

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 793**

51 Int. Cl.:

C09D 5/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2013 PCT/GB2013/053156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14087139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2013 E 13799652 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2925820**

54 Título: **Revestimiento derivado de sol-gel para inhibir la bioincrustación y la corrosión en un sustrato**

30 Prioridad:

03.12.2012 GB 201221703

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.10.2017

73 Titular/es:

**SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY (50.0%)
City Campus Howard Street Sheffield
South Yorkshire S1 1WB, GB y
KING FAHD UNIV. OF PETROLEUM&MINERALS
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GITTENS, JEANETTE;
WANG, HEMING;
AKID, ROBERT;
SMITH, THOMAS;
SULEIMAN, RAMI, KHALID y
KHALED, MAZAN, MOHAMMED**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 636 793 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Revestimiento derivado de sol-gel para inhibir la bioincrustación y la corrosión en un sustrato

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un sustrato que comprende un revestimiento protector y a un procedimiento de preparación de un sustrato usando un revestimiento derivado de sol-gel que incorpora un microorganismo y un inhibidor de corrosión para inhibir la bioincrustación y la corrosión en el sustrato.

Técnica anterior

10 La corrosión inducida por microbiología (CIM) de materiales metálicos ha recibido considerable atención durante las dos últimas décadas. Se estima que al menos un tercio de la pérdida de material que surge de la corrosión se puede atribuir a CIM. Tanto ambientes oxigenados como privados de oxígeno pueden conducir a la formación de diversos tipos de metabolitos que participan directamente en reacciones electroquímicas que conducen al establecimiento de células de corrosión local. El papel de las bacterias reductoras de sulfato (BRS) en CIM está bien establecido y la corrosión puede resultar de la formación de biopelículas que contienen bacterias. Por ejemplo, se ha informado que la corrosión de hierro y níquel incrementa en presencia de *Pseudomonas* sp. S9 y *Serratia marcescens* sp. EF 190. Por otro lado, se sabe que algunas cepas bacterianas incluyendo *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli* DH5, *Pseudomonas flava* y *Paenibacillus polymyxa* inhiben la corrosión cuando están presentes en biopelículas.

20 Un planteamiento existente para mitigar la corrosión influida por microbio implica añadir biocidas a sistemas de agua en un intento directo de limitar el desarrollo de biopelículas superficiales dentro de las cuales los microbios secretan compuestos ácidos o alcalinos altamente agresivos. La eficacia de este planteamiento es dependiente de (a) el biocida a administrar a todos los sitios de interacción de sustrato metálico y agua y (b) el biocida que continúa activo para prevenir el desarrollo/crecimiento de la biopelícula. Estos biocidas son ambos peligrosos al medioambiente. Por ejemplo, tri-butil estaño es tóxico para la vida acuática, así como a cualquiera que esté en la proximidad inmediata. También se sabe que es relativamente ineficaz frente a bacterias protegidas en una biopelícula sobre la superficie del metal que se corroe.

25 En otro planteamiento, se desarrolló un revestimiento para su uso sobre aleaciones de Al y contenía bacterias "protectoras" encapsuladas [R. Akid, H. Wang, T.J. Smith, D. Greenfield, y J.C. Earthman. *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 203-211]. Sin embargo, las aleaciones de Al son materiales relativamente inertes para la corrosión en comparación con sustratos de acero dulce y otros metales y son menos susceptibles a CIM.

30 Más recientemente, se ha emprendido un trabajo para desarrollar revestimientos de sol-gel para aplicación sobre superficies metálicas para servir como una barrera protectora frente a especies corrosivas [F. Tang, X. Wang, X. Xu, L. Li., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 369 (2010) 101-105]. Se ha enfocado mucho interés sobre los revestimientos de sol-gel orgánicos-inorgánicos híbridos para conseguir mayor espesor crítico, flexibilidad mejorada y temperaturas de curado inferiores que las de sus equivalentes inorgánicos. Los sistemas de sol-gel se han desarrollado para una diversidad de aplicaciones y funcionalidad, por ejemplo, propiedades anticorrosión/barrera [H. Wang, R. Akid, M. Gobara, *Corrosion Science*, 52 (2010) 2.565-2.570, A.N. Khramov, V.N. Balbyshev, N.N. Voevodin & M.S. Donley., *Progress in Organic Coatings*, 47 (2003), 207-213, S.V. Lamaka, M.F. Montemore, A.F. Galio, M.L. Zheludkevich, C. Trindade, L.F. Dick & M.G.S Ferreira., *Electrochemical Acta*, 53 (2008) 4.773-4.783] propiedades de corrosión inducida antiincrustación y antimicrobianas [R. Akid, H. Wang, T.J. Smith, D. Greenfield, J.C. Earthman, *Advanced Functional Materials*, 18 (2008), 203-211, J. Gittens, H. Wang, T.J. Smith, R. Akid, D. Greenfield, ECS *Transactions*, 24 (2010), 211-229], anticorrosión con funcionalidad autoreparación [R. Akid, M. Gobara, H. Wang, *Electrochimica Acta*, 56 (2011), 2.483-2.492] y adhesivos estructurales [M. May, H. Wang & R. Akid, *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 30 (2010), 505-512].

Sin embargo, existe una necesidad de un revestimiento de sol-gel que presente resistencia aumentada a corrosión y bioincrustación en un ambiente real tal como la sumersión de un sustrato metálico dentro del mar.

Compendio de la invención

50 Es un objeto de la presente invención proporcionar un revestimiento y un procedimiento de protección de un sustrato frente a corrosión (en particular corrosión inducida microbiana) y bioincrustación que incluye, en particular, desarrollo de ambientes locales que favorecerían la formación de biopelículas dañinas en la interfaz del sustrato. El presente revestimiento y el procedimiento protegen eficazmente el sustrato subrayado de las especies químicas y microorganismos. El objeto se alcanza, en parte, proporcionando un revestimiento derivado de sol-gel que se une químicamente al sustrato y comprende un inhibidor de corrosión y un microorganismo viable incorporado dentro del revestimiento.

55 Los inhibidores de corrosión y los microorganismos son eficaces para prevenir que las especies reactivas y los microorganismos penetren en el revestimiento por los microporos, grietas y áreas de baja densidad de reticulado. Tales especies corrosivas incluyen, por ejemplo, agua, oxígeno, iones de cloruro y especies bioactivas. La incorporación de inhibidores de corrosión inorgánicos u orgánicos y/o microorganismos viables dentro de la película

de sol-gel se ha encontrado que incrementa significativamente las propiedades de protección frente a corrosión del revestimiento.

La referencia a “viable” dentro de la memoria abarca microorganismos que mantienen alguna actividad metabólica, sin embargo, no necesariamente abarca microorganismos que se pueden cultivar. El trabajo experimental ha mostrado que las mezclas de la presente invención proporcionan protección frente a corrosión/bioincrustación cuando hay relativamente poca evidencia de crecimiento o respiración del microorganismo. Por lo tanto, no hay necesidad absoluta de que el microorganismo esté creciendo.

El término “bioincrustación” usado dentro de la memoria se refiere a la acumulación de microorganismos sobre lo expuesto y/o estructuras que se sumergen en, por ejemplo, ambientes acuosos. El término “bioincrustación” incluye microincrustación, macroincrustación y formación de biopelícula.

La presente formulación de revestimiento se puede aplicar como un revestimiento a un rango de sustratos, tales como estructuras exteriores incluyendo, pero no se limita a, estructuras de ingeniería civil, estructuras marinas, embarcaciones marinas, aviones, vehículos y estructuras similares que están expuestas al clima o ambientes corrosivos. En particular, el presente revestimiento es adecuado para la aplicación sobre sustratos basados en metal además de polímero, plásticos, fibra de vidrio y otros sustratos no basados en metal que encuentren aplicación en los anteriores ambientes.

En un aspecto, se cree que la naturaleza protectora de la presente formulación de revestimiento puede ser dividida a la actividad biológica del microorganismo o debida al revestimiento proporcionando una barrera extra frente a corrosión/bioincrustación debido a la absorción de agua y oxígeno por el agente biológicamente activo que previene que estos elementos alcancen la superficie del sustrato y causen así corrosión/bioincrustación.

Cuando el revestimiento comprende un microorganismo viable, según una aplicación, es ventajoso preparar dos componentes separados según el procedimiento anterior ya que posibilita que los componentes se almacenen por separado durante largos periodos de tiempo antes de la mezcla y posterior aplicación como revestimiento a la superficie del sustrato. Los componentes son estables en sus ambientes dados y así serán igualmente tan eficaces si se usan cuando se prepara primero, o se usan después de almacenar durante un periodo de tiempo. Además, ya que los dos componentes se preparan por separado, es posible optimizar el sol para el espesor, tiempos de curado y densidad, etc. y optimizar la suspensión para proporcionar un ambiente optimizado para la actividad biológica u otra de inhibición de corrosión/bioincrustación del microorganismo. De este modo, cualquier componente del sol que pueda ser perjudicial a la actividad biológica u otra del microorganismo se puede aislar y establecer antes de la mezcla de sol y suspensión antes de revestir el sustrato.

Los componentes del sol se seleccionan para proporcionar condiciones ambientales óptimas para el microorganismo de la suspensión. En particular, el pH es suficientemente neutral para permitir la supervivencia del microorganismo y la temperatura a la cual la mezcla se somete a curado es alrededor de la temperatura ambiente pero no más de 120 °C. Además, la composición del sol-gel preferentemente excluye cualquier componente que pueda ser perjudicial a la actividad biológica u otra inhibidora de corrosión/bioincrustación del microorganismo, por ejemplo, disolventes y óxidos metálicos. Estas condiciones se han seleccionado de manera que el microorganismo mantiene su capacidad para inhibir o prevenir con éxito la corrosión/bioincrustación del sustrato. Los sistemas sol-gel híbridos se obtienen a partir de la incorporación estructural de grupos orgánicos por enlaces Si-C dentro de los precursores de sol-gel (por ejemplo, metiltrietoxisilano [MTES]), conduciendo así a la incorporación de grupos orgánicos dentro de los revestimientos inorgánicos basados en SiO₂. Para evitar los asuntos relacionados con la oxidación de grupos CH₃ [Andrés Pepe, Pablo Galliano, Mario Aparicio, Alicia Durán, Silvia Cere, *Surface & Coatings Technology*, 200 (2006) 3.486–3.491] se usaron temperaturas de sinterización bien por debajo de 550 °C.

Ventajosamente, el presente revestimiento comprende un inhibidor de corrosión que se reduce significativamente la corrosión en el sustrato. El presente revestimiento de sol-gel inorgánico-orgánico es adecuado para incorporar un rango diverso de diferentes inhibidores de corrosión incluyendo a modo de ejemplo, inhibidores orgánicos o inorgánicos.

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un sustrato que tiene un revestimiento unido al sustrato y configurado para proteger el sustrato de la corrosión y la bioincrustación, el revestimiento obtenible por un proceso de sol-gel para crear una red de óxido inorgánico resulta de reacciones de condensación de al menos un óxido inorgánico; comprendiendo el revestimiento: un microorganismo viable incorporado dentro del revestimiento, el microorganismo capaz de reaccionar químicamente con microbios responsables de corrosión inducida microbiana y bioincrustación y configurado para inhibir la actividad biológica de dichos microbios; y un inhibidor de corrosión configurado para inhibir la corrosión y/o la bioincrustación en el sustrato.

Preferentemente, el inhibidor de corrosión comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: un fosfato, un vanadato; un borato; cerio; molibdeno. Preferentemente, el inhibidor de corrosión comprende un compuesto orgánico o inorgánico. Preferentemente, el inhibidor de corrosión comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: una grasa de litio; un aceite de hidrocarburo sintético; un aceite mineral; un compuesto de molibdeno orgánico. Preferentemente, el inhibidor de corrosión comprende uno cualquiera o una

- combinación del siguiente conjunto de: un compuesto basado en silicona; un compuesto basado en sílice-calcio. Preferentemente, el inhibidor de corrosión comprende uno cualquier o una combinación del siguiente conjunto de: un ortofosfato modificado; y polifosfato; un gel de silicona modificado con calcio. Preferentemente, el óxido inorgánico comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: un óxido de metal; un compuesto basado en aluminato; un compuesto basado en sílice; un compuesto orgánico-inorgánico híbrido; un ormosil o híbrido de ormosil. Preferentemente, el óxido inorgánico comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: tetrametoxisilano (TMOS); tetraetoxisilano (TEOS); 3-glicidoxipropilmetoxisilano (GLYMO); metiletrioxisilano (MTEOS).
- Preferentemente, el microorganismo comprende uno cualquiera o una combinación de los siguientes: células procariotas; células de arqueas; células bacterianas; endosporas.
- Preferentemente, el inhibidor de corrosión está incluido en una concentración en el intervalo de 0,5 a 20 % p/v. Preferentemente, el inhibidor de corrosión está incluido en una concentración en el intervalo de 1 a 10 % p/v.
- Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de revestimiento de un sustrato para inhibir la corrosión y la bioincrustación en el sustrato, comprendiendo el procedimiento: preparar un sol que comprende un óxido inorgánico; añadir un microorganismo viable y un inhibidor de corrosión al sol para formar una mezcla; revestir el sustrato con la mezcla; y curado de la mezcla sobre el sustrato para formar un revestimiento secado de sol-gel unido al sustrato.
- Preferentemente, el microorganismo se añade al sol como una suspensión en la que el microorganismo se inmoviliza dentro de la suspensión. Opcionalmente, el microorganismo se liofiliza.
- Preferentemente, el procedimiento comprende el curado de la mezcla a una temperatura menor de 120 °C. Preferentemente, el procedimiento comprende el curado de la mezcla a una temperatura en el intervalo de 10 a 40 °C.
- Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un sustrato que tiene un revestimiento unido a un sustrato y configurado para proteger el sustrato de la corrosión y la bioincrustación, comprendiendo el revestimiento: una primera capa obtenible por un proceso sol-gel para crear una red de óxido inorgánico resultante de las reacciones de condensación de al menos un óxido inorgánico, comprendiendo la primera capa un inhibidor de corrosión; y una segunda capa obtenible por un proceso sol-gel para crear una red de óxido inorgánico resultante de las reacciones de condensación de al menos un óxido inorgánico, comprendiendo la segunda capa un microorganismo viable, el microorganismo capaz de reaccionar químicamente con microbios responsables de la corrosión inducida microbiana o la bioincrustación y configurado para inhibir la actividad biológica de dichos microbios.
- Preferentemente, la primera capa y/o la segunda capa comprenden además γ -alúmina. Preferentemente, la segunda capa comprende además un inhibidor de corrosión. Preferentemente, un espesor de la primera capa y la segunda capa es básicamente igual.
- Según un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de revestimiento de un sustrato para inhibir la corrosión y la bioincrustación en el sustrato, comprendiendo el procedimiento:
- preparar un primer sol que comprende un óxido inorgánico; añadir un inhibidor de corrosión al primer sol para formar una primera mezcla; preparar un segundo sol que comprende un óxido inorgánico; añadir un microorganismo viable al segundo sol para formar una segunda mezcla; revestir el sustrato con la primera mezcla para formar una primera capa; curado de la primera capa en el sustrato para formar un revestimiento derivado de sol-gel unido al sustrato; revestir la primera capa con la segunda mezcla; curado de la segunda mezcla sobre la primera capa para formar una segunda capa derivada de sol-gel unida a la primera capa. Opcionalmente, la primera capa se une químicamente a la segunda capa.
- Preferentemente, el procedimiento comprende el curado de la primera capa de sol-gel a una temperatura en el intervalo de 200 a 600 °C. Preferentemente, el procedimiento comprende el curado de la primera capa de sol-gel a una temperatura en el intervalo de 300 a 500 °C. Preferentemente, el procedimiento comprende el curado de la segunda capa de sol-gel a una temperatura menor de 120 °C. Preferentemente, el procedimiento comprende el curado de la segunda capa de sol-gel a una temperatura en el intervalo de 10 a 40 °C. Preferentemente, el procedimiento comprende añadir γ -alúmina a la primera y/o segunda capa de sol-gel antes del curado de la primera y/o segunda capa de sol-gel.
- Preferentemente dicho microorganismo puede comprender células procariotas tales como células de arqueas o células bacterianas. Por ejemplo, en el momento de la inmovilización dicho microorganismo puede comprender células bacterianas vegetativas, endosporas o células en algún otro estado quiescente. Cuando dicho microorganismo está en la forma de células vegetativas, es preferible que las células vegetativas sean *Pseudomonas fragi*. Las células bacterianas alternativamente pueden ser endosporas tales como aquellas de *Paenibacillus polymyxa*. *Paenibacillus polymyxa* son organismos formadores de endospora que producen al menos un compuesto antimicrobiano que mata bacterias asociadas con MIC.

El microorganismo se selecciona por su capacidad de sobrevivir en condiciones severas, incluyendo pH, temperatura y contenido de disolvente del revestimiento. En una realización preferida de la presente invención, la suspensión se puede añadir al sol en la relación de volumen de 1:10. Preferentemente, dicha mezcla es acuosa. La mezcla puede tener un pH dentro del intervalo de desde 4 a 10, preferentemente la mezcla tiene un pH de 7. Más componentes opcionales del sol y la suspensión pueden incluir un agente de tamponamiento en la suspensión y un agente de curado y/o agente espesante en el sol. Cuando el microorganismo está en la forma de células vegetativas biológicamente activas en el momento de la inmovilización se incorpora un agente de tamponamiento dentro de la mezcla de la presente invención para prevenir el microorganismo de la lisis tras la introducción en una solución acuosa. Tras mezclar el sol y la suspensión, los componentes de la suspensión se difunden dentro del sol creando una solución semi-homogénea. De este modo la mezcla tiene una naturaleza de inhibición de corrosión uniforme por todo el espesor del revestimiento. Los microorganismos pueden reaccionar con los componentes del sol, formando enlaces y causando que tengan lugar reacciones químicas, por ejemplo, reacciones de condensación.

Opcionalmente, el sustrato puede estar basado en metal y puede comprender uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de: hierro; aluminio; titanio; cobre; plata; acero; aleación de aluminio; acero inoxidable; aleación de titanio; aleación de cobre; aleación de magnesio; aleación de plata.

El sustrato al cual se aplica la mezcla de la presente invención como un revestimiento puede estar basado en plástico, polímero o fibra de vidrio. Además, el sustrato puede comprender una combinación de estos materiales incluyendo un sustrato híbrido plásticos-metal o fibra de vidrio-metal.

Para conseguir un revestimiento de sustrato de espesor, resistencia a corrosión y dureza requeridos se pueden mezclar los silanos, alquil-silanos o silanos alquil-modificados de la presente invención con polímeros orgánicos, inorgánicos o híbridos para obtener el sol de ormosil o híbrido de ormosil deseado.

El presente revestimiento puede utilizar cualquier precursor basado en silicato incluyendo específicamente un precursor basado en organosilicato y/o uno en silano incluyendo en particular un organosilano. Además, el componente de polisiloxano puede comprender una forma de polisiloxano incluyendo, en particular, un organopolisiloxano.

El término "revestimiento híbrido" dentro de la memoria se refiere a un revestimiento derivado de sol-gel formado de al menos dos precursores diferentes basados en silicio. Por consiguiente, el revestimiento híbrido de la invención objeto comprende al menos un primer centro de silicio, derivado de un primer precursor unido a carbono y un segundo centro de silicio, derivado de un segundo precursor unido a oxígeno. Es decir, al menos dos centros de silicio diferentes por toda la red por el número de enlaces de carbono y/u oxígeno respectivos en cada centro de silicio.

El presente revestimiento puede comprender un polisiloxano y comprende un revestimiento basado en polisiloxano derivado de sol-gel. El revestimiento de polisiloxano puede ser derivado de uno cualquiera o una combinación de los siguientes precursores adicionales incorporados dentro de la red de revestimiento durante la fase de sol-gel: cualquier silano orgánicamente modificado del grupo que consiste en alquilsilanos; metiltrietoxisilano; metiltrietoxisilano; dimetildietoxisilano; trimetiletetoxisilano; viniltrietoxisilano; viniltrietoxisilano; etiltrietoxisilano; isopropiltrietoxisilano; butiltrietoxisilano; octiltrietoxisilano; dodeciltrietoxisilano; octadeciltrietoxisilano; silanos aril funcionales; feniltrietoxisilano; aminosilanos; aminopropiltrietoxisilano; aminofeniltrietoxisilano; aminopropiltrietoxisilano; silanos acrilato funcionales; silanos metacrilato funcionales; acriloxipropiltrietoxisilano; carboxilato; fosfonato; éster; sulfonato; isocianato; silanos epoxi funcionales; clorosilanos; clorotrimetilsilano; clorotrietilsilano; clorotrihexilsilano; diclorodimetilsilano; triclorometilsilano; N,O-Bis (trimetilsilil)-acetamida (BSA); N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA); hexametildisilazano (HMDS); N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA); N-metil-N-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA); trimetilclorosilano (TMCS); trimetilsilimidazol (TMSI); y combinaciones de los mismos.

El polisiloxano puede comprender uno cualquiera o una combinación de los siguientes grupos: un alquilo; un alquilo sustituido, un halosustituido, un alquenilo, un alquinilo, un alquinilo halosustituido, un fenilo, un fenilo sustituido, un compuesto hidroxílico. En particular, el polisiloxano puede comprender un grupo organofuncionalizado incluyendo, en particular, un grupo hidroxilo, epoxi alcoxi, silanol, amino o isocianato. El polisiloxano puede comprender una única unidad repetida o se puede formar como un polisiloxano de dos, tres, cuatro o cinco componentes que tienen diferentes respectivas unidades repetidas que forman parte de la parte Si-O de la cadena principal. Específicamente, y a modo de ejemplo, el polisiloxano puede comprender uno cualquiera o una combinación de los siguientes compuestos: Poli[dimetilsiloxano-co-[3-(2-(2-hidroxi)etoxi)propil]metilsiloxano]; Poli(dimetilsiloxano), bis(3-aminopropil) terminado; Poli(dimetilsiloxano), diglicidil éter terminado; poliácridatos de injerto de poli(dimetilsiloxano); tetrakis(1,2-butileno glicol) de injerto de poli[dimetilsiloxano-co-metil(3-hidroxi)propil]siloxano]; Poli[dimetilsiloxano-co-(2-(3,4-epoxiciclohexil)etil)metilsiloxano]; Poli[dimetilsiloxano-co-(3-aminopropil)metilsiloxano]; Poli[dimetilsiloxano-co-metil(estearoilalquil)siloxano] y/o Poli[dimetilsiloxano-co-[3-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi]propil]metilsiloxano].

El polisiloxano preferentemente comprende un número mínimo de repetición de diez y puede comprender diez, cien, mil o diez mil unidades repetidas dentro de una cadena principal de polímero sencilla.

5 El término “alquilo” se refiere a un hidrocarburo lineal, ramificado, cíclico o cualquier combinación de los mismos. El término “alquilo sustituido” se refiere a uno o más de los hidrógenos sobre el grupo alquilo que está reemplazado por otro sustituyente, tal como ciano, alquilo, nitro, mercapto, alquiltio, halo, alquilamino, dialquilamino, alcoxi y tri alcoxisililo. El término “fenilo sustituido” se refiere a uno o más de los hidrógenos sobre el anillo aromático que están reemplazados por otro sustituyente, tal como ciano, alquilo, nitro, mercapto, alquiltio, halo, alquilamino, dialquilamino y alcoxi.

10 Opcionalmente, el presente revestimiento se puede derivar de uno cualquiera o una combinación de los siguientes precursores: tetraetoxi ortosilicato (TEOS); metiltrietoxi ortosilicato (MTEOS); feniltrietoxi ortosilicato (PTEOS); octiltrietoxi ortosilicato (OTEOS); dimetildietoxi ortosilicato (DMDEOS); metiltrimetoxi ortosilicato (MTMOS); feniltrimetoxi ortosilicato (PTMOS); tetrametoxi ortosilicato (TMOS).

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describirá una aplicación específica de la presente invención, solamente a modo de ejemplo, y en referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

- 15 La Figura 1 es una imagen de SEM de una sección transversal de acero revestido con sol-gel con SAPP;
- la Figura 2a es un diagrama de Bode de EIS para las muestras de acero dulce revestido después de 1 h de inmersión a temperatura ambiente en NaCl al 3,5 %.
- las Figuras 2b y 2c son espectros de diagrama de Nyquist para las muestras de acero dulce revestido después de 1 h de inmersión a temperatura ambiente en NaCl al 3,5 %;
- 20 la Figura 3a es un espectro de diagrama de Bode de EIS para los materiales revestidos después de 192 h de inmersión en NaCl al 3,5 %;
- las Figuras 3b y 3c son espectros de diagrama de Nyquist para los materiales revestidos después de 192 h de inmersión en NaCl al 3,5 %;
- la Figura 4 es una gráfica de R_p (Ohmios) de los revestimientos de sol-gel dopado con inhibidor durante un tiempo (horas);
- 25 la Figura 5a es un diagrama de Bode de EIS para las muestras de acero dulce revestido después de 1 h de inmersión a temperatura ambiente en NaCl al 3,5 %.
- la Figura 5b es un espectro de diagrama de Nyquist para los materiales revestidos con sol-gel abiótico y biótico después de 1 h de inmersión en NaCl al 3,5 %;
- 30 las Figuras 6a y 6b son espectros de diagrama de Nyquist para los materiales revestidos con sol-gel abiótico y biótico después de 192 h de inmersión en NaCl al 3,5 %;
- la Figura 6c es un espectro de Nyquist para el sistema de revestimiento con Moly biótico después de 192 h de inmersión en NaCl al 3,5 %;
- 35 la Figura 7 son imágenes de CLSM de revestimientos de sol-gel (bióticos) que contienen endosporas sobre acero dulce después de inmersión en NB2 durante 24 y 48 horas; aumento x 64 (objetivo de inmersión en aceite) en las que 7a, 7c, 7e son imágenes multicanal, y 7b, 7d, 7f son imagen del lado izquierdo-solamente filtro de FITC, imagen del lado derecho-solamente filtro de Rodamina;
- la Figura 8 es una fotografía de SEM de una sección transversal de sol-gel con Moly biótico sobre acero dulce;
- la Figura 9 es el ángulo de contacto para todas las muestras antes (Pre) y después (Post) de la inmersión en ensayos de campo en el puerto de Whitby;
- 40 la Figura 10 es un log de la impedancia a 0,01 Hz de doblemente revestido (capa inferior con ZAPP al 5 % + capa superior de sol-gel abiótico/biótico);
- la Figura 11 es un diagrama de Bode de sol-gel con ZAPP de doble capa con capa superior abiótica o biótica con o sin gama-alúmina 24 horas;
- la Figura 12 es una comparación de ZD y ZDGA después de 24 horas de inmersión en NaCl;
- 45 la Figura 13a es un diagrama de impedancia de Bode para revestimientos dobles con ZAPP con capas superiores abióticas y bióticas después de 6 días de inmersión en NaCl;
- la Figura 13b es un diagrama de Nyquist para revestimientos dobles con ZAPP con capas superiores abióticas y bióticas después de 6 días de inmersión en NaCl;

la Figura 14a es un diagrama de Bode para capa superior de sol-gel abiótica y biótica sobre capa inferior de sol-gel con ZAPP después de inmersión en NaCl al 3,5 % p/v durante 19 días;

la Figura 14b es un diagrama de Nyquist para capa superior de sol-gel abiótica y biótica sobre capa inferior de sol-gel con ZAPP después de inmersión en NaCl al 3,5 % p/v durante 19 días;

5 la Figura 15a es un diagrama de Bode para revestimientos dobles con ZAPP con capas superiores abióticas y bióticas que contienen γ -alúmina al 1,5 % p/v después de inmersión en NaCl al 3,5 % p/v durante 23 días;

la Figura 15b es un diagrama de Nyquist para revestimientos dobles con ZAPP con capas superiores abióticas y bióticas que contienen γ -alúmina al 1,5 % p/v después de inmersión en NaCl al 3,5 % p/v durante 23 días;

10 la Figura 16 es una gráfica de los resultados de LPR para muestras de ensayo de campo sumergidas en el puerto de Whitby;

la Figura 17 es la tasa de corrosión calculada usando los resultados de LPR mostrados en la figura 16;

la Figura 18 es la temperatura media (°C), precipitación (mm) y conductividad (mili-siemens [ms]) en Whitby durante los meses en que se llevaron a cabo los ensayos LPR;

15 la Figura 19 son los resultados del ángulo de contacto para acero dulce revestido de capa sencilla y doble sumergido en el puerto de Whitby; y

la Figura 20 son los resultados del ángulo de contacto para el sol-gel de doble capa con Moly biótico que contiene cepas de *Bacillus* KFUPM.

Descripción detallada de las realizaciones descritas en el presente documento

20 En general, se han desarrollado tres sistemas de revestimiento y sus eficacias para mitigar la corrosión y la bioincrustación se valoraron tanto en laboratorio como en ambientes “de la vida real”. Los tres planteamientos se pueden considerar y resumir como:

1. un revestimiento derivado de sol-gel que incorpora un inhibidor de corrosión
2. un revestimiento derivado de sol-gel que incorpora un microorganismo y un inhibidor de corrosión
- 25 3. un revestimiento derivado de sol-gel de doble o múltiple capa en el que una primera capa de sol-gel (inferior) incluye un inhibidor de corrosión y una segunda capa de sol-gel (superior) incluye un microorganismo

Sistema de revestimiento de sol-gel dopado con inhibidor de corrosión

Sustrato

30 Se limpiaron por ultrasonificación láminas de Q-panel de acero dulce S-35 durante 10 minutos en solución de limpieza “kleen ikb 401” industrial y se lavaron a mano con agua corriente y, a continuación, agua destilada y finalmente se secaron al aire completamente antes de la aplicación de los revestimientos.

Preparación de los revestimientos de sol-gel dopados con inhibidor

Solución de sol-gel base

35 La solución de sol-gel se preparó en primer lugar mezclando dos silanos (tetraetoxisilano [TEOS] y metiltrietoxisilano [MTEOS] y etanol en la relación de 10:8:10 en volumen. A continuación, se añadió agua gota a gota (10 ml) y la solución se volvió marrón; a continuación, se añadió gota a gota 100 a 200 μ l de HNO₃ concentrado. La mezcla se agitó durante 2 horas.

Revestimientos de sol-gel cargados con inhibidor

40 A continuación, la solución de sol-gel preparada anteriormente se dopó con inhibidor disolviendo el inhibidor apropiado (a 5 % p/v) en la solución. Los tres inhibidores de corrosión usados eran: sílice modificado Shieldex (303)® (SD), Moly-white® 101-ED (Moly) y Heucophos Zapp® (ZAPP).

Procedimiento de revestimiento

45 Se aplicaron revestimientos de sol-gel cargados con inhibidor sobre paneles de acero dulce usando un aplicador de revestimiento de varilla K101. Se trataron muestras revestidas con sol-gel cargado con inhibidor a 400 °C durante 30 s en un horno eléctrico con una atmósfera de aire. La temperatura de metal máxima alcanzó aproximadamente 200 °C. Se cortó una sección (400 mm x 78 mm) de las cuatro muestras revestidas y el lado inverso y los bordes se revistieron con una mezcla (1:1) calentada de colofonia (Fluka) y cera de abeja (Fluka) para dejar un área de ensayo medido mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1. Áreas de ensayo de muestras usadas para analizar datos de EIS

Muestra	Área (cm ²)
Sol-gel solamente	19,0
Sol-gel con Moly	13,5
Sol-gel con SD	18,2
Sol-gel con ZAPP	17,6

Caracterización del revestimiento

Se analizaron las muestras revestidas usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips XL40 usando un voltaje de haz de 20 kV. Se aplicaron finas películas de carbono sometidas a pulverización catiónica a las muestras para prevenir la carga superficial en el SEM. Los datos de la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se recogieron usando un instrumento PARstat 2273 con un electrodo de referencia de calomelano saturado (KCl saturado, 0,242 V frente a EEH) aplicando un potencial sinusoidal (± 10 mV) durante el intervalo de barrido de frecuencia desde 0,1 MHz a 10,0 mHz que se registra a 75 puntos logarítmicamente espaciados. Se usó el programa informático Zsimpwin para simular los datos obtenidos para determinar el mejor ajuste de diagrama del circuito.

Resultados

Después de la aplicación de los revestimientos, las muestras con revestimientos que contenían los inhibidores parecieron muy similares y no mostraron señales visibles de corrosión u otro daño. La muestra revestida con sol-gel solamente parecía descolorida en un extremo, indicando posiblemente el inicio de la corrosión. El análisis por EIS de esta muestra se condujo usando las partes que parecían impolutas en esta fase.

Después de 8 días de inmersión en NaCl al 3,5 % en peso, la muestra de solamente sol-gel se había corroído ampliamente durante aproximadamente 50 % del área superficial. Por el contrario, la muestra revestida con sol-gel con Moly estaba intacta, aunque había pequeños elementos marrones/naranjas esparcidos sobre la superficie. La muestra revestida con sol-gel con ZAPP parece intacta, sin corrosión visible. La muestra de acero dulce revestida con SD se corroyó más rápidamente durante el periodo de inmersión en comparación con las otras muestras con revestimientos cargados con inhibidor, con corrosión iniciada sobre aproximadamente el 50 % de la superficie y algunos puntos de corrosión avanzada en los que el revestimiento que contenía SD parece haber perdido adhesión.

La Figura 1 muestra una fotografía de SEM de una sección transversal de acero revestido con sol-gel con ZAPP encapsulado no pulido. Se puede observar que el revestimiento está bien unido (químicamente) y está libre de defectos. El espesor del revestimiento es aproximadamente de 16 μ m. El estudio por SEM de las superficies revestidas reveló diferencias en la homogeneidad de las superficies de la muestra después de 8 días de inmersión en NaCl. La muestra de acero dulce revestido con solamente sol-gel parecía que había perdido adhesión con la superficie de sustrato. Por el contrario, el sol-gel con Moly era predominantemente suave. El sol-gel con ZAPP mostrado tenía una superficie rugosa. A mayor aumento, la formación de ampollas y el agrietamiento del revestimiento era evidente. La muestra revestida con sol-gel con SD tenía una superficie rugosa y se observó un punto blanco elevado sobre la superficie. A mayor aumento, el punto blanco parecía ser una ampolla, aunque en esta fase no era visible agrietamiento del revestimiento.

Se usó EIS para examinar la diferencia en resistencia a corrosión entre la muestra control revestida con sol-gel sin la adición de inhibidores (muestra CI) y las muestras revestidas con sol-gel cargado con inhibidor. Generalmente, el módulo de mayor Z del revestimiento a frecuencia menor indica una resistencia de corrosión mayor del sustrato metálico (diagramas de Blode, Figuras 2a y 2a) y la forma del diagrama de Nyquist da un indicio del comportamiento de la impedancia del revestimiento (Figuras 2b y 3b y 3c). Cuando se usa un diagrama de Nyquist para comparar diferentes tipos de revestimiento, un semi-círculo mayor indica que el revestimiento está proporcionando protección frente a corrosión. La comparación de los diagramas de EIS en formatos Bode y Nyquist de todas las muestras después de inmersión a corto (1 h) y largo (192 h) plazo en NaCl al 3,5 % en peso se da en las Figuras 2a, 2b, 2c y 3a, 3b, 3c, respectivamente. Los resultados a 192 h indican que los revestimientos de sol-gel dopados con ZAPP y Moly proporcionan la mejor protección frente a corrosión para el sustrato de acero dulce.

Los espectros de impedancia se ajustaron numéricamente para circuitos equivalentes (CE) usando el programa informático ZSimpWin™ 3.21 [Princeton Applied Research]. Se usó un elemento de fase constante (Q) en lugar de un condensador "ideal", teniendo en cuenta que las pendientes de las curvas en los diagramas de Bode no eran -1 (un valor esperado para un condensador ideal) ya que había una inconsistencia en el ajuste de los datos a través de las escalas de tiempo usadas si se elegía un condensador "ideal" (C) en el circuito equivalente. Estos circuitos equivalentes se propusieron y se establecieron asumiendo lo siguiente: (i) una resistencia de electrolito (R_s); (ii) una capa de sol-gel (R_o); elementos de fase constante (Q_o) y R_o representan la resistencia del poro o defectos en la capa de sol-gel en paralelo con Q_o y (iii) las propiedades de la capa intermedia se describen mediante una resistencia R_i ,

5 en paralelo con un condensador Q_i [H. Wang, R. Akid, *Corrosion Science*, 49 (2007), 4.491-4.503]. Después de 24 h de inmersión, parece que se forma una capa protectora o pasiva (representada por Q_p y R_p), que se deriva presumiblemente de los inhibidores de corrosión dopados que pueden formar un compuesto relativamente estable que previene que el acero continúe corroyéndose [R. Naderi, M.M. Attar, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 5.692-5.696]. Los diferentes parámetros relacionados con la medida de la impedancia, derivados del revestimiento de sol-gel dopado con ZAPP, SD y revestimiento de sol-gel dopado con Moly se dan en las Tablas 2, 3 y 4 respectivamente.

Tabla 2. Datos ajustados obtenidos de los espectros de EIS para el revestimiento de sol-gel dopado con SD después de diversos tiempos de inmersión en solución de NaCl al 3,5 % en peso.

Muestra	Elemento	Tiempo de inmersión (h)			
		1	24	48	192
SD	Circuito	R(QR)(QR)	R(QR)(Q(R(QR)))	R(QR)(C(R(QR)))	R(QR)(Q(R(QR)))
	R_s	$1,64 \times 10^{-11}$	0,1098	$8,265 \times 10^{-5}$	50,61
	Q_o	$3,744 \times 10^{-9}$	$1,504 \times 10^{-6}$	$9,649 \times 10^{-5}$	0,0001409
	R_o	5948	13760	103600	8,051
	Q_i/C_i	$3,238 \times 10^{-7}$	$9,291 \times 10^{-10}$	$9,309 \times 10^{-10}$	0,0001239
	R_i	889100	2385	1170	0,119
	Q_p	-	$3,518 \times 10^{-5}$	$3,678 \times 10^{-5}$	$5,899 \times 10^{-5}$
	R_p	-	159200	8378	12650

10 Tabla 3. Datos ajustados obtenidos de los espectros de EIS para el revestimiento de sol-gel dopado con ZAPP después de diversos tiempos de inmersión en solución de NaCl al 3,5 % en peso.

Muestra	Elemento	Tiempo de inmersión (h)			
		1	24	48	192
ZAPP	Circuito	R(QR)(QR)	R(QR)(Q(R(QR)))		
	R_s	$1,17 \times 10^{-7}$	0,0001404	0,0003896	90,71
	Q_o	$1,852 \times 10^{-9}$	$2,566 \times 10^{-8}$	$1,13 \times 10^{-7}$	0,0001035
	R_o	$3,638 \times 10^4$	4184	5778	514,6
	Q_i/C_i	$1,187 \times 10^{-7}$	$6,544 \times 10^{-6}$	$1,72 \times 10^{-5}$	$9,323 \times 10^{-8}$
	R_i	$1,017 \times 10^6$	$1,513 \times 10^4$	4967	2542
	Q_p		$3,98 \times 10^{-5}$	$4,025 \times 10^{-5}$	$8,909 \times 10^{-5}$
	R_p		$1,416 \times 10^5$	$2,465 \times 10^5$	$5,874 \times 10^4$

Tabla 4. Datos ajustados obtenidos de los espectros de EIS para el revestimiento de sol-gel dopado con Moly después de diversos tiempos de inmersión en solución de NaCl al 3,5 % en peso.

Muestra	Elemento	Tiempo de inmersión (h)			
		1	24	48	192
Moly	Circuito	R(QR)(QR)	R(QR)(Q(R(QR)))		
	R_s	0,0001952	0,01779	$9,99 \times 10^{-5}$	139
	Q_o	$6,127 \times 10^{-7}$	$7,972 \times 10^{-5}$	$1,83 \times 10^{-7}$	$8,316 \times 10^{-5}$
	R_o	$6,721 \times 10^5$	$1,485 \times 10^5$	322,1	$1,285 \times 10^4$

(continuación)

Muestra	Elemento	Tiempo de inmersión (h)			
		1	24	48	192
Moly	Circuito	R(QR)(QR)	R(QR)(Q(R(QR)))		
	Q_i/C_i	$2,051 \times 10^{-7}$	$2,032 \times 10^{-6}$	$1,055 \times 10^{-5}$	$1,189 \times 10^{-5}$
	R_i	$1,432 \times 10^4$	476,2	5670	113
	Q_p		$5,542 \times 10^{-6}$	$9,32 \times 10^{-5}$	0,0006299
	R_p		7232	$1,336 \times 10^5$	$1,59 \times 10^4$

La R_p de los sistemas se puede trazar frente al tiempo y se muestra en la Figura 4, en la que los revestimientos de sol-gel dopados con Moly y ZAPP muestran una mayor resistencia a corrosión “promedio” pero con el revestimiento con ZAPP que muestra protección frente a corrosión sostenida durante más tiempo cuando se compara con las formulaciones de revestimiento con Moly y SD.

La adición de diferentes inhibidores de corrosión a un revestimiento de sol-gel base se ha mostrado que es un planteamiento alternativo para el desarrollo de revestimientos de sol-gel protectores sobre acero dulce. La formulación de sol-gel sola era ineficaz en la protección del sustrato de acero dulce de la corrosión en solución de NaCl al 3,5 % pero proporcionaba una matriz adecuada para los inhibidores de corrosión, SD (Shieldex™), ZAPP (Heucophos ZAPP™) y Moly (Molywhite™) puesto que el beneficio de los inhibidores era evidente en la inspección visual y después de los ensayos de EIS. El sol-gel dopado con ZAPP dio la resistencia a corrosión más eficaz, la cual mejoró con el tiempo en comparación con los sistemas de SD y Moly. La resistencia a corrosión de los revestimientos de sol-gel basados en inhibidor se encontraron que estaba en el orden de ZAPP>Moly>SD.

Revestimiento de sol-gel dopado con inhibidor de corrosión y microorganismo

La solución de sol-gel base y los revestimientos de sol-gel cargados con inhibidor se prepararon como se describió anteriormente para el revestimiento dopado con inhibidor de corrosión.

Diversos inhibidores de corrosión y bacterias “protectoras” se añadieron a sistemas anticorrosión y antiincrustación de sol-gel y se ensayaron sobre superficies de acero dulce en el laboratorio bajo condiciones de solución salina (NaCl al 3,5 %) y en ensayos de campo en un ambiente de estuario. La eficacia de los presentes revestimientos para la protección frente a corrosión se ha evaluado por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y observación visual. Los resultados indican que el sol-gel que contenían inhibidores o una combinación de inhibidor y bacterias mostraron protección frente a corrosión mejorada en comparación con los revestimientos de sol-gel sin estos aditivos, después de inmersión a largo plazo en NaCl al 3,5 %.

Revestimientos de sol-gel cargados con bacterias

Se usó una colonia única de *Paenibacillus polymyxa* ATCC 10401 para inocular una alícuota de 5 ml de caldo NB2 y se incubó (30 °C, agitando a 180 rpm) durante la noche para proporcionar un cultivo iniciador (*starter*), el cual se usó para inocular el biorreactor. Las endosporas se produjeron a partir de un cultivo NB2 aeróbico de 5 litros complementado con solución de sales CCY al 1 % en un biorreactor de 5,3 litros de volumen de trabajo Brunswick Bioflo 115 a una temperatura constante de 30 °C con una velocidad impulsora de 200 rpm con una tasa de aeración de 1,5 l min⁻¹. La esporulación y la lisis de células madre se confirmaron usando microscopía de contraste de fase antes de recolectar el cultivo después de 7 días de fermentación. Las endosporas se recuperaron del cultivo por centrifugación (17.696 xg a 4 °C durante 10 minutos en 6 x frascos de centrifuga de 500 ml) y se lavaron 5 veces con agua desionizada estéril helada mediante resuspensión y centrifugación. El precipitado lavado se resuspendió en agua desionizada estéril y se sometió a sonicación sobre el hielo en alícuotas de 2 ml al 40 % del poder máximo durante 25 s usando un sonicador de sonda Vibra Cell de Jencons Sonics (punta de sonda de 3 mm de diámetro) para separar endosporas agregadas. Cualquier célula vegetativa restante se mató por vórtex con 0,2 ml de cloroformo saturado con agua por ml de suspensión de endospora. La suspensión de endospora se ajustó a una DO600 de 66 con agua destilada estéril antes de almacenamiento a -20 °C.

Se sacó la suspensión de endospora del almacenamiento y se dejó descongelar a temperatura ambiente, a continuación, se mantuvo en hielo para prevenir la germinación. La suspensión de endospora acuosa se centrifugó (16.800 xg/13.200 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente) en una microcentrífuga, se resuspendió en 1 ml de sol-gel y se sometió a sonicación al 40 % del poder máximo sobre hielo bajo las condiciones anteriormente detalladas durante 5 s para separar las endosporas agregadas inmediatamente antes de añadir al sol-gel restante a una relación de 4:1 (sol-gel:suspensión de endospora diluida en sol-gel). El estudio de las esporas después de la

sonicación, usando el microscopio de contraste de fases, confirmó que la sonicación no había alterado las esporas, que continuaban la fase brillante. Los revestimientos abióticos (libres de bacterias) se produjeron reemplazando la suspensión bacteriana con agua desionizada y omitiendo las etapas de sonicación.

Procedimiento de revestimiento

5 Se aplicaron revestimientos de sol-gel cargados con bacterias e inhibidor sobre paneles de acero dulce usando un aplicador de pintura de metal. Los revestimientos se aplicaron bajo una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de los revestimientos y se dejaron curar a temperatura ambiente durante 24 horas. La ruta de procesamiento era: i) sol-gel>inhibidor>revestimiento y; ii) sol-gel>inhibidor>endosporas>revestimiento.

10 También se revistieron muestras de acero dulce con la solución de sol-gel (C1) sola y con solución de sol-gel mezclada con suspensión bacteriana (C2) como muestras control.

Caracterización del revestimiento

15 Se analizaron las muestras revestidas usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) Philips XL40 usando un voltaje de haz de 20 kV. Películas finas de carbón sometidas a pulverización catiónica se aplicaron a las muestras para prevenir la carga de superficie en el SEM. Las medidas del ángulo de contacto se llevaron a cabo en un instrumento DataPhysics usando una gota de agua desionizada. Las medidas de las seis réplicas se llevaron a cabo sobre cada ángulo para dar un valor medio. Los datos de la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se recogieron usando un instrumento PARstat 2273 con un electrodo de referencia de calomelano saturado (KCl saturado, 0,242 V frente a EEH) aplicando un potencial sinusoidal (± 10 mV) durante el intervalo de barrido de frecuencia desde 0,1 MHz a 10,0 MHz que se registra a 75 puntos logarítmicamente espaciados. El programa informático Zsimpwin se usó para simular datos obtenidos para determinar el mejor ajuste de diagrama de circuito.

20 También se caracterizaron muestras revestidas bioactivas por microscopía confocal láser de barrido (CLSM) para confirmar la viabilidad de la endospora y la distribución de las células bacterianas vegetativas dentro del revestimiento. Las micrografías se obtuvieron usando un microscopio confocal láser de barrido Zeiss AxioVision usando un objetivo de inmersión en aceite Plan Apochromat x64. Se usaron filtros de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (488 nm) y rodamina (543 nm) para las imágenes obtenidas después de la tinción con el kit de tinción BacLight™ Live/Dead. Se cortaron pedazos de 1,5 cm² (aproximadamente) de los paneles, se sumergieron en NB2 (30 °C durante 24 y 48 horas) y se tiñeron usando el tinte de viabilidad bacteriana BacLight™ Live/Dead (Invitrogen). Esta mezcla de dos tintes fluorescentes de unión a ADN muestra las células viables en verde puesto que absorben solamente el tinte Syto 9. Las células no viables también se tiñen con yoduro de propidio, el cual se une al ADN para dar fluorescencia roja, pero solamente dentro de las células con membranas dañadas en las que el colorante cargado positivamente puede ganar acceso al interior. Hay una cierta cantidad de fluorescencia de fondo, aparentemente debido a que el sol-gel adsorbía el tinte Syto 9, y los poros del sol-gel (los cuales contienen grupos silanol negativamente cargados) se unen al tinte de yoduro de propidio positivamente cargado.

Resultados

35 Se seleccionaron los inhibidores ZP y Moly para su uso en el desarrollo de revestimientos antiincrustación protectores que contienen bacterias sobre acero dulce puesto que los revestimientos dopados con estos inhibidores mostraron la mejor protección frente a corrosión sobre acero dulce. El planteamiento dependió de una capa sencilla en el que el inhibidor y las bacterias estaban encapsulados en un revestimiento de matriz de sol-gel sencillo (referido como Moly biótico y ZP biótico).

40 Los datos de EIS se recogieron después de 1 h (Figuras 5a y 5b) y 192 h (Figuras 6a, 6b y 6c) de inmersión en solución de NaCl al 3,5 %. Después de 192 h (Figuras 6c), el Moly biótico proporcionó la mejor inhibición de corrosión de acero dulce. La protección frente a corrosión proporcionada por el otro revestimiento (ZP biótico) después de inmersión a largo plazo en solución de NaCl al 3,5 % era básicamente menor que lo debido al revestimiento de Moly biótico, lo cual no se hubiera previsto a partir del comportamiento de los revestimientos que contenían inhibidores sin bacterias, en los que la mayor protección frente a corrosión se daba por el revestimiento que contenía ZP.

50 Se ensayaron pedazos separados de acero dulce revestido con cada uno de los revestimientos de sol-gel que contenía bacterias para la viabilidad de las bacterias encapsuladas mediante incubación en medio nutriente líquido (NB2) a 30 °C durante 24 o 48 horas. Las Figuras 7a a f representan imágenes de CLSM del revestimiento de sol-gel biótico después de la incubación en NB2 durante 24 horas, en las que las líneas paralelas vistas a la izquierda de las imágenes indican crestas en la superficie del acero dulce. Se observaron las formas ovales de varilla verde fluorescente y estas son endosporas de germinación (7a y b). Las formas de varilla verde fluorescente son células viables, un grupo de las cuales están rodeadas por un círculo en las Figuras 7c y d.

55 El ensayo de campo de muestras de bacterias encapsuladas y control se condujeron en agua de mar/ambiente de estuario en el puerto de Whitby en la costa de UK. Se hizo un seguimiento del desarrollo de la bioincrustación durante el ensayo fotografiando las muestras en momentos hasta 10 semanas. Con la excepción de muestras agrietadas, los revestimientos con endosporas encapsuladas proporcionaron propiedades de antiincrustación

relativamente buenas. Después de 2 semanas de inmersión, no había señales de bioincrustación o corrosión sobre ninguna de las muestras. El inicio de la incrustación se vio a partir de la semana 6 en adelante. La incrustación más sería apareció sobre la muestra abiótica (no endosporas o inhibidores).

- 5 Una ligera incrustación comenzó a aparecer sobre la muestra de Moly biótico a la semana 6. A las 8 semanas se llega a despegar un área central del panel revestido con sol-gel abiótico durante la pulverización con agua destilada para eliminar una raja y cualquier material no adherido. Se puede deducir que esto se causó por la incrustación fuerte, en el que la biopelícula gruesa acumulada creó un gran estrés que indujo agrietamiento del revestimiento. Después de 10 semanas de inmersión, las muestras se pueden clasificar en términos de realización de incrustación como sigue: abiótico (C1)>Moly biótico>ZP biótico>biótico (C2). La muestra de sol-gel biótico (C2), que no contenía inhibidores Moly o ZP dio el comportamiento antiincrustación más eficaz mientras que el revestimiento abiótico (C2-sol-gel sin inhibidores o endosporas) era el menos eficaz en prevenir la incrustación.

La Figura 8 muestra una fotografía de SEM típica de una sección transversal de acero dulce revestido con sol-gel biótico. El espesor del revestimiento medio de Moly biótico era de 16 μm (30 puntos medidos, desviación estándar 4,5) y el de ZP biótico era de 15 μm (30 puntos medidos, desviación estándar 2,5).

- 15 Las medidas del ángulo de contacto de los revestimientos se representan en la Figura 9. Antes de la inmersión el ángulo de contacto para todas las muestras era mayor de 90°, indicando que los revestimientos son hidrófobos. Hay pequeña variación en el ángulo de contacto de los revestimientos. Después del ensayo de campo de inmersión, el ángulo de contacto de los revestimientos, con excepción de la muestra abiótica, disminuyó a aproximadamente 60 a 70 grados, indicando una gota en la hidrofobicidad.
- 20 Los resultados de los ensayos de campo que combinaban tanto inhibidores de corrosión como bacterias antiincrustación protectoras dentro del sistema de sol-gel proporcionaron un mejoramiento significativo en el rendimiento antiincrustación en comparación con sol-gel solo (abiótico).

Sistemas de doble capa que contienen inhibidores de corrosión-microorganismo

Formulaciones de sol-gel y revestimiento

- 25 Se preparó la formulación de sol-gel como se describió anteriormente. El revestimiento cargado de inhibidor y las formulaciones de sol gel con carga microbiana también se preparan como se describió anteriormente.

Resultados de la doble capa preliminar

- 30 Se revistió un panel de acero dulce usando sol-gel con ZAPP con capa superior de sol-gel biótica y se sumergió en Whitby durante 10 semanas. Los resultados mostraron que puesto que la incrustación era extensa sobre la superficie del panel sería necesario mejorar la formulación de revestimiento para mejorar el rendimiento antiincrustación.

- 35 Durante el ensayo de campo y después del estudio por nano-SEM y microscopía de foco infinito en SHU, se observó agrietamiento de la capa superior (sol-gel biótico). La formación de algunos tipos de bioincrustación suave, tales como algas, sobre superficies metálicas pueden ser fomentada por la rugosidad de superficie, la cual podría estar causada por una superficie de revestimiento agrietada.

Es posible que la superficie del revestimiento se altere por la germinación de endosporas dentro del revestimiento superior (biótico) aunque no se vio extenso agrietamiento usando el nano-SEM sobre muestras después de la inmersión. Sin embargo, había algún indicio de tamaño de poro incrementado cerca de la superficie de revestimiento. Porosidad incrementada, puede haber fomentado la adhesión de los organismos de incrustación.

- 40 Los organismos de incrustación tales como briozoos de incrustación se posan de manera preferencial sobre superficies fácilmente humectables. El ángulo de contacto del revestimiento doble de sol-gel ZAPP/biótico disminuyó desde 94,9° a 63,2° durante las 10 semanas del ensayo de campo, indicando que el descenso en la hidrofobicidad estaba directamente relacionado con la rugosidad de superficie.

Modificación de la formulación para mejorar revestimientos dobles con ZAPP

- 45 Se preparó un conjunto de muestras de doble capa (abiótica y biótica) con ZAPP usando la misma formulación de sol-gel que se describió anteriormente. Después de 8 días de inmersión en NaCl al 3,5 % p/v el rendimiento de la protección era escaso como se demuestra por el agrietamiento del revestimiento e impedancia baja en 0,01 Hz (indicando una tasa de corrosión considerable).

- 50 Para abordar los problemas de anticorrosión y agrietamiento, se prepararon un conjunto adicional de muestras de la misma manera que anteriormente, pero las capas abióticas y bióticas superiores se aplicaron tan finamente como era posible. Sin embargo, todavía se dio agrietamiento de la capa superior biótica. Es posible que la germinación de las endosporas y el consecuente crecimiento de células de *Paenibacillus polymyxa* dentro de la capa superior biótica causara que se agrietase el revestimiento. Se puede añadir γ -alúmina a la formulación de sol-gel para soportar la estructura de sol-gel y no compromete la viabilidad celular de la endospora encapsulada. γ -alúmina incrementa la

flexibilidad del sol-gel para permitir el crecimiento de las células dentro del revestimiento permitiendo el movimiento en tanto el plato horizontal como fuera del sustrato y no compromete la producción de enzimas y especies bioactivas por células bacterianas encapsuladas.

5 Se llevaron a cabo ensayos de EIS adicionales sobre cupones de acero dulce revestido con una capa de sol-gel inferior que contenía ZAPP al 5 % y capas superiores de sol-gel abióticas o bióticas para investigar el asunto. Para abordar el agrietamiento de la capa de sol-gel superior, se añadió γ -alúmina al 1,5 % p/v (nanopolvo de Al_2O_3 tamaño de partícula de 50 nm) a las capas superiores, los cuales eran o sol-gel abiótico o biótico.

10 Se preparó sol-gel con ZAPP añadiendo polvo de inhibidor de corrosión Heucophos™ ZAPP al 5 % p/v a sol-gel AF1 y se sometió a sonicación durante 10 minutos. Se usó 250 μ l del sol-gel con ZAPP para revestir cupones de acero dulce (panel Q) que medían 10 x 2,5 cm después de limpiar los cupones con etanol. La capa de revestimiento con ZAPP abiótico se curó a 400 °C durante 30 segundos. A continuación, se aplicó 250 μ l de capa superior o bien abiótica o biótica sobre la capa de sol-gel con ZAPP usando un aplicador de pintura bajo la campana laminar para evitar contaminación. Las muestras revestidas finales se dejaron curar a temperatura ambiente durante 24 horas.

15 Se prepararon cupones de acero dulce doblemente revestidos (capa inferior de sol-gel con ZAPP al 5 % p/v con una capa superior de sol-gel o bien abiótica o biótica) por el ensayo de impedancia electroquímica cubriendo unas áreas de acero expuestas con cinta aislante Scotch™ Super 88 dejando solamente el área revestida expuesta al electrolito. La parte inferior del cupón también se revistió con cera de abeja. Se preparó un conjunto idéntico de muestras pero que tenían γ -alúmina al 1,5 % añadido a las capas abióticas superiores y bióticas superiores. Las áreas de ensayo se muestran en la Tabla 5 y Tabla 6.

20 Tabla 5. Áreas de ensayo de muestras de ZAPP doble sin γ -alúmina

Muestra	Área de ensayo (cm ²)
ZAPP abiótico doble 1	7,14
ZAPP abiótico doble 2	6,63
ZAPP biótico doble 1	6,24
ZAPP biótico doble 2	7,28

Tabla 6. Áreas de ensayo de muestras de ZAPP doble con γ -alúmina al 1,5 % p/v

Muestra	Área de ensayo (cm ²)
ZAPP abiótico doble GA 1	7,56
ZAPP abiótico doble GA 2	6,24
ZAPP biótico doble GA 1	6,63
ZAPP biótico doble GA 2	5,94

25 Se sumergieron cupones revestidos en solución de NaCl al 3,5 % (p/v). Los ensayos de EIS se llevaron a cabo en un instrumento PARstat 2273 usando un electrodo de referencia de calomelano saturado (KCl saturado, 0,242 V frente a EEH) aplicando un potencial sinusoidal (10 mV) durante el rango de barrido de frecuencia desde 0,1 MHz a 10,0 MHz que se registra a 75 puntos logarítmicamente espaciados.

30 Los ensayos de EIS se llevaron a cabo durante diferentes periodos de tiempo, sin embargo, es posible ver que la adición de γ -alúmina al 1,5 % p/v a la capa de sol-gel superior sobre la capa de sol-gel con ZAPP inferior incrementa las propiedades de inhibición de corrosión de la capa doble (Figura 10). En el día 7, hay pequeña diferencia en dos revestimientos de sol-gel abióticos (Figura 10, ZDAB y ZDAB GA) sobre acero dulce. Sin embargo, la adición de γ -alúmina al 1,5 % p/v al revestimiento superior biótico parece producir una diferencia significativa, es decir, la impedancia del revestimiento ZDB GA a 0,01 Hz el día 7 es un orden de magnitud superior que el revestimiento ZDB en el que la capa superior de sol-gel abiótica no contiene γ -alúmina al 1,5 % p/v. En comparación con ZDB de 2011 (revestimiento de ZAPP biótico doble), tanto las muestras ZDB como ZDB GA ensayadas en 2012 tenían impedancia mayor (Figura 10).

35 Después de 24 horas de inmersión en NaCl, había poca diferencia en los diagramas de Bode para las muestras doblemente revestidas con ZAPP (capa superior abiótica y biótica) con y sin γ -alúmina realizadas en 2012. El diagrama de Bode para la muestra de ZAPP biótico doble usada para la EIS en 2011 muestra impedancia inferior y es de una forma diferente (Figura 11).

Es posible ver el efecto de la capa doble sobre datos de impedancia puesto que hay un distinto cambio en el ángulo de la pendiente de los diagramas de Bode a 5×10^1 Hz (indicado con flecha en la Figura 11). Los datos muestran que la capa doble con ZAPP con capa superior abiótica da mejor protección frente a corrosión puesto que la impedancia es mayor durante el rango de frecuencia usado.

5 El diagrama de Nyquist para los revestimientos dobles con ZAPP muestra que después de 24 horas de inmersión en NaCl, hay poca diferencia en la forma de los espectros para los revestimientos abióticos y bióticos con γ -alúmina. La variante abiótica tiene mayor impedancia en este momento y esto se puede ver en los datos de Nyquist como un semicírculo capacitivo mayor (indicado por una flecha en la Figura 12). Los datos para los revestimientos abióticos y bióticos con γ -alúmina tiene un punto de datos erráticos único a 48,89 Hz (indicado por X en la Figura 12) y puede ser un rasgo de los revestimientos más que un error. La diferencia más obvia entre los revestimientos con y sin γ -alúmina es la forma del segundo semicírculo. Los revestimientos sin γ -alúmina tienen un segundo semicírculo mayor para variantes tanto abióticas como bióticas. Después de 6 días de inmersión en NaCl, había diferencias en la apariencia de las capas superiores de sol-gel abióticas y bióticas. En comparación con el revestimiento doble con ZAPP abiótico, el biótico tiene una apariencia moteada y había señales de corrosión alrededor de la esquina superior derecha, cerca de la cinta.

La Figura 13a muestra la impedancia de Bode y la Figura 13b el diagrama de Nyquist para las muestras doblemente revestidas con ZAPP con capa superior tanto abiótica como biótica (no γ -alúmina) después de 6 días de inmersión en NaCl al 3,5 %. Los datos están de acuerdo con el deterioro observable de la superficie del revestimiento, es decir, el valor de impedancia es inferior para la muestra de ZAPP doble con capa superior biótica y el radio del(de los) semicírculos de Nyquist es más corto.

Las medidas finales de EIS sobre el sistema de capa doble con ZAPP sin la adición de gama-alúmina se llevaron a cabo el día 19. Ya había distintas diferencias en los diagramas de Bode y Nyquist para los revestimientos con capas superiores abióticas en comparación con bióticas (Figuras 14a y 14b). La influencia del revestimiento superior parece estar indicado por los datos recogidos desde 1×10^5 a 1×10^4 Hz, en los que la resistencia del revestimiento biótico es mayor en un orden de magnitud. Sin embargo, la presencia de grietas en la capa superior biótica da como resultado la difusión, que se muestra por la línea recta que se extiende en un ángulo desde el semicírculo para los datos bióticos (indicado por una flecha en las Figuras 14a y 14b). Aunque a frecuencias mayores de 1×10^5 a 1×10^4 se aumenta la resistencia ofrecida por el revestimiento biótico, el agrietamiento de la capa superior da como resultado la difusión y baja el valor de la impedancia global.

30 Las medidas de EIS finales en el sistema de capa doble con ZAPP con γ -alúmina al 1,5 % p/v se llevaron a cabo el día 23. Al contrario que las imágenes obtenidas para muestras previas en las que se puede ver el inicio y el avance del agrietamiento, la imagen de este sistema mostró que después de 23 días el agrietamiento se redujo significativamente, con solamente unos pocos sitios de corrosión observados. Los revestimientos abióticos y bióticos tenían apariencias similares.

35 Los diagramas de Bode mostrados en la Figura 15a muestran que añadir γ -alúmina al 1,5 % p/v a la capa superior de sol-gel abiótica y biótica tenía un efecto beneficioso. La impedancia de variantes de ZAPP tanto abiótico como biótico doble eran mayores a 0,01 Hz, con el ZAPP abiótica doble que tiene alrededor del mismo valor el día 23 que el que tenía ZAPP abiótico doble sin γ -alúmina después de 16 días de inmersión. La impedancia a 0,01 Hz del ZAPP biótico doble con γ -alúmina era mayor por en un orden de magnitud (Figura 15a) que los revestimientos equivalentes sin gama alúmina (Figura 14a y 14b) incluso después de una semana adicional de inmersión (23 días).

Los diagramas de Nyquist (Figura 15b) para los revestimientos dobles con ZAPP biótico y abiótico tienen una forma similar; un semicírculo distinto a las mayores frecuencias y una segunda constante de tiempo. La segunda constante de tiempo para el revestimiento abiótico parece ser un elemento de difusión, mientras que para el revestimiento biótico es un segundo semicírculo.

45 Para mejorar el rendimiento antiincrustación en el ambiente de campo, la integridad estructural de la capa superior requería mejoramiento. Se encontró que la adición de γ -alúmina al 1,5 % p/v a la capa superior abiótica y biótica reducía la formación de grietas en la superficie. Se vio agrietamiento en la capa superior biótica, para las muestras de ensayo de campo previas y esto puede haber estimulado el asentamiento y adhesión de organismos de bioincrustación suave, la agrupación de algas e incrustación de briozoos. Después del escaso rendimiento inicial en los ensayos de EIS, se preparó un conjunto adicional de muestras usando la misma formulación de sol-gel sin adiciones, pero los revestimientos superiores se aplicaron más finamente. Esto no fue suficiente para reducir el agrietamiento. La γ -alúmina al 1,5 % p/v era la capa superior abiótica y biótica para una serie adicional de ensayos de EIS. Esto dio como resultado mejoramientos en el rendimiento del revestimiento y la reducción de agrietamiento, lo cual se confirma por los resultados de EIS.

55 Para optimizar las capacidades de antiincrustación de los sistemas de capa doble, es necesario asegurar que no se da agrietamiento de los revestimientos. Los ensayos de EIS de laboratorio han mostrado, de uno en uno, que la reducción en el agrietamiento superficial incrementa el rendimiento de la corrosión global y la longevidad de los revestimientos.

Ensayos de campo*Procedimiento y preparación de muestra*

5 En el momento de la inmersión el flujo del agua de mar era mínimo. Los paneles se suspendieron dentro del agua de mar del puerto (puerto de Whitby, North Yorkshire) desde un dique seco de flotación y se sumergieron continuamente.

Las medidas del ángulo de contacto se llevaron a cabo usando el instrumento DataPhysics (Carl Stuart LTD), el cual fotografía la gotita de agua cuando toca la superficie y, a continuación, mide el ángulo de contacto en ambos lados de la gotita. El ángulo de contacto de una gota de agua sobre la superficie de revestimiento se midió para proporcionar un indicio de la hidrofobicidad de los revestimientos. 23

10 Se prepararon un conjunto de muestras de sol-gel de capa sencilla y doble para la inmersión en el agua del estuario en el puerto de Whitby. La formulación de sol-gel para la capa superior de las muestras doblemente revestidas se adaptaron después de que los ensayos de EIS revelaran un mejoramiento donde γ -alúmina al 1,5 % (nanopolvo de Al_2O_3 de <50 μm de tamaño de partícula). Las muestras se prepararon como previamente, con la capa inferior de las muestras doblemente revestidas (sol-gel dopado con ZAPP al 5 % o Molywhite al 5 %) curado a 400 °C durante 30 segundos y la capa de sol-gel abiótica o biótica superior curado a temperatura ambiente. Los revestimientos de sol-gel abióticos/bióticos con ZAPP de doble capa se usaron para el ensayo de campo.

20 Después de los anteriores resultados preliminares, se ha preparado un conjunto de paneles de acero dulce doblemente revestidos con ZAPP preparados con γ -alúmina al 1,5 % p/v añadida a la capa superior abiótica o biótica. Para hacer un seguimiento del efecto de la formulación de revestimiento y la configuración sobre la inhibición de la corrosión, se llevó a cabo el ensayo de LPR en el lugar del ensayo de campo. Se conectó un cable de acero aislado a la superficie de la muestra usando un tornillo y una tuerca de plástico y se pegó con epoxi adhesivo resistente a corrosión impermeabilizado para proporcionar contacto eléctrico entre el potencióstato y cada panel. El montaje del tornillo se selló usando sellador de silicio y los paneles de acero dulce se cubrieron con cinta aislante Scotch™ Super 88.

25 Se prepararon muestras adicionales soldando por puntos el cable al reverso del panel. Un punto de epoxi adhesión resistente a corrosión se usó para sellar sobre el área de soldadura y la muestra se cubrió con cinta aislante para dejar el área de ensayo. El cable se cubrió con envoltura termotráctil y el extremo del cable se selló.

30 Las medidas de LPR se llevaron a cabo usando un potencióstato de mano Uniscan con un electrodo de referencia de calomelano saturado (KCl). Para observar el efecto de los revestimientos sobre la inhibición de la bioincrustación, se obtuvieron imágenes de tanto los lados no revestidos como revestidos de todas las muestras aproximadamente una vez al mes usando una cámara digital.

Se obtuvieron imágenes adicionales de todas las muestras en el laboratorio usando la misma cámara digital. La superficie de uno de cada tipo de muestra se limpió con un estropajo estéril para obtener muestras de biopelícula para análisis de ADN, las cuales se almacenaron a -20 °C.

35 *Resultados*

40 Para paneles de acero dulce no revestidos (control) y revestidos abióticos y bióticos sencillos, se observó corrosión sobre el panel no revestido. El revestimiento abiótico estaba intacto a parte de un área pequeña de corrosión, pero había extensa incrustación suave y marrón. El panel revestido biótico se corroyó, pero de una manera enteramente diferente al panel no revestido. La apariencia moteada azul/negro de la superficie no parecía ser el resultado de incrustación.

Después de 9 semanas de inmersión, se vio el avance de la corrosión sobre el panel no revestido. El revestimiento abiótico sencillo se deslaminó y había incrustación incrementada en comparación con lo visto a las 4 semanas. La corrosión había avanzado sobre el panel revestido sencillo biótico.

45 Después de 12 semanas, había aumento de incrustación sobre el panel abiótico y corrosión sobre la mitad inferior del panel revestido biótico. A las 18 semanas, una gran área del revestimiento abiótico llega a despegarse después del que el panel se enjuagara con el agua de mar e inmediatamente antes de que se obtuviera la imagen. Es de notar que, a pesar de la pérdida de adhesión del revestimiento, no se dio corrosión bajo el revestimiento. La mayoría de las muestras se hicieron por duplicado, y un segundo panel revestido sencillo abiótico se había corroido de una manera similar al anterior panel revestido sencillo biótico. El panel revestido abiótico tenía una superficie rugosa y parece que se ensució. El panel revestido biótico era oscuro y la superficie no parecía estar ensuciada. Después de 50 9 semanas, los paneles revestidos de sol-gel abióticos y bióticos sencillos replicados mostraron corrosión adicional, aunque el panel revestido sencillo biótico no parecía haberse ensuciado.

55 En referencia a los paneles revestidos de sol-gel con Moly de capa sencilla, los paneles abióticos tenían incrustación marrón y suave sobre la superficie, aunque este no era denso en esta fase. Los revestimientos con Moly revestidos sencillos parecían intactos en comparación con los revestimientos sin inhibidores que mostraron áreas de pérdida de

revestimiento. Se vio bioincrustación sobre paneles revestidos sencillos con Moly abióticos mientras que los paneles revestidos sencillos con Moly bióticos parecían estar libre de bioincrustación. Había puntos de corrosión sobre los paneles revestidos sencillos con Moly biótico. Después de 9 semanas de inmersión, se vio corrosión localizada sobre toda la superficie de los paneles abióticos de capa sencilla. Se vieron algunas áreas deslaminadas sobre uno de los paneles abióticos de capa sencilla. Los paneles bióticos de capa sencilla tenían pocas áreas de corrosión localizada y no parecían tener ninguna pérdida de revestimiento en esta fase. Después de 12 semanas, cuando se ha dado deslaminación del panel revestido abiótico, había una gran área de corrosión. Después de 18 semanas, los paneles revestidos con Moly abiótico se han corroído más que los paneles revestidos con Moly biótico.

Se prepararon revestimientos dobles control, con sol-gel abiótico (no inhibidores) como capa inferior con sol-gel o bien abiótico o biótico como capa superior para observar el efecto de revestimientos dobles sin inhibidores. Después de 4 semanas, el revestimiento doble abiótico está relativamente intacto, con poca incrustación. Un área en la parte superior del revestimiento se había despegado, conduciendo al inicio de la corrosión. El revestimiento doble abiótico/biótico tiene una apariencia "moteada" similar a los revestimientos bióticos sencillos como anteriormente. Después de 9 semanas, el revestimiento doble abiótico/biótico se había corroído adicional y había incrustación alrededor de la parte inferior del panel. El revestimiento doble abiótico/biótico tenía descoloración y corrosión adicional. Después de 12 semanas, había más incrustación sobre el panel abiótico/abiótico y ha aparecido una gran área corroída. El panel revestido abiótico/biótico se ha corroído más en la parte superior del panel. Después de 18 semanas, alrededor del 50 % del área de ensayo del panel abiótico/biótico se había corroído o ha sufrido desprendimiento del revestimiento. El panel abiótico/biótico no se ha corroído más.

Las áreas elevadas de un color más claro sobre todos los paneles de capa doble con Moly con capa superior abiótica/biótica indicaron el inicio de la formación de ampollas. Esto había progresado sobre los paneles de capa doble con Moly con capa superior de sol-gel biótica, donde áreas del revestimiento habían perdido adhesión al sustrato y se habían despegado completamente dando a la superficie una apariencia moteada. Después de 9 semanas de inmersión, se vio la formación de ampollas como áreas blancas y después de 4 semanas había avanzado a pérdida de revestimiento. Los paneles con Moly biótico doblemente revestidos inhibieron la incrustación a un mayor grado que los paneles con Moly abiótico doblemente revestidos. Los paneles cambiaron poco después de este momento en términos de corrosión e incrustación hasta el final del ensayo de campo a la semana 18.

Los paneles con inhibidor de capa doble con capa superior de sol-gel biótica preparados para los posteriores ensayos de campo parecen tener mejoradas propiedades antiincrustación que aquellos preparados en el ensayo inicial, posiblemente como resultado de la γ -alúmina al 1,5 % p/v añadida.

Las medidas de LPR se llevaron a cabo en agua de mar natural en el lugar del ensayo de campo. Se recogió una muestra de agua de mar para establecer la conductividad cada momento puesto que la ubicación del estuario se somete a salinidad variante como resultado de la precipitación. Los parámetros usados para los ensayos eran los siguientes: Potencial de cambio 1 (V): -0,020; Potencial de cambio 2 (V): 0,020; Tasa de cambio (V/Seg): 0,000167; V por punto (V): 0,001. Los resultados se muestran en la Figura 16.

Las constantes de Tafel para todos los tipos de revestimiento se obtuvieron usando un rango de barrido de -250 mV/+750 mV (frente a PCA) a una tasa de barrido de 0,166 mV/s (Tabla 7 y Tabla 8). Los ensayos se llevaron a cabo en agua de mar natural esterilizada por filtro recogida en Whitby.

Tabla 7. Constante de Tafel para revestimientos de capa sencilla y acero dulce no revestido

	Acero dulce no revestido	Abiótico sencillo	Biótico sencillo	Moly biótico sencillo	Moly biótico sencillo	ZAPP abiótico sencillo	ZAPP biótico sencillo
E(I=0) (mV):	-426,6	-649,4	-516,2	-451,9	-464,6	-683,2	-513,8
I _{corr} (μA)	149,9	69,6	4,0	0,8	0,2	0,4	0,3
<i>b_c</i> (mV)	5,7x10 ²	5,5x10 ²	3,5x10 ²	6,5x10 ¹	2,3x10 ²	3,8x10 ²	2,9x10 ²
<i>b_a</i> (mV)	2,9x10 ¹	8,6x10 ¹	2,2x10 ²	1,6x10 ²	7,7x10 ¹	1,2x10 ²	1,3x10 ²
Tasa de corrosión (mmpa)	2,2x10 ⁻⁵	1,1x10 ⁻⁵	3,0x10 ⁻⁷	1,9x10 ⁻⁷	3,1x10 ⁻⁸	8,8x10 ⁻⁸	6,7x10 ⁻⁸

Tabla 8. Constante de Tafel para revestimientos de doble capa sobre acero dulce

	Moly abiótico doble	Moly biótico doble	ZAPP abiótico doble	ZAPP biótico doble
E(I=0) (mV):	-447,5	-564,0	-514,1	-542,2
I _{corr} (μA)	0,2	0,9	0,6	0,2
b _c (mV)	2,7x10 ²	2,6x10 ²	2,0x10 ²	4,7x10 ²
b _a (mV)	4,9x10 ¹	3,3x10 ²	5,5x10 ²	3,5x10 ²
Tasa de corrosión (mmpa)	3,7x10 ⁻⁸	7,7x10 ⁻⁵	2,8x10 ⁻⁸	2,2x10 ⁻⁸

5 Usando las constantes de Tafel mostradas en la Tabla 7 y Tabla 8, se calculó la tasa de corrosión de las muestras sumergidas en el puerto de Whitby y los resultados se muestran en la Figura 17. Los revestimientos abióticos que contienen inhibidor de corrosión Molywhite; Moly abiótico sencillo y Moly de doble capa con capa superior abiótica tienen la tasa de corrosión más baja (6,3x10⁷ y 5,1x10⁷ mm por año) a 18 semanas. El Moly biótico sencillo y ZAPP biótico sencillo tienen una tasa de corrosión de aproximadamente 1,5x10⁸ y 2,7x10⁸ mm por año, con el ZAPP biótico sencillo que tiene una tasa de corrosión de 5,9x10⁸ mm por año a 18 semanas. El doble ZAPP con capa superior de sol-gel biótica tiene la siguiente tasa de corrosión más alta de 6,8x10⁸ mm por año y la tasa de corrosión más alta se ve para el ZAPP abiótico doble (7,1x10⁸ mm por año) y el Moly de doble capa con capa superior biótica (7,9x10⁸ mm por año).

10 Estos resultados parecen contradecir los resultados anteriores, puesto que clasificando la apariencia de las superficies de revestimiento el ZAPP biótico de doble capa parece estar menos corroído que las muestras de Moly abiótico sencillo o Moly de doble capa con capa superior abiótica. Los datos mostrados en la Figura 17 se corrigieron para eliminar la variación surgida de las diferencias en la conductividad durante el periodo de ensayo mostrado (desde las semanas 4 a 18). Puesto que el puerto de Whitby es un ambiente de estuario, la conductividad cambia cuando la salinidad del agua se disminuye por la precipitación y se aumenta en periodos secos. La temperatura media y la precipitación se muestran con la conductividad en la figura 18.

15 Las medidas de ángulo de contacto para todas las muestras se obtuvieron antes de la inmersión en Whitby. Los resultados se obtuvieron de las medidas en 6 áreas de cada área de revestimiento. Los ángulos de contacto mayores se vieron sobre los revestimientos sencillos con Moly biótico, ZAPP abióticos sencillos, ZAPP bióticos sencillos, ZAPP abióticos de doble capa y ZAPP bióticos de doble capa mostrados en la figura 19.

20 Después de 18 semanas de inmersión en Whitby, las muestras se volvieron a SHU y se secaron. Las medidas de ángulo de contacto se obtuvieron como antes, con la excepción del acero dulce no revestido y el revestimiento abiótico sencillo. No fue posible obtener ninguna medida de ángulo de contacto puesto que la burbuja de agua se allanaba sobre la superficie de la muestra en contacto. Los revestimientos que contenían inhibidores tenían mayores ángulos de contacto, con la excepción del ZAPP de doble capa con capa superior abiótica o biótica, que cambiaron lo máximo después de la inmersión y estaban alrededor del mismo valor que el ángulo de contacto visto para el revestimiento biótico sencillo.

30 Evaluación de ensayo de campo con cepas de *Bacillus*

Tres de las cuatro especies de *Bacillus* se eligieron para encapsulación en sol-gel para investigar posible actividad de antiincrustación. Se encapsularon *Bacillus* 6, 22 y 30 en sol-gel y se aplicaron a una capa inferior dopada con Moly sobre paneles de acero dulce. Se usaron revestimientos bióticos de *Paenibacillus polymyxa* para proporcionar un control positivo y abiótico (solamente sol-gel) como control negativo. Se eligió el inhibidor de corrosión Molywhite después de que se viera inhibición de corrosión superior en ensayos de EIS de laboratorio en comparación con la capa inferior de sol-gel dopada con ZAPP.

35 Se inocularon tres alícuotas de 10 ml de caldo NB2 con una de cada bacteria y se incubó durante la noche a 45 °C (30 °C para *P. polymyxa*), agitando a 180 rpm. Se usaron cultivos iniciadores para inocular tres frascos de 1 litro de NB2 con la adición de sales CCY al 1 % y estos se incubaron a 45 °C, agitando 180 rpm durante una semana. Endosporas de *Paenibacillus polymyxa* se incubaron a 30 °C. La esporulación y la lisis de células madre se confirmó usando microscopía de contraste de fases antes de recolectar el cultivo después de 7 días de incubación. Las endosporas se recuperaron del cultivo mediante centrifugación (17.696 xg a 4 °C durante 10 minutos en 6 x frascos de centrifuga de 500 ml) y se lavaron 5 veces con agua desionizada estéril helada por resuspensión y centrifugación. El precipitado (*pellet*) lavado se resuspendió en agua desionizada estéril y se sometió a sonicación sobre hielo en alícuotas de 2 ml al 40 % de polvo máximo durante 25 s usando un sonicador de sonda Vibra Cell de Jencons Sonics (punta de la sonda de 3 mm de diámetro) para separar endosporas agregadas. Algunas células vegetativas restantes se mataron por vórtex con 0,2 ml de cloroformo saturado con agua por ml de suspensión de

- endospora. La suspensión de endospora se ajustó a una DO600 de 66 con agua destilada estéril antes de almacenamiento a -20 °C. Se confirmó la esporulación usando microscopía de contraste de fases. La suspensión de endospora acuosa se centrifugó (16.800 xg/13.200 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente) en una micro-centrífuga, se resuspendió en 1 ml de sol-gel y se sometió a sonicación al 40 % del polvo máximo sobre hielo bajo las condiciones anteriormente detalladas durante 5 s para separar endosporas agregadas inmediatamente antes de añadir al sol-gel restante a una relación de 4:1 (sol-gel:suspensión de endospora diluida en sol-gel). El estudio de las esporas después de la sonicación, usando el microscopio de contraste de fases, confirmó que la sonicación no había alterado las esporas, las cuales continuaron en fase brillo. Se mezcló el sol-gel con *Bacillus* 6, 22 y 30 en un agitador magnético durante 3 días antes de que se aplicaran los revestimientos usando un aplicador de pintura.
- 5 Los paneles revestidos se sumergieron en Whitby y se examinaron y fotografiaron a intervalos de aproximadamente 1 mes. Después de 4 semanas de inmersión del Moly abiótico de doble capa con capa superior biótica (*P. polymyxa*, *Bacillus* 6, 22 y 30) los revestimientos dobles con Moly y *P. polymyxa* y *Bacillus* 6 tenían poca incrustación. El revestimiento doble con Moly y *Bacillus* 22 tenía grandes parches de corrosión localizada y ligera incrustación y el revestimiento doble con Moly y *Bacillus* 30 tenía incrustación más extensa.
- 10 En cuanto a los revestimientos Moly de doble capa con y sin bacterias había áreas de pérdida de revestimiento visibles sobre el revestimiento doble con Moly y *P. polymyxa*. El revestimiento doble con Moly y *Bacillus* 6 parece tener rendimiento superior en términos de inhibición de incrustación e integridad estructural. La corrosión localizada vista sobre el revestimiento doble con Moly y *Bacillus* no pareció haber avanzado más. La superficie del revestimiento doble con Moly y *Bacillus* 30 formó ampollas, sin embargo, no había evidente pérdida de revestimiento en esta fase.
- 15 Después de 12 semanas de inmersión, se vieron incrustación y áreas pequeñas de pérdida de revestimiento en todas las muestras. Había más incrustación adherida sobre la muestra revestida con sol-gel abiótico en comparación con las muestras revestidas bióticas. El *Bacillus* 6 y el *P. polymyxa* inhibieron la incrustación a un grado similar.
- 20 La Figura 20 muestra el cambio en ángulo de contacto después de la inmersión en el puerto de Whitby del sol-gel con Moly de doble capa con endosporas de *Bacillus* 6, 22 y 30 encapsuladas. Se obtuvo un ángulo de contacto medio usando medidas tomadas en 6 áreas diferentes sobre la superficie de revestimiento. Después de la inmersión, la distribución de las áreas de ensayo se limitó mediante la alteración de la superficie de revestimiento. Los resultados muestran que, aunque el revestimiento de doble capa con Moly que contenía *Bacillus* 6 encapsulado dio corrosión superior e inhibición de incrustación, el ángulo de contacto era marginalmente menor que los revestimientos que contenían endosporas *Bacillus* 22 y 30 tanto antes como después del periodo de inmersión de 18 semanas.
- 25 Todos los revestimientos con endosporas encapsuladas han presentado menos incrustación que el control abiótico. Las endosporas de *Bacillus* 22 parecían causar que la superficie de revestimiento llegara a estar alterada y se vieron áreas de corrosión localizada en una fase anterior. La pérdida de adhesión del revestimiento observada después de 12 semanas puede ser el resultado de la aplicación de revestimiento más que la incompatibilidad de las endosporas.
- 30
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un sustrato que tiene un revestimiento unido al sustrato y configurado para proteger el sustrato de la corrosión y la bioincrustación, teniendo el revestimiento una red de óxido inorgánico derivado de sol-gel resultante de reacciones de condensación de al menos un óxido inorgánico; comprendiendo el revestimiento:
- 5 un microorganismo viable incorporado dentro del revestimiento, el microorganismo capaz de reaccionar químicamente con microbios responsables de corrosión inducida microbiana y/o bioincrustación y configurado para inhibir la actividad biológica de dichos microbios; y un inhibidor de corrosión configurado para inhibir la corrosión y/o bioincrustación en el sustrato; en el que el microorganismo y el inhibidor de corrosión son especies separadas.
- 10 2. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el microorganismo comprende uno cualquiera o una combinación de los siguientes;
- células procariotas
 - células de arqueas
 - células bacterianas
- 15 • endosporas.
3. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el inhibidor de corrosión comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de:
- un ortofosfato modificado
 - un polifosfato
- 20 • un gel de silicona modificado con calcio
- una grasa de litio
 - un aceite de hidrocarburo sintético
 - un aceite mineral
 - un compuesto de molibdeno orgánico.
- 25 4. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el óxido inorgánico comprende uno cualquiera o una combinación del conjunto de:
- un óxido de metal
 - un compuesto basado en aluminato
 - un compuesto basado en sílice
- 30 • un compuesto orgánico-inorgánico híbrido
- un ormosil u ormosil híbrido.
5. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el óxido inorgánico comprende uno cualquiera o una combinación del conjunto de:
- tetrametoxisilano (TMOS);
 - tetraetoxisilano (TEOS);
 - 3-glicidoxipropilmetoxisilano (GLYMO);
 - metiletrioxisilano (MTEOS).
- 35 6. Un procedimiento de revestimiento de un sustrato para inhibir la corrosión y la bioincrustación en el sustrato, comprendiendo el procedimiento:
- 40 preparar un sol que comprende un óxido inorgánico;
- añadir un microorganismo viable como primer componente y un inhibidor de corrosión como segundo componente al sol para formar una mezcla;
- revestir el sustrato con la mezcla; y
- 45 curado de la mezcla sobre el sustrato para formar un revestimiento secado de sol-gel unido al sustrato;
- en el que el microorganismo y el inhibidor de corrosión son especies separadas.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el microorganismo se añade al sol como una suspensión en el que el microorganismo se inmoviliza dentro de la suspensión.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende el curado de la mezcla a una temperatura en el intervalo de 10 a 40 °C.
- 50 9. Un sustrato que tiene un revestimiento unido a un sustrato y configurado para proteger el sustrato de la corrosión y la bioincrustación, comprendiendo el revestimiento:

- una primera capa que tiene una red de óxido inorgánico derivado de sol-gel resultante de las reacciones de condensación de al menos un óxido inorgánico, comprendiendo la primera capa un inhibidor de corrosión; y una segunda capa que tiene una red de óxido inorgánico derivado de sol-gel resultante de las reacciones de condensación de al menos un óxido inorgánico, comprendiendo la segunda capa un microorganismo viable, el microorganismo capaz de reaccionar químicamente con microbios responsables de corrosión inducida microbiana o bioincrustación y configurado para inhibir la actividad biológica de dichos microbios; en el que el microorganismo y el inhibidor de corrosión son especies separadas.
- 5
10. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 12 en el que la primera capa y/o la segunda capa comprende además γ -alúmina.
- 10
11. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el microorganismo comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de:
- células procariotas
 - células de arqueas
 - células bacterianas
 - endosporas.
- 15
12. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el inhibidor de corrosión comprende uno cualquiera o una combinación del siguiente conjunto de:
- un ortofosfato modificado
 - un polifosfato
 - un gel de silicona modificada con calcio
 - una grasa de litio
 - un aceite de hidrocarburo sintético
 - un aceite mineral
 - un compuesto de molibdeno orgánico.
- 20
13. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el óxido inorgánico comprende uno cualquiera o una combinación del conjunto de:
- un óxido de metal
 - un compuesto basado en aluminato
 - un compuesto basado en sílice
 - un compuesto orgánico-inorgánico híbrido
 - un ormosil u ormosil híbrido.
- 25
- o uno cualquiera o una combinación del conjunto de:
- tetrametoxisilano (TMOS);
 - tetraetoxisilano (TEOS);
 - 3-glicidoxipropilmetoxisilano (GLYMO);
 - metiletrioxisilano (MTEOS).
- 30
- 35
14. Un procedimiento de revestimiento de un sustrato para inhibir la corrosión y la bioincrustación en el sustrato, comprendiendo el procedimiento:
- 40
- preparar un primer sol que comprende un óxido inorgánico;
añadir un inhibidor de corrosión al primer sol para formar una primera mezcla;
preparar un segundo sol que comprende un óxido inorgánico;
añadir un microorganismo viable que es una especie separada al inhibidor de corrosión al segundo sol para formar una segunda mezcla;
revestir el sustrato con la primera mezcla para formar una primera capa;
- 45
- curado de la primera capa en el sustrato para formar un revestimiento derivado de sol-gel unido al sustrato;
revestir la primera capa con la segunda mezcla;
curado de la segunda mezcla sobre la primera capa para formar una segunda capa derivada de sol-gel unida a la primera capa.
- 50
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende:
- curado de la primera capa de sol-gel a una temperatura en el intervalo de 200 a 600 °C; y
curado de la segunda capa de sol-gel a una temperatura menor de 120 °C.

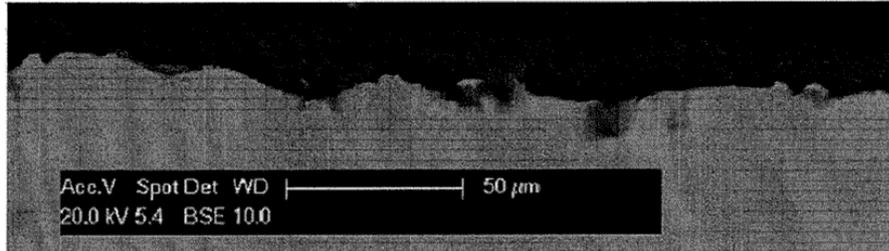


FIG. 1

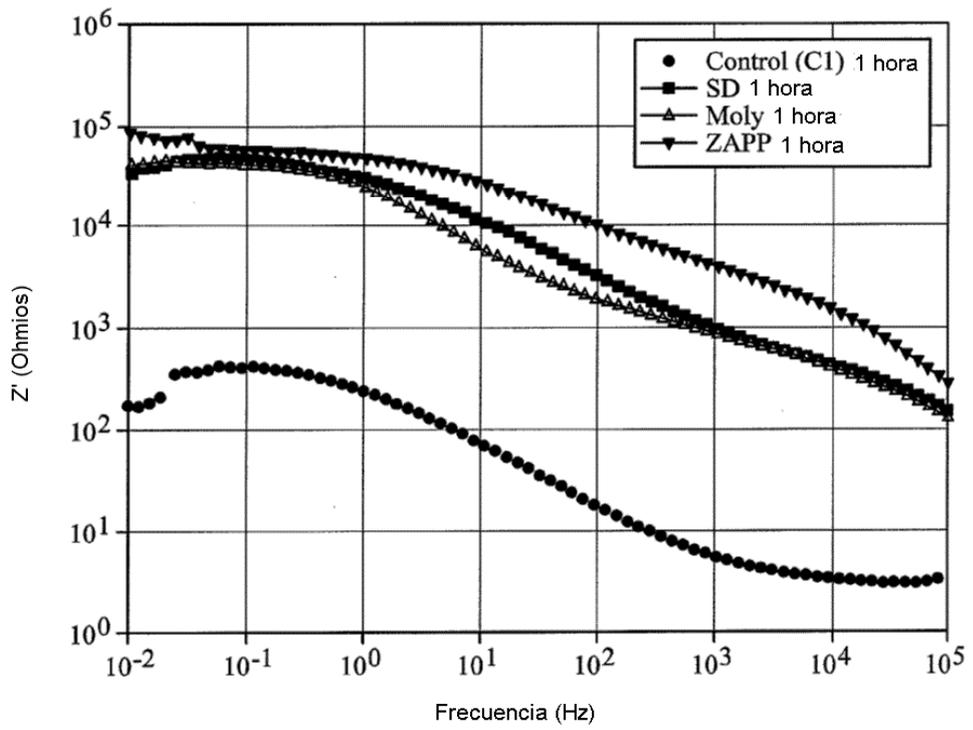


FIG. 2a

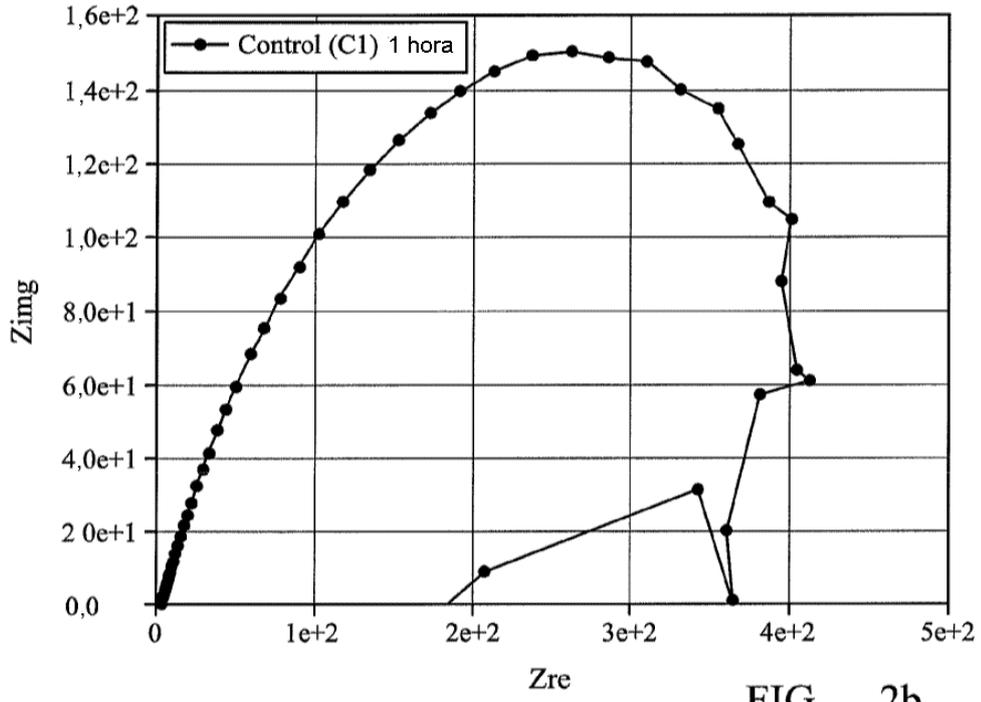


FIG. 2b

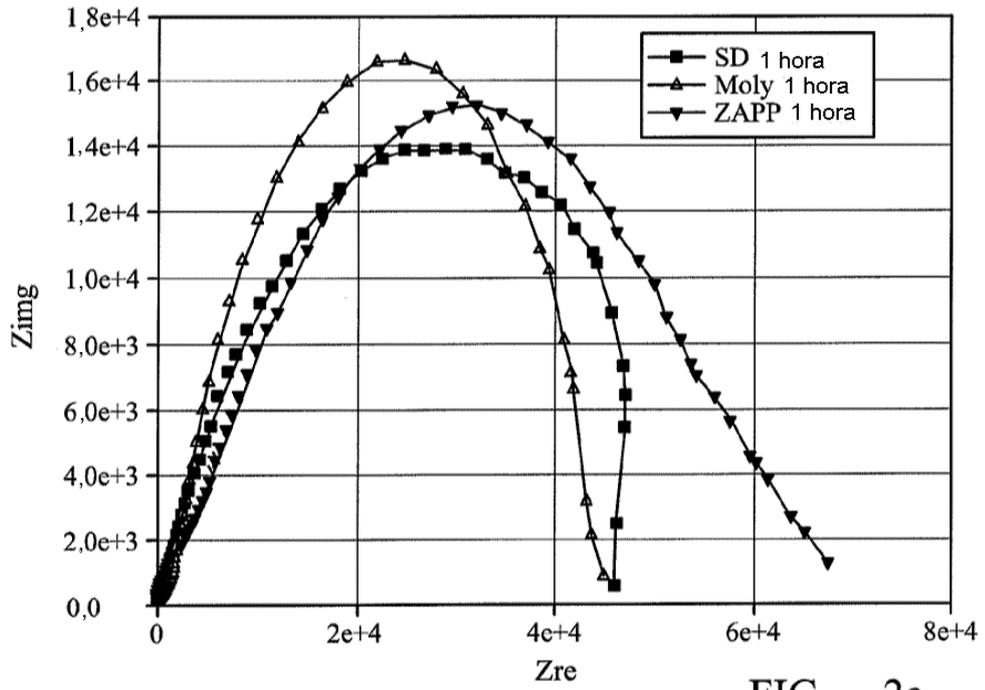
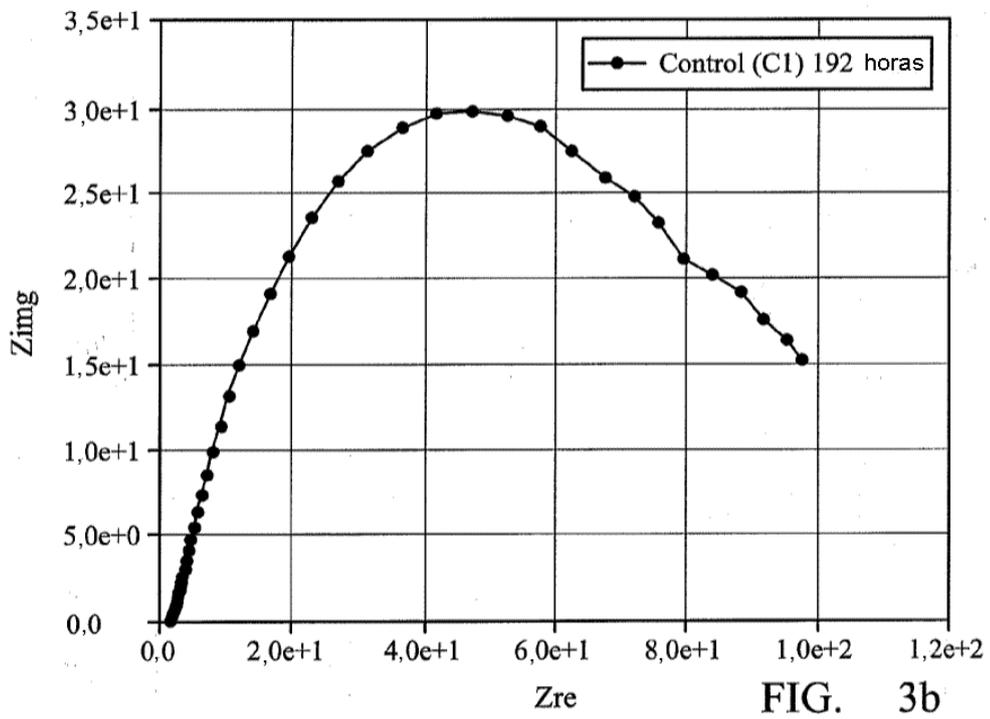
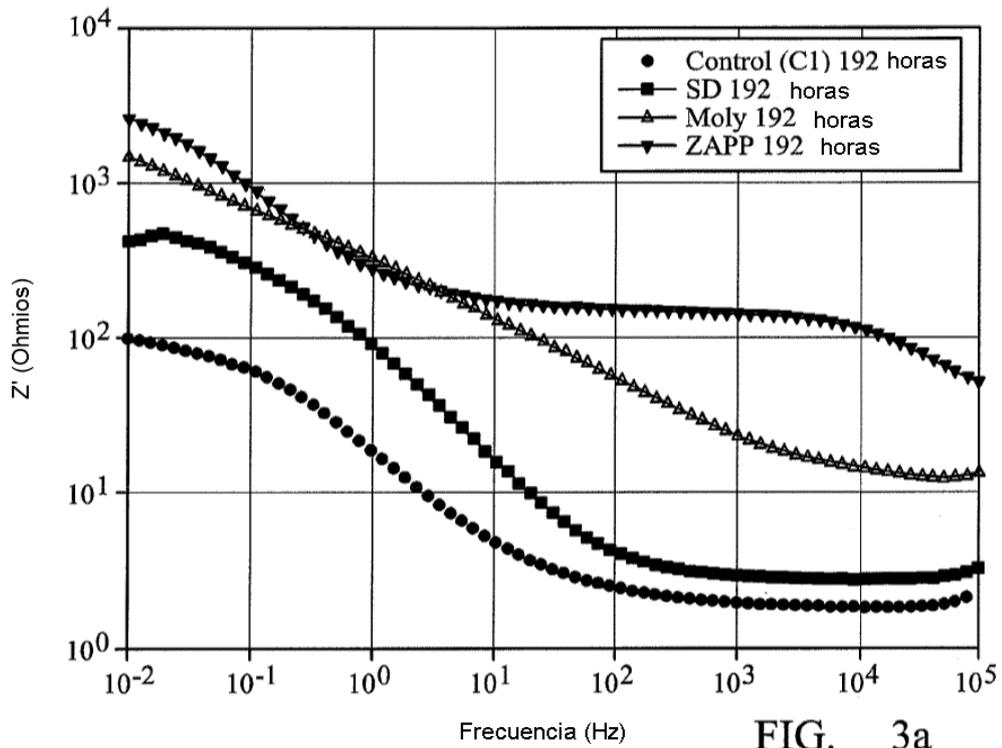


FIG. 2c



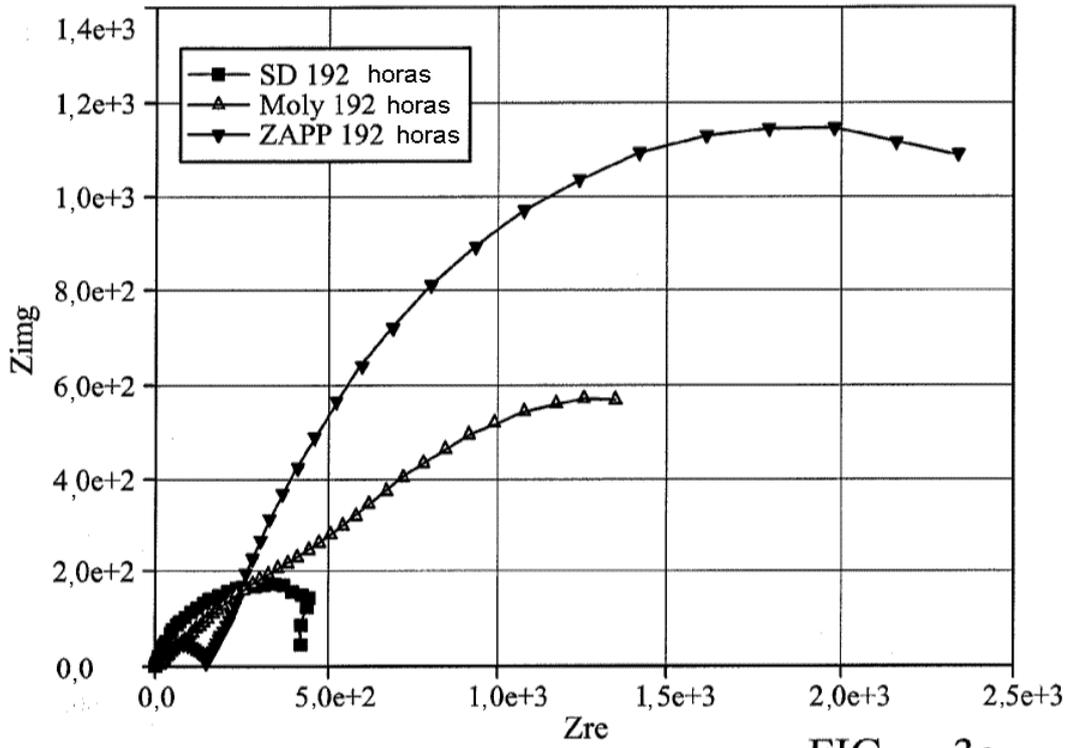


FIG. 3c

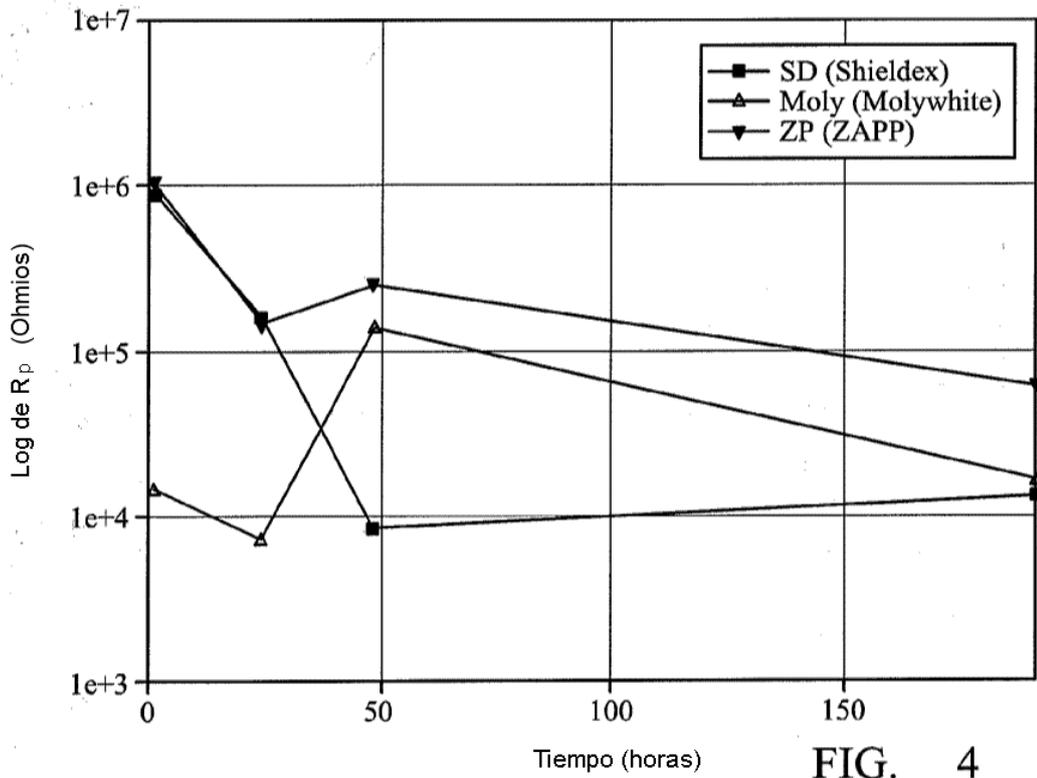
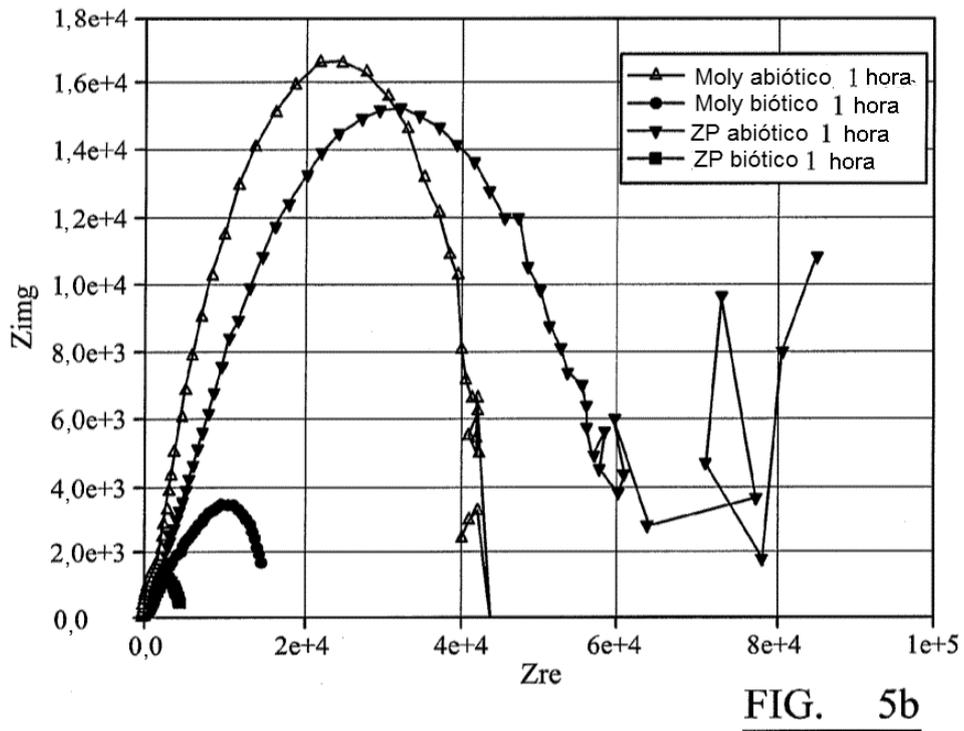
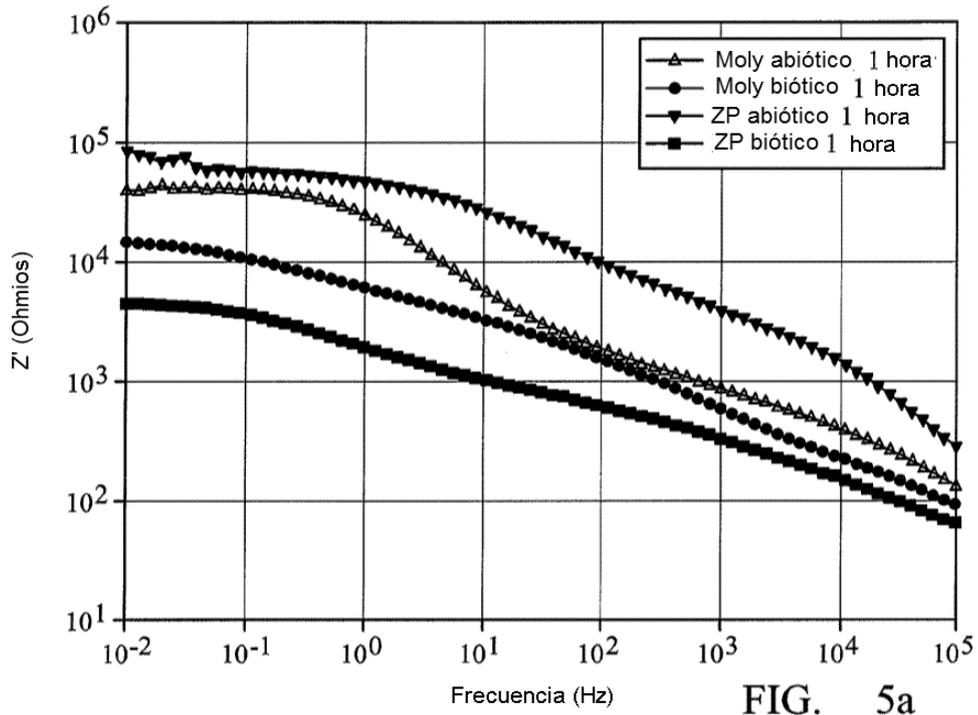


FIG. 4



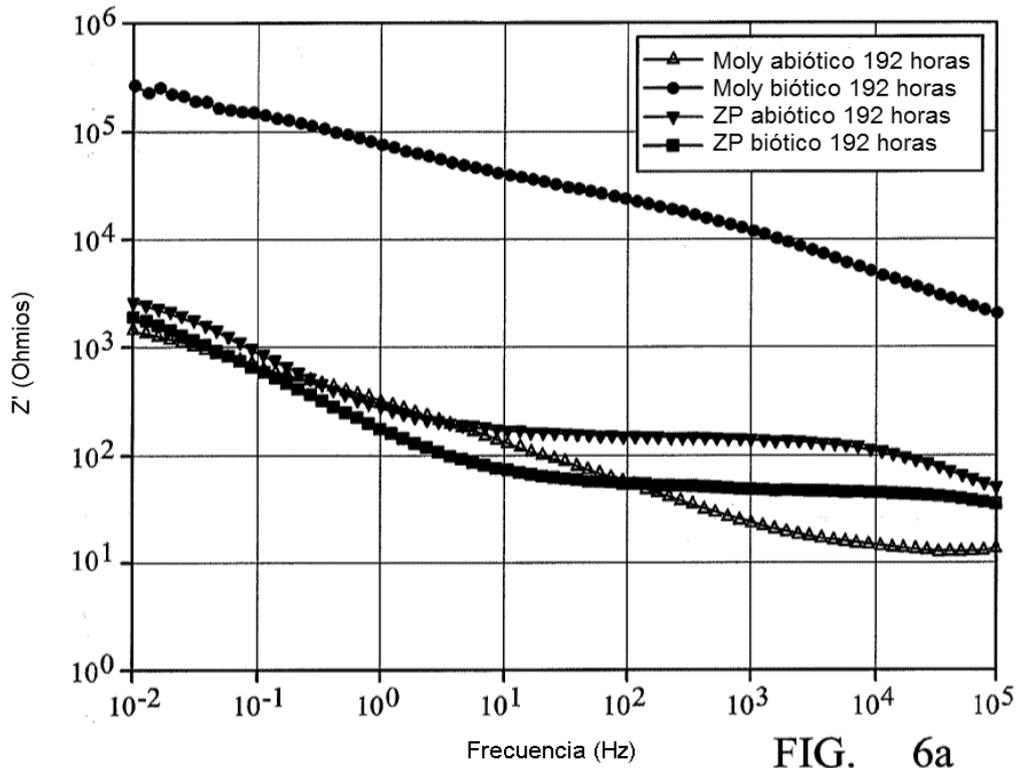


FIG. 6a

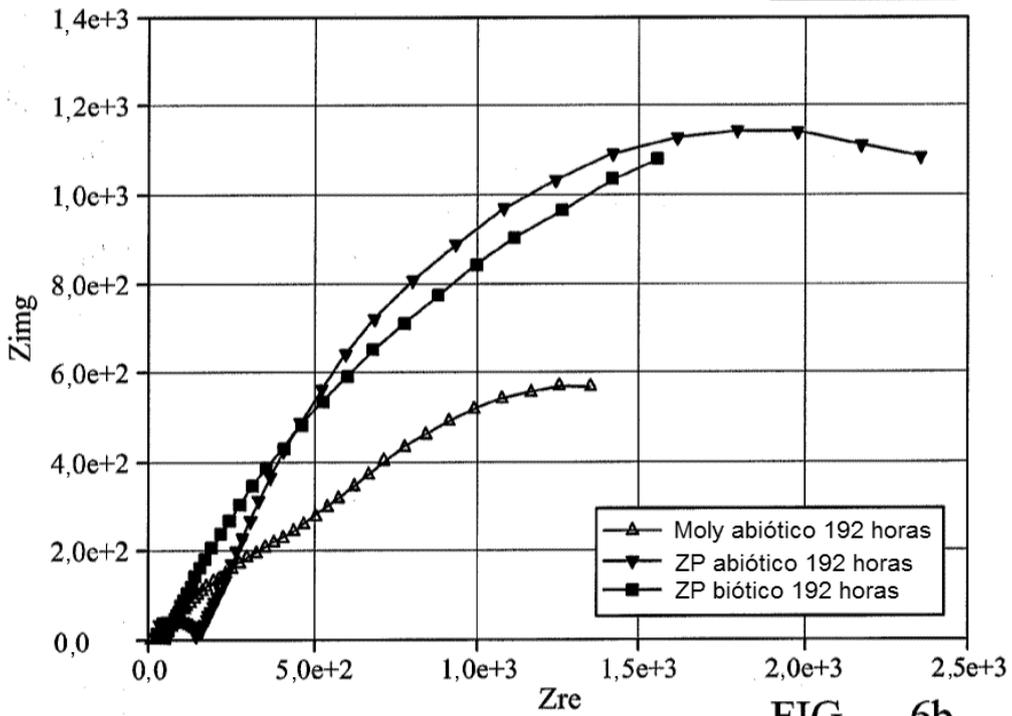


FIG. 6b

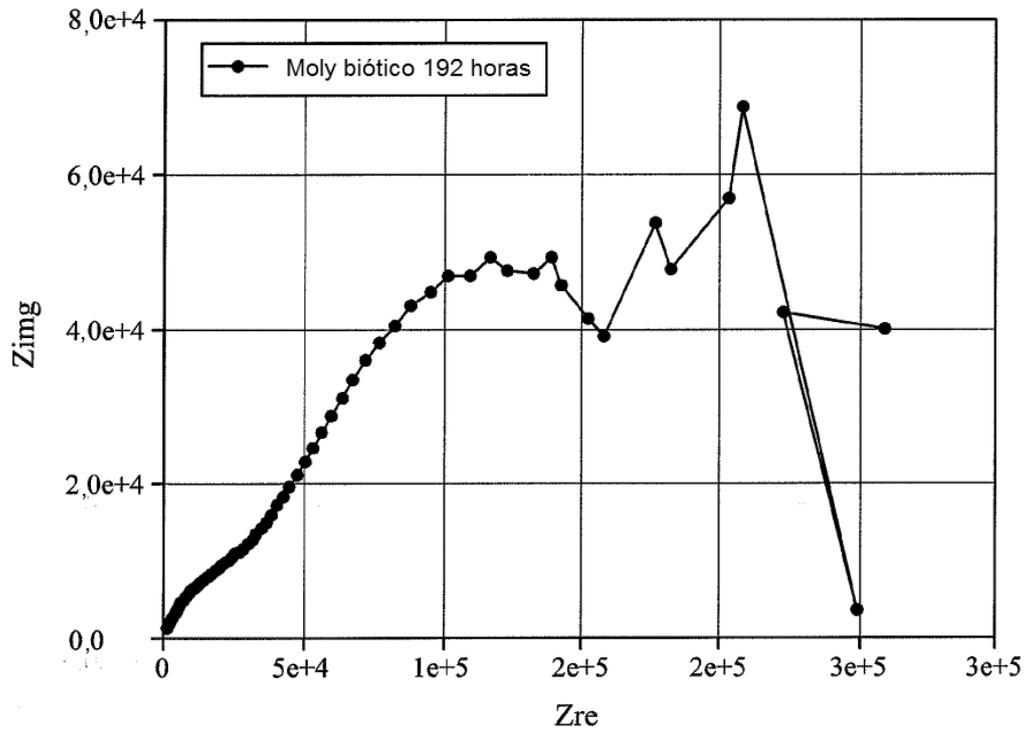


FIG. 6c

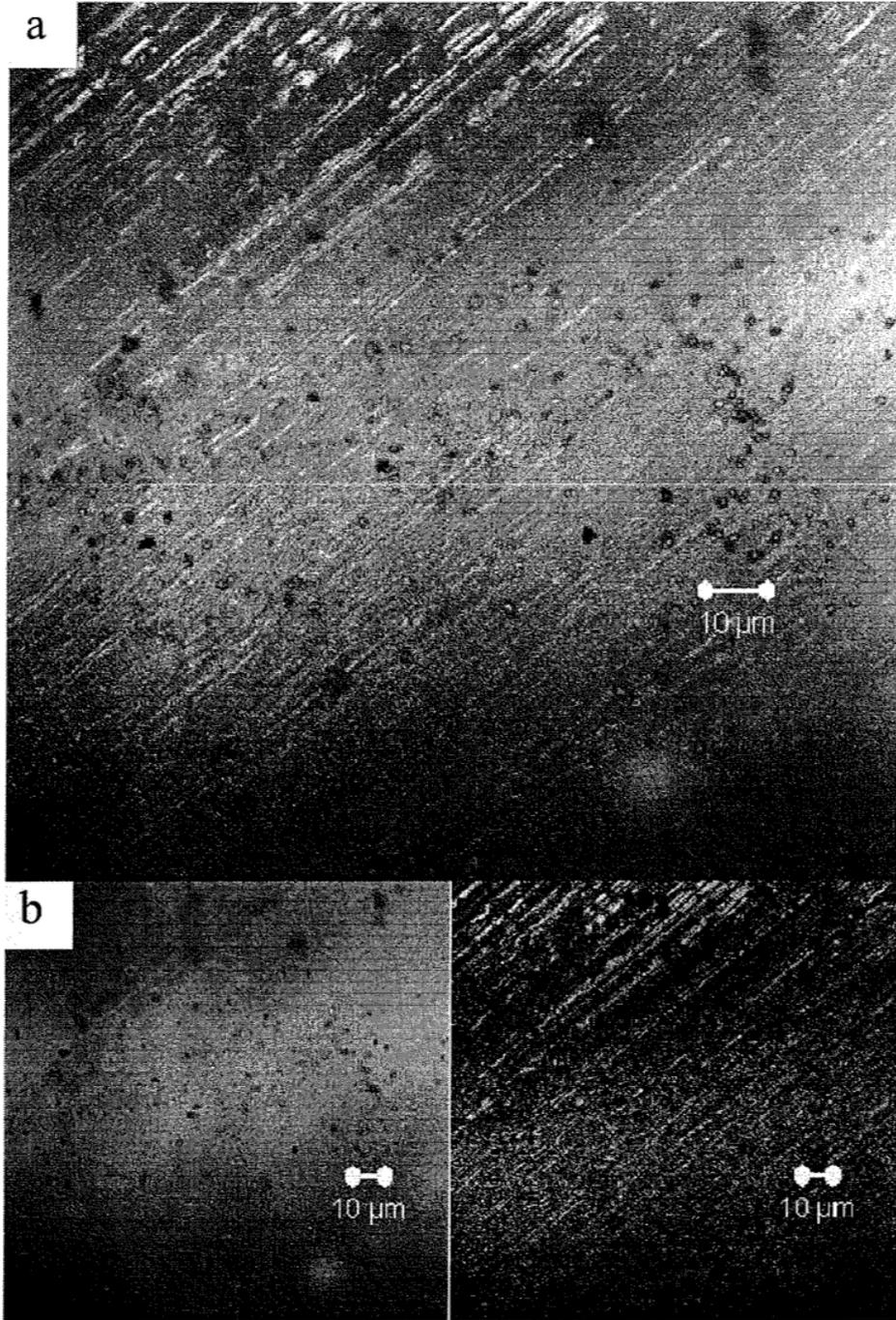


FIG. 7a

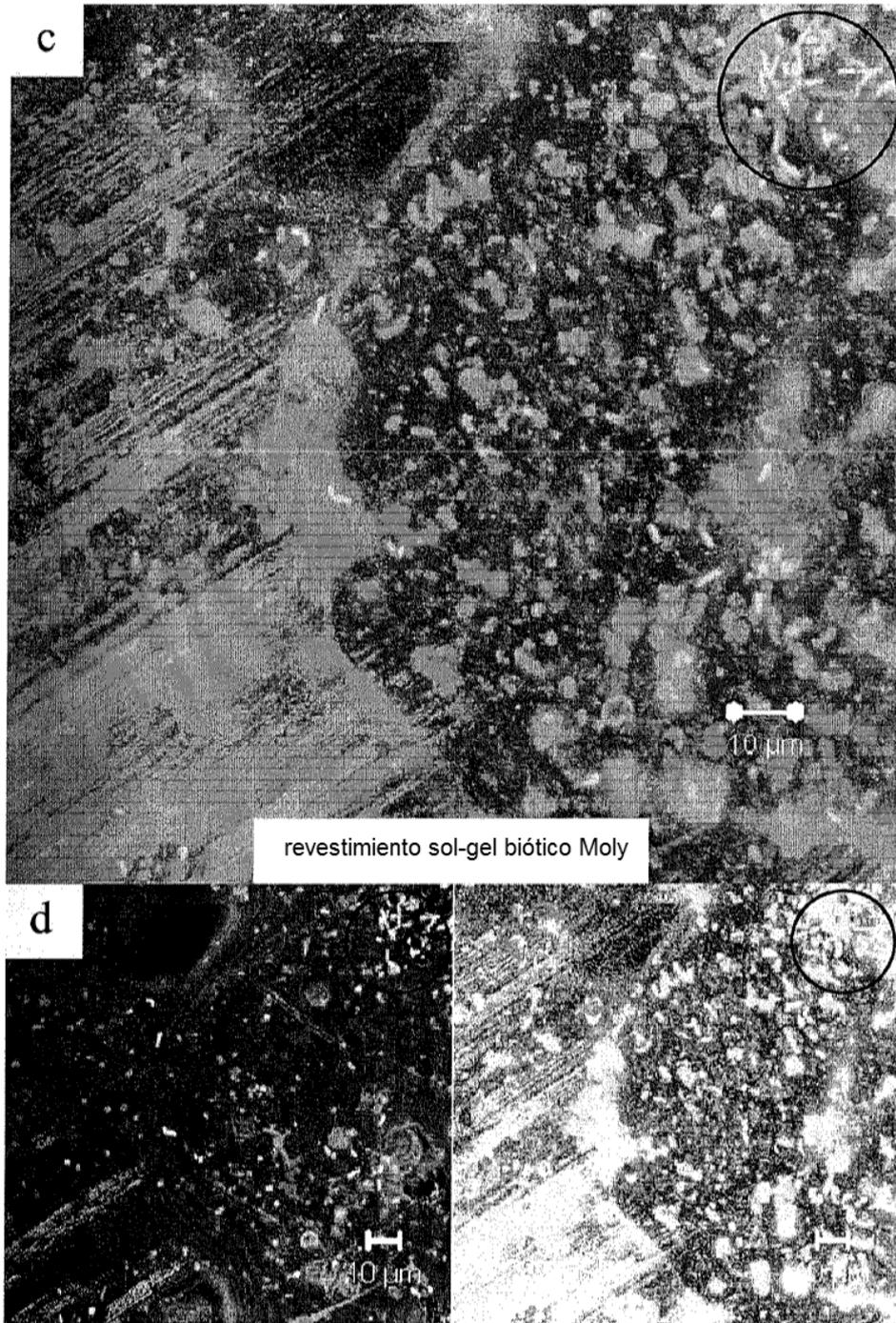


FIG. 7b

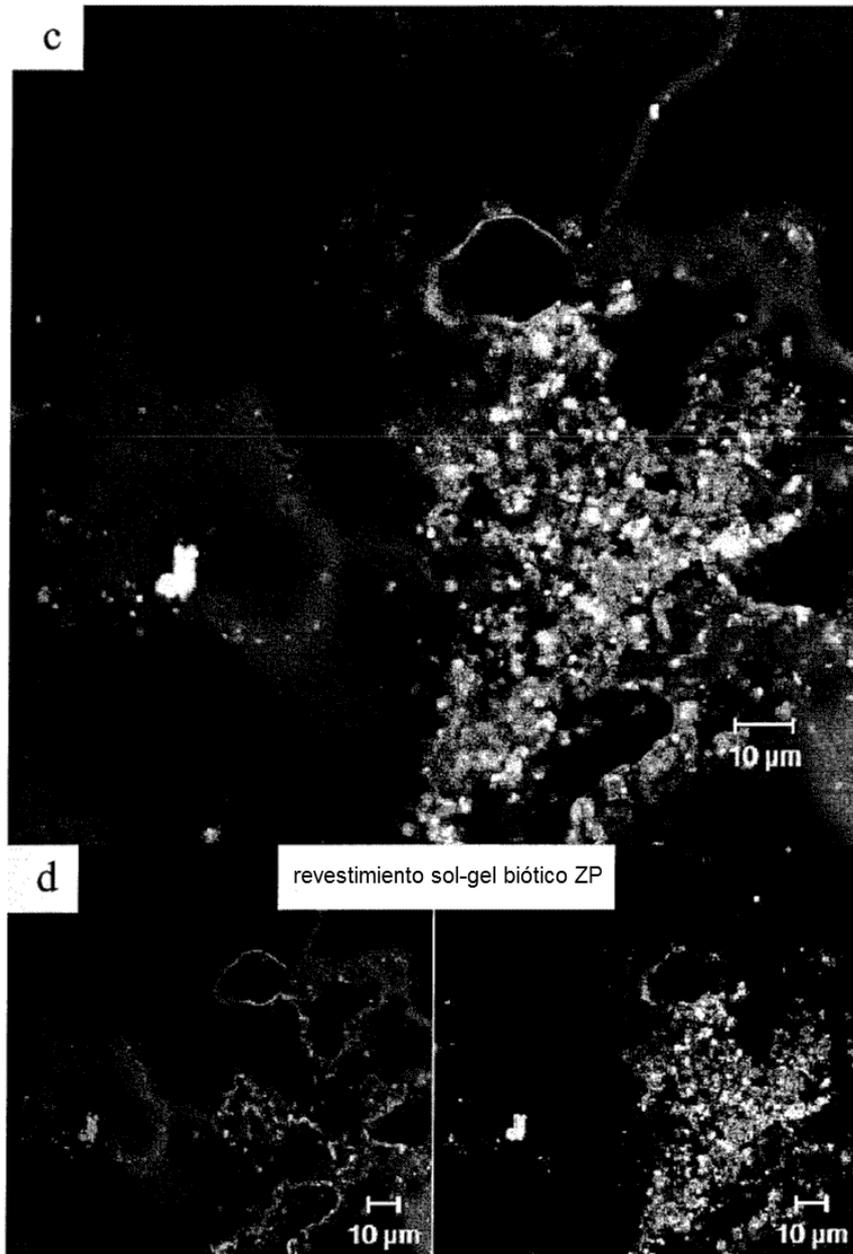


FIG. 7c

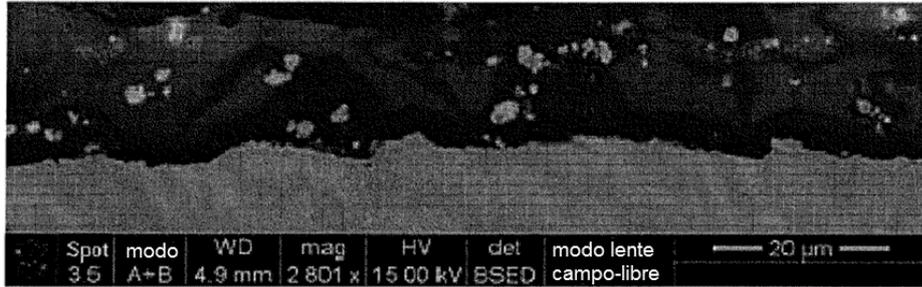


FIG. 8

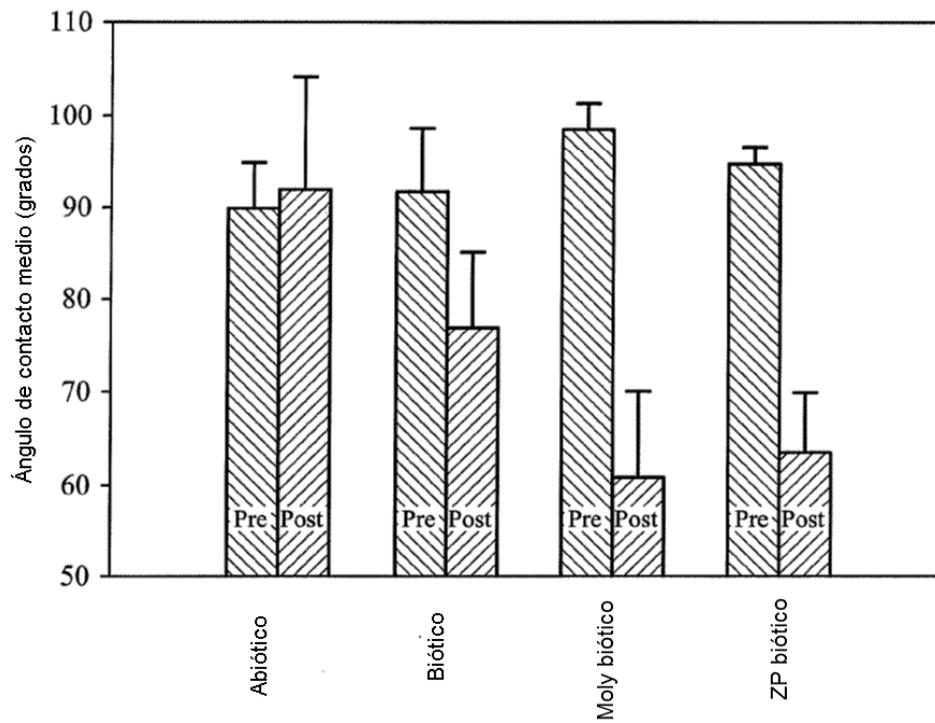
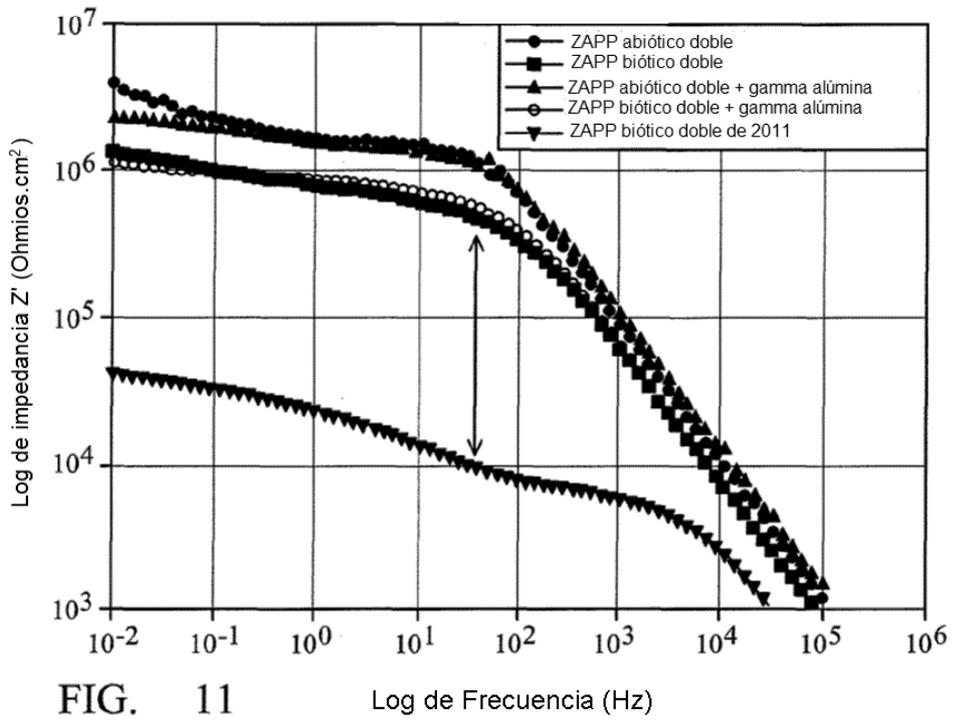
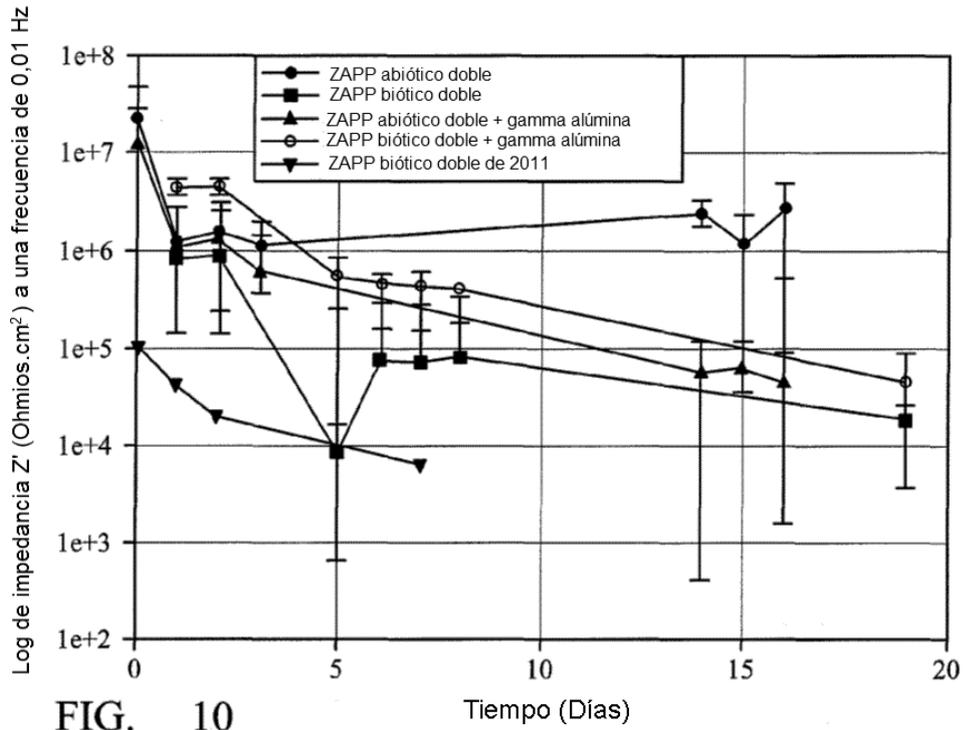


FIG. 9



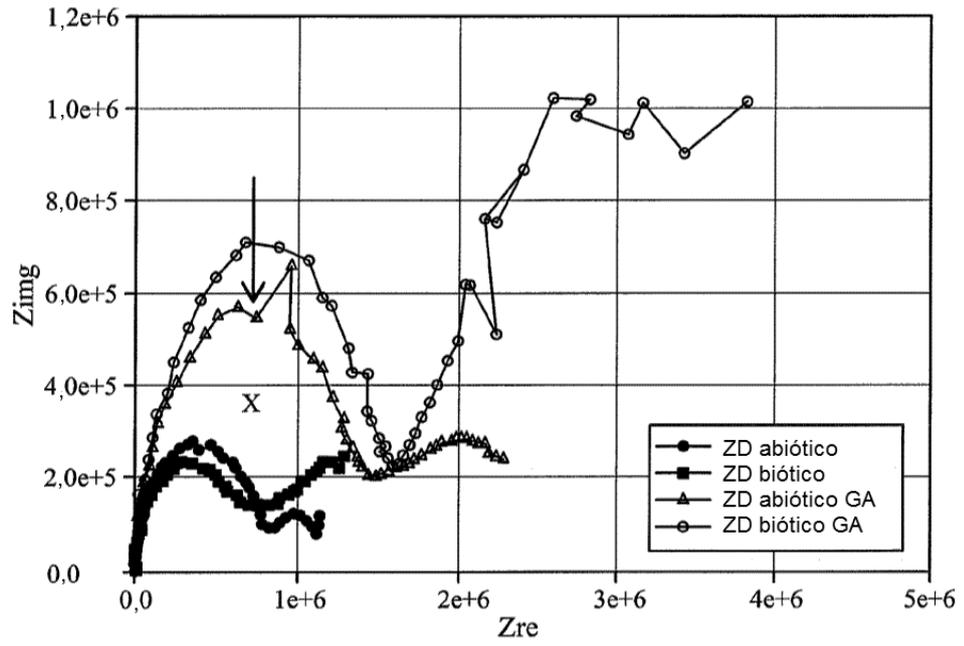


FIG. 12

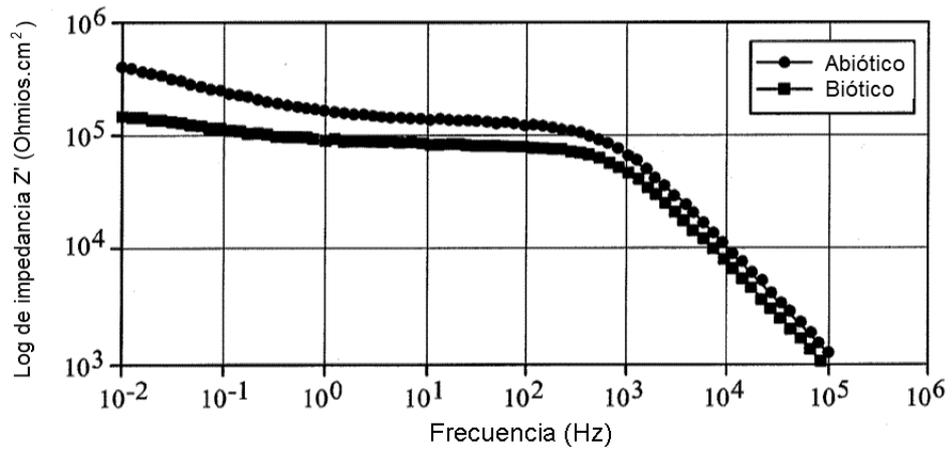


FIG. 13a

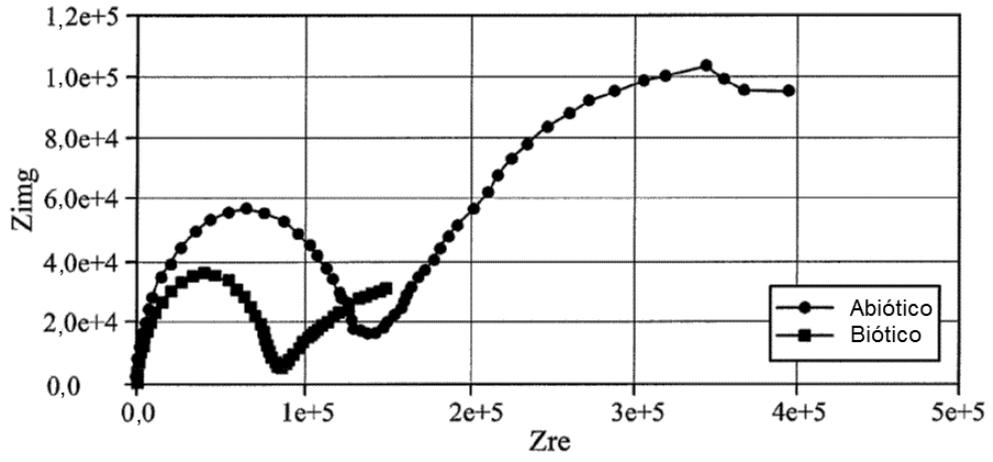


FIG. 13b

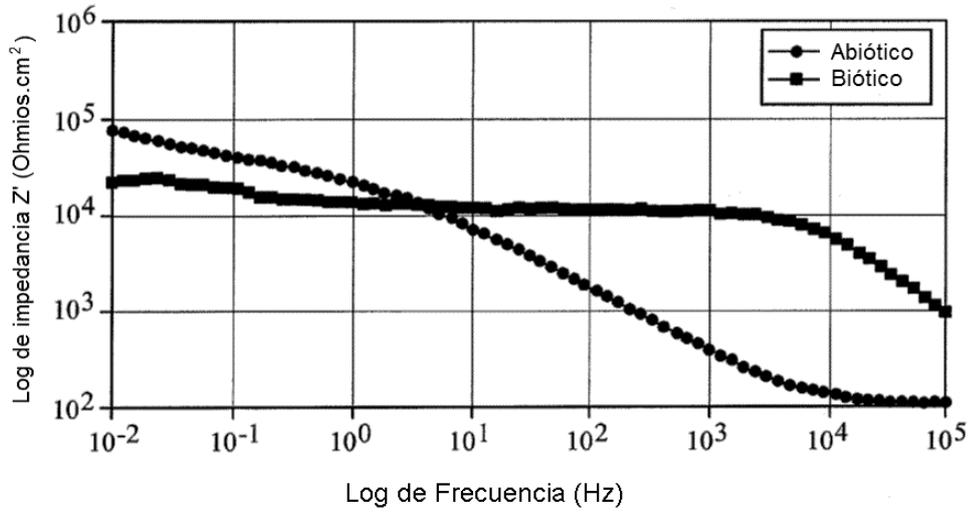


FIG. 14a

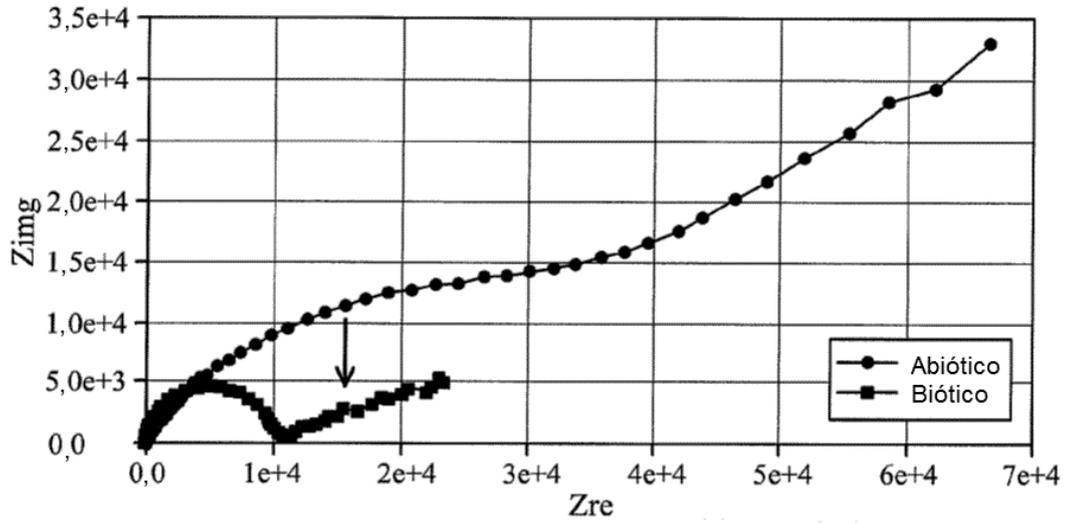


FIG. 14b

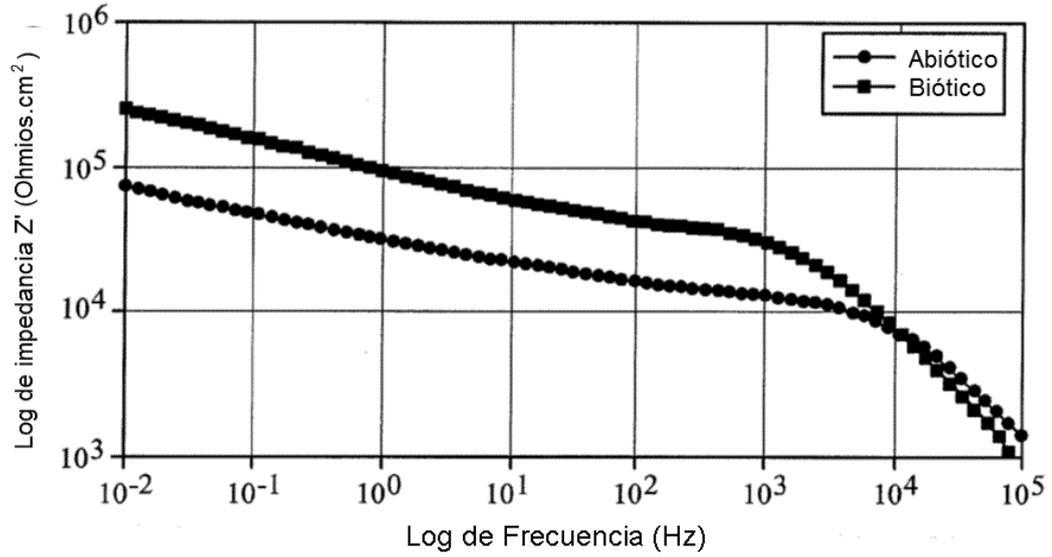


FIG. 15a

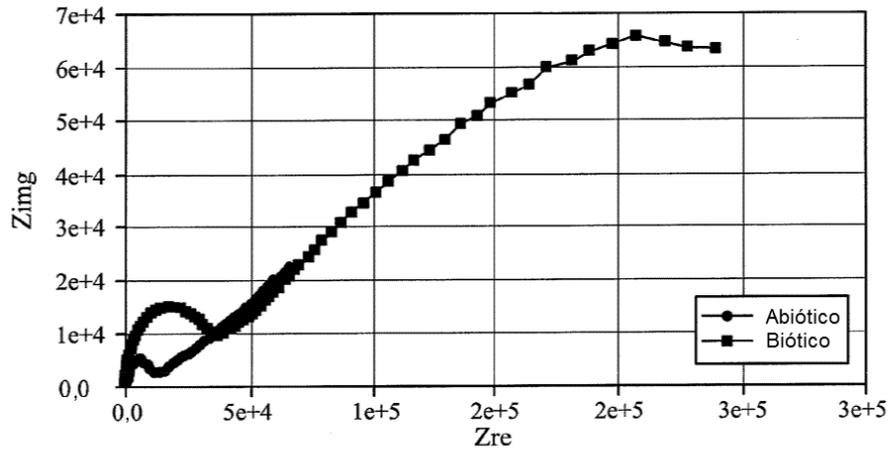


FIG. 15b

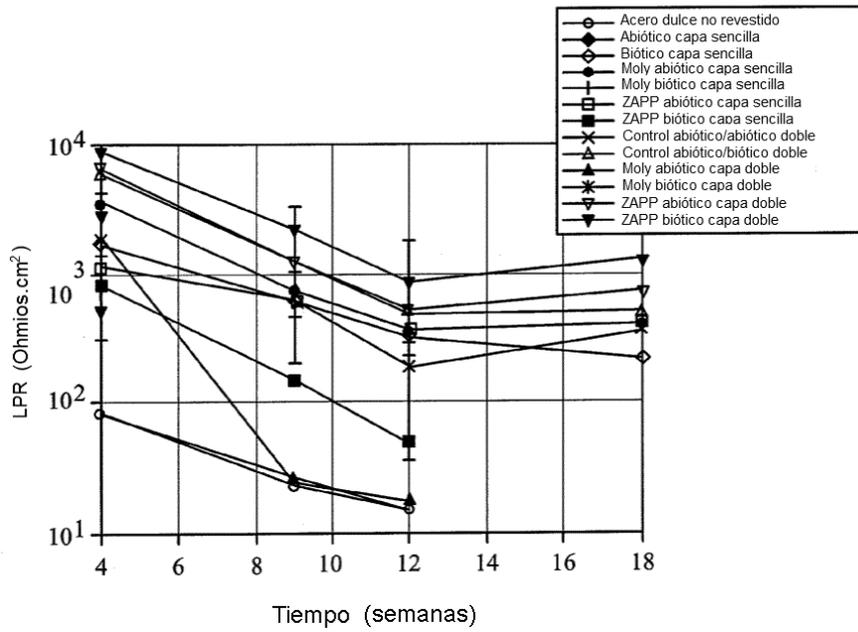


FIG. 16

