

## ESTUDO DO EFEITO DOS MICRO-ORGANISMOS *Kloeckera apis* E *Klebsiella sp* NO AÇO INOXIDÁVEL AISI 316<sup>1</sup>

Lorena Raphael Rodrigues<sup>2</sup>  
Viviane Azambuja Favre Nicolin<sup>3</sup>  
Ninive Soares<sup>4</sup>  
Adriana Marcia Nicolau Korres<sup>5</sup>

### Resumo

A presença de micro-organismos pode acelerar a corrosão do substrato ao qual está aderido, ou mesmo proteger a superfície do metal. O principal objetivo do estudo realizado foi analisar a influência da presença de biofilmes microbianos de *klebsiella sp* e *kloeckera apis* na resistência à corrosão do aço inoxidável AISI 316 em solução de NaCl 0,9%. Foram utilizadas as técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica e polarização anódica, além de observar as amostras por microscopia ótica. Os ensaios eletroquímicos, bem como as microscopias óticas, mostraram que a presença do biofilme prejudica a resistência à corrosão do material analisado.

**Palavras-chave:** Biorrosão; Espectroscopia de impedância eletroquímica; Polarização anódica; Microscopia ótica.

### EFFECT OF *Kloeckera apis* AND *Klebsiella sp* IN AISI 316 STAINLESS STEEL Abstract

The presence of microorganisms may accelerate the corrosion of the substrate to which is attached, or protect the metal surface. The aim of this study was investigate the influence of *klebsiella sp* and *kloeckera apis* biofilm on the corrosion of AISI 316 stainless steel in NaCl 0,9% solution. The electrochemical techniques employed were: electrochemical impedance spectroscopy and anodic polarization. The samples were observed by optical microscopy. The tests performed as well as optical microscopy showed a decrease of corrosion resistance for the material covered by biofilm.

**Keywords:** Corrosion; Electrochemical impedance spectroscopy; Anodic polarization; Optical microscopy.

<sup>1</sup> Contribuição técnica ao 68<sup>o</sup> Congresso Anual da ABM - Internacional, 30 de julho a 2 de agosto de 2013, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Graduanda em Engenharia Metalúrgica – IFES. Vitória, ES, Brasil.

<sup>3</sup> Doutora em Engenharia Metalúrgica e de Materiais e Professora do Programa de Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais – IFES. Vitória, ES, Brasil.

<sup>4</sup> Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental – IFES. Vitória, ES, Brasil.

<sup>5</sup> Doutora em Biotecnologia e Professora do curso de Engenharia Sanitária e Ambiental – IFES. Vitória, ES, Brasil.

## 1 INTRODUÇÃO

A corrosão induzida por micro-organismos é aquela em que a corrosão do material metálico se processa sob a influência de micro-organismos.<sup>(1)</sup> Nos processos de biocorrosão, os micro-organismos, apesar de influenciarem na deterioração do metal, não alteram a natureza eletroquímica da corrosão.

Superfícies metálicas são rapidamente colonizadas por micro-organismos em contato com ambientes aquáticos naturais ou industriais, fazendo surgir o biofilme, cuja acumulação não apenas protege as células microbianas, mas também pode ser prejudicial à superfície a qual está aderido.<sup>(2)</sup>

Apesar de o termo corrosão influenciada microbiologicamente ser normalmente interpretado como indicativo de um crescimento da taxa de corrosão devido à presença de bactérias que aceleram as taxas de reação anódica e/ou catódica, pesquisas realizadas sugeriram que a inibição da corrosão por micro-organismos é um fenômeno mais comum do que se havia assumido.<sup>(3)</sup>

O estudo da corrosão em um metal exposto a ação de micro-organismos, pode fornecer dados importantes para uma posterior prevenção à corrosão.

Entre os métodos de estudo da corrosão eletroquímica, a polarização é fundamental. Esse método consiste em realizar uma eletrólise, utilizando como eletrodo e eletrólito, respectivamente, o metal e o meio cuja interação se deseja estudar.<sup>(1)</sup>

Os métodos de polarização, se bem compreendidos, permitem a obtenção de parâmetros importantes para a avaliação do desempenho de diferentes materiais frente à corrosão.

Alguns metais podem tornar-se passivos em ambientes corrosivos, como os aços inoxidáveis. Esse tipo de aço tem elevada resistência à corrosão devido à formação de um filme de óxido de cromo, que protege a superfície do meio externo.

É de grande importância a complementação dos métodos de polarização com a técnica de impedância eletroquímica. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) atua como um poderoso método de análise, fornecendo boas informações no processo de corrosão.<sup>(4)</sup> Por meio dessa técnica é possível obter dados como a resistência e capacitância do filme passivo.

Os principais objetivos do estudo realizado foi quantificar a adesão dos microrganismos *klebsiella sp* e *kloekera apis*, por meio do número de unidades formadoras de colônia por unidade de área (UFC/cm<sup>2</sup>) do aço AISI 316 e analisar a influência desses microrganismos no processo corrosivo do aço inoxidável AISI 316, em solução de NaCl 0,9%, por meio de ensaios eletroquímicos de polarização anódica e impedância eletroquímica e observação das amostras ensaiadas por microscopia ótica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Determinação da Adesão dos Microrganismos sobre Cupons de Aço Inoxidável

A adesão e formação de biofilme em cupons de aço AISI 316 foram avaliadas quanto ao número de células aderidas por cm<sup>2</sup>. As superfícies do aço foram limpas individualmente com acetona pura, imersos em detergente neutro por 1 h, enxaguados com água destilada esterilizada e lavadas com álcool 70% (v/v). Após este procedimento, os cupons foram submetidos a uma lavagem adicional com água destilada esterilizada, secos por 2 h a 60°C e esterilizados em autoclave

(121°C/15 min).<sup>(5)</sup> Após esterilização, os corpos de prova foram imersos em 50 ml de meio rico (BHI ou TSB) juntamente com 10 ml do inóculo dos microrganismos, previamente ativados e em fase log de crescimento. Os corpos de prova ficaram incubados em condição estática por três dias em frasco com meio esterilizado, após o que foram removidos, lavados com tampão fosfato (PBS) (pH 7,4) e transferidos para novo frasco contendo meio BHI e a mesma quantidade de inóculo. Este processo foi repetido quatro vezes, completando o período de 15 dias, com vistas ao estabelecimento do biofilme.<sup>(6)</sup> Ao final dos 15 dias, o número de células por cm<sup>2</sup> de cada tipo de microrganismo foi avaliado utilizando-se a raspagem com swab esterilizado. O material coletado foi transferido para tubos contendo 9 ml de água peptonada (0,1% p/v) e homogeneizados durante 2 minutos. Alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para meio sólido PCA, incubado por 24 h/37°C, sendo então realizada a contagem, calculando o número de UFC/cm<sup>2</sup>.

Para contagem dos microrganismos foram utilizados três cupons de aço com diâmetro de 1,9 cm, para cada bactéria utilizada.

Esse procedimento foi realizado no laboratório de microbiologia do IFES.

## 2.2 Polarização Anódica

Os cupons de aço com formação de biofilme foram submetidos a testes eletroquímicos de polarização utilizando um potenciostato da marca IVIUM, localizado no laboratório de corrosão do IFES.

Os ensaios foram realizados em solução de NaCl 0,9%. Para montagem do ensaio foram utilizados três eletrodos: o eletrodo de referência (calomelano), o contra-eletrodo (platina) e o eletrodo de trabalho (amostra com biofilme). Após conectar os eletrodos ao aparelho, foi feita uma rampa de potencial de -0,5V a 1,5V, com uma velocidade de varredura de 1mV/s.

A resposta da corrente em função do potencial aplicado permite a obtenção de uma curva, a qual possibilita a observação de parâmetros importantes para análise da resistência à corrosão do material utilizado, como o potencial de corrosão ( $E_c$ ) e potencial de pite ( $E_{pite}$ ).

## 2.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Para complementar os resultados obtidos com os ensaios de polarização, as amostras com formação de biofilme também foram submetidas a ensaios de impedância eletroquímica, utilizando um aparelho potenciostato/galvanostato da marca IVIUM, localizado no laboratório de corrosão do IFES.

O ensaio foi realizado utilizando uma montagem semelhante ao teste de polarização, onde é montada uma célula eletroquímica com três eletrodos (eletrodo de trabalho, referência e contraeletrodo). O meio utilizado para os testes de impedância também foi NaCl 0,9%.

O potencial de início do ensaio EIE foi o obtido após 30 min de medidas de potencial em circuito aberto e as frequências de início e fim do ensaio foram, respectivamente, 40000Hz e 0,004Hz.

A espectroscopia de impedância eletroquímica fornece informações significantes para avaliar o processo de corrosão, por meio desse método é possível obter parâmetros como resistência e capacitância do revestimento.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados em triplicata para confirmação dos resultados.

## 2.4 Microscopia Ótica

As amostras, após ensaios de polarização anódica, foram observadas por microscopia ótica, utilizando microscópio Motic, localizado no laboratório de corrosão do IFES. Com o uso dessa técnica foi possível observar degradações nas amostras, como a formação de pites, possibilitando conclusões quanto à resistência à corrosão do material analisado.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Adesão dos Microrganismos sobre Cupons de Aço

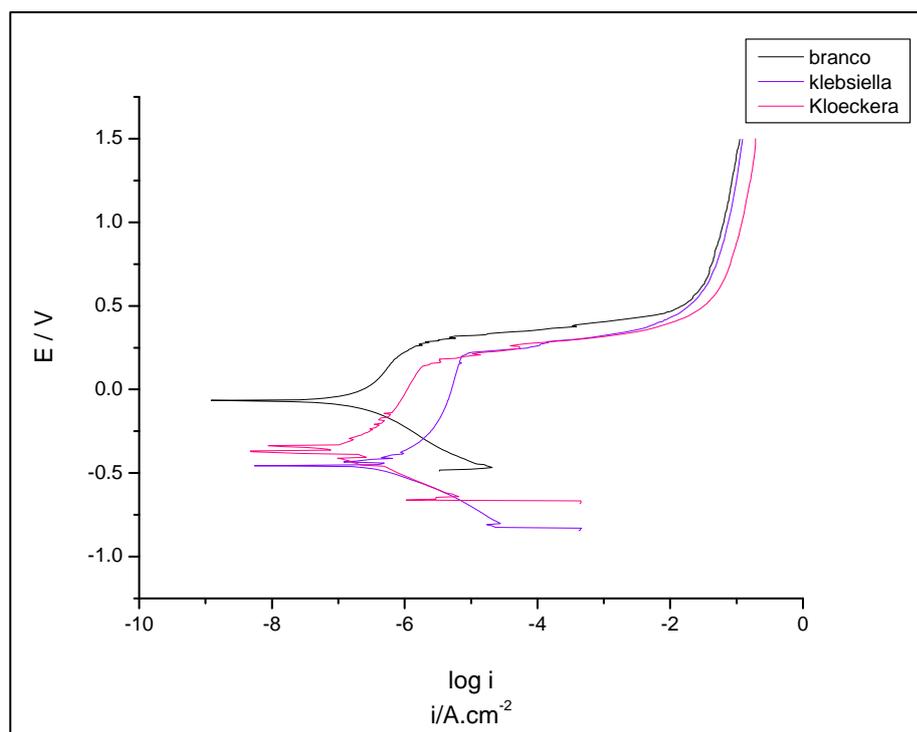
Na Tabela 1 são apresentadas a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) por unidade de área, calculadas.

**Tabela 1.** Unidades formadoras de colônia por cm<sup>2</sup>

	<i>kloeckera apis</i>	<i>klebsiella sp</i>
UFC/ cm <sup>2</sup>	6,101 x 10 <sup>7</sup>	1,586 x 10 <sup>8</sup>

### 3.2 Polarização Anódica

A seguir, na Figura 1, são apresentadas as curvas de polarização para o aço AISI 316 na ausência e presença de biofilme.



**Figura 1.** Curvas de polarização para o aço AISI 316 em solução de NaCl 0,9%.

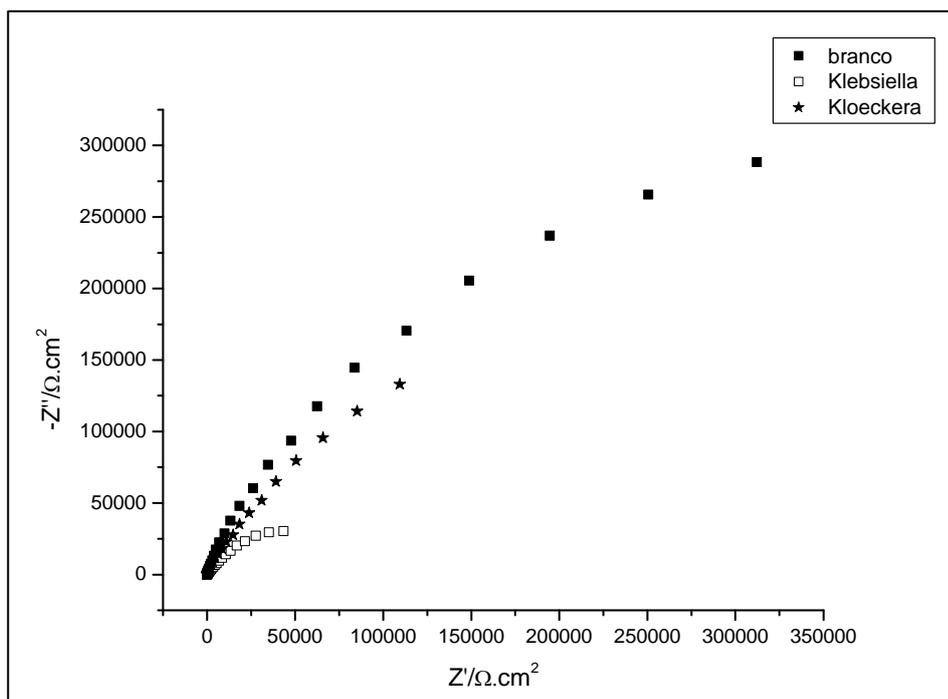
A partir das curvas de polarização, foram obtidos: potencial de corrosão ( $E_c$ ), potencial de pite ( $E_{\text{pite}}$ ), densidade de corrente de corrosão ( $i_c$ ) e densidade de corrente de pite ( $i_{\text{pite}}$ ). Esses dados são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios de polarização

	branco	<i>kloeckera apis</i>	<i>klebsiella sp</i>
$E_c$ (V)	$-0,082 \pm 0,011$	$-0,47 \pm 0,15$	$-0,39 \pm 0,13$
$E_{p_{ite}}$ (V)	$0,28 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$
$i_{p_{ite}}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$-5,5 \pm 0,5$	$-5,6 \pm 0,1$	$-5,3 \pm 0,4$
$i_c$ (A/cm <sup>2</sup> )	$-8,2 \pm 0,6$	$-7,9 \pm 0,5$	$-8,0 \pm 0,4$

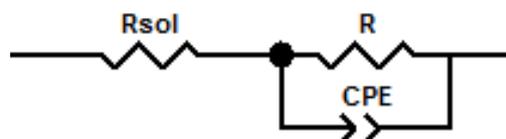
### 3.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Com os dados dos ensaios de EIE foi obtido o diagrama de impedância a seguir (Figura 2).



**Figura 2.** Diagramas de impedância eletroquímica para o aço AISI 316 em solução NaCl 0,9%.

Utilizando o software ZView, foi feita uma simulação do circuito equivalente para obter os valores de  $R_{sol}$ ,  $R$  e  $CPE$ . A figura a seguir mostra o circuito equivalente obtido a partir do ajuste dos dados de EIE.



**Figura 3.** Circuito equivalente aos sistemas analisados, onde  $R_{sol}$  é a resistência do eletrólito,  $R$  a resistência e  $CPE$  o elemento de fase constante.

A Tabela 3 apresenta os valores de  $R_{sol}$ ,  $R$  e  $CPE$  obtidos pelo ZView.

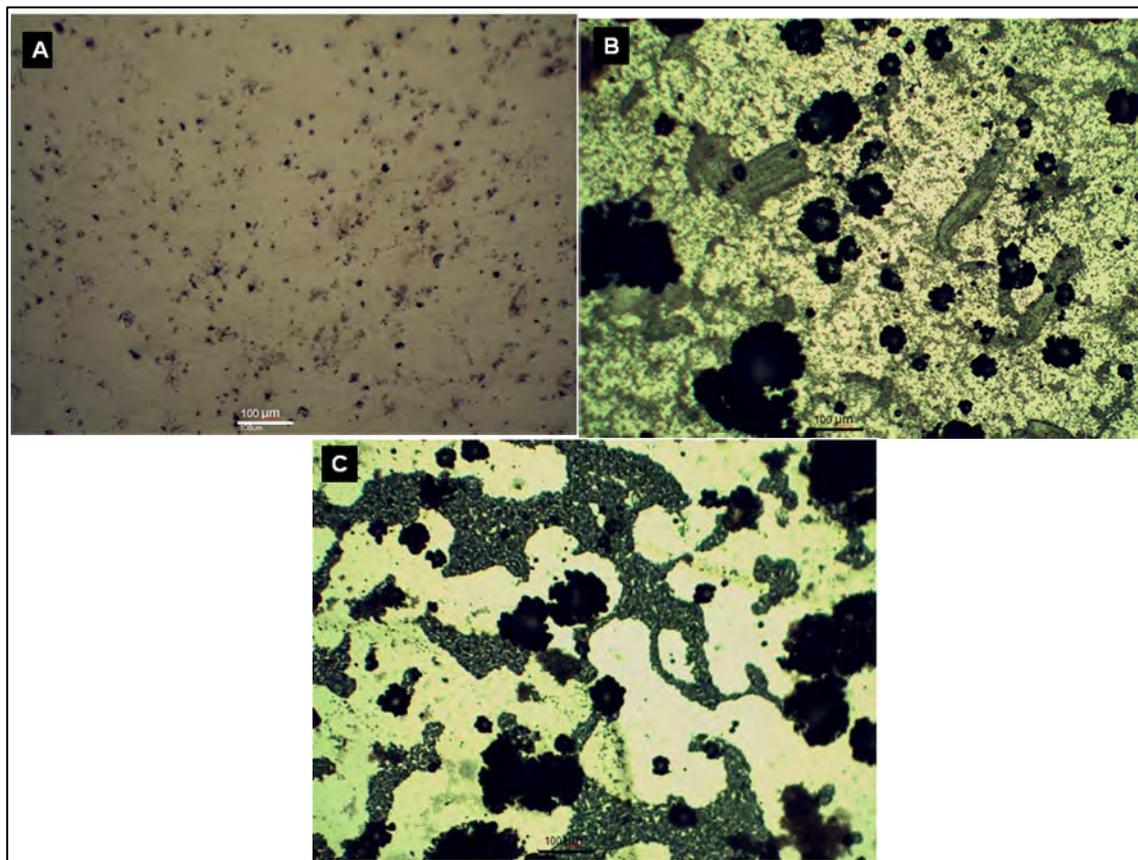
**Tabela 3.** Valores de  $R$  e  $CPE$

	branco	<i>kloeckera apis</i>	<i>klebsiella sp</i>
$R_{sol}$ (Ω.cm <sup>2</sup> )	15,6 (4,5%)	13,7 (5,4%)	13,6 (5,5%)
$R$ (Ω.cm <sup>2</sup> )	$7,44 \times 10^5$ (7,2%)	$2,71 \times 10^5$ (12%)	$8,66 \times 10^4$ (11%)
$CPE$ (F.cm <sup>2</sup> )	$2,75 \times 10^{-5}$ (1,3%)	$6,98 \times 10^{-5}$ (2,5%)	$1,54 \times 10^{-4}$ (2,4%)

Obs: os dados entre parênteses indicam o erro.

### 3.4 Microscopia Ótica

As imagens das amostras, após os testes eletroquímicos, feitas por microscopia ótica são apresentadas na Figura 4.



**Figura 4.** Microscopias óticas da superfície do aço AISI 316, após ensaio de polarização: A- superfície sem biofilme; B- superfície com biofilme de *Klebsiella sp*; C- superfície com biofilme de *Kloeckera apis*.

## 4 DISCUSSÃO

Após o procedimento para determinação da adesão dos microrganismos no aço foi observada a formação de biofilme na superfície. As amostras com formação de biofilme foram, então, utilizadas para realização de testes eletroquímicos.

As curvas de polarização obtidas (Figura 1) mostram uma queda no potencial de corrosão ( $E_c$ ) e no potencial de pite ( $E_{\text{pite}}$ ) do aço exposto a ação dos microrganismos, indicando uma queda na resistência à corrosão do material.

Observa-se também uma maior densidade de corrente no potencial de pite ( $i_{\text{pite}}$ ) para o aço em presença de *klebsiella sp*, o que leva a concluir que houve uma taxa de oxidação maior.

Da mesma forma que nos ensaios de polarização, os testes de EIE também mostraram uma queda na resistência do aço com biofilme (Figura 2).

Como os diagramas de impedância apresentaram uma distorção, não descrevendo uma semicircunferência perfeita, o comportamento capacitivo foi melhor ajustado pela existência de um elemento de fase constante (CPE) ao invés de um capacitor ideal (Figura 3).

Com o circuito equivalente foram obtidos os valores mostrados na Tabela 3. Os valores de R indicam que a maior resistência é apresentada pelo material que não sofreu ação dos microrganismos e a maior queda na resistência ocorreu com o aço exposto a *Klebsiella sp*, o qual também apresentou maior quantidade de UFC por unidade de área. A análise de CPE indica que a maior capacidade de armazenamento de cargas foi do material com biofilme de *Klebsiella sp*, seguido pelo aço coberto com *kloeckera apis*.

Os resultados do teste de impedância eletroquímica mostraram que a presença de biofilme na superfície do metal foi prejudicial a sua resistência.

Resultados semelhantes foram obtidos por González, Santana e Mirza-Rosca<sup>(4)</sup> ao estudarem o efeito de biofilmes bacterianos na resistência à corrosão do aço inoxidável AISI 316 em água marinha. Nesse estudo eles observaram, através de ensaios de impedância eletroquímica, que a introdução de bactérias redutoras de sulfato (SRB) no meio modificou as propriedades eletroquímicas do filme passivo do aço 316, além de ter sido observada uma queda nos potenciais de corrosão e de pite para o aço exposto durante três semanas em meio contendo SRB.

Confirmando os testes eletroquímicos, as microscopias apresentadas (Figura 4) também revelam que houve maior formação de pites na superfície exposta aos microrganismos, cuja formação de pites observada já era prevista pelas curvas de polarização, nas quais pode ser verificado o potencial onde ocorre ruptura do filme passivo ( $E_{\text{pite}}$ ).

A aceleração da corrosão causada pela presença de micro-organismos também foi observada por Sheng, Ting e Pehkonen<sup>(7)</sup> com a realização de um estudo da influência de SRB na corrosão do aço AISI 316. Imagens feitas por microscopia de força atômica mostraram a presença de pites, com forma semelhante à célula bacteriana - em cupons com biofilme contendo *Desulfovibrio desulfuricans*, expostos em água marinha artificial - sugerindo que as SRB tenham uma relação direta com a corrosão localizada desse material.

## 5 CONCLUSÃO

A partir das técnicas eletroquímicas utilizadas, observou-se uma aceleração do processo corrosivo nos cupons com formação de biofilme. As microscopias óticas confirmaram os resultados dos ensaios eletroquímicos.

Os resultados dos ensaios de polarização mostraram que o  $E_c$  para o aço AISI 316, em meio NaCl 0,9%, sem a presença de biofilme é próximo de 0,0 V enquanto que para o material submetido a ação de *klebsiella sp* e *kloeckera apis* o valor do potencial de corrosão apresentado foi menor indicando que a presença dos microrganismos acelera o processo corrosivo.

Novamente foi identificada uma queda na resistência a corrosão do aço estudado, por meio da análise por EIE. A simulação feita pelo software ZView mostrou que a resistência é maior no aço sem biofilme.

Da mesma forma que os testes eletroquímicos, as micrografias obtidas por microscopia ótica também indicaram que a presença das bactérias *klebsiella sp* e *kloeckera apis* favorecem a degradação do material.

## Agradecimentos

À FACITEC pelo apoio financeiro e ao laboratório de microbiologia do IFES.

## REFERÊNCIAS

- 1 GENTIL, Vicente. Corrosão. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011
- 2 YUAN, S. J.; PEHKONEN, S. O. AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas* NCIMB 2021 and *Desulfobivrio desulfuricans*. *Corrosion Science*, v. 51, p. 1372-1385, 2009.
- 3 MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochimica Acta*, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, 2007.
- 4 GONZÁLEZ, J. E. G.; SANTANA, F. J. H.; MIRZA-ROSCA, J. C. Effect of bacterial biofilm on 316 ss corrosion in natural seawater by EIS. *Corrosion Science*, v. 40, p. 2141-2154, 1998.
- 5 RASSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.
- 6 MARQUES, S. C.; et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, p. 538-543, 2007.
- 7 SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. *Corrosion Science*, v. 49, p. 2159-2176, 2007.