

Efecto de la biopelícula en la corrosión de aceros inoxidables austeníticos en estaciones depuradoras de aguas residuales^(*)

M. Bethencourt*, J. García de Lomas**, A. Corzo**, D. Villahermosa** y V. Matres***

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la influencia de las biopelículas en los procesos de corrosión de diferentes aleaciones de acero inoxidable, situadas durante 4 años en dos puntos de una estación depuradora de aguas residuales. Se caracterizó el microambiente físico-químico en el interior de las biopelículas mediante microelectrodos de O₂, H₂S y pH, y se cuantificaron las tasas de corrosión a partir del número, diámetro y profundidad de picadura. Los resultados obtenidos muestran un desarrollo más notable de las biopelículas y un número de picaduras significativamente mayor en el canal de salida de desbastes que en el canal de recirculación de fangos. Con base en las características del agua sobrenadante y en las medidas realizadas con microelectrodos, se sugiere que la biopelícula induce la corrosión a través de tres posibles mecanismos: creación de celdas de aireación diferencial, zonas con diferente pH y zonas con elevada producción de sulfuro capaz de reaccionar con iones metálicos.

Palabras clave

Biopelículas; Biocorrosión; Acero inoxidable; Microelectrodos; Sulfuro.

Effect of biofilm in the corrosion of austenitic stainless steels in wastewater treatment plants

Abstract

In this work, the influence of the biofilms in the corrosion process of different alloys of stainless steel was studied in two sampling points in a wastewater treatment plant during 4 years. The physicochemical microenvironment within the biofilms was characterized through O₂, H₂S and pH microelectrodes. Corrosion rates were quantified from the number, diameter and depth of pits. The results show a remarkable development of the biofilm and a significantly greater number of pits in the grit removal channel than in the sludge recirculation channel. Based on the characteristics of the water phase and microelectrode measurements, our results suggest that biofilms induced corrosion throughout 3 mechanisms: creation of differential aeration cells, areas with different pH and areas having high sulphide production which may react with metal ions.

Keywords

Biofilms; Biocorrosion; Stainless steel; Microelectrodes; Sulphide.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) cumplen un papel trascendente en el mantenimiento de los recursos hídricos, el control de la contaminación, la salud pública y los recursos naturales en general. El proceso de depuración de aguas no ha dejado de experimentar avances, especialmente desde la implantación de la Directiva Europea 91/271/CEE sobre el tratamiento de aguas

residuales urbanas, que ha propiciado el incremento del número de EDARs y la mejora de las instalaciones ya existentes. La puesta en marcha y posterior mantenimiento de estas instalaciones industriales es costosa y requiere de un estudio pormenorizado del comportamiento de los materiales a emplear en un medio tan peculiar y agresivo. Entre los agentes causantes del deterioro de los materiales y sistemas de las EDARs cabe destacar el sulfuro de hidrógeno, H₂S. En las aguas residuales, el origen más frecuente

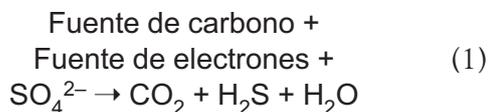
^(*) Trabajo recibido el día 5 de marzo de 2009 y aceptado en su forma final el día 20 de octubre de 2009.

* Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica y Química Inorgánica, Centro Andaluz de Ciencia y Tecnología Marinas, Universidad de Cádiz, Polígono Río San Pedro s/n, Puerto Real-11510, España. manuel.bethencourt@uca.es

** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Polígono Río San Pedro s/n, Puerto Real-11510, España.

*** Acerinox S. A., Palmones, Los Barrios-11379, España.

de este gas volátil es la reducción de sulfato llevada a cabo por bacterias sulfatorreductoras (BSR), capaces de oxidar materia orgánica acoplándola a la reducción de sulfato^[1], (Ec.(1)):



En general, el deterioro de metales debido a actividad microbiana suele conocerse como biocorrosión o corrosión inducida por microorganismos (MIC)^[2 y 3]. Las bacterias causantes de estos procesos se suelen agrupar en biopelículas o comunidades microbianas adheridas a superficies sumergidas^[4]. Una biopelícula puede considerarse como un gel que contiene un 95 % o más de agua, constituido por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en la que se encuentran suspendidas bacterias, otras células y detritus inorgánicos. Estas comunidades concentran una densidad de microorganismos muy elevada^[5], de manera que su actividad puede llegar a determinar en gran medida las características de la fase acuosa en contacto con ellas, especialmente en ambientes acuáticos someros con una elevada relación superficie/volumen (lagunas, marismas, charcas temporales, pero también canalizaciones y tuberías por las que el agua residual circula a baja velocidad), donde la comunidad bentónica explica en gran medida las oscilaciones diarias de algunas variables (p. ej.: oxígeno disuelto, pH)^[6]. Por otro lado, la actividad microbiana en el interior de las biopelículas y la existencia de un transporte de masas limitado (difusión molecular) motiva el establecimiento de gradientes físico-químicos muy acentuados. Esto da lugar a la segregación espacial de microorganismos con distintos metabolitos, conformándose interesantes relaciones interespecíficas y consorcios metabólicos^[7]. Estos consorcios tienen una gran importancia ecológica y económica, participando activamente en numerosos procesos de interés para el ser humano, como la eliminación de contaminantes (biorremediación), la depuración de aguas o la deposición de minerales, pero también en los procesos de deterioro de materiales.

Las biopelículas pueden participar en la corrosión metálica a través de interacciones complejas (a veces sinérgicas) entre la superficie del metal, los productos de corrosión abiótica, las células bacterianas y sus metabolitos^[8]. Entre estos metabolitos, la formación de ácidos inorgánicos volátiles como el sulfuro puede intensificar las tasas de corrosión. En ambientes oxigenados, la presencia de heterogeneidades en el recubrimiento de la biopelícula sobre la superficie metálica da lugar a la formación de celdas de aireación diferencial, que favorecen un ataque localizado de la superficie del metal^[9]. Estas celdas también apare-

cen cuando la actividad microbiana de la biopelícula crea nichos anóxicos en un ambiente oxigenado^[3]. La actividad de las BSR se ha relacionado, desde hace años, con un incremento de las tasas de corrosión de diversos metales, por su papel en la generación de sulfuro^[4, 8, 10 y 11]. Considerando el papel que las BSR tienen en la corrosión metálica, es de gran importancia analizar su actividad en instalaciones depuradoras de aguas residuales.

En este trabajo se estudia el efecto de las biopelículas en la corrosión de distintas aleaciones de acero inoxidable (AISI-304, AISI-304LS, AISI-316, AISI-316L), emplazadas durante 4 años en una estación depuradora de aguas residuales. Este estudio es clave para conocer la resistencia de diferentes aleaciones, de cara a su posible utilización en el futuro, como material en este tipo de instalaciones. Las probetas se ubicaron en dos puntos de la planta susceptibles de presentar elevadas tasas de corrosión: canal de salida de desbastes y canal de recirculación de fangos. En primer lugar, se analizaron las propiedades de la fase acuosa en las dos estaciones donde se colocaron las probetas. En segundo lugar, teniendo en cuenta que la comunidad microbiana adherida a la superficie del metal puede participar de forma activa en la corrosión, se estudió cómo fue el desarrollo de las biopelículas en las probetas instaladas en la planta, determinando sus principales características (espesor, contenido en materia orgánica, composición elemental, etc.). Se incluyó la determinación del microambiente físico-químico en el interior de la biopelícula, en las proximidades de la superficie del metal, mediante el uso de microelectrodos de H₂S, pH y O₂. A la luz de estos datos, se discuten los posibles mecanismos por los que la formación de biopelículas en aguas residuales interviene en la corrosión de aceros inoxidables.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio, puntos de muestreo y probetas de acero inoxidable

Los dispositivos de muestreo para la supervisión de los procesos de biocorrosión y de formación de las biopelículas se pueden usar simultáneamente para evaluar la corrosión tras la eliminación de depósitos biológicos e inorgánico^[8]. Para este trabajo se prepararon probetas de 150x100x2 mm de cuatro aleaciones de acero inoxidable (AISI-304, AISI-304LS, AISI-316 y AISI-316L), que presentaban un acabado superficial 2B (material laminado en frío, recocido decapado y Sink Pass húmedo). Las distintas aleaciones ensayadas presentan algunas diferencias importantes en su

composición, como su contenido en molibdeno, manganeso, cobre, etc. (Tabla I).

Las probetas se instalaron en dos puntos de la EDAR-“Guadalete” de Jerez de la Frontera (Cádiz): 1: el canal de salida de desbastes (CSD) y 2: el canal de recirculación de fangos (CRF) (Fig. 1). Una descripción más detallada de la EDAR-“Guadalete” puede encontrarse en la literatura^[12]. Las probetas se emplazaron en los canales mediante perchas construidas en aluminio con una capacidad de 8 probetas (2 de cada aleación), sostenidas mediante aislantes eléctricos de cerámica para prevenir interferencias galvánicas. En ambos casos, se colocaron paralelamente en el sentido del flujo, para no provocar problemas operativos en la EDAR y reproducir la orientación de las paredes de los canales. En CSD, las perchas se introdujeron en una arqueta sin contacto con la luz solar, mientras que CRF estaba expuesta al exterior. Se tuvieron en cuenta las oscilaciones circadianas del nivel del agua en ambas estaciones para que las probetas quedaran siempre sumergidas.

Se montaron 7 perchas por estación, con dos probetas de cada aleación por percha, sumando un total de 14 probetas de cada aleación por estación. Las probetas se dejaron sumergidas en ambas estaciones durante 4 años, a fin de estimar las tasas de corrosión. Durante los primeros 8 meses, se realizaron 6 muestreos coincidiendo con los días 10, 15, 30, 60, 120 y 240 desde su colocación en la planta, y un muestreo final al cabo de los 4 años. En cada muestreo realizado se retiró una percha completa y las probetas contenidas en ella, cuyas biopelículas adheridas se destinaron bien para el análisis físico-químico y microbiano, bien para la medición con microelectrodos en el laboratorio.

2.2. Variables en la fase acuosa

Para conocer el ambiente físico-químico en contacto directo con las biopelículas, se monitoreó la fase

acuosa en ambas estaciones (caudal, DQO, pH, temperatura, conductividad, etc.), a partir del seguimiento diario que se realiza de forma convencional en la EDAR. Adicionalmente, se midieron con una frecuencia mensual otras variables como nitrato, amonio, cloruro, sulfito, sulfato y carbono orgánico disuelto (COD) en ambas estaciones. Las distintas variables se midieron siguiendo los métodos estandarizados propuestos en la bibliografía^[13-16].

2.3. Variables en la biopelícula

Para las distintas aleaciones y para las dos estaciones seleccionadas, se midieron varias características de la biopelícula. La recogida de las muestras de biopelícula se realizó con un rascador de teflón construido a tal efecto, para evitar rallar la superficie de la probeta^[5]. El crecimiento de la biopelícula se estimó a partir de muestras de biomasa de biopelícula adherida a una superficie conocida de probeta, recogiendo la muestra rápidamente en tubos herméticos para evitar su rápida deshidratación. Una vez en el laboratorio, se tomaron medidas de peso fresco y se deshidrataron las muestras a 60°C hasta peso constante para determinar el contenido en agua por diferencia (Ec. (2)). Una vez tomado el peso seco, las muestras de biopelícula se incineraron en el horno mufla a 550 °C durante 2 h^[17], calculando el contenido en materia orgánica por diferencia respecto al peso seco (Ec. (3)).

$$\text{Agua (\%)} = 100 \times (P_f - P_s) / P_f \quad (2)$$

$$\text{Materia orgánica (\%)} = 100 \times (P_s - P_{mo}) / P_s \quad (3)$$

Tabla I. Composición nominal (%) de las diferentes aleaciones de acero inoxidable ensayadas en la EDAR-“Guadalete”

Table I. Nominal composition (%) of different stainless steel alloys tested in the WWTP-“Guadalete”

	C	Si	Mn	Cr	Ni	Mo	P	S	N	Sn	Cu
304	0,048	0,39	1,76	18,28	8,15	0,33	0,028	0,003	0,0498	0,012	0,24
304LS	0,021	0,31	0,18	18,17	8,12	0,34	0,022	0,001	0,1254	0,007	0,07
316	0,045	0,29	1,19	16,96	10,78	2,33	0,024	0,004	0,0372	0,005	0,30
316L	0,018	0,42	1,74	16,85	10,69	2,64	0,024	0,001	0,0450	0,005	0,29

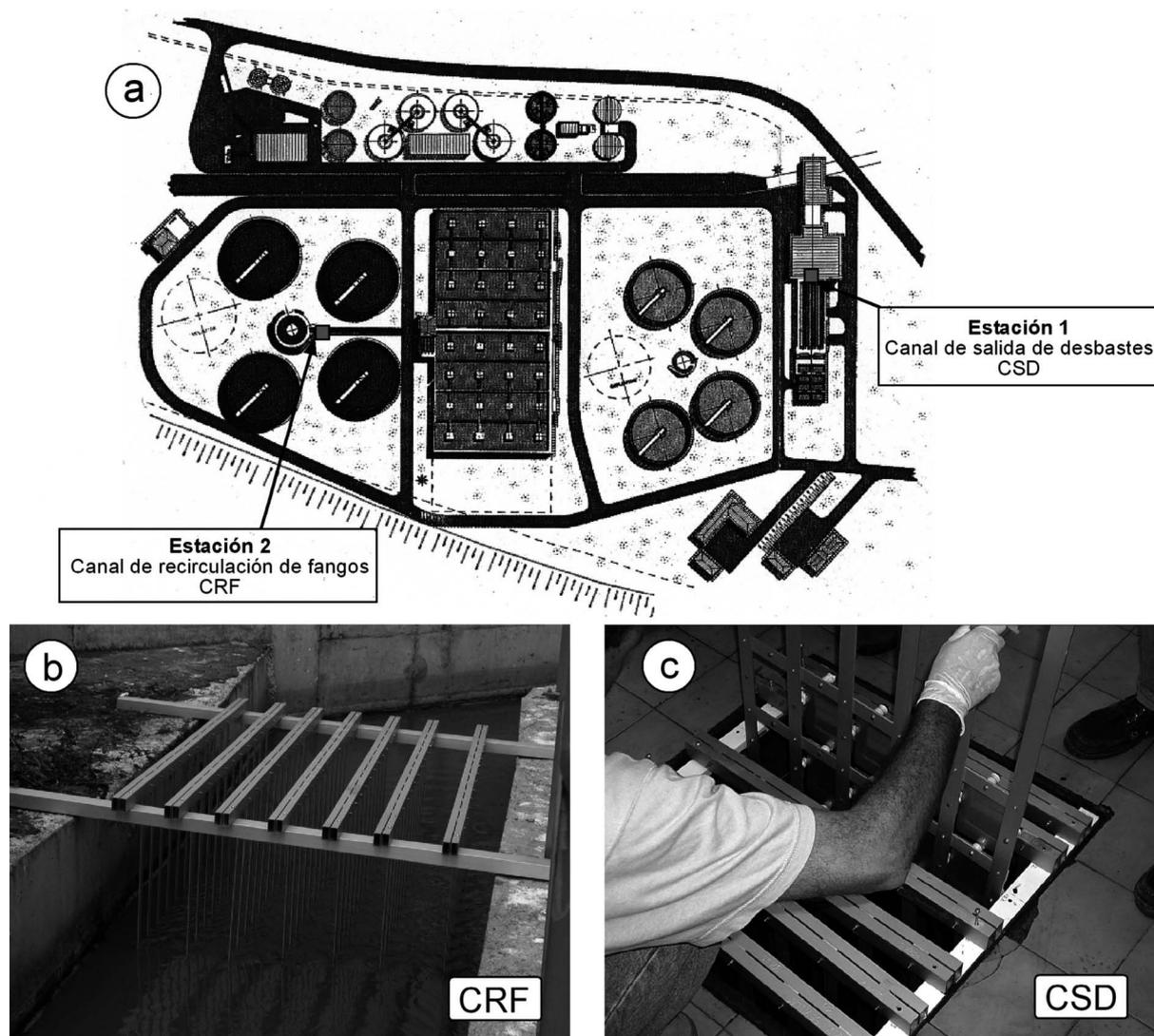


Figura 1. a) Plano de la EDAR-“Guadalete” indicando las estaciones de muestreo en las que se sumergieron las probetas: (1) canal de salida de desbastes; (2) canal de recirculación de fangos. b-c) aspecto de las perchas una vez sumergidas en las dos estaciones seleccionadas.

Figure 1. a) Aerial view of the WWTP-“Guadalete”, indicating the sampling stations used: (1) grit removal channel, (2) sludge recirculation channel. b-c) side of the hanger once submerged in the two selected stations.

donde, P_f es el peso fresco, P_s es el peso seco y P_{lmo} el peso libre de materia orgánica, todos ellos medidos en gramos.

Por otro lado, se determinó el contenido elemental de carbono orgánico e inorgánico (C_{org} y C_{inorg}), nitrógeno (N_{tot}) y azufre (S_{tot}), utilizando un analizador elemental Leco CHNS-932. Para ello, se reservaron pequeñas cantidades de biopelícula seca (a partir de la cual se determinó el contenido total de C, N y S) y de biopelícula calcinada en el horno mufla (a partir de la cual se midió el contenido en C_{inorg}), calculando el contenido en la fase orgánica por diferencia.

El número de células totales se midió mediante microscopía de epifluorescencia^[18-21]. Seis muestras de biopelícula ($\approx 0,5 \text{ gP}_f$) de cada probeta se fijaron, inmediatamente, en formol al 2 % (prefiltrado por $0,2 \mu\text{m}$), y se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta su análisis. Para el recuento, las muestras fueron diluidas, homogeneizadas y teñidas con naranja de acridina a una concentración final de 5 mg l^{-1} . Las muestras teñidas fueron filtradas en filtros Nuclepore[®] ($0,2 \text{ mm}$ de tamaño de poro) y se observaron en el microscopio de epifluorescencia iluminando las muestras con lámpara de Hg de alta presión (Osram[®] HBO 103W/2) y utilizando el filtro I3 (Leica[®]).

2.4. Microgradientes físico-químicos en el interior de la biopelícula: microelectrodos de O₂, pH y H₂S

Para la medición de los microperfiles verticales de O₂, H₂S y pH, las probetas con las biopelículas se transportaron al laboratorio en una atmósfera saturada en vapor de agua para evitar su deshidratación^[22]. Para ello, se utilizaron contenedores herméticos de plástico en cuyo interior se colocaron varias esponjas humedecidas previamente con agua residual tomada *in situ*. Una vez en el laboratorio, las probetas se colocaron en una cámara de flujo construida en metacrilato (volumen = 287,5 ml). Para los experimentos se utilizó agua de la EDAR, recogida en cada una de las estaciones poco antes de las mediciones. El agua residual se bombeó desde un acuario (V = 15 l) termostatzado a 20 °C utilizando una bomba peristáltica, recirculando el agua residual durante las mediciones (Fig. 2).

Se utilizaron microelectrodos de O₂^[23], H₂S y pH^[24], siguiendo las instrucciones del fabricante (Unisense®, Dinamarca). Los microelectrodos se montaron en un micromanipulador manual que se desplazó verticalmente a intervalos de 100 μm, registrándose la señal de los electrodos en registrador de papel continuo Linseis® L6512 (Fig. 2). Los microelectrodos tenían un diámetro de punta de 20-30 μm y se calibraron y utilizaron tal y como se ha descrito en trabajos previos^[25-28]. Para la calibración del electrodo de oxígeno se tomó como 0 de oxígeno agua residual estéril burbujeada con N₂ durante 5 min, mientras que el 100 % de saturación se tomó en agua residual estéril, previamente burbujeada con aire, durante otros 5 min. Las concentraciones de oxígeno

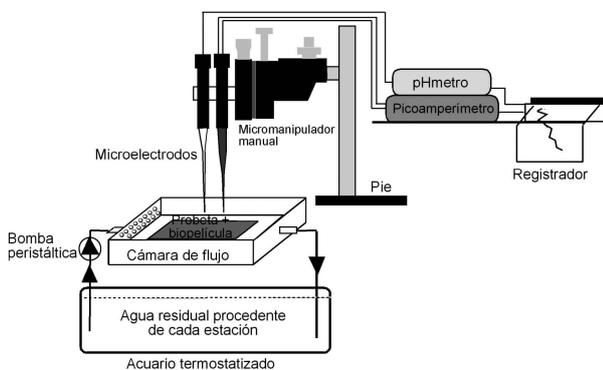


Figura 2. Diagrama del sistema experimental utilizado para la caracterización del microambiente físico-químico de la biopelícula.

Figure 2. Diagram of the experimental setup used for physicochemical characterization of biofilms.

se convirtieron, posteriormente, a μM siguiendo la ecuación de García y Gordon^[29]. El electrodo de pH se calibró utilizando disoluciones tamponadas de pH conocido (4 y 7), mientras que para el electrodo de sulfuro se utilizaron varias disoluciones tamponadas con fosfato y a las que se añadió volúmenes crecientes de una disolución madre de sulfuro obtenida a partir de Na₂S·9H₂O. En este último caso, se utilizaron frascos de cristal de 100 ml para evitar que la difusión del oxígeno (que puede ocurrir en frascos de PVC) oxidara el sulfuro. Todas las calibraciones y medidas se realizaron a la misma temperatura (20 ± 1 °C). Para el cálculo de la concentración de sulfuro total ([S²⁻_{tot}]) se utilizó la ecuación (5), que se deriva de la simplificación de la ecuación (4).

$$[H_2S] = [S_{tot}^{2-}] \cdot (1 + K_1/[H_3O^+] + K_1 \cdot K_2/[H_3O^+]^2) \quad (4)$$

donde, [H₂S] es la concentración de sulfuro medida por el microelectrodo, K₁ es la primera constante de disociación del sistema de equilibrio del sulfuro y [H₃O⁺] la concentración de protones obtenida a partir de los valores de pH medidos en perfiles paralelos al mismo tiempo que los valores de [H₂S]. Para valores de pH < 9, esta ecuación se simplifica a:

$$[H_2S] = [S_{tot}^{2-}] \cdot (1 + K_1/[H_3O^+]) \quad (5)$$

K₁ se calculó, previamente, de acuerdo con Millero *et al.*^[30] (Ec. (6)), considerando una conductividad media de 1,81 mS·cm⁻¹, que correspondió a una salinidad de 0,7 utilizando un ajuste experimental realizado previamente (Ec. (7)), obteniéndose así, pK₁ = 6,9616.

$$pK_1 = -98,08 + 5765,4/T + 15,04555 \times \text{LN}(T) - 0,127 \times S^{0,5} + 0,0135 \times S \quad (6)$$

donde, T es la temperatura (en grados Kelvin), LN es el logaritmo neperiano y S es la salinidad:

$$S = -0,21447 + (0,51708 \times \text{Conductividad (mS} \cdot \text{cm}^{-1})); R = 0,99291 \quad (7)$$

Con base en los perfiles de sulfuro medidos con microelectrodos, se pueden calcular los flujos difusivos de esta sustancia en el interior de la biopelícula, mediante la primera Ley de Fick (Ec. (8)), de acuerdo a Garcia-de-Lomas *et al.*^[31].

$$J = -D_s \times (dC/dz) \quad (8)$$

donde, D_s es el coeficiente de difusión efectiva del H_2S en el interior de la biopelícula ($D_s = 1,39 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Estos flujos permiten estimar la tasa de sulfatorreducción^[32 y 33].

2.5. Corrosión por picadura

Se evaluaron las tasas de corrosión de las diferentes aleaciones, a partir del número de picaduras. Se tomó, igualmente, el peso de la probeta antes y después de la incubación en la EDAR, para evaluar una probable pérdida de peso. También, se realizaron fotografías de la superficie de todas las probetas utilizadas antes y después de la inmersión para identificar mejor la presencia de manchas y picaduras. Para el seguimiento de la corrosión, las probetas fueron extraídas de la EDAR en los tiempos antes indicados (a los 10, 15, 30, 60, 120, 240 días y a los 4 años, desde su colocación en la planta). Las probetas se limpiaron con agua corriente en el laboratorio, utilizando una esponja suave para retirar la biopelícula, evitando así rallar la superficie. Seguidamente se enjuagaron con acetona 100 % utilizando papel secante. La identificación de las picaduras se realizó mediante observación a la lupa a 70 aumentos. Una vez localizadas las picaduras, se realizaron mediciones de su superficie y profundidad mediante observación al microscopio óptico. Se tomaron fotografías en detalle en una lupa Leica® Wild-M10, a partir de fotografías tomadas a distintos aumentos, calibrando las distancias a los distintos aumentos mediante un portaobjetos graduado.

2.6. Análisis estadístico

Se analizó la existencia de diferencias significativas entre las características físico-químicas del medio líquido de CSD y CRF en contacto con las biopelículas. Se aplicó, previamente, el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos, aplicándose entonces el test no paramétrico de U-Mann Whitney. Se empleó un Anova de 2 vías para comparar las distintas características de la biopelícula (contenido en agua, MO, C_{org} , etc.) en función de la aleación y de la localización en la EDAR. Las diferencias en el diámetro y la profundidad de las picaduras (valores medios) en función de la aleación empleada se analizaron mediante el Anova de una vía, realizando el análisis por separado para cada una de las estaciones de muestreo (CSD y CRF). A con-

tinuación, dentro de cada estación, se realizaron comparaciones múltiples entre las aleaciones utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher. Por otro lado, se valoraron conjuntamente los datos de diámetro y profundidad de las picaduras de todas las muestras para analizar las diferencias en el diámetro y profundidad de las picaduras de todas las aleaciones en función de la estación de muestreo, mediante un Anova de un factor. Se utilizó el software Statgraphics Plus® 5.1 para Windows.

3. RESULTADOS

3.1. Características de la fase acuosa en contacto directo con las biopelículas

Se observaron algunas diferencias importantes entre las fases acuosas del canal de salida de desbastes (CSD) y del canal de recirculación de fangos (CRF). El CSD recibe agua residual con un contenido significativamente mayor en materia orgánica ($P < 0.001$, U-Mann Whitney), oxígeno ($P < 0.001$, U-Mann Whitney) y pH ($P = 0.005$, U-Mann Whitney) que el CRF (Tabla II). A pesar de estar expuesto a la luz solar, el CRF presentó una concentración de oxígeno casi inapreciable, debido a la alta concentración de flóculos procedentes del reactor biológico. El resto de variables (conductividad y temperatura) mostraron valores similares en ambas estaciones.

3.2. Desarrollo y características de las biopelículas

Las probetas colocadas en CSD mostraron un crecimiento exponencial de la biopelícula durante los primeros 30 días, alcanzándose la biomasa máxima (60-80 mg biopelícula cm^{-2}) y espesores de 2-4 mm a los 60 días, con un número de células en la biopelícula del orden de $5,0 \cdot 10^5 - 2,6 \cdot 10^6$ células g^{-1} (de biopelícula), que corresponden a densidades de $1,4 \cdot 10^4 - 2,0 \cdot 10^5$ células cm^{-2} . Estos valores permanecieron constantes durante el resto del experimento. Sin embargo, las probetas colocadas en CRF apenas mostraron biopelícula muestreable, y sólo a partir de 240 días se pudo apreciar cierto desarrollo en las probetas de las aleaciones 304, 304LS y 316 (1,4-7,6 mg biopelícula cm^{-2}). Su colonización, tras 4 años en CRF, siempre fue parcial al contrario de lo observado en CSD (Fig. 3).

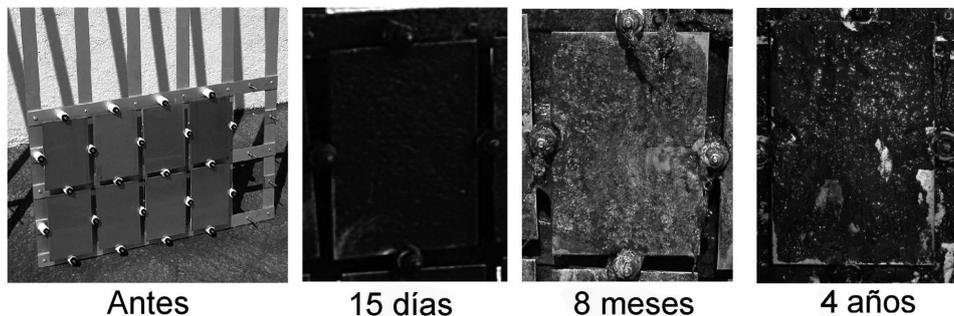
Los resultados obtenidos por los autores de este trabajo no muestran diferencias significativas en la

Tabla II. Características de la fase acuosa en el canal de salida de desbastes (CSD) y en el canal de recirculación de fangos (CRF), a lo largo del período de inmersión de las probetas. Se incluyen los valores máximos y mínimos y la media durante el período de seguimiento. Entre paréntesis se indica el número de datos utilizados para el cálculo de la media

Table II. Characteristics of the aqueous phase in the grit removal channel (CSD) and in the sludge recirculation channel (CRF) along the immersion period. Maximum and minimum values and the average during the monitoring period are shown. Brackets indicate the number of data used for calculating the average

Variable	CSD	CRF
pH	7,2-8,1; 7,6 (270)	7,0-8,01; 7,4 (20)
Conductividad (mS cm ⁻¹)	648-1940; 1621 (270)	750-2380; 1465 (20)
Temperatura (°C)	14,7-25,8; 20 (20)	14,9-25,3; 19,9 (20)
Oxígeno disuelto, OD (% sat)	3-64; 39 (20)	0-30; 5 (20)
COD (mg l ⁻¹)	56-167; 89 (20)	10-171; 44 (20)
DQO (mg O ₂ l ⁻¹)	208-1211; 588 (270)	—
Sulfato (mg l ⁻¹)	146-386; 251 (20)	97-418; 242 (20)
Sulfito (mg l ⁻¹)	<0,2-5,3; 2,6 (20)	<0,2-7,4; 2,3 (20)
Amonio (mg l ⁻¹)	13-133; 56 (20)	9-95; 40 (20)
Nitrato (mg l ⁻¹)	1,5-9; 2,5 (20)	5,1-18; 7,2 (20)
Cloruro (mg l ⁻¹)	64-631; 276 (20)	117-447; 259 (20)

Canal de salida de desbastes



Canal de recirculación de fangos

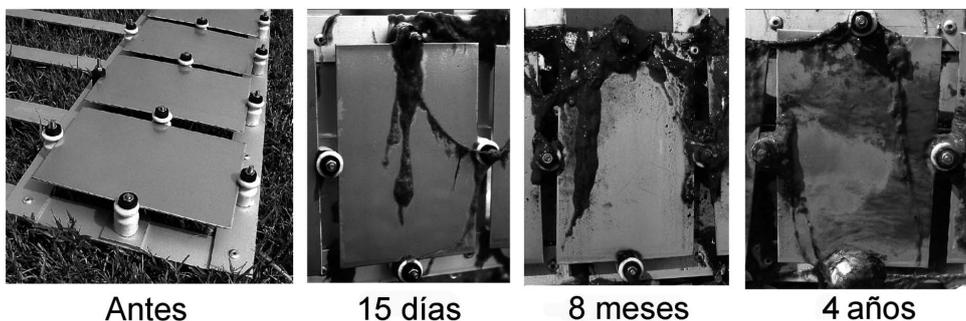


Figura 3. Aspecto de las probetas antes de ser colocadas en la EDAR y después de 15 días, 1 año y 4 años desde su colocación. Arriba) probetas sumergidas en el canal de salida de desbastes (CSD); Abajo) probetas sumergidas en el canal de recirculación de fangos (CRF).

Figure 3. View of stainless steel coupons during the course of experiment. Upper pictures correspond to the grit removal channel (CSD). Below: samples in the sludge recirculation channel (CFR).

colonización, desarrollo y características de la biopelícula entre las distintas aleaciones ensayadas para una misma posición en la EDAR (Tabla III). Sin embargo, existieron diferencias en las características de las biopelículas dependiendo de su posición en la EDAR ($P < 0,05$ Anova). El contenido en agua fue significativamente menor en las biopelículas crecidas en el CSD ($85,3 \pm 0,7$ %) para todas las aleaciones que las crecidas en CRF ($95,9 \pm 1,5$ %). También, fue considerablemente menor el contenido en materia orgánica (MO) en CSD (51,8 %) respecto a CRF (89,2 %). El contenido de carbono orgánico (C_{org}) de la biopelícula fue significativamente mayor en CRF ($37,2 \pm 0,6$ %) que en CSD ($24,7 \pm 2,5$ %). Similarmente, fueron mayores los contenidos en nitrógeno total (N_{tot}) y en azufre total (S_{tot}) en CRF, $11,1 \pm 4,2$ y $1,3 \pm 0,5$ %, respectivamente, que en CSD ($7,7 \pm 6,8$ y $0,8 \pm 0,1$ %, respectivamente). Por el contrario, el contenido en carbono inorgánico (C_{inorg}) fue significativamente mayor en las biopelículas de CSD ($2,6 \pm 0,3$ %) que en CRF ($0,5 \pm 0,2$ %).

3.3. Microgradientes de O_2 , H_2S y pH en las biopelículas

Se extrajeron probetas de las distintas aleaciones a los 60, 120 y 240 días desde su instalación en la

EDAR para caracterizar el microambiente químico existente en la biopelícula mediante microelectrodos. No se encontraron diferencias sistemáticas destacables en la forma de los perfiles verticales de O_2 , pH y H_2S entre las distintas aleaciones ni entre los distintos tiempos (resultados no mostrados), por lo que se muestra como ejemplo los perfiles obtenidos en las probetas de las aleaciones 304 y 304LS, extraídas a los 240 días (Fig. 4). Los microperfiles de O_2 revelaron la existencia de condiciones microaerófilas durante las incubaciones de las biopelículas en el laboratorio, similares a las condiciones existentes *in situ* en el CSD (Tabla II). En la casi totalidad de los perfiles realizados se agotó el O_2 en las primeras 200 μm de biopelícula, quedando el resto de la misma en condiciones completamente anóxicas (Fig. 4).

Los microperfiles de sulfuro total (S_{tot}^{2-} = valores de H_2S corregidos por pH) mostraron una intensa actividad sulfatorreductora en todas las biopelículas adheridas a las diferentes aleaciones, alcanzándose concentraciones de hasta casi 1,4 mM S_{tot}^{2-} en el interior de las biopelículas que tendían a estabilizarse con la profundidad (Fig. 4). La máxima actividad sulfatorreductora mostró tasas netas de sulfatorreducción, en general, menores en el muestreo de 60 días ($0,09$ - $0,53$ mmol $S_{tot}^{2-} m^{-2} h^{-1}$) que en los muestreos posteriores ($0,41$ - $1,62$ mmol $S_{tot}^{2-} m^{-2} h^{-1}$). Las diferencias observadas en la morfología de los microperfiles de sulfuro y en sus concentraciones máximas

Tabla III. Características de las biopelículas formadas durante 4 años en el canal de salida de desbastes (CSD) y en el canal de recirculación de fangos (CRF). Los datos de composición elemental se han obtenido como promedio de $n = 2$ muestras por aleación. No se aportan datos para la aleación 304 en CRF debido a que la biopelícula adherida sobre la probeta no llegaba al mínimo muestreable. Todos los datos vienen expresados en % (agua respecto a peso fresco, MO respecto a peso seco, y C, N y S, respecto al peso total)

Table III. Characteristics of biofilm development after 4 years in the grit removal channel (CSD) and in the sludge recirculation channel (CRF). The elemental composition data were obtained as average of $n = 2$ samples per alloy. No data are provided for the alloy 304 in CRF because the biofilm attached on the test did not reach the minimum sample size. All data are expressed in% (water with respect fresh weight, MO with respect dry, and C, N and S, with respect to the total weight)

Aleación	CSD				CRF			
	304	304LS	316	316L	304	304LS	316	316L
Agua	85,2	85,7	85,9	84,3	—	94,2	96,8	96,8
MO	52,4	46,6	57,1	51,2	—	93,8	85,9	88,0
C_{org}	24,43	22,24	28,28	23,92	—	36,53	37,63	37,59
C_{inorg}	2,25	2,84	2,73	2,71	—	0,47	0,41	0,75
N_{tot}	4,49	3,84	17,88	4,57	—	7,75	9,46	16,13
S_{tot}	0,71	0,84	0,90	0,97	—	0,76	1,58	1,68

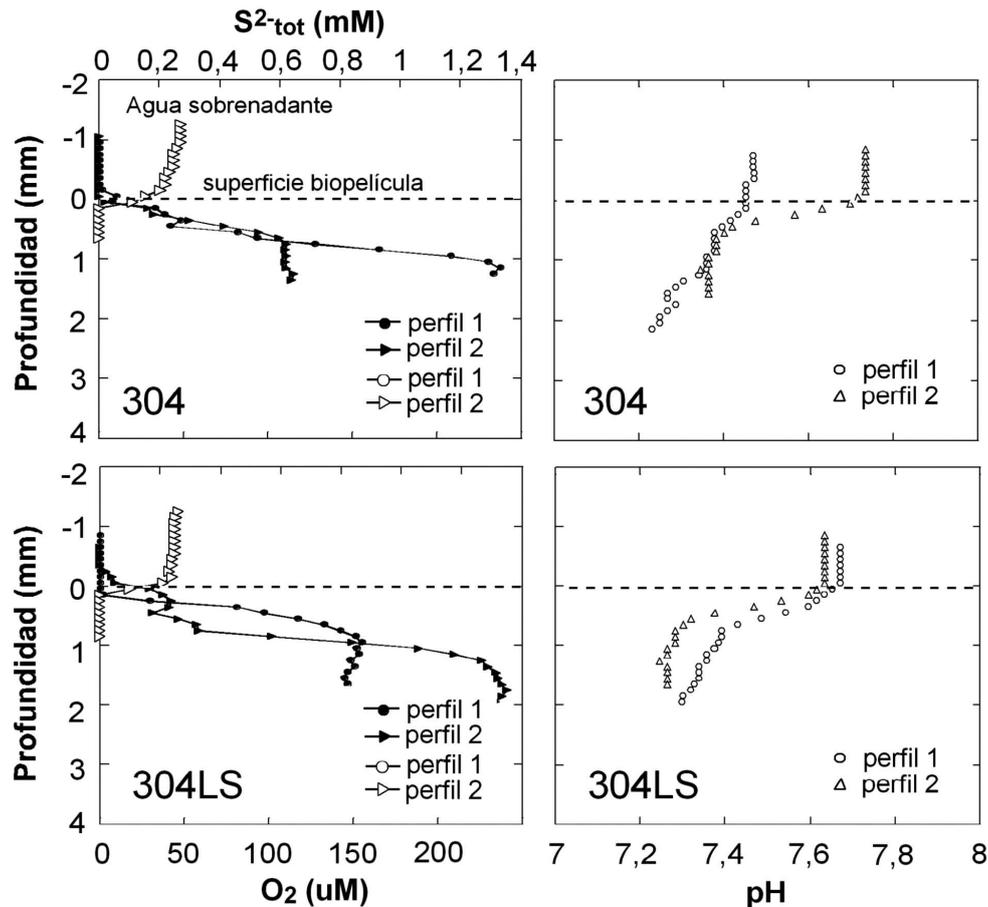


Figura 4. Perfiles representativos de sulfuro (gráficas de la izquierda, símbolos negros), oxígeno disuelto (gráficas de la izquierda, símbolos blancos), y pH (gráficas de la derecha) en las biopelículas desarrolladas sobre las aleaciones 304 y 304LS en el canal de salida de desbastes, tras 240 días de su inmersión. Se realizaron dos réplicas: perfil 1: símbolos redondos y perfil 2: triángulos.

Figure 4. Sulphide profiles (graphs on the left, black symbols), dissolved oxygen (graphs on the left, white symbols) and pH (graphs on the right) in the biofilms grown on 304 and 304LS alloys of stainless steel in the grit removal channel, after 240 days of immersion. Two replicates were made: profile 1: circles and profile: 2 triangles.

indican un nivel elevado de microheterogeneidad en la biopelícula. El pH osciló entre 7,2-7,8, mostrando normalmente un descenso con la profundidad, coincidiendo con valores crecientes de sulfuro en la biopelícula (Fig. 4).

3.4. Tasas de corrosión

El escaso número de picaduras encontradas durante los primeros 8 meses de incubación (máximo de 3 picaduras acumuladas) no permitió una comparación estadísticamente significativa ni entre aleaciones ni entre CSD y CRF (resultados no mostrados). La evaluación de la tendencia a la corrosión, para las diferentes aleaciones en las dos estaciones de muestreo, se cen-

tró, por tanto, en las probetas que estuvieron sumergidas 4 años y a ellas nos referiremos en adelante.

Las probetas colocadas en el CRF presentaron cierta coloración amarillenta distribuida de forma homogénea por la superficie, además de abundantes manchas de color marrón o azuladas acompañadas en algunas ocasiones de depósitos marrones que se desprendían por rascado. Este aspecto no se apreció en las probetas situadas en el CSD que estaban completamente colonizadas (Fig. 3). Las muestras de 304 y 304LS situadas en CRF presentaron un mayor número de manchas que las de 316 y 316L, situadas en el mismo lugar. Esas manchas o iridiscencias, de origen incierto, podrían relacionarse con ataques biológicos por BSR, en medios ricos en S, o bien con cambios en el espesor del óxido, y por lo tanto, con un

comportamiento óptico que va variando a lo largo y ancho de la mancha^[34]. No se observó pérdida de peso, siendo la aparición de picaduras la única forma de corrosión encontrada. En la figura 5 se muestran, a modo de ejemplo, algunas fotografías con las picaduras de mayor diámetro encontradas en las aleaciones 304 y 304LS instaladas en CSD, tras 4 años de inmersión.

Se encontraron diferencias en la resistencia a la corrosión de las aleaciones ensayadas en función de su posición en la planta. Las probetas situadas en CSD presentaron un mayor número de picaduras que las situadas en CRF (Fig. 6 a)). La suma total de picaduras considerando todas las aleaciones y las dos caras de cada probeta fue de 145 picaduras en CSD y de 92 en CRF. Por otro lado, dentro de cada estación de muestreo, se apreciaron diferencias significativas en el número de picaduras entre las diferentes aleaciones utilizadas. En CSD, las aleaciones 304 y 304LS sufrieron una corrosión relativamente más severa, con un promedio de 37 ± 9 y 26 ± 4 picaduras, respectivamente ($n = 2$ probetas), que las aleaciones 316 y 316L (6 ± 1 y 5 ± 1 picaduras, respectivamente, $n = 2$). En CRF, se observó un patrón similar: n° picaduras = 16 ± 9 ($n = 4$), 5 ± 3 ($n = 4$), 2 ± 1 ($n = 2$) y 2 ± 1 ($n = 2$), para las aleaciones 304, 304LS, 316 y 316L, respectivamente (Fig. 6 b)). En función de estos datos se deduce que la tendencia a la corrosión por las diferentes aleaciones sigue la siguiente secuencia: $304 > 304LS > 316 = 316L$, y que la resistencia a la corrosión es, por tanto, inversa al orden indicado anteriormente: $316L = 316 > 304LS > 304$. En la bibliografía^[35] se observó una tendencia similar pero basada en el bioensuciamiento (bacterias/cm²) de tres aceros inoxidables similares a los empleados en nuestro trabajo: UNS S30400 > UNS S30403 > UNS S31600.

En CSD el diámetro máximo de las picaduras mostró valores máximos de hasta 150 μm en la aleación 304 y mínimos de ca. 20 μm en la aleación 316L

(Fig. 6 c)). En esta estación, se encontraron diferencias significativas entre las diferentes aleaciones ($P < 0,0001$, Anova de 1 vía). Las comparaciones múltiples mostraron diferencias significativas entre las aleaciones 304-304LS, 304-316L, 304LS-316L y 316-316L (F-Fisher) y no se observaron diferencias para los valores obtenidos entre 304-316 y 304LS-316. En CRF, también se encontraron diferencias significativas entre las diferentes aleaciones ($P = 0,0066$, Anova de 1 vía), concentrándose estas diferencias entre las aleaciones 304-304LS y 304-316 (F-Fisher) (Fig. 6 d)).

Con respecto a la profundidad máxima de las picaduras, los valores medios oscilaron entre 4 y 15 μm (Fig. 6 e) y f)). En este caso, no se apreciaron diferencias significativas entre las aleaciones en CSD pero sí en CRF ($P = 0,0174$, Anova de 1 vía), presentándose picaduras de menor profundidad relativa en las aleaciones 316 y 316L (Fig. 6 f)).

Considerando todas las picaduras en conjunto, se estudió si su localización en la planta o el tipo de aleación determinaban diferencias significativas bien en el diámetro máximo o en la profundidad máxima de las picaduras encontradas. Los resultados mediante Anova de 2 factores revelaron que la localización en la planta no determinó diferencias ni en el diámetro ni en la profundidad de las picaduras. Sin embargo, en CSD el diámetro de las picaduras varió de forma significativa respecto al tipo de aleación ($P = 0,0062$, Anova de 2 factores).

4. DISCUSIÓN

4.1. Desarrollo y características de las biopelículas en CSD y CRF

La inmersión de probetas de acero inoxidable en la EDAR-“Guadalete” ha permitido observar, en una

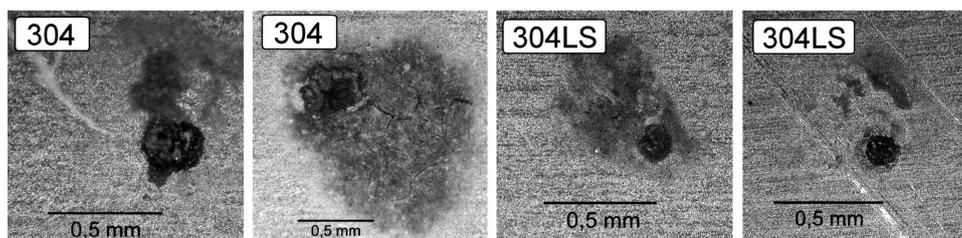


Figura 5. Imágenes a microscopía óptica de las picaduras más grandes observadas en las aleaciones 304 y 304LS, tras 4 años de inmersión en el canal de salida de desbastes (CSD).

Figure 5. Optical microscopy images showing the largest pits observed in alloys 304 and 304LS, after 4 years of immersion in the grit removal channel (CSD).

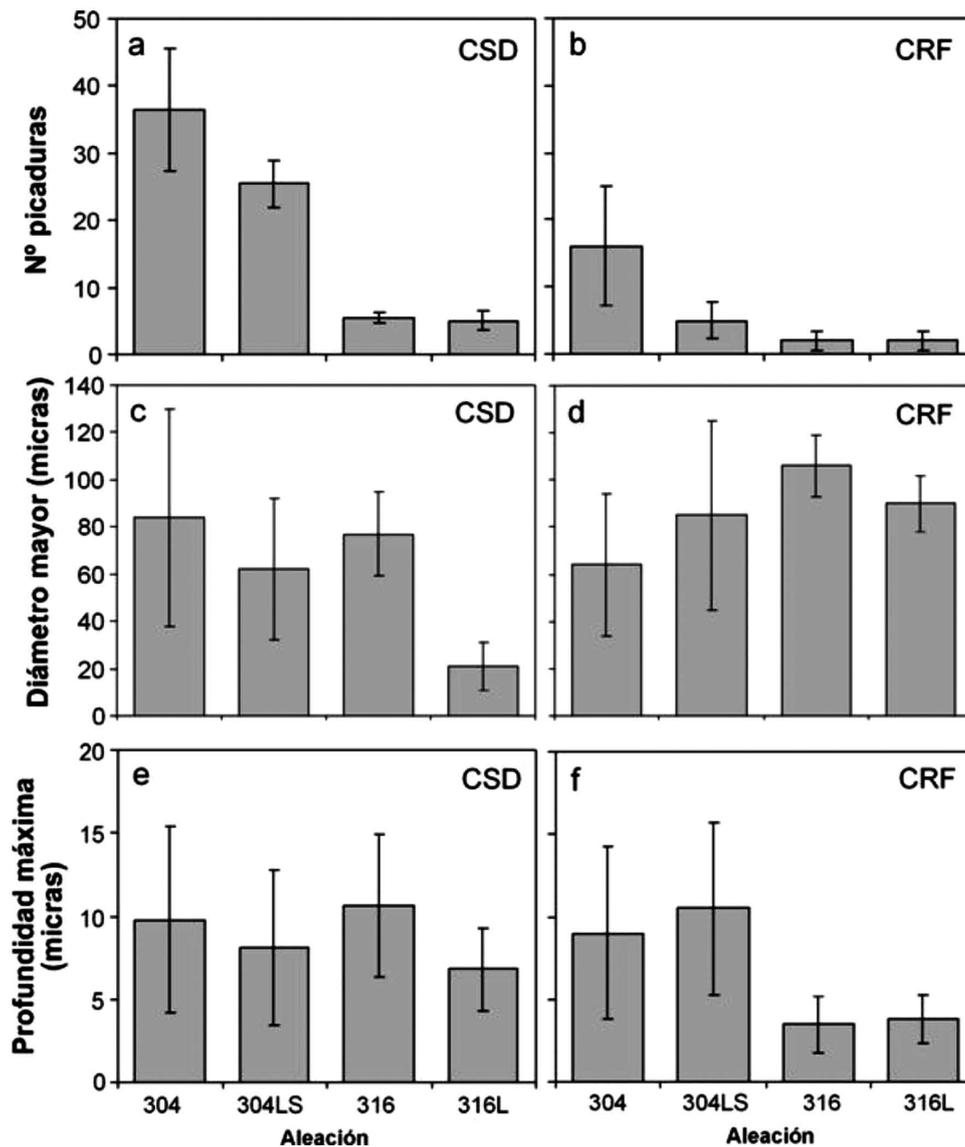


Figura 6. (a-b), diámetro máximo (c-d) y profundidad máxima (e-f) de las picaduras observadas en las probetas de acero inoxidable sumergidas durante 4 años en el canal de salida de desbastes (CSD) y en el canal de recirculación de fangos (CRF). Las barras muestran la media \pm la desviación estándar. El número de datos utilizados por aleación fueron: AISI-304: n = 73; AISI-304LS: n = 51; AISI-316: n = 11; AISI-316L: n = 10.

Figure 6. Number (a-b), maximum diameter (c-d), and maximum depth (e-f) of pits in the stainless steel samples immersed during 4 years in the grit removal channel (CSD) and the sludge recirculation channel (CFR). Each bar correspond to the mean \pm SD. Sample size was: AISI-304: n = 73; AISI-304LS: n = 51, AISI-316: n = 11; AISI-316L: n = 10.

primera aproximación, el grado de colonización y crecimiento de biopelículas sobre superficies metálicas sumergidas en condiciones reales de funcionamiento y durante un largo periodo de tiempo (4 años). Los resultados demuestran que el desarrollo de la biopelícula adherida a aceros inoxidables es significativamente diferente dependiendo de su localización en la planta. Mientras en el canal de salida

de desbastes (CSD) se observó un crecimiento rápido de biopelículas, con desarrollo de espesores de hasta 4-5 mm, en el canal de recirculación de fangos (CRF) apenas se observó un desarrollo, aparente a simple vista, en los controles visuales, hasta pasados 2-3 años. Desafortunadamente, no tenemos constancia de estudios similares con los que comparar nuestros resultados, que hayan sumergido probetas de los

mismos materiales, en puntos comparables de plantas de tratamiento de aguas residuales y a largo plazo. Sin embargo, es bien sabido que el espesor de una biopelícula madura puede variar en gran medida en función de la tasa de aporte de substratos y de las condiciones hidrodinámicas, disminuyendo el espesor a mayores velocidades del agua debido a las fuerzas de cizalla sobre la biopelícula^[36-38]. Aunque la fase acuosa del CSD tiene un contenido mayor en materia orgánica y de O_2 que CRF, ambos medios tenían características químicas muy parecidas (Tabla II). De modo que las diferencias observadas no parecen suficientes, por sí solas, para explicar la rápida colonización y mayor desarrollo de la biopelícula en CSD respecto de CRF (Fig. 3).

La acumulación y persistencia de una biopelícula es el resultado neto de varios procesos físicos (p. ej.: adsorción de materia orgánica, fuerzas de cizalla, adhesión de partículas, abrasión) y biológicos (adhesión y crecimiento microbiano, depredación, etc.) que ocurren simultáneamente^[39 y 40]. El tipo de material y la carga eléctrica de su superficie también tiene una gran influencia en la adherencia de la biopelícula (rugosidad, porosidad, etc.)^[41 y 42]. En este caso, se emplearon las mismas aleaciones en las dos estaciones y no detectamos diferencias significativas entre las aleaciones ni en el crecimiento ni en las características generales de las biopelículas (Tabla III, Fig. 4). Sin embargo, se encontraron diferencias claras entre las biopelículas formadas en CSD y CRF independientemente del tipo de aleación. En general, las biopelículas crecidas en CSD mostraron características típicas de biopelículas más maduras, es decir, con menores contenidos en agua, MO, N y S (Tabla III). Teniendo en cuenta que se observó un menor crecimiento de la biopelícula en las probetas situadas en las perchas en primera línea flujo, es decir, aquellas que interceptaban la corriente, parece probable que el principal elemento responsable de un menor desarrollo de las biopelículas en CRF fue la mayor velocidad de flujo en este punto de la EDAR. Esta mayor velocidad de flujo dificulta probablemente la adhesión de las bacterias libres y de los agregados y aumenta las fuerzas de cizalla y de abrasión sobre la biopelícula dificultando su crecimiento y maduración.

4.2. Papel de la biopelícula en la biocorrosión

La ausencia de pérdida de peso y la presencia de picaduras pone de manifiesto que la corrosión localizada fue la principal forma de corrosión sufrida por las diferentes aleaciones de acero inoxidable ensayadas.

Las diferencias en la tendencia a la corrosión por picadura, registradas entre las dos estaciones de muestreo (CSD y CRF) a lo largo de 4 años, coincidieron con un desarrollo de biopelículas radicalmente mayor en CSD que en CRF, lo que sugiere que las biopelículas podrían tener un papel activo como estimuladores de la corrosión. Hay varios mecanismos que pueden explicar esta afirmación. En primer lugar, la presencia de heterogeneidades en el recubrimiento del metal por biopelículas, pudo favorecer la creación de zonas anódicas y catódicas a lo largo de la superficie del metal, lo que ha sido apuntado como elemento potenciador de la corrosión localizada^[43]. Las zonas anódicas se encontrarían en zonas recubiertas por biopelículas, en cuyo interior las medidas con microelectrodos revelaron un rápido agotamiento del oxígeno. Por su parte, las zonas catódicas serían aquellas zonas más expuestas que, teniendo en cuenta la presencia de oxígeno en el agua sobrenadante (Tabla II), favorecerían la despolarización del cátodo mediante la retirada de los electrones producidos en la zona anódica (Fig. 7). En segundo lugar, existieron ligeras diferencias de pH entre las zonas colonizadas y no colonizadas por biopelícula. En zonas recubiertas por biopelículas, las medidas con microelectrodos de pH revelaron un ligero descenso asociado a las zonas de intensa sulfatorreducción. En zonas en las que el metal está expuesto, el pH sería el del agua sobrenadante y la ausencia de actividad sulfatorreductora evitaría la disminución de pH. Además, es bien conocido que la reducción del oxígeno mediante los electrones procedentes del ánodo da lugar a la generación de iones oxidrilo que tenderían a incrementar el pH y a aumentar las diferencias de esta variable entre las zonas colonizadas y aquellas más

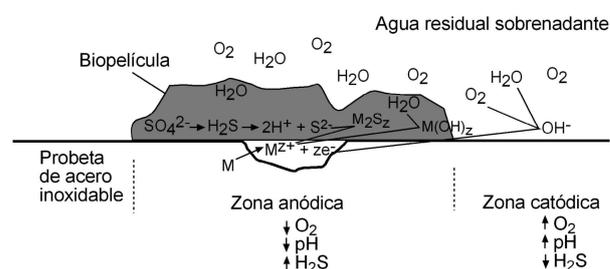


Figura 7. Diagrama de los mecanismos implicados en la corrosión inducida por biopelículas. M: metal; M_2S_z : indica sulfuro metálico insoluble; $M(OH)_z$: hidróxido metálico.

Figure 7. Diagram of the mechanisms involved in biofilm-induced corrosion. M denotes metal; M_2S_z : insoluble metal sulphide; $M(OH)_z$: metal hydroxide.

expuestas: $O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$ [43]. En tercer lugar, la intensa producción de H_2S en el interior de la biopelícula, con tasas de sulfatorreducción de hasta $1,62 \text{ mmol } S_{\text{tot}}^{2-} \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ daría lugar a la presencia de iones sulfuro (hasta casi $1,4 \text{ mM } S_{\text{tot}}^{2-}$) que, fácilmente, podrían reaccionar con iones metálicos potenciando así la reacción anódica. En definitiva, la presencia de un recubrimiento heterogéneo del metal por parte de biopelículas con actividad sulfatorreductora favorece la creación de (i) celdas de aireación diferencial, (ii) zonas con diferentes pH y (iii) zonas con altas concentraciones de sulfuro reactivo (Fig. 4).

En CRF, el menor desarrollo de biopelículas redundaría en menores gradientes de pH a lo largo de la superficie de la probeta, así como menores concentraciones de sulfuro reactivo, mientras que la casi total ausencia de oxígeno en el agua sobrenadante prevendría la formación de celdas de aireación diferencial, pudiendo explicar, en conjunto, las menores tasas de corrosión observadas en esta localización.

Por otro lado, la relación entre las superficies del ánodo y del cátodo puede influir sobre la velocidad de corrosión. Así, una superficie anódica pequeña puede acelerar la intensidad de la corrosión [43]. En este sentido, la corrosión por picadura en CRF debería haber sido más elevada al haber registrado un crecimiento menor de biopelícula, pero la escasa presencia de oxígeno en esta estación limita la formación de celdas de aireación diferencial, indispensables para el desarrollo de la corrosión. Este hecho pone de manifiesto la influencia que ejercen, de manera combinada, el desarrollo de biopelículas sobre las probetas y las características del agua sobrenadante en contacto con los aceros. En cualquier caso, bien por un menor desarrollo de biopelícula acompañado de ausencia de oxígeno en CRF, bien por un desarrollo más uniforme de biopelícula en presencia de oxígeno en CSD, el número de picaduras y su tamaño y profundidad fue en ambos casos moderadamente bajo.

4.3. Resistencia a la corrosión de las diferentes aleaciones de acero inoxidable

Los resultados obtenidos demuestran la mayor resistencia a la corrosión de las aleaciones 316 y 316L frente a la serie 304. Considerando las diferencias en la composición entre las aleaciones (Tabla I), se corrobora el efecto protector del molibdeno frente a la corrosión inducida por biopelículas en aguas residuales urbanas. Este elemento mejora las propiedades de los aceros inoxidables austeníticos en muchos aspectos: me-

jora su respuesta mecánica, reduce la rotura de la pasividad, especialmente en medios ricos en cloruro, e incrementa la resistencia a la corrosión por picadura y por grietas o fisuras en distintos medios [44-50]. Por otro lado, el molibdeno ayuda al cromo presente en el acero inoxidable a formar la capa pasiva [51] y previene la despasivación dentro de las grietas o fisuras [52]. Incluso, se ha demostrado el comportamiento biocida de compuestos de molibdeno sobre bacterias sulfatorreductoras, utilizándose con éxito para prevenir la producción de sulfuro en aguas procedentes de pozos de petróleo [53]. Asimismo, destacó el mejor comportamiento relativo la aleación 304LS frente a la aleación 304, cuya composición con bajo S y alto N relativos ha podido explicar su mayor resistencia frente a la corrosión. La adición de nitrógeno a aceros inoxidables austeníticos modifica el potencial de picadura, aumentando el intervalo pasivo del metal [54].

5. CONCLUSIONES

- Los aceros inoxidables sumergidos en la EDAR-“Guadalete” durante 4 años mostraron un desarrollo de biopelículas dependiente del lugar de incubación. En CSD se produjo una rápida y abundante colonización de biopelículas frente a un menor desarrollo en CRF.
- La mayor velocidad del fluido en CRF parece ejercer una influencia en los procesos de desarrollo y erosión de biopelículas adheridas a aceros inoxidables, limitando su crecimiento.
- La aplicación de microelectrodos permitió demostrar una intensa actividad sulfatorreductora en el interior de la biopelícula. El pH experimentó un ligero descenso, coincidiendo con la zona de máxima tasa de sulfatorreducción dentro de la biopelícula.
- La evaluación de la resistencia frente a la corrosión en probetas de aceros inoxidables, en dos puntos de la EDAR-“Guadalete”, reveló la presencia de picaduras en ambas estaciones, detectándose una mayor tasa de corrosión en CSD que en CRF. Considerando que el desarrollo de las biopelículas fue mayor en las probetas colocadas en CSD que en CRF, se sugiere que la biopelícula podría inducir la corrosión a través de 3 posibles mecanismos: creación de celdas de aireación diferencial, zonas con diferente pH y zonas con elevada producción de sulfuro capaz de reaccionar con iones metálicos.
- En ambos lugares, CSD y CRF, las tendencias a la corrosión de las diferentes aleaciones siguió la misma secuencia: $304 > 304LS > 316 = 316L$, lo que confirma el papel protector del molibdeno.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía por la financiación de los proyectos P06-RNM-01787 (PAI/EXCEL) y FQM-02433, al Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto CTM2009-10736 y a la Unión Europea (Research Fund for Coal and Steel) por el proyecto RFSR-CT-2008-00018. D. Villahermosa es becaria del proyecto de excelencia P06-RNM-01787. PAI/EXCEL.

También agradecen a Aguas de Jerez EMSA y a J.A. Andrades el acceso a la EDAR "Guadalete" y su apoyo técnico durante la realización del estudio.

REFERENCIAS

- [1] R.D. Pomeroy, *The problem of hydrogen sulfide in sewers*, 2nd edition, A.G. Boon (Ed.) Clay Pipe Development Association Ltd, Londres, Inglaterra, 1990, pp. 1-24.
- [2] I.B. Beech, *Int Biodeterior. Biodegradation* 53 (2004) 177-183.
- [3] I.B. Beech Y J. Sunner, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 181-186.
- [4] S.G. Gómez de Saravia, P.S. Guiamet Y H.A. Videla, *Rev. Metal. Madrid* Vol. Extr. (2003) 49-54.
- [5] T. Griebel Y H.C. Flemming, *Biofilms: Investigative methods and applications*, H.C. Flemming, U. Szewzyk y T. Griebel (Eds.), Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania, EE. UU. 2000, pp. 23-40.
- [6] C.M. Garcia, Tesis doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Málaga, 1991.
- [7] T.M. Madigan, J.M. Martinko y J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*. 8th. Edition, Prentice Hall, International Inc. Londres, Inglaterra, 1997, pp. 24-35.
- [8] H.A. Videla, *Rev. Metal. Madrid* Vol. Extr. (2003) 256-264.
- [9] B.L. Little, P.A. Wagner, W.G. Characklis y W. Lee. *Biofilms*, W.C. Characklis y K.C. Marshall (Eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, EE. UU., 1990, pp. 635-670.
- [10] M.F. de Romero, Z. Duque, O.T. de Rincón, O. Pérez e I. Araujo, *Rev. Metal. Madrid* Vol. Extr. (2003) 182-187.
- [11] R.D. Bryant, W. Jansen, J. Boivin, E.J. Laishley y J.W. Costerton, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2.804-2.809.
- [12] J. Garcia-de-Lomas, A. Corzo, J.M. González, J.A. Andrades, E. Iglesias y M.J. Montero, *Biotech. Biotechnol.* 93 (2006) 801-811.
- [13] R. Cord-Ruwish, *J. Microbiol. Methods* 4 (1985) 33-36.
- [14] APHA-AWWA-WPFC, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, EE. UU., 1992.
- [15] J.M. Visser, G.A.H. de Jong, L.A. Robertson y G.J. Kuenen, *Arch. Microbiol.* 167 (1997) 295-301.
- [16] L.H. Larsen, L.R. Damgaard, T. Kjaer, T. Stenstrom, A. Lynggaard-Jensen y N.P. Revsbech, *Water Res.* 34 (2000) 2.463-2.468.
- [17] B. Krungalz y G. Fainshtein, *Anal. Chim. Acta* 218 (1989) 335-340.
- [18] J.C. Fry, *Methods in aquatic bacteriology*, B. Austin (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, EE. UU., 1988, pp. 27-72.
- [19] J.E. Hobbie, R.J. Daley y S. Jasper, *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977) 1.225-1.228.
- [20] M.T. Suzuki y E.B. Sherr, *Limnol. Oceanogr.* 38 (1993) 1.566-1.570.
- [21] J.W.G. Lund, C. Kipling y E.D. Le Cren, *Hydrobiol.* 11 (1958) 143-170.
- [22] G. Schaule, T. Griebel y H.C. Flemming, *Biofilms: investigative methods and applications*, H.C. Flemming, U. Szewzyk y T. Griebel (Eds.), Technomic Publishing Co., Lancaster, Pennsylvania, EE. UU., 2000, pp. 1-21.
- [23] N.P. Revsbech y D.M. Ward, *Microbial mats: stromatolites*, Y. Cohen, R.W. Castenholz y H.O. Havorson (Eds), Alan R. Liss, Nueva York, EE. UU., 1984, pp. 171-188.
- [24] N.P. Revsbech y B.B. Jørgensen *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 9, K.C. Marshall (Ed.), Plenum, Nueva York, EE. UU., 1986, pp. 293-352.
- [25] P. Jerochewski, C. Steuckart y M. Kühl, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4.351-4.357.
- [26] M. Kühl, C. Steuckart, G. Eickert y P. Jerochewski, *Aquat. Microbiol. Ecol.* 15 (1998) 201-209.
- [27] A. Corzo, A. Luzón, M.J. Mayayo, S. Van Bergeijk, P. Mata y J. García de Lomas, *Geomicrob. J.* 22 (2005) 283-298.
- [28] J. García de Lomas, A. Corzo, C.M. García y S. Van Bergeijk, *Aquatic. Microbiol. Ecol.* 38 (2005) 53-69.
- [29] H.E. García y L.I. Gordon, *Limnol. Oceanogr.* 37 (1992) 1.307-1.312.
- [30] F.J. Millero, T. Plese y M. Fernández, *Limnol. Oceanogr.* 33 (1988) 269-274.
- [31] J. García de Lomas, A. Corzo, M.C. Portillo, J.M. Gonzalez, J. M. Andrades, C. Saiz-Jimenez y E. Garcia-Robledo, *Water Res.* 41 (2007) 3.121-3.131.

- [32] M. Kühl y B.B. Jørgensen, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 1.164-1.174.
- [33] T. Ito, S. Okabe, H. Satoh y Y. Watanabe, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1.392-1.402.
- [34] S.C. Dexter, *Waste Package Materials Performance Peer Review. A Compilation of Special Topic Reports*, M.G.F. Wong y J.H. Payer (Eds.), U.S. Department of Energy, EE. UU., 2002, pp. 17.1-17.18.
- [35] M.I. Sarró, Ó. Alemán, D.A. Moreno, M. Roso y C. Ranninger, *Rev. Metal. Madrid* 40 (2004) 21-29.
- [36] T. Hvited-Jacobsen, *Microbial and chemical process engineering of sewer networks*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE. UU., 2002, p. 297.
- [37] B.M. Peyton, *Water Res.* 30 (1996) 29-36.
- [38] S. Wäsche, H. Horn y D.C. Hempel, *Water Res.* 36 (2002) 4.775-4.784.
- [39] C.M. Santegoeds, T.G. Ferdelman, G. Muyzer y D. De Beer, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3.731-3.739.
- [40] E. Morgenroth y P.A. Wilderer, *Water Res.* 34(2) (2000) 417-426.
- [41] C. Capdeville y K.M. Nguyen, *Wat. Sci. Technol.* 22 (1990) 149-170.
- [42] I. Apiláñez, A. Gutiérrez y M. Díaz, *Biores. Technol.* 66 (1998) 225-230.
- [43] B.L. Little, P.A. Wagner, W.G. Charackils y W. Lee. *Biofilms*, W.C. Characklis y K.C. Marshall (Eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, EE. UU., 1990, pp. 635-670.
- [44] K. Sugimoto y Y. Sawada, *Corrosion* 32 (1976) 347-352.
- [45] J.N. Wanklyn, *Corros. Sci.* 21 (1981) 211-225.
- [46] I. Olefjord y B. Brox, *Proc. 5th Int. Symp. Passivity of Metals and Semiconductors*, Bombannes, Francia, 1983 M. Froment (Ed), Elsevier, Amsterdam, Holanda, 1983, p. 561.
- [47] A. Guenbour, J. Faucheu y A.B. Bachir, *Corrosion* 44 (1988) 214-221.
- [48] H.A. El Dahan. *J. Mater. Sci.* 34 (1999) 851-857.
- [49] K.S.K. Danadurai, T.M. Sridhar, S.V. Narasimhan y S. Rajeswari, *J. Solid State Electrochem.* 4 (2000) 159-167.
- [50] F.H. El-Taibl, M.A. Ameer, A.M. El-Aziz y A.M. Fekry, *Mater. Werk* 35 (2004) 407-412.
- [51] I. Betova, M. Bojinov, P. Kinnunen, P. Pohjanne y T. Saario, *Electrochim. Acta* 47 (2002) 3.335-3.349.
- [52] K. Kaneko y H.S. Isaacs, *Corros. Sci.* 44 (2002) 1.825-1.834.
- [53] M. Nemati, T.J. Mazutinec, G.E. Jenneman y G. Voordouw, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2001) 350-355.
- [54] R.F.A. Jargelius-Pettersson, *Corros. Sci.* 41 (1999) 1.639-1.664.