



POLITECNICO MILANO 1863

Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica “Giulio Natta”

PoliLaPP – Laboratorio di Corrosione dei Materiali “Pietro Pedeferra”

CORROSIONE MICROBIOLOGICA: MECCANISMO DI AZIONE DEI BATTERI SOLFATO-RIDUTTORI SU ACCIAIO AL CARBONIO

**Validazione sperimentale della
Teoria del Trasferimento Elettronico Extracellulare (TEE)**

NACE – Milano Italia Section
Via Roma 19
20077 Melegnano (MI)

Milano, 11.12.2020

File: 21-03 NACE Italia - Proposta ricerca MCI

PoliLaPP

Via Mancinelli, 7
20131 Milano - Italia

Tel: +39 02 2399 3152
Fax: +39 02 2399 3080

Email: polilapp-dcmc@polimi.it
Sito web: polilapp.chem.polimi.it



Indice

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Premessa | 3 |
| 1.1 | Scopo della ricerca | 3 |
| 2 | Meccanismo di corrosione da batteri..... | 4 |
| 3 | Fase della ricerca | 6 |
| 3.1 | Fase 1: ricerca bibliografica | 6 |
| 3.2 | Fase 2: coltura cellulare dei batteri solfato-riduttori | 6 |
| 3.3 | Fase 3: validazione della Teoria del Trasferimento Elettronico Extracellulare | 7 |
| 3.3.1 | <i>Starvation test</i> | 7 |
| 3.3.2 | <i>Doping test da mediatori redox</i> | 8 |
| 3.4 | Caratterizzazione elettrochimica e delle superfici..... | 9 |
| 3.5 | Durata del progetto | 10 |
| 4 | Finanziamento..... | 11 |



1 Premessa

La corrosione microbiologica (MIC) è un fenomeno di corrosione elettrochimico catalizzato dalla presenza di microrganismi, come funghi e soprattutto batteri. A causa della natura ubiquitaria delle specie microbiche, la MIC è diffusa nei più svariati settori industriali, come gli impianti di trattamento delle acque o dei reflui, l'Oil & Gas, gli impianti antincendio e le tubature interrate in genere.

La MIC è caratterizzata da velocità di corrosione elevate (oltre 1 mm/anno) ed è responsabile di numerosi casi di danneggiamento o cedimento strutturale.

Tra le famiglie di microrganismi, i batteri solfato-riduttori (SRB, Sulphate Reducing Bacteria) costituiscono di gran lunga la principale specie microbica responsabile di fenomeni di corrosione su acciaio al carbonio. Questi batteri, in quanto organismi anaerobici, proliferano in ambienti deaerati, che siano inoltre neutri o basici e ricchi di solfati e sostanze nutritive organiche.

Ciò che invece resta ancora da appurare con certezza è l'effettivo meccanismo elettrochimico che caratterizza la MIC catalizzata dagli SRB.

1.1 Scopo della ricerca

Lo scopo dell'attività è validare dal punto di vista sperimentale uno dei modelli proposti per spiegare il meccanismo della corrosione microbiologica sull'acciaio al carbonio. In particolare, saranno presi in considerazione i batteri solfato-riduttori (SRB), essendo la famiglia microbica più pericolosa e diffusa in ambito industriale.

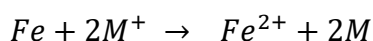


2 Meccanismo di corrosione da batteri

Nel corso degli ultimi decenni sono stati proposti più modelli. La teoria che oggi riceve più credito è quella del **Trasferimento Elettronico Extracellulare (TEE)**, in cui il ruolo dei batteri non è meramente secondario, come accade in altri modelli, bensì centrale. Il modello, nel definire la reazione catodica del processo elettrochimico di corrosione, considera che gli elettroni rilasciati dall'ossidazione del metallo vengono direttamente assorbiti dal batterio, senza alcuna reazione catodica che coinvolga lo sviluppo di idrogeno (come accade invece solitamente nelle reazioni catodiche in assenza di ossigeno). Gli elettroni vengono trasportati attraverso la parete cellulare del batterio, in modo da partecipare alla riduzione dei solfati *all'interno* della cellula, nel citoplasma. In altre parole, i batteri SRB favorirebbero la corrosione del metallo per ottenere energia (sfruttando cioè la cosiddetta *riduzione biocatalitica dei solfati*).

Sono proposte in letteratura due principali ipotesi riguardo all'effettivo meccanismo di trasporto degli elettroni all'interno del batterio:

- **Teoria del Trasporto Elettronico Diretto (TED).** Il trasporto delle cariche avviene per semplice contatto diretto della cellula con il substrato metallico: in particolare, gli elettroni si muoverebbero o direttamente attraverso la parete cellulare a contatto col metallo, oppure risalendo il pilo conduttivo o flagello del batterio.
- **Teoria del Trasporto Elettronico Mediato (TEM).** In questo modello il batterio non deve necessariamente venire in contatto con il substrato metallico; il trasporto degli elettroni avviene infatti sfruttando i cosiddetti *mediatori redox* (M), già presenti in soluzione. Quest'ultimi fungono da shuttle tra il metallo che sta ossidando e l'interno del citoplasma del batterio, attraverso un processo in due step:
 - Cattura degli elettroni rilasciati dal metallo (reazione di riduzione);



- Rilascio degli elettroni all'interno della cellula (reazione di ossidazione).





Le specie mediatrici possono essere appositamente prodotte dal metabolismo dei batteri, e sono quindi dette *endogene*. Esempi di specie mediatrici endogene sono la riboflavina (cioè la vitamina B₂), la flavina adenina dinucleotide e la ferredoxina.

Quest'ultima è la teoria che si vuole validare sperimentalmente nell'attività di ricerca.



3 Fase della ricerca

L'attività di ricerca avrà una durata di 1 anno e si articolerà in tre fasi:

- Fase 1 - Ricerca bibliografica e produzione di uno stato dell'arte sui principali modelli elettrochimici proposti per spiegare il meccanismo di corrosione da batteri SRB su acciaio al carbonio, con particolare attenzione al modello del TEE.
- Fase 2 - Coltura cellulare dei batteri SRB (comune *Desulfovibrio Vulgaris*) in un apposito brodo di coltura. Data la natura anaerobica dei batteri solfato-riduttori, questa fase, così come la successiva, prevedrà l'utilizzo di atmosfere strettamente deaerate.
- Fase 3 - Validazione sperimentale della teoria TEE attraverso due principali configurazioni di esperimento:
 - *Starvation test*
 - *doping test* da mediatori redox

In entrambe le tipologie di esperimento, agli step sperimentali di natura strettamente microbiologica sarà affiancata una serie di tecniche per determinare la velocità di corrosione e i parametri elettrochimici principali.

3.1 Fase 1: ricerca bibliografica

In questa prima fase, si provvederà ad una ricerca bibliografica finalizzata alla stesura di uno stato dell'arte. Quest'ultimo consentirà di avere un quadro aggiornato sui diversi modelli proposti negli anni per la descrizione del processo elettrochimico che caratterizza la MIC. Lo stato dell'arte sarà organizzato in ordine cronologico, evidenziando soprattutto gli sviluppi più recenti proposti negli ultimi anni.

Durata prevista: 2 mesi

3.2 Fase 2: coltura cellulare dei batteri solfato-riduttori

In questa seconda fase sarà realizzata la coltura cellulare necessaria per ottenere la colonia batterica SRB, da adoperare poi nelle successive fasi sperimentali. Si è scelto di utilizzare un ceppo batterico anaerobico comune, il *Desulfovibrio Vulgaris*, da inoculare in un apposito brodo di coltura ricco



di solfati e sostanze nutritive (come estratto di lievito, lattato di sodio e citrato di sodio). L'inoculazione del batterio deve avvenire in apposite *vial*, in rapporto 1:100 in volume rispetto al *medium* di coltura; quest'ultimo deve essere preventivamente sterilizzato in autoclave, a 120°C per 20 minuti. La soluzione così ottenuta deve essere mantenuta a pH neutro e ad una temperatura costante di 37°C, per poter permettere la proliferazione dei batteri. Durante tutte queste operazioni l'ambiente deve essere mantenuto completamente deaerato: ciò può essere ottenuto posizionando tutto il materiale all'interno di una *glove-bag*, in cui può essere mantenuta una atmosfera costante di azoto, escludendo completamente l'ossigeno, permettendo al tempo steso di manipolare il sistema tramite gli appositi guanti. Per eliminare ogni possibile traccia residua di ossigeno, si può inoltre aggiungere preventivamente un *oxygen scavenger* nella soluzione, come ad esempio la cisteina. A questo punto si potrà aggiungere il coupon metallico (1 cm²) in acciaio al carbonio, in modo da permettere la formazione del biofilm. L'incubazione, a temperatura e pH controllati, deve durare almeno una settimana. Per l'enumerazione dei batteri (planctonici e poi sessili) all'interno delle *vial*, si utilizzeranno misure di torbidità, con l'impiego di uno spettrofotometro.

Durata prevista: 2 mesi

3.3 Fase 3: validazione della Teoria del Trasferimento Elettronico Extracellulare

La teoria del TEE sarà validata sperimentalmente mediante due principali configurazioni di test:

- *Starvation test* (Paragrafo 3.3.1);
- *Doping test* da mediatori redox (Paragrafo 3.3.2);

Durata prevista: 8 mesi

3.3.1 Starvation test

Il test consiste innanzitutto nel coltivare i batteri in un *medium* di coltura standard, con il contenuto completo di sostanze nutritive organiche. Dopo l'incubazione in questo brodo, di almeno una settimana, si ottiene la formazione del biofilm sul coupon metallico. Il campione è quindi estratto dalla *vial*, in modo da rimuovere i batteri planctonici dispersi. A questo punto il coupon è reimmerso in brodi parzialmente o totalmente de-carbonizzati, ossia privati in parte o totalmente delle sostanze nutritive organiche, sottoponendo quindi i batteri ad una *starvation* (carezza nutrizionale) forzata.



Si prevede di utilizzare inizialmente tre soluzioni de-carbonizzate, in cui il contenuto di lattato e citrato di sodio sarà ridotto rispettivamente del 50, 90 e 100%. Scopo dell'esperimento è valutare (anche quantitativamente) se la diminuzione di sostanze nutritive comporta un corrispondente aumento nella velocità di corrosione dell'acciaio; in altre parole si vuole validare l'ipotesi alla base della teoria del TEE, secondo cui i batteri SRB causerebbero la corrosione del metallo per ottenere energia (sfruttando la riduzione biocatalitica dei solfati).

Oltre al controllo in temperatura e pH, l'esperimento prevede il monitoraggio del potenziale di libera corrosione o OCP (Open Circuit Potential). Parallelamente, per avere una stima della velocità di corrosione, si effettueranno misurazioni di perdita di massa e di resistenza di polarizzazione lineare (LPR, Linear Polarization Resistance).

Setup dell'esperimento:

| | |
|--------------------------------|--|
| <i>Materiale</i> | Acciaio al carbonio |
| <i>Superficie</i> | Coupon da 1 cm ² |
| <i>Soluzione di coltura</i> | BSR <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (ATCC®7757) inoculato in rapporto 1:100 v/v nel <i>medium</i> di coltura (ATCC®1249, contenente MgSO ₄ ·7H ₂ O, CaSO ₄ , NH ₄ Cl, K ₂ HPO ₄ , citrato di sodio, lattato di sodio, estratto di lievito) |
| <i>Soluzioni di starvation</i> | Brodo utilizzato per la coltura, parzialmente o completamente de-carbonizzato (tre tipi di soluzione, con contenuto di citrato e lattato di sodio ridotto del 50, 90 e 100% rispetto al <i>medium</i> originale) |
| <i>pH</i> | Neutro |
| <i>Temperatura</i> | 37°C |
| <i>Durata delle prove</i> | Due settimane circa |
| <i>Monitoraggio</i> | Temperatura, pH, OCP |
| <i>Misure</i> | Stima della velocità di corrosione tramite perdita di massa e di LPR |

3.3.2 Doping test da mediatori redox

Il test consiste nel coltivare i batteri in un *medium* di coltura standard, al quale venga aggiunto un *doping* di mediatore redox, durante la fase di inoculazione. L'aggiunta della specie mediatrice ha lo scopo di valutare se essa comporta un conseguente aumento della velocità di corrosione, come



sarebbe previsto dalla teoria del Trasporto Elettronico Extracellulare, e in particolare dal modello del Trasferimento Elettronico Mediato. A questo scopo, si prevede di utilizzare uno o più dei tre principali mediatori redox endogeni (riboflavina, flavina adenina dinucleotide e ferredoxina), in più quantità (con un minimo di 10 ppm di mediatore per 100 mL di *medium* di coltura). Oltre al controllo in termini di temperatura e pH, anche questo esperimento prevede il monitoraggio dei parametri elettrochimici sopra esposti (potenziale e velocità di corrosione)

Setup dell'esperimento:

| | |
|--|---|
| <i>Materiale</i> | Acciaio al carbonio |
| <i>Superficie</i> | Coupon da 1 cm ² |
| <i>Soluzione di coltura con doping</i> | BSR <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (ATCC®7757) inoculato in rapporto 1:100 v/v nel <i>medium</i> di coltura (ATCC®1249), con aggiunta di mediatore redox |
| <i>pH</i> | Neutro |
| <i>Temperatura</i> | 37°C |
| <i>Durata delle prove</i> | Almeno una settimana |
| <i>Monitoraggio</i> | Temperatura, pH, OCP |
| <i>Misure</i> | Stima della velocità di corrosione tramite misurazione della perdita di massa e di LPR |

3.4 Caratterizzazione elettrochimica e delle superfici

A valle dei test descritti nei precedenti paragrafi, i parametri elettrochimici principali possono essere determinati sperimentalmente con prove di polarizzazione potenziodinamica. La prova consiste nella polarizzazione in senso anodico del metallo e nella determinazione grafica dei parametri di cinetica elettrochimica. Il test potenziodinamico sarà effettuato nella soluzione utilizzata durante l'incubazione, nelle stesse condizioni di temperatura e pH riportate nei precedenti paragrafi.

Infine, i coupon saranno analizzati con ulteriori tecniche sperimentali per ottenere una caratterizzazione topologica del biofilm e delle superfici corrose; in particolare, saranno impiegate microscopia SEM (prima e dopo la rimozione del biofilm), profilometria laser (per quantificare la



profondità dei pit) e XRD (per analizzare i prodotti di corrosione e in particolare per identificare la forma del prodotto polimorfico FeS).

3.5 Durata del progetto

Il diagramma di Gantt riportato qui di seguito schematizza la durata prevista di ciascuna fase nell'arco temporale totale del progetto. Sono previsti due rapporti di prova, uno intermedio in cui si descriveranno i risultati dello stato dell'arte e i risultati della fase 2, e uno al termine dell'attività. È prevista una riunione al termine delle attività.

| Mese | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Fase 1 | ■ | ■ | | | | | | | | | | |
| Fase 2 | | ■ | ■ | | | | | | | | | |
| Fase 3 | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| Riunioni | | | | | | | | | | | | ■ |
| Report | | | | | | ■ | | | | | | ■ |



4 Finanziamento

Per lo svolgimento dell'attività descritta si chiede a NACE ITALIA MILANO SECTION un contributo di €20.000,00.