

MORFOLOGÍA DE UN ACERO API 5L EXPUESTO A CULTIVOS BACTERIANOS AERÓBICOS

A. De Sisto^a, Z. Duque^{b*}, D. García^{a,b}, L. Naranjo Briceño^a

^a Área de Energía y Ambiente. Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas, Venezuela.

^b Unidad de Investigación y Desarrollo Biodeterioro Industrial. Fundación Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT), Maracaibo, Venezuela.

*Autor de correspondencia, E-mail: zduque@inzit.gob.ve, phone/ Fax. +58 2617915371

Recibido: Octubre 2013. Aprobado: Febrero 2013.

Publicado: Abril 2013.

RESUMEN

La corrosión bacteriana es un problema reconocido mundialmente que afecta diferentes industrias. Se ha estimado que el 40% del daño interno en tuberías de distribución en la industria petrolera se atribuye a la corrosión inducida microbiológicamente. Sin embargo, los esfuerzos científicos para su abordaje se han centrado principalmente en la corrosión anaeróbica inducida por bacterias reductoras de sulfato y se han descrito pocos avances relacionados con la corrosión por microorganismos aeróbicos. En este trabajo, se evaluaron dos cepas bacterianas aeróbicas aisladas de un sistema de distribución de diluyente de crudo, en una operadora petrolera venezolana con daños de corrosión mediante Microscopía Electrónica de Barrido, con la finalidad de determinar sus características morfológicas y su posible potencial corrosivo sobre un acero API 5L. Los análisis morfológicos permitieron discriminar que las dos cepas bacterianas poseen morfotipos diferentes (coco y bacilo). La cuantificación por microscopía de epifluorescencia reveló el mismo valor de densidad celular sésil para ambas cepas. Los análisis morfológicos, también permitieron detectar efectos opuestos producidos por las cepas bacterianas sobre la superficie metálica: la cepa con morfología tipo bacilo generó un efecto protector mientras que la cepa con morfología tipo coco no inhibió la corrosión, por el contrario, en presencia o ausencia de esta bacteria, se evidenciaron las mismas características de corrosión localizada (picaduras) obtenidas en el control, lo cual sugiere una prevalencia de corrosión abiótica en las condiciones estudiadas.

Palabras claves: MIC; bioprotección; acero al carbono; picaduras; MEB.

MORPHOLOGY OF AN API 5L STEEL EXPOSED TO AEROBIC BACTERIAL CULTURE

ABSTRACT

Bacterial corrosion is recognized as a worldwide problem that affects different industries. In oil industries, 40% of the internal damage in transporting pipeline distribution is attributed to microbially-induced corrosion. Several studies have been focused on anaerobic corrosion influenced by sulfate-reducing bacteria and few advances related to the MIC by aerobic microorganisms have been described. In this study, two aerobic bacterial strains isolated from naphtha distribution system of Venezuelan Oil Industries with corrosion damage were tested using Scanning Electron Microscope in order to determine their morphological characteristics and their possible corrosivity on coupons steel surfaces API 5L. Morphological analysis allowed to discriminate that bacterial strains have different morphotypes (cocco and bacilli). The fluorescence microscopy quantification revealed the same sessile cell density values for the both strains. MEB analysis on the metal surface allowed to detect opposed effect produced by the bacterial strains: bacilli type strain generated a protective effect while the cocco type strain did not inhibit corrosion. Instead, in the presence or absence of the cocco type strain, localized corrosion (pitting) like control were obtained, suggesting the prevalence of abiotic corrosion in the condition studied. The results obtained are discussed.

Keywords: MIC; bioprotection; carbon steel; pitting; MEB.

INTRODUCCIÓN

La corrosión inducida por microorganismos (MIC, por sus siglas en inglés *Microbiologically Influenced Corrosion*) es definida como el deterioro acelerado de un metal debido a la actividad microbiana [1]. Aproximadamente

dos mil millones de dólares anuales representa el costo de la MIC asociado a la industria petrolera. Reparaciones y paradas de plantas, remplazos de equipos y extensiones de tuberías corroídas, aunado a la contaminación ambiental, constituyen algunos de los problemas que

ocasionan los microorganismos, correspondiéndole el 40% de la corrosión interna en las líneas de distribución de crudo [2]. Diferentes grupos de bacterias, desde las reductoras de sulfato (SRB, por sus siglas en inglés *Sulphate Reducing Bacteria*), aeróbicas, productoras de ácidos, formadoras de limo y hongos han sido objeto de estudio por estar involucrados en la inducción de daños localizados en estructuras metálicas [3]. Estos daños se producen cuando los microorganismos generan productos metabólicos que afectan el medio circundante a la interface metal-solución y se incrementa por la acción sinérgica de diferentes microorganismos [4].

Es importante resaltar, que la presencia de microorganismos en un sistema no implica que estén involucrados a problemas de corrosión. Para que esta ocurra, deben existir por lo menos 4 factores: a) la presencia de microorganismos o sus productos; b) la morfología de daño característico y; c) los productos y depósitos de corrosión específicos y condiciones ambientales compatibles [5].

El factor clave que genera alteraciones en la superficie metálica y que puede incrementar o retardar la MIC es la biopelícula, la cual se define como la interface bioorgánica entre el sustrato (metálico o no metálico) y el medio, donde las células microbianas se encuentran aglomeradas sobre las superficies por fuerzas electrostáticas y/o por sustancias extracelulares poliméricas que le facilitan la adherencia, quedando entramadas con productos de corrosión y/o precipitados inorgánicos y orgánicos [6].

Para mitigar el bioensuciamiento y la MIC en sistemas de distribución construidos con acero; se han desarrollado diferentes técnicas, tales como tratamientos químicos y protección catódica. Sin embargo, además de ser costosos para la industria, los biocidas pueden producir efectos dañinos al ambiente, a la vida humana y, en algunos

casos, pueden generar corrosión de algunos metales. Adicionalmente, estos compuestos químicos no atacan eficientemente las bacterias que conforman las biopelículas ya que, a diferencia de sus homologas las planctónicas, las sésiles presentan características fisiológicas diferentes, tales como: a) resistencia incrementada frente a los agentes químicos; b) alta producción de exopolisacáridos; c) cambios en la morfología celular (dado que generan diferentes respuestas a los estímulos ambientales) y; d) un perfil de expresión genética diferencial [7].

El concepto original de bioprotección de la corrosión en sistemas de distribución de agua fue presentado inicialmente por Potekhina y colaboradores (1985). Videla y Characklis (1992) definieron la bioprotección a la relación entre los múltiples mecanismos metal-biota-electrolito que ocasionan un efecto sinérgico en la inhibición de la corrosión [9]. Diferentes investigaciones han evidenciado que las biopelículas también pueden inhibir la corrosión de diversos materiales, entre los que se encuentran el acero al carbono [10]. La inhibición puede estar asociada a diferentes mecanismos metabólicos dados por: 1) la formación de barreras que impiden o reducen el contacto de agentes corrosivos (Ej. oxígeno, iones cloruros) con la superficie metálica; 2) la disminución de la concentración del agente corrosivo que reacciona con el metal; 3) la generación de productos metabólicos que actúan como inhibidores de corrosión (Sideroforos) y; 4) la producción de productos antibacterianos que controlan la proliferación de diferentes microorganismos.

Algunos grupos bacterianos, entre ellos el género *Bacillus* (genera biopelículas), son capaces de producir compuestos antimicrobianos que inhiben el desarrollo de algunas cepas de SRB sobre superficies metálicas. Destacan el *B. brevis* productor de gramicidina S, *B. polymyxa* que produce polimicina y *B. subtilis* ATCC

6633 que sintetiza el antibiótico subtilin [11-14]. Otro género que ha sido reportado en la literatura como inhibidor de la corrosión en acero, es el *Staphylococcus*. En este caso, el mecanismo de inhibición está asociado a la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés *Extracellular Polymeric Substances*) que protegen la superficie metálica [15- 17]. También destacan las bacterias *Serratia marcescens* (ASTM 90) [14], *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. [18-20] como microorganismos inhibidores de la corrosión en diferentes materiales metálicos.

Para estudiar la MIC, se han utilizado diferentes técnicas, entre ellas, la microscopía electrónica de barrido (MEB) El objetivo de este trabajo fue utilizar MEB para discriminar las características morfológicas de dos cepas bacterianas aeróbicas aisladas de un sistema de distribución de diluyente con daños localizados, y determinar si morfológicamente evidencian influencia corrosiva sobre el acero al carbono, bajo las condiciones experimentales ensayadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas y medio de cultivo

Las cepas bacterianas aeróbicas evaluadas fueron aisladas de muestras de nafta recolectada a la salida del tanque de almacenamiento de una empresa mixta petrolera venezolana (Estado Anzoátegui, Venezuela). Las cuales previamente fueron caracterizadas bioquímicamente e identificadas molecularmente por De Sisto y colaboradores 2012 (en evaluación) como: *Bacillus pumilus* (cepa M4-1) y *Staphylococcus* sp. (cepa M4-9.1). Dichas bacterias se encuentran preservadas en el Banco de Microorganismos del Área de Energía y Ambiente del IDEA bajo los números M4-1 y M4-9.1, respectivamente. Para el crecimiento bacteriano se utilizó medio líquido de cultivo heterotrófico Luria Bertani modificado (LB, peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L. pH 7,0). Las cepas bacterianas se

evaluaron morfológicamente utilizando MEB en modo bajo vacío.

Preparación de cupones de acero al carbono

De una sección de tubería de acero al carbono API 5L, se cortaron cupones, se embebieron en resina epoxi, dejando un área expuesta de 1 cm², se prepararon superficialmente con papel de carburo de silicio No. 600. Posteriormente, fueron inmersos en etanol absoluto en un baño de ultrasonido durante 5 minutos, extraídos y colocados en una cabina de bioseguridad clase II, dejándolos un mínimo de 4 horas de exposición a luz ultravioleta (265 nm) para garantizar la esterilidad de los mismos.

Diseño del experimento

Para promover el crecimiento de las cepas bacterianas sobre los cupones, estos se colocaron, bajo condiciones de asepsia, en viales de 10 mL conteniendo 2,5 mL de medio LB estéril + 2,5 mL de nafta estéril. Los viales se clasificaron en: grupo estéril como control con cupones inmersos en medio LB+nafta sin inóculo. El otro grupo de viales con cupones se inóculo al 10 % del volumen total (5 mL). Para ello, se utilizó un inóculo con la población celular tomada en fase exponencial temprana, previa determinación de las curvas de crecimiento poblacional planctónica. Correspondiendo 0,37 y 0,69 de absorbancia, para M4-1 y M4-9.1, respectivamente. Los cupones se colocaron por triplicado en viales independientes, se incubaron a 30 °C y se removieron a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas de haber iniciado el experimento.

Evaluación de los cupones en condiciones aeróbicas

Al finalizar cada tiempo de evaluación los cupones se procesaron en condiciones de esterilidad, según la evaluación correspondiente:

1) Cuantificación de la población sétil viable. Para ello, se extrajeron los cupones y se colocaron individualmente

en 15 mL de solución tampón (PBS, del inglés *Phosphate buffered saline*), para el lavado de plantónicas presentes por efecto de mojado. Inmediatamente el cupón se colocó en otro recipiente con 90 mL del mismo tampón y fue sometido a sonicación. Este paso se realizó con parámetros de operación del equipo Cole Parmer Ultrasonic Processor [5] ajustado para mantener las células viables. Las células sésiles extraídas se preservaron en un tubo eppendorf con 500 μ L de glicerol y almacenadas a -20 $^{\circ}$ C hasta su cuantificación. Para ello, se utilizó la tinción BacLight LIVE/DEAD viability kit (Molecular Probes Inc.) y un microscopio de epifluorescencia modelo Leica DM2500M (Leica Microsystems GmbH) con filtros de luz de longitud de onda de 480 y 550 nm y magnificación de 100X.

2) Evaluación de la biopelícula/producto de corrosión mediante MEB. Para ello, los cupones destinados a esta evaluación se extrajeron asépticamente del vial, se sumergieron inicialmente en agua estéril e inmediatamente se sumergieron en glutaraldehído al 2,5 % con buffer cacodilato a pH 7,4. Finalmente, se preservaron a 4 $^{\circ}$ C hasta realizar las observaciones utilizando un FE Quanta 200 en modo de bajo vacío (90-130 Pa) y potencial de aceleración entre 5-10 kV. Así mismo en conjunto con las observaciones se aplicó Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS por sus siglas en inglés *Energy Dispersive Spectroscopy*).

3) Evaluación de los posibles daños sobre la superficie. Para ello, se realizó la remoción de los productos de corrosión siguiendo la norma ASTM G1-03. Posteriormente se observaron por MEB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica y crecimiento poblacional sésil de las cepas en estudio

La evaluación morfológica del cultivo axénico de las cepas bacterianas aeróbicas, utilizando MEB, permitió diferenciar dos morfotipos: uno tipo bacilo y otro tipo

coco para las cepas M4-1 y M4-9.1, respectivamente, tal como se observa en las Figuras 1 y 2.

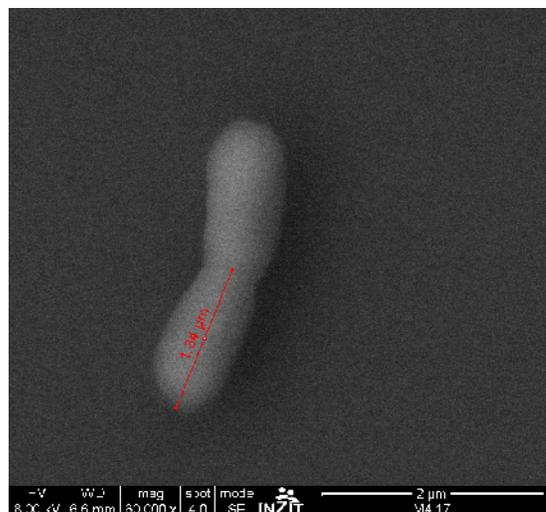


Fig. 1. Micrografía de cepa M4-1. Nótese la longitud celular de 1,34 μ m.

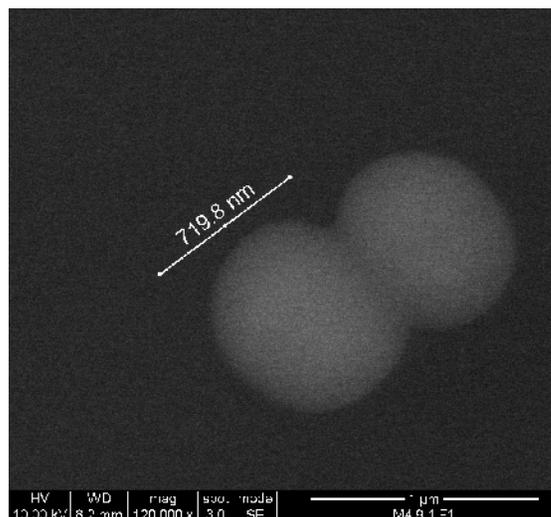


Fig. 2. Micrografía de la cepa M4-9.1. Nótese la dimensión celular 719,8 nm.

Como parte de las evaluaciones, se llevó a cabo la cuantificación poblacional sobre los cupones confirmando el desarrollo de aglomeraciones celulares (Biopelículas). La estimación de la densidad celular sésil, registró el crecimiento poblacional durante los 7 días (168 h) de evaluación. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.

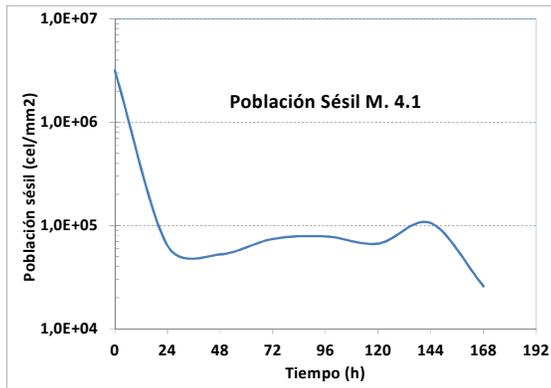


Fig. 3. Crecimiento Población sésil de M4-1

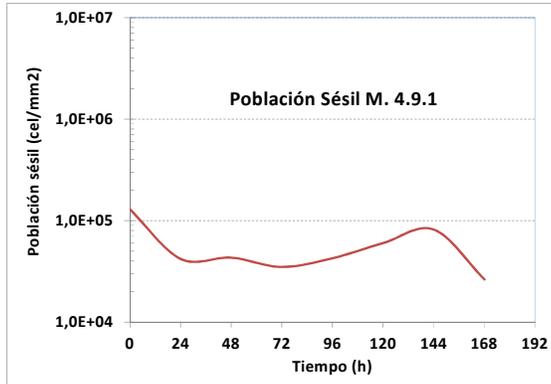


Fig. 4. Crecimiento Población sésil de M4-9.1

El crecimiento poblacional sésil presentado anteriormente indica que se desarrollaron células en los cupones de acero en un orden de 10^4 , registrándose un máximo celular a los 6 días (144 h), tiempo en el cual se observó un equilibrio poblacional con una marcada disminución celular a los 7 días (168 h), en ambas cepas. Esta disminución de la población pudiera asociarse al agotamiento de nutrientes (por ser un sistema cerrado), pero también pudiera atribuirse al agotamiento paulatino de oxígeno necesario en la respiración tanto de la población planctónica como la de la sésil.

Morfología de biopelículas y/o productos de corrosión

La evidencia morfológica del crecimiento poblacional, de ambas cepas es compleja, dado lo activo del acero API 5L, se observan productos de corrosión y diferentes capas de conformación del mismo con algunos indicios celulares o de aglomeraciones bioorgánicas, tal como se puede observar en las micrografías obtenidas por MEB, presentadas en las Figura 5 hasta la 11.

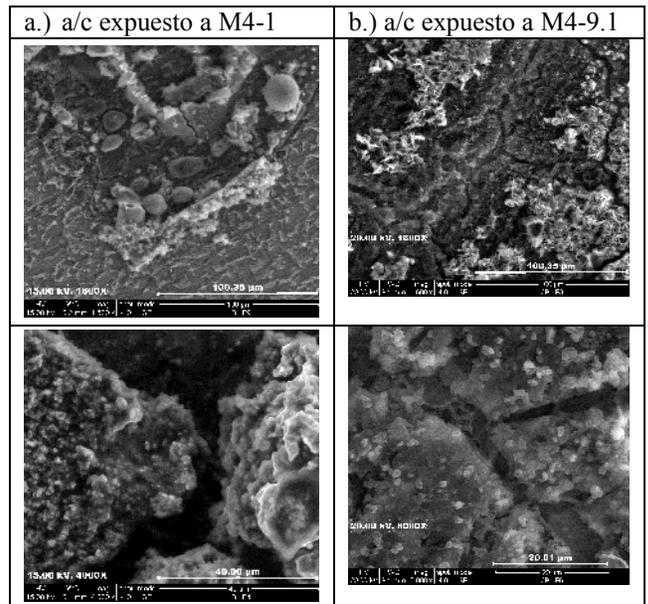


Fig. 5. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 1 día a los medios inoculados.

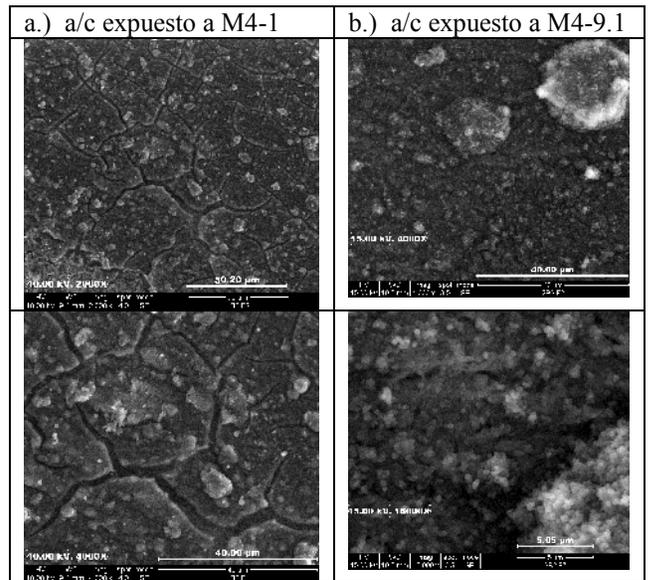


Fig. 6. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 2 días a los medios inoculados.

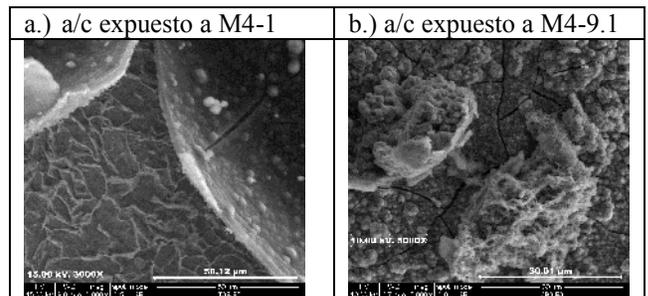


Fig. 7. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 3 días a los medios inoculados..

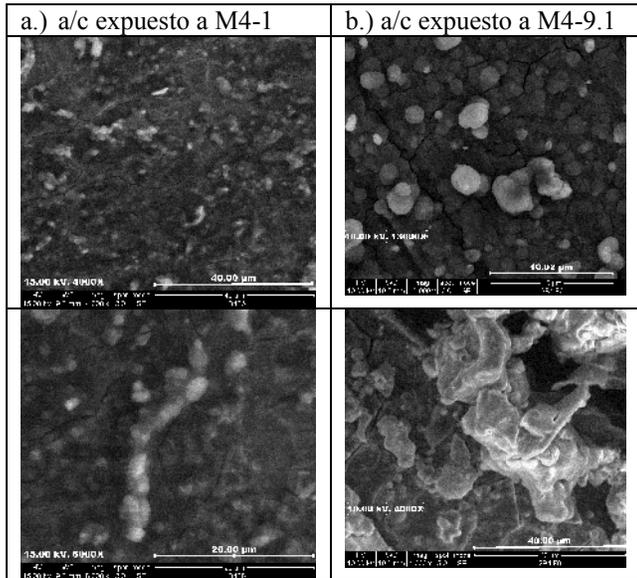


Fig. 8. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 4 días a los medios inoculados.

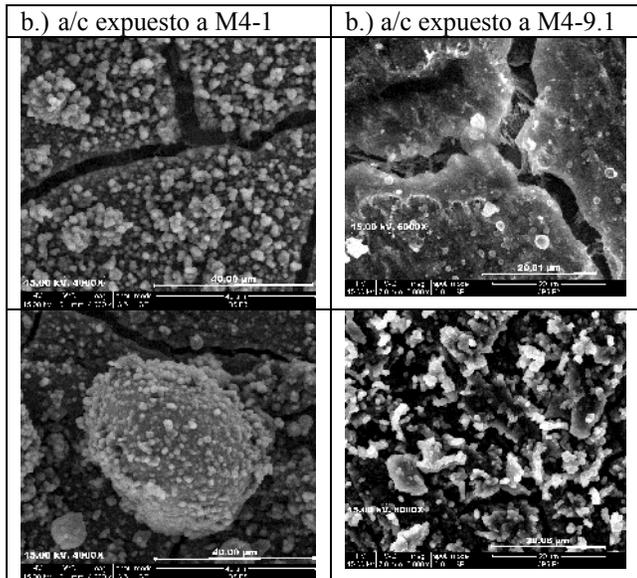


Fig. 9. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 5 días a los medios inoculados.

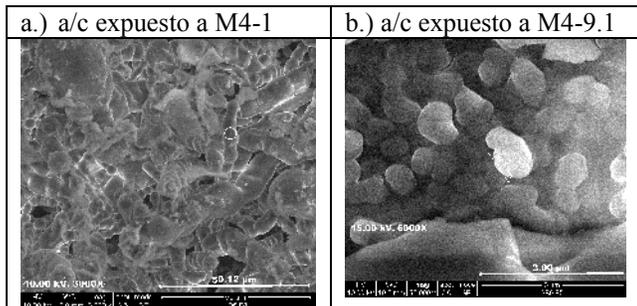


Fig. 10. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 6 días a los medios inoculados.

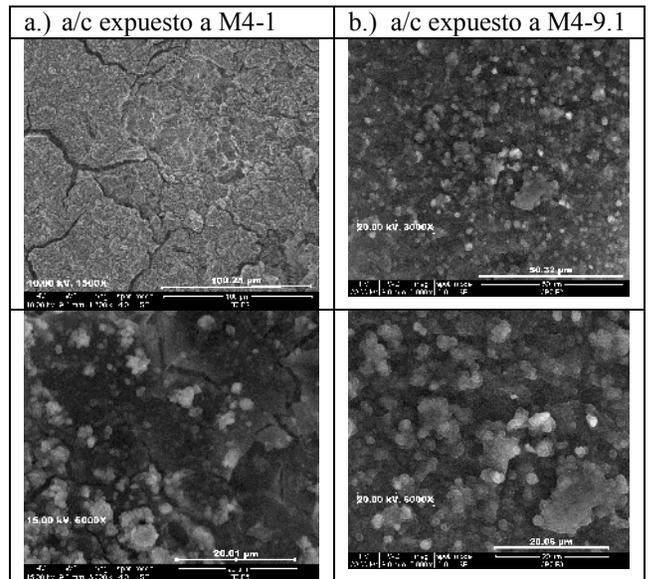


Fig. 11. Micrografías de acero al carbono expuesto durante 7 días a los medios inoculados.

En las micrografías anteriores puede observarse que ya a las 24 h se forman aglomeraciones heterogéneas, que permanecen a lo largo del tiempo, siendo complejo poder observar en todas las micrografías células bacterianas bien diferenciadas de los productos de corrosión, observándose varios estratos de los mismos.

La Figura 12 y 13, corresponden a los microanálisis químico por EDS, donde se evidencia la química elemental de los productos de corrosión en medio aeróbico.

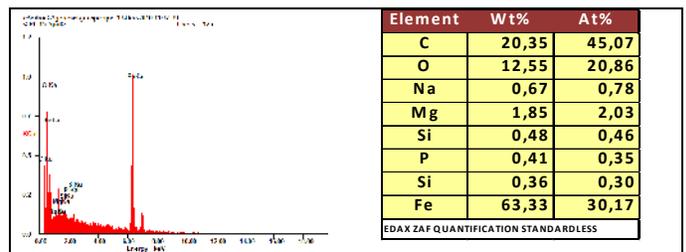


Fig. 12. MEB-EDS de productos desarrollados en el a/c expuesto 1 día a medio inoculado con la Cepa M4-1

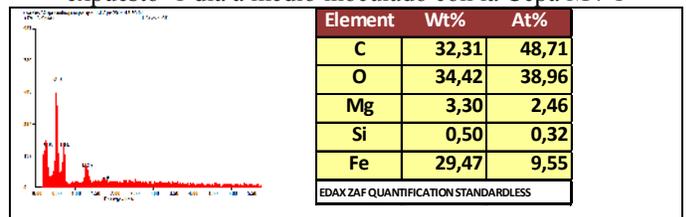


Fig. 13. MEB-EDS de productos desarrollados en el a/c expuesto 1 día a medio inoculado con la Cepa M9-4.1

Los microanálisis químicos por EDS evidencian la presencia de oxígeno, asociado a formaciones de óxidos y heterogeneidad de los mismos en donde el carbono indica presencia bioorgánica, como parte de la dinámica interfacial que se generó en el sustrato metálico con el medio en las primeras 24 h.

Morfología del daño sobre el acero al carbono expuesto a los cultivos bacterianos

En este punto, es importante visualizar como era la superficie de los cupones de acero API 5L antes de exponerla a la condición biótica o abiótica, es decir, en presencia o ausencia de las cepas bacterianas. En la Figura 14 se observa el patrón lineal del desbaste propio de la preparación superficial realizada a los cupones.

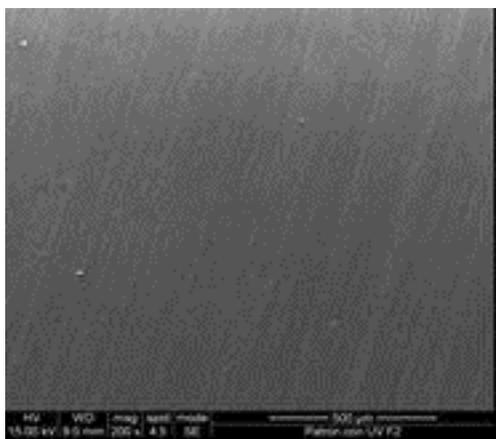


Fig. 14. Micrografía del acero al carbono antes de ser expuesto a los medios de estudio. 200X.

Todas las micrografías anteriores del acero API 5L expuesto en los medios inoculados evidenciaron interfaces bioorgánicas y actividad corrosiva. Sin embargo, las superficies decapadas son la que corroboran si estas actividades ejercieron alguna influencia corrosiva significativa sobre el material. Tal como se puede observar en las micrografías presentadas en la Figura 15, las cuales muestran en detalle la incidencia de las cepas

bacterianas estudiadas sobre la superficie metálica de cupones inmersos durante 1, 3, 5 y 7 días.

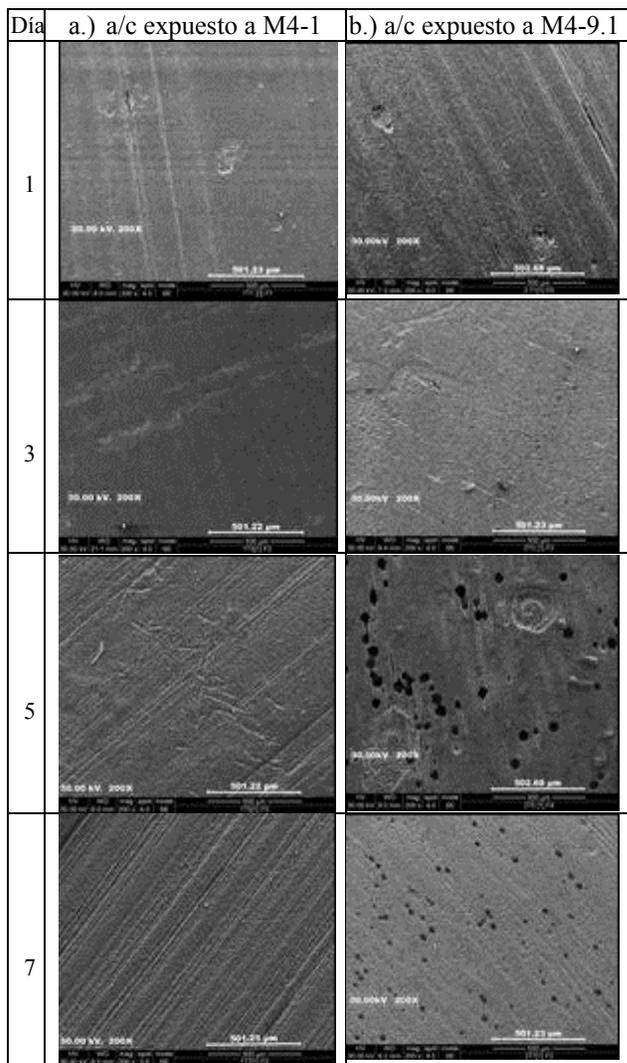


Fig. 15. Micrografías de los cupones de acero al carbono decapado, luego de estar expuesto a cepas aeróbicas (condición biótica), en diferentes días de inmersión. 200X.

En las Micrografías del acero decapado puede observarse dos tipos de daños localizados: a) depresiones poco profundas, heterogéneas, con muy escasa presencia. b) significativos daños localizados, bien definidos geoméricamente de menor diámetro y profundos (picaduras) con amplia densidad superficial, a medida que incrementa el tiempo de exposición. La morfología

que prevalece en los cupones expuestos a la cepa M4-1 (*Bacillus pumilus*) fue de insignificante daño superficial. En cambio los de diámetros menores y geometría definida y severa dominaron en los cupones expuestos a la cepa M4-9.1. (*Staphylococcus* sp.). Para diferenciar ambos daños, se debe observar las micrografías de los cupones Patrón (control) expuestos a medio LB+nafta sin inoculo bacteriano en los tiempos estudiados (Figura 16).

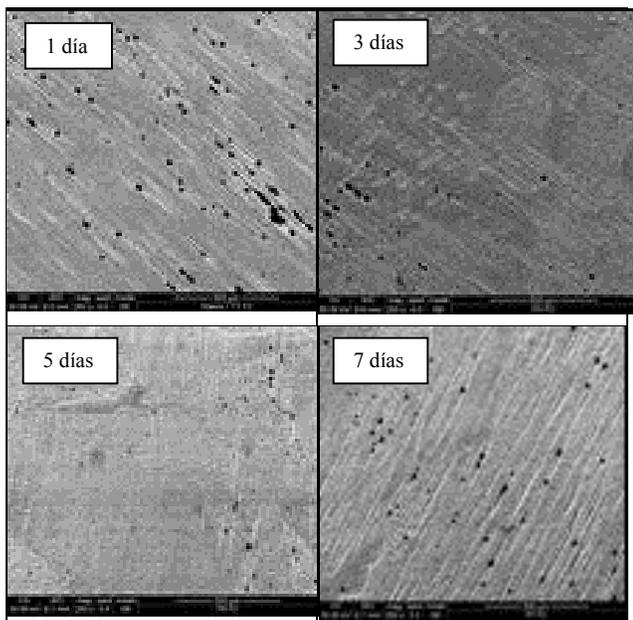
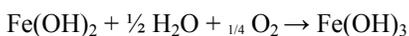
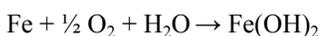
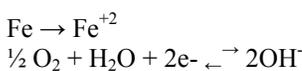
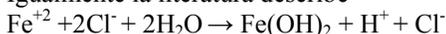


Fig. 16. Micrografías de acero expuesto a medio estéril (condiciones abióticas). 200X.

Las micrografías obtenidas en condiciones abióticas pueden asociarse a la actividad del acero API 5L, activo superficialmente y expuesto en un medio aeróbico, por principio termodinámico, tenderá a un equilibrio con el oxígeno presente, tal como se establece convencionalmente en las reacciones de corrosión:



Igualmente la literatura describe



Tal como lo expresan las reacciones anteriores, en las condiciones abiótica con oxígeno, se activa un proceso

oxido/redox que genera diferentes productos de corrosión, cuyos diferenciales de aireación y en presencia de cloruros se forma un ciclo continuo de daños puntuales y desarrollo de las picaduras [5]. Así mismo se puede plantear la posible conformación de celdas de concentración, en una etapa inicial, por los constituyentes proteicos del medio. Los complejos proteicos, son descritos como compuestos globulares, hipotéticamente la deposición aleatoria de microparticulados de éstos, pudo haber generado reacciones locales formando micro cátodos y micro ánodos en la micropila, los cuales pudieran verse afianzado por la presencia de iones cloruros en el medio de cultivo LB (5000 mg/L).

Para este proceso abiótico, mucho se ha descrito en la literatura en relación a las picaduras en medio aireado con presencia de iones cloruros. Destacan las investigaciones de Medina y colaboradores en el año 2009, reportaron resultados similares en las mismas condiciones experimentales, pero utilizando el medio de cultivo NACE. Dichos autores concluyeron que los daños observados en las superficies expuestas al medio de cultivo fueron debido a la formación de una capa protectora en la superficie en los primeros días de exposición que, conforme aumento en el tiempo aunado a la presencia de iones cloruros, se rompió y ocasiono picaduras [4]. Sin embargo, este mecanismo no es suficiente para explicar lo evidenciado en los cupones del presente trabajo.

Por lo tanto, bajo la premisa de la influencia del medio heterotrófico LB en condiciones aeróbicas en la formación de picaduras sobre la superficie del metal, se puede sugerir que la actividad metabólica de la bacteria *Bacillus pumilus* (M4-1) mostró un efecto protector ante los agentes agresivos del medio (iones cloruro y oxígeno) en las condiciones estudiadas. Cabe destacar, que Ornek y colaboradores 2002, obtuvieron resultados similares de inhibición de la corrosión sobre aluminio 2024 mediado

por cepas del género *Bacillus* [18]. Entre los posibles mecanismo de bioprotección, destaca la disminución del agente oxidante, en este caso el oxígeno, usado para la respiración aeróbica, metabolismo continuo de la célula, vía fosforilación oxidativa para su desarrollo y generación de energía vía ATP. En este sentido, es de esperarse que la disminución de oxígeno va a estar controlada por la respiración bacteriana (planctónica y sésil), además del consumido por las reacciones oxido/redox.

En relación a los daños observados en la superficie metálica en presencia de la cepa *Staphylococcus* sp. (M4-9.1), llama la atención la similitud con los daños que presentan los cupones patrones expuestos solo al medio abiótico (control). Los resultados obtenidos con esta cepa en particular difieren con los hallazgos encontrados por Ponmariappan y colaboradores 2004, donde reportan la inhibición de la corrosión de acero dulce por una cepa de *Staphylococcus* sp [15]. Así mismo, no son coincidentes con los hallazgos evidenciados en este estudio. Existen patrones disímiles de comportamientos de las diversas cepas del género *Staphylococcus* reportadas, por lo que se sugiere profundizar las investigaciones e identificar a nivel de especie dichas cepas y discriminarlas según su incidencia sobre superficies metálicas.

Si tomamos en cuenta que *Staphylococcus* sp. también posee metabolismo aeróbico y que estuvo expuesto a las mismas condiciones de cultivo que *Bacillus pumilus*, surge la interrogante si será que esta bacteria utiliza menos oxígeno que el *Bacillus*, puesto que este último tiene una longitud y área dos veces mayor (Figuras 1 y 2). Dada que las concentraciones se encontraban en el mismo orden exponencial 10^4 . De allí, el oxígeno como agente oxidante interactúa en las reacciones oxido-redox, acentuándose los daños en los diferenciales de aireación que se generan por los diferentes extractos y productos de corrosión [5].

Los resultados obtenidos en trabajos de esta naturaleza contribuyen decididamente a la toma de decisiones por parte de los operadores petroleros, para el control, funcionamiento adecuado y mantenimiento de los sistemas de almacenamiento y distribución de nafta y crudo diluido en las empresas petroleras venezolanas, las cuales tienden a presentar niveles de criticidad importantes inducida por la corrosión microbiológicamente activa y la presencia de elementos abióticos, que producen severos daños sobre las estructuras metálicas. En este sentido, se plantean dos estrategias para contribuir al control de los procesos de biocorrosión: a) evitar la presencia de la aireación (presencia de oxígeno) en los sistemas y/o; b) profundizar el estudio de microorganismos candidatos con la finalidad de emplearlos como biocontroladores para la inhibición de la corrosión, bien sea mediante procesos de bioaugmentación o bioestimulación.

CONCLUSIONES

El MEB es una herramienta de gran relevancia que permitió establecer diferencias morfológicas entre las cepas bacterianas objeto de estudio, así como determinar su incidencia sobre el acero API 5L. La cepa *Bacillus pumilus* (M41) mostró un efecto protector ante los agentes agresivos presentes en las condiciones de cultivo empleadas (iones cloruro y oxígeno), mientras que la cepa *Staphylococcus* sp. (M4 9.1) no generó ningún daño significativo u efecto protector sobre la superficie del metal. Se concluye que las picaduras observadas sobre la superficie metálica del acero al carbono API 5L son producto de un proceso abiótico en las condiciones experimentales estudiadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la valiosa colaboración del Lic. Eric Plaza, como operador del MEB, del Instituto Zuliano de Investigaciones tecnológicas (INZIT). El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto del

Área de Energía y Ambiente del IDEA titulado: Detección y control de la biocorrosión en líneas de distribución de diluyente y crudo diluido de operadoras petroleras: *Aplicación de herramientas metagenómicas*.

REFERENCIAS

- [1] Beech I.B., Sonner J. (2004). "Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals". *Curr.Opin.Biotechnol.* 15: 181-186.
- [2] NACE. (1994). *Field Monitoring of Bacterial growth in Oilfield Systems*. Houston. Nace International Press. pp. 3-7.
- [3] Rajasekar A., Ponmariappan S., Maruthamuthu S., Palaniswamy N. (2007). "Bacterial degradation and Corrosion of Naphtha in transporting pipeline". *Curr.Microbiol.* 55: 374-381.
- [4] Medina O., Prado A., Armendariz V.H., Franssens R. (2009). "Microbiological Corrosion in low Carbon steel". *Ing.Invest.Tecnol.* 1: 1-14.
- [5] Herro, H.M. "MICMYTHS-DOES PITTING CAUSE MIC?. (1998). Corrosion 98. Paper No.278.
- [6] Vargas A., Duque Z. (2007). "Sonication parameters for detachment and study of biocorrosion's biofilms". *Rev. Tec. Ing.Univ.Zulia.* 30: 216-224.
- [7] Siu. (2004). "Corrosion Industrial". *Sociedad Latinoamericana de Ingeniería Química.* 51:131-137.
- [8] Zuo R., Ornek D., Syrett B.C., Green R.M., Hsu C.H., Mansfeld B.F., Wood T.K. (2004). "Inhibition mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water". *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 64: 275-283.
- [9] Franklin M.J., Nivens D.E., Vass A.A., Mittelman M.W., Jack R.F., Dowling N.J.E., White D.C. (1991). "Effect of Chlorine and Chlorine/Bromine Biocide Treatments on the Number and Activity of Biofilm Bacteria and on Carbon Steel Corrosion". *Corrosion.* 47(2): 128-134.
- [10] Davey M.E., O'Toole G.A. (2000). "Microbial biofilms from ecology to molecular genetics". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4) 847-867.
- [11] Potekhina J.S., Sherisheva L.P., Poverkina A.P., Pospelov T.A., Ralotoma F., Gottschalk. (1999). "Role of microorganisms in corrosion inhibition of metal in aquatic systems". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 639-646.
- [12] Flemming C. (2002). "Biofouling in Water Systems (cases) Causes and Countermeasure". *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(6): 629-640.
- [13] Little B., Lee J., Ray R. (2007). "A review of 'green' strategies to prevent or mitigate microbiologically influenced corrosion". *Biofouling.* 23(2): 87-97.
- [14] Jayaraman A., Hallock P. J., Carson R.M., Lee C.C., Mansfeld F.B., Wood T.K. (1999). "Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generate in situ". *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 52: 267-275.
- [15] Ponmariappan S., Maruthamuthu S., Palaniappan R. (2004). "Inhibition of corrosion of mild steel by *Staphylococcus* sp. *Transactions of the SAEST* 39. 39: 99-108.
- [16] Mansfeld F. (2007). "The interaction of bacteria and metal surfaces". *Electrochimica Acta.* 52: 7670-7680.
- [17] Zuo R., Kus E., Mansfeld F., Wood T.K. (2002). "The importance of live biofilms in corrosion protection". *Corrosion Science.* 47: 279-287.
- [18] Ornek D., Jayaraman A., Syrett B., Hsu C.H., Wood T.K. (2002). "Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or γ -poliglutamate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 651-657.
- [19] Jayaraman A., Earthman J.C., Wood Y.K. (1997). "Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 62-68.

- [20] Videla, H.A. and Characklis, W.G. (1992).
“Biofouling and Microbially influenced Corrosion”.
International Biodeterioration and Biodegradation:
29:195-212.