

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE CORROSIÓN MICROBIANA EN VARILLAS DE ACERO EXPUESTAS A CEPAS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORA.

Y. Figueroa de Gil^{*a}, G. López de Gómez^b, C. Rodríguez^a, Y. Bruzual^a, J.L. Prin^a, A. Gómez^a.

^a Departamento de Ciencia de los Materiales. Laboratorio de Corrosión. Instituto de Investigación en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), Universidad de Oriente. Cumaná – Venezuela.

^b Escuela de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Departamento de Mecánica. Núcleo de Anzoátegui. Universidad de Oriente. Puerto la Cruz – Venezuela.

*Autor de Correspondencia: E-mail: yelidegil@gmail.com.

Recibido: Octubre 2009. Aprobado: Febrero 2010.
Publicado: Mayo 2010.

RESUMEN

Un estudio morfológico por MEB y EDS fue realizado en las superficies de varillas de acero de refuerzo en el concreto de pilotes que sirven de base a unidades habitacionales tipo palafito construidas en una urbanización conectada por canales marítimos. Para este propósito se aislaron e identificaron bacterias sulfato-reductoras (BSR) de las aguas de tres estaciones de muestreo (I, II y III) en los canales seleccionados para estudio. Mediante MET, se estudió las características de las bacterias aisladas, presentando éstas morfologías bien definidas. Para la formación de la biopelículas, se sometieron muestras a una solución inoculada con BSR de la estación que resultó con mayor crecimiento bacteriano durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. La morfología observada sugiere gran actividad bioquímica para la formación de biopelículas gruesas, mezcladas con posibles sulfuros de hierro y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que es producido por los mismos microorganismos. La morfología del daño estudiada mediante el MEB, para las muestras de cabillas de refuerzo, presentan de manera general un daño localizado, el cual pudiera ser debido al sulfuro de hidrógeno (H₂S) o sulfuro biogénico proveniente de la actividad de estas bacterias.

Palabras claves: Corrosión microbiana, biopelículas, MEB, BSR.

MORPHOLOGICAL STUDY OF MICROBIOLOGICAL CORROSION OF STEEL RODS EXPOSED TO SULPHATE REDUCING BACTERIA STRAINS.

ABSTRACT

A morphologic study by MEB and EDS was made in the surfaces of steel rods used as reinforcement in partially submerged concrete piles that serve as bases to houses built in an urbanization connected by maritime channels. For this intention sulphate-reducing bacteria (SRB) were isolated from water samples collected in three different locations (stations I, II and III) in the channels selected for study. The isolated BSR displayed well defined morphologies when they were studied and identified by means of MET. For the formation of biofilms, steel samples were submerged in a solution inoculated with BSR grown in seawater from the station sample which presented the greater bacterial growth after 24 hours of exposure to a temperature of 37 °C. The observed biofilm morphology suggests great biochemical activity for the formation of heavy films, mixed with possible sulfides of iron and extracellular poliméricas substances (EPS) that were produced by the SRB. The morphology of the steel rod surfaces studied by MEB, displayed a localized damage, which could be due to hydrogen sulfide (H₂S) or biogenic sulfide also produced by SRB activity.

Keywords: Microbiological corrosion, biofilm, MEB, BSR.

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente reconocido que los microorganismos se fijan o forman películas que influyen en la corrosión de los metales y aleaciones sumergidos en ambientes acuosos naturales. Estas biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se

adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde

se establecen. Además, la hidrodinámica del sistema juega un papel importante en el desarrollo de estas biopelículas [1,2], las cuales se desarrollan en una interfase líquido-sólido.

Estos microorganismos influyen en la corrosión cambiando las condiciones electroquímicas de la superficie del metal. Teóricamente estos cambios pueden tener muchos efectos, variando desde la inducción de la corrosión localizada a un cambio en la tasa de la corrosión generalizada o la inhibición de la misma [3]. Este tipo de corrosión origina o acelera el deterioro y la destrucción de los metales, y es provocada por un gran número de microorganismos - entre ellos las bacterias sulfato reductoras- que están presentes en el suelo o en el agua, donde descomponen activamente la materia orgánica y los minerales, participando de esta manera en los ciclos naturales del carbono, nitrógeno y azufre, procesos en los cuales se forman diferentes productos que se acumulan en el medio y modifican su composición, ocasionando problemas en aleaciones y materiales no metálicos, y afectando a una gran variedad de industrias, así como también a los materiales de construcción, como los refuerzo metálico donde se afectan significativamente las características funcionales del concreto armado tales como la adherencia, además de inducir la formación de agrietamientos y desprendimiento de trozos de concreto, que dejan expuesto el refuerzo de acero al medio, lo que compromete la integridad estructural, la seguridad de las personas que lo habitan y de terceros, provocando la desvalorización del inmueble a causa de su deterioro estético y funcional [4-8].

En las estructuras sumergidas como es el caso de los pilotes de concreto que sirven de base a unidades habitacionales tipo palafito, el problema de deterioro se puede agravar si en el medio existen bacterias capaces de ocasionar corrosión microbiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se planteo realizar estudio morfológico por microscopia electrónica de barrido (MEB) acompañado de un análisis químico elemental y puntual sobre la biopelícula en la superficie de las varillas de acero de refuerzo en el concreto de pilotes que sirven de base a unidades habitacionales tipo palafito construidas en una urbanización conectada por canales marítimos. Para este propósito se aislaron e identificaron bacterias sulfato reductoras (BSR) de las aguas de tres estaciones de muestreo (I, II y III) en los canales seleccionados para dicho estudio. Para el aislamiento de BSR se usó un medio de cultivo basal, el cual se preparó de acuerdo al método descrito por Postgate [9]; modificado por Lapage; Shelton y Mitchell, [10]. La preparación para un litro de medio contiene: 0,5 g de KH_2PO_4 ; 1 g de NH_4Cl ; 1 g de Na_2SO_4 ; 0,1 g de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 g de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g de KCl ; 1 g de extracto de levadura; 0,1 g de ácido ascórbico. Como fuente de carbono se utilizó acetato de sodio al 0,2 % p/v., suplementándose con 1 ml de solución de metales trazas y 1 ml de solución vitaminas [11], utilizándose para su preparación 75 % de agua de mar envejecida y filtrada y 25 % de agua destilada. El aislamiento de la BSR a partir de las muestras se realizó siguiendo la técnica de diluciones decimales seriadas (10^{-1} hasta 10^{-6}). Ya obtenidas las cepas aisladas de bacterias sulfato-reductoras se aplicó la técnica de Tinción Negativa, para Microscopía Electrónica de Transmisión (M.E.T.) [12], a fin de observar las características propias de las células bacterianas tales como: forma, tamaño, presencia de esporas y números de flagelos. Para la formación de la biopelícula se sometieron muestras a una solución inoculada con Bacterias Sulfato-Reductoras de la estación II, durante 24 horas a una temperatura de 37 °C, la cual se preparó añadiéndole a 220 ml del medio basal Postgate 25 ml del cultivo puro de BSR ya aisladas. Se obtuvieron las unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml), siguiendo la técnica de diluciones decimales

seriadas desde (10^{-1} hasta 10^{-10}). Para observar la microestructura de la biopelículas por MEB se procedió a métodos convencionales de fijación con glutaraldehído al 2,5% post fijación con tetraóxido de osmio al 1% (O_3O_4), deshidratación con etanol de 50 % al 100% de concentración, secado con punto crítico y finalmente cubiertas con cromo. Para observar la morfología de ataque las muestras fueron sumergidas en una solución de HCl al 20 % y luego limpiadas con agua destilada de manera de remover los productos de corrosión. Estas observaciones se realizaron utilizando un MEB HITACHI modelo S-800.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características fisico-químicas de las aguas de las estaciones seleccionadas se indican en la tabla 1.

Las bacterias sulfato reductoras están usualmente asociadas con la corrosión metálica y no con el deterioro del concreto, por lo tanto la selección de las aguas de las estaciones I, II y III para esta investigación se fundamentó en las características fisico-química asociadas con la corrosión del acero (pérdida de hierro hacia el medio) y con una mayor actividad microbiana la cual se relacionó con la presencia de nutrientes específicos (sulfatos) presentes en las aguas.

Tabla 1. Características fisico-química de las aguas de las estaciones evaluadas.

Características Físicoquímicas	Estaciones		
	I	II	III
T (°C)	26	26	25,4
pH	7,65	7,75	8,09
Salinidad (S %)	36,55	35,95	30,8
Sulfato (mg/L)	3220	2602	2339
Cloruros (mg/L)	20,96	21,16	18,14
Hierro (mg/L)	0,46	0,41	0,36
Sól.Totales (mg/L)	57.552	46.816	38.244

Como resultado del aislamiento de las BSR se pudo comprobar un crecimiento bacteriano planctónico de 100.000 bacterias/ml en las muestras de las estaciones I y III y de 1.000.000 bacterias/ml en la muestra de la estación II, la cual fue la seleccionada para la realización de los ensayos siguientes, figura 1. Este crecimiento bacteriano es evidenciado por el ennegrecimiento del agua y sedimento, así como por el olor característico a sulfuro de hidrógeno (H_2S), el cual se produce generalmente, por la descomposición anaeróbica de compuestos orgánicos que contienen azufre o por la reducción bacteriana del sulfato.



Fig. 1. Crecimiento de BSR en las aguas marinas canalizadas.

En la tabla 2, se muestra una interpretación de los resultados obtenidos relacionando el factor de dilución con el crecimiento de BSR. Este crecimiento bacteriano ocurrió durante un periodo de 21 días.

Tabla 2. Interpretación del crecimiento bacteriano de las BSR en colonias de BSR/ml.

Estaciones	Factor de dilución	Interpretación del crecimiento (BSR/ml)
I	1:100.000	10.00-100.000
II	1:100.000	10.000-100.000
III	1:1.000.000	100.000-1.000.000

En la figura 2, se presentan microfografías por la técnica de tinción negativa de las bacterias sulfato reductora, obtenidas mediante MET.

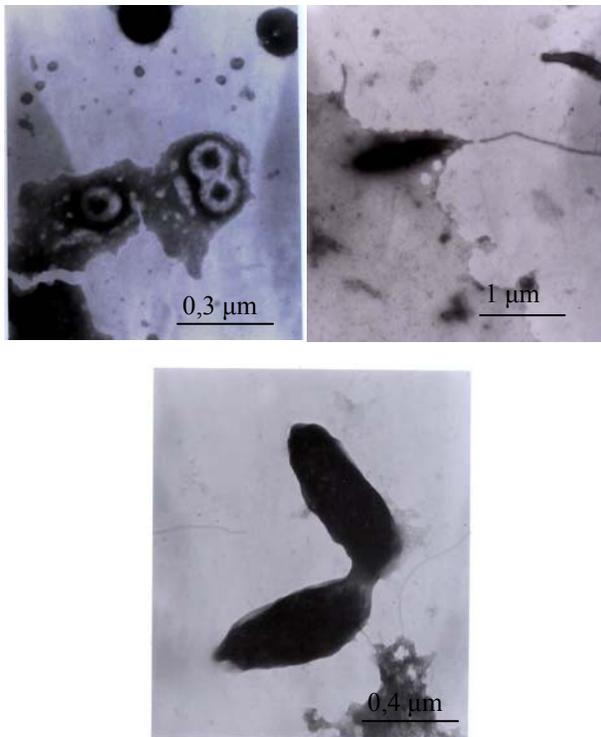


Fig. 2. Micrografías de transmisión por tinción negativa de BSR con forma de bacilo y flagelo polar, células de formas ovoides y vibrioides,

Se puede observar que estas bacterias presentan características morfológicas bien definidas como son: bacilos rectos y/o curvos cuyas medidas varían entre 0,40 a 0,63 μm de ancho y de 1, a 1,4 μm de largo, móviles por flagelación polar. Estas células pueden encontrarse separadas o en pareja, con formación de esporas, características éstas de bacterias sulfato reductoras del género *Dusulfovibrio* siendo favorecidas por la concentración de sulfato nutriente que favorece el crecimiento bacteriano como se puede observar. Cabe destacar que a pesar de ser esta una técnica que permite observar la morfología de la célula bacteriana, se hace necesario la aplicación de pruebas bioquímicas diferenciales para determinar género y especie de la bacteria sulfato reductora encontradas e inclusive para indicar el grupo (13).

En la figura 3 se muestran micrografías tomadas por MEB de las biopelículas desarrolladas sobre las varillas de refuerzo durante 24 horas de manera comparativa.

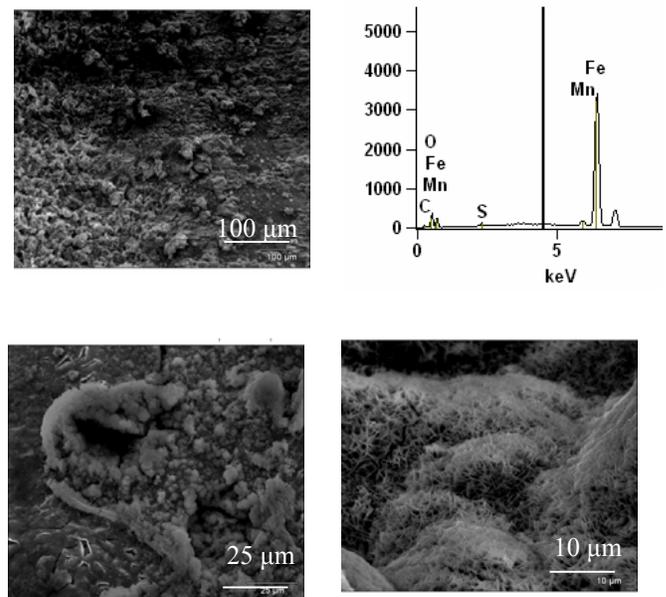


Fig. 3. Micrografía por MEB mostrando los aspectos morfológicos de la biopelículas de BSR sobre de las superficies evaluadas de acero de refuerzo.

Puede observarse una película de aspecto homogéneo con presencia productos de corrosión asociados a la presencia de microorganismos. Igualmente se presentan biopelículas de masa muy densa mezcladas con posibles sulfuros de hierro (EDX de la figura 3) y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que es producido por los mismos microorganismos, formando una matriz adherente en donde estos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Estas múltiples capacidades metabólicas permiten el establecimiento de microorganismos pioneros y el desarrollo posterior de los demás consorcios metabólicos, es entonces cuando el sistema microbiano establecido en equilibrio dinámico puede inducir corrosión localizada, en muchos casos por bacterias sulfato reductoras (BSR) entre otros y por las características activas del acero en medio acuoso.

En la figura 4 se muestran micrografías las cuales reflejan características de la morfología del daño tomadas mediante el MEB, para las muestras de cabillas de refuerzo expuestas a medio de cultivo de BSR por 24 horas decapadas.

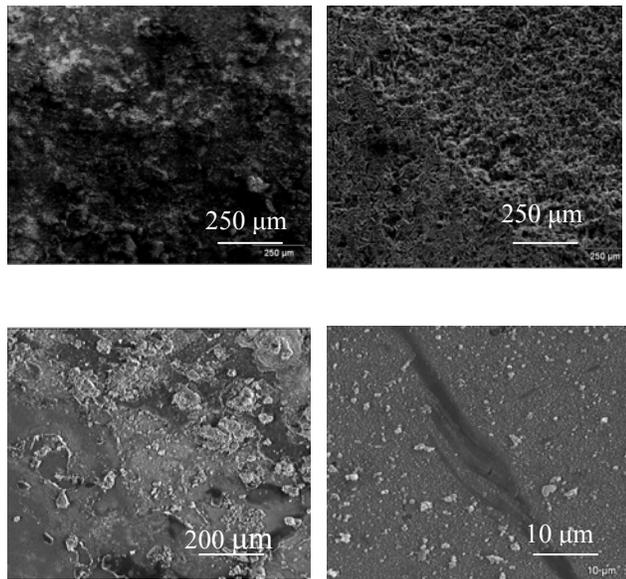


Fig. 4. Micrografías donde se observa la morfología del daño tomada por MEB en los muestras de acero de refuerzo expuesto por 24 horas a medios de cultivos inoculados con BSR. Mag.100 X

Se observa de manera general un daño localizado, con presencia de microhoyuelos, del orden de 0,2 a 4 μm producido por el sulfuro biogénico. Este compuesto precipita al combinarse con metales pesados y forma, en la mayoría de los casos, una película negra de sulfuro de hierro (FeS), que puede producir pérdidas localizadas de metal denominadas picaduras, ocasionadas por la actividad de las bacterias sulfato-reductoras (BSR), mayoritariamente microorganismos anoxigénicos estrictos y que se consideran los principales agentes productores de biocorrosión, El análisis realizado en los puntos indicados en las superficies (Fig.5) reveló la presencia simultánea de los elementos Mg, Si, Mn, Ca, Si, Al, y Cl, en puntos cuya morfología hizo suponer la presencia de sales provenientes del medio Postgate

modificado, las cuales posibilitan reacciones electroquímicas intensas.

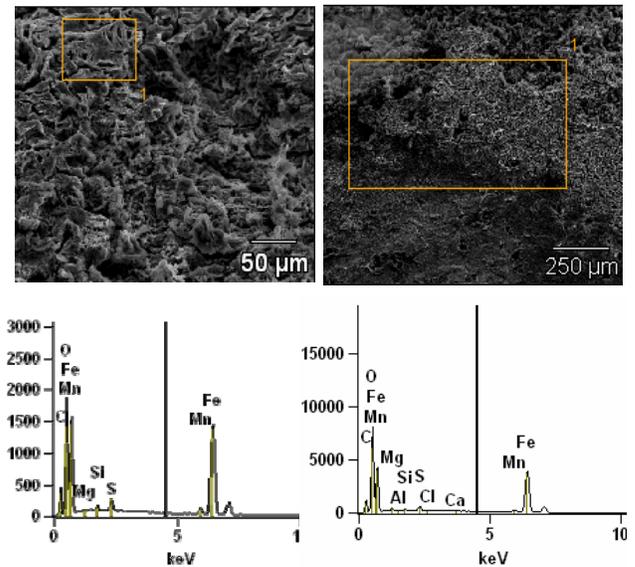


Fig. 5. Micrografías por MEB de una muestra de acero de refuerzo expuesto a un medio inoculado con BSR mostrando productos de corrosión superficie como lo indica su microanálisis químico por EDS.

Así mismo el microanálisis químico por EDS indicó la presencia de S y Fe, lo cual permite sugerir la formación de un sulfuro de hierro, Fe_xS_y , el cual resulta ser catódico con respecto al acero. La actividad metabólica de estas bacterias causa acumulación de sulfuro hacia la superficie del metal. Esta es una particular evidencia de que la superficie está cubierta con una biopelícula como se presentó en las micrografías analizadas. El suministro de oxígeno disminuye bajo la masa bacteriana durante el crecimiento de bacterias sobre una superficie de hierro. La respiración celular dentro de la biopelículas establece regiones anódicas y catódicas sobre la superficie del metal, promoviendo el flujo de electrones (14). Las biopelículas causan el biodeterioro del metal al modificar la interfase solución-metal y afectar las interacciones de la superficie del metal y el ambiente (15).

CONCLUSIONES

Por la conformación de productos locales y heterogéneos se detectó la presencia de bacterias sulfato reductoras utilizando como sustrato al acetato y como donadores de electrones al benzoato, propianato, piruvato y etanol, con oxidación completa hasta CO₂.

En las cabillas de acero, utilizadas como refuerzo en los pilotes, que sirven de base a unidades habitacionales tipo palafito, en presencia de BSR se desarrollan biopelículas y corrosión localizada.

El acero experimentó un daño localizado, con presencia de microhoyuelos, producido por sulfuro biogénico, dadas las condiciones experimentales del estudio.

El análisis obtenido por M.E.B. de las muestras después de ser expuesta al medio inoculado con BSR, confirman que efectivamente las bacterias o consorcios microbianos influyen en la corrosión del acero de refuerzo con la presencia de sales y óxidos.

REFERENCIAS

[1] Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scout HM. (1999). "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure". *Appl Microbiol* 85: 518-519.

[2] Donlan RM. (2002) "Biofilms: Microbial life on Surfaces". *Emerg Infect Dis*. 8: 9: 881- 890.

[3] Betancourth, M, Botero, J.E, Rivera, S.P. (2004) "Biopelículas: Una comunidad microscópica en Desarrollo" *Colombia Médica*. 35: 3(1).

[4] Ferrari, M.D. Mele, M.F.L. de y Videla, H.A. (1995.) "Corrosión impacto ambiental sobre materiales" Red iberoamericana de corrosión microbiológica y biofouling en sistema industriales (BIOCORR).

[5] Vico, W. Morris, y M. Velásquez. (2003). Evaluación el avance de la corrosión de refuerzo en estructuras de hormigón. Universidad Nacional Mar del Plata.

[6] Steven F. Daily. (1981). Using protection to control of corrosion of reinforced concrete structures in marine environments. *Corrpro Companies. Inc.*

[7] CYTED. Red DURAR (1997). Durabilidad de la armadura, Manual de inspección, evaluación y diagnóstico de Corrosión en Estructuras de Hormigón Armado, ISBN 980-296-541-3.

[8] M. A. Frontini. Corrosión Microbiológica. Asociación Argentina de Materiales Registro N°ISSN 1668-4788.

[9] J. Postgate. (1963). "Versatile Medium for the Enumeration of Sulfate-Reducing". *Appl. Microbiol*, 11:265-267.

[10] S. Lapage; J. Shelton y T Mitchell. (1970.) Media for the Maintenance and Preservation of Bacteria. En: *Methods in Microbiology*. Norris J. Ribbons, D. Academic Press, London, New York. 10:120.

[11] A. Brehmshstuh, T. Gendron and R. Cleaned. (1993.) "Mechanism of Underdeposit Corrosion on Freshwater Cooled Austenitic Alloy Heat Exchangers". *Corrosion Science* 35: 699-711,

[12] Mercer y M. Birbeck.(1972). Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos, Editorial Blumé. Madrid 58-59 .

[13] Figuroa, de Gil, Y. Camero, S. Prin, J L. y Réquiz, R. (2008)."Evaluación de la corrosión inducida por bacteria sulfato reductora en un acero Inoxidable 316L". *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 28:1.

[14] Little, B. J., P. A. Wagner & Z. (1997) Spatial Relationships between bacteria and mineral surfaces, Lewandowski. pp. 123-159.

[15] Videla H. A. & L. K. Herrera. (2005). "Microbiologically influenced corrosion: looking to the future". *Int. Microbiol*. 8:169-180.