

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS IONES FERROSOS EN LA CORROSIÓN MICROBIOLÓGICA DEL HIERRO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Lisseth Ocando*, Matilde F. de Romero, Orlando Pérez y Oladis T. de Rincón.

Centro de Estudios de Corrosión (CEC)-Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. Maracaibo - Venezuela.

*Autor de correspondencia, E-mail: lissethocando@gmail.com

Recibido: Diciembre 2010. Aprobado: Mayo 2011.

Publicado: Mayo 2011.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como propósito evaluar el efecto de los iones ferrosos (Fe^{++}) en la corrosión microbiológica del hierro por Bacterias Sulfato-Reductoras (SRB) mediante Microscopía Electrónica de Barrido, observando las diferencias en la formación de biopelículas y en el tipo de ataque generado por las SRB sobre este metal en medios de cultivo con y sin la presencia de estos iones. Los resultados mostraron que los iones Fe^{++} aceleran el proceso corrosivo global y se demostró que la posición de la superficie metálica, bien sea horizontal o vertical, influye en la generación de morfologías de ataque distintas, siendo principalmente de tipo uniforme en posición horizontal (Por ejemplo en la hora 6 de una tubería) y muy localizada en posición vertical (horas 3 y 9 de una tubería). Finalmente, se determinó que la condición más agresiva para el hierro en medios con SRB corresponde a un sistema cargado con iones ferrosos en posición vertical, donde los sulfuros de hierro son poco protectores y se desprenden con facilidad generando celdas galvánicas y la posterior aceleración del proceso corrosivo de forma local.

Palabras Clave: Corrosión Microbiológica, Bacterias Sulfato-Reductoras, Iones Ferrosos, Biopelícula, Morfología de Ataque.

EVALUATION OF FERROUS IONS INFLUENCE ON THE MICROBIAL CORROSION OF IRON BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ABSTRACT

The aim of this investigation was to evaluate the effect of the presence of ferrous ions (Fe^{++}) in the microbial corrosion of iron by Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) through Scanning Electron Microscopy (SEM), watching the differences generated in the biofilms and the type of attack in cultures medium with and without these ions. The results showed that the Fe^{++} ions accelerate the corrosive process and it was demonstrated that the position of the metallic surfaces, horizontal or vertical, influences the generation of different attack morphologies, being uniform for horizontal positioned surfaces and localized for vertical placed surfaces. Finally, it was determined that the most aggressive condition for iron surfaces in contact with SRB corresponds to a system with ferrous ions in vertical position, where iron sulfides are little protectives and become detached easily accelerating the corrosion process by formation of galvanic cells.

Keywords: Microbial Corrosion, Sulfate Reducing-Bateria, Ferroue Ions, Biofilm, Attack Morphology.

INTRODUCCIÓN

La Corrosión Microbiológica o MIC por sus siglas en inglés: *Microbiologically Influenced Corrosion*, se refiere al deterioro acelerado de los materiales metálicos por la formación de biopelículas sobre sus superficies, las cuales son el resultado de un proceso de acumulación de sedimentos, grupos bacterianos y productos de corrosión, no necesariamente de forma homogénea, que se inicia

inmediatamente después de la inmersión del metal en un medio acuoso cargado con diferentes grupos de microorganismos [1]. Estas biopelículas pueden ser consideradas como geles compuestos por 95 % (o más) de agua y de una matriz exopolimérica llamada comúnmente EPS, también por sus siglas en inglés: *Extracellular Polymeric Substance*, donde las células

microbiológicas y los compuestos orgánicos e inorgánicos se encuentran suspendidos [2].

Debajo de estas biopelículas ocurre la disolución del metal y la subsecuente formación de productos de corrosión, produciéndose una interacción entre las capas de dichos productos y la biopelícula [3].

Otro factor importante relacionado con la corrosión microbiológica es el tipo de microorganismo asociado al conglomerado polimérico. Uno de los principales grupos bacterianos citado como altamente corrosivo es el de las Bacterias Sulfato-Reductoras (SRB) [4]. Estas bacterias generan H_2S como producto final de su metabolismo, produciéndose sobre la compleja interfase metal-solución sulfuros metálicos (sulfuros de hierro o FeS , para el caso de las aleaciones ferrosas) los cuales se entremezclan con la biopelícula y los demás compuestos presentes en el medio acuoso. Los sulfuros de hierro pueden generarse por los iones liberados por el proceso corrosivo del metal y/o por los iones ferrosos contenidos en el medio electrolito.

Varias investigaciones han establecido que la presencia de los iones ferrosos en el medio acelera el proceso corrosivo del acero. Adams y Farrer (1953) determinaron que los productos metabólicos de las bacterias son factores importantes en la corrosión microbiana [5]. Establecieron que las velocidades de corrosión (realizada por pérdida de peso) fueron mayores en medios conteniendo una alta cantidad de hierro soluble (Fe^{++}) que en aquellos en donde estos iones no estuvieron presentes. Estos investigadores atribuyeron los resultados descritos a los sulfuros de hierro formados, ya que los mismos fueron completamente diferentes en ambos medios. En ausencia de hierro soluble, el producto encontrado fue duro y muy adherente y la examinación microscópica reveló cristales bien definidos, lo que pudo proteger al material; por otro lado, en medios con Fe^{++} no se reportó la presencia de ninguno de estos cristales sobre las muestras corroídas

describiendo la superficie como cubierta por una capa negra mate.

Por otro lado, Videla y col. (1988) realizaron un resumen de la influencia de los iones ferrosos en el proceso de corrosión microbiana por SRB, demostrando su complejidad [6]. Determinaron que el tipo de sulfuro de hierro formado (bien sea una película compacta, un precipitado suave o una suspensión) condicionaba el efecto de estos iones en la disolución del metal y concluyeron que los procesos globales de disolución en la interfase no pueden ser considerados como resultado de la suma de los efectos individuales causados por el cambio en parámetros particulares, sino que es el resultado de cambios simultáneos causados por interacciones sinérgicas o inhibitorias entre aniones, cationes y productos de corrosión.

Beech y Gaylarde (1999), reportaron diferentes estudios realizados en donde se destaca la influencia de estos iones en la severidad del ataque microbiano [7]. Estos autores hacen referencia a otros investigadores quienes demostraron que altos niveles de hierro soluble aumentaban la velocidad de corrosión del acero y que esto estaba ligado a una disminución del pH.

Royer y Unz (2005) realizaron una investigación sobre el efecto de los iones ferrosos, la reducción de sulfatos y los esfuerzos en la velocidad y naturaleza de MIC del acero al carbono por la *Desulfovibrio desulfuricans subespecie aestuarii* [8]. Utilizaron la técnica de Resistencia Eléctrica para monitorear la velocidad de corrosión de un delgado alambre de acero. En algunos ensayos inhibieron el proceso de reducción de sulfatos con Molibdato de Sodio (Na_2MoO_4) para demostrar la importancia del mismo en la iniciación y el mantenimiento de la agresividad de MIC. Observaron que una corrosión mesurable de la probeta ocurría cuando el proceso de reducción de sulfatos estaba activo (sin molibdato) y para concentraciones de hierro soluble (Fe^{++}) mayores a 1 mM (56 ppm). A altos niveles de

estos iones, 12 y 18 mM (670 y 1000 ppm, respectivamente) la resistencia eléctrica medida fue significativamente superior, lo que indicó una mayor disolución del alambre y los tiempos de falla o ruptura fueron largos (corrosión uniforme). A bajas concentraciones de Fe^{++} los tiempos de ruptura fueron menores, pero se registró una menor disolución del metal (corrosión localizada). Debido a esto, los investigadores concluyeron que la corrosión microbiológica del acero fue tanto localizada como uniforme, dependiendo de la concentración de iones ferrosos en el medio y que ambos mecanismos eran dependientes del proceso de reducción de sulfatos, lo que demuestra la importancia de este proceso para la ocurrencia de MIC.

Por su parte, F. de Romero (2005), propuso un mecanismo de acción para la participación de las SRB en casos de MIC, basado en la producción de H_2S por parte de estas bacterias y en la formación de productos de corrosión [9]. Este mecanismo corresponde a un sistema experimental que analizó el acero al carbono expuesto a un medio con SRB con una alta concentración de iones ferrosos (200 mg/L).

En dicha investigación se establece que son los sulfuros de hierro generados por las SRB los que aceleran el proceso corrosivo local, ya que se generan películas poco adherentes y porosas que se desprenden con facilidad, generando corrosión galvánica por la naturaleza catódica de dichos sulfuros con respecto al hierro.

De acuerdo a lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo primordial corroborar la influencia adversa de los iones ferrosos en la corrosión microbiológica del hierro por SRB, considerando igualmente el efecto que puede generar sobre este proceso la posición del sistema a estudiar (horizontal o vertical), utilizando para ello la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando cupones de hierro (99,99%) de 20 mm de largo por 10 mm de ancho y un espesor de 4 mm. Dichos cupones fueron lijados con papel de carburo de silicio a diferentes granulometrías (100, 240, 360, 400 y 600), esterilizados con etanol absoluto y expuestos, posteriormente, a luz U.V. por 24 horas. Los cupones fueron sumergidos, en posición horizontal y vertical, en un medio de cultivo anaeróbico selectivo para las SRB, cuya composición se presenta en la Tabla 1. Se destaca que se añadió 200 mg/L de Fe^{++} en la versión con iones ferrosos y 0 mg/L en la correspondiente sin iones ferrosos.

Luego, los viales conteniendo cada tipo de medio de cultivo se inocularon, en un 10%, con una cepa pura comercial de SRB: *Desulfovibrio desulfuricans*. Todos los viales se mantuvieron por 24 horas en incubadora a 37 °C, tiempo en el cual se extrajeron para ser preparados y observados con el Microscopio Electrónico de Barrido (Philips, modelo XL 30 DX4i), acoplado a un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDAX, modelo DX4) con el cual se realizó análisis químico elemental de los productos formados sobre los cupones. Cabe destacar que los ensayos se realizaron por duplicado y se colocaron cupones en viales conteniendo sólo los medios estériles para hacer las veces de viales patrón (Figura 1) y corroborar el mantenimiento de la esterilidad al cabo de las 24 horas de exposición.

Una vez extraídos, los cupones fueron sumergidos en una solución de glutaraldehído al 2,5%, en búfer de cacodilato de potasio 0,01 M, pH= 7,4, por un periodo de 3 horas a 4 °C. Luego se deshidrataron paulatinamente con soluciones de acetona de diferentes concentraciones (30, 50, 70, 90 y 100%), mantenidos también a esa temperatura, y se metalizaron con oro antes de su observación al microscopio. Para la observación de la morfología de ataque, los cupones fueron decapados y preparados siguiendo la norma ASTM G1-03 [10].

Tabla 1. Composición del Medio de Cultivo utilizado para 1 L de agua destilada.

Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$)	2,0 g
Citrato de Sodio ($C_6H_5Na_3O_7$)	5,0 g
Sulfato de Calcio ($CaSO_4$)	1,0 g
Cloruro de Amonio (NH_4Cl)	1,0 g
Fosfato Dipotásico (K_2HPO_4)	2,5 g
Lactato de Sodio ($C_3H_5NaO_3$)	3,5 g
Extracto de Levadura	1,0 g
Sulfato de Amonio [$(NH_4)_2SO_4$] o Sulfato de Amonio Ferroso [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$] al 5 %	20,0 mL
Ascorbato de Sodio ($C_6H_7NaO_6$) al 5 %	10,0 mL
Tioglicolato de Sodio ($C_2H_3NaO_2S$) al 5 %	10,0 mL

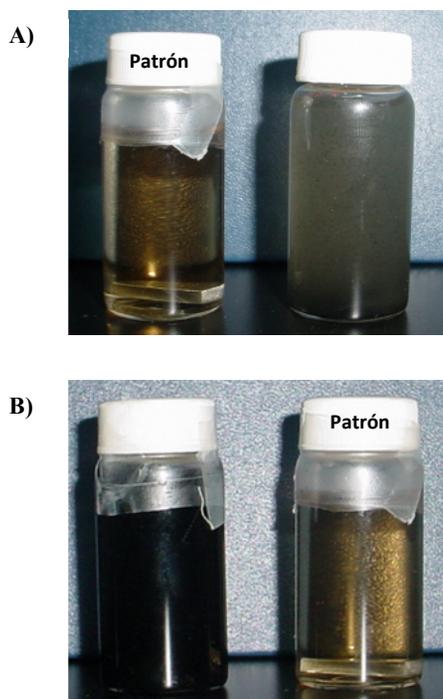


Fig. 1. Viales con medios de cultivo inoculados con *D. desulfuricans* versus cada patrón estéril, con 24 horas de incubación. A) Medio sin iones ferrosos; B) Medio con iones ferrosos. Nótese las diferencias en la coloración de los medios debido a la presencia de los iones ferrosos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la Biopelícula en medios de cultivo sin y con iones ferrosos. Posición Horizontal.

En la Figura 2 se presenta la morfología de biopelícula formada sobre los cupones de hierro en posición horizontal a las 24 horas de exposición a la *D. desulfuricans*, para los medios con y sin iones ferrosos,

tomadas a una magnificación de 250X. Adicionalmente, en dicha figura se muestra una microfotografía típica obtenida a 1000 X, para los cupones patrón mantenidos en 24 horas en los medios de cultivo estériles.

Para el caso del medio de cultivo sin iones ferrosos, las biopelículas formadas parecieron ser delgadas, uniformes y/o compactas, con pequeña densidad de sulfuros de hierro (Figura 2A). Contrariamente, las imágenes de las biopelículas formadas en el medio cargado con iones ferrosos mostraron una mayor densidad de productos de corrosión entremezclados con el EPS bacteriano (Figura 2B).

Para el caso de los cupones patrón, no se apreció formación de biopelícula alguna sobre ellos aún a magnificaciones mayores (1000X), tal y como se muestra en la Figura 2C. Sólo se pudo apreciar la formación de una capa homogénea inorgánica presumiblemente formada por carbonatos y/o sulfatos provenientes del medio de cultivo. Esto evidenció el mantenimiento de la esterilidad en estos sistemas al cabo de las 24 horas de exposición.

Mayores magnificaciones para la biopelícula formada en el medio sin iones ferrosos muestran, claramente, el gran número de SRB entrelazadas con el exopolímero y los productos de corrosión (Figura 3).

El análisis químico a través de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) evidenció que estos productos de corrosión estaban conformados de hierro (Fe) (62,220 %) y Azufre (S) (26,569 %) principalmente, confirmando que el producto formado es del tipo Fe_xS_y o Sulfuro de Hierro (Figura 4).

Con respecto a los cupones sumergidos en el medio con iones ferrosos, el proceso de observación de la biopelícula no fue tan fácil. La alta densidad de los sulfuros precipitados sobre las láminas no permitía observar las bacterias a una mayor magnificación (Figura 5A). La observación de la biopelícula se logró haciendo un acercamiento en las zonas menos profundas de la

misma, aprovechando el lugar donde se manipuló el cupón para su observación al microscopio (Figura 5B).

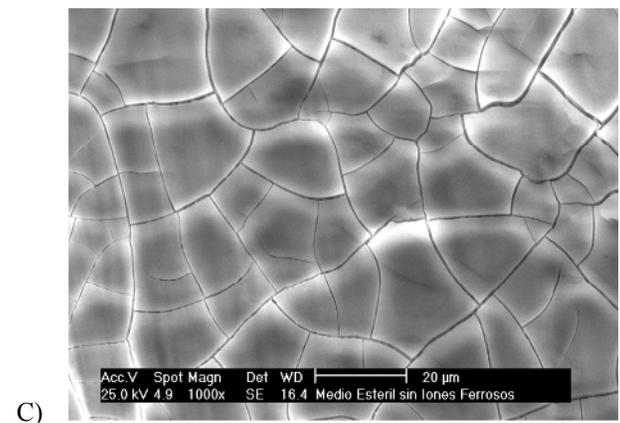
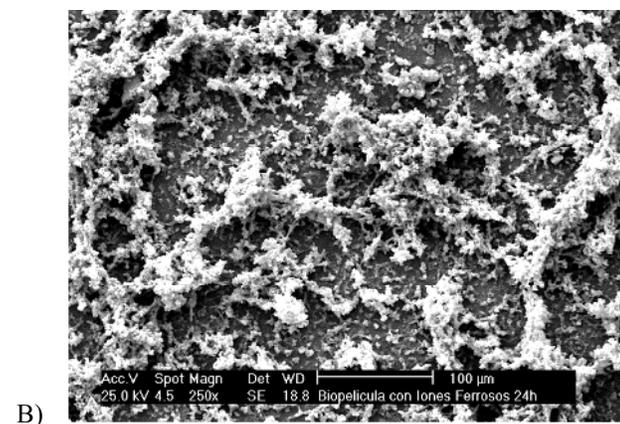
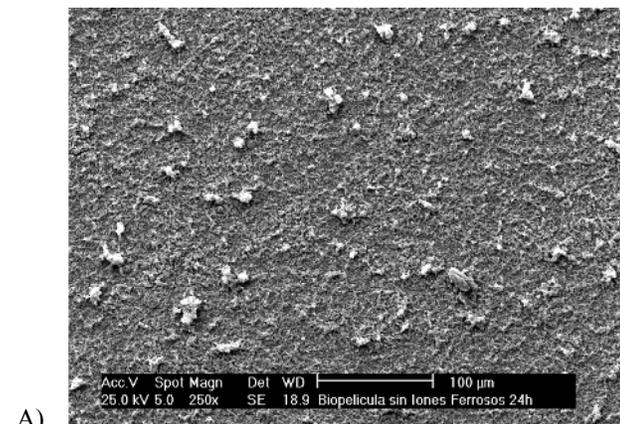


Fig. 2. Fotomicrografías de las biopelículas de *D. desulfuricans* a las 24 horas de exposición en ambos medios de cultivo. Posición horizontal. A) Sin iones Fe^{++} ; B) Con iones Fe^{++} ; C) Fotomicrografía típica de la película formada sobre los cupones patrón a 1000X.

Al hacer esto, si se pudo observar las bacterias (Figura 5C), algunas de las cuales también se encontraban

entrelazadas con los sulfuros precipitados como sucedió con el medio sin iones ferrosos.

Los resultados de la observación mediante SEM de las biopelículas formadas en este medio de cultivo permiten inferir que las SRB van colonizando la superficie metálica ocurriendo, simultáneamente, la precipitación masiva de los sulfuros de hierro provenientes del inóculo bacteriano y la adsorción de los productos formados por la corrosión del metal. Cabe destacar que este proceso de precipitación está favorecido por la posición horizontal de la lámina.

Evaluación de la Biopelícula en medios de cultivo sin y con iones ferrosos. Posición Vertical.

Los resultados de las biopelículas para ambos medios de cultivo en posición vertical se presentan en la Figura 6, a una magnificación de 250X. En este caso, la densidad de los productos de corrosión y de la biopelícula fue mucho menor que para los cupones colocados en posición horizontal, demostrando que el proceso de precipitación es un factor determinante para la formación de la biopelículas sobre los sustratos metálicos.

Para el caso de los cupones colocados en posición vertical en presencia de iones ferrosos, las bacterias si pudieron ser observadas claramente, mezcladas con EPS y sulfuros de hierro (Figura 7).

Adicionalmente, en una de las imágenes tomadas para el cupón en estas condiciones, pudo medirse el espesor de la biopelícula deshidratada (Figura 8), dando como resultado 20 μm , aproximadamente. Esto concuerda con los valores reportados en la literatura que estima el espesor de las biopelículas bacterianas entre 20 y 100 μm [2].

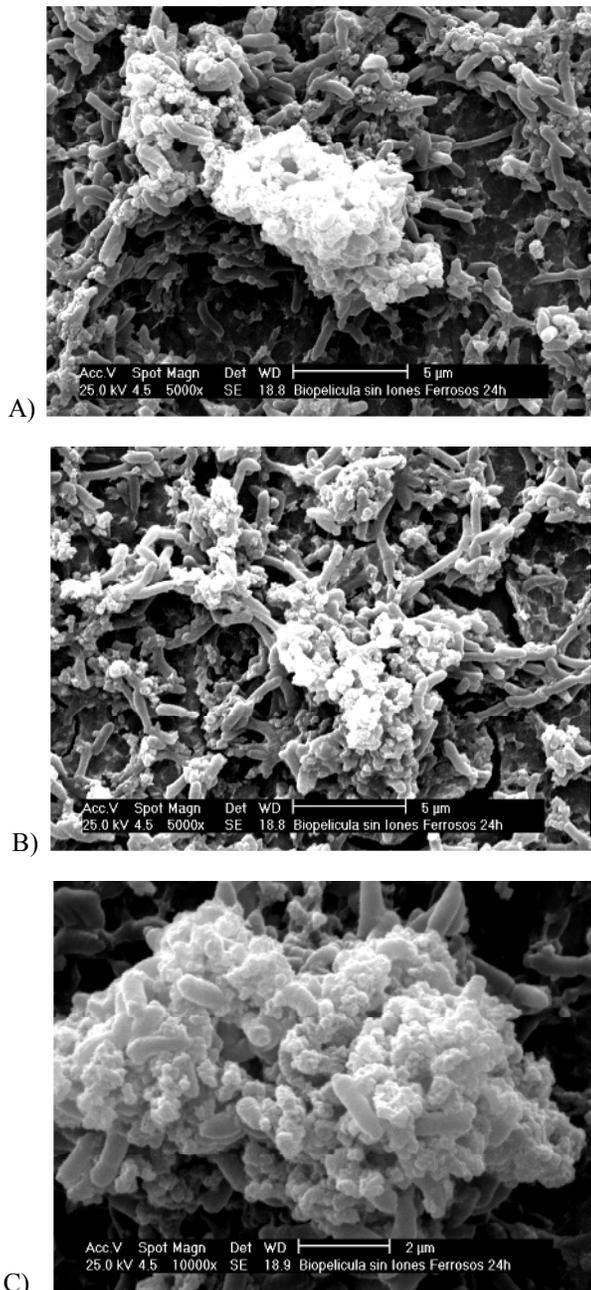


Fig. 3. Fotomicrografías de las biopelículas de *D. desulfuricans* a las 24 horas formadas en el medio de cultivo sin iones ferrosos y en posición horizontal. A y B) 5000X; C) 10000X.

Morfología de Ataque en medios de cultivo sin y con iones ferrosos.

En las Figuras 9 y 10 se presentan las fotomicrografías (a 1000X) más representativas de las superficies de hierro atacadas por las SRB para cada uno de los casos

evaluados: con y sin iones ferrosos y posición horizontal y vertical.

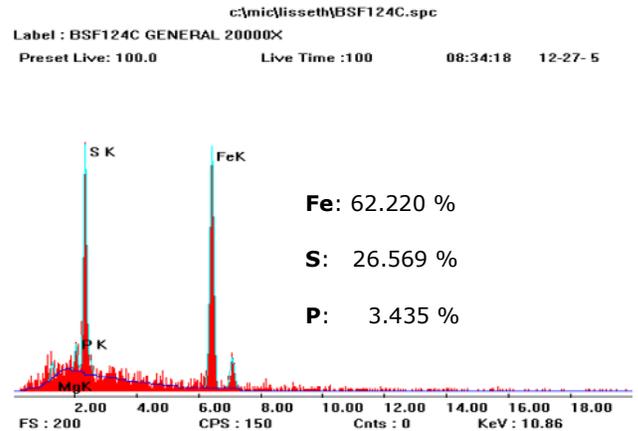
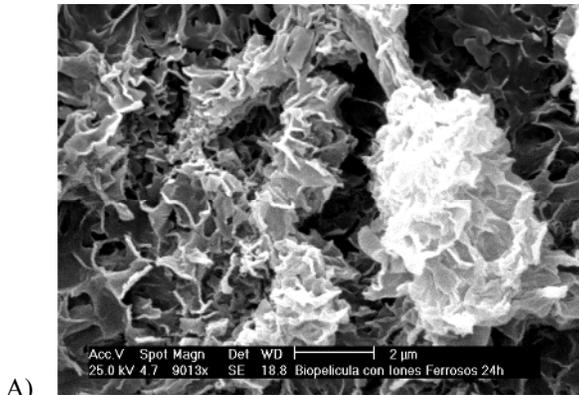


Fig. 4. EDS para un cúmulo de bacterias y productos de corrosión formado sobre la superficie metálica en un medio sin iones ferrosos.

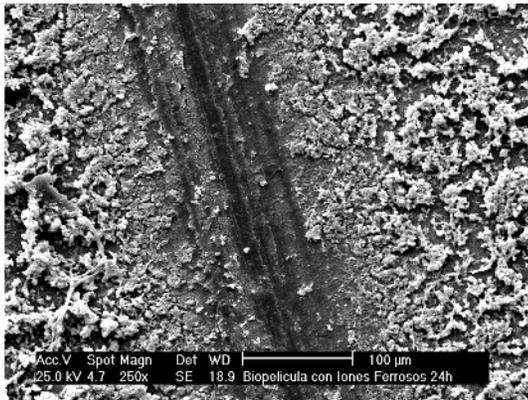
En el caso del medio sin iones ferrosos en ambas posiciones (Figuras 9A y 9B), las imágenes muestran el ataque de tipo localizado generado, comúnmente, por este grupo bacteriano, hoyuelos redondeados y poco profundos, pero se aprecia que estos hoyuelos son escasos y muy localizados, siendo ligeramente mayor el ataque generado sobre el cupón colocado en posición vertical. Las imágenes permiten inferir que al ser escasa la cantidad de iones ferrosos disponibles en el medio, las bacterias se adsorben sobre las superficies metálicas formando biopelículas aparentemente más uniformes y/o compactas (como se apreció en la Figura 2A) y generan cierta protección temporal que va modificándose según la dinámica que se suscite en la interfase ante la presencia de estos productos, segregaciones celulares y diferenciales iónicas, lo que eventualmente genera los daños localizados observados.

Para el caso del medio de cultivo con presencia de iones ferrosos (Figuras 10A y 10B), se muestra que las superficies son igualmente susceptibles a la corrosión localizada generada por estas bacterias, sin embargo,

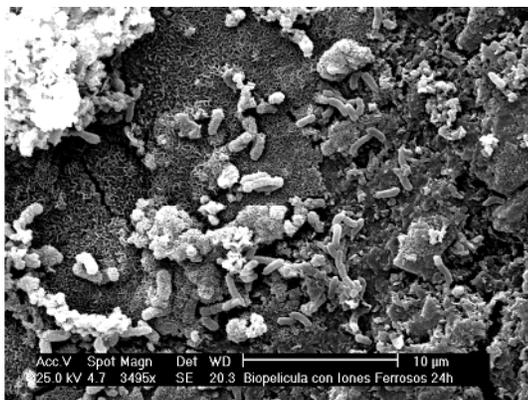
puede diferenciarse que el ataque tiende a ser mayor que en el medio sin Fe^{++} , igualmente observando mayor daño de tipo local en los cupones posicionados verticalmente (Figura 10B).



A)



B)

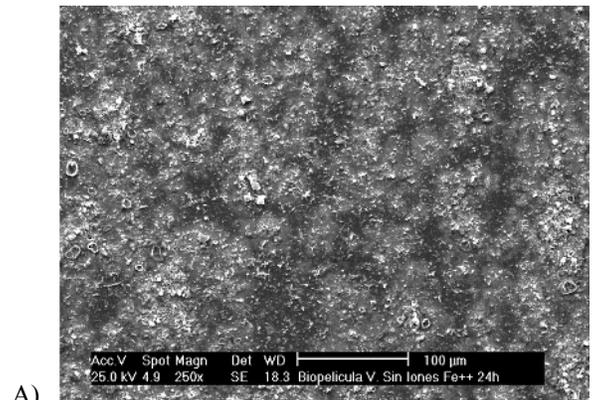


C)

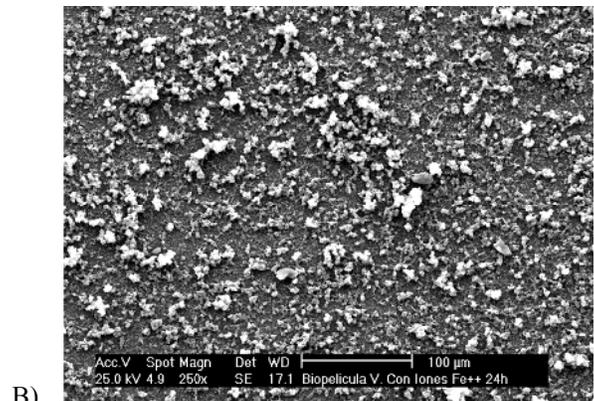
Fig. 5. Fotomicrografía de la biopelícula de *D. desulfuricans* a las 24 horas en medio de cultivo con iones ferrosos en posición horizontal A) 9000X. B) lugar donde los sulfuros de hierro fueron removidos y las bacterias pudieron ser observadas, 250X; C) magnificación de la figura B, 3495X.

Esto último, muy probablemente se debe al desprendimiento de la biopelícula generado por la acción de la gravedad, lo cual acelera la corrosión localizada por formación de pares galvánicos hierro-sulfuro de hierro, con relación de áreas desfavorables.

De acuerdo a estos resultados se puede indicar que la biopelícula formada por este grupo bacteriano, entramada con productos de sulfuros de hierro no protectores, generan un ataque severo confirmando la tesis expuesta de que son los sulfuros de hierro los que agravan el proceso corrosivo por acción de las Bacterias Sulfato-Reductoras.



A)



B)

Fig. 6. Fotomicrografías de las biopelículas de *D. desulfuricans* a las 24 horas de exposición en ambos medios de cultivo a 250X. Posición vertical. A) Sin iones Fe^{++} B) Con iones Fe^{++} .

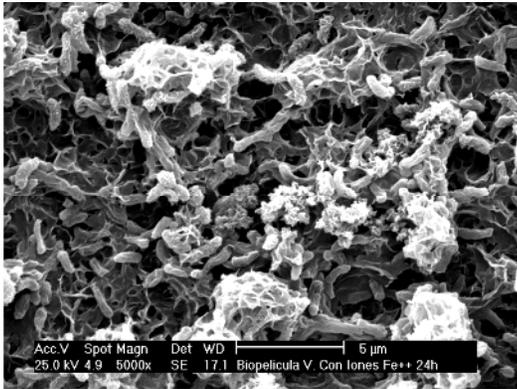
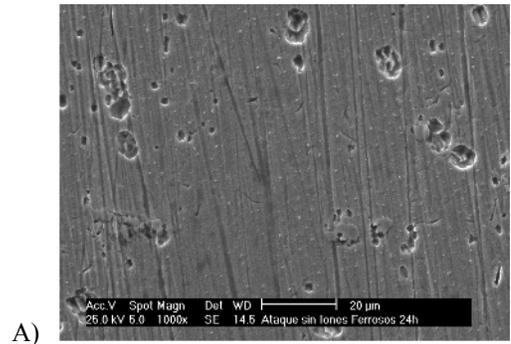
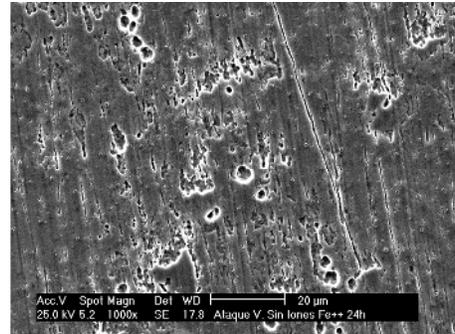


Fig. 7. Biopelícula formada sobre una lámina en posición vertical en presencia de iones ferrosos (5000X).

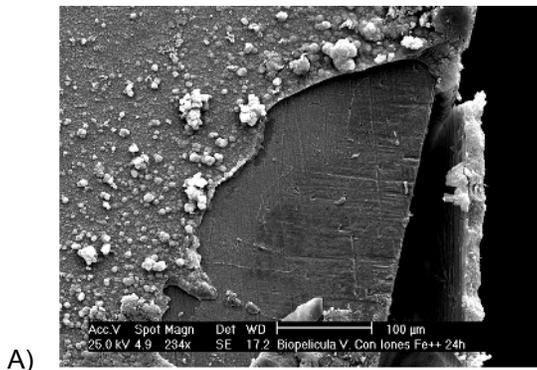


A)

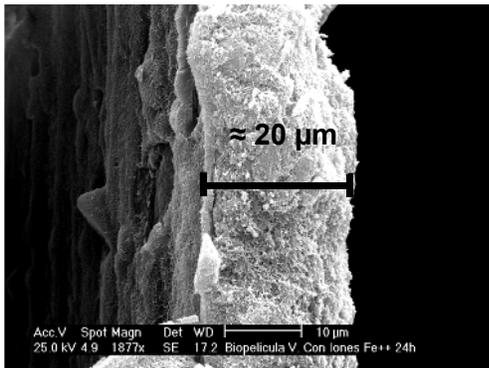


B)

Fig. 9. Morfología de ataque para los cupones expuestos por 24 horas a *D. desulfuricans* en el medio de cultivo sin iones ferrosos. A) Posición horizontal. B) Posición vertical. 1000 X.

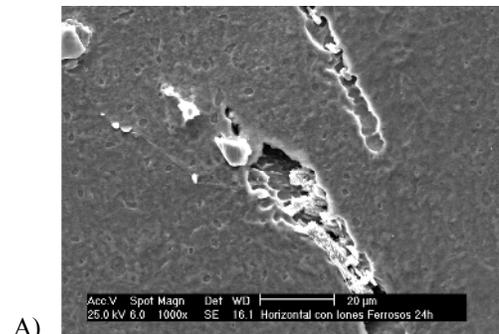


A)

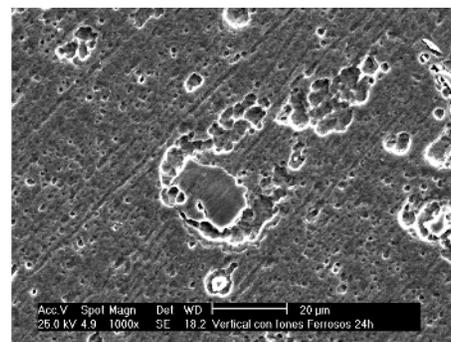


B)

Fig. 8. Fotomicrografías de una zona de un cupón en posición vertical con biopelícula desprendida. A) 234X. B) 1877X.



A)



B)

Figura 10. Morfología de ataque para los cupones expuestos por 24 horas a *D. desulfuricans* en el medio de cultivo con iones ferrosos. A) Posición horizontal. B) Posición vertical. 1000 X.

CONCLUSIONES

1. Se confirmó que los iones ferrosos aceleran el proceso de corrosión microbiológica del hierro por la formación de productos de sulfuros de hierro no protectores generados bióticamente.
2. Las fotomicrografías tomadas con SEM confirmaron que el daño de MIC es de tipo localizado, caracterizado por la formación de hoyuelos aislados y/o coalescentes. No obstante, los daños localizados varían en su severidad según la presencia de los iones ferrosos del medio.
3. La condición más severa para el metal ocurrió cuando éste estaba en posición vertical y los iones ferrosos estaban presentes (corrosión altamente localizada), dado que la corrosión se ve favorecida por el desprendimiento de la biopelícula por la acción de la gravedad y la subsecuente formación de pares galvánicos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación estuvo financiada por el FONACIT bajo el número de proyecto G-2000001606. Gracias especiales a FUNDACITE-Zulia por el aporte prestado para la divulgación de esta información.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] B. Little, P. Wagner, F. Mansfeld, *Microbiologically Influenced Corrosion*. NACE, Houston, 1991.
- [2] H. Videla, *Manual of Biocorrosion*. Lewis Publishers, New York, 1991.
- [3] H. Videla, *Microbially Induced Corrosion: an update overview*. Elsevier Applied Science, London, 1991.
- [4] J. Stoecker, *A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion*. NACE, Houston, 2001.
- [5] Adams, M., Farrer, W. (1953) "The Influence of ferrous iron on bacterial corrosion". *J. appl. Chem.*: 3: 117-120.

- [6] Videla, H., Swords, C., Fernández, L., Edyvean, R., Watkins, P., Beech, I. (1998) "The Role of Iron in SRB Influenced Corrosion of Mild Steel". *Corrosion* 98289: 1-13.
- [7] Beech, I., Gaylarde, C. (1999) "Recent Advances in the Study of Biocorrosion - An overview". *Revista de Microbiologia* 30: 177-190.
- [8] Royer, R., Unz, R. (2005) "Influence of Ferrous Iron on the Rate and Nature of Microbiologically Influenced Corrosion of High Strength Steel under Sulfate-Reducing Conditions". *Corrosion* 61(11): 1070-1077.
- [9] F. de Romero, M. (2005) "The Mechanism of SRB Action in MIC Based on Sulfide Corrosion Products and Iron Sulfide Corrosion Products". *Corrosion* 05481: 1-30.
- [10] ASTM G1-03: "Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens". ASTM Internacional, 2003.