

0
H 1112
G 11 d

36 990

**Diagnóstico sobre la presencia de fenómenos
de corrosión microbiológica en perforaciones
de explotación de agua ubicadas en
el Valle de Catamarca**

Informe Final

Expte. 2056

Diciembre de 1992



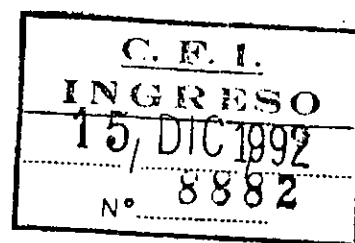
0
H 1112
G 11 d

Miguel Angel Gariboglio
48 N° 1462 (1900) La Plata

T 1125

La Plata, 15 de Diciembre de 1992.

Sr. Secretario General del
Consejo Federal de Inversiones
Ing. Juan José Ciáccera.
S/D.

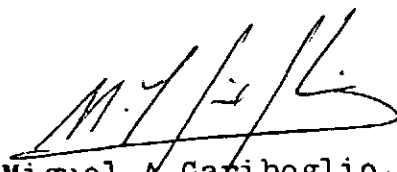


De mi mayor consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., a los efectos de elevarle los Informes Finales correspondientes al Contrato de Locación de Obra, Expte. 2056, tramitado por la Dirección de Cooperación Técnica y referidos a los trabajos realizados en las Provincias de La Pampa y Catamarca.

Esta fecha de entrega corresponde a la prórroga solicitada por nota del 24 de Noviembre del presente año motivada por diversos inconvenientes surgidos en las dos áreas de estudio y que obligaron a un pequeño retraso en la programación de las tareas a realizarse.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para saludarlo con atenta y distinguida consideración:


Miguel A. Gariboglio.
48 N° 1462.
1900. La Plata.

Ref.: Contrato de L.O. Expte. 2056. Departamento de Aprovechamiento de los Recursos. Dirección de Cooperación Técnica.

Colaboró:

Ing. Fernando Torres.

Instituto de Investigaciones de Medio Ambiente y Recursos Naturales (IDIMARN).

Secretaría de Estado de Ciencia y Técnica de Catamarca (SECYTCa).

1.- INTRODUCCION.

Los objetivos son establecer métodos para identificar los problemas de taponamiento, incrustación y bioensuciamiento acorde a las posibilidades con las que se cuentan en el presente. Las metas a alcanzar en un futuro son la difusión de estos problemas y su tratamiento interdisciplinario para lograr un manejo racional del recurso hídrico subterráneo.

En la actualidad, los estudios sobre los fenómenos de bioensuciamiento y CIM han avanzado tanto en lo que se refiere a la identificación diagnóstica de los microorganismos involucrados como en las medidas correctivas y prescriptivas para suprimir la actividad de los mismos.

No obstante, hasta hace poco tiempo atrás el papel que juegan las BRS y otros microorganismos en la corrosión de pozos y cañerías era descartado o poco tenido en cuenta en los servicios de explotación y abastecimiento de agua e industria conexas.

Al menos en nuestro país, parte del problema reside en la formación de técnicos o profesionales ligados al tema ya que generalmente en sus planes de estudio no figuran estos temas; la consecuencia de esto es que ingenieros, geólogos, hidrogeólogos, etc. no perciben los fenómenos biológicos como causantes de los problemas de corrosión y taponamiento en sistemas de captación y distribución de agua. Otro aspecto de esta situación es la falta de elementos y métodos para estudiar adecuadamente la existencia de microorganismos en aguas subterráneas y perforaciones y su incidencia en casos de corrosión y otros problemas.

Lo que se aconseja entonces es realizar un análisis de las causas de corrosión que abarque la química del agua, estableciendo sus características corrosivas o incrustantes mediante el uso de los índices de Ryznar o Langellier, las posibilidades de corrosión electroquímica (conexiones dimetálicas, corrientes parásitas, etc.), análisis microbiológicos para identificar organismos que provocan corrosión o bioensuciamiento, inspección del encamisado y los filtros del pozo mediante el uso de un aparato de T.V., e inspección de corrosión o debilitamiento estructural en los componentes metálicos de la bomba.

La prevención del bioensuciamiento y el correcto diagnóstico de los problemas de taponamiento y corrosión dependían de una identificación confiable del bioensuciamiento y sus causas.

Las causas biológicas o no biológicas que originan los procesos de incrustación, bioensuciamiento y corrosión no siempre son fácilmente distinguibles, ya que, en la mayoría de los casos existe una interacción de las mismas.

Por lo tanto es conveniente considerar también los análisis químicos de la incrustación y un análisis del comportamiento hidráulico de la perforación y la bomba; ésta última es un buen indicador de la corrosión microbiana ya que acelera su desgaste y reduce su eficiencia la que suele manifestarse disminuyendo la producción a valores de abatimiento normales. Otro indicador es el consumo de energía eléctrica o de combustible que se podrán calcular mensualmente y considerar junto con los consumos previstos según la eficiencia de la perforación.

La combinación de datos operacionales con el conocimiento de los efectos del bioensuciamiento puede usarse para un diagnóstico precoz, el cual será confirmado por análisis posteriores de agua, depósitos y otras muestras.

Uno de los síntomas que indican condiciones corrosivas en la perforación es la existencia de SH_2 ; como todo SH_2 en aguas subte-

rráneas reconoce un origen microbiano, se puede presumir la presencia de BRS cuando el olor a sulfuro de hidrógeno está presente. Este compuesto puede detectarse por su particular olor y cuantificarse utilizando los juegos de reactivos comerciales existentes; los análisis deben hacerse "in situ" debido a que el SH_2 puede perderse con facilidad antes de ser cuantificado.

La confirmación de la presencia de BRS puede realizarse usando medios de cultivo apropiados para tal fin; no existe medio de cultivo que pueda recuperar todas las BRS presentes debido a que éstas tienen requerimientos nutricionales diversos como ya se señalara.

La mayoría de los caldos de cultivo líquidos estaban diseñados en base al uso del lactato de sodio como fuente de carbono; hoy se conocen requerimientos distintos para otros géneros de BRS aislados más recientemente, por ejemplo, el uso del acetato de sodio.

También se deben usar caldos de cultivo que excluyan totalmente el oxígeno y, de ser posible, que tengan en Eh menor a -150 mV para lo cual la fórmula de los mismos incluye algún agente reductor (por ejemplo ácido ascórbico o tioglicolato de sodio).

Existen una variedad de medios de cultivo y técnicas de enumeración y una buena referencia sobre éstas se pueden encontrar en Postgate, J.R. (1984) y Pfennig, N.; Widdel, F. y Trüper, H. (1981).

Otro de los problemas en la enumeración o detección de las BRS es el tiempo de incubación requerido para visualizar los cultivos positivos; la mayoría de los autores aconseja incubar los caldos hasta 21 días antes de informar un resultado negativo.

Por esta razón se han estudiado y desarrollado otras técnicas que permiten acortar los tiempos necesarios para detectar las BRS; Gaylarde y Cook (1987) informan sobre una técnica de detección rápida utilizando antisueros específicos.

Una revisión sobre varios métodos es la realizada por Tatnall y colaboradores (1988); este estudio examina seis métodos diferentes; tres de ellos son métodos de cultivos y los otros se refieren a técnicas de detección directa de BRS.

Los métodos de cultivos son los sugeridos por el American Petroleum Institute en su Recommended Practice N°38 (API RP-38); la técnica de siembra en agar profundo desarrollada por Biosan Laboratories que es una ligera modificación del anterior y la de tubos de agar fundidos y enfriados en la que se usa triptona como único nutriente y sulfito de sodio como agente reductor.

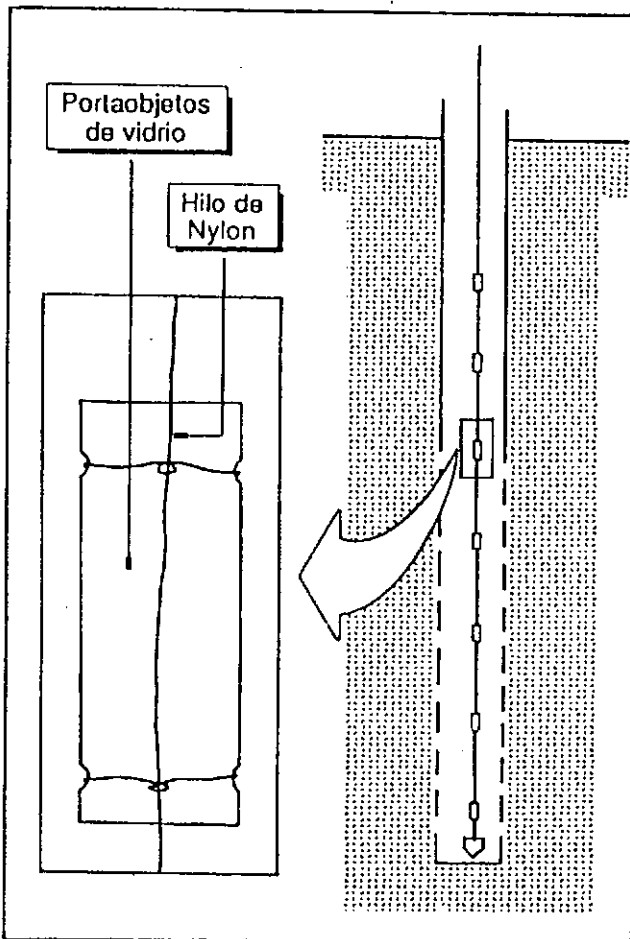
Los métodos directos comprenden ensayos que miden la cantidad de adenosín - trifosfatos (ATP) en la muestra y que se mide por una reacción fotoquímica utilizando un fotómetro; otro método basado en anticuerpos específicos marcados con un compuesto fluorescente, que se fijan en sitios específicos de la superficie celular (Epifluoresce / Cell Surface Antibody - ECSA) y desarrollado por Pope, D.H. y colaboradores en el Rensselaer Polytechnic Institute. El último método directo consiste en anticuerpos que actúan con una enzima constitutiva de las BRS, la adenosín - 5 fosfosulfato reductasa (APS) que si está presente en la muestra hace que se desarrolle un color en la solución el que es relacionado con la cantidad de BRS según una escala de color que se adjunta con el juego de reactivos.

Para las bacterias relacionadas con la precipitación del hierro y/o manganeso existen diversos medios de enriquecimiento y técnicas para la observación directa de éstas bacterias en muestras de agua; excelentes revisiones de los mismos se pueden encontrar en Cullimore y Mc Cann (1977), Hanert (1981 a y b), Smith (1984 b) y

en los Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1985).

Muchas de las metodologías anteriormente descritas necesitan, a veces, una infraestructura de laboratorio que dificulta su implementación; otras son difíciles de realizar como trabajos a campo. Un método accesible y de fácil ejecución para obtener muestras de bacterias adheridas a superficies, es el descrito por Wojcik y col. 1986; este procedimiento se llama "del portaobjetos sumergido" y consiste en colocar varios de ellos dentro del pozo y dejarlos por un tiempo variable. Si bien Hasselbarth y Ludemann (1967) recomendaron que el tiempo óptimo fuera de 10 a 20 días, este autor encuentra que con siete días de exposición se puede coleccionar un buen material.

Método del portaobjeto sumergido para obtener muestras de bacterias adheridas a superficies



(Tomado de: Wojcik, W. and Wojcik, M. (1986). Monitoring Biofouling - Int. Symp. on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. A.W.W.A. p.p. 109-119)

Los portaobjetos son de vidrio y ubicándolos a diferentes profundidades dentro de la columna de agua se puede obtener una interesante información al mismo tiempo (ver figura). Los portaobjetos pueden colocarse en el interior del pozo o en el piezómetro localizado en el prefiltro de grava; la instalación de estos piezómetros son exigidas según normas de varios países europeos incluyendo Polonia y Alemania. Transcurrido el tiempo de exposición; el portaobjetos se retira, se seca y fija a la llama y se tiñe con un colorante; en el examen microscópico de los mismos podrán observarse bacterias filamentosas; este método es similar al descrito mas adelante en las técnicas utilizadas en nuestro país.

Otro método simple de realizar es una variante de la "Prueba de Estabilidad Relativa" utilizado en estudios de contaminación orgánica en aguas superficiales. El colorante azul de metileno se agregaba a una botella sellada que contenía la mezcla de agua; los microorganismos de la muestra agotan el oxígeno disponible debido a su metabolismo respiratorio. Las enzimas de hidrogenasas liberan

hidrógeno que son fijados por el colorante reduciéndolo a su forma incolora.

El tiempo transcurrido para que el colorante se decolore está relacionado al grado o tasa respiratoria la cual, a su vez está en relación a la concentración del material orgánico (fuente de energía) o nivel de la población microbiana.

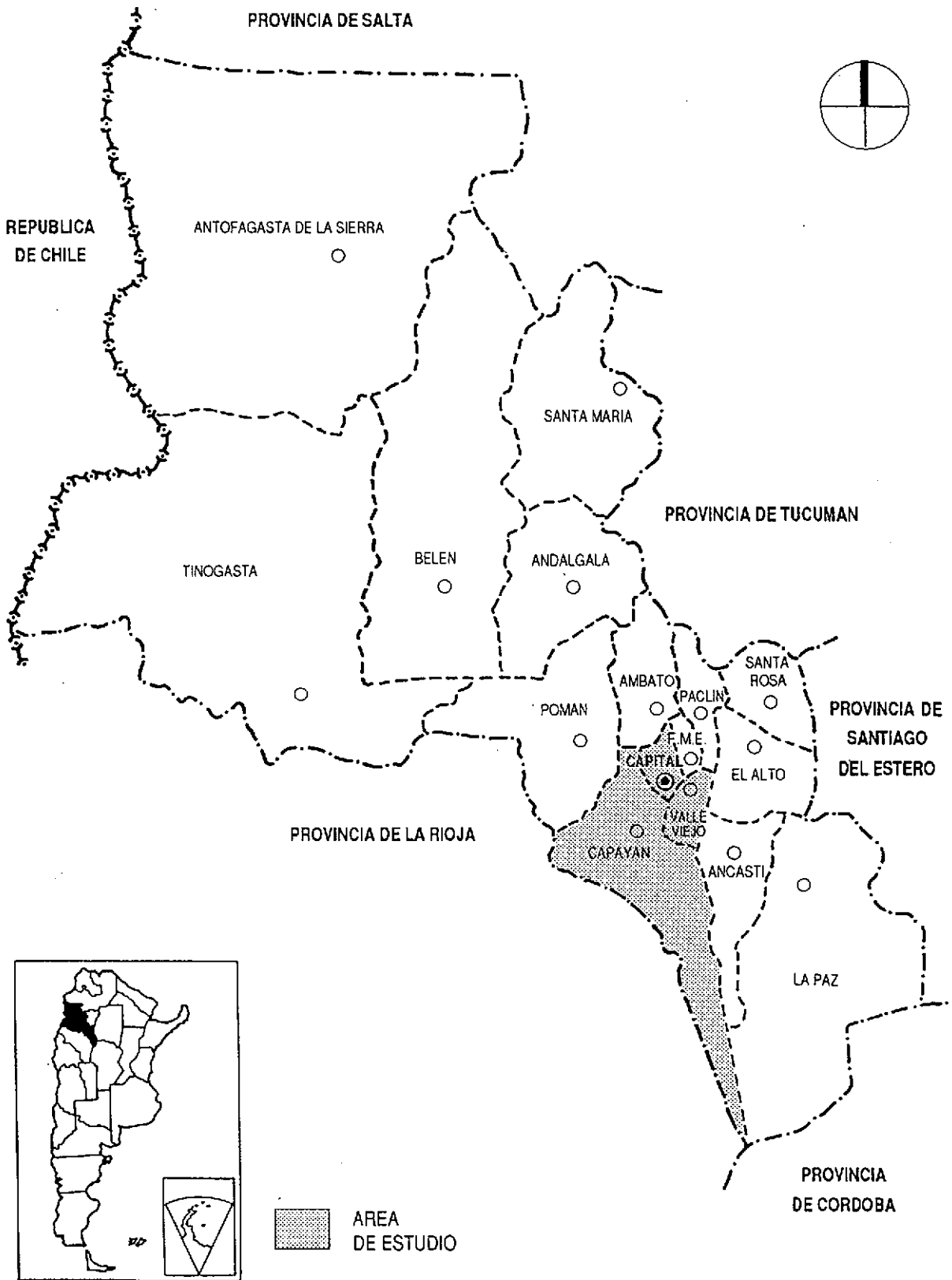
La modificación sugerida a la prueba descrita y utilizada en muestras de agua subterránea es la llamada "Potencial Reductor Biológico". Puede usarse un envase con tapa a rosca o utilizar un

corcho, se llena con la muestra de agua y se agrega una gota de azul de metileno como reactivo; se sella y se incuba en refrigerador. La muestra de agua puede reflejar, aunque no con gran precisión pero sí como un indicador, la actividad biológica existente en el pozo.

El potencial de bioensuciamiento está relacionado inversamente al tiempo requerido para la decoloración del azul de metileno; si se observan cambios significativos en el tiempo requerido para la decoloración entre muestras tomadas en semanas o meses, éstos reflejarían indirectamente el aumento o no de actividad biológica en el pozo.

El verdadero valor de este ensayo es que es muy simple, barato y puede ser realizado por personal sin mayor experiencia.

En esta publicación se sugieren técnicas utilizadas en los trabajos descritos para nuestro país que han resultado confiables, que son de fácil implementación e interpretación, permitiendo de esta manera una posibilidad diagnóstica acorde a las disponibilidades presentes, tanto financieras como técnicas. X



PROVINCIA DE CATAMARCA

2.- OBTENCION DE MUESTRAS Y ANALISIS BACTERIOLOGICOS.

Los análisis bacteriológicos necesarios para la detección de los diferentes grupos bacterianos involucrados en fenómenos de incrustación y CIM se realizan generalmente sobre dos tipos de muestras:

- * muestras de agua bombeada.

- * muestras de incrustaciones obtenidas en superficies de tuberías o bombas.

Para iniciar el estudio bacteriológico se deben contemplar de antemano todos los elementos necesarios conforme el tipo de muestra que se vaya a analizar y considerar si las muestras serán procesadas:

- * "in situ"

- * se colectarán y enviarán a un laboratorio para ser analizadas.

Para obtener resultados confiables debe considerarse que en las muestras de agua bombeada las condiciones ambientales existentes en el acuífero se ven drásticamente alteradas y que la construcción de los pozos dificultan el uso de otros métodos de colección de muestras que eviten en lo posible estas alteraciones. Por otro lado, si las muestras provienen de incrustaciones o tubérculos debe evitarse la desecación de las mismas; por estas razones es imprescindible definir previamente las siguientes etapas:

- * obtención de la muestra en forma adecuada.

- * conservación de la muestra desde el momento de su obtención hasta su procesamiento.

- * utilización de recipientes y utensilios adecuados, medios de cultivos apropiados y exámenes microscópicos con fines de identificación.

Muestras de agua bombeada

El pozo deberá contar con un grifo que permita coleccionar la muestra evitando salpicaduras u otros inconvenientes. Deberán quitarse cortachorros u otros aditamentos de goma u otro material.

Se abrirá el grifo, se dejará correr el agua durante 1 o 2 minutos y, disminuyendo el caudal del chorro se coleccionará la muestra.

En esta etapa, uno de los síntomas de posible actividad bacteriana que puede observarse es la aparición de color ocre o marrón oscuro en los primeros chorros.

Muestras enviadas a distancia.

En este caso la muestra se recoge en un frasco de vidrio transparente, (preferentemente de vidrio borosilicatado) de boca ancha, estéril, de 200 - 250 ml de capacidad.

Un recipiente de alternativa que puede resultar útil debido a que a veces no se puede contar con posibilidades de frascos de vidrio estériles, o por rotura de los mismos son los utilizados para coleccionar muestras de orina que se consiguen con cierta facilidad aún en poblaciones pequeñas y alejadas y que son estériles y descartables.

El frasco se destapa evitando tocar con las manos su tapa y boca y se llena hasta las 2/3 partes de su volumen total. Se vuelve a tapar y los análisis deberán practicarse no transcurriendo más de 1-2 horas de obtenida la muestra.

Se rotularán consignando lugar de extracción, fecha, hora y algún dato de interés (turbidez, coloración, etc.) si fuera necesario.

Si se necesitara procesarlas dentro de las 24 horas de obtenidas, las muestras deberán ser alojadas en un contenedor, refrigerarlas con hielo (no hielo seco) para tratar de mantenerlas a 4 °C aproximadamente evitándose pérdidas o derrames en su traslado.

Inconvenientes

Ya por 1940 Zo Bell advirtió sobre las alteraciones que sufren las poblaciones bacterianas contenidas en recipientes que se envían a distancia. El incremento de bacterias observados cuando transcurre más de 24 hs entre la colección y procesamiento de la muestra se interpreta como el resultado de la concentración de nutrientes en la interfase agua/vidrio y se sabe que a mayor relación superficie/volumen del frasco de muestreo, mayor es el incremento en el número de bacterias.

También se sabe que cuando la temperatura, aún en pequeños incrementos, facilita el crecimiento bacteriano alterando sustancialmente su densidad original.

Muestras analizadas "in situ".

Realizar los análisis bacteriológicos no bien obtenida la muestra evita las alteraciones señaladas precedentemente y produce resultados más confiables. Especialmente en el caso de las BRS, anaeróbicas estrictas, se evita la oxigenación de la muestra que podría dar resultados negativos para este grupo cuando en realidad estaban presentes en la muestra original.

Las técnicas y medios de cultivo aconsejados serán descriptos más adelante.

Muestras de incrustaciones o tubérculos

Las muestras deberán ser retiradas no bien se extraigan las tuberías o bombas. Para desprenderlas de la superficie se utilizará una pequeña espátula metálica que se flameará con alcohol evitando tocar con los dedos el material así recogido. Es importante obtener fotografías de caños o bombas ya que el aspecto de estos materiales y algunos signos de su deterioro pueden orientar respecto al origen biológico de los mismos.

Muestras enviadas a distancia.

Las muestras ya colectadas deberán colocarse en un frasco de vidrio estéril, de boca ancha o en uno de plástico, estéril, descartable (del tipo utilizado para coleccionar muestras de orina) y se mantendrán en un estado de humedad elevada. Para ello se sumergen inmediatamente en el agua proveniente de la perforación de la que provienen en cantidad suficiente para cubrirlas totalmente. Se rotularán asentando los datos de lugar, fecha y alguna observación que ayude a interpretar mejor los resultados (consistencia, color, etc.).

La conservación y traslado requiere los cuidados descriptos para muestras de agua bombeada remitidas a distancia.

Llegadas a laboratorio una porción de las mismas ($\pm 10g$) es colocada en un mortero estéril, se homogeneizan agregando agua destilada estéril y se deslién con el pilón del mortero.

Habiéndose logrado una suspensión homogénea, una alícuota de la misma se inocula en los diferentes medios de cultivo y otra alícuota puede disponerse para observación microscópica.

Muestras analizadas "in situ".

De procesarse las muestras no bien extraídas se evitan los resultados falso-negativos para BRS que por su anaerobiosis estricta son las más afectadas por la oxigenación de la muestra. Las técnicas y medios de cultivos aconsejados serán descriptos más adelante.

Otros análisis y observaciones.

Es conveniente prever la recolección de muestras de incrustaciones o tubérculos para efectuar análisis químicos. También es importante comprobar el estado del metal debajo de incrustaciones o tubérculos; cuando la corrosión es de origen biológico éste suele presentarse brillante debido a la acción de un verdadero "pulido químico" producido por la liberación de SH_2 proveniente del metabolismo de las BRS.

Técnicas y medios de cultivos

La diferencia obvia entre la corrosión e incrustación bacteriana en perforaciones con aquellas que revisten otro origen es la presencia de bacterias involucradas en estos fenómenos.

Los grupos bacterianos que suelen estudiarse desde el punto de vista cuali-cuantitativo son los siguientes:

- * bacterias aerobias totales (BAT).
- * bacterias precipitantes, no oxidantes, del hierro (BPNM).
- * bacterias reductoras de sulfatos (BRS).
- * bacterias precipitantes y oxidantes del hierro (BPOM).

Análisis de muestras de agua provenientes de perforaciones

Análisis Cuantitativos

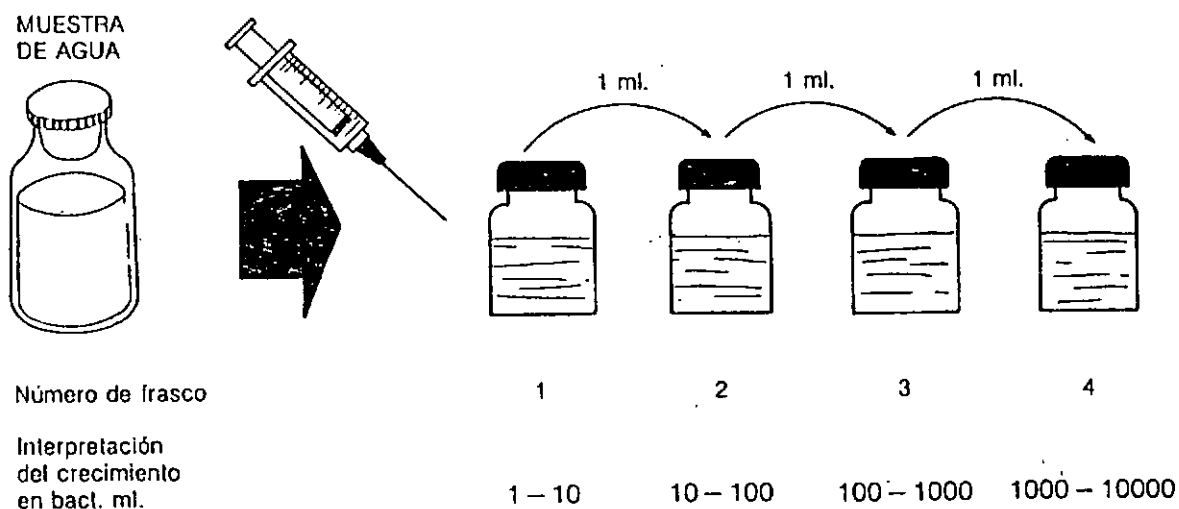
Se utiliza la técnica de dilución por extinción que consiste en inocular una serie de frascos tipo antibiótico que contienen 9 ml del medio de cultivo de composición acorde al grupo bacteriano que se quiera cuantificar.

Se obtiene 1 ml de la muestra usando una jeringa descartable, estéril, de 1 o 2 ml de capacidad.

Se inocula el primer frasco, sin retirar la aguja se agita el mismo, se invierte y se retira 1 ml que se inocula en el 2° frasco.

Con una nueva jeringa, se retira 1 ml del frasco N° 2, previamente agitado, y se inocula el frasco N° 3 y así sucesivamente, utilizando una nueva jeringa para cada frasco.

Técnica de recuento de bacterias por el método de dilución por extinción.



Si no existe información previa sobre cantidad de bacterias/ml de la muestra suelen sembrarse 5 frascos.

La manifestación de crecimiento bacteriano es la turbidez del medio de cultivo que se observa comparando con un frasco sin inocular y por transparencia (el medio puede virar al amarillo o rojizo-amarillento).

Una vez inoculado, los frascos rotulados convenientemente, se llevan a estufa de cultivo a 35°C durante 5 días, efectuando lecturas diarias para observar los que manifiestan desarrollo positivo.

El tiempo de lectura se ajustará dentro de este periodo de 5 días teniendo en cuenta aquel a partir del cual no se observan modificaciones posteriores en el caldo de cultivo.

Caldos de cultivo utilizados

Para cuantificar bacterias aerobias, heterotróficas, mesófilas, viables (BAT) se utiliza el caldo rojo de fenol glucosa modificado diluido 1:2.

Para BRS se utiliza el medio de cultivo que responde a la fórmula del medio C de Postgate modificado.

Ya rotulados e inoculados, se llevan a estufa de cultivo a 35°C y se incuban durante 21 días como máximo efectuando lecturas diarias.

Si la cantidad de BRS en la muestra es grande la positividad puede manifestarse antes, a veces hasta en 48 horas.

Un frasco positivo es aquel que presenta un ennegrecimiento del mismo que puede observarse como un precipitado negro (SFe) o como un espejado en las paredes del frasco.

Para BPNM se utiliza el caldo citrato de hierro amoniacal, de aspecto amarillo-verdoso. Ya rotulados e inoculados se incuban a 35°C durante 21 días con observaciones diarias.

La presencia de este grupo bacteriano se manifiesta por la aparición de un precipitado color ocre y un sobrenadante incoloro y turbio.

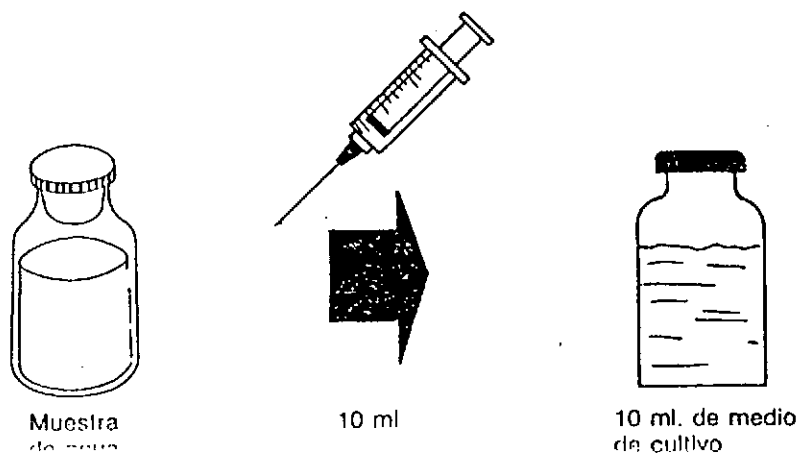
Expresión de resultados

Empleando la técnica de dilución por extinción los resultados se expresan como bacterias/ml. Por ejemplo: si los frascos inoculados presentan positividad hasta el frasco N°4 el resultado se expresa como 1000-10000 bact/ml o también 10^3-10^4 bact/ml.

Análisis cualitativos

Generalmente, las BRS y las BPNM suelen encontrarse en menos cantidad que las bacterias aerobias heterotróficas (BAT) por lo que suele aconsejarse efectuar análisis cualitativos para demostrar su presencia o ausencia.

Análisis cualitativo para bacterias precipitantes del hierro o bacterias sulforreductoras.



En este caso se utilizan frascos de 20-25 ml de capacidad que contengan 10 ml del medio de cultivo apropiado.

Una vez rotulados convenientemente se extrae una muestra de agua con jeringa descartable estéril de 10 ml de capacidad, se eliminan las burbujas de aire que pudieran quedar y se inoculan los frascos empleando, en este caso, la misma jeringa.

Los medios de cultivo a utilizarse son el medio C de Postgate para las BRS y el citrato de hierro amoniacal para las BPNM.

Temperatura y tiempo de incubación así como la manifestación de positividad son iguales a lo descrito en el punto anterior.

Expresión de resultados

En el caso de los análisis cualitativos los resultados se expresan como:

+ = presencia

- = ausencia

Como observación puede notarse el período de tiempo transcurrido entre la inoculación y la aparición de positividad en los frascos (por ejemplo: + 8 días) ya que menores tiempos indican mayor cantidad o actividad de las bacterias en la muestra original

Análisis cualitativos para BPOM

Este grupo bacteriano presenta dificultades para ser detectado mediante el uso de medios de cultivo.

Por lo tanto, se utiliza una técnica que aprovecha la facultad que tienen estas bacterias de adherirse a superficies sólidas.

Se prepara un frasco de boca ancha, de tapa esmerilada (preferentemente Pyrex) de 200-250 ml de capacidad.

En su interior se coloca un portaobjetos perfectamente lavado, enjuagado y seco y se esteriliza el conjunto en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

En el momento de obtener la muestra de agua bombeada, se destapa evitando tocar la boca y la tapa del frasco con las manos, y se recoge un volumen de agua que llene las 2/3 partes del volumen del frasco tapando inmediatamente el mismo.

Se rotula indicando el lugar, día y cualquier otra observación (turbidez o color en la muestra). Se deja a temperatura ambiente durante 3-4 semanas.

Transcurrido este tiempo, se extrae el portaobjetos, se lo seca y fija a la llama y se tiñe con una solución de cristal violeta al 0,1% durante 3 minutos. Se lava el colorante y se seca a calor suave, examinándose con microscopio óptico utilizando aceite de inmersión.

Expresión de resultados

En caso de presencia de este grupo se observarán filamentos característicos en el caso de Sphaerotilus-Leptothrix o pedúnculos retorcidos en forma de trenza típicos de Gallionella así como otras formas filamentosas características de otros géneros.

Después de recorrer varios campos ópticos y de acuerdo a la densidad de formas filamentosas obtenidas puede informarse como:

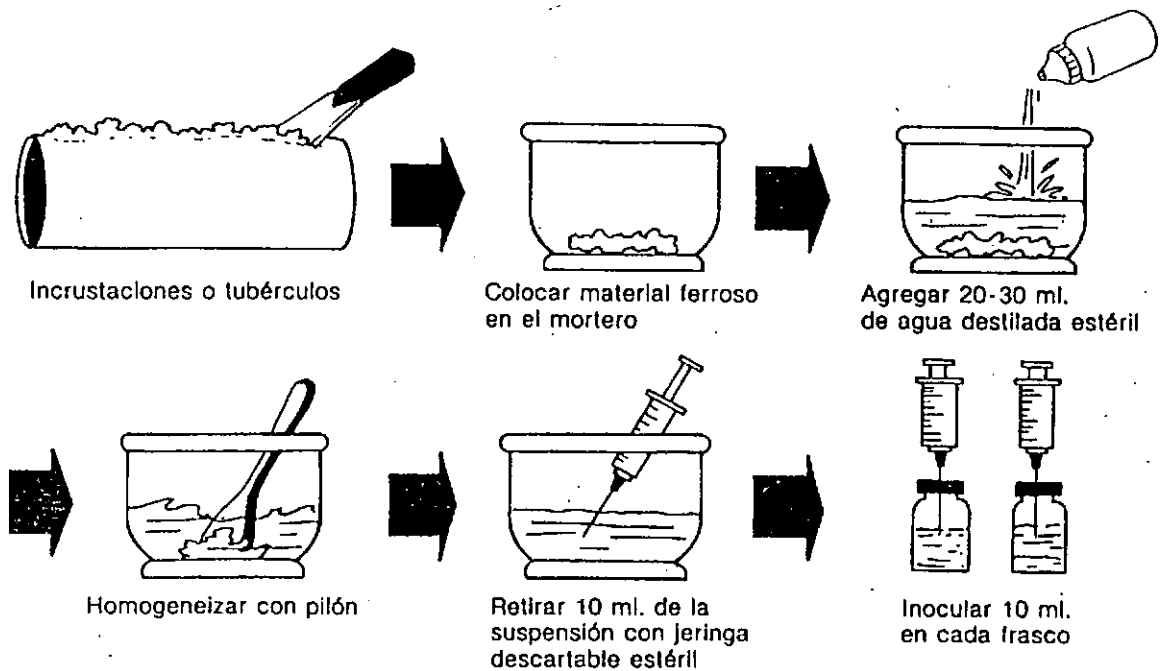
Escasos, abundantes o regular cantidad de formas filamentosas.

El reconocimiento de los filamentos requiere un entrenamiento previo al observador para poder distinguir las diferencias morfológicas que indiquen frente a que grupo está.

Análisis bacteriológicos en incrustaciones y tubérculos de tuberías y bombas

Como ya se dijera es deseable obtener estas muestras no bien se

extraiga el equipo de bombeo en otro tramo de tubería para evitar la desecación de la muestra.



Toma de muestra, tratamiento de la misma e inoculación en medios de cultivo para detectar presencia o ausencia de BRS y BPNH

Con una espátula flameada con alcohol se retiran 10-20 gramos del material ferroso húmedo y se deposita en un mortero previamente esterilizado. Se agrega cantidad suficiente de agua destilada estéril hasta lograr una suspensión y se muele el material con el mango del mortero.

De esta suspensión se toman 10 ml con jeringa descartable estéril con aguja de 40x8 y se inoculan en los frascos que contienen los medios ya descritos para BRS y BPNM. La temperatura y tiempo de incubación así como la expresión de resultados es igual que para análisis cualitativos de muestras de agua bombeada.

3.- TAREAS REALIZADAS EN PERFORACIONES DEL VALLE DE CATAMARCA.

Antecedentes.

En la Provincia de Catamarca, la escasez de cuerpos de agua superficial ha motivado el empleo de aguas subterráneas con fines de riego, consumo humano e industrial.

Desde 1985 se tiene conocimiento de la disminución del rendimiento específico en perforaciones de un campo de pozos para riego en el área de Tres Quebrachos, Huillapima y en algunas perforaciones de Obras Sanitarias de Catamarca lo que sugería que se estaba frente a los siguientes problemas:

- * Defectos constructivos de las perforaciones.
- * Efectos corrosivo-incrustantes debido a las características químicas del agua.
- * Actividad bacteriana relacionada a los fenómenos de incrustación y corrosión asistida microbiológicamente.

En un primer momento se realizaron tareas con participación de la Dirección de Hidráulica de Catamarca y la Cátedra de Perforaciones y Sondeos de la UNCa, asociada esta última al Centro de Investigaciones de Recursos Hídricos, IDIMYCA.

Posteriormente, en 1987, se realizaron consultas al CFI sobre metodologías analíticas aplicadas por este organismo en tareas realizadas en Caleta Olivia, Santa Cruz. Se dicta también, con apoyo del CFI, un Seminario de "Corrosión microbiológica en sistemas de captación de aguas subterráneas" que se dicta en la UNCa.

Se comienzan entonces tareas diagnósticas en el Valle de Catamarca utilizando técnicas y caldos de cultivo aportados por el CFI y se incorpora la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCa. Esta última tuvo a su cargo las observaciones microscópicas de los portaobjetos preparados para tal fin y las microfotografías incluidas en este informe fueron obtenidas por la licenciada Susana Pernasetti de Vera del Laboratorio de Microbiología Agraria.

Mayor información sobre estos trabajos pueden encontrarse en: Factor, Giménez y otros. 1987.

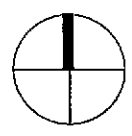
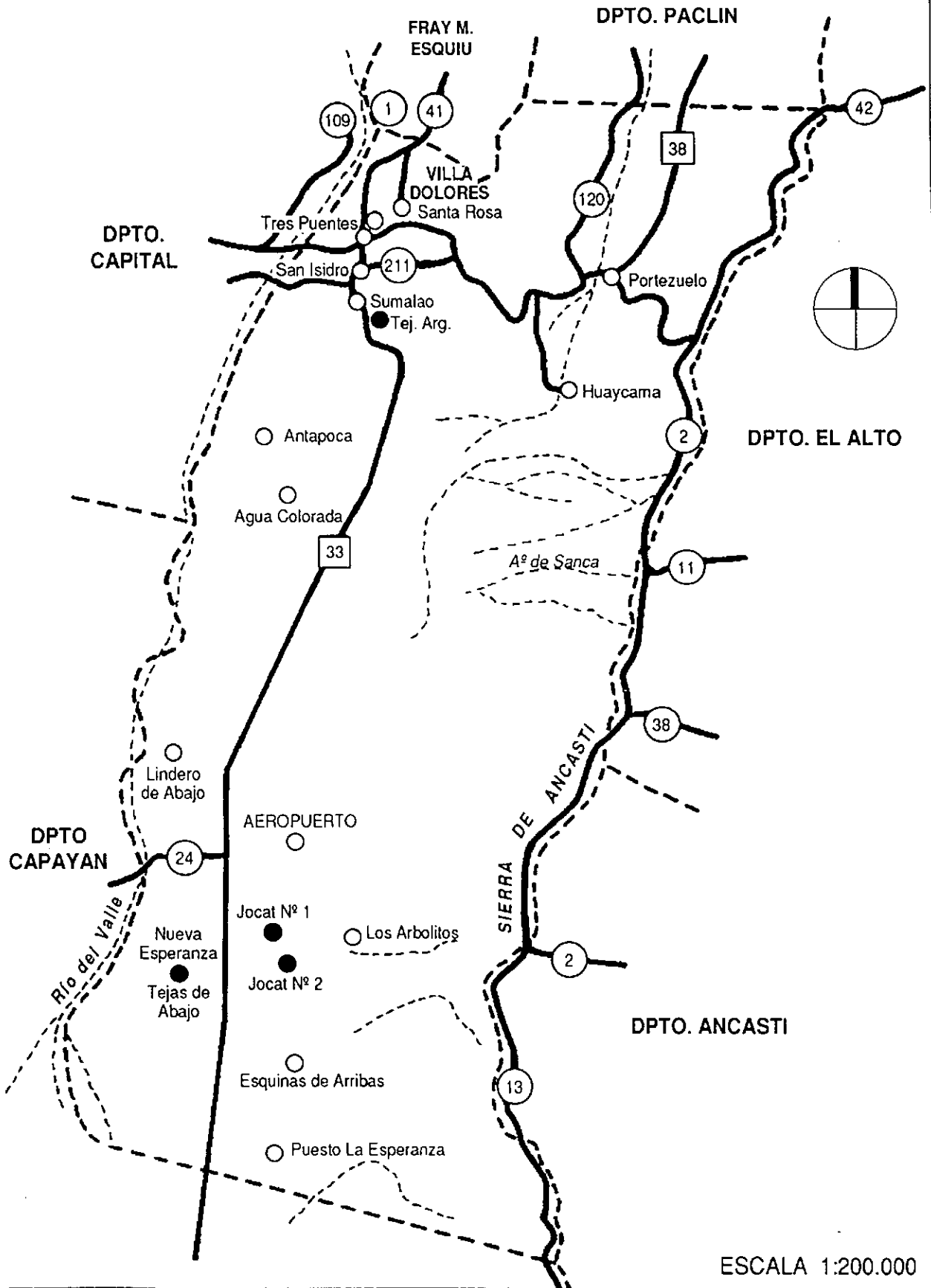
En 1992, se solicita nuevamente la colaboración del CFI para realizar tareas diagnósticas de apoyo al Proyecto "Identificación, prevención y corrección de daños bacterianos a perforaciones"; se realizaron entonces análisis de muestras de aguas provenientes de perforaciones algunas de las cuales coinciden con aquellas muestreadas en el período 1987-1990.

Las técnicas y caldo de cultivo utilizados son los descriptos en este informe; se incorpora al ingeniero Fernando Torres del Instituto de Investigaciones del Medio Ambiente y Recursos Naturales (IDIMARN) de la SECYTCa que tiene a su cargo las tareas de obtención de muestras, análisis bacteriológicos y relevamiento de parámetros ambientales.

Area de trabajo y perforaciones estudiadas.

El área de trabajo abarca los departamentos de Valle Viejo, Capayán y Capital y se relevaron con fines diagnósticos 21 perforaciones del Valle de Catamarca según la siguiente distribución:

DEPARTAMENTO VALLE VIEJO



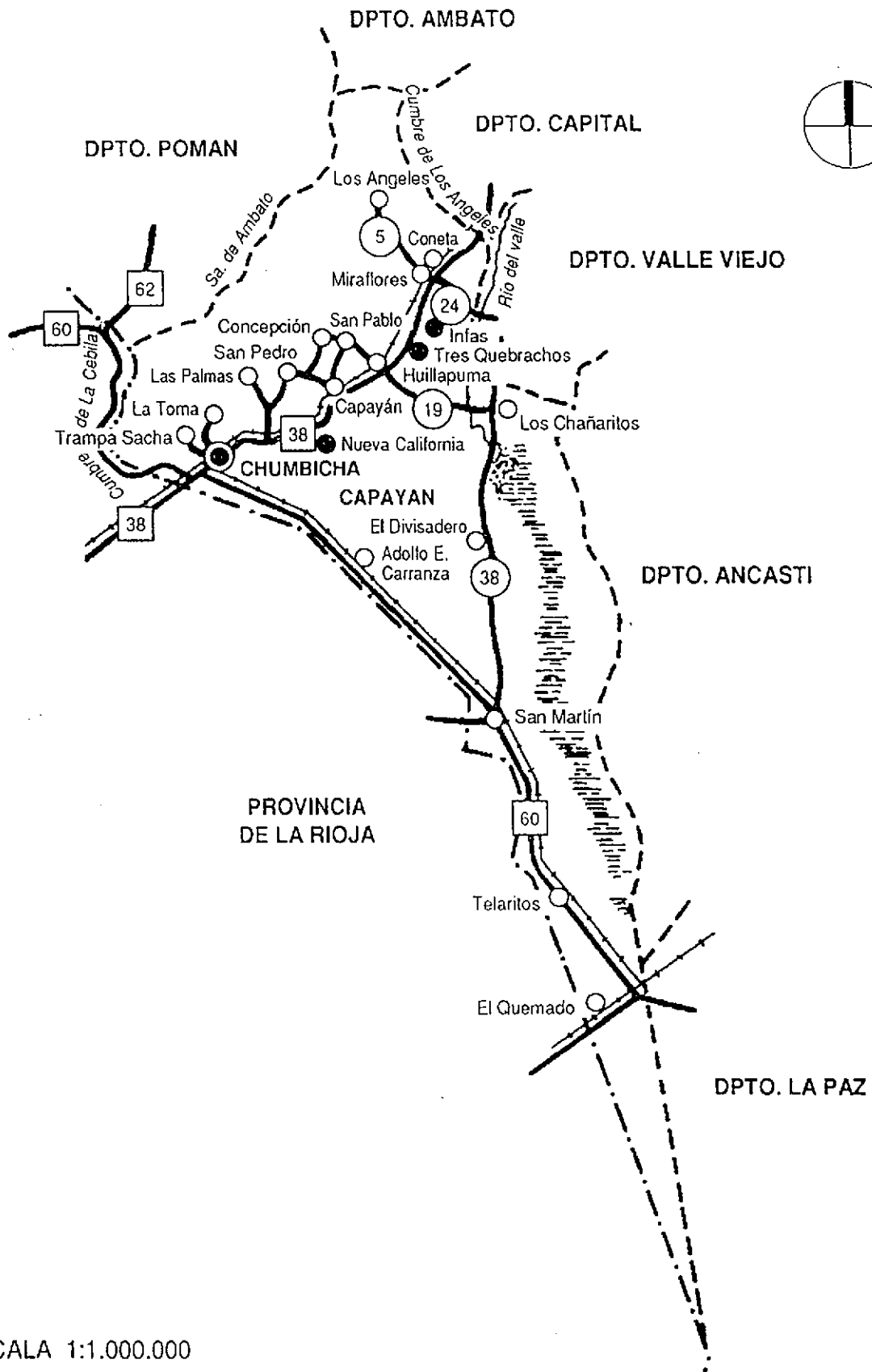
ESCALA 1:200.000

PROVINCIA DE CATAMARCA

Cantidad de pozos	Ubicación	Localidad	Departamento
2	JOCAT SA.	Las Tejas	Valle Viejo
5	Nueva Esperanza	Las Tejas	Valle Viejo
2	Tejidos Argentinos	Sumalao	Valle Viejo
2	INFAS SA.	Cnia. del Valle	Capayán
4	Tres Quebrachos	Huillapima	Capayán
4	Nueva California	Chumbicha	Capayán
2	Catamarca Rioja Refr.	Capital	Capital

Nota: de los dos pozos de Capital no se disponen de datos por ser obtenidas las muestras en días previos a la confección de este informe.

DEPARTAMENTO CAPAYAN



ESCALA 1:1.000.000

PROVINCIA DE CATAMARCA

4.- RESULTADOS OBTENIDOS.

Un detalle de los recuentos de BAT, detección de BRS y BPNM y parámetros ambientales relevados se pueden encontrar en las planillas de datos que figuran en el apéndice de este informe.

Análisis bacteriológicos.

La mayoría de las 21 perforaciones estudiadas denotaron actividad biológica pero la de Tres Quebrachos N°2, Nueva California N°6, Jocat N°1 y 2 y Tejidos Argentinos N°1 y 4 presentaron valores de 10^5 BAT/ml y los análisis para detectar presencia de BRS y BPNM fueron positivos siempre en todas las muestras obtenidas de esas perforaciones.

Con respecto a las bacterias filamentosas, BPOM fueron observadas en muestras de Tres Quebrachos N°4, 7 y 8, Nueva Esperanza N°9, Nueva California N°6, Jocat N°1 y Tejidos Argentinos N°1 y 2.

Variables ambientales.

Las variables ambientales relevadas en las muestras de agua bombeadas fueron temperatura, pH y Eh. La mayoría de los valores encontrados se hallan entre los que permiten el desarrollo bacteriano y en la mayoría de los casos en un rango de valores favorable para las bacterias relacionadas al metabolismo del hierro.

No obstante, se registran valores que varían con cierta amplitud por ejemplo:

Ubicación	Temp. (°C)	pH	Eh
Nueva California N°6	33,2	8,8	164
Tejidos Argentinos N°1	21,2	7,0	-0,82
Nueva Esperanza N°3	23,4	7,4	-0,79
Nueva Esperanza N°9	24,0	7,4	---

Las mediciones de Eh fueron realizadas mediante un ORP Tester, Hanna Instruments y los valores de pH mediante un pH Meter de Hanna Instruments.

5.- OTRAS TAREAS.

* Entrenamiento de personal.

Se entrenó personal del IDIMARN en tareas de obtención de muestras a campo, siembra "in situ" de las muestras de agua en los caldos de cultivo apropiados y lectura e interpretación de resultados. Se diseñaron planillas para anotación de resultados de cada perforación con la perspectiva de ir formando una base de datos.

* Dictado de un seminario..

Se dictó un seminario durante los días 15 y 16 de Octubre de 1992 con la participación del Ing. Adolfo Factor (SECYTCa) y el Ing. Fernando Torres (IDIMARN). Concurrieron productores agrícolas de la zona, de la Dirección de Hidráulica y de Catamarca-Rioja Refrescos SA. en cuyo salón auditorio se desarrollaron las clases.

* Divulgación.

Se realizó una nota por el canal de TV local explicando algunos aspectos técnicos y la cooperación CFI-SECYTCa.

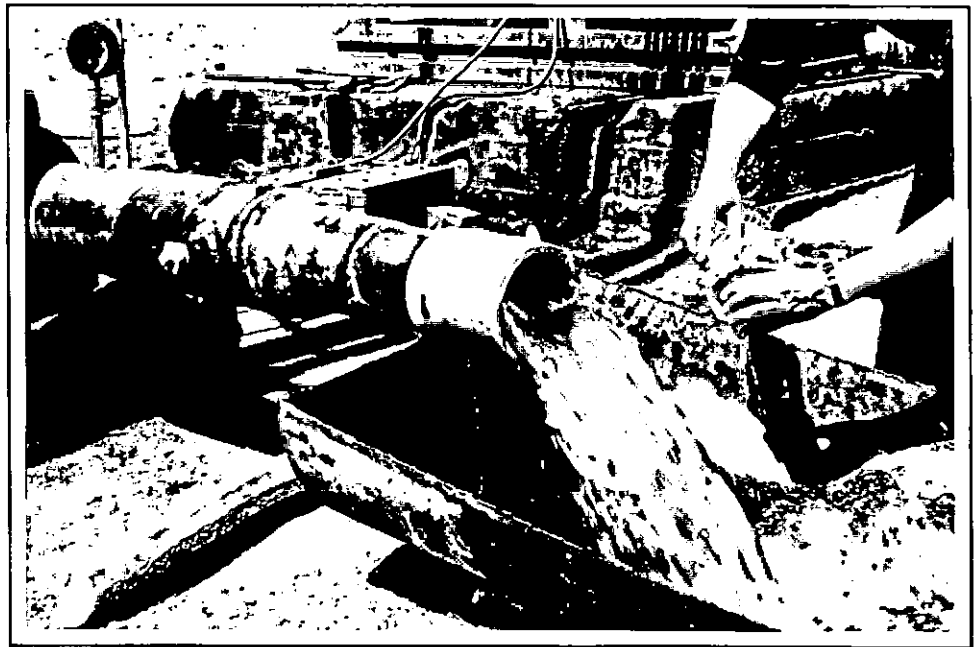


FOTO 1. Típico síntoma de agua coloreada en una perforación de Tres Quebrachos. Se detectó presencia de BRS, BPNM y 105 BAT/ml.

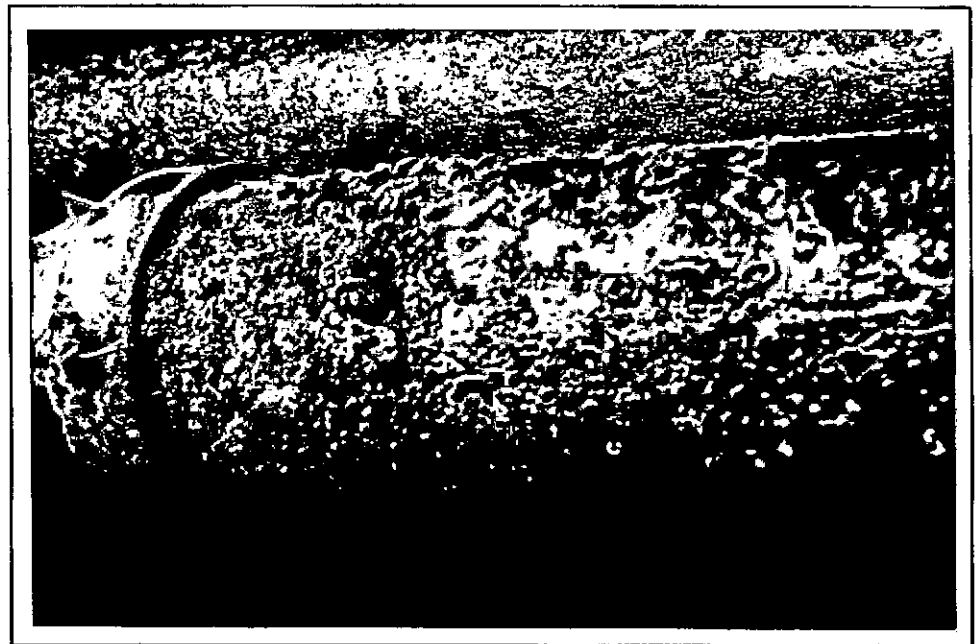


FOTO 2. Tuberculización con corrosión bajo depósito en un caño chupador de una bomba de un pozo en el que se constató actividad bacteriana.



FOTO 3 y FOTO 4. Bacterias filamentosas, probablemente del grupo *Shaerotilus-Leptothrix* obtenidas por la técnica del portaobjetos sumergido en una muestra de agua proveniente de una perforación de Tres Quebrachos.



6.- COMENTARIOS.

En diferentes perforaciones del área estudiada se han observado algunos síntomas típicos de la actividad bacteriana en perforaciones:

* **Agua coloreada:** se observó coloración ocre en el agua proveniente de las perforaciones de Tres Quebrachos N°7, 8 y 2, en Nueva Esperanza N°9 y en Nueva California N°6 en donde el color pasó de verde a marrón rojizo; en todos los casos la coloración estaba asociada a una turbidez apreciable.

* **Tuberculización:** en Tres Quebrachos N°2 se observó tuberculización en una bomba y en Tejidos Argentinos N°1 se reemplazó la cañería de impulsión por tuberculización y corrosión bajo depósito. Esta empresa utiliza el agua subterránea como fuente de agua para refrigeración y para el sistema contra incendio; un tramo de cañería de 600m de este último sistema fue reemplazado por incrustación, corrosión y perforación bajo depósito.

Otra observación a destacar es la falta de información sobre el tema por parte de los propietarios de las perforaciones; el Seminario se realizó con fines de captar el interés de estas personas ya que en algunos casos algunas de ellas han perdido perforaciones, presumiblemente debido a la actividad bacteriana.

Esta falta de información trae como consecuencia la dificultad para recabar datos sobre las características de las perforaciones, construcción, comportamiento hidráulico, producción, gastos de energía de bombeo, etc. Tampoco, en la mayoría de los casos se ha tenido la precaución de tomar fotografías del estado que presentan los equipos de bombeo cuando son extraídos por tareas de mantenimiento; estas fotografías muchas veces revelan las lesiones típicas por la acción bacteriana.

Al recabarse información sobre las prácticas de perforación de los pozos no han tomado las medidas preventivas para evitar los problemas biológicos y este sería un aspecto importante que explicaría la dispersión del fenómeno en las perforaciones estudiadas. Por otro lado, el régimen de bombeo, dado que se usan para riego, permite que los pozos queden en condiciones estancas durante períodos de tiempo prolongados (meses) favoreciendo de esta manera el desarrollo de la actividad bacteriana.

Es reconocida la posibilidad de que estos fenómenos se dispersen mediante el uso de herramientas de perforación o equipos contaminados; en el caso del pozo Jocat N°2, si bien se construyó con métodos preventivos, fue desarrollado usando una bomba provista por el perforista que no se desinfectó previamente como tampoco el pozo una vez terminado. Este pozo se construyó en Abril del '92 y ya presenta actividad bacteriana.

Como puede advertirse, una suma de factores concurrentes estarían determinando la existencia de problemas microbiológicos en el área bajo estudio; la consecuencia del desarrollo de estos fenómenos conduce a la pérdida de algunas perforaciones con el consiguiente incremento en los costos de la producción agrícola o acorta la vida útil de otras amenazando la actividad agrícola que depende, esencialmente de la disponibilidad del recurso hídrico subterráneo.

7.- CONCLUSIONES.

* Se dispone en la zona bajo estudio de un sistema confiable para detectar actividad bacteriana y para establecer parámetros ambientales que inciden sobre la misma.

* Esto ha permitido elaborar una estrategia de monitoreo para que, en una etapa futura, se pueda acudir con medidas correctivas a las perforaciones más afectadas.

* Se pudo constatar que tanto los propietarios de las perforaciones como las empresas perforistas, desconocen muchos aspectos importantes que llevan a instalar la actividad microbiana en los pozos.

* Sería necesario continuar con el programa de relevamiento actual para obtener datos estadísticos más confiables y, eventualmente, extender estas tareas a otras perforaciones del área.

* Sería necesario establecer condiciones de construcción, desarrollo y terminación de las perforaciones en los contratos con las empresas de perforación con la intención de reducir al mínimo el impacto de las malas prácticas.

* Se debería tender a realizar tareas de inspección de perforaciones con cierta periodicidad para lograr un alerta temprano referido a la instalación de estos fenómenos microbianos.

BIBLIOGRAFIA

- Alcalde, R. and E. Castronovo de Knott. 1987. Occurrence of Iron Bacteria in Wells in Rio Negro (Argentina). Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 127-136.
- Alcalde, R. and Gariboglio, M.A. 1990. Biofouling in Sierra Colorado Water Supply: a Case Study, International Conference on Microbiology in Civil Engineering, (ed. P. Howsam) Cranfield Institute of Technology, England, pp. 183-191.
- Alcalde, R. and Gariboglio, M.A. 1990. Monitoring, Maintenance and Rehabilitation Strategies for Biofouling Control in Water Wells in Rio Negro (Argentina), International Conference on the Monitoring, Maintenance and Rehabilitation of Water Supplies Boreholes and Irrigation Tubewells. (ed. P. Howsam) Cranfield Institute of Technology, England, pp. 338-343.
- Alford, G. et al. 1984. Contamination of Water Wells by Organisms. Position paper presented to the Winfred Rockefeller Foundation, Arkansas Water Resources Research Center, Fayetteville, AR.
- API RP38 1975. Recommended practice for biological analysis of subsurface injection waters. 3rd edn, American Petroleum Institute, Dallas, USA.
- Barbic, F.F. et al. 1974. Iron and Manganese Bacteria in Ranney Wells. Water Res. 8:895-898.
- Barbic, F. et al. 1987. Ecology of Iron and Manganese Bacteria in Underground Water. Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 11-22.
- Caldwell, D.E. 1987. Microbial Colonization of Surfaces, Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 7-9.
- Caldwell, D.E. et al. 1981. Quantitation of Microbial Growth on Surfaces. Microb. Ecol. 7:1-11.
- Cataldi, M.S. 1938. Aislamiento de *Leptothrix ochracea* en medios sólidos a partir de cultivos electivos líquidos. Folia Biol. N° 79-80-81-82. Buenos Aires.
- Cataldi, M.S. 1939. Estudio Fisiológico y Sistemático de algunas Chlamydo bacteriales. Tesis. Universidad de Buenos Aires.
- Cataldi, M.S. 1940. La presencia de bacterias del hierro en las aguas de consumo de la ciudad de Buenos Aires. Boletín de Obras Sanitarias de la Nación. Buenos Aires. Argentina.
- Chantereau, J. 1985. Corrosión bacteriana. Editorial Limusa. México.
- Characklis, W.G. et al. 1982. Dynamics of Biofilm Processes:

Methods. Water Res. 16:1207-1216.

Characklis, W.G. and Cooksey, K.E. 1983. Biofilms and microbial fouling. In Advances in Applied Microbiology (ed. A.I. Laskin) Academic Press, London, pp. 93-108.

Clark, F.M., Scott, R.M. and Bone, E. 1967. Heterotrophic Iron Precipitating Bacteria. J.AWWA. pp. 1036-1042.

Costerton, J.W. 1987. Conceiving, Culturing, and Controlling Biofilms (discussion). IPSCO 1986 Think Tank on Biofilms and Biofouling in Wells and Groundwater Systems. D.R. Cullimore, ed. Regina Water Research Institute, Regina, SK, Canada, pp. 3-5.

Cullimore, D.R. 1975. The Control of Iron Bacteria in Water - Section 1: Laboratory Studies, Final Report. Regina Water Research Institute, Regina, SK.

Cullimore, D.R. 1976. Tackling the Rusty Monster Problems in Wells, the Story of a Research Project, RWRI Information Booklet No.1. Regina Water Research Institute, Regina, SK, Canada.

Cullimore, D.R. and Mc Cann, A. 1977. The Identification, Cultivation and Control of Iron Bacteria in Ground Water; in Aquatic Microbiology; F.A. Skinner and J.M. Shewan, editors; Academic Press, New York, pp.219-261.

Cullimore, D.R. 1979. Rusty Monsters - Disinfectant Control of Iron Bacterial Infestations. Can. Water Well, 5:6-10.

Cullimore, D.R. 1987b. Physico-chemical Factors in Influencing the Biofouling of Groundwater. Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 23-36.

Cullimore, D.R. 1988. A Simplified Atlas to Understand the Classification of Bacteria. Regina Water Research Institute, Regina, Saskatchewan.

Cullimore, D.R. and A.E. McCann. 1975. The Control of Iron Bacteria in Water. Field Report # 10, Regina Water Research Institute, Regina, SK.

Cullimore, D.R. and A.E. McCann. 1977. The Identification, Cultivation and Control of Iron Bacteria in Ground Water. Aquatic Microbiology. F.A. Skinner and J.M. Shewan, eds. Academic Press, New York, pp. 219-261.

Dondero, N.C. 1975. The Sphaerotilus - Leptothrix group. Annual Review of Microbiology. 29, 407-408.

Driscoll, F. 1986. Groundwater and Wells. Johnson Screen Division, St. Paul, MN.

Gariboglio, M.A., Salvarezza, R.C. y Videla, H.A. 1983. Corrosión microbiológica del acero al carbono en presencia de bacterias sulforeductoras. Agua. N° 31, pp.47-51.

- Gariboglio, M.A. 1984. Manual de técnicas bacteriológicas para aguas de uso industrial. Publicación ocasional
- Gariboglio, M.A. 1986. Ensuciamiento Biológico y Corrosión Inducida Microbiológicamente en Sistemas de Captación y Distribución de Agua de Caleta Olivia, Santa Cruz. Informe Técnico. Convenio UNLP-CFI. La Plata.
- Gariboglio, M.A. 1990. Diagnóstico y tratamiento de fenómenos de incrustación biológica y corrosión inducida microbiológicamente en perforaciones de la Provincia de Río Negro. Informe Técnico. Convenio DPA-CFI-UNLP. La Plata.
- Gaylarde, C.C. and P.E. Cook. 1987. Rapid Techniques for the Detection and Quantification of Sulfate-Reducing Bacteria (abstract). Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 171.
- Ghiorse, W.C. 1987. Biology of Leptothrix, Gallionella, and Crenothrix. Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 97-108.
- Grainge, J.W. and E. Lund 1969. Quick Culturing and Control of Iron Bacteria. J. AWWA 61:242-245.
- Hackett, G. and J.H. Lehr. 1986. Iron Bacteria Occurrence, Problems, and Control Methods in Water Wells. National Water Well Association, Worthington, OH.
- Haesselbarth, U. and D. Luedemann. 1972. Biological Incrustation of Wells due to Mass Development of Iron and Manganese Bacteria. Water Treat. Exam. 21:20-29.
- Haines, L. 1982(?). Iron Bacteria Control in Water Wells (Twenty Years Later). Pac. Groundwater Digest. 31-32.
- Hallbeck, E-V. and K. Pedersen. 1987. The Biology of Gallionella. Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 87-95.
- Hamilton, W.A. 1985. Sulphate-Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion. Ann. Rev. Microbiol. 39:195-217.
- Hanert, H.H. 1981a. The Genus Gallionella. Chap. 40, The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. M.P. Starr et al., eds. Springer-Verlag, Berlin, FRG, pp. 509-521.
- Howsam, P. 1988. Biofouling in Wells and Aquifers. J. Institution of Water and Environmental Management, 2.2, 209-215.
- IPSCO. 1986. Think Tank on biofilms and biofouling in wells and ground water systems. Ed. by D.R. Cullimore. Regina Water Research Institute. Regina, SK, Canadá.
- Iverson, W.F. 1974. Microbial Corrosion of Iron. In Microbial Iron Metabolism, ed. Nielands, J.B. pp.475-513. Academic Press: New

York, London, San Francisco.

Jones, J.G. et al. 1984. Iron Reduction by Bacteria: Range of Organisms Involved and Metals Reduced. FEMS Microbiol. Lett. 21:133-136.

King, R.A. and Miller, J.D.A. 1971. Corrosion by the Sulphate-Reducing Bacteria. J.appl.Bact.,33,543.

Koenig, L. 1960a. Survey and Analysis of Well Stimulation Performance. J. AWWA 52:333-350.

Mallard, G.E. 1981. Effects of Bacteria on the Chemical and Physical State of Iron. Microbiology of the Aquatic Environment, Geological Survey Circular 848-E. U.S. Geological Survey, pp. E13-E21.

Mansuy, N. 1986. Microbial Assessment of Plugging in the Laboratory (Abstract W-D2). Technical Workshop - Contamination Control of Iron Bacteria Infested Aquifers, November 1986). American Water Resources Association, Bethesda, MD.

Mara, D.D. and Williams, D.J.A. 1970. The Evaluation of Media Used to Enumerate Sulphate-Reducing Bacteria. J.appl.Bact.,33, 543-52

Mogg, J.L.,1972. Practical Corrosion and Incrustation Guide Lines for Water Wells; Ground Water, vol.10, N°2, pp.611.

Pedersen, K. 1986. The Occurrence of Gallionella in Wells in Sweden. (Abstract W-I2). Technical Workshop - Contamination Control of Iron Bacteria Infested Aquifers, November 1986). American Water Resources Association, Bethesda, MD.

Pfennig, N.; Widdel, F. and Trüper, H.G. 1981. The Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria. In The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, ed. Starr, M.P.; Stolp, H., Trüper, H.G.; Balows, A. and Schlegel, h.G.; vol.1 pp.926-40. Berlin: Springer-Verlag.

Postgate, J.R. 1984. The Sulfate-Reducing Bacteria 2nd edn., Cambridge: University Press.

Pringsheim, E.G. 1952. Iron Organisms. Endeavour. 11,208-214.

Salvarezza, R.C., Gariboglio, M.A. y Videla, H.A. 1982. Importancia de los sulfuros en la iniciación de la corrosión microbiológica. Revista Iberoamericana de Corrosión y Protección. Septiembre-Diciembre. pp.21-25

Smith, S. 1980. A Layman's Guide to Iron Bacteria Problems in Wells. Water Well J. 34(6):40-41.

Smith, S. 1982. Field Reports - Culture Methods for the Enumeration of Iron Bacteria from Water Well Samples - a Critical Literature Review. Ground Water 20:482-485.

Smith, S. 1984. An Investigation of Tools and Field Techniques for the Detection of Iron-Precipitating Bacteria in Ground Water and Wells. MS Thesis, The Ohio State University, Columbus, OH.

- Smith S. 1985. Iron Bacteria Problems and Wells. *Ground Water Age* 19(7):26-28, 30-31, 33-34.
- Smith, S.A. 1987a. Educating the Drillers and Engineers. IPSCO 1986 Think Tank on Biofilms and Biofouling in Wells and Groundwater Systems. D.R. Cullimore, ed. Regina Water Research Institute, Regina, SK, Canada, pp. 12-13.
- Smith, S. 1987b. Tricky Water Treatment Jobs. *Water Tech.* 10(2):31-32,34,36,38.
- Smith, 1987d. Case Histories of Iron Bacteria and Other Biofouling. *Water Well J.* 41(2):30-32.
- Smith, S.A. and O.H. Tuovinen 1985. Environmental Analysis of Iron-Precipitating Bacteria in Ground Water and Wells. *Ground Water Monitoring Review* 5(4):45-52.
- Tatnall, R.E.; Stanton, K.M., and Ebersole, R.C. 1988. Testing for the Presence of Sulfate-Reducing Bacteria. Paper N°88. CORROSION/88. St Louis, M.O.
- Tuovinen, O.H. et al. 1980. Bacterial, Chemical, and Mineralogical Characteristics of Tubercles in Distribution Pipelines. *J. AWWA* 72:626-635.
- Tuovinen, O.H. and G. Cragnolino [date]. A Review of Microbiological and Electrochemical Techniques in the Study of Corrosion Induced by Sulfate-Reducing Bacteria. *Corrosion Monitoring in Industrial Plants Using Nondestructive and Electrochemical Methods.* (G.C. Moran and P. Labine, eds.) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 413-432.
- Tuovinen, O.H. and E-L. Nurmiäho. 1979. Microscopic Examination of Bacteria in Fe(III)-Oxide Deposited from Ground Water. *Microb. Ecol.* 5:57-66.
- van Beek, C.G.E.M. 1984. Restoring Well Yield in the Netherlands. *J. AWWA* 76:66-72.
- van Veen, W.L. and Mulder, E.G. and Deinema, M. 1978. The Sphaerotilus Leptothrix of Bacteria; *Microbiological Reviews*, vol.42,N°2, pp.329-356.
- Videla, H.A. y Salvarezza, R.C. 1984. Introducción a la corrosión microbiológica. Librería Agropecuaria S.A. Buenos Aires, Argentina.
- von Wolzogen kühn, C.A.H. and van der Vlugt, I.S. 1934. The Graphitization of Cast Iron as an Electrobiochemical Process in Anaerobic Soil. *Water*, 18,147-65.
- Wojcik, W. and M. Wojcik 1987. Proc. 1986 International Symposium on Biofouled Aquifers: Prevention and Restoration. D.R. Cullimore, ed. American Water Resources Association, Bethesda, MD., pp. 109-119.
- Wolfe, R.S. 1958. Cultivation, Morphology, and Classification of Iron Bacteria. *J. AWWA* 42:849-858.

CATALOGADO

