) Agregados de partículas de Sulfuro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>73</b>

<b>Figura 29. Observación microscópica de las células de la cepa 239 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 30. Observación microscópica de las células de la cepa 239 A1. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>75</b>
<b>Figura 31. Observación microscópica de las células de la cepa 239 B. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.</b>	<b>76</b>
<b>Figuras 32. Observación microscópica de las células bacterianas, 5X.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 33. Determinación de indol en aislados.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 34. Presencia de la enzima catalasa en las BRS aisladas.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 35. Determinación de Desulfovirdina en BRS aisladas. En la izquierda se observa una reacción negativa (tubo negro).</b>	<b>97</b>
<b>Figura 36. Kit para Determinación de Actividad Hidrogenasa, Caproco.</b>	<b>98</b>
<b>Figura 37. Determinación de Hidrogenasa. a) Montaje inicial de la prueba. b) Lectura final de la prueba. c) Presencia de la enzima Hidrogenasa</b>	<b>99</b>

## ABSTRACT

**TITLE: ISOLATION AND MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA (SRB) FROM PRODUCTION WATER OF AN OIL FIELD \***

**AUTHOR: PARRA CHÁVEZ, DIANA CAROLINA \*\***

**KEYWORDS:** Sulfate-Reducing Bacteria, Production water, Microbiologically-Influenced Corrosion, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*.

### DESCRIPTION:

Detailed studies about morphology and physiology of sulfate-reducing bacteria (SRB) are limited.

In this work, were isolated SRB from production water of an oil field with conventional microbial techniques. Thirteen strains were characterized morphologically and physiologically using tests for catalase, oxidase, motility, Gram stain, indole, growth in different temperatures and pH, hydrogen sulfide production, growth with different electron donors and acceptors, desulfovirdin and hydrogenase.

Twelve strains were desulfovirdin positive and were vibrio-shaped, typical characteristics of the genus *Desulfovibrio*. On the other hand, one strain was desulfovirdin negative and was straight rods, typical characteristics of the genus *Desulfomicrobium*. All strains were hydrogenase positive, stained Gram negative, motile, mesophilic, oxidase negative and catalase positive. As electron donors, lactate, ethanol, succinate, fumarate and benzoate were used by all isolates, they were not able to grow on acetate. All strains grew on sulfate and thiosulfate as electron acceptors. Sulfite, nitrate, fumarate and sulfur were used by some strains.

The results obtained indicate that the genus *Desulfovibrio* and *Desulfomicrobium* are the main microorganisms found in production water, presumably because they are able to degrade different organic compounds as electron donors and carbon source.

\*

---

\* Research Project.

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

## RESUMEN

**TITULO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUÍMICA Y MORFOLÓGICA DE BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO (BRS) PROVENIENTES DE AGUAS DE PRODUCCIÓN DE UN CAMPO PETROLERO \***

**AUTOR: PARRA CHÁVEZ, DIANA CAROLINA \*\***

**PALABRAS CLAVES:** Bacterias reductoras de sulfato, aguas de producción, corrosión influenciada microbiológicamente, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*.

### DESCRIPCIÓN:

Los estudios detallados acerca de la morfología y fisiología de bacterias reductoras de sulfato (BRS) son relativamente pocos.

En éste trabajo se aislaron BRS provenientes de aguas de producción de un campo petrolero, empleando técnicas microbiológicas convencionales. Trece cepas fueron caracterizadas morfológica y fisiológicamente, empleando pruebas para catalasa, oxidasa, motilidad, tinción de Gram, indol, crecimiento a diferentes temperaturas y pH, producción de Sulfuro de Hidrógeno, crecimiento con diferentes donadores y aceptores de electrones, desulfovirdina e hidrogenasa.

Doce cepas fueron desulfovirdina positiva y presentaron morfología de vibrio, características particulares del género *Desulfovibrio*. Por el contrario, la cepa restante fue desulfovirdina negativa con morfología bacilar, perteneciente al género *Desulfomicrobium*. La presencia de hidrogenasa fue positiva para los trece aislados. Todos fueron Gram negativos, móviles, mesófilos, oxidasa negativa y catalasa positiva. Ninguno empleó acetato como donador de electrones, pero sí lactato, etanol, succinato, fumarato y benzoato. Los aceptores de electrones usados por los trece aislados fueron el sulfato y tiosulfato. El sulfito, nitrato, fumarato y azufre fueron empleados por la mayoría.

Estos resultados indican que los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* son los principales microorganismos encontrados en las aguas de producción, probablemente debido a que éstos presentan gran versatilidad para degradar diferentes compuestos orgánicos, empleándolos como donadores de electrones y fuente de carbono.

\*

---

\* Trabajo de grado.

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

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pueden afectar directa o indirectamente la integridad de diversos materiales metálicos empleados en los sistemas industriales causando corrosión, principal fuente de problemas y pérdidas económicas en un gran número de industrias (Jack, 2002).

La biocorrosión o corrosión influenciada microbiológicamente, es el resultado de interacciones entre los microorganismos, sus metabolitos y las superficies metálicas, siendo éstas últimas modificadas y deterioradas (Beech & Sunner, 2004).

Los principales microorganismos que participan en la corrosión son las bacterias reductoras de sulfato (BRS). Estas bacterias, requieren ambientes anaerobios para llevar a cabo sus procesos metabólicos, los cuales implican la reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno, principal producto de corrosión (Keresztes et al., 1998).

Estudios acerca de la morfología y fisiología de éste grupo bacteriano son escasos, debido a las dificultades durante la manipulación de dichos microorganismos empleando técnicas microbiológicas convencionales (Rapp & Wall, 1987). Estas técnicas son de uso limitado para la cuantificación y caracterización de poblaciones ambientales, debido a que la mayoría de microorganismos no crecen in vitro, pues los medios de cultivo difieren de las condiciones naturales de crecimiento y diferentes cepas son interdependientes (Santegoeds et al., 1998).

Debido a su gran importancia para la industria petrolera colombiana, es fundamental citar la corrosión microbiológica como uno de los principales problemas en los campos de explotación, donde se produce ataque directo al

metal y pérdida de la calidad de los productos. En consecuencia, los análisis de carácter microbiológico son indispensables para detectar la presencia de grupos bacterianos que puedan ser una posible amenaza en éstos sistemas.

Este estudio provee información preliminar acerca de los microorganismos alojados en éstos sistemas, con el fin de desarrollar una alternativa para lograr el control de estas bacterias y evitar la corrosión influenciada por ellas.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 CORROSION INFLUENCIADA MICROBIOLÓGICAMENTE

**1.1.1 Principios Electroquímicos.** Las interacciones electroquímicas entre un material metálico y su ambiente pueden causar corrosión. La corrosión electroquímica es una reacción que implica la transferencia de electrones del metal a un aceptor de electrones externo, causando la liberación de los iones metálicos al ambiente y el deterioro del metal (Beech & Sunner, 2004).

Para que ocurra el proceso de corrosión en un ambiente acuoso, se requiere la formación de una celda de corrosión electroquímica, la cual consta de cuatro elementos básicos: el ánodo, área del metal corroida; el cátodo, área del metal no corroida; el electrolito, líquido en el cual los metales están en contacto; y la conexión eléctrica entre el ánodo y el cátodo que permite el flujo de electrones entre ellos (Bradford, 1993).

En soluciones aireadas, la reacción catódica es la reducción del oxígeno, mientras en soluciones anóxicas es usualmente la evolución del hidrógeno. La tasa de la reacción anódica (disolución del metal) disminuye gradualmente con el tiempo, debido a que los productos de oxidación (productos de corrosión) se adhieren a la superficie formando una capa protectora que actúa como una barrera. La estabilidad de estas capas depende de su química y morfología, y determina la susceptibilidad del metal a la corrosión. La actividad microbiana dentro de las biopelículas formadas sobre las superficies de los materiales metálicos pueden afectar la cinética de las reacciones catódicas y/o anódicas (Jones & Amy, 2002) y puede modificar considerablemente la química de cualquier capa protectora, llevando a la aceleración o inhibición de la corrosión (Little & Ray, 2002).

**1.1.2 Impacto Económico de la Biocorrosion.** El impacto económico de la corrosión microbiana es muy significativo. Knox (1968) estimó que el biodeterioro de los materiales tenía un costo de 1000 millones de dólares por año, en donde la mayor contribución fue de la corrosión microbiana. Iverson (1972) reportó que el costo de la corrosión microbiana de tuberías enterradas en Estados Unidos, fue aproximadamente entre \$500 a \$2000 millones por año y en la industria del petróleo, el 77% de las fallas en un grupo de pozos productores de petróleo fueron atribuidos a éste fenómeno (Parkins, 1982).

En Sur Africa, se ha detectado biocorrosión de acero al carbono en sistemas de enfriamiento, y los costos asociados con la reparación se estimaron en millones de dólares al año. Jack et al., (1992) estimaron que el 34% de los daños causados por la corrosión experimentados por una compañía petrolera estuvieron relacionados a microorganismos ( Beech & Gaylarde, 1999).

De acuerdo a recientes estudios, los daños ocasionados por la corrosión en los Estados Unidos se estima en \$276 billones. Análisis similares en Reino Unido, Japón, Australia y Alemania estiman el costo de la corrosión entre el 1 y 5% del producto bruto nacional.

La corrosión influenciada microbiológicamente se reporta como responsable del 50% del costo total de la corrosión. Las industrias mas afectadas por la biocorrosión (Tabla 1) son las de generación de energía, producción de petróleo, transporte y almacenamiento; y distribución de agua (Little & Lee, 2007).

**Tabla 1. Industrias afectadas por la Corrosión Influenciada Microbiológicamente.**

INDUSTRIA	AREAS AFECTADAS
Industrias para procesamiento de químicos	Tanques y tuberías de acero inoxidable.
Generación de energía nuclear	Tanques y tuberías en acero al carbono y acero inoxidable, sistemas de enfriamiento de agua en aluminio-bronce, acero inoxidable y cobre-níquel.
Industrias de gas y petróleo	Sistemas de flujo de agua: sistemas de manipulación de gas y petróleo, particularmente ambientes contaminados con sulfuro producido por bacterias sulfato-reductoras.
Industria de tuberías subterráneas	Suelos arcillosos saturados con agua, de pH neutro con materia orgánica.
Industria de tratamiento de aguas	Intercambiadores de calor y tuberías.
Industria de tratamiento de aguas residuales	Estructuras en concreto.
Industria para el mantenimiento de vías	Tuberías.
Industria de Aviación	Tanques de aluminio y tanques de almacenamiento de combustible.

Fuente: Tomado de Jones, 1996.

**1.1.3 Aspectos Generales de la Biocorrosion.** El deterioro del metal debido a la actividad microbiana es denominada biocorrosión o corrosión influenciada microbiológicamente, CIM (Beech & Sunner, 2004). Es una de las principales

formas de corrosión que contribuye a las grandes pérdidas en la economía y a la contaminación del ambiente.

Se define como la degradación de estructuras metálicas que resulta de la actividad de una variedad de organismos, los cuales producen metabolitos agresivos creando un ambiente corrosivo, o participando directamente en las reacciones electroquímicas que ocurren sobre la superficie del metal (Parkins, 1982).

Los microorganismos adicionan al proceso de corrosión diversos efectos derivados de sus interacciones con el ambiente que rodea la superficie del metal. Debido a que ésta interacción es muy intensa, se espera que la participación microbiana aumente el daño producido sobre la superficie metálica.

La corrosión abiótica se caracteriza por comportarse como un sistema de dos componentes, éstos son el metal y la solución. En biocorrosión, el sistema se convierte en uno de tres elementos que son el metal, la solución y los microorganismos; y el comportamiento de la interface de metal/ solución es condicionada por la interacción entre los tres componentes (Videla, 1996).

En ambientes naturales, los microorganismos se adhieren a los metales y colonizan superficies formando biopelículas (Srivastava, 1998). Estas son definidas como una comunidad estructurada de células bacterianas suspendidas en una matriz de exopolisacáridos, EPS (Dunne, 2002). La formación de biopelículas sobre metales es el resultado de un proceso acumulativo, no necesariamente uniforme en tiempo y espacio, que inicia inmediatamente después de la inmersión del metal en un ambiente acuoso. Una película delgada se forma debido al depósito de iones inorgánicos y compuestos orgánicos. Esta capa inicial puede alterar las cargas electrostáticas de la superficie del metal, facilitando su colonización por bacterias. En muy poco tiempo, el crecimiento microbiano y la producción de

EPS resulta en el desarrollo de una biopelícula madura, la cual se convierte en un sistema dinámico en donde se llevan a cabo diferentes procesos de transporte y reacciones químicas (Videla & Herrera, 2005).

## **1.2 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A PROCESOS CORROSIVOS**

**1.2.1 Características Generales.** Los microorganismos implicados en biocorrosión de metales tales como el hierro, cobre, aluminio y sus aleaciones son fisiológicamente diversos. Su capacidad para influenciar la corrosión de muchos metales normalmente considerados resistentes, en una variedad de ambientes, hace a los microorganismos una amenaza real para la estabilidad de aquellos metales (Beech & Gaylarde, 1999).

Las bacterias han recibido la mayor atención por su influencia en la corrosión (Little & Lee, 2007). Estos microorganismos pueden coexistir en biopelículas que ocurren naturalmente, formando consorcios que son capaces de afectar los procesos electroquímicos a través de un metabolismo co-operativo que no se observa en especies individuales (Beech & Gaylarde, 1999).

Las principales características de los microorganismos asociados a la corrosión microbológica se citan a continuación (Borenstein, 1994):

- Son pequeños, a menudo menores que una micra.
- Son ubicuos.
- Móviles así como también sésiles.
- Pueden unirse a las superficies metálicas cuando sea necesario.
- Son resistentes o toleran un amplio rango de temperaturas, presiones, pHs y concentraciones de oxígeno.
- Crecen en colonias mixtas. Pueden formar consorcios creando un ambiente para la supervivencia de muchos organismos que no podrían vivir solos.
- Se reproducen rápidamente bajo ciertas condiciones favorables.

- Son resistentes a diversos químicos.
- Pueden producir una variedad de ácidos, como el acético, sulfúrico y fórmico.
- Producen películas, conocidos como polímeros extracelulares. Estas películas (similares a las sustancias secretadas por caracoles), atrapan nutrientes y actúan como grietas o crean celdas de concentración de oxígeno.
- Pueden oxidar o reducir metales o iones metálicos.

**1.2.2 Principales Grupos Bacterianos Asociados a Biocorrosión.** Los principales tipos de bacterias asociadas con fallas por corrosión de estructuras de hierro y de acero inoxidable, son las sulfato-reductoras, oxidadoras de azufre, oxidadoras y reductoras de hierro, oxidadoras de manganeso y que secretan ácidos orgánicos y exopolímeros (Beech & Gaylarde, 1999).

- **Bacterias reductoras de sulfato.** Las bacterias reductoras de sulfato (BRS) son un grupo de diversos anaerobios los cuales llevan a cabo la reducción desasimilatoria de compuestos de azufre tales como el sulfato, sulfito, tiosulfato y el azufre elemental, a sulfuro.

Las industrias de gas y petróleo son seriamente afectadas por los sulfuros generados por éstas bacterias. La producción biogénica de sulfuro tiene como consecuencia problemas de salud y seguridad, riesgos ambientales y pérdidas económicas severas por la corrosión de equipos. Desde las investigaciones preliminares sobre los efectos de las BSR en la corrosión del hierro en 1930, el rol de éstas bacterias en la corrosión por picadura de varios metales y sus aleaciones en ambientes acuáticos y terrestres, bajo condiciones anóxicas y oxigénicas, ha sido confirmado.

Diversos modelos se han propuesto para explicar los mecanismos por los cuales las bacterias reductoras de sulfato pueden influenciar la corrosión del acero y es claro que la actividad de reducción del sulfato de alguna manera

está implicada. El producto de ésta actividad, el sulfuro, es corrosivo; sin embargo, el sulfuro derivado químicamente no tiene el mismo grado de agresividad (Beech & Gaylarde, 1999).

Las BRS son encontradas en sedimentos marinos y de agua dulce en donde el sulfato está presente. También son comúnmente encontradas en biopelículas desarrolladas sobre las superficies de sistemas industriales como intercambiadores de calor, tuberías de campos petroleros, sistemas de aguas residuales y torres de enfriamiento (Sungur et al., 2007).

- **Bacterias Reductoras de Metales.** Estas bacterias son conocidas por promover la corrosión del hierro y sus aleaciones a través de reacciones que llevan a la disolución de películas de óxido resistentes a la corrosión sobre la superficie del metal. Estos resultados en la capas protectoras sobre superficies como el acero inoxidable, son perdidas o reemplazadas por películas metálicas menos estables las cuales permiten que la corrosión ocurra.

A pesar de su abundancia en la naturaleza e importancia en la corrosión industrial, la reducción metálica causada por bacterias no ha sido considerada recientemente en las reacciones de corrosión.

Numerosos tipos de bacterias, incluyendo aquellos de los géneros *Pseudomonas* y *Shewanella*, son capaces de llevar a cabo la reducción de la película de óxido de hierro y/o manganeso y se ha mostrado su influencia en la corrosión (Beech & Gaylarde, 1999).

- **Bacterias que Depositán Metales.** Bacterias del género *Siderocapsa*, *Gallionella*, *Leptothrix*, *Sphaerotilus*, *Crenothrix* y *Clonothrix* participan en la biotransformación de óxidos de metales como hierro y manganeso. Las bacterias que depositan hierro como *Gallionella* y *Leptothrix*, oxidan  $Fe^{+2}$ , disuelto en el medio o como precipitado, a  $Fe^{+3}$ . Las bacterias de los géneros citados anteriormente también son capaces de oxidar iones manganesos a iones mangánicos formando depósitos de dióxido de manganeso.

Estas bacterias son típicamente asociadas con la formación de tubérculos, depósitos macroscópicos que consisten de microorganismos y materiales orgánicos e inorgánicos; formando bajo éstos, picadura en el acero inoxidable. La resistencia de las aleaciones como el acero inoxidable a la corrosión, se debe a una película delgada de óxido. La formación de depósitos orgánicos e inorgánicos por éste tipo de bacterias sobre la superficie de óxido, compromete la estabilidad de ésta película. Una gran abundancia de bacterias que depositan metales, puede promover las reacciones de corrosión al depositar óxidos mangánicos y férricos (Beech & Gaylarde, 1999).

- **Bacterias Productoras de Limos o Secreciones.** Los microorganismos que producen grandes cantidades de EPS durante el crecimiento en las biopelículas, han sido implicadas en el ataque localizado del acero inoxidable. Los principales géneros bacterianos productores de éstas sustancias, son *Clostridium spp*, *Flavobacterium spp*, *Bacillus spp*, *Desulfovibrio spp*, *Desulfotomaculum spp* y *Pseudomonas spp*.

El rol de los EPS en la biocorrosión del acero inoxidable no ha sido claro. Sin embargo, se ha postulado que no son suficientes para inducir la corrosión biológica del acero. Además, se ha sugerido que los EPS protegen las superficies metálicas de la corrosión. Un consorcio bacteriano entre *Bacillus sp.* y *Deleya marina* produjeron EPS que se unía al metal y que redujo la tasa de corrosión de acero al carbono en un 94% (Beech & Gaylarde, 1999).

- **Bacterias Productoras de Acido.** Las bacterias pueden producir abundantes cantidades de ácidos orgánicos e inorgánicos como productos del metabolismo. Bacterias acidofílicas oxidadoras de azufre como *Thiobacillus spp*, oxidan formas reducidas del azufre a sulfuro. Estos microorganismos pueden causar corrosión severa en equipos de minería. Bacterias que producen ácidos orgánicos fueron sugeridos como la causa

principal en un caso de corrosión de acero al carbono en una planta generadora de energía.

Los ácidos acético, fórmico y láctico son comunes productos del metabolismo de las bacterias productoras de ácido. Al ser producidos, éstos se concentran en la superficie del metal favoreciendo los procesos corrosivos (Beech & Gaylarde, 1999).

### 1.3 BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO

**1.3.1 Características Generales.** Las bacterias reductoras de sulfato (BRS) son microorganismos procariotas, bacterias y arqueas, que pueden usar el sulfato como aceptor terminal de electrones en su metabolismo llevando a cabo la reducción desasimilatoria del sulfato.

La mayoría de las BRS descritas pertenecen a uno de los cuatro linajes filogenéticos:

- Proteobacteria mesofílicos: con los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*.
- Bacterias Gram negativas termofílicas, con el género *Thermodesulfovibrio*.
- Bacterias Gram positivas, con el género *Desulfotomaculum*.
- Euryarqueota, con el género *Archaeoglobus* (Castro et al., 2000).

Un quinto linaje, Thermodesulfobiaceae, ha sido descrito recientemente (Mori et al., 2003).

Muchas BSR son versátiles debido a que pueden usar aceptores de electrones diferentes al sulfato para la respiración anaerobia. Estos incluyen azufre elemental, fumarato, nitrato, dimetilsulfóxido, Mn(IV) y Fe(III). Las BRS pueden crecer a expensas de la reducción del sulfato solo en completa ausencia de oxígeno molecular. Son microorganismos anaerobios estrictos y son principalmente encontrados en hábitats anóxicos ricos en sulfato.

Debido a que la mayoría de BRS pueden usar aceptores de electrones diferentes al sulfato, pueden ser encontradas en hábitats anóxicos con poco sulfato como el tracto intestinal humano. Sin embargo, son mas abundantes en hábitats en donde la disponibilidad del éste ion no es limitada (Barton & Hamilton, 2007).

Aunque morfológicamente sean diversas, las bacterias sulfato-reductoras pueden considerarse un grupo fisiológico unificado. Actualmente se reconocen 18 géneros de bacterias que llevan a cabo la reducción desasimilatoria del sulfato y pueden subdividirse en dos grandes subgrupos. Los géneros del grupo I como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* y *Desulfobulbus*, usan lactato, piruvato, etanol o ciertos ácidos grasos como fuentes de carbono y energía, reduciendo el sulfato a sulfuro de hidrógeno.

Los géneros del grupo II, como *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* y *Desulfonema*, están especializados en la oxidación de los ácidos grasos, particularmente acetato, reduciendo el sulfato a sulfuro.

Las bacterias sulfato-reductoras están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres que se vuelven anóxicos debido a procesos microbianos de descomposición. El género mejor estudiado es *Desulfovibrio*, que es frecuente en hábitats acuáticos o suelos encharcados con materia orgánica abundante y suficiente cantidad de sulfato. *Desulfotomaculum* comprende bacilos formadores de esporas que se encuentran principalmente en el suelo y comprende una especie termófila. Los otros géneros de reductores de sulfato son propios de ambientes anóxicos de aguas continentales o marinas (Madigan et al., 1999, p. 671).

**1.3.2 Fisiología de las Bacterias Reductoras de Sulfato.** Son muchos los donadores de electrones usados por las bacterias sulfato-reductoras.  $H_2$ , lactato y piruvato son utilizados casi universalmente, y muchas especies del grupo I utilizan malato, formiato y determinados alcoholes primarios (como el metanol, etanol, propanol y butanol). Algunas cepas de *Desulfotomaculum* utilizan glucosa, pero esto es bastante raro entre las BSR. Las bacterias sulfato-reductoras del grupo I oxidan su fuente de energía al nivel de acetato y excretan este ácido graso como producto final.

Los organismos del grupo II difieren de los del grupo I por su capacidad de oxidación de ácidos grasos, lactato, succinato y en algunos casos, incluso benzoato, para formar  $CO_2$ .

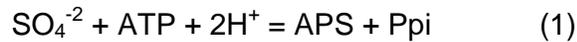
*Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum* y algunas especies de *Desulfovibrio* tienen la propiedad exclusiva de crecer quimiolitotróficamente con  $H_2$  como donador de electrones, sulfato como aceptor de electrones y  $CO_2$  como única fuente de carbono (es decir presentan crecimiento autotrófico).

Además de usar sulfato como aceptor de electrones, muchas de estas bacterias crecen usando nitrato ( $NO_3^-$ ) como aceptor de electrones, reduciendo el  $NO_3^-$  a amoníaco,  $NH_3$ , o pueden usar ciertos compuestos orgánicos para generar energía a partir de vías metabólicas fermentativas en ausencia absoluta de sulfato o de otros aceptores terminales de electrones.

El compuesto fermentable más corriente es el piruvato que mediante la reacción produce acetato,  $CO_2$  y  $H_2$ . Con lactato o etanol, la fermentación no produce suficiente energía y se requiere sulfato (Madigan et al., 1999, p. 673-674).

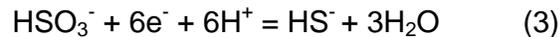
**1.3.3 Bioquímica de la Reducción de Sulfato.** La reducción de  $\text{SO}_4^{-2}$  a sulfuro de hidrógeno, una reducción de ocho electrones, ocurre mediante ciertas fases intermedias.

El ion sulfato es estable y no puede usarse sin que antes se active. El sulfato se activa por el ATP. La enzima ATP sulfurilasa cataliza la unión del ion sulfato a un fosfato del ATP, originando la formación de adenosina fosfosulfato, APS (1). En la reducción desasimilatoria del sulfato, la porción sulfato de la APS se reduce directamente a sulfito ( $\text{SO}_3^{-2}$ ) con la separación de AMP (2).



En la reducción asimilatoria se añade otro fósforo al APS para formar fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS), y solo entonces se reduce la porción sulfato.

En ambos casos, el primer producto de la reducción del sulfato es el sulfito,  $\text{SO}_3^{-2}$ . Una vez formado, el  $\text{SO}_3^{-2}$ , las reducciones siguientes son muy rápidas (3).



Varios organismos incapaces de llevar a cabo la reducción desasimilatoria de sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) son capaces de realizar la reducción desasimilatoria de sulfito ( $\text{SO}_3^{-2}$ ), probablemente porque, aunque son capaces de convertir el sulfito a  $\text{H}_2\text{S}$ , carecen del sistema APS y por tanto son incapaces de reducir el sulfato a sulfito.

Las bacterias reductoras de sulfato realizan un transporte de electrones basado en citocromos, transfiriendo electrones desde la fuente de energía al

ion sulfato en el APS y al sulfito. El citocromo de las bacterias sulfato-reductoras es un citocromo c muy electronegativo llamado citocromo c3. Este no se encuentra en organismos que usan otros aceptores de electrones. Otros transportadores de electrones de estas cadenas de transporte son ferredoxina y flavodoxina. Los reductores de sulfato de tipo II (especies que degradan acetato y otros ácidos grasos) también contienen un citocromo de tipo b que se supone está implicado en la cadena de transporte de electrones de estas especies; el citocromo b no aparece en BSR que no degradan ácidos grasos.

En las BRS el H<sub>2</sub> generado de algunos donadores de electrones o procedente del medio, transfiere electrones a la enzima hidrogenasa, situada en el periplasma y asociada con el citocromo c3. cuando los átomos H del H<sub>2</sub> se oxidan, los protones (H<sup>+</sup>) permanecen fuera de la membrana, mientras que los electrones se transfieren a través de ella generando un gradiente de protones que puede ser usado para la síntesis de ATP. En el citoplasma los electrones se emplean en la reducción de APS y sulfito (Madigan et al., 1999, p. 505).

**1.3.4 Importancia de las BRS en la industria.** Las bacterias reductoras de sulfato cumplen un rol económico muy importante en muchos aspectos de la tecnología petrolera. Son las responsables de causar la corrosión en la maquinaria de bombeo y tanques de almacenamiento. Además, debido a la producción de sulfuro de hidrógeno contaminan los productos del petróleo y aumenta los niveles de azufre del mismo.

Son importantes en procesos de recuperación secundaria de crudo, en donde el crecimiento bacteriano en aguas de inyección puede obstruir la maquinaria usada en estos procesos. Se ha sugerido que estos organismos pueden jugar un papel importante en la biogénesis de hidrocarburos. Por todas estas razones las BSR son de vital importancia en industrias de producción y procesamiento de petróleo (Luptakova, 2007).

En muchos procesos industriales el sulfuro de hierro producido por las BRS causa ennegrecimiento y decoloración de los productos. Por ejemplo, en industrias del papel, las BRS pueden contaminar las aguas para el procesamiento, llevando a la producción de sulfuro que posteriormente ennegrece el papel (Maukonen et al., 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Aislar y caracterizar bioquímica y morfológicamente bacterias reductoras de sulfato a partir de aguas de producción de un campo petrolero.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar bacterias reductoras de sulfato a partir de aguas de producción de un campo petrolero.
- 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. MATERIALES Y METODOS**

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Parque Tecnológico de la Universidad Industrial de Santander en la sede de Guatigará en Piedecuesta, Santander.

Las pruebas fueron ejecutadas gracias a un convenio entre el Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular – CINBIN – de la UIS, y la Corporación para la Investigación de la Corrosión – CIC.

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en las siguientes etapas:

#### Fase I

Aislamiento de bacterias reductoras de sulfato (BRS) a partir de aguas de producción de un campo petrolero.

#### Fase II

Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias reductoras de sulfato aisladas.

#### Fase III

Preservación de las bacterias reductoras de sulfato caracterizadas.

### **3.1 FASE I**

#### **AISLAMIENTO DE BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO:**

**3.1.1 Área de Estudio.** Los campos La Cira-Infantas son considerados como los de mayor producción a lo largo de la historia en la cuenca del valle medio

del Magdalena. Se encuentran ubicados al oriente del río Magdalena y al sur del río Sogamoso, abarcando un área de 160 kilómetros cuadrados y a 22 kilómetros de Barrancabermeja.

Se caracterizan 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 de La Cira-Infantas 1.703 pozos, de los cuales 572 son productores y 60 son inyectores de agua (ECOPETROL, 2003).

**3.1.2 Recolección de las Muestras.** Las muestras de agua fueron colectadas a partir de 5 cabezales de pozo, del campo petrolero La Cira-Infantas, los días 20 y 21 de noviembre del año 2006.

Para la toma de muestras, se empleó 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, CIC.

Al iniciar la actividad, las facilidades de muestreo fueron purgadas durante 1min, dejando drenar el líquido contenido en ellas para garantizar la toma de una muestra representativa. Posteriormente, las muestras fueron colectadas asépticamente en frascos Schott tapa azul de cierre hermético con capacidad para 100 ml (Figura 1) y rotuladas con el punto de muestreo, fecha, hora, temperatura, pH y observaciones particulares, tales como presencia de sólidos, coloración, entre otras.

**Figura 1. Recolección de muestras en campo a partir de cabezales de pozo.**



Seguidamente, las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en una nevera plástica bajo condiciones de refrigeración (4 °C aproximadamente) evitando superar las 48 h luego de la recolección en campo.

**3.1.3 Aislamiento de Bacterias en Medio Anoxigénico.** Para el aislamiento de las bacterias reductoras de sulfato se empleó el medio de cultivo Lactato de Sodio, ampliamente usado para la detección y estimación de BRS en la industria (Tabla 2). Este permite la reducción del sulfato a sulfuro que se evidencia por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro (FeS).

**Tabla 2. Composición del medio Lactato de Sodio para el aislamiento de las BRS.**

<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD (g/l)</b>
60% Lactato de Sodio	4ml
Extracto de Levadura	1,0
Acido ascórbico	0,1
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,01
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	10,0
Agua Destilada	1000ml
pH 7,3	

Fuente: Tomado de NACE, 2004.

El medio de cultivo fue preparado según la norma NACE TM0194-2004, siendo distribuido en tubos de ensayo tapa rosca en alícuotas de 9 ml, los cuales fueron sometidos a una corriente de nitrógeno desplazando el oxígeno presente en el medio. Los tubos fueron sellados con un corcho de silicona y tapa rosca, según la técnica de Hungate (Miller & Wolin, 1974) y finalmente se esterilizaron por calor húmedo a 121 °C durante 15 min.

Para el procedimiento de siembra, cada tubo de ensayo fue inoculado con 1ml de la muestra usando una jeringa estéril, siendo cada muestra procesada por duplicado (Figura 2). Posteriormente, se llevó a incubación a 32 °C durante 28 días para permitir el crecimiento de las bacterias reductoras de sulfato (NACE, 2004).

**Figura 2. Siembra de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido.**



Al observar el crecimiento bacteriano, se realizaron continuos repiques de los aislados en medio Posgate B (Postgate, 1963) incubando a 32 °C durante 8 días.

A partir de los repiques en medio líquido, se procedió a realizar la siembra en medio sólido Postgate (Tabla 3). El medio fue servido en cajas de Petri previamente esterilizadas. Las cajas fueron llevadas a incubación a 32 °C por 24 h con el fin de realizar prueba de esterilidad.

**Tabla 3. Composición del medio Postgate B.**

COMPOSICIÓN	CANTIDAD (g/l)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0

Lactato de Sodio	3,5
Extracto de Levadura	1,0
Acido ascórbico	0,1
Acido Tioglicólico	0,1
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,5
Agar	15,0
pH 7,6	

A partir de cada cultivo líquido, se tomó una alícuota de 0,1 ml con una jeringa estéril, y se inoculó sobre el medio sólido. Usando un asa estéril, el inóculo fue distribuido sobre la superficie del medio empleando la técnica de siembra por agotamiento (Madigan et al., 1999). Posteriormente, las cajas se incubaron a 32 °C durante 28 días en una jarra de anaerobiosis (2,5L), en la cual se introdujo un indicador de anaerobiosis ANAEROTEST y un sobre de anaerobiosis ANAEROGEN (Oxoid, UK), garantizando las condiciones de anoxigenia, necesarias para el crecimiento de reductoras de sulfato (Figura 3).

**Figura 3. Jarra de anaerobiosis para incubación de BRS.**



Al observar la morfología de las colonias sobre el medio sólido, se procedió a realizar repetidos pases con el fin de garantizar su aislamiento y la obtención de cultivos axénicos. Seguidamente, se realizaron repiques en medio líquido

Postgate B, y la caracterización macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana.

## **3.2 FASE II**

### **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUIMICA**

**3.2.1 Caracterización Macroscópica.** La descripción detallada de las colonias formadas sobre la superficie del medio sólido, fue realizada mediante inspección visual teniendo en cuenta parámetros como forma, superficie, color, borde, lustre y tamaño de las colonias.

**3.2.2 Caracterización Microscópica.** El análisis microscópico se realizó empleando la tinción de Gram, la cual permitió observar distribuciones particulares de las bacterias, su morfología y el grupo al cual pertenecen. La observación se realizó a 5X, 40X y 100X.

**3.2.3 Identificación Bioquímica.** Las colonias aisladas fueron identificadas empleando pruebas bioquímicas convencionales. A continuación se citan las pruebas realizadas:

1. Rango de crecimiento a diferentes temperaturas.
2. Rango de crecimiento a diferentes valores de pH.
3. Determinación de motilidad.
4. Determinación de Indol.
5. Producción de Sulfuro de Hidrógeno (H<sub>2</sub>S).
6. Determinación de Catalasa.
7. Determinación de Oxidasa.
8. Determinación de Desulfoviridina.
9. Determinación de Hidrogenasa.
10. Donadores de electrones..

## 11. Aceptores de electrones.

Para la ejecución de las pruebas en tubo de ensayo, se empleó la técnica de Hungate (Miller & Wolin, 1974), que mantiene las condiciones de anoxigenia.

- **Rango de Crecimiento a Diferentes Temperaturas.** Para realizar esta prueba, se tomaron tubos de ensayo tapa rosca cada uno con 9 ml de medio líquido Postgate B. Estos fueron debidamente rotulados con la cepa, replica (A, B o C) y temperatura a evaluar. Cada cepa fue procesada por triplicado en cada una de las temperaturas seleccionadas. Posteriormente, a cada tubo fue inoculado 1 ml del cultivo bacteriano respectivo y llevado a incubar.

Para ésta prueba fueron seleccionadas 3 temperaturas: 30 °C, 45 °C y 60 °C, manteniendo la incubación por 28 días.

El ennegrecimiento del medio de cultivo indicó un resultado positivo.

- **Rango de crecimiento a diferentes valores de pH.** Empleando tubos de ensayo tapa rosca cada uno con 9 ml de medio líquido Postgate B, se inoculó 1 ml de la cepa. El pH del medio fue ajustado con soluciones 1M HCl y 1M NaOH, a los diferentes valores a evaluar: 4.5, 5.0, 8.0, 8.5 (Mogensen et al., 2005).

Cada cepa fue procesada por triplicado. Los tubos se llevaron a incubación por 28 días a 32 °C. Un resultado positivo fue evidenciado por el ennegrecimiento del medio.

- **Determinación de Motilidad.** Para la ejecución de la prueba, se empleó el medio SIM (Sulfuro-Indol-Motilidad), sembrando el inóculo por picadura (Koneman et al., 1988) y llevando a incubar a 32 °C durante 8 días. El crecimiento dentro y fuera de la línea de siembra indicó una prueba positiva.

- **Determinación de Indol.** Para la ejecución de la prueba, se tomó una colonia de cada cepa sembrándola por picadura en un tubo con medio SIM. Los tubos fueron incubados 8 días a 32 °C. Posteriormente, a cada tubo se le

adicionaron 10 gotas del reactivo de Kovac dejándolas resbalar por la pared interna del tubo. La aparición de un color rojo en la superficie segundos después de agregar el revelador, indicó la presencia de indol (Koneman et al., 1988).

- **Producción de Sulfuro de Hidrógeno.** Para la detección del sulfuro de hidrógeno, se emplearon dos medios: SIM (Koneman et al., 1988) y Postgate B modificado (5g/l de agar). Los tubos con los medios fueron inoculados con la cepa sembrándola por picadura (Koneman et al., 1988), y se llevó a incubar a 32 °C 8 días. El ennegrecimiento de los medios indicaron un resultado positivo.

- **Determinación de Catalasa.** A partir de un medio sólido y empleando un palillo de madera estéril, se tomó una colonia bacteriana que fue depositada sobre una lámina portaobjeto. Seguidamente, se adicionó una gota de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La formación de burbujas indicó un resultado positivo (Koneman et al., 1988).

- **Determinación de Oxidasa.** La determinación de oxidasa en el laboratorio se realizó tomando una colonia de cada cepa a partir de un medio sólido, que fue inoculada sobre una tira del kit de determinación Bactiden Oxidasa para citocromoxidasa de Merck, que contiene el sustrato para la enzima. Una coloración violeta se consideró positivo (Koneman et al., 1988).

- **Donadores de electrones.** Para la realización de la prueba de donadores de electrones, se empleó medio de cultivo líquido Postgate B modificado, reemplazando el lactato de sodio (donador de electrones) por los diferentes donadores a evaluar: Acetato, Benzoato, Fumarato, Etanol y Succinato, a una concentración final de 30 mM, según Feio et al., 1998, y ajustando a un pH de 7,6.

Posteriormente, a cada tubo fue inoculado 1 ml de la cepa llevando a incubar por 15 días a 32 °C. Cada muestra fue procesada por triplicado.

Los cultivos fueron transferidos 3 veces en medio nuevo con el respectivo donador de electrones para asegurar que el crecimiento no ocurriera debido al lactato y/o sulfato residual del cultivo original (Nielsen et al., 1999). Un resultado positivo se evidenció por ennegrecimiento del medio.

- **Aceptores de electrones.** Se preparó medio de cultivo líquido Postgate B modificado, en el cual se sustituyó el sulfato (aceptor de electrones) por los aceptores a evaluar: Sulfito, Tiosulfato, Nitrato, Fumarato y Azufre a una concentración final de 10 mM (Devereux et al., 1990), ajustando a un pH de 7,6.

Cada tubo de ensayo con medio fue inoculado con 1 ml de la cepa y se incubó a 32 °C durante 15 días. Cada cepa fue procesada por triplicado.

Al igual que en la prueba de donadores de electrones, se realizaron 3 repiques sucesivos en medio de cultivo según Nielsen et al., 1999. El ennegrecimiento del medio indicó un resultado positivo.

- **Determinación de Desulfovirdina.** Cada cepa fue inoculada en 9 ml de medio líquido Postgate llevando a incubar a 32 °C durante 8 días. Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 4500 rpm a 24 °C resuspendiendo las células en 1 ml de agua desionizada estéril. A cada tubo se adicionó 1 gota de 2N NaOH observando inmediatamente bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm (Garrity, 2005). Una luz roja fluorescente indicó presencia de la enzima.

- **Determinación de Hidrogenasa.** Para verificar la presencia de la enzima, se empleo el Kit para prueba Hidrogenasa de Caproco, el cual es un indicador de la actividad de organismos causantes de corrosión. La actividad de la Hidrogenasa es establecida por el desarrollo de un color azul en menos de 4 h. La intensidad del color es proporcional a la tasa en la cual la enzima toma el hidrógeno, como se describe en el manual de Instrucciones Caproco, 1987.

### **3.3 FASE III**

#### **PRESERVACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS E IDENTIFICADAS**

Las bacterias reductoras de sulfato aisladas y posteriormente identificadas fueron preservadas en medio líquido Postgate, rico en un precipitado de hierro ferroso (Garrity, 2005). Los cultivos fueron refrigerados a 4° C dos días después de realizar el último repique, garantizando la presencia de células en fase logarítmica.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS

**4.1.1 Recolección de las Muestras.** Las muestras de agua colectadas a partir de los 5 cabezales de pozo presentaron dos fases: una líquida acuosa y otra líquida orgánica (crudo). En la tabla 4 se observan los puntos y fechas de muestreo, codificación de las muestras en el laboratorio, pH y temperatura de las mismas.

**Tabla 4. Muestras colectadas en el campo La Cira-Infantas.**

Código de la muestra	Tipo de muestra	Fecha de muestreo	Punto de muestreo	pH	Temperatura
233	Líquido acuoso/ orgánico	20/ 11/ 2006	Pozo C2PP2	7,3	38,2° C
234	Líquido acuoso/ orgánico	20/ 11/ 2006	Pozo 1053	7,23	28,3° C
236	Líquido acuoso/ orgánico	21/ 11/ 2006	Pozo 1118	7,31	35,2° C
237	Líquido acuoso/ orgánico	21/ 11/ 2006	Pozo 1110	7,13	35,1° C
239	Líquido acuoso/ orgánico	21/ 11/ 2006	Pozo 1127	7,3	34,9° C

**4.1.2 Aislamiento de Bacterias.** Transcurrido éste tiempo, se observó el ennegrecimiento del medio de cultivo indicando crecimiento de bacterias reductoras de sulfato (Figura 4a). Las bacterias, llevan a cabo la reducción del sulfato presente en el medio, a sulfuro (característico por su olor azufrado) y posteriormente se da lugar a la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro, FeS (Figura 4b).

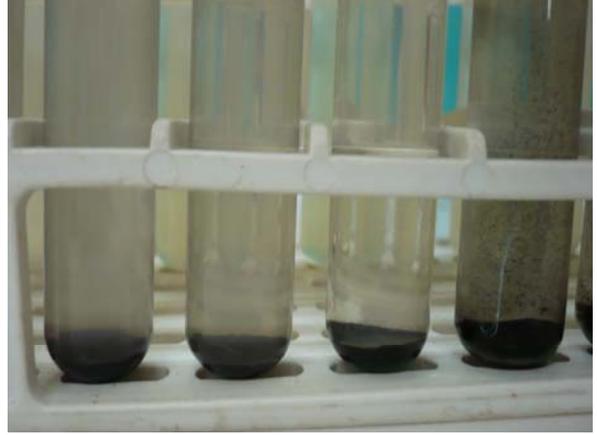
Después de repetidos pases, se procedió a sembrar 1 ml de cada cultivo en 9 ml de medio Postgate B y se llevó a incubar a 32 °C durante 8 días. El crecimiento bacteriano fue evidenciado por la formación del precipitado de sulfuro de hierro.

El medio de Postgate B usualmente contiene altas concentraciones de hierro ferroso, formando un precipitado blancuzco. Este reacciona con el sulfuro para producir sulfuro ferroso de color negro, actuando así como un indicador de actividad metabólica y crecimiento (Garrity, 2005).

**Figura 4. a) Crecimiento de bacterias reductoras de sulfato en medio líquido. b) Precipitado de Sulfuro de Hierro.**



a



b

Al observar el ennegrecimiento del medio, se procedió a realizar un pase en medio sólido Postgate B, empleando la técnica de siembra por agotamiento. Después de incubar en jarra de anaerobiosis durante 28 días (Figura 5), se observó el crecimiento de las colonias bacterianas. Estas fueron evaluadas mediante inspección visual y según sus características fueron clasificadas como colonias diferentes, las cuales fueron descritas y sembradas en nuevas cajas de Petri con medio sólido Postgate B, por la técnica de siembra por agotamiento.

La siembra de bacterias reductoras de sulfato requiere condiciones especiales para mantener un ambiente anoxigénico. Por tanto, es fundamental el uso de jarras, sobres e indicadores de anaerobiosis. Los sobres de Anaerogen absorben rápidamente el oxígeno atmosférico con la generación simultánea de  $\text{CO}_2$ , manteniéndose una reacción continua sin producción de  $\text{H}_2$ .

Los indicadores, poseen la forma oxidada (azul) del colorante azul de metileno. En un medio libre de oxígeno éste se transforma en leuco-azul de metileno cambiando la tonalidad a incolora. Durante el procedimiento de siembra de

estas bacterias se observa el cambio de coloración de los indicadores de azul a incoloro, demostrando este último un ambiente libre de oxígeno.

En total se lograron obtener trece cepas de las muestras colectadas inicialmente (Tabla 5).

A partir de cada una se tomó una colonia que se inoculó en un tubo de ensayo con medio Postgate B, llevando a incubación durante 8 días a 32 °C, con el fin de mantener los aislados en medio líquido.

**Figura 5. Crecimiento de BRS en medio sólido. Se observa el sobre el indicador de anaerobiosis.**



**Tabla 5. Cepas aisladas a partir de las muestras colectadas.**

<b>MUESTRA</b>	<b>CEPAS AISLADAS</b>
233	233 A
	233 A1
	233 B
234	234 A
	234 B
236	236 A
	236 B
237	237 A
	237 A1
	237 B
239	239 A
	239 A1
	239 B

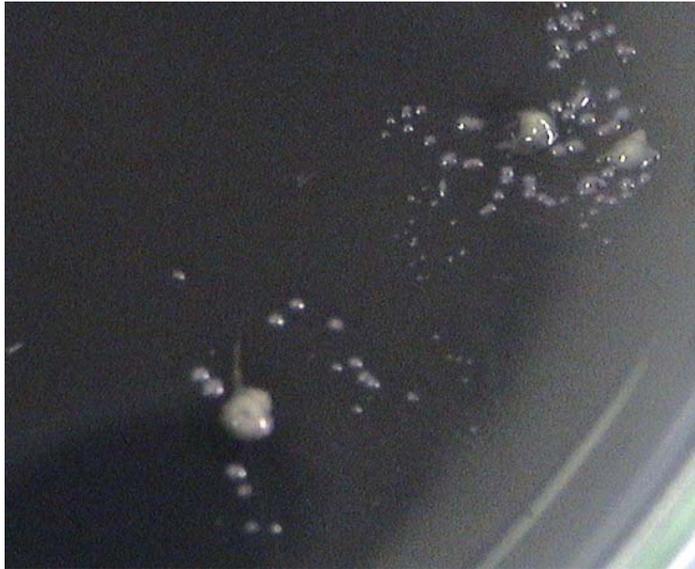
## **4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA**

**4.2.1 Caracterización Macroscópica.** Después de incubar las bacterias en medio sólido y observar su crecimiento, se realizó la descripción morfológica de sus colonias teniendo en cuenta los siguientes parámetros: forma, superficie, elevación, borde, tamaño, color, lustre, consistencia, entre otros.

A continuación se presentan las figuras y descripciones de las cepas aisladas.

**Figura 6. Crecimiento macroscópico de colonias en medio Postgate, cepa 233 A.**

CEPA 233 A

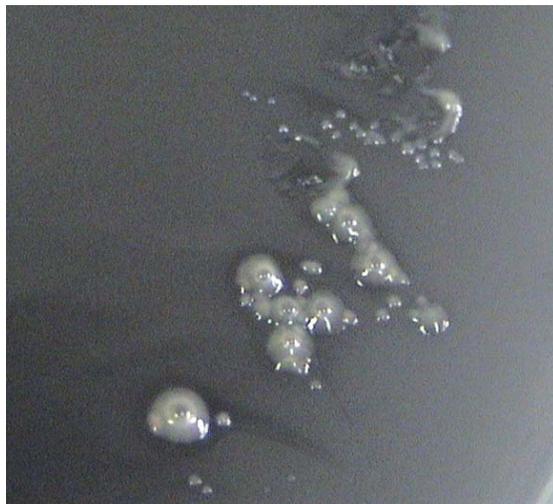


**Tabla 6. Descripción morfológica de las colonias, cepa 233 A.**

CEPA 233 A	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris oscuro (colonia madura) y morado (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Medianas, pequeñas y puntiformes.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un agujero pequeño en el centro, similar a la apariencia de un volcán. Las colonias jóvenes presentan una ligera coloración morada y son puntiformes.

CEPA 233 A1

**Figura 7. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 233 A1.**



**Tabla 7. Descripción morfológica de las colonias, cepa 233 A1.**

CEPA 233 A1	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris blancuzco (colonia madura) y ligeramente morado (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Grandes, medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un anillo concéntrico blanco en su zona más alta. Las colonias jóvenes son puntiformes.

CEPA 233 B

**Figura 8. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 233 B.**



**Tabla 8. Descripción morfológica de las colonias, cepa 233 B.**

<b>CEPA 233 B</b>	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris blancuzco (colonia madura) y ligeramente morada (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Grandes, medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias jóvenes se presentan puntiformes.

CEPA 234 A

**Figura 9. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 234 A.**

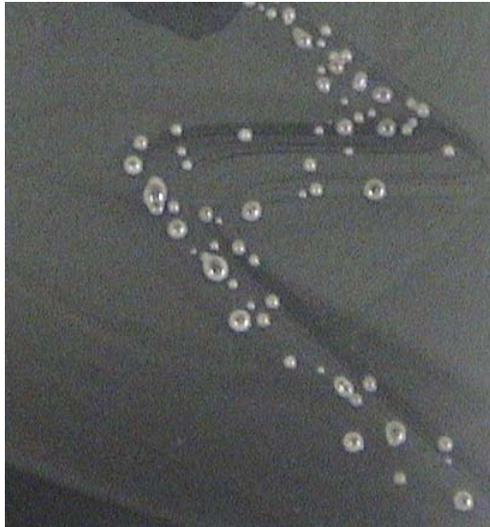


**Tabla 9. Descripción morfológica de las colonias, cepa 234 A.**

CEPA 234 A	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris blanquizco.
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan una coloración blanquizca y un agujero en el centro similar a un volcán.

CEPA 234 B

**Figura 10. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 234 B.**



**Tabla 10. Descripción morfológica de las colonias, cepa 234 B.**

<b>CEPA 234 B</b>	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada.
Color:	Gris claro (colonia madura) y ligeramente morado (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un agujero en el centro similar a un volcán.

CEPA 236 A

**Figura 11. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 236 A.**



**Tabla 11. Descripción morfológica de las colonias, cepa 236 A.**

CEPA 236 A	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada.
Color:	Blancuzco (colonia madura) y gris claro (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	La mayoría de las colonias presentan un agujero en el centro, similar a un volcán.

CEPA 236 B

**Figura 12. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 236 B.**



**Tabla 12. Descripción morfológica de las colonias, cepa 236 B.**

CEPA 236 B	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinadas y convexas.
Color:	Gris claro.
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	La mayoría de las colonias fueron jóvenes.

CEPA 237 A

**Figura 13. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 237 A.**



**Tabla 13. Descripción morfológica de las colonias, cepa 237 A.**

<b>CEPA 237 A</b>	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Convexas.
Color:	Blanco.
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Medianas y Pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Ninguna.

CEPA 237 A1

**Figura 14. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 237 A1.**

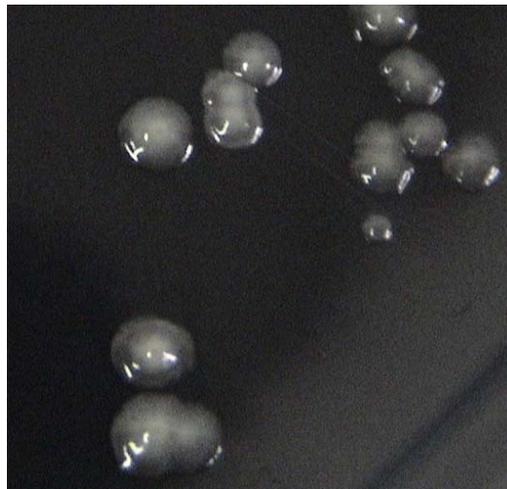


**Tabla 14. Descripción morfológica de las colonias, cepa 237 A1.**

CEPA 237 A1	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris blancuzco (colonia madura) y ligeramente morada (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Grandes, medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un anillo concéntrico blanco en su zona mas alta.

CEPA 237 B

**Figura 15. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 237 B.**

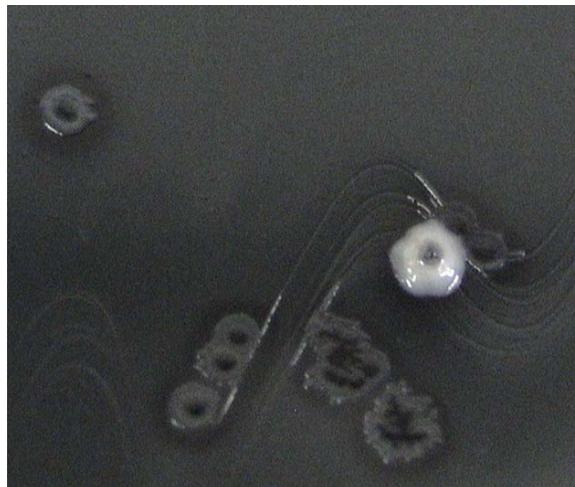


**Tabla 15. Descripción morfológica de las colonias, cepa 237 B.**

<b>CEPA 237 B</b>	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris blancuzco.
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Grandes, medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un anillo concéntrico blanco en su zona mas alta. El agujero en el centro es muy pequeño.

CEPA 239 A

**Figura 16. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 239 A.**

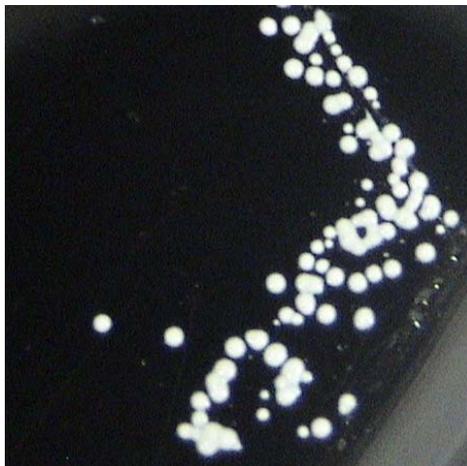


**Tabla 16. Descripción morfológica de las colonias, cepa 239 A.**

CEPA 239	
Forma:	Colonias redondeadas, algunas irregulares.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Blanco ( colonia madura) y gris oscuro (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Grandes y medianas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un anillo concéntrico blanco en su zona mas alta y un agujero similar a un volcán. Cuando las colonias grandes mueren, estas dejan una huella sobre el medio de cultivo de color gris oscuro.

CEPA 239 A1

**Figura 17. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 239 A1.**



**Tabla 17. Descripción morfológica de las colonias, cepa 239 A1.**

CEPA 239 A1	
Forma:	Colonias redondeadas.
Borde:	Entero.
Elevación:	Convexa.
Color:	Blanco.
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Cremosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Ninguna.

CEPA 239 B

**Figura 18. Crecimiento macroscópico de las colonias en medio Postgate, cepa 239 B.**



**Tabla 18. Descripción morfológica de las colonias, cepa 239 B.**

<b>CEPA 239 B</b>	
Forma:	Colonias redondeadas, algunas irregulares.
Borde:	Entero.
Elevación:	Pulvinada umbilicada (colonia madura) y convexa (colonia joven).
Color:	Gris blancuzco (colonia madura) y ligeramente morado (colonia joven).
Superficie:	Lisa.
Tamaño:	Grandes, medianas y pequeñas.
Lustre:	Brillante.
Consistencia:	Viscosa y adherente al medio de cultivo.
Observaciones:	Las colonias maduras presentan un agujero en el centro, similar a un volcán. Debajo de cada colonia se observa un color negro más oscuro que el del medio de cultivo.

Como se observa en las figuras y en las descripciones anteriores, la mayoría de los aislados presentaron una morfología común con respecto a su elevación de tipo pulvinado umbilicado, con una depresión en el centro, cuya apariencia es similar a la de un volcán.

Además, se observa la variedad en los tamaños de las colonias, las cuales pueden ser desde pequeñas casi punteadas hasta grandes, siendo las primeras las más jóvenes y las últimas las maduras. En cuanto a la coloración, las colonias presentaron una ligera tonalidad morada en sus primeras etapas y grises blancuzcas en etapas maduras.

Con respecto a la forma de las colonias, todas fueron redondeadas, con elevación, superficie lisa y borde entero.

Por otra parte, los aislados que mostraron variación en su morfología, fueron las cepas 237 A y 239 A1. Sus colonias exhibieron una pigmentación blanca, elevación de tipo convexa, y tamaño mediano a pequeño.

Una observación importante no reportada en estudios preliminares, fue la formación de una huella sobre el medio de cultivo en las cepas 239 A y 239 B, indicando la desaparición de una colonia. Esta se presentó como una pequeña mancha de color grisáceo con un agujero en el centro, de apariencia similar a la de las colonias en su estado maduro.

En cultivos sólidos con un tiempo de incubación de 15 días, fue notoria la formación de colonias convexas, medianas y pequeñas. Por el contrario, en cultivos con incubación de 28 días, se presentaron colonias grandes y pulvinadas umbilicadas.

De acuerdo a lo anterior, se infiere que las colonias de las bacterias sulfato-reductoras aisladas, presentan variación morfológica según su estado de madurez. Inicialmente, su elevación y tamaño son mínimos y al entrar en etapas maduras su elevación y tamaño son mayores; cambiando de colonias convexas y pequeñas, a pulvinadas umbilicadas y grandes.

En las colonias pulvinadas umbilicadas se observa una depresión en la zona superior, formada en etapas maduras. Esta depresión, se presume podría permitir la expulsión del sulfuro de hidrógeno producto del metabolismo bacteriano, el cual se acumula en la colonia.

La mayoría de las colonias de los aislados presentaron una coloración gris blanqueca y forma redondeada, características observadas por Ollivier et al., 1988 al describir una bacteria reductora de sulfato del género *Desulfovibrio*, aislada a partir de sedimentos estuarinos.

**4.2.2 Caracterización Microscópica.** La caracterización microscópica de las cepas aisladas se realizó empleando la técnica de tinción de Gram, observando con un aumento de 5X, 40X y 100X.

La coloración se realizó tomando una lámina portaobjeto sobre la cual se adicionó una gota de solución salina (0,85% NaCl). Seguidamente, una colonia de la cepa fue tomada con un asa recta y depositada sobre la lámina mezclando con la solución. La muestra fue flameada para permitir la fijación de la misma. Se adicionó una gota de cristal violeta dejando actuar por 1 min, se realizó lavado con abundante agua y se adicionó una gota de lugol por 1 min. Después de enjuagar, se depositó una gota de decolorante de Gram por 2 s, se realizó un lavado y finalmente se adicionó safranina por 30 s (Koneman et al., 1988). Se procedió a realizar el lavado con agua dejando secar para la posterior observación al microscopio.

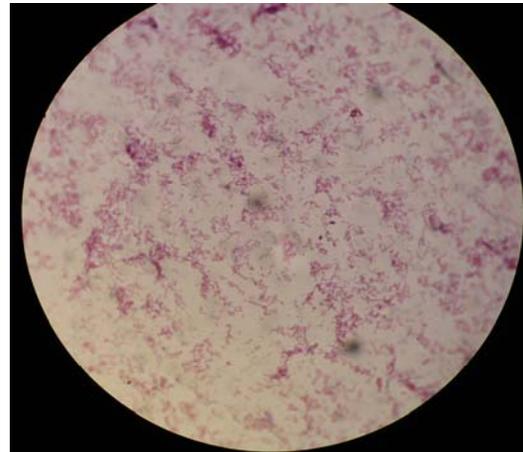
A continuación se muestran las figuras y descripciones microscópicas de las células de cada aislado.

**Figura 19. Observación microscópica de las células de la cepa 233 A. a) Agregados de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

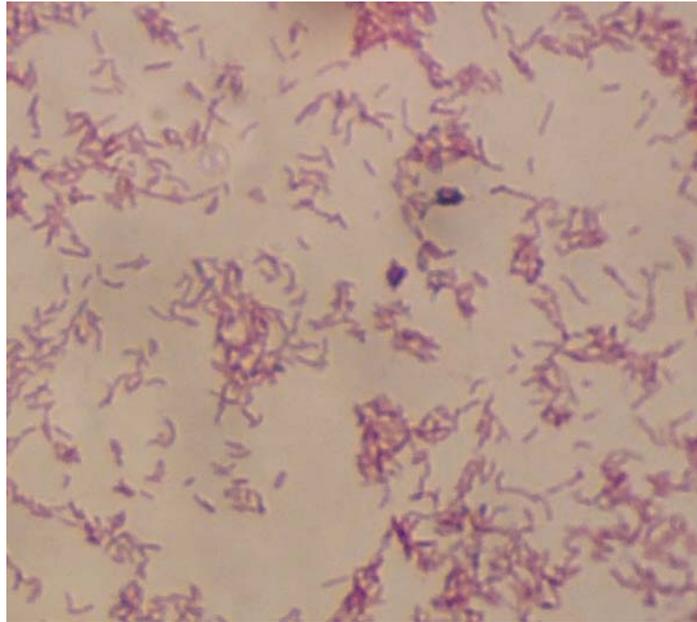
CEPA 233 A



a



b



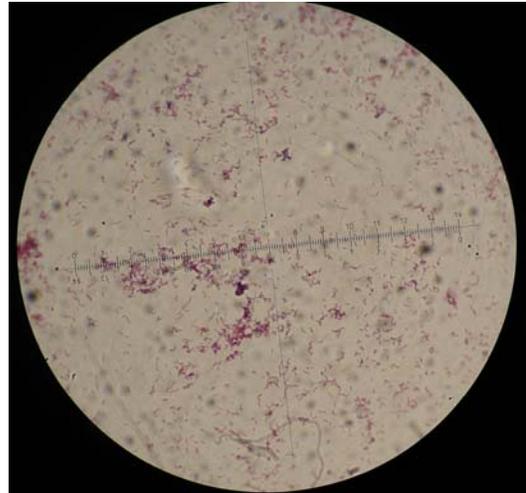
c

**Figura 20. Observación microscópica de las células de la cepa 233 A1. a) Agregados de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

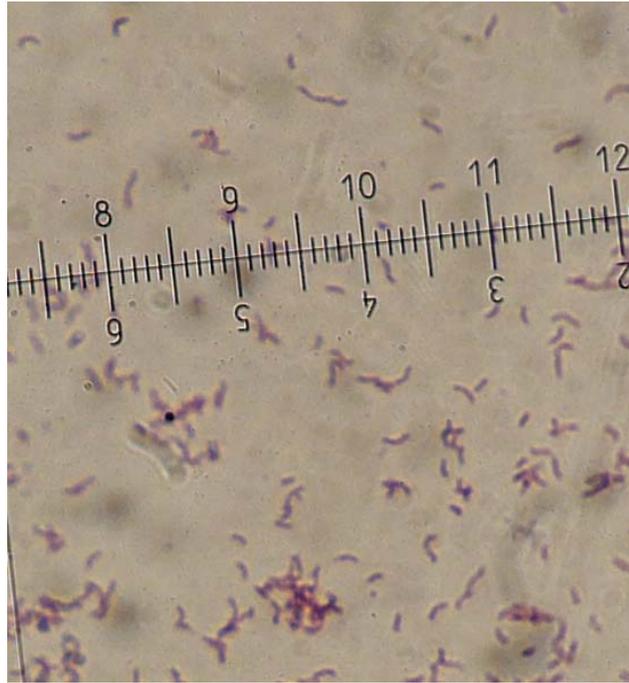
CEPA 233 A1



a



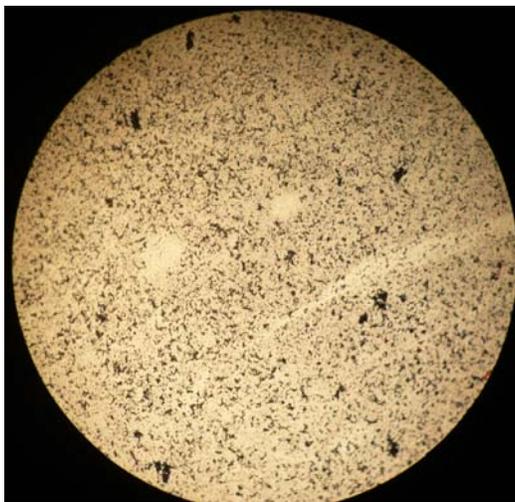
b



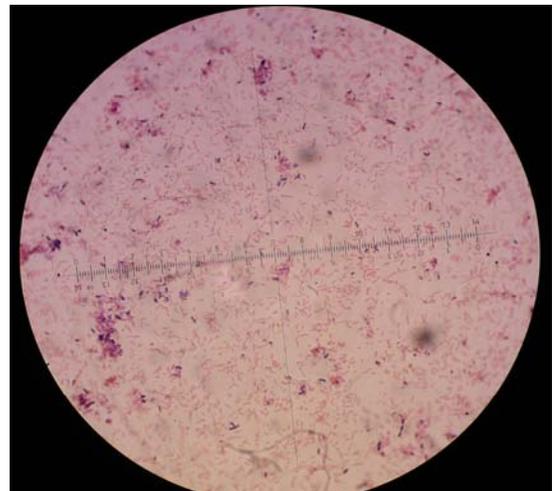
c

**Figura 21. Observación microscópica de las células de la cepa 233 B. a) Partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

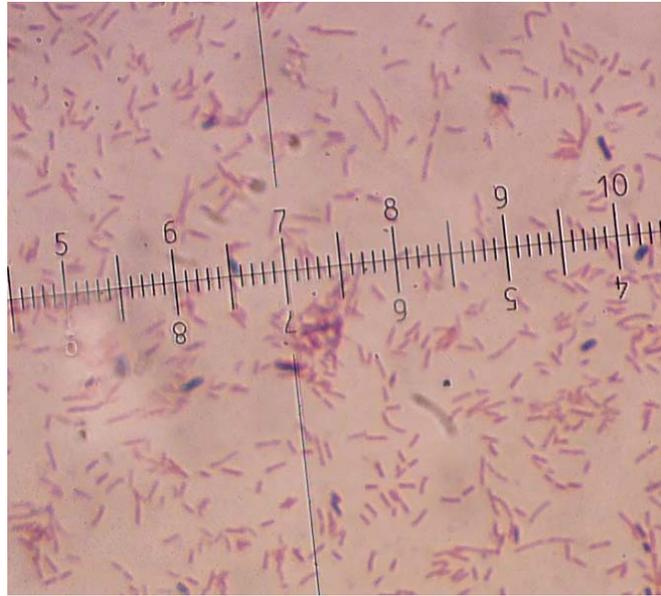
CEPA 233 B



a



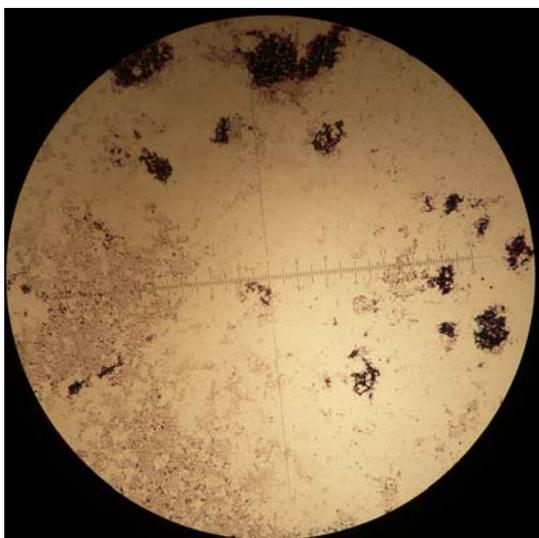
b



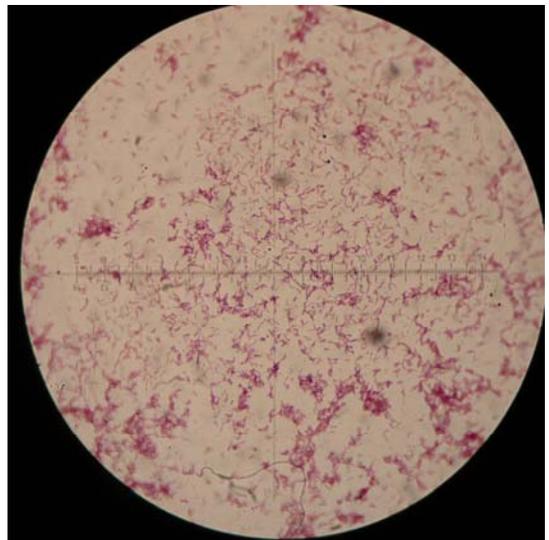
c

**Figura 22. Observación microscópica de las células de la cepa 234 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

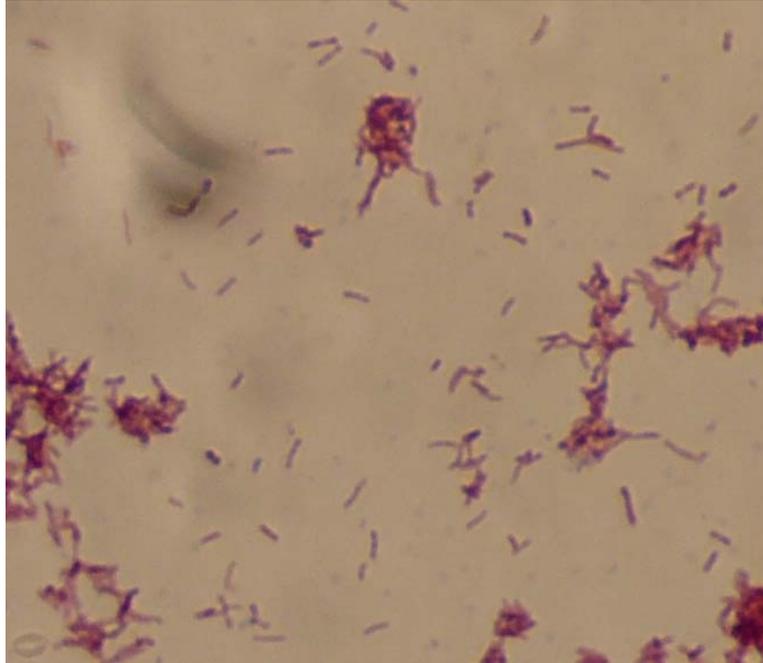
CEPA 234 A



a



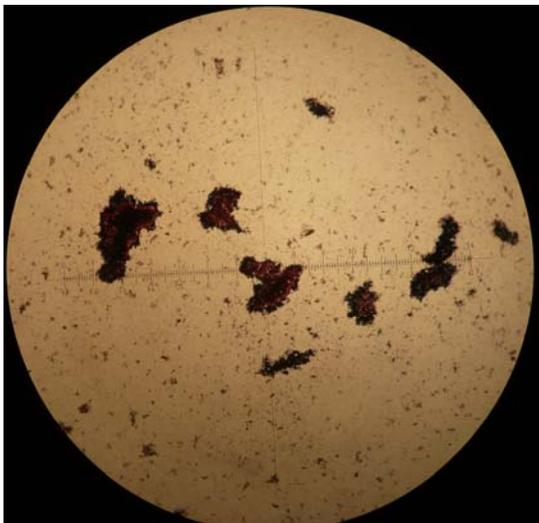
b



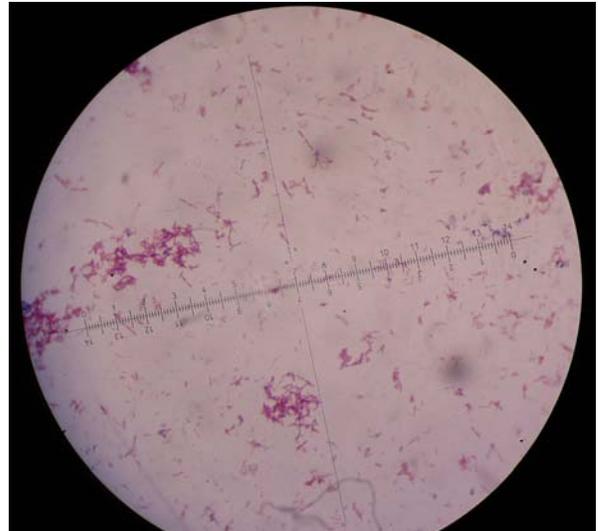
c

**Figura 23. Observación microscópica de las células de la cepa 234 B. a) Agregados de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

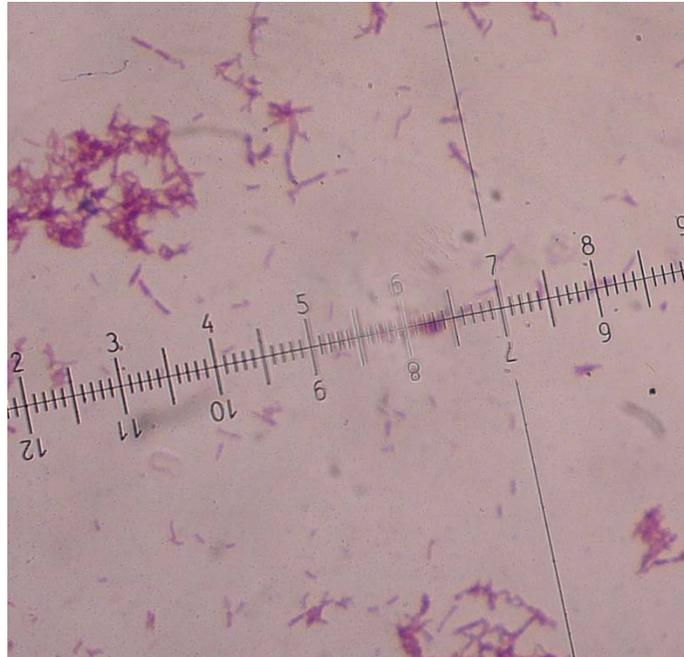
CEPA 234 B



a



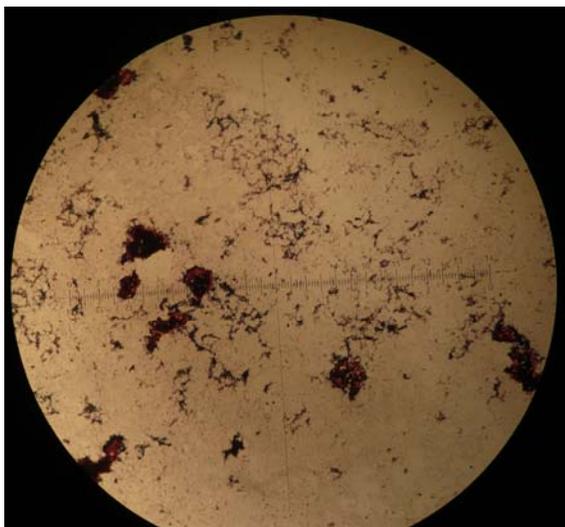
b



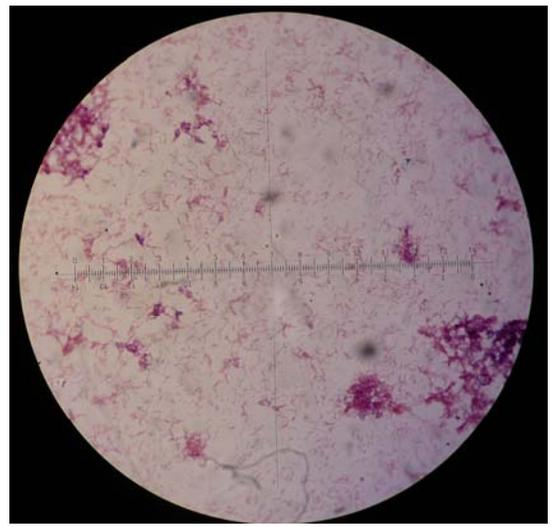
c

**Figura 24. Observación microscópica de las células de la cepa 236 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hidrógeno, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

CEPA 236 A



a



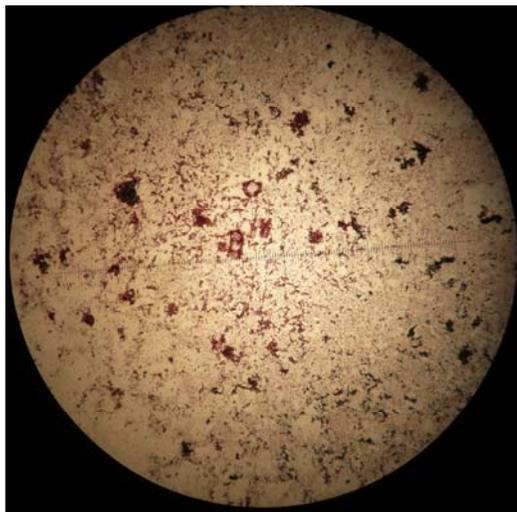
b



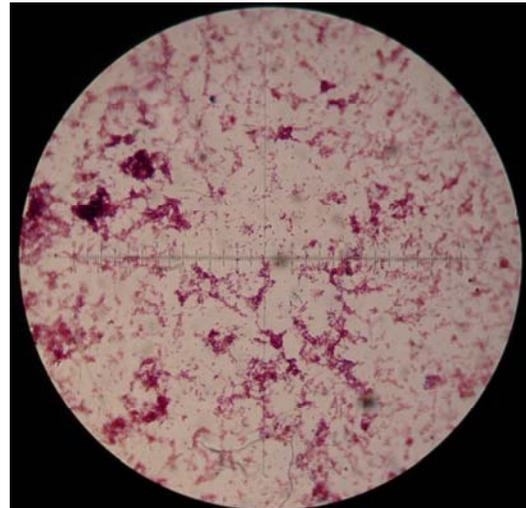
c

**Figura 25. Observación microscópica de las células de la cepa 236 B. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

CEPA 236 B



a



b

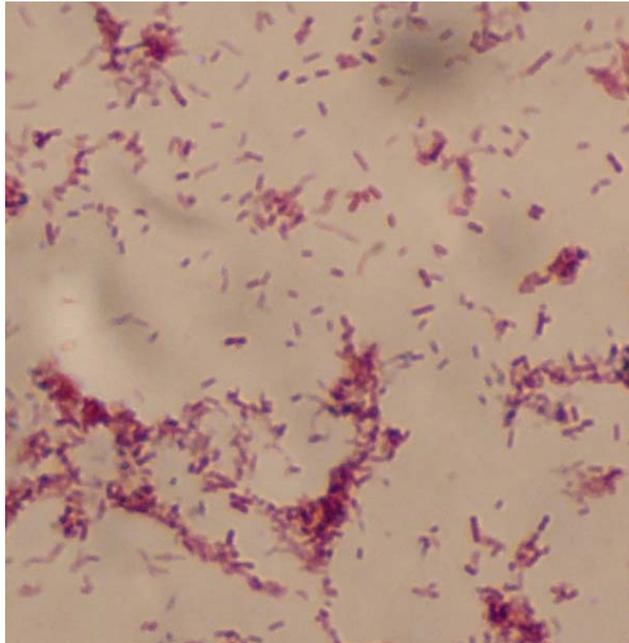
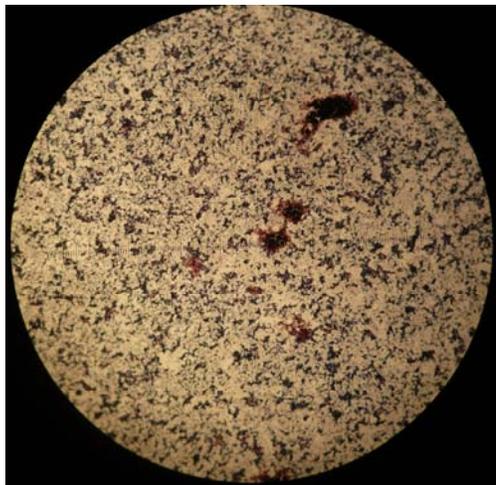
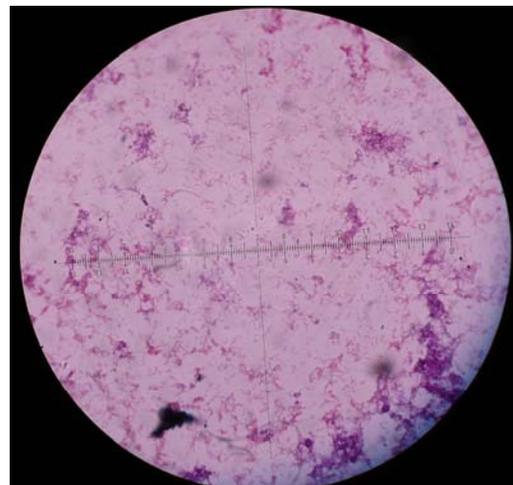


Figura 26. Observación microscópica de células de la cepa 237 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.

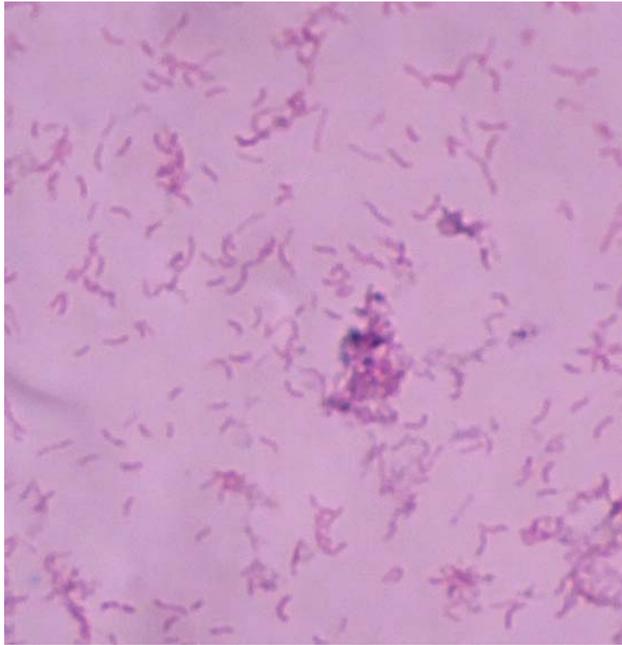
CEPA 237 A



a



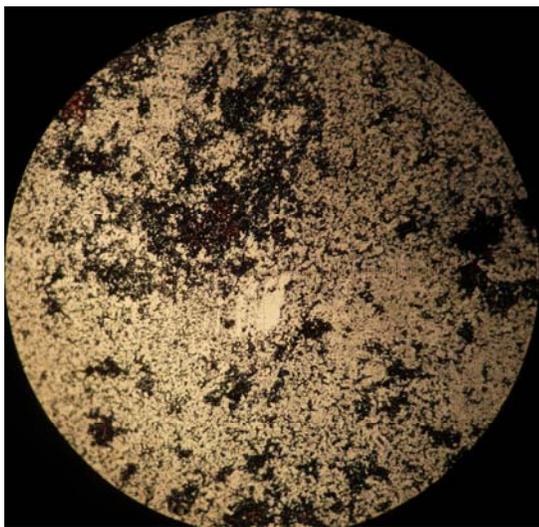
b



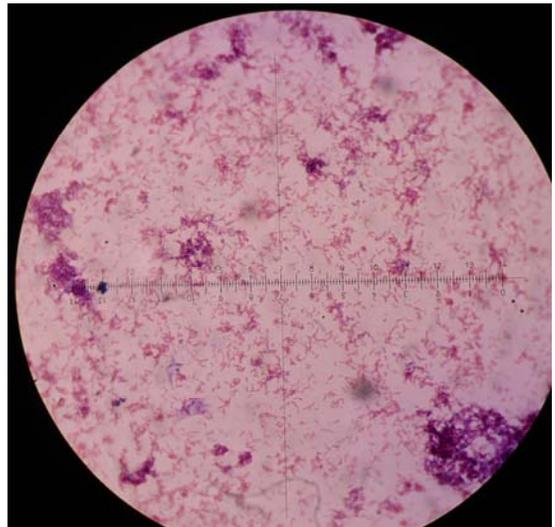
c

**Figura 27. Observación microscópica de células de la cepa 237 A1. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

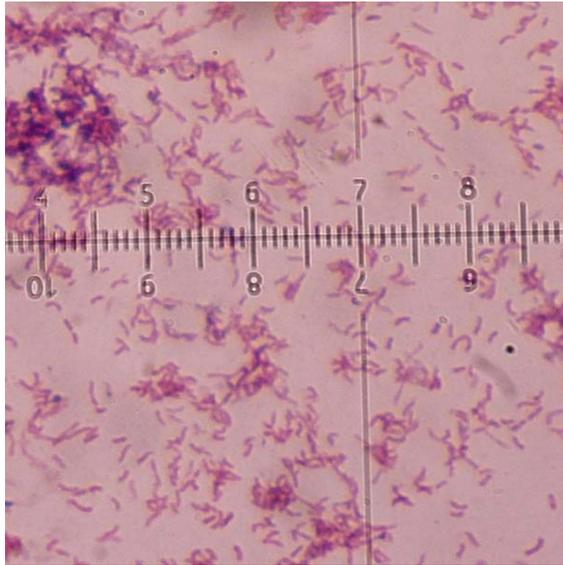
CEPA 237 A1



a



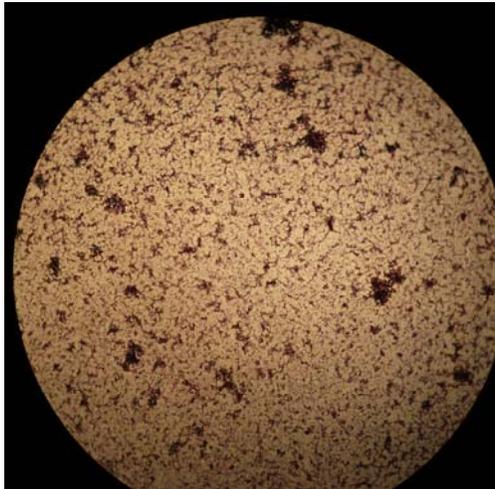
b



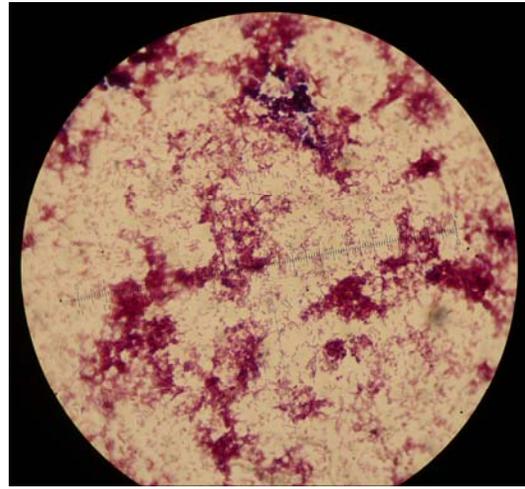
c

**Figura 28. Observación microscópica de las células de la cepa 237 B. a) Agregados de partículas de Sulfuro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

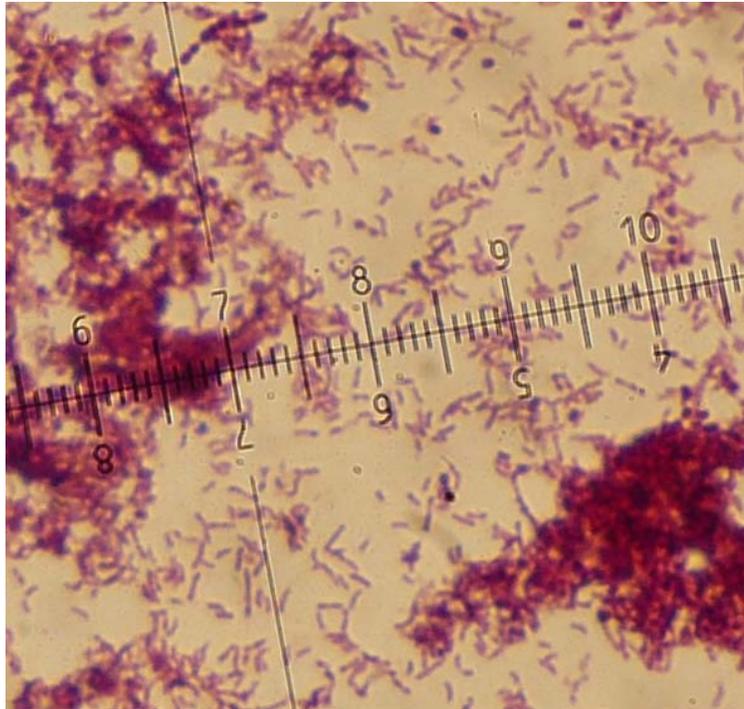
CEPA 237 B



a



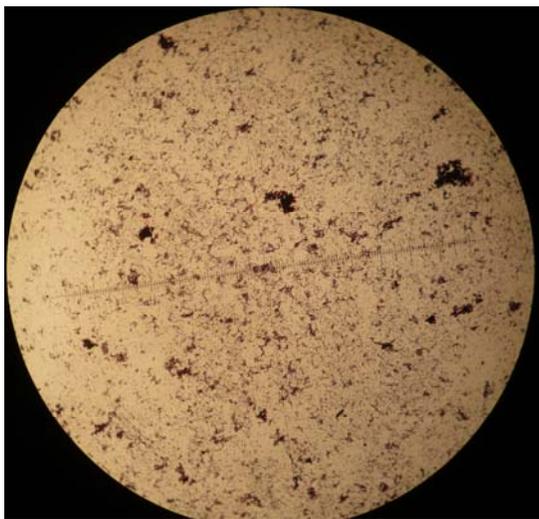
b



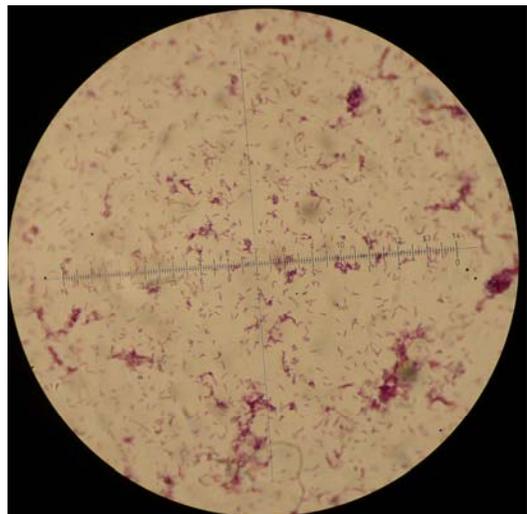
c

**Figura 29. Observación microscópica de las células de la cepa 239 A. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

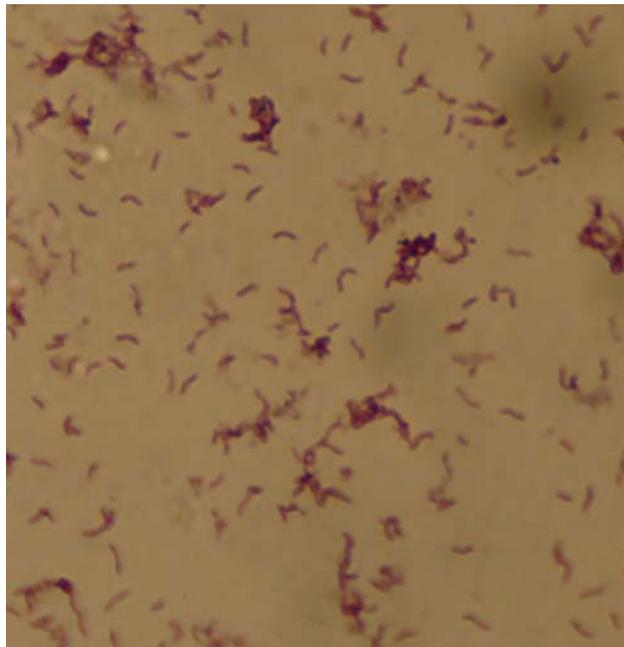
CEPA 239 A



a



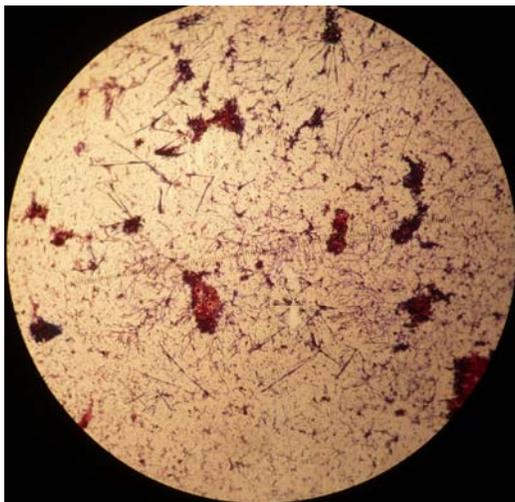
b



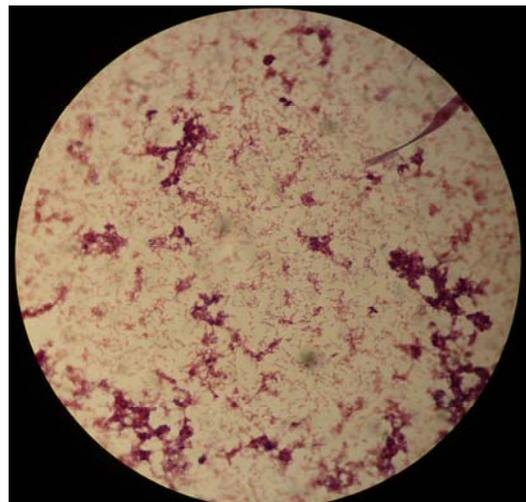
c

**Figura 30. Observación microscópica de las células de la cepa 239 A1. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

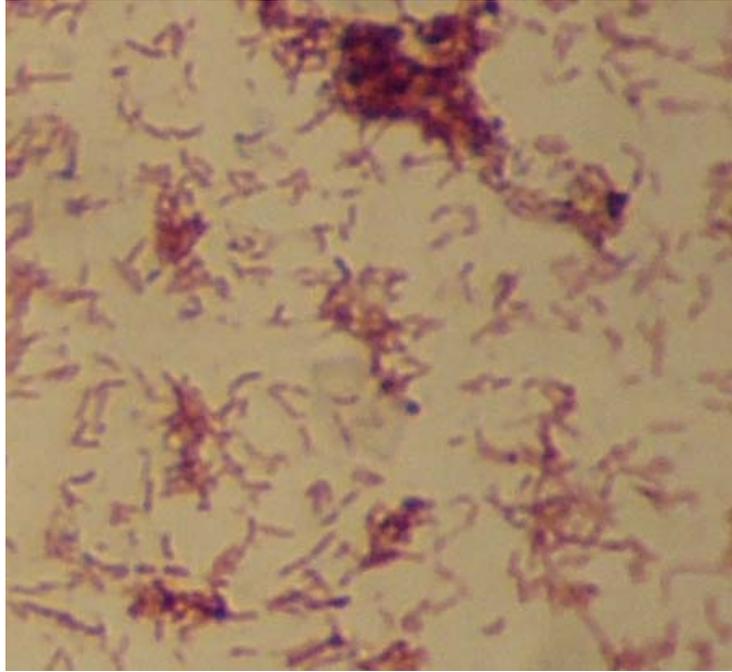
CEPA 239 A1



a



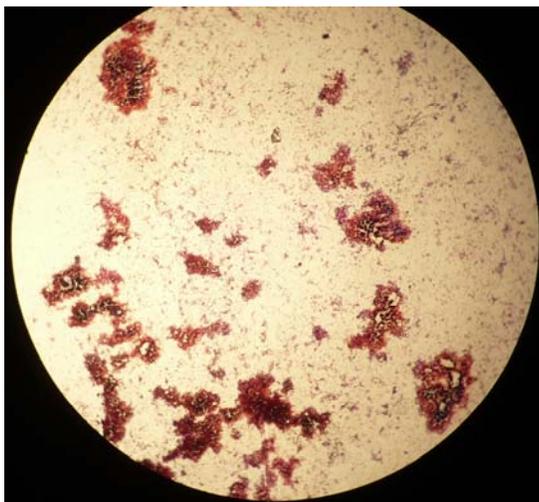
b



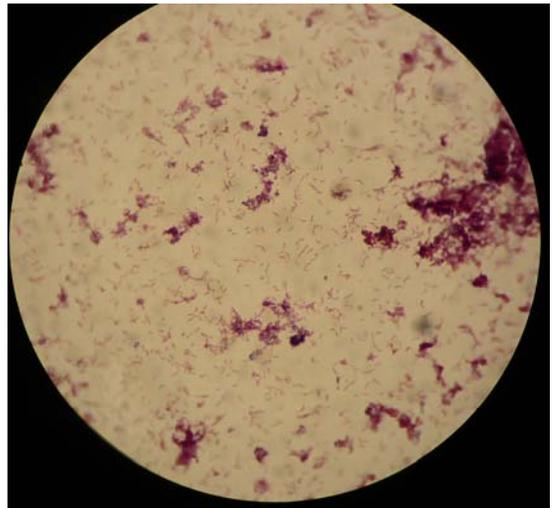
c

**Figura 31. Observación microscópica de las células de la cepa 239 B. a) Agregados de partículas de Sulfuro de Hierro, 5X. b y c) Morfología celular, 100X.**

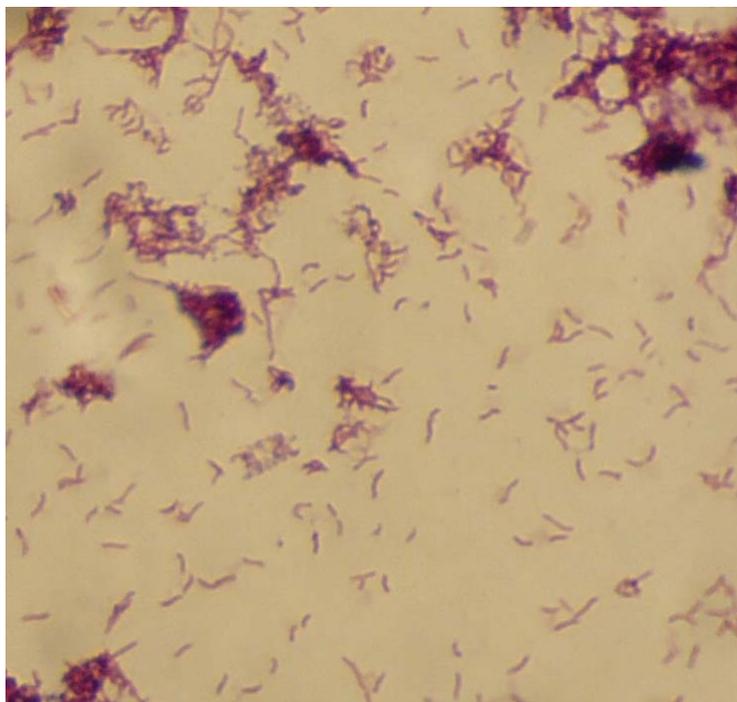
CEPA 239 B



a



b



c

**Tabla 19. Principales características morfológicas de las células.**

CEPA	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
233 A	Bacterias Gram negativos. Bacilos grandes. Rectos, curvos y sigmoides. Algunos distribuidos en cadenas de 2 a 4 células.
233 A1	Bacterias Gram negativos. Bacilos rectos, curvos, sigmoides y vibrios.
233 B	Bacterias Gram negativos. Bacilos grandes y largos. La mayoría son bacilos rectos. Algunos se disponen en cadenas de hasta 3 células, en pares y otros individuales.
234 A	Bacterias Gram negativos. Bacilos grandes y largos.

	<p>Ligeramente curvos y algunos rectos.</p> <p>La mayoría se disponen en pares, en cadena y otros individuales.</p>
234 B	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos grandes, largos y delgados.</p> <p>La mayoría son rectos y otros ligeramente curvos.</p> <p>Algunos se disponen en cadenas y otros individuales.</p>
236 A	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos grandes y largos.</p> <p>Rectos y curvos.</p> <p>Algunos dispuestos en cadena.</p>
236 B	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos cortos y delgados.</p> <p>Rectos.</p> <p>Algunos dispuestos en pares, otros individuales.</p>
237 A	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos curvos, sigmoides y vibrios.</p>
237 A1	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos grandes.</p> <p>Curvos, sigmoides y vibrios.</p> <p>Algunos dispuestos en cadenas de hasta 3 células.</p>
237 B	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos cortos y pequeños.</p> <p>La mayoría son rectos. Algunos curvos.</p>
239 A	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos largos.</p> <p>Curvos, sigmoides y vibrios.</p> <p>Algunos dispuestos en cadenas.</p>
239 A1	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos largos.</p> <p>Curvos, sigmoides y vibrios.</p> <p>Dispuestos en cadenas de hasta 3 células, en pares e individuales.</p>

239 B	<p>Bacterias Gram negativos.</p> <p>Bacilos cortos y pequeños.</p> <p>La mayoría son rectos, pocos ligeramente curvos, sigmoides y vibrios.</p> <p>Algunos se disponen en cadenas de hasta 3 células, otros en pares.</p>
-------	---

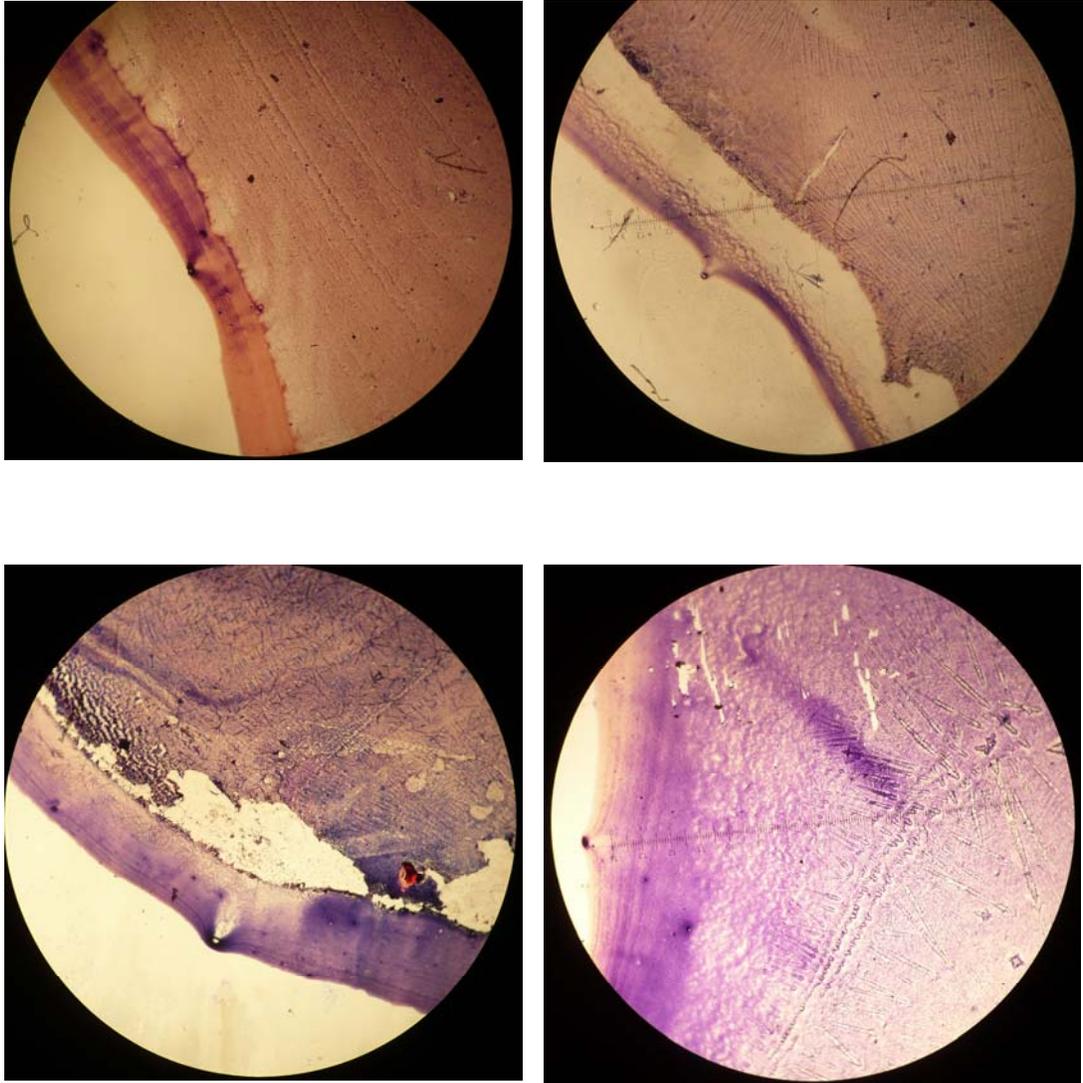
Al observar con el menor aumento, fue evidente la formación de agregados celulares rodeados por partículas de Sulfuro de Hierro presentes en el medio de cultivo, a partir del cual se realizó la tinción.

Los trece aislados presentaron una tinción característica de bacterias Gram negativas. Las células exhibieron morfología de bacilos rectos, curvos, sigmoides y vibrios. No se observaron esporas.

Fue notoria una distribución particular, pues la mayoría de las células se disponían en cadenas de hasta tres dando una apariencia filamentosa; en pares en los cuales las células se presentaron paralelas entre sí o en cadena e individuales.

Las características generales de cada cepa se resumen en la Tabla 19.

**Figura 32. Observación microscópica de las células bacterianas, 5X.**



Por otra parte, se observó una distribución muy peculiar de las células dentro de las colonias formadas sobre el medio sólido. Fue notoria la elevación de las colonias, y las capas en las cuales se disponen las células bacterianas (Figuras 32). Esta morfología encuentra relación con la descripción macroscópica de las colonias, ya que como se mencionó anteriormente éstas presentaron elevación y una depresión en la zona superior que permitiría la expulsión del Sulfuro de Hidrógeno generado por las reacciones metabólicas.

### 4.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

**4.3.1 Rango de crecimiento a diferentes temperaturas.** Esta prueba permite evaluar el rango de temperatura en el cual crecen las bacterias reductoras de sulfato aisladas. El crecimiento fue evidenciado por el ennegrecimiento del medio de cultivo. Todas las cepas fueron procesadas por triplicado en cada temperatura.

**Tabla 20. Crecimiento de BRS a diferentes temperaturas.**

CEPA	TEMPERATURA								
	30° C			45° C			60° C		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
233 A	+	+	+	-	-	-	-	-	-
233 A1	-	+	+	-	-	-	-	-	-
233 B	+	+	-	-	-	-	-	-	-
234 A	+	+	+	-	-	-	-	-	-
234 B	-	+	+	-	-	-	-	-	-
236 A	-	+	+	-	-	-	-	-	-
236 B	+	+	+	-	-	-	-	-	-
237 A	-	+	+	-	-	+	-	-	-
237 A1	-	+	+	-	-	-	-	-	-
237 B	+	+	+	+	+	+	-	-	-
239 A	+	+	+	-	-	-	-	-	-
239 A1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
239 B	+	+	+	+	+	+	-	-	-

La mayoría de las BRS crecieron (+) a una temperatura de 30° C. Sin embargo, algunas también presentaron crecimiento a 45° C (Tabla 20). El crecimiento óptimo se logró a 32° C. Según los datos obtenidos, la bacterias reductoras de sulfato aisladas son mesófilas, pues su rango de crecimiento se encuentra

entre los 30° C y 45° C, es decir, requieren temperaturas medias para llevar a cabo sus reacciones metabólicas. Según estudios realizados sobre BRS en sistemas de inyección de agua (Chalela, 1991), la temperatura óptima para estas oscila entre 20 y 40° C, lo cual coincide con los resultados de este trabajo. Ninguna cepa presentó crecimiento a 60° C.

**4.3.2 Rango de crecimiento a diferentes valores de pH.** El crecimiento se evidenció por ennegrecimiento del medio. Las cepas se procesaron por triplicado.

**Tabla 21. Crecimiento de BRS a diferentes valores de pH.**

CEPA	pH											
	4.5			5.0			8.0			8.5		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
233 A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
233 A1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
233 B	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
234 A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
234 B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
236 A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
236 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
237 A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
237 A1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
237 B	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
239 A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
239 A1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
239 B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La cepa 236 B fue la única que presentó crecimiento en todos los valores de pH, desde 4.5 hasta 8.5. Cepas como 233 A, 233 B, 237 B y 239 B reportaron crecimiento a partir de pH 5.0. El medio de cultivo con pH 8.0 ofreció las mejores condiciones pues la mayoría de los aislados presentaron crecimiento, al igual que en el medio con pH 8.5 (Tabla 21).

Según lo anterior, las bacterias reductoras de sulfato objeto de estudio prefieren un pH cercano al neutro para llevar a cabo su crecimiento, es decir valores como 8.0 y 8.5. Sin embargo, algunas toleran valores ligeramente ácidos, como 4.5 y 5.0. El crecimiento óptimo fue obtenido en pH 7,6.

En general, los aislados mostraron crecimiento en un amplio espectro de pH en un rango entre 5.0 y 8.5. Resultados similares fueron reportados al evaluar reductoras de sulfato aisladas a partir de aguas subterráneas, las cuales crecieron a valores de pH entre 5.5 y 8.5 (Sass & Cypionka, 2004).

**4.3.3 Determinación de Motilidad.** El objetivo de ésta prueba es determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Para tal fin, se empleó un medio semisólido sobre el cual la cepa fue sembrada por picadura, llevando a incubar durante 8 días a 32°C.

**Tabla 22. Motilidad de las BRS aisladas.**

MOTILIDAD	
CEPA	RESULTADO
233 A	+
233 A1	+
233 B	+
234 A	+
234 B	+
236 A	+

236 B	+
237 A	+
237 A1	+
237 B	+
239 A	+
239 A1	+
239 B	+

Transcurrido el tiempo de incubación, los trece aislados presentaron motilidad positiva (Tabla 22) evidenciado por el crecimiento dentro y fuera de la línea de siembra causando turbidez en el medio SIM.

Este movimiento se debe a la presencia de flagelos, los cuales predominan en las reductoras de sulfato (Odom & Singleton, 1993).

**4.3.4 Determinación de Indol.** La presencia de indol fue determinada al realizar la siembra de cada cepa en tubos de ensayo con medio semisólido SIM dejando incubar a 32 °C durante 8 días. Posteriormente, se adicionó el reactivo de Kovac indicando la presencia de indol por la formación de un anillo rojo o fucsia.

**Tabla 23. Determinación de indol para BRS aisladas.**

INDOL	
CEPA	RESULTADO
233 A	-
233 A1	-
233 B	+
234 A	+
234 B	-
236 A	-

236 B	+
237 A	+
237 A1	-
237 B	-
239 A	-
239 A1	-
239 B	+

Cinco cepas fueron indol positivo (Tabla 23) evidenciado por la formación de un anillo rojo a fucsia en la zona superior. Las cepas 233B y 236 B, exhibieron un anillo ligeramente rojo debido a la mínima producción de indol (Figura 33). Por el contrario, las cepas 234 A, 237 A y 239 B, presentaron un anillo fucsia debido a una mayor producción de éste compuesto.

El indol es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. La triptofanasa cataliza la reacción removiendo el grupo amino (NH<sub>2</sub>) de la molécula de triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco.

La prueba se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehido, componente principal del reactivo de Kovac (Koneman et al., 1988).

La variación en la coloración del complejo formado al finalizar la prueba, permite distinguir el tipo de actividad que presenta la enzima triptofanasa. Así, una tonalidad ligeramente roja indica actividad débil y roja o fucsia una actividad intensa.

**Figura 33. Determinación de indol en aislados.**



**4.3.5 Producción de Sulfuro de Hidrógeno.** Dos medios fueron empleados para verificar la producción de H<sub>2</sub>S. Se sembraron las cepas por picadura dejando incubar a 32 °C durante 8 días.

**Tabla 24. Producción de Sulfuro de Hidrógeno en los aislados.**

PRODUCCION DE H2S		
CEPA	RESULTADO	
	SIM	Postgate modificado
233 A	+	+
233 A1	+	+
233 B	+	+
234 A	+	+
234 B	+	+
236 A	+	+
236 B	+	+
237 A	+	+

237 A1	+	+
237 B	+	+
239 A	+	+
239 A1	+	+
239 B	+	+

Todos los aislados formaron Sulfuro de Hidrógeno en los dos medios empleados, SIM y Postgate semisólido (Tabla 24). Su formación fue evidente por el ennegrecimiento de los medios ya que el H<sub>2</sub>S al reaccionar con el hierro disuelto forma Sulfuro de Hierro responsable del cambio de coloración. Además, la formación de éste ácido fue comprobado al percibir su olor característico a huevo podrido.

En la prueba fueron empleados dos medios debido a que la fuente de azufre en éstos es diferente. En el SIM la fuente de azufre es el Tiosulfato y en el Postgate es el Sulfato. Según los datos obtenidos las bacterias reductoras de sulfato aisladas son capaces de generar éste importante producto a partir de dos fuentes de azufre diferentes.

Las BRS reducen el sulfato por desasimilación a sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S). El sulfuro de hidrógeno es el principal gas volátil de azufre, es muy tóxico y se reconoce por su característico olor fétido. Este ácido se combina con las sales ferrosas para formar un sulfuro de hierro (FeS) negro, importante producto de corrosión (Madigan t al., 1999).

Para las industrias del petróleo y gas, el Sulfuro de Hidrógeno es de gran interés debido a que es el responsable de la corrosión en superficies metálicas, afecta la economía de la recuperación y proceso de refinado del petróleo y representa un alto riesgo para la salud del personal (Odom & Singleton, 1993).

**4.3.6 Determinación de Catalasa.** Como se mencionó anteriormente la presencia de catalasa fue comprobada al tomar una colonia de cada cepa depositándola en una lámina y adicionando peróxido de hidrógeno 30%.

Todas las cepas fueron catalasa positiva debido a la formación de burbujas al adicionar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 25). Las cepas 233 B, 234 A y 237 A1 presentaron una menor producción de burbujas con respecto a los demás aislados; por tanto su reacción fue débil (Figura 34).

**Tabla 25. Determinación de catalasa en BRS aisladas.**

CATALASA	
CEPA	RESULTADO
233 A	+
233 A1	+
233 B	(+)
234 A	(+)
234 B	+
236 A	+
236 B	+
237 A	+
237 A1	(+)
237 B	+
239 A	+
239 A1	+
239 B	+

(+) actividad débil.

Los trece aislados contienen la enzima catalasa, la cual funciona como un mecanismo de defensa para las bacterias reductoras de sulfato frente a los radicales libres de oxígeno.

Debido al efecto tóxico del oxígeno, las bacterias reductoras de sulfato han desarrollado estrategias de adaptación para protegerse del mismo. Estas estrategias pueden ser clasificadas en dos grupos: estrategias de comportamiento y estrategias moleculares (Cypionka, 2000). Las primeras incluyen aerotaxis y formación de agregados, mientras que las últimas permiten a las BRS remover el oxígeno y protegerse de sus efectos nocivos.

Al igual que para organismos aerobios, las especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas (como el superóxido, radical hidroxilo y peróxido de Hidrógeno) son generadas cuando las BSR están en contacto con el oxígeno. La enzima catalasa es la responsable de eliminar el  $H_2O_2$ , catalizando su conversión en agua y oxígeno molecular sin la producción de radicales libres que serían perjudiciales para bacterias anaerobias como las BRS. La actividad catalasa fue detectada por primera vez en *Desulfovibrio* por Hatchikian et al., 1977 (Dolla, et al., 2006).

La reacción es la siguiente:



El  $H_2O_2$ , es una especie reactiva de oxígeno responsable de la toxicidad por  $O_2$  debido a su alta reactividad la cual genera diferentes tipos de daños dentro de las células. Entre los principales daños se citan oxidaciones de proteínas y aminoácidos, inactivación de enzimas, entre otros. Además, la auto-oxidación química del Sulfuro de Hidrógeno, normalmente producido por sulfato-reductoras, puede resultar en la formación de éstas especies, las cuales aumentan la sensibilidad de las BRS al oxígeno (Cypionka et al., 1985). El estrés oxidativo es también una consecuencia de la inactivación directa por oxígeno molecular de algunas enzimas importantes como la hidrogenasa (Cammack et al., 1994) o lactato deshidrogenasa (Stams & Hansen, 1982) y la modificación de parámetros físico-químicos del ambiente como el potencial redox y pH (Dolla et al., 2006).

**Figura 34. Presencia de la enzima catalasa en las BRS aisladas.**



**4.3.7 Determinación de Oxidasa.** Esta prueba fue realizada empleando el kit de determinación Bactiden Oxidasa para citocromooxidasa de Merck, tomando una bacteria y depositándola sobre una tira del kit.

Todos los aislados fueron oxidasa negativo (Tabla 26), pues no se presentó la coloración púrpura sobre la tirilla, luego de inocular la cepa. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con investigaciones preliminares en las cuales bacterias reductoras de sulfato aisladas resultan negativas para ésta prueba (Sass & Cypionka, 2004; Suzuki et al., 2007).

**Tabla 26. Determinación de oxidasa para BRS aisladas.**

OXIDASA	
CEPA	RESULTADO
233 A	-
233 A1	-
233 B	-
234 A	-
234 B	-
236 A	-
236 B	-
237 A	-
237 A1	-
237 B	-
239 A	-
239 A1	-
239 B	-

Esta permite determinar si una bacteria presenta citocromoxidasa, enzima encontrada en algunas bacterias que transfieren electrones al oxígeno que actúa como aceptor final en algunas cadenas transportadoras. La enzima oxida el citocromo c, para realizar la transferencia de energía. La presencia de la citocromo oxidasa puede ser detectada a través del uso de una tirilla o un disco que contiene tetra metil-p-fenilendiamina (TMPD) o dimetil-p-fenilendiamina, los cuales actúan como donadores de electrones para la enzima. Si la bacteria oxida el reactivo alojado en la tirilla o en el disco, es decir, si remueve los electrones, se tornará púrpura indicando una prueba positiva. Por el contrario, si no se presenta cambio en la coloración, la prueba se considera negativa, como en éste caso (Koneman et al., 1988).

**4.3.8 Donadores de electrones.** Empleando medio líquido Postgate B con diferentes donadores a una concentración final de 30 mM, se inoculó 1ml de cada cepa llevando a incubar a 32 °C durante 15 días. Los cultivos fueron transferidos 3 veces en medio nuevo.

**Tabla 27. Crecimiento de BRS con diferentes donadores de electrones.**

CEPA	DONADORES DE ELECTRONES					
	LACTATO	ACETATO	BENZOATO	FUMARATO	SUCCINATO	ETANOL
233 A	+	-	+	+	+	+
233 A1	+	-	-	+	-	+
233 B	+	-	+	+	+	+
234 A	+	-	+	+	+	+
234 B	+	-	+	+	+	+
236 A	+	-	-	-	+	+
236 B	+	-	+	+	+	+
237 A	+	-	-	+	+	+
237 A1	+	-	-	+	+	+
237 B	+	-	+	+	-	+
239 A	+	-	-	-	-	+
239 A1	+	-	+	+	+	+
239 B	+	-	+	+	+	+

Después de realizar 3 pases continuos para cada cepa y en cada medio con donador de electrones, se observó la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro, el cual indicó el crecimiento de las BRS aisladas.

Como se observa en la Tabla 27, la mayoría de los aislados fueron positivos para cinco de los seis donadores evaluados a una concentración final de 30mM. La cepa 239 A solo creció en presencia de Lactato y Etanol, pero no empleó Acetato, Benzoato, Fumarato y Succinato como donadores. En éste

caso el medio de cultivo conservó su color inicial sin la formación del precipitado de FeS.

Ningún aislado presentó crecimiento empleando el acetato como donador de electrones.

El lactato es uno de los sustratos más ampliamente usados para el cultivo de bacterias sulfato-reductoras en estudios bioquímicos (Odom & Singleton, 1993). Diversas especies de BRS pueden usar el lactato como un donador de electrones y fuente de carbono (Liamleam & Annachatre, 2007).

El etanol es otro de los donadores de electrones comúnmente usados. Es empleado como fuente de energía por muchas reductoras de sulfato como por ejemplo *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum* y por algunas cepas de *Desulfobacter* (Widdel, 1988).

El fumarato y succinato son ácidos dicarboxílicos usados por diversas especies de *Desulfovibrio* y por ciertas especies de *Desulfobacterium* (Widdel, 1988). El benzoato es usado por algunos géneros pertenecientes a éste grupo bacteriano.

Por el contrario, son pocas las BRS que emplean el acetato como donador de electrones. Este compuesto puede ser usado como donador de electrones y fuente de carbono en el proceso de reducción de sulfato. Especies del género *Desulfotomaculum* generalmente consume acetato, pero *Desulfovibrio* no usa acetato (Liamleam & Annachatre, 2007).

Las bacterias reductoras de sulfato aisladas utilizaron un amplio espectro de sustratos: lactato, etanol, benzoato, fumarato y succinato. El acetato no fue empleado por los aislados.

Las BRS exhiben una variedad de procesos metabólicos alternativos. Algunos organismos pueden llevar a cabo su respiración con fumarato, en la cual los electrones del lactato u oxidación el piruvato son tranferidos al fumarato, para generar succinato (Barton et al., 1970).

**4.3.9 Aceptores de electrones.** Al igual que en la prueba para donadores, se inoculó 1ml de la cepa a evaluar en medio líquido con diferentes aceptores de electrones a una concentración final de 10mM. Se llevó a incubación durante 15 días a 32 °C. Se realizaron 3 pases sucesivos para cada cepa en cada medio de cultivo.

**Tabla 28. Crecimiento de BRS aisladas con diferentes aceptores de electrones, 10 mM.**

CEPA	ACEPTORES DE ELECTRONES					
	SULFATO	SULFITO	NITRATO	TIOSULFATO	FUMARATO	AZUFRE
233 A	+	+	+	+	-	-
233 A1	+	+	+	+	+	-
233 B	+	+	+	+	+	+
234 A	+	+	+	+	+	+
234 B	+	-	-	+	(+)	-
236 A	+	+	-	+	-	-
236 B	+	+	+	+	+	+
237 A	+	+	-	+	+	-
237 A1	+	+	-	+	+	(+)
237 B	+	+	-	+	+	+
239 A	+	+	-	+	-	-
239 A1	+	+	+	+	(+)	(+)
239 B	+	+	+	+	+	+

En total fueron evaluados seis aceptores de electrones. El crecimiento fue evidenciado por la turbidez del medio de cultivo. El sulfato y tiosulfato fueron

empleados por todos los aislados. La cepa 234 B no empleó el sulfito como aceptor de electrones pues no se presentó turbidez en el medio que indicara crecimiento.

Seis de los trece aislados no presentaron crecimiento con nitrato como aceptor de electrones.

Con respecto al fumarato, tres aislados fueron negativos, y dos fueron positivo débil. El azufre como aceptor no fue empleado por seis aislados y se reportó poco crecimiento para dos cepas (Tabla 28).

Los aceptores más usados fueron el sulfato, tiosulfato y sulfito. El sulfato fue el principal aceptor empleado por los trece aislados. El tiosulfato es uno de los aceptores preferidos por sulfato-reductoras (Postgate, 1984; Widdel, 1988), presuntamente debido a que a diferencia del sulfato, éste no necesita activación antes que pueda ser reducido ( Odom & Singleton, 1993).

Con respecto al fumarato, es empleado por éste grupo bacteriano ya sea como donador o aceptor de electrones, así como sustrato fermentable (Suzuki et al., 2007).

En general, los aceptores de electrones evaluados, permitieron el crecimiento bacteriano. Estos resultados coinciden con datos obtenidos por Ollivier et al. (1988), al realizar estudios bioquímicos de una sulfato-reductora aislada a partir de sedimentos estuarinos.

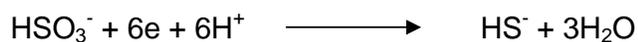
**4.3.10 Determinación de Desulfovirdina.** La prueba fue realizada según el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity, 2005). Luego de centrifugar los cultivos bacterianos y resuspender en agua desionizada, se adicionó 1 gota de 2N NaOH. Posteriormente se observó bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm.

**Tabla 29. Determinación de Desulfovirdina en los aislados.**

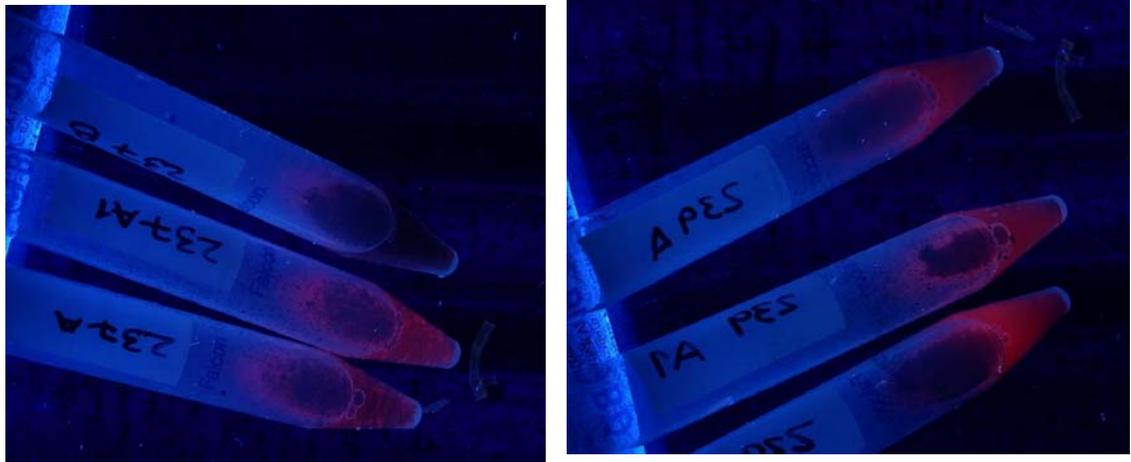
DESULFOVIRIDINA	
CEPA	RESULTADO
233 A	+
233 A1	+
233 B	+
234 A	+
234 B	+
236 A	+
236 B	+
237 A	+
237 A1	+
237 B	-
239 A	+
239 A1	+
239 B	+

Como se observa en la Tabla 29, doce de los trece aislados obtenidos a partir de las muestras acuosas, fueron positivas para la prueba. La cepa 237 B mostró un respuesta negativa.

La desulfovirdina conocida también como pigmento verde, de significado taxonómico para el género *Desulfovibrio*, presenta actividad bisulfito reductasa y puede catalizar la conversión de  $\text{HSO}_3^-$  a  $\text{S}^{-2}$  en un solo paso (LeGall et al., 1979). Las sulfito reductasas son importantes constituyentes de la cadena transportadora de electrones en bacterias reductoras de sulfato y cataliza la reducción de seis electrones de sulfito a sulfuro. La reacción es la siguiente (Steuber & Kroneck, 1998):



**Figura 35. Determinación de Desulfovirdina en BRS aisladas. En la izquierda se observa una reacción negativa (tubo negro).**



Todos los miembros del género *Desulfovibrio* dan una reacción positiva a la prueba de desulfovirdina, manifestándose como una fluorescencia roja (Figura 35) debido al cromóforo de sirohidroclorin del pigmento (Garrity, 2005).

Diversos estudios realizados con bacterias sulfato-reductoras han demostrado que especies del género *Desulfovibrio* son positivas para la presencia de ésta enzima (Ollivier et al., 1988; Mogensen et al., 2005).

**4.3.11 Determinación de Actividad Hidrogenasa.** La actividad hidrogenasa fue verificada empleando el Kit para prueba Hidrogenasa de Caproco (Figura 36). Después de seguir el procedimiento se evaluó constantemente el cambio de coloración en los tubos.

**Figura 36. Kit para Determinación de Actividad Hidrogenasa, Caproco.**



**Tabla 30. Determinación de la actividad Hidrogenasa para los aislados.**

HIDROGENASA	
CEPA	RESULTADO
233 A	+
233 A1	+
233 B	+
234 A	+
234 B	+
236 A	+
236 B	+
237 A	+
237 A1	+
237 B	+
239 A	+
239 A1	+
239 B	+

Todos los aislados fueron positivos para la prueba de hidrogenasa (Tabla 30). Los tubos presentaron un cambio de coloración de café claro a azul oscuro (Figura 37). El primer viraje se observó tres horas después de realizar el

montaje. La lectura final fue realizada 24 h después con el fin de detectar posibles actividades enzimáticas débiles.

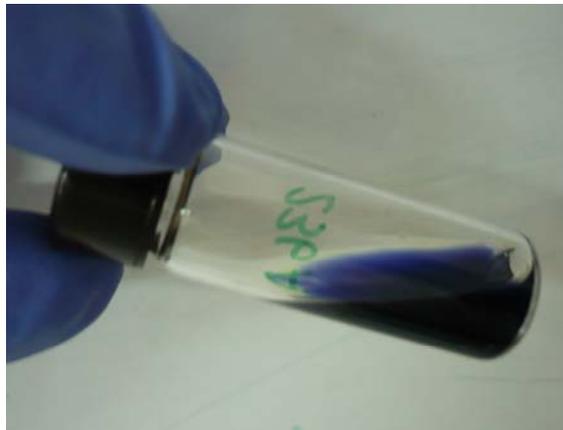
**Figura 37. Determinación de Hidrogenasa. a) Montaje inicial de la prueba. b) Lectura final de la prueba. c) Presencia de la enzima Hidrogenasa**



a



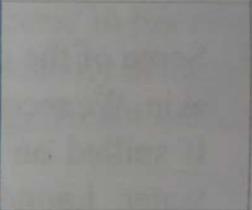
b



c

Al finalizar la prueba, los tubos con los aislados revelaron una coloración azul intensa que al comparar con la carta de colores suministrada por el kit (Tabla 31), indicó una actividad enzimática fuerte codificada con el número 3. Esta actividad fuerte muestra que aproximadamente las bacterias toman entre 5 a 5000 nmol de H<sub>2</sub> por minuto, lo cual generalmente está correlacionado a bacterias que participan activamente en procesos corrosivos.

**Tabla 31. Carta de colores para detección de actividad hidrogenasa.**

<b>3</b> <b>STRONG</b>	<b>2</b> <b>MODERATE</b>	<b>1</b> <b>WEAK</b>	<b>0</b> <b>NEGATIVE</b>
			
<b>5 TO 5,000</b> <b>NANOMOLES</b> <b>H<sub>2</sub> UPTAKE</b> <b>PER MINUTE</b>	<b>0.05 TO 5</b> <b>NANOMOLES H<sub>2</sub></b> <b>UPTAKE PER</b> <b>MINUTE</b>	<b>0.0 TO 0.5</b> <b>NANOMOLES H<sub>2</sub></b> <b>UPTAKE PER</b> <b>MINUTE</b>	<b>0.0</b> <b>NANOMOLES H<sub>2</sub></b> <b>UPTAKE PER</b> <b>MINUTE</b>

En las bacterias reductoras de sulfato, el H<sub>2</sub> bien sea procedente del medio o generado de algunos donadores orgánicos de electrones como el lactato, transfiere electrones a la enzima hidrogenasa, que está situada en el periplasma en estrecha asociación con el citocromo C3. Debido a la disposición espacial en la membrana de los componentes del sistema de transporte, cuando los átomos H del H<sub>2</sub> se oxidan, los protones (H<sup>+</sup>) permanecen fuera de la membrana; mientras que los electrones se transfieren a través de ella. Esto crea un gradiente de protones o fuerza motriz de protones que puede ser usada para la síntesis de ATP. En el citoplasma los electrones se usan en la reducción de APS y sulfito (Madigan et al., 1999).

Se ha establecido que uno de los mecanismos más importantes de la corrosión influenciada microbiológicamente, es la despolarización del cátodo por bacterias que emplean hidrógeno como las reductoras de sulfato. Este tipo de bacterias usan la enzima hidrogenasa para extraer energía de procesos de corrosión para sus actividades metabólicas. Esto resulta en corrosión localizada en forma de agujeros o picaduras y para algunas bacterias, la producción de H<sub>2</sub>S y depósitos de Sulfuro de Hierro.

Actualmente, los procedimientos se han concentrado en identificar la presencia de ciertos organismos marcadores como las BRS en muestras acuosas y de depósitos, determinando la influencia de las bacterias en celdas de corrosión midiendo la actividad de los organismos mas que su número absoluto. La presencia de la enzima hidrogenasa es un indicador real de la actividad de organismos causantes de corrosión (Caproco, 1987).

#### 4.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO

**Tabla 32. Bacterias reductoras de sulfato identificadas.**

CEPA	MICROORGANISMO
233 A	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
233 A1	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
233 B	<i>Desulfovibrio sp.</i>
234 A	<i>Desulfovibrio sp.</i>
234 B	<i>Desulfovibrio acrylicus</i>
236 A	<i>Desulfovibrio aminophilus</i>
236 B	<i>Desulfovibrio sp.</i>
237 A	<i>Desulfovibrio salexigens</i>
237 A1	<i>Desulfovibrio gabonensis</i>
237 B	<i>Desulfomicrobium sp.</i>
239 A	<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i>

239 A1	<i>Desulfovibrio sp.</i>
239 B	<i>Desulfovibrio sp.</i>

De acuerdo a las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias aisladas (Tabla 33), éstas corresponden a sulfato-reductoras que pertenecen a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* (Tabla 32).

Las BRS en particular los miembros del género *Desulfovibrio*, juegan un papel importante en la corrosión influenciada microbiológicamente de superficies metálicas sumergidas en ambientes acuáticos; básicamente debido a la producción de H<sub>2</sub>S el cual modifica el pH ambiental y lleva a la formación de productos de corrosión como el FeS (González et al., 2006).

Este género se caracteriza por presentar morfología variable, desde bacilos rectos, curvos y sigmoides hasta vibrios. Son Gram negativos, móviles, anaerobios estrictos y mesófilos. La mayoría de las especies oxidan compuestos orgánicos como el lactato incompletamente hasta acetato. Todos sus miembros contienen desulfoviridina e hidrogenasa, y están presentes en diversos hábitats como lodos anóxicos, agua dulce, ambientes marinos, incluso intestinos de animales (Garrity, 2005).

Miembros del género *Desulfomicrobium* presentan una morfología bacilar con extremos redondeados. Son Gram negativos, móviles, mesófilos, anaerobios estrictos y no producen esporas. A diferencia del género descrito anteriormente, éste no presenta desulfoviridina, ni morfología de vibrio, pero si la enzima hidrogenasa. Se encuentran en sedimentos y lodos anaerobios marinos y de agua dulce, depósitos orgánicos, y agua localizada a nivel de estratos anaerobios (Garrity, 2005).

Los géneros de bacterias reductoras de sulfato identificados en éste estudio, se relacionan con los obtenidos a partir de aguas de producción de diversos

campos petroleros en Francia (Magot et al., 1988). Lo anterior indica que miembros del género *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* son los principales microorganismos encontrados en éstos habitats, tal vez por su versatilidad para degradar diferentes compuestos orgánicos, empleándolos como donadores de electrones y fuentes de carbono en su metabolismo.

Además, las condiciones que brindan las aguas de producción, como pH cerca al neutro y temperaturas medias favorecen el crecimiento de éste tipo de bacterias.

**Tabla 33. Características morfológicas y fisiológicas de las bacterias reductoras de sulfato aisladas.**

CARACTERISTICAS	233A	233 A1	233 B	234 A	234 B	236 A	236 B	237 A	237 A1	237 B	239 A	239 A1	239 B
Morfología celular	Bacilo/ vibrio	Bacilo/ vibrio	Bacilo	Bacilo curvo	Bacilo curvo	Bacilo curvo	Bacilo	Bacilo curvo	Bacilo/ vibrio	Bacilo	Bacilo/ vibrio	Bacilo/ vibrio	Bacilo/ vibrio
Temperatura (° C)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30 – 45	30	30	30 – 45
pH	5.0- 8.5	8.0- 8.5	5.0- 8.5	8.0- 8.5	8.5	8.0- 8.5	4.5- 8.5	8.0- 8.5	8.0- 8.5	4.5- 8.5	8.0- 8.5	5.0- 8.5	5.0- 8.5
Indol	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
H <sub>2</sub> S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desulfovirdina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Hidrogenasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Donadores de electrones:													
Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoato	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Fumarato	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Succinato	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aceptores de electrones:													
Sulfato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sulfito	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Tiosulfato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fumarato	-	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	-	(+)	+
Azufre	-	-	+	+	-	-	+	-	(+)	+	-	(+)	+

+, presente, crecimiento; -, ausente, no crecimiento; (+), crecimiento débil.

#### **4.5 PRESERVACIÓN DE LAS BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO IDENTIFICADAS**

Las bacterias reductoras de sulfato aisladas y posteriormente identificadas fueron preservadas en medio líquido Postgate B, rico en un precipitado hierro ferroso. Los cultivos fueron refrigerados a 4° C dos días después de realizar el último repique, garantizando la presencia de células viables.

Dos meses después de la refrigeración de los aislados, se realizó un nuevo repique en medio líquido Postgate B llevando a incubación durante 8 días a 32° C. Transcurrido éste tiempo, se observó el crecimiento bacteriano evidenciado por la formación del precipitado de sulfuro de hierro.

## CONCLUSIONES

Las aguas de producción de campos petroleros favorecen el crecimiento de microorganismos asociados a procesos corrosivos como las bacterias reductoras de sulfato. Estos ambientes proveen las condiciones necesarias para que microorganismos mesófilos y ligeramente neutrófilos puedan llevar a cabo sus reacciones metabólicas.

El análisis microbiológico realizado a las muestras colectadas a partir de cabezas de pozo, indicaron la presencia de BRS pertenecientes al género *Desulfovibrio*. El género *Desulfomicrobium* estuvo presente en un solo pozo, el cual reportó el menor pH in situ.

La mayoría de las colonias bacterianas aisladas e identificadas presentaron un patrón morfológico similar, pulvinado umbilicado. La depresión localizada en la zona superior de las colonias probablemente permitiría la expulsión del Sulfuro de Hidrógeno producto de su metabolismo.

Los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfomicrobium* son los principales microorganismos encontrados en las aguas de producción petrolera, probablemente debido a su versatilidad el emplear diversos compuestos orgánicos como donadores y aceptores de electrones, lo cual fue evaluado en éste trabajo.

Pruebas bioquímicas como la presencia de desulfovirdina e hidrogenasa, fueron determinantes en la identificación de las bacterias sulfato-reductoras aisladas.

## RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares para caracterizar las bacterias reductoras de sulfato presentes en diversos sistemas industriales con el fin de conocer los géneros probablemente asociados a procesos corrosivos.

Para futuros análisis realizar el aislamiento de bacterias reductoras de sulfato empleando diferentes donadores de electrones en el medio de cultivo. De esta manera se obtendrá un mayor número de géneros.

Estudios mas detallados son necesarios acerca de la fisiología de las bacterias reductoras de sulfato aisladas a partir de aguas de producción de campos petroleros, empleando un rango más amplio de compuestos que puedan actuar como donadores y aceptores de electrones.

Estandarizar las condiciones de preservación para las bacterias reductoras de sulfato empleando diversos métodos.

## BIBLIOGRAFÍA

Barton, L., LeGall, J. and Peck, H. 1970. Phosphorylation coupled to oxidation of hydrogen with fumarate in extracts of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 41: 1036-1042.

Barton, L., Hamilton, A. 2007. Sulphate-reducing bacteria. Environmental and Engineered systems. Cambridge University Press. 20-31.

Beech, I. and Gaylarde, C. 1999. Recent Advances in the study of Biocorrosion.: An overview. Revista de microbiología. 30: 177-190.

Beech, I. and Sunner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. Environmental Biotechnology. 15: 181-186.

Borenstein, S. 1994. Microbiologically Influenced Corrosion Handbook. Woodhead Publishing. 22-33.

Bradford, S. 1993. Corrosion Control. Van Nostrand Reinhold. 3-11.

Caproco Ltda., Edmonton, Alberta, Canada. 1987. Instruction Manual.

Castro, H., Williams, N. and Ogram, A. 2000. Phylogeny of sulphate-reducing bacteria. FEMS Microbiol Ecol. 31: 1-9.

Chalela, G. 1991. Informe Final II: Estudio fisiológico, caracterización y actividad metabólica de las BSR encontradas en los sistemas de inyección de agua. Universidad Industrial de Santander.

Cypionka, H., Widdel, F. and Pfennig, N. 1985. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 39-45.

Devereux, R., He, S., Doyle, C., Orkland, S., Stahl, D., LeGall, J., Whitman, W. 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology.* 3609-3619.

Dolla, A., Fournier, M., Dermoun, Z. 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology.* 126: 87-100.

ECOPETROL, 2003. Carta Petrolera: El regreso de la Cira. Edición 108.

Feio, M., Beech, I., Carepo, M., Lopes, J., Cheung, C., Franco, R., Guezennec, J., Smith, J., Mitchell, J. Moura, J and Lino, A. 1998. Isolation and Characterization of a novel sulphate-reducing bacterium of the *Desulfovibrio* Genus. *Anaerobe.* 4: 117-130.

Garrity, G. 2005. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Volumen 2: Parte C Alfa-, Beta-, Delta-, y Epsilon Proteobacteria.* Brenner, D., Krieg, N., Staley, J. (Eds) Berlin: Springer-Verlag Publishers. 925-948.

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

Hatchikian, E., Bell, G. and LeGall, J. 1977. Significance of superoxide dismutase and catalase activities in the strict anaerobes, sulfate-reducing bacteria, in : Michelson, A., McCord, J., Fridovich, I. Eds, *Superoxide dismutase.* Academic Press, London, United Kingdom. 159-172.

Iverson, W. 1972. Biological corrosion, en *Advances in corrosion science and technology*. Vol. 2, eds M. G. Fontana and R. W. Staehle, 1. Plenum Press, London.

Jack, R. , Ringelberg, D., White, D. 1992. Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus* sp., *Hafnia alvei*, and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilm. *Corr. Sci.* 33: 1843-1853.

Jack, T. 2002. Biological Corrosion Failures. *ASM International Handbook*.11: 1-18.

Jones, D. 1996. Principles and prevention of corrosion. Second edition. Prentice Hall. 372-381.

Jones, D. and Amy, P. 2002. A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion*. 58: 638-645.

Koneman, A., Dowell, J., Sommers, W. 1988. Diagnóstico microbiológico. 190-260.

Knox, J. 1968. The role of government in international co-operative research, in *Biodeterioration of materials*, eds A. H. Walters and J. J. Elphick, 1. Elsevier, London.

LeGall, J., DerVartanian, D. and Peck, H. 1979. Flavoproteins, iron proteins and hemoproteins as electron-transfer components of the sulfate-reducing bacteria. *Current Topics in Bioenergetics*. 9: 237-265.

Liamleam, W., Annachhatie, A. 2007. Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*. 25: 452-263.

- Little, B. and Ray, R. 2002. A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion*. 58: 424-428.
- Little, B., Lee, J. 2007. *Microbiologically Influenced Corrosion*. New Jersey. John Wiley & Sons. 14-32.
- Loubioux, J., Valente, F., Pereira, I., Costa, A., Grimont, P., LeFaou, A. 2002. Reclassification of the only species of the genus *Desulfomonas*, *Desulfomonas pigra*, as *Desulfovibrio piger* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1305-1308.
- Luptakova, A. 2007. Importance of Sulphate-reducing Bacteria in Environment. *Nova Bioteconológica*. VII – I: 17-22.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 1999. *Brock Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice may. Madrid. 505-510.
- Magot, M., Tardy, C., Caumette, P., Hurtevent, C., Crolet, J. 1988. Identification of sulphate-reducing bacteria from production water of various oil fields. 576-580.
- Maukonen, J., Saarela, M., Raaskal, L. 2006. Desulfovibrionales-related bacteria in a paper mill environment as detected with molecular techniques and culture. *J. Ind. Microbial Biotechnol.* 33: 45-54.
- Miller, T., Wolin, M. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied microbiology*. 27: 985-987.
- Mogensen, G., Kjeldsen, K., Ingvorsen, K. 2005. *Desulfovibrio aerotolerans* sp. Nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from acrtived sludge. *Anaerobe*. 11: 339-349.

Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T. and Hanada, S. 2003. A novel lineage of sulphate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. Nov., Thermodesulfobium narugense, gen. Nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. Extremophiles. 7: 283-290.

NACE International, 2004. Standard TM0194: Field monitoring of bacterial growth in oil and gas systems. 1-17.

Nielsen, J., Liesack, W., Finster, K. 1999. Desulfovibrio zosterae sp. Nov., a new sulfate reducer isolated from surface-sterilized roots of the seagrass Zostera marina. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 859-865.

Odom, J., Singleton, R. 1993. The sulfate-reducing bacteria: Contemporary Perspectives. Springer-Verlag. New York.

Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Hatchikian, E., Garcia, J. 1988. Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. Nov. Arch. Microbiol. 149: 447-450.

Parkins, R. 1982. Corrosion Process. Applied Science Publishers. 115-159.

Postgate, J. 1963. Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. 265-267.

Rapp, B. and Wall, J. 1987. Genetic transfer *Desulfovibrio desulfuricans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 9128-9130.

Santegoeds, C., Fredelman, T., Muyzeer, G., de Beer, D. 1998. Structural and functional dynamics of sulphate-reducing populations in bacterial biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 3731-3739.

Sass, H., Cypionka, H. 2004. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description at *Desulfovibrio cavernae* sp. Nov. System Appl Microbiol. 27: 541-548.

Stams, A. and Hansen, T. 1982. Oxygen-labile L(+) lactate dehydrogenase activity in *Desulfovibrio desulfuricans*. FEMS Microbiol. Lett. 13: 389-394.

Sungur, E., Cansever, N., Catuk, A. 2007. Microbial Corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate-reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp.). Corrosion Science. 49: 1097-1109.

Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A., Ueki, K. 2007. Diversity of substrate utilization and growth characteristics of sulphate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 53: 119-132.

Videla, H. 1996. Manual of Biocorrosion. Lewis Publisher. 1-45.

Videla, H., Herrera, L. 2005. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. International microbiology.8: 169-180.

Widdel, F. 1988. Microbiology and ecology of sulfate-reducing bacteria. 469-585, in Zehnder, A. Biology of Anaerobic Organisms. John Wiley, New York.