

# Influencia de la composición química, del tratamiento térmico y del acabado superficial en el bioensuciamiento de aceros inoxidable austeníticos<sup>(\*)</sup>

M.I. Sarró\*, Ó. Alemán\*, D.A. Moreno\*, M. Roso\* y C. Ranninger\*

## Resumen

El objetivo de este estudio es analizar el comportamiento frente al bioensuciamiento de tres aceros inoxidable austeníticos, utilizados habitualmente en la industria (UNS S30400, UNS S30403, UNS S31600), con diferentes tratamientos térmicos y acabados superficiales de lijado y pulido. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas de microscopía. Por microscopía electrónica de barrido se evaluó la distribución de los microorganismos en la superficie del material, y por microscopía de epifluorescencia se analizó la viabilidad de los mismos. Los resultados obtenidos revelan una influencia del material, del tratamiento térmico, del acabado superficial y de la rugosidad en el bioensuciamiento de los aceros inoxidable austeníticos.

## Palabras clave

Acero inoxidable austenítico. Tratamiento superficial. Electropulido. Rugosidad. Biopelícula. Bioensuciamiento.

## Influence of the chemical composition, heat and surface treatment in the biofouling of austenitic stainless steels

## Abstract

The main objective of this study was to analyse the biofouling processes in three kinds of stainless steels used normally in industry (UNS S30400, UNS S30403 and UNS S31600), with different surface treatments after grinding and polishing. The study was developed using two microscopy techniques. Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to evaluate the microorganisms distribution in the materials, and Epifluorescence Microscopy was used to evaluate the viability of cells in the biofilm. The results revealed the influence of the material, heat treatment, surface treatment and roughness in the biofouling processes in the stainless steel assays.

## Keywords

Austenitic stainless steel. Surface treatment. Polished electrolytic. Roughness. Biofilm. Biofouling.

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de las biopelículas ha ido aumentando gradualmente desde su primera descripción<sup>[1]</sup>. Cuando se examinan diferentes ecosistemas, entre ellos los naturales, industriales u hospitalarios, se observa que la mayoría de los microorganismos presentes en los mismos son capaces de colonizar los materiales y formar biopelículas sobre distintas superficies, incluso en ambientes tan aparentemente hostiles como aguas con elevados niveles de radiación<sup>[2]</sup>. Las biopelículas pue-

den definirse como una matriz constituida por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), donde están inmersas diversas poblaciones microbianas adheridas entre sí, con la matriz de exopolisacáridos y con la superficie del material que están colonizando<sup>[3]</sup>.

Las biopelículas provocan pérdidas importantes en la industria eléctrica, nuclear, naval, alimentaria, entre otras, debido al aumento de la resistencia a la fricción por el paso de fluidos en conductos de agua<sup>[4]</sup>, a la disminución de la transferencia de calor en los intercambiadores térmicos<sup>[5]</sup>, o a la

(\*) Trabajo recibido el día 1 de julio de 2003 y aceptado en su forma final el día 1 de diciembre de 2003.

(\*) Universidad Politécnica de Madrid. Dpto. de Ingeniería y Ciencia de los Materiales. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. José Gutiérrez Abascal, 2. E-28006 Madrid, España. E-mail: moreno@materials.upm.es.

contaminación de alimentos por bacterias patógenas<sup>[6]</sup>. También, son responsables de gran cantidad de problemas clínicos como la formación de la placa dental<sup>[7]</sup>, contaminación de lentillas<sup>[8]</sup> y pueden dar lugar a infecciones en pacientes que tengan implantes<sup>[9]</sup>.

Prácticamente, todos los materiales en las condiciones adecuadas son susceptibles de ser colonizados por los microorganismos, incluyendo los aceros inoxidables<sup>[10-13]</sup>, utilizados en aquellos ambientes donde se requiere una resistencia extra frente a la corrosión o biocorrosión. Por ello, muchas de las investigaciones están dirigidas al estudio de la influencia de las propiedades fisicoquímicas en la adhesión bacteriana<sup>[14]</sup> o al estudio de diversas técnicas de prevención y protección de materiales frente al bioensuciamiento, biocorrosión y biodeterioro<sup>[15 y 16]</sup>.

La composición del material, su acabado superficial y la rugosidad parecen influir en la adhesión bacteriana y posterior formación de las biopelículas<sup>[17-22]</sup>. En este estudio se analiza si el tipo de acero inoxidable, el tratamiento térmico, el acabado superficial y la rugosidad influyen en la colonización bacteriana.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Aceros inoxidables austeníticos

El presente trabajo se realizó sobre tres tipos diferentes de aceros inoxidables austeníticos, el UNS S30400, UNS S30403 y el UNS S31600. Se utilizaron probetas de 35 mm x 15 mm, con espesores diferentes dependiendo del material, de 5, 6 y 4 mm respectivamente.

La composición química en carbono y azufre de los materiales utilizados se determinó por combustión a alta temperatura (Leco, modelo CS 125). El resto de los componentes corresponden a la certificación del fabricante (Tabla I).

En total, se han utilizado 42 probetas, 14 de cada tipo de acero, que se identificaron convenientemente en una de las esquinas de cada probeta.

Las probetas de cada material se dividieron en dos grupos, uno en estado de recepción y otro sometido a tratamiento térmico en horno a 700 °C, durante 30 min.

A continuación, en todas las probetas se realizaron tres acabados superficiales distintos de lijado: 120, 120+400 y 120+400+600; el último lijado se llevó a cabo, siempre, en dirección longitudinal de la probeta. En la mitad de cada probeta se realizó

**Tabla I.** Composición química de los aceros inoxidables austeníticos utilizados

*Table I. Chemical composition of the stainless steels assays*

Material	% C	% Si	% Mn	% S	% P	% Cr	% Mo	% Ni
UNS S30400	0,080	0,48	1,17	0,0034	0,027	18,1	0,60	7,0
UNS S30403	0,018	0,41	1,30	0,0051	0,017	19,1	0,21	10,0
UNS S31600	0,046	0,61	1,16	0,0027	0,019	18,0	3,00	10,0

un acabado de pulido electrolítico, empleando un electrolito compuesto en volumen por ácido ortofosfórico (85 %) en un 60 % y ácido sulfúrico (96 %) en un 40 %. Se utilizó una densidad de corriente de 2,5 A/cm<sup>2</sup> con tiempos de pulido/ataque de 90 s para las probetas en estado de recepción y de 30 s en las tratadas térmicamente.

Para la determinación del grado de preparación, ataque o picadura de los distintos acabados se tomaron micrografías de las probetas y sus acabados superficiales mediante un microscopio óptico Olympus, Vanox AHB-LB con equipo fotográfico automático PM-10 AD.

Finalmente, entre las zonas de lijado y pulido de las probetas se realizó, mediante una pulidora portátil Movipol, un ensayo para determinar el grado de sensibilización por medio de la Práctica A de la norma ASTM A-262<sup>[23]</sup>.

### 2.2. Rugosidad

Se midió la rugosidad de todas las probetas, previamente limpiadas con acetona, utilizando un rugosímetro Surtronic 3+, Rank Taylor Hobson. Se registraron los datos de rugosidad y ondulación.

Las mediciones de rugosidad se llevaron a cabo en dirección longitudinal y transversal en cada probeta, de forma que, en cada una de ellas, se obtuvieron cuatro medidas, dos correspondientes a la zona lijada y dos a la zona lijada y electropulida, seleccionando, para la caracterización del acabado superficial, el valor promedio de los valores de Ra longitudinal y transversal.

### 2.3. Microorganismo

El microorganismo utilizado, se aisló de la pared de la piscina situada sobre el reactor de la Central Nuclear de Cofrentes (Valencia, España), construida en acero inoxidable austenítico.

La identificación del microorganismo se realizó mediante pruebas bioquímicas con el kit

BBL® Oxi/Ferm™ Tube II de Becton & Dickinson, y mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, realizando la extracción de DNA del cultivo, la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación de las 1500 pares de bases del 16S rDNA con el kit de Micro Seq™ Full Gene, empleando el secuenciador "ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer DNA". Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en las bases de datos del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) y del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), siendo el microorganismo aislado y utilizado para este estudio *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), con número de acceso de la base de datos de 16S rDNA AF397060, con una similitud en la comparación del 100 % y que se mantuvo en crioteca (Microkit, S.L.) a -20 °C hasta su utilización en los ensayos de bioensuciamiento.

#### 2.4. Ensayos de bioensuciamiento

Se llevaron a cabo en tubos de ensayo universales de 20 ml de capacidad. Se adicionó el medio de cultivo, se esterilizó y en condiciones asépticas se añadió el microorganismo. A continuación las probetas se limpiaron con acetona y se esterizaron con etanol 96 % flameándolas a la llama y dejándolas enfriar antes de introducirlas en el tubo de ensayo. Finalmente se incubaron a 37 °C, durante 48 h. El medio de cultivo utilizado fue TSB (*Tryptone Soya Broth*, OXOID). El inóculo inicial del microorganismo fue de 10<sup>3</sup> bacterias/ml.

#### 2.5. Microscopía de epifluorescencia

Para realizar el recuento de las bacterias tanto en el inóculo inicial como en las biopelículas de las probetas se utilizó el Kit L-7012 (LIVE/DEAD Bac Light Viability; Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon), tiñendo a una concentración final de 3,41 µm de SYTO 9 y 6,01 µm de yoduro de propidio. El fluorocromo SYTO 9 tiñe en verde todas las células, independientemente de su estado vital y de si tienen o no las membranas intactas. El fluorocromo yoduro de propidio tiñe en rojo tan sólo a células con membranas comprometidas y dañadas por lo que se las considera bacterias muertas y nos permite diferenciar entre bacterias vivas o muertas en la biopelícula.

Para el recuento inicial de microorganismos se utilizaron filtros Isopore negros (GTBP 02500™, Millipore) teñidos con SYTO 9 durante 15 min en

oscuridad y se observaron al microscopio, montados con el aceite de montaje del kit.

Las probetas, previamente a su tinción, se lavaron con agua destilada estéril para retirar los microorganismos que no estaban adheridos a la superficie del material. A continuación se tiñeron con un volumen de 60 ml de agua desionizada estéril y los fluorocromos en proporción 1:1 a las concentraciones finales dadas. La tinción se realizó en agitación suave y oscuridad durante 15 min. Las probetas se conservaron a 4 °C hasta su observación por un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop-2, con objetivo de inmersión x100 (Immersol® 518N, n<sub>e</sub>=1,518 (23 °C)), y con filtros Zeiss 487709 para la observación de los dos fluorocromos simultáneamente, y Zeiss 487714 para observar sólo las bacterias teñidas con yoduro de propidio. Las micrografías se tomaron usando una cámara Ricoh XR-X3000 y película Fujifilm Sensia II 100ASA, o Kodak Gold 100ASA.

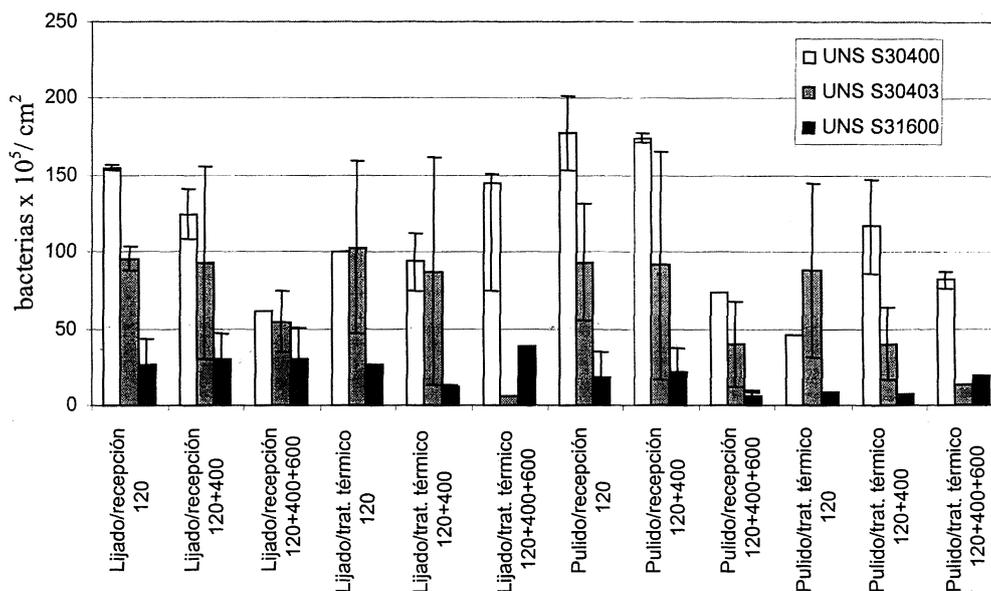
#### 2.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las probetas se prepararon para SEM con el fin de comprobar la distribución de las bacterias en el material. En este caso el inóculo inicial fue de 10<sup>4</sup> bacterias/ml y la incubación se realizó a 37 °C, durante 24 h. Después, las probetas se lavaron dos veces en un tampón de cacodilato sódico 0,01 M. La fijación se llevó a cabo con glutaraldehído al 2,5 % en cacodilato sódico 0,01 M durante 3 h, a 4 °C. La deshidratación se realizó mediante la inmersión de las probetas en una serie acetónica creciente de 20, 40, 60 y 80 % (V/V). Cada paso de la serie se mantuvo durante 30 min, a 4 °C. Finalmente, se conservaron en acetona 100 %, a 4 °C, hasta que se llevó a cabo el punto crítico (Balzers Union CPD 020) y metalizado con oro (Balzers Union SCD 004). Las probetas se observaron con un microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM 960) a 15 kV, utilizando electrones secundarios y retrodispersados.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Influencia del acabado superficial en el bioensuciamiento

En la figura 1 se observa que el bioensuciamiento presentado en los aceros inoxidables, expresado en bacterias x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> mediante recuento por microscopía de epifluorescencia, es diferente en función del acabado superficial recibido.



**Figura 1.** Bioensuciamiento (expresado en bacterias x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>) de los aceros inoxidables austeníticos ensayados en función de su acabado superficial y tratamiento térmico.

*Figure 1.* Biofouling (expressed in bacteria x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>) of austenitic stainless steels assays in function of their surface finish and heat treatment.

Para los acabados lijados, en el acero inoxidable UNS S30400 en estado de recepción, se observa una disminución del número de bacterias/cm<sup>2</sup>, en función del aumento del grado de lijado al que se ha sometido el material. Las excepciones registradas en este material en estado de tratamiento térmico de sensibilización, se deben a la presencia de irregularidades ya que, en algunas probetas, los niveles de ataque han sido evaluados como 3, debido al tratamiento térmico al que se sometieron (Tabla II). En el caso de los acabados pulidos se observa la misma tendencia que en el caso anterior, coincidiendo el menor número de bacterias/cm<sup>2</sup> con el acabado de granulometría más fina (120+400+600). Al igual que para el caso lijado, las excepciones a esta tendencia general se observan en probetas que poseen niveles de ataque evaluados como 3, en los acabados de granulometría 120+400 y 120+400+600 (Tabla II). En las zonas de acabado pulido el número de bacterias/cm<sup>2</sup> es algo mayor que para los mismos acabados lijados, pero se observó que el número de bacterias con membranas comprometidas en la zona pulida, es, en cualquier caso, mayor que en la zona lijada de la probeta.

En el acero inoxidable tipo UNS S30403 se observa una disminución del número de bacterias/

cm<sup>2</sup> en función del aumento del grado de lijado, al igual que ocurría para el UNS S30400. En el acabado pulido, la tendencia es la misma que para los acabados lijados, siendo las probetas menos colonizadas las pulidas a partir del lijado más fino (120+400+600). La colonización bacteriana en los acabados pulidos es menor que para los acabados lijados. En este material se observa el mayor número de bacterias con membranas comprometidas para los acabados desde lijado a 120+400 y su correspondiente pulido. El porcentaje de bacterias con membranas comprometidas es de un 30 % para el acabado lijado y de un 45 % para el acabado pulido.

En el material UNS S31600 se observa un ligero descenso en el número de bacterias/cm<sup>2</sup> para el acabado pulido que para los acabados lijados, tanto en las probetas en estado de recepción como en las sensibilizadas.

Existe discrepancia sobre la influencia del electropulido en la colonización microbiana, de manera que, algunos autores documentan la existencia de un menor número de microorganismos en los acabados electropulidos<sup>[25]</sup> como muestra la tendencia de los materiales ensayados en este estudio, mientras que otros autores concluyen que el electropulido no afecta a la colonización de los aceros inoxidables<sup>[26]</sup>.

**Tabla II.** Evaluación metalográfica de los aceros inoxidables austeníticos después del pulido electrolítico

*Table II. Metallographic evaluation of the stainless steels after electrolytic polishing*

Material	Tratamiento térmico	Lijado	Nivel de pulido	Nivel de ataque	Nivel de picadura
UNS S30400	Recepción	120	1	1	1
		120+400	1	1	1
		120+400+600	1	1	1
	Tratamiento térmico	120	1	3	1
		120+400	1	3	1
		120+400+600	1	3	1
UNS S30403	Recepción	120	1	1	1
		120+400	1	1	1
		120+400+600	1	1	1
	Tratamiento térmico	120	1	1	2
		120+400	1	1	1
		120+400+600	1	1	1
UNS S31600	Recepción	120	1	1	1
		120+400	1	1	1
		120+400+600	1	1	1
	Tratamiento térmico	120	1	1	2
		120+400	1	1	2
		120+400+600	1	1	1

**Nota.** Los niveles de pulido ataque y picadura indicados corresponden a la clasificación no estándar definida por M. Roso [30], para el electropulido de aceros inoxidables austeníticos con diferentes electrolitos. El nivel 1 corresponde al mejor grado de pulido y al menor grado de ataque o picadura, siendo el peor nivel de pulido el 5, el mayor nivel de ataque el 4 y el de picadura el 3.

*Note.* The levels of polished, etched and pitting indicated corresponds to the not standard classification defined by M. Roso [30], for the electrolytic polished of the austenitic stainless steels using different electrolytes. Level 1 corresponds to the best degree of polished and the smaller degree of etching or pitting, being the worst level of polished is the number 5, the greater level of etching is the number 4 and the one of pitting is the number 3.

### 3.2. Influencia del tratamiento térmico en el bioensuciamiento

La sensibilización de los aceros inoxidables ocurre cuando se exponen a temperaturas entre 500 y 800 °C, durante un tiempo determinado, produciendo la precipitación de carburos de cromo hacia los límites de grano del material. El tratamiento térmico realizado produjo la sensibilización de los aceros UNS S30400 y S31600 quedando el S30403 no sensibilizado por su bajo contenido en carbono. La disminución de la concentración de cromo en los dos materiales sensibilizados aumenta el riesgo de corrosión intergranular<sup>[26]</sup>.

En los aceros inoxidables UNS S30400 y UNS S30403 sensibilizados se observa una disminución en la colonización bacteriana, expresada por el número de bacterias/cm<sup>2</sup>, con respecto a los mismos en estado de recepción (Tabla III). En el UNS S30400, esta tendencia la siguen todos los acabados excepto aquellos con un acabado lijado y pulido (120+400+600) que, en ambos casos, presentan niveles de ataque de tipo 3.

En el UNS S31600 no parece ponerse de manifiesto la misma tendencia que en el UNS S30400 y el UNS S30403, lo que puede deberse a que la influencia de la composición del material es tan grande que no permite observar la influencia ejercida por el tratamiento térmico o el acabado superficial lijado-pulido.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores. Tide *et al.* (1999)<sup>[6]</sup>, no obtuvieron diferencias significativas en la densidad de colonización bacteriana por *Listeria monocytogenes*, en zonas de soldadura al compararlas con el material base. Otros grupos<sup>[20, 21, 27 y 28]</sup>, tampoco encontraron diferencias significativas en la densidad bacteriana en las zonas soldadas, tras un corto período de exposición a la acción microbiana de diferentes tipos de soldadura en UNS S30403. Flint *et al.* (1996)<sup>[28]</sup>, tampoco pudieron establecer una correlación entre la presencia o ausencia de soldaduras y el ataque bacteriano de microorganismos termorresistentes del grupo de los *Streptococcus*. Sin embargo, anteriormente, Walsh *et al.* (1993)<sup>[29]</sup>, presentaron evidencias de un ataque y colonización bacteriana más rápidos sobre superficies metálicas afectadas térmicamente. La diversidad de resultados parece estar relacionada con las condiciones del ensayo y con los microorganismos utilizados.

**Tabla III.** Bioensuciamiento (expresado como la suma de bacterias x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> de los tres grados de lijado) en función del tipo de acero inoxidable ensayado y su estado de tratamiento térmico

*Table III. Biofouling (expressed as the sum of bacteria x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> of the three degrees of grinding) in function of the type of stainless steel assay, and the heat treatment state*

Material	Tratamiento térmico	Lijado	Pulido
UNS S30400	Recepción	341,12	425,35
	Sensibilizado	339,64	244,48
UNS S30403	Recepción	292,35	224,12
	Tratamiento térmico	196,66	141,30
UNS S31600	Recepción	86,65	46,98
	Sensibilizado	77,89	34,36

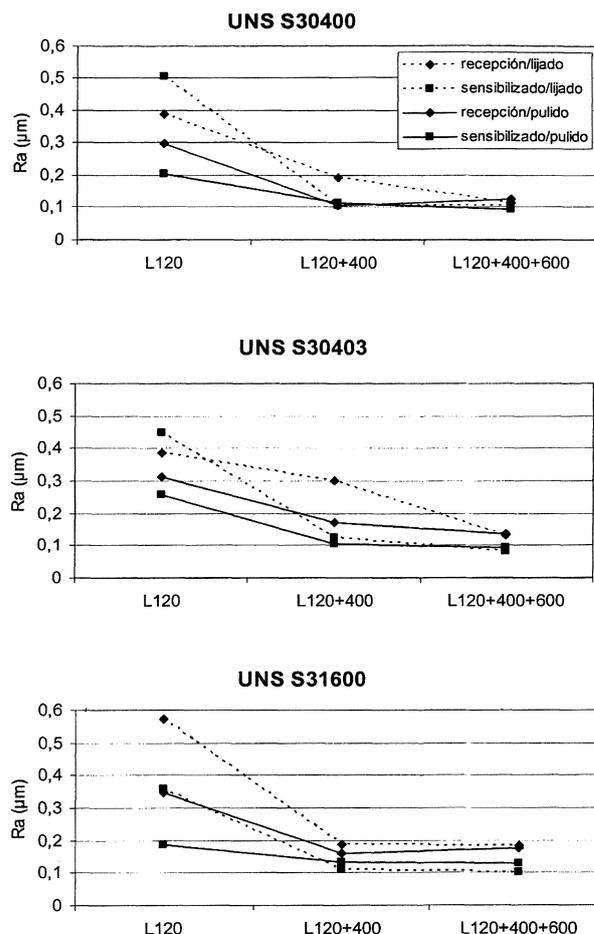
### 3.3. Influencia de la rugosidad

#### 3.3.1. Valores de rugosidad

Los aceros se clasificaron según Roso (1989)<sup>[30]</sup>, en función del grado de ataque y de picadura que presentaban. Se clasificaron en cuatro niveles de ataque y en tres niveles de picadura con respecto a micrografías patrón. Se evaluó, como nivel 1, a un estado de picadura nulo o muy bajo, como nivel 2, a un estado de picadura medio y, como nivel 3, a un estado de picadura alto. Los aceros inoxidables austeníticos utilizados se clasificaron con niveles de picadura 1 y 2. Los niveles de ataque para todos los materiales fueron clasificados como nulo o muy bajo, siendo de nivel 1 en todos los casos, excepto para el acabado pulido del UNS S30400 tratado térmicamente, en los que los niveles de ataque se clasificaron como nivel 3 (Tabla II).

Se observa que los valores de rugosidad en los tres aceros en estado recepción lijado (tratados y no tratados térmicamente), disminuyen a medida que se aumenta el lijado de granulometría, siendo el acabado de 120+400+600 el de menor rugosidad (Fig. 2). En estado de recepción pulido (tratados y no tratados térmicamente), se observa que el valor de Ra, valor promedio de la rugosidad<sup>[31]</sup>, aumenta en el electropulido realizado a un lijado previo a 120+400+600, siendo siempre más baja que la rugosidad del pulido desde 120, pero mayor que el de 120+400.

A la vista de las ligeras anomalías observadas en los valores de Ra con grados de lijado 120+400 y 120+400+600 y sus correspondientes acabados electropulidos, que se reproducían repetitivamente, se decidió realizar un estudio en profundidad de la rugosidad de acuerdo con ISO 4288 de 1996<sup>[32]</sup>. Se utilizaron diferentes  $\lambda_c$  y determinando valores de Ra y RSm, representando este último valor de rugosidad el promedio de las desviaciones cuadráticas con respecto a la altura media<sup>[31]</sup> (Tabla IV). El estudio se realizó sobre dos probetas de acabado lijado a 120+400+600. Se observa que en las determinaciones sobre una misma probeta, con  $\lambda_c = 0,8$  mm, la rugosidad de la parte electropulida de la probeta da una Ra mayor que la rugosidad de la parte lijada. En las determinaciones con  $\lambda_c = 0,25$  y  $\lambda_c = 0,08$  mm, sin embargo, se presentan valores de Ra menores en la zona electropulida de la probeta de lo que cabría esperar. Sin embargo, en ningún caso de los evaluados para valores iguales de  $\lambda_c$ , cumplen con la tabla 3 de ISO 4288<sup>[32]</sup>. Se puede decir que los valores de Ra, por sí solos, no carac-



**Figura 2.** Valores de rugosidad (Ra) de los aceros inoxidables austeníticos en estado de recepción o tratados térmicamente y lijados o pulidos.

Figure 2. Values of roughness (Ra) of the austenitic stainless steels in as-received state or heat treatment and ground or polished.

**Tabla IV.** Valores de Ra y RSm a diferentes valores de  $\lambda_c$

Table IV. Ra and RSm values using different values of  $\lambda_c$

$\lambda_c$	Lijada		Pulida		Lijada Pulida	
	0,8	0,25	0,8	0,25	0,08	0,08
Ra ( $\mu\text{m}$ )	0,066	0,086	0,070	0,054	0,064	0,027
RSm ( $\mu\text{m}$ )	42 (*)	229	20 (*)	113	16 (*)	48

(\*) No cumple con tabla 3 de ISO 4288 (1996).

(\*) It does not fulfil table 3 of ISO 4288 (1996).

terizan la superficie del material y más cuando se comparan los valores de Ra y RSm en los materiales electropulidos desde 120+400+600, ya que la RSm presenta unos valores muy superiores a los de la Ra. Este mismo comportamiento en los valores de rugosidad ha sido documentado por Hilbert *et al.* (2003)<sup>[25]</sup>.

El aumento de rugosidad en el acabado pulido a partir del lijado 120+400+600 puede deberse a que las irregularidades superficiales aumentan, apareciendo picaduras y zonas de ataque en el material. El ataque es patente en los materiales sensibilizados, donde se llega a observar la estructura de borde de grano del material y se forman irregularidades en "step". Por este motivo es por lo que se recogen datos más altos de Ra, con la técnica de medida de rugosidad empleada (Rugosímetro Suntronic 3+), de los que cabría esperar en los acabados pulidos a partir del lijado 120+400+600.

### 3.3.2 Influencia de la rugosidad en el bioensuciamiento

Parece existir cierta tendencia a disminuir el número de microorganismos en función de la rugosidad en los materiales UNS S30400 y UNS S30403 con acabado lijado en estado de recepción, ya que a medida que se aumenta el grado de lijado disminuye la rugosidad (Ra) y también el número de bacterias/cm<sup>2</sup> presentes. Esta tendencia parece seguirse también en los materiales sensibilizados lijados, pero no es tan clara, ya que, en el UNS S30400, aparecen niveles de ataque de tipo 3 que alteran los resultados, aunque esa tendencia parece reafirmarse en el UNS S30403.

Para los acabados electropulidos parece ser que la tendencia es la misma, es decir, disminuye en función del grado de lijado del que se parta, aunque en este caso no coincide que el grado más fino sea el de menos Ra. Se produce (apartado 3.3.1), un ligero aumento de la rugosidad para todos los acabados pulidos desde un lijado 120+400+600, debido a la presencia de irregularidades superficiales que hace que el detector de rugosidad marque valores más altos, pero que no son suficientes para observar una influencia en la colonización bacteriana.

En el caso del UNS S31600, no parece existir ningún tipo de correlación con la Ra, aunque si atendemos al hecho de que existe un menor número de bacterias en los acabados pulidos y que, esto, implica valores más bajos de rugosidad, también podría indicar que para rangos más dispares de rugosidad, la tendencia sería la misma que en los materiales antes citados.

Esto mismo se pone de manifiesto si se compara con otros estudios en los que se evalúan distintos acabados de acero inoxidable con valores de rugosidad bajas, en los que este factor no afecta a la colonización bacteriana<sup>[20]</sup>, lo que explica la difícil co-

relación del valor de la rugosidad con los números de bacterias que encontramos en el material.

La dificultad en la correlación de la rugosidad (Ra) y el número de bacterias presentes en los materiales estudiados en general y, principalmente, en el UNS S31600, se debe a la marcada influencia de composición del material. Este parámetro enmascara la influencia de la rugosidad en la colonización del material, debido a que los rangos de rugosidad no son lo suficientemente grandes como para observar diferencias debidas a este parámetro. En estudios posteriores, se debería tener en cuenta un intervalo de rugosidad más amplio.

### 3.4. Influencia del tipo de acero en el bioensuciamiento

Considerando que los valores de rugosidad (Ra), para los tres aceros en estado de recepción electropulido sin tratamiento de lijado previo, son similares, se pueden comparar los tres materiales y observar su colonización sin que influya el valor de rugosidad en esta. En la figura 3 se observa que el acero que presenta mayor colonización expresada en bacterias/cm<sup>2</sup>, corresponde al acero inoxidable UNS S30400 (211 x 10<sup>5</sup> bacterias/cm<sup>2</sup>), seguido del UNS S30403 (119 x 10<sup>5</sup> bacterias/cm<sup>2</sup>), siendo el UNS S31600 (70 x 10<sup>5</sup> bacterias/cm<sup>2</sup>) el que menor número de bacterias presenta.

Si se tiene en cuenta el número de bacterias vivas y muertas presentes en el material, se observa que el mayor porcentaje de bacterias muertas con respecto al total se presenta en el UNS S31600, con un 27 %, seguido del UNS S30400, con un 12 %, y del UNS S30403, con un 7 %.

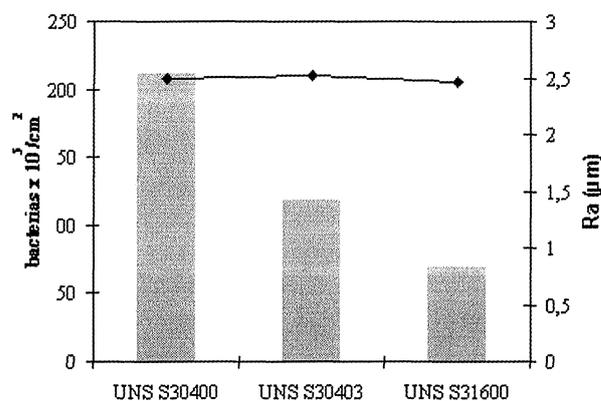


Figura 3. Relación del número de bacterias x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> y la rugosidad (Ra) con los aceros inoxidables en estado de recepción-pulido.

Figure 3. Relation of the number of bacteria x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> and the roughness (Ra) with the stainless steels in as-received and polished state.

También, en el estado de recepción, bien sea para el acabado lijado o lijado+electropulido, y para valores iguales de rugosidad, el acero que presenta una menor colonización bacteriana y, por tanto, menor bioensuciamiento, es el UNS S31600, seguido del UNS S30403, presentando el mayor número de bacterias/cm<sup>2</sup> el UNS S30400. Estos resultados también se observaron por Percival *et al.* (1998)<sup>[19]</sup>, para los mismos aceros inoxidables en un sistema dinámico.

Por tanto, el tipo de acero inoxidable austenítico es la variable que más afecta a la colonización bacteriana de todas las estudiadas.

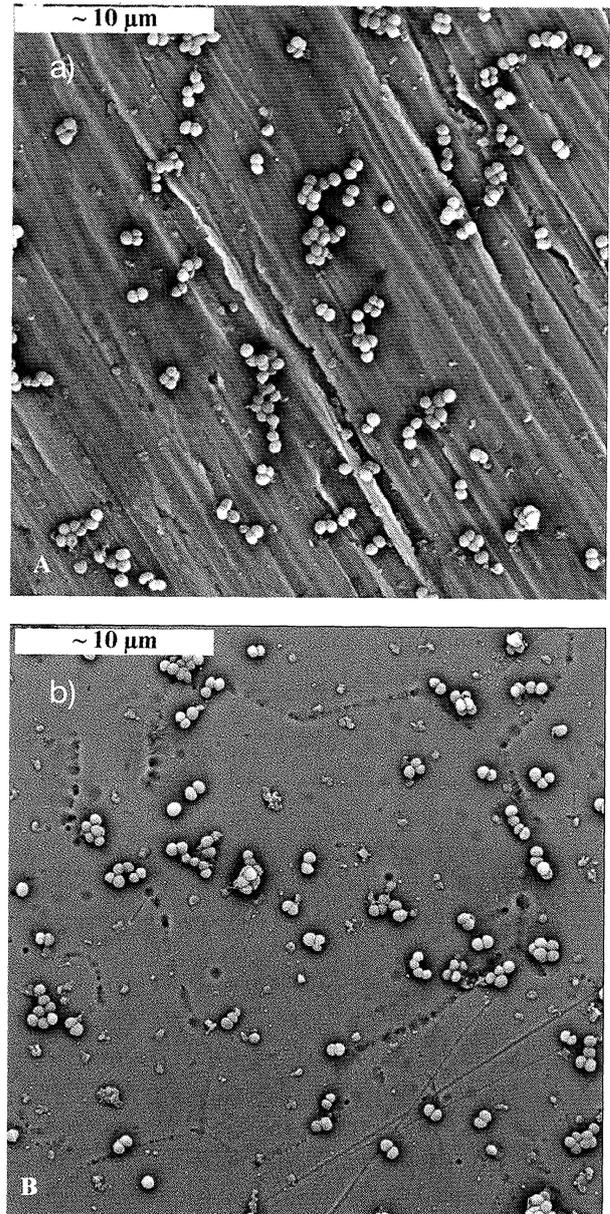
### 3.5. Distribución de los microorganismos

Se observó, por microscopía electrónica de barrido que, los microorganismos, para los distintos aceros inoxidables utilizados y en diferentes tratamientos, siguen un patrón de colonización aleatorio, no pudiendo relacionarse ni con el borde de grano del material ni con la dirección de lijado del mismo (Fig. 4). Este comportamiento pudiera estar relacionado con el mecanismo por el que se inicia la corrosión microbiana, y por ello debería considerarse esta información en estudios de prevención y control.

## 4. CONCLUSIONES

Del presente estudio se puede concluir que el material que presenta menos bioensuciamiento, independientemente de su estado, es el UNS S31600, seguido del UNS S30403 y, por último, del UNS S30400. Para el primero de estos aceros no pudo establecerse una correlación entre los diferentes acabados superficiales, mientras que para el UNS S30400 y el UNS S30403 se pudo establecer una tendencia en la colonización bacteriana de los materiales con la rugosidad del acero en el acabado lijado, disminuyendo la colonización con la disminución de la rugosidad. Para estos dos materiales, también existe cierta tendencia a la disminución de la colonización debido al acabado electropulido, lo que corrobora la tendencia anterior.

Si se tienen en cuenta los materiales utilizados en el estudio y a la vista de los resultados obtenidos de rugosidad en los acabados electropulidos, desde acabados lijados a 120+400+600, se pone de manifiesto, el comportamiento diferente de la RSm con respecto a la Ra, siendo los valores de RSm muy superiores a los de Ra. Estos datos revelan la conveniencia del empleo de otras técnicas más sensibles en la determinación de la rugosidad,



**Figura 4.** Micrografías de SEM (empleando electrones retrodispersados) del bioensuciamiento de aceros inoxidables austeníticos por *S. epidermidis* tras 24 h de incubación, a 37 °C, en medio TSB, 3000x. (A) Acero inoxidable UNS S30403, lijado a 120+400+600. (B) Acero inoxidable UNS S30400, sensibilizado, lijado a 120+400+600 y electropulido.

*Figure 4. SEM micrographs (using backscattered electrons) of the biofouling developed on austenitic stainless steels by S. epidermidis after 24 h of incubation in TSB medium at 37 °C, x3000. (A) Stainless steel UNS S30403, grinding at 120+400+600. (B) Stainless steel UNS S30400, sensitized, ground at 120+400+600 and electropolished.*

si se pretenden realizar estudios de bioensuciamiento de materiales con rugosidades de entre 0,25 y 0,1 de Ra, así como el empleo de otros parámetros de rugosidad además del utilizado, de forma principal, en este estudio.

Se puede decir que en el bioensuciamiento de los aceros inoxidable austeníticos con rugosidades variables entre 0,45 y 0,1 influyen correlativamente las siguientes variables metalúrgicas, la composición química del material, el acabado superficial mecánico de lijado seguido del estado de tratamiento térmico, y de si el material está sensibilizado, y por último el acabado superficial de electropulido.

En las condiciones del ensayo, no existe colonización preferente en el borde de grano del material, por parte de *Staphylococcus epidermidis*, produciéndose el ataque bacteriano, indistintamente, sobre toda la superficie de los aceros inoxidable austeníticos ensayados.

A la vista de los resultados obtenidos se pueden dar una serie de recomendaciones para el control en la formación de biopelículas bacterianas, de manera que, se elijan materiales con superficies con valores bajos de Ra y con pocas irregularidades superficiales, no porosos y resistentes al desgaste.

Antes de poder establecer criterios y guías de elección de materiales en la industria es necesario llevar a cabo más estudios sobre colonización bacteriana, teniendo en cuenta gran cantidad de parámetros, siendo los más importantes el tipo de material a utilizar y su composición, ya que es el parámetro que influirá de forma decisiva en la colonización, seguido de la rugosidad del mismo, que influirá no sólo en los procesos de formación de biopelículas sino, también, en la facilidad de limpieza del material y, por último, se tendría que estudiar el comportamiento de las zonas de soldadura del material.

## Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (CICYT-FEDER, 2FD97-0530-MAT).

## REFERENCIAS

- [1] C.E. ZOBELL y D.Q. ANDERSON, *Biol. Bull. Woods Hole* 71 (1936) 324-342.
- [2] M.I. SARRÓ, D.A. MORENO, E. CHICOTE, P.I. LORENZO, A.M. GARCÍA y F. MONTERO, *Mater. Corros.* 54 (2003) 1-7.
- [3] J.W. COSTERTON y Z. LEWANDOWSKI, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 711-745.
- [4] J.C. LEWTHWAITE, A.F. MOLLAND y K.W. THOMAS, *Trans. R. Inst. Nav. Archit.* 127 (1985) 269-284.
- [5] J.W. COSTERTON y E.S. LASHEN, *Mater. Perform.* 23 (1984) 13-17.
- [6] C. TIDE, S.R. HARKIN, G.G. GEESEY, P.J. BREMER y W. SCHOLZ, *J. Food Eng.* 42 (1999) 85-96.
- [7] O.D. SCHEIN, R.J. GLYNN, J.M. SEDDON y K.R. KENYON, *New. Engl. J. Med.* 321 (1989) 773-778.
- [8] L. PASSERINI, K. LAM, J.W. COSTERTON y E.G. KING, *Crit. Care Med.* 20 (1992) 665-673.
- [9] C. JOHANSEN, P. FALHOLT y L. GRAM, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3724-3728.
- [10] J.R. IBARS, D.A. MORENO y C. RANNINGER, *Int. Biodeterior. Biodegr.* 29 (1992) 343-355.
- [11] D.A. MORENO, J.R. IBARS y C. RANNINGER, *Rev. Metal. Madrid* 36 (2000) 266-278.
- [12] B.H. OLESEN, R. AVCI y Z. LEWANDOWSKI, *Corros. Sci.* 42 (2000) 211-227.
- [13] M. GEISER, R. AVCI y Z. LEWANDOWSKI, *Int. Biodeter. Biodegr.* 49 (2002) 235-243.
- [14] G. HARCHES, J. FEIJEN, y J. DANKERT, *Biomaterialst* 12 (1991) 853-860.
- [15] S.G. GÓMEZ DE SARABIA, P.S. GUIAMET y H.A. VIDELA, *Rev. Metal. Madrid* Vol. Extr. (2003) 49-54.
- [16] H.A. VIDELA, *Rev. Metal. Madrid* Vol. Extr. (2003) 256-264.
- [17] G.G. GEESEY, R.J. GILLIS, R. AVCI, M. HAMILTON, P. SHOPE y G. HARKIN, *Corros. Sci.* 38 (1996) 73-95.
- [18] S.L. PERCIVAL, J.S. KNAPP, R. EDYVEAN y D.S. WALES, *Water Res.* 32 (1997) 243-253.
- [19] S.L. PERCIVAL, J.S. KNAPP, R. EDYVEAN y D.S. WALES, *Water Res.* 32 (1998) 2187-2201.
- [20] L.M. BARNES, M.F. LO, M.R. ADAMS y A.H.L. CHAMBERLAIN, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4543-4548.
- [21] H. CERI, M.E. OLSON, C. STREMIK, R.R. READ, D. MORCK y A. BURET, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1771-1776.
- [22] R. SHUTTLEWORTH, R. BEHEME, A. MCNABB y D. COLBY, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 2537-2541.
- [23] American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM 262 (1991).
- [24] S.H. FLINT, P.J. BREMER y J.D. BROOKS, *Biofouling* 11 (1997) 81-97.
- [25] L.R. HILBERT, D. BAGGE-RAVN, J. KOLD y L. GRAM, *Int. Biodeter. Biodegr.* 52 (2003) 175-185.
- [26] R. JARGELIUS, S. HERTZMAN, E. SYMNIOTIS, P. AALTONEN y H. HÄNNIEN, *Corrosion* 47 (1991) 429-435.
- [27] P.J. BREMER, *Proc. Asian-Pac. Weld. Cong. Auckland, NZ.* W Scholz (Eds.). Abington Publishing, 1996, pp. 743-761.
- [28] H.S. FLINT, W. SCHOLZ, N.J. KELLS y P.G. WILES, *Proc. Asian-Pac Weld. Cong. Auckland, NZ.* W Scholz (Eds.). Abington Publishing, 1996, pp. 723-730.
- [29] D. WALSH, D. POPE, M. DANFORD y T. HUFF, *J. Miner. Met. Mater. Soc.* 45 (1993) 22-30.
- [30] M. ROSO. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica de Madrid, 1989.
- [31] M. HINOJOSA y M.E. REYES, *Ingenierías* 11 (2001) 27-33.
- [32] International Organization for Standardization: ISO 4288:1996.