



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

INFLUENCIA DEL BIOFILM DE ***DESULFOVIBRIO*** SP EN LA
BIOCORROSIÓN DE ACERO AL CARBONO SAE1018
EN AGUAS DE INYECCIÓN.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

EDGAR JOE PÉREZ MORENO.

DIRECTORA DE TESIS.

FLORINA RAMÍREZ VIVES.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**INFLUENCIA DEL BIOFILM DE *DESULFOVIBRIO* SP EN LA
BIOCORROSIÓN DE ACERO AL CARBONO SAE1018 EN AGUAS DE
INYECCIÓN.**

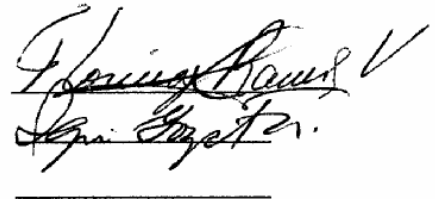
Que presentó
Edgar Joe Pérez Moreno.

Comité Tutorial.

Directora: Dra. Florina Ramírez Vives.

Asesores: Dr. Ignacio González Martínez.

Dr. Eliceo Sosa Hernández.



Jurado.

Presidenta: Dra. Monica Meraz Rodríguez.

Secretario: Dr. Ignacio González Martínez

Vocales : Dr. Román Cabrera Sierra

Dr. Felipe Martínez Orta.



Este trabajo fue realizado en los laboratorios de:

Fisiología Microbiana, Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas
Residuales del Departamento de Biotecnología.

Electroquímica del Departamento de Química.

Microscopía electrónica.

Pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está
incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del **CONACYT** Registro 0471-0.

Iztapalapa, D.F. a 15 de enero del 2006

AGRADECIMIENTOS.

Al CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de maestría con el contrato número 181016.

Especialmente a Karito por estar incondicionalmente en mis malos (casi siempre) y buenos momentos (100-casi siempre), por haberme tenido una paciencia que solo tu gran amor puede lograr, por ser mi compañera fiel y mi gran amiga con todo mi amor para ti.

De la manera más atenta y con mucho cariño a la Dra. Florina por permitirme caminar a su lado durante el inicio de mi formación científica y por compartirme sin dudarle su amplia experiencia e ineludiblemente por ser una gran amiga y compañera de trabajo.

A Nacho, por haberme integrado a su equipo de trabajo y compartirme hasta el día de hoy una fracción de lo mucho que aun puedo recibir de ti, deseando poder continuar trabajando en conjunto.

A Román, por tu atención, tiempo y dedicación, desinteresada, para explicarme la más mínima duda durante mi estancia en el complejo mundo de la electroquímica y por permitirme ser tu amigo.

A mis padres y hermanito, por creer siempre en el niño que jugaba al químico, que ahora da sus primeros pasos como científico, con mi amor para ustedes.

Al Dr. Eliceo por su apoyo y comprensión cuando lo requerí.

Deseo agradecer de la manera más atenta al Dr. Jorge Gómez y a la Dr. Flor Cuervo por haberme adoptado por unos cuantos meses en sus instalaciones.

Dr. Sepúlveda por su gran apoyo y experiencia aplicada durante este trabajo y por su gran amistad que se que nunca podré olvidar.

A Landy por su apoyo durante mi estancia en las instalaciones de los Gómez.

A Diana por su amistad y comprensión cuando más lo necesite.

A mis amigos Ula y Juan por su amistad y apoyo reciproco e incondicional.

Y a mis inolvidables compañeros de laboratorio Lulzo, Huizi, Toba, yaruka y dora.

Y todas aquellas personas que contribuyeron para mi formación personal y profesional que han caminado a mi lado.

Sin duda alguna a mi CASA ABIERTA AL TIEMPO y mi MÉXICO por permitirme recibir una educación superior que siempre defenderé y pondré en alto; con orgullo y honestidad, ante todo y ante todos.

RESUMEN.

INFLUENCIA DE LA BIOPELÍCULA DE *DESULFOVIBRIO* SP EN LA BIOCORROSIÓN DE ACERO AL CARBONO SAE1018 EN AGUAS DE INYECCIÓN.

Durante las últimas décadas, la extracción de petróleo se ha realizado costa afuera, sin embargo al realizarse costa dentro, uno de los mayores problemas que se presenta es la corrosión inducida por microorganismos; siendo las bacterias sulfato reductoras uno de los grupos microbianos más comúnmente asociado a este tipo de problemas. Una de las principales dificultades al realizar estudios de biocorrosión es la propagación y producción de biopelículas en el laboratorio, siendo una de las etapas más importantes en este proceso la interfase acero al carbono/biopelícula/agua de mar, debido a que por la complejidad de esta interfase no han sido estudiados por separado, el efecto del metabolismo microbiano y de las sustancias exopoliméricas presentes en la biopelícula. Por lo que en este trabajo se estudió la interfase acero/película de sustancias exopoliméricas/agua de mar, para lo cual se propagó una cepa de *Desulfovibrio* sp. en medio de cultivo Posgate C. Al emplear una relación C/N = 12 se obtuvo un tiempo de duplicación de 80h; una vez en estas condiciones se consiguió producir una cantidad mayor de biopelícula, la cual se adaptó en agua de mar sintética presentando un tiempo de duplicación de 62h. Con las condiciones de cultivo establecidas se obtuvieron dos biopelículas de características estructurales (visualmente) diferentes, las cuales fueron observadas por microscopía electrónica de barrido, para determinar sus características. Se cuantificaron carbohidratos y proteínas exopoliméricas, encontrándose que para la biopelícula adaptada en medio posgate y la obtenida en agua de mar la producción de proteínas exopoliméricas no varía significativamente, lo cual no ocurre para la producción de carbohidratos exopoliméricos. En los estudios de microscopía electrónica de barrido se observó que la evolución de la biopelícula depende de la concentración de los componentes presentes en el agua de mar sintética. En medio Postgate se pudo observar que no existe un arreglo definido de las sustancias exopoliméricas y las bacterias presentes en esa biopelícula; sin embargo, al adaptar la biopelícula en agua de mar y realizar diluciones volumen a volumen de ésta, se encontró que a partir de la dilución 1:4 las sustancias exopoliméricas se modifican estructuralmente; presentando un arreglo laminar que inicialmente cuenta con un tamaño promedio de 3 μm por 4 μm . La biopelícula obtenida en agua de mar presentó un arreglo bien definido de las sustancias exopoliméricas, así como una superficie homogénea, en donde las bacterias son cubiertas por las sustancias exopoliméricas, en el cual la concentración de microorganismos fue de $5.6 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$ en comparación con la biopelícula obtenida en medio Postgate en donde la concentración microbiana fue de $3.2 \times 10^{15} \text{ UFC/mL}$. Los análisis por impedancia revelaron que el acero al carbono SAE1018 en agua de mar bajo condiciones anaerobias es una especie pasiva hasta un tiempo de inmersión de 3h, incrementando esta propiedad hasta un tiempo de 12h de inmersión, alcanzando el acero al carbono SAE1018 magnitudes de impedancia de 12000 Ω , lo cual lo convierte en una especie poco conductora y homogénea, en las etapas iniciales del proceso de corrosión. La formación de la interfase acero/biopelícula tiene como consecuencia la pasividad de la superficie de acero al carbono SAE 1018 con magnitudes de impedancia que alcanzan el orden de los 34000 Ω , bajo las condiciones de operación establecidas, sin embargo en tiempos de inmersión mayores a las 140h el proceso de biocorrosión se ve activado nuevamente debido a que las magnitudes de impedancia disminuyen hasta los 1400 Ω , como consecuencia del desprendimiento de la biopelícula de esa interfase.

SUMMARY.

IT INFLUENCES OF THE BIOFILM OF *DESULFOVIBRIO* SP IN THE BIOCORROSION OF CARBON STEEL SAE1018 IN INJECTION WATERS.

During the last decades, the petroleum extraction has been made coast outside, nevertheless when being made coast inside, one of the greater problems than it appears is the corrosion induced by microorganisms; being the reducing bacteria sulphate one of the microbial groups more commonly associated to this kind of problems. One of the main difficulties when making biocorrosión studies is the propagation and production of biofilms in the laboratory, being the one of the most important stages in this process interphase carbon steel/biofilm/seawater, because by the complexity of this interphase they have not been studied separately, the effect of the microbial metabolism and the exopolymeric substances present in biofilm. Reason why in this work the interphase studied carbon steel/film of exopolymeric substances/seawater, for which a stock of *Desulfovibrio* sp was propagated in the middle of culture Posgate C. When using a ratio C/N = 12 obtained a time of duplication of 80h; once in these conditions one was able to produce a greater amount of biofilm, which adapted in water of synthetic sea presenting/displaying a time of duplication of 62h. With the established conditions of culture two were obtained biofilms of structural characteristics (visually) different, which were observed by electronic microscopy of sweeping, to determine its characteristics. Carbohydrates and exopolymeric proteins were quantified, being that for biofilm in the middle adapted Posgate and obtained in seawater the exopolymeric protein production does not vary significantly, which does not happen for the exopolymeric carbohydrate production. In the studies of electronic microscopy of sweeping it was observed that the evolution of biofilm depends on the concentration of the component presents in the synthetic seawater. In the middle Postgate could be observed that a defined adjustment of the exopolymeric substances and the bacteria present in that does not exist biofilm; nevertheless, when adapting biofilm in seawater and making dilutions volume to volume of this one, was that from dilution 1:4 the exopolymeric substances are modified structurally; presenting/displaying a laminar adjustment that initially counts on a so large average of 3?m by 4?m. Biofilm obtained in seawater presented/displayed a defined affluent adjustment of the exopolymeric substances, as well as a homogenous surface, in where the bacteria are covered by the exopolymeric substances, in which the concentration of microorganisms was of 5.6×10^6 UFC/mL in comparison with biofilm obtained in Postgate middle in where the microbial concentration was of 3.2×10^{15} UFC/mL. The analyses by impedance revealed that the carbon steel SAE1018 in water of sea under anaerobic conditions is a passive species until a time of immersion of 3h, increasing this property until a time of 12h of immersion, reaching the carbon steel SAE1018 magnitudes of impedance of 12000Ω , which turns it a conductive and little homogenous species, in the initial stages of the corrosion process. The formation of the interphase carbon steel/biofilm has like consequence the passivity of the surface of carbon steel SAE 1018 with magnitudes of impedance that reach the order of the 34000Ω , under the conditions of operation established, in the days of immersion nevertheless greater to 140h the biocorrosión process one is again activated because the magnitudes of impedance diminish until the 1400Ω , as a result of the loosening of biofilm of that interphase.

ÍNDICE DE FIGURAS.	I
ÍNDICE DE TABLAS.	II
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Problemática Actual.	2
1.2 Antecedentes.	5
1.6 Justificación.	17
1.7 Objetivo General.	18
1.7.1 Objetivos Particulares.	18
1.8 Planteamiento De Hipótesis.	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	
2.1 Inóculo	21
2.2 Medio de Cultivo	22
2.3 Producción de biopelícula	23
2.4 Mantenimiento de la biopelícula	24
2.5 Cinética de crecimiento	26
2.6 Adaptación de la biopelícula en agua de mar	27
2.7 Extracción de exopolímeros.	28
2.8 Método para medir proteínas. Método de Lowry modificado (Lowry 1951)	28
2.9 Método para medir carbohidratos.	29
2.10 Determinación de bacterias en la biopelícula mediante el método del número más probable.	30
2.11 Medición de los sólidos suspendidos totales (SST).	31
2.12 Observación por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).	32
2.13 Celda electroquímica.	35
2.14 Electrodo de trabajo.	38
2.15 Inducción del daño a electrodos.	39

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Propagación de la biopelícula en medio Postgate.	44
3.2. Propagación de biopelícula en AMS.	47
3.3. Evaluación de sustancias presentes en la biopelícula.	49
3.4 Determinación de bacterias presentes en la biopelícula por el método NMP (Mc. Grady, 1957)	55
3.5 Análisis por microscopia electrónica de barrido.	57
3.6 Análisis por espectroscopia de electroquímica de impedancia.	62
3.6.1 Mecanismo de corrosión para acero al carbono SAE1018 en AMS bajo condiciones anóxicas.	62
3.6.2 Caracterización electroquímica de la interfase acero al carbono / AMS, por espectroscopia de impedancia electroquímica.	64
3.6.3 Caracterización electroquímica del acero al carbono SAE 1018 en presencia de biopelícula de <i>Desulfovibrio sp.</i>	70
3.6.4 Caracterización electroquímica del acero al carbono SAE 1018 en presencia de biopelícula de <i>Desulfovibrio sp.</i>	71
3.7 Análisis cuantitativo de los diagramas de EIS.	79

4. CONCLUSIONES 90

5. BIBLIOGRAFÍA. 94

ANEXO A

I. Generalidades de electroquímica.	ii
II) Impedancia de espectroscopia electroquímica.	v
III) Impedancia como función de transferencia.	vii
IV) Representaciones gráficas de las medidas de impedancia.	ix
V) Diagrama de Nyquist.	ix
VI) Elementos Presentes en un diagrama De Nyquist.	x

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 2.1. Botella serológica con biopelícula de <i>Desulfovibrio sp.</i>	22
Figura 2.2. Curva patrón para determinación de proteínas.	29
Figura 2.3 Curva patrón para la determinación de carbohidratos.	30
Figura 2.4. Cámara de secado al punto crítico.	33
Figura 2.6. Celda electroquímica.	34
Figura 2.7. Tapa en Naylamid®.	36
Figura 2.8. Propela en Naylamid ®.	37
Figura 2.9. Electrodo de trabajo.	37
Figura 3.1. Concentración celular de <i>Desulfovibrio sp</i> a diferentes relaciones C / N:i) 2.18,ii)3, iii)8,iv)12y v)16 en medio Postgate con lactato 40mM.	45
Figura 3.2. Crecimiento de <i>Desulfovibrio sp</i> en AMS con lactato 40mM.	48
Figura 3.3. Producción de carbohidratos i) solubles y ii) exopoliméricos en la biopelícula de <i>Desulfovibrio sp</i> , en medio Postgate a una C / N=12.	50
Figura 3.4. Producción de proteínas i) solubles y ii) exopoliméricos en la biopelícula de <i>Desulfovibrio sp</i> , en medio Postgate a una C / N=12.	50
Figura 3.5. Producción de carbohidratos i) solubles y ii) exopoliméricos en la biopelícula de <i>Desulfovibrio sp</i> , cultivado en AMS con lactato 40mM.	51
Figura 3.6. Producción de proteínas solubles y exopoliméricas en la biopelícula de <i>Desulfovibrio sp</i> , cultivado en AMS con lactato 40mM.	53
Figura 3.7 Biopelícula cultivada en a) medio Postgate y b) AMS.	57
Figura 3.7 Biopelícula cultivada en a) medio Postgate y b) AMS.	59
Fig.3.8. Micrografía electrónica a 5000x de biopelícula cultivado en a) Medio Postgate y b) AMS 1:4.	60
Figura 3.9. Micrografía electrónica a 5000x de la biopelícula propagada en a) AMS 1:3 y b) AMS.	60
Figura 3.10. Representación mecanística del proceso de corrosión del acero al carbono SAE1018 en agua de mar bajo condiciones anóxicas.	63
Figura 3.11. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a)0h b) 1h de inmersión. El recuadro representa los valores de impedancia obtenidos a altas frecuencias.	65
Figura 3.12 Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a 2, y 12 horas de inmersión.	66

Figura 3.13. Diagramas de Nyquist para carbono SAE1018 en AMS, valores experimentales obtenidos a altas frecuencias a 0h,1h, 2h , 3h y 12h de inmersión.	67
Figura 3.14. Diagrama de Bode para acero al carbono SAE1018 en AMS, a) ángulo de fase y b) plano complejo ambos horas de inmersión.	69
Figura 3.15 Representación mecanística del proceso de corrosión del acero al carbono SAE1018 en presencia de <i>Desulfovibrio</i> sp en agua de mar bajo condiciones anóxicas.	71
Figura 3.16. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS en presencia de biopelícula de <i>Desulfovibrio</i> sp	73
Figura 3.17. Ampliación de diagrama de Nyquist en la zona correspondiente a altas frecuencias para acero al carbono SAE1018 en AMS en presencia de biopelícula de <i>Desulfovibrio</i> sp a a i) 0h, ii) 1h, iii) 2h, iv) 12h y v) 40h y vi)140	75
Figura 3.18. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en presencia de biopelícula de <i>Desulfovibrio</i> sp a 140h de inmersión a) bajas frecuencias b) altas frecuencias.	75
Figura 3.19.a. Diagrama de bode de ángulo de fase para la interfase acero /biopelícula de <i>Desulfovibrio</i> sp a i) 0h, ii) 1h, iii) 2h , iv) 12h y v) 40h y vi)140 horas de inmersión.	76
Figura 3.19.b. Diagrama de bode de ángulo de fase para la interfase acero /biopelícula de <i>Desulfovibrio</i> sp a i) 0h , ii) 1h, iii) 2h , iv) 12h y v) 40h y vi) 140 horas de inmersión.	77
Figura 3.20. Circuito equivalente para tres constantes de tiempo.	79
Figura 3.21.a Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a diferentes tiempos de inmersión, la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.	81
Figura 3.21.B. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a 0h y 1h de inmersión, los puntos corresponden a los valores experimentales y la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.	82
Figura 3.22 Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE 1018 en AMS en presencia de biopelícula de <i>Desulfovibrio</i> sp a i) 0h, ii) 1h, iii) 2h ,iv) 12h y v) 40h diferentes tiempos de inmersión, la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.	84
Figura 3.22.B. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE 1018 en AMS en presencia de biopelícula 140 horas inmersión, la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.	85
Figura 3.19. Circuito equivalente con tres constantes de tiempo propuesto para éste proceso.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Composición de medio Postgate. (Postgate,1965) .	23
Tabla 2.2 Composición de medio del Postgate Modificado, C / N=12.	25
Tabla 2.3 Composición del agua de mar ASTM. (Norma ASTM D665B).	28
Tabla 3.1 Tiempo de duplicación de <i>Desulfovibrio sp</i>	46
Tabla 3.2 Producción de carbohidratos y proteínas.(Valores promedio correspondientes a 32 muestras analizadas	54
Tabla 3.3 Coeficiente de variación para proteínas y carbohidratos Postgate AMS	54
Tabla 3.4 Determinación de número células en medio Postgate (C / N=12) y AMS con lactato 40 Mm	55
Tabla 3.5. Parámetros electroquímicos obtenidos para el circuito equivalente propuesto.	80
Tabla 3.6. Parámetros electroquímicos obtenidos para el circuito equivalente propuesto.	83

Dedicado

A DIOS y a la Naturaleza.

Por ser maravillosamente perfectos.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN.





1.1 Problemática Actual.

Durante las últimas décadas la extracción de petróleo no sólo se ha llevado acabo costa adentro, se ha expandido más costa afuera, lo que ha conducido a incrementar la atención sobre el monitoreo y control de uno de los problemas, con mayor importancia, encontrados en sistemas submarinos; la corrosión relacionada con el crecimiento de microorganismos dentro de la tuberías, así como a la adherencia y crecimiento de biopelículas en el interior de las líneas de inyección. Estos problemas han sido ampliamente relacionados a la presencia de bacterias sulfato reductoras (BSR). En la industria petrolera las pérdidas causadas por la corrosión inducida microbiológicamente (MIC) son enormes, por citar algunos ejemplos; Escom, empresa sudafricana que aporta el 90% de energía para ese país, ha detectado que tanto en sistemas de agua de enfriamiento, como en sistemas de inyección de agua, existe MIC sobre tuberías fabricadas con acero al carbono, teniendo que invertir miles de millones de dólares al tener que realizar reparaciones de las instalaciones dañadas.

Los costos por MIC en la industria petrolera y gasera, así como las pérdidas por MIC son sustanciales; siendo estimado que el 34% del daño por corrosión es relacionado a los microorganismos. En el Reino Unido la reparación y reemplazo de oleoductos dañados por MIC fue reportada recientemente en 250 millones de euros por año y en USA fueron estimados en un intervalo de 0.5-2 billones de dólares por año.

En México la red de ductos que tiene Petróleos Mexicanos (PEMEX) cuenta con aproximadamente 56 mil kilómetros, de los cuales 54 mil son terrestres y dos mil marinos; cerca del 50 por ciento de ellos, tienen más de 30 años de servicio, por lo que con el paso del tiempo han sufrido fallas originadas principalmente por la corrosión de las bacterias, golpes de maquinaria, tomas clandestinas y fisuras en soldaduras,



desafortunadamente en México actualmente no se encuentran disponibles cifras de los costos generados por la MIC en la industria petrolera.

La formación de una biopelícula en agua de inyección es promovida inicialmente por la necesidad de introducir agua de mar a un pozo petrolero, cuando éste ya no cuenta con el gradiente de presión necesario para la extracción del crudo. Esta acción tiene como consecuencia que el agua introducida al oleoducto presente una gran carga microbiana en la cual el grupo de las bacterias sulfato reductoras es de gran importancia, debido a que por su naturaleza anaerobia, comúnmente se sitúan en la interfase más próxima al acero, teniendo una gran importancia en la biocorrosión de éste.

Recientemente se ha informado que los microbios pueden variar los grados de corrosión localizada a inhibición de corrosión, siendo una posible explicación la formación de biopelículas. Estas biopelículas consisten de células microbianas y sustancias extracelulares poliméricas o exopolímeros (EPS). Estas sustancias facilitan tanto la adherencia irreversible de las células a la superficie, así como de precipitados inorgánicos formados a partir de la fase acuosa o bien de productos de corrosión del sustrato metálico. Los EPS consisten de una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Al ser necesaria la evaluación del fenómeno de corrosión, se han desarrollado diferentes procedimientos para ello, dentro de los cuales el más comúnmente empleado es el de pérdida por peso sobre cupones del material en estudio; desafortunadamente, este procedimiento no aporta información de acerca de las diferentes etapas que influyen en el proceso de biocorrosión. Además la mayoría de los estudios de biocorrosión han considerado de manera indistinta las células



microbianas y a la película de sustancias exopoliméricas formados por éstas. Sin embargo las características de estos componentes en las biopelículas suelen ser tan diferentes, que es necesario estudiar la cantidad de cada uno de ellos por separado. Por esta razón en este trabajo se considera particularmente la caracterización de la interfase acero al carbono/Película de exopolimeros en un medio lo más cercano al agua de mar.

De esta manera se pretende simular las condiciones ambientales que se generan entre el acero al carbono, la biopelícula y el agua de mar real. Tratando con ello disminuir los efectos que producen sobre el acero los medios de cultivo y los agentes reductores requeridos por las BSR para su desarrollo, los cuales han sido ampliamente utilizados en este tipo de experimentos. Al ser necesaria la producción de una biopelícula para los estudios de biocorrosión se realizaran modificaciones en la relación C/N del medio de cultivo empleado, para lograr inducir la producción de EPS, y posteriormente adaptar la biopelícula obtenida a agua de mar sintética.

Por ello y debido a la complejidad de las interfases formadas en este fenómeno, en el presente trabajo se emplea la técnica de impedancia de espectroscopia electroquímica (EIS, por sus siglas en ingles) la cual ofrece información de las diferentes etapas que ocurren en este fenómeno. Una vez formado la biopelícula, constituida en mayor parte por exopolímeros, y adaptada al agua de mar sintética (AMS), se deposita sobre la superficie del acero al carbono, y se evalúa la evolución del acero al carbono, así como la evolución de la interfase en función del tiempo de inmersión. Esta evaluación se lleva acabo obteniendo diagramas de EIS a los diferentes tiempos de inmersión del acero al carbono en agua de mar, con el fin de evaluar la influencia de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp, en la pruebas de corrosión del acero al carbono en agua de mar y comparar los resultados obtenidos por EIS de la superficie de acero al carbono en agua de mar.



1.2 ANTECEDENTES.

Newman R.C.,y *Col.*, 1992, Barton 1995 han propuesto que la formación de una biopelícula puede cambiar la cinética electroquímica de la interfase metal /líquido permitiendo localizar la corrosión del metal. Una biopelícula madura puede alterar considerablemente la difusión de O₂, el transporte de masa y el pH.

Ha sido ampliamente aceptado que la formación de biopelículas inicia inmediatamente después que el metal ha sido sumergido en un medio acuoso, formándose una película muy delgada de 20-80 nm de espesor debido a la deposición de iones inorgánicos y compuestos orgánicos de alto peso molecular en una primera etapa. Esta película formada inicialmente es capaz de retener la carga electrostática de la superficie metálica facilitando su posterior colonización por los microorganismos, formándose una biopelícula no visible en la interfase metal/solución. (Characklis and Marshall,1990) .

En la mayoría de los ambientes naturales y experimentales, se han encontrado EPS en configuraciones ordenadas, los cuales son comúnmente encontrados en temperaturas bajas y en altas concentraciones de sales. Los polisacáridos son esencialmente muy grandes, con una masa molecular del orden de $0.5 - 2.0 \cdot 10^6$ Da, por lo cual pueden asociarse de diferentes maneras. La matriz de exopolímeros (biopelícula) puede ser poco uniforme, en consecuencia cualquier muestra tomada para un análisis representara únicamente una “fotografía” de la composición de los EPS en ese instante. La cantidad de EPS sintetizados dentro de una biopelícula dependerá en gran medida de la disponibilidad de sustratos con carbono tanto dentro como fuera de la célula, y así mismo del balance de carbono y otros nutrientes.

En tiempo corto el crecimiento microbiano y la producción de exopolímeros darán como resultado el desarrollo de una biopelícula. Por lo tanto una biopelícula es la



acumulación en una superficie la cual no necesariamente es uniforme en el tiempo y el espacio, con esto se crea una interfase la cual está gobernada por diferentes procesos de transporte a través de la biopelícula. (Characlis, 1981), se ha propuesto que la formación de una biopelícula sigue los siguientes pasos de manera general:

- a) Transporte de moléculas orgánicas del seno de la solución a la superficie metálica, donde algunos pueden ser adsorbidos en esa superficie, presentándose de esta manera un sustrato en la superficie del metal.
- b) Una fracción de los microorganismos presentes en el plancton, es transportada del seno de la solución a la superficie acondicionada con un sustrato.
- c) Una fracción de esas células se pega al sustrato adsorbido por un lapso de tiempo y después se despega de él. Este proceso es llamado adsorción reversible.
- d) La desorción puede resultar de fuerzas de corte producidas por el fluido, pero no se debe de olvidar que factores físicos, biológicos y químicos pueden influenciar este proceso.
- e) Una fracción de las células adsorbidas reversiblemente, se pueden mantener inmovilizadas teniendo un gran tiempo de residencia y siendo absorbidas irreversiblemente.
- f) Entonces las células absorbidas irreversiblemente crecen dependiendo de la presencia de sustratos y nutrientes presentes en la solución, incrementando el número de células en la película; de esta manera, al estar las bacterias en condiciones limitadas de nutrientes, la producción de sustancias exopoliméricas se verá favorecida manteniendo con ello a la biopelícula unida adherida sobre la superficie metálica
- g) Las células y otras materias particularmente unidas a la biopelícula, incrementaran la acumulación de la biopelícula.



- h) Finalmente algunas porciones de la biopelícula formado se despegaran y serán transportadas por la solución hacia otro sitio. En la liberación de esa porción de biopelícula se pueden liberar células, EPS, sustratos.

Con lo anterior es notable que la presencia excesiva de sustratos con carbono y la limitación de otros nutrientes tales como nitrógeno, potasio o fósforo, favorecerán la síntesis de EPS, lo cual son las condiciones más cercanas a las que se presentan en ambientes marinos.

La mayoría de los polisacáridos que conforman una biopelícula parecen semejantes, en tipos generales, a los que están asociados con todas las clases de células microbianas, siendo los más frecuentes heteropolisacáridos y homopolisacáridos. Los EPS contribuyen directamente en las propiedades de la biopelícula, en el que éstos normalmente retienen cantidades considerables de agua al estar enlazados. Sin embargo, polisacáridos tales como el ácido hialurónico puede enlazarse a 1 Kg de agua/g de polisacárido. Probablemente muchos de estos EPS en las biopelículas se enlacen a cantidades menores a éstas, como la celulosa bacterial, el curdlan, capaz de excluir la mayor cantidad de agua en su estructura terciaria.

Los polisacáridos resultantes del metabolismo de las bacterias producen soluciones altamente viscosas con propiedades visco elásticas así mismo los polisacáridos bacterianos acetilados y los grupos acetilo, inhiben fuertemente las interacciones entre las cadenas de polímeros y los cationes, formando así un gel. Los polisacáridos acetilados son altamente resistentes a las alginato liasas, las cuales pueden degradar algunos productos de algas. Muchos EPS poseen estructuras semejantes a la espina dorsal en las cuales existen secuencias 1,3- o 1,4- β -ligada a un residuo de hexosa. Cuando tales secuencias están presentes, el polímero tiende a presentar una estructura mucho más rígida, menos deformable, y en el caso de polisacáridos tales



como los de mutantes o aquellos a partir de cadenas de *Enterobacter agglomerans*, que son pobremente solubles o efectivamente insolubles. (Sutherland ,2001)

El curdlan es un ejemplo a partir de triples hélices en donde las cadenas están muy firmemente enlazadas unas con otras mediante puentes de hidrógeno, tales arreglos, con moléculas lineales pueden excluir fácilmente el agua de su estructura más eficientemente.(Sutherland ,2001; Newman,1992)

En algunas biopelículas, las soluciones de EPS actúan totalmente independientes una de otra, algunos reportes han sugerido que los EPS en la biopelícula interactúan con agentes antimicrobianos para prevenir el acceso de compuestos o por reducción efectiva de su concentración, sin embargo el efecto protector es probablemente limitado.(Newman,1992)

De esta forma la colonización del metal por las bacterias, modifica drásticamente el concepto de interfase eléctrica comúnmente utilizada en estudios de electroquímica. Con ello existen importantes cambios en la concentración y tipo de iones, pH y condiciones redox, siendo inducidas por la biopelícula, alterando el comportamiento pasivo del sustrato metálico y sus productos de corrosión así como los parámetros electroquímicos empleados para conocer el grado de corrosión.

Simultáneamente la formación de biopelículas conduce a cambios fisiológicos que en consecuencia producen cambios en la superficie del metal, posterior a la inmersión en un medio agresivo, relacionándose con la disolución del metal (corrosión) y la formación de productos de corrosión (pasivación). Sin embargo cada uno de estos procesos toma direcciones opuestas a la interfase metal/ Solución, presentándose corrosión del metal y acumulación de productos de corrosión de la superficie del metal hacia la solución. Con esto se considera que los cambios inorgánicos son



debidos únicamente por la disolución del metal seguido por un proceso de acumulación (formación de productos de corrosión).

Mayer *y Col.*, 1999; han sugerido que las biopelículas pueden presentar estructuras de geles, pero éstas pueden ser muy débiles y en consecuencia puede iniciarse la destrucción de la biopelícula por el corte o la disolución de los polisacáridos aclarando que algunos polisacáridos poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, lo que les confiere muchas propiedades diferentes dentro de la matriz en la cual se encuentran, dependiendo de la estructura de los EPS, éstos contribuirán a la estabilidad mecánica de la biopelícula permitiendo ser un buen soporte frente a los esfuerzos cortantes del medio, con lo que se produce una biopelícula mucho más estable.

Se ha puntualizado en la literatura por Skillman *y Col.*, (1999), que la proporción de células presentes, no refleja una contribución en la formación de EPS, en la estructura y propiedades de la biopelícula resultante.

Ian W.Sutherland (2001) ha propuesto que las biopelículas proporcionan una gran variedad de EPS, estando en duda que todos ellos se formen a partir de los microorganismos, ya que se podrían formar por compuestos presentes en el agua de inyección empleada; sin embargo estos EPS confieren a la biopelícula muchas de sus características físicas, la capacidad de interactuar con otros polisacáridos, con otras macromoléculas y células, así como con iones y solutos de bajo peso y masa molecular, proporcionando micro ambientes dentro de la biopelícula. Puntualizando que las EPS sintetizados por células microbianas varían ampliamente en su composición incluso en sus propiedades físicas y químicas. Algunos son macromoléculas neutras, pero la mayoría son polianiónicas debido a la presencia de cualquier ácido urónico, siendo el más común el ácido D- glucorónico, al igual que el



ácido D- galacturónico y el D- manurónico, estos ácidos son los más comúnmente encontrados.

Un medio de cultivo ampliamente utilizado para la propagación de bacterias sulfato reductoras es el medio posgate C (Posgate, 1965), del cual algunos componentes de su formulación son adicionados al medio de trabajo para favorecer el crecimiento de este tipo de bacteria, sin embargo este medio presenta una relación C/N=de 3.2, lo que dirige el metabolismo en un sentido desasimilativo, teniendo con ello velocidades de crecimiento muy lentas. (Barton,1995).

Santana y **Col** (2005), al realizar estudios de biocorrosión emplearon para la para las pruebas electroquímicas, el medio agua de mar de proveniente de las islas canarias, adicionando 5 g/L de lactato de sodio como donador de electrones y fuente de carbono para crecimiento de BSR. Debido a que ellos lograron aislar un grupo de BSR provenientes de esas islas, empleando medio Starkey que consiste de las siguientes cantidades por litro: 0.5 de K_2HPO_4 ;1g NH_4Cl ; 1g de Na_2SO_4 ; 0.1 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2 g de $Mg SO_4 \cdot H_2O$; 5g de lactato de sodio al 70%, siendo éste un medio selectivo para BSR, teniendo el lactato de sodio como donador de electrones y fuente de carbono para crecimiento.

Para los estudios de corrosión, estos autores, emplearon acero inoxidable 304 con un espesor de 2mm y un área de 6cm², los especímenes de prueba se colocaron dentro de una tolva, presentando ésta una perforación para permitir el contacto del agua de mar en con el acero en condiciones naturales. Los especímenes se colocaron a 15m de profundidad a una distancia de un metro de una plataforma marina, con la finalidad de permitir el contacto natural sobre del agua de mar sobre este material. Así mismo realizaron estudios en laboratorio con agua proveniente de la misma región, para lo cual ésta fue esterilizada y enriquecida con lactato puntualizando que en los estudios



de laboratorio el cupón de acero no presentaba la perforación realizada en los cupones colocados en el mar.

Örnek y **Col.** (2002) emplearon el medio VNSS también conocido como solución de Bataneen de 9 sales, teniendo la siguiente composición por litro de medio: 17.6g de NaCl; 0.08g de NaHCO₃ , 0.04 g de KBr; 0.4g de CaCl₂*2H₂O, 0.008 g de SrCl₂; 1.47g de Na₂SO₄; 0.25g de 4 KCl; 1.87 g de MgCl₂*6H₂O 0.008g de H₃BO₃; 0.01g de FeSO₄*7H₂O; 0.01g de Na₂HPO₄; 1g de peptona, 0.5g de almidón y 0.5g de extracto de levadura.

Rongan y **Col.** (2004) al realizar estudios sobre la importancia de la biopelícula en la protección de la corrosión emplearon el medio NVSS, para la producción de biopelículas, sin embargo no presentan evidencia de la formación o ausencia del biopelículas en este medio bajo las condiciones de cultivo establecidas, también emplearon el medio Luria Bertani (LB. pH 6.5), el cual es un medio rico en nutrientes para inducir el crecimiento de la cepa, que consiste de 10g de tristona , 5 g de extracto de levadura y 10g de NaCl por litro.

Lee y **Col.** (2005) al realizar estudios de biocorrosión en acero al carbono 1018, sumergieron una placa de acero esterilizada previamente, en el mar permaneciendo esta por espacio de tres meses , concluido ese tiempo de inmersión, se extrajo la placa y de ella lograron aislar una cepa de *Shewanwlla oneidensis* y una cepa de *Desulfovibrio desulfuricans* ,empleando para ello medio marino el cual consiste en 20g/L de NaCl, 1.4 g/L de MgCl₂*6H₂O a pH 8.0; para así poder estudiar la influencia de biopelículas de diferentes especies microbianas sobre la corrosión del acero al carbono en un medio marino natural, observando, que a parte de este tipo de bacterias, se sumaban otros grupos así como algas y sedimento marino sobre la superficie del acero. Para lograr la producción de biopelículas en el laboratorio, emplearon el medio marino con

las siguientes concentraciones: 8mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 20 mM de NH_4Cl ; 2.2 mM de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0.06 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 25 mM de HEPES, 20 mM de Na_2SO_4 ; 66 mM de Lactato; suplementado con vitaminas y minerales, 1g/L de extracto de levadura; pH de 7.0.; observando con ello que existe la formación inicial de Fe_xS_y sobre el acero al carbono al interactuar únicamente la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans*; sin embargo, al realizar un cultivo mixto con *Desulfovibrio desulfuricans* y *Shewanwlla oneidensis* observaron que no existía la formación de dichos sulfuros debido a que estos no se acumulaban sobre la superficie del acero.

Shobhana y Col.(2005) realizaron estudios sobre la inhibición de corrosión con biopelículas empleando para ello una cepa aerobia de *Pseudomonas alcaligenes* y *Pseudomonas cichorii* empleando el medio BSS que consiste de 30g de NaCl, 0.75 g de KCl, 7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.7 g de K_2HPO_4 ; 0.3g de KH_2PO_4 , 3g de citrato trisodico, por litro de solución ; adicionando una pequeña cantidad de elementos traza como B, Ni, Mn, Co, Zn. Ni, Cu y Mo, ajustando el pH con NaOH diluido. Estos autores pudieron observar un efecto pasivante, alcanzando un valor del $\text{Log}|Z|=4$ donde $|Z|$ corresponde al valor del módulo de impedancia de la interfase acero/biopelícula, reportando de esta manera un efecto pasivante en presencia de este tipo de biopelículas.

Barton, 1995; desarrolló varias líneas de investigación hacia las bacterias sulfato reductoras (BSR), la razón es debida a su obligada dependencia de condiciones de anaerobiosis, en el medio en que se encuentren, la cual depende de muchas variaciones del metabolismo respiratorio aerobio. Esta propiedad puede determinar su considerable importancia respecto al carbono, la energía y a la recuperación de azufre en muchos ecosistemas microbianos anóxicos. En los últimos años el estudio de las BSR tiene su importancia en el gran impacto ecológico y económico que representan. En las plataformas petroleras así como en la industria gasera, las BSR están implicadas en la acumulación de sulfuro en ambientes de trabajo cerrados y en

poblaciones de camas marinas bajo depósitos ricos en materia orgánica, éstos son los principales organismos responsables de la corrosión inducida por microorganismos (MIC), en las estructuras de las plataformas marinas, en líneas de transmisión y equipo en general, incluyendo el agriado del aceite y gas producido, y obturaciones en formaciones geológicas. Es sabido que las bacterias sulfato reductoras reducen el sulfato a sulfuro, el cual es un compuesto químico que presenta altas propiedades corrosivas sobre el acero al carbono.

Las BSR comúnmente incluidas en este proceso son *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* y *Desulformaculum*, Wolzogen Kuhr y Van der Vlugt publicaron un artículo acerca de las reacciones producidas por el metabolismo de las BSR al producir corrosión en el acero, las reacciones propuestas son:

Reacción Anódica



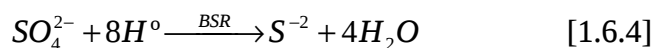
Disociación de agua



Reacción catódica.



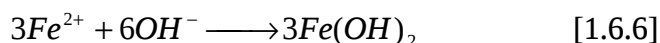
Despolarización



Productos de corrosión.



Productos de corrosión.



Reacción global.





En el mecanismo anterior se puede apreciar que la remoción de hidrógeno es empleada por la bacteria para reducir el sulfato a sulfuro. Sin la bacteria el proceso se detiene en la reacción 1.6.4, teniendo en consecuencia que la superficie del metal pueda estar cubierta por una capa de hidrógeno.

Sosa E, y *Col.*, (2002). Estudiaron la corrosión del acero en medios acuosos que contenían H_2S , HS^- , siendo este uno de los compuestos químicos principales de este proceso de corrosión en las plantas de petróleo. La naturaleza, el espesor y las propiedades químicas de estas películas dan el carácter protector y están controlados por el potencial y el tiempo de crecimiento.

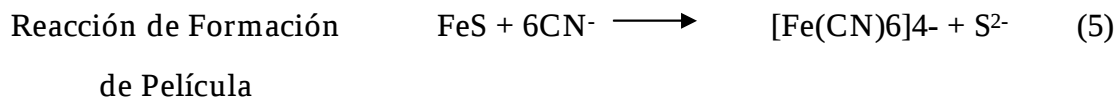
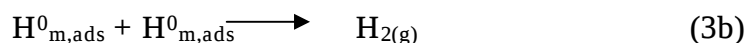
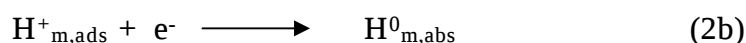
Las observaciones anteriores han despertado el interés de estudiar la naturaleza fisicoquímica de los productos de corrosión adheridos al acero al carbono para conocer sus propiedades pasivantes y su efecto en la corrosión del acero.

Sosa E, y *Col.*, (2002). Mediante el estudio y formación de sulfuros de hierro no estequiométricos en acero al carbono SAE 1018 comprobaron que el hierro iónico forma diferentes tipos de compuestos, que inhiben o incrementan la velocidad de corrosión. Por otro lado, la reacción catódica principal en medios en donde no hay oxígeno, corresponde a la reducción de los protones provenientes del H_2S a hidrógeno. Existe una gran controversia en la identificación de los productos de corrosión, mientras que algunos autores (Uhlig, 1984; Kofstad, 1972) proponen que inicialmente se forma la Mackinawita ($Fe_{1+x}S$), la cual dependiendo del pH del medio se disolverá rápidamente ($6 < pH < 8$) o bien se transformara en pirrotita (FeS_{1+x}) y pirita (FeS_2), las cuales forman películas protectoras. Otros autores proponen la formación inicial de pirita y pirrotita, que se pueden transformar en troilita (FeS hexagonal) y mackinawita. Así mismo, otros autores (Foroulis) proponen que a pH muy alcalino se forma $Fe_3O_{4-x}S_x$, por las diferentes propiedades de las especies



formadas en la interfase acero / medio amargo es esencial para explicar dos etapas que pueden controlar el proceso de corrosión en estos medios; la estabilidad de la película frente a otros componentes químicos (NH_3 , CN^- , CaCO_3^{2-} , Cl^-) y las etapas difusionales en las diferentes interfases formadas por el proceso de corrosión.

En general se establece que el proceso de corrosión es producido mediante los siguientes mecanismos (Kofstad 1972) :



Donde $\text{HS}_{\text{m,ads}}$ y $\text{H}_{\text{m,ads}}^+$ corresponden a los iones bisulfuro y al protón adsorbidos sobre el metal. Después de que los iones bisulfuro son adsorbidos sobre el electrodo de acero (ec 2a) ocurre la reducción de los protones (ec. 2b). De toda la cantidad de hidrógeno atómico producido (ec. 2b) una parte es absorbida ($\text{H}_{\text{m,abs}}^0$) (ec. 3a) y se difunde dentro de la película y el metal (formando ampollas), mientras que el resto simplemente evoluciona sobre la superficie como $\text{H}_{2(\text{g})}$ (ec. 3b). La reacción química (ec.(4)) presente en estos medios forma una película de sulfuros sobre la superficie del metal de naturaleza no estequiométrica cuya estabilidad depende del medio. La no estequiometría es equivalente, a la presencia de puntos defectuosos en la estructura de la película de sulfuros; y se extiende hasta la medida directa de la concentración



neta de los defectos. Estos defectos puntuales consisten de dos tipos: deficientes de aniones (o exceso de cationes) con respecto a la composición estequiométrica o deficientes de cationes (o exceso de aniones) con respecto al compuesto estequiométrico (Kofstad, 1972; Greenwood, 1968). En ambientes alcalinos ($\text{pH} > 7$) se ha determinado que las capas de Fe_xS_y (ec. 4) son adherentes, de naturaleza protectora y están compuestas principalmente por makinawita ($\text{Fe}_{(1+x)}\text{S}$) (Foroulis, 1993; Hemmingsen *et al.*, 1998 ; (Newman *y Col.*, 1992) y pirrotita ($\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$) (Hemmingsen *y Col.*, 1998). Sin embargo, en presencia de un medio amargo a pH ácido, se ha encontrado que éstas son porosas y de fácil disolución (Vedage *y Col.*, 1993; García *y Col.*, 2000). En medios donde además están presentes los cianuros, estas capas de sulfuros se disuelven (ec. 5), en parte, debido a la posible reacción entre la película de sulfuro de hierro y los iones cianuro CN^- .



1.3 JUSTIFICACIÓN.

Debido a la complejidad de la interfase acero/biopelícula/ solución, que se presenta de manera natural en sistemas de agua de inyección y a la diversidad de factores naturales que influyen en su investigación, y a la complejidad de la producción de biopelículas a nivel laboratorio; se procederá a inducir la formación de una biopelícula de *Desulfovibrio* sp, realizando los balances necesarios en el medio de cultivo para su posterior adaptación en agua de mar. Una vez obtenida esta biopelícula, será posible estudiar la interfase acero al carbono/biopelícula/agua de mar, con el fin de establecer las características electroquímicas de esta interfase y relacionarla con el proceso de corrosión por MIC en agua de mar.



1.4 OBJETIVO GENERAL.

Producir una biopelícula de *Desulfovibrio* sp en agua de mar con una baja concentración celular y una concentración de sustancias exopoliméricas y comprobar mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), la influencia de los exopolímeros de *Desulfovibrio* sp en la corrosión inducida microbiológicamente en acero al carbono SAE1018.

1.4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✚ Propagar un cultivo puro de *Desulfovibrio* sp en medio de Postgate, variando la relación C/N para obtener una mayor concentración celular.
- ✚ Adaptar la biopelícula de *Desulfovibrio* sp en agua de mar sintética.
- ✚ Estudiar por microscopia electrónica de barrido, los cambios presentes en la estructura de la biopelícula bajo diferentes condiciones de cultivo.
- ✚ Evaluar proteínas y carbohidratos exopoliméricos de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp.
- ✚ Evaluar por medio de espectroscopia de impedancia electroquímica, el efecto de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp sobre acero al carbono SAE 1018.



1.5 PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.

H₀₁:

Se puede aumentar la concentración de sustancias exopoliméricas de la biopelícula de ***Desulfovibrio*** sp en agua de mar sintética.

H₀₂:

Mediante el uso de EIS se puede demostrar el efecto de los exopolímeros de la biopelícula de ***Desulfovibrio*** sp en la interfase acero / biopelícula.

H₀₃:

Es posible demostrar que existe la formación de celdas de concentración en la interfase acero / biopelícula.

Capítulo 2.

Materiales y métodos.





En este capítulo se presentan las diferentes metodologías de pretratamientos realizadas al espécimen de prueba (electrodo de trabajo). Así mismo se presentan las técnicas analíticas y microbiológicas realizadas para la propagación mantenimiento y cuantificación de proteínas y carbohidratos solubles y exopoliméricos de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp. Además, se presentan los medios electrolíticos, los dispositivos experimentales y los equipos utilizados para la adquisición de datos experimentales.

2.1 Inóculo.

La cepa de *Desulfovibrio* sp fue aislada a partir de un pozo petrolero de México (Miranda *et al* 2001), el cual se mantuvo bajo las condiciones necesarias para asegurar su pureza y esterilidad, siendo reactivado en junio del 2004 en medio Postgate C.



Figura 2.1. Botella serológica con biofilm de *Desulfovibrio* sp.



2.2 Medio de Cultivo.

Para la reactivación de la cepa se empleó medio Postgate C(Posgate,1965)(Tabla 2.1). Durante la elaboración del medio de cultivo, se disminuyó el volumen de agua por ebullición, para esto se adiciona 30% de agua en exceso y se permite que hierva el tiempo necesario para recuperar el volumen de agua original, se permite que el agua se enfríe a 40°C y se mezclan los componentes correspondientes a la formulación; mientras se realizó la mezcla de los componentes, se burbujeó nitrógeno al medio con un dispersor de vidrio poroso, finalmente se permitió la ebullición del medio de cultivo por 3 minutos; concluido el tiempo de ebullición, se dispensaron 45 mL de medio en botellas serológicas de 65 mL(previamente lavadas y enjuagadas con agua desionizada y secadas en estufa a 100°C), durante el llenado de las botellas serológicas se continuó el burbujeo de nitrógeno dentro de éstas; una vez completado el volumen de medio en la botella serológica se permite el burbujeo de nitrógeno por 30 segundos y se procede a colocar el tapón de goma y se coloca un sello de aluminio asegurado por una engargoladora(Hungate,1969). Una vez completado el llenado de las botellas serológicas se esterilizan a una temperatura de 121°C y una presión de 18 lb/in². Una vez terminada la esterilización del medio se procedió a inocular las botellas con la cepa de *Desulfovibrio* sp, bajo condiciones de esterilidad.

Tabla 2.1 Composición de medio
Postgate. (Posgate,1965) .

Compuesto	Peso(g/L)	Compuesto	Peso(g/L)
KH ₂ PO ₄	0.5	Lactato de sodio	6
NH ₄ Cl	1	Extracto de levadura	1
Na ₂ SO ₄	4.5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.004
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.06	Citrato de sodio·2H ₂ O	0.3



2.3 Producción de de biopelícula.

La producción de la biopelícula se realizó inicialmente en medio de Postgate C, empleando tres diferentes concentraciones de lactato, variando con ello la relación carbono/Nitrógenos (C/N), para conocer el efecto de esta fuente de carbono en la formación de la biopelícula.

Paralelamente, se realizó la adaptación de la cepa de *Desulfovibrio sp* en agua de mar administrando lactato como fuente de carbono. De acuerdo al balance de materia para la producción de 20 g/L y 10g/L de biomasa (BM) se emplearon dos concentraciones de lactato de 0.29M y 0.58 M, en medio Postgate C respectivamente. Así mismo se realizaron pruebas para conocer la concentración de lactato adecuada y paralelamente se inocularon viales conteniendo agua de mar con atmósfera de H₂/CO₂, en ausencia y presencia de lactato, en las concentraciones anteriormente propuestas.

Finalmente, se procedió a la elaboración de medio de cultivo de Postgate realizando las siguientes modificaciones: aumentar la concentración de cloruro de sodio a 24.54 g/L y la relación carbono nitrógeno(C/N) de 12(Tabla 2.2) para limitar en nutrientes el medio de cultivo, y así lograr dirigir el metabolismo a metabolismo asimilativo.

La cepa de *Desulfovibrio sp*, fue inoculada en un reactor de 1L empleando medio de cultivo Postgate C modificado, bajo condiciones de anaerobiosis y de esterilidad en que se prepararon las botellas serológicas, el tamaño de inóculo fue de 15 mL con una concentración de 3 mg/mL e incubada a 37°C .



Tabla 2.2 Composición de medio del Postgate Modificado, C/N=12.

Medio de Postgate modificado		[g/L]
Cloruro de Calcio.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06
Cloruro de Amonio	NH_4Cl	0.46
Fosfato diácido de potasio.	KH_2PO_4	0.5
Sulfato de Sodio	Na_2SO_4	3
Sulfato de Magnesio*7/ H2O	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
Cloruro de sodio.	NaCl	30
Extracto de levadura.		1
Lactato 40 mM (mL)	$\text{CH}_3\text{CHOHCOONa}$	5.70
Contenido de lactato [g/V]	$\text{CH}_3\text{CHOHCOONa}$	4.48

2.4 Mantenimiento de la biopelícula.

Una vez propagada de la biopelícula, se procedió a inocular con un volumen de 1 mL y una concentración de 8.2 mg de BM/ mL, 15 botellas serológicas conteniendo 45 mL de agua de mar sintética estéril con una concentración 40 mM de lactato, bajo una atmósfera de nitrógeno, siendo estos incubados a 37°C. A cada una de las botellas serológicas, y a cada uno de los reactores empleados en la propagación y mantenimiento de la cepa, se le realizó el cambio de atmósfera cada 72 horas de la siguiente forma; se preparó una zona de esterilidad mediante la limpieza de la mesa de microbiología con solución de fenol al 3%, posteriormente se prende el mechero fischer y se permite secar el fenol, a continuación, se colocaron las botellas serológicas o reactores en su caso y se impregnó el tapón de goma con alcohol etílico y se flameó con el mechero, una vez terminada la flama sobre el tapón se realizó una punción con un filtro estéril siendo éste soportado dentro de una jeringa estéril con un tapón



de hule en la parte superior, asegurado con un sello de aluminio, con el objetivo de purgar el H_2S producido por la actividad microbiana, permitiendo que el émbolo sea el que controle la purga de sulfuro de hidrógeno formado por el metabolismo de la bacteria. Al terminar de purgar el H_2S , se insertó un filtro de algodón estéril, el cual se conectó a la alimentación de nitrógeno, permitiendo de esta manera realizar el cambio de atmósfera, el tiempo de burbujeo varió de acuerdo a cada unidad experimental y éste continuó hasta que el aroma a H_2S no se percibió. Terminada la nitrogenación se retira el filtro de purga y se permite la saturación del espacio de cabeza siendo esta por 10 segundos para botellas serológicas y 45 segundos para reactores.

2.5 Cinética de crecimiento.

Del reactor de un litro se tomó una muestra de 30 mL, de los cuales 20 mL se colocaron en una botella y 10mL en un tubo de vidrio marca HACH, ambos recipientes se encontraban bajo las mismas condiciones de esterilidad y atmósfera de nitrógeno.

La toma de muestras se realizó cada 12 horas por un periodo de 8 días, la muestra recolectada en las botellas serológicas se empleó para la determinación de carbohidratos y proteínas solubles y exopoliméricas; así mismo se tomó 1 mL para la determinación de lactato residual a través del tiempo por medio de electroforesis capilar, el tubo de HACH con 10 mL de muestra se empleó para la determinación de densidad óptica a 580 nm y determinación de sólidos suspendidos totales



2.6 Adaptación de la biopelícula en agua de mar.

Una vez obtenida de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp , se procedió a la adaptación de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp en agua de mar sintética(Tabla 2.3). Para ello se dispensaron 45 mL de agua de mar con una concentración 40 mM de lactato de sodio como sustrato, en botellas serológicas, al mismo tiempo que se burbujeó nitrógeno durante 30 segundos para eliminar el oxígeno presente en el medio, posteriormente las botellas serológicas fueron tapadas con tapón de goma y sello de aluminio. Finalmente las botellas conteniendo agua de mar fueron esterilizadas a 121°C y 1.8 lb/in².

El inóculo para este medio provino de la biopelícula obtenido en medio posgate C/N=12, siendo éste de 1 mL a una concentración de 10mg BM/mL. La inoculación se llevó acabo bajo condiciones de esterilidad, posterior a ello las botellas serológicas inoculadas fueron colocadas en incubación a 37°C.

Tabla 2.3 Composición del agua de mar ASTM. (Norma ASTM D665B).

AGUA DE MAR ASTM.		[G/L]
Cloruro de sodio.	NaCl	24.54
Cloruro de Magnesio	MgCl ₂ *6H ₂ O	11.1
Sulfato de Sodio	Na ₂ SO ₄	4.09
Cloruro de Calcio.	CaCl ₂ *2H ₂ O	1.16
Cloruro de Potasio.	KCl	0.69
Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃	0.2
Bromuro de Potasio.	KBr	0.1
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.03
Cloruro de Estroncio.	SrCl ₂ *6H ₂ O	0.04
Fluoruro de Sodio	NaF	0.003



2.7 Extracción de exopolímeros. (Martínez *et al*, 2003)

Se tomaron 30 mL de muestra del reactor, posteriormente se vertieron 15 mL de muestra en un tubo para centrífuga y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos, separando el sobrenadante del sedimento. El sobrenadante se filtra por medio de una membrana de celulosa regenerada de 0.45 μm de poro. Al filtrado se le determina proteína (Lowry y *et al*, 1951) y carbohidratos (Dubois *et al*, 1956). Al sedimento se le agrega 15 mL de EDTA 0.1M, se agita con ayuda de un vortex durante 10 minutos (lisis celular), se centrifuga nuevamente a 5000 r.p.m. durante 10 minutos.

Del sobrenadante que representa la fracción exopolimérica, se toman 3 mL para determinar carbohidratos. Del sobrenadante restante, se toman 5 mL y se colocan en bolsas de diálisis de 12 kDa de tamaño de corte, por 5 días para separar el EDTA y eliminar interferencias y poder medir proteína. La diálisis se llevó a cabo con agua desionizada y en refrigeración durante 6 días, recambiando diariamente el agua desionizada. Terminada la diálisis se determina proteína.

2.8 Método para medir proteínas. Método de Lowry Modificado (Lowry 1951)

El procedimiento consiste en preparar una curva de calibración con las siguientes concentraciones 0, 20,40,60,80,120,140,160,180,200,240 y 300 mg/L con albúmina sérica bovina (Sigma). A un mL de muestra, perfectamente homogenizado, se le agrega 0.1 mL de hidróxido de sodio 10 N, se calienta a 90°C durante 30 minutos a baño María, posteriormente se le agregan 5 ml de una solución 0.19 M Na_2CO_3 disueltos en 0.1N NaOH y CuSO_4 al 1%, Tartrato de Sodio y Potasio al 2%. Se permitió reposar por 20 minutos en la oscuridad y, por último se le adicionó 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 2 horas en la oscuridad. Finalmente



la muestra se leyó a 750 nm. En la figura 2.2 se muestra una curva de calibración típica, utilizada en este trabajo para la determinación de proteínas.

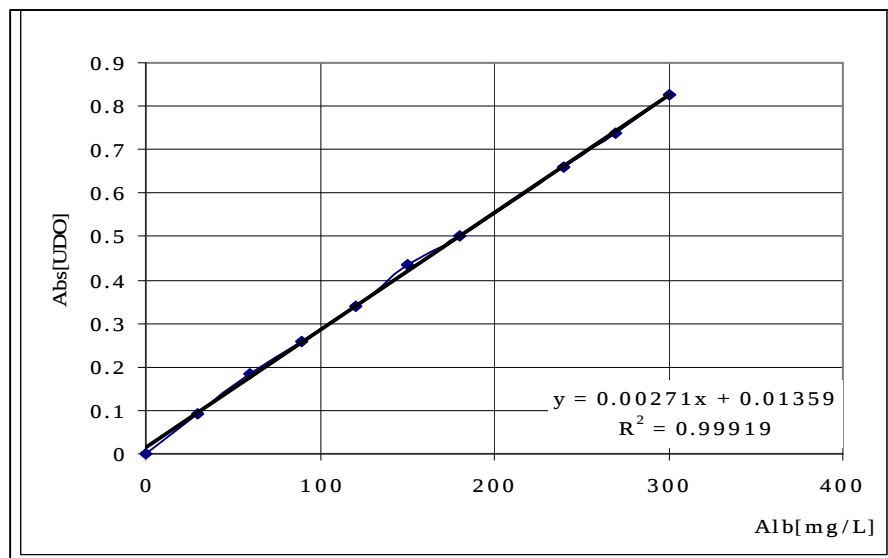


Figura 2.2. Curva patrón para determinación de proteínas.

2.9 Método para medir carbohidratos.

La metodología consistió en preparar una solución estándar de 100 mg de glucosa por litro, y de ésta se hacen diluciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. Las muestras se tratan de la misma manera que los estándares. Un mL de muestra se deposita en un tubo de ensaye y se le agrega 1 ml de solución de fenol al 5%. Posteriormente se adiciona por las paredes del tubo y muy lentamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, con sulfato de hidracina 0.5%, se deja enfriar y se lee a 490 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado. En la figura 2.3 se muestra una curva de calibración típica, utilizada en este trabajo para la determinación de carbohidratos.

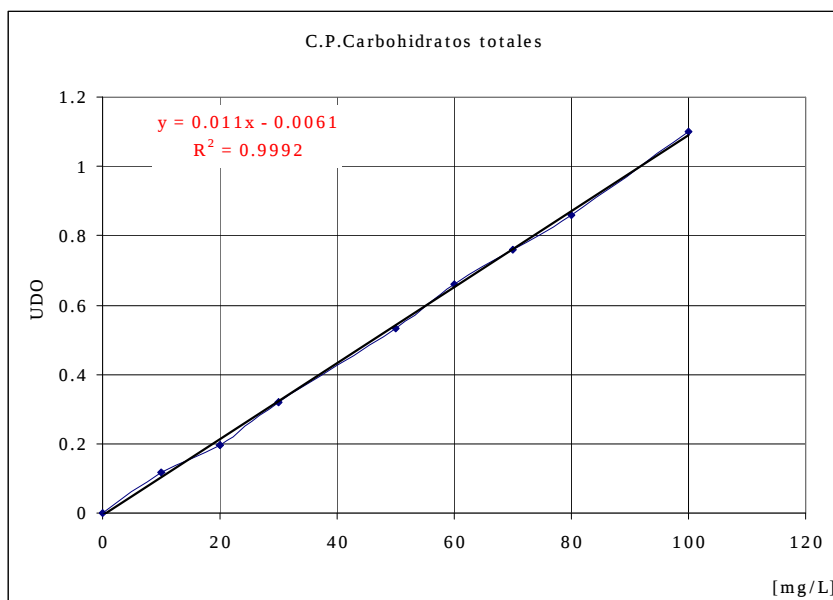


Figura 2.3 Curva patrón para la determinación de carbohidratos.

2.10 Determinación de bacterias en la biopelícula mediante el método del número más probable.

La determinación se realizó preparando 80 tubos Hungate conteniendo 4.5 mL de medio Postgate a una C/N=12. Se preparó un inóculo con una concentración de 50 mg/mL en agua de mar y otro con medio posgate modificado. Se inocularon 8 tubos conteniendo medio posgate modificado, 4 tubos con 0.5 mL del inóculo proveniente del agua de mar y 4 tubos con el inóculo proveniente del medio posgate modificado y se realizaron diluciones en cascada hasta llegar a una dilución del orden de $1 \cdot 10^{-10}$.

Cumplido el tiempo de incubación que fue de 160 horas se determinó H_2S soluble por la técnica de Cord Rwisdi (1985).



2.11 Medición de los sólidos suspendidos totales (SST).

La medición de SST se realizó por gravimetría, (APHA, 1985). Se usaron muestras de 10 mL (por duplicado). Se emplearon filtros de fibra de vidrio con un poro de 0.45 μm y 4 cm. de diámetro, los cuales se colocaron en una mufla a 550°C durante una hora, posteriormente en una estufa a 105°C (15 min). El proceso se repitió hasta tener un peso constante de los filtros de fibra de vidrio. La muestra fue filtrada con la ayuda de una jeringa de 20 mL, conectada a un tubo de latex con la finalidad de lograr un vacío moderado y evitar filtrar las bacterias, debido a su tamaño tan pequeño. Los filtros con la muestra se pasaron a una estufa a 105°C (una hora) y después se llevaron a un desecador (15 min.). Los sólidos suspendidos totales (SST) se obtienen de la siguiente manera (peso en gramos):

$$\text{SST (g/L)} = \text{PM} - \text{PF} / \text{V}$$

PM = Peso en gramos del filtro más muestra (g)

PF = Peso en gramos del filtro (g)

V = Volumen de la muestra (L)



2.12 Observación por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

Para la observación al microscopio electrónico de barrido se tomaron dos muestras de 10 mL de biopelícula con una edad de 10, días posteriores a la inoculación; una muestra provenía de un medio de agua de mar, y la otra provenía del medio de Postgate C, modificado ambos con una concentración 40 mM de lactato.

Una vez tomada la muestra, se centrifuga suavemente a 500 rpm por 10 minutos para evitar colapsar la estructura de la biopelícula, se retiró el sobrenadante, se recuperó el sedimento y fue transferido a un tubo eppendorf con algo de medio de cultivo para cada caso; se extrae el medio de cultivo del tubo eppendorf y se adicionó glutaraldehído al 5% y se permite reposar la muestra dentro de esta solución por 48 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo de fijación con glutaraldehído; se procedió a eliminar el glutaraldehído, recolectándolo con ayuda de una pipeta Pasteur; se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos, reposando la solución amortiguadora con la muestra durante 30 minutos manteniendo en refrigeración a 4°C, se realizaron los lavados necesarios hasta que desapareció el aroma a glutaraldehído. A continuación se retira la solución amortiguadora y se adicionan 0.5 mL de tetróxido de osmio al 2%, permitiendo reposar la muestra un tiempo mínimo de 1 hora pero no mayor a 2 horas, manteniendo en refrigeración la muestra a 4°C.

Una vez concluido el tiempo de refrigeración, se retiró el tetróxido de osmio (Nota: se deben de extremar precauciones al emplear esta sustancia, debido a su alta toxicidad) realizando dos lavados con una misma concentración de acetona, siendo cada uno de 15 minutos; se continúa con concentraciones crecientes, iniciando a partir del 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%(v/v) y finalmente con acetona absoluta; terminado cada periodo de lavado se mantiene la preparación en refrigeración a 4°C.



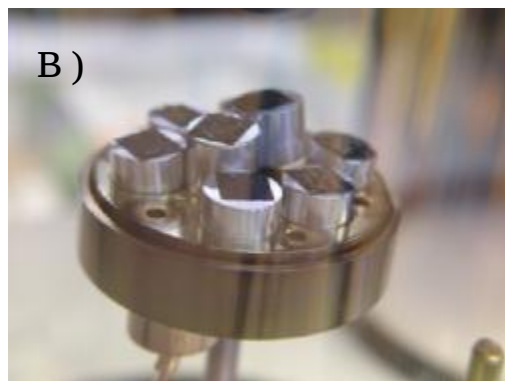
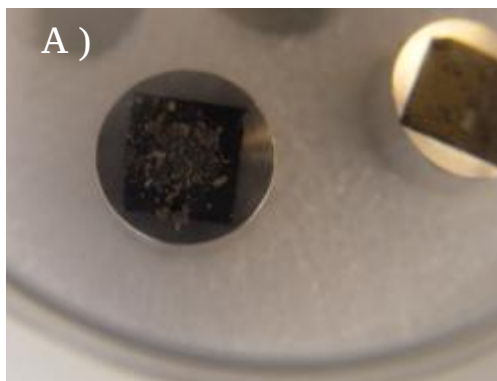
A continuación se procedió a colocar las muestras en una cápsula de polipropileno teniendo una base interna de papel Wathman® No.41 y una tapa superior del mismo papel, posteriormente se sumergió la cápsula en acetona absoluta y dentro de ésta se depositó la muestra, se procedió a cerrar con la tapa de polipropileno y se sumergen en acetona absoluta.

La cápsula conteniendo la muestra se introdujo en un desecador al punto crítico (Fig. 2.4), donde se desecó con CO₂ y acetona a una temperatura de -120°C y una presión de 1800 psi, se mantiene el procedimiento y la presión hasta que no sean notables las diferencias de densidades de los dos líquidos, dentro de la cámara, a través de la ventana de cuarzo.



Figura 2.4. Cámara de secado al punto crítico.

Concluido el secado al punto crítico, sobre un porta muestra de magnesio u aluminio de 8 mm de diámetro y altura de 1 cm., se coloca un cinta de carbón y doble adhesivo y sobre ésta se vierte la muestra (Fig.2.5.A) y sufixa con ayuda de un pincel de cerda natural y fina. Las muestras ya montadas se colocan en un equipo Denton Vacuum para ser cubiertas con carbono(Fig.2.5.B) y finalmente dar un recubrimiento de oro(Fig.2.5.C) y finalmente se observan en un microscopio electrónico de barrido(Fig.2.5.D) marca JEOL modelo JSM5900LV ,a un potencial de 13 kV.



Figuras 2.5. A) Porta muestras con cinta de carbón; muestra recubiertas con B) Carbón, C) Oro y D) Microscopio electrónico de barrido.



2.13 Celda electroquímica.

Para realizar los diferentes pretratamientos electroquímicos al electrodo de trabajo y la caracterización electroquímica se utilizó una celda de tres electrodos. La celda (Fig.2.6) se elaboró en base a un diseño de un biorreactor con la finalidad de proveer las condiciones necesarias de presión, temperatura, esterilidad, hermeticidad y anaerobiosis para el mantenimiento de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp.

La unidad experimental consiste en un cilindro de vidrio de boro silicatos con un diámetro interior de 90 mm con una altura nominal de 150 mm y un volumen operacional de 500 mL, las dimensiones de diseño son correspondientes a un biorreactor de geometría estándar; cuenta con una junta roscada en la parte inferior para el electrodo de trabajo y una junta en un lateral para toma de muestra.

Debido a las condiciones operacionales de la celda se diseñó una tapa elaborada en Naylamid® (Fig.2.7) la cual cuenta con 6 entradas, que son empleadas para soportar a cada uno de los siguientes elementos: un electrodo de referencia y un contra electrodo de grafito, cada uno inmerso dentro de un capilar de Luggin, conteniendo solución saturada de cloruro de potasio, un difusor de nitrógeno, un extractor de gases, un termómetro, junta de neopreno de 3 mm de espesor, una horadación extra y un dispositivo integrado por 2 baleros de acero inoxidable, 2 juntas de silicón de grado alimenticio (inocuo, resistente a la corrosión por H₂S) y 2 extensiones de teflón para soportar la flecha de la propela y conferir condiciones de esterilidad y hermeticidad mediante las juntas.

Los capilares de Luggin presentan la función de 3 mamparas con la finalidad de disminuir la formación del vórtice dentro de la celda teniendo velocidades de corte



bajas. Así mismo se diseñó una propela (Fig.2.8) de 4 paletas con terminación de punta para evitar la formación de burbujas en la flecha y propela.

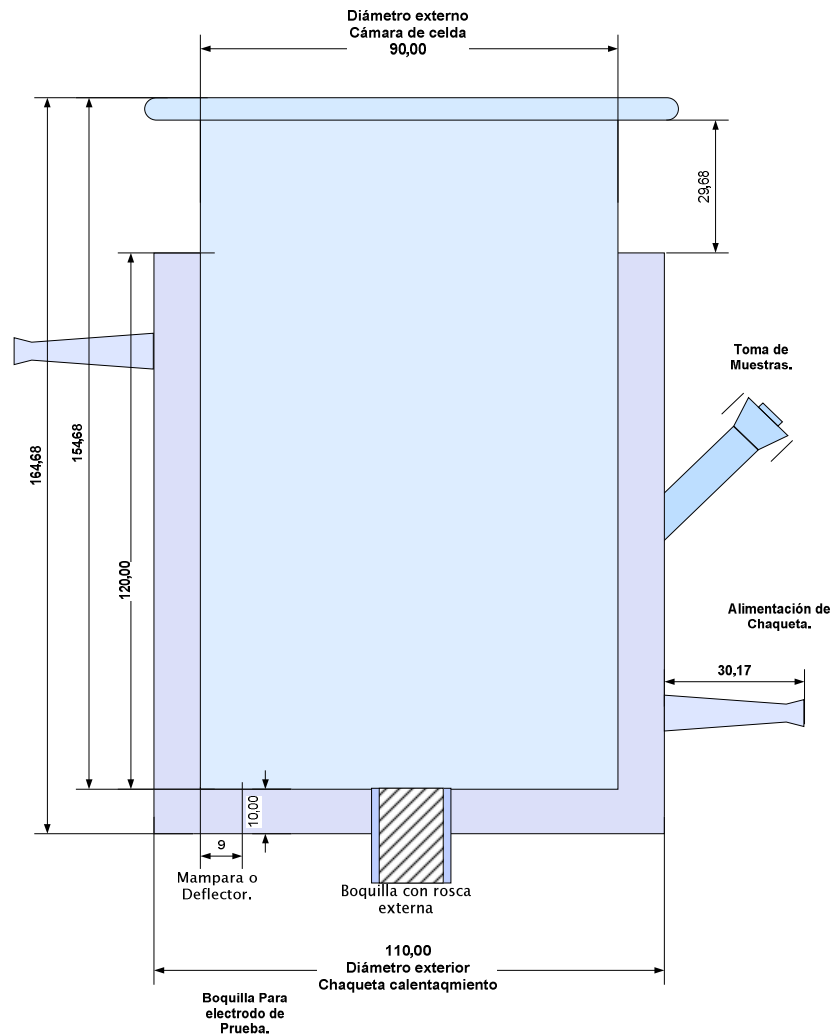


Figura 2.6. Celda electroquímica.

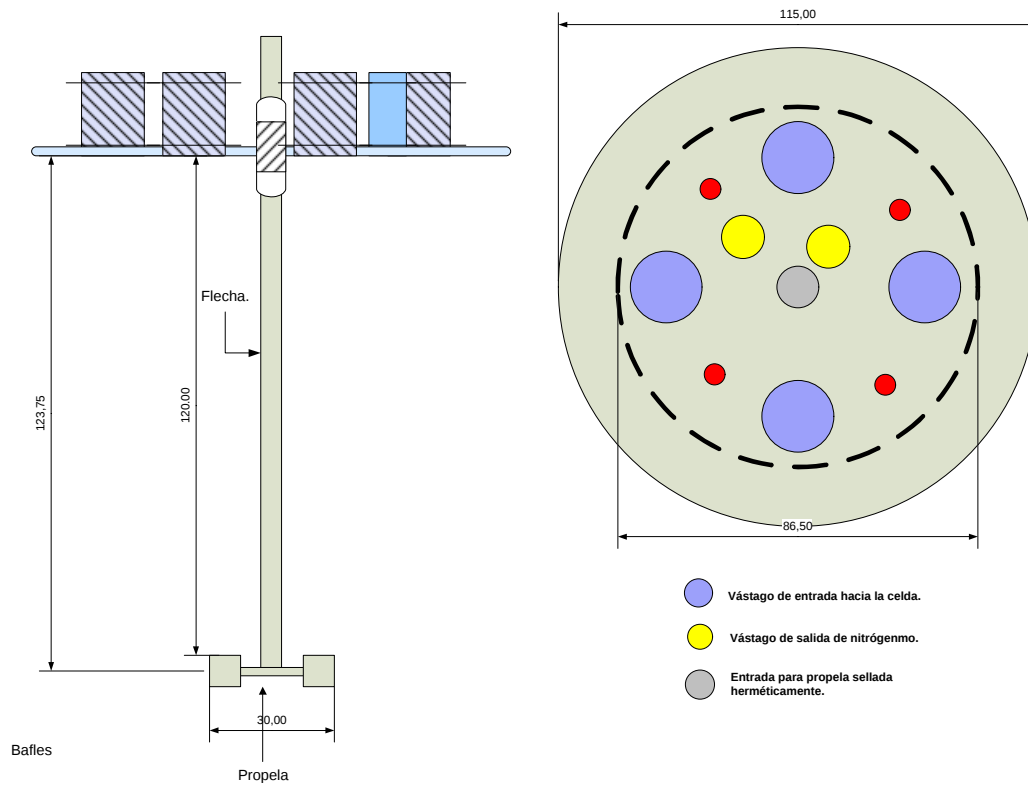


Figura 2.7. Tapa en Naylamid®.

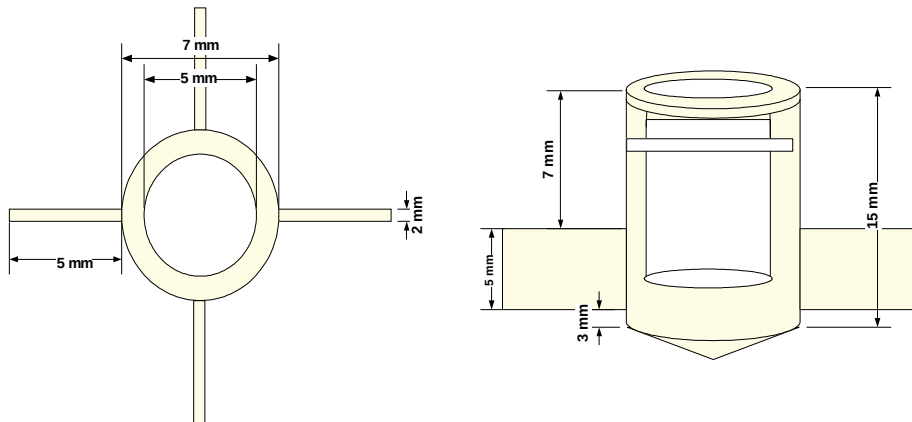


Figura 2.8. Propela en Naylamid®.



2.14 Electrodo de trabajo.

Los electrodos de trabajo (Fig.2.9) utilizados para la los experimentos consistieron de una barra de acero al carbono 1018 (Tab.2.4) con un área superficial de 0.7854 cm² ($\phi = 0.5\text{cm}$) y una longitud de 13mm aproximadamente; como electrodo de referencia fue utilizado un electrodo de sulfato mercurioso saturado de sulfatos (SSE) dentro de un capilar de Luggin y como contraelectrodo una barra de grafito, colocada en un compartimiento separado. Con la finalidad de tener un área constante sobre la cual realizar los experimentos correspondientes el electrodo se coloca en un cilindro de teflón a presión.

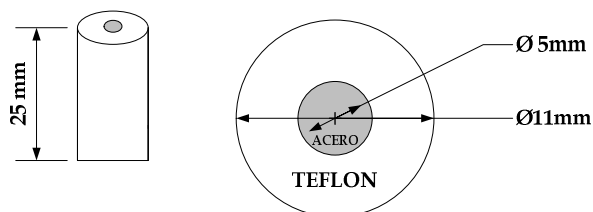


Figura 2.9. Electrodo de trabajo.

A continuación se muestra la composición típica de este material.

Tabla 2.4 Composición de Acero al Carbono SAE 1018.
(American Iron and steel institute,1977).

Compuesto	C	Mn	S	P	Fe
Cantidad(% peso)	0.14-0.20	0.60-0.90	0.04	0.03	99.1



Antes de realizar un tratamiento electroquímico o una caracterización electroquímica, los electrodos de trabajo fueron sometidos a un pretratamiento mecánico de la siguiente manera.

Primero, la superficie del electrodo es pulida con una lija de carburo de silicio de grado 280, 360, 400, 520 y 600 hasta obtener una superficie homogénea, después, se sumerge el electrodo en acetona y se somete a un lavado en ultrasonido durante 5 minutos.

2.15 Inducción del daño a electrodos.

En cada muestra se empleó un electrodo de acero al carbono SAE1018 pulido y lavado en ultrasonido con acetona, éste se introdujo por la parte inferior de la celda con ayuda de un porta electrodo.

Una vez dentro el electrodo, se adicionó agua de mar estéril a la cual previamente se le burbujeó nitrógeno para desplazar el O_2 presente y se vertieron 500mL de ésta dentro de la celda, al mismo tiempo que se burbujeaba nitrógeno al interior de la celda por medio de un difusor de vidrio poroso.

Cada electrodo de trabajo de acero SAE 1018 fué sometido a un determinado tiempo de inmersión, en 500 mL de agua de mar dentro de la celda electroquímica diseñada, con un flujo de 0.01L N_2 /h, con una velocidad de agitación de 160 rpm, proporcionando un $Re=900$ a temperatura y presión atmosféricas.

Los diagramas de impedancia fueron trazados al potencial de corrosión, aplicando una señal sinusoidal de 10 mV de amplitud, en un intervalo de frecuencias desde



300 KHz hasta 0.01 Hz. Para este propósito se utilizó un analizador de respuesta de frecuencia FRA 1260 marca Solartron y un potencióstato EG&G PAR 283.

Para las pruebas con de la biopelícula, se realizó el mismo procedimiento, sólo que antes de adicionar el agua de mar de mar se colocó bajo condiciones de esterilidad, la biopelícula en la superficie de acero al carbono SAE1018, con ayuda de una jeringa de 1mL.



CAPÍTULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.





El cultivo de biopelículas (BP) en el laboratorio es uno de los factores más importantes al realizar estudios de biocorrosión ya que tanto la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación; así como el tipo de metabolismo (asimilativo o desasimilativo) del sustrato (lactato) por medio de la población microbiana presente en la biopelícula, son factores muy importantes para disminuir el tiempo de cultivo y costos en los ensayos de biocorrosión.

3.1. Propagación de la biopelícula en medio Postgate.

Para el presente estudio se cultivó una cepa de *Desulfovibrio sp* en medio de Postgate (Postgate, 1969), la cepa se propagó en este medio variando la relación carbono nitrógeno (C/N), para conocer el efecto de esta variable sobre la velocidad específica de crecimiento.

Para ello se emplearon diferentes C/N, partiendo de una C/N= 2.18 que es la presente en el medio original, paralelamente se emplearon las relaciones C/N= 3, 8, 12 y 16, adicionando como fuente de carbono, lactato de sodio 40 mM.

En la figura 3.1 se puede apreciar que para las relaciones C/N=3, 8 y 16, la fase estacionaria de crecimiento se mantiene hasta las 100 horas, no siendo así en las relaciones C/N= 2.18 y 12(Fig.3.1.i,iv), donde es apreciable un incremento a los 78horas. Así mismo se puede observar que a una C/N=3,8 y 16 la producción de biomasa (BM) es mínima alcanzando esta 1.2g BM/L, llegando a obtener valor máximo de 3.33g BM/L, a una C/N=12(Fig.3.1.iv). De acuerdo al comportamiento presentado en la figura 3.1 se puede apreciar que a una C/N=12(Fig.3.1.iv) se obtienen la mayor velocidad de crecimiento y producción de BM en comparación con las diferentes C/N empleadas, incluso siendo mayor que la presentada en la formulación original, bajo las condiciones experimentales de cultivo establecidas.

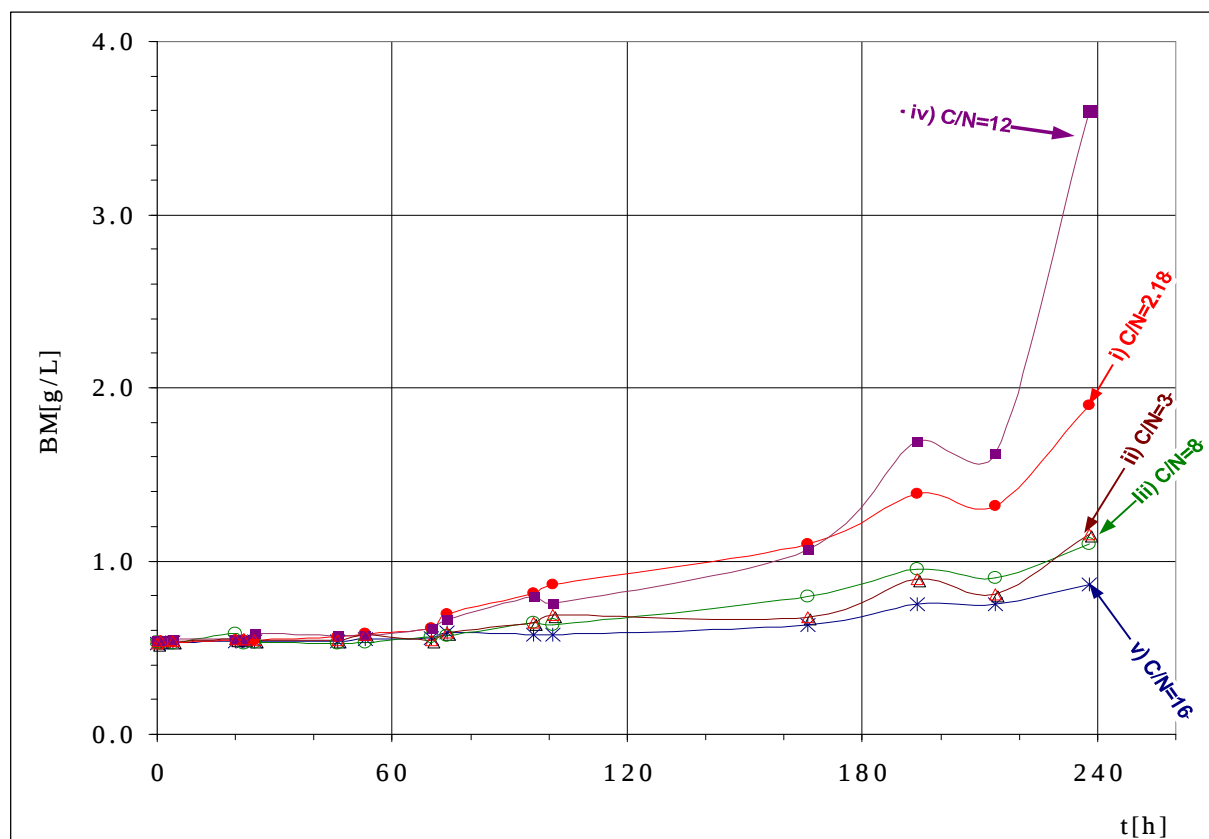


Figura 3.1. Concentración celular de *Desulfovibrio sp* a diferentes relaciones C/N: i) 2.18(—), ii) 3(r), iii) 8(š), iv) 12(¾) y v) 16(Ů) en medio Postgate con lactato 40mM.

De los valores cuantificados de la figura 3.1 se puede obtener un parámetro cinético llamado tiempo de duplicación (t_d) siendo este el intervalo de tiempo comprendido para duplicar la biomasa, calculado mediante la siguiente relación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde μ [h^{-1}] es la velocidad específica de crecimiento.

En la tabla 3.1 se presentan los valores correspondientes al t_d en función de la relación C/N para la cepa de *Desulfovibrio sp*.



De aquí es notable que a una relación C/N=8 se presenta un t_d grande 230, por lo que la producción de la BP es sumamente lenta; posteriormente se observó un pequeño decremento en el t_d con una C/N=3, sin embargo al emplear una relación C/N=12 se tiene como respuesta un tiempo de duplicación de 80 horas el cual es 2 veces menor que el comparado en la literatura, probablemente el crecimiento de la BP, se puede deber a que bajo estas condiciones de cultivo y con esta C/N, el metabolismo microbiano toma un sentido asimilativo.

Tabla 3.1 t_d de *Desulfovibrio sp*
a diferentes C/N

C/N	t_d [h]
2.18	147
3	191
8	230
12	80
16	Efecto Inhibitorio

Los valores anteriormente calculados son respaldados por la figura 3.1 donde es apreciable un incremento en la concentración celular a partir de las 80 horas de cultivo, siendo más importantes a una relación C/N=12.

Posiblemente, la diferencia en la producción de BM, al emplear diferentes relaciones C/N manteniendo la concentración de la fuente de carbono constante (40mM Lactato) puede ser debida a la disponibilidad de la fuente de nitrógeno, siendo ésta mínima en una C/N=16 y 8, en contraste con las C/N=2.18 y 3, donde la fuente de nitrógeno se encuentra en una alta concentración, por ello posiblemente se puede apreciar la fase de retardo durante el crecimiento de *Desulfovibrio sp*.

Con los resultados anteriores se puede concluir que el mejor tiempo de duplicación obtenido bajo estas condiciones de cultivo fue de 80 horas, sin embargo se han



informado tiempos de duplicación para algunas especies de *Desulfovibrio* de hasta 3 horas (Zehjnder, 1998); esta diferencia se puede deber a las modificaciones realizadas en la composición del medio de cultivo empleado (Postgate C) ; ya que éste no cuenta con agentes reductores ni oligoelementos que comúnmente son adicionados para favorecer la propagación de este tipo de bacterias, siendo la única fuente de nutrientes 1g/L de extracto de levadura. Cabe señalar que el valor obtenido del t_d corresponde al informado en la literatura (2-260 horas) para microorganismos sulfatos reductores, con estas características fisiológicas y bajo condiciones de cultivo semejantes. (Stathopalus, 1980)

Con los resultados hasta aquí presentados se considera que es posible inducir la producción de biomasa y la formación de la BP de *Desulfovibrio sp* variando la relación C/N, cumpliendo con ello el primer objetivo, aceptando de este modo la Ho₁ planteada.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo favorables para la producción de biomasa y BP de *Desulfovibrio sp*, se procederá a adaptar de la BP obtenida en medio Postgate, en AMS adicionando lactato como sustrato bajo condiciones anaerobias.

3.2. Propagación de BP en AMS.

Al ser necesario adaptar la BP al agua de mar sintética(AMS), siendo ésta el medio de trabajo para ser utilizado en los ensayos de biocorrosión, es importante considerar que el AMS, en condiciones naturales, puede presentar materia orgánica como resultado del sedimento fósil que en ella se encuentra presente; sin embargo en la formulación del AMS utilizada en esta investigación no existe una fuente de carbono orgánica ni de nitrógeno que pudiera funcionar como sustrato o nutriente respectivamente, para los microorganismos. Por esta razón la BP obtenida en medio



de Postgate a una $C/N=12$, fue transferido a AMS empleando lactato 40mM como sustrato, en la figura 3.2 se presenta el crecimiento de *Desulfovibrio sp* en AMS con lactato 40mM, obteniéndose un $t_d=62$ h, siendo este valor aproximadamente 4 veces mayor que el informado, en la literatura en un medio selectivo y un poco menor al obtenido en medio Postgate, en la primera etapa de esta investigación, lo cual puede ser una consecuencia de la ausencia de nitrógeno y la alta concentración de sales en AMS; sin embargo, esta variación en el crecimiento de la BP no se puede extrapolar con los antecedente presentados; ya que la mayoría de los trabajos realizados, son adicionados con frecuencia agentes reductores, oligoelementos y factores de crecimiento, para así garantizar un mayor crecimiento de la BP (Iowana, 1999).

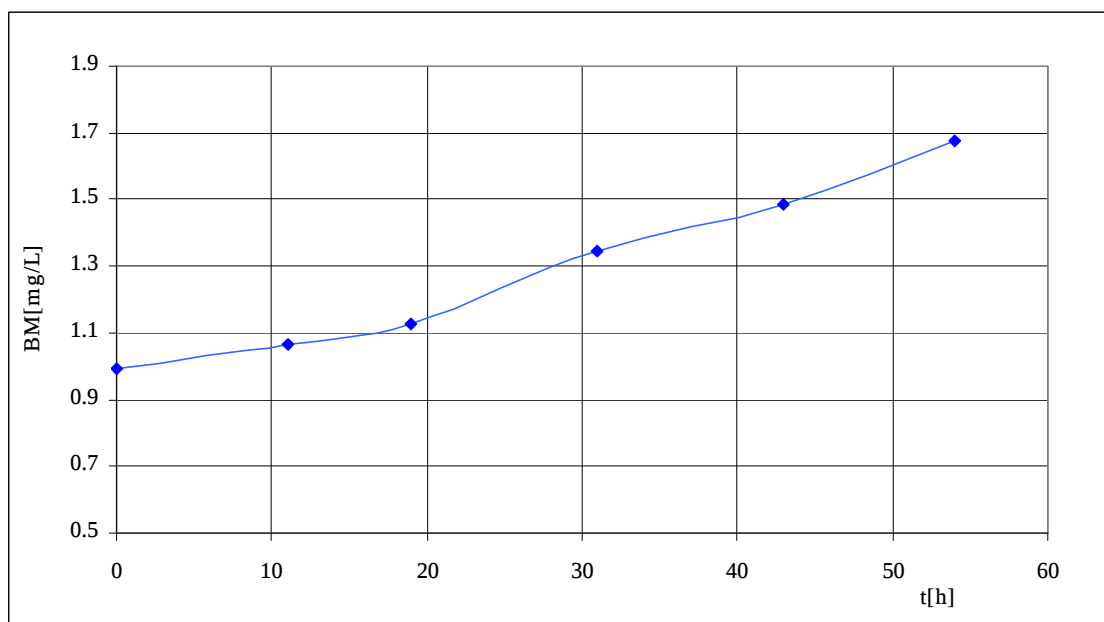


Figura 3.2. Crecimiento de *Desulfovibrio sp* en AMS con lactato 40mM.

El t_d obtenido bajo estas condiciones puede estar ampliamente relacionado con la ausencia de nitrógeno en el AMS, debido a que la ausencia de este nutriente repercute directamente en la síntesis de proteínas y en la mayoría de los procesos metabólicos donde se requiere la participación de éste elemento, siendo ésta una de



las principales causas por la que se presentan valores pequeños en el crecimiento de *Desulfovibrio sp.* Donde presumiblemente el nitrógeno presente en el AMS puede provenir de la lisis celular por las condiciones de cultivo bajo las cuales se encuentran las bacterias.

Con las estrategias hasta aquí planteadas ha sido posible adaptar la BP de *Desulfovibrio sp* al medio de trabajo presentando velocidades de crecimiento lentas y un cambio mínimo en la producción de biomasa durante el periodo de adaptación. Cabe señalar que visualmente los biopelículas obtenidos en medio Postgate y AMS presentan diferencias morfológicas y estructurales importantes. Debido a las diferencias observadas se realizará la caracterización bioquímica de las sustancias exopoliméricas presentes en ambas BP.

3.3. Evaluación de sustancias presentes en la biopelícula.

Las diferencia visuales en la producción de BP en medio Postgate y en AMS llevaron a la cuantificación de las sustancias más comúnmente encontradas en las biopelículas, siendo carbohidratos y proteínas, tanto solubles como exopoliméricos. La figura 3.3 muestra la producción de carbohidratos exopoliméricos (CEX) y solubles (CSO) en medio Postgate a una C/N=12, en donde se puede apreciar que la producción carbohidratos solubles al igual que los carbohidratos exopoliméricos varían con el tiempo, sin embargo, es notable la diferencia en la concentración de CEX y CSO siendo aproximadamente 5 veces mayor esta última. La figura 3.4 muestra la producción de proteína soluble (PSO) y exopolimérica (PEX), en medio Postgate a una C/N=12, siendo notable que durante el periodo producción se presenta una gran variación en la concentración de proteína soluble, no observándose un comportamiento semejante en la producción de proteína exopolimérica, ya que en ésta parece haber menor variación.

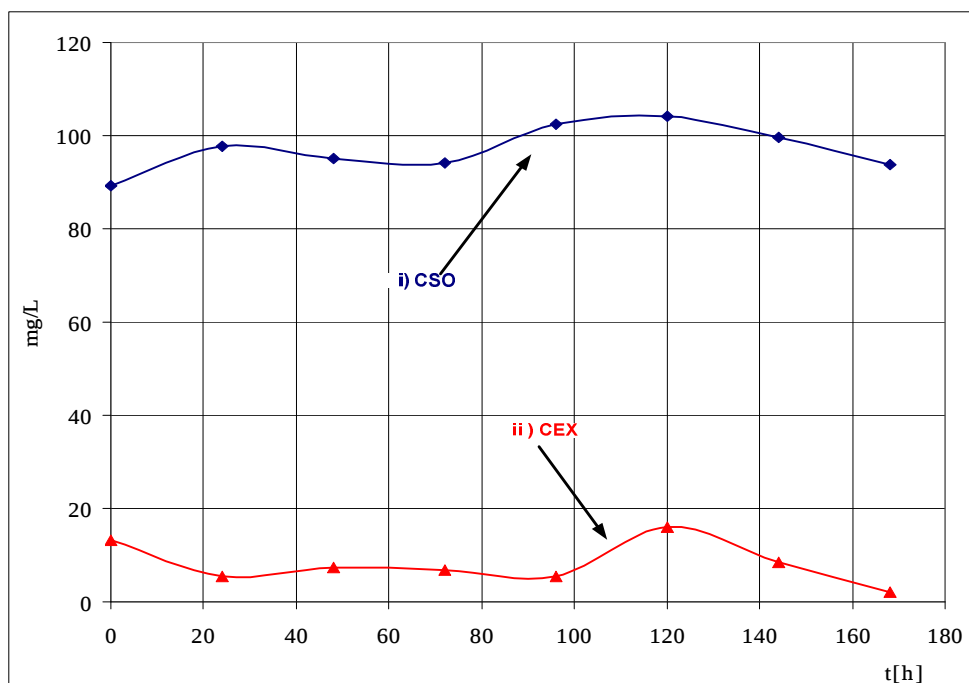


Figura 3.3. Producción de carbohidratos i) solubles (¾) y ii) exopoliméricos (•) en la biopelícula de *Desulfovibrio sp*, en medio Postgate a una C/N=12.

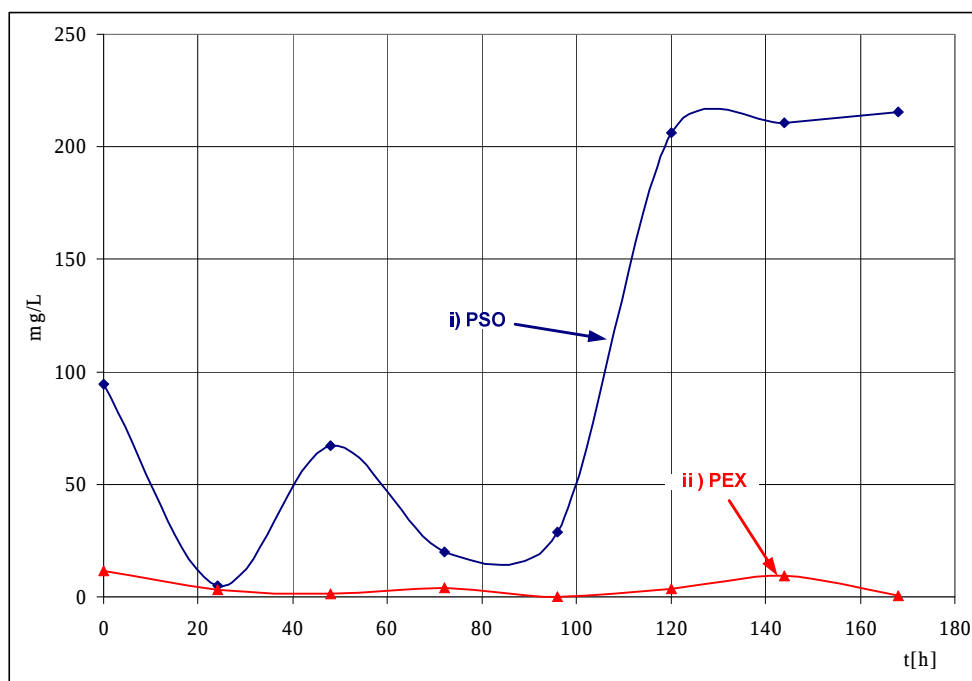


Figura 3.4. Producción de proteínas i) solubles (¾) y ii) exopoliméricos (•) en la biopelícula de *Desulfovibrio sp*, en medio Postgate a una C/N=12.



En la figura 3.5.i se puede observar una variación importante en la producción de CSO hasta un tiempo de 48 horas de cultivo; así mismo se puede apreciar que después de 72 horas inicia nuevamente la producción de carbohidratos solubles con una menor variación. En comparación los CEX (Fig.3.5.ii) presentan una menor variación durante el periodo de adaptación en AMS el cual fue de 120 horas.

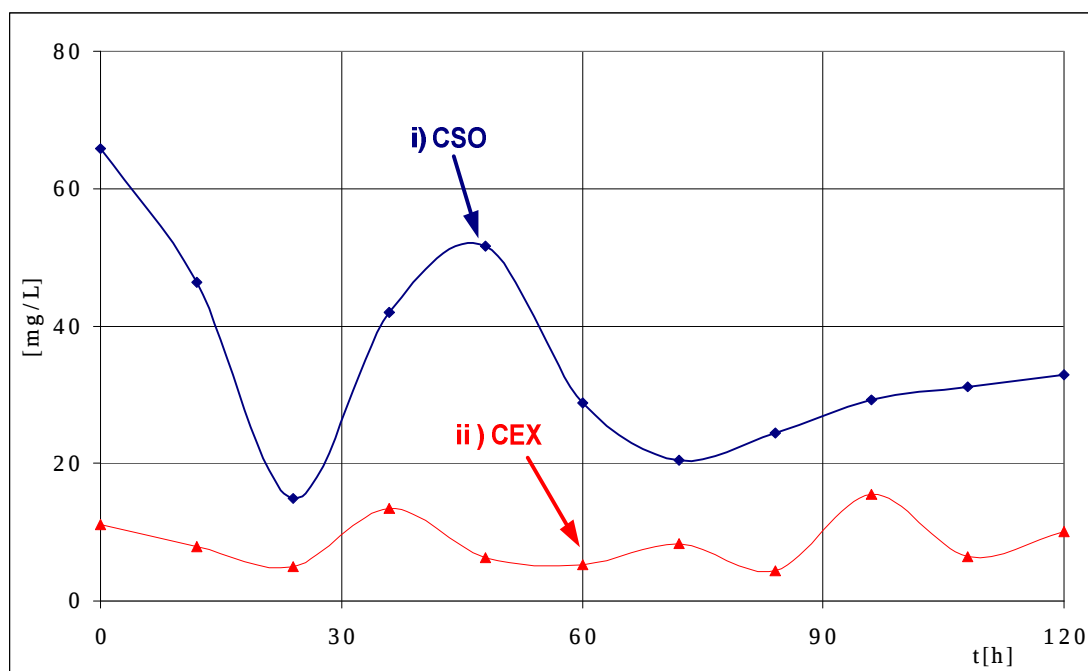


Figura 3.5. Producción de carbohidratos i) solubles (34) y ii) exopoliméricos (•) en la biopelícula de *Desulfovibrio sp*, cultivado en AMS con lactato 40mM.

Es necesario puntualizar que el comportamiento en la producción de carbohidratos en medio Postgate (Fig.3.3) es muy diferente al observado en AMS, en donde la concentración de CEX tanto como CSO presentan concentraciones menores con una mayor variación en su producción. Es necesario resaltar que las variaciones en la concentración de CEX y CSO en AMS, dependerán ampliamente de la concentración de sustratos de carbono biodisponible tanto dentro como fuera de la célula, así como del balance del carbono, respecto a otros nutrientes limitantes, ya que la presencia de



un exceso en la concentración del sustrato y la limitación de otros nutrientes, tales como el nitrógeno, potasio u fósforo, promueven la síntesis de sustancias exopoliméricas (Sutherland; 2001).

Una de las principales causas por la cual se observa una mayor variación en la producción de CSO, puede ser debido a que la velocidad de producción es menor que la velocidad de consumo de estos mismos compuestos, por el microorganismo, siendo mayor que la de los carbohidratos exopoliméricos. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta que no todos los exopolímeros contribuyen de igual manera en la estructura y propiedades de la BP, lo cual ha sido ampliamente reportado en la literatura. (Skillman et al, 1999)

En la figura 3.6.i se puede apreciar que durante la producción de PSO en AMS se pueden identificar tres etapas, presentándose en el periodo de 0-24 horas de cultivo una fase retardada, incrementándose la producción de PS a partir de las 24 horas hasta llegar a un valor máximo de 560 mgPSO/L a las 72 horas; observando que; después de este tiempo la PSO disminuye hasta los 280 mgPSO/L, para posteriormente incrementar su concentración después de las 90 horas. El comportamiento presentado en la producción de PSO (Fig.3.6.i) en AMS es muy semejante al presentado durante la etapa final de propagación de de *Desulfovibrio* sp auna C/N=12 (Fig.3.1.iv).

Las variaciones presentadas en la PSO pueden estar relacionadas con la cantidad de células presentes en el medio de cultivo, debido a que no existen otras fuentes de proteína en el AMS, donde el nitrógeno empleado para la producción de proteína puede provenir del metabolismo endógeno de las bacterias o de la lisis celular de éstas, al estar en condiciones de estrés o poco favorables para su crecimiento.

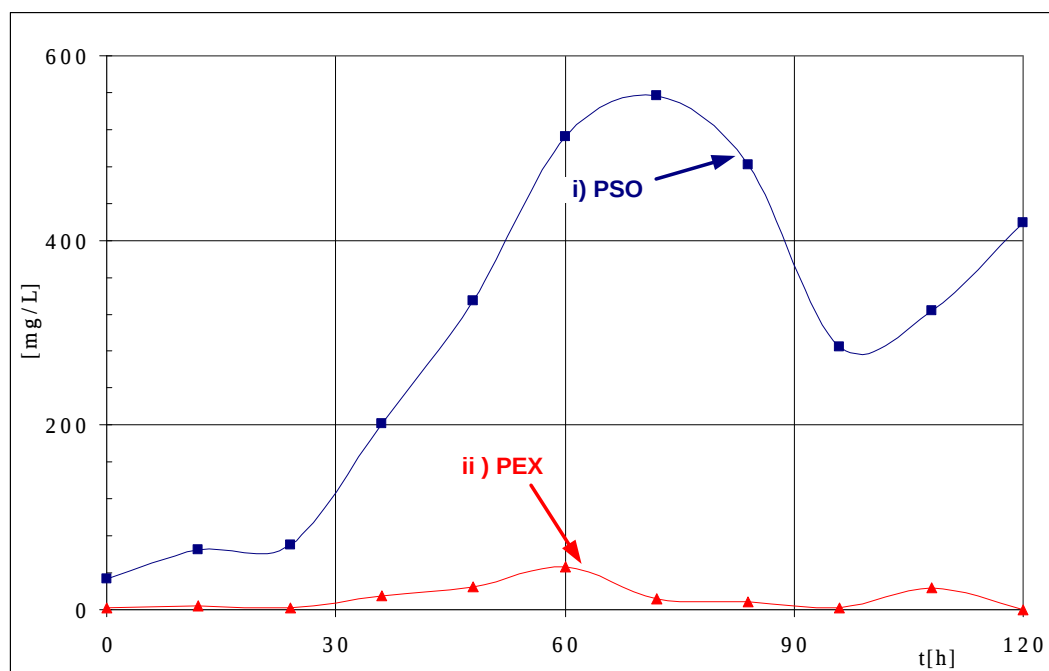


Figura 3.6. Producción de proteínas i) solubles (■) y ii) exopoliméricas (▲) en la biopelícula de *Desulfovibrio sp*, cultivado en AMS con lactato 40mM.

La tabla 3.2 muestra los valores promedio de las sustancias presentes en la BP de *Desulfovibrio sp*, correspondientes a 32 muestras con una desviación estándar del 7%. Los CEX y PEX en medio Postgate al tiempo inicial, superan en ambos casos a las sustancias presentes en la BP propagada en AMS; sin embargo, el incremento correspondiente a proteína soluble es mayor en AMS no siendo así el incremento en carbohidratos solubles. Al tiempo de 140 h; los valores en los incrementos tanto de carbohidratos como de proteínas se mantienen constantes teniendo una variación pequeña la cual no es significativa ($P < 0.05$), con ello la producción de proteína en ambos casos es la misma, sin embargo la estructura de éstas pudo haber cambiado debido a las condiciones de cultivo.



Tabla 3.2 Producción de carbohidratos y proteínas.
(Valores promedio correspondientes a 32 muestras analizadas)

Sustancias.	Postgate.		Agua de Mar	
	Ti=0 h	Tf= 140 h	Ti=0 h	Tf= 140 h
Proteína Soluble.	94.62	214.54	5.69	179.49
Proteína Exopolimérica	12	36	2.36	26
Carbohidratos Solubles	89.19	93.74	123.18	50.55
Carbohidratos Exopoliméricos.	65	120	11.3	65.83

En la tabla 3.3 se muestran los valores del coeficiente de variación para las diferentes sustancia cuantificadas en la BP de *Desulfovibrio* sp en medio Postgate y AMS, donde claramente es apreciable que los CSO en medio Postgate presenta una menor variación respecto a los producidos en agua de mar, no siendo así con los CEX que en medio Postgate presentan un coeficiente de variación mayor (aproximadamente 13%) que los cuantificados en AMS. Los valores que mayor variación presentan son los correspondientes a PEX y PSO en medio Postgate, no observándose el mismo comportamiento en AMS.

Tabla 3.3 Coeficiente de variación para proteínas y carbohidratos

SUBSTANCIA	Postgate	AMS
	C.V.	C.V.
CSO	0.051	0.423
CEX	0.5555	0.4241
PSO	0.8609	0.3745
PEX	1.0019	0.63

De lo anterior es importante resaltar los altos coeficientes de variación de las sustancias exopoliméricas y solubles en medio Postgate, los cuales puede ser debido a la presencia del extracto de levadura en este medio; sin embargo en AMS, se observa una menor variación de este valor, con lo que los resultados aquí mostrados apoyan de una manera importante el por que inicialmente la BP de *Desulfovibrio* sp es propagada en un medio selectivo y su posterior adaptación en AMS.



3.4 Determinación de bacterias presentes en la biopelícula por el método NMP (Mc. Grady, 1957)

Los valores de concentración celular (Tabla.3.4) dentro de la BP de *Desulfovibrio* sp, muestran que la concentración de células al final del cultivo en medio Postgate con una C/N=12 es mayor, por 6 órdenes de magnitud, en comparación con la población presente en la BP obtenida en AMS, durante un periodo de 140 horas de cultivo, esto es un indicio de que los microorganismo, al estar en AMS, se encuentran bajo condiciones de estrés, propiciando posiblemente fenómenos de metabolismo endógeno y lisis celular, lo que se confirma con la disminución del número de microorganismos después de 140 horas. Para apoyar este supuesto se determino la concentración celular por gramo de sólido soluble total, el cual esta relacionado al peso en base seca de la biopelícula, observándose que las magnitudes en la producción de biomasa se mantienen tanto en base seca o base húmeda.

Tabla 3.4 Determinación de número células en medio Postgate (C/N=12) y AMS con lactato 40 Mm.

Tiempo de cultivo[h]	Agua de Mar		Postgate	
	Cel/mL	Cel/gSST	Cel/mL	Cel/gSST
0	$2.6 \cdot 10^8$	$3.53 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^9$	$8.09 \cdot 10^9$
140	$8 \cdot 10^7$	$8.4 \cdot 10^7$	$3.2 \cdot 10^{15}$	$1.1 \cdot 10^{15}$

Este efecto causa una gran competencia entre las bacterias presentes dentro de la matriz de la BP, al estar en un medio en el que los nutrientes están limitados, en comparación al medio de Postgate. Lo anteriormente mencionado puede ser una explicación a las diferencias encontradas en la población al final del periodo de incubación así como a los niveles de proteína soluble y exopolimérica presentes en ambos medios, siendo la PSO mucho mayor en AMS lo cual puede explicar la poca



producción de biomasa y el uso de la fuente de carbono por la cepa, para la producción de la BP, lo anteriormente discutido esta apoyado en investigaciones previas realizadas por Sutherland (2001) quien ha observado que la producción de exopolímeros se induce con la presencia de una fuente de carbono en exceso, limitado por la presencia de iones metálicos en el medio.

Los resultados mostrados en esta sección servirán como criterios para el uso de la BP de *Desulfovibrio sp* adaptada en AMS, durante los estudios de biocorrosión a realizar debido a que las ventajas, por mencionarlo de alguna manera, encontradas en esta BP son:

- ü Mayor estabilidad ante fenómenos de corte producidos por la agitación del medio.
- ü Una mayor producción de proteína y carbohidratos exopoliméricos que en medio Postgate.
- ü Menor concentración celular en la BP, con lo que se disminuye el efecto metabólico del *Desulfovibrio sp* sobre el AC1018.
- ü El tiempo de producción de esta BP es mucho menor que el reportado ampliamente en la literatura para este tipo de estudios.

3.5 Análisis por microscopía electrónica de barrido.

El crecimiento de biopelículas en medio Postgate y en AMS tuvo como resultado la formación de biopelículas con características macroscópicas diferentes. La BP obtenida en medio Postgate (Fig.3.7.a) es una película aparentemente adherida de una manera homogénea en la interfase vidrio/biopelícula; sin embargo, superficialmente presentó un aspecto esponjoso e irregular en su superficie (Fig.3.7.a), teniendo como resultado que al agitar moderadamente la botella conteniendo esta BP, se desintegrara y se homogenizara en el medio de una manera sencilla, indicando poca estabilidad en la estructura o bien que las interacciones de los exopolímeros de ésta película no están fuertemente ligados unos a otros. La BP obtenida en AMS con lactato 40 mM (Fig.3.7.b) presentó un color blanquecino, con una apariencia translúcida, con una superficie lisa y homogénea visualmente. Esta BP a diferencia de la cultivada en medio Postgate presenta una mayor rigidez, por lo que no se homogeniza fácilmente en el medio a pesar de agitar vigorosamente.

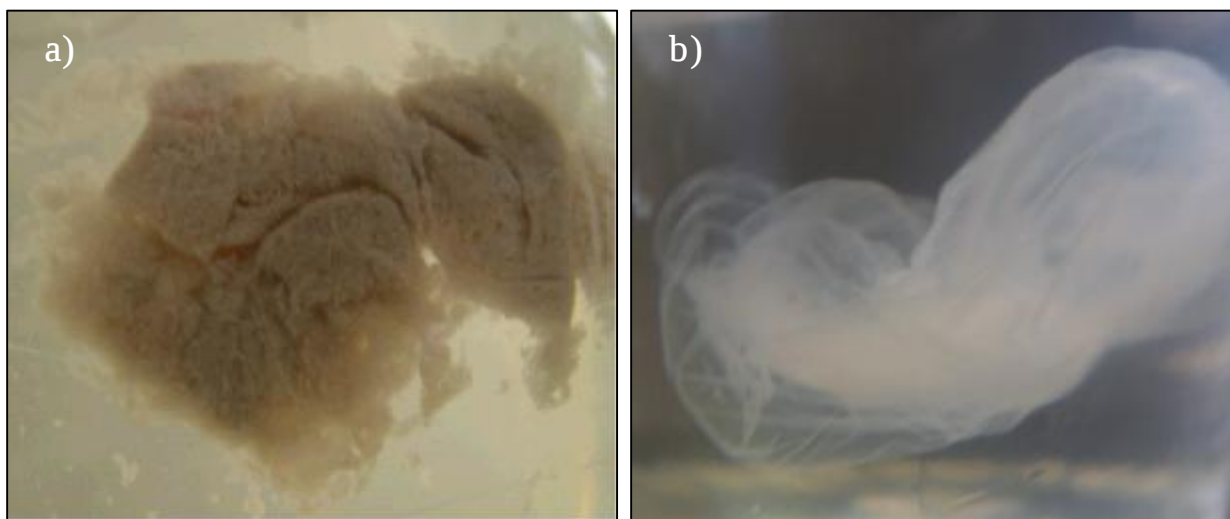


Figura 3.7 Biopelícula cultivada en a) medio Postgate y b) AMS.



Las diferencias observadas en ambas BP son una respuesta a las condiciones de cultivo; por lo cual es posible tener una respuesta diferente en cada medio en cuanto al arreglo estructural de los carbohidratos y proteínas presentes en ambos BP; de esta forma, no se descarta que en ambas biopelícula existan componentes (carbohidratos y proteínas) de la misma naturaleza. Los análisis realizados por microscopía electrónica de barrido a 5000x mostraron que en la BP crecida en medio Postgate (Fig.3.8.a), existen microorganismos que se encuentran aglomerados interactuando con los exopolímeros siendo visible que éstos no presentan una estructura definida y asemejan una sustancia gelatinosa (microscópicamente).

Con la finalidad de observar la evolución de la BP en función de la concentración de las especies iónicas presentes en el AMS, se realizaron diluciones volumen a volumen de AMS con agua desionizada, siendo estas 1:3 y 1:4, posteriormente, esta solución se esterilizó y se inoculó con 1 ml a una concentración de 100mg BM/mL y se incubó por espacio de 120 horas.

La micrografía obtenida de la BP adaptada en AMS a una dilución 1:4 (Fig. 3.8.b), muestra que los microorganismos presentes en la BP tienen un arreglo aglomerado semejante al presentado en medio Postgate; sin embargo son visibles fragmentos de BP con una estructura superficial lisa.

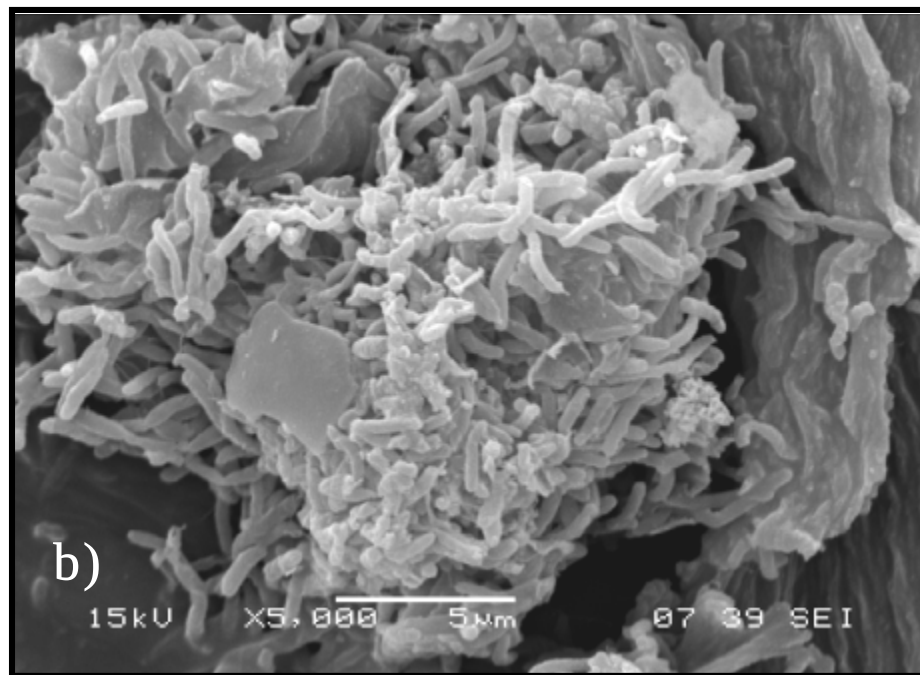
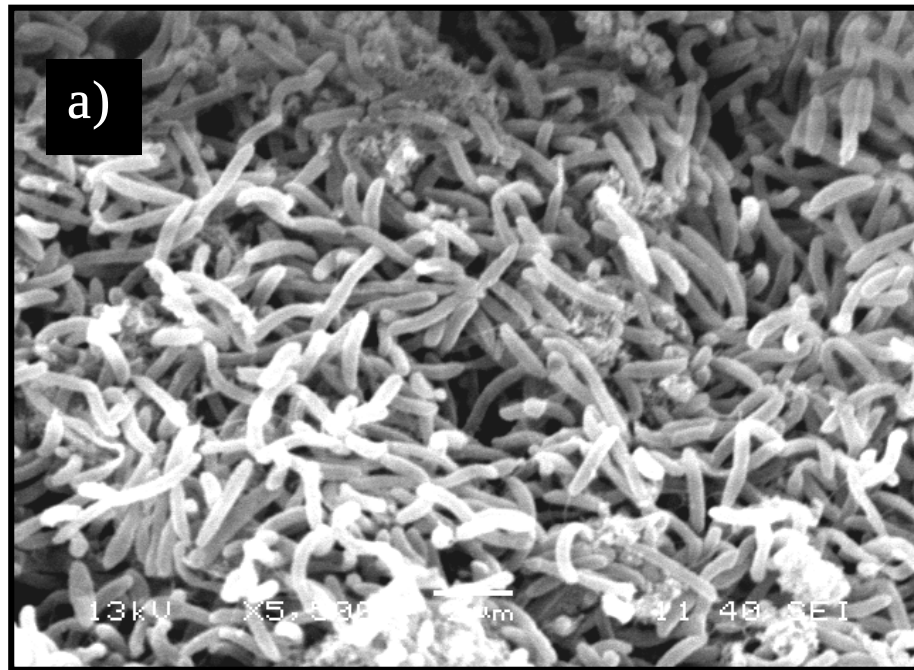


Fig.3.8. Micrografía electrónica a 5000x de biopelícula cultivado en
a) Medio Postgate y b) AMS 1:4.

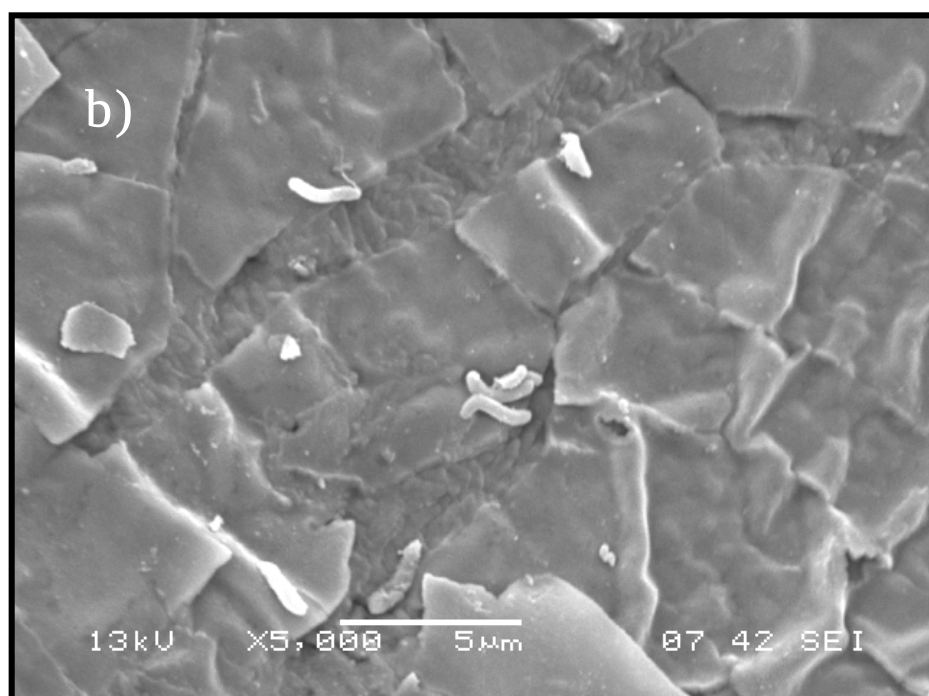
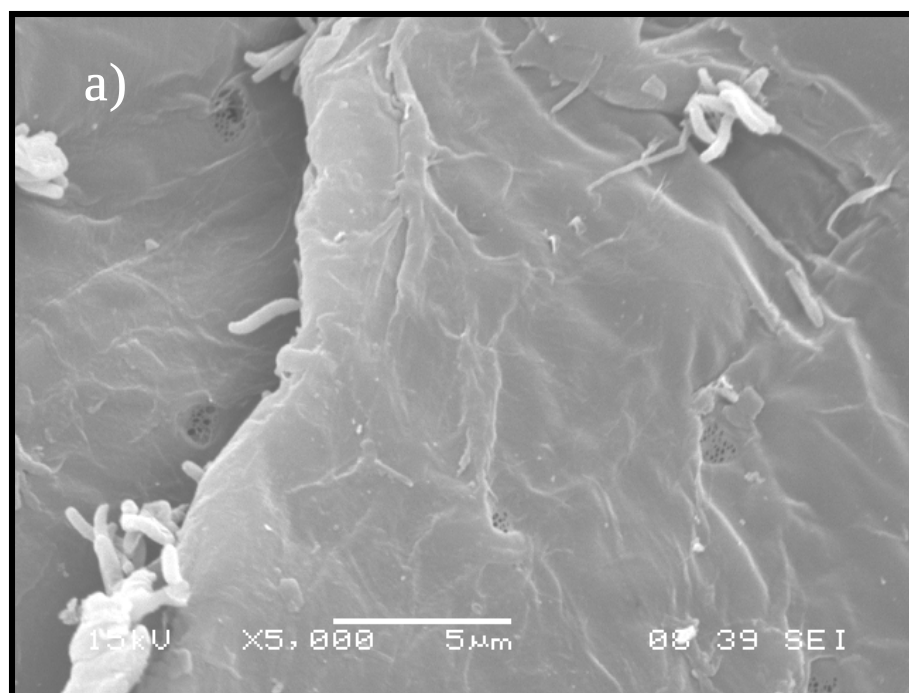


Figura 3.9. Micrografía electrónica a 5000x de la biopelícula propagada en
a) AMS 1:3 y b) AMS.



La Figura 3.9.a en una dilución 1:3 de AMS presenta un arreglo estructural de la BP con una superficie lisa, presentando de manera secundaria algunas estrías”, en la superficie donde se encuentran presentes algunas bacterias. La figura 3.9.b corresponde a la BP adaptada en AMS concentrada, teniendo como resultado la formación de una BP con una superficie totalmente lisa en donde los microorganismos presentes en la superficie son mínimos y la mayoría de ellos están cubiertos por la BP .

Los análisis de las sustancias solubles y exopoliméricas de la BP en medio Postgate, así como las observaciones realizadas por microscopia electrónica muestran una similitud con lo informado en la literatura, en la cual se menciona que los exopolímeros pueden ser los componentes más abundantes en una BP (Allison, 2003); sin embargo, las características de la BP en AMS son completamente diferentes, no pudiéndose relacionar con la literatura por que hasta la fecha no existen trabajos informados al respecto. La estructura de la BP (Fig.3.9.b) aparentemente presenta una superficie muy compacta la cual es presumiblemente permeable a algunos iones metálicos y agua. La estructura presente en ésta BP presumiblemente se puede deber a la presencia de Ca^{2+} como algunos autores lo han referido (Videla, 1990).

Con los resultados presentados en las secciones anteriores se tiene una visión y la información suficiente de la BP obtenida, con ello se manifiesta que la estrategia experimental para la producción de la BP y su posterior adaptación en AMS han sido adecuadas para esta investigación, cumpliendo con ello los tres primeros objetivos de la presente investigación, siendo de esta forma aceptadas las dos primeras hipótesis nulas planteadas. La información obtenida durante esta etapa experimental será relacionada con el proceso de corrosión en AC1018, empleando para ello la técnica electroquímica de EIS.

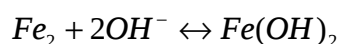
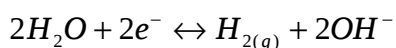
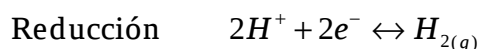
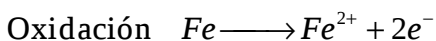


3.6 Análisis por espectroscopia de electroquímica de impedancia.

Con el fin de evaluar y/o caracterizar la influencia de la BP de *Desulfovibrio* sp sobre AC1018, se empleara la técnica de EIS. En ésta sección se muestran los resultados obtenidos por EIS, empleando para su interpretación los diagramas de Nyquist así como diagramas de Bode de ángulo de fase y de módulo.

3.6.1 Mecanismo de corrosión para acero al carbono SAE1018 en AMS bajo condiciones anóxicas.

El proceso que se presenta de manera espontánea en los sistemas de transporte de crudo, es el proceso de corrosión. El mecanismo de corrosión generalmente aceptado para superficies metálicas en los sistemas de transporte de crudo. Por un lado la reacción anódica, que consiste principalmente en la disolución del hierro del AC1018 al carbono en presencia de electrolitos mientras que por otro se considera la reacción de reducción del oxígeno disuelto, que promueve la formación de iones hidróxido. En el presente trabajo se considera esta reacción catódica, ya que se burbujeó nitrógeno para conferir condiciones necesarias para el desarrollo de la BP; de esta manera sólo el agua y los protones podrán actuar en esta reacción catódica. La reacción de media celda catódica del proceso de corrosión esta dada por la reducción de los protones y /o del agua. Por lo que las reacciones que intervienen durante este proceso son:





Las reacciones anteriormente propuestas se presentan en la figura 3.10 que ejemplifica de una manera sencilla el proceso de corrosión en el medio de trabajo (sin la presencia de BP), donde se considera la formación de una película de productos de corrosión. La presencia de las diferentes especies iónicas del medio de trabajo, la reducción de los diferentes iones metálicos y la oxidación de Fe así como la presencia de N_2 , con esto se tiene que el medio electrolítico de trabajo es muy agresivo para el AC1018.

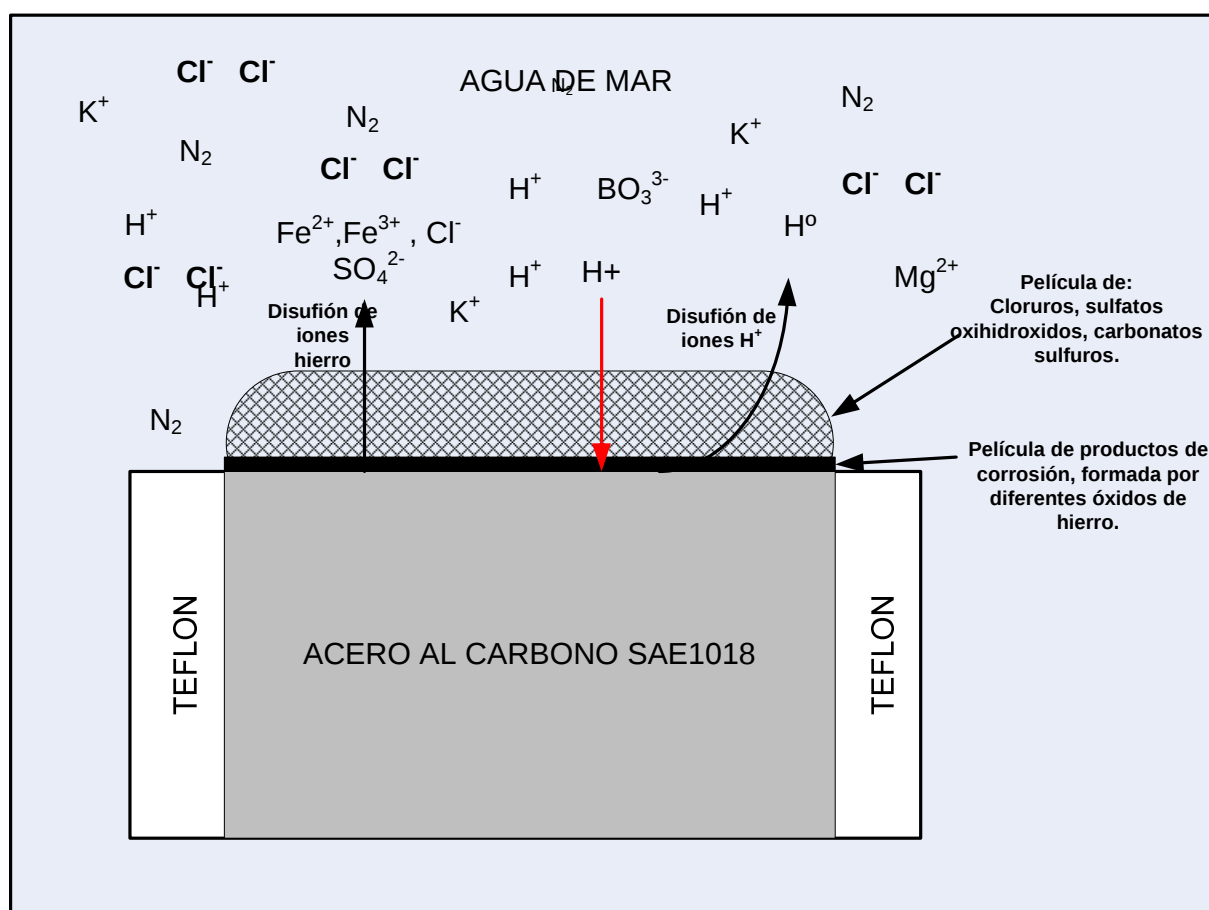


Figura 3.10. Representación mecánica del proceso de corrosión del acero al carbono SAE1018 en agua de mar bajo condiciones anódicas.



3.6.2 Caracterización electroquímica de la interfase acero al carbono/AMS, por espectroscopia de impedancia electroquímica.

Con el propósito de caracterizar el medio, por EIS, las mediciones de impedancia se realizaron en AMS, con un flujo de N_2 , con una velocidad de agitación de 60 r.p.m, a $27^\circ C$. Las mediciones de impedancia se realizaron al potencial de corrosión en un intervalo de frecuencias entre 300 kHz y 10 mHz, con una amplitud de 10 mV, para la superficie recién pulida de AC1018. Cabe señalar que el potencial de corrosión al tiempo de 0 horas de inmersión presentó un valor inicial de -0.56 vs. SCE, llegando éste hasta -0.76Vvs.SCE después de 12 horas de inmersión, indicando que a superficie del AC1018 está sufriendo un cambio químico en el AMS. Por ello en este trabajo, se estudia por EIS, la evolución de esta superficie a diferentes tiempos de inmersión.

La figura 3.11 muestra los diagramas de EIS obtenidos para una superficie limpia de AC1018 en AMS bajo un flujo de $N_{2(g)}$ a los tiempos de inmersión de 0 y 1 hora. En esta figura se puede apreciar que para estos periodos de tiempo las magnitudes de impedancia imaginarias y reales alcanzan valores cercanos a los 1000 Ω y 3000 Ω , respectivamente. Esto indica que bajo estas condiciones de trabajo existe la formación inicial de películas de productos de corrosión semiconductoras (Marín, 2004). En el recuadro de las figuras 3.11 se muestra la ampliación de las zonas correspondientes a altas frecuencias en las que se puede apreciar un semicírculo, el cual es un indicativo de la presencia de un proceso a altas frecuencias.

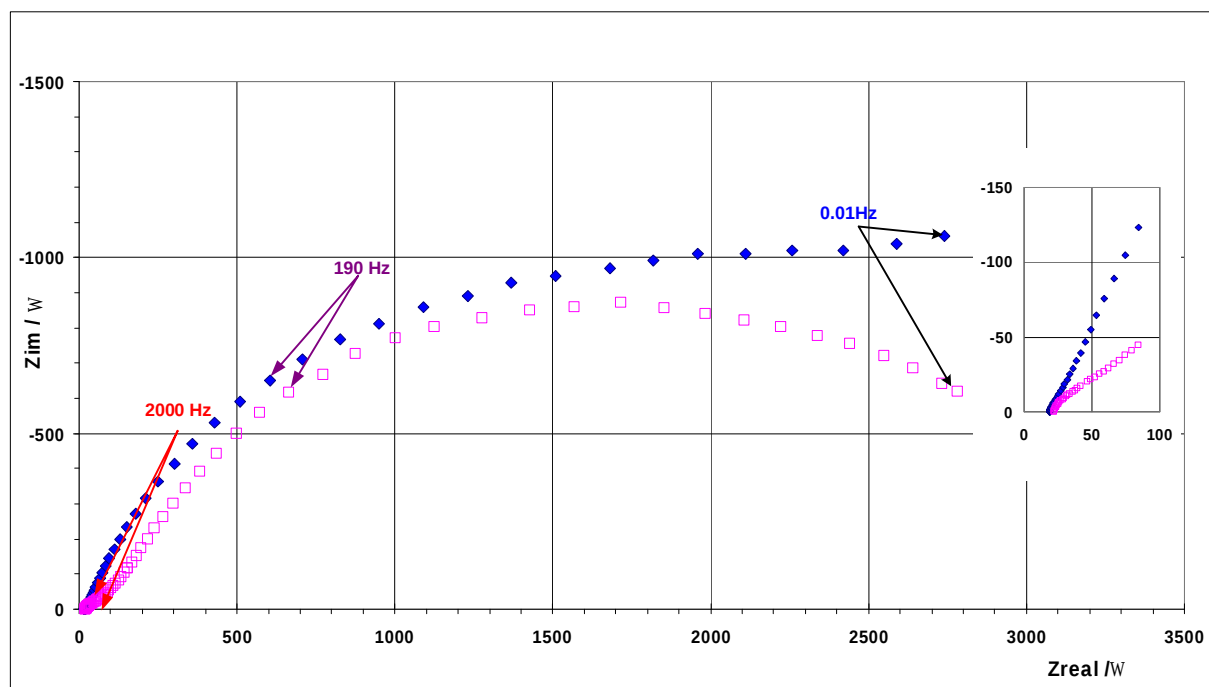


Figura 3.11. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a) 0h (♦) b) 1h (◻) de inmersión. El recuadro representa los valores de impedancia obtenidos a altas frecuencias.

La figura 3.12 muestra los diagramas Nyquist obtenidos sobre el AC1018, para los tiempos de inmersión de 2, 3 y 12 horas, donde se puede apreciar que las magnitudes del componente imaginario y real, se ven incrementadas considerablemente, respecto al diagrama de la figura 3.12. Donde las magnitudes de los componentes reales de la impedancia son muy altos comparados a los observados en los diagramas de EIS conteniendo O_2 o iones HS^- (ambientes de refinería), esto indica que la capa de productos de corrosión que se forma en medio anaerobio, sobre AC1018 es muy resistiva, es decir protectora, este hecho está asociado también a la ausencia de una especie oxidante que promueva el fenómeno de oxidación del AC1018.

Como se puede apreciar en el recuadro de la figura 3.12, en la zona correspondiente a altas frecuencias, se presentan dos bucles, de los cuales el primero muestra un



incremento mayor en un tiempo de inmersión de dos horas, presentándose un comportamiento diferente para los tiempos de 3 y 12 horas donde en el tiempo de 3 horas en el primer bucle se puede apreciar una pendiente mayor que el observado 2 y 12 horas.

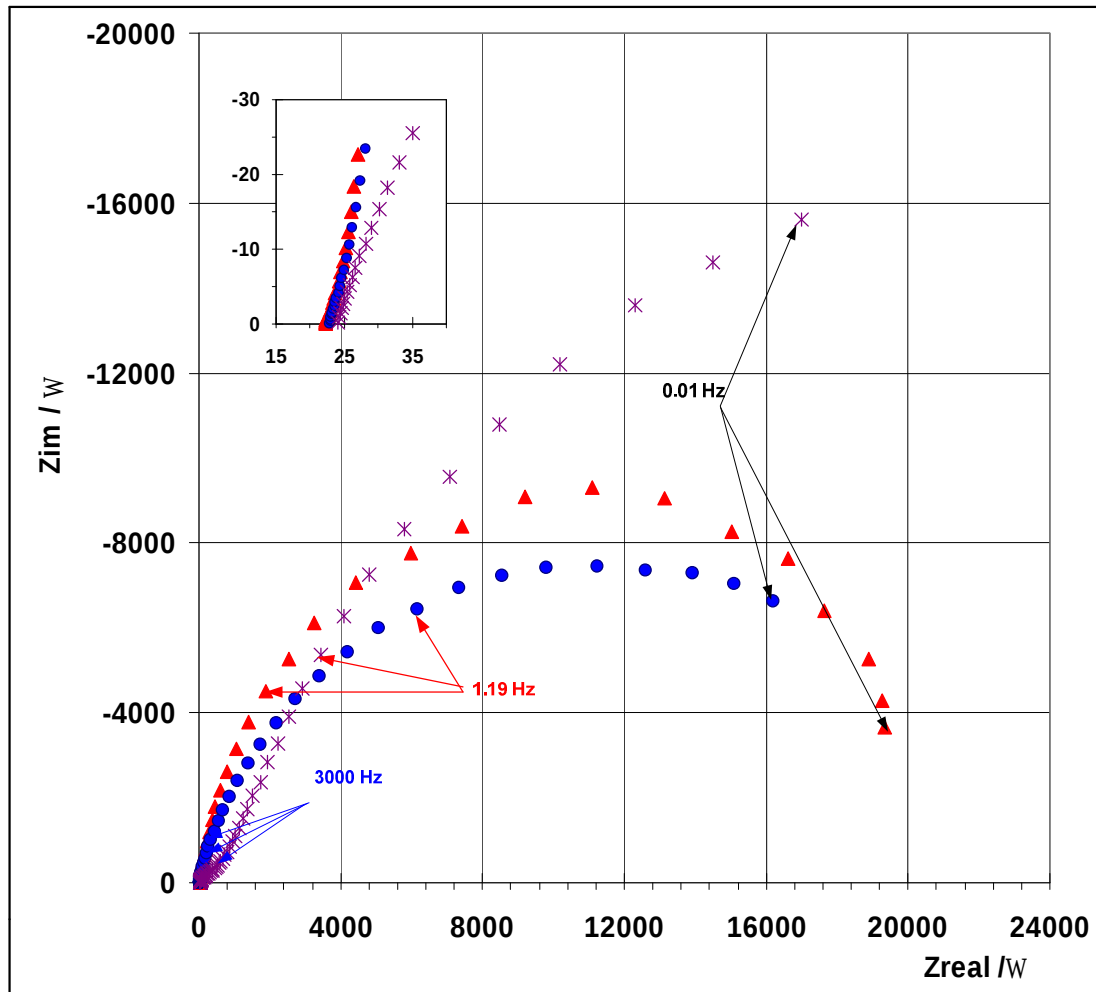


Figura 3.12 Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a 2(•) , 3(l) y 12(û) horas de inmersión.

La figura 3.13 muestra una ampliación del diagrama de Nyquist de la zona correspondiente a altas frecuencias, donde se puede apreciar de mejor manera el comportamiento anteriormente mencionado.

Así también se puede apreciar un desplazamiento de la componente real de impedancia a altas frecuencias (asociado a altas frecuencias). El incremento observado indica una modificación de la resistencia de la solución, esto se asocia en con una variación en la concentración de las diferentes especies iónicas presentes en el AMS; este comportamiento indica los iones en solución están involucrados en la formación de la película de productos de corrosión del AC1018.

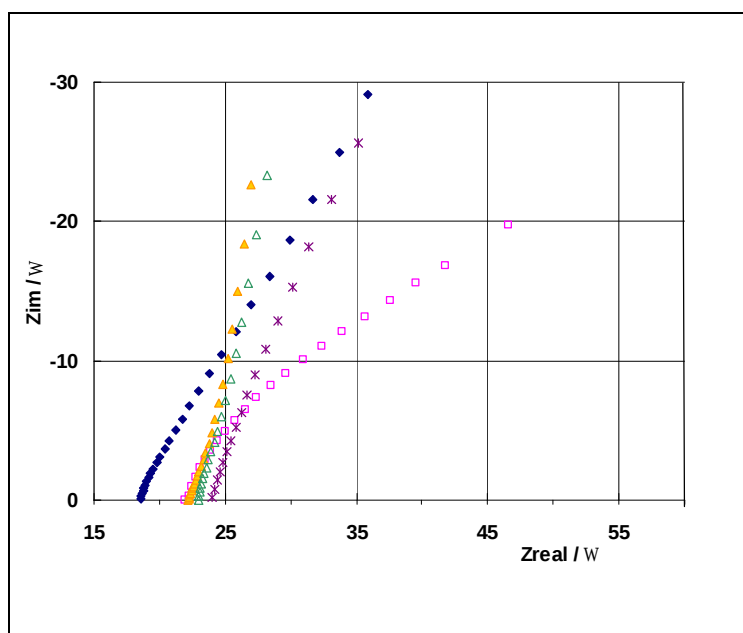


Figura 3.13. Diagramas de Nyquist para carbono SAE1018 en AMS, valores experimentales obtenidos a altas frecuencias a 0h(**u**) y 1h (**o**), 2h(**•**) , 3h(**Δ**) y 12h(**¶**) de inmersión.

Los diagramas de Bode de ángulo de fase (θ) (Fig.3.14.a) y de plano complejo IZI (Fig.3.14.b), son una herramienta muy útil ya que en ellos esta explícita la frecuencia, en comparación con los diagramas de Nyquist, en los cuales la tienen implícita. De



este modo, es posible diferenciar los procesos que están ocurriendo durante el fenómeno de corrosión.

En el gráfico θ vs. $\text{Log } F_q$ (Fig.3.14.a); se observa la presencia de tres máximos bien definidos, para los tiempos de inmersión de 0, 2 y 12 horas (Fig.3.14.a. i, iii y v), lo que indica la presencia de tres constantes de tiempo; sin embargo no ocurre lo mismo para los tiempos restantes. Estos máximos se modifican en el ángulo, en donde aparecen, dependiendo del tiempo de inmersión. Esto indica que la película de productos de corrosión formada sobre AC1018, se modifica en porosidad, con el tiempo de inmersión. Sin embargo, para un tiempo de inmersión de 3 horas (Fig.3.14.a.iv) la amplitud del máximo del ángulo de fase indica la presencia de dos constantes de tiempo colapsadas. Esto puede ser debido a que para este tiempo de inmersión, las etapas del proceso de corrosión pueden presentar tiempos de relajación similares.

Por último para, el tiempo de 1 hora (Fig.3.14.a.ii) la presencia de tres constantes de tiempo se corrobora con la formación de diferentes pendientes, en el diagrama de módulo vs. frecuencia (Fig.3.14.b. ii). Esta última evidencia también aplica para los demás tiempos de inmersión indicados en la figura. Es necesario recordar que las etapas más rápidas durante el fenómeno de corrosión se manifiestan en las regiones de altas frecuencias, incluyendo la resistencia de la solución, las etapas de velocidad media, se manifiestan a medias frecuencias, los cuales están comúnmente asociados a la estructura y composición de la película; y por último, las etapas asociadas con la difusión a través de la película de productos de corrosión, se manifiestan a frecuencias bajas, siendo estos los que limitan el proceso, por presentar la velocidad más lenta. De esta manera es posible que el agua de mar sintética, en condiciones anaerobias, provoque la oxidación del AC1018 con velocidades muy pequeñas, formando una película de productos de corrosión y/o incrustación, de carácter



poroso, sobre la superficie del AC1018. Esta película sufre modificaciones en composición durante el tiempo de inmersión en todos los casos, parece que ésta película es protectora ya que los valores de impedancia son mayores a 1000Ω .

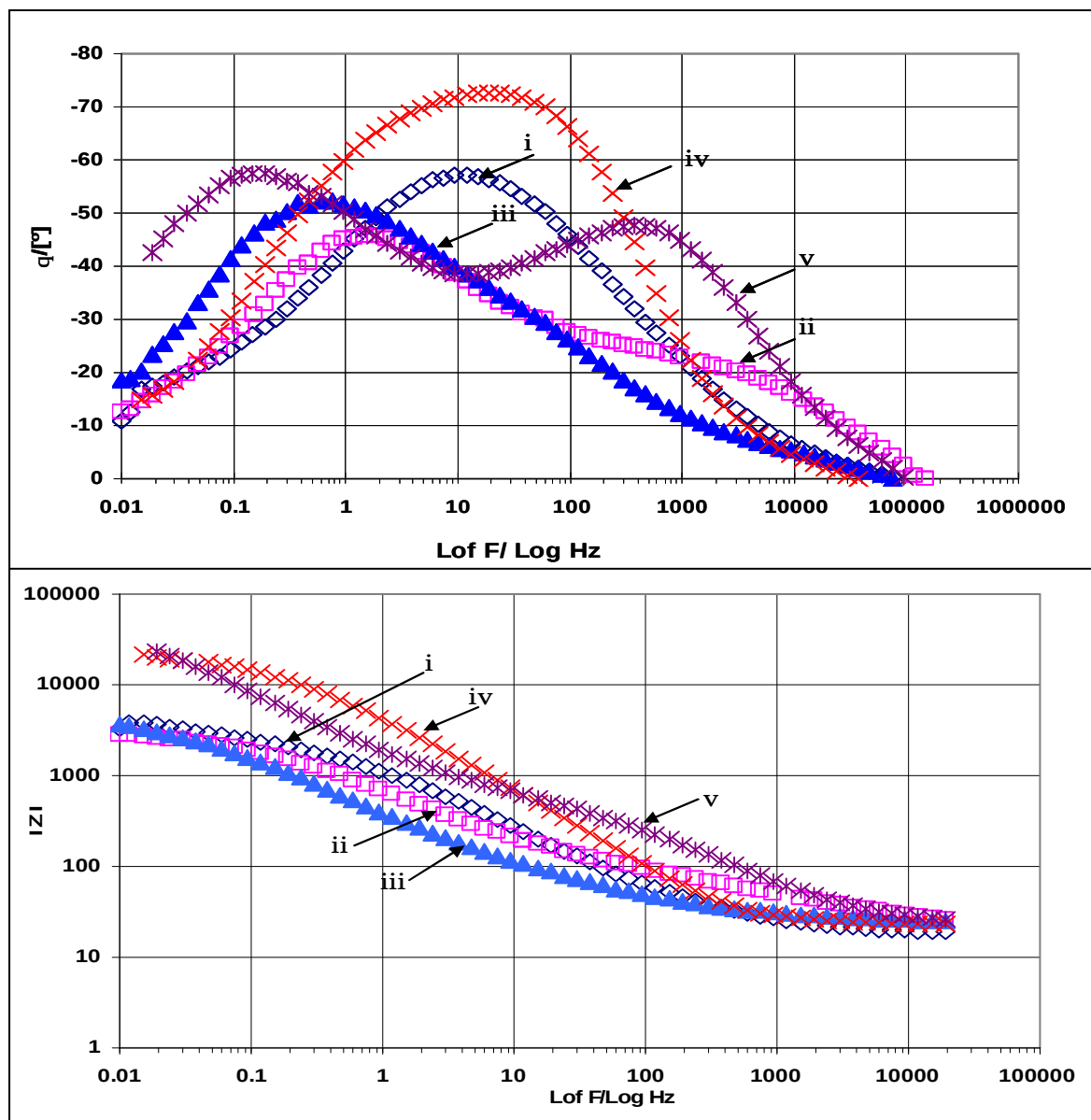


Figura 3.14. Diagrama de Bode para acero al carbono SAE1018 en AMS, a) ángulo de fase y b) plano complejo ambos a i) 0(,) y ii) 1(○), iii) 2(•), iv) 3(Ĥ) y v) 12(Ũ) horas de inmersión.

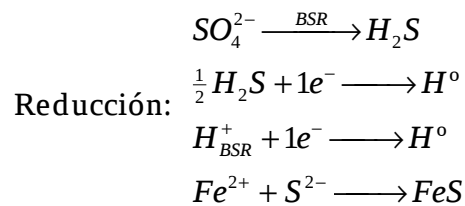
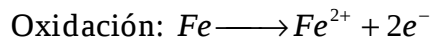


3.6.3 Caracterización electroquímica del acero al carbono SAE 1018 en presencia de BP de *Desulfovibrio sp.*

En esta etapa experimental se empleara la BP de *Desulfovibrio sp* adaptada a AMS. Al colocar la BP de *Desulfovibrio sp* sobre el AC1018, es visualmente notable la formación de una película de color negro sobre la superficie del AC1018. Esta película se puede relacionar ampliamente a la formación de sulfuros de hierro no estequiométricos, la cual por sus características visuales puede ser asociada a pirrotita, producida por la actividad metabólica de la poca cantidad de bacterias presentes en la BP, ya que el metabolismo de ellas produce iones sulfuro responsables de esto.

Una de las etapas o procesos que posiblemente pueden darse al crear esta nueva interfase es la reducción de hidrógeno, así como la generación de este por el metabolismo de los microorganismos presentes en la BP.

Donde el proceso de una manera global esta asociado de la siguiente manera:



Donde el H^{+} de la última reacción es aportado del metabolismo de *Desulfovibrio sp* al medio de trabajo. En la figura 3.15 se muestra la interfase AC1018/BP/AMS, en donde la BP actúa como una membrana selectiva a los iones SO_4^{2-} y es apreciable la formación de pirrotita.

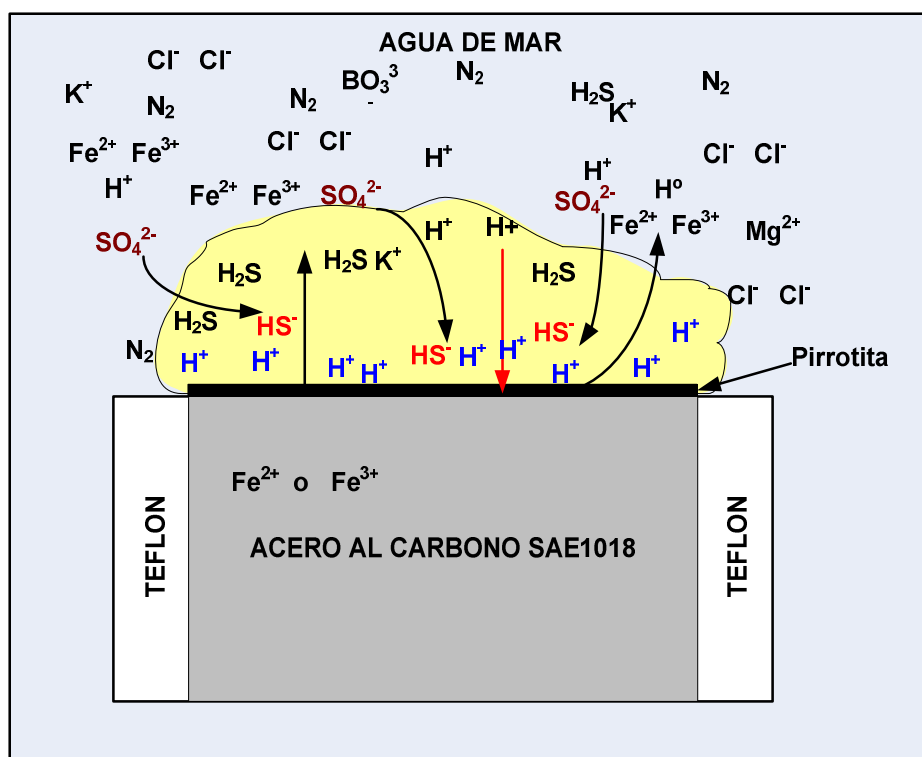


Figura 3.15 Representación mecánica del proceso de corrosión del acero al carbono SAE1018 en presencia de *Desulfovibrio* sp en agua de mar bajo condiciones anóxicas.

3.6.4 Caracterización electroquímica del acero al carbono SAE 1018 en presencia de BP de *Desulfovibrio* sp.

La figura 3.16 muestra los diagramas de Nyquist obtenidos en una superficie de AC1018 sobre la que se depositó la BP de *Desulfovibrio* sp, crecida previamente en medio Postgate y posteriormente adaptada en AMS.

Como medio de trabajo se ha empleado AMS, burbujeando un flujo constante de $\text{N}_{2(g)}$, formando con ello la interfase AC1018/BP/AMS. En esta figura se puede apreciar claramente que en todos los casos las magnitudes de impedancia imaginarias presentan valores mayores a 2000Ω , indicando que hay una mayor contribución en la



pasivación del proceso de corrosión, respecto a las magnitudes obtenidas en la interfase AC1018/AMS(Fig.3.11 y 3.12).

Así mismo, se puede apreciar que las magnitudes reales de impedancia alcanzan valores de hasta 34000Ω para un tiempo de inmersión de 1 hora, siendo estos valores mayores que los observados en la interfase AC1018/AMS indicando un efecto pasivante (protector) de la BP presente en esa superficie ante el fenómeno de corrosión bajo las condiciones experimentales establecidas.

El recuadro dentro de los diagramas de Nyquist; presenta una ampliación los datos experimentales obtenidos en la zona correspondiente a altas frecuencias, en los cuales se puede apreciar un bucle bien definido al tiempo inicial de inmersión (Fig.3.16.i), sin embargo las magnitudes de impedancia imaginarias como reales se ven desplazadas en comparación con el valor inicial a medida que aumenta el tiempo de inmersión, este primer bucle se ve más definido en un intervalo de 0-2h de inmersión(Fig.3.16.i-iii) .

En el intervalo de 0-2 horas (Fig.3.16.i-iii) se observa un incremento notable en ambas magnitudes de impedancia, con lo que hasta un tiempo de inmersión de dos horas se presenta un efecto pasivante (protector) sobre esta superficie ante el proceso de corrosión.

Los valores observados en la disminución de las magnitudes de impedancia, pueden ser debidos a que posiblemente la película de pirrotita formada inicialmente se disuelve como una consecuencia al pH ácido producido en la interfase AC1018/BP

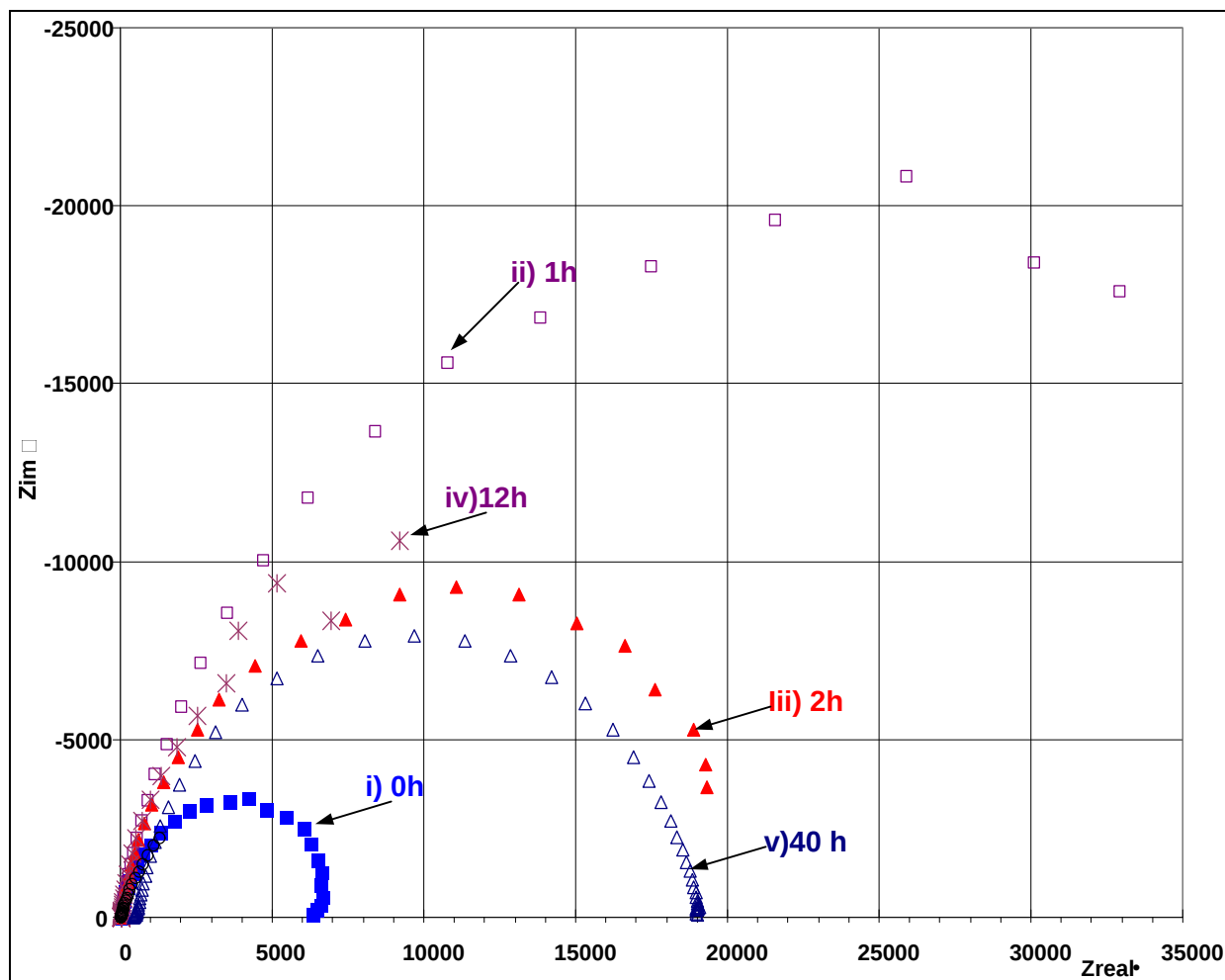


Figura 3.16. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS en presencia de biopelícula de *Desulfovibrio sp* a i) 0h (■), ii) 1h (●), iii) 2h (•), iv) 12h (×) y v) 40h (Δ).

En la figura 3.17 se pueden apreciar los diagramas de Nyquist para la interfase AC1018 /BP, correspondientes a la zona de altas frecuencias, en donde se es visible que a los tiempos de inmersión de 0, 1, 2 y 12 horas (Fig.3.17.i-iv) presentan un comportamiento semejante al de un capacitor ideal (Fig.3.17.i-iv) para frecuencias mayores de 3 Hz, que a medida que se incrementa el tiempo de inmersión va



disminuyendo este comportamiento lo cual se puede apreciar con la disminución de la pendiente de la curva. El comportamiento anteriormente descrito esta ampliamente ligado a la estructura de la doble capa, con ello se puede tener una gran simplificación de esta etapa durante el proceso de corrosión, esto es ampliamente aceptado para los casos en que la solución presenta una alta concentración de electrolitos (Fig.3.17.i-iv).

Como se puede apreciar en los diagramas de Nyquist a tiempos de inmersión cortos en la región comprendida a altas frecuencias (Fig.3.17.i-iv); éstos se deforman, lo cual se puede relacionar a la estructura de la doble capa y de la interfase AC1018 /BP, siendo esta poco homogénea o rugosa.

En comparación a un tiempo de inmersión de 40 horas (Fig.3.17.v) la etapa durante el proceso de corrosión que ocurre a frecuencias mayores de 30000 Hz se puede asociar a un elemento de Warburg , debido a que en esa región, se presenta una ángulo de 45°(Fig.3.17.v)., con esto podemos decir que el proceso de difusión se hace mas lento que en los casos anteriores, por ello se observa el incremento en la magnitud de impedancia respecto al tiempo de inmersión de una hora (Fig.3.17.i).

En la figura 3.18 se puede apreciar el diagrama de Nyquist a un tiempo de inmersión de 140 horas en presencia de la BP de *Desulfovibrio* sp, donde es claramente notable que las magnitudes de impedancia disminuyen enormemente en comparación con los tiempos de inmersión cortos, con ello se puede decir que el proceso de corrosión se activa, este fenómeno se puede deber a que para ese tiempo la producción en la proteína exopolimérica disminuye (Ver Fig.3.6), así como el numero de bacterias presentes en la BP , con ello el AC1018 queda expuesto a la agresividad del AMS explicando con esto estas bajas magnitudes en la impedancia. Así mismo en esta figura se muestra en el recuadro la zona correspondiente a altas frecuencias.

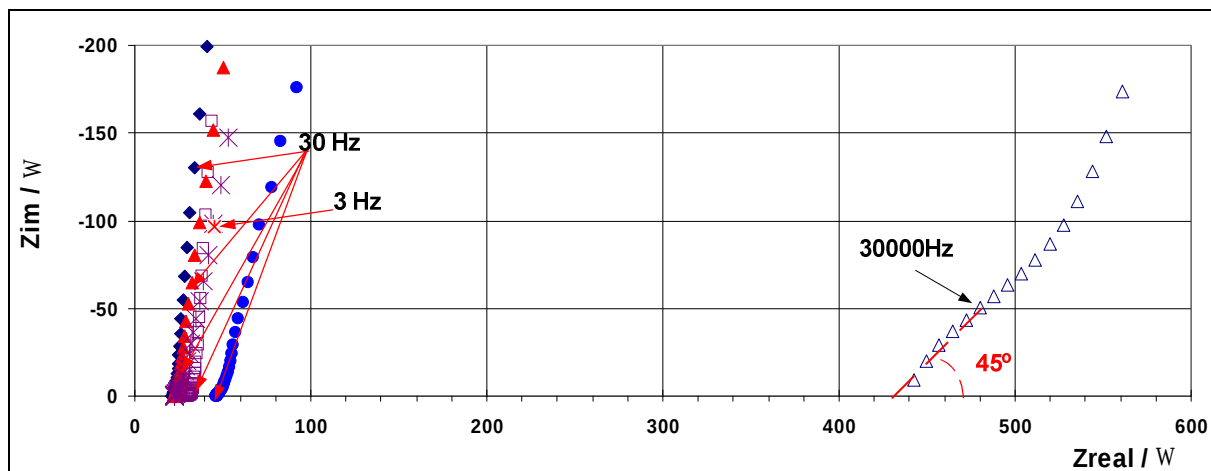


Figura 3.17. Ampliación de diagrama de Nyquist en la zona correspondiente a altas frecuencias para acero al carbono SAE1018 en AMS en presencia de biopelícula de *Desulfovibrio sp* a i) 0h($\frac{3}{4}$), ii) 1h($\circ$), iii) 2h($\bullet$), iv) 12h($\hat{\circ}$) y v) 40h(Δ) y vi) 140($\textcolor{blue}{\Delta}$) horas de inmersión.

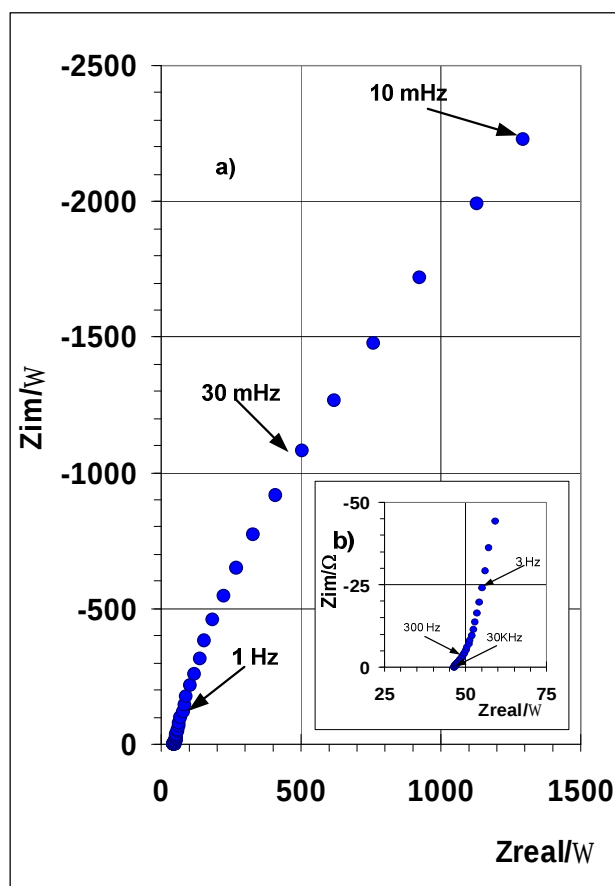


Figura 3.18. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en presencia de biopelícula de *Desulfovibrio sp* a 140h de inmersión a) bajas frecuencias b) altas frecuencias.



En las siguientes figuras se muestran los diagramas de bode de ángulo de fase (Fig.3.19.a) y módulo (Fig.3.19.b).

En la figura.3.19.a, se puede apreciar que para los tiempos de 0,1,2 y 12 horas de inmersión(Fig.3.19.a.i-iv) el máximo del ángulo de fase se mantiene constante alrededor de los 78-79°, lo cual no representa una variación significativa, sin embargo es notable resaltar que a medida que aumenta el tiempo de inmersión (0-12horas)la amplitud de la campana de esas curvas aumenta; lo que indica la presencia de dos etapas en el proceso de corrosión que tienen tiempos de relajación muy similares.

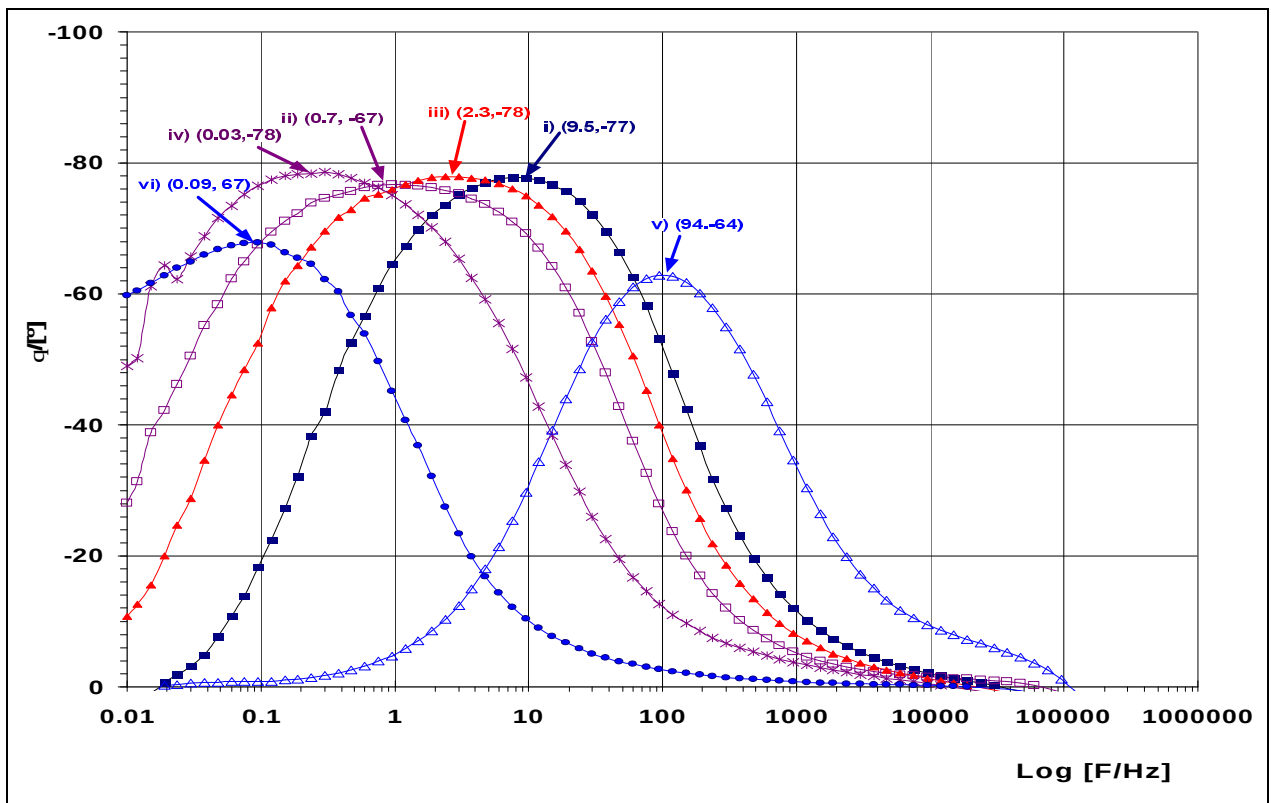


Figura 3.19.a. Diagrama de bode de ángulo de fase para la interfase acero/biopelícula de *Desulfovibrio sp* a i) 0h($\frac{3}{4}$), ii) 1h($\circ$), iii) 2h($\bullet$), iv) 12h($\hat{U}$) y v) 40h(Δ) y vi)140($|$) horas de inmersión.

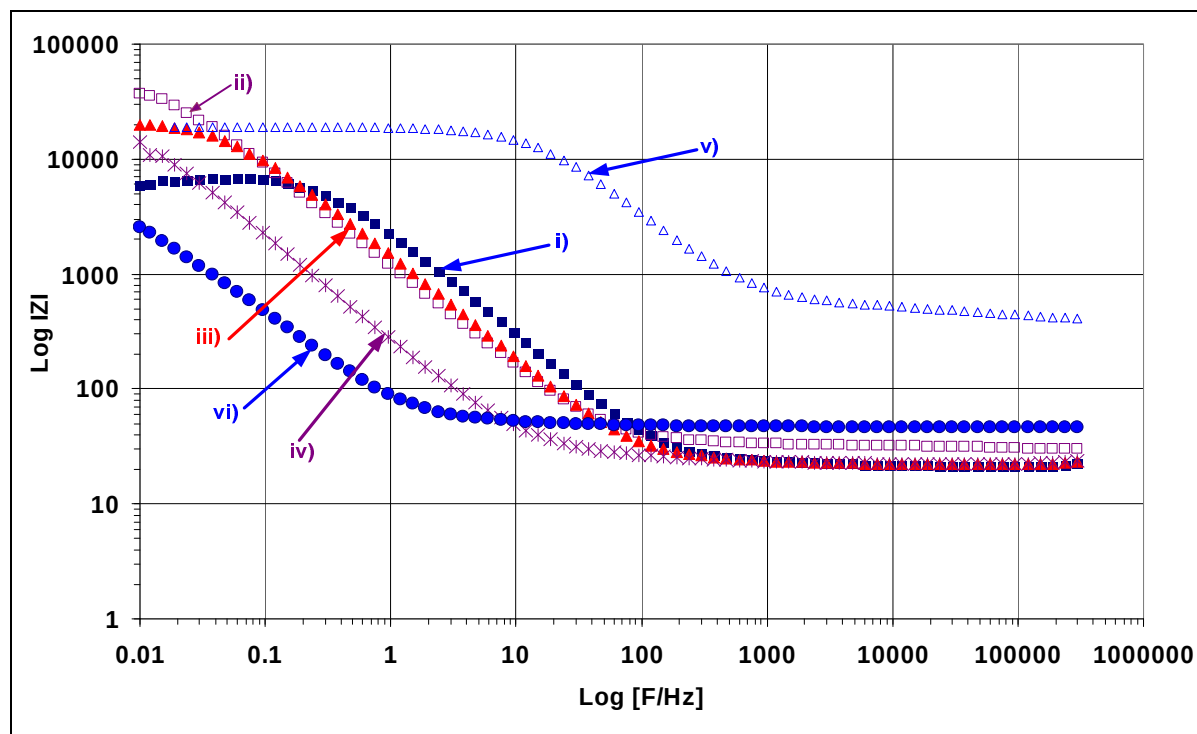


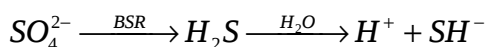
Figura 3.19.b. Diagrama de bode de ángulo de fase para la interfase acero/biopelícula de *Desulfovibrio sp* a i) 0h ($\frac{3}{4}$), ii) 1h($\bullet$), iii) 2h($\cdot$), iv) 12h($\hat{U}$) y v) 40h (Δ) y vi) 140h($|$) horas de inmersión.

Por ello se puede apreciar que a tiempos de inmersión cortos (0-12h) (Fig.3.19.a.i-iv) la corriente resultante se retrasa considerablemente respecto a la perturbación aplicada al sistema, sugiriendo que la interfase AC1018 /BP cambia en porosidad, teniendo como consecuencia que la velocidad del proceso de corrosión disminuya. Sin embargo a un tiempo de 40 horas de inmersión (Fig.3.19.a.v) se puede apreciar que el máximo del ángulo de fase disminuye hasta los 62° , con un desplazamiento importante hacia la región de altas frecuencias, indicando con ello que este proceso disminuye su tiempo de relajación a medida que aumenta el tiempo de inmersión, de tal manera que la difusión a través de la interfase AC1018/ BP disminuye, quizás por que bajo esas condiciones y especifica a ese tiempo la interfase disminuye su



porosidad. Sin embargo a un tiempo de inmersión de 140 horas de inmersión (Fig.3.19.a.vi) se observa que el máximo del ángulo de fase se desplaza hacia la zona de baja frecuencia, con lo que el máximo del ángulo que aparecía a un tiempo de inmersión de 1h (Fig.3.19.a.ii) desaparece, con lo que el proceso es ampliamente controlado por difusión en la interfase AC1018/ BP, aumentando de esta manera su velocidad; lo que posiblemente se puede deber a 2 factores:

- a) La disolución de la película interfacial de pirrotita (FeS) formada a tiempos cortos de inmersión (0-12horas) en la interfase AC1018/ BP, debido una disminución del pH interfacial como consecuencia del proceso respiratorio del *Desulfovibrio* sp producido por la siguiente reacción,:



Con lo que la película de pirrotita se disuelve ya que esta solo es estable a pH alcalinos.

- b) Al desprendimiento de la BP en algunas regiones de la interfase AC1018/BP, debido a una disminución en la concentración de proteína exopolimérica a un tiempo de 120h de cultivo(Fig.3.6), quedando de esta manera la superficie del AC1018 expuesta a la agresividad del AMS y al HS^- presente en la solución.

En la figura 3.19.b, se observa en todos los diagramas de una manera más clara la presencia de 3 pendientes, lo cual se asocia a 3 constantes de tiempo definidas, con ello se identifica que ocurren 3 etapas de manera simultanea en el proceso de corrosión en la interfase AC1018 / BP. En la figura 3.19.b se puede apreciar que a medida que el tiempo de inmersión se incrementa la velocidad de la etapa a bajas frecuencias aumenta.

3.6 Análisis cuantitativo de los diagramas de EIS.

Para poder hacer una comparación cuantitativa de los datos obtenidos por espectroscopia de impedancia electroquímica, se realizó el ajuste de los datos experimentales por medio de un circuito equivalente (Fig.3.20), empleando el programa de ajuste no lineal por mínimos cuadrados, Boukamp ,1993.

Cada constante de tiempo se compone de un capacitor y una resistencia, las cuales se muestran en el mismo color en la siguiente figura:

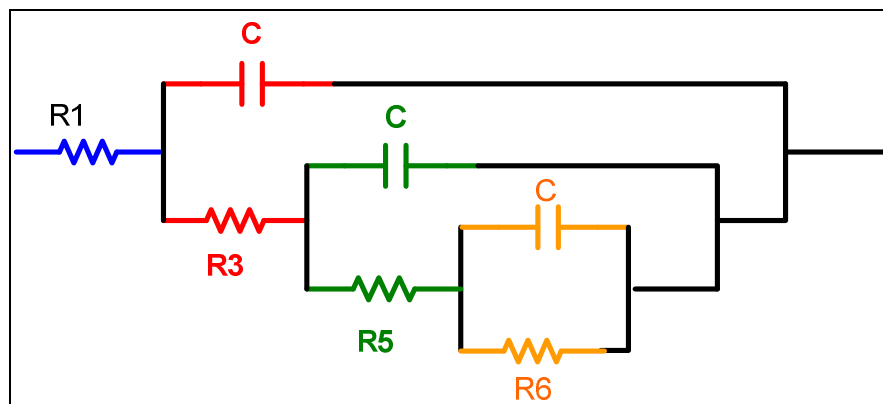


Figura 3.20. Circuito equivalente para tres constantes de tiempo.

A continuación se muestran los valores de los elementos del circuito eléctrico obtenidos del mejor ajuste de los diagramas de EIS obtenidos sobre AC1018 en AMS.

En la tabla 3.5 se puede apreciar que los valores de R1 asociados comúnmente a la resistencia de la solución varían en un intervalo de 18.42-23.75 Ω ; lo que puede indicar que existe un cambio mínimo en la composición del medio, posiblemente debido a la formación de precipitados, con lo que se ve modificad la actividad iónica de la solución.



El valor de R3 se puede asociar procesos de oxidación de hierro u reducción de iones metálicos presentes en el electrolito los cuales a través de la película de óxidos u productos de corrosión formada en la interfase metal/solución, observándose que este valor disminuye a medida que aumenta el tiempo de inmersión, indicando un fenómeno de activación del metal. Paralelamente el valor de R5, correspondiente a la difusión de hierro (II ó III) del metal hacia la solución a través de la película de productos de corrosión, se ve favorecido ya que los valores de esta resistencia disminuyen hasta en un orden de magnitud, a medida que aumenta el tiempo de inmersión. Los valores de R6 es asociados a procesos difusionales a través de la película de óxidos, debido al incremento en el espesor de la película de productos de corrosión. Este proceso difusional puede ser asociado a los protones que difunden a través de los productos de corrosión, hasta alcanzar la interfase metal/película. Los valores del parámetro n , indican la presencia de una superficie rugosa, confirmando el comportamiento no ideal de un capacitor en esa interfase.

Tabla 3.5. Parámetros electroquímicos obtenidos para el circuito equivalente propuesto.

Acero al carbono SAE1018 /AMS					
$t_{in}[h]$	0	1	2	3	12
χ^2	5.00E-05	4.20E-04	4.10E-04	3.30E-05	2.80E-04
R1[Ω]	18	21	24	23	23
Y2[μF]	110	130	140	10	200
n1	0.74	0.72	0.7	1	0.91
R3[Ω]	57	36	14	12	7
R5[Ω]	2631	1399	167	628	146
R6[Ω]	4608	4343	4077	23695	26022

En la figura 3.21.a y 3.21.b se pueden observar los valores experimentales del espectro de impedancia obtenido así como los valores resultantes del ajuste por medio del



circuito eléctrico equivalente, presentando un buen ajuste, siendo éste más preciso en la región de altas frecuencias (Fig. 3.21.b).

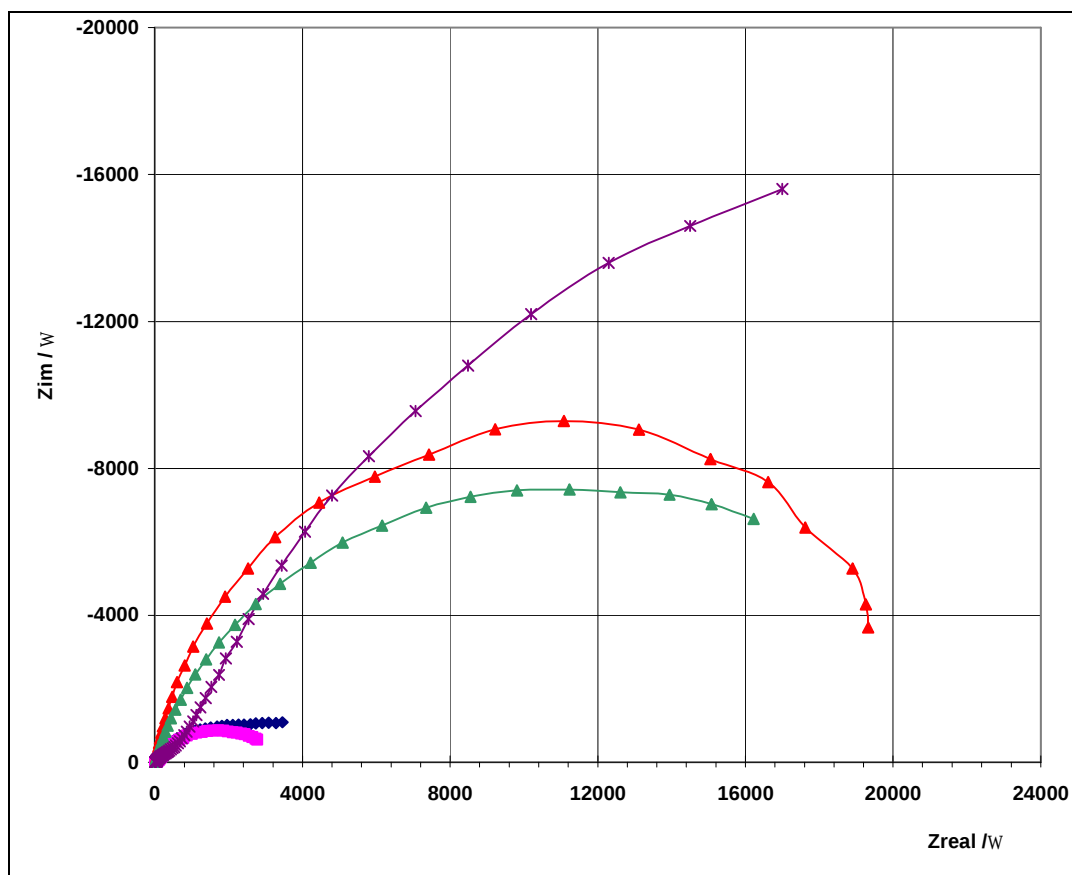


Figura 3.21.a Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a diferentes tiempos de inmersión, la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.

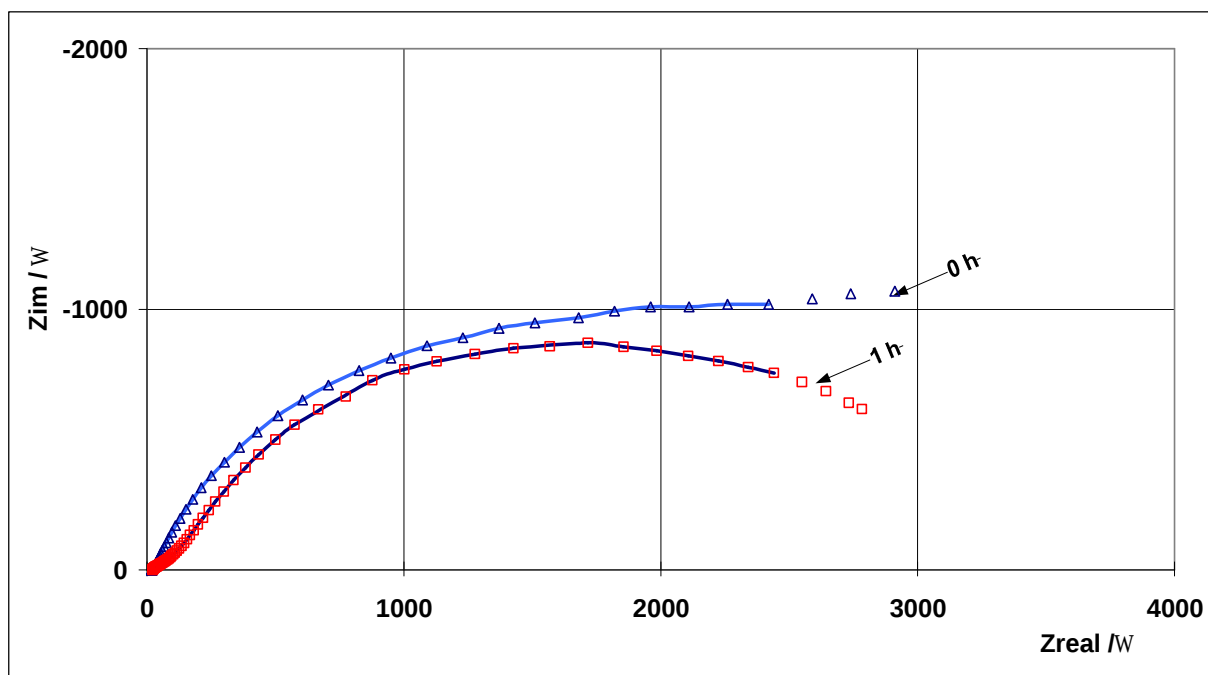


Figura 3.21.B. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE1018 en AMS a 0h (Δ) y 1h ($\circ$) de inmersión, los puntos corresponden a los valores experimentales y la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.

Para el caso de los valores obtenidos en presencia de la BP (Tabla 3.6) los valores de la resistencia de solución (R_1) no varían considerablemente. Sin embargo, esas pequeñas variaciones pueden ser causadas por la producción de H_2S como una consecuencia del proceso respiratorio de las bacterias sulfato reductoras presentes en la BP, debido a que éste presenta selectividad a los iones sulfato (Shuterland, 2003). La resistencia R_3 es asociada al proceso de transferencia de carga en la interfase metal/BP, siendo estos valores similares que a los observados en agua de mar.

El proceso asociado al proceso difusional de Fe^{2+} y Fe^{3+} , a través de la película de sulfuros y de la BP(R_5) disminuye conforme se incrementa el tiempo de inmersión.



Esta variación sugiere que la interfase electroquímica se vuelve mas activa. Esta misma tendencia fue observada para el sistema en AMS sin la presencia de BP.

Así mismo se puede observar en la tabla 3.6 que el capacitor formado en la interfase, presenta un comportamiento semiconductor en los tiempos de 1 y 2 horas de inmersión, sin embargo es altamente conductor a tiempos mayores de 40 horas de inmersión lo cual explica la activación del proceso de corrosión. El valor correspondiente a la difusión que ocurre a bajas frecuencias, presenta un incremento a través del tiempo, lo cual es un indicio de que este proceso es el más lento durante este fenómeno. Esta etapa en particular asociada a la difusión de los iones HS^- o H^+ al presentarse la cepa de *Desulfovibrio sp*, ya que para poder metabolizar carbohidratos y proteínas presentes en el medio procedente de la lisis celular o de sustancias exopoliméricas, se requiere de éste como donador de electrones. Sin embargo al tiempo de 140 horas este fenómeno se ve favorecido, debido probablemente a la captación del hidrógeno

Tabla 3.6. Parámetros electroquímicos obtenidos para el circuito equivalente propuesto.

Acero al carbono SAE1018 AMS/ Biopelícula / N ₂					
t _{in} [h]	0	1	2	12	140
χ^2	2.38E-03	2.21E-04	1.47E-04	8.83E-05	1.34E-04
R1[Ω]	22	31	22	23	47
Y2[μF]	684	74.6	106	191	601
n1	0.83	0.86	0.88	0.92	0.98
R3[Ω]	88	5	17	7	8
R5[Ω]	6239	800	950	203	11
R6[Ω]	6333	43464	20673	21273	15455
C[μF]	385	21	45	107	539

En la siguiente figura se muestra el ajuste de los datos experimentales en la interfase AC1018/BP/AMS, donde se puede apreciar la calidad del ajuste, siendo este mas precisos para estos experimentales que los obtenidos en AMS. Cabe destacar que los



resultados presentados hasta en esta investigación son una muy buena aproximación a los fenómenos que ocurren en esta interfase. Sin embargo se deben de realizar estudios más profundos, empleando más combinaciones de circuitos para obtener una mejor información del proceso de corrosión bajo las condiciones operacionales establecidas.

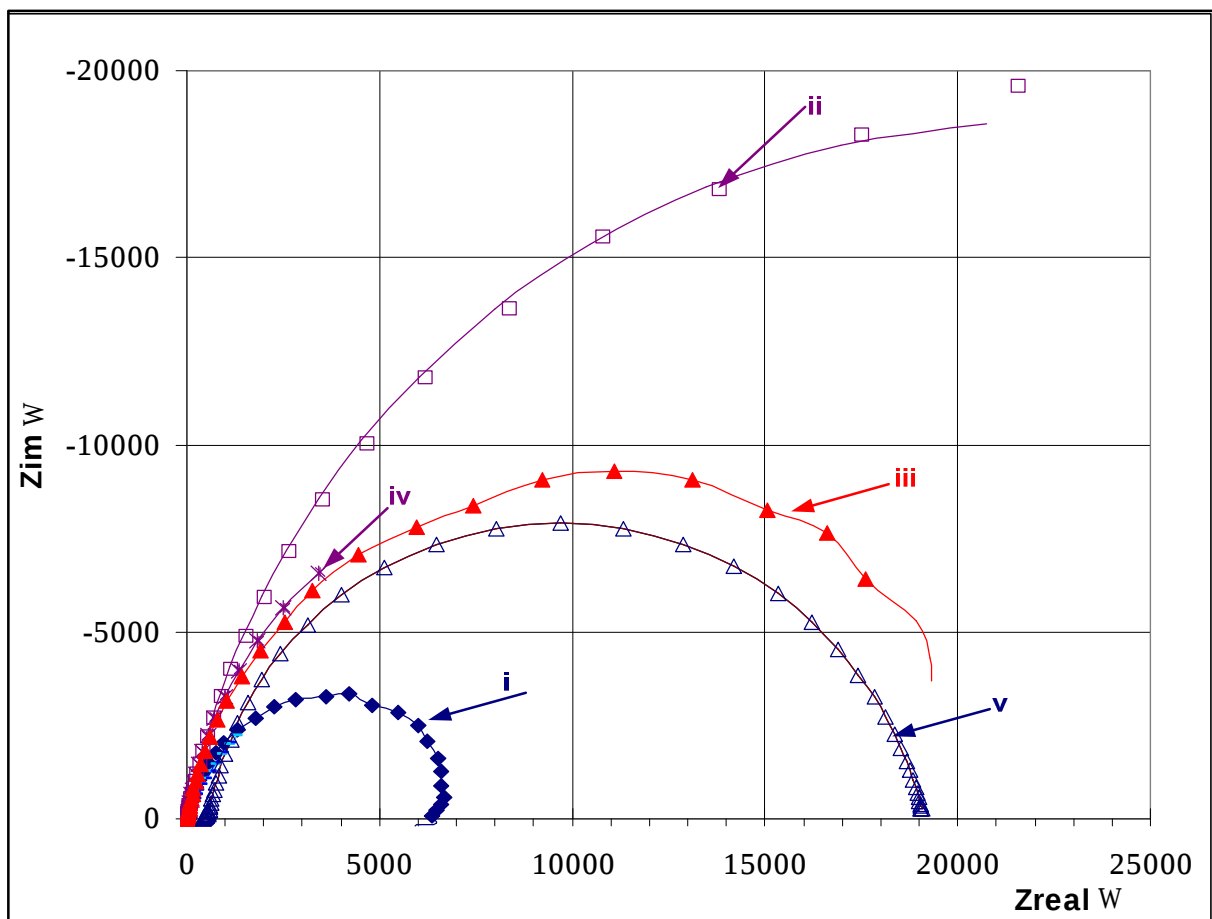


Figura 3.22 Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE 1018 en AMS en presencia de biopelícula de *Desulfovibrio* sp a i) 0h ($\frac{3}{4}$), ii) 1h($\circ$), iii) 2h($\bullet$) , iv) 12h($\hat{\cup}$) y v) 40h(Δ) diferentes tiempos de inmersión, la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.

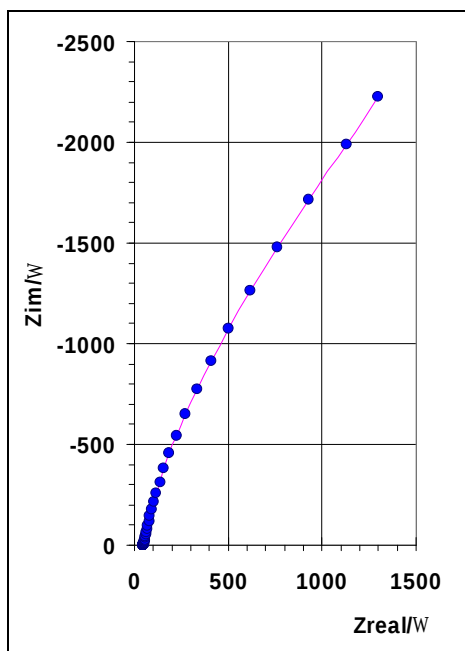


Figura 3.22.B. Diagrama de Nyquist para acero al carbono SAE 1018 en AMS en presencia de biopelícula 140 horas inmersión, la línea continua corresponde al ajuste por medio del programa de simulación BOUKAMP.

Por lo tanto el circuito equivalente queda representado de la siguiente manera

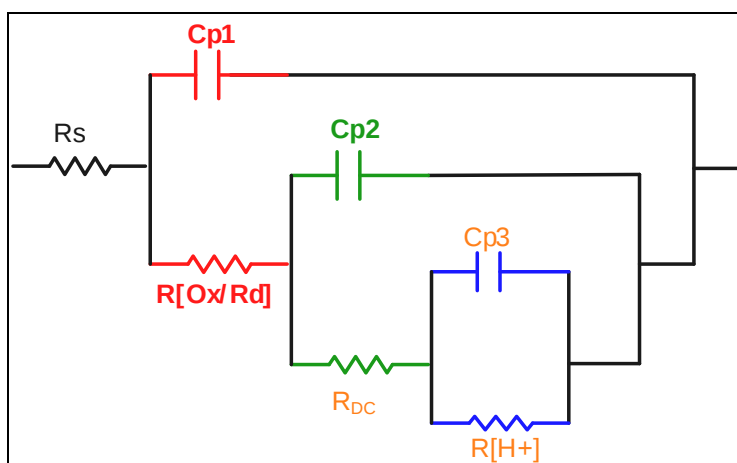


Figura 3.19. Circuito equivalente con tres constantes de tiempo propuesto para éste proceso.



Donde R_s es la resistencia de la solución, C_{p1} y $R[Ox/Rd]$ es el capacitor y la resistencia de la película de productos de corrosión, siendo este el único capacitor con un sentido físico.

Los capacitores C_{p2} y C_{p3} no tiene significado físico ya que sólo son empleados para poder realizar el ajuste de los datos al circuito propuesto.

El elemento $R_{DC}-C_{p1}$ corresponde al comportamiento capacitivo de la doble capa, debido a que esta interfase es más compleja, llevándose a cabo a frecuencias medianas.

El valor $R [H^+]$ corresponde al proceso de difusión de H^+ atómico a través de la película de óxidos, para AC1018 limpio de la solución al metal. En el caso de la BP el componente $R [H^+]$ corresponde a la difusión a través y de la película de productos de corrosión de la solución hacia el metal. Posteriormente existe la formación de H atómico como consecuencia del proceso de reducción.

Del mejor ajuste de los diagramas de impedancia obtenidos se puede observar claramente que los datos experimentales obtenidos en presencia de la BP se ajustan de una mejor forma que los datos obtenidos en ausencia de éste.

De acuerdo a los valores de n obtenidos para la interfase AC1018 / BP indican que la BP se adhiere de una manera homogénea al mismo tiempo que da un efecto pasivante al AC1018 en presencia de la BP *Desulfovibrio sp.*



Por lo tanto el proceso de corrosión en AMS se puede dar en tres etapas, las cuales son:

- a) Oxidación de hierro y reducción de H^+ o HS^- en la interfase metal/biopelícula en donde éste es el proceso con mayor velocidad durante el proceso de corrosión..
- b) Transporte de Fe^{2+} o Fe^{3+} través de la película de productos de corrosión formada encontrándose éste a medianas frecuencias.
- c) Transporte de protones, siendo éste el proceso más lento que se localiza a bajas frecuencias.

En el caso de la BP el mecanismo se puede comportar de la siguiente manera;

- a) Oxidación de hierro y reducción H^+ o HS^- en la interfase AC1018/BP.
- b) Proceso capacitivo en la interfase formada por AC1018/ película de productos de corrosión (sulfuros de hierro)/BP, realizándose éste proceso a medianas frecuencias.
- c) El proceso más lento consiste en la difusión de H^+ o HS^- de la BP hasta el metal a través de la BP y de la película de sulfuros de hierro.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

A pesar de la complejidad que representa el elaborar estudios de biocorrosión, debido a que en él se presentan de manera simultánea diferentes etapas sobre la superficie del acero en agua de mar sintética y una biopelícula, se logró una buena aproximación a las condiciones naturales en que ocurre este proceso. Pudiendo con este trabajo conocer el efecto causado por las sustancias exopoliméricas presentes en la biopelícula de *Desulfovibrio* sp.

Al variar la concentración de nitrógeno manteniendo constante la concentración de lactato, en el medio Postgate con una relación C/N=12, se consiguió una mayor producción de biomasa y de sustancias exopoliméricas de *Desulfovibrio* sp, bajo las condiciones de cultivo establecidas.

Con las estrategias planteadas se consiguió adaptar la biopelícula de *Desulfovibrio* sp en agua de mar sintética, produciendo una biopelícula con una concentración celular mucho menor que la presentada en un cultivo en medio Postgate pero con una mayor concentración de sustancias exopoliméricas.

Durante la adaptación de la biopelícula de *Desulfovibrio* sp en agua de mar sintética se logró inducir fenómenos del metabolismo endógeno y lisis celular en la biopelícula de *Desulfovibrio* sp, disminuyendo de una manera muy importante los efectos causados por la actividad metabólica de las bacterias sulfato reductoras presentes en la interfase Acero / biopelícula.

Se logró diseñar una celda que garantizara las condiciones biológicas y electroquímicas para la realización de los estudios de biocorrosión.

Los análisis de impedancia con acero al carbono SAE1018 en agua de mar/N₂, mostraron que el acero al carbono SAE1018 se convierte en una especie pasiva alcanzando magnitudes de impedancia real de hasta 18000Ω para tiempos de inmersión menores a 2 horas, indicando la formación de una película de productos de corrosión e incrustación de carácter protector que con el paso del tiempo se hace más porosa, activando de esta forma el proceso de corrosión.

Los análisis de impedancia en la interfase acero al carbono/Agua de mar/biopelícula/N₂ indican que la biopelícula de *Desulfovibrio sp*, pasiva el fenómeno de corrosión y por lo tanto protege al acero al carbono SAE 1018 hasta un tiempo de inmersión menor a 40 horas.

Con la presencia de la biopelícula de *Desulfovibro* sp sobre el acero al carbono, existe la formación de una película interfacial de sulfuros de hierro, principalmente Pirrotita, por sus características visuales; la cual da propiedades protectoras al acero, evolucionando de manera importante a medida que se incrementa el tiempo de inmersión, con lo que el proceso de corrosión se ve disminuido hasta tiempos menores de 40 horas.

Es posible observar que el proceso de corrosión se activa bajo las condiciones de trabajo establecidas después de 140 horas de inmersión como una consecuencia de la disminución en la concentración celular y de proteína en la biopelícula, teniendo como resultado el desprendimiento de ésta en la interfase formada, dejando de esta manera expuesta la superficie de acero a la agresividad del medio.

5. BIBLIOGRAFÍA.





- 1) Anne Mai-Prochnow, Flavia Evans, Doralyn Dalisay-Saludes, Sacha Stelzer, Suhelen Egan, Sally James, Jeremy S. Webb, and Staffan Kjelleberg. (2004). Biofilm Development and Cell Death in the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. Applied And Environmental Microbiology, p. 3232–3238
- 2) Anthea K. Lee, Martin G. Buehler, Dianne K. Newman. (2006), Influence of a dual-species biofilm on the corrosion of mild steel. Corrosion Science 48 (2006) 165–178
- 3) Baikun Li Bruce E. Logan. (2004) Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 36(2004) 81–90
- 4) Barton L.L., (1995), Biotechnology Handbooks. Sulfate-Reducing Bacteria” Plenum Press, New México, USA.
- 5) Boukamp B. A. (1993).. *Users Manual Equivalent Circuit, ver. 4.51* Faculty of Chem. Tech., University of Twente, The Netherlands
- 6) Beech, I.B. V. Zinkevich, R. Tapper, R. Gubner, and R. Avci. (1999). Study of the Interaction of Sulfate-Reducing Bacteria Exopolymers with Iron Using XPS and ToFSIMS, J. Microbiological Methods, 36, 3-10
- 7) Beech, I.B. R. Gubner, V. Zinkevich, L. Hanjansit, and R. Avci. (1999). The effect of *Pseudomonas* NCIMB biofilm on the formation of passive layer on AISI 316 stainless steel. Corrosion99, Paper No. 185 (Houston, TX: NACE International, 1999).

- 8) Beech, I.B., V. Zinkevich, L. Hanjongsit, J. Smith, R. Gubner, and R. Avci.(1998). Modification of the passive layer of 316 stainless steel in the presence of *Pseudomonas* biofilm. 3rd NACE Latin American Region Corrosion Congress, Latincorrosion98, Cancun, Mexico, 30 August – 4 September 1998. Paper No S19-04. NACE electronic publications, NACE, Houston, Texas.
- 9) Beech, I.B., V. Zinkevich, R. Tapper, and R. Avci(1998). The interaction of exopolymers produced by a marine sulphate-reducing bacterium with metal ions. Biodegradation and Biodeterioration in Latin America, C.C. Gaylarde, T.C.P. Barbosa and N. H. Gabilan (eds.), Published by The British Phycological Society UK, CD-ROM, Paper 07 (1998).
- 10) Beech, I.B., Zinkevich, V., Tapper, R. and Avci, R.(1999). Study of the interaction of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with iron using X-ray photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary ionisation mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 3-10.
- 11) Beech, I.B., Hanjongsit, L., Kalaji, M., Neal, A., and Zinkevich, V.(2001). Exopolymer production by planktonic and biofilm *Pseudomonas* sp. NCIMB2021 cells in continuous culture. *Microbiology*, 145, 1491-1497.
- 12) Beech, I.B., Gubner, R., Zinkevich, V., Hanjongsit, L. and Avci, R. (2000). Characterisation of conditioning layers formed by exopolymeric substances produced by *Pseudomonas* NCIMB 2021 on surfaces of AISI 304 and 316 stainless steel. *Biofouling*, 16, 93-104.



- 13) Beech, I.B., Smith, J., Steele, A., Penegar, J and Campbell, S. (2002). The application of AFM in investigating interactions of biofilms with inanimate surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23, 231-247.
- 14) Cabrera-Sierra R., M. Miranda, E. Sosa, T. Oropeza, I. González, (2001) *Corrosion. Scienceence.*, 43, 2305.
- 15) Carpen.L, Laura Raaska, Tero Hakkarainen (1999). Effects of biofilm formation on the electrochemical behavior of aisi 304 in board machine environment. *CORROSION/19999*, paper no. 165, (Houston, TX: NACE International, 1997).
- 16) Chaieb.E., A. Bouyanzer, B. Hammouti*, M. Benkaddour.(2004). Inhibition of the corrosion of steel in 1 M HCl by eugenol derivatives. *Applied Surface Science* 246 (2005) 199–206
- 17) Cruz-Gaona R. (2000), *Caracterización Electroquímica del Estudio Superficial de Sulfuros Minerales de Hierro. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México.*
- 18) Davenport A. J. and M. Sansome, (1995) *Journal of Electrochemical. Society.* 142, 725.
- 19) Deslouis.C., P. Falaras,O, Gil, M. Jeannin , V. Maillot, B. Tribollet.(2005). Influence of clay on calcareous deposit in natural and artificial sea water. *Electrochimica Acta*. Article in press



- 20) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem* 28, 350-356
- 21) Dunne.WM.Ir.(2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?.*Clinical Microbiology.Review*.April; 15(2): 155–166
- 22) Foroulis Z. A., (1993) *Corrosion Prevention and Control*, August, 84.
- 23) Frings, C.S., Dunn, R.T., (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Journal of Clinical Pathology* 53, 89-91.
- 24) González I.(2004).“Semanario de la UAM. Desarrolla UAM técnicas contra la corrosión en refinación del Crudo”, Vol. X Núm. 28 México D.F.
- 25) Héctor A.Videla.,Liz K. Herrera.(2005) Microbiologically influenced corrosion: looking to theFuture. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY*,8:169-180
- 26) Jeyaprabha.C., S. Sathiyarayanan, G. Venkatachari.(2004). Corrosion inhibition of pure iron in 0.5 M H₂SO₄ solutions by ethanolamines. *Applied Surface Science* 246, 108–116
- 27) Kofstad P. (1972.) *Nonstoichiometry. Diffusion. Electrical Conductivity in Binary Metal Oxides* Wiley-InterScienceence, New York 5-17.



- 28) Lowry, O.H., Rosen Brough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- 29) Marin-Cruz.J.,R.Cabrera-Sierra,.M.A,Pech-Canul And I. Gonzalez.(2004).Characterization of different allotropic forms of calcium carbonate scales on carbon steel by electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Applied Electrochemistry* 34: 337–343
- 30) Marin-Cruz.J.,R.Cabrera-Sierra,.M.A,Pech-Canul And I. Gonzalez.(2005).EIS study on corrosion and scale processes and their inhibition in cooling system media. *Electrochimica Acta*.Article in press.
- 31) Martínez F.O.(2003).Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de materia orgánica. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- 32) MIRANDA T.E (2001).Caracterización filogenética de bacterias reductoras de tiosulfato aisladas de pozos petroleros. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- 33) Newman R.C., K. Rumash, and J. Webster, (1992).Corrosion reports. *Corrosion. Science.*, 33, 1877.
- 34) Pope, DH, Duquette, DJ, Wayner, P. and Johannes, AH.(1984.). Microbiologically Influenced Corrosion: A State-of-the-Art Review, MTI



Publication No. 13, Materials Technology Institute of the Chemical Processing Industry,

- 35) Rongjun Zuo . Thomas K. Wood.(2004). Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using gramicidin-S-producing biofilms. *Appl Microbiology and Biotechnology*. Springer-Verlag 65: 747–753
- 36) Rongjun Zuo, Esra Kus, Florian Mansfeld b, Thomas K. Wood(2005). The importance of live biofilms in
- 37) corrosion protection. *Corrosion Science* 47, 279–287
- 38) Sosa E., R. Cabrera-Sierra, M. E. Rincón, M. T. Oropeza, I. González.(2002) . Chemical Characterization of Corrosion Films Electrochemically Grown on Carbon Steel in Alkaline Sour Environment. *Electrochim. Acta*, 47, (8), 1197.
- 39) Sosa E., R. Cabrera-Sierra, I. García, M. T. Oropeza, I. González. (2002). The role of different surface damages in corrosion process in alkaline sour media. *Corrosion Science*. Vol. 44, pp 1515-1528.
- 40) Sosa E., R. Cabrera-Sierra, M. T. Oropeza, I. García, I. González.(2001). *Journal of Applied Electrochemistry*. Special edition of Meeting EIS 2001, Marilleva Trento, Italy. In press.
- 41) Sosa E.(2002). *Caracterización Por Técnicas Electroquímicas Y Espectroscópicas De Productos De Corrosión (Fexsy) Formados Sobre El Acero Al Carbono En Medios Amargos Alcalinos*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.



- 42) So-Young Kang, Phil J. Bremer, Kyoung-Woong Kim and A. James McQuillan..(2005). Monitoring Metal Ion Binding in Single-Layer *Pseudomonasaeruginosa* Biofilms Using ATR-IR Spectroscopy *Langmuir*, 22 (1), 286 -291
- 43) Sutherland I.W. (2001).Mini review. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework.Microbiology, 147, 3–9
- 44) Uhlig H. H. (1984).Corrosion and Corrosion Control. Introduction to corrosion Scienceence Engineering" 3rd. ed. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. 70.
- 45) Vedage H., T. A. Ramanarayanan, J. D. Mumford, S. N. Smith, (1993) The effect of H₂S concentration on the corrosion behavior of API 5L X-70 steel. Corrosion, 49, 114.
- 46) Videla H.A. Sandra G. Gdmez de Saravia, Patricia S. Guiamet, Patricia Allegreti and Jorge Furlong.2000.Microbial degradation of film-forming inhibitors and its possible effects on corrosion inhibition performance. Corrosion2000.Paper 00386.



- 47) Zinkevich, V and Beech, I.B. Screening of sulphate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa.(2000).The effect of marine *Pseudomonas* NCIMB 2021 biofilm on AISI 316 stainless steel. *Microbiology Ecology*, 34, 147-155

ANEXO A

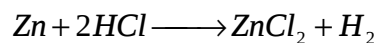


I. Generalidades de electroquímica.

La electroquímica se define como ciencia encargada de estudiar las propiedades de los iones en solución y sus reacciones en la interfase metal/solución.

Cual es la diferencia entre la corrosión química y la electroquímica?...

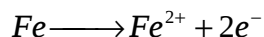
La corrosión es una reacción química, por ejemplo puede ser zinc colocado en ácido clorhídrico , el cual produce una reacción rápida con se muestra a continuación:



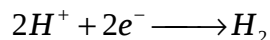
Una reacción electroquímica es una reacción química que involucra la transferencia de electrones comprendiendo reacciones de oxidación y reducción. Por lo tanto la corrosión electroquímica involucra transferencia de electrones, lo cual no ocurre en la corrosión química. Para evaluar la corrosión electroquímica por ejemplo la corrosión por picaduras, donde el ataque ocurre en un área pequeña de la superficie metálica y el resto de la superficie se mantiene sin afecciones, pueden ser empleadas técnicas electroquímicas para su determinación sin afectar las demás zonas del metal.

De donde se puede formular la siguiente pregunta: Como se da el proceso de corrosión de un metal?

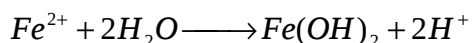
El proceso de corrosión puede iniciar cuando el acero esta en agua conteniendo electrolitos, estos es los iones que pueden producir un flujo de corriente del ánodo al cátodo. Suponiendo que tenemos una pieza de aceroal carbon sumergido en agua, la superficie del acero presentara una reacción anódica como catódica:



Esto es una reacción de oxidación y ocurre en el ánodo. El átomo de hierro Fe, pierde dos electrones y se convierte en ion ferroso, Fe^{2+} :

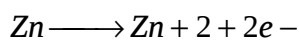


La anterior es una reacción de reducción y ocurre en el cátodo, ambas reacciones ocurren simultáneamente, para lo cual el ión ferroso reacciona con agua de la siguiente manera:

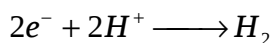


Por lo tanto los iones del hierro en agua producen hidróxido ferroso. Con esto el hierro se oxida y el hidróxido se deposita en la superficie del cátodo y forma los productos de corrosión conocidos comúnmente como óxidos. Siendo de una manera la corrosión un proceso natural, el óxido se forma sobre un metal que es expuesto a el aire o a agua, debido a que muchos compuestos se disocian en iones al ser sumergidos en agua con ello las partículas cargadas del electrolito conducirán la corriente eléctrica de la solución.

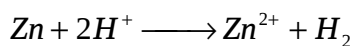
Las reacciones pueden ser simplificadas dentro de reacciones catódicas y reacciones anódicas, como se puede observar a continuación donde una reacción neta ocurre al sumar las dos semi reacciones:



Oxidación(Rx.Anódica)



Reducción(Rx.Catódica)



Rx.Global.



Las reacciones separadas, anódicas y catódicas, ocurren simultáneamente y en ocasiones son referidas como una reacción de semi celda. Una reacción de semi celda es la reacción de una celda que consiste de un electrodo inmerso e un electrolito diseñado para medir un solo potencial de electrodo.

Uno de los conceptos mas importantes en corrosión es el de Polarización, el cual se define como el cambio de potencial como resultado de un flujo de corriente, éste puede ser medido en términos del potencial del metal donde las reacciones ocurren.

El fenómeno de corrosión puede ser modelada con circuitos eléctricos, incluyendo los conceptos básicos de corriente, resistencia y voltaje. Donde el voltaje es la fuerza electrón motriz, o una diferencia en el potencial del electrodo presentada en volts. El volt es una unidad de fuerza electromotriz que produce una corriente de un ampere para que ese flujo pase a través de una resistencia de 1 Ohm. La corriente es e grado del flujo de electrones cargados. Un ampere es el flujo de un coulomb ($6.2 \cdot 10^{18}$ electrones) por segundo y finalmente la resistencia es la oposición al paso del flujo de corriente a través del material y es una propiedad dependiente de éste.

Actualmente se han empleado mediciones cuantitativas del grado y la extensión del daño por corrosión comúnmente determinadas por la perdida de peso una vez que han sido retirados los productos de corrosión , en comparación las mediciones electroquímicas pueden dar una información mayor sobre el posible mecanismo de corrosión observado.

Algunos ejemplos de técnicas electroquímicas son: corriente de polarización directa, impedancia de corriente alterna y resistencia a la polarización. En la corriente de polarización directa, para un circuito abierto el potencial inicialmente es medido con



un potencióstato. A partir de estos valores la corrosión puede ser determinada a partir de la siguiente relación:

$$R = 0.13 I_{\text{corr}} K / \rho \quad (3)$$

Donde R es el grado de corrosión en mm/año, I_{corr} es la densidad actual de corrosión en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, K es el peso equivalente del metal, ρ es la densidad del metal en g/cm^3 .

Para el estudio de la biocorrosión existen tres técnicas primordiales, debido a que estas no perturban la actividad microbiológica durante la medición de parámetros: Técnica de ruido electroquímico, espectroscopia de impedancia electroquímica y Amperometría de resistencia Zero. De estas técnicas ampliamente utilizadas en este campo se le dará prioridad a la impedancia de espectroscopia electroquímica.

II) Impedancia de espectroscopia electroquímica.

La espectroscopia de impedancia es una técnica no estacionaria que consiste en aplicar al sistema en estudio una perturbación eléctrica de forma sinusoidal (voltaje o corriente conocidos) de pequeña amplitud, a distintas frecuencias. La respuesta, también sinusoidal, (corriente o voltaje) se compara con la perturbación para deducir la impedancia a cada frecuencia.

La impedancia $Z(\omega)$ puede ser vista operacionalmente como una resistencia dependiente de la frecuencia. Al igual que una resistencia óhmica, es definida como una relación potencial/corriente. Sin embargo en el caso de la impedancia, se considera a un potencial $E(\omega)$ y una corriente $I(\omega)$ dependientes de la frecuencia:

$$Z(\omega) = E(\omega) / I(\omega) \quad \text{eq.1}$$



De esta manera la impedancia es una generalización del concepto de resistencia, cuyo caso particular es la relación entre potencial y corriente directos ($\omega \rightarrow 0$). Dado que usualmente se trabaja con funciones periódicas de $E(\omega)$ e $I(\omega)$ tales como seno y coseno, éstos pueden ser considerados como vectores. Por lo tanto la impedancia, el cociente de estas funciones, es también un vector y puede expresarse tanto en coordenadas cartesianas como en coordenadas polares. En el primer caso la impedancia se expresa, utilizando la nomenclatura de los números complejos, como:

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + jZ''(\omega) \quad (4)$$

Donde Z' y Z'' son respectivamente la componente real y la componente imaginaria de la impedancia y j es el número imaginario. En el segundo caso la impedancia queda definida por el módulo $|Z(\omega)|$ y el ángulo de fase $\theta(\omega)$:

$$|Z(\omega)| = ([Z'(\omega)]^2 + [Z''(\omega)]^2)^{1/2} \quad (5)$$

$$\theta(\omega) = \arctan \frac{Z''(\omega)}{Z'(\omega)} \quad (6)$$

Las representaciones gráficas (Figura 1.1) de los datos de impedancia más usadas se basan en estas definiciones. El diagrama de Nyquist, diagrama de Argand, o diagrama complejo es una representación de la componente imaginaria vs. la componente real. Este diagrama tiene la ventaja de presentar un panorama global del comportamiento de la impedancia y de resaltar el proceso predominante. Sin embargo, presenta la desventaja de no incluir explícitamente la dependencia con la frecuencia, y de ocultar a simple vista los procesos no predominantes en la impedancia (y que pueden ser importantes en el desarrollo del proceso global). El diagrama de Bode es la representación del módulo o el ángulo de fase en función de la frecuencia. En este diagrama se encuentra explícita la dependencia del módulo o el ángulo con la frecuencia, además de que los procesos que contribuyen poco a la

impedancia también pueden ser discernibles. Es por eso que su uso es más recomendado que los diagramas de Nyquist . No obstante, el uso de ambos es una buena medida para probar la coherencia de los datos y revelar errores experimentales.

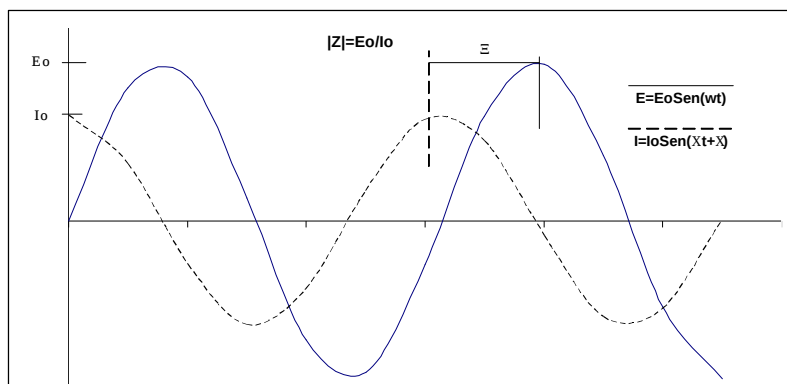


Figura i. Representación de las señales de perturbación y respuesta en función del tiempo en un experimento de impedancia. (Mc. Donald ,1980)

III) Impedancia como función de transferencia.

Un acercamiento distinto al manejado anteriormente considera a la impedancia como una “función de transferencia”. Este es un término adoptado de los estudios de sistemas dinámicos lineales, de acuerdo con Zill (1997), y que define a la función de transferencia como la razón de la respuesta de un sistema lineal a una perturbación aplicada al mismo:

$$W(s) = Y(s) / G(s) \quad (7)$$

Donde $W(s)$ es la función de transferencia, $Y(s)$ es la respuesta del sistema a la perturbación aplicada $G(s)$, y s es la variable de Laplace, idéntica a $j\omega$ si se trabaja en el dominio de frecuencias. Así, para el caso de un sistema electroquímico controlado



en modo galvanostático, sobre el cual se aplica una perturbación periódica de corriente $I(\omega)$, se obtendrá una respuesta en potencial $E(\omega)$ también periódica y a la misma frecuencia, por lo que la función de transferencia será idéntica a la impedancia:

$$W(s) = E(\omega) / I(\omega) \equiv Z(\omega) \quad (8)$$

En el caso de que el sistema se controle en modo potencioestático, la perturbación se aplica sobre el potencial y se mide la respuesta en corriente, por lo que la función de transferencia será ahora idéntica a la admitancia $Y(\omega)$:

$$W(s) = I(\omega) / E(\omega) \equiv Y(\omega) \quad (9)$$

Hay que remarcar que en el desarrollo formal de estas expresiones se encuentra implícita la condición de que el comportamiento del sistema puede ser representado con una ecuación diferencial lineal ordinaria de coeficientes constantes. De ahí que para cumplir esta condición en los sistemas electroquímicos (fuertemente no lineales) se requiere aplicar en general perturbaciones pequeñas de potencial o corriente. Siguiendo en el contexto de la impedancia como una relación respuesta/perturbación, si la perturbación es periódica con amplitud $|\Delta I|$ y frecuencia ω , la respuesta a esta perturbación también será periódica, a la misma frecuencia ω pero de amplitud $|\Delta E|$. En estas condiciones se puede demostrar que su módulo está dado por la ecuación (10) y su ángulo fase es el desfase entre la respuesta y la perturbación.

$$|Z| = |\Delta E / \Delta I| \quad (10)$$

Actualmente existen dos aproximaciones al estudio de sistemas electroquímicos mediante la técnica de impedancia: En una se analiza la respuesta de impedancia a



través de modelos basados en ecuaciones cinéticas y termodinámicas adecuadas al proceso estudiado y en la otra se emplean circuitos eléctricos equivalentes más o menos empíricos como modelos de ajuste de los medidas de impedancia.

IV) Representaciones gráficas de las medidas de impedancia.

Una forma de obtener rápidamente información de las medidas de impedancia, así como de presentar una idea general del comportamiento del sistema en estudio, se hace con las representaciones gráficas de estas medidas, es decir, los espectros de impedancia. Existen varias representaciones de cantidades relacionadas con la impedancia en un intervalo de frecuencias, y su uso se determina de acuerdo a la información que se necesita obtener del espectro y el campo de aplicación en que se utilice. Para los sistemas electroquímicos han sido empleados principalmente dos representaciones: El diagrama de Nyquist y el diagrama de Bode. Menos frecuente, pero también utilizada es la representación de los datos en el plano complejo de la admitancia. Los diagramas mencionados aprovechan la característica de considerar a la impedancia como un vector, por lo que puede manejarse como un número complejo con componente real e imaginaria, o ser descrito con un módulo y un ángulo de fase.

$$\bar{Z} = Z' + iZ'' = |Z| (\cos q + i \sin q) \quad (11)$$

V) Diagrama de Nyquist.

Consiste en la presentación de los datos de impedancia en un plano complejo, con su componente real (Z') a lo largo del eje X y su componente imaginaria (Z'') sobre el eje Y. (Figura ii)

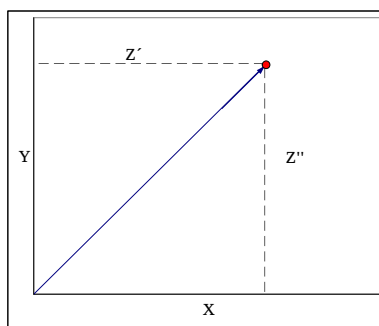


Figura ii. Representación vectorial de la impedancia. (Mc. Donald ,1980)

La utilidad de esta representación estriba en que presenta un estado global del comportamiento del sistema, con lo que se puede visualizar rápidamente en qué tipo de arreglo se encuentran los elementos eléctricos que se pueden asociar a dicho comportamiento, y cuáles de estos elementos predominan en una región dada del espectro. También se pueden estimar directamente, aunque de manera aproximada, las magnitudes de los elementos resistivos.

VI) Elementos Presentes en un diagrama De Nyquist.

Resistor.- En el caso de un resistor, la expresión de impedancia no depende de la frecuencia, por lo que sólo se observa un punto en el diagrama de Nyquist, con su componente real igual al valor del resistor y su componente imaginaria igual a cero. (Fig. iii)

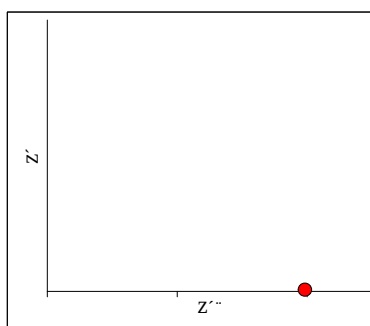


Figura iii. Diagrama de Nyquist para un resistor ideal. (Mc. Donald ,1980)

Capacitor.- Para un capacitor, el diagrama de Nyquist es una recta paralela al eje de la componente imaginaria (Z'') y con su componente real (Z') igual a cero. Las Z'' para un capacitor son valores negativos. Sin embargo, debido a que en electroquímica gran parte de los sistemas presentan comportamientos capacitivos, es de uso común tomar dichos valores sobre el sentido positivo del eje imaginario, a efecto de obtener la representación en el primer cuadrante del plano cartesiano. (Fig. iv)

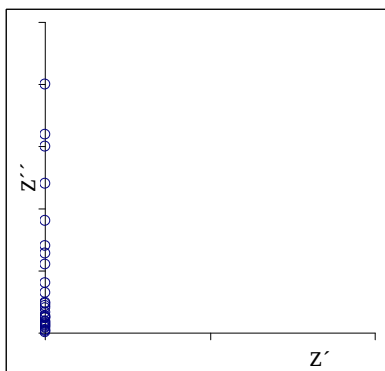


Figura iv. Diagrama de Nyquist para un capacitor ideal. (Mc. Donald ,1980)

Inductor.- Para un inductor la gráfica es similar a la del capacitor, pero en este caso la componente imaginaria es positiva, por lo que los valores se dispersan en el sentido negativo de las ordenadas (debido a la convención de signo adoptada). Aquí la componente real es cero y se observa que Z'' tiende a ∞ . Una de las desventajas que presenta el diagrama de Nyquist consiste en que la frecuencia no se muestra de manera explícita, por lo que es difícil a veces reconocer por ejemplo variaciones en los comportamientos capacitivos. Por otra parte, debido a que los intervalos de los valores de impedancia en el espectro son frecuentemente de varios órdenes de magnitud y las escalas de los ejes son lineales, es muy fácil que los fenómenos que predominan en intervalos con valores de pequeña magnitud, se encuentren parcial o

completamente opacados por aquellos fenómenos que producen impedancias grandes. (Fig. v)

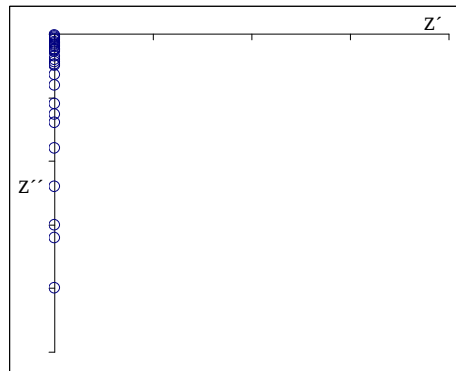


Figura v. Diagrama de Nyquist para un inductor ideal. (Mc. Donald ,1980)