



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE CORROSIÓN EN METALES**  
**DE USO INDUSTRIAL POR *Desulfovibrio desulfuricans***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CAROLINA BEATRIZ SANTANDER MORALES

PROFESOR GUÍA  
LEANDRO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN  
JOSÉ HERNÁNDEZ  
FERNANDO PUCHI

SANTIAGO DE CHILE  
ENERO 2008

## **ESTUDIO EXPERIMENTAL DE CORROSIÓN EN METALES DE USO INDUSTRIAL POR *Desulfovibrio desulfuricans***

El desarrollo alcanzado por la humanidad desde la Revolución Industrial hasta hoy exige a la industria mundial, procesos que sean eficientes en el uso de materias primas y metales que sean confiables de acuerdo a los requerimientos de cada aplicación industrial. Es aquí, entonces, en donde el conocimiento sobre la corrosión y particularmente la corrosión mediada por microorganismos juega un papel fundamental para poder generar alternativas de mitigación y prevención de la corrosión, que permitan aminorar las millonarias pérdidas económicas que año a año aquejan a las industrias.

En el presente trabajo se realiza un estudio experimental de corrosión en diversos tipos de acero, los cuales son incubados a tres tiempos distintos en un reactor anaeróbico con un cultivo de bacterias sulfato reductoras autotróficas *Desulfovibrio desulfuricans*, siendo el objetivo del trabajo poder simular una corrosión mediada por microorganismos, junto con cuantificarla indirectamente a través del área cubierta por bacterias en la superficie de las muestras. Posterior a la incubación, las placas metálicas son analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido, para poder visualizar las bacterias y el daño sobre la superficie. El área cubierta por bacterias en cada una de las muestras fue calculada con un programa para contar píxeles, el cual discrimina a partir de las diferencias de color de las áreas seleccionadas entregando un porcentaje de área cubierta con respecto al área total.

Los principales resultados de este trabajo fueron los siguientes: se pudo simular con éxito una corrosión mediada por bacterias ya que fue posible observar daño en la superficie de los metales a partir del menor tiempo de incubación. Por otra parte, se observó una heterogeneidad de bacterias sobre la superficie, luego, el cultivo empleado no corresponde solamente a *Desulfovibrio desulfuricans*. Los aceros inoxidable AISI 316L, AISI 420 y el hierro fundido ASTM A536, fueron las muestras con menor superficie cubierta por bacterias, mientras que el acero al carbón AISI 1020 y el acero estructural AISI A36 fueron las muestras con mayor cantidad de bacterias depositadas en su superficie.

Se ajustaron cinéticas de poblamiento de superficie por bacterias para cada una de las muestras, excepto para el acero inoxidable AISI 316L por tener un extraño comportamiento de cubrimiento en el tiempo. Se obtuvieron cinéticas de primer orden para los siguientes metales: Hierro fundido (vel. inicial de poblamiento de superficie observada,  $-0,039 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ ), SAE 4340 (vel. inicial de poblamiento de superficie observada,  $-0,043 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ ); y cinéticas de segundo orden para los siguientes metales: AISI 420 (vel. inicial de poblamiento de superficie observada,  $-3 \times 10^{-6} \text{ [mm}^{-2} \text{ d}^{-1}\text{]}$ ), AISI 1020 (vel. inicial de poblamiento de superficie observada,  $-8 \times 10^{-6} \text{ [mm}^{-2} \text{ d}^{-1}\text{]}$ ) y A36 (vel. inicial de poblamiento de superficie observada,  $-8 \times 10^{-6} \text{ [mm}^{-2} \text{ d}^{-1}\text{]}$ ).

*Dedicado a mis papitos...  
Anamey y Juany*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por esta gran etapa de mi vida que culmina y por todos los éxitos alcanzados en estos años, por conceder el deseo de mis padres y mi propio sueño...ser profesional.

En especial a los señores miembros de la comisión: Leandro Herrera, José Hernández y Fernando Puchi, gracias por los consejos y apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis padres, por estar apoyándome cada día... por cada abrazo al llegar a casa, por cada dulce bajo la almohada, por cada palabra de ánimo cuando todo se ponía gris, por quedarse a mi lado en las noches y estudiar conmigo aunque no entendieran nada, por cada sonrisa y cada lágrima derramada junto a mí...para ustedes, toda mi admiración. Palabras especiales para mis hermanitos! Alex, Ariel, Andrés y Cindy...gracias niños por hacerme reír cada vez que estuve cansada y triste, por los chistes fomes y por las serenatas.

A mis primos y tíos, por estar siempre pendientes y preocupados de mí estos años. A mis abuelos: Juan, Nidia y Sonia...pues sus historias de vida me enseñaron a perseverar siempre para alcanzar mis sueños; gracias también por sus oraciones. A mi tía Yeca...gracias por la paciencia y el cariño.

A mis amigos durante estos años: Paz, Jota Pe, Karlalee y Priz, compañeros de curso y de la salita, que aportaron con su compañía y apoyo a que estos años fuesen mucho más agradables y llevaderos.

A Loreto, por la inmensa paciencia y ayuda. A los chiquillos del laboratorio de ultratumba: Claudio y Felipe, gracias por los entretenidos desayunos, por los consejos y apoyo. Mención especial para Gina e Irene, siempre dispuestas a ayudar en todo lo posible.

Para finalizar, quisiera agradecer inmensamente a quien me ha acompañado en estos últimos tres años, al amor de mi vida...a mi Balito. Gracias por hacerme feliz cada día, por creer en mí y hacerme sentir que nada es imposible si es que se tienen las ganas y la fe para lograrlo. Gracias por cada nuevo sueño que construimos juntos y porque me haces sentir mejor persona. Estoy segura que juntos lograremos todos lo que nos hemos propuesto, ya no puedo esperar para comenzar...mi vida contigo. Te amo chiquitito!!!.

# Índice

<b>Capítulo 1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>6</b>
1.1	<i>Antecedentes bibliográficos</i> .....	6
1.1.1	Corrosión electroquímica.....	6
1.1.2	Corrosión mediada por microorganismos.....	9
1.1.3	Aceros de uso industrial.....	12
1.2	<i>Descripción del proyecto y Justificación</i> .....	14
1.3	<i>Objetivos</i> .....	15
1.3.1	Generales.....	15
1.3.2	Específicos.....	15
1.3.3	Alcances.....	15
<b>Capítulo 2</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>17</b>
2.1	<i>Materiales y reactivos</i> .....	17
2.2	<i>Justificación Experimental</i> .....	18
2.3	<i>Montaje</i> .....	18
2.4	<i>Metodología</i> .....	19
2.4.1	Realización de un cultivo de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> .....	20
2.4.2	Diseño de un soporte para las muestras.....	20
2.4.3	Preparación de las muestras para la experiencia.....	21
2.4.4	Incubación de las muestras y Microscopía.....	21
2.4.5	Cuantificación de la Biocorrosión.....	22
2.4.6	Análisis de Resultados.....	22
<b>Capítulo 3</b>	<b>Resultados y Discusiones.....</b>	<b>24</b>
3.1	<i>Microscopía electrónica de Barrido (SEM)</i> .....	24
3.1.1	Fierro fundido.....	24
3.1.2	Acero Inoxidable 316L.....	26
3.1.3	Acero Inoxidable 420.....	28
3.1.4	Acero al carbón 1020.....	30
3.1.5	Acero A36.....	33
3.1.6	Acero cromo níquel bonificado SAE 4340.....	35
3.1.7	Pintura Anticorrosiva.....	37
3.2	<i>Cuantificación de la biocorrosión con Pixarea</i> .....	41
3.2.1	Fierro fundido.....	41
3.2.2	Acero Inoxidable 316L.....	43
3.2.3	Acero inoxidable 420.....	44
3.2.4	Acero al carbón 1020.....	45
3.2.5	Acero A36.....	47
3.2.6	Acero cromo níquel bonificado SAE 4340.....	49
3.2.7	Comparación entre Aceros.....	50
3.2.8	Otros resultados.....	54
<b>Capítulo 4</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 5</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>Medio de Cultivo ATCC 1627.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>Descripción del programa Pixarea.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>Resultados programa Pixarea.....</b>	<b>65</b>

# Capítulo 1 Introducción

## 1.1 Antecedentes bibliográficos

### 1.1.1 Corrosión electroquímica

Se conoce como corrosión el deterioro de un material, usualmente un metal, que resulta de la reacción con su ambiente, entendiendo por ambiente, los alrededores o condiciones (físicas, químicas o mecánicas) en los cuales un material existe [1].

Desde un punto de vista más químico, la corrosión puede definirse como el tránsito de un metal de su forma elemental a su forma iónica o combinada con cesión de electrones a un no metal, como el oxígeno o el azufre, por ejemplo. El metal retorna a la forma combinada formando óxidos, hidróxidos, sulfuros, entre otros; formas termodinámicamente más estables, que es como los metales se encuentran normalmente en la naturaleza [2].

La corrosión, tal como ya se ha dicho anteriormente, es un fenómeno en que el metal vuelve a su estado de más baja energía, ya que el estado de existencia más estable para un metal es su forma combinada, ya sea en forma de óxido, sulfuro, cloruro, sulfato o carbonato [3]. De esta forma, lo que el hombre hace para extraer los metales de la tierra es ir en contra de una reacción que se da espontáneamente en la naturaleza; la corrosión. El obtener el metal libre requiere entonces de gran cantidad de energía, y al recuperarlo posee una energía elevada con fuertes tendencias a bajarla, estabilizándose y reaccionando con el medio ambiente para volver a su estado mineral original.

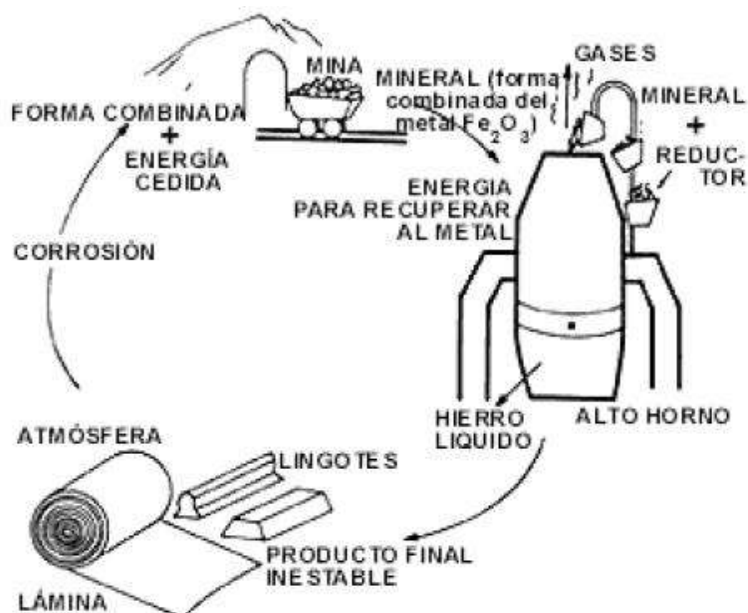


Figura 1.1: Representación de la relación entre la extracción de metales y corrosión.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fuente: Referencia 3

La estabilidad de los metales está dada por la relación entre el metal y el medio que lo rodea, luego, es posible prever el comportamiento de un metal y ambiente determinados de acuerdo a la energía libre del sistema:

- La energía libre es cero o negativa: El metal es indiferente a la interacción con su ambiente, es decir, no habrá reacción de corrosión. Este es el caso típico de los metales más nobles como el oro y el platino.
- La energía libre es positiva: El metal es activo y puede existir corrosión. Este es el caso típico de los metales más usados en la industria, como el hierro, aluminio y cromo.
- La energía libre es positiva pero el metal no presenta corrosión: El metal pareciese no ser atacado, por lo que se dice que el metal está pasivado o pasivo.

La corrosión se manifiesta de distintas formas y a causa de distintos fenómenos, ya sea por la naturaleza misma del material, por la interacción con electrolitos y/o microorganismos, entre otras. Puede ser uniforme, con lo cual el material se corroe a la misma velocidad en toda su superficie, o bien, ser localizada, en cuyo caso el metal resulta afectado sólo en pequeñas áreas. En la Figura 1.2 se presenta un esquema resumen con los distintos tipos de corrosión que se han descrito en la literatura.

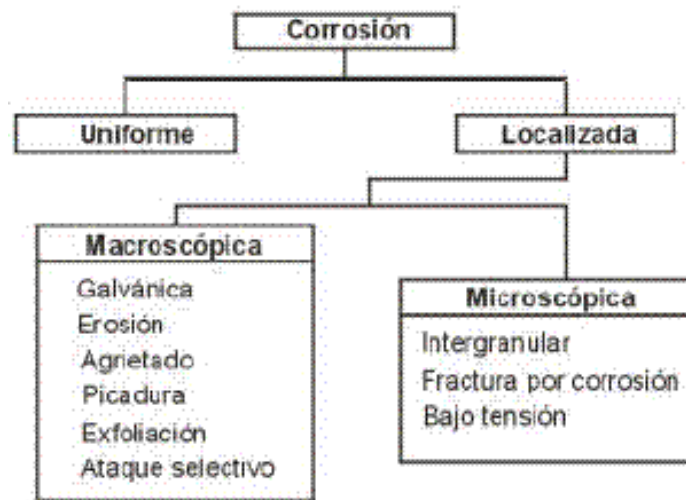


Figura 1.2: Tipos de Corrosión.<sup>2</sup>

De los tipos de corrosión antes mencionados, uno de los más estudiados corresponde al fenómeno de corrosión electroquímica, de gran importancia industrial debido a las pérdidas económicas por daños en equipos y cañerías. Ésta se produce por la interacción entre la superficie de un metal y un líquido (electrolito) dando origen a una celda galvánica, en donde se producen reacciones de oxidación y reducción.

A causa de la interacción con el electrolito, se forman en la superficie del material zonas anódicas y catódicas. En la zona anódica se lleva a cabo la disolución del metal (reacción de oxidación) en donde el metal cede electrones y pasa a la solución en forma de iones metálicos.

<sup>2</sup> Fuente: Referencia 2

Estos electrones viajan a través de la superficie hasta las zonas catódicas, en donde son captados por otros compuestos que se depositan en la superficie en forma de compuestos insolubles; productos de corrosión.

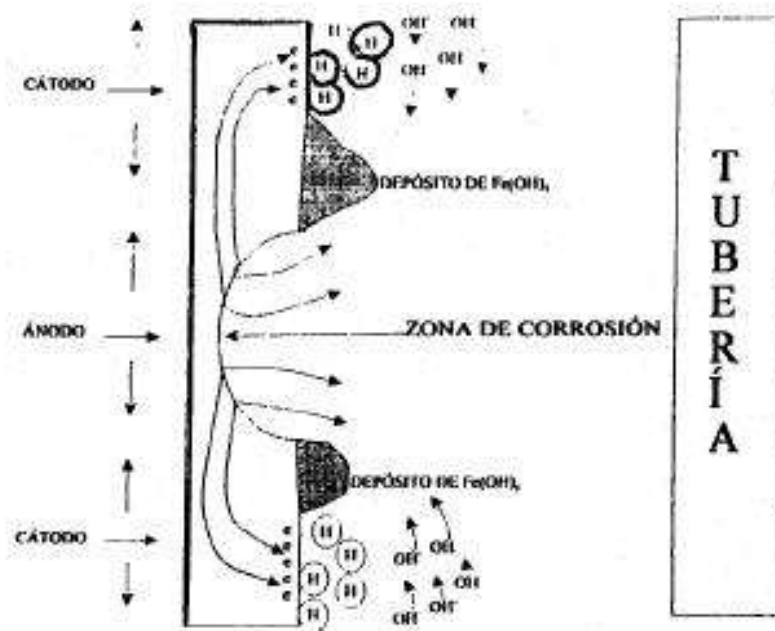
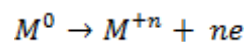


Figura 1.3: Corrosión electroquímica.<sup>3</sup>

En cuanto a las reacciones involucradas en la corrosión electroquímica, se sabe que éstas dependen del ambiente en el que el metal se encuentre.

La reacción anódica o de oxidación siempre es la misma, esto es, la disolución del metal:



Siendo

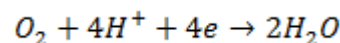
$M^0$ : Metal de valencia  $n$

$M^{+n}$ : Forma iónica del metal

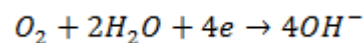
$ne$ : Electrones cedidos por el metal

La reacción catódica, dependiendo de las condiciones en que el metal se encuentre, es [4]:

*Reducción de  $O_2$  (solución ácida)*



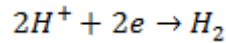
*Reducción de  $O_2$  (solución neutra o alcalina)*



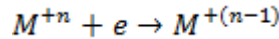
<sup>3</sup> Fuente: Fundamentos científicos del envejecimiento de pozos de agua entubados metálicamente. Carrión Mero, Maldonado Zapata.



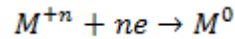
*Generación de Hidrógeno a partir de protones*



*Reducción de un ión metálico*



*Deposición de un metal*



En algunos casos, la corrosión de los metales no se debe solamente al efecto electroquímico propiamente tal, sino que se han realizado estudios desde hace varios años que buscan establecer cómo la presencia de bacterias colabora e influye en la pérdida de material por corrosión.

### **1.1.2 Corrosión mediada por microorganismos**

La corrosión es un proceso electroquímico que consiste en una reacción anódica, la cual comprende la oxidación (ionización) del metal; y una reacción catódica que consiste en la reducción de especies químicas.

Se ha demostrado que estas reacciones pueden ser influenciadas por la actividad de los microorganismos, especialmente cuando éstos están en contacto directo con la superficie de los metales, formando biofilms [5,6]. El resultado de este proceso es conocido como biocorrosión o corrosión influenciada por microorganismos (MIC).

La actividad microbiana dentro de los biofilms formados sobre la superficie de los metales puede afectar considerablemente la química de las capas protectoras, causando la aceleración o inhibición de la corrosión [7,8]. La corrosión influenciada por microorganismos no origina nuevos mecanismos electroquímicos de corrosión, sino que es el resultado de un cambio microbiológicamente influenciado que promueve el establecimiento o mantenimiento de reacciones fisicoquímicas que no son favorecidas bajo condiciones similares [9].

Los principales tipos de bacterias asociadas con metales en ambientes terrestres y acuáticos son las bacterias sulfato reductoras (SRB), bacterias sulfuro oxidantes, bacterias hierro oxidantes/reductoras, bacterias manganeso oxidantes y bacterias secretoras de ácidos orgánicos y slime [10]. Estos organismos coexisten en biofilms formados naturalmente, formando verdaderos consorcios sobre la superficie de los metales [11].

| Los aceros inoxidable tienen buena resistencia a la corrosión, sin embargo, son susceptibles a corrosión mediada por microorganismos [12], así, cerca del 20% del daño anual causado por corrosión en aceros son causados por la actividad de bacterias sobre la superficie del material [13], del cual una parte significativa corresponde a corrosión anaeróbica influenciada por bacterias sulfato reductoras y corrosión aeróbica influenciada por bacterias hierro oxidantes [14].

Estudios realizados en aceros inoxidable dan cuenta que cuando cultivos mixtos de estas bacterias son usados para provocar corrosión, el daño observado es mucho mayor en comparación con cultivos puros de cada uno [15].

ORGANISMO	REPRESENTANTES GENEROS	ACTIVIDAD	CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES
FERROBACTERIAS	Gallionella Sphaerotilus-Leptothrix Siderocapsa Sideronema Ferribacterium Sideromonas Naumannella Ochrobium Crenothrix, Ciconothrix	Formacion de peliculas e incrustaciones por la precipitacion de Fe y Mn.	Aerobicos-microaerobios, el pH (6-8), Fe <sup>2+</sup> , 8-16 de C, CO <sub>2</sub> , materia organica.
SULFOBACTERIAS	Thiobacillus Thiospira Thiobacterium	Utilizan azufre para producir H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Aerobicos, el pH (2-5), 10-35°C
BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS	Desulfovibrio Desulfotomacular Desulfomonas	Oxidan H <sub>2</sub> o compuestos organicos para convertir el sulfato en sulfuro	Anaerobicos, Eh reductor o medioambiente reductor, agua fresca o salina, pH (5.5-9), 25-65°C con etapas mesofilica y termofilica.
BACTERIAS CARBONATORREDUCTORAS	Methanobacterium Methanosarcina Methanococcus	Extraen su energia de la oxidacion de substratos organicos simples y tambien pueden utilizar el H <sub>2</sub>	Anaerobicos. Las temperaturas son mayores a 30°C.
BACTERIAS FERMENTATIVAS	Varios	Oxidan materia organica y la transforman en acidos organicos.	Anaerobicos
HONGOS	Varios	Oxidan materia organica y la transforman en acidos organicos.	Aerobicos.

Figura 1.4: Esquema enumerativo de los microorganismos que participan en el proceso corrosivo de metales.<sup>4</sup>

Con respecto a las bacterias sulfato reductoras, que es el tema en el que se centra este trabajo, éstas son un grupo muy diverso de anaerobias que llevan a cabo reacciones desasimilatorias de reducción de compuestos de azufre tales como sulfato, sulfito, tiosulfato e inclusive azufre elemental. Aunque estas bacterias son usualmente consideradas como anaerobias estrictas, algunos géneros toleran oxígeno, siendo capaces de respirar Fe<sup>+3</sup> o incluso oxígeno con hidrógeno actuando como donador de electrones, cuando la concentración de oxígeno disuelto es baja [16].

Varios modelos se han propuesto para intentar explicar el mecanismo por el cual las bacterias sulfato reductoras pueden influenciar la corrosión de acero. El producto de su actividad metabólica, H<sub>2</sub>S, es corrosivo; sin embargo, el ácido sulfhídrico producido por mecanismos netamente químicos no tiene el mismo grado de agresividad que el producido por medio de bacterias, lo cual demuestra la importancia del bioproceso en sí, desechando la validez de los experimentos realizados con compuestos abióticos [17].

<sup>4</sup> Fuente: Fundamentos científicos del envejecimiento de pozos de agua entubados metálicamente. Carrión Mero, Maldonado Zamora.

No se puede establecer un único modelo que logre explicar la corrosión de los metales por influencia de bacterias sulfato reductoras, sino que éstos dependen de varias variables como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, entre otros. Algunos de los mecanismos sugeridos por varios autores son los siguientes:

Sustancia o Proceso corrosivo	Autores
Despolarización catódica provocada por Hidrogenasa	Von Wolzogen Kühr y Van der Vlught (1934); Bryan et al. (1991)
Despolarización anódica	Salvarezza y Videla (1984); Daumas et al. (1988); Crolet (1992)
Ácido sulfhídrico	Little et al. (1998)
Sulfuros de Hierro	King y Wakerley (1973)
Compuesto fosforoso volátil	Iverson y Ohlson (1983)
Exopolímeros unidos a Hierro	Beech y Cheung (1995); Beech et al. (1996, 1998, 1999)
Cracking o blistering inducido por hidrógeno	Edyvean et al. (1998)

Tabla 1.1: Resumen de algunos de los modelos propuestos para el mecanismo de corrosión por bacterias sulfato reductoras

En la siguiente figura se muestra el mecanismo de despolarización catódica el cual supone ausencia de oxígeno y pH ácido a neutro:

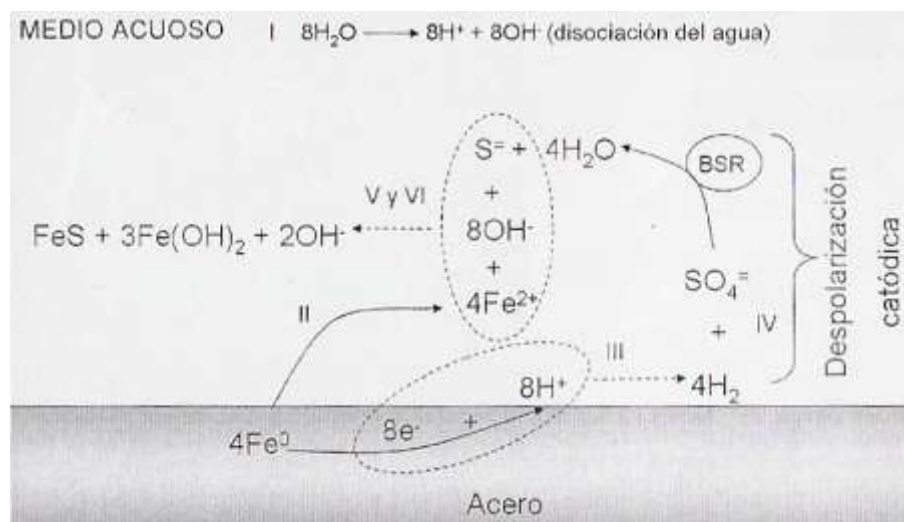


Figura 1.5: Mecanismo de despolarización catódica.<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Fuente: Biocorrosión en ductos de acero al carbono SAE 1018 para la extracción secundaria del petróleo. Celestino Rodríguez.

En el mecanismo de despolarización catódica, los protones actúan como receptores de electrones en el cátodo, con la formación de hidrógeno molecular que es utilizado junto con sulfato, por las bacterias sulfato reductoras para su actividad metabólica. Como resultado precipitan sobre la superficie del metal, óxidos y sulfuros de hierro [18].

Se ha observado que el sulfuro de hierro, puede actuar como capa protectora en contra de la corrosión y que altos niveles de hierro soluble previenen la formación de tales capas protectoras sobre el acero. Estudios con *Desulfovibrio vulgaris* han mostrado que ésta es regulada por la disponibilidad de  $Fe^{+2}$ , lo cual abre nuevos caminos hacia la prevención de la corrosión [19].

### 1.1.3 Aceros de uso industrial

Los aceros son aleaciones hierro-carbono con concentraciones apreciables de otros elementos aleantes. Según el International Iron and Steel Institute (IISI), la producción mundial de acero bruto fue de 92,1 millones de toneladas en abril del presente año, marcando un crecimiento de un 8% en comparación con la producción de mayo de 2004 [20].

Los aceros al carbono sólo contienen concentraciones residuales de impurezas mientras que los aceros aleados contienen elementos que se añaden intencionadamente en concentraciones específicas. El acero al carbono, constituye el principal producto de los aceros que se producen, estimándose que un 90% de la producción mundial total corresponde a aceros al carbono y el 10% restante son aceros aleados [21]. La composición química de los aceros al carbono es compleja ya que, además del hierro y el carbono, hay en la aleación otros elementos como el silicio y manganeso, así como impurezas, las cuales no pueden ser retiradas completamente.

Los aceros inoxidables son aleaciones a base de hierro, cromo, carbono y otros elementos como níquel, manganeso, silicio, molibdeno y titanio, los cuales les confieren una resistencia particular a algunos tipos de corrosión en determinadas aplicaciones industriales. Así, la presencia de cada elemento en determinados porcentajes da origen a distintos tipos de aceros y define las características propias de cada cual. Según la Norma EN 10088 se definen los aceros inoxidables como aquellas aleaciones férreas que contienen cromo en una proporción mínima del 10,5% [22]. La característica de resistencia a la corrosión, propia de estos aceros, se debe a la propiedad de estas aleaciones de pasivarse en un ambiente oxidante, así, dicha película pasiva se vuelve a reconstruir cuando se daña si el ambiente es suficientemente oxidante, manteniendo una protección permanente del acero. Generalmente la capa pasivante corresponde a un óxido de cromo.

Los efectos de algunos de los elementos que se agregan a las aleaciones se resumen a continuación [23]:

*Cromo:* Mejora la resistencia, dureza, resistencia al desgaste y dureza en caliente. Es uno de los más efectivos elementos de aleación para incrementar la templabilidad. El cromo mejora significativamente las propiedades de resistencia a la corrosión.

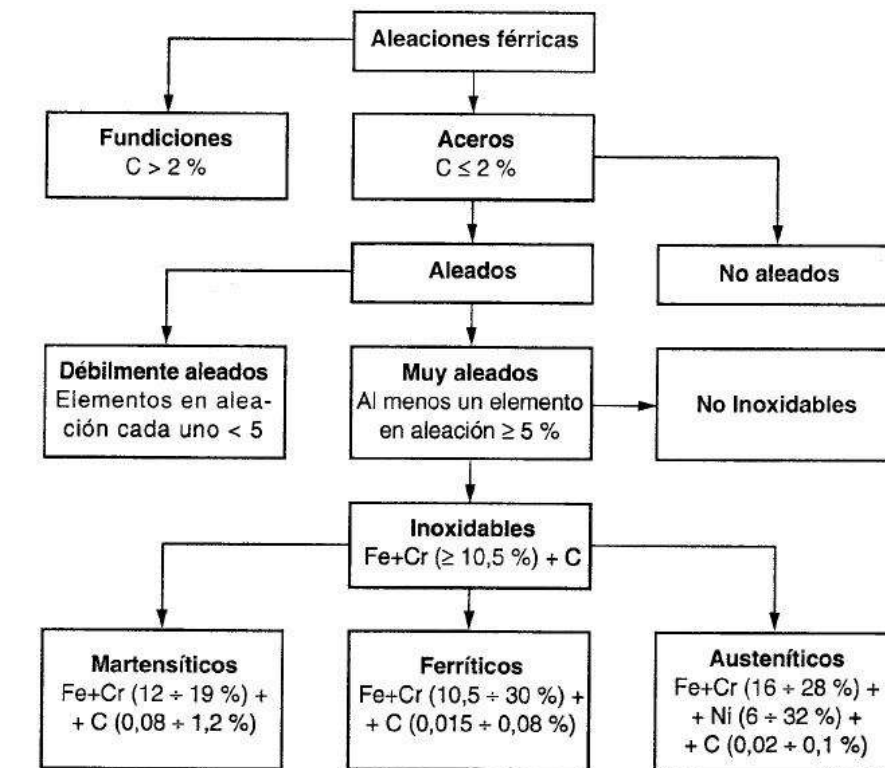
**Manganeso:** Mejora la resistencia y dureza del acero. Cuando el acero se trata térmicamente, el incremento de manganeso mejora la templabilidad. Debido a esto, el manganeso se usa ampliamente como elemento de aleación en el acero.

**Molibdeno:** Aumenta la tenacidad, la dureza en caliente y la resistencia a la termoinfluencia. También mejora la templabilidad y forma carburos para resistencia al desgaste.

**Níquel:** Mejora la resistencia y tenacidad. Incrementa la templabilidad, pero no tanto como los otros elementos de aleación en el acero. En cantidades significativas mejora la resistencia a la corrosión y es otro de los elementos mayoritarios (además del cromo) en ciertos tipos de acero inoxidable.

**Vanadio:** Inhibe el crecimiento de los granos durante el procesamiento a temperaturas elevadas y durante el tratamiento térmico, lo cual mejora la resistencia y tenacidad del acero. También forma carburos que incrementan la resistencia al desgaste.

En la siguiente figura se muestra un esquema acerca de las relaciones entre los aceros dependiendo de su composición:



Otros tipos: **Austeníticos** al Cr, Mn, Ni  
**Austeno-Ferríticos** (Dúplex, Bifásicos o *Dual Phase*)  
**Endurecidos por precipitación** (PH, *Precipitation Hardening*)

**Figura 1.6: Esquema de relaciones entre los aceros.**<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Fuente: Referencia 23

Los aceros y aleaciones en general se pueden designar de acuerdo a las instrucciones dadas por AISI “American Iron and Steel Institute”, ASTM “American Society for Testing and Materials” y SAE “Society of Automotive Engineers”.

La designación AISI/SAE consta de cuatro cifras. Las dos primeras indican el contenido porcentual en aleantes y las dos segundas en carbono dividido por cien. Las dos primeras para aceros al carbono son 1 y 0 mientras que en aceros aleados puede ser por ejemplo 13, 41 o 43. Las cifras tercera y cuarta indican el contenido en carbono multiplicado. Por ejemplo, el acero código AISI/SAE 1020, es un acero al carbono, sin elementos aleantes adicionales, con un 0.2 % de C.

Para finalizar, se presentan en la siguiente tabla la composición de los aceros [24, 25] a ensayar en este trabajo:

Metal	%C	%Cr	%Ni	%Mo	%Si	%Mn	%S (Máx.)	%P (Máx.)
F. fundido	3-3,9	---	---	---	1,5-3	0,2-0,6	0,02	0,05
AISI 316L	0,03 máx.	17,5	12,5	2,2	1	2 máx.	---	---
AISI 420	0,3-0,4	12-14	---	---	1	1	0,03	0,04
AISI 1020	0,18 máx.	---	---	---	---	0,3-0,6	0,05	0,04
AISI A36 <sup>7</sup>	0,27	---	---	---	---	0,6-0,9	0,05	0,04
SAE 4340	0,38-0,43	0,7-0,9	1,65-2	0,2-0,3	0,15-0,35	0,6-0,8	0,04	0,035

Tabla 1.2: Resumen de la composición química de los metales a ensayar en este trabajo

## 1.2 Descripción del proyecto y Justificación

El presente trabajo pretende simular experimentalmente una corrosión mediada por bacterias sulfato reductoras, particularmente *Desulfovibrio desulfuricans*, en distintos aceros de uso industrial para estudiar la susceptibilidad de éstos a la corrosión causada por estas bacterias.

Se dispone de un total de tres muestras de los diferentes aceros a estudiar, las cuales se incuban al interior del reactor en tres tiempos distintos, a fin de observar el cambio de la superficie de los metales en el tiempo mediante Microscopía electrónica de Barrido.

Se cuantifica la adherencia de las bacterias a la superficie como una medida indirecta de la corrosión que éstas provocan, suponiendo que existe una relación directa entre las bacterias depositadas en la superficie del metal y el daño provocado por corrosión. Las imágenes obtenidas por Microscopía electrónica de Barrido (SEM) se utilizan para detectar y observar bacterias adheridas en la superficie de los metales, así como para observar el daño en la superficie de los metales estudiados.

El porcentaje del área de la muestra cubierto por bacterias se calcula empleando un programa de uso médico, Pixarea, que permite calcular áreas de tumores. En este trabajo, se le entrega la imagen de las muestras procedentes de Microscopía electrónica de Barrido

<sup>7</sup> Los datos de composición que aparecen en la tabla corresponden a los requisitos de composición química para barras de 19 a 38 mm de espesor. Este tipo de acero es de tipo estructural, por lo que puede presentarse en forma de barras o perfiles.

previamente tratadas con el programa de código abierto Gimp, en donde se seleccionan de antemano las áreas cubiertas por bacterias. En la interfaz del programa Pixarea se colorea el área cubierta por bacterias ya seleccionada con Gimp, para luego recuperar el porcentaje correspondiente al área cubierta por bacterias en las muestras. Este programa fue debidamente probado con imágenes control, de las cuales el área de interés es conocida.

Finalmente, se calcula la velocidad inicial de poblamiento de superficie para cada uno de los metales estudiados, determinando también el orden de la cinética asociada.

El trabajo pretende aportar conocimiento sobre el inicio de la corrosión mediada bacterias sulfato reductoras y determinar cuál de los metales ensayados es más susceptible a la corrosión causada por estas bacterias.

### **1.3 Objetivos**

Los objetivos tanto generales como específicos que persigue la realización de este trabajo son los siguientes:

#### **1.3.1 Generales**

Realizar un estudio experimental de corrosión con *Desulfovibrio desulfuricans* en aceros de uso industrial y cuantificar la corrosión mediada por estas bacterias en términos de la superficie del metal cubierta.

#### **1.3.2 Específicos**

- Realizar y mantener un cultivo viable de bacterias sulfato reductoras para la experimentación con las muestras metálicas.
- Diseñar un soporte para introducir y mantener firmes las muestras de los metales en el reactor.
- Observar mediante Microscopía electrónica de Barrido las bacterias que se adhieren a la superficie de los metales y el daño provocado por éstas.
- Cuantificar la corrosión causada por las bacterias sulfato reductoras *Desulfovibrio desulfuricans* usando como medida la superficie del metal cubierta por ellas observada en las imágenes de Microscopía electrónica de Barrido.
- Calcular la velocidad específica de adherencia de las bacterias a cada uno de los metales, encontrar una ley o expresión cinética de corrosión y compararlas entre los metales estudiados para establecer relaciones de velocidad de corrosión entre ellos.

#### **1.3.3 Alcances**

El presente trabajo sólo pretende establecer relaciones de mayor o menor corrosión entre los seis aceros estudiados y la cinética de adherencia de las bacterias a la superficie se calcula suponiendo que ésta sólo depende del área del metal cubierta por ellas, por lo cual, es sólo una

aproximación. Dado el poco tiempo en que las muestras son incubadas en el reactor, se decide cuantificar la corrosión por área cubierta por bacterias y no como pérdida de espesor o masa que es como usualmente se cuantifica la corrosión.

En lo que respecta al tratamiento de las muestras post-incubación, es decir, deshidrataciones, secado de punto crítico y sombreado con oro/paladio; y la Microscopía electrónica de Barrido se encargan a servicios externos, que son realizados en la Facultad de Ciencias Biológicas y Facultad de Física de la Pontificia Universidad Católica de Chile, respectivamente.



## Capítulo 2 Metodología

### 2.1 Materiales y reactivos

Para el desarrollo y montaje del trabajo experimental se utilizaron los siguientes materiales y reactivos:

➤ Placas metálicas:

Fierro fundido ASTM A536  
Acero Inoxidable AISI 316L  
Acero Inoxidable AISI 420  
Acero al carbón AISI 1020  
Acero estructural AISI A36  
Acero cromo-níquel bonificado SAE 4340  
Acero inoxidable AISI 316L con pintura anticorrosiva Rojo Maestranza Renner.

Las dimensiones de las muestras o placas metálicas son de 1 cm<sup>2</sup> de área (1 cm × 1 cm) y de espesor variable, entre 2 y 3 mm dependiendo de la muestra.

➤ Soporte

Placa de acrílico transparente (80 mm × 30 mm × 6 mm)  
Varilla de acero (Diámetro 4 mm, largo 13 cm)  
Esterilla  
Pegamento resistente al agua (Araldit)

➤ Cultivo anaeróbico de *Desulfovibrio desulfuricans*

Reactor anaeróbico cilíndrico, volumen 1,3 L.  
Agitador magnético  
Termocupla Tipo K  
Control on-off de temperatura  
Calefactor de 10 [KW] para acuarios  
Manómetro 0-8 [psi]  
Electrodo de pH, Hanna Instruments

➤ Reactivos

Hidrógeno gaseoso  
Dióxido de carbono gaseoso, para ajuste de pH del medio de cultivo  
Medio de cultivo, especificaciones en Anexo 1

➤ **Medición de sulfato**

El sulfato al interior del reactor fue determinado mediante espectrofotometría usando cloruro de Bario. El producto de la reacción, sulfato de bario, es insoluble en medio acuoso, así la turbiedad de la muestra, provocada por la presencia del sulfato de bario, es proporcional a la cantidad de sulfato presente. Se empleó el método Hach 680 en el espectrofotómetro marca Hach, modelo DR2000.

➤ **Conteo de bacterias en solución**

El conteo de bacterias viables en solución se realizó empleando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico convencional.

## **2.2 Justificación Experimental**

El montaje experimental guarda relación con la simulación de una corrosión mediada por bacterias sulfato reductoras, la cual es acelerada desde dos aspectos fundamentales: primero, otorgando a las bacterias las condiciones óptimas de nutrientes, pH y temperatura para que éstas se desarrollen y multipliquen; y segundo, agregando al medio de cultivo hidrógeno gaseoso como un catalizador o acelerador de la corrosión que las bacterias sulfato reductoras provocan en las muestras metálicas, ya que como se ha mencionado en el capítulo anterior, este compuesto es el reactivo que éstas retiran de la superficie de los metales mediante la reacción conocida como despolarización catódica.

De esta forma, se asegura que el fenómeno de corrosión mediada por las bacterias sulfato reductoras, *Desulfovibrio desulfuricans*, sea observable durante el periodo de experimentación definido en este trabajo.

## **2.3 Montaje**

El montaje para la realización del experimento se presenta en la figura 2.1. El montaje consiste básicamente en un reactor anaeróbico agitado en cuyo interior se incuban las muestras metálicas en sus respectivos soportes, junto con el medio rico en bacterias sulfato reductoras *Desulfovibrio desulfuricans*. El reactor dispone de un toma muestra para ir monitoreando la concentración de sulfato y bacterias a lo largo del experimento, una conexión a los cilindros de hidrógeno y dióxido de carbono, los cuales se necesitan como fuente de electrones para las bacterias y para ajuste de pH respectivamente. Como la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias es de aproximadamente 30°C, se dispuso de una termocupla acoplada a un control on-off que enciende o apaga el calefactor dependiendo de la temperatura. El reactor cuenta también con un electrodo de pH y un pH-metro que permite conocer el valor de este parámetro cada vez que se desee.

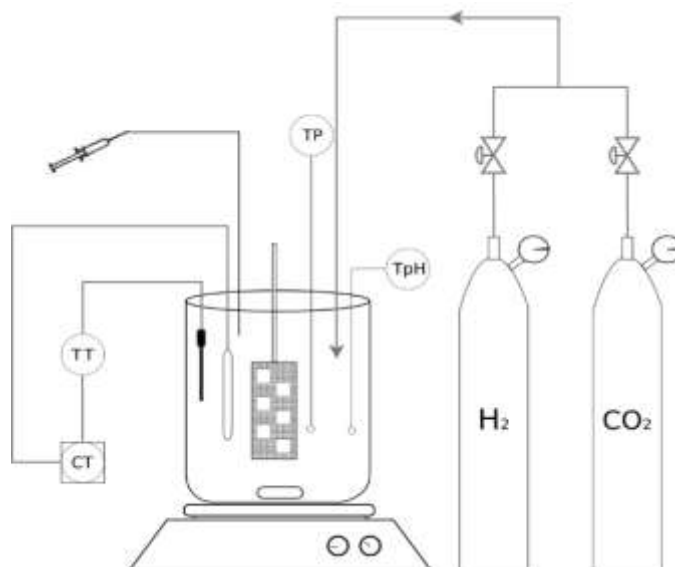


Figura 2.1: Esquema del montaje diseñado para el experimento. El reactor se encuentra completamente cerrado.

## 2.4 Metodología

La metodología empleada en este trabajo consta de varias etapas, las cuales permiten finalmente cuantificar la corrosión mediada por bacterias sulfato reductoras.

En forma general, se realiza y monitorea un cultivo de bacterias sulfato reductoras del género *Desulfovibrio desulfuricans* en un reactor anaeróbico hasta alcanzar una concentración de células determinada, para luego introducir al interior del reactor los soportes con las muestras de los metales a ensayar, las cuales son previamente pulidas y caracterizadas superficialmente por Microscopía electrónica de Barrido. Una vez cumplidos los tiempos de incubación se retiran los soportes del reactor y las muestras de metales son tratadas para poder visualizar bacterias depositadas en su superficie mediante Microscopía electrónica de Barrido. Las fotografías provenientes de Microscopía son procesadas en el programa de código libre Gimp, en el cual se seleccionan las áreas del metal cubiertas por bacterias, exportando una imagen bicolor que se analiza en un programa capaz de entregar el porcentaje de área seleccionada sobre el total del área mediante el recuento de píxeles de cierta coloración de interés. Finalmente, se determina mediante el procesamiento de los datos, los aceros con mayor o menor susceptibilidad de sufrir corrosión mediada por estas bacterias.

A continuación se describen en forma más detallada cada una de las etapas de la metodología:

#### 2.4.1 Realización de un cultivo de *Desulfovibrio desulfuricans*

El primer paso de la experiencia consiste en la realización de un cultivo de bacterias sulfato reductoras del género *Desulfovibrio desulfuricans* en condiciones anaeróbicas y en un medio autotrófico (medio ATCC 1627) enriquecido con extracto de levadura. La composición del medio se encuentra desglosada en el Anexo 1. Para empezar el cultivo no es necesario esterilizar ya que el medio debiese ser selectivo para bacterias sulfato reductoras.

El cultivo se mantiene agitado a una velocidad de 100 rpm aproximadamente al cual se le agrega hidrógeno gaseoso como fuente de electrones. El reactor es monitoreado constantemente y se espera hasta que la concentración de bacterias viables en el cultivo sea de aproximadamente  $10^8$  [células/mL] para introducir las muestras de los metales en el reactor. Esta concentración de bacterias hace posible asegurar adherencia de bacterias a las muestras en un corto periodo de incubación.

#### 2.4.2 Diseño de un soporte para las muestras

Para mantener las muestras metálicas al interior del reactor, se diseñó un soporte que pudiese sostener firmemente las placas de forma que la dirección del fluido (medio con bacterias) fuese “tangencial” a la superficie de las placas metálicas.

El soporte diseñado consiste en una placa de acrílico unida a una varilla de acero doblada en forma de rombo en uno de sus extremos para dar mayor estabilidad al soporte al interior del reactor. Para la unión del acrílico y la varilla metálica se usó un pegamento resistente al agua (Araldit).

Las dimensiones del acrílico y de la varilla metálica se encuentran en la sección Materiales de este mismo capítulo.

El soporte diseñado se muestra en la siguiente figura:



Figura 2.2: Soporte diseñado para mantener las placas metálicas en el reactor

### **2.4.3 Preparación de las muestras para la experiencia**

Para poder comenzar la experiencia, es necesario preparar las muestras de aceros y caracterizar su superficie.

Antes de ser incubadas en el reactor, las muestras de aceros fueron dimensionadas y pulidas a metal blanco con una solución de óxido de cromo, para luego ser limpiadas con alcohol etílico al 98% para de extraer residuos.

Con el fin de observar la superficie a tiempo cero de incubación, se llevaron las muestras para ser analizadas mediante Microscopía electrónica de Barrido; así, se obtienen imágenes antes del ataque por bacterias al interior del reactor.

Una vez que las muestras hayan sido observadas por Microscopía, se deben unir las placas de acero al soporte ya diseñado para mantenerlas en el reactor. La unión de las muestras al soporte debe cumplir con dos objetivos: mantener con firmeza las placas unidas al soporte y ser fácil de romper para recuperar las muestras sin dañar la superficie una vez terminado el periodo de incubación en el reactor. Se optó por unir las muestras metálicas con Araldit en esterilla, que tiene el aspecto de una malla plástica, para finalmente pegar esta malla sobre la cubierta de acrílico del soporte. Las placas se unen en dos filas intercaladas, sin que las muestras de acero se topen.

### **2.4.4 Incubación de las muestras y Microscopía**

Para la incubación de las muestras se tienen tres soportes con los 7 metales a ensayar, los cuales fueron retirados del reactor a tres tiempos distintos: 5, 10 y 15 días de incubación. La elección de los tiempos fue arbitraria.

Finalizado el tiempo de incubación en el reactor, las muestras de acero deben ser sometidas a diversos tratamientos para poder observar bacterias depositadas en su superficie. Así, una vez concluido el tiempo de incubación deseado de las muestras, éstas se extraen del soporte y son fijadas con glutaraldehído al 3%. Posteriormente son lavadas y sometidas al proceso de deshidrataciones sucesivas sumergiendo las muestras en concentraciones crecientes de acetona en agua destilada. Luego, prosigue el secado de punto crítico en donde el solvente en que se encuentra el soporte es removido con dióxido de carbono gaseoso, el cual mantiene la forma de las bacterias sin destruirlas. Finalmente, las muestras son cubiertas con oro/paladio a fin de proveer de una superficie conductora para la Microscopía electrónica de Barrido.

Las superficies de las muestras ya preparadas son analizadas con Microscopía Electrónica de Barrido para observar el progreso de la adherencia de las bacterias a los aceros y el daño provocado por éstas en la superficie. Se observan las muestras a diferentes magnitudes obteniendo fotografías con un aumento de 10.000 veces el tamaño real, magnitud en la cual es posible distinguir bacterias con bastante claridad. Para cada una de las muestras de acero se obtuvieron 4 fotografías de sectores distintos elegidos al azar con el fin de calcular un promedio de cubrimiento para cada una de las muestras.

## 2.4.5 Cuantificación de la Biocorrosión

El avance de la corrosión sobre las muestras se cuantificó indirectamente mediante el área cubierta por las bacterias sobre la superficie del metal, suponiendo que existe una relación directa entre la cantidad de bacterias adheridas a la superficie del material y el daño causado por corrosión.

Para efectuar esta cuantificación de bacterias sobre la superficie se emplearon las fotografías obtenidas de Microscopía electrónica de Barrido, las cuales fueron procesadas con dos programas para llegar finalmente, al porcentaje cubierto de la muestra en los tres tiempos de incubación.

El primer programa empleado corresponde a un software de código abierto Gimp. Con él se seleccionan las áreas de las fotografías correspondientes a superficie del acero cubierta por bacterias para cada una de las muestras y para todos los tiempos de incubación. La selección de estas áreas se realizó conforme al tamaño de las bacterias (1 a 2  $\mu\text{m}$ ) las cuales tienen forma ovalada, y a la presencia de exopolímeros en las muestras, con los cuales las bacterias se adhieren firmemente al acero. Del programa Gimp se obtiene entonces, una imagen en dos colores que diferencia las zonas de las muestras cubiertas y no cubiertas por bacterias. Esta imagen bicolor facilitará el cálculo del porcentaje de la muestra cubierta por bacterias en el siguiente programa utilizado.

Con la herramienta computacional Pixarea, un programa que mediante el conteo de píxeles de la imagen de interés, entrega el porcentaje de área seleccionada en relación a la imagen completa; se logró calcular el porcentaje de área cubierta en cada una de las muestras. El programa permite cargar la imagen que se desea analizar y seleccionar de ella las regiones de interés destacándolas con un color determinado. Luego, el programa realiza el conteo de píxeles totales de la imagen completa y los píxeles del color con que se seleccionan las regiones de interés, para entregar finalmente el porcentaje correspondiente a la región de interés, área cubierta por bacterias en este caso.

Para disminuir el error se promediaron los resultados provenientes de 4 fotografías de la misma muestra tomadas al azar en las sesiones de Microscopía electrónica de Barrido. Luego, teniendo el área de la muestra se calcula el área total de la muestra cubierta por bacterias. Para una mayor descripción del programa Pixarea, ver Anexo 2.

## 2.4.6 Análisis de Resultados

Con los resultados de cubrimiento obtenidos, se realiza una gráfica que refleja el progreso de la superficie cubierta por las bacterias para cada una de las muestras en el tiempo que dura la experiencia.

A su vez, estos datos del progreso de la superficie cubierta por las bacterias en las muestras en el tiempo, se utilizaron para determinar el orden cinético de la adherencia de las bacterias a la superficie al metal, y por ende, algo así como la velocidad específica de adherencia de *Desulfovibrio desulfuricans* a cada uno de los metales ensayados, suponiendo que la cinética sólo depende del área cubierta por las bacterias.

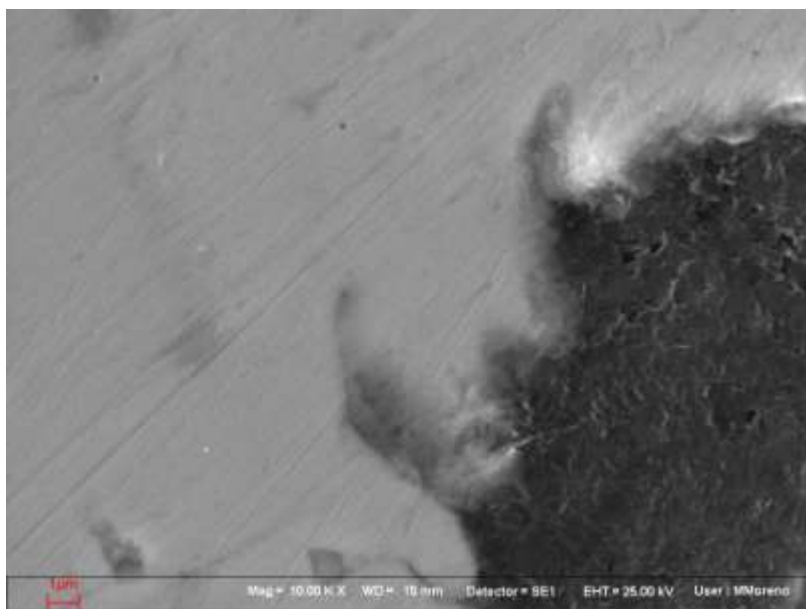
Finalmente, se compara entre los metales estudiados para concluir, cuál de ellos es más susceptible a la corrosión por este tipo de bacterias bajo las condiciones estudiadas.

## Capítulo 3 Resultados y Discusiones

### 3.1 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Se presentan a continuación las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido, de las distintas muestras de metales que fueron incubadas a distintos tiempos en el reactor. Todas las fotografías que se muestran están con un aumento de 10.000 veces el tamaño real, y la barra presente en el extremo inferior derecho de cada fotografía representa un tamaño de 1 a 2  $\mu\text{m}$ . dependiendo del caso.

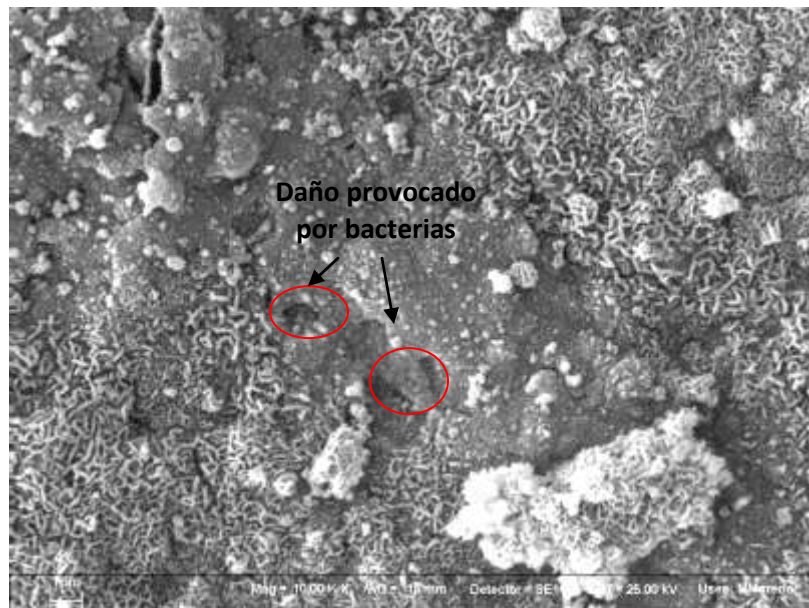
#### 3.1.1 Fierro fundido



**Fotografía 3.1: Superficie del Fierro fundido previo a la incubación en el reactor**

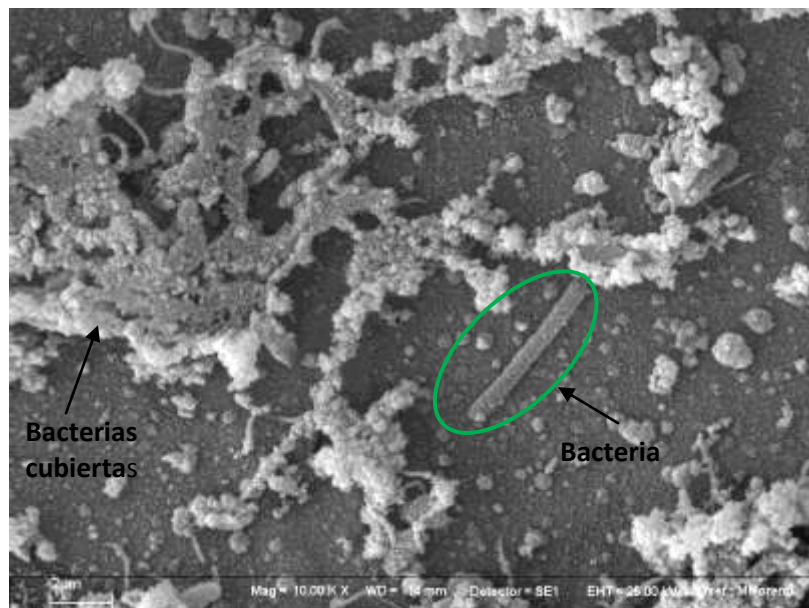
En la fotografía 3.1 se observa la superficie del Fierro fundido previo a la incubación de las muestras en el reactor. Se observa que el material, aparentemente pulido a metal blanco, posee regiones bastante irregulares en su superficie, manchas y ralladuras.





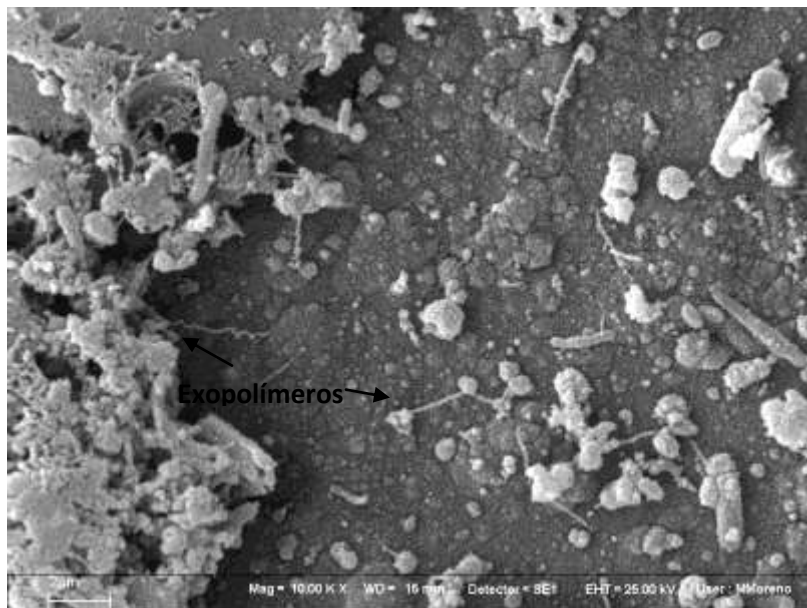
**Fotografía 3.2: Superficie del Hierro fundido tras 5 días de incubación en el reactor**

A los 5 días de incubación ya se observa sobre la muestra depósitos de sales y probablemente óxidos de hierro, en adelante, productos de corrosión. La presencia de bacterias se aprecia en lento desarrollo en esta muestra habiendo más evidencia de su presencia dado el daño en el metal, el cual que se observa en forma de cavidades sobre la superficie del metal.



**Fotografía 3.3: Superficie de Hierro fundido tras 10 días de incubación en el reactor**

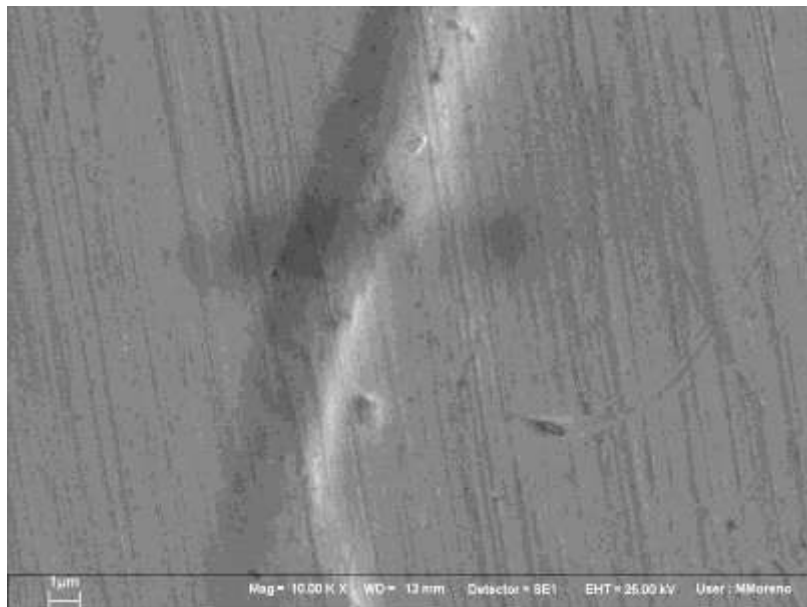
A los 10 días de incubación ya se pueden observar a las bacterias unidas al metal a través de lipopolisacáridos (LPS), también conocidos como exopolímeros, formando verdaderas redes en donde quedan atrapados, cubriendo a las bacterias, productos de corrosión. La superficie libre del metal se observa más porosa, evidencia de la corrosión electroquímica, en donde la pérdida de material es más uniforme.



**Fotografía 3.4: Superficie de Hierro fundido tras 15 días de incubación en el reactor**

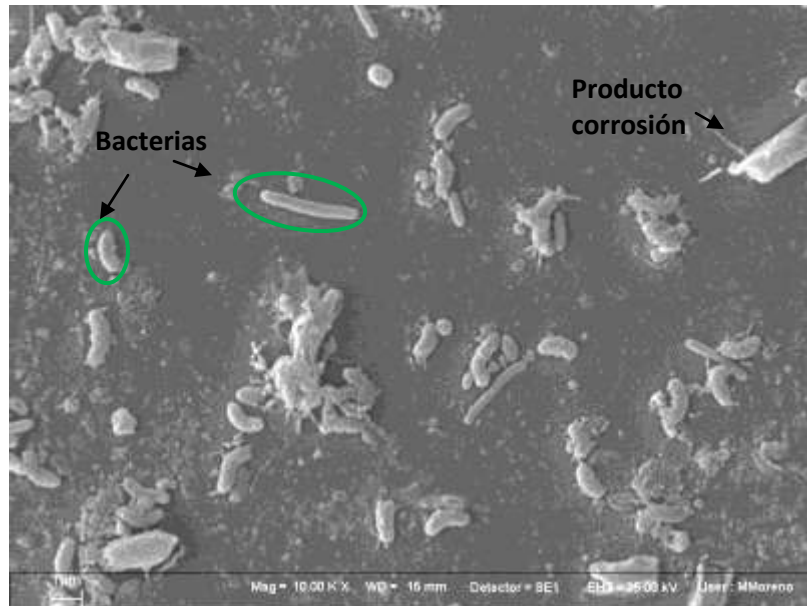
A los 15 días de incubación de la muestra se observa un aumento de la superficie cubierta por bacterias y la superficie no cubierta, o libre, del metal mucho más porosa, evidencia de la corrosión electroquímica. Seguramente, bajo la capa de bacterias que cubre el material existen cavidades provocadas por su presencia sobre el metal.

### **3.1.2 Acero Inoxidable 316L**



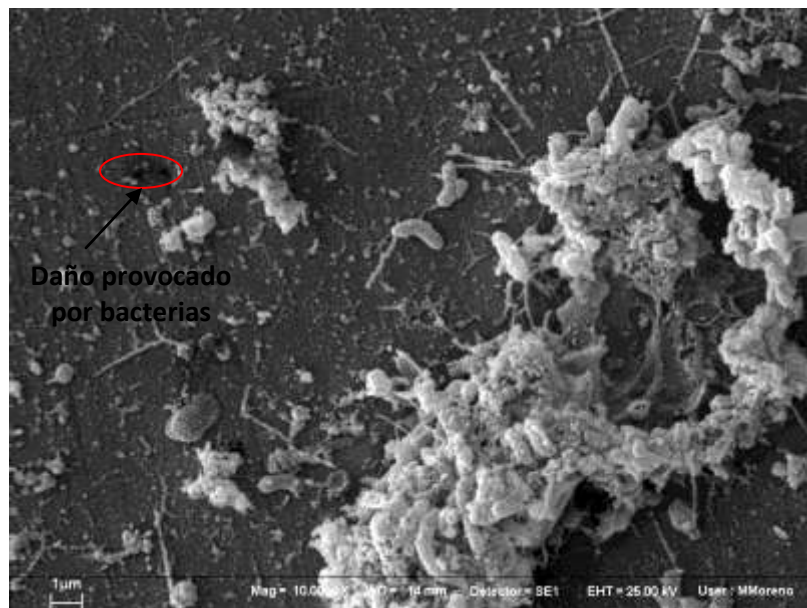
**Fotografía 3.5: Superficie de Acero inoxidable AISI 316L previo a la incubación en el reactor**

Al igual que en el hierro fundido, se observa la superficie del metal previo a la incubación de las muestras en el reactor. La superficie no se encuentra completamente lisa ya que el pulido no es perfecto. Sin embargo, no se observan hoyos sino sólo pequeñas ralladuras sobre la superficie.



Fotografía 3.6: Superficie de Acero Inoxidable AISI 316L tras 5 días de incubación en el reactor

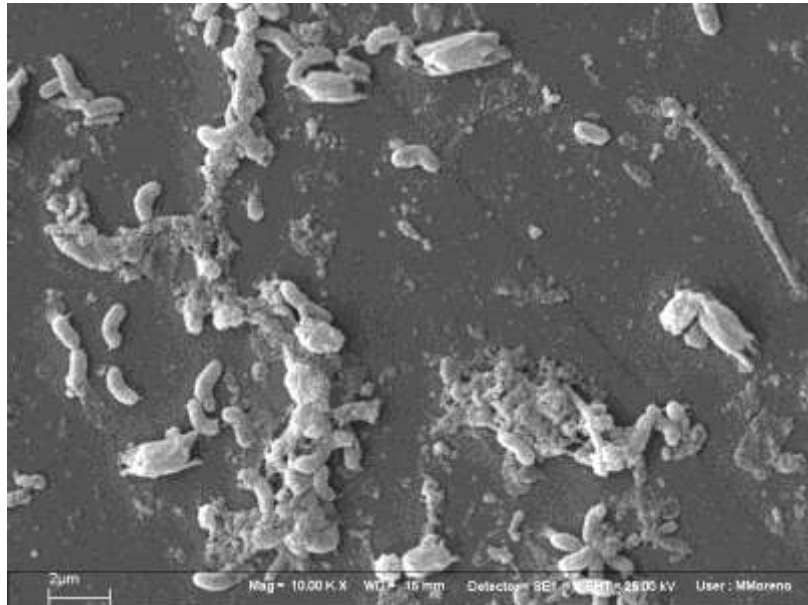
Tras 5 días de incubación, ya se pueden notar bacterias adheridas al metal junto con productos de corrosión en forma de pequeños cristales. Se observa también, una heterogeneidad de bacterias por lo que se desprende que el cultivo empleado para el desarrollo de este trabajo no contiene solamente bacterias del género *Desulfovibrio desulfuricans* como se esperaba, sino que seguramente, otro tipo de bacteria sulfato reductora, dadas las características del medio de cultivo.



Fotografía 3.7: Superficie de Acero inoxidable AISI 316L tras 10 días de incubación en el reactor

En la fotografía 3.7 se observa la superficie del acero inoxidable AISI 316L tras 10 días de incubación en el reactor. Las bacterias ya se organizan en agregaciones mucho más

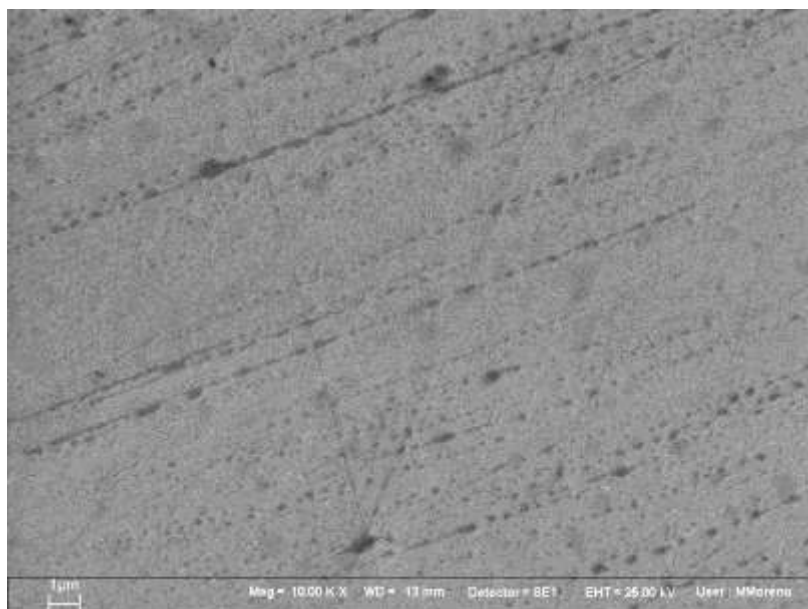
compactas, las cuales se componen de bacterias, exopolímeros y productos de corrosión. Es posible notar claramente que las bacterias no se adhieren al metal en forma de monocapas, sino que lo hacen en estructuras multicapa.



**Fotografía 3.8: Superficie de Acero inoxidable AISI 316L tras 15 días de incubación en el reactor**

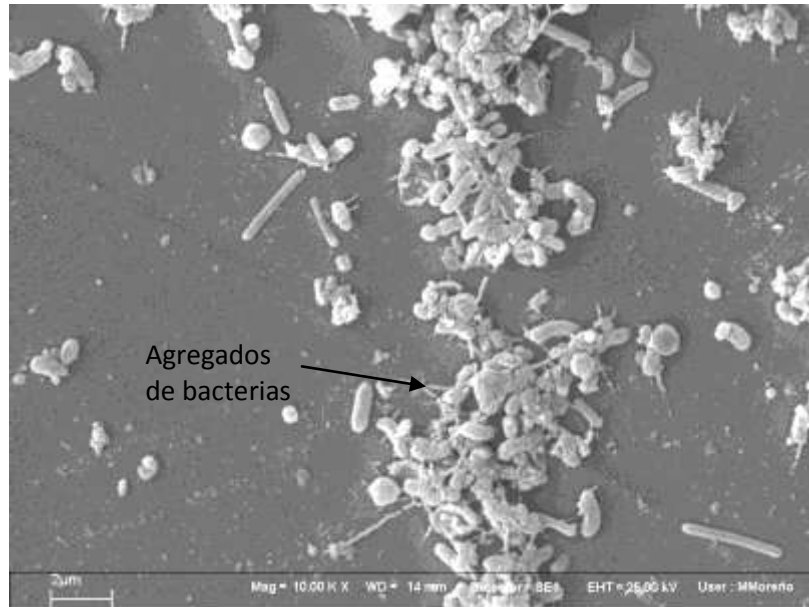
Para los 15 días de incubación, pareciera que el área cubierta por bacterias en vez de aumentar ha ido disminuyendo, lo cual no concuerda con lo esperado. No se pueden sacar mayores conclusiones de este resultado a menos que haya ocurrido algún fenómeno en la superficie del acero que haya provocado que las bacterias se hayan desprendido en vez de adherirse a la superficie.

### **3.1.3 Acero Inoxidable 420**



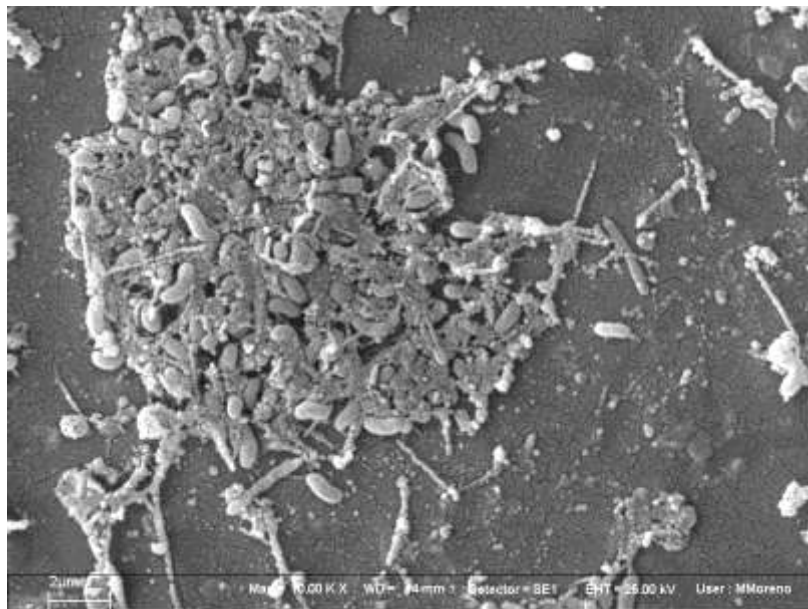
**Fotografía 3.9: Superficie de Acero inoxidable AISI 420 previo a la incubación en el reactor**

En la fotografía 3.9 se aprecia la superficie del acero inoxidable AISI 420 antes de ser sometido al ataque de bacterias en el reactor. La superficie, microscópicamente, no queda completamente lisa a pesar de que fue pulida a metal blanco quedando con una apariencia brillante y lisa al ojo humano. Se observan ralladuras y manchas.



**Fotografía 3.10: Superficie de Acero Inoxidable AISI 420 tras 5 días de incubación en el reactor**

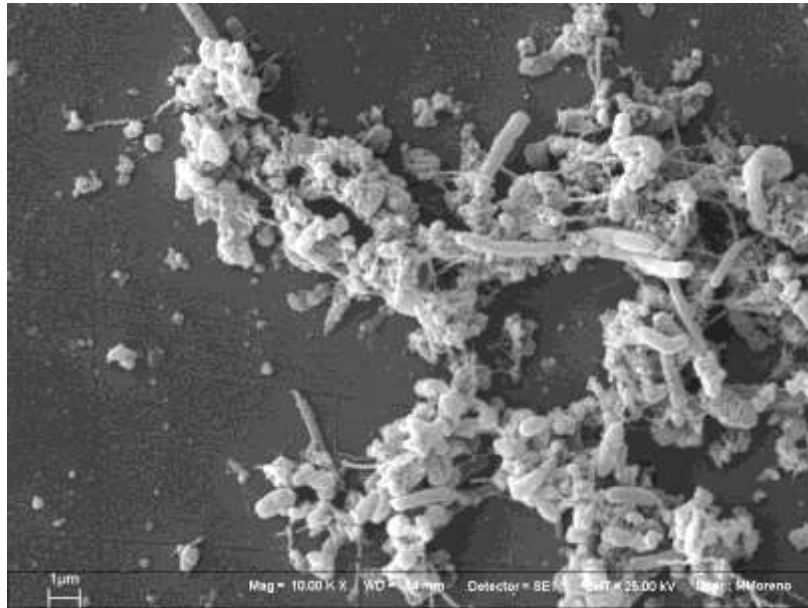
A los 5 días de incubación de las muestras ya se observan bacterias adheridas a la superficie del metal, en forma no independiente, sino que formando agregados con otras bacterias. La superficie libre del metal se aprecia más o menos lisa, dando cuenta de la mayor resistencia a la corrosión en comparación con el hierro fundido.



**Fotografía 3.11: Superficie de Acero Inoxidable AISI 420 tras 10 días de incubación en el reactor**



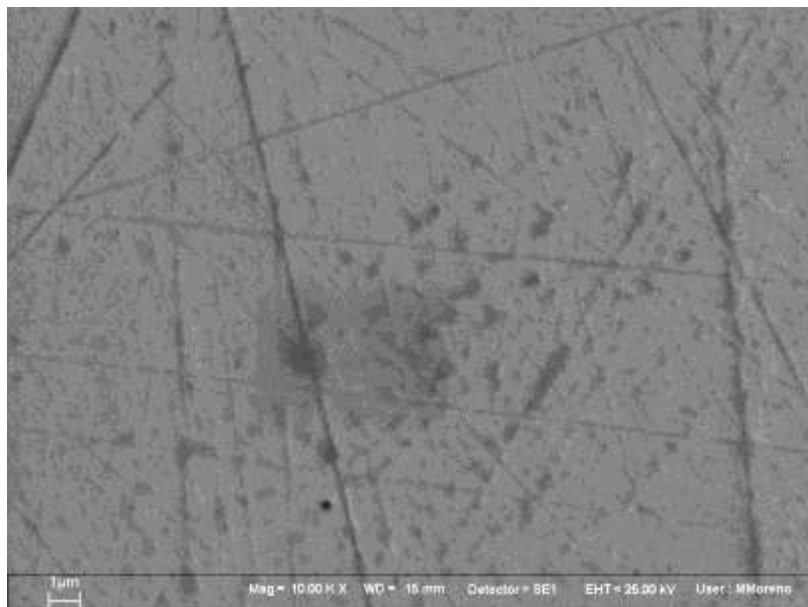
A los 10 días de incubación de la muestra de acero se aprecia una mayor densidad de bacterias en estos agregados y también una mayor superficie cubierta del metal. La superficie no cubierta del acero comienza a manifestar pequeños indicios de corrosión electroquímica.



**Fotografía 3.12: Superficie de Acero inoxidable AISI 420 tras 15 días de incubación en el reactor**

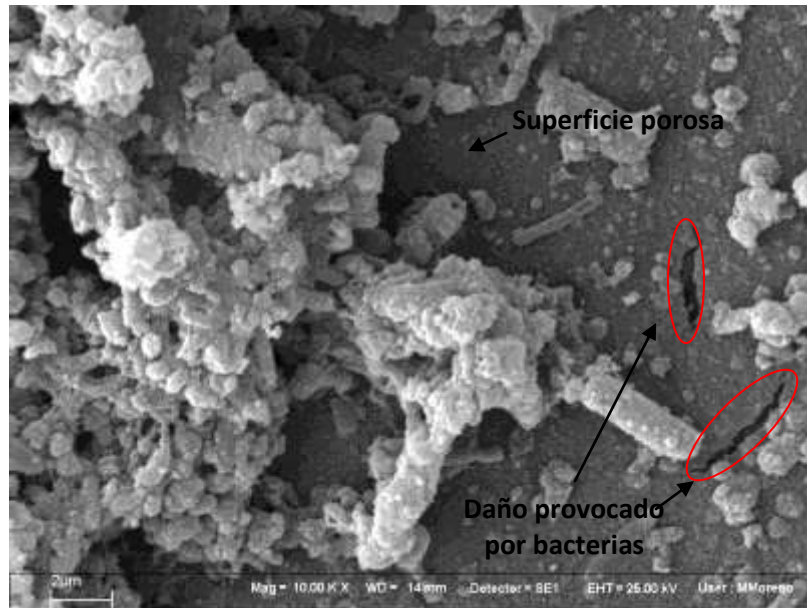
La fotografía correspondiente a los 15 días de incubación presenta agregaciones de bacterias, de mayor espesor que en la fotografía anterior. La superficie no cubierta por bacterias no presenta mayor cambio en comparación con la muestra correspondiente a los 10 días de incubación.

### 3.1.4 Acero al carbón 1020



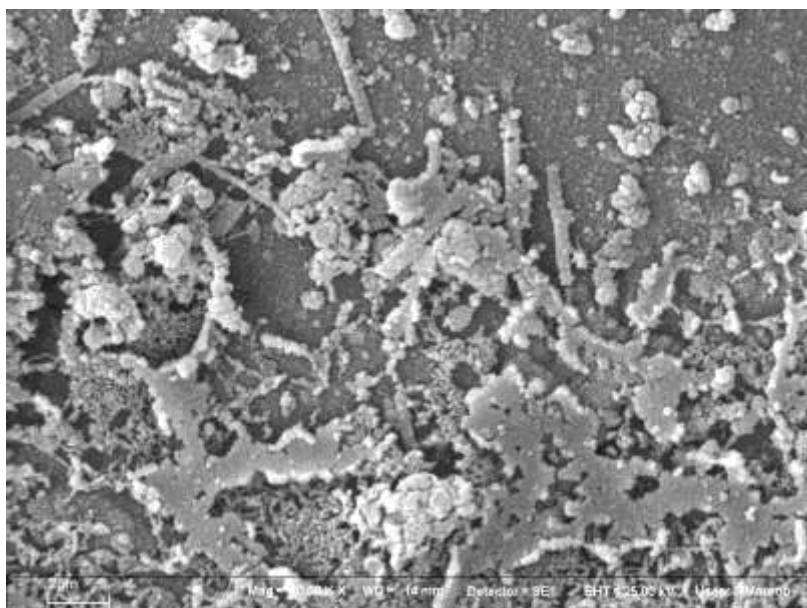
**Fotografía 3.13: Superficie de Acero al carbón AISI 1020 previo a la incubación en el reactor**

La fotografía 3.13 muestra la superficie del acero al carbón 1020 antes de ser incubada en el reactor. La superficie es muy similar al caso del acero inoxidable AISI 420, presentando algunas manchas y ralladuras sin orificios.



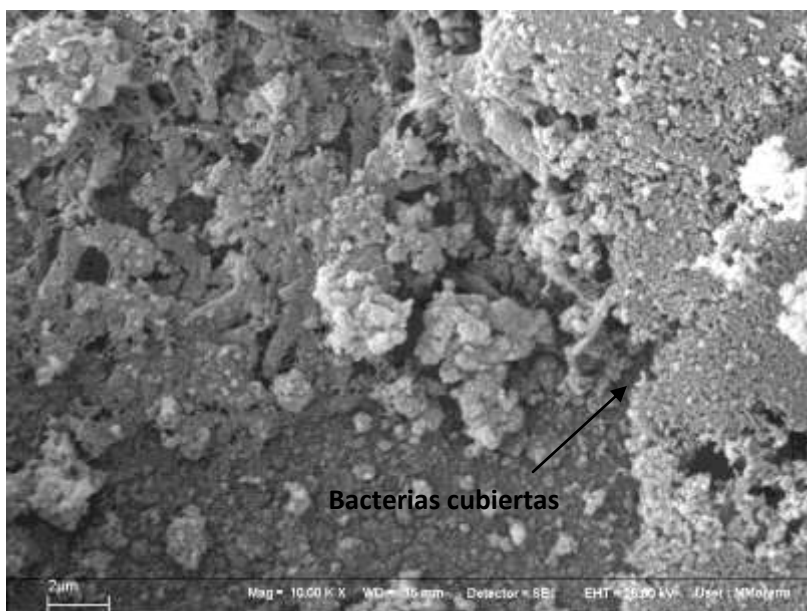
**Fotografía 3.14: Superficie de Acero al carbón AISI 1020 tras 5 días de incubación en el reactor**

Ya a los 5 días de incubación se puede observar daño sobre la superficie. Las zonas recalcadas en la fotografía 3.14 señalan probablemente sitios en donde hubo bacterias adheridas provocando los orificios en el metal. La superficie no cubierta se observa porosa, con pequeños gránulos que evidencia la corrosión electroquímica sobre el acero. Se muestra además una gran agrupación de bacterias y productos de corrosión, de espesor considerable en comparación con todas las muestras analizadas. Sin embargo, en las otras fotografías correspondientes al quinto día de incubación de este tipo de acero, no se presenta tanta cantidad de bacterias, sino que se eligió ésta por presentar orificios que dejan de manifiesto la corrosión mediada por bacterias.



**Fotografía 3.15: Superficie de Acero al carbón AISI 1020 tras 10 días de incubación en el reactor**

Al décimo día de incubación, aumenta el área cubierta por bacterias y se observa que éstas se van cubriendo por productos de corrosión, aislando el metal del ambiente que lo rodea, en este caso, el medio de cultivo en el reactor. La superficie libre del metal se observa más porosa que el correspondiente al quinto día de incubación.

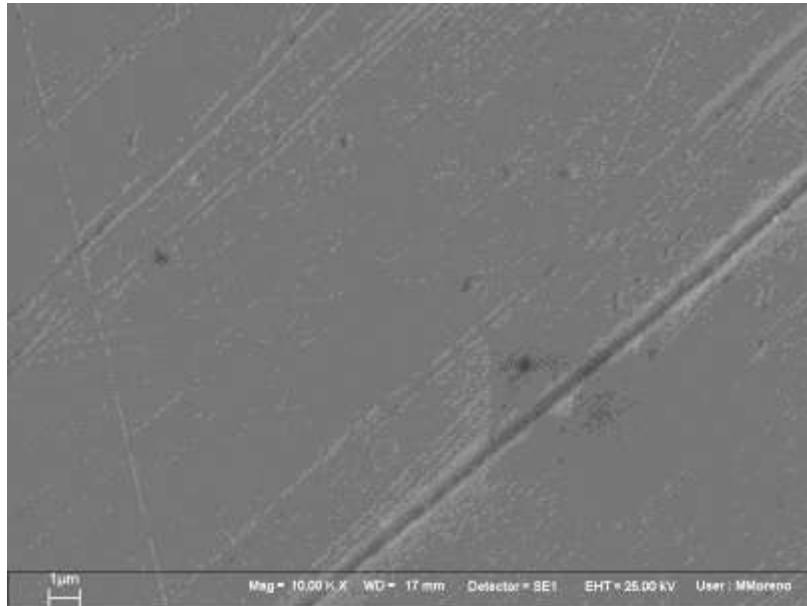


**Fotografía 3.16: Superficie de Acero al carbón AISI 1020 tras 15 días de incubación en el reactor**

A los 15 días de incubación de la muestra se observa una mayor cantidad de bacterias adheridas a la superficie, formando una capa de mayor espesor en comparación con las de días anteriores. El grado de corrosión electroquímica también ha avanzado ya que la superficie libre está aún más porosa.

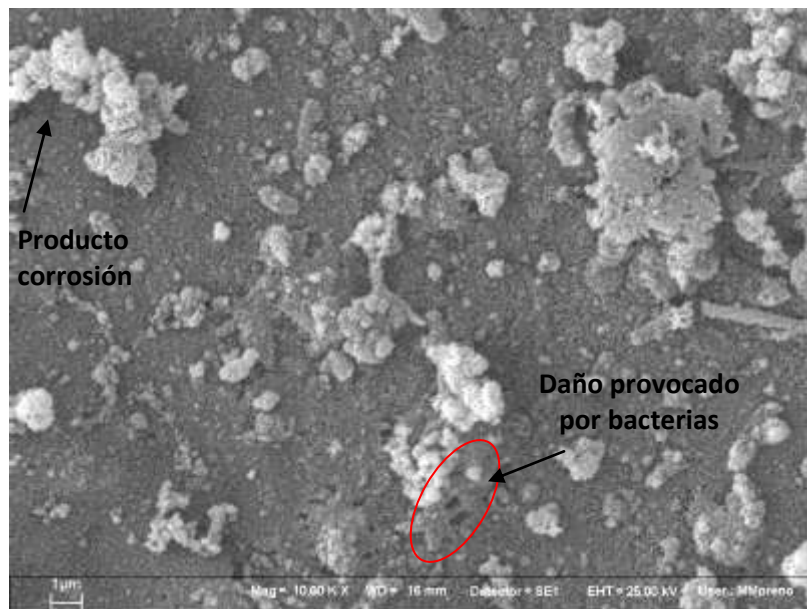


### 3.1.5 Acero A36



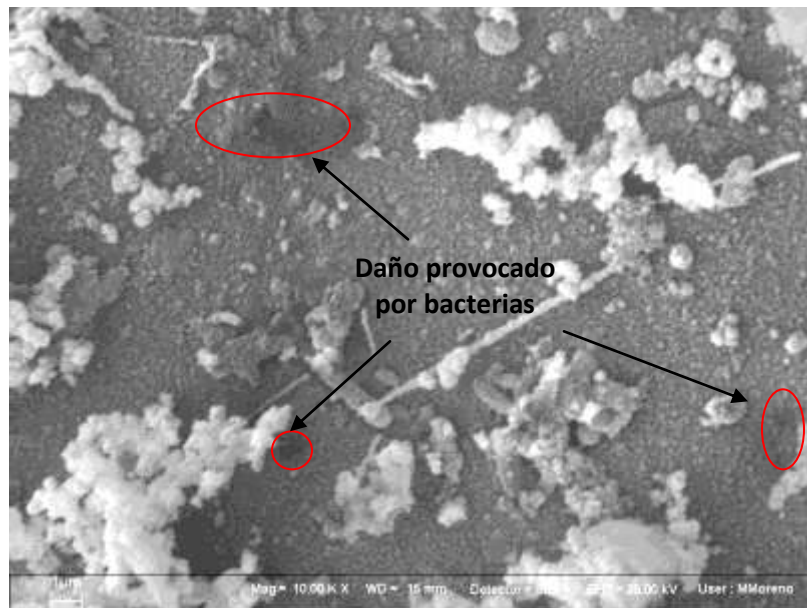
**Fotografía 3.17: Superficie de Acero al carbón A36 previo a la incubación en el reactor**

En la fotografía 3.17 se presenta la superficie del acero estructural AISI A36 antes de introducir las muestras en el reactor. Se observa una superficie relativamente lisa con algunos surcos, ralladuras y pequeñas manchas.



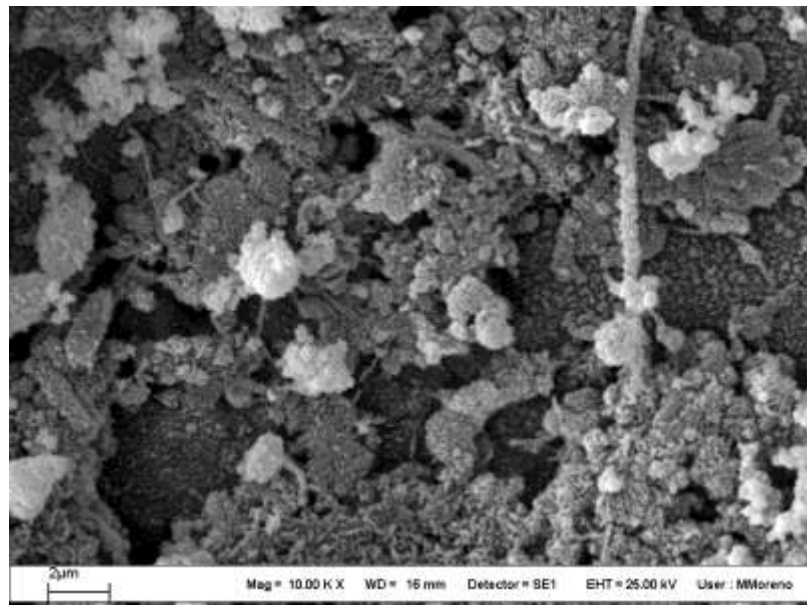
**Fotografía 3.18: Superficie de Acero al carbón A36 tras 5 días de incubación en el reactor**

Tras 5 días de incubación ya se observa la presencia de bacterias sobre la muestra y evidencias de corrosión mediada por éstas. La superficie no cubierta por bacterias se presenta ya bastante porosa al quinto día.



**Fotografía 3.19: Superficie de Acero al carbón A36 tras 10 días de incubación en el reactor**

A los 10 días de incubación se observa mayor cantidad de bacterias unidas a través de sus exopolímeros a la superficie del metal. Las bacterias de a poco comienzan a organizarse en esas especies de agregaciones de bacterias y sedimentos, habiendo mayormente productos de corrosión sobre la superficie del acero.



**Fotografía 3.20: Superficie de Acero al carbón A36 tras 15 días de incubación en el reactor**

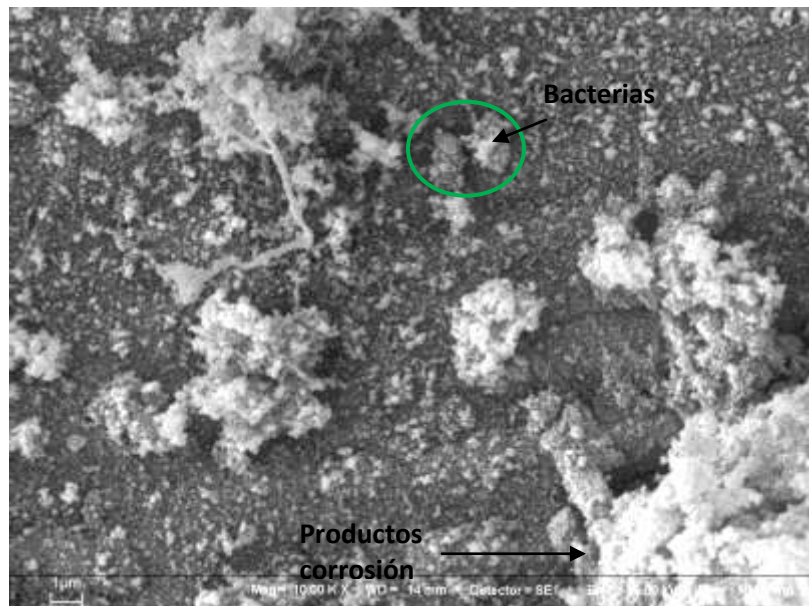
El cambio de la superficie a los 15 días de incubación de la muestra es notorio. Existe mucha más área cubierta por bacterias y éstas se encuentran ya como grandes agregaciones de bacterias, exopolímeros y productos de corrosión atrapados entre ellos. La superficie no cubierta está mucho más corroída por efectos netamente electroquímicos, estando ésta mucho más porosa al término de la experiencia.

### 3.1.6 Acero cromo níquel bonificado SAE 4340



**Fotografía 3.21: Superficie de Acero bonificado SAE 4340 previo a la incubación en el reactor**

En la fotografía 3.21 se presenta la superficie del acero SAE 4340 previo a la incubación de las muestras en el reactor. Se observa que una superficie aparentemente pulida a metal blanco es realmente una superficie con bastantes hendiduras y manchas, lo cual podría facilitar la adherencia de las bacterias más que en las otras muestras de aceros.



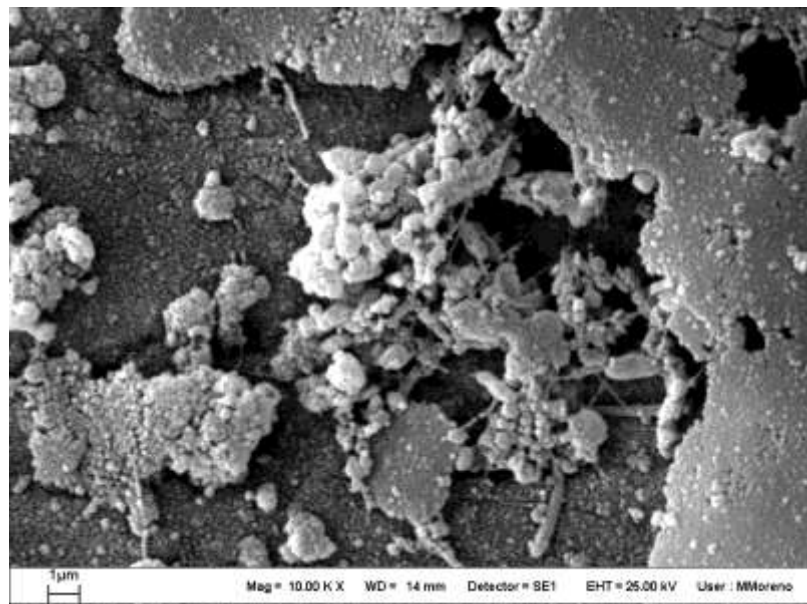
**Fotografía 3.22: Superficie de Acero bonificado SAE 4340 tras 5 días de incubación en el reactor**

Tras 5 días de incubación, no se aprecia una cantidad considerable de bacterias sobre la muestra, sino que aparecen más productos de corrosión sobre ella.



**Fotografía 3.23: Superficie de Acero bonificado SAE 4340 tras 10 días de incubación en el reactor**

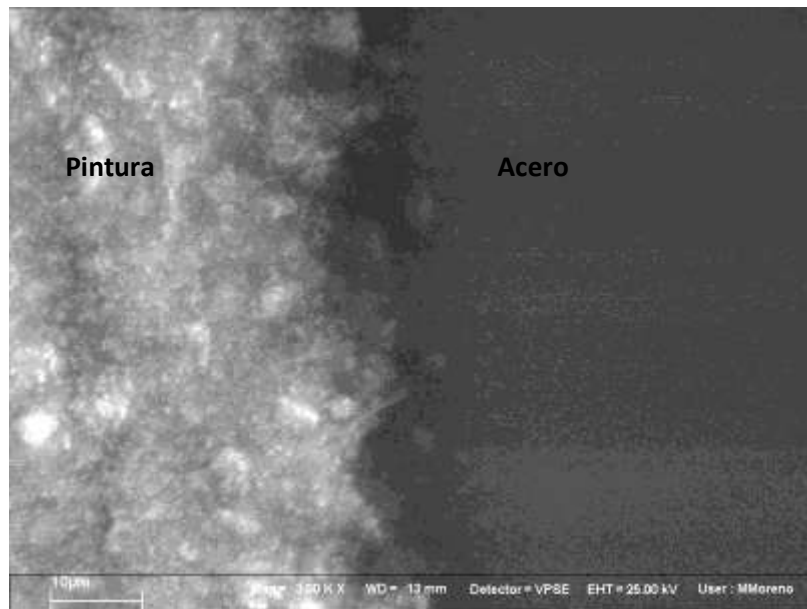
Al décimo día de incubación de la muestra, se observa un cambio en la superficie ya que existe mayor cantidad de área cubierta por bacterias. Éstas se encuentran mayormente agregadas con productos de corrosión.



**Fotografía 3.24: Superficie de Acero bonificado SAE 4340 tras 15 días de incubación en el reactor**

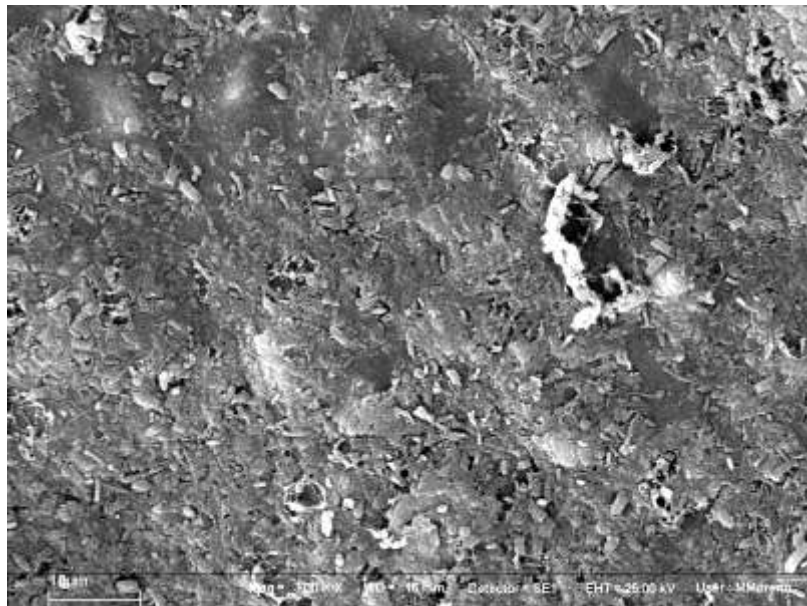
Al finalizar el tiempo de incubación más prolongado de las muestras, se observa el aumento de la superficie cubierta por bacterias y el mayor espesor de las capas. La superficie aún libre del metal se torna más irregular por efecto de la corrosión electroquímica.

### 3.1.7 Pintura Anticorrosiva



**Fotografía 3.25: Interfase entre el acero inoxidable y la pintura anticorrosiva previa a la incubación en el reactor. Aumento: 3000 veces**

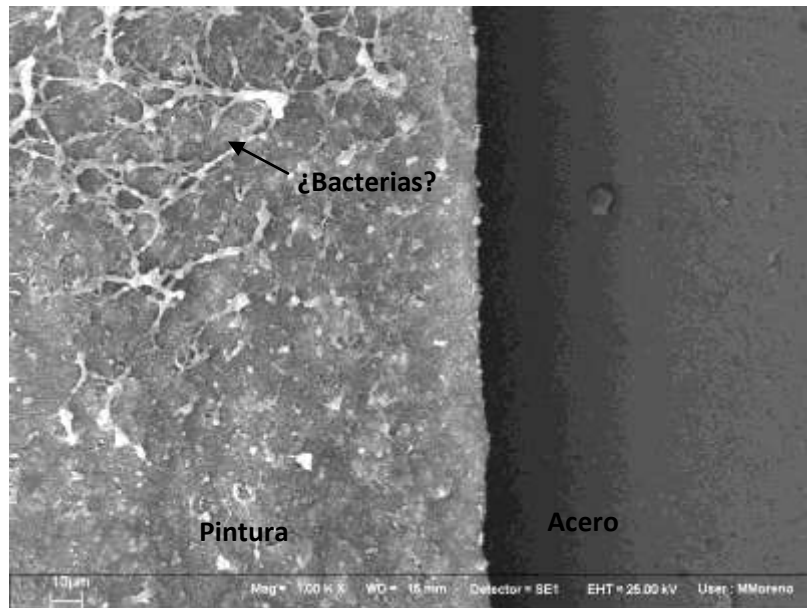
En la figura 3.25 se observa la interfase entre el acero inoxidable y la pintura anticorrosiva antes de la incubación de las muestras en el reactor. Dado que la capa de pintura sobre la superficie del acero no es conductora, la calidad de la imagen no permite obtener mayores detalles sobre la cantidad de poros de la pintura, pero por los perfiles de colores sobre la pintura, se presume que la superficie de la pintura no es regular.



**Fotografía 3.26: Superficie de la pintura anticorrosiva tras 5 días de incubación en el reactor. Aumento: 3000 veces**

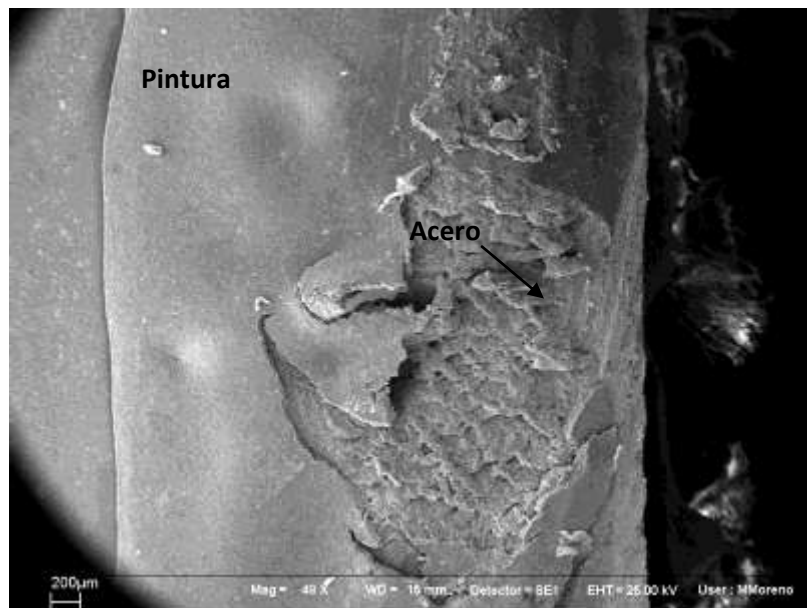


En la fotografía anterior se muestra la superficie de la pintura anticorrosiva tras 5 días de incubación en el reactor. Se observa una gran cantidad de bacterias adheridas a la pintura y una cantidad considerable de orificios.



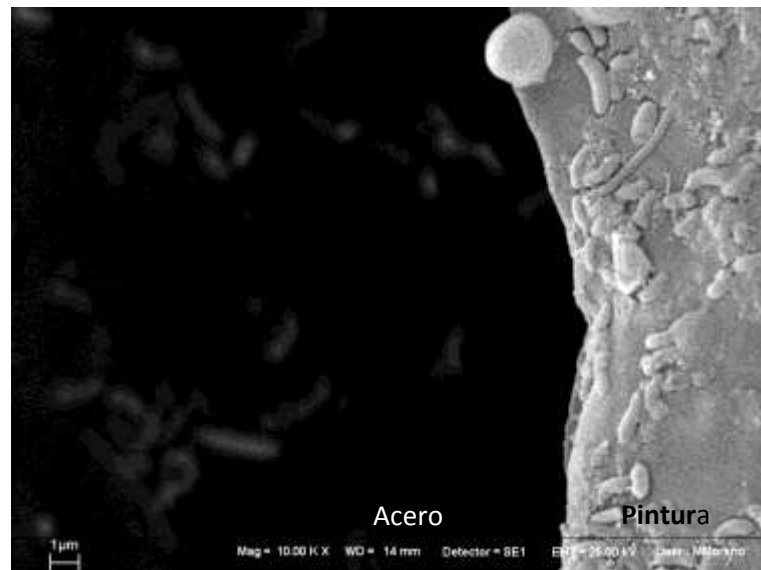
**Fotografía 3.27: Interfase entre Acero inoxidable y pintura anticorrosiva tras 5 días de incubación en el reactor. Aumento: 1000 veces**

En la fotografía 3.27 se muestra la interfase entre la pintura y el acero inoxidable. Asombrosamente, se observan más bacterias sobre la pintura anticorrosiva que sobre el acero inoxidable. Asimismo, en la zona superior de la pintura se ven estructuras similares a hifas de hongos, abriendo la posibilidad de que la pintura anticorrosiva haya estado contaminada.

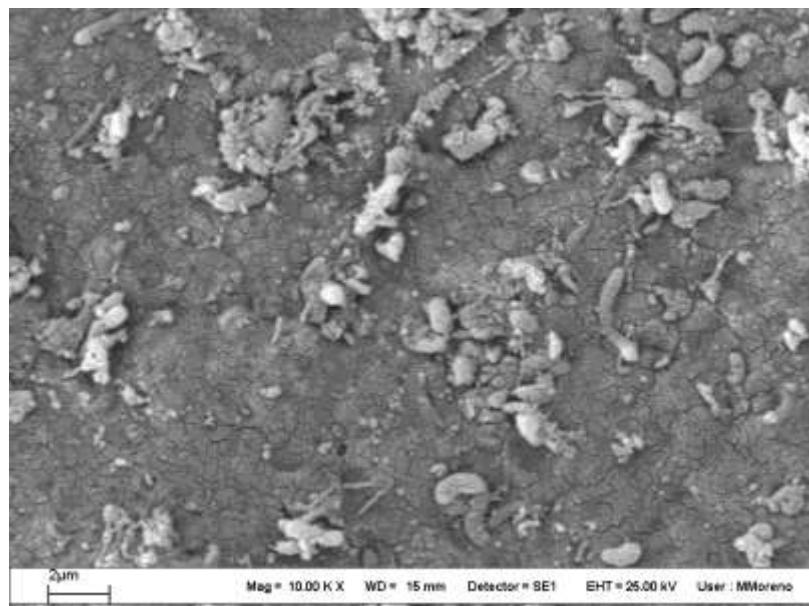


**Fotografía 3.28: Superficie de la pintura anticorrosiva tras 10 días de incubación en el reactor. Aumento: 48 veces**

La fotografía 3.28 muestra una vista panorámica de la superficie de la pintura anticorrosiva tras 10 días de incubación de la muestra en el reactor. Se observa una pérdida importante de pintura la cual probablemente haya sido provocada tanto por la acción de las bacterias como por la agitación del reactor.



**Fotografía 3.29: Interfase entre Acero inoxidable y pintura anticorrosiva tras 10 días de incubación.  
Aumento: 10.000 veces**



**Fotografía 3.30: Superficie de la pintura anticorrosiva tras 15 días de incubación en el reactor.  
Aumento: 10.000 veces**

Tras 15 días de incubación en el reactor, se muestra en la fotografía 3.30 la superficie de la pintura anticorrosiva. Se observa la presencia de bacterias y sus exopolímeros, con los cuales se adhieren a la pintura. Las zonas de la pintura anticorrosiva que no está cubierta por bacterias se observa un tanto quebradizas. Debido a una mala manipulación de esta última muestra, no se

tiene registro fotográfico de la interfase pintura-metal, ya que la capa de pintura se despegó del acero, no quedando interfase que fotografiar.

La pintura anticorrosiva ensayada parece no ser, entonces, el mejor recubrimiento para aceros ya que es fácilmente colonizada y dañada por bacterias. Según la información del fabricante, esta pintura es a base de resinas alquídicas a la cual se le agregan compuestos con características anticorrosivas, no señalados. En general, las pinturas anticorrosivas de uso industrial son epóxicas, por lo cual se sugiere en trabajos posteriores hacer la comparación entre estos dos tipos de pinturas.



### 3.2 Cuantificación de la biocorrosión con Pixarea

El procesamiento de las imágenes obtenidas por Microscopía y el empleo de los programas señalados en la sección Metodología, permitieron el cálculo del porcentaje de superficie de los metales cubierto por bacterias, mediante el recuento de pixeles de las áreas seleccionadas correspondientes a bacterias y metal descubierto. Como el área de las muestras metálicas es conocida, se calculó además el área de la muestra cubierta por las bacterias en cuestión.

Los resultados obtenidos, por metal, se resumen a continuación:

#### 3.2.1 Fierro fundido

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para las muestras de Fierro fundido incubadas a tres tiempos distintos en un medio de cultivo con bacterias sulfato reductoras.

Tiempo [d]	% Superficie cubierta por bacterias	Área de la muestra cubierta por bacterias [mm <sup>2</sup> ]
0	0	0
5	2,8	276
10	34,6	3.460
15	25,8	2.576

Tabla 3.1: Resumen resultados para Fierro fundido

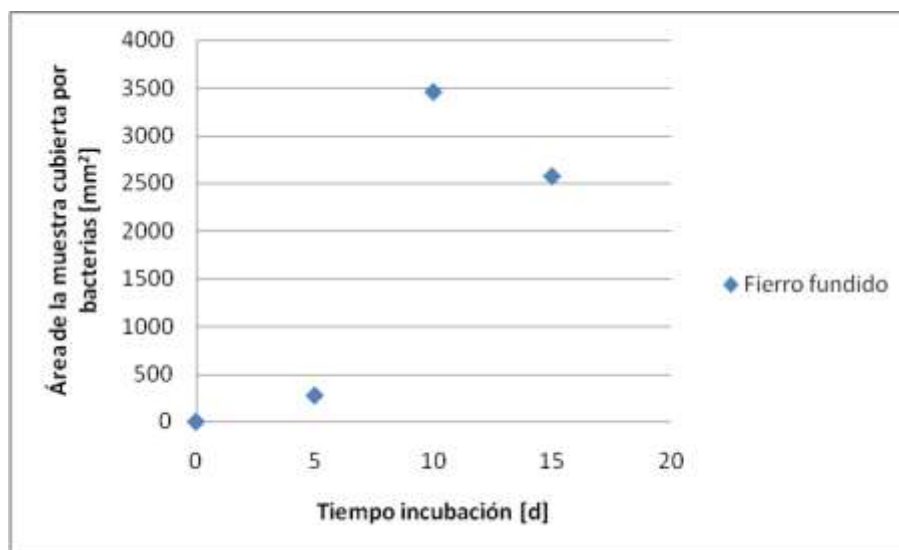


Gráfico 3.1: Progreso de la superficie cubierta por bacterias en Fierro fundido a lo largo de la experiencia

El gráfico anterior representa la evolución en el tiempo del cubrimiento de la superficie de la muestra de Fierro fundido por bacterias. Se observa una tendencia creciente del área cubierta hasta el día 10 de incubación, bajando significativamente para el tercer tiempo observado.

A partir del gráfico 3.1 se puede observar que al día 15 de incubación aún no se alcanza un estado estacionario de adherencia de bacterias a la superficie, sino que la tendencia es a seguir

umentando el área cubierta por bacterias en el tiempo. Un mayor tiempo de incubación de las muestras podría haber aportado mayor información para la estimación de la cinética de adherencia de las bacterias, o en forma equivalente, el área cubierta del metal por éstas en el tiempo.

Es importante recalcar que el experimento no se realizó con una única muestra del metal, sino que se utilizaron tres muestras presuntamente idénticas para el seguimiento de la corrosión. Luego, es posible que alguna singularidad en la superficie de la muestra incubada por 10 días en el reactor haya provocado que más bacterias se hayan adherido a su superficie, como por ejemplo, que el pulimiento de la superficie previo a la incubación no haya tenido el mismo efecto, quedando ésta con mayor rugosidad explicando la mayor superficie cubierta por bacterias.

Por otro lado, es interesante, desde el punto de vista cinético, esbozar algún tipo de orden para la cinética de adherencia de las bacterias, o de poblamiento bacteriano, a este tipo de superficie considerando solamente, por simplicidad y primera aproximación, el área libre del metal que queda disponible para que otras bacterias se adhieran a ella, como una fuerza motriz que impulsa a las bacterias a unirse al metal.

En este caso, pareciera ser que el punto correspondiente al día 10 de incubación no representa ciertamente el comportamiento de la adherencia de las bacterias a este metal, por lo cual queda excluido en esta etapa del análisis. Se descarta ese punto pues es posible que se haya detectado una mayor cantidad de bacterias en la superficie, unidas débilmente al acero. Se debe considerar que las muestras no fueron previamente lavadas antes de la etapa de fijación con glutaraldehído para remover aquellas bacterias débilmente unidas al metal.

Así, considerando los tres puntos restantes, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cinética observada	Primer Orden
<b>Velocidad inicial de poblamiento de la superficie</b>	-0,039 [d <sup>-1</sup> ]

**Tabla 3.2: Resultados sobre la cinética de adherencia de las bacterias a Fierro fundido**

De esta forma, la expresión de la cinética para el área cubierta por bacterias queda de la siguiente manera:

$$\frac{dA}{dt} = kA' = k(A_T - A)$$

O equivalentemente:

$$A(t) = A_T \times (1 - \exp(kt))$$

$$A(t) = 10000 \times (1 - \exp(-0,039t)) [mm^2]$$

La comparación de las velocidades de cubrimiento de la superficie por las bacterias para los distintos metales ensayados se encuentra al término del análisis por metal.

### 3.2.2 Acero Inoxidable 316L

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para las muestras de Acero Inoxidable AISI 316L incubadas a tres tiempos distintos en un medio de cultivo con bacterias sulfato reductoras.

Tiempo [d]	% Superficie cubierta por bacterias	Área de la muestra cubierta por bacterias [mm <sup>2</sup> ]
0	0	0
5	36,8	3.681
10	23,7	2.372
15	17,1	1.710

Tabla 3.3: Resumen resultados para Acero Inoxidable AISI 316L

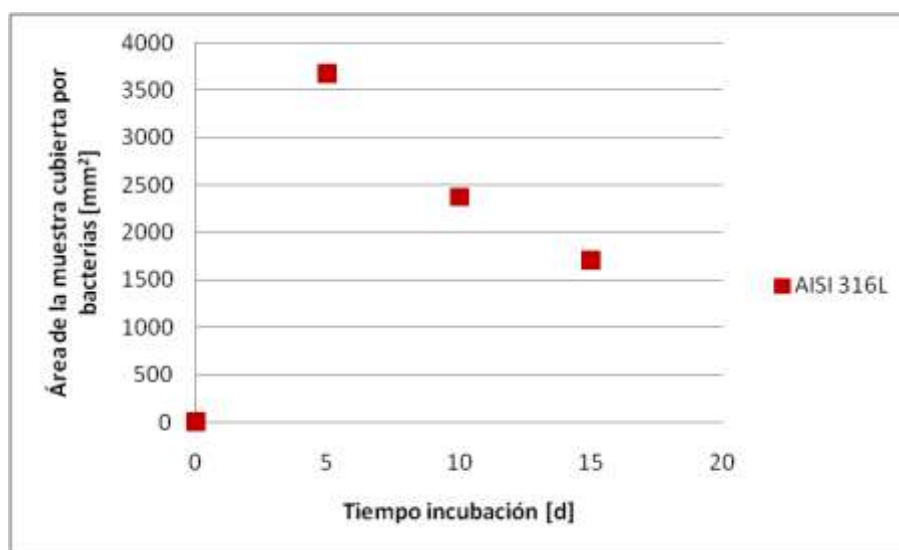


Gráfico 3.2: Progreso de la superficie cubierta por bacterias en Acero inoxidable AISI 316L a lo largo de la experiencia

En el gráfico 3.2 se observa la evolución de la superficie cubierta por bacterias en el tiempo que duró el experimento. En él se puede apreciar una tendencia a la disminución del área cubierta por bacterias a partir del quinto día de incubación, lo cual puede asociarse a que las bacterias de las muestras que estuvieron menos tiempo al interior del reactor se encontraban unidas débilmente a la superficie del acero. Para evitar este tipo de inconvenientes, se debiera haber llevado a cabo un lavado con agua destilada de las muestras antes de la fijación con glutaraldehído para remover las bacterias débilmente unidas a la superficie.

Luego, no se cree tenga mayor sentido tratar de establecer una cinética para el Acero Inoxidable AISI 316L con los resultados obtenidos, pero sí es posible, para efectos de comparación, suponer comportamientos lineales entre el punto inicial (tiempo cero y área cubierta inicial) y el último tiempo de incubación con sus correspondiente superficie cubierta por bacterias. Estos cálculos se presentan al final de este capítulo, en el segmento en el cual se comparan los comportamientos de todas las muestras metálicas ensayadas en este trabajo.

### 3.2.3 Acero inoxidable 420

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para las muestras de Acero Inoxidable AISI 420 incubadas a tres tiempos distintos en un medio de cultivo con bacterias sulfato reductoras.

Tiempo [d]	% Superficie cubierta por bacterias	Área de la muestra cubierta por bacterias [mm <sup>2</sup> ]
0	0	0
5	23,1	2.312
10	28,5	2.855
15	32,8	3.280

Tabla 3.4: Resumen Resultados para Acero Inoxidable AISI 420

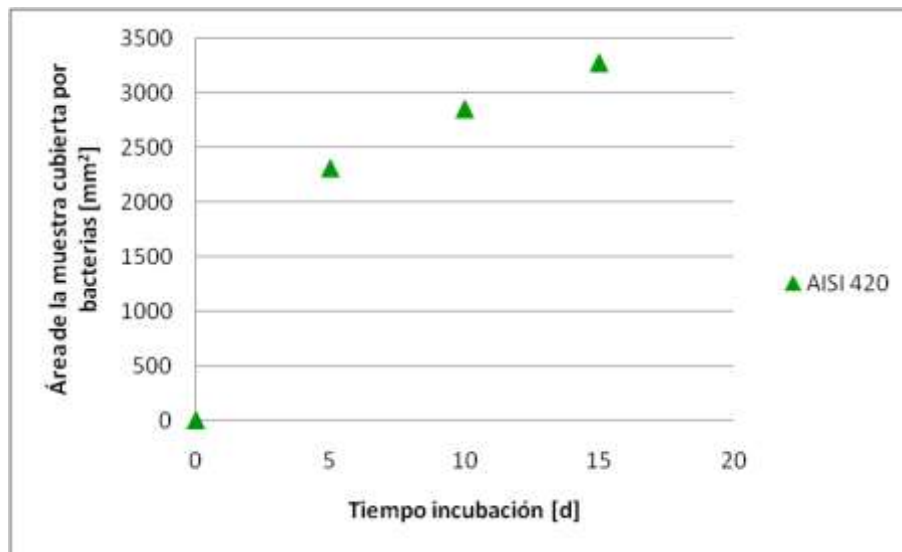


Gráfico 3.3: Progreso de la superficie cubierta por bacterias en Acero Inoxidable AISI 420 a lo largo de la experiencia

En el gráfico 3.3 se muestra el progreso de la superficie cubierta por bacterias durante el periodo de experimentación. Se observa una disposición más o menos cóncava de los puntos, donde no existe un cubrimiento completo de la muestra hasta el día 15 de incubación, pero sí se esboza una tendencia a alcanzar el estado estacionario de bacterias sobre la superficie del metal ya que la pendiente va disminuyendo a medida que el tiempo de incubación aumenta.

Al igual que en el caso del Fierro fundido, es posible establecer una cinética de poblamiento de la superficie en el tiempo, mediante el ajuste de las curvas características de primer, segundo o tercer orden. Los resultados del mejor ajuste se presentan en la siguiente tabla:

Cinética observada	Segundo Orden
Velocidad inicial de poblamiento de la superficie	$-3 \times 10^{-6} \text{ [mm}^{-2}\text{d}^{-1}\text{]}$

Tabla 3.5: Resultados sobre la cinética de adherencia de las bacterias sobre Acero Inoxidable AISI 420

De esta forma, se puede escribir la cinética de adherencia de bacterias a la superficie de Acero Inoxidable AISI 420 como sigue:

$$\frac{dA}{dt} = k(A_T - A)^2$$

O equivalentemente,

$$\frac{1}{A_T - A} = \frac{1}{A_T - A_0} - kt$$

Con  $A_0$ : Área cubierta por bacterias a tiempo cero; ( $A_0 = 0$  [ $\text{mm}^2$ ])

$A_T$ : Área total de la muestra; ( $A_T = 10000$  [ $\text{mm}^2$ ])

$$A(t) = \frac{(A_T)^2 kt}{(1 - A_T kt)} [\text{mm}^2]$$

$$A(t) = \frac{(10000)^2 \times -3 \times 10^{-6} t}{(1 + 10000 \times 3 \times 10^{-6} t)} [\text{mm}^2]$$

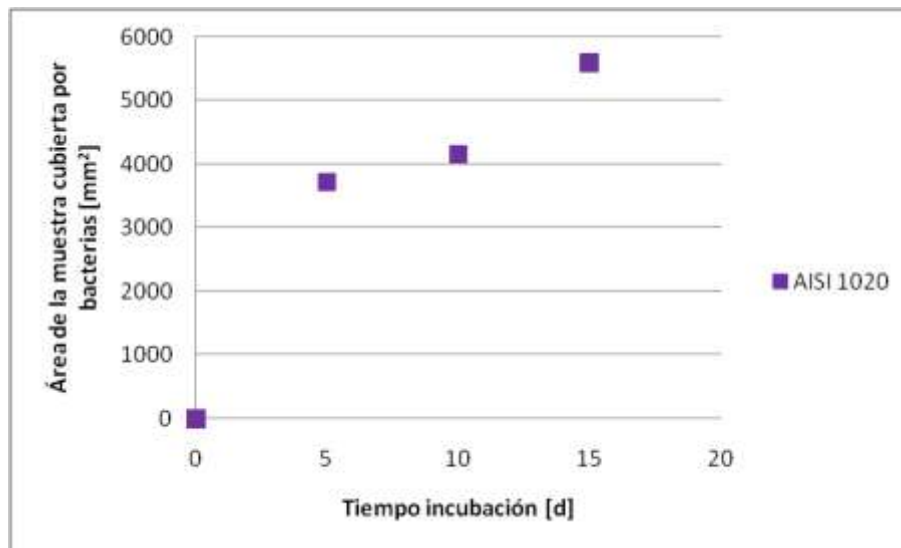
La comparación de las velocidades iniciales de poblamiento de la superficie por las bacterias para los distintos metales ensayados se encuentra al término del análisis por metal.

### 3.2.4 Acero al carbón 1020

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para las muestras de Acero al carbón AISI 1020 incubadas a tres tiempos distintos en un medio de cultivo con bacterias sulfato reductoras.

Tiempo [d]	% Superficie cubierta por bacterias	Área de la muestra cubierta por bacterias [ $\text{mm}^2$ ]
0	0	0
5	37,2	3.718
10	41,6	4.155
15	56,0	5.598

Tabla 3.6: Resumen resultados para Acero al carbón AISI 1020



**Gráfico 3.4: Progreso de la superficie cubierta por bacterias en Acero al carbón AISI 1020 a lo largo de la experiencia**

En el gráfico 3.4 se muestra el progreso de la superficie del metal cubierta por bacterias en el tiempo de experimentación. Se ve claramente que a medida que la muestra permanece más tiempo dentro del reactor, más cubierta por bacterias se encuentra la superficie del material, por lo cual la corrosión mediada por éstas irá en aumento.

No se observa una tendencia clara hacia alcanzar el estado estacionario de cubrimiento de la superficie por las bacterias, sino que pareciese ir en aumento continuo.

En cuanto a la cinética de cubrimiento de la superficie del metal por bacterias en el tiempo, el mejor ajuste logrado con los datos obtenidos fue el siguiente:

Cinética observada	Segundo Orden
Velocidad inicial de poblamiento de la superficie	$-8 \times 10^{-6} \text{ [mm}^{-2}\text{día}^{-1}\text{]}$

**Tabla 3.7: Resultados sobre la cinética de adherencia de bacterias sobre Acero al carbón AISI 1020**

Así, una primera aproximación a la cinética de adherencia de las bacterias sulfato reductoras presentes en el reactor sobre la superficie de las muestras de Acero al carbón AISI 1020 es:

$$\frac{dA}{dt} = k(A_T - A)^2$$

Integrando,

$$\frac{1}{A_T - A} = \frac{1}{A_T - A_0} - kt$$

Con  $A_0$ : Área cubierta por bacterias a tiempo cero; ( $A_0 = 0 \text{ [mm}^2\text{]}$ )

$A_T$ : Área total de la muestra; ( $A_T = 10000 \text{ [mm}^2\text{]}$ )

$$A(t) = \frac{(A_T)^2 kt}{(1 - A_T kt)} [mm^2]$$

$$A(t) = \frac{(10000)^2 \times -8 \times 10^{-6} t}{(1 + 10000 \times 8 \times 10^{-6} t)} [mm^2]$$

La comparación de las velocidades iniciales de poblamiento de la superficie por las bacterias para los distintos metales ensayados se encuentra al término del análisis por metal.

### 3.2.5 Acero A36

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para las muestras de Acero al carbón A36 incubadas a tres tiempos distintos en un medio de cultivo con bacterias sulfato reductoras.

Tiempo [d]	% Superficie cubierta por bacterias	Área de la muestra cubierta por bacterias [mm <sup>2</sup> ]
0	0	0
5	3,8	377
10	16,3	1.628
15	56,2	5.621

Tabla 3.8: Resumen resultados para Acero A36

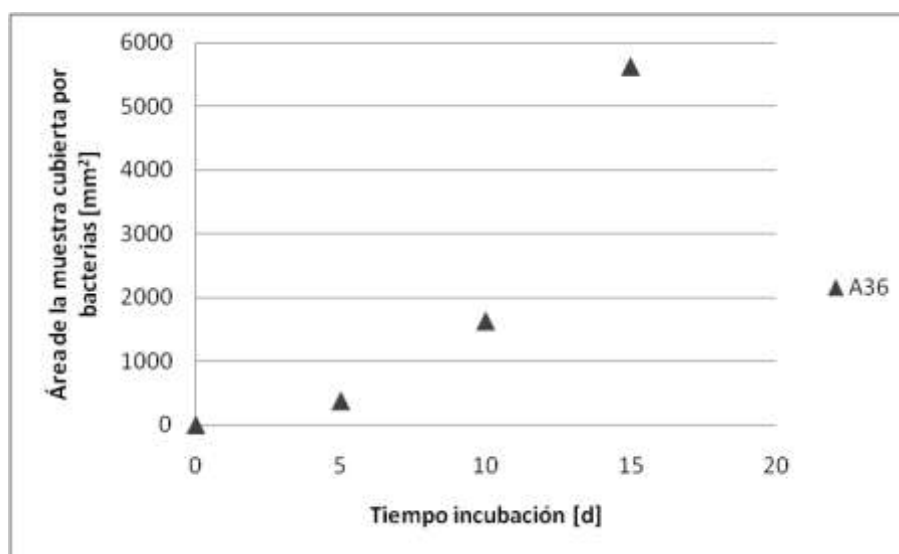


Gráfico 3.5: Progreso de la superficie cubierta por bacterias en Acero A36 a lo largo de la experiencia

En el gráfico 3.5 se observa cómo va aumentando la superficie cubierta por bacterias en el tiempo de experimentación para este tipo de acero. Es interesante destacar que a diferencia del resto de las otras muestras metálicas analizadas, en este acero se observa una tendencia de

adherencia de las bacterias a la superficie, expresada como superficie cubierta, marcadamente ascendente; estando al día 15 de incubación más de la mitad de la muestra cubierta por bacterias.

A partir del gráfico, no hay evidencias de que se alcance el estado estacionario de cubrimiento de la muestra a un tiempo cercano a los 15 días, sino que probablemente, la totalidad de la muestra se hubiera encontrado con bacterias adheridas al estar la muestra por más tiempo en el reactor.

Tal como en los otros metales ensayados, se realizó un ajuste para conocer la cinética observada y el valor de la velocidad inicial de poblamiento de la superficie para este tipo de acero, siempre considerando solamente el área descubierta del material, libre para ser cubierta por bacterias.

Los resultados obtenidos en esta oportunidad son los siguientes:

<b>Cinética observada</b>	<b>Segundo Orden</b>
<b>Velocidad inicial de poblamiento de la superficie</b>	$-8 \times 10^{-6} \text{ [mm}^2\text{día}^{-1}\text{]}$

**Tabla 3.9: Resultados sobre la cinética de adherencia de bacterias sobre Acero al carbón A36**

De esta forma, la expresión cinética para la adherencia de las bacterias sobre la superficie se puede aproximar a la siguiente expresión:

$$\frac{dA}{dt} = k(A_T)^2 = k(A_T - A)^2$$

$$A(t) = \frac{(10000)^2 \times -8 \times 10^{-6} t}{(1 + 10000 \times 8 \times 10^{-6} t)} \text{ [mm}^2\text{]}$$

Que es exactamente la misma expresión del acero al carbón AISI 1020. Sin embargo, el coeficiente de correlación de la recta que se ajustó para estos datos es bastante menor en comparación con la del Acero al carbón AISI 1020, siendo esta aproximación de la cinética no muy fiable pero válida aún como primer esbozo.

La comparación de las velocidades iniciales de poblamiento de las superficies por las bacterias para los distintos metales ensayados se encuentra inmediatamente después de los resultados del Acero cromo-níquel bonificado SAE 4340.



### 3.2.6 Acero cromo níquel bonificado SAE 4340

En la tabla siguiente se presentan los resultados obtenidos para las muestras de Acero al carbón A36 incubadas a tres tiempos distintos en un medio de cultivo con bacterias sulfato reductoras.

Tiempo [d]	% Superficie cubierta por bacterias	Área de la muestra cubierta por bacterias [mm <sup>2</sup> ]
0	0	0
5	22,1	2.212
10	34,5	3.449
15	48,9	4.893

Tabla 3.10: Resumen resultados para Acero SAE 4340

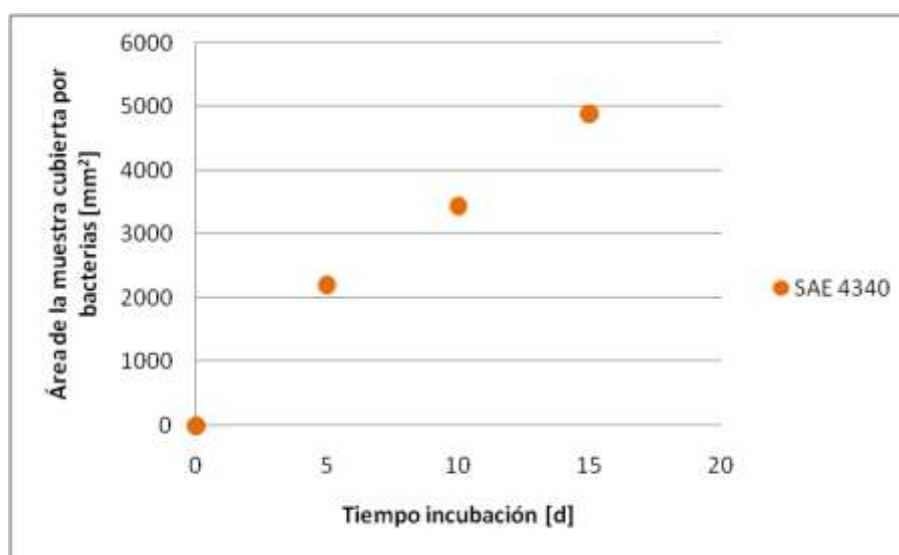


Gráfico 3.6: Progreso de la superficie cubierta por bacterias en Acero SAE 4340 a lo largo de la experiencia

En el gráfico 3.6 se presenta el progreso del área del Acero SAE 4340 cubierta por bacterias durante el tiempo de incubación de las muestras en el reactor. Se aprecia una tendencia relativamente lineal, que parece ir disminuyendo su pendiente cerca del día 15 de incubación, en donde el área cubierta de la muestra de acero llega a ser cercana al 50%.

El ajuste realizado para la aproximación de la cinética de adherencia de las bacterias a la superficie de este acero es la que se presenta en la siguiente tabla:

Cinética observada	Primer Orden
Velocidad inicial de poblamiento de la superficie	-0,043 [día <sup>-1</sup> ]

Tabla 3.11: Resultados sobre la cinética de adherencia de las bacterias sobre Acero cromo-níquel bonificado SAE 4340

Luego, la expresión para la cinética de adherencia de las bacterias queda de la siguiente forma:

$$\frac{dA}{dt} = kA' = k(A_T - A)$$

O equivalentemente:

$$A(t) = A_T \times (1 - \exp(kt))$$

$A_T$ : Área total de la muestra; ( $A_T = 10000 \text{ [mm}^2\text{]}$ )

$$A(t) = 10000 \times (1 - \exp(-0,043t)) \text{ [mm}^2\text{]}$$

### 3.2.7 Comparación entre Aceros

En esta parte del trabajo, se desea comparar las velocidades iniciales de poblamiento bacteriano de las superficies de los metales en los distintos tiempos de incubación, calculando las velocidades solamente considerando la pendiente entre los puntos iniciales y finales, es decir, tiempo cero y tiempo 15 días de incubación.

En el siguiente gráfico se resume el progreso del área cubierta por bacterias en el tiempo para todos los metales estudiados en el presente trabajo:

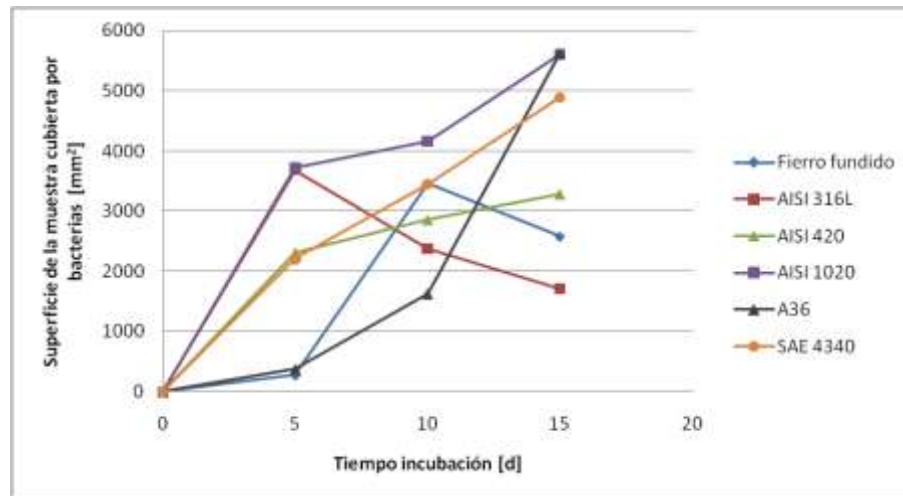


Gráfico 3.7: Resumen del progreso del área cubierta por bacterias en cada uno de los Aceros estudiados

En este gráfico se observa el comportamiento dinámico del área cubierta por bacterias para cada uno de los aceros ensayados. Se observa que hasta los 5 días de incubación, hubo aceros que se comportaron de forma muy similar en su velocidad inicial de poblamiento, sin embargo, tuvieron distintos comportamientos a partir de las siguientes rondas de muestras, correspondientes a los tiempos de incubación sucesivos.

Se observa, por ejemplo, el caso de las muestras de Acero al carbón AISI 1020 y Acero al carbón A36, que partieron con velocidades iniciales de poblamiento muy distintas, pero que

llegaron al mayor tiempo de incubación casi con el mismo porcentaje de superficie del metal cubierta. Así también, se presenta el caso del Acero al carbón AISI 1020 y el Acero Inoxidable AISI 316L que partieron casi con la misma velocidad inicial de poblamiento de la superficie, pero que al mayor tiempo de incubación, presentaron porcentajes de superficie cubierta muy lejanos entre sí.

Se desprende, además, que los aceros que tienen mayor superficie cubierta por bacterias son el AISI 1020 y A36, los cuales deberían presentar mayor corrosión por bacterias al tener mayor superficie cubierta por bacterias. Por otra parte, se observa que los aceros con menos superficie cubierta son el acero inoxidable AISI 316L y el Fierro fundido, seguido por el acero inoxidable AISI 420.

El hecho que el fierro fundido haya sido uno de los metales con menor superficie cubierta era poco esperable dada su composición, mayoritariamente hierro y carbono, y sin tener capa protectora de cromo o níquel alguna.

En la siguiente tabla se presentan las velocidades lineales de adherencia bacteriana a la superficie, o en forma equivalente, la velocidad de cubrimiento o poblamiento de la superficie, para cada uno de los metales ensayados:

Muestra	Velocidad adherencia 5 días [mm <sup>2</sup> /día]	Velocidad adherencia 10 días [mm <sup>2</sup> /día]	Velocidad adherencia 15 días [mm <sup>2</sup> /día]
Fierro fundido	55	346	172
AISI 316L	736	237	114
AISI 420	462	285	219
AISI 1020	744	416	373
A36	75	163	375
SAE 4340	442	345	326

Tabla 3.12: Comparación de velocidades lineales de adherencia de bacterias a las muestras de Aceros

Luego, hasta el quinto día de incubación de las muestras, los aceros con mayor velocidad de cubrimiento de su superficie son el AISI 316L y AISI 1020; al décimo día de incubación, AISI 1020; y al decimoquinto día de incubación, AISI 1020 Y A36. Paralelamente, los aceros con menor velocidad de cubrimiento de su superficie son: al quinto día de incubación, fierro fundido y A36; décimo día de incubación, A36; decimoquinto día de incubación, AISI 316L.

El acero al carbón AISI 1020 es, entonces, el acero con mayor superficie cubierta al final de la experiencia y el que posee mayores velocidades de cubrimiento en todos los tiempos de incubación, de acuerdo a la Tabla 3.12.

En el caso del acero A36, es interesante el hecho que pasa de ser uno de los aceros con menor velocidad de cubrimiento hasta el décimo día de incubación, y por ende con menor superficie cubierta, a uno de los aceros con mayor velocidad de cubrimiento y superficie cubierta al final del experimento.

Dado el corto tiempo de incubación de las muestras en el reactor, para concluir el análisis se considera solamente la velocidad lineal de poblamiento de superficie que corresponde al

mayor tiempo de incubación, es decir, 15 días. Esto último se debe a que como se desconoce el poblamiento de la superficie de los aceros a tiempos mayores, es posible a que los gráficos mostrados en este capítulo correspondan sólo a una pequeña parte de la curva real, por lo cual, una buena aproximación para la velocidad inicial de poblamiento de las superficies de los aceros sería la velocidad a los 15 días de incubación.

Así, en líneas generales y considerando solamente el área cubierta al final del experimento, independiente de la velocidad con que la superficie del metal fue cubierta por bacterias se ordenan los metales en la siguiente tabla, en orden de mayor a menor superficie cubierta y, por ende, corrosión mediada por bacterias:

<b>Metal</b>	<b>% Superficie cubierta por bacterias</b>
A36	56,2
AISI 1020	56,0
SAE 4340	48,9
AISI 420	32,8
Fierro fundido	25,8
AISI 316L	17,1

**Tabla 3.13: Resumen superficie cubierta por bacterias al término de la experiencia**

En cuanto al ajuste de las cinéticas, cabe mencionar que el modelo empleado en este trabajo para primer y segundo orden no es el más conveniente para este tipo de casos, ya que las bacterias no se adhieren en monocapa sobre la superficie del metal, sino que se van agregando en verdaderos tubérculos a medida que la muestra permanece más tiempo en contacto con el medio con bacterias, y por lo tanto se estaría omitiendo el espesor de la capa con bacterias sobre la superficie de los metales.

Si bien es cierto que en este trabajo se trabajó con un medio rico en nutrientes y en condiciones favorables para el crecimiento de las bacterias, lo cual acelera el proceso de adherencia a la superficie y, por ende, la corrosión mediada por éstas; el comportamiento de los metales no debería cambiar en otras condiciones, es decir, el mecanismo de adherencia de bacterias a la superficie es el mismo aunque tarde mucho más tiempo en alcanzar los porcentajes de poblamiento de superficie logrados en este trabajo.

Valdría la pena considerar en futuros trabajos el cómo las bacterias presentes en solución, las cuales estarían disponibles para unirse a la superficie del metal, influyen en la cinética de cubrimiento de superficie activa del metal por bacterias. Así también, sería interesante incluir alguna propiedad del metal que propiciara el depósito de bacterias en uno u otro caso como la variación de hierro o cromo en el tiempo.

De esta forma, podría modelarse la cinética de adherencia de bacterias a la superficie de los aceros mediante el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dA}{dt} = k_1 \times (A_T - A)^n \times X^m$$

$$\frac{dX}{dt} = k_2 \times X$$

Se intentó caracterizar la composición elemental de la superficie de los metales en el tiempo a través de un análisis de Espectroscopia de energía dispersiva (Rayos X) en el mismo microscopio con que se obtuvieron las fotografías de Microscopía electrónica de Barrido. Sin embargo, los resultados del análisis no fueron concluyentes ya que hubo mucha diferencia entre las composiciones debido presumiblemente a lo poco homogénea capa de oro/paladio depositada sobre la superficie de los metales durante el sombreado que influyó en que a tiempos de incubación cercanos, un elemento apareciera y desapareciera de la superficie del metal. Estos resultados no se incluyen en este trabajo por no ser concluyentes.

Es importante señalar que la metodología empleada debiese ser válida para ensayar otros metales de interés como cobre, aluminio y otros aceros. En el caso de querer estudiar el comportamiento de los metales ante el ataque de otras bacterias se deben realizar modificaciones en el medio de cultivo y las condiciones de temperatura y pH de acuerdo al tipo de bacteria.

La metodología propuesta en este trabajo ha resultado ser eficaz para los objetivos planteados en este estudio. Se ha demostrado que con el montaje empleado se puede simular una corrosión mediada por bacterias en aceros de diversa composición y que la Microscopía electrónica de Barrido junto con el tratamiento de imágenes posterior, son una buena herramienta para la cuantificación de corrosión influenciada por bacterias. Así, esta metodología puede ser empleada para estudiar el comportamiento de materiales, tanto metálicos como no metálicos, frente a la corrosión mediada por microorganismos, sirviendo como una especie de prueba de diagnóstico de materiales para ciertas aplicaciones industriales.

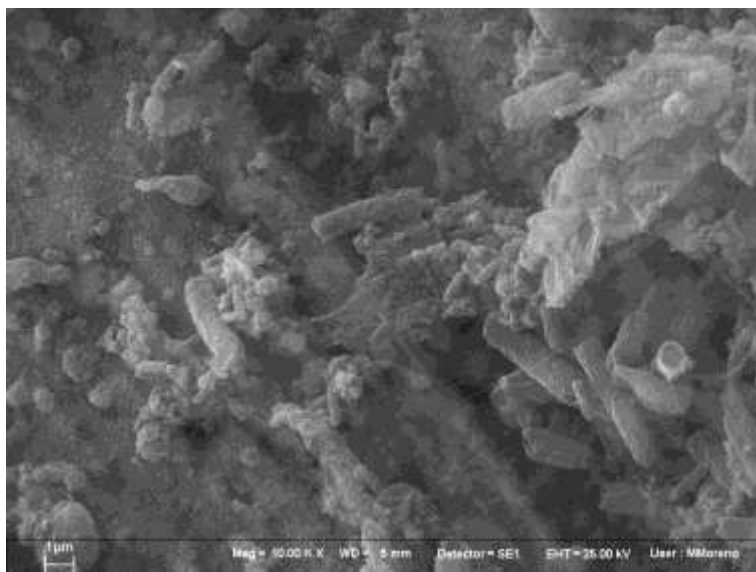
La selección de las áreas cubiertas por bacterias en las fotografías de Microscopía de cada una de las muestras se funda en la apariencia ovalada y alargada de las bacterias junto con el tamaño característico de éstas (1 a 2  $\mu\text{m}$  para *Desulfovibrio desulfuricans* y 2 a 4  $\mu\text{m}$  para las bacterias no identificadas), lo que da confiabilidad a las áreas seleccionadas en las muestras de acero y a los resultados presentados en este trabajo.

### 3.2.8 Otros resultados

Aunque no es objetivo de este trabajo el estudiar el comportamiento en superficies de metales no pulidas y borde de las muestras, se presentan a continuación fotografías obtenidas de Microscopía electrónica para Fierro fundido y Acero inoxidable AISI 316L que corresponden a un costado no pulido de las muestras en los diferentes tiempos de incubación:

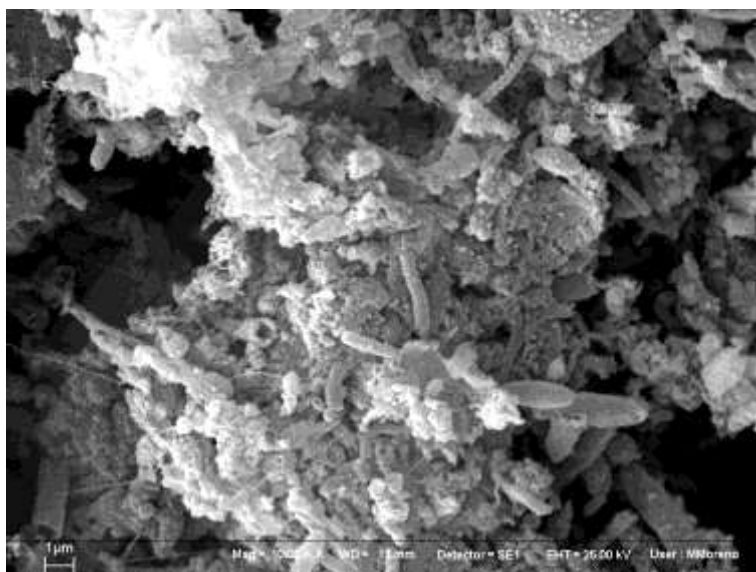
#### ➤ Fierro fundido

En las siguientes fotografías se muestra un costado de la muestra de Fierro fundido no pulido. Las fotografías se encuentran con un aumento de 10.000 veces su tamaño real para poder visualizar bacterias.



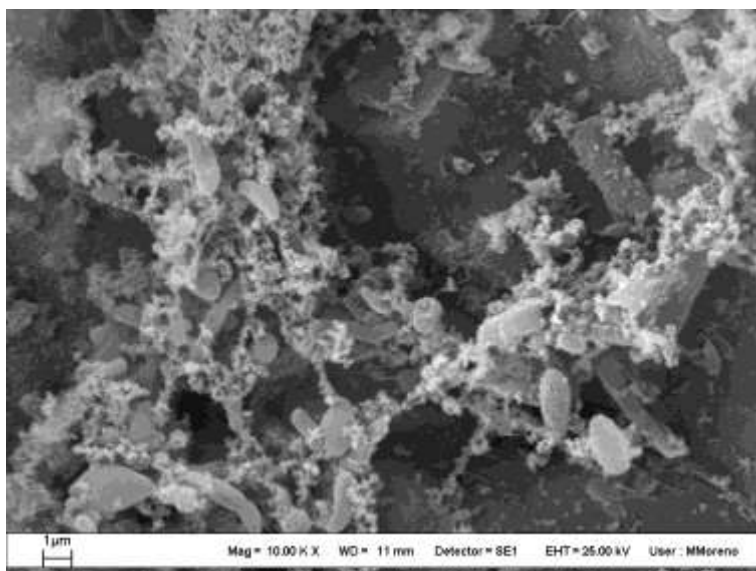
**Fotografía 3.31: Superficie no pulida de fierro fundido tras 5 días de incubación en el reactor**

A los 5 días de incubación se observa una baja cantidad de bacterias adheridas a la superficie, con una presencia apreciable de productos de corrosión. Se puede observar aún la superficie del material con hendiduras y surcos provocados por el corte del material al dimensionar las muestras para el ensayo.



**Fotografía 3.32: Superficie no pulida de Hierro fundido tras 10 días de incubación en el reactor**

Al igual que en el caso de la superficie pulida de este material, ya visto en este capítulo, se observa gran cantidad de bacterias sobre la muestra, en forma de agregados con productos de corrosión, formando una capa gruesa que impide ver la superficie libre del metal.

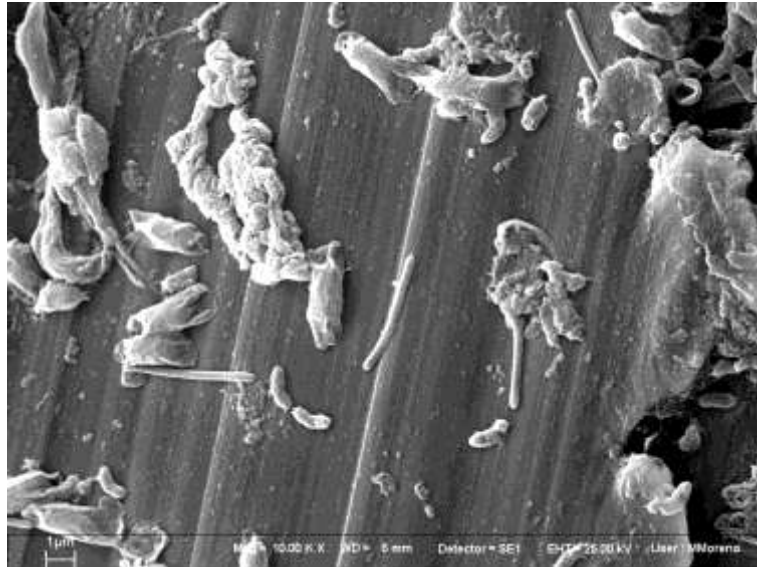


**Fotografía 3.33: Superficie no pulida de Hierro fundido tras 15 días de incubación en el reactor**

Tras 15 días de incubación se observa mayor cantidad de bacterias que el primer tiempo de incubación, pero mucho menos que en el caso de los 10 días. Pareciera ser que las bacterias se adhieren con mayor facilidad en las hendiduras que quedan en el material que en las zonas más lisas.

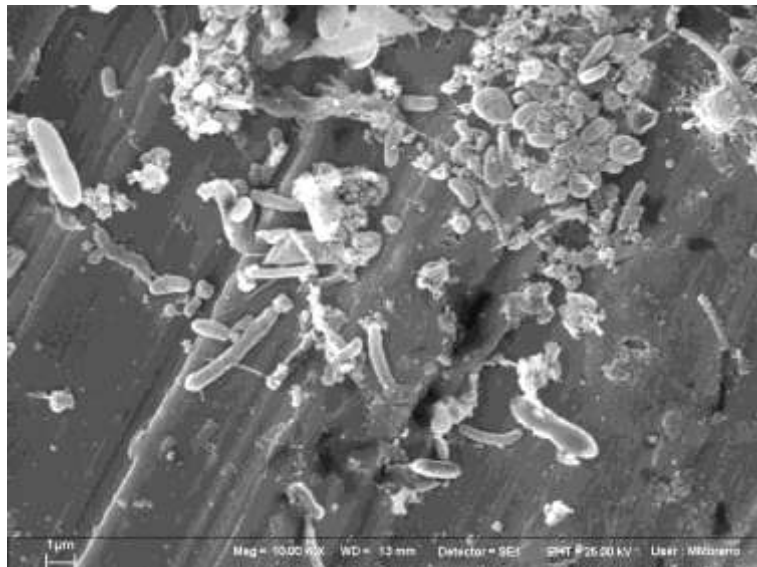
➤ **Acero inoxidable AISI 316L**

En las siguientes fotografías se muestra la superficie de Acero inoxidable AISI 316L correspondiente a un costado no pulido de la muestra. Las imágenes se encuentran ampliadas 10.000 veces su tamaño real.



**Fotografía 3.34: Superficie no pulida de Acero inoxidable AISI 316L tras 5 días de incubación en el reactor**

Al quinto día de incubación ya se observan bacterias sobre la superficie, pero con una baja cantidad de exopolímeros, por lo cual, las bacterias se encuentran débilmente unidas a la superficie del metal.

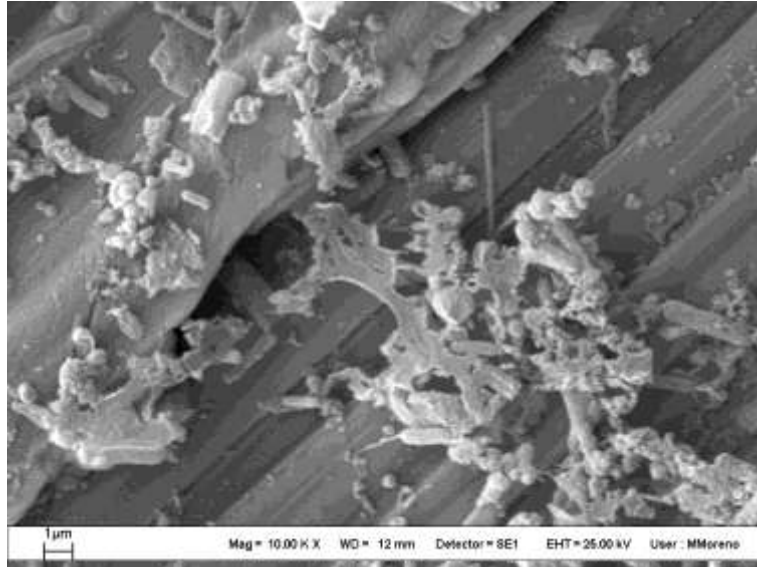


**Fotografía 3.35: Superficie no pulida de Acero inoxidable AISI 316L tras 10 días de incubación en el reactor**

Tras 10 días de incubación, se aprecia una mayor cantidad de bacterias, las cuales se encuentran formando pequeñas agregaciones. Se observan exopolímeros, por lo tanto, las



bacterias se encuentran unidas más firmemente al acero. Además, es posible ver daño sobre la superficie, el cual se ve reflejado en pequeñas manchas oscuras en la imagen.



**Fotografía 3.36: Superficie no pulida de Acero Inoxidable AISI 316L tras 15 días de incubación en el reactor**

En el último día de incubación de la muestra, se observa similar cantidad de bacterias sobre la superficie que en la fotografía anterior.

En general, se desprende en ambos metales que la rugosidad influye en el poblamiento de la muestra ya que las bacterias aparentemente prefieren zonas con hendiduras o surcos para adherirse a la muestra en lugar de las zonas más lisas. Luego, para el caso particular de las soldaduras en metales, se puede sugerir que habrá mayor cantidad de bacterias sobre una unidad de área de soldadura que en el metal mismo, suponiendo que el metal es pulido.

## Capítulo 4 Conclusiones

Gracias a la microscopía electrónica de barrido se pudo observar el daño en la superficie de los metales, tanto por corrosión electroquímica, como por las bacterias sulfato reductoras utilizadas para simular la corrosión.

El cultivo de bacterias de *Desulfovibrio desulfuricans* usado para simular la corrosión no se encontraba puro, sino que se pudo observar la presencia de bacterias más grandes y alargadas adheridas a la superficie de los metales. Un análisis de t-RFLP podría ayudar a identificar de qué tipo de bacteria se trata y cuál es su relación con el proceso corrosivo.

Los resultados obtenidos con el programa Pixarea fueron muy importantes para el desarrollo de este trabajo, ya que a pesar de estar diseñado para otro tipo de aplicación, se pudo comprobar su eficacia para el cálculo del área cubierta por bacterias en las muestras de los metales ensayados. Sin embargo, el programa sólo es útil para el cálculo de superficies planas ya que ignora cualquier tipo de espesor de película.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los metales con mayor área cubierta al final de la experiencia fueron AISI 1020 y A36, por lo cual, deberían tener mayor corrosión influenciada por bacterias, bajo el supuesto de que hay una relación directa entre corrosión y el área del metal cubierta por éstas. El progreso del área cubierta por bacterias en ellos fue, sin embargo, bastante distinta ya que para el acero AISI 1020 la velocidad inicial de poblamiento de superficie o adherencia de bacterias fue muy rápida al principio (744 [mm<sup>2</sup>/día]) y disminuyendo al final (343 [mm<sup>2</sup>/día]), mientras que para el acero A36, esta tendencia fue completamente contraria; 75 [mm<sup>2</sup>/día] al primer tiempo de incubación y 375 [mm<sup>2</sup>/día] al último.

De acuerdo al área cubierta por bacterias al final del experimento, se tiene que los metales con mayor a menor corrosión provocada por bacterias son: A36 (56,2% superficie cubierta), AISI 1020 (56% superficie cubierta), SAE 4340 (48,9% superficie cubierta), AISI 420 (32,8% superficie cubierta), Fierro fundido (25,8% superficie cubierta), AISI 316L (17,1% superficie cubierta).

Se ajustaron, además, expresiones para las cinéticas observadas de adherencia de bacterias a la superficie de los metales tomando en consideración sólo el área libre del material disponible para que otras bacterias se depositen en la superficie. Se obtuvieron cinéticas de primer orden para los siguientes metales: Fierro fundido (vel. específica inicial de poblamiento bacteriano observada, -0,039 [d<sup>-1</sup>]), SAE 4340 (vel. específica inicial de poblamiento bacteriano observada, -0,043 [d<sup>-1</sup>]); y cinéticas de segundo orden para los siguientes metales: AISI 420 (vel. específica inicial de poblamiento bacteriano observada,  $-3 \times 10^{-6}$  [mm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>]), AISI 1020 (vel. específica inicial de poblamiento bacteriano observada,  $-8 \times 10^{-6}$  [mm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>]) y A36 (vel. específica inicial de poblamiento bacteriano observada,  $-8 \times 10^{-6}$  [mm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>]). Para el caso del acero inoxidable AISI 316L no se realizó el ajuste ya que los datos obtenidos no califican para este análisis.

Los órdenes sobre la cinética de adherencia bacteriana sobre las superficies de los metales es solo una primera aproximación del fenómeno que hay detrás, por lo que se sugiere para trabajos posteriores incluir la biomasa disponible para depositarse sobre la superficie, así como la

variación de la composición del metal, como por ejemplo, el contenido de hierro para el caso particular de los aceros.

Los resultados de este trabajo han confirmado que incluso los aceros inoxidables son susceptibles a la corrosión mediada por microorganismos, bacterias sulfato reductoras en este caso en particular, por lo cual queda claro que el problema de corrosión mediada por microorganismos debe ser un tópico al cual las industrias que emplean aceros debiesen poner mayor atención y cuidado en orden de prevenir daños y evitar las cuantiosas pérdidas económicas causadas por este fenómeno.

Aunque las condiciones en que la simulación de la corrosión fue realizada acelera el crecimiento de bacterias y el proceso biológico que hay detrás de la biocorrosión, los mecanismos y comportamiento de los aceros estudiados son los mismos ya que también dependen de las características del metal.

La metodología empleada para la cuantificación de la corrosión en los aceros ensayados permite estudiar no solamente aceros, sino que eventualmente, podría ayudar en el diagnóstico y elección de materiales variadas aplicaciones industriales. Luego, se plantea en este trabajo una incipiente técnica de selección de materiales que debe ser mejorada, principalmente, en el número de muestras a ensayar y los tiempos de incubación en el reactor. Se recomienda para futuros trabajos ensayar con 5 muestras y a mayores tiempos de incubación para lograr ver algún tipo de estado estacionario de cubrimiento de los metales. También se sugiere lavar con agua destilada las muestras antes de ser fijadas con glutaraldehído con el fin de eliminar las bacterias débilmente adheridas, las cuales pueden interferir en los resultados y buscar alguna aplicación que considere el espesor de la capa de bacterias que se adhieren a la superficie del material ya que en el análisis realizado en este trabajo, se omite por simplicidad en el análisis.

## Capítulo 5 Bibliografía

- [1] NACE International (2007) Glossary of Corrosion-Related Terms.  
En línea: <<http://www.nace.org/nace/content/pubsonline/free/GLOSSARY.PDF>>  
Consulta: Octubre 2007
- [2] Juscamaita, H. Prevención de la corrosión en una planta de gas. Curso Tecnología y diagnóstico de fallas y reparaciones de elementos de máquinas. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú.
- [3] Ávila, J., Genesca, J. (1986) Más allá de la Herrumbre. Primera edición. Fondo de cultura económica. México. En línea:< <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>>
- [4] Montañola, D. (2004) Mecanismos de corrosión biológica industrial: alternativas de mitigación. Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Chile.
- [5] Little, B., Wayner, P. (1992) An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochim Acta* 37: 2185-2194.
- [6] Videla, H.A. (2001) Microbially induced corrosion: an updated overview. *Int Biodeterior Biodegradation* 48: 176-201.
- [7] Little, B., Ray, R. (2002) A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion* 58: 424-428.
- [8] Ornek, D., Wood, TK. (2002) Pitting corrosion control of aluminum 2024 using protective biofilms that secrete corrosion inhibitors. *Corrosion* 58: 761-767.
- [9] Beech, I., Gaylarde, C. (1999) Recent advances in the study of biocorrosion, an overview. *Revista de Microbiología* 30: 177-190.
- [10] Beech, I., Coutinho C. (2003) Biofilms on corroding materials. *Biofilms in medicine, Industry and Environmental Biotechnology*, pp. 115-131
- [11] Kjellerup, B., Ohlsen, B. (2003) Monitoring and characterization of bacteria in corroding district heating systems using fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Water Sci Technol* 47: 117-122.
- [12] Werner, S., Johnson, C., (1998) *Corrosion Science* 40, 465.
- [13] Heitz E., Flemming, H., Sand, W. (1996) Microbiologically influenced corrosion of materials, Springer-Verlag, Berlín.
- [14] Hamilton, W. (2003). *Biofouling* 19:6

- [15] Xu, C., Zhang Y, Cheng, G, Zhu, W. (2007) Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Materials Science and Engineering* 443: 235-241.
- [16] Dilling, W., Cypionka, H. (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* 71:123-128.
- [17] Thomas, C., Edyvean, R., Brook, R. (1988) Biologically enhanced fatigue. *Biofiling* 1: 65-77.
- [18] Hamilton, W., Lee, W. (1995). *Biocorrosion. Sulfate-Reducing bacteria*. Larry Barton. Plenum Press, New York. pp. 243-262.
- [19] Bryant, R., Kloeke, F., Laishley, E. (1993) Regulation of the periplasmic [Fe] hydrogenase by ferrous iron in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Applied Environmental Microbiology* 59:491-495.
- [20] International Iron and Steel Institute. En línea: <[www.worldsteel.org](http://www.worldsteel.org)>. Consulta: Noviembre 2007.
- [21] Acero de Construcción. En línea: <<http://es.wikipedia.org>>. Consulta: Diciembre 2007.
- [22] Correa, Julio. Metalografía de Aceros, fundiciones, inoxidables. En línea: <[juliocorrea.wordpress.com](http://juliocorrea.wordpress.com)>. Consulta: Diciembre 2007.
- [23] El Wahabi, Mohammed (2002). Caracterización Termomecánica de Aceros Inoxidables austeníticos AISI-304. Capítulo 1 de Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. España. En línea:<<http://tdcat.cesca.es>>
- [24] Compendio de Normas para productos de Acero (2002). Documento preparado por Aceros Gerdau Aza®. Primera edición, pp. 21-25. Consulta: Diciembre 2007
- [25] Montaña, Francisco. Introducción a los procesos de manufactura. Apunte de Tecnología Mecánica II. Facultad de Ciencias y Tecnología, Ingeniería Civil Mecánica. Universidad Mayor de San Simón. Bolivia. En línea:<<http://materias.fcyt.umss.edu.bo/teco-II/>>. Consulta: Diciembre 2007

## **Anexo 1 Medio de Cultivo ATCC 1627**

### **Solución A**

3 g.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
0,2 g.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,3 g.  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
21 g.  $\text{NaCl}$   
3 g.  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$   
0,5 g.  $\text{KCl}$   
0,15 g.  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
1 mg. Resazurin  
930 mL. Agua destilada

### **Solución B**

1 mL. Elementos trazas SL-10

### **Solución C**

2,5 g.  $\text{NaHCO}_3$   
50 mL. Agua destilada

### **Solución D**

10 mL. Solución de vitaminas Wolfe

### **Solución E**

3 mg.  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$   
1 L.  $\text{NaOH}$  0,01M

### **Solución F**

0,4 g.  $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$   
10 mL. Agua destilada

### **Elementos traza solución SL-10**

10 mL.  $\text{HCl}$  (25%,; 7,7 M)  
1,5 g.  $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$   
70 mg.  $\text{ZnCl}_2$   
100 mg.  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$   
6 mg.  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
190 mg.  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$   
2 mg.  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
24 mg.  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

36 mg.  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
990 mL. Agua destilada

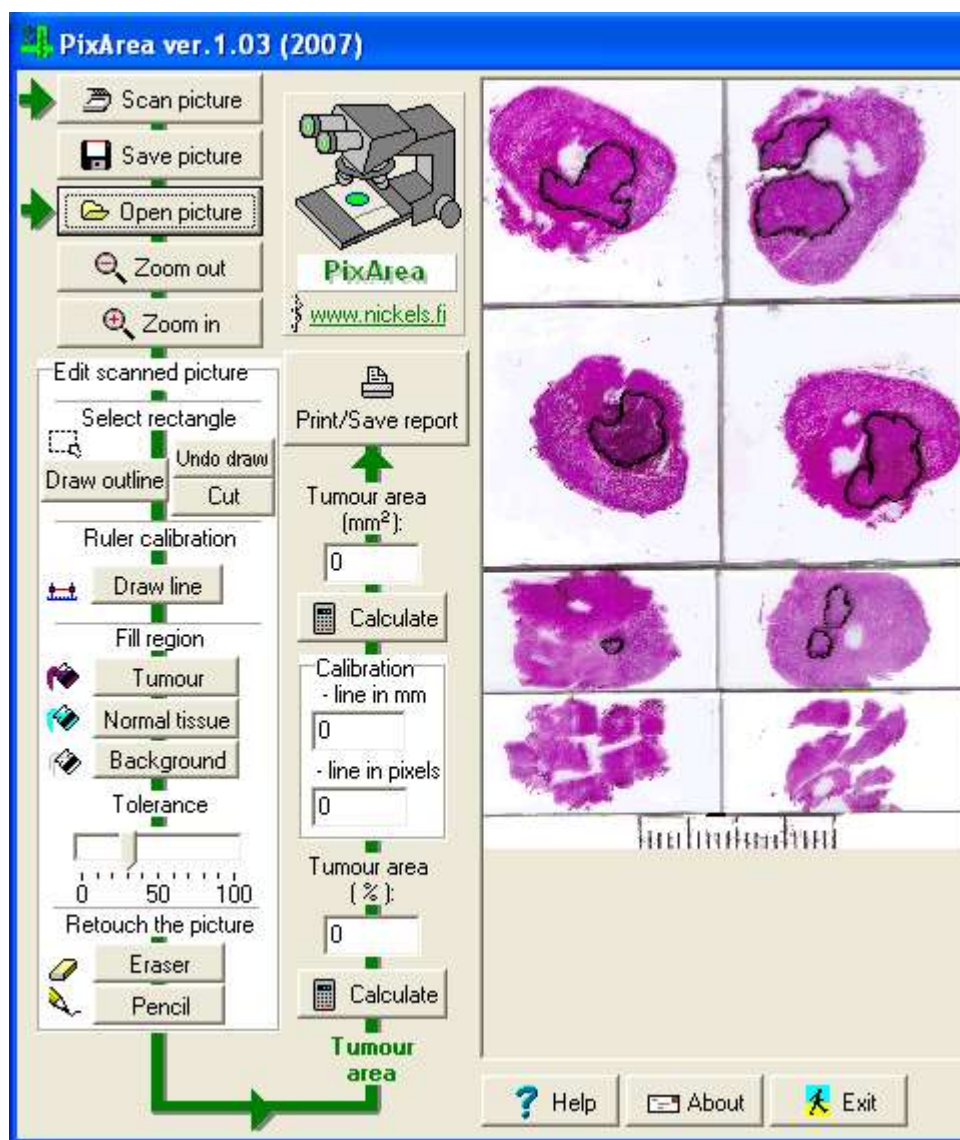
### **Solución de vitaminas de Wolfe**

2 mg. Biotina  
2 mg. Ácido fólico  
10 mg. Pyridoxina HCl  
5 mg. Tiamina HCl  
5 mg. Rivo flavina  
5 mg. Ácido nicotínico  
5 mg. Calcio D-(+)-pantothenato  
0,1 mg. Vitamina B12  
5 mg. Ácido p-aminobenzoico  
5 mg. Thiocctic acid  
1 L. Agua destilada

## Anexo 2 Descripción del programa Pixarea

El programa Pixarea es simplemente una aplicación que procesa imágenes, conteniendo un menú en línea verde que va guiando en cada paso del proceso.

La idea es saturar la región de interés con morado y la región normal con Calipso. El programa cuenta pixeles cada vez que el área seleccionada es cliqueada con el mouse. Presionando el botón “Calculate”, el valor numérico del área de interés es mostrado como porcentaje. Siguiendo la línea de menú verde, al presionar el botón “Calculate”, el área de la región de interés es calculada en milímetros cuadrados. Para terminar, el botón “Print/Save report” genera un resumen de la imagen procesada. La interfaz del programa se muestra en la figura a continuación:



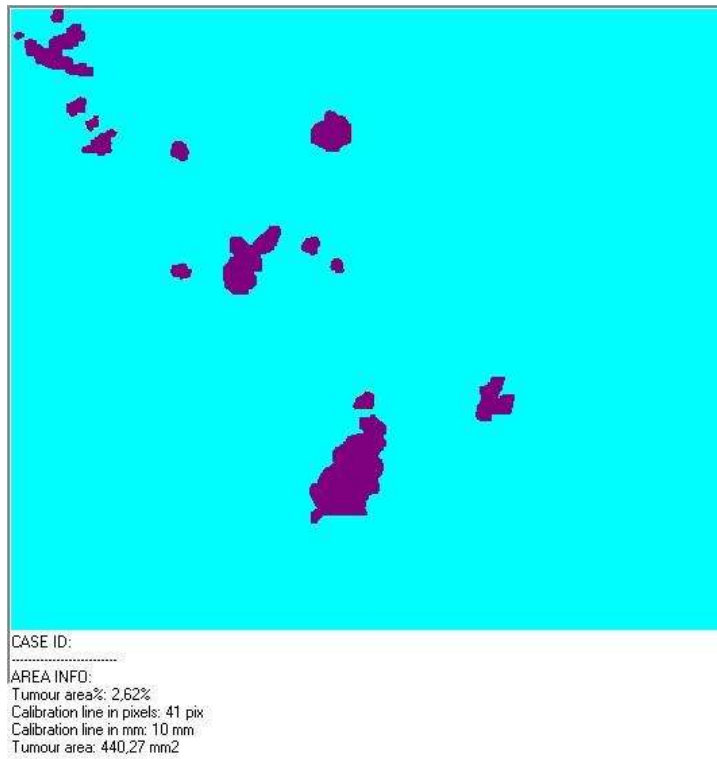


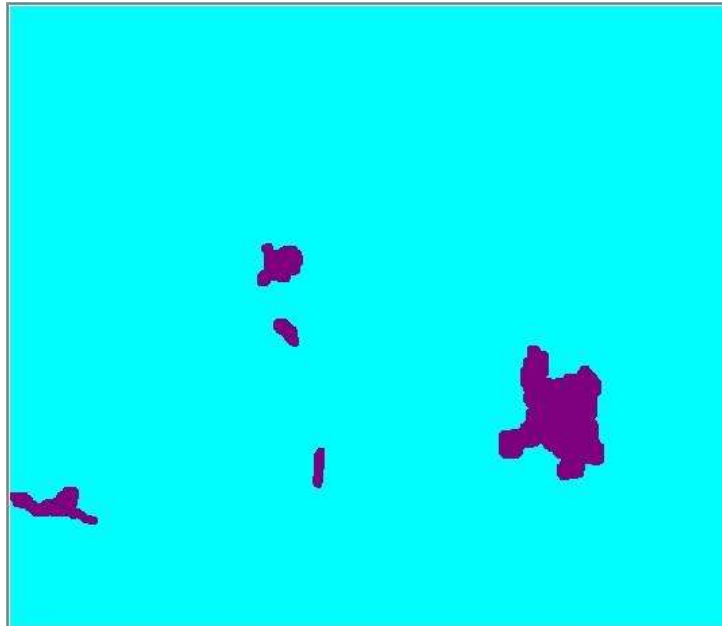
### Anexo 3      Resultados programa Pixarea

En las figuras que se presentan en esta sección, se muestran los resultados obtenidos con el programa Pixarea, en donde la región de color morado corresponde a las áreas cubiertas por bacterias, y la región restante, de color Calipso, corresponde al metal descubierto.

#### Muestra A              Fierro fundido

Día 5

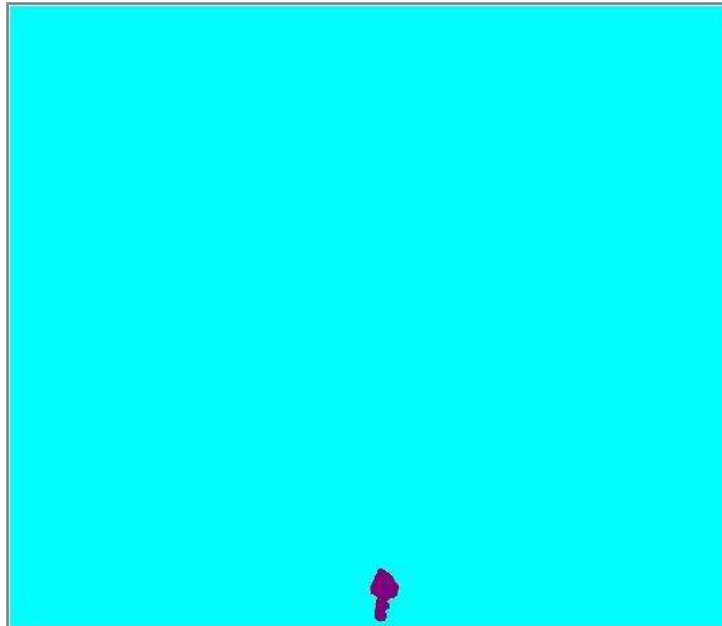




CASE ID: .....

AREA INFO:

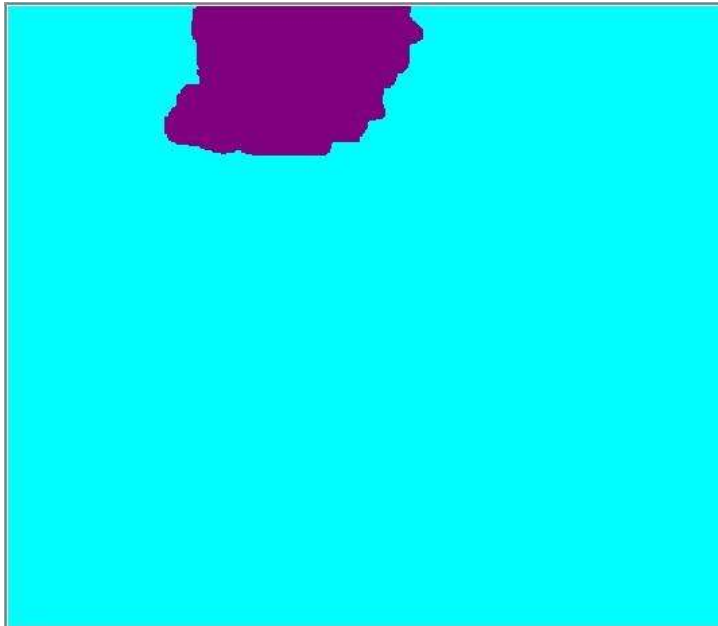
Tumour area%: 2,32%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 390,24 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 0,17%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 28,85 mm<sup>2</sup>

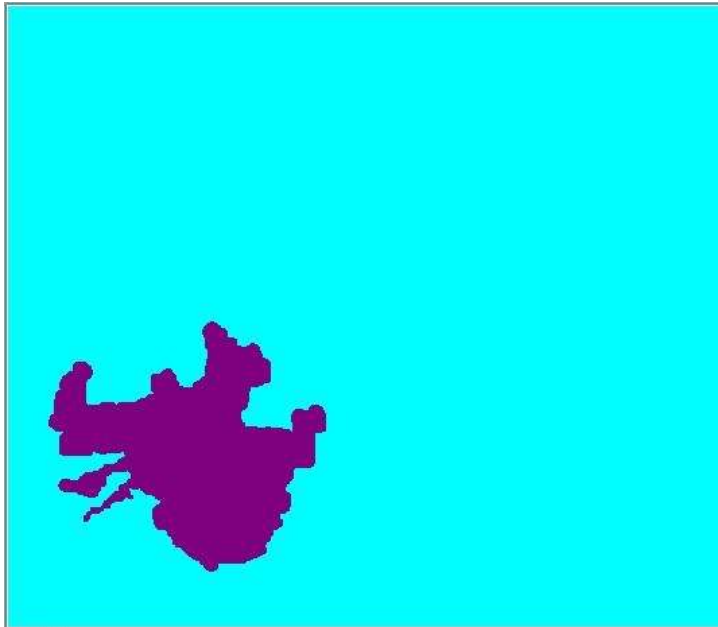


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 5,92%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 996,55 mm<sup>2</sup>

Día 10



CASE ID: .....

AREA INFO:

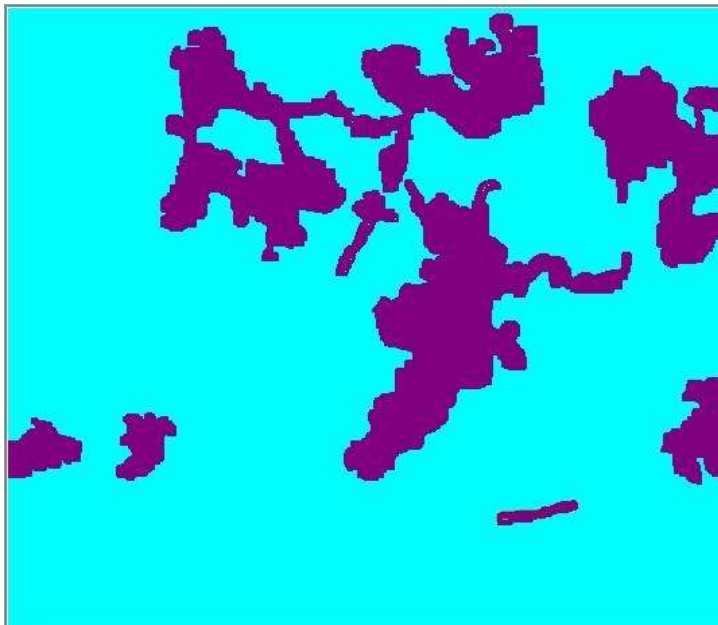
Tumour area%: 6,76%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1138,49 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

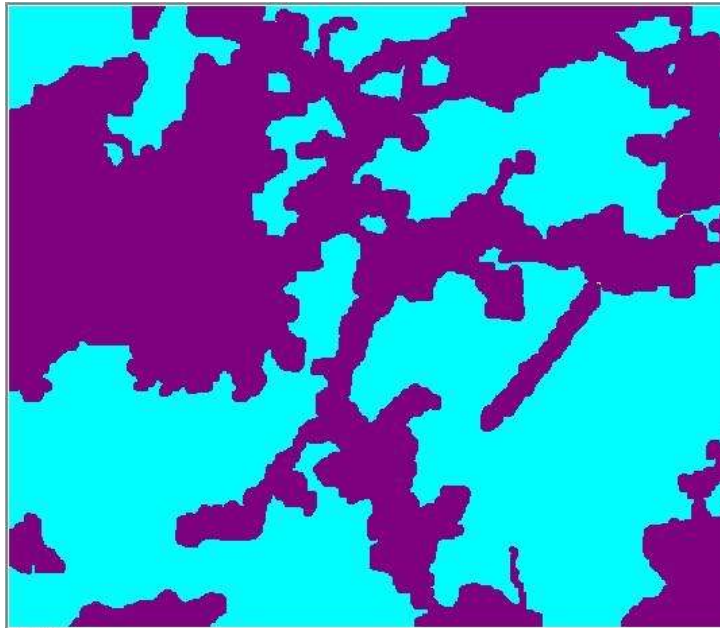
Tumour area%: 65,52%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 11032,06 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 20,41%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3435,99 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 45,71%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 7696,61 mm<sup>2</sup>

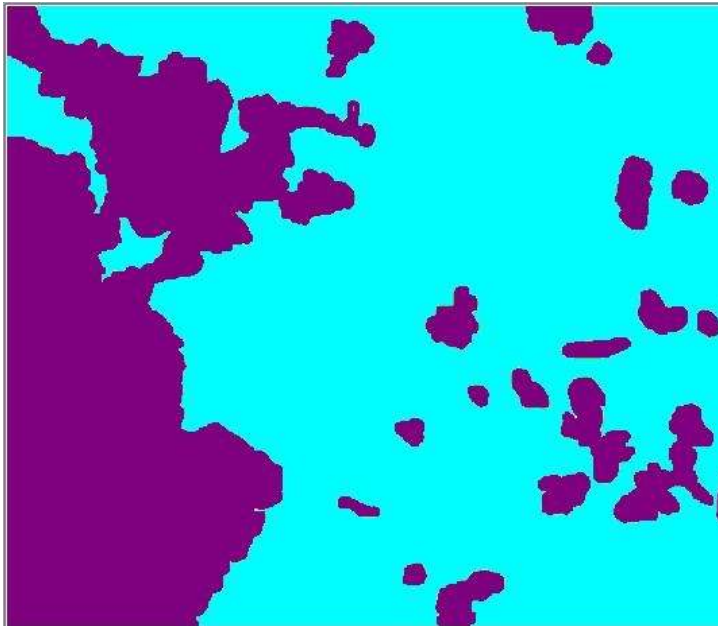
Día 15



CASE ID: .....

AREA INFO:

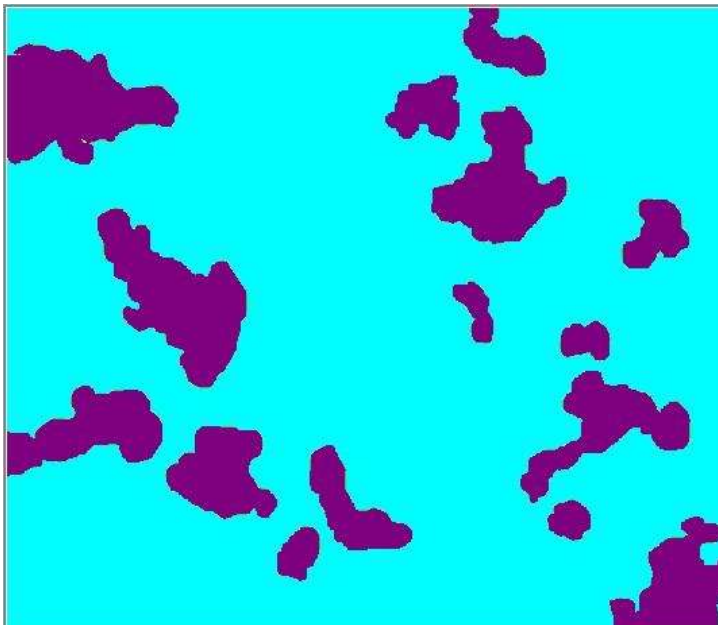
Tumour area%: 37,56%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 6284,3 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

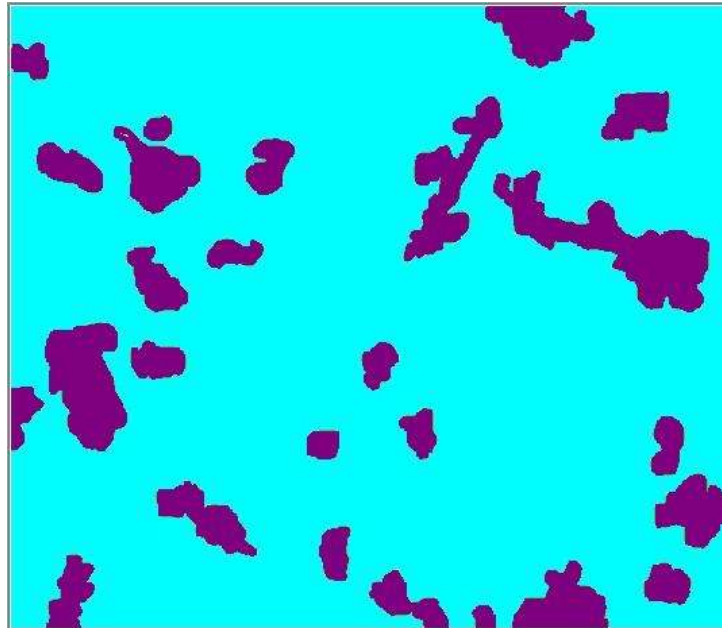
Tumour area%: 32,3%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 5406,66 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 18,43%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3086,85 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:  
Tumour area%: 14,75%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 2465,44 mm2

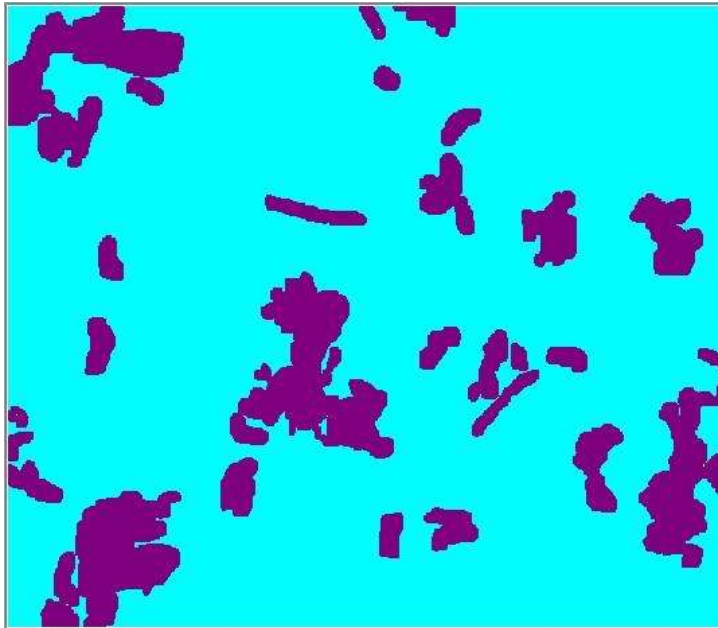
**Muestra B Acero inoxidable 316L**

Día 5



CASE ID: .....

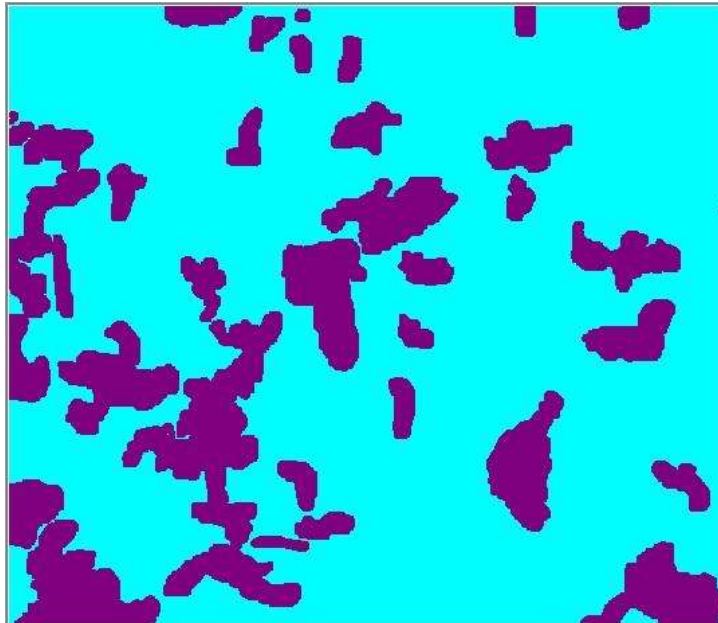
AREA INFO:  
Tumour area%: 88,57%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 14912,97 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 15,74%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 2650,51 mm<sup>2</sup>

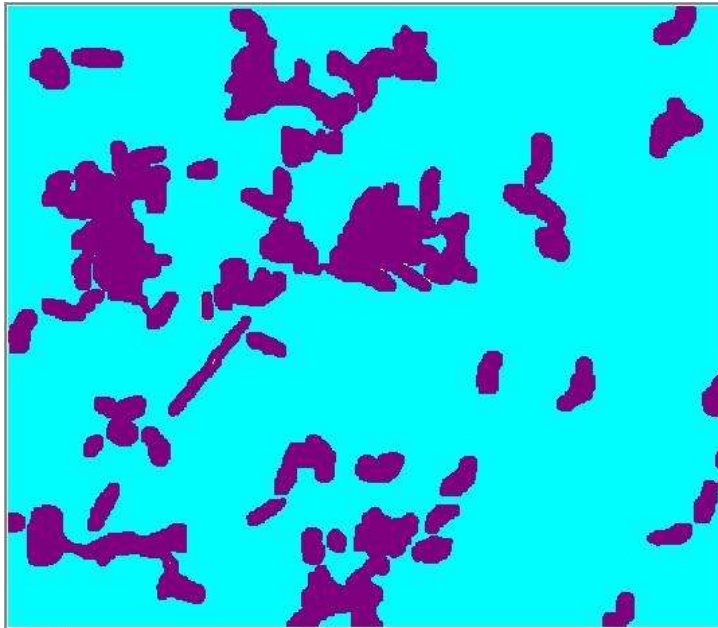


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 22,64%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3812,37 mm<sup>2</sup>



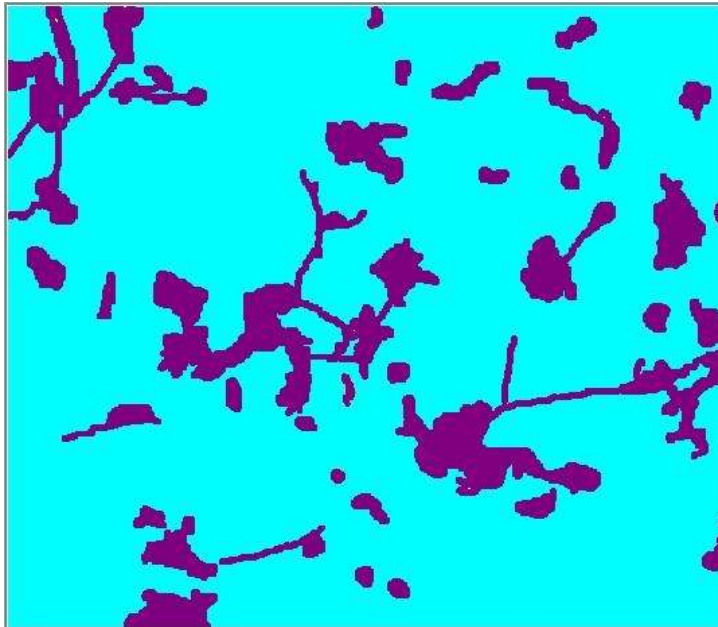


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 20,27%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3411,84 mm<sup>2</sup>

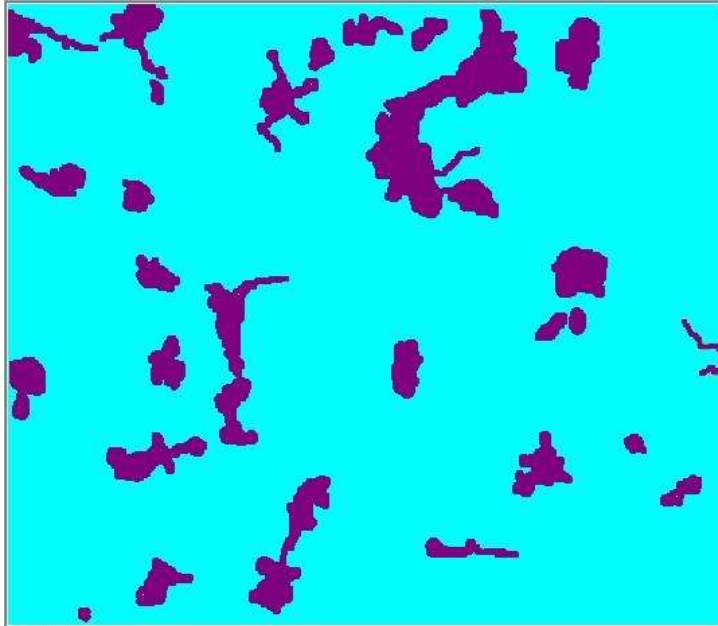
Día 10



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 17,36%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 2922,19 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

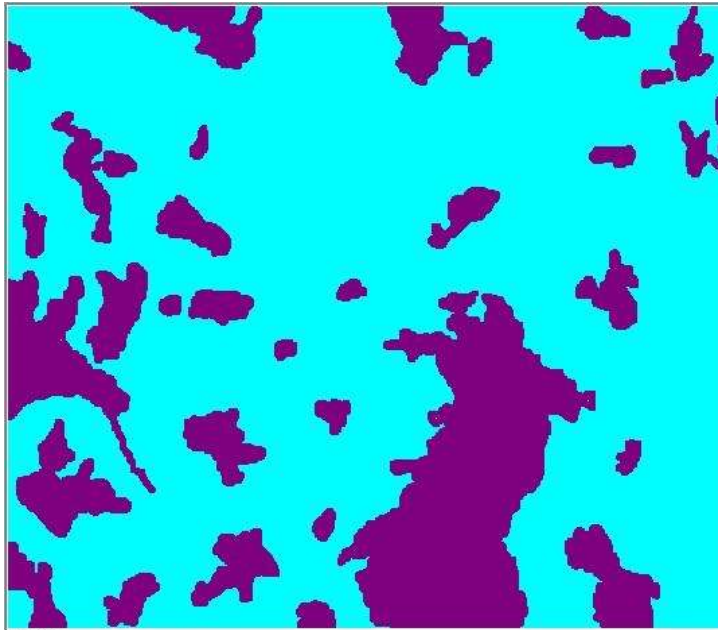
Tumour area%: 11,39%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1917,25 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 41,74%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 7028,2 mm2

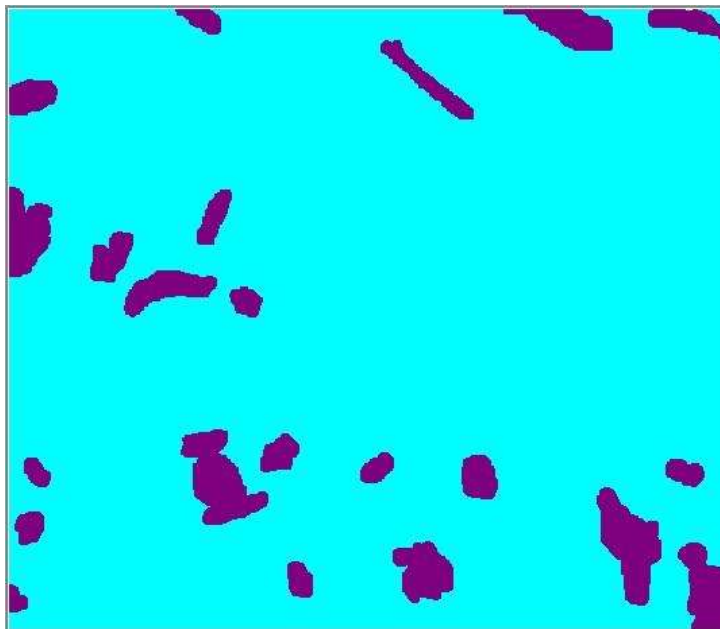


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 24.4%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4107,56 mm<sup>2</sup>

Día 15



CASE ID: .....

AREA INFO:

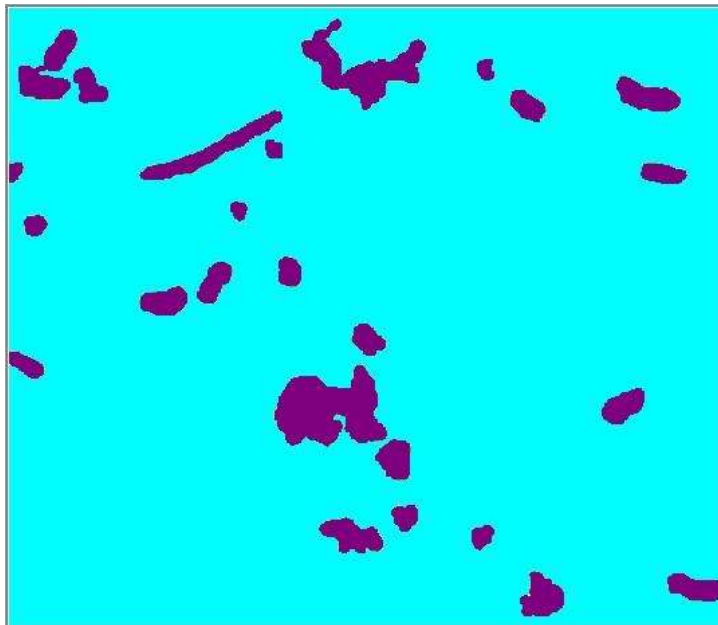
Tumour area%: 10,16%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1710,53 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

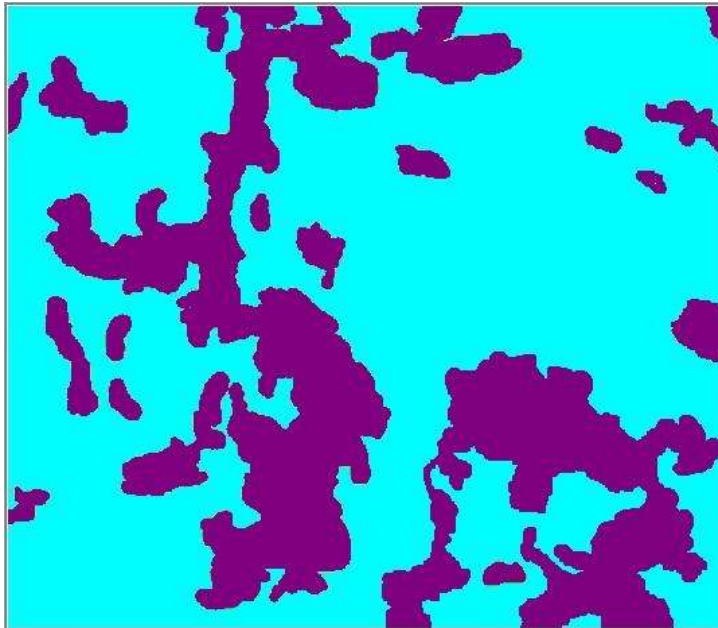
Tumour area%: 23,04%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3879,06 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 6,15%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1031,71 mm<sup>2</sup>

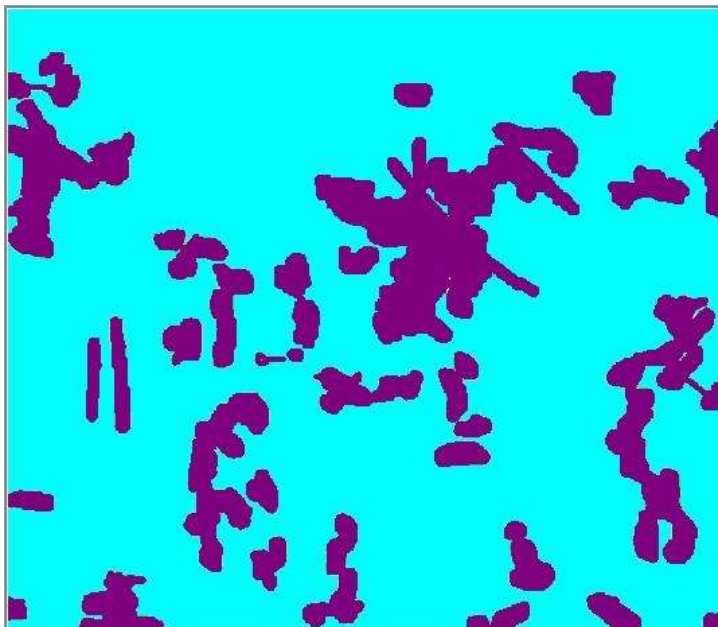


CASE ID: .....

AREA INFO:  
Tumour area%: 29,05%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4861,87 mm<sup>2</sup>

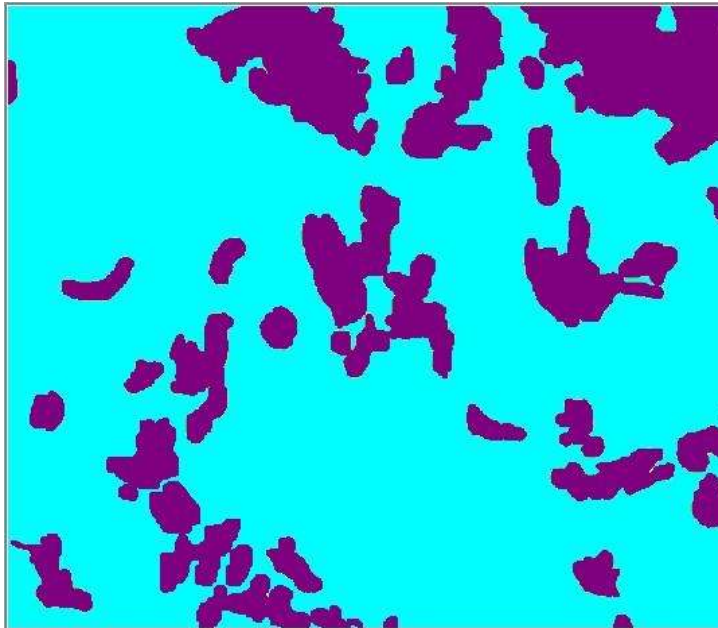
**Muestra C Acero inoxidable AISI 420**

Día 5



CASE ID: .....

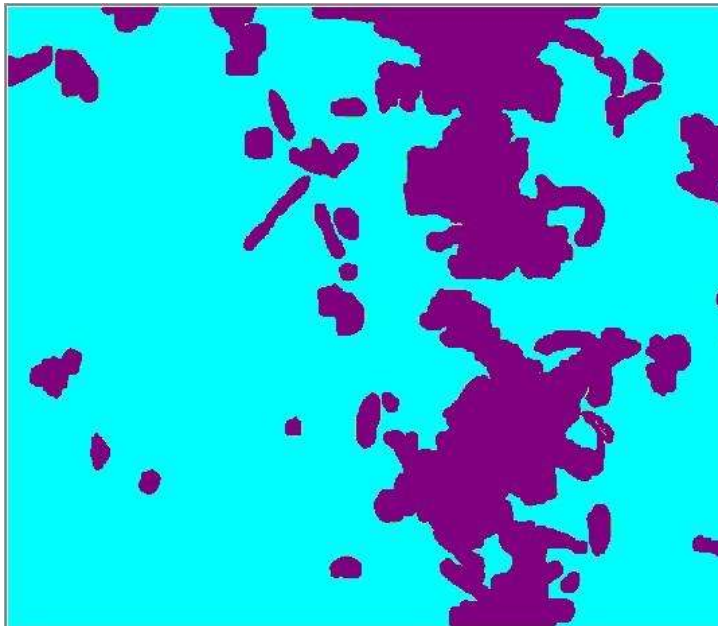
AREA INFO:  
Tumour area%: 21,08%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3524,57 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 24,05%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4019,45 mm<sup>2</sup>



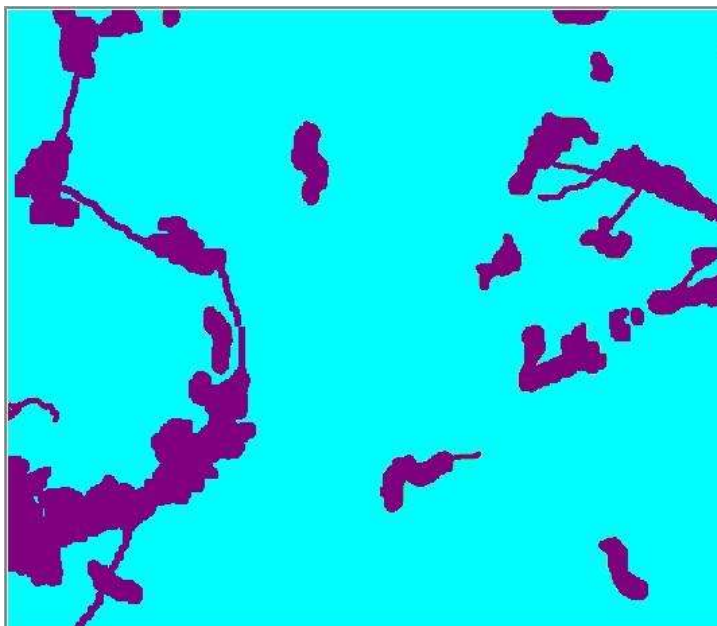
CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 24,23%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4051,87 mm<sup>2</sup>



Día 10



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 12,86%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 2156,45 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 44,23%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 7427,6 mm<sup>2</sup>

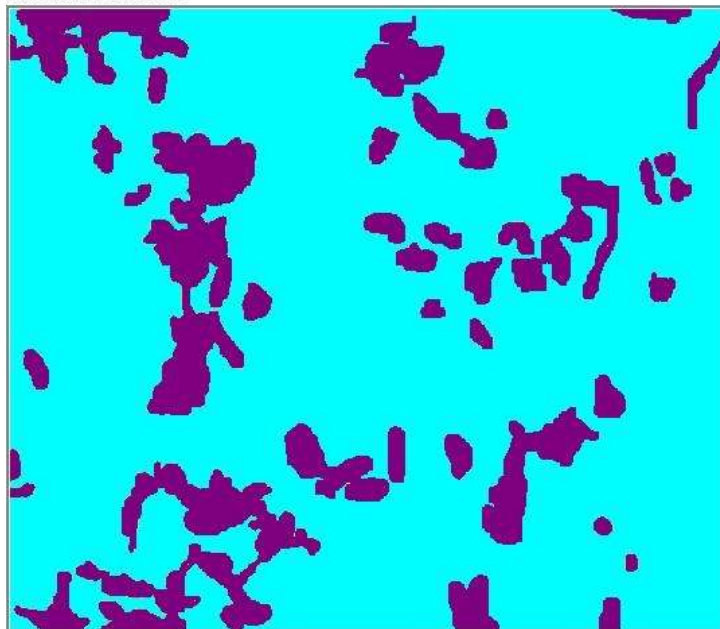
Día 15



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 31,71%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 5333,67 mm2

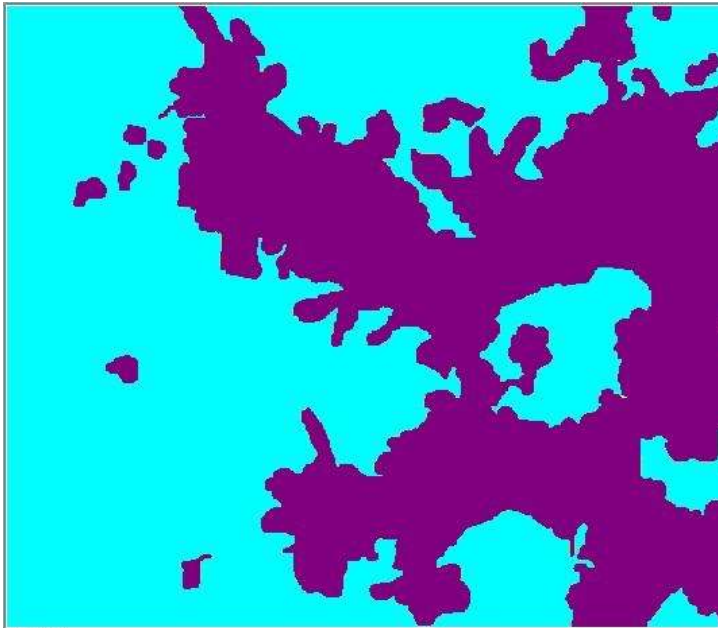


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 18,38%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3080,25 mm2





CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 45,22%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 7569,13 mm<sup>2</sup>



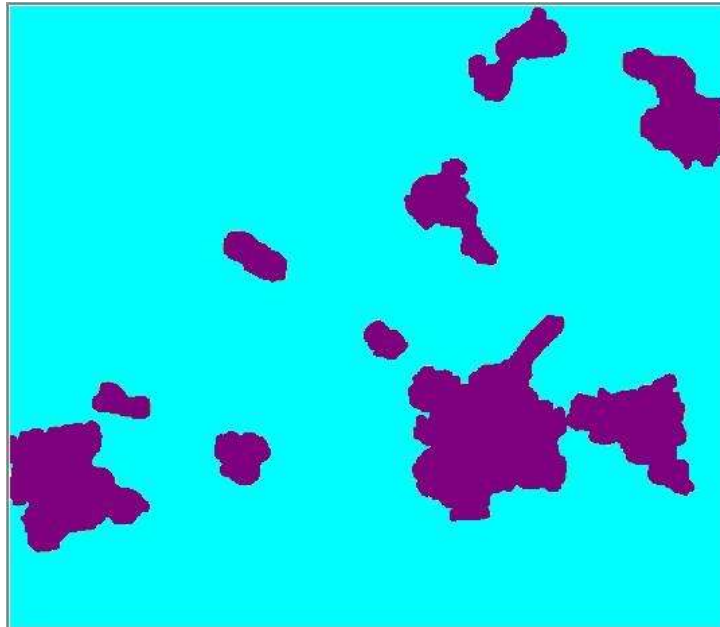
CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 35,88%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 6015,7 mm<sup>2</sup>

**Muestra D Acero al carbono 1020**

Día 5



CASE ID: .....

AREA INFO:

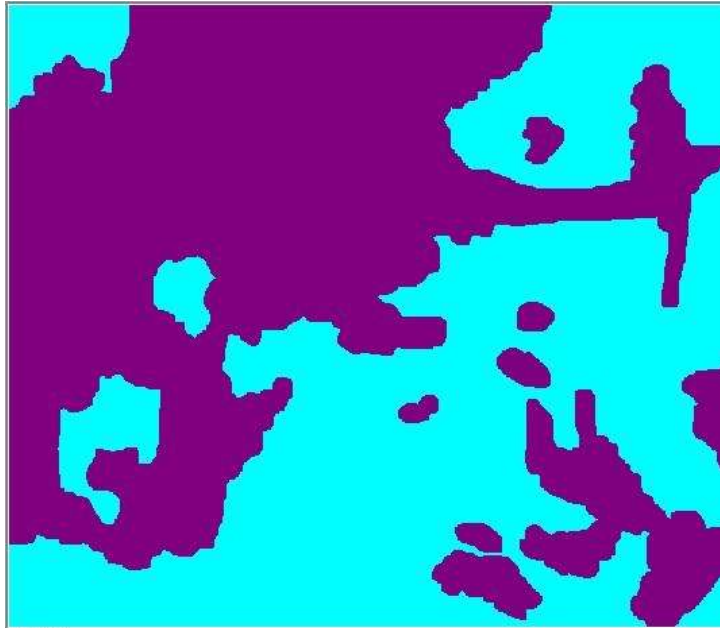
Tumour area%: 14%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 2347,71 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 58,06%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 9718,92 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 50,73%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 8542 mm<sup>2</sup>

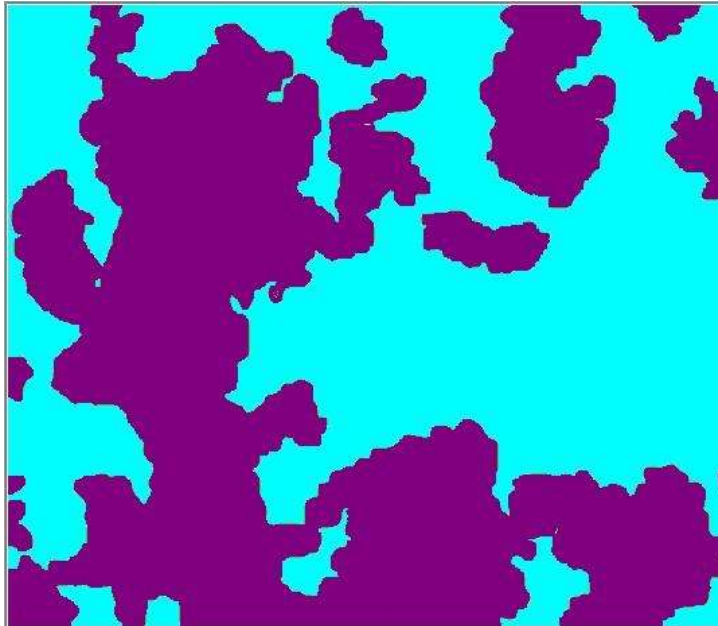


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 25,93%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4344,44 mm<sup>2</sup>

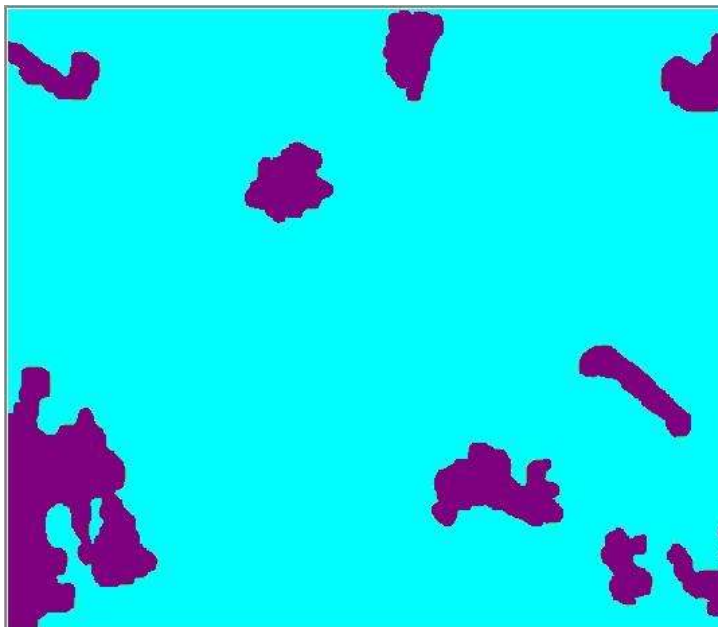
Día 10



CASE ID: .....

AREA INFO:

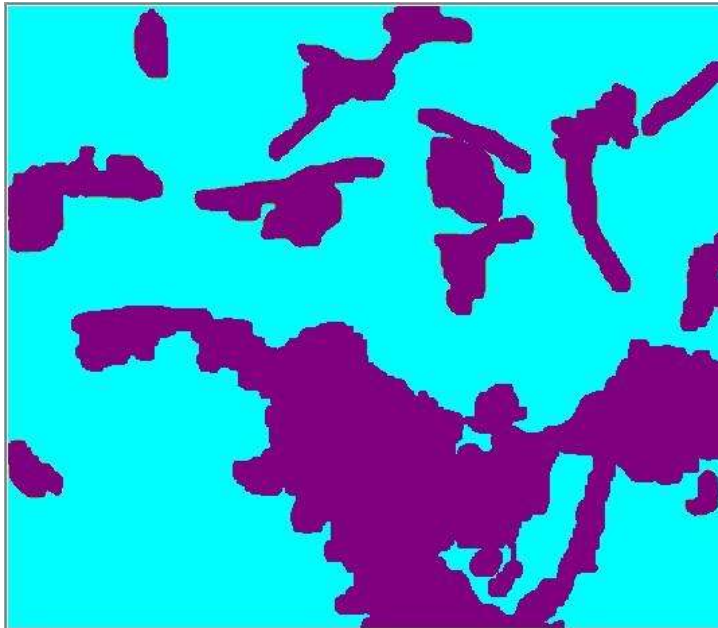
Tumour area%: 49.4%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 8242,83 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 13.38%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 2244,74 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 29,35%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4918,8 mm2



CASE ID: .....

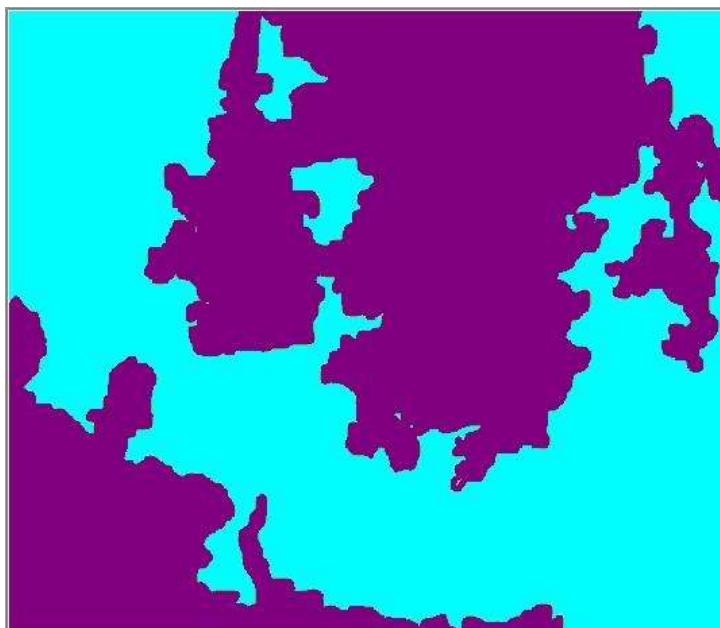
AREA INFO:

Tumour area%: 74,08%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 12442,42 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:  
Tumour area%: 77,96%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 13096,37 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:  
Tumour area%: 44,87%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 7509,7 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 89,66%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 15054,13 mm<sup>2</sup>



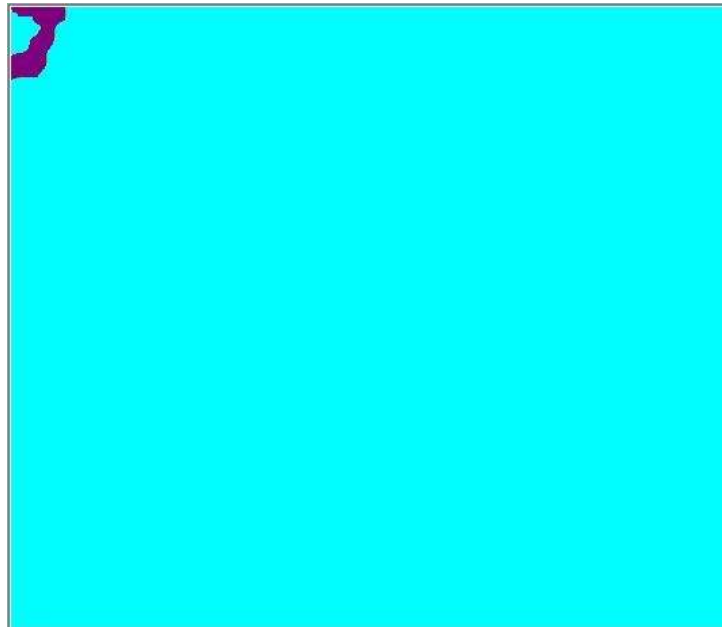
CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 11,43%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1916,72 mm<sup>2</sup>

**Muestra E Acero AISI A36**

Día 5

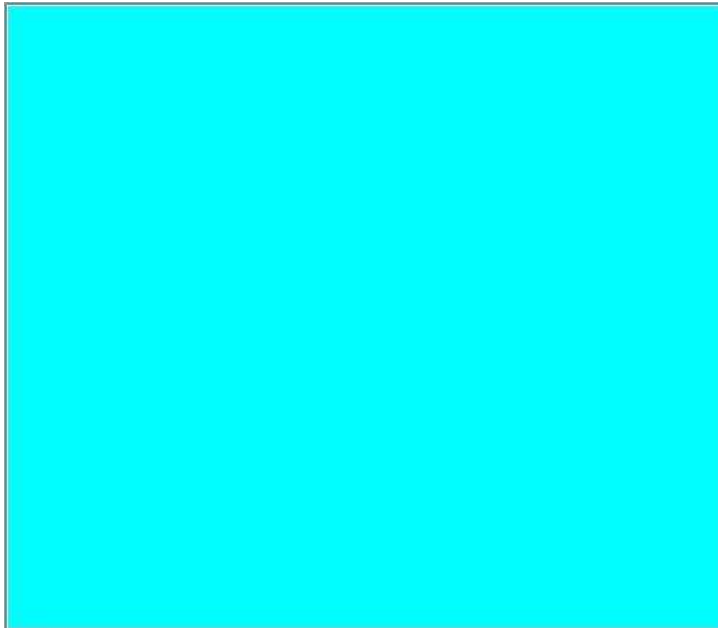


CASE ID: .....  
AREA INFO:  
Tumour area%: 0,4%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 67,76 mm2



CASE ID: .....  
AREA INFO:  
Tumour area%: 8,09%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1359,9 mm2

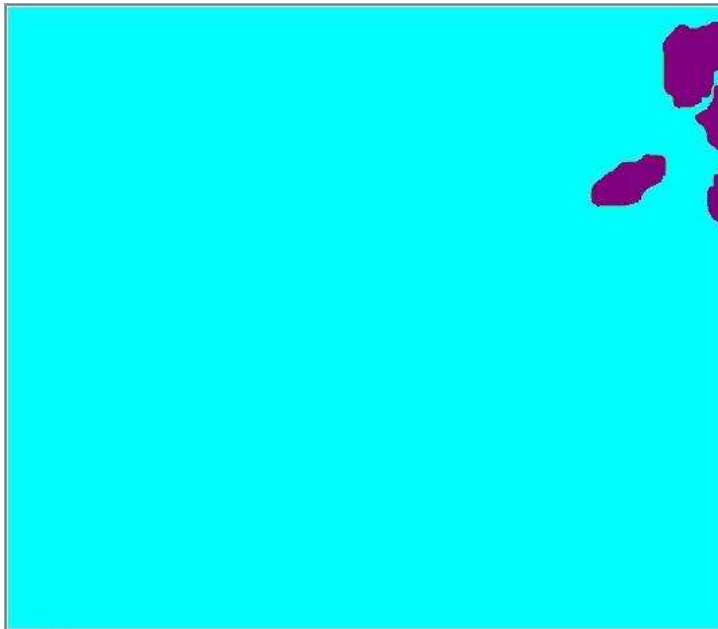




CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 0%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 0 mm<sup>2</sup>

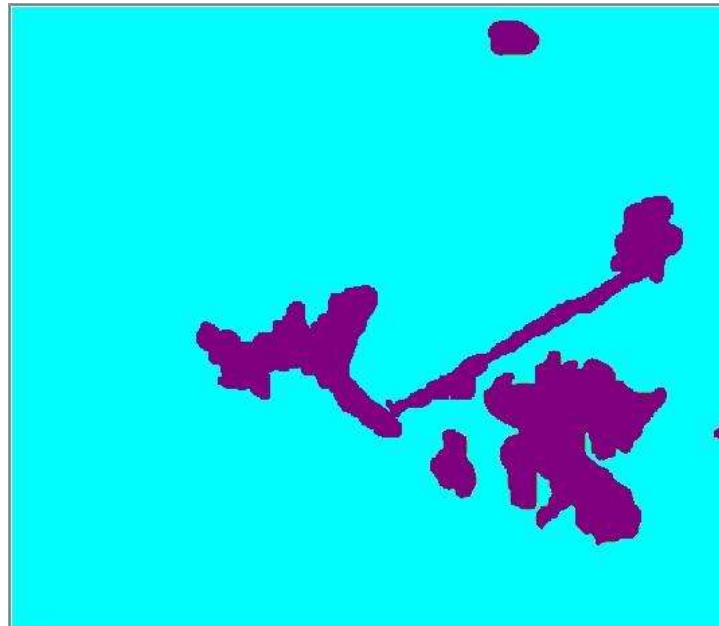


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 6.59%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1108.57 mm<sup>2</sup>

Día 10



CASE ID: .....

AREA INFO:

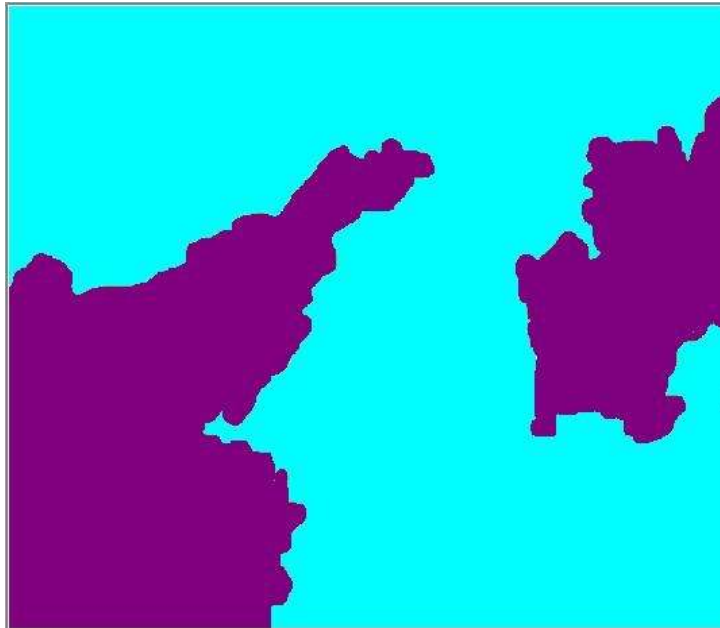
Tumour area%: 9,39%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 1578,11 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 3,71%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 622,55 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 35,74%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 6001,19 mm<sup>2</sup>

Día 15



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 96,69%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 16281,32 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

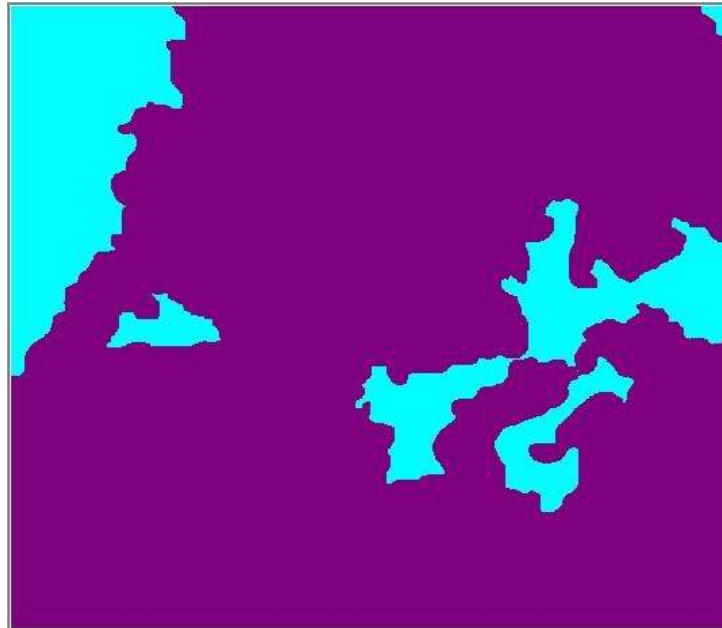
Tumour area%: 40,16%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 6750,21 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

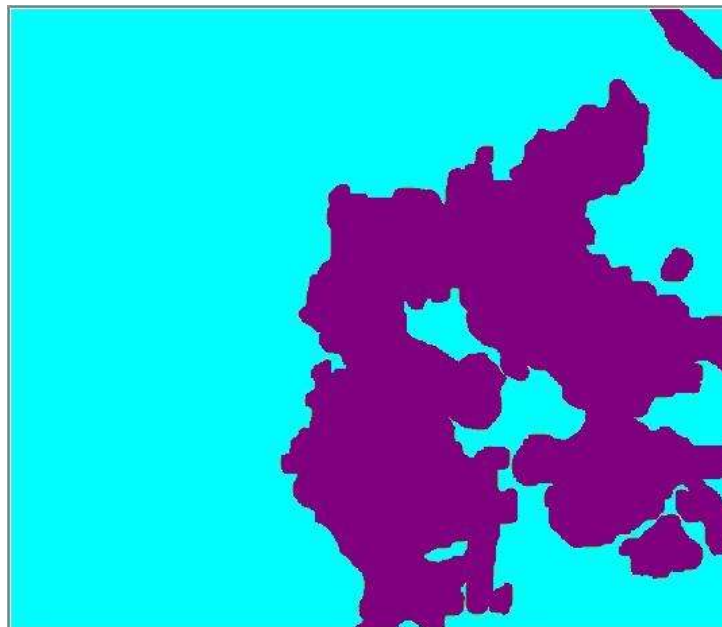
Tumour area%: 6,91%  
Calibration line in pixels: 411 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 11,57 mm<sup>2</sup>



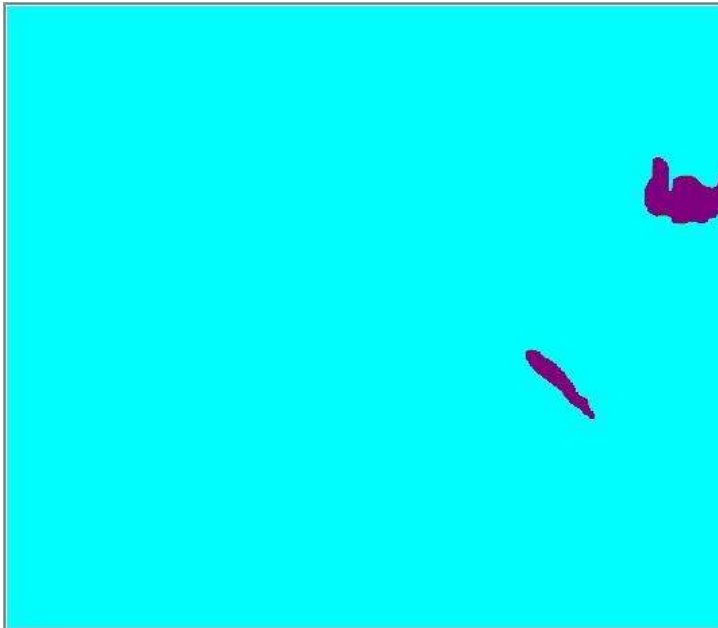
CASE ID: .....  
AREA INFO:  
Tumour area%: 81,08%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 13627,36 mm2

**Muestra F Acero SAE 4340**

Día 5



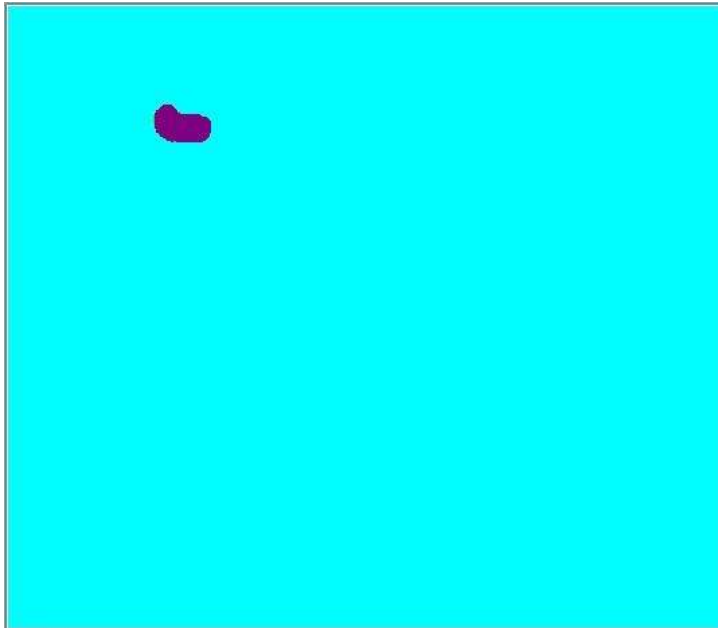
CASE ID: .....  
AREA INFO:  
Tumour area%: 29,06%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4867,76 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

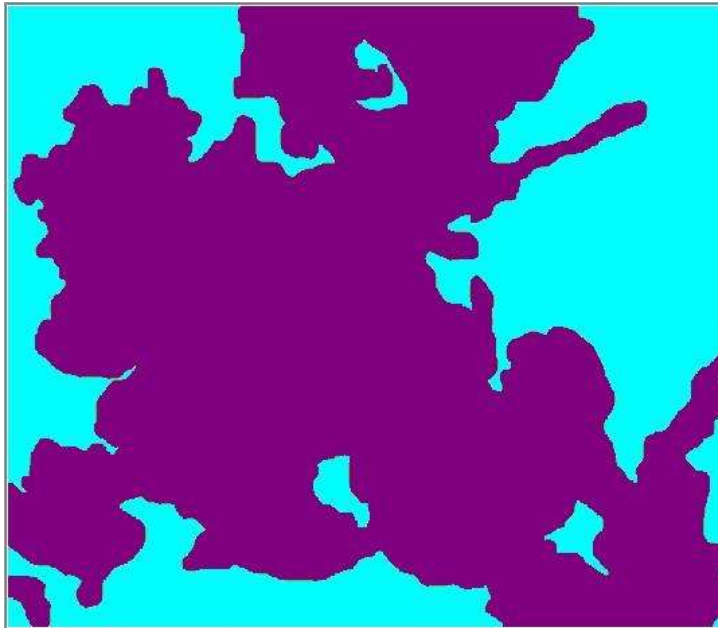
Tumour area%: 1,04%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 175,85 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 0,63%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 105,35 mm<sup>2</sup>

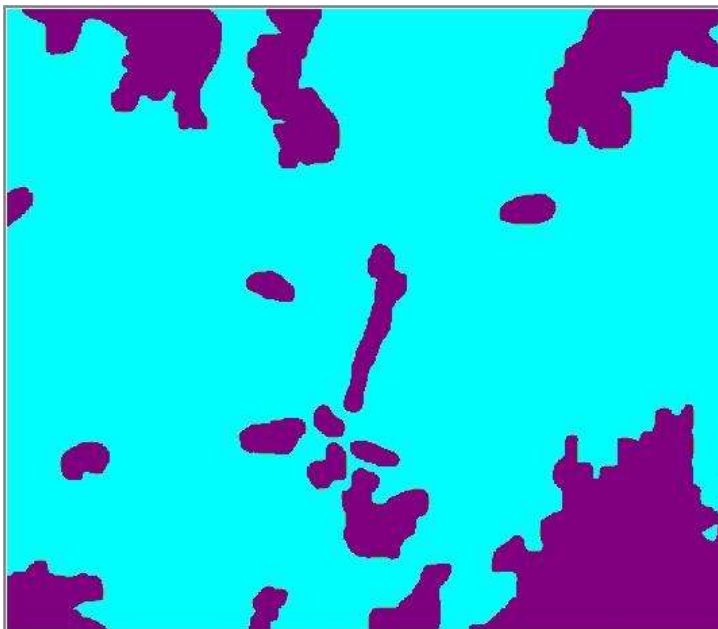


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 57,74%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 9662,76 mm<sup>2</sup>

Día 10



CASE ID: .....

AREA INFO:

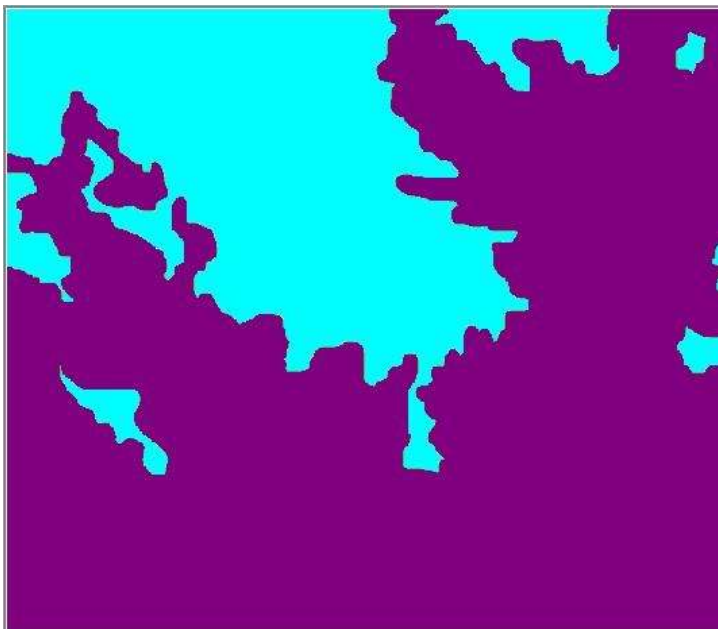
Tumour area%: 20,9%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3495,3 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 20,04%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3355,09 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 73,08%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 12246,16 mm2



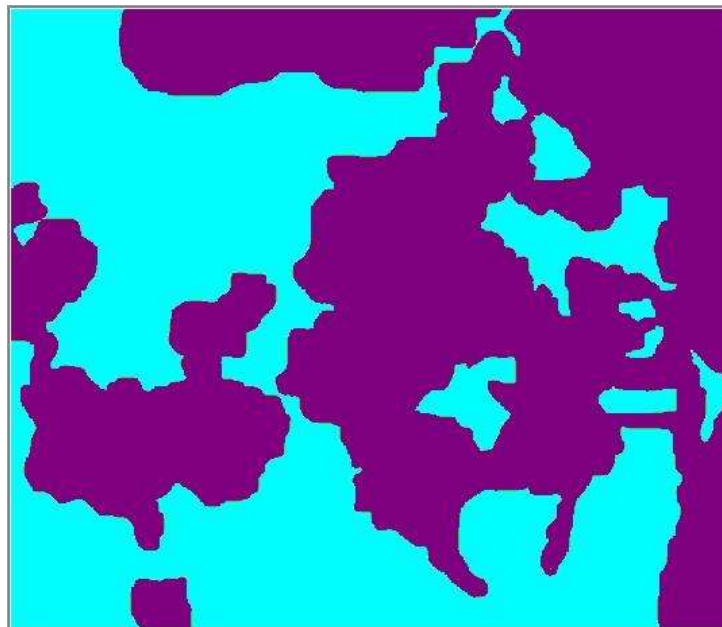


CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 23,95%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 4016 mm<sup>2</sup>

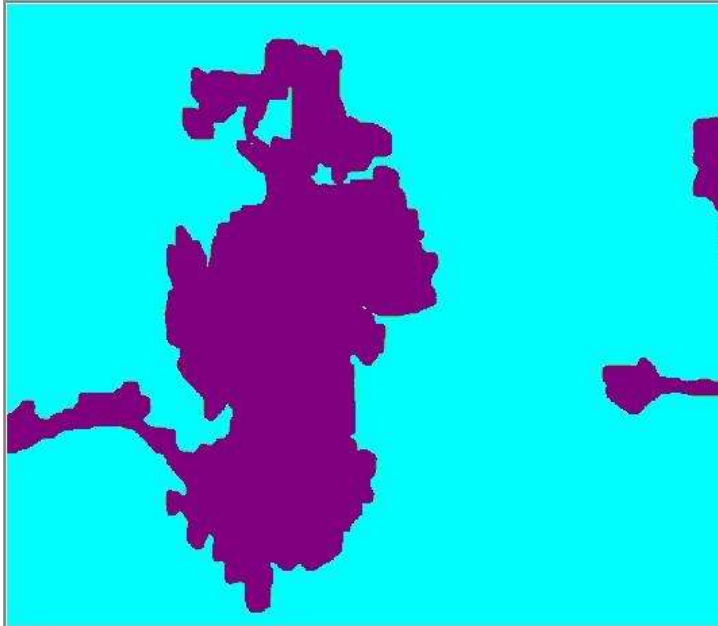
Día 15



CASE ID: .....

AREA INFO:

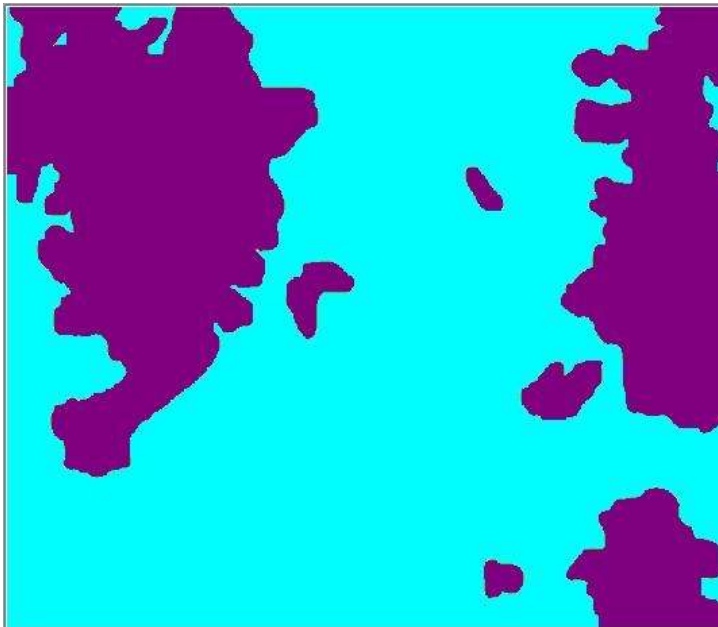
Tumour area%: 60,51%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 10110,59 mm<sup>2</sup>



CASE ID: .....

AREA INFO:

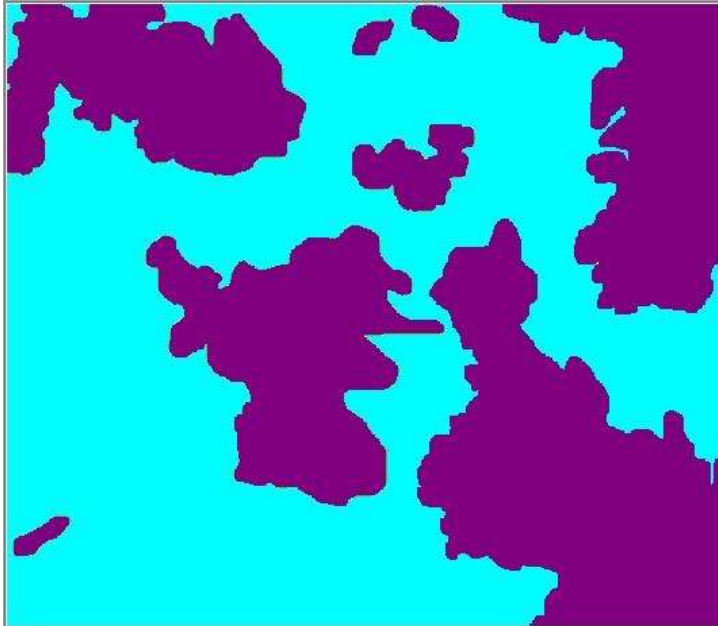
Tumour area%: 22,34%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 3743,6 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 34,96%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 5856,51 mm2



CASE ID: .....

AREA INFO:

Tumour area%: 51,31%  
Calibration line in pixels: 41 pix  
Calibration line in mm: 10 mm  
Tumour area: 8608,09 mm<sup>2</sup>