

MINISTERIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
METALÚRGICA E DOS MATERIAIS - PPGEMM

ESTUDO DA CORROSAO DO AÇO ABNT 1006  
INFLUENCIADA POR BACTERIAS  
*Pseudomonas aeruginosa*

por

ELIENA JONKO BIRRIEL  
Química

Trabalho realizado no Departamento de Engenharia  
Metalúrgica da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro  
do Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Metalúrgica e dos Materiais

PORTO ALEGRE  
- 1993-

ESTUDO DA CORROSAO DO AÇO ABNT 1006  
INFLUENCIADA POR BACTERIAS  
*Pseudomonas aeruginosa*

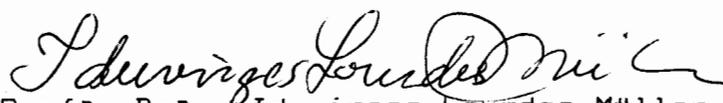
DISSERTAÇÃO

Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica  
e dos Materiais - PPGEMM, como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de

MESTRE EM ENGENHARIA  
AREA DE CONCENTRAÇÃO: CIENCIA DOS MATERIAIS

por  
ELIENA JONKO BIRRIEL  
Química

Esta DISSERTAÇÃO foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, Area de Concentração Ciência dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.



Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iduvirges Lourdes Müller

- UFRGS / PPGEMM

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. M.Sc. Christine Gaylard

- UFRGS/Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e Ambiental

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jane Zoppas Ferreira

- UFRGS/PPGEMM

Prof. Dr. Luis Frederico Pinheiro Dick

- UFRGS/PPGEMM

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iduvirges Lourdes Müller

- UFRGS/PPGEMM



Coordenador do PPGEMM

Prof. Dr. Carlos Hoffmann Sampaio

*Ao Paulo e Paulinho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Professora Iduvirges Lourdes Müller pela orientação segura, dedicação, apoio e amizade.

A minha amiga Gelsa Edith Englert pelo incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC).

Aos Professores, Funcionários e colegas do PPGEMM/UFRGS.

A Biblioteca da Escola de Engenharia.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

Neste trabalho estudou-se o comportamento do aço ABNT 1006, em soluções de água do mar sintética diluída em presença e ausência de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, bem como de seus produtos metabólicos. Também investigou-se o comportamento de um inibidor de corrosão - hexametáfosfato de sódio, nestes meios.

Utilizou-se os seguintes métodos: técnicas de microbiologia, medições da variação do potencial de corrosão com o tempo, ensaios gravimétricos e determinação de curvas de polarização potencioestática.

O hexametáfosfato de sódio comportou-se como inibidor catódico, e observou-se a formação de um filme na superfície do aço. Em sistemas com bactérias ocorreu a formação de um biofilme na superfície metálica, induzindo a corrosão do tipo pite. A presença de bactérias também alterou a atuação do filme do inibidor.

## ABSTRACT

This paper evaluated the behavior of ABNT 1006 steel in contact with solutions of diluted artificial sea water containing bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and their metabolic products. The behavior of ABNT 1006 steel in such conditions was then compared to that observed in solutions with no bacteria culture. The study also investigated the effectiveness of sodium hexametaphosphate as a corrosion inhibitor in those media.

The following methods were employed: microbiological techniques, measurement of potential/time curves, weight loss measurements and of potentiostatic polarization curves.

The analyses showed that sodium hexametaphosphate behaved as a cathodic inhibitor forming a film on the steel surface. It was also observed the formation of a biofilm on the metal surface, which induced its pitting in media containing bacteria. The presence of bacteria also influenced the action of the inhibitor.

## SUMARIO

	Pag
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUÇÃO.....	1
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>3</b>
1.1 Desenvolvimento histórico.....	3
1.2 Formação do biofilme.....	4
1.3 Adesão de células bacterianas em superfícies.....	6
1.3 a Aspectos fisico-químicos da adesão bacteriana.....	6
1.3.a.i Forças de longo alcance.....	7
1.3 a ii Forças de pequeno alcance.....	11
1.3.a iii Formação de filme adsorvido.....	12
1.4 Propriedades do substrato.....	13
1.5 Experiências com diversos substratos.....	15
1.6 Outros fatores que podem influenciar a adsorção.....	16
1.7 Corrosão de metais em meios aquosos.....	20
1.8 A corrosão microbiológica.....	21
1.8.a Microorganismos associados com corrosão.....	21
1.8.b Mecanismos de corrosão microbiológica.....	22
1.9 Medidas de corrosão microbiológica usando técnicas eletroquímicas.....	24
1.10 Inibidores de corrosão.....	26
1.11 Principais fosfatos.....	29
1.11 a Fosfato monobásico de sódio.....	29
1.11 b Hexametáfosfato de sódio.....	30
<b>2 MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 Materiais.....	32
2.1.1 Corpos de prova.....	32
2.1.2 Soluções.....	32
2.2. Métodos de microbiologia.....	34
2.2.1 Esterilização do material e assepsia do local de trabalho.....	35
2.2.2. Técnicas de semeadura.....	35
2.2.2.1. Métodos de preparação do inóculo.....	36
2.2.2.1.a Método 1.....	36
2.2.2.1 b Método 2.....	36
2.2.2.2 Acompanhamento do desenvolvimento das culturas de bactérias durante a realização dos ensaios.....	36
2.2.3 Microscopia.....	37
2.2.3.a Microscopia eletrônica.....	37
2.2.3.b Microscopia ótica.....	37
2.3 Equipamentos.....	37
2.4 Métodos.....	38

2.4.1	Testes de acompanhamento do potencial x tempo.....	38
2.4.2	Ensaio de perda de massa.....	38
2.4.3	Curvas de polarização potencioestática.....	39
2.4.3.1	Curvas de polarização em água do mar sintética a 10%....	39
2.4.3.2	Curvas de polarização em água do mar sintética a 1,5% com 0,01% de peptona bacteriológica.....	40
2.4.3.3	Curvas de polarização em água do mar sintética a 1,5% com hexametáfosfato de sódio.....	40
2.4.3.4	Curvas de polarização com produtos metabólicos.....	40
<b>3</b>	<b>RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>42</b>
3.1	Crescimento dos microrganismos.....	42
3.2	Acompanhamento do potencial a circuito aberto.....	43
3.2.1	Ensaio realizado sem a presença de microrganismos.....	43
3.2.1.a	Em água do mar sintética diluída a 10%.....	43
3.2.1.b	Em meio de cultura líquido.....	43
3.2.1.c	Em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	43
3.2.1.d	Em diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio.....	47
3.2.2	Ensaio de potencial a circuito aberto na presença de bactérias.....	49
3.2.2.a	Em água do mar sintética diluída a 10%.....	49
3.2.2.b	Em meio de cultura líquido.....	52
3.2.2.c	Em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	52
3.2.2.d	Com a concent. de 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	57
3.3	Ensaio de perda de massa.....	58
3.3.a	Ensaio abiótico.....	58
3.3.b	Ensaio biótico.....	59
3.4	Curvas de polarização potencioestática.....	71
3.4.1	Curvas de polarização potencioestática sem a presença de bactérias.....	71
3.4.1.a	Em água do mar sintética diluída a 10%.....	71
3.4.1.b	Em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	71
3.4.1.c	Em água do mar sintética diluída a 1,5% com diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio.....	77
3.4.2	Curvas de polarização potencioestática realizadas na presença de bactérias.....	91
3.4.2.a	Em água do mar sintética diluída a 10%.....	91
3.4.2.b	Em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	91
3.4.2.c	Em água do mar sintética diluída a 1,5% e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	102
3.4.3	Curvas de polarização potencioestática em água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos.....	103
<b>4</b>	<b>Discussão dos resultados.....</b>	<b>123</b>
4.1	Crescimento do microrganismo.....	123
4.2	Ensaio de acompanhamento de potencial a circuito aberto...123	123
4.2.a	Acompanhamento do potencial a circuito aberto em água do mar sintética diluída a 1,5% com hexametáfosfato de sódio.....	130
4.3	Curvas de polarização potencioestática.....	134
4.3.1	Curvas de polarização potencioestática em água do mar sintética diluída.....	134
4.3.1.a	Em água do mar sintética diluída a 10%.....	134
4.3.1.b	Em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	135

4.3.2 Em água do mar sintética diluída a 1,5% com hexametáfosfato de sódio.....	139
4.3.2.a Sem bactérias.....	140
4.3.2.b Com bactérias.....	143
4.3.3 Curvas de polarização potencioestática realizadas com produtos metabólicos.....	146
4.4 Discussão geral.....	149
CONCLUSÕES.....	153
SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	
BIBLIOGRAFIA.....	155
APENDICE.....	160

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Fig.01 Representação esquemática de um consórcio bacteriano na superfície do metal.....	6
Fig.02 Representação esquemática de uma partícula aproximando-se de uma superfície macroscópica.....	8
Fig.03 Interação da energia livre ( $G_i$ ) versus separação ( $h$ ) como uma função da concentração do eletrólito ( $c$ ), para uma partícula carregada aproximando-se de uma superfície macroscópica de mesmo sinal. $G_A$ é a energia livre de atração e $G_R$ é a energia livre de repulsão .....	9
Fig.04 Interação da energia livre ( $G_i$ ) versus separação ( $h$ ) como uma função da concentração do eletrólito ( $c$ ), para uma partícula carregada aproximando-se de uma superfície macroscópica de sinais opostos .....	10
Fig.05 Relação entre a concentração da cultura e o número de células que começam a se fixar depois de 2 horas (O) Fase log, (O) Fase estacionária, ( ) Fase de morte .....	16
Fig.06 Relação entre o tempo para a fixação e o número de células aderidas. (O) Fase log, (O) Fase estacionária, ( ) Fase de morte.....	16
Fig.07 Colônias de bactérias após 24 horas em estufa (Plaqueamento).....	44
Fig 7a Colônia de bactérias após 24 horas em estufa.(Plaqueamento retirado da solução contaminada).....	44
Fig.08 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída a 10% na presença e ausência de bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
Fig.9 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em meio de cultura líquido, na presença e ausência de bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
Fig.10 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída a 1.5%.....	46
Fig.11 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	46
Fig.12 Aparência dos corpos de prova após ensaios com hexametáfosfato de sódio.....	48

Fig.13 Aspecto da superfície do aço ABNT (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....48

Fig.14 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006, em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio na ausência e presença de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....50

Fig.15 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 e 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio (sem bactérias).....50

Fig.16 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....53

Fig.17 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....53

Fig.18 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....54

Fig.19 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....54

Fig.20 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....55

Fig.21 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa* .....55

Fig.22 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....56

Fig.23 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....56

Fig.24 Acompanhamento do pot.de corrosão do aço ABNT 1006, em água do mar sintética diluída a 1,5%, na presença de bactérias.....51

Fig.25 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa* .....60

Fig.26 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.....60

Fig.27	Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
Fig.28	Ensaio gravimétrico realizado em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias.....	61
Fig.29	Ensaio gravimétrico realizado em água do mar sintética diluída a 1,5%.....	62
Fig.30	Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	62
Fig.31	Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	63
Fig.32	Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	63
Fig.33	Plaqueamento realizado da solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias e hexametáfosfato de sódio.....	64
Fig.34	Plaqueamento realizados da solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias sem hexametáfosfato de sódio.....	64
Fig.35	Aparência dos corpos de prova após o ensaio de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5% (meio abiótico).....	65
Fig.36	Aparência dos corpos de prova após o ensaio de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	66
Fig.37	Aparência dos corpos de prova após o ensaio de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, na presença de bactérias....	66
Fig.38	Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de Clark (ensaio realizado em água do mar sint. diluída a 1,5%).....	67
Fig.39	Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de clark (ensaio realizado em água do mar sintética diluída a 1,5% e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio).....	67
Fig.40	Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de Clark (ensaio realizado em água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias.).....	68
Fig.41	Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de Clark (ensaio realizado em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias.....	68

Fig.42 Aparência do corpo de prova embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.....	69
Fig.43 Aparência do corpo de prova, embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias depois de 24 horas de crescimento.....	69
Fig.44 Aparência do corpo de prova, embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias depois de 48 horas de crescimento.....	70
Fig.45 Aparência do corpo de prova, embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias depois de 72 horas de crescimento.....	70
Fig.46 Curva de polarização potencioestática para aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10%.....	72
Fig.47 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.....	73
Fig.48 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.....	74
Fig.49 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%. .....	75
Fig.50 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.....	76
Fig.51 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 50 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	79
Fig.52 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 50 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	80
Fig.53 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 100 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	81
Fig.54 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 100 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	82
Fig.55 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 500 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	83

Fig.56 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 1000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	84
Fig.57 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	85
Fig.58 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	86
Fig.59 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	87
Fig.60 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	88
Fig.61 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	89
Fig.62 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 5000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....	90
Fig.63 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10% com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	92
Fig.64 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10% com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	93
Fig.65 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10% com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	94
Fig.66 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Ensaio realizado logo após o inóculo.....	95
Fig.67 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Ensaio realizado 24 h após o inóculo....	96
Fig.68 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Ensaio realizado 48 h após o inóculo.....	97

- Fig.69 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 72 h após o inóculo.....98
- Fig.70 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 96 h após o inóculo.....99
- Fig.71 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 120 h após o inóculo...100
- Fig.72 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 144 h após o inóculo...101
- Fig.73 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hemetafosfato de sódio. Ensaio realizado logo após o inóculo.....105
- Fig.74 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 24 horas após o inóculo.....106
- Fig.75 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 48 horas após o inóculo.....107
- Fig.76 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 72 horas após o inóculo.....108
- Fig.77 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 96 horas após o inóculo.....109
- Fig.78 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 120 horas após o inóculo.....110
- Fig.79 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 144 horas após o inóculo.....111
- Fig.80 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio. Ensaio realizado 24 horas após o inóculo.....112

Fig.81 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 48 horas após o inóculo.....113

Fig.82 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 72 horas após o inóculo.....114

Fig.83 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 96 horas após o inóculo.....115

Fig.84 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 178 horas após o inóculo.....116

Fig.85 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 360 horas após o inóculo.....117

Fig.86 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 3 dias.....118

Fig.87 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 5 dias.....119

Fig.88 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 6 dias.....120

Fig.89 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 13 dias, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....121

Fig.90 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 13 dias. Com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.....122

## TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Composição da água do mar.....	33
Tabela 2 Concentrações de hexametáfosfato de sódio usadas e seus respectivos valores de pH.....	33
Tabela 3 Composição do meio agar nutriente.....	34
Tabela 4 Composição do meio de cultura líquido.....	34
Tabela 5 Acompanhamento do potencial de corrosão.....	51
Tabela 6 Ensaios de perda de massa.....	65

## INTRODUÇÃO

A partir do final do século passado iniciaram-se os estudos da corrosão influenciada por microrganismos. Este tipo de corrosão ocorre quando microrganismos que podem ser bactérias, fungos ou algas, aderem-se na superfície do metal e atuam nas reações eletroquímicas direta ou indiretamente, seja pela produção de substâncias metabólicas que podem ser agressivas tornando o meio corrosivo ou destruindo as camadas de revestimentos protetores.

Devido a grande variedade de ambientes que podem proporcionar o crescimento de microrganismos como solo, meios aquosos industriais, água de mar e de rios, interfaces óleo/água, muitos são os equipamentos e estruturas que podem sofrer corrosão microbiológica.

Este tipo de corrosão tem sido estudado com vários tipos de microrganismos, os quais apresentam características diversas quanto a versatilidade nutricional e condições de sobrevivência (faixa de pH, temperatura, níveis de oxigênio, etc). Diferentes substratos metálicos, entre eles aços inoxidáveis, aço-carbono, alumínio, e diversas ligas têm sido utilizadas para avaliação do processo.

Nas últimas décadas, estudos para o melhor entendimento da corrosão induzida por microrganismos estão sendo desenvolvidos,

integrando conhecimentos das áreas de metalurgia, química, microbiologia, bioquímica e eletroquímica.

Neste trabalho procurou-se estudar alguns aspectos da corrosão do aço ABNT 1006 em presença de bactérias aeróbicas do gênero *Pseudomonas aeruginosa* em água de mar sintética diluída, adicionada ou não de um inibidor de corrosão.

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Desenvolvimento histórico

Garret é citado na literatura<sup>1,2</sup> como o primeiro a se reportar a microrganismos envolvidos com corrosão: ele atribuiu a corrosão de cabos enterrados à ação de metabólitos bacterianos, com a formação de amônia, nitritos e nitratos.

Gaines (1910)<sup>1</sup> mostrou evidências de que bactérias do ferro e enxofre foram envolvidas na corrosão do exterior e interior de tubos de água demonstrado pela presença de grande quantidade de enxofre.

No ano de 1934, Von Wolzogen Köhr e Van der Vlught<sup>1</sup> propuseram um mecanismo para explicar a ação das bactérias redutoras de sulfato, em ausência de oxigênio, sobre canos de ferro fundido enterrados. A teoria se baseia fundamentalmente, na ação direta das bactérias anaeróbicas do gênero *Desulfovibrio* sobre a cinética do processo de corrosão através de um mecanismo de despolarização catódica.

Videla<sup>3</sup> relata que Bengough e May, neste mesmo ano, informaram sobre a produção de amoníaco por algumas bactérias e sobre sua ação corrosiva sobre ligas de cobre.

O papel de microrganismos na corrosão aeróbica foi postulado por Olsen e Sxybalski (1949)<sup>1</sup> devido a formação de tubérculos em conjunto com o crescimento microbiano, os quais iniciam as células de aeração diferencial. Este mecanismo foi

proposto como a causa de problemas envolvendo microrganismos associados a corrosão de tanques de alumínio. Aeronaves comerciais e militares foram afetadas, nos anos de 1950 e início de 1960.

Em 1959, Horváth e Solti<sup>3</sup> apresentaram evidências de despolarização catódica devido a culturas de bactérias redutoras de sulfatos sobre eletrodos de aço.

Booth e Tiller<sup>3</sup>, em uma série de trabalhos iniciados em 1960, estabelecem uma relação entre a despolarização catódica e a capacidade de empregar hidrogênio para reduzir sulfatos, que é medido pela atividade hidrogenásica das bactérias.

Atualmente os problemas relacionados a corrosão influenciada por microrganismos (CIM) têm sido estudados utilizando vários metais e ligas e vários microrganismos, como também consórcios microbianos, interligando áreas de diferentes conhecimentos.

## 1.2 Formação do biofilme

É comentado na literatura<sup>4</sup> que estruturas imersas em meios aquosos naturais ou industriais, rapidamente começam a ser recobertos por filmes biológicos, e organismos macroscópicos das mais variadas formas crescem neste filme gelatinoso. Sanders et al.<sup>5</sup> citam que superfícies imersas em água de mar, quase que imediatamente começam a ser recobertas por uma camada orgânica e, em pouco tempo um grande número de bactérias começam a se fixar. Subsequente a este "fouling" inicial micro algas, protozoários e outros organismos microscópicos fixam-se, seguidos depois de um tempo maior de outros organismos macroscópicos.

Characklis et al.<sup>4</sup> acrescentam que as células imobilizadas crescem, reproduzem-se e produzem polímeros extracelulares (em geral polissacarídeos) que formam uma matriz de fibras entrelaçadas produzindo a estrutura denominada "biofilme".

O material extrapolissacarídeo (EPS: Extracellular Polymeric Substance) é constituído de cadeias longas de açúcares<sup>7</sup>. Análises realizadas indicam que estas estruturas podem ter composição variada dependendo da comunidade microbiana e de condições como as fases de crescimento ou condições nutricionais<sup>8</sup>. A camada de polissacarídeo superficial é chamada de "glicocalyx", faz parte da membrana e apresenta notável heterogeneidade na estrutura e composição entre células de diferentes tipos<sup>7</sup>.

O crescimento de organismos, microscópicos ou macroscópicos, na superfície do metal pode produzir áreas localizadas de diferentes concentrações de oxigênio. Segundo Hamilton<sup>10</sup> estes biofilmes raramente contêm uma espécie apenas de microrganismos. Uma variação local no biofilme pode favorecer o crescimento e a diversificação de organismos, formando assim um "micro meio"<sup>11</sup>. Como as bactérias começam a predominar nestes micro meios, seus produtos metabólicos podem estimular o crescimento de organismos secundários, que podem desenvolver um consórcio microbiano dentro do biofilme. Alguns consórcios de microrganismos têm sido detectados em biofilmes, inclusive associados com corrosão, onde constituem um foco local de ataque em muitos substratos insolúveis, incluindo metais<sup>11</sup>.

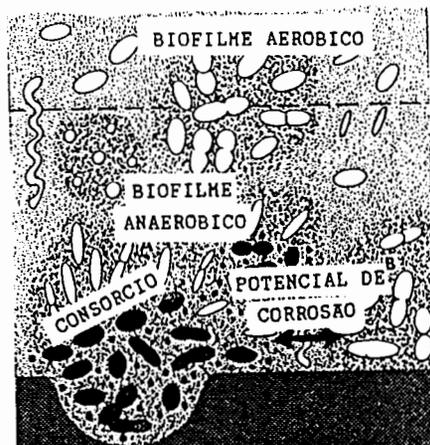


Fig.01 Representação esquemática de um consórcio bacteriano na superfície do metal (11).

Estes biofilmes, segundo Hamilton<sup>10</sup> são portanto, heterogêneos em relação aos parâmetros físico-químicos e ao tipo de organismos presentes devido a formação de micro meios.

### 1.3 Adesão de células bacterianas em superfícies.

Desde os primeiros estudos referentes a adesão celular, é reconhecida como característica fundamental das células e organismos biológicos o fato destes estabelecerem um contato com superfícies dos mais variados tipos, como solos, fibras, etc.<sup>7</sup>

Evidentemente, que estas interações entre microrganismos e as interfaces, assim como o processo de fixação de bactérias são extremamente complexos. Para melhor esclarecer a adesão microbiana, faz-se necessário conhecer alguns parâmetros que incluem propriedades do substrato, forças de interação, componentes do meio, entre outros.

#### 1.3.a Aspectos físico-químicos da adesão bacteriana

i) Forças de longo alcance

A teoria "DLVO"<sup>12</sup> foi desenvolvida independentemente por Derjuguim e Landam (URSS-1941) e Verwey e Overbeek (Holanda-1948), para explicar a estabilidade de sistemas devido a sobreposição de forças atrativas de Van der Waals e forças repulsivas do tipo eletrostáticas.

A fixação de bactérias às superfícies pode ser descrita por um modelo puramente físico derivado da química dos colóides, em que os organismos são tratados como partículas coloidais carregadas, geralmente com cargas negativas, aproximando-se da superfície.

As forças de Van der Waals são originadas por dipolos dentro destas partículas, que podem ser permanentes ou induzidos em moléculas não polares ou instantâneos, dependendo do tipo da molécula. A repulsão eletrostática pode ocorrer desde que aconteça a sobreposição de duplas camadas entre as bactérias ou entre a superfície e as bactérias.

Rutter e Vincent<sup>13</sup> descrevem os aspectos físico-químicos da aderência de microrganismos, as interações de longo alcance entre partículas carregadas e corpos macroscópicos utilizando a teoria DLVO. Segundo os autores, as células biológicas e microrganismos não são consideradas partículas ideais, pois não têm uma geometria simples e também podem apresentar uma composição molecular não uniforme. Em alguns casos elas são deformáveis, e as reações químicas internas podem levar a mudanças na composição tanto no seu interior como na superfície. Por estas razões, torna-se difícil aplicar um modelo mais sofisticado, e os autores optaram

por uma análise semi-quantitativa, considerando os microrganismos primeiramente, como partículas carregadas, esféricas e rígidas, adsorvendo-se numa superfície plana num meio aquoso.

A situação é ilustrada esquematicamente na figura 2:

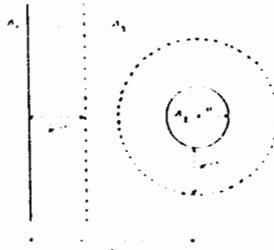


Fig.02 Representação esquemática de uma partícula aproximando-se de uma superfície macroscópica (5).

A premissa básica desta teoria é que a interação total entre a partícula e a superfície se constitui de dois termos: um de atração, ( $G_A$ ) devido a forças de Van der Waals, e outra ( $G_E$ ) devido a sobreposição da dupla camada elétrica associada com grupos carregados presentes nas partículas e superfícies macroscópicas. Dependendo da força iônica do meio, da carga do eletrólito e da temperatura, a teoria prediz duas posições de atração: a primeira no mínimo primário (a distâncias muito curtas) e a segunda no mínimo secundário (a distâncias maiores). Em algum ponto entre estes dois mínimos, as forças repulsivas são máximas em concentrações baixas<sup>14</sup>.

As formas de  $G_A$ ,  $G_E$  e  $G_I (= G_A + G_E)$  (13) podem ser mostradas esquematicamente conforme a figura 3, para os casos em que a partícula e a superfície tem a mesma polaridade.

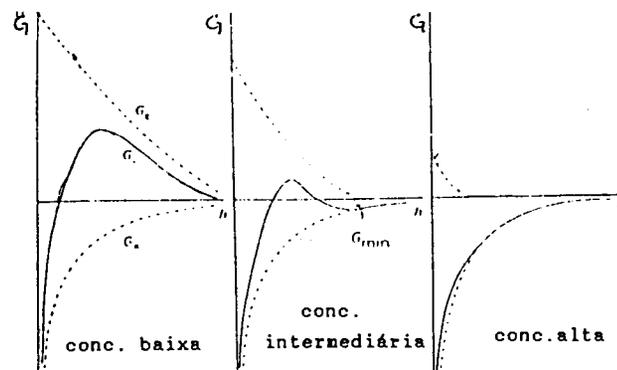


Fig.03 Interação da energia livre ( $G_i$ ) versus separação ( $h$ ) como uma função da concentração do eletrólito ( $c$ ), para uma partícula carregada aproximando-se de uma superfície macroscópica de mesmo sinal.  $G_a$  é a energia livre de atração e  $G_r$  é a energia livre de repulsão .-

Pode-se observar que com uma baixa concentração de eletrólitos (fig 3.a) há uma grande barreira de energia livre para a partícula vencer e obter contato com a superfície, assim efetivamente a partícula é repelida da superfície. Com uma alta concentração de eletrólitos (fig 3.c) esta barreira é diminuída e há uma forte atração entre a partícula e a superfície. Numa concentração de eletrólitos intermediária, a barreira de energia livre ainda está presente, mas é muito pequena. Portanto, uma certa fração das partículas que colidiram com a superfície poderão fazer um contato efetivo no mínimo primário. Na concentração intermediária, o mínimo secundário também existe (tipicamente  $< 5KT$ ). Neste mínimo secundário as partículas residem temporariamente. Esta residência para partículas no mínimo secundário será proporcional a  $\exp(G_{min}/KT)$ .

No caso de a partícula e a superfície terem cargas de sinais opostos a forma da curva da energia livre de interação é esboçada na figura 4 para várias concentrações de eletrólitos. O efeito total é uma forte atração, decrescendo com o aumento da

concentração do eletrólito, mas em todo caso levando a uma adesão irreversível (permanente).

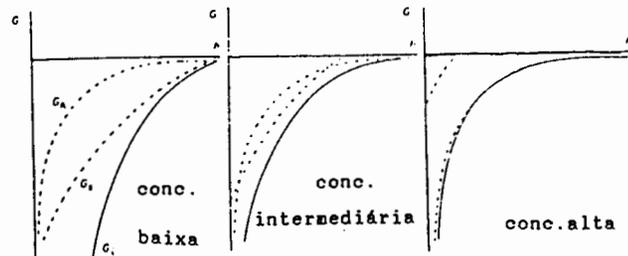


Fig.04 Interação da energia livre ( $G_i$ ) versus separação ( $h$ ) como uma função da concentração do eletrólito ( $c$ ), para uma partícula carregada aproximando-se de uma superfície macroscópica de sinais opostos

A adsorção inicial de células no mínimo secundário é provavelmente mais comum que a adsorção no mínimo primário<sup>14</sup>. Nestas três situações as células podem ser imobilizadas na superfície, "independente" da força iônica do meio, com a ajuda de anexos e biopolímeros. De acordo com a teoria DLVO, estes biopolímeros podem penetrar a barreira de energia entre a célula e a superfície, e imobilizar a célula na superfície, embora esta barreira possa ser insuperável para algumas células, o que pode acarretar a diferença no tipo de imobilização das células no substrato. Se ocorre uma retenção transiente da célula microbiana no substrato isto é chamado de adsorção, e quando a associação é mais permanente é denominado adesão.

Segundo Pethica<sup>9</sup> algumas proteínas podem inibir a fixação de bactérias na superfície como: albumina serum, fibrinogênio e pepsina. O autor refere-se a este fato citando que a albumina adsorve-se na superfície bacteriana interferindo com o adesivo extracelular.

ii) Forças de curto alcance

Rutter e Vincent<sup>13</sup> também referem-se as chamadas forças de pequeno alcance que atuam a uma pequena distância entre a superfície e as partículas, como por exemplo, interações dipolo-dipolo (Keesom), interações dipolo induzido (Debye), interações ion-dipolo, pontes de hidrogênio, etc. Estas interações são particularmente importantes em sistemas aquosos, e podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da natureza das superfícies envolvidas. Os autores discutiram a importância destas forças embasados nas interações hidrofóbicas e hidrofílicas.

Segundo eles, estas interações podem ser discutidas em termos do deslocamento de moléculas de água da zona de interação quando as partículas se aproximam da superfície macroscópica. Se ambas as superfícies são hidrofílicas há um aumento na energia livre das moléculas de água deslocadas. Isto porque a ordem (sequência) da estrutura da água é quebrada próxima a superfície. Isto leva a forças de repulsão de pequeno alcance, que podem ser suficientes para prevenir que a partícula aproxime-se da superfície macroscópica.

Em outro caso, quando as superfícies envolvidas são hidrofóbicas as interações de pequeno alcance são atrativas. Este efeito pode levar a uma permanência no primeiro mínimo. Isto acontece porque as moléculas de água deslocadas do seio da solução agora decrescem sua energia livre, já que no seio da solução elas têm um aumento com suas pontes de hidrogênio. Isto é a base da chamada interação hidrofóbica.

Muitos microrganismos são hidrofílicos, e as análises predizem que sua adsorção a superfícies hidrofóbicas (ex. teflon) será mais forte que a superfícies hidrofílicas (ex vidro).

Fletcher<sup>®</sup> também cita a hidrofobicidade como um dos parâmetros usados para caracterizar uma superfície, evidenciando o fato que, em geral, a hidrofilicidade da superfície tende a aumentar com o aumento da energia livre superficial. Comenta ainda que, se a superfície tem fortes grupos iônicos ou dipolos, a água tende a ser fortemente ligada e orientada sobre estes grupos. Se a superfície é hidrofóbica (poucos grupos iônicos ou dipolos), a água tende a formar um arranjo tipo gelo (aumentar o grau de ordenação) e, este aumento na "ordenação" da água é acompanhado por um decréscimo da entropia. Este fato, favorecerá a adsorção de moléculas com grupos polares e não polares, como proteínas, glicoproteínas e fosfolipídeos (com a resultante liberação da água). Por causa desta tendência das superfícies de adsorver espécies dissolvidas, um número de pesquisadores têm proposto que nutrientes poderão ser adsorvidos e conseqüentemente concentrados na superfície, proporcionando vantagens para células associadas a superfícies.

### iii) Formação de filme adsorvido

Um outro fator também discutido para a colonização de superfícies é a formação de um filme de macromoléculas adsorvido.

Fletcher<sup>®</sup> faz uma distinção entre solutos de baixo peso molecular nos quais a adsorção/desorção ocorre continuamente, e solutos de múltiplos sítios de ligação (por exemplo proteínas) em que o tempo de residência da molécula na superfície é muito maior.

Estas moléculas tendem a ficar retidas na superfície e, quando estas moléculas são também nutrientes bacterianos, elas podem ser transportadas para dentro da célula de uma forma indireta sendo primeiramente hidrolizadas por enzimas extracelulares.

Segundo Characklis<sup>6</sup>, esta adsorção espontânea de material orgânico da fase aquosa altera a energia livre interfacial do sólido assim como seu potencial de corrosão, quando se tratar de um metal ou semicondutor.

Duddridge et al.<sup>4</sup> também citam como primeiro passo para a formação da camada do "fouling" biológico, a adsorção de macromoléculas na superfície do substrato formando um "filme condicionante".

#### 1.4 Propriedades do substrato

É bem documentado na literatura<sup>15,16</sup> que a fixação de bactérias em superfícies sólidas é um importante fenômeno que acontece em muitos meios aquáticos, solos, etc. Como mecanismos de fixação são citados "holdsfasts" e "pili", estruturas muito pequenas que ajudam a bactéria a se aderir. Os polímeros extracelulares, frequentemente acompanham a fixação e em certos casos de adesão são necessários.

Segundo um estudo de Fletcher<sup>8</sup> um dos princípios mais fundamentais da fisiologia microbiana é que processos celulares são influenciados por fatores do meio. Devido a isto não é surpresa que bactérias fixadas a uma superfície, são com frequência fisiologicamente diferentes de células plantônicas. Condições da

superfície sólida podem se diferenciar consideravelmente das do seio da solução. Muitos estudos têm objetivado determinar os efeitos que as superfícies sólidas tem na atividade bacteriana, e tentativas têm sido feitas para identificar estes princípios que explicam a base dos efeitos da superfície. Entretanto, a determinação de tais princípios tem sido infrutífera, segundo Fletcher, devido a grande variedade de sistemas experimentais, condições e tipos de observações que têm sido utilizadas. Isto evidencia o fato de que não se pode generalizar os efeitos das superfícies sólidas na atividade bacteriana adsorvida. Pode-se apenas identificar características importantes da interface sólido-líquido (por exemplo características físico-químicas e hidrodinâmicas) que podem influenciar significativamente os processos fisiológicos bacterianos. Muitos elementos combinados determinam a natureza da comunidade que se desenvolve na interface e a sua atividade fisiológica (por exemplo: capacidade fisiológica do organismo, condições nutricionais do ambiente e fatores físico-químicos, como o potencial de oxigênio, a concentração do eletrólito, a natureza da superfície sólida, o fluxo da água e a turbulência). Fletcher<sup>2</sup> cita que as duas mais importantes características das interfaces sólido-líquido do ponto de vista da aderência bacteriana são:

- i). condições hidrodinâmicas diferentes na superfície e no seio da solução
- ii) tendência de solutos e partículas dissolvidas serem adsorvidas na superfície. Estes fatores juntos afetam a concentração do

substrato e o fluxo de nutrientes e dos produtos metabólicos entre a interface e o seio da solução.

Fletcher et al<sup>17</sup> dizem que usualmente, em meios aquosos, a superfície coletora e a bactéria são carregadas negativamente, a célula bacteriana sofrerá uma força repulsiva quando sua dupla camada difusa sobrepor-se com a dupla camada associada com o coletor.

### 1.5 Experiências com diversos substratos

A fim de investigar a influência dos efeitos da carga superficial de alguns diferentes substratos (coletores) na fixação de bactéria marinha em superfícies sólidas, Fletcher e Loeb<sup>18</sup> realizaram experiências em diferentes substratos, e citam que a bactéria marinha *Pseudomonas* parece se fixar por meio de seus polímeros extracelulares. Em seus experimentos obtiveram como resultados que um grande número de bactérias se aderiram a plásticos hidrofóbicos com pouca ou nenhuma carga superficial (teflon, polietileno, poliestireno, poli(etileno tetracarboxilato)); moderado número de bactérias aderiram-se a metais hidrofílicos com carga superficial positiva (platina) ou neutra (germânio); e muito poucas se aderiram a substratos hidrofílicos, carregados negativamente (vidro, mica e plásticos oxidados).

Segundo os autores, estudos sobre a fixação de vários tipos de células têm indicado que muitas bactérias têm a preferência por superfícies hidrofílicas carregadas negativamente, embora neste estudo não tenham sido encontrados estes resultados. Entender as preferências de organismos de se fixarem em

circunstâncias particulares, requer informação detalhada do substrato, componentes dissolvidos e população bacteriana envolvida. Uma das causas citadas para tentar explicar as diferenças de fixação deste gênero de bactérias utilizada neste estudo, é que a bactéria *Pseudomonas* tem um polímero com superfície hidrofílica. Assim, uma vez formada uma monocamada de bactérias aderidas na superfície hidrofóbica, esta superfície de fixação favorável é convertida em hidrofílica, com superfície negativamente carregada e não favorável.

### 1.6 Outros fatores que podem influenciar a adsorção

Outros fatores também podem influenciar na adsorção de bactérias a superfícies sólidas. Um estudo realizado por Fletcher<sup>15</sup> mostrou que a fixação de *Pseudomonas* marinha foi influenciada pelos quatro fatores estudados: concentração da cultura, tempo permitido para a fixação, a idade da cultura e a temperatura. Os gráficos a seguir mostram a influência de três destes parâmetros:

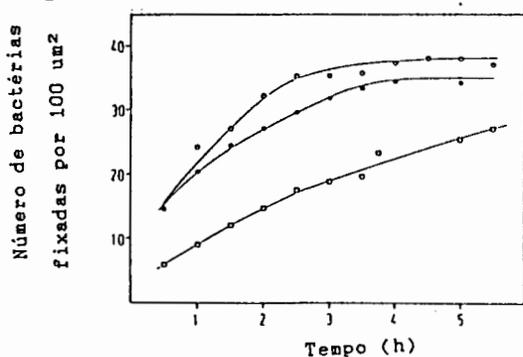


Fig. 06 Relação entre o tempo para a fixação e o número de células aderidas. (○) Fase log, (●) Fase estacionária, (□) Fase de morte.

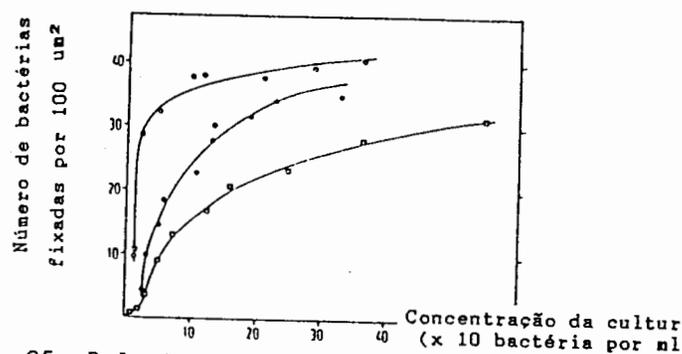


Fig. 05 Relação entre a concentração da cultura e o número de células que começam a se fixar depois de 2 horas. (○) Fase log, (●) Fase estacionária, (□) Fase de morte..

A dependência da fixação com a concentração da cultura e com o tempo não é surpresa. O aumento destes fatores poderia levar a um aumento no número de colisões bacterianas com a superfície a

ser colonizada e assim, a um aumento na oportunidade de fixação. A influência da idade da cultura é provavelmente devido a dois fatores:

a) mudanças na motilidade da célula

b) mudanças na qualidade ou quantidade de polímeros superficiais da célula. A motilidade aumenta grandemente as chances de que a bactéria possa encontrar uma superfície de fixação, e as bactérias não móveis são dependentes de fatores como movimento Browniano ou correntes de água para movimentar-se sobre a superfície. Inspeções deste referido estudo comprovaram que a motilidade da célula é alterada com a idade da cultura; inspeções micrográficas das células revelaram que culturas na fase de crescimento logarítmico (fase log) têm uma maior proporção de células móveis, fração esta que diminui progressivamente na fase estacionária. Isto poderia ser explicado com o acompanhamento do declínio na fixação. No que se refere à temperatura, a influência na adesão pode estar relacionada principalmente por afetar a fisiologia do microrganismo.

Outro estudo para avaliar os fatores que afetam a fixação de *Pseudomonas aeruginosa* no aço inoxidável, foi realizado por Stanley<sup>18</sup> que realizou testes observando o efeito de alguns fatores como motilidade das células, agitação, tipo de eletrólito e concentração, do pH, da viabilidade das células e da fase de seu crescimento sobre células móveis e não móveis (tratamento de blending). Os resultados mostraram que a aderência de células móveis e não móveis começa em menos de um minuto após a exposição e aumenta linearmente com o tempo. Quanto à motilidade das células, foi observado que o tratamento de blending reduz a fixação em 87%,

e que não afeta a viabilidade das células. Outro parâmetro testado foi a agitação e este, segundo a autora, tem um pequeno efeito na fixação de células não móveis, sendo pequeno o aumento detectado. No que tange ao tipo de eletrólito, é mostrado neste trabalho que a aderência em água destilada não é apreciável, e que a fixação aumenta quando há um aumento da concentração de certos eletrólitos como  $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{NaCl}$ . Quanto à influência do pH na aderência de células móveis ou não, é relatado que estas têm um aumento da sua taxa de fixação numa faixa de pH entre 4,8 e 7,0, seguido por um declínio a pH 8,4. Para avaliar sua viabilidade, as células foram submetidas a várias temperaturas, ocorrendo uma redução significativa na sua fixação, assim como o tratamento com glutaraldeído causou uma redução no número de células viáveis. Quanto à fase de crescimento, os resultados da pesquisadora indicam que células no início ou final da fase log aderem 2 vezes melhor que células na fase estacionária.

Baseada em seus dados, a autora conclui que a rápida fixação de células bem como a aderência de células não viáveis, sugere que a bactéria pode atuar como uma partícula "pegajosa" e que a síntese de polímeros não é necessária para a fixação irreversível. Também conclui que as mudanças na motilidade e o flagelo como elemento estrutural não são importantes para a aderência. A influência da força iônica na adesão de *Ps. aeruginosa* sugere que efeitos eletrostáticos da baixa força iônica são importantes mas, que as altas concentrações iônicas mudanças nos polímeros extracelulares podem ser um fator dominante.

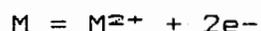
Wrangstadh e colaboradores<sup>19</sup> estudaram a produção e liberação de extrapoliissacarídeos de *Pseudomonas sp.* durante período de inanição (baixa concentração de nutrientes) e o seu efeito na adesão em superfícies hidrofóbicas. A proporção relativa de açúcares encontrada nos polissacarídeos foi de 28% glucose, 35% N-acetil glucosamina e 37% N-acetilgalactosamina. Os autores investigaram como as mudanças no meio influenciam os tipos e a concentração de açúcares nos polissacarídeos extracelulares bacterianos. Estes efeitos podem ser importantes para a bactéria marinha continuamente exposta a trocas rápidas de nutrientes e níveis de energia. Este estudo demonstrou que a inanição de *Pseudomonas sp.* marinha induz à produção e liberação de polímeros extracelulares, que resulta em efeitos pronunciados no grau de adesão e agregação das células bacterianas, já que as bactérias respondem à inanição tendendo a uma fragmentação, aumentando o número de células e diminuindo o volume celular. O grau de redução do volume celular foi maior em condições estáticas que em regime de inanição agitada. Quanto a produção de polímeros, foram detectadas visualmente mudanças na viscosidade somente no regime de inanição estático e a agitação previne a produção de polímeros, os quais não foram observados durante o crescimento da *Pseudomonas sp.* Quanto à adesão das células foi verificado que esta foi significativamente diferente em superfícies hidrofóbicas, em condições agitadas e estáticas. Observaram que a adesão de células sob agitação aumenta nas primeiras horas seguindo um decréscimo da fixação com o tempo. A adesão de células em regime de inanição e em condições estáticas decresce nas primeiras horas e após aumenta com a inanição

continuada. Os resultados experimentais mostraram que a presença de polímeros na superfície da célula corresponde a um decréscimo no grau de adesão em superfícies hidrofóbicas. Depois de 10 horas de inanição, os polímeros não foram detectados na superfície da célula e este fato foi concomitante com um aumento na adesão.

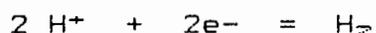
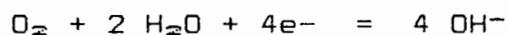
### 1.7 Corrosão de metais em meios aquosos

Num aspecto muito difundido e aceito universalmente<sup>20</sup> pode-se definir corrosão como a deterioração de material, geralmente metálico, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente aliada ou não a esforços mecânicos. A deterioração representa alterações prejudiciais indesejáveis, sofridas pelo material, tais como desgaste, variações químicas ou modificações estruturais.

A corrosão é um processo eletroquímico de superfície comum aos metais em meios aquosos<sup>10</sup>. A dissolução do metal se dá lugar em sítios anódicos,



e em sítios catódicos ocorre um processo de redução. As reações catódicas mais comuns são a redução de oxigênio dissolvido e a liberação de hidrogênio gasoso, como representado resumidamente nas reações:



Sendo a corrosão um fenômeno de superfície do material, várias alterações podem ocorrer acelerando ou retardando este processo. Alguns parâmetros que podem interferir na velocidade e na morfologia da corrosão frequentemente investigados são: presença de imperfeições na superfície, variáveis microestruturais, composição da solução que pode conter gases dissolvidos como  $O_2$  e  $CO_2$ , presença de ânions diversos, íons metálicos, de agentes complexantes, oxidantes e ainda outras condições do meio, tais como pH, temperatura, pressão, velocidade, além das tensões mecânicas aplicadas ou residuais, no material metálico.

### 1.8 A corrosão microbiológica

Além dos parâmetros citados acima como modificadores da corrosão, a presença de microrganismos vem sendo reconhecida como tendo possibilidades de influenciar mais ou menos intensamente a corrosão.

Segundo Videla<sup>21</sup>, a corrosão microbiológica é um processo eletroquímico igual à corrosão em meios abióticos. Não obstante, a participação dos microrganismos é ativa e introduz características diferenciais no processo, mas sem modificar sua natureza.

#### 1.8.a Microrganismos associados com corrosão

Muitos microrganismos são citados na literatura associados a casos de corrosão nos mais diferentes meios.

Tiller<sup>2</sup> classificou estes microrganismos em três grupos: fungos, algas e bactérias (aeróbicas e anaeróbicas).

Os fungos são um grupo de organismos que crescem como saprófitas e não vivem sem uma matriz orgânica, ou ainda como parasitas de outros organismos. Os fungos associados com corrosão de metais são geralmente os filamentosos ou do tipo levedura.

Algas e diatomáceas fazem parte de um grupo heterogêneo de organismos que contêm clorofila, encontradas em águas de mar e de rios. São autotróficas, e obtêm sua energia da luz e da oxidação de substâncias inorgânicas.

As bactérias associadas ao processo de corrosão são unicelulares, podendo ser aeróbicas ou anaeróbicas, autotróficas ou heterotróficas.

#### 1.8.b Mecanismos de corrosão microbiológica

Characklis<sup>6</sup> observa que um simples tipo de microrganismo pode afetar simultaneamente os processos eletroquímicos através de vários mecanismos.

Videla<sup>7</sup>, como vários outros autores enumeram os seguintes mecanismos pelos quais os microrganismos podem interferir no processo corrosivo:

1 - Produção metabólica de substâncias corrosivas: o microrganismo produz como resultado parcial ou final de seu metabolismo uma substância de natureza agressiva, geralmente ácidos orgânicos e inorgânicos.

2 - Criação de células de aeração diferencial por causar diferenças de concentração de oxigênio: a associação de distintas espécies de microrganismos, especialmente no que se refere a sua necessidade de

oxigênio, pode originar este tipo de corrosão e inclusive criar condições ao desenvolvimento de espécies anaeróbicas. As bactérias comumente envolvidas são ferrobactérias e sulfatobactérias.

3 - Influência direta na cinética do processo corrosivo como no caso da despolarização catódica atribuída às bactérias sulfato redutoras: as bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato estão particularmente envolvidas neste processo<sup>6</sup>, que têm sido foco de muitas investigações. O trabalho de Von Wolzogen Kühr e Van der Vlugt (1934) sugeriu algumas reações químicas envolvidas na reação de despolarização. Esta despolarização está baseada na teoria em que as bactérias removem hidrogênio acumulado na superfície do ferro. A remoção do elétron como resultado da utilização do hidrogênio resulta na despolarização catódica e força mais ferro a se dissolver do ânodo. A enzima hidrogenase, sintetizada por muitas espécies de *Desulfovibrio* pode ser envolvida neste processo de despolarização específico<sup>6</sup>.

4 - Destruição de películas protetoras sobre o metal: este mecanismo foi proposto por Iverson para os casos em que o microrganismo pode prover ou, ao contrário remover uma cobertura protetora situada sobre o metal<sup>7</sup>. É interessante mencionar o trabalho de Obuekwe et al.<sup>8</sup> em que um recobrimento protetor foi formado em amostras de aço-carbono por reação com um inibidor oxidante (nitrito). Em culturas com bactérias *Pseudomonas sp* havia perda da passividade e os estudos de polarização revelaram intensa

despolarização anódica, enquanto que na ausência das bactérias o metal permanecia passivo.

### 1.9 Medidas de corrosão microbiológica usando técnicas eletroquímicas

Mansfeld e Little<sup>22</sup> apresentaram uma revisão crítica da literatura no que diz respeito a aplicação de técnicas eletroquímicas no estudo da corrosão influenciada microbiologicamente, por exemplo, potencial de corrosão, potencial redox, resistência de polarização, etc. O uso destas técnicas experimentais suscitou algumas discussões concernentes a procedimentos experimentais, vantagens e desvantagens destas técnicas para o estudo de CIM. Os autores dizem que detalhes e informações de confiança do fenômeno de corrosão podem ser obtidas quando um número de diferentes técnicas eletroquímicas são combinadas. A primeira técnica a ser discutida foi a medida do potencial de corrosão, que poderia apresentar problemas com o eletrodo de referência devido a possibilidade de formação de biofilme. O potencial redox ou potencial da solução que é usualmente medido com um eletrodo de Pt, tem sido usado para monitorar mudanças nas propriedades corrosivas de soluções como resultado do metabolismo bacteriano. Medidas da resistência de polarização é muito usada para a detecção de mudanças nas taxas de corrosão devido a presença de bactérias, inibidores, biocidas, etc.

A técnica da célula dupla, desenvolvida por B. Little et al. monitora continuamente as mudanças nas taxas de corrosão do metal devido a presença de biofilme. Esta técnica consiste em duas

células eletroquímicas idênticas que são biologicamente separadas por uma membrana semipermeável. Os dois eletrodos de trabalho são conectados a um amperímetro de resistência zero. As bactérias são adicionadas a uma destas células, e faz-se o acompanhamento da corrente galvânica. O sinal e a magnitude da corrente galvânica pode ser usado para determinar detalhes da ação corrosiva das bactérias.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma nova técnica usada em pesquisa de corrosão, onde os dados são registrados em função da frequência de um sinal sobreposto a um ponto de trabalho ( $E, i$ ) da curva de polarização. Este ponto frequentemente é o potencial de corrosão ( $E=E_{corr}, i=0$ ). Dowling et al.<sup>23</sup> tem estudado os efeitos de CIM no aço inox em água de mar artificial usando EIE.

Na análise do ruído eletroquímico a flutuação do potencial (frequentemente  $E_{corr}$ ), ou da corrente são determinados em função do tempo ou das condições experimentais. Os efeitos da bactéria redutora de sulfato e outras comunidades de microrganismos na corrosão do concreto e do aço foram estudados por este método<sup>24</sup>.

As curvas de polarização tradicionais em que o  $E$  ou  $I$  variam sobre ampla gama de valores fornecem várias informações sobre o mecanismo das reações que ocorrem em um sistema em corrosão: controle por transferência de carga por difusão, ocorrência de passividade e transpassividade e fenômenos de corrosão localizada. O efeito de ligantes ou a adição de inibidores podem ser reconhecidos pelas mudanças nas curvas de polarização.

Numerosos investigadores têm usado as curvas de polarização para determinar o efeito de microrganismos na superfície de metais e o resultante comportamento da corrosão. Em muitos destes estudos, comparações têm sido feitas entre curvas de polarização em meio estéril e as obtidas em presença de bactérias e fungos, ou então em meios contaminados com produtos metabólicos desses.

Outra técnica usada no estudo de CIM a qual é descrita por Franklin e colaboradores<sup>25</sup>, é a técnica de eletrodo vibratório (SVET) usada para detectar a corrosão do aço carbono na presença e ausência de bactérias. Os resultados mostraram que esta técnica pode ser aplicada a estudos de CIM, como uma técnica não destrutiva para determinar sítios anódicos e catódicos.

Sequeira<sup>26</sup> também fez uma revisão da literatura com a finalidade de avaliar os métodos eletroquímicos para o estudo da corrosão microbiológica, com ênfase nas vantagens e limitações de técnicas correntes, como o de medida de potencial de circuito aberto e medições de curvas de polarização catódicas e anódicas. Sequeira descreve as técnicas tradicionais e mais modernas que, segundo este autor, poderiam ser utilizadas para elucidar os mecanismos de corrosão microbiológica.

### 1.10 Inibidores de corrosão

Inibidor de corrosão é uma substância, ou mistura de substâncias, que quando presentes em concentrações adequadas, no meio corrosivo reduz ou elimina a corrosão<sup>20</sup>. Neste trabalho utilizou-se o hexametáfosfato de sódio em soluções diluídas de água

do mar sintética na presença e ausência de bactérias, a fim de observar alguma alteração de comportamento inibidor deste tipo de fosfato em presença de microrganismos e de seus produtos metabólicos.

Os fosfatos em geral são comumente usados como inibidores de corrosão, especialmente em águas de abastecimento e sistemas de refrigeração. Dean e colaboradores<sup>27</sup> em seu artigo de revisão, classificaram os fosfatos como inibidores formadores de camada de conversão. Este tipo de ação inibidora é apoiada frequentemente pela presença de cátions divalentes, como os de zinco, cálcio e magnésio. Esses cátions tendem a suprir a solubilidade dos compostos de ferro, assim como interferem com a reação catódica de oxigênio na superfície. Em geral este tipo de inibidor é menos efetivo em relação a outros inibidores passivantes e são muito atrativos por causa de suas características não tóxicas.

Buttler e Ison<sup>28</sup> citam que o uso de polifosfatos (juntamente com silicatos), é o método mais econômico de prevenir a corrosão e que, nas concentrações em que é usado como inibidor não tem influência no paladar. Os fosfatos condensados são um grande grupo de compostos contendo cadeias de átomos de fósforo e oxigênio unidos alternadamente, como no modelo:



Estes polifosfatos são agentes complexantes e com um metal divalente, como o cálcio, formam partículas coloidais carregadas positivamente.

Uma grande variedade de polifosfatos está em uso, variando amplamente na solubilidade; os mais comuns são: pirofosfatos ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), tripolifosfato ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) e hexametáfosfato de sódio ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub>, cujas fórmulas estruturais estão em anexo.

A ação dos polifosfatos, segundo Butler et al.<sup>28</sup> é predominantemente catódica; as partículas coloidais carregadas positivamente migram para os micro-cátodos onde um filme é formado, e decresce então, o potencial ao restringir o suprimento de oxigênio à superfície.

Segundo Szklarska - Smialowska e Mankowski<sup>29</sup>, os polifosfatos não atuam diretamente como inibidores, as propriedades protetoras são manifestadas somente pelo produto da hidrólise ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), que junto com os íons hidroxila que ocorrem no eletrodo devido à redução de oxigênio, promovem a deposição de cálcio na superfície do metal, de acordo com a reação:



Embora os polifosfatos sozinhos sejam inibidores até um certo ponto, a maior eficiência só é obtida em presença de uma adequada concentração de íons de metal divalente.

A maioria dos pesquisadores citam que os polifosfatos são mais efetivos em sistemas com agitação, devido a facilitarem o acesso de fosfato à superfície do metal (e também aumentarem o suprimento de  $\text{O}_2$  à superfície do metal). Entretanto, Butler<sup>30</sup> relata com sucesso a proteção do aço contra a corrosão em solução

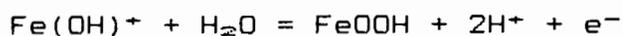
estacionária e que o filme formado na superfície do aço retém as suas propriedades protetoras por um certo período de tempo (14 dias) quando o objeto é transferido para uma solução que não contém o inibidor. Assim, o fosfato teria um "after effect", e que o inibidor não necessita ser continuamente reposto. West<sup>21</sup> acrescenta que estes filmes têm uma alta tolerância a cloretos e podem ser usados em meios agitados. Como exemplo pode-se citar os excelentes resultados citados por Buttler e Ison<sup>28</sup> na prevenção do ataque ao aço-carbono em soluções contendo 1500 ppm de ions cloreto adicionando fosfato ( $P_2O_5$ ) na concentração de 50 ppm e cálcio e zinco na concentração de 30 ppm.

### 1.11 Principais fosfatos

a -  $Na_2HPO_4$  - Fosfato monobásico de sódio

Embora o efeito dos fosfatos seja marcadamente catódico, Cohen<sup>22</sup> caracteriza o  $Na_2HPO_4$  como um inibidor anódico e agente tamponante, mas observa que há a necessidade da presença de oxigênio na solução para prevenir a corrosão. Segundo o autor, o filme de fosfato pode ser formado pela reação com o oxigênio dissolvido, na forma de um filme de óxido. Aparentemente, o processo é lento, há formação de hidratado ou filme de fosfato pela deposição anódica e/ou precipitação; este processo requer uma alta concentração de inibidor. A reparação do filme depende da presença e concentração do inibidor e de oxigênio. Para baixas concentrações de inibidor e de oxigênio, o filme de fosfato poderá apresentar

perfurações. Neste caso, o metal exposto atuará como um ânodo com alta velocidade de dissolução e o filme como cátodo com grande área, ocorrendo corrosão localizada do substrato (pite). O processo de deposição anódica dependerá dos constituintes iônicos da solução. Os exemplos são:



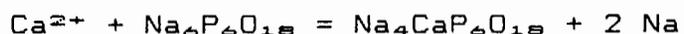
Segundo Rosenfeld<sup>33</sup> este tipo de fosfato não apresenta boas características quanto às propriedades protetoras devido a acidificação do meio como resultado de sua hidrólise.

b)  $(\text{NaPO}_3)_6$  - Hexametáfosfato de sódio

Um estudo do efeito do hexametáfosfato de sódio<sup>33</sup> sobre o potencial de um eletrodo de aço mostrou que há uma forte mudança do potencial no sentido negativo. Isto tem experimentalmente confirmado que este polifosfato é um desacelerador da reação catódica.

O hexametáfosfato de sódio tem a propriedade de criar complexos solúveis com o cálcio e outros íons metálicos. Como resultado, estes íons, como também os íons de ferro, são retidos na solução. E isto previne a formação de depósitos de carbonatos de cálcio e ferro que interfere com a transferência de calor, através de chapas e tubos de aço. De acordo com Rosenfeld<sup>33</sup> na sua

interação com sais de cálcio, o seguinte complexo solúvel pode ser formado:



Com a ausência de íons de metais divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o autor pressupõe que o hexametáfosfato de sódio pode agir tanto como inibidor quanto como estimulador da corrosão. Se o fluxo (taxa de movimento) é baixo e a concentração de inibidor também o é, são as propriedades do complexo solúvel do hexametáfosfato que se manifestarão primariamente, resultando uma aceleração da reação anódica e, portanto da corrosão. Quando a concentração do hexametáfosfato de sódio é aumentada a solubilidade limite pode ser excedida e a superfície do metal torna-se coberta por um filme que diminui a reação anódica.

Comparando as propriedades protetoras do hexametáfosfato com outros inibidores, tais como cromatos e nitritos, Butler<sup>30</sup> concluiu que os polifosfatos exibem consideráveis vantagens. Embora em água pura as concentrações protetoras de cromato de sódio e nitrito de sódio sejam menores do que aquela de hexametáfosfato de sódio, em soluções com cloretos a situação é diferente, pois com a combinação de íons cálcio é possível obter proteção com uma concentração menor deste inibidor em comparação com cromato e nitrito.

## 2 MATERIAIS E METODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 - Corpos de prova

Os corpos de prova consistiram de chapas de aço carbono ABNT 1020, de 1,2 cm de espessura com a seguinte composição química:

C: 0.04%  
Mn: 0.276%  
S: 0.01254%  
P: 0.0088%

Para os ensaios de imersão foram utilizadas chapas de aproximadamente 5,0 cm x 2,0 cm, as quais foram perfuradas, a fim de serem suspensas por uma fita de teflon, e tiveram os cantos arredondados, para evitar efeitos de concentração de tensões. Os corpos de prova foram lixados com lixa d'água até o número 600, e após desengraxados com tricloroetileno, acetona e álcool, e secos em ar quente.

Para os ensaios eletroquímicos, foram utilizados corpos de prova de aproximadamente 2,5 cm x 2,0 cm embutidos em uma resina acrílica e curadas a temperatura ambiente. A superfície de cada corpo de prova era, a seguir, lixada até lixa 600 e desengraxada. O contato elétrico foi obtido com um fio de cobre embutido num fino tubo de vidro; a área de contato entre o fio e o corpo de prova foi recoberta com uma resina epóxi, que também foi utilizada para recobrir parcialmente a superfície do aço. Para evitar o aparecimento de fresta esta resina era seca em estufa a temperatura de 80°C por aproximadamente 30 minutos, deixando-se uma área exposta de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.

#### 2.1.2 Soluções

As soluções foram preparadas utilizando-se diluições em água bidestilada de 10 e 1,5% de água do mar sintética.<sup>24</sup>

Tabela 1 - Composição da água do mar

	ppm
$\text{NaHCO}_3$	199
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	3811
$\text{NaCl}$	23216
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10567
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1462
$\text{KCl}$	708
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.5
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	65

O pH da água do mar sintética variou entre 8,0 e 8,2. O pH das soluções de água do mar diluída a 10% manteve-se em torno de 8,0 e 8,2 e o pH das soluções de água do mar diluída a 1,5% variou entre 7,1 e 7,3.

Estas soluções foram utilizadas para a realização de testes de imersão, acompanhamento do potencial a circuito aberto e ensaios eletroquímicos na presença e ausência de microrganismos.

Também foram realizados ensaios com diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio. Os valores de pH das diferentes concentrações está mostrado na seguinte tabela:

Tabela 2 - Concentração de hexametáfosfato de sódio utilizadas e seus respectivos valores de pH

Concentração de hexametáfosfato de sódio ppm de $(\text{NaPO}_3)_6$	pH
50	6.7
100	7.2
500	7.4
1000	7.1
2000	7.1
4000	6.9
5000	6.8

Todas as soluções usadas eram arejadas por estarem em contato com o ar atmosférico.

## 2.2 Métodos de microbiologia

Utilizou-se neste estudo a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria é gram negativa, tem a forma de bastonete de 0,5-0,8 por 1,5-3,0 um, podendo ser encontradas sozinhas, em pares ou pequenas cadeias. São móveis, com um flagelo polar. Obrigatoriamente aeróbica, exceto em meios com nitrato, podem usar o  $\text{NO}_2$  como aceptor alternativo. Esta classe de bactéria é nutricionalmente versátil, sendo que algumas espécies utilizam mais de 100 substratos diferentes. Podem ser isoladas do solo, da água e de espécies clínicas <sup>35</sup>

A cepa original utilizada neste estudo foi identificada pela empresa Aquatec, e foi mantida em meio de cultura agar nutriente, com a seguinte composição:

Tabela 3 - Meio agar nutriente (g/l) <sup>36</sup>

Peptona de gelatina	5 g
Extrato de carne	3 g
agar	15 g

pH final 6,8 +/- 0,2 a 25 °C

O início dos ensaios era procedido após um tempo de incubação de 48 horas à temperatura de 28°C.

Em testes de acompanhamento de potencial foi utilizado meio de cultura líquido com a seguinte composição:

Tabela 4 - Meio de cultura líquido (g/l) <sup>36</sup>

Glicose	1 a 3,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5.24
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.77

yeast extract

5.0

pH 6.8

As diluições da água do mar a 10% e 1,5% foram feitas em água bidestilada, com peptona bacteriológica nos meios que continham bactérias. Todos os reagentes utilizados foram P.A., e não se efetuou nenhuma correção do pH.

### 2.2.1 Esterilização do material e assepsia do local de trabalho.

A vidraria e os meios de cultura utilizados nos experimentos foram esterilizados em autoclave, à temperatura de 121°C, durante 15 minutos.

Utilizou-se uma lâmpada ultra violeta, para esterilização do local no qual se procedia o manuseio de bactérias, bem como dos corpos de prova, que após o tratamento descrito em 2.1.1. eram esterilizados com UV durante 10 minutos antes do início dos testes.

Para a assepsia de bancadas utilizou-se biocida comercial e álcool.

### 2.2.2 Técnicas de semeadura

As bactérias foram replicadas a partir de uma única cepa. Primeiramente, preparava-se o meio de cultura agar nutriente (tabela 3) que após a esterilização era vertido assepticamente em placas de Petri. Após a solidificação do agar, com uma alça de platina previamente flambada, procedia-se o plaqueamento, retirando-se uma alíquota da cultura de bactérias da cepa original, a qual espalhava-se na placa.

Após este procedimento, as placas de Petri permaneciam em estufa, a temperatura de 28°C.

Depois de um período de 48 horas, transferia-se uma amostra para os tubos de ensaio inclinados com meio agar nutriente, espalhando-se o material em zigue-zague de modo a esgotá-lo sobre toda a superfície do meio sólido.

As placas de Petri eram periodicamente observadas durante o tempo em que permaneciam na estufa, a fim de se detectar visualmente, algum tipo de contaminação.

Depois do crescimento bacteriano, procedia-se ao método de preparação do inóculo.

### 2.2.2.1 Métodos de preparação do inóculo

#### a) Método 1

Após 24 horas de crescimento das colônias de bactérias sobre o agar em tubo de ensaio inclinado, fazia-se um espalhamento destas colônias com a alça de platina, e após cobria-se com uma solução salina 0,85% de NaCl, obtendo-se assim as bactérias em suspensão.

Depois de homogeneizar manualmente a solução, transferia-se de forma aséptica 1 ml desta suspensão, com micropipetas de pontas descartáveis, para o primeiro de uma série de 10 tubos de ensaio com tampa rosqueada. Os referidos tubos continham 9 ml de solução salina.

Mantinha-se o bico de Bunsen aceso para flambar a boca dos tubos de ensaio.

Após a colocação do inóculo, os tubos de ensaio eram agitados manualmente para garantir a distribuição homogênea dos microrganismos na amostra. Desta forma obtinha-se a concentração de bactérias para os testes preliminares de potencial em função do tempo.

#### b) Método 2

Um outro método de preparação do inóculo foi desenvolvido, que consistia da retirada de 1 ml contaminado de bactérias do inóculo dos tubos de ensaio (descrito acima). A seguir transferia-se para 100 ml de água do mar sintética, diluída a 1.5%; após agitação e homogeneização, retirava-se 1 ml desta solução diluindo-o em um volume de 300 ml no qual se realizava os ensaios.

Para manter as bactérias por um período longo, utilizou-se óleo mineral esterilizado por 2 horas a 180° C em estufa, colocando-o sobre as bactérias nos tubos de ensaio inclinados.<sup>37</sup>

### 2.2.2.2 Acompanhamento do desenvolvimento das culturas de bactérias durante a realização dos ensaios

Para a verificação do crescimento do microrganismo, foram retiradas alíquotas de 0,5 e 1 ml dos meios contaminados e efetuando-se logo após, um plaqueamento usando o meio agar nutriente. Depois de 24 horas em estufa, observava-se visualmente as placas de Petri.

### 2.2.3 Microscopia

#### a) Microscopia eletrônica

As amostras observadas no microscópio eletrônico de varredura consistiram de chapas embutidas em resina acrílica, que ficaram em imersão em solução de água do mar sintética nas diluições de 10% e 1,5% em água bidestilada, contaminadas com bactérias.

Imediatamente após a retirada, os corpos de prova foram lavados em solução tampão de fosfato com pH 7.4, com duas repetições. A seguir foram fixados em glutaraldeído 2% por aproximadamente 10 horas, novamente lavados em solução tampão e desidratados em soluções aquosas com 50, 70, 80, 95 e 100% de etanol durante 20 minutos em cada concentração, com duas trocas.

Em seguida foram desidratados em acetona pura (P.A) e secos em ar quente<sup>38</sup>.

Os corpos de prova foram metalizados com ouro e observados e fotografados no microscópio eletrônico de varredura.

#### b) Microscopia ótica

Após a realização dos ensaios eletroquímicos, os corpos de prova eram observados em microscópio ótico.

### 2.3 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos e acessórios:

- Potenciostato marca Wenking ST 72, e registrador x-t ECB, modelo 101, que foram utilizados para o traçado das curvas de polarização potencioestáticas anódicas e catódicas.

- Eletrodo de referência de calomelano saturado, junção simples, marca Analion. Todas as medidas de potencial neste trabalho, são dadas em relação a esse eletrodo.

- Foi utilizado como contra eletrodo um fio de platina.
- medidor de pH marca Digimed.
- Balança analítica.
- Milivoltímetro de fabricação própria.
- Microscópio ótico marca Union.
- Microscópio eletrônico de varredura Cambridge

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Testes de acompanhamento do potencial x tempo.

Os testes de acompanhamento do potencial a circuito aberto foram realizados nos seguintes meios:

- água do mar sintética diluída a 10% em água bidestilada;
- meio de cultura líquido, específico para o crescimento da bactéria em estudo (tabela 4);
- água do mar sintética diluída a 1,5 % em água bidestilada.
- água do mar sintética diluída a 1,5% com diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio. Estes ensaios foram realizados no mínimo em quadruplicata, primeiramente em meios abióticos, isto é, sem a presença de bactérias; e em meios bióticos, na presença de bactérias.

Nos ensaios com hexametáfosfato de sódio e bactérias, fixou-se a concentração do sal em 2000 ppm.

Em todos os ensaios foi utilizado um volume de 300 ml.

Nos ensaios com bactérias foi utilizado um sistema de aquecimento, a temperatura de  $30^{\circ} \pm x^{\circ}C$ .

### 2.4.2 - Ensaios de perda de massa

Os ensaios de perda de massa foram realizados em água do mar sintética diluída a 1,5% com ou sem a concentração de 2000 ppm

de hexametáfosfato de sódio. O método de inoculação usado é o descrito em 2.2.1.b. Os meios foram, pois, os seguintes:

- água do mar diluída;
- água do mar diluída e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio;
- água do mar diluída e bactérias;
- água do mar diluída, bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio;

As medidas de perda de massa foram verificadas gravimetricamente, pesando-se os corpos de prova antes e depois do tempo de imersão. Nos ensaios com bactérias foi acrescentado 0,01 % de peptona bacteriológica.

Nos ensaios abióticos a retirada dos produtos de corrosão foi realizada empregando-se a solução de Clark, e nos ensaios bióticos o corpo de prova era lavado primeiramente com solução salina repetidas vezes a fim de retirar o biofilme que se formava na superfície do aço, e após utilizou-se a solução de Clark.

A fim de evitar contaminações, os erlenmeyers eram fechados com tampões de algodão, recobertos de papel alumínio e, cada ensaio continha uma chapa imersa.

O tempo de duração para os ensaios de imersão foi de 19 dias e o potencial de corrosão foi medido antes e no final de cada ensaio.

Estes ensaios foram realizados em duplicata.

### **2.4.3 Curvas de polarização potencioestática**

As curvas de polarização em meio abiótico e biótico foram realizadas pelo método potencioestático variando-se o potencial de 20 mV a cada minuto, a partir de -1000 mV<sub>(ECS)</sub>, registrando-se a densidade de corrente correspondente a cada potencial. Nas curvas com bactérias o corpo de prova ficava imerso 40 minutos antes de iniciar o ensaio, sem aplicar nenhum potencial.

Foram realizadas curvas nos seguintes meios:

#### **2.4.3.1 - Curvas de polarização em água do mar sintética 10%.**

Foram realizadas curvas de polarização em água do mar sintética diluída a 10%, e também neste meio com a presença de bactérias. (concentração de bactérias de  $10^{-5}$  e  $10^{-10}$ )

#### **2.4.3.2 Curvas de polarização em água do mar diluída a 1.5 % com 0.01% de peptona.**

Primeiramente realizou-se curvas de polarização potencioestática em meio abiótico, para se conhecer o comportamento do aço estudado nestas condições.

As curvas bióticas foram realizadas durante um período de 6 dias, com um intervalo de 24 horas entre duas curvas. As bactérias foram inoculadas em todos os erlenmeyers (1 ml contaminado, como descrito no método 2 da preparação do inóculo) com água do mar sintética diluída e peptona no mesmo horário e permaneciam na estufa até a hora respectiva de iniciar os testes, quando a solução com as bactérias era vertido para a célula de trabalho. O corpo de prova ficava em contato com a solução 40 minutos antes de iniciar a curva de polarização. Durante este período não se aplicava nenhum potencial.

Este tipo de teste, foi realizado em triplicata.

#### **2.4.3.3 Curvas de polarização em água do mar sintética diluída a 1.5 % com hexametáfosfato de sódio**

Foram realizadas curvas de polarização potencioestáticas em diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio. Nestes ensaios, em que os meios foram previamente autoclavados, o hexametáfosfato de sódio foi adicionado após as soluções alcançarem a temperatura ambiente.

Na presença de bactérias fixou-se a concentração de 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio, realizou-se curvas em períodos de 6 dias, com intervalos de 24 horas conforme descrito no item 2.4.2.2. Os testes foram realizados em triplicata, sendo que alguns foram realizados em quadruplicatas.

#### **2.4.3.4 Curvas de polarização com os produtos metabólicos**

Para a realização destes ensaios as bactérias também foram inoculadas em água do mar diluída a 1.5%. Os erlenmeyers em que foram incubadas as bactérias permaneciam em estufa por um

determinado período de tempo. A fim de obter uma solução sem bactérias, mas apenas com o produto proveniente das reações metabólicas realizadas durante um determinado período de crescimento destes microrganismos, efetuou-se uma filtração à vácuo com membrana milipore de 2 um do sistema previamente contaminado.

Também foram realizadas curvas de polarização potencios-tática com os produtos metabólicos proveniente das bactérias e adicionado-se o hexametáfosfato de sódio na concentração de 4000 ppm antes do início da curva.

### 3 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 Crescimento do microrganismo.

A cultura de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* desenvolveu-se em meio agar nutriente, tendo apresentado crescimento de colônias após 24 horas em estufa a 28°C, figura (7) e (7a). Em todos os meios adicionados com o inóculo desta bactéria observou-se o crescimento bacteriano. Com o plaqueamento das aliquotas provenientes dos ensaios, acompanhou-se também a pureza da cultura da bactéria em estudo. No período em que foram realizados os testes não foi detectado, visualmente, nenhum tipo de contaminação.

Nos meios de água do mar sintética diluída a 10% e em meio de cultura líquido, o crescimento das bactérias parece ser mais acentuado do que em água do mar diluída a 1,5%. Nos ensaios realizados com as soluções aquosas de hexametáfosfato de sódio na concentração de 2000 ppm em água do mar sintética diluída a 1,5%, também foi verificado o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Nos ensaios eletroquímicos utilizou-se a diluição descrita em 2.2.2.1 b, devido ao crescimento abundante desta bactéria, obtendo-se assim um meio considerado razoável para a realização dos ensaios.

### 3.2 Acompanhamento do potencial a circuito aberto

#### 3.2.1 Ensaaios realizados sem a presença de microrganismos.

##### 3.2.1.a Em água do mar sintética diluída a 10%

Nos ensaios realizados em água de mar sintética diluída a 10%, os corpos de prova apresentaram produtos de corrosão de cor alaranjada, provavelmente hidróxido férrico, pouco aderentes, ocorrendo ora de maneira uniforme em toda a superfície do corpo de prova, ora apenas em um dos lados do corpo de prova.

Como se observa na figura (8), o potencial de corrosão do aço situava-se em torno de  $-600$  mV (ECS) em poucos minutos de imersão do corpo de prova, permanecendo próximo a estes valores durante ensaios acompanhados por 24 horas.

##### 3.2.1.b Em meio de cultura líquido

Nos ensaios realizados em meio de cultura líquido, também observou-se um abaixamento do potencial de corrosão como se vê na figura (9), notando-se a formação de produtos de corrosão.

##### 3.2.1.c Em água do mar sintética diluída a 1.5%

Nos ensaios realizados em água do mar diluída a 1,5 %, o potencial de corrosão permaneceu em valores acima de  $-600$  mV (ECS), como pode ser visto na figura (10), e apresentava um comportamento semelhante aos testes referidos em 3.2.1.a.

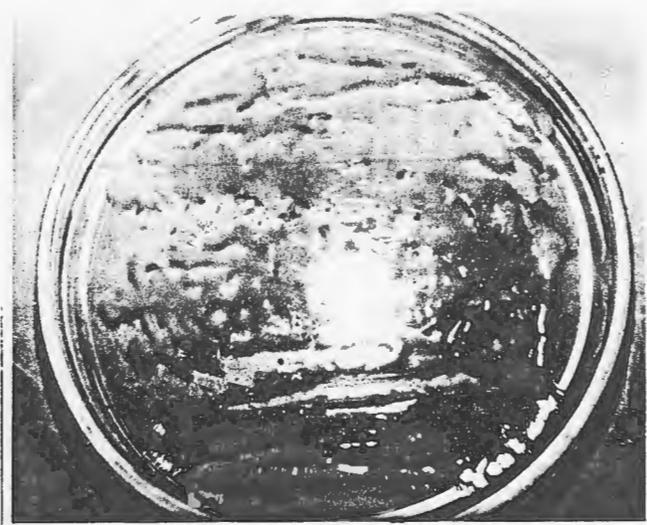


Fig.07 Colônias de bactérias após 24 horas em estufa (Plaqueamento)

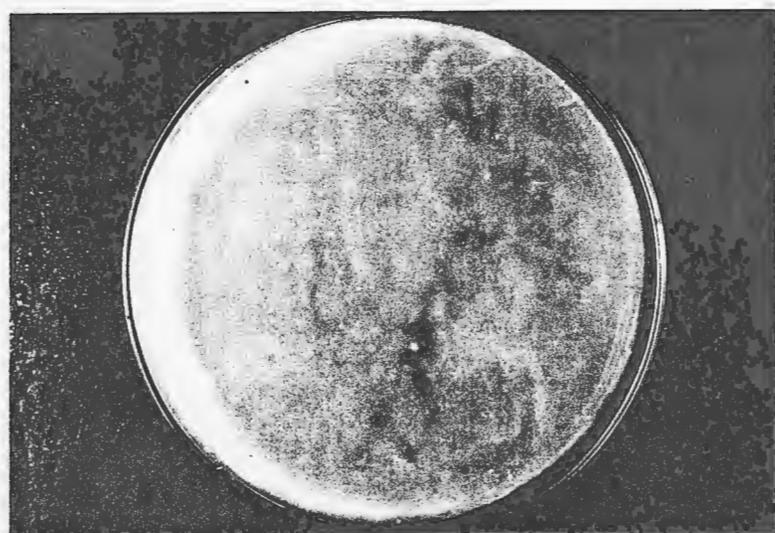


Fig 7a Colônia de bactérias após 24 horas em estufa.(Plaqueamento retirado da solução contaminada)

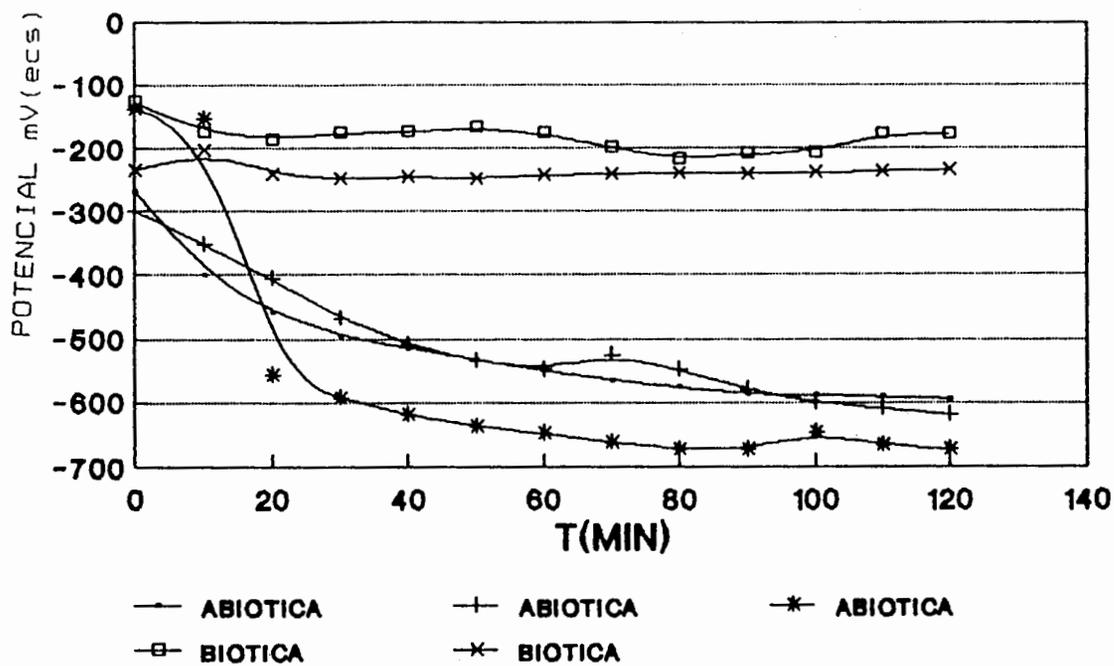


Fig.08 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída a 10% na presença e ausência de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

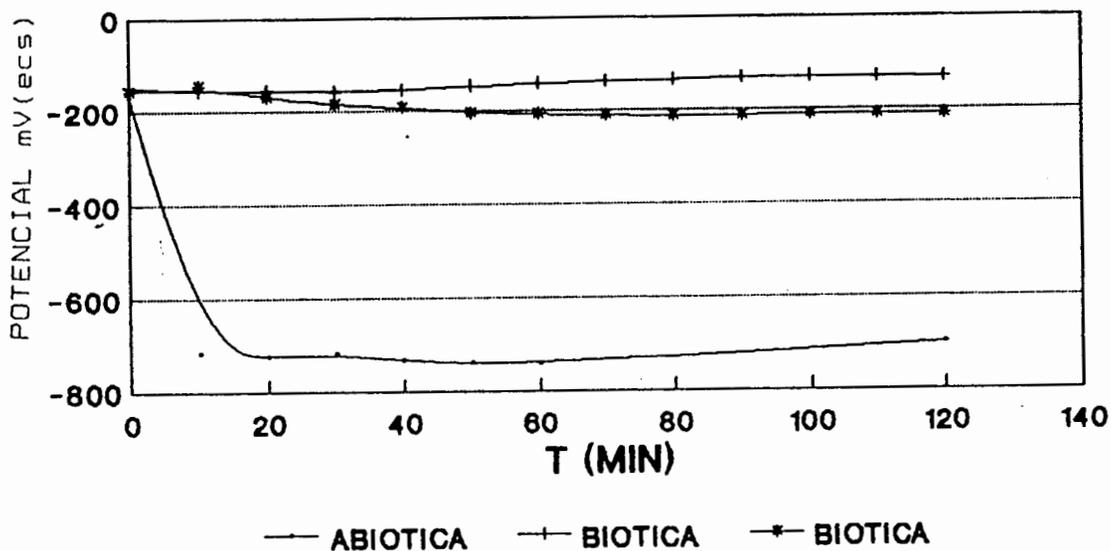


Fig.9 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em meio de cultura líquido, na presença e ausência de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

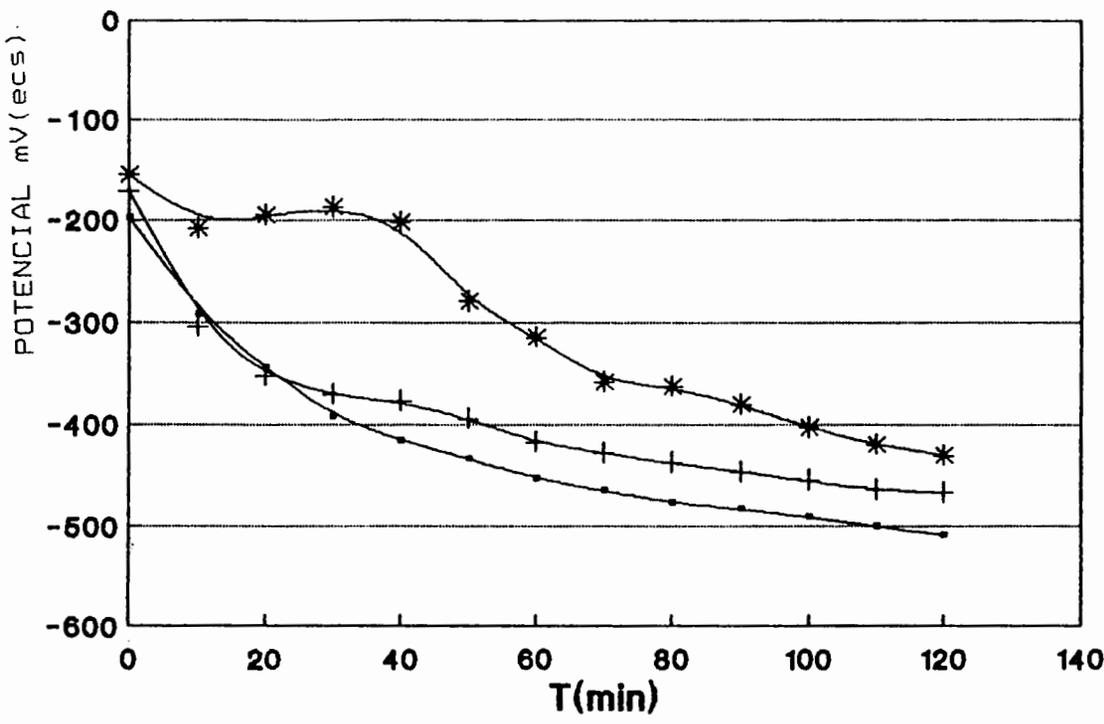


Fig.10 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída a 1.5%.

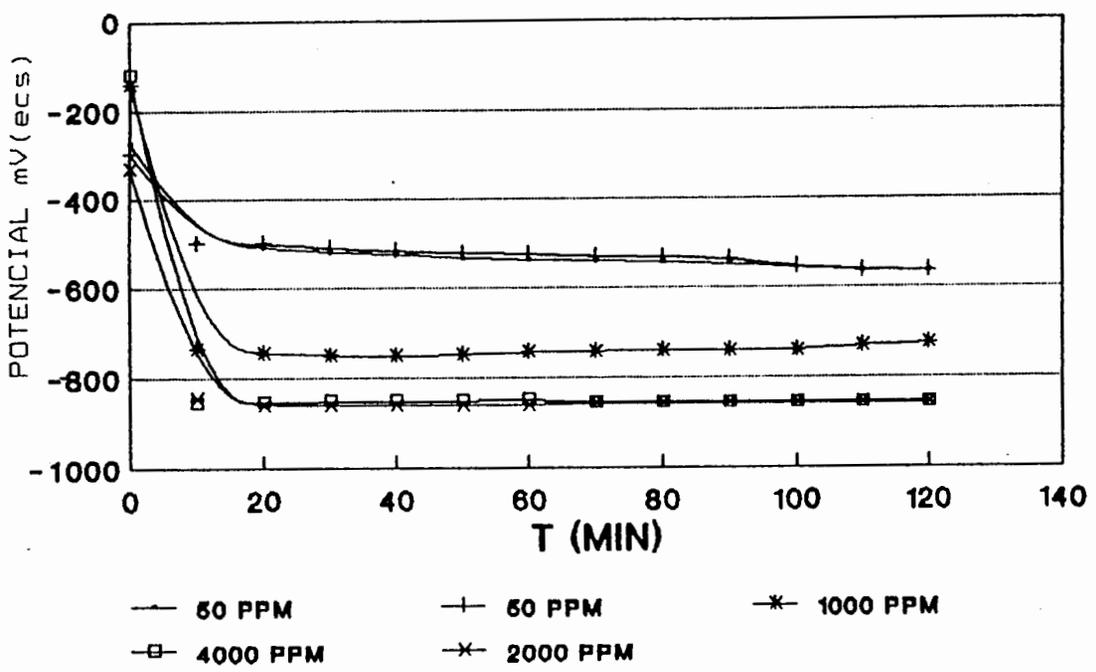


Fig.11 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio em água do mar sintética diluída a 1,5%.

3.2.1.d Em diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio em água do mar diluída a 1,5%.

Em todas as concentrações de hexametáfosfato de sódio usadas observou-se um abaixamento do potencial de corrosão do aço.

Nos testes realizados nas concentrações de 50 e 100 ppm, conforme se observa na figura (11), o potencial ficava em torno de -550 mV logo após a imersão do corpo de prova, e notou-se grande incidência de corrosão, e produtos de corrosão. Havia uma tendência à formação de um filme sobre a superfície metálica, vide figura (12).

Na concentração de 1000 ppm, notava-se pouca corrosão, e o potencial de corrosão do aço ficou em torno de -700 mV (ecs), conforme figura (11). Nesta concentração observou-se pites no corpo de prova.

Nos testes realizados na concentração de 2000 ppm notava-se a rápida redução do potencial após a imersão do corpo de prova, alcançando valores abaixo de -800 mV (ecs), e sua permanência nestes valores, apesar do aparecimento de pites no corpo de prova depois de 24 horas de imersão.

Quando da retirada do corpo de prova, verificava-se que se havia formado um filme sobre a superfície metálica que não apresentava boa formação nas bordas.

Os ensaios realizados na concentração de 4000 ppm apresentavam um comportamento bastante semelhante aos testes realizados com 2000 ppm, conforme figura (15), pois o potencial de corrosão do aço baixava rapidamente e observou-se a formação do filme sobre a



Fig.12 Aparência dos corpos de prova após ensaios com hexametáfosfato de sódio.

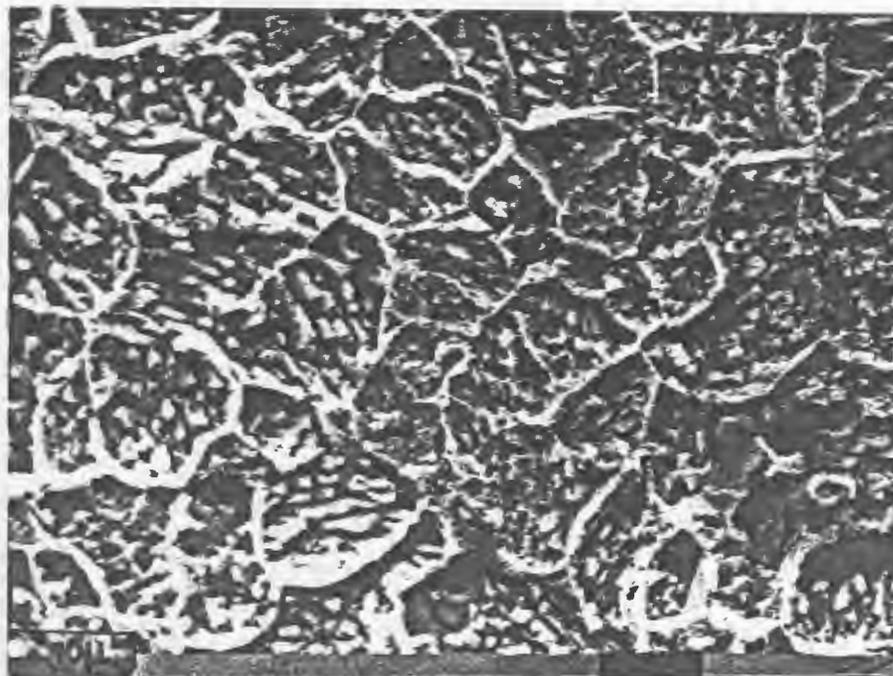


Fig.13 Aspecto da superfície do aço ABNT (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

superfície metálica com as mesmas características da concentração de 2000 ppm, figura (12) e (13).

### 3.2.2 Ensaios de potencial a circuito aberto na presença de bactérias

#### 3.2.2.a Em água do mar sintética diluída a 10%

Nos ensaios realizados em água do mar diluída a 10% contaminada com bactérias observou-se que o potencial mantinha-se em valores mais positivos situando-se em torno de  $-200$  mV (ecs), conforme a figura (8). Nestes ensaios não se observava a presença de produtos de corrosão como naqueles realizados sem a presença de bactérias, já que um espesso biofilme recobria toda a extensão do corpo de prova.

Com o passar do tempo (após 12 horas) notava-se o aparecimento de uma turbidez na solução, mais acentuada quando permanecia por períodos mais longos (24 horas) de incubação das bactérias.

Também se verificou que em períodos mais longos de exposição do corpo de prova embutido na solução contaminada com bactérias, que estas começavam a se infiltrar por baixo da resina epóxi que recobria o metal, impedindo assim a determinação exata de sua área.

As figuras de número (16) a (23) mostram a superfície do metal colonizada por bactérias, após um período de 3 dias de imersão.

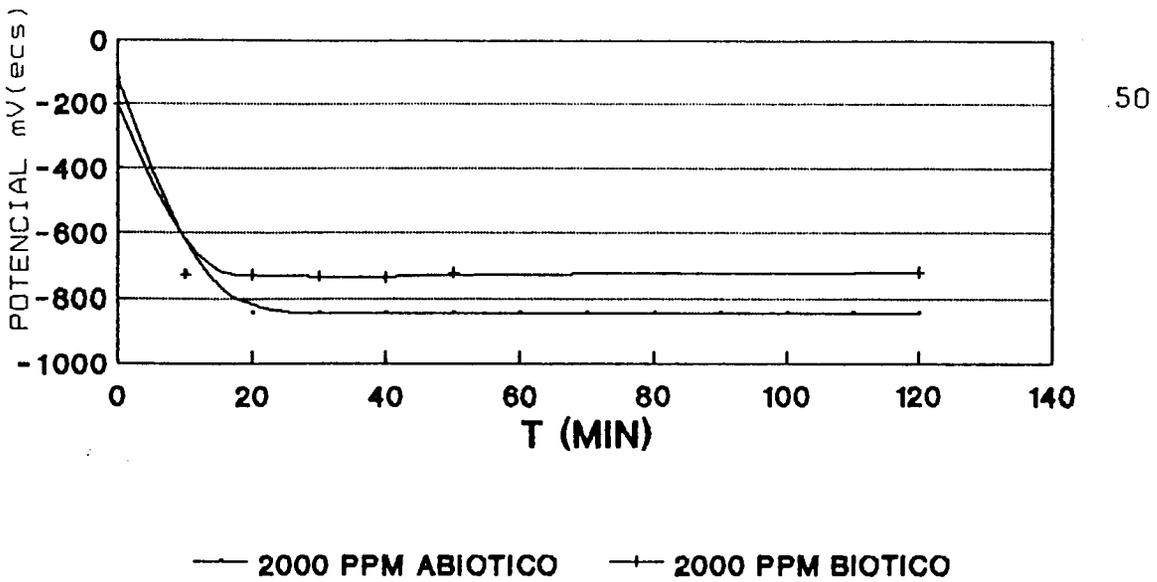


Fig.14 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006, em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametafosfato de sódio na ausência e presença de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

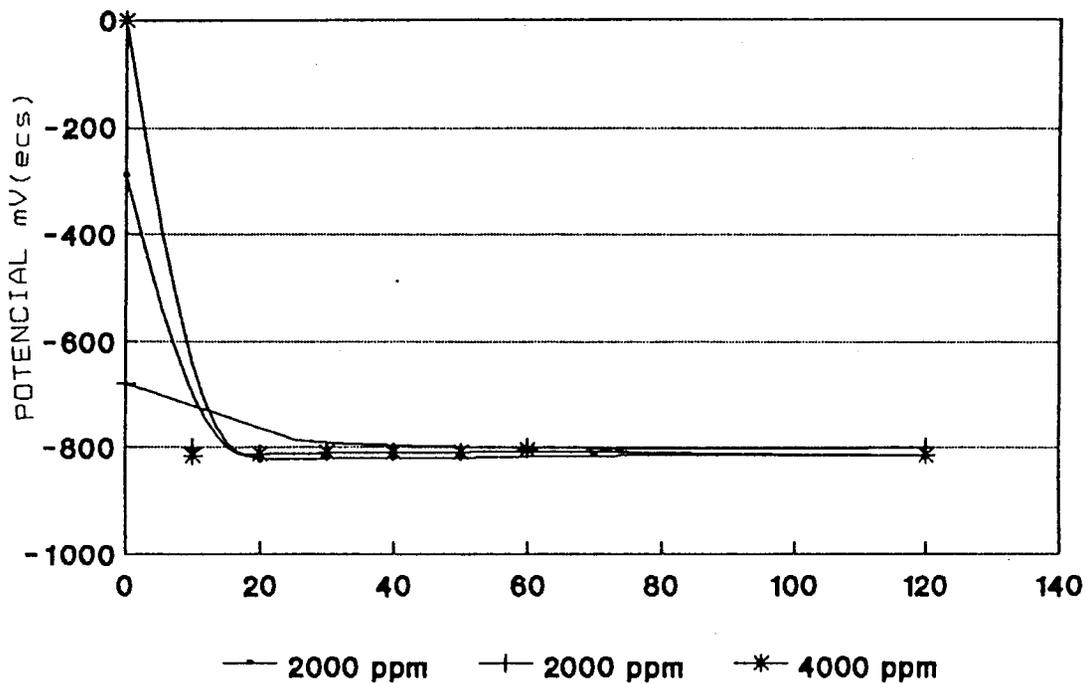


Fig.15 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 e 4000 ppm de hexametafosfato de sódio (sem bactérias).

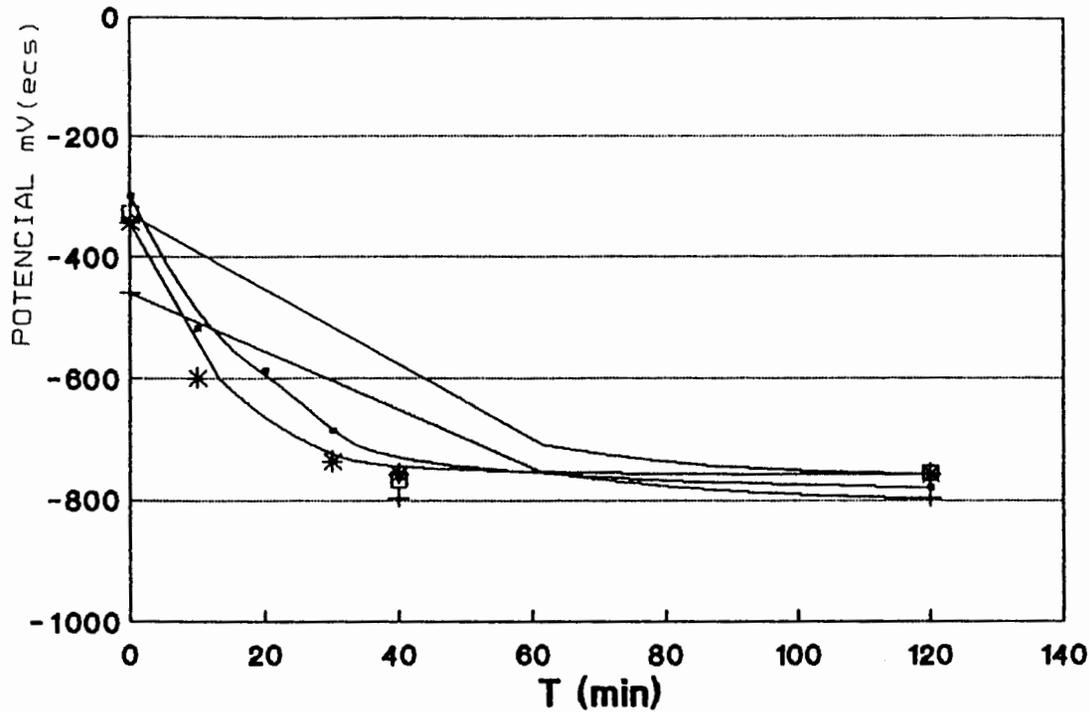


Fig.24 Acompanhamento do potencial de corrosão do aço ABNT 1006, em água do mar sintética diluída a 1,5%, na presença de bactérias.

MEIO	AMOSTRAS	E CORROSAO INICIAL/FINAL	
AMD			
HMP	1	-288	-720
PEPT	2	-217	-726
BACT			
AMD	3	-208	-829
HMP	4	-367	-819
AMD			
PEPT	5	-400	-712
BACT	6	-300	-733
AMD			
BACT	7	-434	-756

AMD: AGUA DO MAR DILUIDA 1,5%

Tabela 5 Acompanhamento do potencial de corrosão (6 Dias)

### 3.2.2.b Em meio de cultura líquido

Nos ensaios bióticos realizados em meio de cultura líquido, o potencial permanecia em valores em torno de  $-200$  mV (ecs), conforme figura (9), e observava-se a formação de um espesso biofilme sobre a superfície metálica.

Devido a que o meio de cultura no qual foram inoculadas as bactérias apresentar uma cor avermelhada, a qual contrastava com a cor amarelada das bactérias, notava-se depois de um determinado tempo, em torno de 35 minutos, que se iniciava a formação de uma "nuvem" de bactérias em torno do corpo de prova. O início da formação do biofilme se dava nas partes inferior e superior da chapa.

Nestes testes preliminares utilizou-se concentração de bactérias de  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$  (diluição de 2.2.2.1) e observou-se um crescimento acentuado, aparentemente semelhante nestas duas concentrações.

### 3.2.2.c Em água do mar sintética diluída a 1.5%

Nos testes realizados em água do mar diluída a 1.5% com bactérias observou-se um comportamento diferenciado em relação aos testes referidos em 3.2.2.b, embora ocorresse a formação do biofilme, e observando-se (através de plaqueamentos) o desenvolvimento da população bacteriana porém em menor escala, figuras (25), (26) e (27). O potencial de corrosão mantinha-se em valores baixos, em torno de  $-600$  mV (ecs), conforme figura (24),

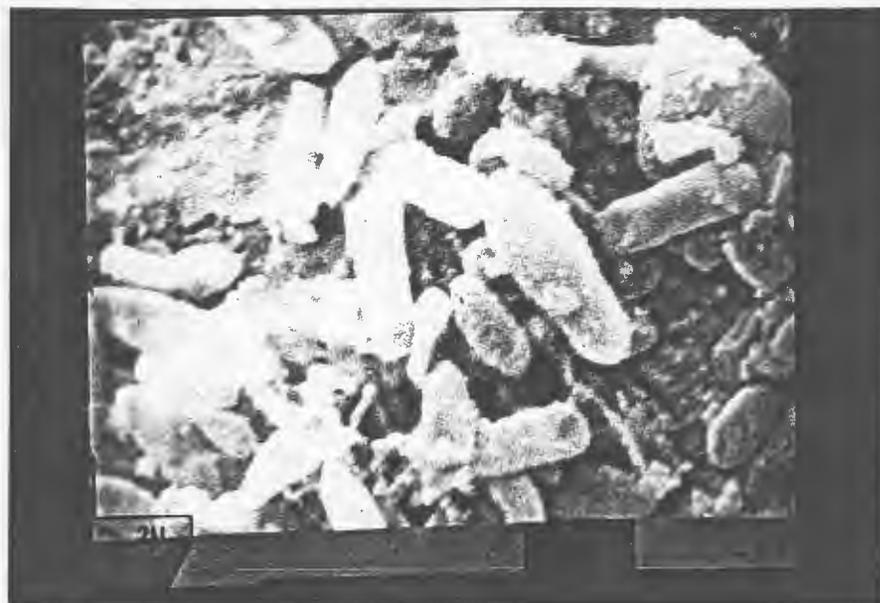


Fig.16 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

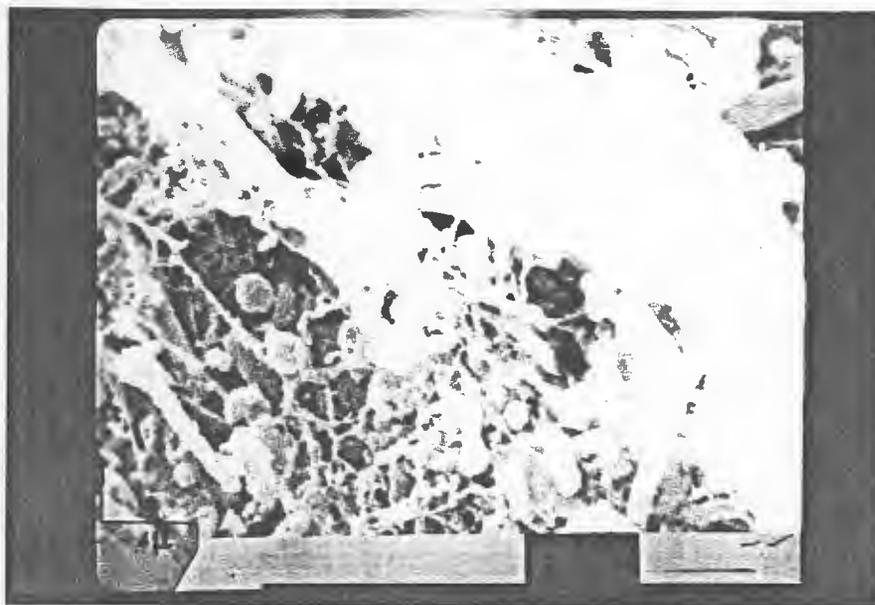


Fig.17 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.



Fig.18 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

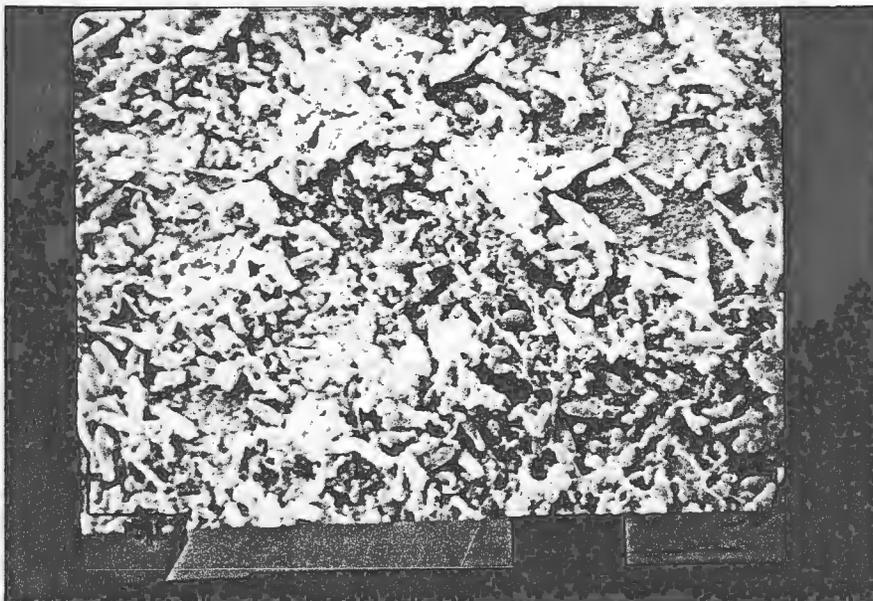


Fig.19 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

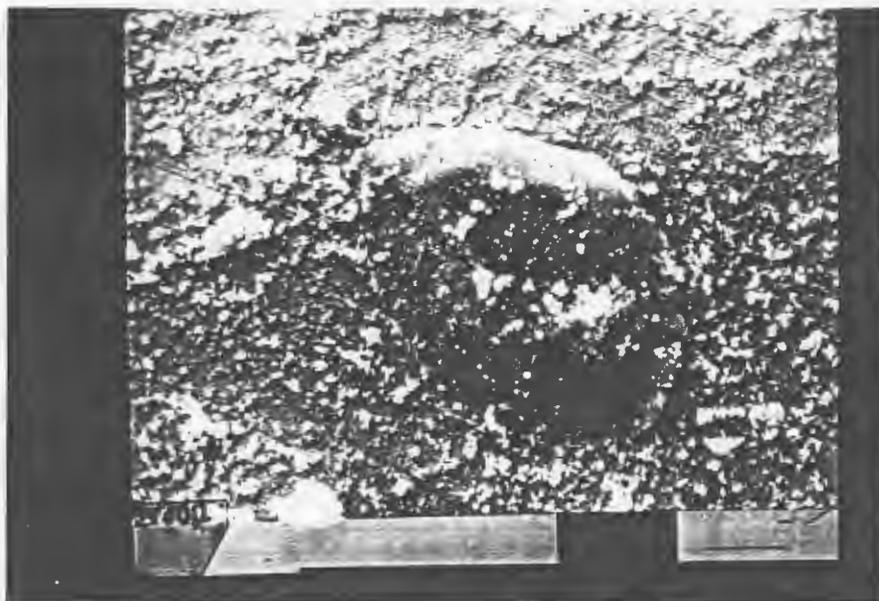


Fig.20 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

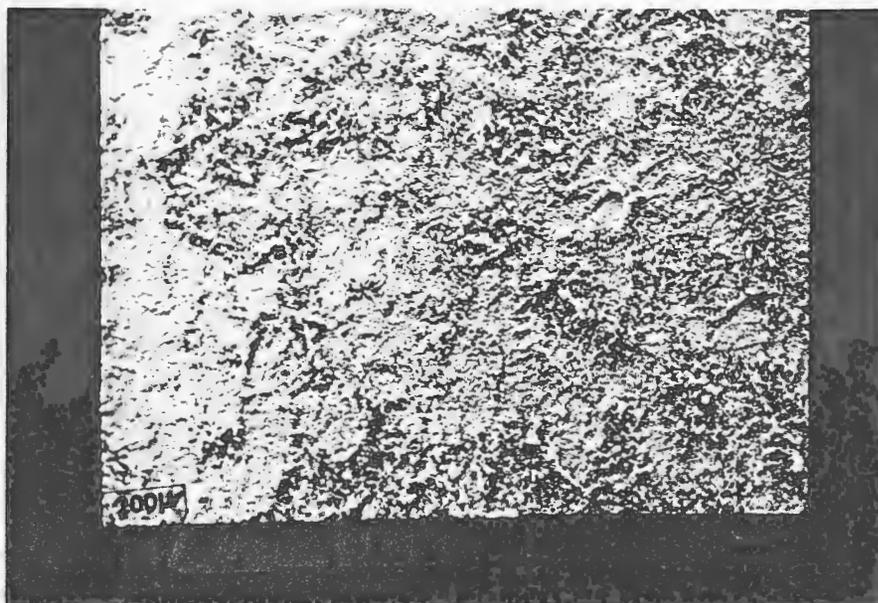


Fig.21 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

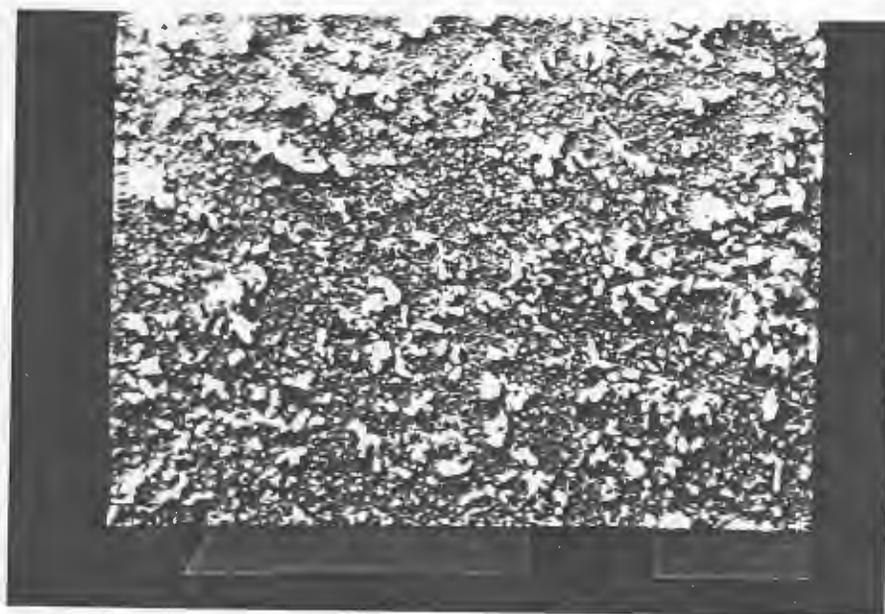


Fig.22 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

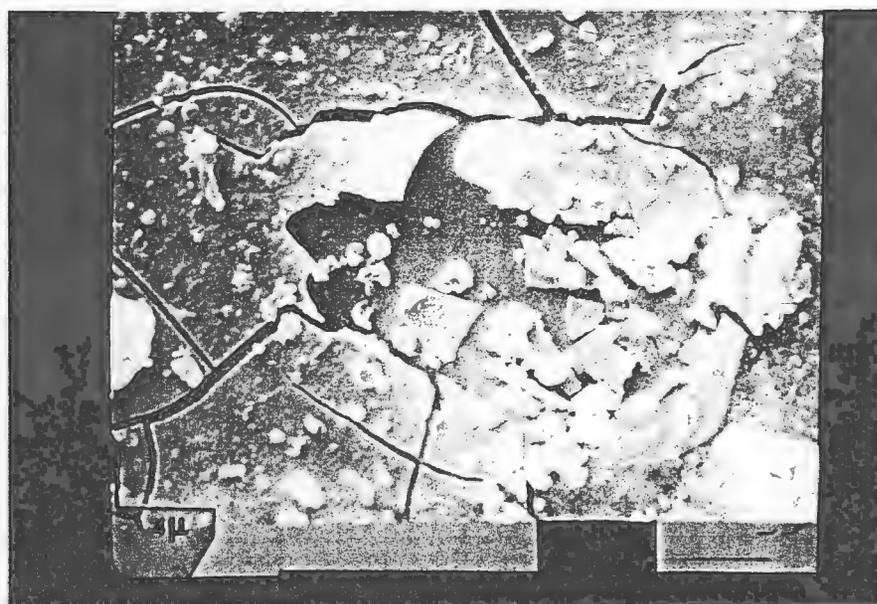


Fig.23 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 3 dias de imersão em água do mar sintética diluída 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

observando-se produtos de corrosão em menor quantidade do que nos meios abióticos já citados em 3.2.1.d.

3.2.2.d Com a concentração de 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio  
Nestes ensaios foi fixada a concentração de hexametáfosfato de sódio em 2000 ppm.

Nos primeiros minutos de imersão do corpo de prova na solução com o inibidor e as bactérias nota-se, conforme a figura (14), que ocorre um comportamento bastante semelhante aos ensaios realizados em meio estéril, isto é, o potencial baixa rapidamente para valores em torno de  $-750$  mV (ECS), mas após determinado período de tempo, o potencial deste sistema biótico deslocava-se para valores de potencial mais positivos do que os de sistemas estéreis.

Observou-se em alguns ensaios com o inibidor na presença de bactérias, que a solução tornava-se turva, como se observa na figura (28) e (29).

As figuras de número (30) a (32) mostram o aspecto da superfície do aço em estudo após 5 dias de imersão em solução com hexametáfosfato de sódio e bactérias. As figuras (33) e (34) mostram os testes de acompanhamento do crescimento dos microrganismos nas soluções com e sem hexametáfosfato de sódio com bactérias.

Ainda foram realizados testes com um período maior de tempo, sem o comprometimento do corpo de prova (com relação a dificuldade na determinação exata da área exposta), lendo-se o potencial no início e fim dos testes, cujos resultados estão na tabela 5.

### **3.3 Ensaaios de perda de massa**

Na tabela 4 estão mostrados os resultados dos ensaios de perda de massa. Estes resultados foram obtidos após 19 dias de imersão dos corpos de prova.

Através das figuras (35) a (37) pode-se observar o aspecto dos corpos de prova, alguns minutos após o encerramento do ensaio.

#### **3.3.a Ensaaios abióticos (sem a presença de bactérias)**

A figura (35) mostra o aspecto do corpo de prova ensaiado em água do mar sintética diluída a 1,5%, nos quais se observou corrosão generalizada, com abundante formação de produtos de corrosão.

Nos ensaios realizados neste meio já citado, acrescido de 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio, vide figura (36), nota-se que as bordas de chapa se apresentam mais escurecidas, indicando provavelmente que estas áreas se comportavam como regiões anódicas. O aspecto geral do corpo de prova não indica ter ocorrido corrosão generalizada.

### 3.3.b Ensaios bióticos (com a presença de bactérias)

A figura (37) mostra o aspecto do corpo de prova após a realização do ensaio em meio contendo água do mar sintética diluída a 1,5 % com bactérias. Pode-se observar que sobre a superfície metálica houve a formação de um biofilme não contínuo, de consistência gelatinosa e com uma parte exterior pouco aderente. Como se pode ver na figura (40), na superfície do metal ocorreu uma aderência mais pronunciada deste filme, que permaneceram marcas mesmo após a decapagem.

Os ensaios realizados neste meio acrescidos de 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio também apresentaram um filme formado sobre a superfície do aço, mas com algumas características diferentes do citado anterior, sendo mais espesso e aderente, abrangendo toda a área do corpo de prova.

As figuras (38) a (41) mostram os mesmos corpos de prova após a imersão em solução de Clark.

As figuras de número (42) a (45) mostram a aparência dos corpos de prova, após a realização das curvas de polarização.

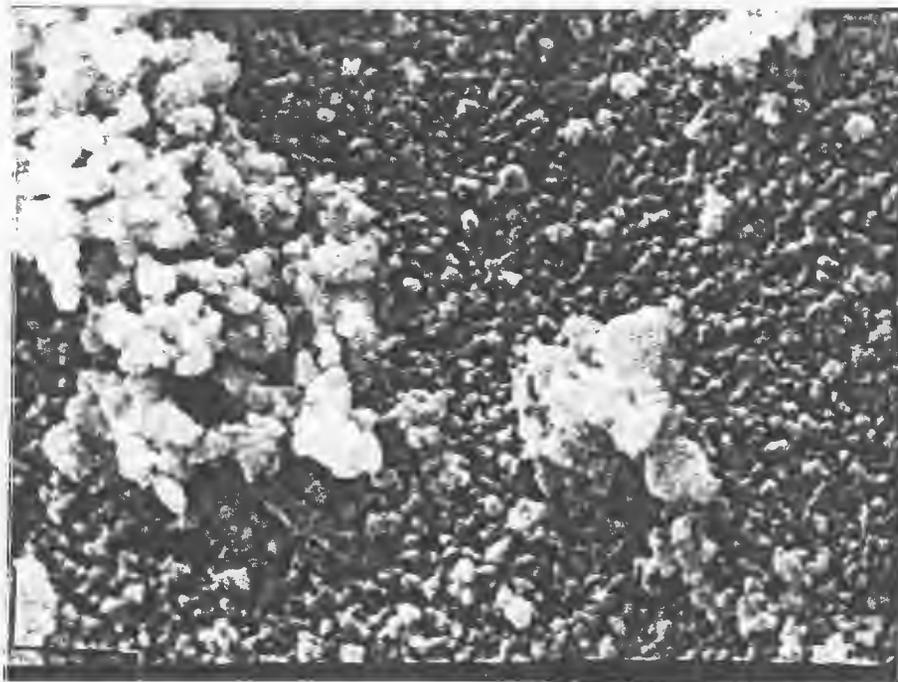


Fig.25 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água o mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*

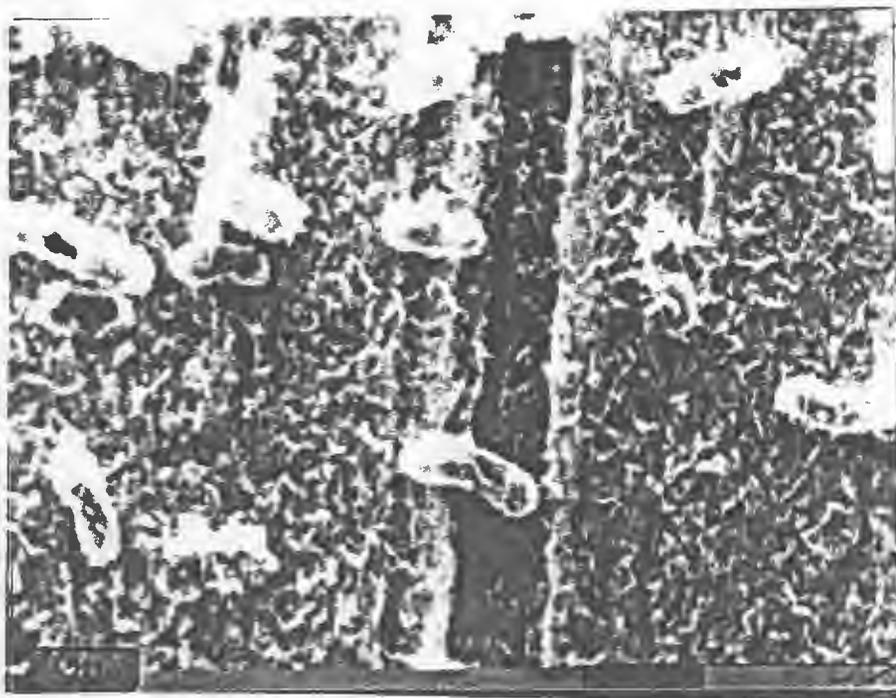


Fig.26 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

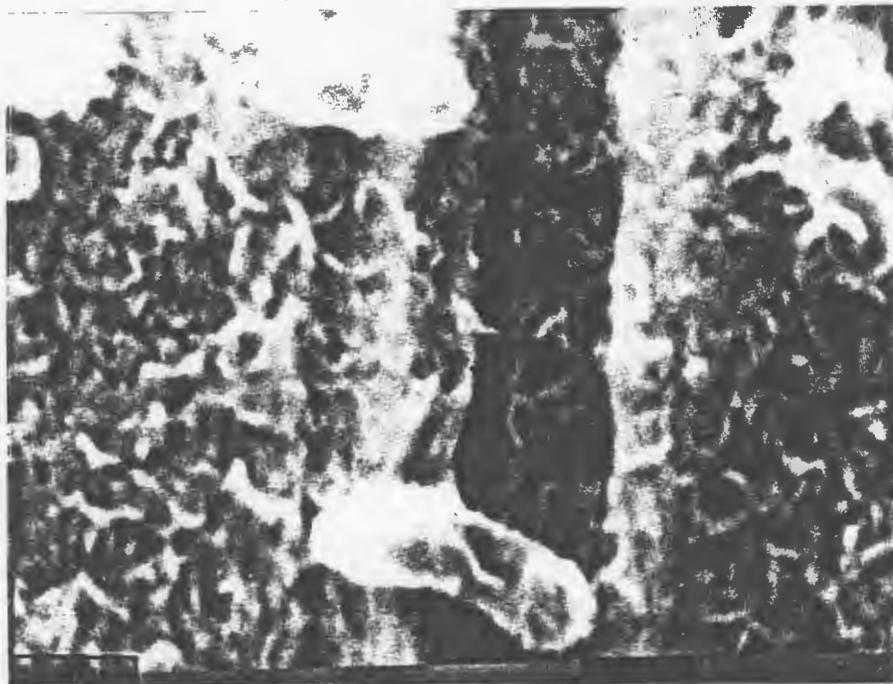


Fig.27 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

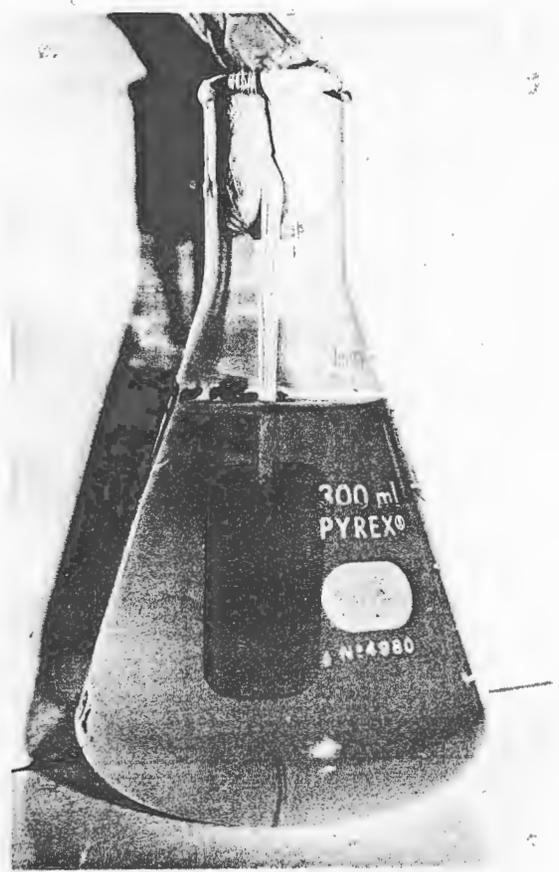


Fig.28 Ensaio gravimétrico realizado em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hemetafosfato de sódio e bactérias.

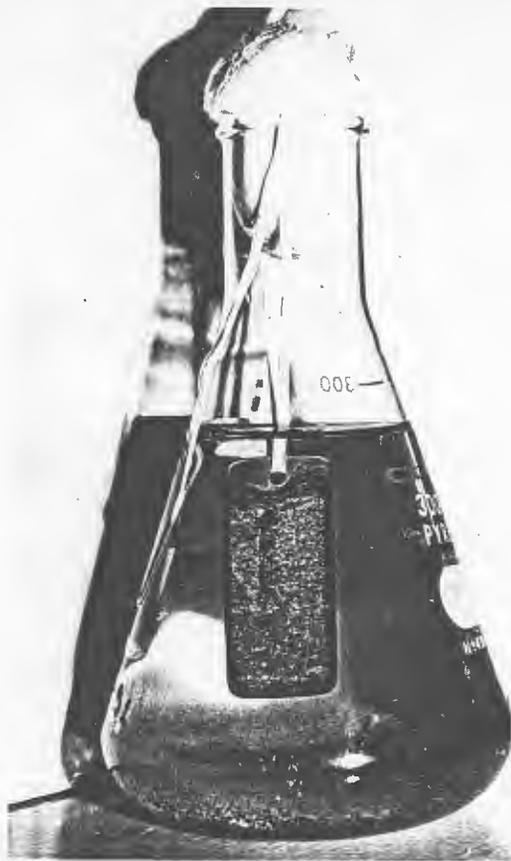


Fig.29 Ensaio gravimétrico realizado em água do mar sintética diluída a 1,5%.

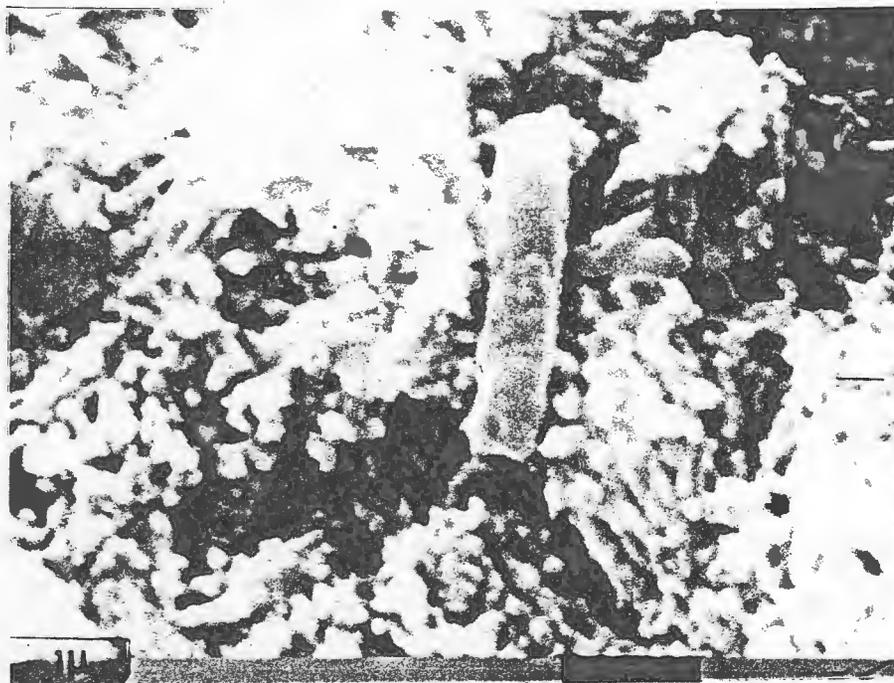


Fig.30 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

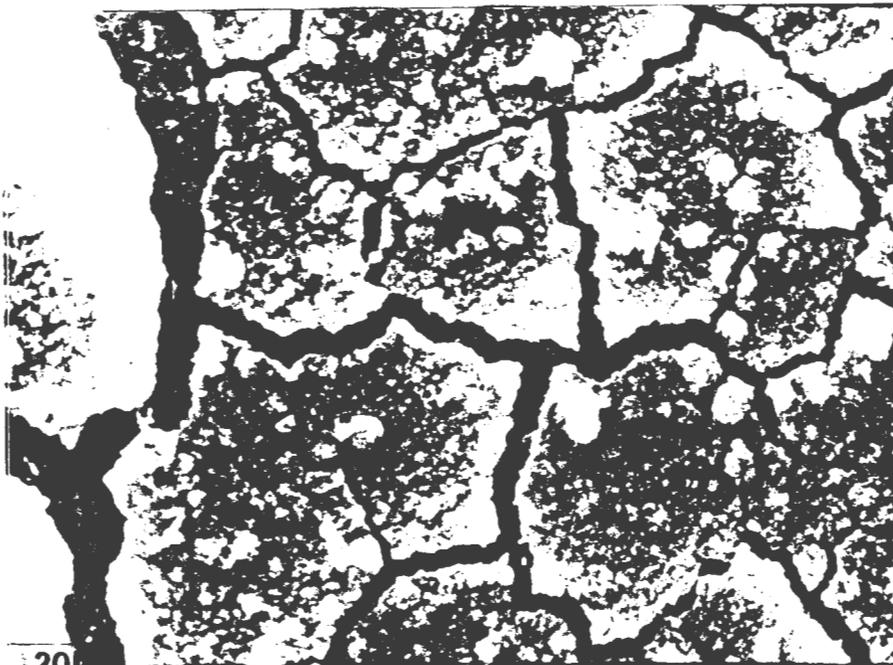


Fig.31 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.



Fig.32 Aspecto da superfície do aço ABNT 1006 (MEV), após 5 dias de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.



Fig.33 Plaqueamento realizado da solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias e hexametáfosfato de sódio.



Fig.34 Plaqueamento realizados da solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias sem o hexametáfosfato de sódio.

<u>Meio utilizado</u>	<u>Perda de massa das amostras</u>	
AMSD	26.390	65
	19.240	
AMSD + 2000 ppm de HMP	6.024	
	5.840	
AMSD + 2000 ppm de HMP + Bact.	4.619	
	4.455	
AMSD + Bact	2.746	
	2.539	

Tabela 6 Ensaio de perda de massa (mdd)

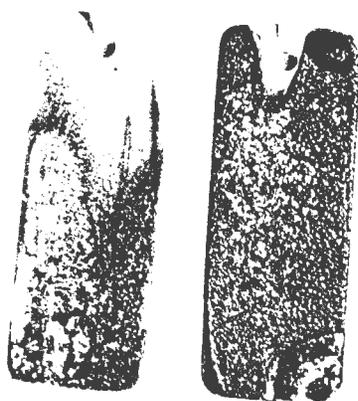


Fig.35 Aparência dos corpos de prova após o ensaio de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5% (meio abiótico).

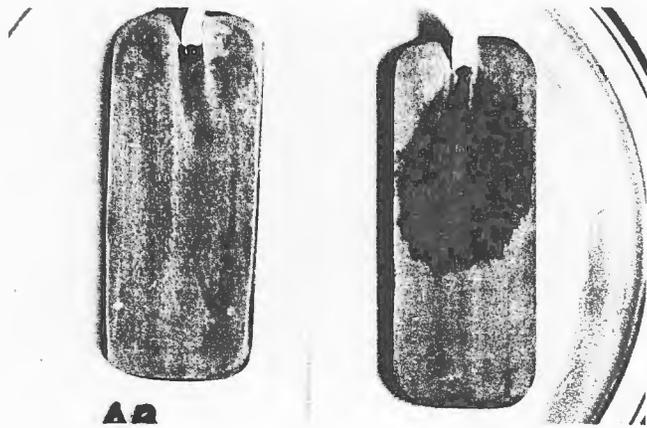


Fig.36 Aparência dos corpos de prova após o ensaio de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

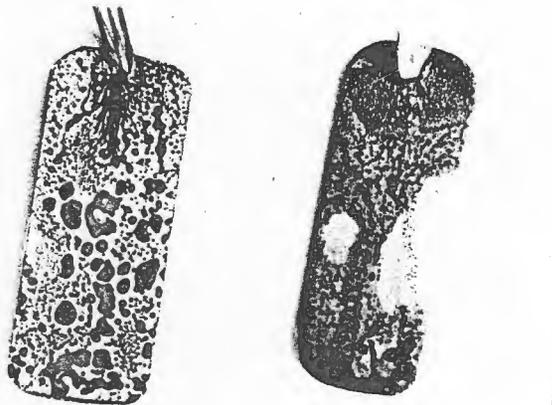


Fig.37 Aparência dos corpos de prova após o ensaio de imersão em água do mar sintética diluída a 1,5%, na presença de bactérias.



Fig.38 Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de Clark (ensaio realizado em água do mar sintética a diluída a 1,5%)

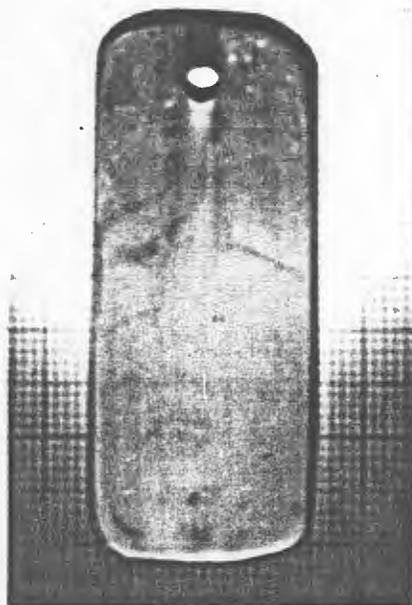


Fig.39 Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de clark (ensaio realizado em água do mar sintética diluída a 1,5% e 2000 ppm de hexametafosfato de sódio).



Fig.40 Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de Clark (ensaio realizado em água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias.)

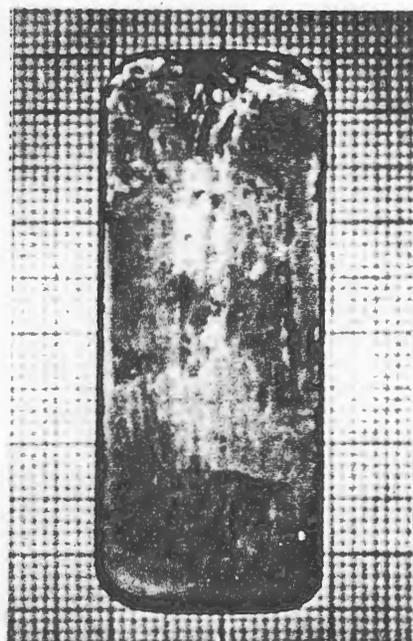


Fig.41 Aparência do corpo de prova após a decapagem em solução de Clark (ensaio realizado em água do mar sintética diluída a 1,5% com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio e bactérias.)



Fig.42 Aparência do corpo de prova embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.

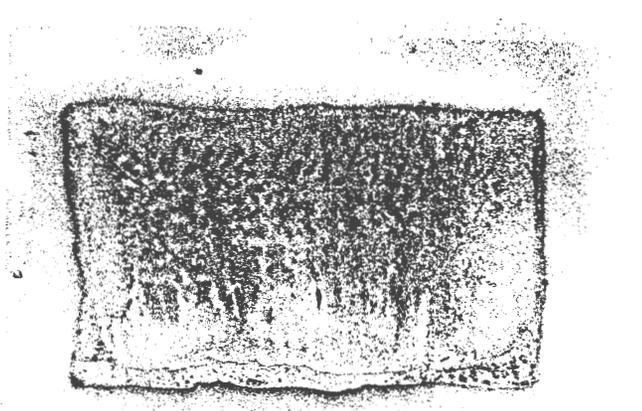


Fig.43 Aparência do corpo de prova, embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias depois de 24 horas de crescimento.

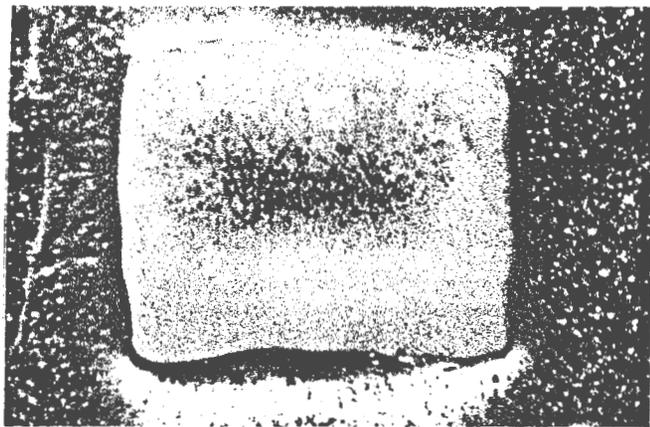


Fig.44 Aparência do corpo de prova, embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias depois de 48 horas de crescimento.

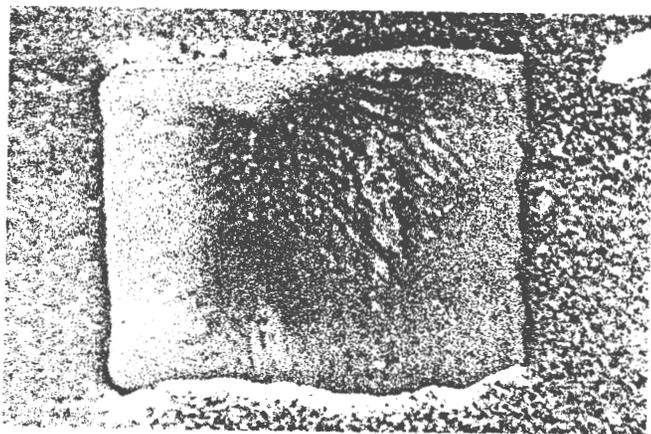


Fig.45 Aparência do corpo de prova, embutido em resina acrílica, após a realização da curva de polarização potencioestática, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias depois de 72 horas de crescimento.

### 3.4 Curvas de polarização

#### 3.4.1 Curvas de polarização sem a presença de bactérias

##### 3.4.1.a Em água do mar sintética diluída a 10%

As curvas de polarização nesta solução apresentaram um comportamento reprodutível, representado na figura (46). Pode-se observar uma zona de corrente limite catódica em torno de  $30 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  que está na faixa entre  $-800$  e  $-1000$  mV (ECS), o potencial de corrosão situa-se abaixo de  $-750$  mV (ECS), e, a partir deste potencial no sentido anódico a densidade de corrente aumentou rapidamente.

O corpo de prova após o ensaio apresentava muitos pites.

##### 3.4.1.b Em água do mar diluída a 1.5%

As curvas obtidas neste meio estão representadas nas figuras (47) a (50). Como pode se notar através das figuras, nestes ensaios não se conseguiu uma boa reprodutibilidade, pois ocorreu variação quanto ao potencial de corrosão, o que pode ser atribuído ao fato de as curvas se traçarem a partir de um potencial bastante catódico ( $-1000$  mV) porém sem uma redução completa do filme de óxido formado ao ar.

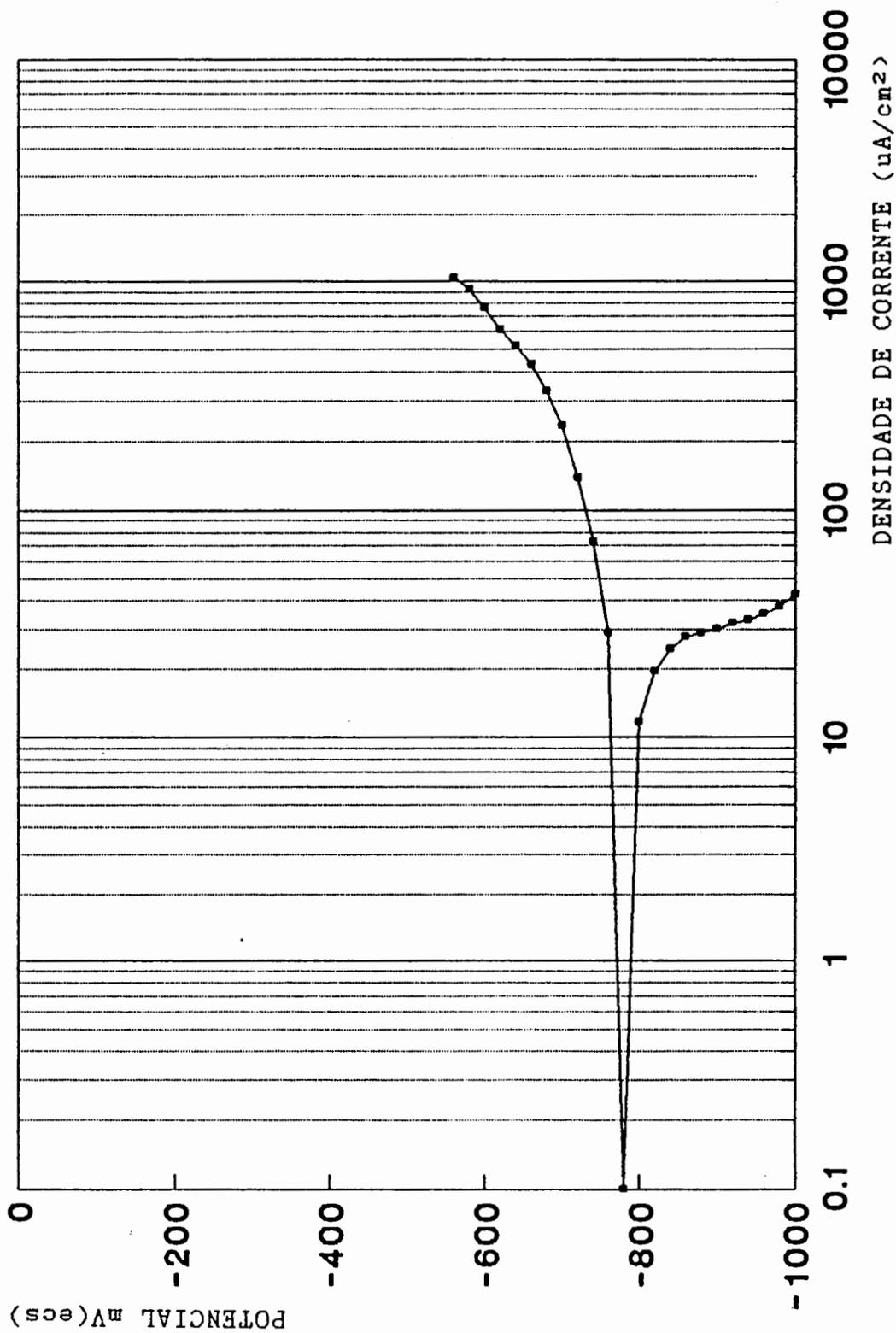


Fig.46 Curva de polarização potencioestática para aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10%.

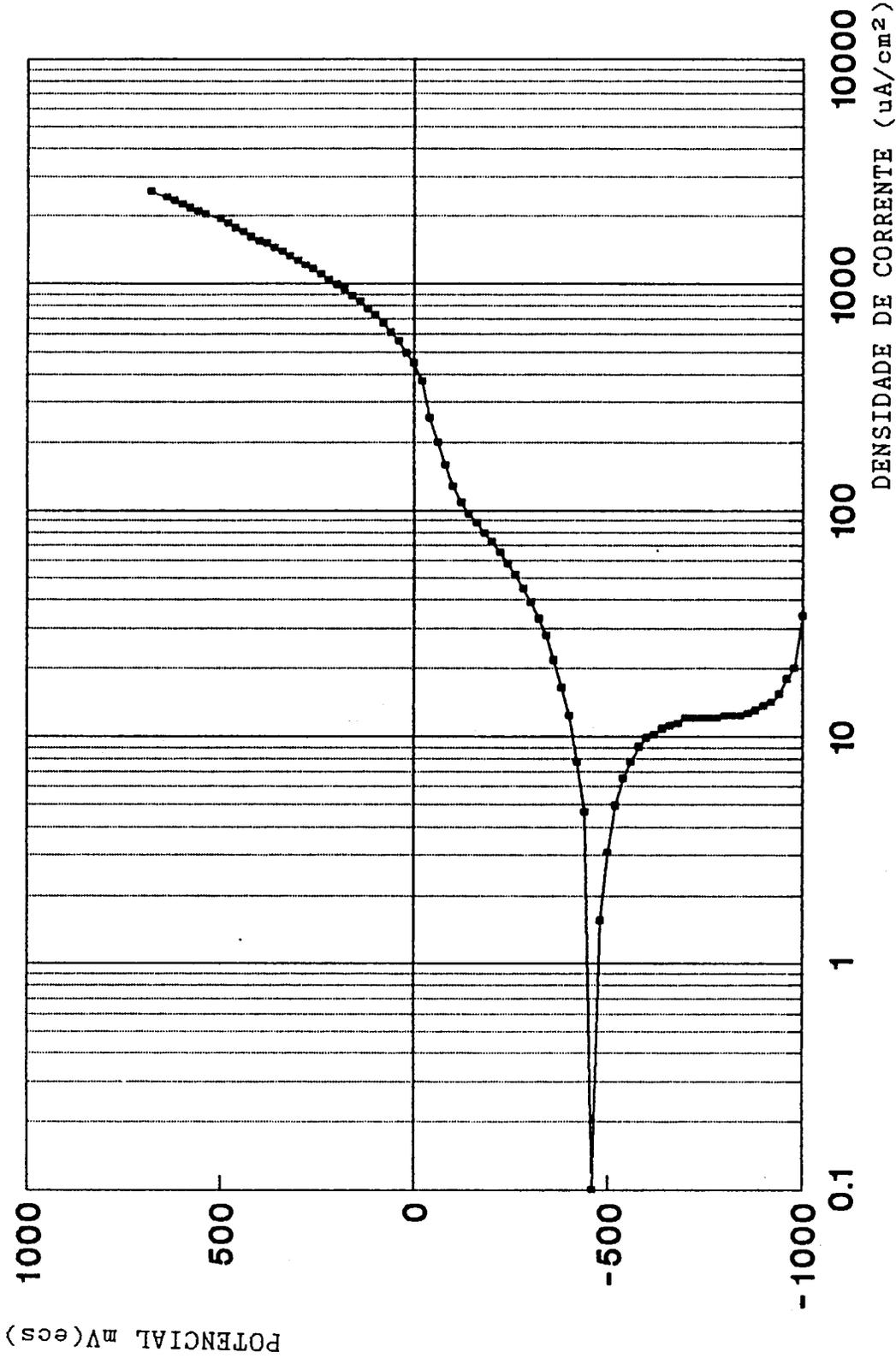


Fig.47 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.

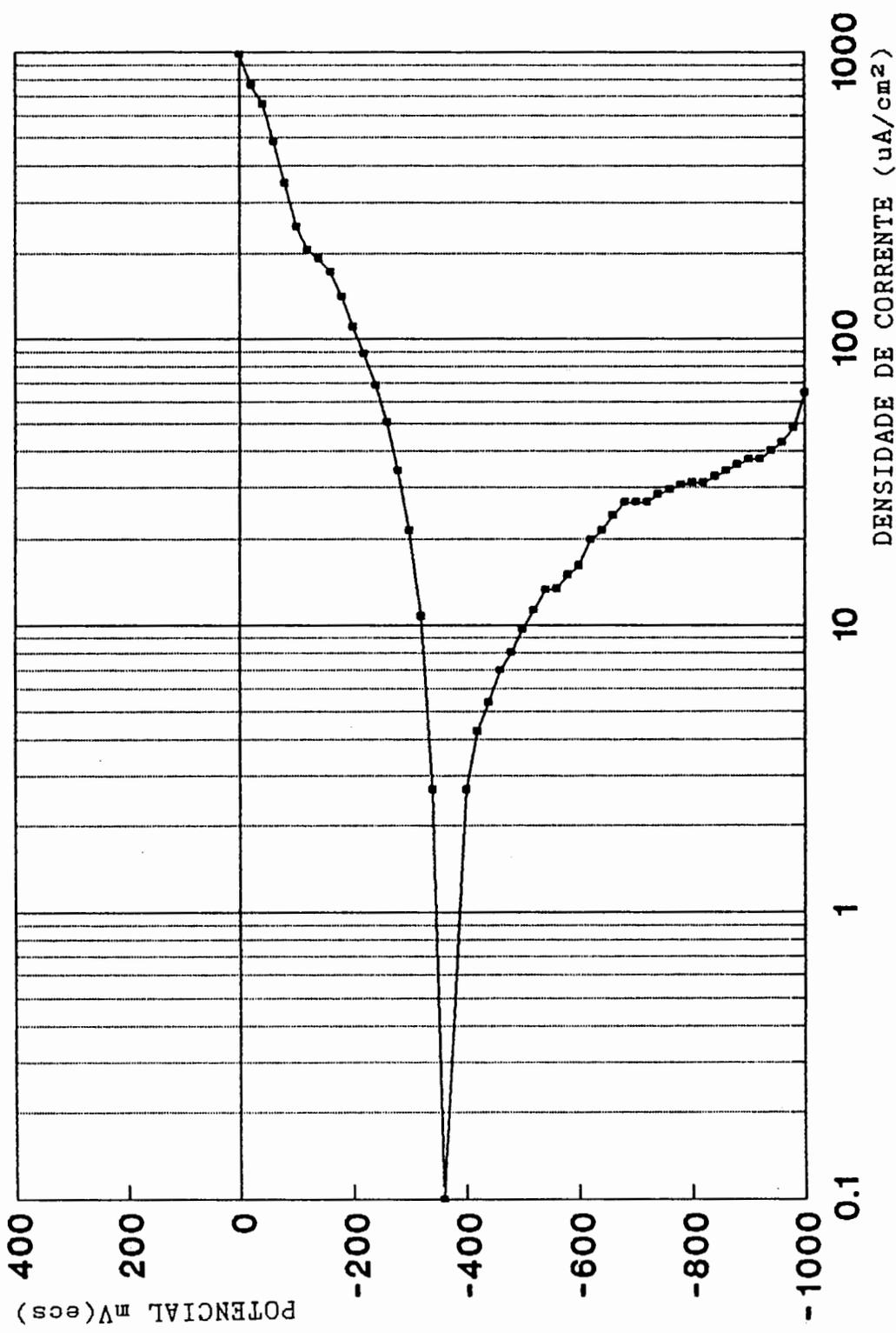


Fig.48 Curva de polarização potenciostática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.

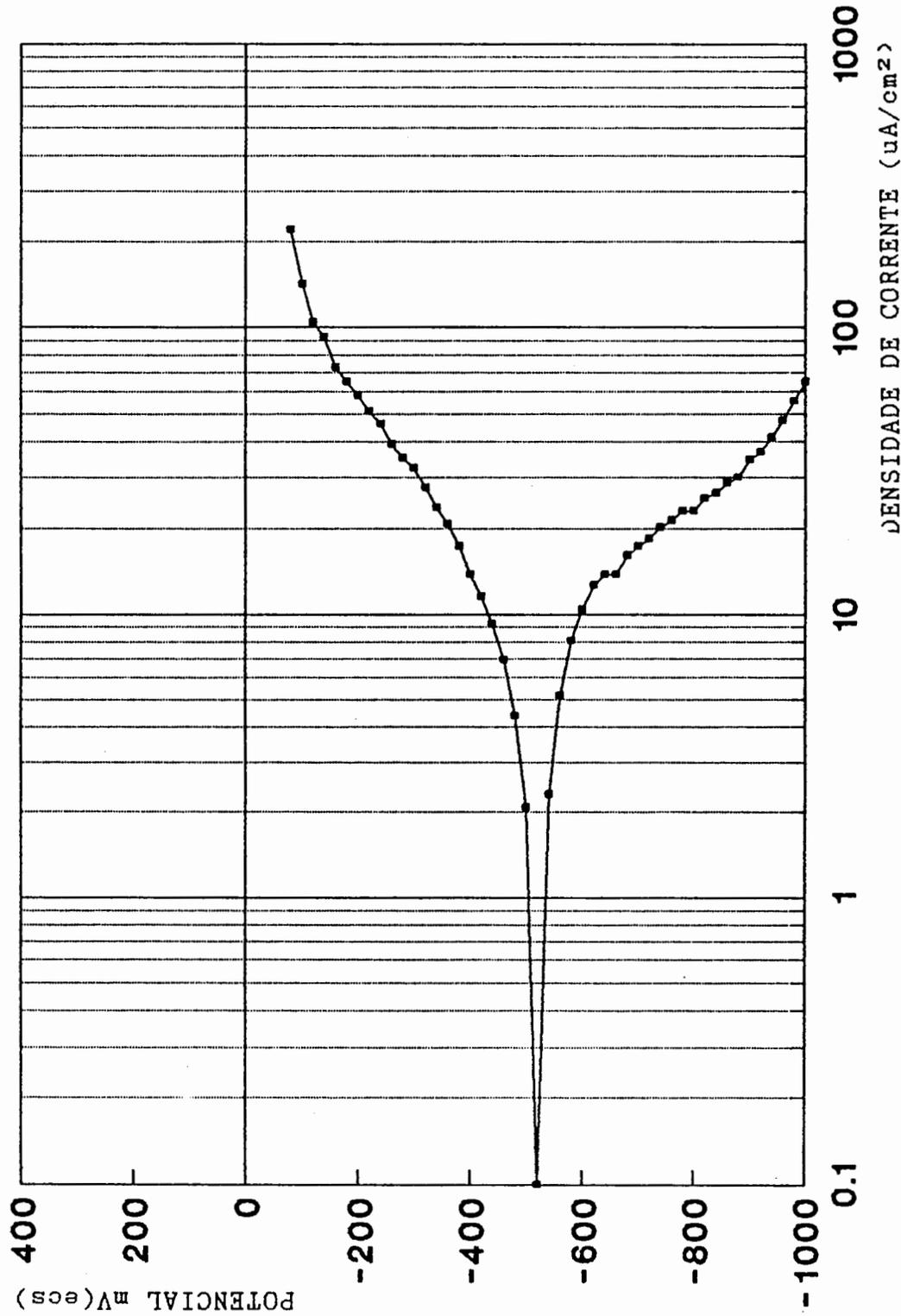


Fig.48 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.

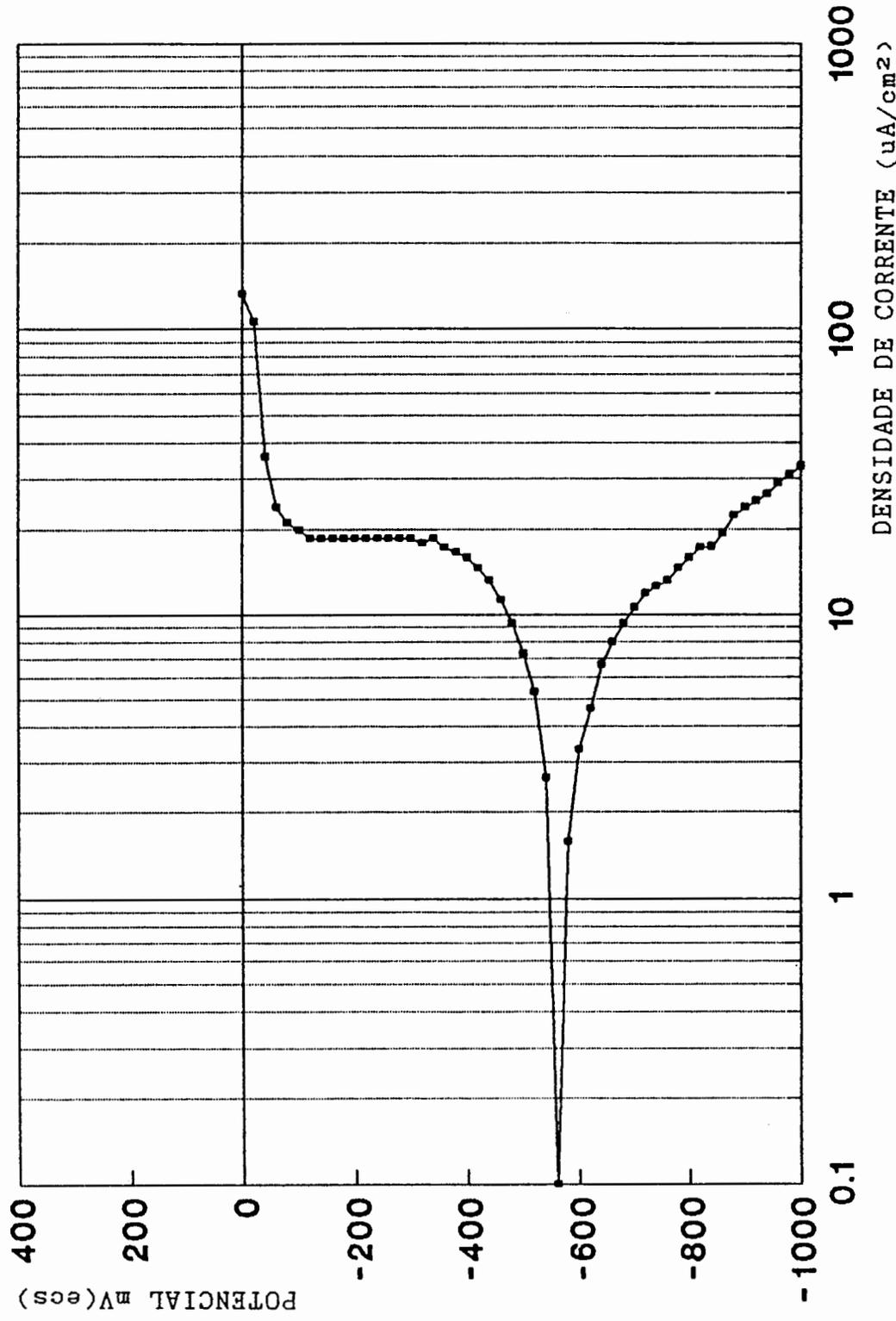


Fig.50 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%.

A figura (48) apresenta uma zona de corrente limite em torno de  $15 \text{ uA/cm}^2$  e um potencial de corrosão em torno de  $-380 \text{ mV}_{(ECS)}$  com um comportamento semelhante ao descrito no item 3.4.1.a, e a densidade de corrente anódica aumentando rapidamente a partir do potencial de corrosão.

Na curva da figura (49), o potencial de corrosão está em torno de  $-500 \text{ mV}_{(ECS)}$ , e a reação anódica apresenta um comportamento similar à das figuras (48).

A curva representada na figura (50) mostra o potencial de corrosão em torno de  $-580 \text{ mV}_{(ECS)}$ , após um aumento rápido de corrente e, em torno de  $-400 \text{ mV}_{(ECS)}$ , há uma tendência a estabilizar a corrente até em torno de  $-50 \text{ mV}_{(ECS)}$ , onde ocorre novamente uma aumento rápido na densidade de corrente.

3.4.1.c Em água do mar sintética diluída a 1.5% em diferentes concentrações de hexametáfosfato de sódio.

As curvas de polarização obtidas na concentração de 50 ppm de hexametáfosfato de sódio - figuras (51) e (52) mostram uma corrente limite catódica bem definida, oscilando em torno de 20 a  $80 \text{ uA/cm}^2$  e a reação anódica apresenta uma região de dissolução ativa a partir do potencial de corrosão, que é de aproximadamente de  $-320 \text{ mV}$ .

Nas curvas de polarização do aço na concentração de 100 ppm de hexametáfosfato de sódio, figuras (53) e (54) continua existindo uma definição da corrente limite, com um abaixamento do potencial de corrosão em torno de  $-400 \text{ mV}_{(ECS)}$ , enquanto que o comportamento da reação anódica permanece inalterado.

Na curva com 500 ppm de hexametáfosfato de sódio, representada na figura (55), permanece o mesmo comportamento anterior, e há uma oscilação em torno do potencial de corrosão, apresentando um valor de  $-200 \text{ mV}_{(ECS)}$ , e na curva com 1000 ppm, figura (56), o potencial de corrosão está em torno de  $-380 \text{ mV}_{(ECS)}$ .

Nas curvas com a adição de 2000 ppm do hexametáfosfato de sódio, representadas nas figuras (57) e (58), há um abaixamento do potencial de corrosão para valores em torno de  $-800 \text{ mV}_{(ECS)}$ , não permitindo a observação da reação catódica, e ocorrendo uma diminuição da corrente em valores altos, e no potencial em torno de  $-400 \text{ mV}_{(ECS)}$ , o que não representa passividade e não se mantém em valores constantes, sendo que em valores de potencial em torno de  $-200 \text{ mV}_{(ECS)}$  a corrente torna a aumentar de maneira contínua.

A partir da concentração de 2000 ppm observava-se depois do corpo de prova ensaiado, a formação de um filme de precipitado de fosfato.

As curvas representadas pelas figuras (59) a (61) onde na concentração de 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio se mantém o mesmo comportamento das anteriores.

As curvas obtidas com a concentração de 5000 ppm, representadas na figura (62), apresentam um comportamento similar àquelas com concentração de 4000 ppm, embora com uma oscilação em relação ao potencial de corrosão. Na figura (62) ocorre a passagem da corrente 2 vezes pelo potencial de corrosão.

Ao analisar os corpos de prova após os ensaios de polarização, em todas as concentrações utilizadas de hexametáfosfato de sódio, verificou-se a incidência de pites.

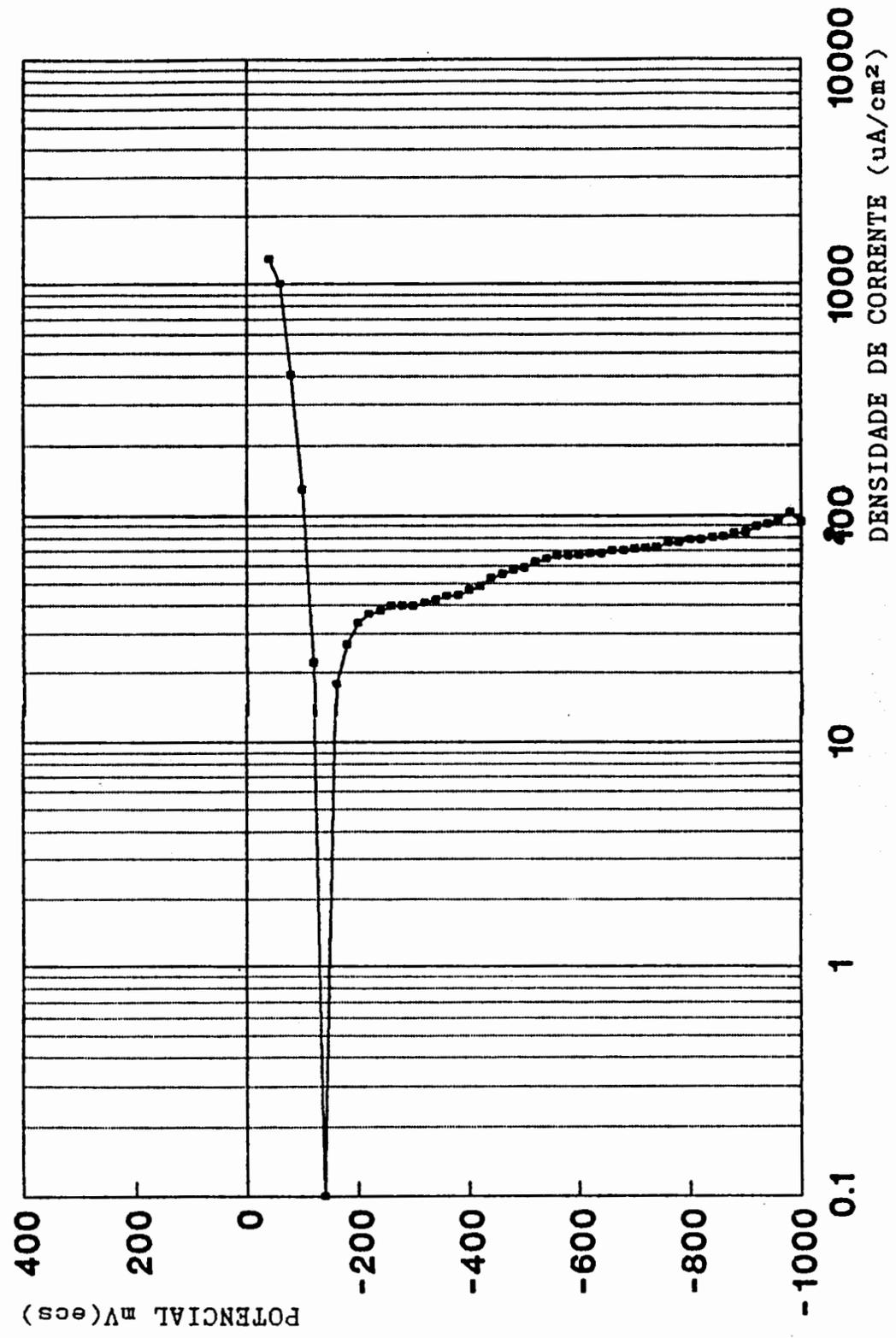


Fig.51 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 50 ppm de hexametáfosfato de sódio.

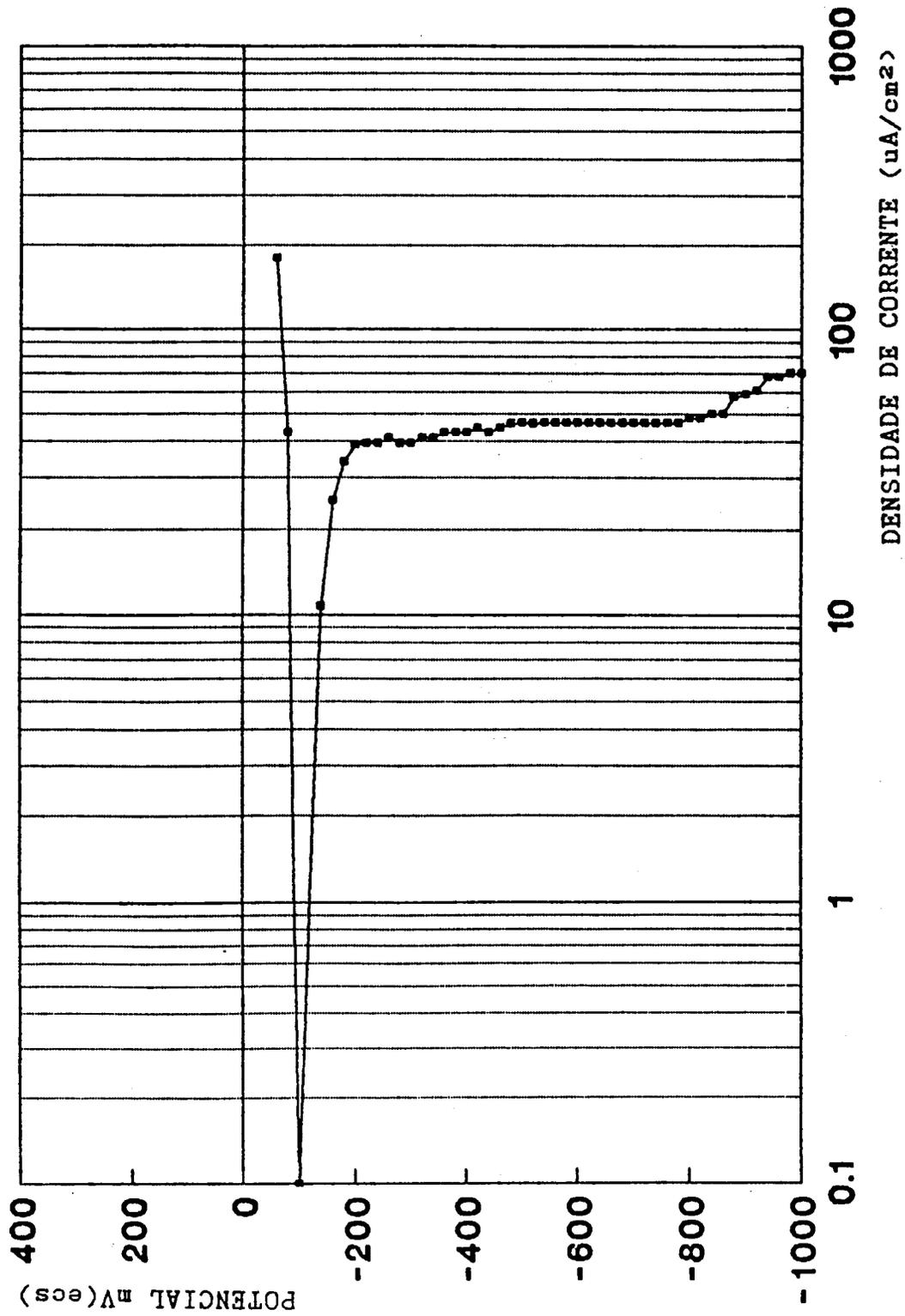


Fig.52 Curva de polarização potenciostática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 50 ppm de hexametáfosfato de sódio.

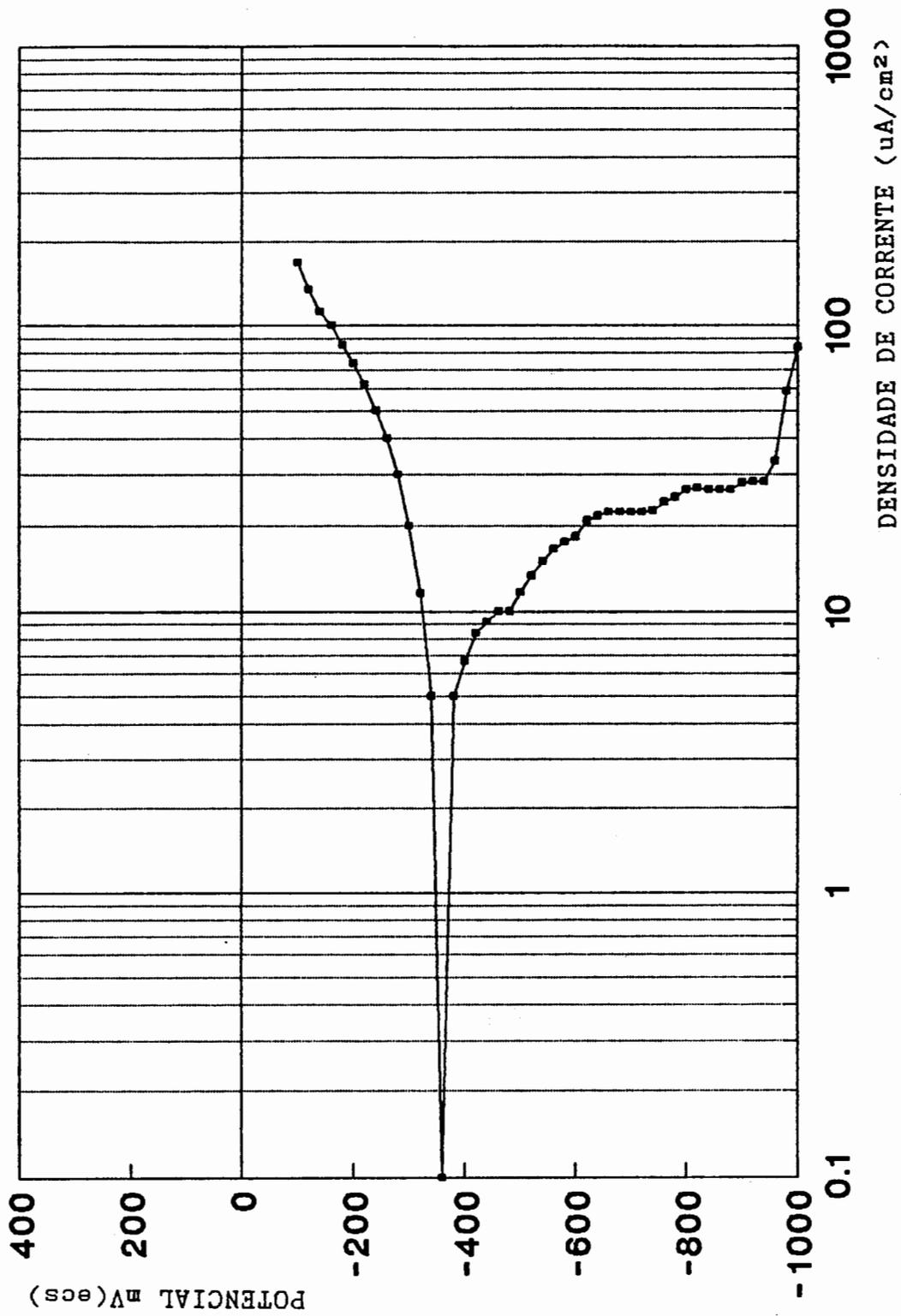


Fig.53 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 100 ppm de hexametáfosfato de sódio.

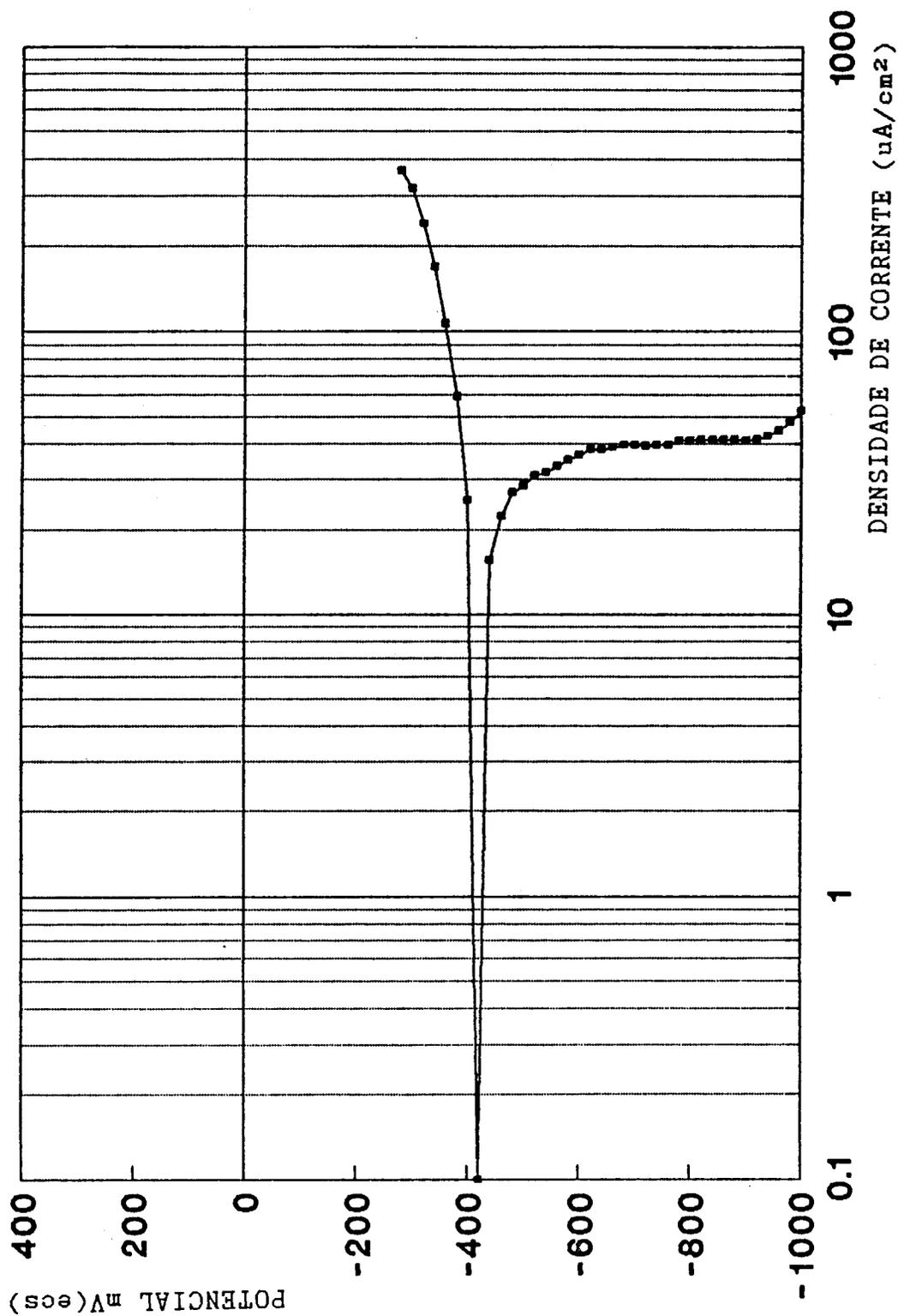


Fig.54 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1.5%, com 100 ppm de hexametáfosfato de sódio.

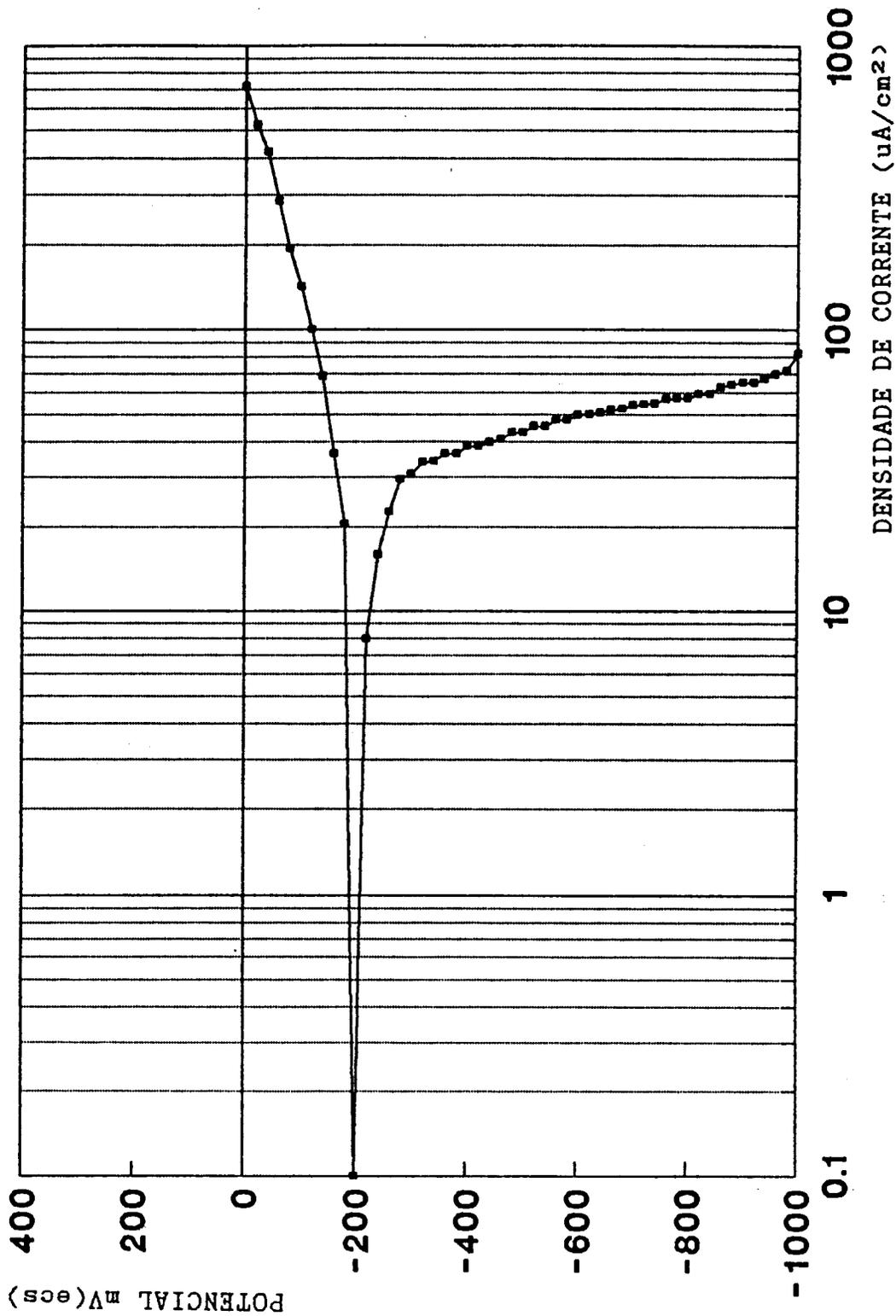


Fig.55 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 500 ppm de hexametáfosfato de sódio..

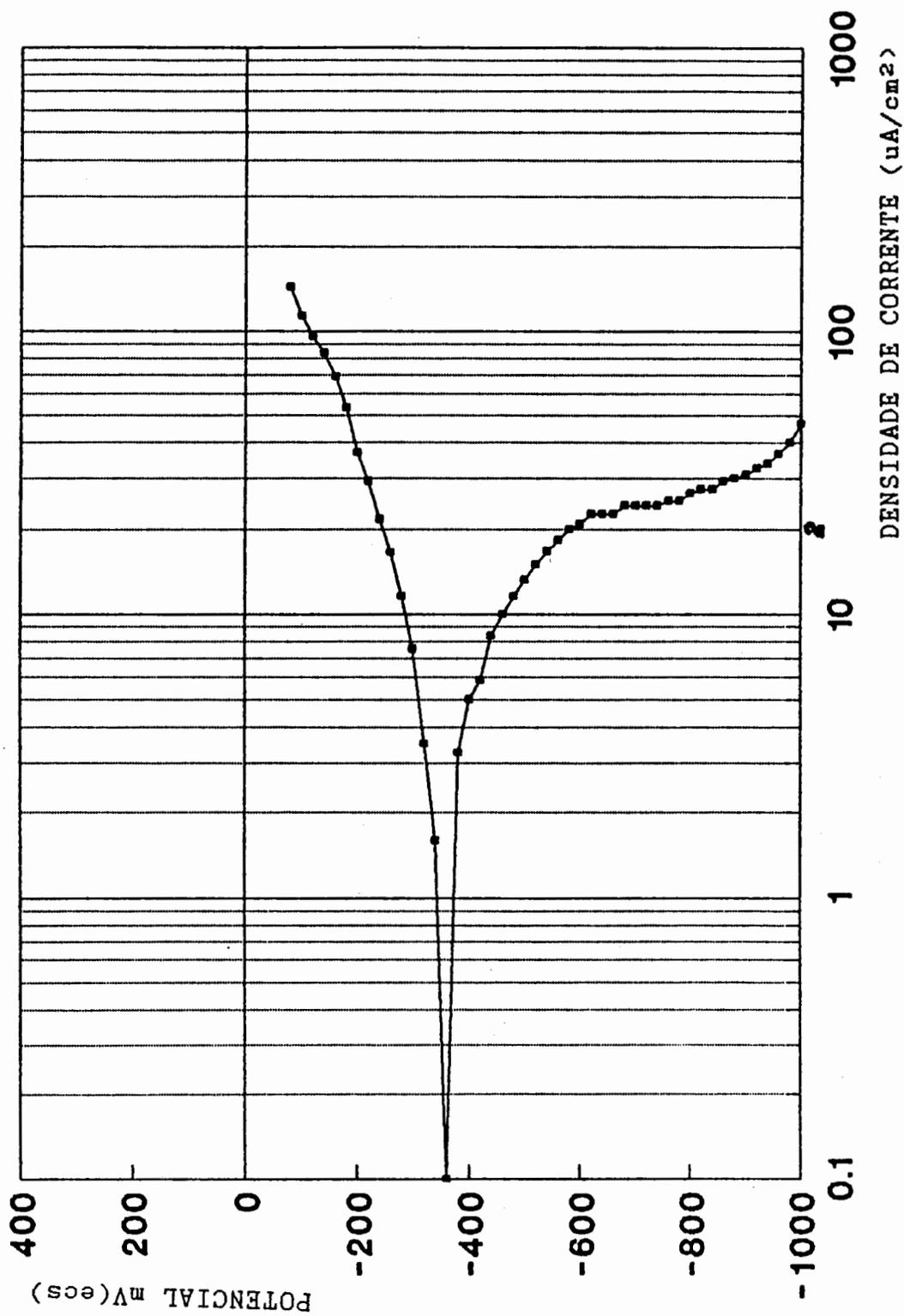


Fig.56 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 1000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

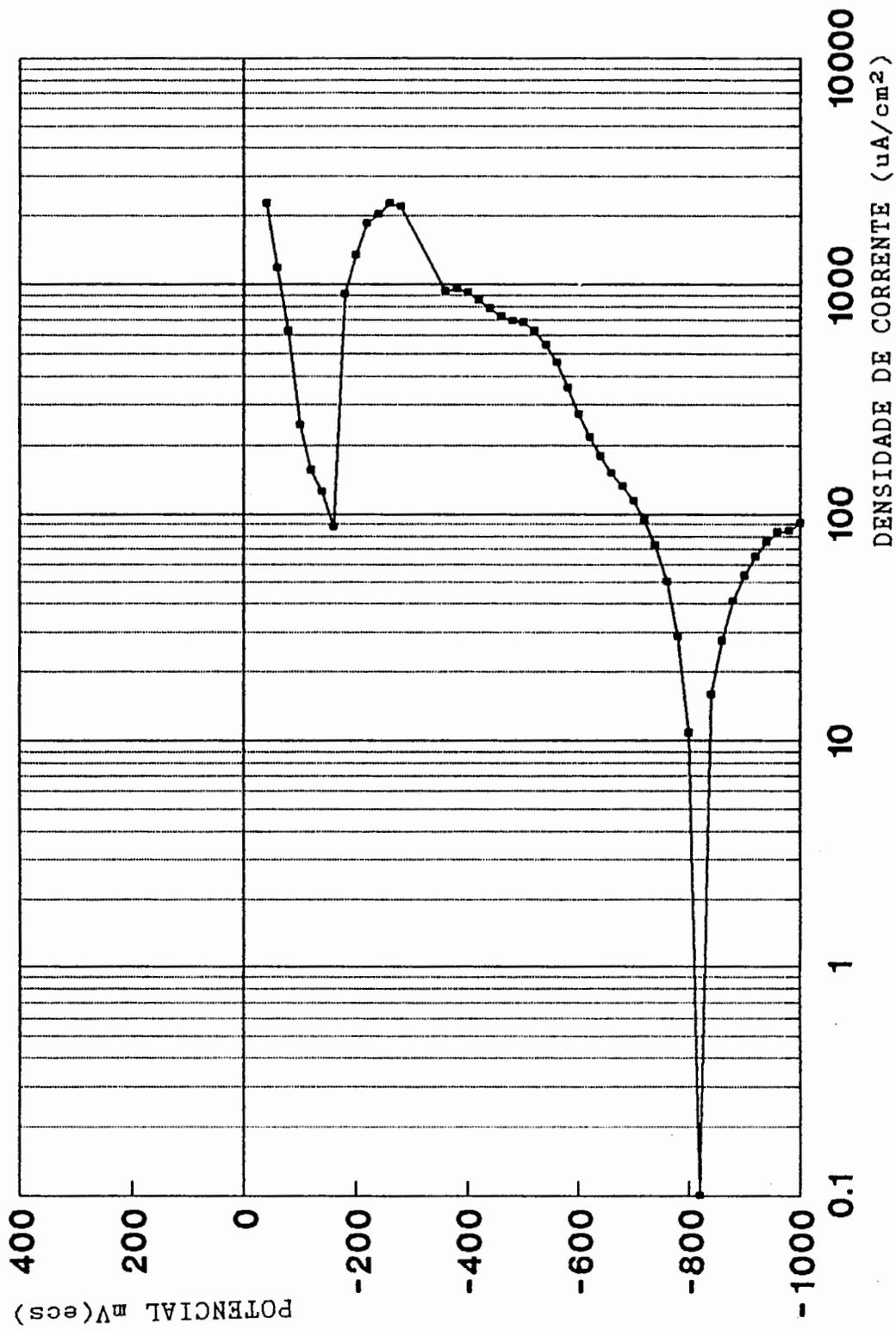


Fig.57 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

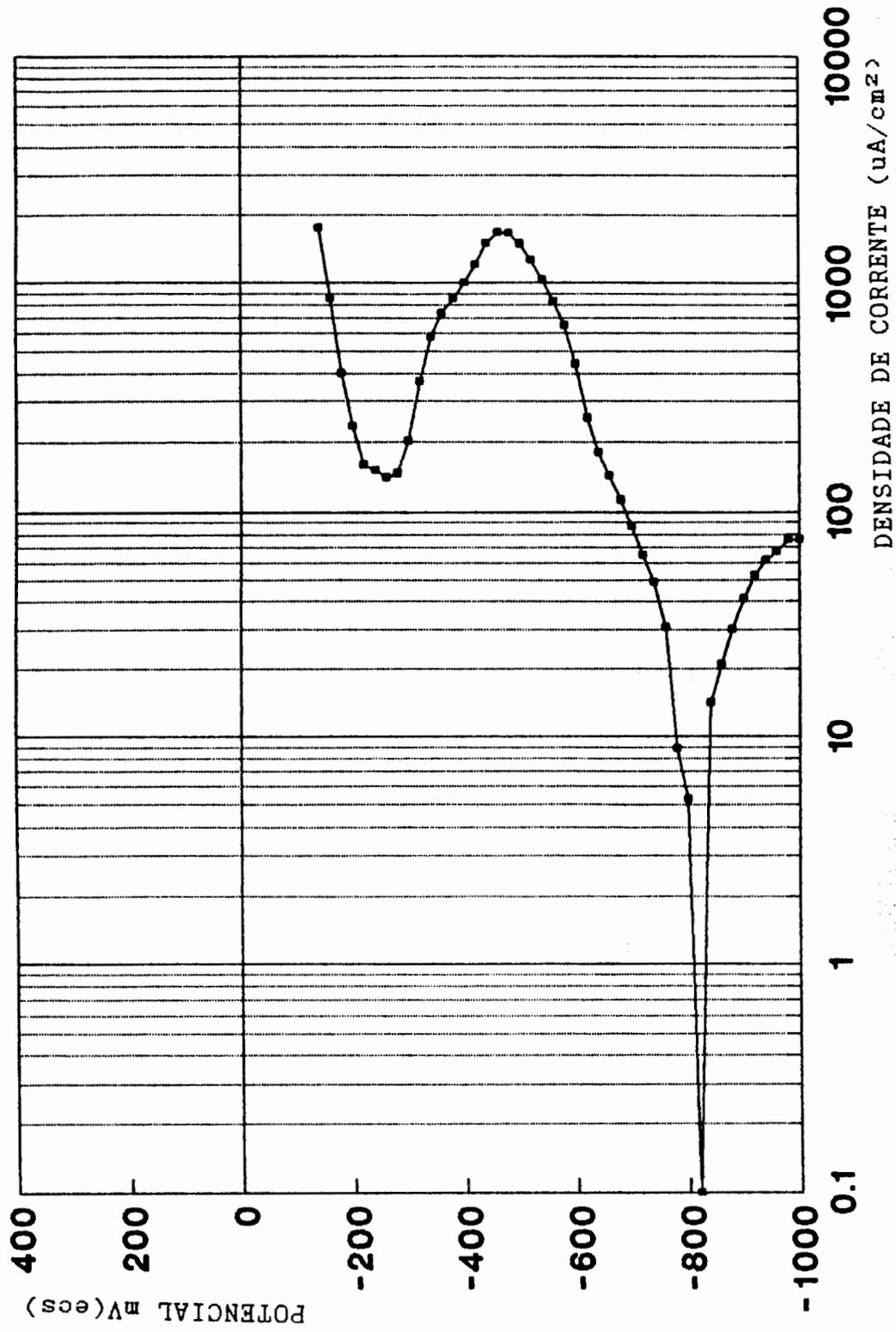


Fig.58 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

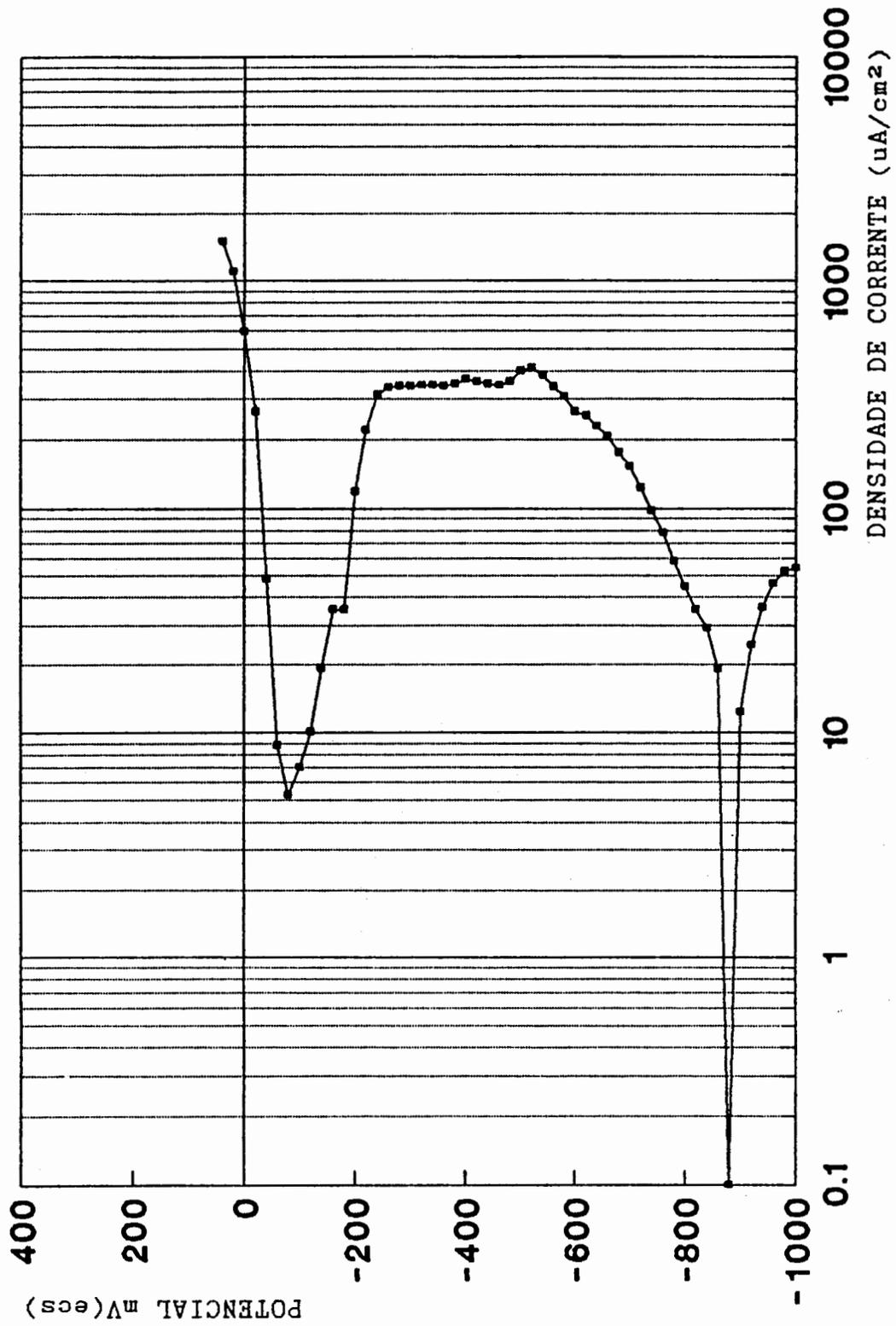


Fig.59 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

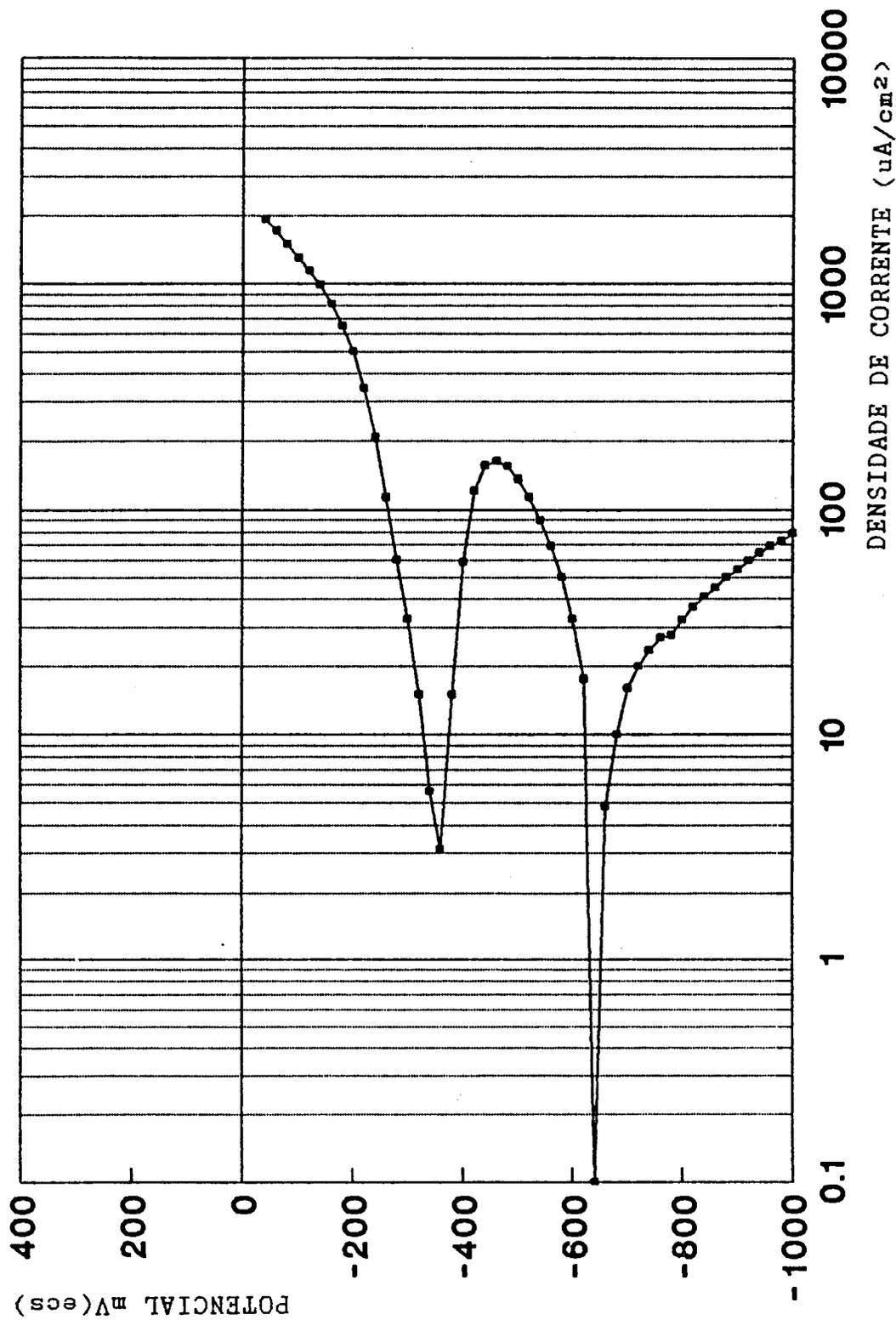


Fig.60 Curva de polarização potencistática para aço ABNT em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

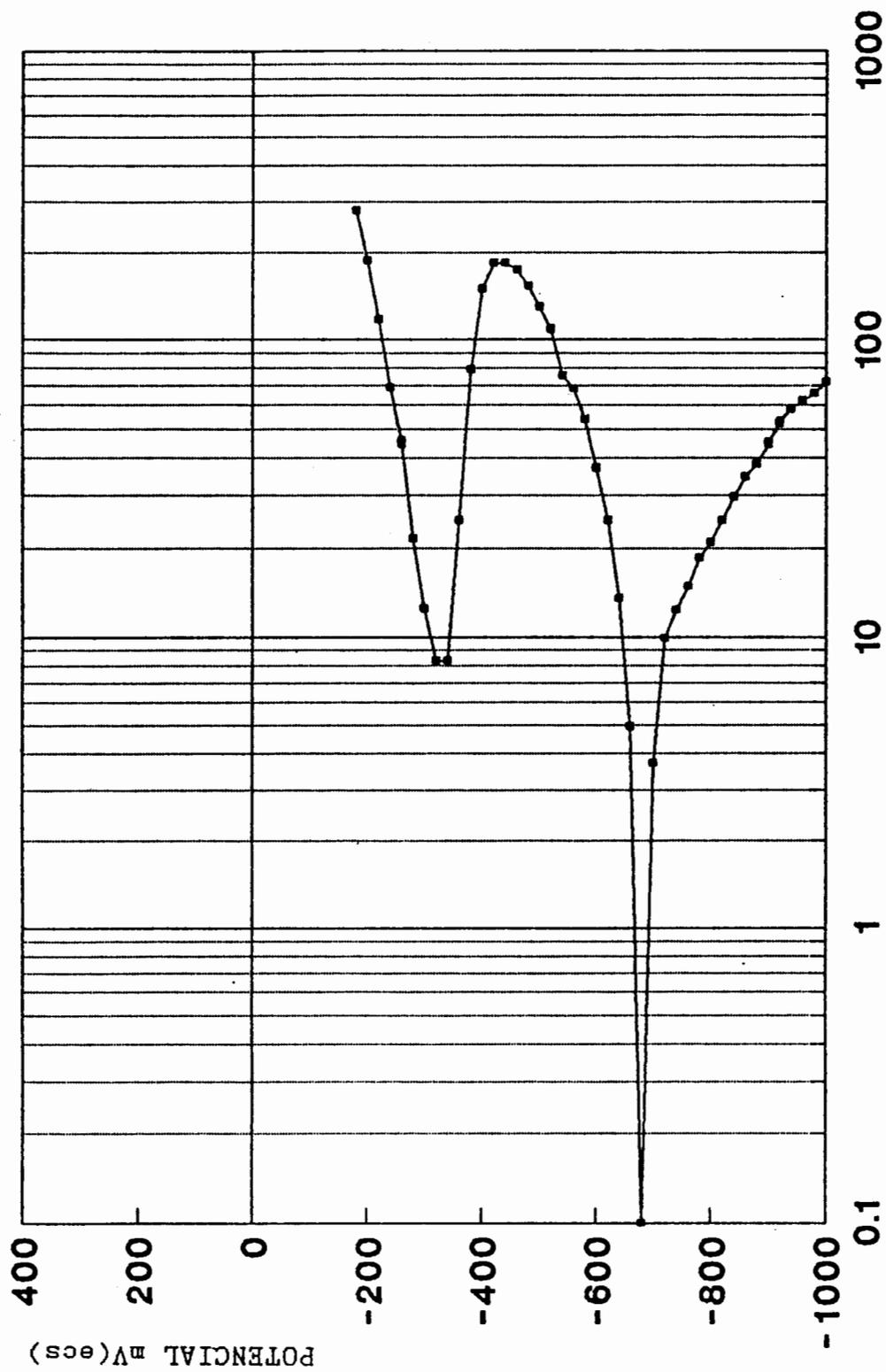


Fig.61 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

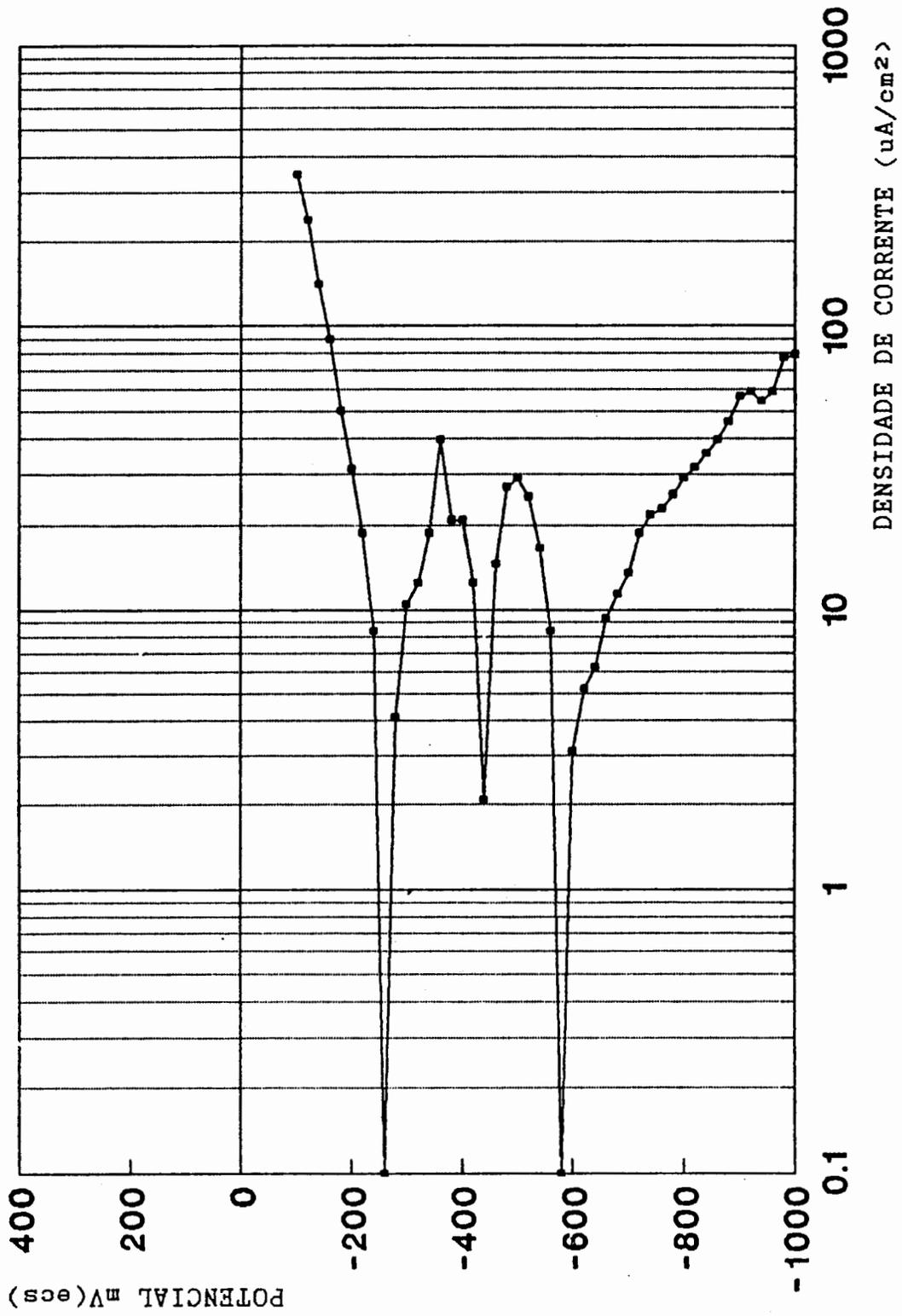


Fig.62 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com 5000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

### 3.4.2 Curvas de polarização potencioestática realizadas na presença de bactérias

#### 3.4.2.a Em água do mar sintética diluída a 10%

As curvas de polarização potencioestática realizadas com bactérias imediatamente após a inoculação não apresentaram um comportamento semelhante, como se pode observar através das figuras (63) a (65). As figuras apresentam uma zona de corrente limite em torno de  $30 \text{ uA/cm}^2$ , o potencial de corrosão está situado em valores mais positivos, em torno de  $-300 \text{ mV}_{(ECS)}$ .

Alguns corpos de prova, após os ensaios, apresentavam a formação de um biofilme de aparência gelatinosa, de cor esbranquiçada e este filme, observado visualmente, não apresentava boa aderência sobre a superfície metálica.

#### 3.4.2.b Em água do mar sintética diluída a 1.5%

As curvas apresentadas são as mais representativas dos testes realizados nestas condições e correspondem as figuras de (66) a (72).

Verifica-se que minutos após a inoculação, figura (66) a corrente limite se situa em torno de  $20 \text{ uA/cm}^2$ , e o potencial de corrosão fica em torno de  $-400 \text{ mV}_{(ECS)}$  e, a partir daí, a densidade de corrente aumenta continuamente até aproximadamente  $0 \text{ mV}_{(ECS)}$ , potencial que mostrou uma tendência a estabilização da corrente até em torno de  $500 \text{ mV}_{(ECS)}$ .

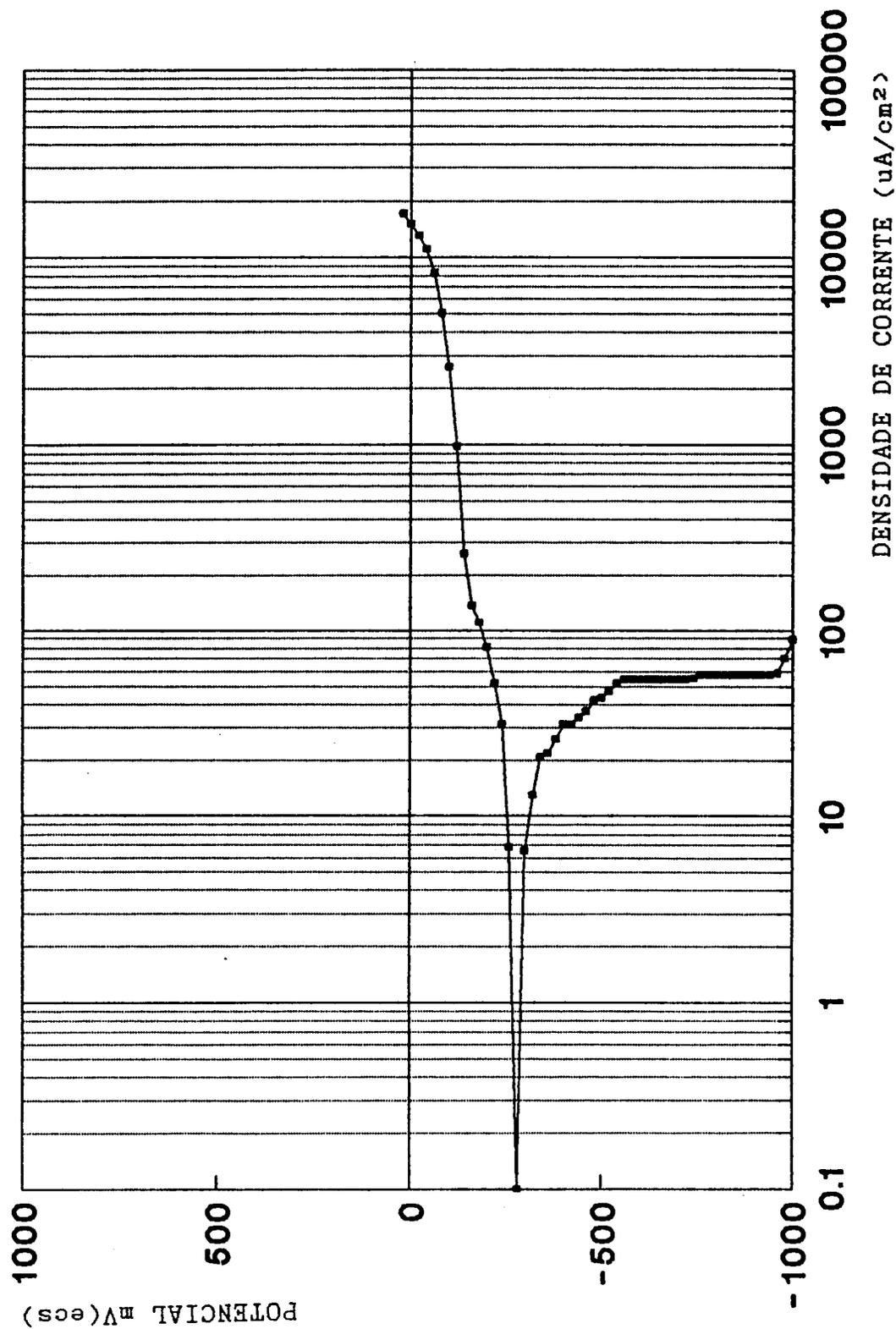


Fig.63 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água dom ar sintética diluída a 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*

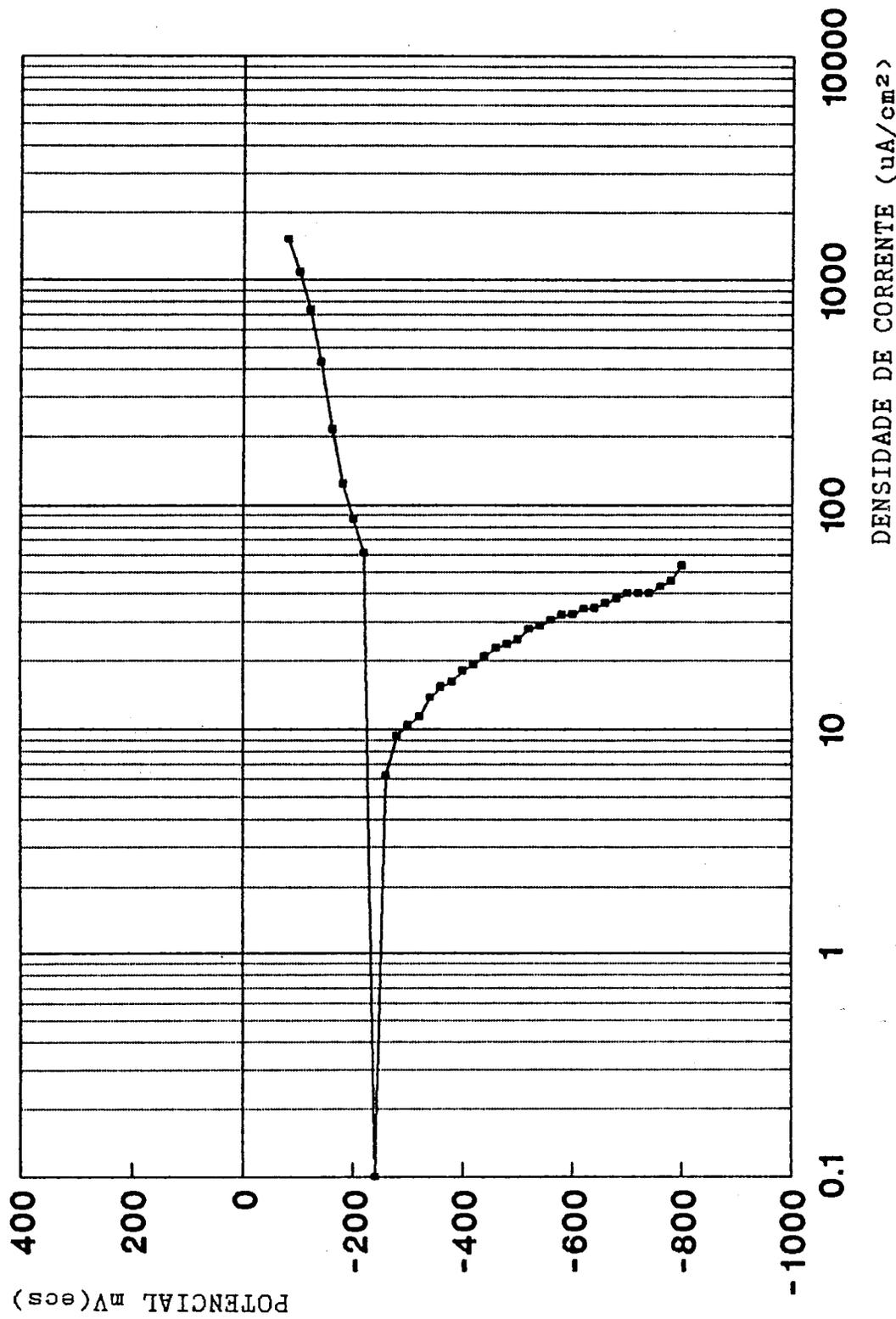


Fig.64 Curva de polarização potenciostática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

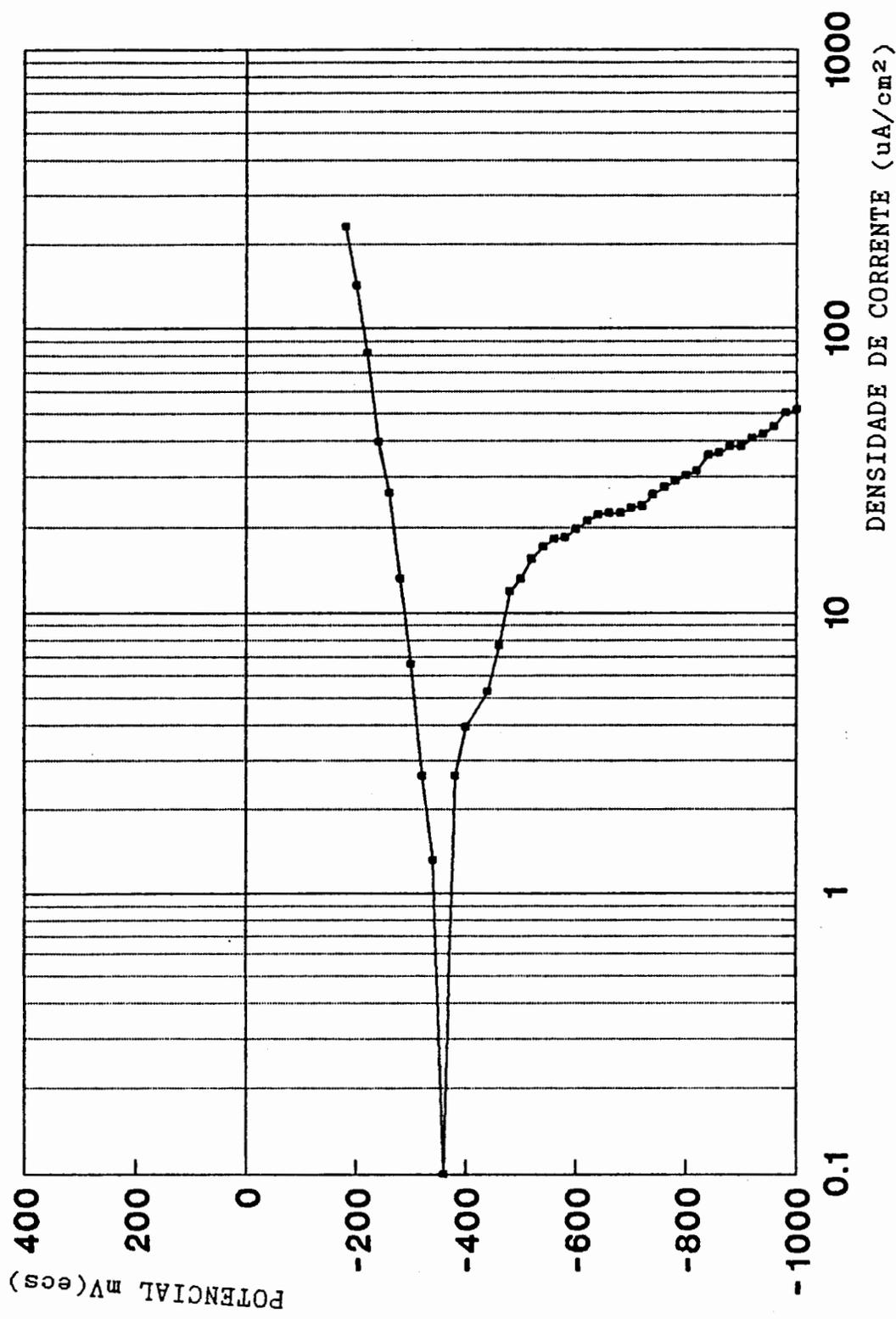


Fig.65 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 10% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*.

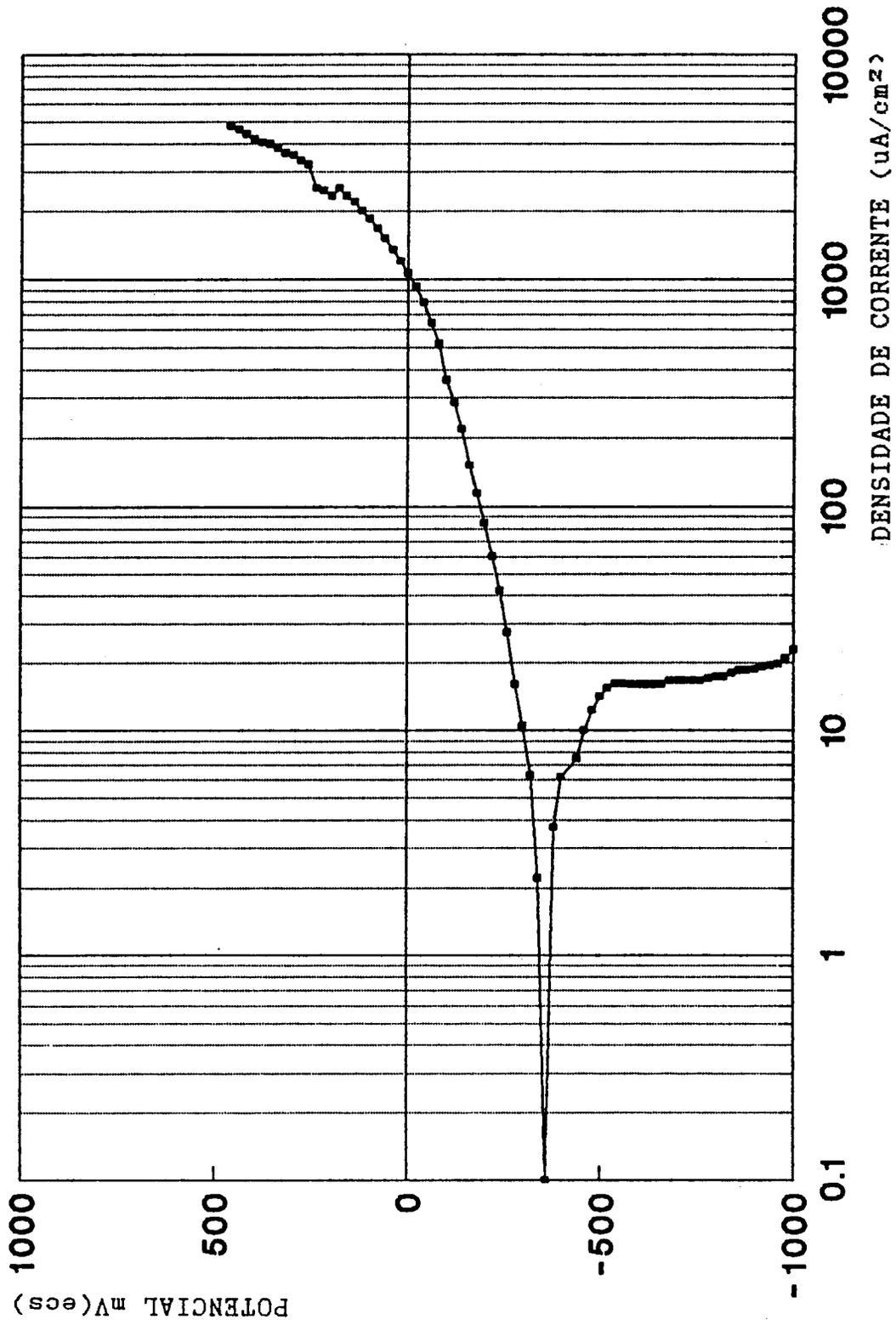


Fig. 68 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado logo após o inóculo.

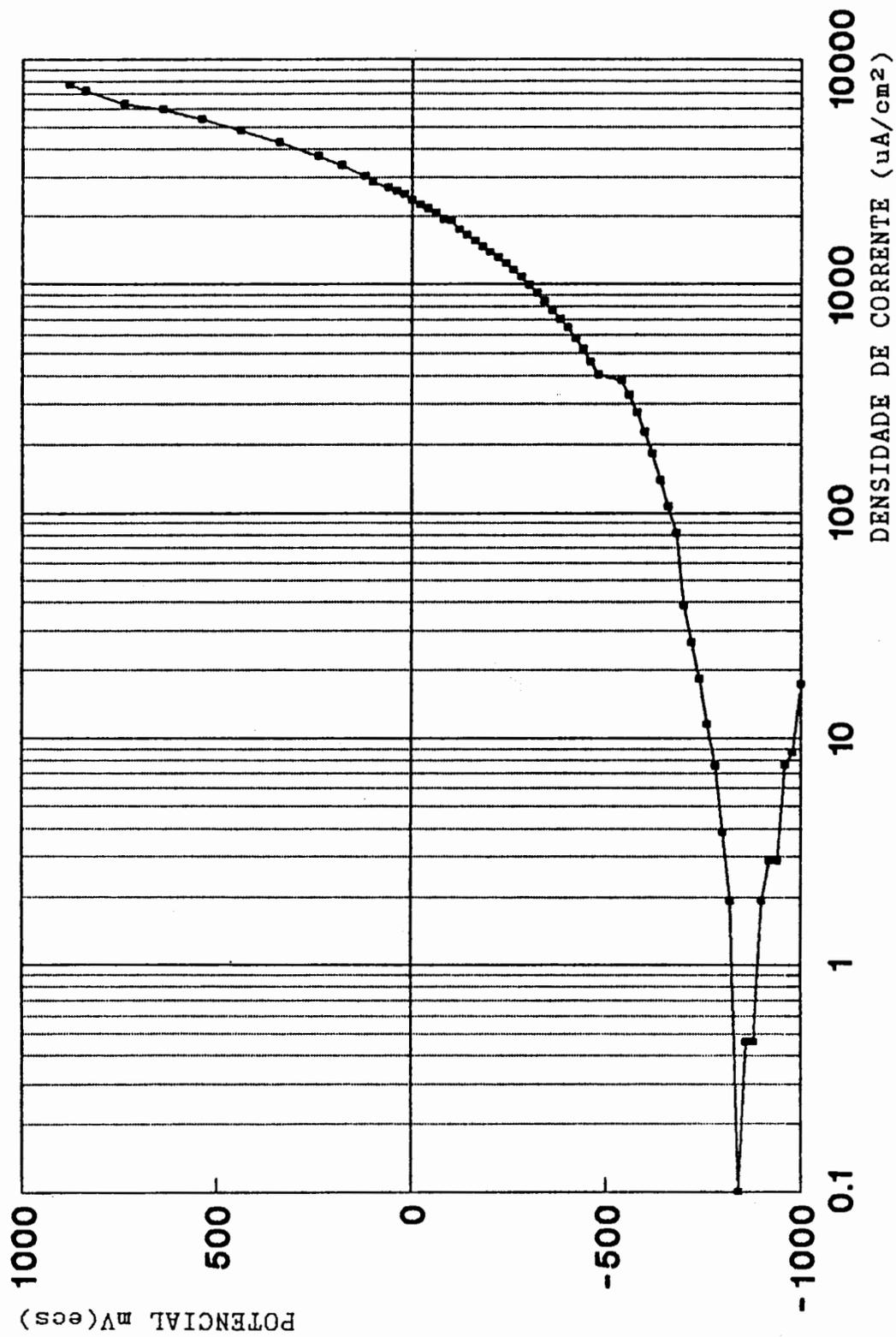


Fig.67 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 24 horas após o inóculo.

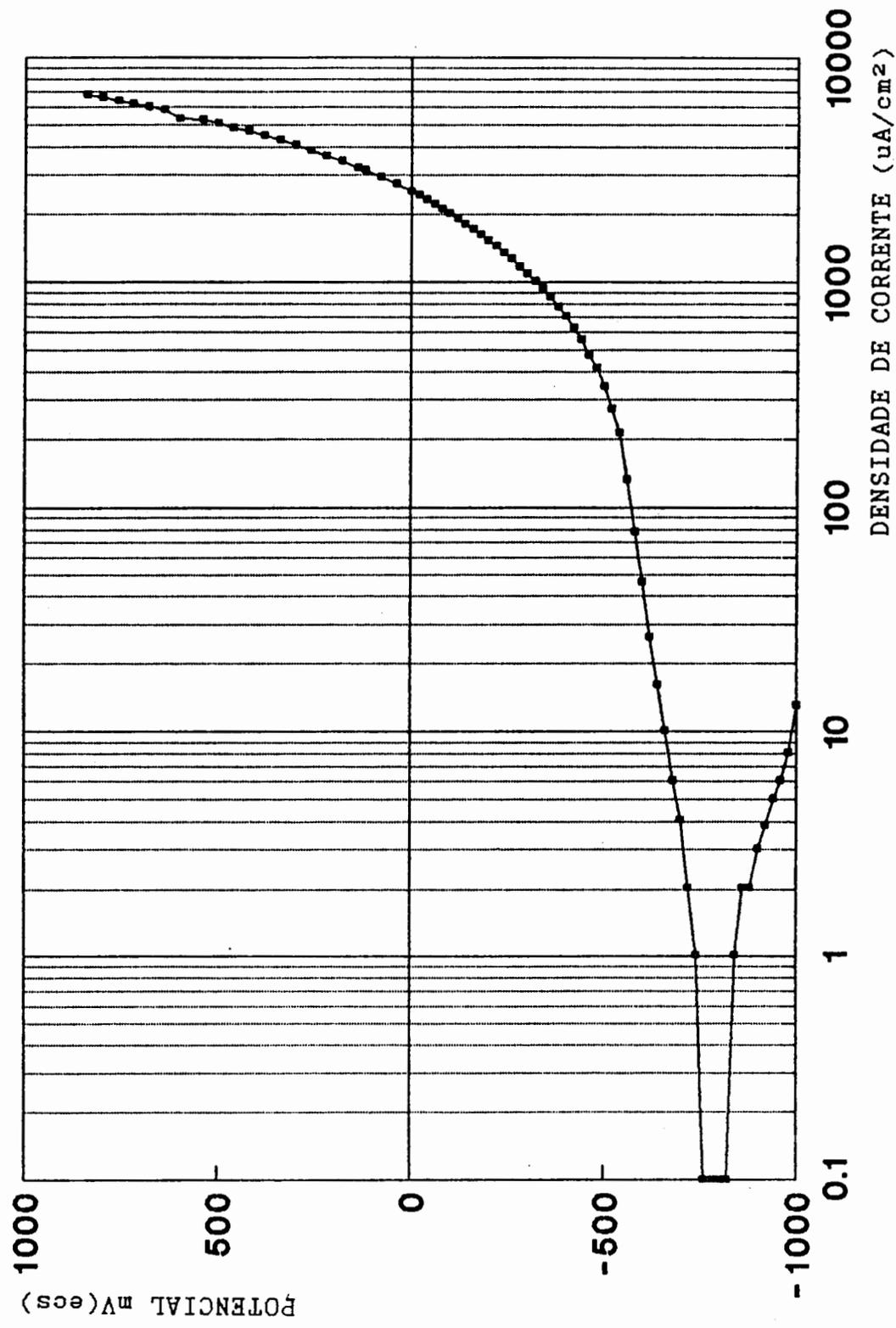


Fig.68 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 48 horas após o inóculo.

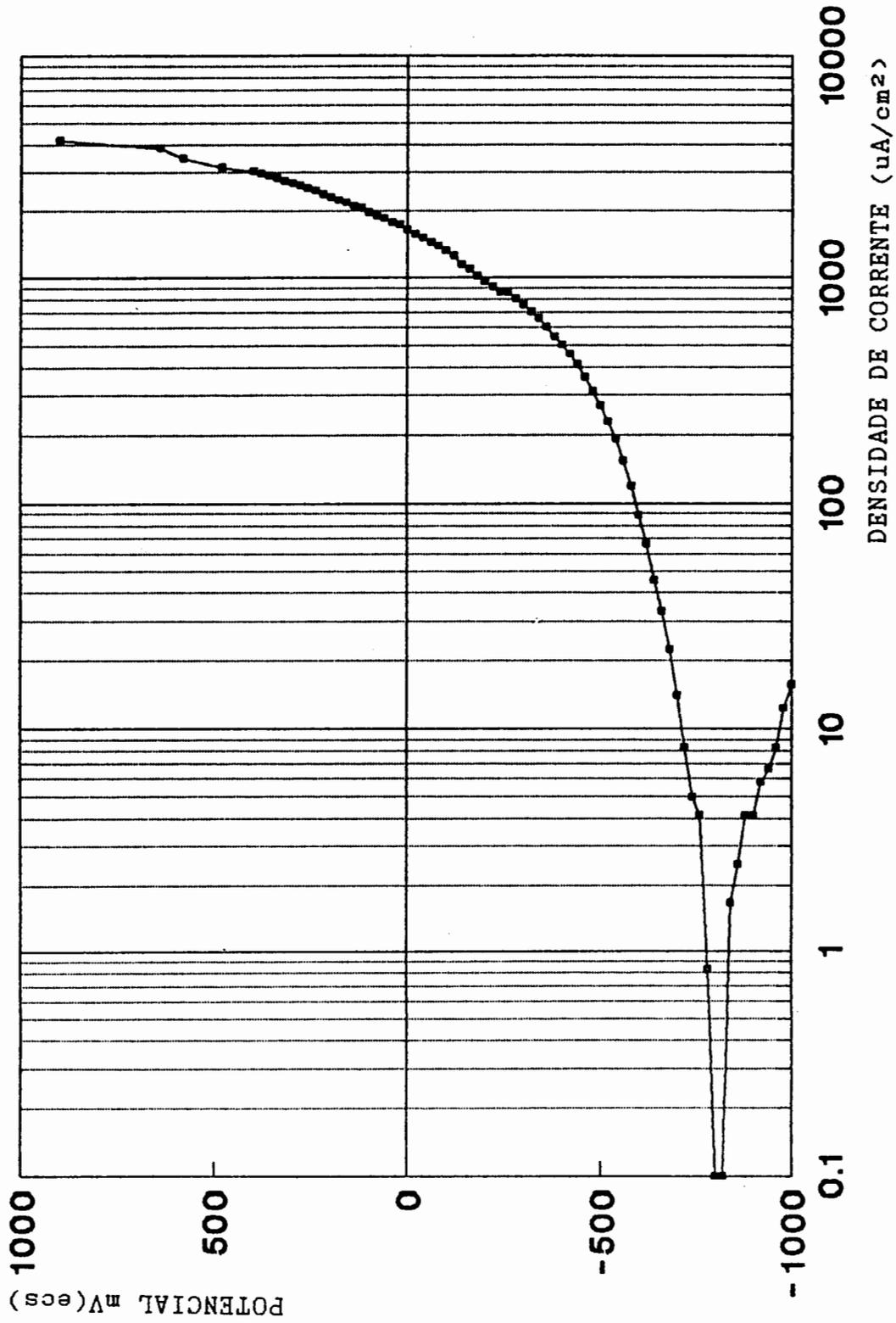


Fig.69 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 72 horas após o inóculo.

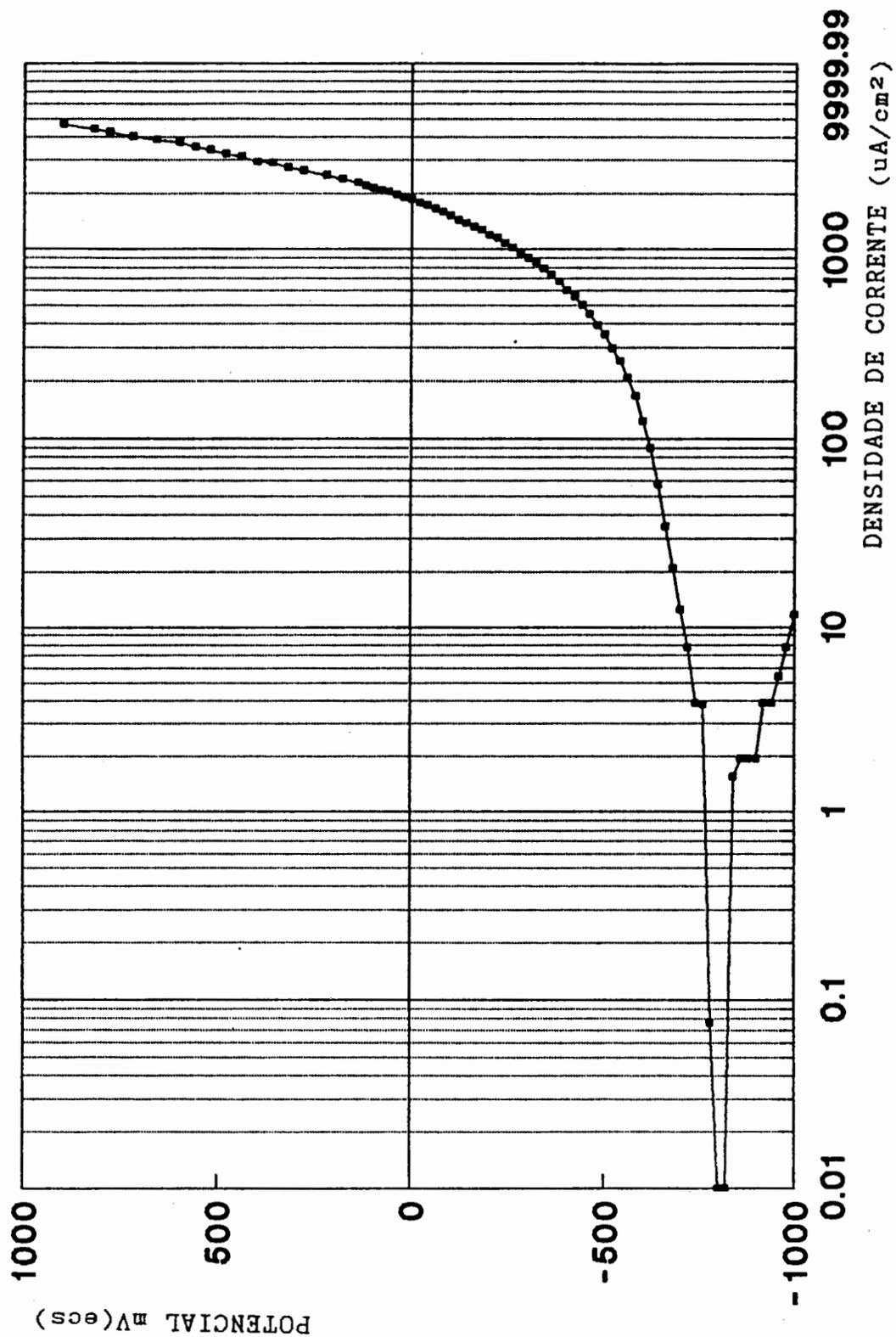


Fig.70 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 96 horas após o inóculo.

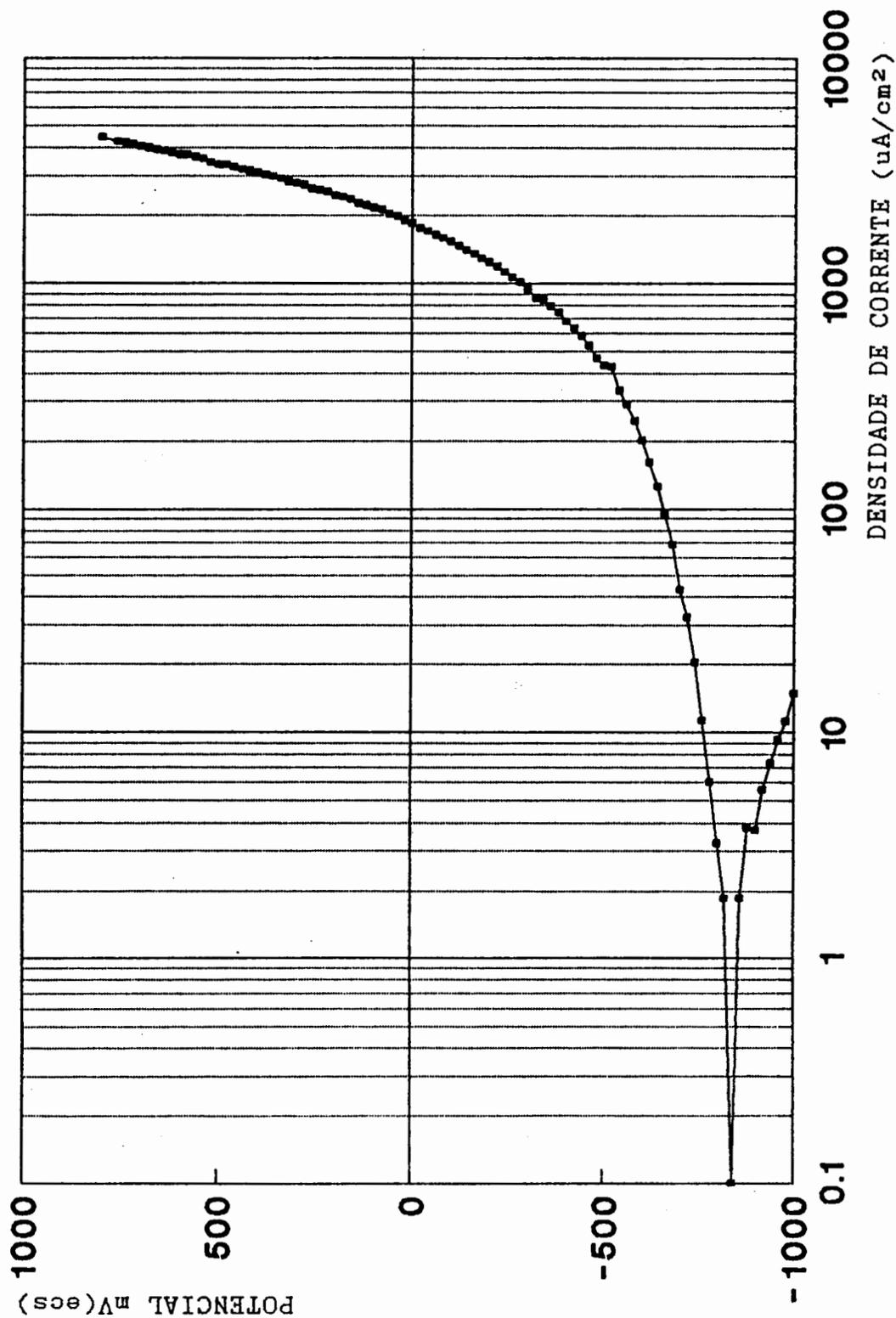


Fig.71 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 120 horas após o inóculo.

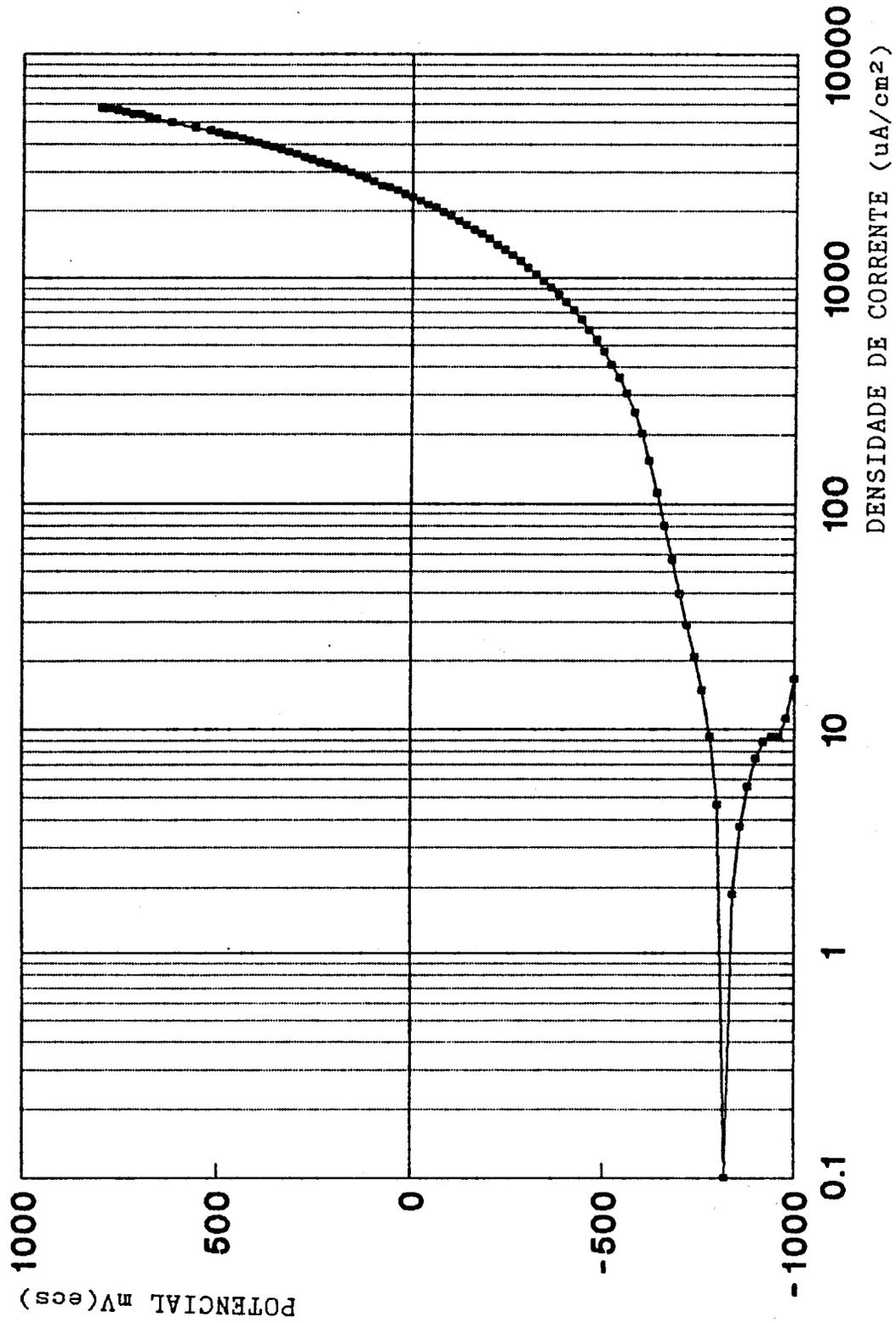


Fig.72 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado 144 horas após o inóculo.

Após 24 horas de incubação das bactérias, figura (67) a curva de polarização apresenta uma zona de corrente limite pouco nítida, e o potencial de corrosão está situado em valores em torno de  $-800$  mV ( $E_{cs}$ ), quando a corrente passa a aumentar continuamente.

A partir das 24 horas após a incubação dos microrganismos o comportamento das curvas de polarização subsequentes (68) a (72) é bastante semelhante, com a reação catódica quase inexistente, e apresentando um potencial de corrosão em valores bem negativos, em torno de  $-850$  mV ( $E_{cs}$ ), sendo que a partir deste valor a corrente anódica aumentava continuamente.

3.4.2.c Em água do mar diluída a 1.5% e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio

As curvas referentes aos ensaios em que foi testado o hexametáfosfato de sódio juntamente com as bactérias, estão representadas nas figuras (73) a (79). Pode-se observar que minutos após a inoculação como também 24 horas depois, figuras (73) (74) o comportamento das curvas de polarização é bastante semelhante às curvas abióticas realizadas nestas mesmas concentrações de HMP sem bactérias, figuras (57) e (58).

Depois do segundo dia, figura (75) o aumento da corrente parece ser determinado por um processo de difusão.

Embora nas curvas de polarização não fique muito evidente, ocorria a formação do biofilme nestas condições e visualmente era bem definido, conforme se pode observar através das figuras (42) a (45).

Em todos os testes se observava pites após a realização da curva de polarização.

Em uma série de testes realizados, como pode observar-se nas figuras (80) a (85), ocorreu um comportamento diferenciado sendo que a corrente anódica tomava valores tão baixos que havia a passagem 3 vezes pelo potencial de corrosão.

### **3.4. 3 Curvas de polarização potencioestática em água do mar diluída a 1.5% com produtos metabólicos**

As curvas realizadas apenas com os produtos metabólicos das bactérias apresentaram um comportamento bastante similar, como pode ser visto nas figuras (86) e (88).

A figura (86) representa a curva de polarização realizada depois de 3 dias de incubação das bactérias e apresenta um comportamento semelhante à curva (87) após 5 dias de incubação. A figura (88) representa a curva de polarização com um período de 6 dias de incubação, observa-se também um comportamento bastante agressivo para o aço. Nestas curvas nota-se o potencial de corrosão do aço situou-se em torno de  $-750 \text{ mV}_{(ECS)}$ , e a reação anódica apresenta uma dissolução ativa.

Em todos os corpos de prova observou-se pites.

As figuras (89) e (90) foram obtidas após 13 dias de incubação das bactérias, acrescentadas de 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio antes do início do ensaio potencioestático. Apresentaram um comportamento similar as curvas anteriores, com potenciais de corrosão bem negativos em torno de  $-980 \text{ mV}_{(ECS)}$  e a partir daí, uma dissolução ativa, a reação catódica é no intervalo de

potenciais estudado insignificante, e não há como definir a corrente limite.

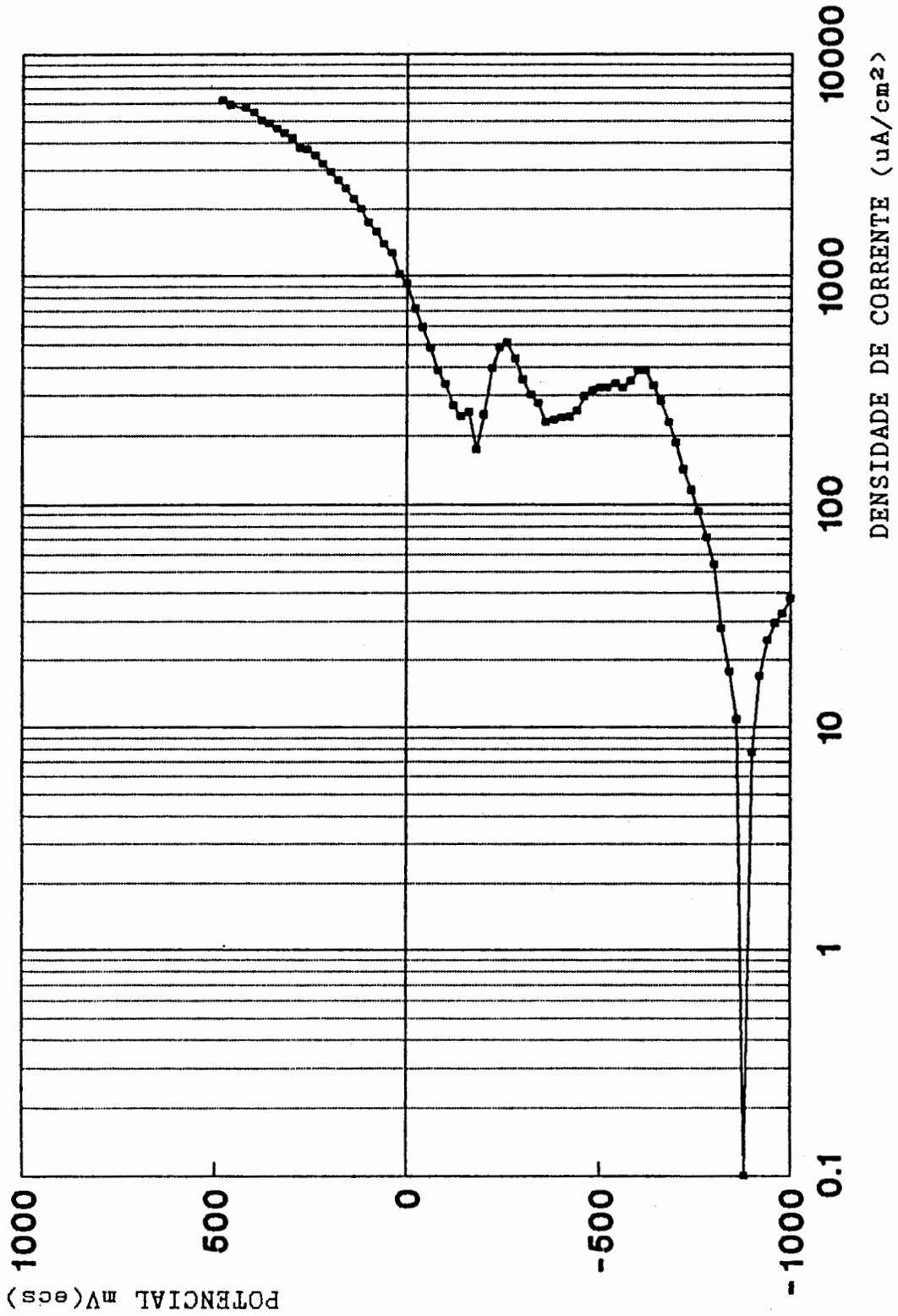


Fig. 73 Curva de polarização potencioestática para o aç ABNT 1006 em solução de água dom mar sintética diluída a 1,5% com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*. Ensaio realizado logo após o inóculo.



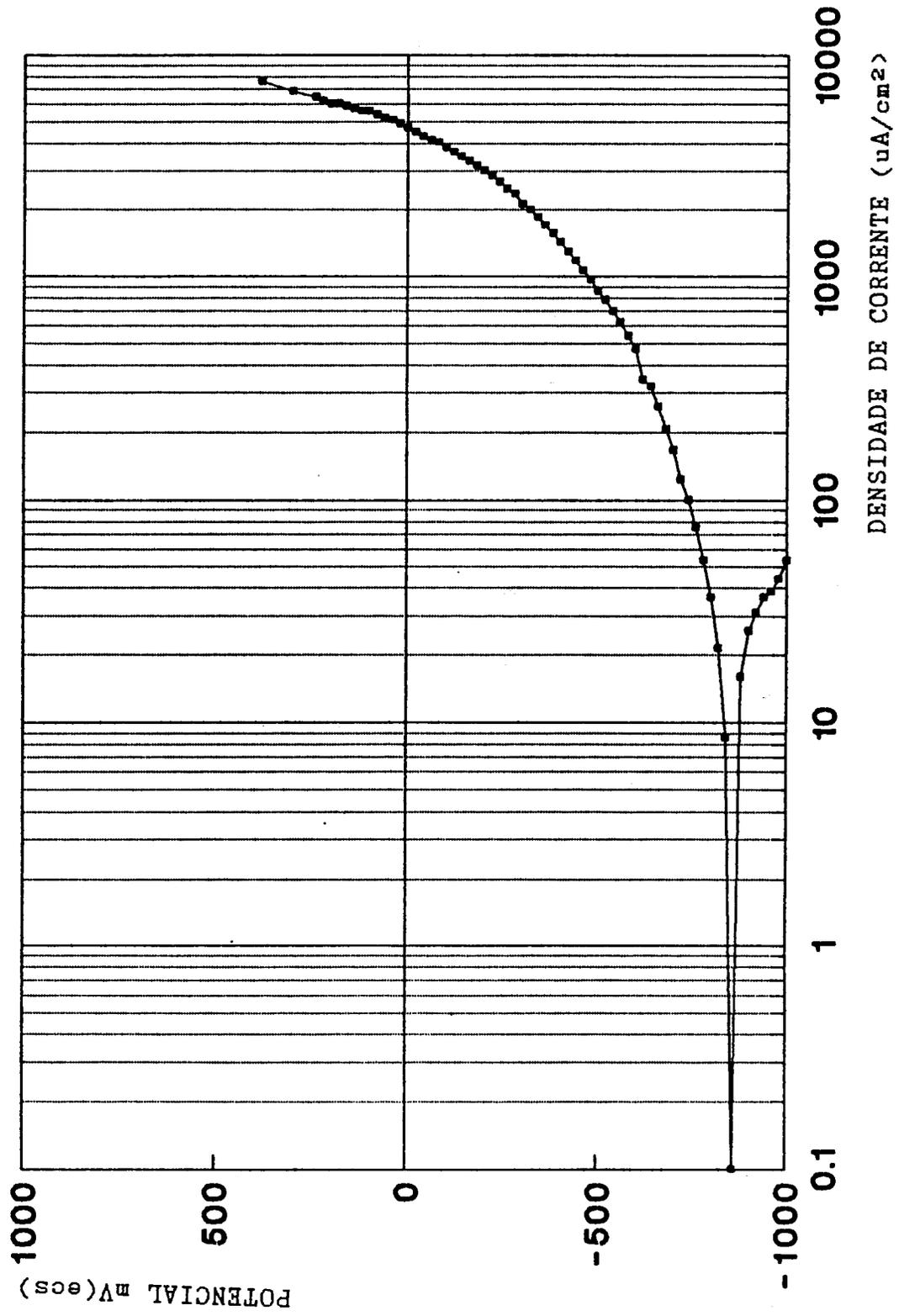


Fig.75 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 48 horas após o inóculo.

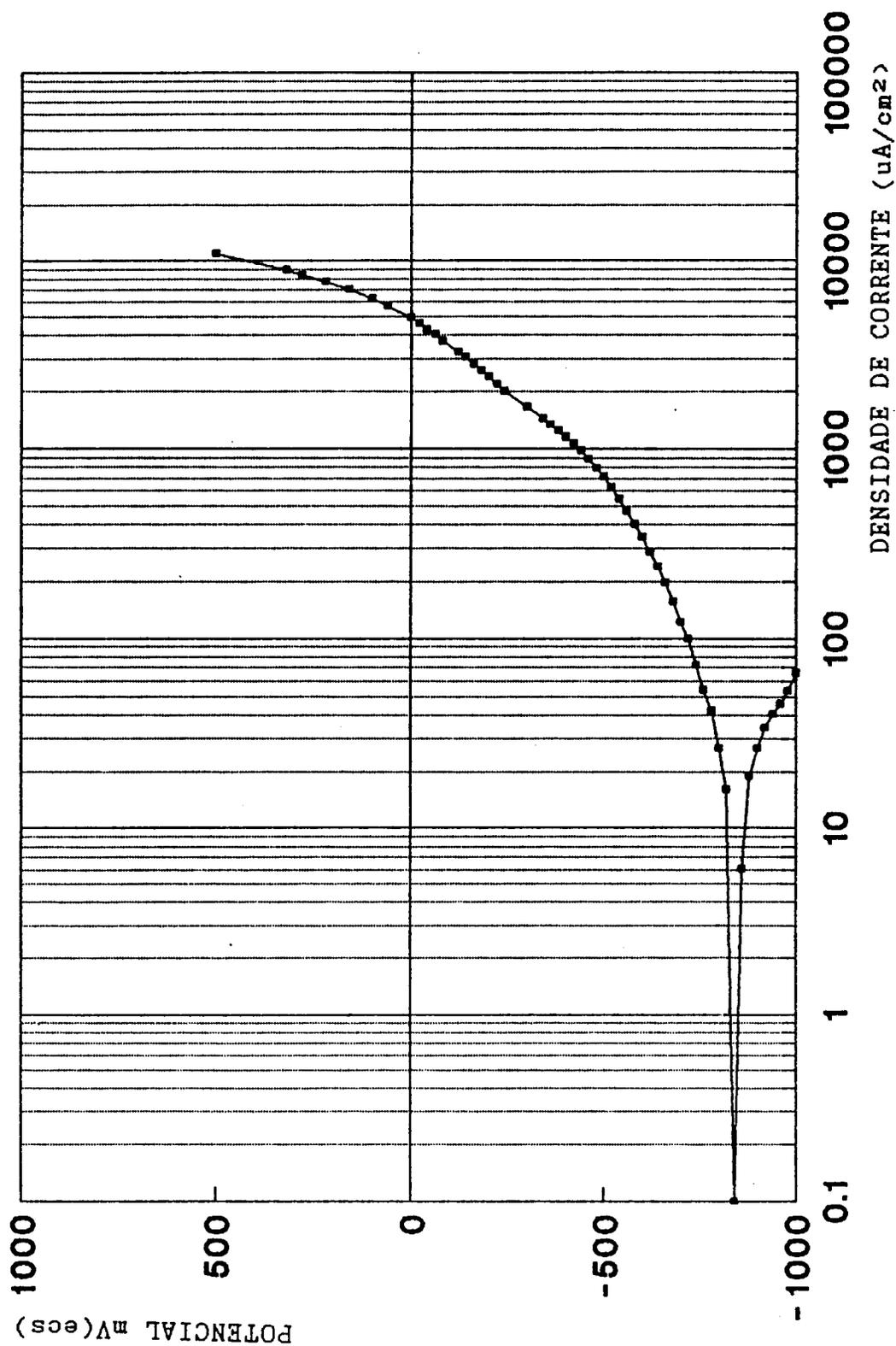


Fig.76 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 72 horas após o inóculo.

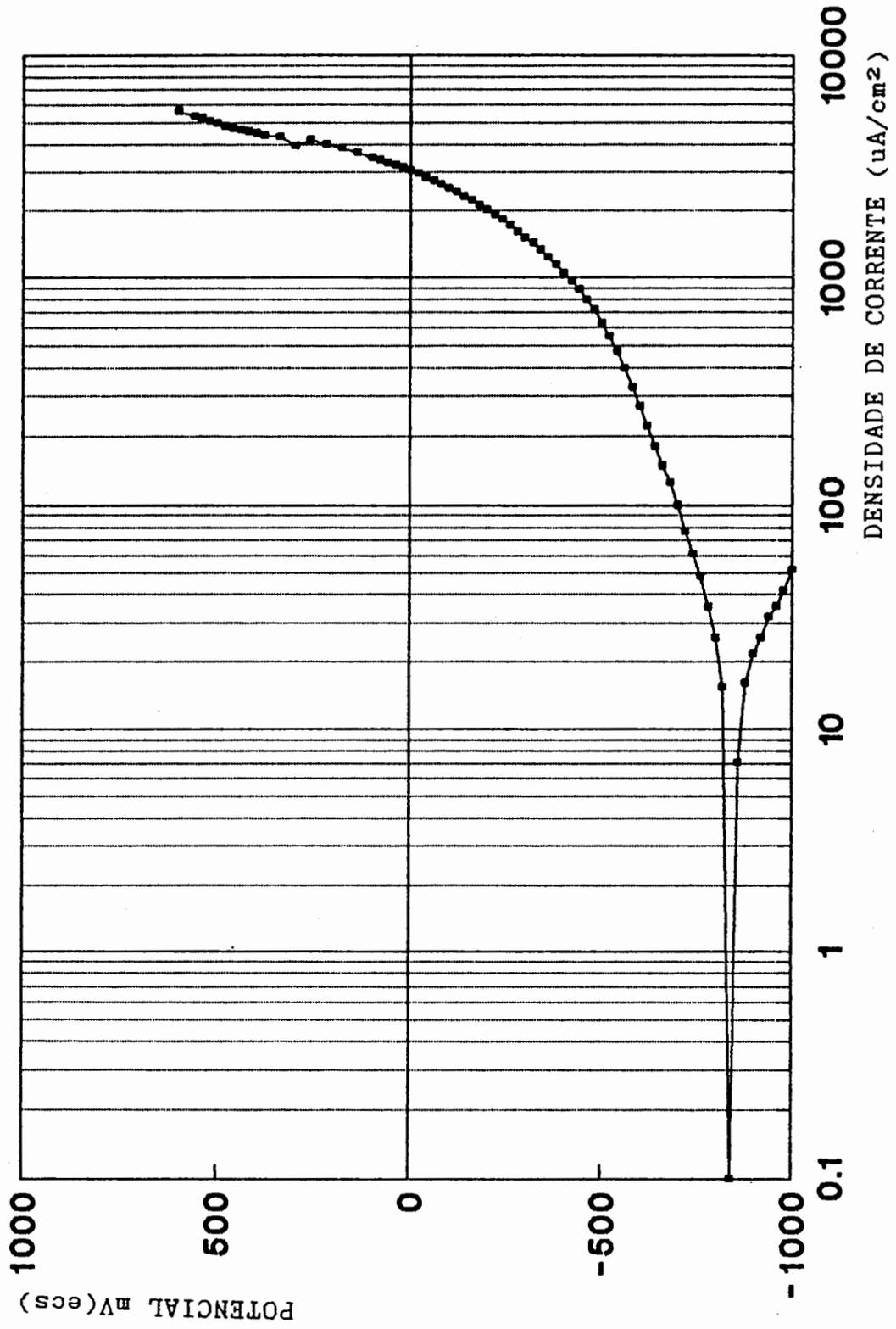


Fig.77 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 96 horas após o inóculo.

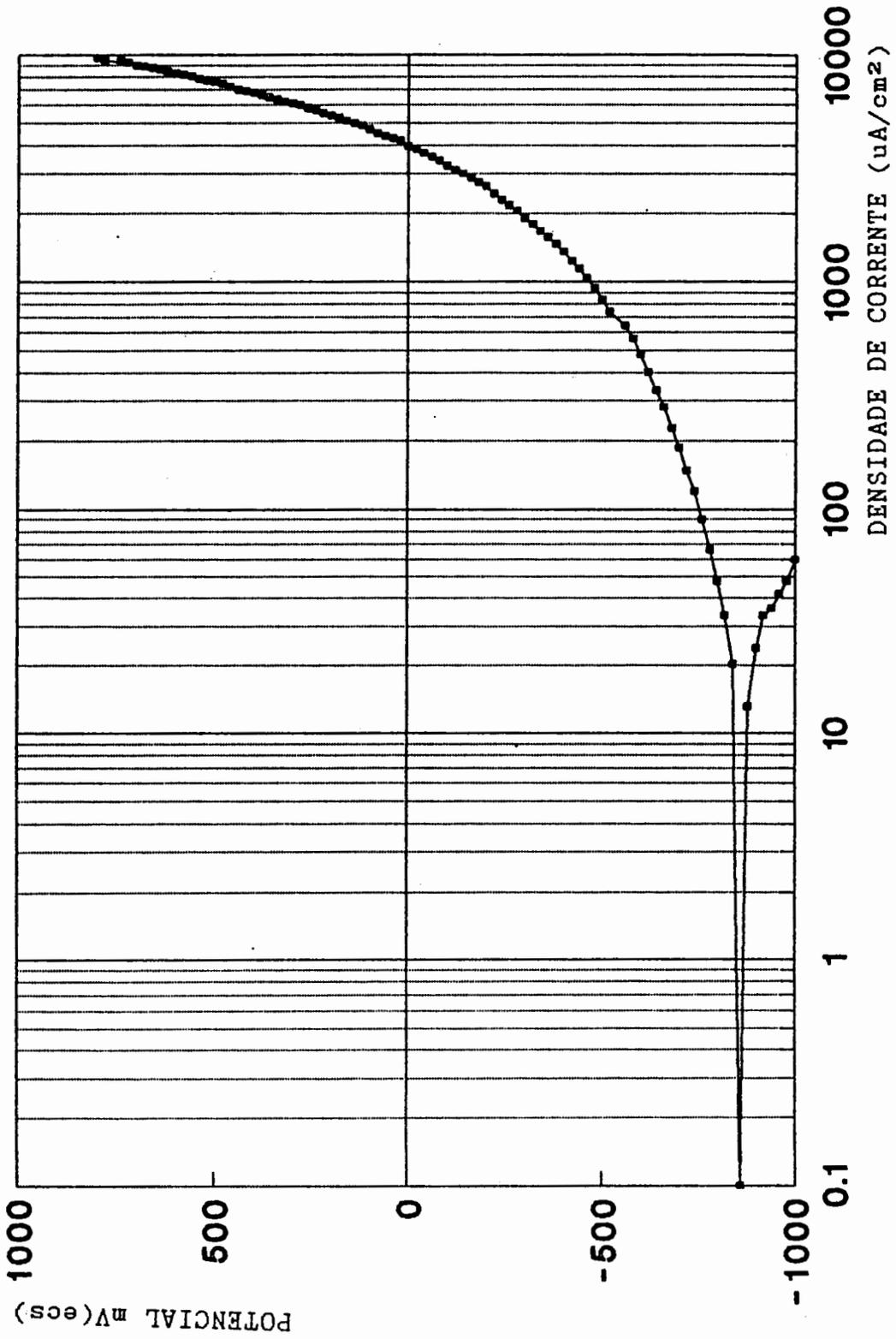


Fig.78 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 120 horas após o inóculo.

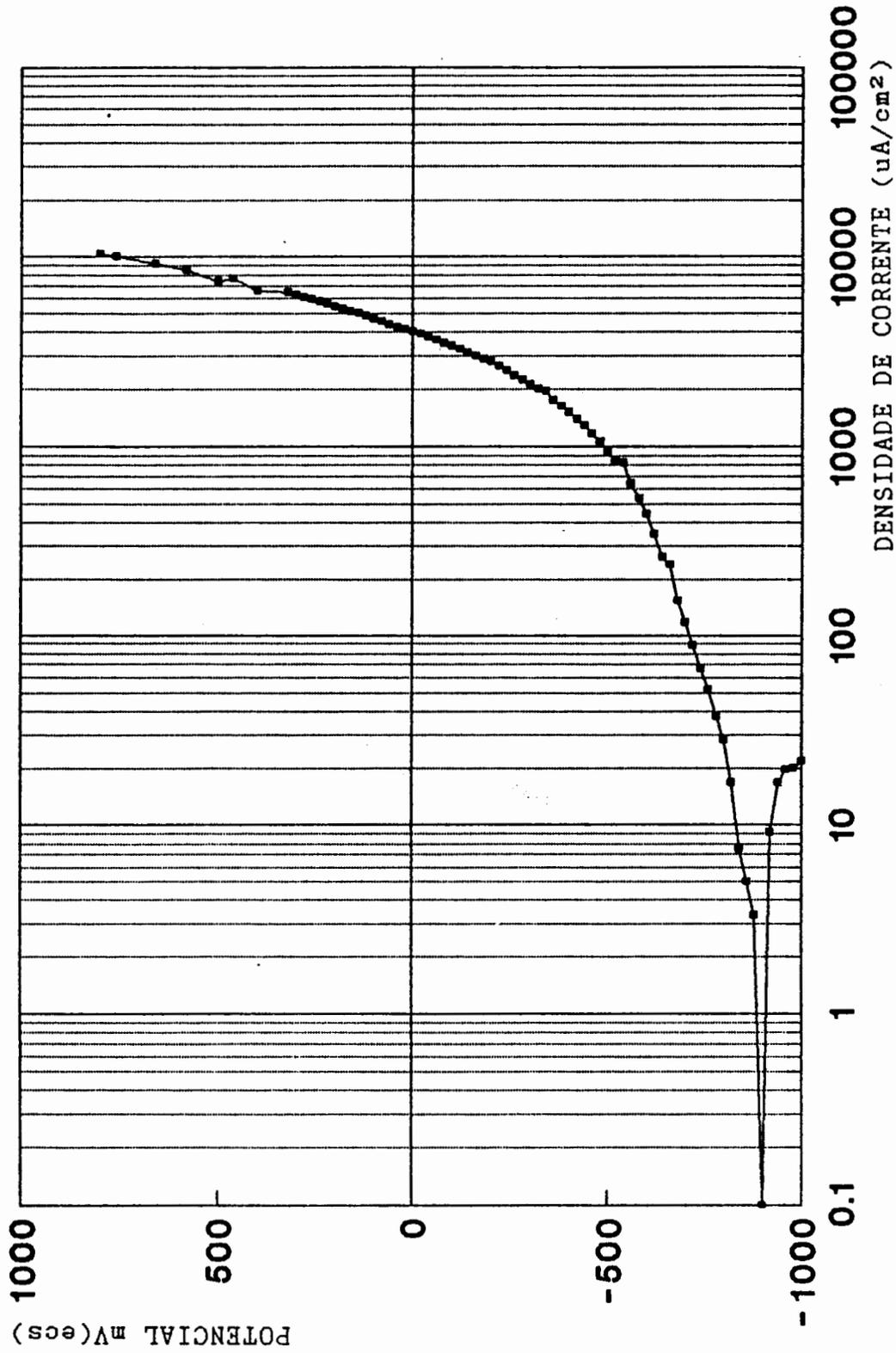


Fig.79 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 144 horas após o inóculo.

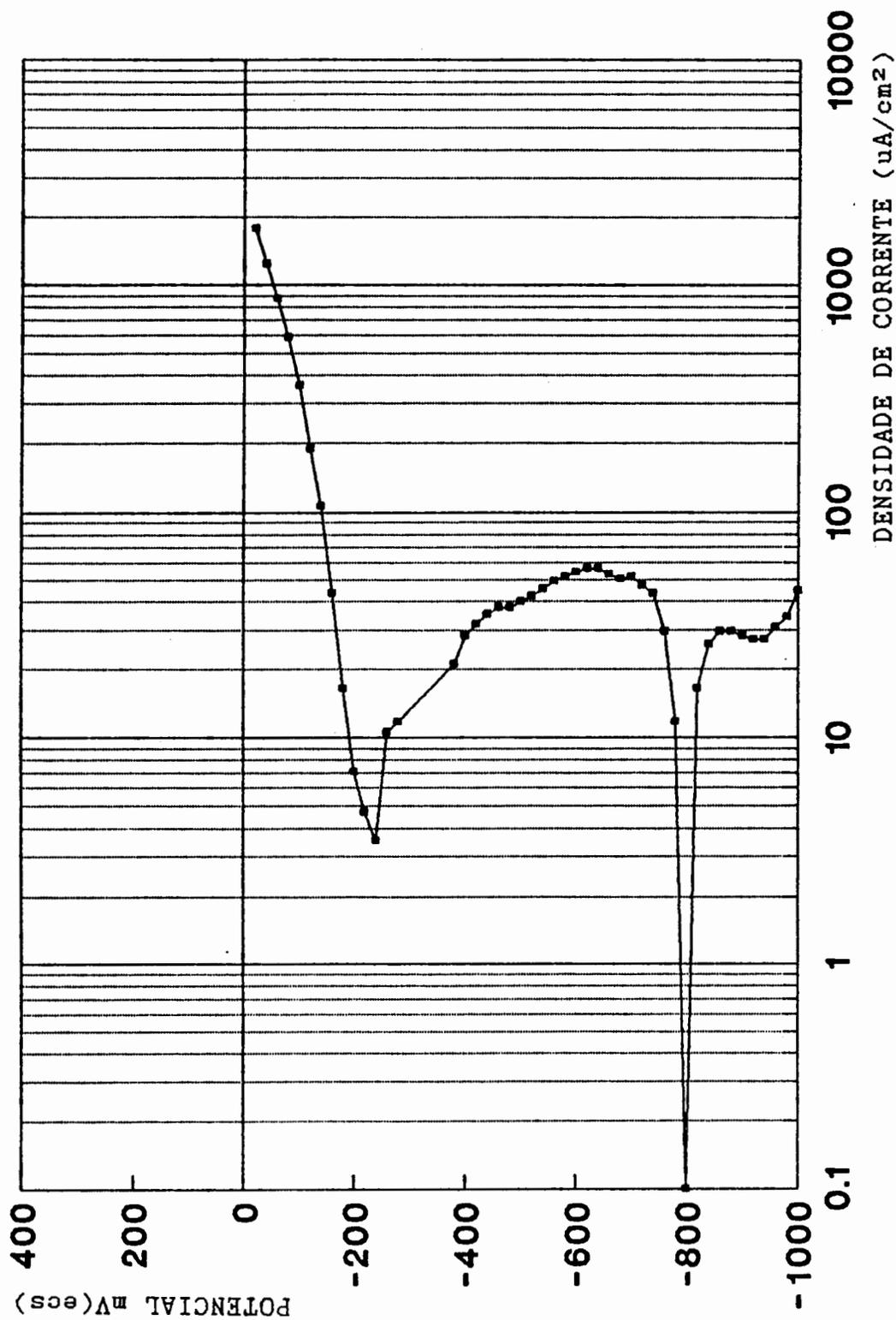


Fig.80 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 24 horas após o inóculo.

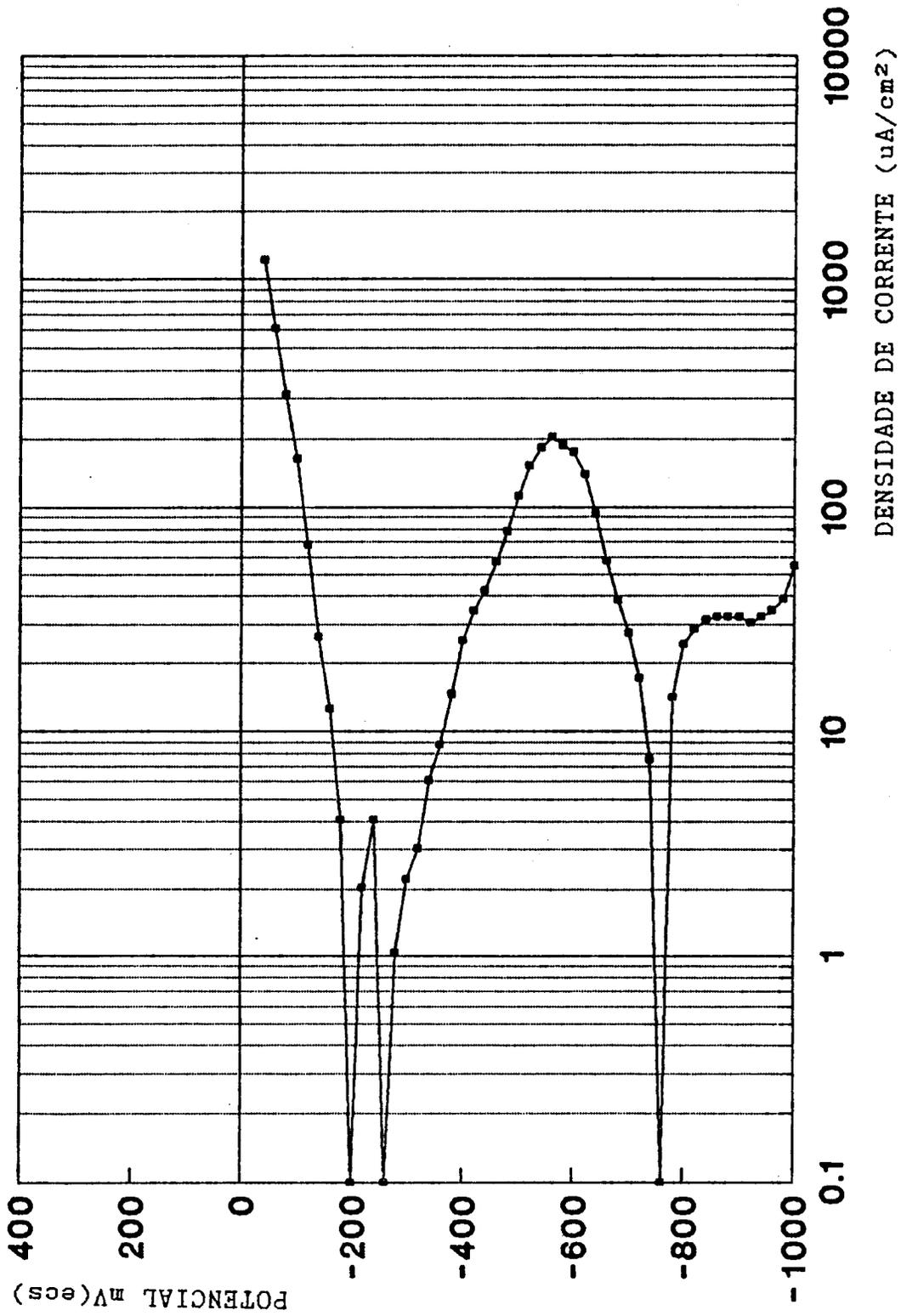


Fig.81 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 48 horas após o inóculo.

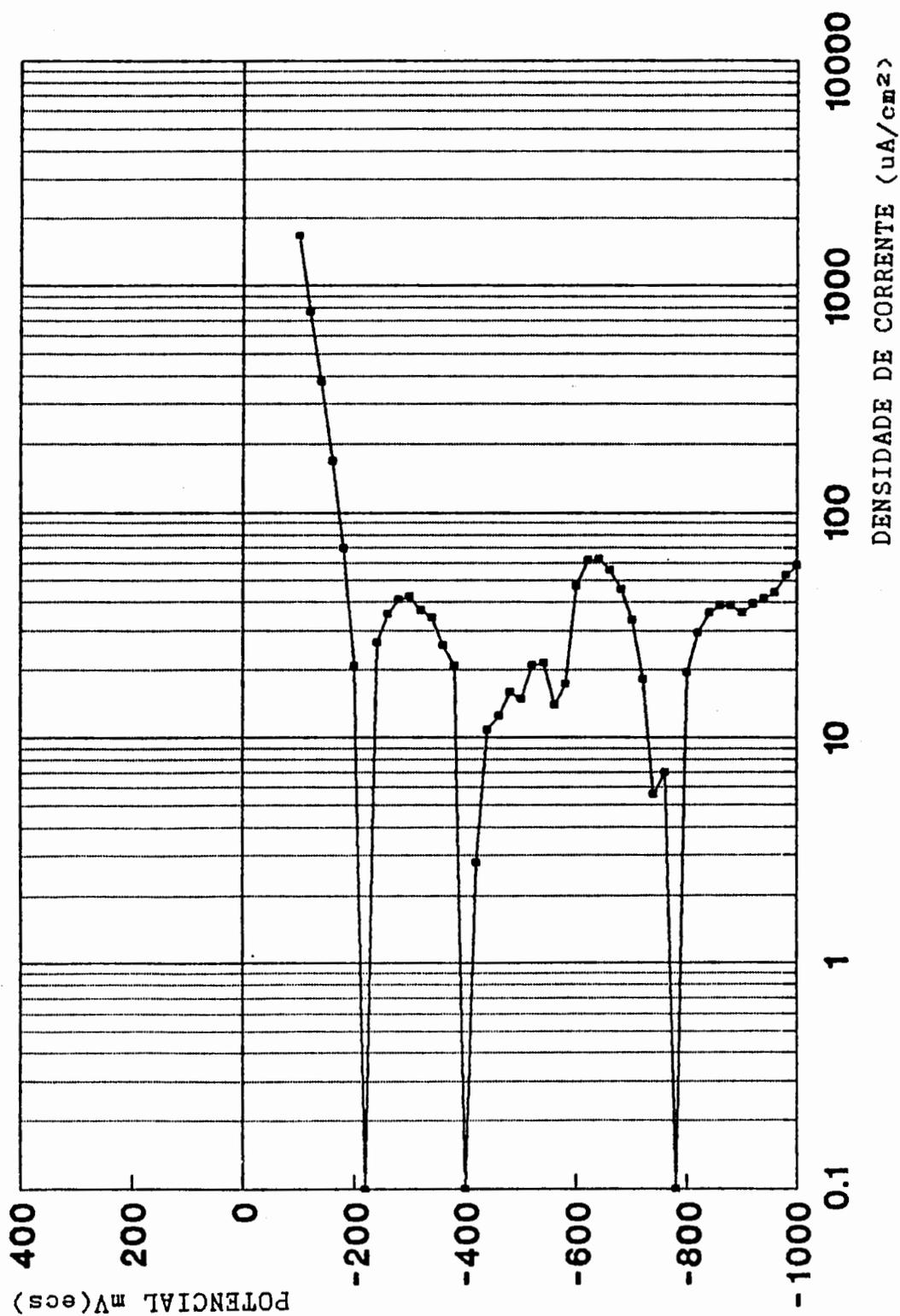


Fig.82 Curva de polarização potenciostática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 72 horas após o inóculo.

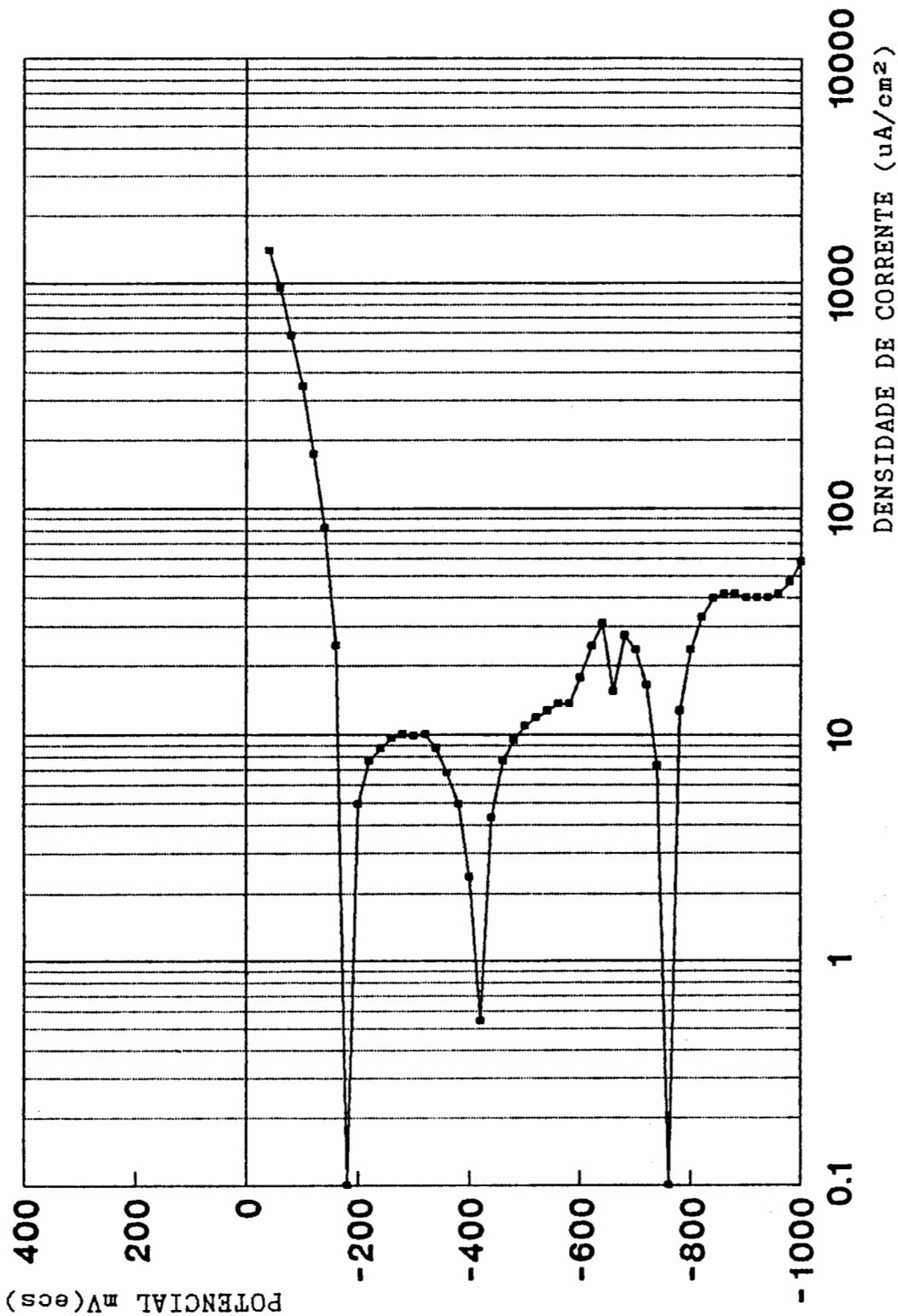


Fig.83 Curva de polarização potenciostática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 96 horas após o inóculo.

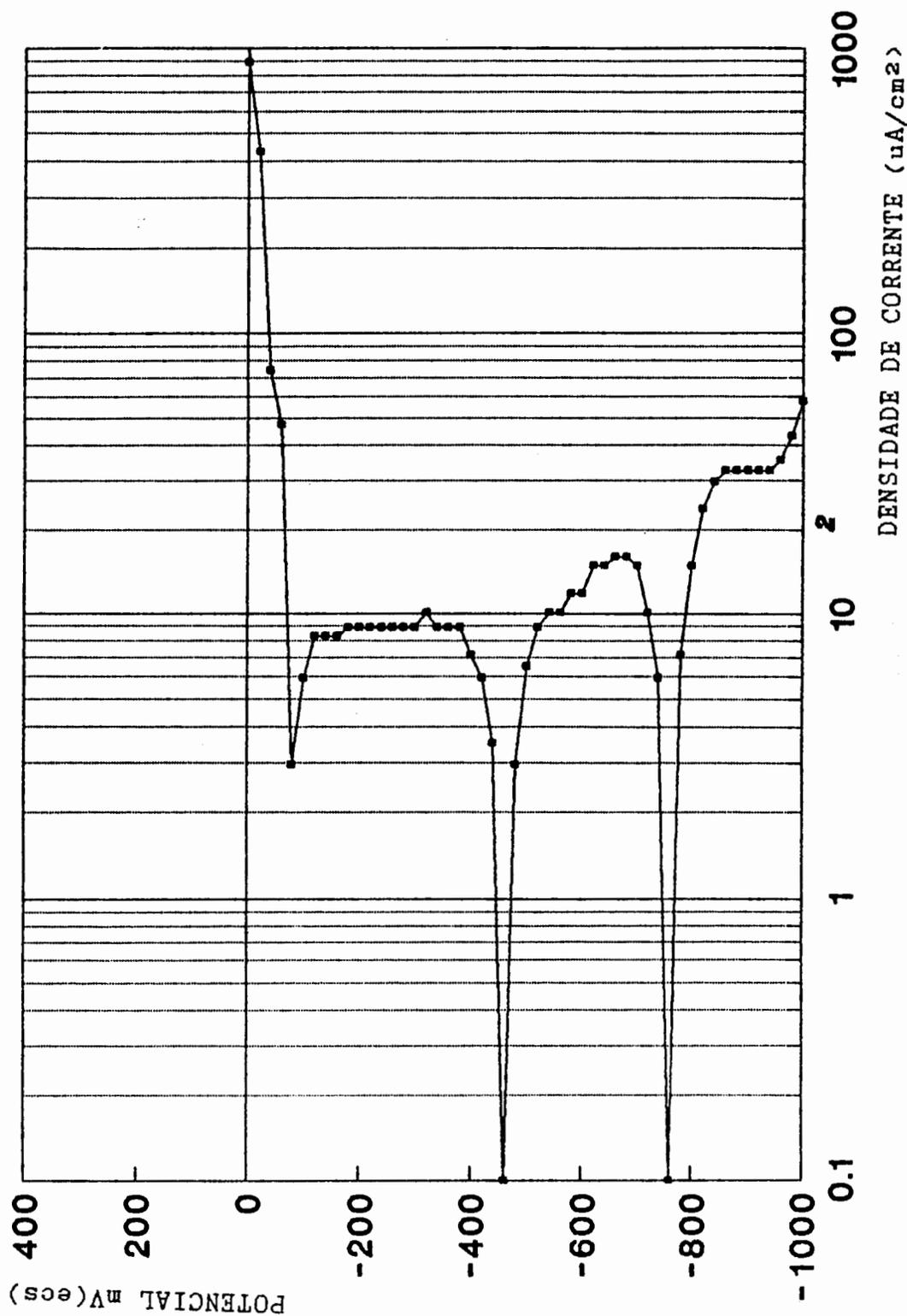


Fig.84 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 178 horas após o inóculo.

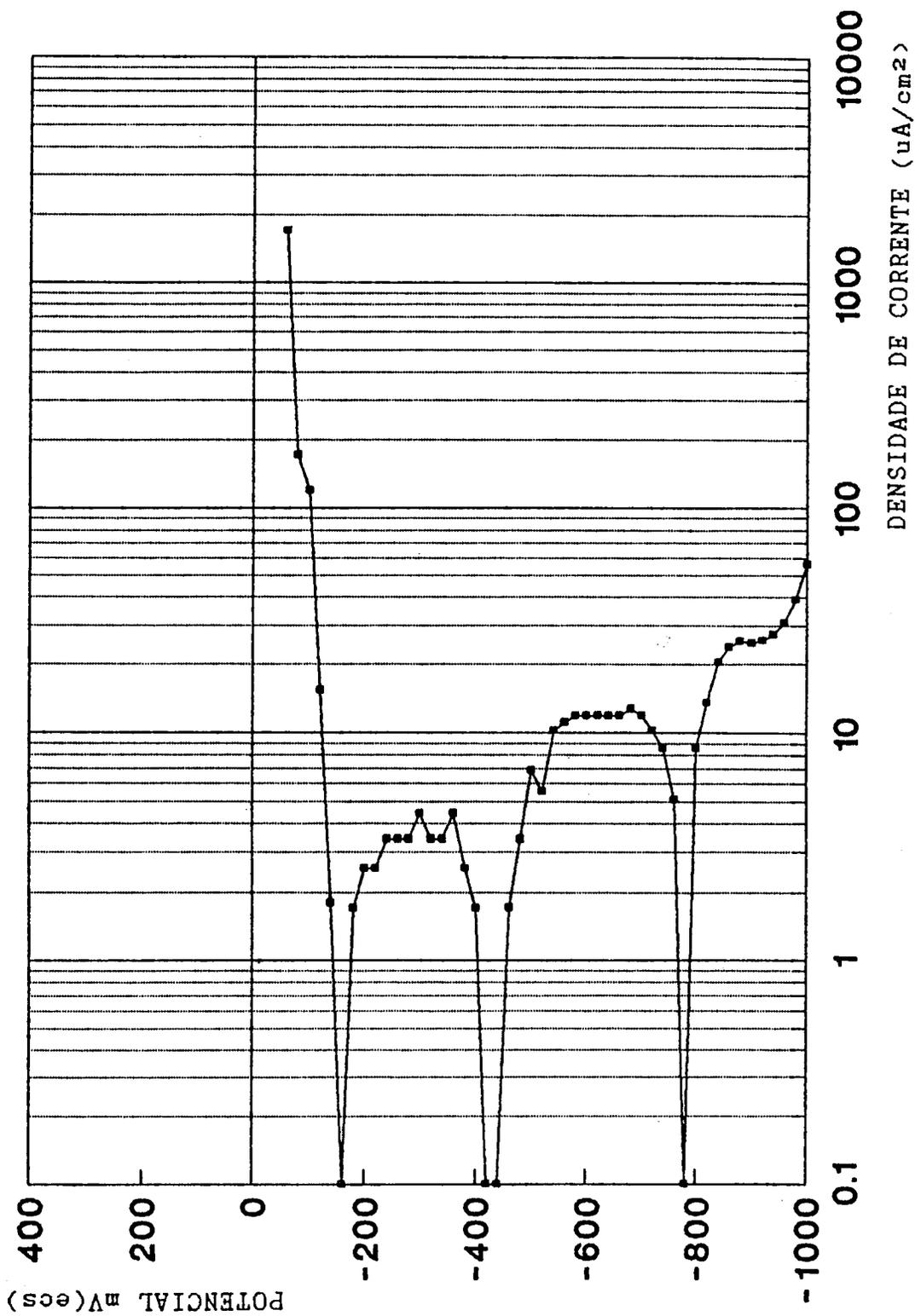


Fig.85 Curva de polarização potenciostática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5%, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio. Ensaio realizado 360 horas após o inóculo.

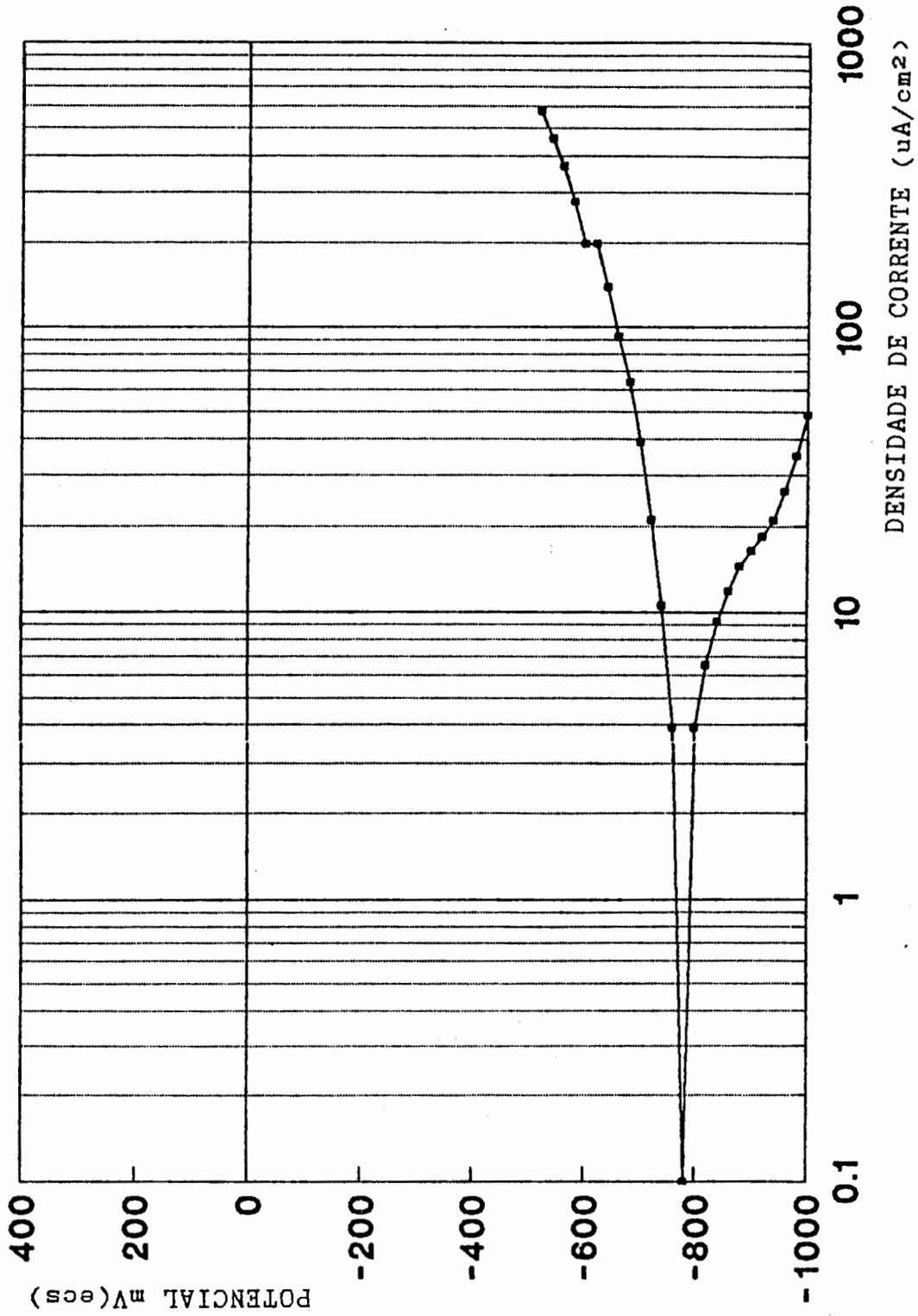


Fig.86 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sinteticadiluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 3 dias.

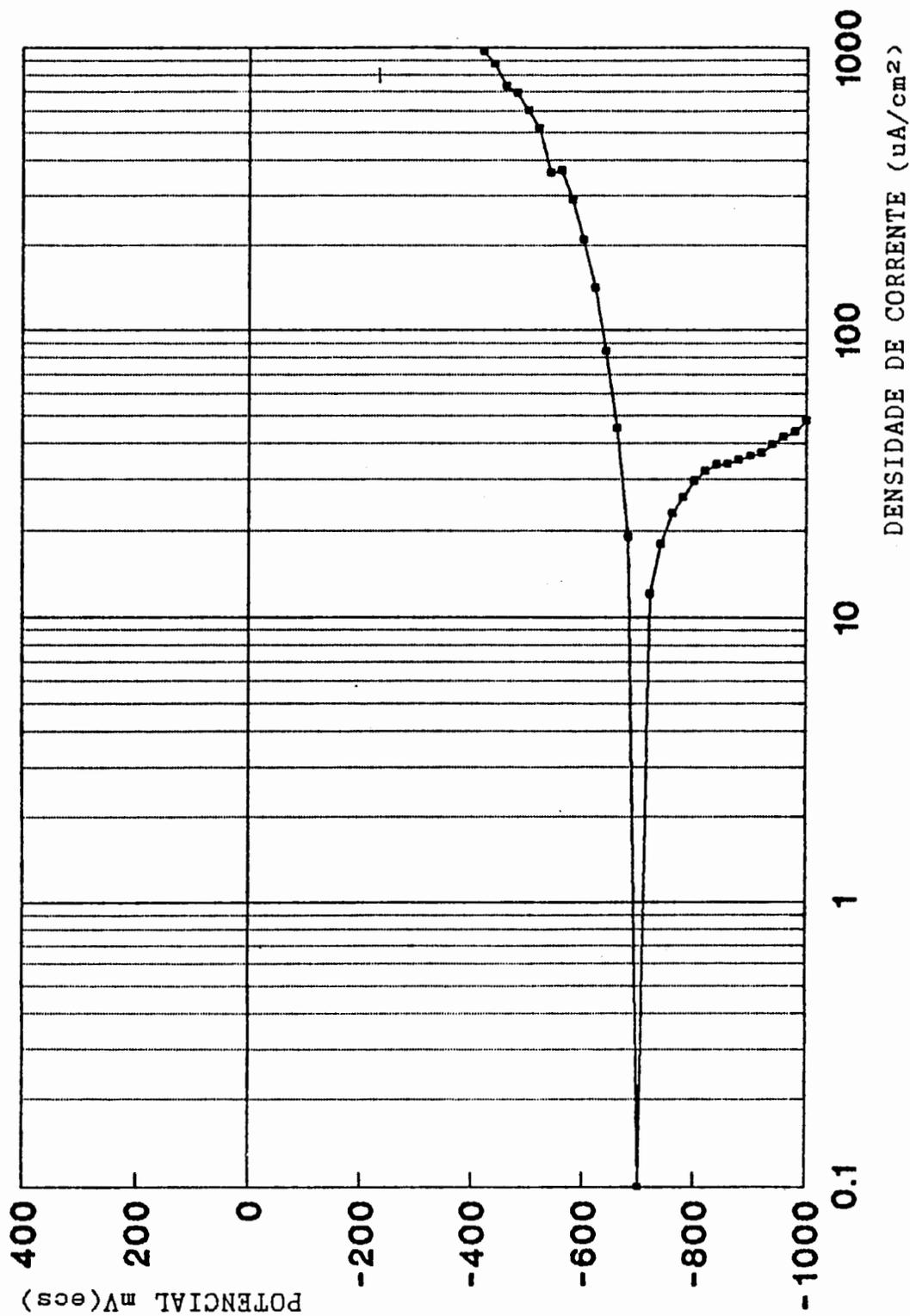


Fig. 87 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 5 dias.

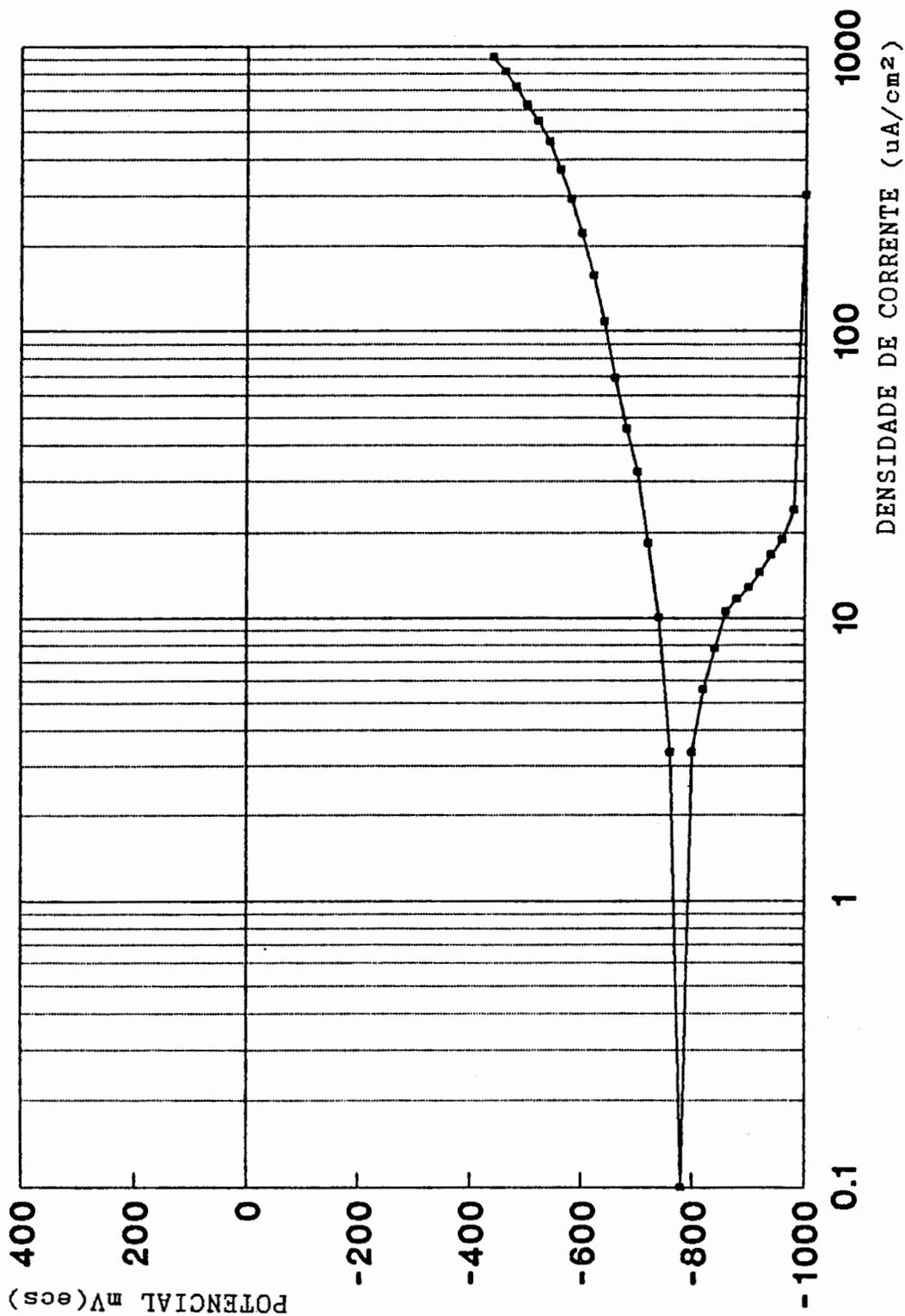


Fig.88 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 6 dias.

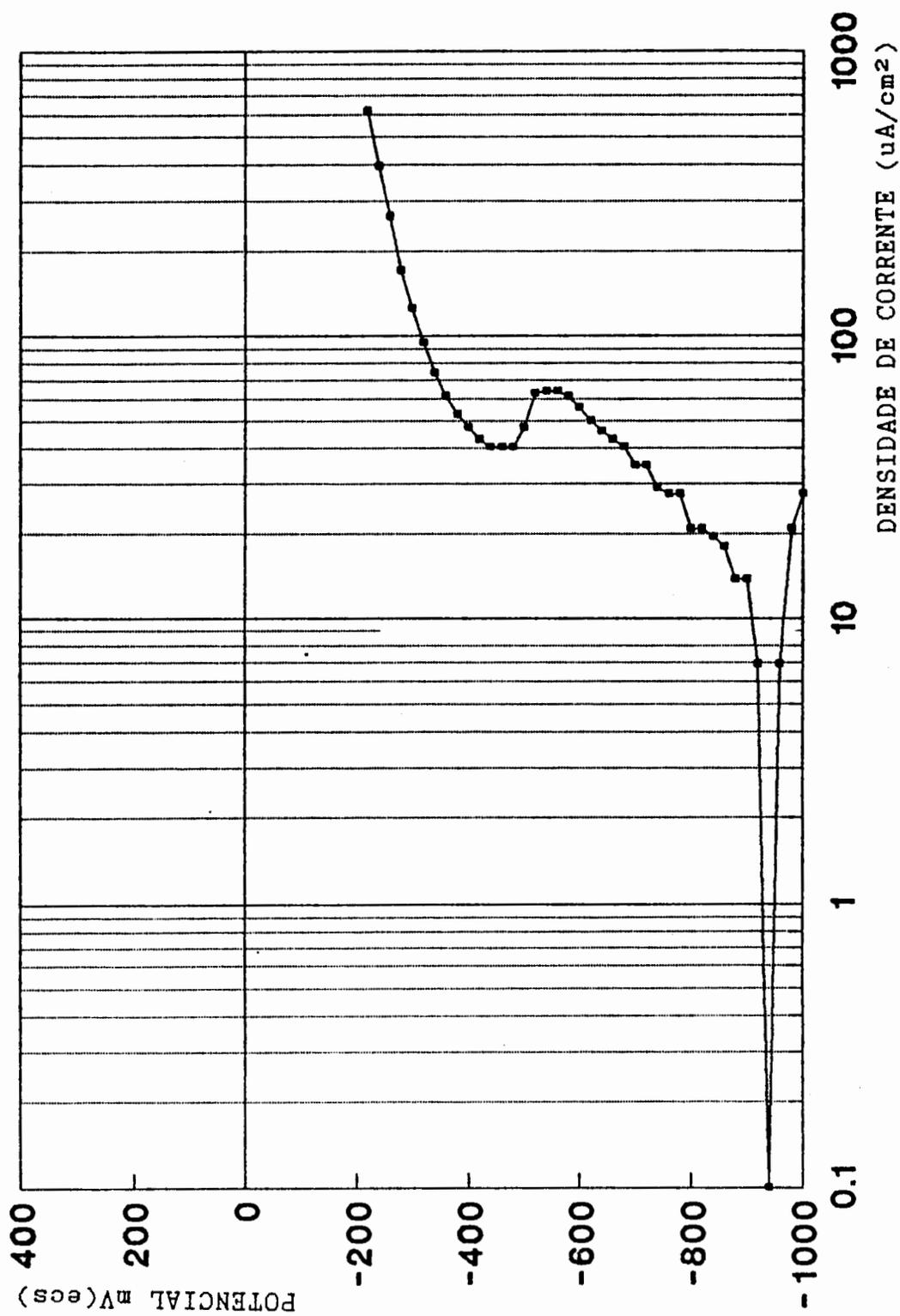


Fig. 89 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 13 dias, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

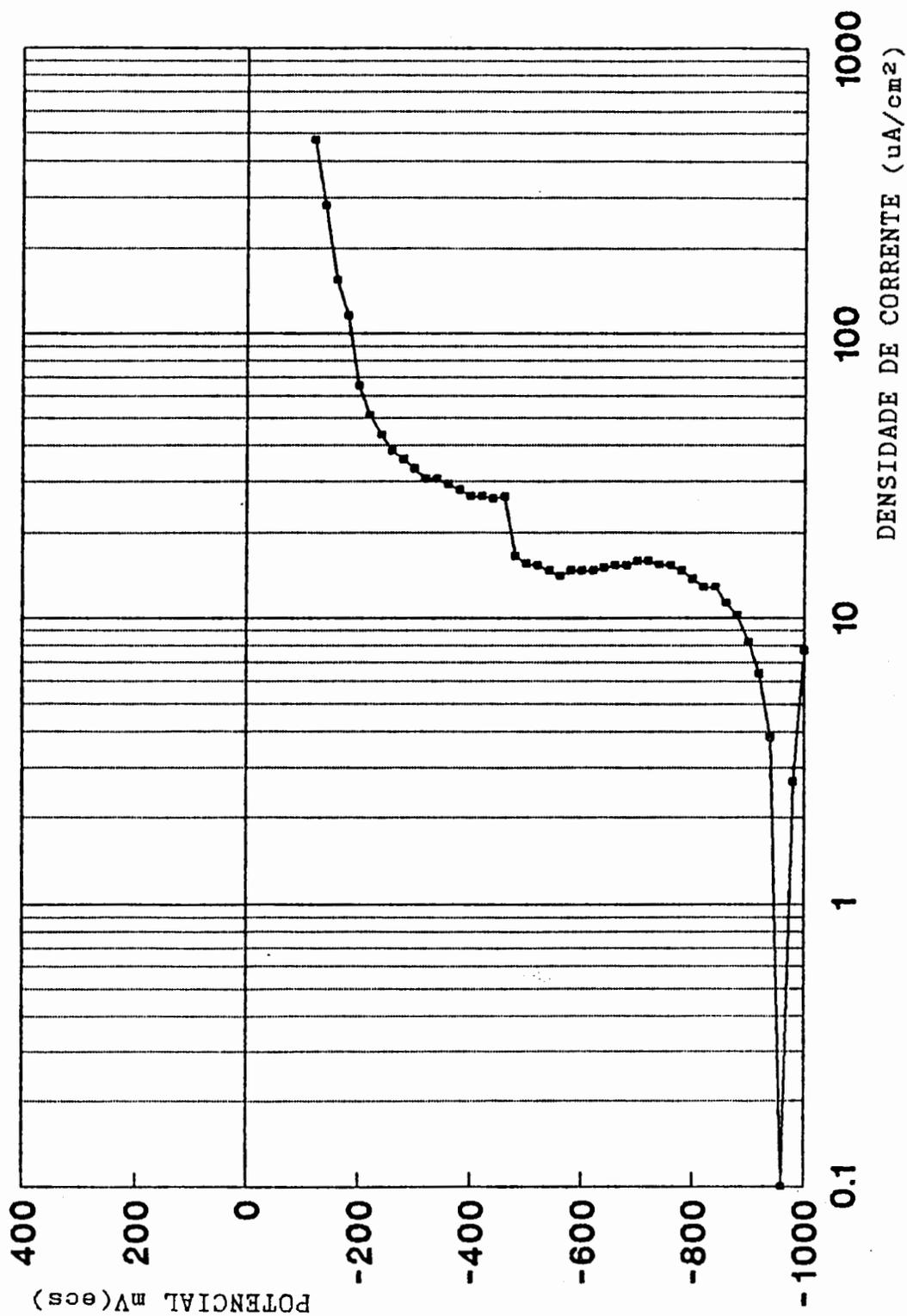


Fig 90 Curva de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006, em solução de água do mar sintética diluída a 1,5% com produtos metabólicos. Tempo de incubação 13 dias, com 4000 ppm de hexametáfosfato de sódio.

## 4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 Crescimento dos microrganismos

A realização dos testes de acompanhamento do potencial em função do tempo, com a diluição usada, do número inicial de bactérias, mostrou um desenvolvimento rápido e acentuado dos microrganismos, fato que poderia interferir sobremaneira nos testes eletroquímicos. A partir destes resultados, desenvolveu-se uma outra diluição do inóculo contaminado, bem como dos meios nos quais o microrganismo em estudo foi adaptado.

Com base nos ensaios realizados, observou-se que em meios mais diluídos o desenvolvimento dos microrganismos ocorria de modo menos acentuado. Fato esperado devido a diluição do inóculo inicial e da diminuição da disponibilidade de nutrientes.

### 4.2 Ensaios do acompanhamento do potencial a circuito aberto.

Os resultados obtidos nos ensaios de potencial a circuito aberto apresentaram comportamentos diferenciados, de acordo com os meios usados. Diversos fatores podem ter influído significativamente para estes resultados, porquanto utilizou-se meios na presença e na ausência de microrganismos e também utilizou-se um inibidor de corrosão do qual foram testadas várias concentrações, bem como seu comportamento na presença de bactérias.

A interface metal-solução sofre importantes modificações quando ocorre o processo de adesão de microrganismos. Segundo

Videla<sup>37</sup> os processos de corrosão microbiológica e a interação do biofilme com camadas passivas inorgânicas podem marcadamente mudar os efeitos da biodeterioração. Duas diferentes superfícies metálicas podem, segundo este autor, ilustrar estes efeitos: o aço inoxidável, superfície resistente a corrosão, é mais facilmente colonizada por microrganismos - a formação do biofilme facilitaria a iniciação do ataque por pite pelos efeitos da aeração diferencial e pela alteração nos gradientes de concentração do oxigênio; o aço-carbono, superfície que facilmente sofre corrosão exibe uma complexa interação biofilme/produtos de corrosão. A formação de células de aeração diferencial entre as áreas de metal cobertas ou não pelas colônias bacterianas pode levar a um ataque localizado.

A dissolução provocada por microrganismos da camada passiva inorgânica e sua capacidade de reduzir as espécies a ferro II pode eventualmente expor a superfície do metal as substâncias agressivas derivadas do metabolismo bacteriano<sup>40</sup>.

O comportamento em relação à corrosão de metais e ligas pode sofrer alterações pela colonização de bactérias. Segundo Gaylard<sup>40</sup> o contato direto entre a célula e a superfície do metal pode ser essencial para a ação corrosiva.

Um fato significativo ocorrido nos ensaios de acompanhamento do potencial de corrosão, em água do mar sintética diluída a 10% na presença de bactérias, figura (8), foi a observação de que esse potencial se mantinha em valores mais positivos, em torno de -200 mV<sub>(ECS)</sub>, comparado aos sistemas sem a presença de bactérias, onde o potencial do aço situou-se abaixo de -700 mV<sub>(ECS)</sub>.

Dexter<sup>41</sup> encontrou resultados similares ao trabalhar com água do mar natural sobre aço 316 em que o potencial a circuito aberto deslocava-se após alguns dias para valores da ordem de +200 mV<sub>(ECS)</sub>. Utilizando água do mar filtrada o potencial permanecia em torno do mesmo valor inicial dos ensaios (-200 mV<sub>(ECS)</sub>). Segundo o autor, na presença de bactérias houve um "enobrecimento do potencial", devido a formação de um filme de natureza biológica (bactérias e outros microrganismos), que levou as amostras ensaiadas ao potencial de pite do aço inoxidável.

Embora, neste trabalho, os testes tenham sido realizados em água do mar sintética, o número de células bacterianas utilizadas no inóculo de partida foi alto, possibilitando a colonização da superfície num período curto e foram obtidos resultados semelhantes aos encontrados em trabalhos desenvolvidos em água do mar natural. É possível que a cultura de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada neste estudo desenvolva um biofilme de características semelhantes ao citado por Dexter<sup>41</sup>, levando o potencial a se deslocar em direção a potenciais mais altos quando comparados aos ensaios sem bactérias.

Mollica et al.<sup>42</sup> também obtiveram resultados semelhantes em relação ao aumento do potencial de corrosão do aço em seus trabalhos em água do mar natural e concluíram que a colonização bacteriana, em especial as bactérias aeróbicas, atuam como um despolarizador da reação do oxigênio no aço inoxidável, e que o período de rápido aumento do potencial coincide com o crescimento exponencial da população bacteriana.

Os resultados de Scotto et al<sup>43</sup> corroboram que em meios naturais a superfície do metal colonizada por bactérias e algas altera o processo de redução do oxigênio, presumivelmente como resultado de catálise enzimática. Este fenômeno facilita a iniciação do ataque localizado, justificando assim a maior agressividade do meio natural em relação ao meio estéril, com semelhantes quantidade de íons agressivos.

Uma explicação para a rápida colonização da superfície metálica, provavelmente em um meio que ofereça condições apropriadas para o desenvolvimento do biofilme, é de acordo com Duddridge<sup>4</sup>, primeiramente pela adsorção de macromoléculas na superfície do substrato para formar um filme condicionante, e em seguida pelo transporte de células, nutrientes e outras substâncias do seio da solução para a superfície. Subsequentemente a estes dois passos ocorre a fixação das células ao substrato.

A partir daí, o crescimento do biofilme envolve a divisão celular, produção de exopolissacarídeos e a retenção de partículas inorgânicas e biológicas. Levando-se em consideração as propostas de Duddridge<sup>4</sup> com relação à aderência de bactérias, pode-se sugerir que na solução estudada tenha ocorrido um favorecimento para a formação do filme condicionante possivelmente de macromoléculas adsorvidas (provenientes da solução em estudo) sobre a superfície do aço, razoavelmente uniforme, figuras (16) a (23), e que as condições de pH e a concentração de nutrientes (peptona), suportava o desenvolvimento dos microrganismos como também o desenvolvimento do biofilme. Além de que a existência de mais nutrientes na solução diluída a 10% facilita a formação do filme

orgânico razoavelmente uniforme sobre a superfície do aço de tal modo que oferece boas condições para a colonização de bactérias.

De outras experiências realizadas por Dexter e Lin<sup>44</sup> em água do mar natural filtrada em ensaios galvanostáticos, o autor concluiu que o biofilme desenvolvido sobre as amostras atuava como uma barreira de difusão e produzia efeitos semelhantes a um depósito de calcáreo.

Neste trabalho foi observado, de acordo com as figuras (16) a (23), a formação de um filme sobre a superfície do aço com uma extensa colonização de bactérias.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho em relação ao biofilme formado na superfície do aço, poder-se-ia sugerir que este poderia atuar prevenindo a dissolução do ferro e possivelmente facilitando a corrosão localizada, pois quando se "retirava" o biofilme, as análises no microscópio, mostravam pequenos pites, diferenciando-se dos ensaios realizados em água do mar sintética sem a presença de bactérias, nos quais ocorria corrosão generalizada.

Mesmo após a desidratação a que os corpos de prova foram submetidos, em seguida a retirada do meio em que estavam imersos para a observação no microscópio eletrônico de varredura, torna-se evidente a abundante formação de material extrapoli-sacarídeos proveniente destas bactérias. Característica descrita por outros autores<sup>25,45</sup> citam que em consórcios microbianos, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* são as primeiras a iniciar a aderência, formando limo e devido a serem bactérias aeróbicas, foram

denominadas sequestrantes de oxigênio e podem abrigar bactérias anaeróbicas como BRS.

Ringas e Robinson<sup>46</sup> no seu estudo sobre aço carbono em presença de bactérias anaeróbicas (bactérias redutoras de sulfato), descreve a formação de um filme de natureza inorgânica, que devido a irregularidades apresentava a formação de tubérculos. Segundo este autor, a formação é aleatória e verificou a incidência de pites abaixo destas formações.

Nos ensaios realizados neste trabalho, embora trabalhando com bactérias aeróbicas também observou-se a formação de tubérculos, figura (20), que poderiam ser explicados pela imperfeição do filme orgânico formado na superfície metálica.

Nos ensaios realizados em água do mar sintética diluída a 1,5% não se observou diferenças significativas no potencial de corrosão do aço (em testes com período curtos - 2 horas) na presença e ausência do microrganismo (nestes testes foi utilizado a diluição do inóculo inicial); o potencial de corrosão do aço atingia valores próximos nos dois sistemas, embora houvesse o crescimento das bactérias, acompanhado através de plaqueamentos.

No sistema biótico, o biofilme apresentou-se de maneira tênue, após um período de 5 dias de imersão - observar através das figuras (25) a (27) - provavelmente não uniforme e a colonização bacteriana não apresentava a formação de material extrapoliissacarídeo abundante, como verificado nos testes na diluição de 10%.

Mesmo assim as células bacterianas estavam aderidas sobre a superfície metálica, como se vê nas fotos de microscopia eletrônica, embora em menor número, fato esperado, já que nestas condições realizou-se a diluição de meios (diluição da água do mar), nutrientes (peptona bacteriológica) e do número de bactérias no inóculo de partida. Cita a literatura que estas bactérias podem viver em meios com um baixo nível nutricional<sup>17</sup> o que nestes casos foi comprovado, pois a bactéria adaptou-se e cresceu num meio bastante diluído.

O potencial de corrosão nestes testes se mantinha em valores abaixo de -600 mV (ECS), figura (24), e observou-se uma corrosão generalizada, embora com menor intensidade do que na ausência de bactérias.

Quanto a aderência das bactérias, observou-se através de fotos de microscopia eletrônica que as bactérias se aderem tanto ao substrato metálico na presença do provável filme orgânico citado, no caso da água do mar sintética diluída a 10%, figura (18), como também em água do mar sintética diluída a 1.5%, figura (26) (27), nas quais se observa a formação menos pronunciada deste filme.

As mudanças na superfície metálica em água do mar diluída sintética a 10%, são constatadas num curto período de tempo, pois logo após iniciar o ensaio, o potencial apresentava uma tendência a permanecer em valores mais positivos, provavelmente devido a rápida interação bactéria /substrato. Fato também relatado por Stanley<sup>18</sup>, que avaliou alguns fatores que afetam a aderência de *Pseudomonas*

*aeruginosa* em aço inoxidável, e observou que as células começam a se fixar na superfície metálica em menos de um minuto e o número de bactérias aderidas aumenta com o tempo.

Os ensaios realizados em meio de cultura líquido apresentaram um comportamento semelhante àqueles feitos em água do mar sintética diluída a 10%. Um fato que pode ser observado devido ao contraste da cor do meio e das bactérias, é que na parte superior e inferior da chapa havia uma maior concentração do biofilme.

Tendo em vista o exposto, podemos inferir que a formação do biofilme depende de alguns fatores, quais sejam a quantidade de nutriente disponível, o número inicial de células bacterianas e o tempo de contato entre a superfície e o microrganismo.

4.2.a Acompanhamento do potencial a circuito aberto em água do mar sintética diluída a 1.5%, com hexametáfosfato de sódio.

O comportamento do potencial de corrosão em função do tempo para o aço em soluções de hexametáfosfato de sódio, indica que se trata de um inibidor preponderantemente catódico, já que o potencial se deslocou para valores negativos, situando-se na zona de imunidade para o ferro, segundo Pourbaix<sup>47</sup>.

Notou-se que aumentando a concentração do inibidor, o potencial se deslocava para valores mais negativos. Observou-se ainda que em concentrações baixas em torno de 50 e 100 ppm ocorria a corrosão do corpo de prova, embora fosse possível observar após os ensaios, com auxílio da lupa, uma tendência para formação de um filme sobre a superfície metálica.

Nos testes com uma concentração mais elevada de inibidor, a partir de 2000 ppm o potencial baixava imediatamente após a imersão do corpo de prova na solução, figura (11), notando-se a formação de um filme, provavelmente de fosfato. Nestas condições o potencial mantinha-se estável por um período considerável (2 semanas), e em alguns testes após 2 dias de imersão observava-se o aparecimento de alguns poucos e pequenos pites.

Cohen<sup>32</sup> cita que os fosfatos de uma maneira geral, necessitam de uma concentração mais alta e não são muito eficientes para formar e reparar o filme protetor formado, em relação a outros tipos de inibidores de corrosão, como por exemplo, o nitrito.

Segundo Carter e Nathan<sup>48</sup>, o hexametáfosfato é o mais eficiente dos inibidores de corrosão do tipo dos polifosfatos e melhora a sua eficiência com o aumento da concentração, como foi observado nos testes de imersão. Cita ainda que um dos problemas no estudo dos fosfatos é uma possível reversão em outro tipo de polifosfato, devido a elevação da temperatura ou tempo de duração dos testes, por exemplo, sendo que estes problemas podem ser contornados se as investigações decorrem num curto período de tempo, e controlando-se a temperatura, conforme os testes deste trabalho.

Das concentrações do inibidor testadas em meios abióticos, foi escolhida a de 2000 ppm para realizar os testes com bactérias, pois nesta concentração de inibidor obteve-se resultados razoavelmente eficientes contra o aparecimento de pites, pelo fato de baixar o potencial até  $-800 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ , e coincidir com a proteção do aço, pela formação de um filme sobre a superfície.

Nos testes realizados na concentração de 2000 ppm contaminado com bactérias observava-se que o potencial não permanecia em valores constantes depois de decorrido algum tempo dos ensaios, e observou-se que naqueles onde havia hexametáfosfato de sódio, as bactérias cresciam, em alguns testes, até em número maior do que sem o inibidor.

Quanto ao potencial de corrosão do aço permanecer em valores mais positivos em meios bióticos, figura (14), poderia ser devido o fato de que como foi observado nos testes de crescimento das bactérias, estas se adaptaram ao meio com hexametáfosfato de sódio, e poderiam interferir junto ao filme formado, devido a extensa colonização provocada na superfície metálica, e a produção abundante de material polimérico celular que poderia interferir no desenvolvimento do filme de fosfato, possivelmente formando membranas que inibissem a difusão de íons passivantes, como os fosfatos, sobre a superfície do aço<sup>25</sup>.

Outro fator que poderia estar relacionado ao aumento do potencial com o decorrer do tempo, seria o consumo do inibidor pelas bactérias. Contudo deve-se considerar que a concentração usada nestes ensaios foi alta (2000 ppm), tornando-se difícil que as bactérias metabolisassem grande parte deste fosfato, de tal modo a influenciar no valor do potencial.

Franklin<sup>25</sup> que realizou testes com *Pseudomonas sp* num meio complexo para o crescimento da bactéria, em que havia fosfato, e partindo do fato que o fosfato inibe a corrosão do aço em meio estéril, realizou testes para determinar se o consumo de fosfato

pela bactéria decresce esta inibição. A fim de esclarecer esta hipótese, utilizou um meio no qual haviam crescido bactérias, as quais depois foram removidas. A propagação de pites foi inibida neste meio gasto (utilizado) estéril. A partir destes resultados o autor sugere que a propagação de pites quando a bactéria estava presente não ocorreu devido ao consumo do fosfato da solução, porque as concentrações iniciais e finais permaneceram as mesmas, e sim pela interferência no filme de fosfato pela formação dos produtos extrapoli-sacarídeos, com o que concordamos baseado nas fotos de microscopia eletrônica, nas quais se observa que existem bactérias aderidas sobre o filme de fosfato.

### 4.3 Curvas de polarização potencioestáticas.

#### 4.3.1 Curvas de polarização potencioestática para o aço ABNT 1006 em água do mar sintética diluída

##### 4.3.1.a Em água do mar sintética diluída a 10%

A água do mar pode ser considerada uma das mais corrosivas entre as águas naturais. Contendo concentrações relativamente elevadas de sais, funciona como um eletrólito forte, provocando um rápido processo eletroquímico de corrosão<sup>20</sup>. Nestas condições a passivação do aço não é atingida.

As curvas de polarização, realizadas neste sistema sem a presença de bactérias, apresentaram um comportamento esperado, como pode ser observado na figura (46), mostrando uma dissolução ativa do metal. Mesmo utilizando-se uma solução diluída (10%), esta continha uma quantidade significativa de ânions agressivos e após a realização das curvas de polarização, a superfície metálica apresentava muitos pites.

Nas curvas realizadas na diluição de 10% com bactérias, figuras (63) a (65), que foram realizadas logo após a colocação do inóculo há uma redução apreciável da reação anódica, embora a catódica não seja praticamente afetada. Vale lembrar que estes experimentos foram realizados com uma quantidade de bactérias que recobriam rapidamente a superfície exposta do corpo de prova. Muito provavelmente com esta aderência era dificultada a cinética da redução do filme de óxido inicialmente existente na superfície.

#### 4.3.1.b Em água do mar sintética diluída a 1,5%

Nas curvas de polarização potencioestáticas realizadas em água do mar sintética diluída a 1.5% sem bactérias, ocorreu uma variação do potencial de corrosão do aço entre os valores de -400 a -200 mV<sub>(ECS)</sub>, como mostram as figuras (47) a (50), e a corrente anódica aumentava rapidamente a partir do potencial de corrosão, ocorrendo uma dissolução ativa do metal.

Uma possibilidade para a ocorrência desta variação de potencial observada neste meio, pode estar associada ao fato de que o filme formado ao ar não foi reduzido previamente antes do início da varredura do potencial, e como esta solução é menos agressiva, devido a diluição, a redução durante o período de polarização catódica pode ter sido mais ou menos perfeita o que pode ter contribuído para a falta de reprodutividade nestas curvas. Este comportamento estaria de acordo com os resultados dos ensaios de potencial de corrosão em função do tempo, figura (10), onde verifica-se que a queda correspondente é mais suave nesta solução que aquela em água do mar diluída a 10% o que caracterizaria uma redução mais lenta do filme de óxido original.

Nos ensaios realizados neste meio, porém com a presença de bactérias, pode-se observar algumas diferenças nas curvas potencioestáticas realizadas depois de distintos tempos de incubação das bactérias até um período de 6 dias. Logo depois da inoculação dos microrganismos, figura (66), observa-se uma definição da corrente limite catódica em torno de 15  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , e um potencial de corrosão semelhante ao do ensaio realizado em meio estéril (sem bactérias). A curva de polarização realizada após um período de 24

horas depois da inoculação dos microrganismos figura (67), apresenta um comportamento diferenciado, sendo que o potencial de corrosão do aço baixou consideravelmente em relação as curvas realizadas neste mesmo meio sem a presença das bactérias, e a zona de corrente limite não se apresenta definida, pois já está em potenciais em que ocorre um aumento acentuado de corrente devido a reação de hidrogênio. A partir do potencial de  $-800 \text{ mV}_{(ECS)}$ , ocorre um aumento brusco da corrente. Este comportamento foi similar nos ensaios realizados nos dias subsequentes.

Nos testes realizados para observação do crescimento de bactérias em placas, e também em meios líquidos, detectava-se um desenvolvimento apreciável da cultura inoculada após um período de 24 horas. Como as alterações nas curvas de polarização, em relação ao potencial de corrosão, coincidem com este mesmo período de tempo, supõe-se que estas modificações possam ser atribuídas à multiplicação das bactérias no meio.

Um fator que poderia contribuir para tais modificações, é a aderência de células bacterianas na superfície metálica, com a subsequente colonização desta superfície, resultando na formação do biofilme. O desenvolvimento deste biofilme não deve ocorrer de um modo perfeito no período de tempo da realização do ensaio, (1 hora em média), mas os resultados dos testes de acompanhamento de potencial mostraram que mesmo num curto período de tempo inicia-se a aderência de células bacterianas. (Este fato foi bem mais detectável nos ensaios realizados em água do mar sintética diluída a 10%), como se pode observar na figura (8).

Uma das características deste filme bacteriano é a sua não uniformidade<sup>49</sup>, sendo a aderência de microrganismos um processo aleatório, e pode gerar sítios de diferentes concentrações de oxigênio, e com isto células de aeração diferencial. As curvas de polarização obtidas neste meio, após um período de 48 horas, vide figura (68), permitem observar que o sistema é bastante agressivo, pois a corrente anódica aumentou acentuadamente em relação à curva obtida logo após a inoculação. Isto poderia ser devido ao início da formação deste filme descontínuo sobre a superfície metálica. Nas fotos obtidas dos corpos de prova, figuras (42) a (45), após a realização das curvas de polarização, observa-se um filme sobre a superfície metálica, que se torna mais evidente quanto maior o período de incubação das bactérias, embora as curvas de polarização não apresentem um comportamento muito diferenciado depois do período de 24 horas após a inoculação, e a formação deste filme não induz à uma possível condição protetora, porque em nenhum ensaio se obteve correntes passivas. Um outro fato que se deve atentar é que devido as reações metabólicas realizadas pelas bactérias, é de se esperar que em sistemas que continham microrganismos, com um tempo maior de crescimento, houvesse também uma quantidade maior de material extrapoli-sacarídeo, e que o acúmulo deste material também interfira nas reações eletroquímicas. Haja visto o aumento da reação anódica também verificado nas curvas de polarização em presença de produtos metabólicos.

Um comportamento similar em relação a corrosão de metais foi observado por White et al<sup>50</sup> que através de uma técnica não destrutiva para analisar biofilme na superfície de metais, descreve

uma acelerada corrosão do aço inoxidável 304 em água de mar artificial por bactérias *Pseudomonad*, atribuindo-a este fato a distribuição não homogênea de microrganismos e seus exopolímeros na superfície do metal. Após 5 dias de incubação a *Ps. Atlantida* aumenta a densidade da corrente de corrosão de  $96 \text{ nA/cm}^2$  para  $264 \text{ nA/cm}^2$ , e decresce o potencial de corrosão de  $-158 \text{ mV}$  para  $-213 \text{ mV}$ .

Num estudo desenvolvido por Gardiazabal et al.<sup>51</sup>, que abordaram a corrosão do aço 1020 em extrato de solo, na presença de bactérias aeróbicas provenientes do mesmo e na presença de *Siderocapsa sp.*, informa que depois de um período de tempo de 138 horas de incubação, a curva de polarização do aço apresenta uma grande zona ativa com uma passivação incompleta, e uma pequena zona passiva com uma posterior aparição de pites. Com um tempo maior de incubação (210 horas) a zona de dissolução ativa aumenta e praticamente desaparece a zona passiva, apresentando correntes muito altas, e os pites aparecem em potencias mais ativos. O referido autor cita ainda que a polarização tem como consequência a não estabilização da película no sistema microbiológico, e que no final do processo se obtém metal em meio mais agressivo do que a solução inoculada original, e não havendo uma película superficial homogênea este meio com microrganismos é mais agressivo que o sistema sem microrganismos; resultados semelhantes foram também obtidos no desenvolvimento deste trabalho.

Embora em alguns trabalhos se tenha noticiado que em presença de microrganismos a reação de corrosão seja facilitada, aumentando a agressividade do meio, Beech<sup>52</sup>, por outro lado, relata que trabalhando com aço inoxidável e de baixo carbono e com dois

tipos de microrganismos, *P. fluorescens* e BRS em meio Postgate C, os resultados obtidos com culturas de *P. fluorescens* não apresentam um indicativo de pites, comprovado em fotos de microscopia eletrônica, diferenciando-se assim dos resultados obtidos em culturas puras de BRS. Cita ainda que este efeito protetor devido a presença de biofilme é comentado por outros pesquisadores. Não obstante, deve-se salientar que estes resultados referentes ao "efeito protetor" do filme formado por bactérias, não foi observado nos experimentos realizados neste trabalho em soluções de água do mar sintética diluída a 1,5%. Talvez possam ocorrer em meios que propiciem o crescimento do biofilme, de tal modo que impeça a difusão de íons ferro para a solução, agindo como uma barreira para a dissolução do metal. Acrescentamos que devido a heterogeneidade e complexidade deste filme, corrosão do tipo pite pode existir abaixo desta formação. Dependendo das condições experimentais, poderá haver diferenças na formação do biofilme, que implicará na forma de corrosão observada. Faço comentado na discussão dos resultados referentes aos ensaios realizados em água do mar diluída a 10% quando se usou uma elevada concentração de bactérias.

4.3.2. Curvas de polarização potencioestática em água do mar sintética diluída a 1,5%, com hexametáfosfato de sódio.

#### 4.3.2.a Sem a presença de bactérias

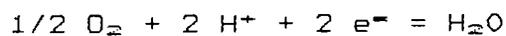
Nas curvas com hexametáfosfato de sódio, sem a presença de bactérias observou-se que este inibidor tem um comportamento catódico. Nota-se um abaixamento do potencial de corrosão do aço a medida que se aumentou a concentração do inibidor, o que vem a reforçar a idéia de que a eficiência deste inibidor depende da concentração usada<sup>48</sup>. Nos ensaios potencioestáticos, observou-se a diminuição da reação catódica.

Nos ensaios realizados a partir da concentração de 2000 ppm, figuras (57) (58), verificou-se uma tendência a passivação após uma densidade de corrente bastante elevada, da ordem de mA/cm<sup>2</sup>, o que sugere que o hexametáfosfato de sódio pode formar uma espécie química precipitada sobre a superfície metálica. Nestes ensaios não se atingiu uma zona de passivação propriamente dita com correntes baixas. Provavelmente isto tenha ocorrido pela quantidade de íons cloreto e de outros ânions agressivos presentes na solução.

Segundo Pryor e Cohen <sup>53</sup> que estudaram o mecanismo de inibição do ferro em soluções de ortofosfato de sódio, na presença e ausência de oxigênio, após a realização de vários testes incluindo curvas de polarização e acompanhamento do potencial, os autores sugeriram, de acordo com os resultados obtidos, que o oxigênio dissolvido na solução é primariamente responsável pela inibição, para este tipo de inibidor não oxidante. Segundo os autores, o oxigênio é primeiramente adsorvido na superfície do ferro e toma parte em reações heterogêneas com os íons de ferro da superfície, resultando na formação de um fino filme de (gama)

$\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Isto não quer dizer que o fosfato férrico hidratado, também detectado no filme passivo, não contribua para a inibição, mas somente ele não poderia evitar a corrosão.

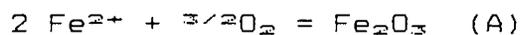
A reação heterogênea que leva a formação de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  pode, contudo, ser considerada como uma reação eletroquímica. A reação catódica é a evolução do hidrogênio despolarizado pela reação do oxigênio dissolvido na solução, de acordo com as equações:



Assim o oxigênio teria um papel duplo, atuando não somente como um inibidor, mas também como um despolarizador da reação catódica de uma reação eletroquímica alternativa.

Segundo os autores, o filme na região passiva corresponde ao  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  e contém algum fosfato de sódio da solução. O

$\text{Fe}_2\text{O}_3$  pode ser formado por reações heterogêneas, similar a oxidação do ar



ou pela reação eletroquímica:



Assumindo-se que a solução seja completamente desarejada a reação (A) não ocorre, e assim a produção de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  deve ocorrer completamente pela reação (B). Isto poderia explicar porque em soluções desarejadas o filme passivo é mais fino que em soluções arejadas.

Neste trabalho não se pretendeu identificar a composição do filme formado sobre a superfície metálica, entretanto, em outros trabalhos encontrados na literatura, esta composição foi definida

através de diversas técnicas. Pode-se citar o trabalho realizado por Smart et al.<sup>54</sup> que estudaram a cinética de repassivação e corrosão sob tensão do aço carbono em soluções 1 N de fosfato ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), no qual realizaram curvas de polarização em meios arejados e desarejados, iniciando em  $-1000 \text{ mV}_{(\text{ECS})}$ , nas quais o potencial de corrosão do aço situou-se em torno de  $-700 \text{ mV}_{(\text{ECS})}$ . Neste meio, foi observada uma passivação até  $-200 \text{ mV}_{(\text{ECS})}$ . Os produtos de corrosão foram identificados através de análises de difração de raio x. Nas soluções arejadas foi detectado um produto de corrosão branco amorfo, identificado como  $\text{FePO}_4$ , e a superfície do filme consiste principalmente de  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ . Em soluções desarejadas o produto de corrosão  $\text{FePO}_4$  só é formado depois da admissão de oxigênio, e segundo os autores a presença de oxigênio é importante para a qualidade protetora do filme. A partir destas observações os autores propuseram o seguinte mecanismo: em soluções arejadas o óxido de ferro formado com o oxigênio dissolvido é capaz de impedir a porosidade do filme de fosfato. Em soluções desarejadas o óxido de ferro formado não pode-se formar por reação com o oxigênio dissolvido e impedir as heterogeneidades do filme de fosfato, e conseqüentemente a atividade corrosiva é maior. Este argumento tem sido proposto para explicar o princípio de operação de inibidores não oxidantes, que requerem oxigênio dissolvido.

Vale a pena salientar que durante a execução deste trabalho foi detectado sobre a superfície do aço, após a realização das curvas de polarização um filme branco, de características semelhantes ao mencionado no trabalho citado por Smart et al.<sup>54</sup>.

#### 4.3.2.b Na presença de bactérias

Nas curvas de polarização potencioestática com o hexametáfosfato de sódio e bactérias, observou-se que nos ensaios realizados logo após a inoculação, figura (73), o comportamento foi bastante similar aos resultados obtidos em meios abióticos, aparecendo inclusive, o segundo pico anódico.

Nos ensaios realizados logo após colocar o inóculo, figura (73) com bactérias, como também os realizadas depois de 24 horas, figura (74), nota-se que a reação catódica é quase inexistente com uma zona de corrente limite pouco definida, em torno de  $20 \text{ uA/cm}^2$ , apresentando um potencial de corrosão de  $-850 \text{ mV}_{(ECS)}$ . Em torno de  $-600 \text{ mV}_{(ECS)}$ , aparece um pico anódico que se mantém até em torno de  $-100 \text{ mV}$  apresentando correntes em torno de 100 a 500  $\text{uA}$ , a partir daí ocorre um aumento contínuo da corrente. Após 48 horas de incubação do inóculo, vide figura (75), as curvas de polarização apresentam uma zona de corrente limite pouco definida, situando-se em torno de  $20 \text{ uA/cm}^2$ . A reação anódica a partir das 48 horas de inoculação das bactérias, sofre uma significativa mudança, apresentando um contínuo aumento de corrente em valores de potenciais baixos, em torno de  $-800 \text{ mV}_{(ECS)}$ . As curvas obtidas nos dias subsequentes mantêm esta mesma característica. Vale a pena lembrar que resultados semelhantes a estes foram obtidos nos ensaios realizados neste mesmo meio sem a presença de hexametáfosfato de sódio, com 48 horas de inoculação das bactérias.

Uma das possibilidades para explicar este comportamento, é relacionar ao fato de que as bactérias utilizadas neste estudo

são aeróbicas, e por isso a concentração de oxigênio na solução, com o passar do tempo e do desenvolvimento das bactérias, tem a tendência a diminuir.

Este fato influenciaria na formação do filme de  $Fe_2O_3$ , devido as soluções com um período maior de incubação das bactérias apresentarem uma baixa concentração de oxigênio dissolvido. Sem a formação deste primeiro filme protetor, o filme de fosfato, que é poroso<sup>54</sup> não cumpriria sua finalidade de reforçar o filme de gama  $Fe_2O_3$ , para uma proteção eficaz do material, e por isso aconteceria um aumento da corrente em potenciais baixos, sem a possibilidade de se observar o segundo pico, o qual se observava nas soluções com hexametáfosfato de sódio sem bactérias.

Videla<sup>55</sup> cita que a importância das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme pode estar ligada ao crescimento microbiano e que se o consumo de oxigênio se a atividade da bactéria é alta pode até mesmo inibir o crescimento de fungos, em meios como água do mar.

Aliado a este fato, sabe-se quando o corpo de prova está em contato com uma solução com bactérias, inicia-se a formação do biofilme, primeiramente pela aderência das bactérias. Isto, como foi comentado anteriormente, deve influir na estabilidade e formação de filmes protetores sobre a superfície do metal.

Outro fator também relacionado a existência deste filme biológico, é que devido a sua própria formação, pode restringir o acesso do oxigênio à superfície do metal, porquanto ofereceria uma barreira a ser superada pelo oxigênio, fato que tornaria mais

difícil as reações para a formação do filme de hexametáfosfato de sódio.

Nas curvas de polarização realizadas em solução de 1,5% de água do mar diluída sintética adicionadas de 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio, na presença e ausência de bactérias, observou-se que o potencial de corrosão do aço situou-se em valores próximos (em torno de  $-800 \text{ mV}_{(ECS)}$ ). Valores próximos a estes também foram obtidos nas soluções com bactérias 48 horas após colocado o inóculo, figura(68), e sem o hexametáfosfato de sódio. Supondo-se que nas soluções com bactérias, a concentração de oxigênio é menor que nas soluções sem bactérias, o comportamento observado nos ensaios poderia indicar que a reação catódica mais importante não é a de redução de oxigênio, porquanto não se nota diferenças significantes nos valores obtidos de potencial. Ainda devido ao potencial de corrosão do aço baixar nestes sistemas, não pode ser atribuído somente a adição do hexametáfosfato de sódio, como comentamos no item 4.2.2.a.

Numa série de curvas de polarização realizadas em água do mar 1,5 %, com bactérias e 2000 ppm de hexametáfosfato de sódio, figura (80) a (85), ocorreu um comportamento diferenciado, mostrando a existência de três potenciais de corrente nula. Uma das causas possíveis para este comportamento poderia ser um pico de corrente na curva anódica real encoberto pela reação catódica. Embora este comportamento não tenha sido reproduzível em outros ensaios, mas por se tratar de um meio biótico, poderia por alguma razão desconhecida ter ocorrido um crescimento maior da população

bacteriana, e assim ter interferido sobremaneira nas reações eletroquímicas ocorrendo este tipo de comportamento.

#### 4.3.3 Curvas de polarização potencioestática realizadas com produtos metabólicos

Assim como a composição da solução pode afetar o processo de corrosão do aço-carbono, as bactérias podem alterar a composição do eletrólito, por conversão de cátions ou ânions para dentro do material celular, ou através de reações metabólicas produzindo como produto final ácidos ou álcoois<sup>25</sup>.

Em nosso estudo, as curvas de polarização realizadas na presença de bactérias, mostraram algumas mudanças no comportamento eletroquímico do aço, provavelmente pela aderência de células à superfície metálica iniciando a formação do biofilme que inclui os produtos metabólicos, resultantes das reações bioquímicas realizadas pelos microrganismos.

A fim de verificar a influência dos produtos metabólicos (que passaram para a solução), procedeu-se a filtração das bactérias, depois de alguns dias de crescimento. Observou-se, através da realização de ensaios eletroquímicos, figuras (86) a (88), que estes sistemas apresentavam um comportamento agressivo em relação ao aço em estudo.

Alguns trabalhos citados na literatura se reportam à esta característica dos microrganismos de modificarem o meio, entre eles Videla<sup>25</sup> cita que *Ps aeruginosa* pode acidificar o meio, provavelmente pela produção de ácidos orgânicos, assim aumentando o processo corrosivo.

White<sup>50</sup>, também cita que *Ps. Atlantica* forma grande quantidade de ácido urânico contida em seus exopolímeros quando se encontra em meios nutricionalmente pobres, e que somente estes polímeros purificados sobre a superfície do aço inoxidável podem aumentar a densidade de corrente, sendo capazes de facilitar a corrosão mesmo na ausência de células viáveis.

Franklin<sup>25</sup>, por outro lado, não detectou diferenças significativas quando realizou testes utilizando o meio reacional em que as bactérias haviam sido inoculadas, pois comenta que os resultados de seus experimentos obtidos na ausência de bactérias são muito semelhantes aos obtidos em meio estéril, e que as mudanças na solução não parecem ser significantes para o ataque por pites com respeito ao meio estéril. Fato que pode ter ocorrido porque estes experimentos foram realizados após somente 24 horas de crescimento das bactérias.

Para a realização dos ensaios deste trabalho, as bactérias cresceram nos meios durante 3,5,6, e 13 dias e, como se pode observar através das curvas de polarização, obteve-se resultados que caracterizam um meio mais agressivo que o respectivo estéril. A reação anódica apresenta correntes mais altas para um dado potencial, quando comparada aos meios estéreis. Após a realização dos ensaios, os corpos de prova apresentavam pites. Deste modo, pode-se observar que os produtos metabólicos devem influenciar aumentando a agressividade do meio, provavelmente pela produção de ácidos orgânicos<sup>55,56</sup>. Acrescentando-se o hexametáfosfato de sódio nos meios em que haviam crescido as bactérias por 13 dias, figuras (89) (90), nota-se que há também o abaixamento do potencial de

corrosão do aço, e um comportamento bastante semelhante aos descritos sem a presença de bactérias. Porém, em todos os experimentos observou-se o aparecimento de pites, demonstrando que nestes meios não ocorreu com perfeição, a formação do filme protetor de fosfato sobre a superfície metálica.

A formação do biofilme na superfície metálica é um dos fatores que pode alterar o comportamento do aço quando da presença de bactérias, podendo originar áreas anódicas e catódicas na superfície do metal<sup>54</sup>. Os resultados dos ensaios gravimétricos evidenciaram a importância do biofilme na corrosão influenciada por microrganismos como pode ser observado nos resultados de perda de massa. Nos testes em água do mar sintética diluída e bactérias, que em princípio, mostrou-se menos propenso a favorecer o desenvolvimento do biofilme (em relação a meios menos diluídos) com um tempo maior de exposição dos corpos de prova à solução contaminada (19 dias), as bactérias desenvolveram um biofilme na superfície do metal que impediu a corrosão generalizada do metal, como a que aconteceu em meios sem a presença de bactérias. Estes resultados vem a confirmar os dados de literatura onde a bactéria estudada é classificada como formadora de lodo<sup>10,25,30,31</sup>. Nos ensaios com hexametáfosfato de sódio juntamente com bactérias, provavelmente tenha ocorrido uma associação entre o biofilme e o filme formado pelo inibidor e com isto pode ter ocorrido uma menor perda de massa nestes sistemas em relação aos sistemas somente com o inibidor. Embora o meio usado seja agressivo para o aço estudado, os resultados dos ensaios de perda de massa vem ratificar os resultados dos ensaios eletroquímicos, mostrando que este inibidor

contribui para a proteção do aço, diminuindo a taxa de dissolução do metal, pela formação de um filme, como se pode verificar comparando os resultados obtidos com o acréscimo de 2000 ppm de hexametafosfato de sódio em relaçaõ ao meio apenas com água do mar sintética diluída, nos quais a corrosão foi diminuída em 75%.

Resultados obtidos em ensaios de perda de massa relatados por Gaylard e Johnston<sup>57</sup> que estudaram uma combinaçaõ de três microrganismos (*Desulfovibrio vulgaris*, *Vibrio anguillarum* e X12, provavelmente *Citrobacter*) em meio Postgate B, mostraram que pode haver um comportamento diferenciado em relaçaõ as taxas de corrosão de amostras de aço-carbono. Segundo os resultados obtidos nos experimentos, os autores sugerem que o *V. anguillarum* protegeu o metal da corrosão, devido a apresentar os menores valores de perda de massa em relaçaõ as outras culturas. Este resultado foi atribuído a formaçaõ de um revestimento fortemente aderente por este microrganismo na superfície do aço.

Embora neste trabalho também tenham sido encontrados resultados semelhantes referentes a menor perda de massa na presença de bactérias, deve-se atentar ao fato que o biofilme formado pela *Pseudomonas aeruginosa* neste meio, apresentou-se de maneira descontínua, figura (37), o que pode induzir à corrosão localizada, como foi observado nas bordas do corpo de prova onde notou-se a incidência de pites.

#### 4.4 Discussão geral

Através dos resultados obtidos durante a execução deste trabalho, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* provavelmente estão associadas ao processo de corrosão do aço estudado primeiramente pela formação do biofilme. A formação deste filme biológico está diretamente relacionada com o meio utilizado (disponibilidade nutricional) e o número inicial de células do inóculo.

Nos ensaios realizados em água do mar sintética diluída a 10% o biofilme formado sobre a superfície do aço era mais espesso do que na diluição de 1,5%. Através de fotos de microscopia eletrônica, entretanto, pode-se constatar que nestes dois meios ocorreu a aderência de células bacterianas na superfície metálica, embora com diferente intensidade.

As curvas de polarização mostraram comportamentos diferenciados quando realizadas na presença dos microrganismos em relação aos meios estéreis, principalmente após um período maior de incubação dos microrganismos, nas quais a reação catódica tornou-se menor e a reação anódica apresentava valores de densidade de correntes altos, indicando que nestes sistemas havia aumentado a agressividade do meio.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de acompanhamento de potencial versus tempo e curvas de polarização potencioestática, verificou-se que o hexametáfosfato de sódio tem uma característica preponderantemente catódica. A partir dos resultados destes ensaios, adicionou-se a melhor concentração estudada deste inibidora nos sistemas com bactérias. Observou-se que não houve interferência negativa no crescimento das bactérias, porém quanto aos ensaios eletroquímicos, observou-se que com tempo

maior de incubação das bactérias a reação anódica tornava-se mais acentuada, diferenciando-se dos resultados em meios estéreis nos quais notava-se a tendência a formação de um segundo pico anódico.

O filme de fosfato que se forma sobre a superfície metálica de alguma forma, sofre a interferência das bactérias que estão presentes no meio, seja pelo consumo de oxigênio, a aderência de células bacterianas induzindo a formação de células de aeração diferencial, pela produção de material extrapoliissacarídeo ou produtos metabólicos agressivos.

Realizando-se experimentos com estes produtos metabólicos tentou-se avaliar este parâmetro independentemente da presença das células bacterianas, notou-se da mesma forma que nos meios estéreis, o aparecimento de pites. Entretanto, as curvas obtidas nestes meios mostraram que nestas condições o meio se torna mais agressivo, com correntes altas a partir do potencial de corrosão. Quando foi adicionado o hexametáfosfato de sódio antes da realização do ensaios nestes meios, também não se observou um comportamento que indicasse a formação de um filme protetor estável. Em todos os ensaios observou-se a incidência de pites no corpo de prova.

Os ensaios de perda de massa, mostraram que ocorreu uma aparente proteção do aço em sistemas com bactérias. Este fato deve-se à formação e desenvolvimento do biofilme que impediu a dissolução generalizada do metal, como ocorreu em sistemas em água do mar sintética diluída, reduzindo-a a um ataque localizado. Os resultados mostram também que o hexametáfosfato de sódio contribui

para a proteção do aço estudado, e que este efeito é maior na presença de bactérias.

Provavelmente mais de um mecanismo pode atuar na corrosão induzida por microrganismos. Neste caso em particular, poderíamos propor:

- aeração diferencial, provocada pela aderência aleatória de células microbianas na superfície metálica, que também podem interferir na formação do filme protetor do inibidor;

- . Provável produção de ácidos orgânicos provenientes das reações metabólicas realizadas pelas bactérias, aumentando assim a agressividade do meio, principalmente próximo a superfície do aço.

## CONCLUSÕES

1 O hexametáfosfato de sódio inibe significativamente a corrosão do aço ABNT 1006, em soluções de água do mar sintética diluída a 1,5%, comportando-se como um inibidor catódico.

2 A inibição da corrosão depende do potencial atingido, que é determinado pela concentração utilizada.

3 As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* aderem-se sobre a superfície do aço-carbono em água do mar sintética diluída em poucos minutos.

4 As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* desenvolvem um biofilme na superfície do aço, que induz a:

- mudanças na forma de corrosão, em meios estéreis ocorreu corrosão generalizada e em sistemas com bactérias observou-se corrosão tipo pite.

- elevação do potencial de corrosão do aço de  $-600 \text{ mV}_{(ECS)}$  para  $-200 \text{ mV}_{(ECS)}$  em soluções de água do mar sintética diluída a 10% e em meios de cultura.

- menor perda de massa em soluções de água do mar sintética diluída a 1,5%.

5 As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* não impedem a curto prazo a atuação do hexametáfosfato de sódio como inibidor de corrosão em

água do mar sintética diluída, porém após um período de tempo maior interferem na sua ação inibidora, pois o potencial de corrosão das soluções não se mantinha em valores constantes.

6 O hexametáfosfato de sódio não inibe o crescimento das bactérias neste estudo, nas soluções estudadas estes microrganismos aderem-se também sobre o filme de fosfato formado sobre a superfície do aço.

7 Os produtos metabólicos de *Pseudomonas aeruginosa* aumentam a corrosividade da água do mar sintética diluída em relação ao aço.

## BIBLIOGRAFIA

- 01-IVERSON, W.P. Microbial corrosion **Advances In Applied Microbiology**, V.32, p.1-36, 1987.
- 02-TILLER, A.K., Aspectos of microbial corrosion. In: PARKINS, R.N. **Corrosion Process**. London, 1982. Cap 3, p. 115-119.
- 03-VIDELA , H.A., **Corrosão Microbiológica**. Sao Paulo: Edgard Blücher, 1981.V 4.65p.
- 04-DUDRIDGE, J.E.; PRITCHARD, A.M. Factors affecting the adhesion of bacteria to surfaces. In: **Microbial Corrosion** London: The Metals Society,1983. p. 28-35.
- 05-SANDERS, P.F. , MAXWELL, S. Microfouling, macrofouling and corrosion of metal test specimens in seawater. In: **Microbial Corrosion** London: The Metals society, 1983. p. 74-83.
- 06-CHARACKLIS, W. , MARSHALL, K.C. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: **Biofilms**. Montana: CHARACKLIS, W., MARSHALL, K.C. ,1989. Cap I.p.3-15.
- 07-CHRISTENSEN, B.E. , CHARACKLIS, W.G. . Physical and chemical Properties of Biofilms. In: **Biofilms**. Montana :CHARACKLIS, W. MARSHALL, K.C. ,1989 Cap.4. p.93 -130.
- 08-FLETCHER, M. The Physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. **Advances in Microbial Physiology**. V. 32,p.53-85, 1991.
- 09-PETHICA, B.A. Microbial and cell adhesion. In: **Microbial Adhesion to Surfaces**. Chinchester:C.W.Berkley et al., 1980. p. 19-45.
- 10-HAMILTON, W.A. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. **Ann. Rev. Microbiol.**, Vol.39, p.195-217, 1985.
- 11-COSTERTON, J.W. , GEESEY, G.G. The microbial ecology of surface colonization and consequent corrosion. In: **Biologically Induced Corrosion**. Houston: Dexter, S.C. 1986. p.223-232.
- 12-MALDONADO, G.G. **Química de Superfícies e Colóides**. Indústrias Gessy-Lever Ltda, São Paulo, SP, 1982.
- 13-RUTTER, P.R., VINCENT, B. The adhesion of microorganisms to surfaces: physico-chemical aspects. In: **Microbial Adhesion to Surfaces**. Chichester, 1980. p. 79-82.

- 14-GANTZER, C.J. ,et al. Exchange process at the fluid biofilm interface. In: **Structure and Function of Biofilms**. Characklis, W.G., Wilderer, P.A., 1989. p. 73-
- 15-FLETCHER, M. and LOEB, G.I. Influence of substratum characteristic on the attachment of a marine *Pseudomonas* to solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 37, p.67-72, 1979.
- 16-FLETCHER, M. The effect of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 37, p.1-6, 1979.
- 17-FLETCHER, M. , LATHAM, M.J. , LYNCH, J.M. , RUTTER, P.R. The characteristics of interfaces and their role in microbial attachment. IN: **Microbial adhesion to surfaces**. Chinchester: Berkeley, J.M. et al. 1980. p.67-78.
- 18-STANLEY, P. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **Canadian Journal of Microbiology**, Vol.29, p.1493-1499, 1983.
- 19-WRANGSTADH, M. , CONWAY, P.L. , KJELLEBERG, S. The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. **Archives of Microbiology**. p.220-227, 1986.
- 20-GENTIL, V. Corrosão. In: **Corrosão**. Guanabara, 1982.Cap.1. p.1-7.
- 21-VIDELA, H. A Corrosion Microbiologica La PLata: Universidad Nacional de La Plata. [198\_] 22p.
- 22-MANSFELD, F. , LITTLE, B. A technical review of electrochemical techniques applied to microbiologically influenced corrosion. **Corrosion Science**. Vol 32, No 3, p.247-272, 1991.
- 23-DOWLING, N.J.F. , FRANKLIN, M. , WHITE, D.C. , LEE, C.H. LUNDIN, C. The effect of microbiologically influenced corrosion on stainless steel weldments in artificial seawater. **Corrosion**, paper nº 187, 1989.
- 24-MOOSAVI, A.N. , DAWSON, J.L. and KING, R.A. The effect of sulphate-reducing bacteria on the corrosion of reinforced concrete. In: **Biologically Induced Corrosion**. Houston: DEXTER, S. C. , 1986. p.292 - 308.
- 25-FRANKLIN, M.J. , WHITE, D.C. and ISAACS, H.S. Pitting corrosion by bacteria on carbon steel, determined by the scanning vibrating electrode technique. **Corrosion Science**. Vol. 32, No 9, p.945-952, 1991.

- 26-SEQUEIRA, C.A.C. Electrochemical techniques for studying microbial corrosion. In: **Microbial Corrosion-1**. SEQUEIRA, C.A.C., TILLER, A.K., 1988. p.99-118.
- 27-DEAN Jr, S.W. , DERBY, R. , VON DEM BUSCHE, G.T. Inhibitors types. **Materials Performance**. Vol. 20 No 12, p.47-51, 1981.
- 28-BUTTNER, G. , ISON, H.C.K. Corrosion and its prevention in waters London: Leonard Hill, 1966. 281p.
- 29-SZKLARSKA-SMIALOWSKA, Z. , MANKOWSKI, J. In: **Corrosion Inhibitors**. McGraw-Hill, 1991.327 p
- 30-BUTTNER, G. **Proc. Third Eur. Symp. Corr. Inh.**, Univ. Ferrara. p. 763, 1971.
- 31-WEST, H. Corrosion Prevention. In: **Corrosion**. Van Nostrand Reinhold, 1971. Cap.6, p.138-160.
- 32-COHEN, M. The breakdown and repair of inhibitive film in neutral solutions. **Corrosion**, Vol.32, p.461-465, 1976.
- 33-ROSENFELD, I.L. **Corrosion inhibitors** McGraw Hill, 1981, p. 175-181.
- 34-LEVANDOWSKY, Z. , LEE, C. , CHARACKLIS, W. , LITTLE, B. **Corrosion Science**, Vol. 45, p.92-98, 1989.
- 35-BERGEY'S **Manual of determinative bacteriology** 8<sup>a</sup> Ed. p. 217, 221-222.
- 36-GUIRARD, B.M. and SNELL, E.E. Biochemical factors in growth. In: **Manual of methods for bacteriology**. GERHARDT., P. et al. 1981. p. 79 - 111.
- 37-MOTA, T.M.B. , **Práticas de Bacteriologia Geral** 2.ed 1977, 57 p.
- 38-Método para preparação de amostras enviado pela Aquatec Química S.A., por correspondência.
- 39-VIDELA, H.A. Metal dissolution/redox in biofilms In: **Structure and function de biofilms**. Characklis, W.G. and Wilderer, P.A.(eds), 1989. p.301-320.
- 40-GAYLARD, C.C., JOHNSTON, J.M. The importance of microbial adhesion in anaerobic metal corrosion. In: **Microbial adhesion to surfaces**. Chinchester: BERKELEY, R.C.W., 1980, p.511-513.
- 41-DEXTER, S.C. Discussion on "Effect of seawater biofilms on corrosion potential and oxigen reduction of stainless steel. **Corrosion**. Vol 45, No 10, p.786-790, 1989.
- 42-MOLLICA, A. , et al. Cathodic Performance of stainless steels

in natural seawater as a function of microorganism settlement and temperature. *Corrosion Science*, Vol.45, No 1, p. 48-56, 1989.

- 43-SCOTTO, V. , CINTIO, R. Di, MARCENARO, G. The influence of marine aerobic microbial film on stainless steel corrosion behavior. *Corrosion Science*, Vol.25. No 3, p.185-194, 1985.
- 44-DEXTER, S.C. , LIN, S.H. Effect of marine bacteria on calcareous deposition. *Materials Performance*, Vol.30. No 4, p.16-21, 1991.
- 45-TATNALL, R.E. Fundamentals of bacteria induced corrosion. *Materials Performance*, Vol 12. No 9, p.32-39, 1981.
- 46-RINGAS, C. , ROBINSON, F.P.A. Corrosion of stainless steel by sulfate-reducing bacteria - Total immersion test results. *Corrosion*, Vol 44. No 9. p.671-678, 1988.
- 47-POURBAIX, M. *Atlas d'équilibres eletrochimiques*. Paris: Gautier-Villars, 1963. p.312.
- 48-CARTER, D.A. , NATHAN, C.C. A polarization study of cooling water corrosion inhibitors. In: *Corrosion source book*. Metals Park, Ohio: ASM/NACE, 1985. p.83-88.
- 49-LITTLE, B. J. et al. Microbial corrosion In *Biofilms*. Montana: CHARACKLIS, W. , MARSHALL, K.C., 1989. Cap 16
- 50-WHITE, D.C. , et al. The role of extracellular polymers in microbial adhesion and corrosion. In: *Aquatec - Workshop on Biodeterioration*. Aquatec Química S.A., Sao Paulo, 1985, p.73-103.
- 51-GARDIAZABAL, J.I. , RIOS, R. , CAMPOS, Y.V. Corrosion de acero dulce por bacterias aerobicas. *Bol. Soc. Quim*. Vol 32, No 2, p.63-73, 1987.
- 52-BEECH, I.B. *Biofilms formation on metal surfaces*. Tese de doutorado. London. 1990.
- 53-PRYOR, M.J. , COHEN, M. The mechanism of the corrosion of iron by solutions of sodium orthophosphate. *J. Eletroch. Soc.*, Vol 98, p.263-272, 1951.
- 54-SMART, N.R. , SCOTT, P.M. , PROCTER, P.M. Repassivation kinetics and stress corrosion of mild steel in phosphate solutions. *Corrosion Science*, Vol 30, No 8/9, p.877-901, 1990.
- 55-VIDELA, H.A. Mechanisms of MIC. In: *Aquatec -Workshop on Biodeterioration*. Aquatec Química do Brasil S.A., 1985. p.43 - 63.

- 56-GAYLARD, C.C. Microbial corrosion of metals. **Environmental Engineering**, Vol 2, No 4, p.30-32, 1989.
- 57-GAYLARD, C.C. and JOHNSTON, J.M. Anaerobic metal corrosion in culture of bacteria from estuarine sediments. In: **Biologically induced corrosion** Houston: DEXTER, S. , C. , 1986. p.137-143.
- 58-OBUEKWE, C.O. et. all Corrosion of mild steel in cultures of ferric iron reducing bacterium isolated from crude oil, II mechanism of anodic depolarization **Corrosion-Nace** Vol 37, No 11, p 632-637, 1981.
- 59-DANTAS, E. **Tratamento de águas de refrigeração** Rio de Janeiro: José Olympio, 1988. 370p.

