

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y GEOQUÍMICO DE SUELOS DEL SUR DE URUGUAY

GEOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL STUDY IN SOILS OF SOUTHERN URUGUAY

Pianzzola, M.J.¹; Goso Aguilar, C.²; Aguilar, M.; de Souza, S. & Soubes M.¹

mpianzzo@fq.edu.uy

¹ Cátedra de Microbiología, Fac. de Química (UdelaR)

² Dpto. de Evolución de Cuencas, Instituto de Ciencias Geológicas, Fac. de Ciencias (UdelaR)

RESUMEN

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) constituyen un grupo diverso de bacterias anaerobias que llevan a cabo la reducción desasimilatoria de compuestos sulfurados como sulfato, sulfito, tiosulfato, y el propio sulfuro a sulfhídrico. Si bien las BSR son anaerobias algunos géneros toleran el oxígeno y a bajas concentraciones algunas pueden respirar con Fe^{+3} o aún con oxígeno, usando hidrógeno como dador de electrones. Varias industrias incluidas la petrolera han sido afectadas por su actividad metabólica y la causa fundamental es la producción de H_2S , tóxico y corrosivo. Esta acidificación daña los equipos de bombeo, los tanques de reserva y las tuberías. Por otra parte, el sulfhídrico generado puede afectar la salud humana y ocasionar problemas de seguridad, ambientales y severas pérdidas económicas.

Dada la importancia ecológica y económica de las BSR este trabajo muestra los resultados de un relevamiento de su presencia en suelos circundantes al gasoducto de distintas unidades geológicas del sur Uruguay. Si bien en los últimos años se ha incrementado su conocimiento a nivel molecular, aún resta mucho por saber para poder controlar todos los efectos producidos por su actividad metabólica. El objetivo de este trabajo es determinar el grado de diversidad de estas bacterias en esos suelos y conocer el potencial de biocorrosión de las mismas. Fueron colectadas muestras de suelo de las formaciones Fray Bentos, Raigón, Libertad, Dolores y del Granito La Paz, con diferentes características, determinándose su pH, humedad, contenido en cloruros y sulfatos así como la presencia de BSR. Si bien el principal obstáculo para entender su ecología y diversidad es la incapacidad de cultivar muchos de los microorganismos que provienen de muestras de suelos esta dificultad puede ser salvada mediante el empleo de técnicas moleculares que permiten estudiar los microorganismos o sus genes, directamente sobre las muestras. En este trabajo correlacionamos la detección de bacterias sulfato reductoras por métodos clásicos y moleculares en los diferentes suelos estudiados.

Palabras clave: bacterias sulfato reductoras, biocorrosión, suelos, sur de Uruguay

ABSTRACT

The sulphate reducing bacteria (SRB) constitute a diverse group of anaerobic prokaryotes that carry out the dissimilatory sulphate reduction of sulphur compounds like sulphate, sulphite, tiosulphate, and sulphide to hydrogen sulphide. Although BSR are anaerobic, some genre tolerate oxygen and some others, at low concentrations, can respire Fe^{+3} or oxygen, using hydrogen as electron donor. Several industries, including oil and natural gas processing and transporting plants, have been affected by their metabolic activity and the fundamental cause is the production of H_2S , corrosive and toxic. It damages the pumping equipment, tanks, and pipes. On the other hand, the generated sulphide affects human health and causes security and environmental problems producing severe economic losses. Given the ecological and economic importance of the SRB this study attempts of its presence in soils of different characteristics from southern Uruguay. Although in the last years its knowledge at molecular level has been increased, there is still lack of information so as to be able to control all the effects produced by its metabolic activity. The objective of our work is to determine the degree of diversity of these bacteria in our soils and to know the biocorrosion potential of them. As a first step we have collected soil samples with different characteristics, having determined its pH, humidity, content of chloride and sulphates as well as the presence of SRB. Although the main obstacle to understand its ecology and diversity is the incapacity to cultivate many of the microorganisms that come from environmental samples, this difficulty can directly be avoided by means of the use of molecular techniques that allow the study of the microorganisms present or their genes. In this work we correlate the detection of sulphate reducing bacteria by classic and molecular methods in the different soils studied.

Keywords: sulphate reducing bacteria, biocorrosion, soils, southern Uruguay.

INTRODUCCIÓN

Con motivo de un estudio del potencial de biocorrosión de los suelos en torno del tendido del gasoducto que transporta el gas argentino, desde el departamento de Colonia hasta Montevideo, con sus respectivos ramales hacia las ciudades de Canelones y San José, se presentan en este trabajo los principales resultados por considerarlos de interés por su aplicabilidad.

El suelo por su contenido variable de humedad, sales y materia orgánica en descomposición es uno de los electrolitos más complejos de todos los que se pueden encontrar. El suelo generalmente es un medio heterogéneo, en donde se dan muchas variaciones en la velocidad de corrosión de los metales. Un suelo natural contiene arena de diferentes tamaños y composiciones mineralógicas, distintos minerales arcillosos, carbonatos, óxidos e hidróxidos, además de otros compuestos y humus. Estos componentes pueden estar mezclados en el suelo en diferentes proporciones que dan lugar a distintos grados de agresividad.

Por lo general, los suelos arenosos, margo-arenosos, margosos y calcáreos no son agresivos; por el contrario los suelos arcillosos en ciertas condiciones son agresivos. Los que son agresivos son las turbas, los humus libres de carbonatos y también los suelos cenagosos y de aluviones. Los suelos artificiales, esto es los formados por escorias, basuras, elementos en putrefacción, residuos humanos e industriales también son agresivos.

Frecuentemente, en suelos arcillosos o turbosos el oxígeno atmosférico tiene más dificultad para penetrar por lo que si se produce hidrógeno a consecuencia de la reacción catódica de una estructura enterrada (tubería) éste puede llegar a ser oxidado por la acción de microorganismos anaerobios, generalmente bacterias sulfato reductoras (BSR).

Los síntomas característicos en las tuberías metálicas enterradas son el ennegrecimiento local por la formación del sulfuro de hierro y a veces el olor a ácido sulfhídrico. La corrosión es un proceso electroquímico que se observa en materiales contruidos con metales puros o con aleaciones en los que ocurre una reacción anódica de oxidación del metal y una reacción catódica de reducción de especies químicas. Estas reacciones cuando están asociadas a microorganismos o a productos de su actividad metabólica como son enzimas, exopolímeros, ácidos orgánicos y/o inorgánicos, se conocen como de biocorrosión o corrosión influenciada por microorganismos (MIC). Para que estas reacciones tengan lugar es necesario el contacto con la superficie metálica por medio de biofilms, constituidos por células microbianas, polímeros extracelulares (EPS) y precipitados inorgánicos productos de la corrosión.

El mecanismo mejor conocido de MIC involucra la corrosión sobre acero producida por la acción de bacterias anaerobias sulfato reductoras. Estos

organismos tienen un metabolismo muy característico en el cual reducen el sulfato a sulfuro y se encuentran frecuentemente en comunidades presentes en suelo y corrientes de agua naturales. En sistemas industriales, materiales biodegradables como algunos hidrocarburos encontrados en operaciones con petróleo o gas o componentes susceptibles de materiales de protección, pueden ser fuente de nutriente para ellas. Algunas BSR son capaces de utilizar el hidrógeno producido en la superficie metálica por corrosión o por protección catódica favoreciendo su crecimiento. El sulfuro producido por estas bacterias combinado con los iones ferrosos da lugar a sulfuro de hierro insoluble negro. Por otra parte, las bacterias productoras de ácido (BPA) pueden tener el rol de proporcionar nutrientes a las BSR. Este mecanismo puede observarse en la FIGURA 1.

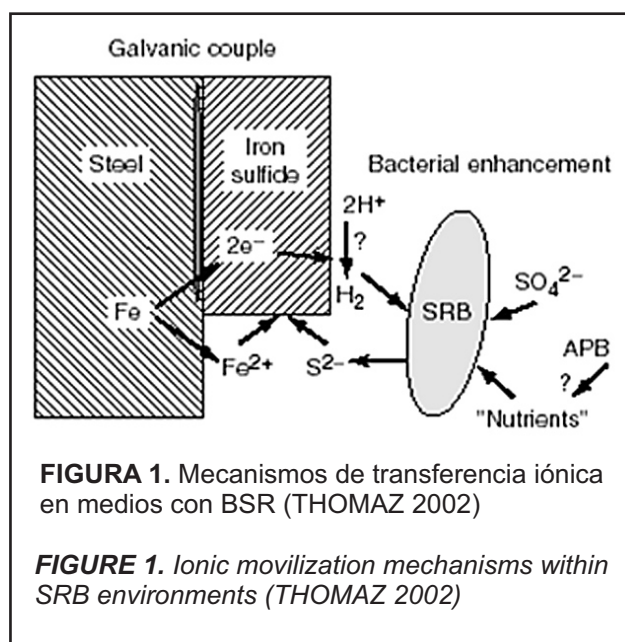


FIGURA 1. Mecanismos de transferencia iónica en medios con BSR (THOMAZ 2002)

FIGURE 1. Ionic mobilization mechanisms within SRB environments (THOMAZ 2002)

En la industria petrolera se estima que el 34% de los daños producidos por corrosión es de origen microbiano. Recientemente, se ha reportado que en Inglaterra, los costos por reparación de tuberías de gas que presentaban biocorrosión fueron del orden de 250 millones de libras por año (BEECH & GAYLARDE 1999).

En cuanto al grado de agresión del suelo, depende de varios factores como la resistividad, humedad y pH, sales, materia orgánica, microorganismos, entre otros (LITTLE et al. 1997).

Grado de agresividad del suelo en función de la resistividad

La resistividad de un terreno depende de su estructura, de las dimensiones de sus partículas constituyentes, de su porosidad y permeabilidad, del contenido de agua (humedad) y de su contenido de sales.

Por ejemplo, en lo que se refiere a un suelo arcilloso, con un 5% de humedad, dicho suelo puede presentar una resistividad de 10.000 ohm-m, en

cambio, con un 20% de humedad, la resistividad disminuye hasta 100 ohm-m.

Por lo tanto, que la resistividad de un terreno y especialmente la de los estratos superiores, puede variar notablemente con las estaciones del año, la precipitación pluvial, la actividad agrícola e industrial, etc. En cambio, la temperatura no ejerce una influencia tan marcada, a menos que supere el punto de congelación, después de lo cual hay un aumento significativo de la resistividad.

La velocidad de corrosión está ligada a la resistividad del terreno de la forma que se señala en la TABLA I.

Resistividad del suelo (ohm-cm)	Grado de corrosividad
0 - 500	muy corrosivo
500 – 1.000	corrosivo
1.000 – 2.000	moderadamente corrosivo
2.000 – 10.000	escasamente corrosivo
>10.000	no corrosivo

TABLA I. Valores de resistividad de suelos y sus efectos corrosivos (según AWWA)

TABLE I. Resistivity soil values and its corrosive levels (following AWWA)

Grado de agresividad del suelo en función del pH

En lo que se refiere a la acidez, los suelos muy ácidos (pH <5.5) pueden motivar una rápida corrosión del metal desnudo, y la agresividad del suelo aumenta con el incremento de la acidez (disminución del pH), aunque estos valores de pH no son normales. La mayor parte de los suelos tienen pH comprendidos entre 5.0 y 8.0, en cuyo caso la corrosión depende de otros factores. En suelos alcalinos parece existir una cierta correlación entre conductividad y agresividad. En la Tabla II se resumen las características agresivas de un suelo basándose en el pH y en el contenido de aniones del mismo (cloruros y sulfatos). Este tipo de información resulta de interés para predecir la agresividad de un suelo frente a, por ejemplo, una tubería enterrada y con base en esto, evaluar la corrosión y la protección correspondiente.

Objetivos

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

- ♦ determinación de las características de agresividad del suelo en diferentes puntos a lo largo del gasoducto considerando: el pH, humedad, la resistividad, el contenido de sulfato y cloruros del suelo.
- ♦ relevamiento de la presencia de bacterias sulfato reductoras y bacterias productoras de ácido.
- ♦ identificación de puntos o zonas críticas que permitan implementar un sistema de monitoreo y control preventivo a la biocorrosión en la tubería de gasoducto estudiada

concentración (ppm)	grado de corrosividad
Cloruro	
>5.000	severo
1.500-5.000	considerable
500-1.500	corrosivo
>500	despreciable
Sulfato	
>10.000	severo
1.500-10.000	considerable
150-1500	posible
0-150	despreciable
pH	
<5,5	severo
5,5-6,5	moderado
6,5-7,5	neutral
>7.5	despreciable

TABLA II. Agresividad relativa en suelos en función de presencia de aniones (ACI 1999) y pH (ROMANOFF 1957)

TABLE II. Relative agresivity in soils by different anionic concentrations (ACI 1999) and pH conditions (ROMANOFF 1957)

Localización

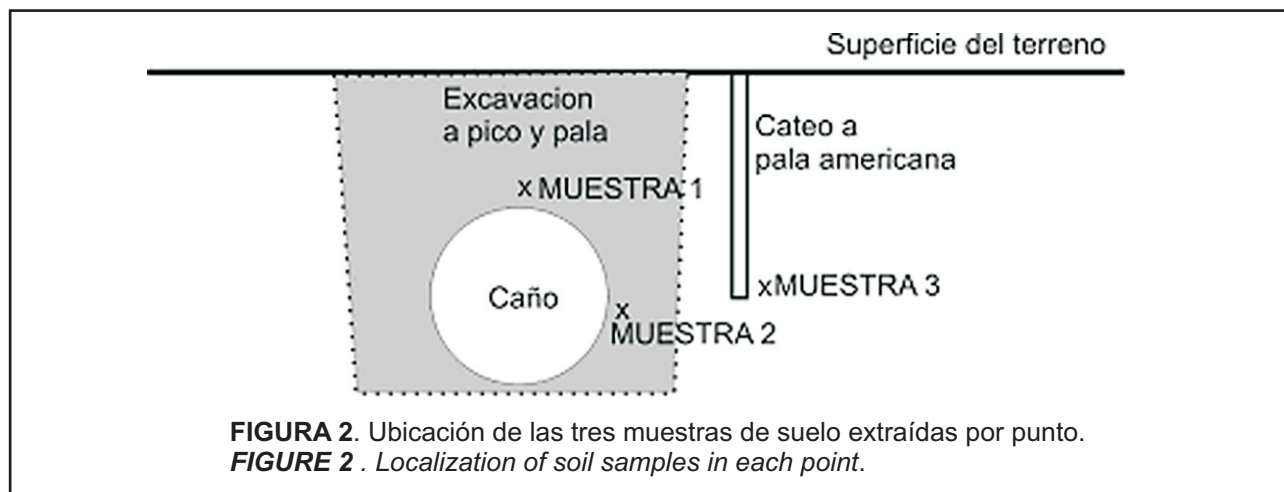
Los estudios fueron desarrollados sobre 129 muestras de suelos, que fueron obtenidas a lo largo del total de la línea del gasoducto, ubicadas en los sitios cuyos valores de resistividad y condiciones geológicas así lo ameritaban, tratando de obtener un muestreo representativo del conjunto de suelos.

Para lograr los objetivos específicos fueron realizados un conjunto de tareas de campo y laboratorio, que se detallan a continuación.

TRABAJOS EFECTUADOS

Muestreo de suelos

Para obtener las muestras de suelos se procedió a muestrear el material del relleno (tapada), del terreno natural más cercano al caño y el inmediatamente junto a la zanja, en 48 puntos a lo largo de toda la traza. Para ello, se realizó una excavación a pico y pala en cada punto hasta detectarlo, para así extraer las muestras de la zanja en contacto con el mismo. Esto permitió tener la seguridad que las muestras analizadas son las que están en contacto directo con el caño. Se extrajeron muestras del suelo natural, obtenidas en un cateo mediante el empleo de pala americana fuera del área de la zanja. En la FIGURA 2 se muestra como fueron realizados los trabajos de excavación, cateos y muestras obtenidas.



Los 48 puntos muestreados fueron ubicados en conjunto con los técnicos de la empresa permisaria del transporte de gas, teniendo en cuenta los antecedentes de resistividad en suelos y tratando de obtener muestras de suelos de diferentes unidades geológicas, con una distribución representativa.

En las circunstancias que por los planos de obra y la medición del instrumento *radiodetection*, el caño se encontraba a una profundidad mayor a 1.70 m, se procedía a realizar los muestreos directamente con pala americana, vista las dificultades y riesgos de realizar la excavación de esas dimensiones (desmoronamientos de taludes, permisos laborales especiales, etc.).

Cabe acotar asimismo, que existieron algunos sitios en los que no fue posible extraer muestras del terreno natural, porque el mismo se encontraba muy cambiado.

Luego de acceder a los puntos seleccionados y con los recaudos de todas las medidas de seguridad laboral pertinentes, se tomaban las coordenadas geográficas (x, y, z) utilizando geoposicionador satelital (GPS) en cada punto.

A continuación, se procedía a relevar el lugar para detectar el caño con el *radiodetection*. Cuando se determinaba su presencia por las marcas en el terreno y/o radiodetector, se procedía a realizar una excavación rectangular a pico y pala, de dimensiones aproximadas 2.00 x 1.40 m, con su lado mayor perpendicular al mismo, hasta detectar el caño.

Al llegar a la profundidad determinada para el muestreo, se procedía a colectar las dos muestras de suelos junto al caño, una de los suelos en contacto con la parte superior y otra en el costado (MUESTRA 1 y MUESTRA 2, respectivamente).

Por su parte, al lado de la excavación efectuada, en terreno natural y mediante el empleo de pala americana, se procedía a realizar un cateo para la

toma de una muestra de suelo a la misma profundidad en que se detectaba el caño (MUESTRA 3). En cada caso, el peso de cada una de las muestras oscilaba los 500 g de suelo, las que eran acondicionadas adecuadamente (extrayendo el aire), en doble bolsa plástica con su etiqueta y rótulo correspondiente, para su transporte el mismo día en conservadora térmica a laboratorio en la Facultad de Química.

Al finalizar las tareas de excavación y cateo, se procedía a tapar las excavaciones de manera de dejar el sitio lo más parecido al estado original.

En cada una de las excavaciones y cateos realizados (zanja y de terreno natural), se realizó la descripción de los suelos –mediante el empleo de una planilla de campo confeccionada con tal fin– atendiendo principalmente a sus aspectos texturales: litología, granulometría, mineralogía, color (utilizando cartilla de colores) y presencia de cemento o carbonatos. Un mapa de ubicación de los puntos muestreados e ilustra en la FIGURA 3 e imágenes de los trabajos de campo se ilustran en la FIGURA 4.

Análisis de laboratorio

Análisis del suelo

A las muestras colectadas se les realizó mediciones de pH y humedad (Facultad de Química), de resistividad (por parte de la empresa), presencia y concentración de iones sulfato y cloruro (Facultad de Ciencias), de forma de poder determinar el grado de agresividad del suelo.

La metodología usada para la determinación de sulfatos fue la extracción con fosfato monocalcico. Las medidas se hicieron por turbidimetría y el límite de detección fue 2 ppm. Para cloruros se efectuó la determinación por extracción con agua, medidas por titulación con nitrato de plata y el límite de detección fue de 1 ppm.

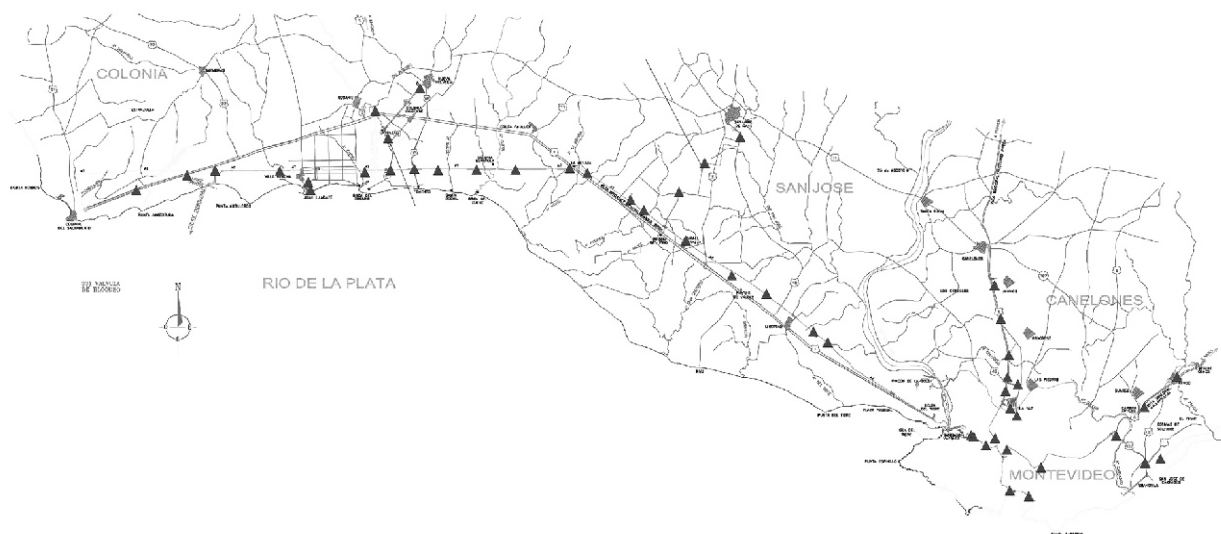


FIGURA 3. Mapa de localización de los puntos muestreados
FIGURE 3. Localization map showing the sampled points



FIGURA 4. Detalle de los trabajos de obtención de muestras en campo
FIGURE 4. Detail of field soil sampling

Cultivo de bacterias anaerobias sulfato reductoras

Los cultivos anaerobios se hicieron en medio líquido en viales o tubos adicionados de agentes reductores (sulfuro de sodio, tioglicolato, ácido ascórbico, según lo indicado en cada caso), bajo corriente gaseosa exenta de oxígeno. La corriente gaseosa utilizada fue de nitrógeno. La temperatura de incubación fue en todos los casos de 30°C (PIANZZOLA 1996; PIANZZOLA et al. 1996).

Se utilizaron dos medios de cultivo selectivos preparados anaeróbicamente: el medio 63 según catálogo DSM de 1989 y el medio lactato (GERHARDT et al. 1994). El primero se utilizó con atmósfera anaerobia y en paralelo también se ensayó la técnica de llenado total de los tubos. En tanto que con el medio lactato sólo se ensayó el llenado total de los tubos (FIGURA 5). Los cultivos se incubaron a 30 °C y se realizó diariamente el seguimiento de su crecimiento.



FIGURA 5. Vistas de los trabajos de cultivo de bacterias en laboratorio.
FIGURA 5. Detail views in lab working with bacteria enrichments

Observación microscópica

Una vez observado el ennegrecimiento de los cultivos se confirmó la presencia de las BSR por observación microscópica de frescos, dadas las características morfológicas y del movimiento de los grupos más característicos de BSR (vibrios con movimientos característicos).

Análisis molecular

Amplificación del gen *dsr* de BSR

a) *A partir de los cultivos.* Amplificación por PCR con los primers *dsrAB*, (DRS1F y DSR4R) para los genes de la sulfito reductasa desasimilatoria, *dsrAB* según PÉREZ- JIMÉNEZ y KERKHOF (2005).

b) *A partir de ADN de muestras de suelo.* Se realizó la extracción de ADN genómico total de la población presente en las muestras de suelo por medio del Kit MO BIO (Laboratoires, Inc.). A partir de estas extracciones se realizaron las amplificaciones del gen *dsr* como explicado en el literal a.

RESULTADOS

Muestreo de suelos

Se hicieron excavaciones y cateos en 48 puntos a lo largo de toda la traza del gasoducto, de los cuales se obtuvo un total de 119 muestras. A éstas se agregaron 10 muestras aportadas por la Empresa provenientes de puntos en los que se realizaron otros trabajos y que a la Empresa le interesaba estudiar, por lo que se obtuvieron un total de 129 muestras.

Tal como se ha establecido en el ítem Muestreo, los puntos a analizar fueron escogidos en conjunto con los técnicos de Gasoducto Cruz del Sur, considerando los valores de resistividades con los que se contaba. Si bien no fue la única razón considerada en la elección (también se tuvo en cuenta el fácil acceso, cercanías a centros poblados, etc), el enfocarnos a suelos más factibles a procesos de corrosión condujo a la selección de aquellos con resistividades menores a 2000 ohm-cm (con excepción de algunos puntos de resistividades > 2000 ohm-cm, que también sirvieran de referencia).

De los trabajos de campo se pudo determinar que las muestras estudiadas pertenecen a suelos y materiales descompuestos de litologías correspondientes a las siguientes unidades geológicas:

- ♦ Granito de La Paz (Cámbrico, PRECIOZZI et al. 1985), granito rosado equigranular (2 puntos);
- ♦ Formación Fray Bentos (Oligoceno, PRECIOZZI op cit.), limos rosados (2 puntos);
- ♦ Formación Raigón (Mio-Pleistoceno, PRECIOZZI et al. 1985), arenas y conglomerados, blanco amarillentos; arcillas verdosas (3 puntos);
- ♦ Formación Libertad (Pleistoceno, PRECIOZZI op cit.), diamictitos, fangos y limos arcillosos marrones (31 puntos);
- ♦ Formación Dolores (Pleistoceno, PRECIOZZI et al. 1985), arcillas limosas marrones (7 puntos);
- ♦ Arenas del Reciente (1 punto)

Hubo 3 puntos en los que los materiales analizados de la zanja corresponden a relleno de balasto (material granular descompuesto del Basamento Cristalino o Granito de La Paz).

Análisis de laboratorio

A cada una de las 129 muestras de suelo se le determinó el pH, la humedad y se le realizaron los análisis microbiológicos de búsqueda de BSR y BPA. A la muestra más profunda se le realizó además el recuento para BSR y BPA. Se realizaron los exámenes químicos (sulfato y cloruro) para las 48 muestras de cada pk estudiado, analizando la muestra compuesta obtenida a partir del homogeneizado de las tres muestras de suelo para cada uno de los puntos (M1, M2 y M3).

Los resultados obtenidos del estudio de las características de los suelos, análisis químicos,

análisis microbiológicos y las resistividades de las muestras estudiadas muestran que:

- ♦ Los valores de pH de las muestras varían en el rango de 6,0 - 9,5 a excepción de un punto para el cual el promedio del pH de las 3 muestras analizadas resultó de 5,2.
- ♦ Los valores de humedad de las muestras oscilaron entre 5,2 a 27,7 %, con las excepciones de un punto con 4,3% y otro con 86,7 %.
- ♦ Los medios utilizados para detección de las BSR resultaron todos eficientes. Hubo una mayor recuperación de BSR en el Medio 63 en atmósfera anaerobia dado que más rápidamente hubo evidencias macroscópicas de crecimiento.
- ♦ De las 129 muestras analizadas 119 indicaron presencia de BSR. A partir de las diluciones realizadas se determinó que el número de BSR en los puntos estudiados varían desde 10 células/g a 10⁵ células/g.
- ♦ Las muestras analizadas para detección de BPA dieron todas positivas para la presencia y su valor estimado fue de 10³ a 10⁵ células/g.

Observación microscópica

Para la observación microscópica y caracterización bacteriológica se realizó sobre dos muestras frotis teñidos con coloración de Gram de enriquecimientos de suelos. En la FIGURA 6 se indican las bacterias sulfato reductoras con forma de vibrio y las bacterias esporuladas.

- ♦ Las concentraciones de sulfato en las muestras variaron desde 2 ppm a 102 ppm.
- ♦ Las concentraciones de cloruro oscilaron entre valores <1 y 311 ppm.
- ♦ Se optimizaron técnicas moleculares para la detección de BSR por PCR a partir de cultivo y también a partir de ADN genómico total de suelo. Se utilizaron los primeros DRS1F y DSR4R para los genes de la sulfito reductasa desasimilatoria (PÉREZ-JIMÉNEZ & KERKHOF 2005). Resultados preliminares permitieron detectar el gen *dsr* tanto a partir de los enriquecimientos como del ADN total de suelo, utilizando como controles positivos cultivos puros de BSR (*Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio vulgaris*) y ADN de cultivos puros de BSR, respectivamente.

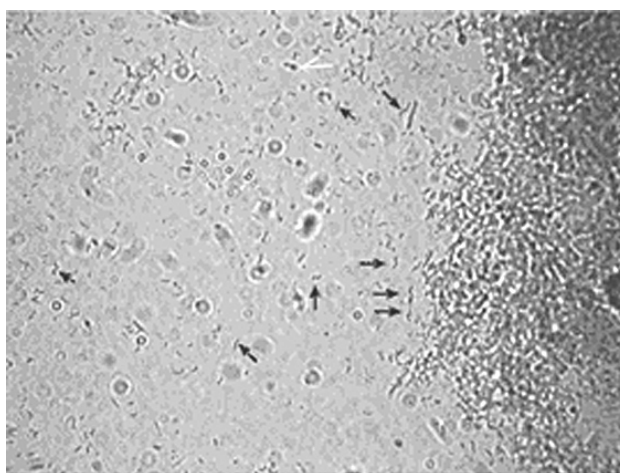
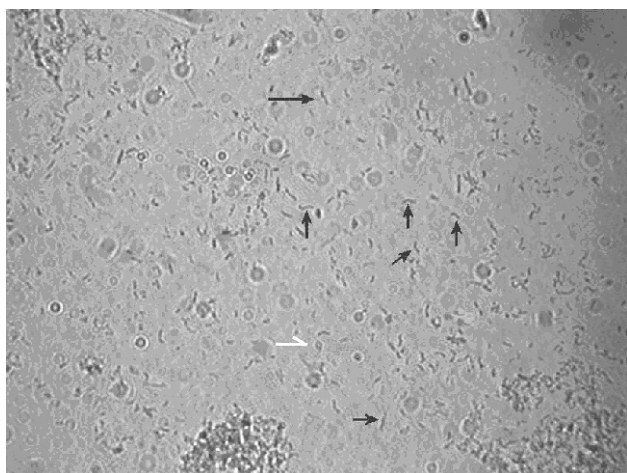


FIGURA 6. Microfotografía de frotis teñido con coloración de Gram de enriquecimientos de suelos en dos muestras. Flecha oscura: bacteria sulfato reductora con forma de vibrio. Flecha blanca: bacteria esporulada.

FIGURA 6. Microphotography of two enriched soil samples. Dark arrow: reduce sulphate bacteria with vibrio feature. White arrow: sporuled bacteria

Análisis molecular

Este tipo de análisis se realizó bajo gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio bajo luz UV. La observación se realizó en la banda correspondiente a la amplificación por PCR del gen *dsr*. Para esto se procedió a:

1. Amplificación por PCR a partir de ADN total extraído de una muestra de suelo
2. Amplificación a partir de Lisis de cultivo puro de *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644
3. Marcador de peso molecular Smart ladder Eurogentec (200 pb)

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Por el criterio adoptado para la selección de puntos estudiados -valores de resistividad- resultó que la mayoría de los suelos analizados correspondieron a arcillas limosas marrones con variable contenido de carbonatos y arena, pertenecientes a las formaciones Libertad y Dolores (30 y 7 puntos, respectivamente). Cabe señalar que estas dos unidades geológicas tienen una extensa distribución superficial en el sur del país y que por lo tanto, están presentes en la mayor parte de la traza del gasoducto. El resto de las unidades geológicas muestreadas fueron la Formación Fray Bentos (2

puntos), la Formación Raigón (3 sitios), el material granular del Granito de La Paz (2 puntos), Arenas del Reciente (1 sitio) y materiales de relleno de balasto (3 puntos). De todos estos, la Formación Raigón presentó diversidad de materiales (desde arenas gruesas a arcillas verdes), los que a su vez mostraron diferencias en sus propiedades físicas y microbiológicas. Así por ejemplo, el valor de pH en las litologías arenosas (pH 5,2) fue bastante inferior a la media de los valores encontrados para el resto de los materiales estudiados (pH 7,8).

Los dos medios de cultivo empleados para las BSR fueron efectivos para determinar su presencia por ennegrecimiento (precipitación de sulfuro de hierro). Sin embargo, los resultados en el Medio 63 con atmósfera gaseosa anaerobia fueron los que mostraron más rápidamente evidencias macroscópicas de crecimiento. En comparación al Medio 63, el Medio lactato fue menos eficiente en la recuperación de las BSR. Por lo tanto, una vez constatado esto en la primera campaña de muestreo, se adoptó el Medio 63 para el resto de los análisis microbiológicos. Las diluciones realizadas permitieron determinar cuáles puntos correspondían a un mayor número de bacterias sulfato reductoras. Se constató la presencia de BSR en un total de 119 de las muestras estudiadas. La abundancia BSR se situó desde 10 células/g hasta un orden de 10^5 células/g. Los cultivos se observaron al microscopio, de forma de constatar la morfología característica de las BSR (vibrios) que por su movilidad facilita la observación de un fresco sumado al olor por la presencia de H_2S .

Respecto a la presencia de BPA, inicialmente se utilizaron las condiciones de cultivo para la búsqueda de *Thiobacillus ferrooxidans* dada su reconocida participación en procesos de biocorrosión (Medio *Thiobacillus*, GERHARDT et al. 1994). No se obtuvieron resultados positivos para ninguna de las muestras de la primera campaña. Dado que este microorganismo se encuentra en suelos de pH ácido, una vez constatado que los pH de los suelos eran levemente ácidos o alcalinos, se decidió dirigir la búsqueda a bacterias fermentadoras de ácido no tan específicas. Por esta razón, se diseñó un medio líquido general para la detección de bacterias fermentadoras productoras de ácido.

Respecto al pH, los suelos analizados tienen valores entre 6,0 - 9,5 a excepción de un punto para el cual las tres muestras presentaron pH promedio de 5,2. Dado que a $pH < 5,5$ los suelos pueden ocasionar una rápida corrosión del metal desnudo, sería conveniente hacer un seguimiento más minucioso de los suelos arenosos de la Formación Raigón. La resistividad registrada para ese tipo de suelos en un punto fue de 1366 ohm-cm, (corresponde la designación del suelo como corrosivo) y el número de BSR encontrado de 10^3 células/g, por lo que es potencialmente riesgoso también para la corrosión inducida por microorganismos (CIM).

Con relación a los suelos alcalinos ($pH > 7$), estos se consideran ambientes no agresivos respecto a la

corrosión química. Sin embargo, aquellos con $pH < 7$ y por lo tanto ácidos, se consideran agresivos e incluso pueden dificultar la polarización de la línea para su protección. Respecto a la corrosión inducida por microorganismos, dado el amplio rango de pH en los que éstos pueden desarrollarse no puede descartarse su acción para ninguno de los casos. En particular, las BSR normalmente pueden crecer entre pH 6–12, y aún pueden mutar para acomodarse a otras condiciones.

En cuanto al contenido de humedad del suelo, dado que el agua es esencial para el desarrollo de los microorganismos también debe tenerse en cuenta. Sin embargo, no es un parámetro que pueda analizarse aisladamente ya que los diferentes grados de agresividad del suelo dependen también de la resistividad del terreno, de su estructura, de las dimensiones de sus partículas constituyentes, de su porosidad y permeabilidad y de su contenido de sales. En nuestro caso el valor más bajo de humedad (4,3%), permitió recuperar BSR, no así el más alto (86,7%). Esto podría explicarse por la complejidad de este sistema y la protección que ejercen las partículas de tierra a los microorganismos, así como a otros factores como la presencia de BSR esporuladas con resistencia a la desecación.

Acerca de los resultados de los análisis químicos, las concentraciones encontradas para sulfato y cloruros son muy bajas lo que no favorece la corrosión química. Sin embargo, la presencia tanto de BSR como BPA no descarta la posibilidad de biocorrosión si se dieran las condiciones favorables.

Finalmente, dado lo laborioso del cultivo de las BSR, el tiempo que insume la preparación de los materiales y el desarrollo vertiginoso que en los últimos años han tenido los métodos moleculares, se buscó optimizar técnicas que permitieran la detección en forma más rápida y sensible de estos microorganismos. Se ajustó la técnica de amplificación por PCR con los primers *dsrAB* y se logró amplificar los genes de la sulfito reductasa desasimilatoria, *dsrAB*, en caldos con cultivos puros de BSR y en ADN total de suelo.

Si bien han sido detectadas BSR en 119 de las 129 muestras analizadas, hasta el momento no se puede correlacionar su presencia con características del suelo u otros parámetros que permitan predecir su potencial de biocorrosión.

Agradecimientos

A la empresa Gasoducto Cruz del Sur por permitir la publicación parcial de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

- ACI (1999) **American Concrete Institute**. ACI-318 Building Code Requirements Restored Concrete
- AWW. **American Water Works** C105 standard NACE Corrosion Basics

- BEECH I.B. & GAYLARDE C.C. (1999) Recent advances in the study of Biocorrosión- an overview. *Revista de Microbiología*, 30, p. 177-190
- GERHARDT P., MURRAY R.G.E., WOOD, W.A. & KRIEG N.R. (1994) **Methods for general and molecular bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- LITTLE B.J., WAGNER P. & MANSFELD F. (1997) Microbiologically Influenced Corrosion. Corrosion Testing Made Easy: Microbiologically Influenced Corrosion. **NACE** p. 273-284.
- PÉREZ-JIMENEZ J.R. & KERKHOF L.J. (2005) Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the Dissimilatory Sulfite Reductase genes (*dsrAB*). *Applied and Environmental Microbiology*. p. 1004-1011.
- PIANZZOLA M. J., M. SOUBES & D. TOUATI. (1996) Overproduction of the rbo gene from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 178, p. 6736-6742.
- PIANZZOLA, M.J. (1996). **Bioquímica y genética de ecosistemas anaerobios. Aspectos genéticos de la tolerancia al oxígeno de la bacteria anaerobia sulfato reductora *Desulfoarculus baarsii***. Tesis de Doctorado Facultad de Química-PEDECIBA. Universidad de la República.
- PRECIOZZI, F; SPOTURNO, J.; ROSSI, P. & HEIZEN, W. (1985). **Carta geológica del Uruguay y Memoria Explicativa a escala 1:500.000**. DINAMIGE. Montevideo.
- ROMANOFF, M. (1957). **Underground Corrosion**, NBS 579, NTS PB 168350, National Bureau of Standards
- THOMAZ J (2002). *Biological Corrosion Failures*. NOVA Chemicals Ltd. From: **ASM Handbook Volume 11, Failure Analysis and Prevention**. 881-890 International Newsletter, 2, p. 1-18.