

Hydrogen permeation study with Palladium in a sulfate-reducing bacteria culture

Matilde F. de Romero¹, Zoilabet Duque C.¹, Oladis T. de Rincón¹, Orlando Pérez¹, Ismenia Araujo² y Beltrán Briceño²

¹Centro de Estudios de Corrosión, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. E-mail: mferman@luz.ve/ zdc1268@hotmail.com. Telefax: 58-61-598784.

²Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigaciones del Agua, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Abstract

A *Desulfovibrio desulfuricans ssp. desulfuricans* culture was used to study the permeation of hydrogen, using a Devanatan and Stachurski cell type and a 1.0 mm-thick palladium sheet. The aim was to evaluate cathodic depolarization as a Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) action mechanism in Microbiologically Induced Corrosion (MIC). The permeation tests were run with and without cathodic polarization, using a sterile deaerated culture medium inoculated with 10% *D. desulfuricans* concentrated at 10^8 cel/ml. Bacteria growth was evaluated by the extinction dilution technique and biofilm formation on the Pd was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The results indicate bacterial growth in the order of 10^9 - 10^{10} cel/ml after 18 hours both in the polarized and non-polarized tests, indicating that *D. desulfuricans* developed regardless of the surface polarized as a source of H^0 , generating H_2S as a product of the sulfate's disassimilating activity. It was also determined that, without cathodic polarization, the conditions are not enough to reduce the H^+ generated by the H_2S dissociation (Pd is not susceptible to corrosion at this condition). On the other hand, cathodic polarization increased the permeation current, which was associated with the maximum enzymatic activity phase of the bacteria.

Key words: Hydrogen permeation cell, cathodic polarization, Sulfate Reducing Bacteria (SRB), Microbiological Induce Corrosion (MIC)

Estudio de permeación de Hidrógeno en Paladio expuesto en un cultivo de bacterias sulfato reductoras

Resumen

En este trabajo se estudió la permeación del hidrógeno proveniente de un cultivo de Bacterias Sulfato Reductoras-BSR (*Desulfovibrio desulfuricans ssp. desulfuricans*), utilizando para ello el tipo de celda de permeación diseñada por Devanatan y Stachurski y una lámina de Paladio (Pd) de 1,0 mm de espesor. Esto se hizo con la finalidad de evaluar la despolarización catódica como mecanismo de acción de las BSR en la Corrosión Inducida Microbiológicamente (MIC), utilizando un sustrato inerte como el Pd. Los ensayos de permeación se realizaron sin y con polarización catódica utilizando un medio de cultivo estéril deaerado e inoculado con 10% de *D. desulfuricans* a una concentración de 10^8 cel/ml. El crecimiento bacteriano se evaluó por la técnica de dilución por extinción, mientras que las características de la biopelícula formada sobre el Pd, se analizaron por Microscopía Electrónica de Barrido. Los resultados obtenidos indicaron crecimiento bacteriano en el orden de 10^9 - 10^{10} cel/ml a las 18 horas tanto en los ensayos sin polarización como en aquellos con polarización, lo cual refleja que la *D. desulfuricans* se desarrolla independientemente de una superficie polarizada como fuente de H^0 , generando H_2S como producto de la actividad de-

sasimilatoria del sulfato. También, se determinó que sin polarización catódica no existen las condiciones para que el H^+ , generado por la disociación del H_2S , se reduzca y permee. Mientras que aplicando polarización catódica se observó un aumento en la corriente de permeación, lo cual estuvo asociado a la fase de máxima actividad enzimática de la bacteria.

Palabras clave: Celda de permeación de hidrógeno, polarización catódica, Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), Corrosión Inducida Microbiológicamente (MIC).

Introducción

Las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) desempeñan un papel muy importante en la Corrosión Influenciada Microbiológicamente (MIC), ya que acelera y/o promueve el proceso electroquímico en cualquier ambiente donde se presenten condiciones favorables para el desarrollo de las mismas. Hoy en día se confrontan diversas teorías sobre el mecanismo por el cual las BSR corroen algunos materiales, siendo la más clásica la de despolarización catódica propuesta por Von Wolzogen Kühn y Van Der Vlugt [1, 2]. Esta teoría establece que las BSR utilizan el H^0 de una superficie metálica polarizada catódicamente para su respiración anaeróbica a través del proceso desasimilatorio del sulfato (reducción de sulfato a sulfuro como vía energética) y por consiguiente el aumento de la velocidad de corrosión del acero es por efecto de la despolarización. Esta y otras teorías, tales como la formación de una película poco adherente de sulfuro ferroso, catódica al metal base, que acelera la velocidad de corrosión y la acción directa de metabolitos agresivos como el H_2S , se encuentran actualmente en estudio. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la teoría de despolarización catódica, utilizando la técnica de permeación de hidrógeno de Devanathan y Stachurski [2], hasta ahora poco utilizada para medios de cultivos inoculados con BSR, una lámina inerte de Pd y la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans ssp. desulfuricans*. Las experiencias reportadas en la utilización de esta técnica y una membrana de paladio, han sido con las bacterias *Clostridium acetobutlicum* y con la *Desulfovibrio desulfuricans ssp. aestuarii*, encontrándose con el uso de esta última bacteria que no existe prácticamente producción neta de hidrógeno y que una capa gruesa de FeS formada sobre el paladio inhibió la permeación de hidrógeno cuando la solución fue saturada con 5% de gas hidrógeno [3, 4].

Desarrollo Experimental

Los ensayos de permeación de hidrógeno se desarrollaron por duplicado en una doble celda tipo Devanathan y Stachurski [2] siguiendo el montaje experimental de Ford y Michell [3, 4] (Figura 1), utilizando una lámina de Pd de 1,0 mm de espesor con un área de exposición de $3,14 \text{ cm}^2$, una solución de NaOH 0,1 N (pH: 12,5) en una celda y en la otra el medio de cultivo ATCC 1249: $MgSO_4$: 2,0 g; citrato de sodio: 5,0 g; $CaSO_4$: 1 g; NH_4Cl : 1 g; K_2HPO_4 : 2,5 g; lactato de sodio: 3,5 g; extracto de levadura: 1,0 g; agua destilada: 1,0 g; $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ al 5%: 2%; resarsurina al 0,2%: 0,1 g; ascorbato de sodio al 5%: 1% y tioglicolato de sodio al 5%: 1%; deaireado con Nitrógeno gas de alta pureza; pH: 7,2; T: $37^\circ C$, estéril o inoculado con la *D. desulfuricans ssp. desulfuricans* ATCC 7757. El inóculo correspondió al 10% del volumen de medio de cultivo a una concentración de 10^8 cel/ml .

Para la detección del hidrógeno permeado se aplicó un potencial de oxidación en los rangos de inmunidad del Pd (-0,3 V vs ECS) [2], con la finalidad de evitar interferencias de otras reacciones indeseables y oxidar los átomos de hidrógeno provenientes del medio de cultivo, registrando la

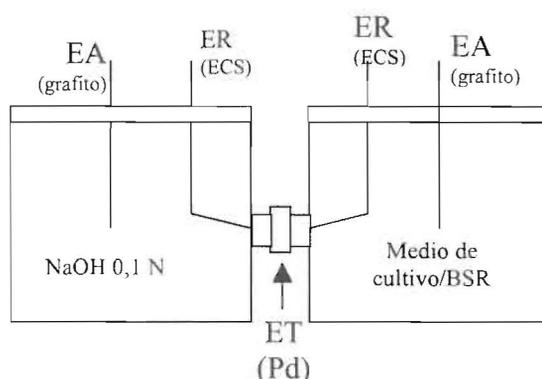


Figura 1. Doble celda electroquímica para evaluar permeación de hidrógeno.

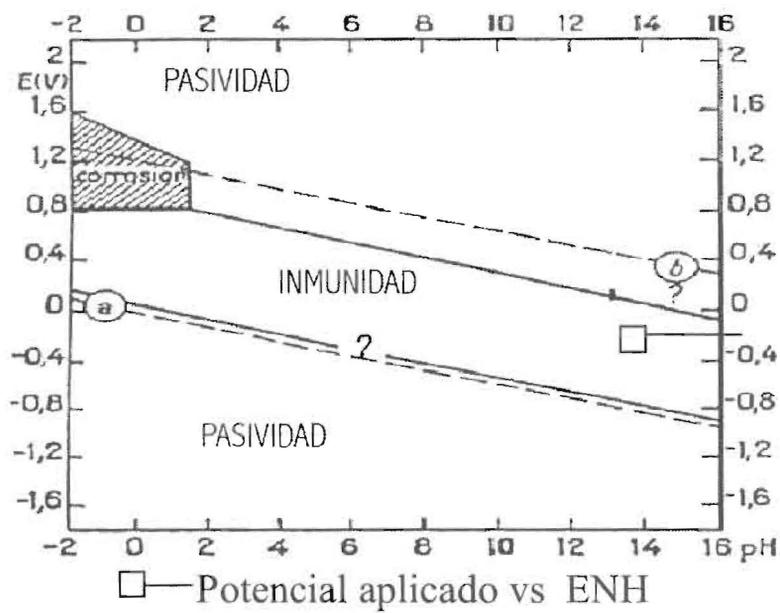


Figura 2. Diagrama de Pourbaix del Pd.

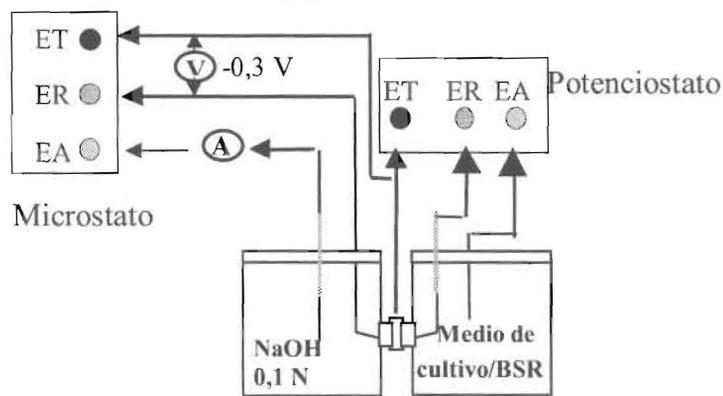


Figura 3. Celda de permeación con polarización catódica.

correspondiente corriente de oxidación o permeación (Figura 2).

La validación del ensayo experimental, se logró aplicando una polarización catódica potencioestática al Pd expuesto en el medio de cultivo estéril, desde $-0,5\text{ V}$ hasta $-1,8\text{ V}$ vs ECS con una velocidad de barrido de 50 mV cada 5 a 10 minutos; para lo cual se instaló el sistema electroquímico presentado en la Figura 3. Una vez demostrada esto, se desarrolló el ensayo de permeación sin polarización catódica (Figura 4); registrando las respuestas de corriente de permeación y el potencial del Pd expuesto al desarrollo bacteriano. Posteriormente, se realizó el ensayo de permeación con polarización catódica (Figura 3),

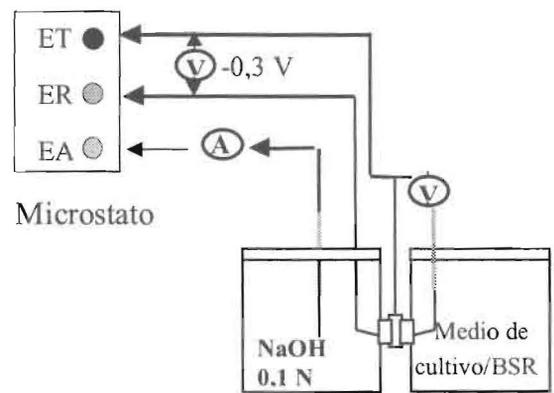


Figura 4. Celda de permeación sin polarización.

manteniendo fijo un potencial de 1000 mV vs ECS por 17 horas tanto en el medio de cultivo estéril como en el inoculado. Esto se hizo con la finalidad de establecer diferencias de permeación con y sin bacteria.

Luego de cada ensayo de permeación la lámina de Pd fue sumergida en etanol al 100% por 5 minutos dentro de un baño con ultrasonido, luego fue extraída, secada y expuesta a U.V por 1 minuto. Posteriormente, la lámina fue tratada en un sistema al vacío con temperaturas entre 250-300°C por 1 hora, para desorber físicamente el hidrógeno posiblemente acumulado en la matriz del

metal [5]. Antes de colocar nuevamente la lámina en la celda electroquímica, se preparó la superficie con lija 600 y se colocó en etanol al 100% por 5 minutos con ultrasonido.

El crecimiento poblacional de la *D. desulfuricans* en la celda electrolítica durante los ensayos sin y con polarización, se evaluó por la técnica de dilución por extinción [6]. Adicionalmente, en la celda electrolítica con polarización se cuantificó el desarrollo bacteriano por la técnica de placa vertida [6] y se caracterizó morfológicamente la *D. desulfuricans* utilizando Microscopía Electrónica de Barrido, para lo cual la biopelícula adherida al Pd se fijó primeramente con glutaraldehído y luego con tetróxido de osmio. Posteriormente la biopelícula se deshidrató con diferentes concentraciones de etanol-acetona y finalmente, se metalizó con oro a un espesor aproximado de 15 nm.

Tabla 1.

Contaje de la *D. desulfuricans* en la celda electrolítica con y sin polarización catódica

Tiempo (h)	Sin polarización (cel/ml)	Con polarización (cel/ml)
0	10^6-10^7	10^6-10^7
3	10^7-10^8	10^6-10^7
6	10^7-10^8	10^7-10^8
9	10^8-10^9	10^7-10^8
12	10^8-10^9	10^7-10^8
15	10^8-10^9	10^8-10^9
18	10^9-10^{10}	10^9-10^{10}
21	10^9-10^{10}	10^9-10^{10}
24	10^9-10^{10}	10^9-10^{10}

Resultados y Discusión

Antes de iniciar con la discusión de los ensayos de permeación es importante analizar el crecimiento de la *D. desulfuricans* en la celda electrolítica. Al respecto se observó un buen desarrollo bacteriano sin y con polarización catódica. El contaje bacteriano reportó un crecimiento en ordenes similares para ambos ensayos (Tabla 1), determinándose a las 18 h valores entre 10^9-10^{10} cel/ml.

La Figura 5 muestra un detalle de la biopelícula desarrollada sobre el Pd en uno de los

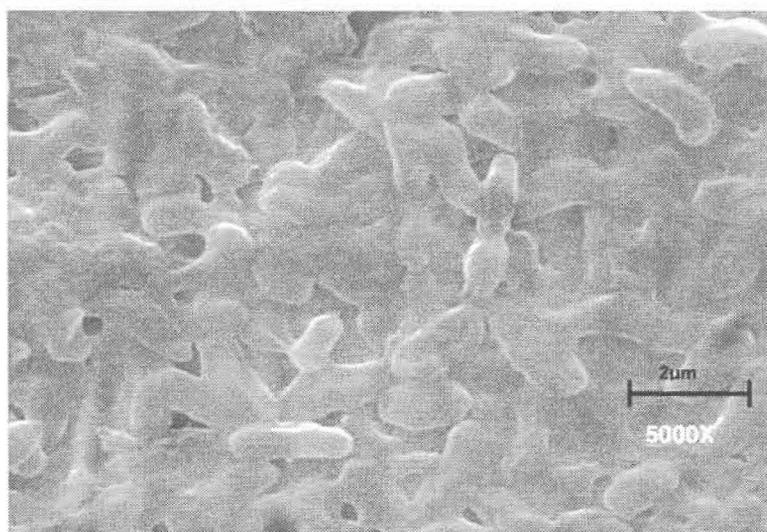


Figura 5. Biopelícula de *D. desulfuricans* sobre Pd.

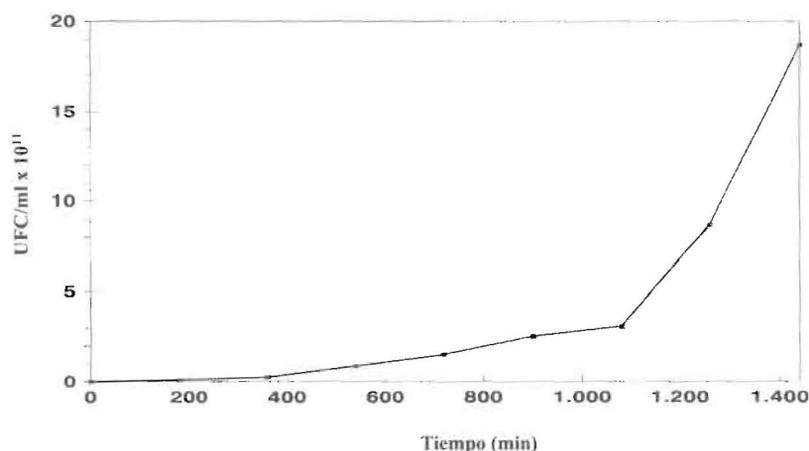


Figura 6. Crecimiento poblacional de la *D. desulfuricans* en la celda electrolítica con polarización catódica.

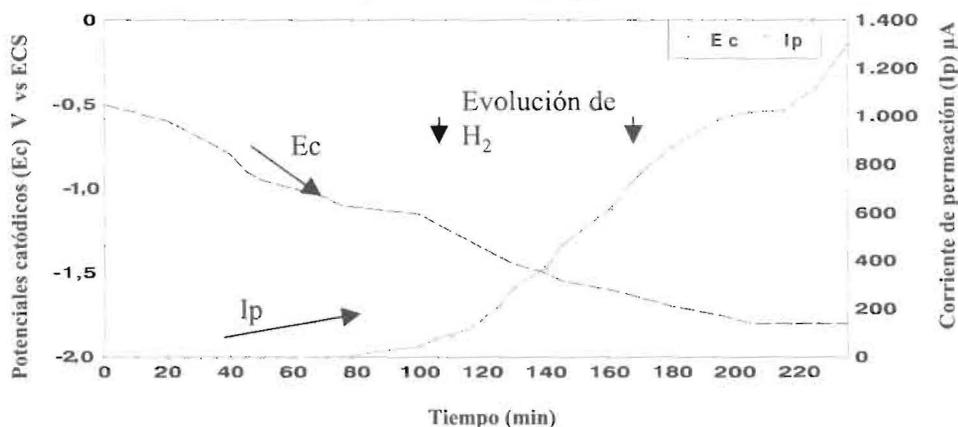


Figura 7. Corriente de permeación con polarización catódica hasta $-1,8$ V vs ECS en medio estéril.

ensayos de permeación sin polarización, observándose una alta densidad celular con la morfología típica del género utilizado (vibrios entre $1,0$ - $1,5$ μm) [6], mientras que la Figura 6 muestra la curva de crecimiento poblacional en uno de los ensayos con polarización, donde se observa una curva típica con su fase de adaptación hasta las 6 horas y luego la fase exponencial con un desarrollo máximo de 19×10^{11} UFC/ml a las 24 horas. Según estos resultados la bacteria *D. desulfuricans* se desarrolla independientemente de la polarización (Tabla 1), lo cual permite establecer que esta bacteria no necesita de superficies polarizadas catódicamente con H^0 para la desasimilación del sulfato (respiración anaeróbica) y que esto lo hace por encontrarse en un medio enriquecido con lactato, cuya fuente carbonada es oxidada en la pared celular de la bacteria en su proceso desasimilatorio generando hidrógeno atómico [4].

En todos los ensayos se observó en la celda inoculada el color característico del sulfuro ferroso (FeS), producto de la reacción de los sulfuros generados por las BSR con las sales ferrosas presentes en el medio de cultivo [6, 7].

En relación con los ensayos preliminares de permeación de hidrógeno con polarización catódica, éstos permitieron corroborar la efectividad de la técnica de permeación y del montaje experimental para evaluar si la BSR produce o no H^0 , ya que se confirmó que al existir H^0 en la interfase del metal con el medio de cultivo, éste permea (Figura 7). Con estos ensayos se determinó que en los primeros 80 minutos de polarización la membrana de paladio se satura de H^0 y a medida que continúa la polarización comienza a aumentar la corriente de permeación, alcanzándose valores de 1300 μA (414 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) a un potencial de $-1,8$ V vs ECS. Esta corriente de permeación tan alta en

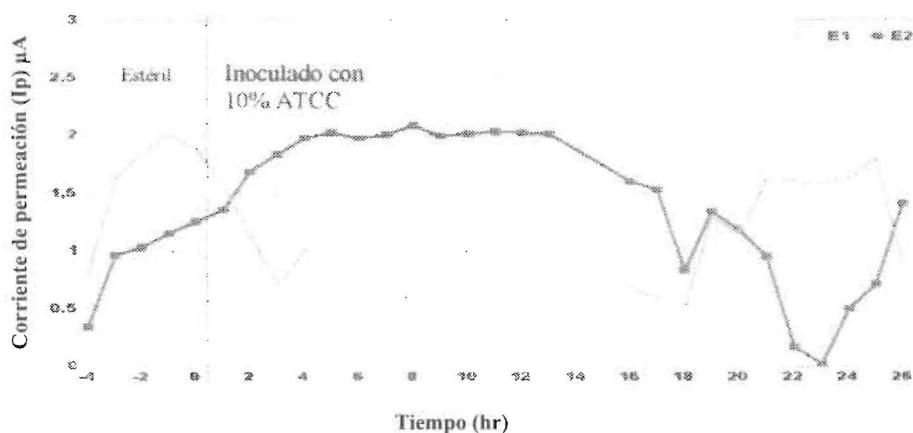
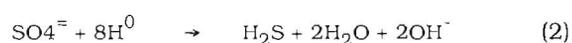
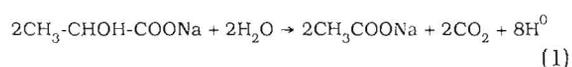


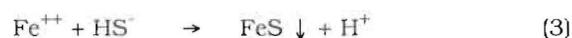
Figura 8. Permeación de hidrógeno por duplicado de la *D. desulfuricans* sin polarización.

el Pd se debe a que éste es un material que presenta una alta solubilidad de hidrógeno y que además, no contiene fases secundarias o inclusiones como el acero que puedan reducir la velocidad de difusión aparente del metal [4].

Una vez confirmada la aplicabilidad de la técnica, se realizaron los ensayos de permeación sin polarización catódica en medios de cultivos con bacterias (Figura 8), determinándose que las corrientes de permeación fluctuaron entre 0 a 2 μA (0 a 0,64 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$), siendo esto reportado por otros investigadores como despreciable [4]. Estos resultados indican que esta bacteria *D. desulfuricans* ssp. *desulfuricans* no genera H^0 extracelularmente capaz de permear, a pesar de que en su proceso metabólico esta bacteria produce organotróficamente, a nivel de su membrana, el H^0 necesario para reducir los sulfatos a sulfuros, siendo éste excretado como H_2S por la bacteria, según las siguientes reacciones:



El H_2S así generado se disocia parcialmente en HS^- y H^+ a un pH amortiguado de 7,2; luego estos iones bisulfuros reaccionan con los iones ferrosos provenientes de la sal de sulfato de amonio ferroso agregada al medio de cultivo, generando FeS que precipita sobre el metal y H^+ , según la siguiente reacción [8]:



Según estas reacciones y los resultados obtenidos se confirma que no hay producción neta de H^0 , siendo ésta la razón por la cual no se determinaron corrientes de permeación, ya que no ocurrió ningún tipo de reacción sobre el Pd que indujera a la reducción de los iones hidrógenos presentes en el medio.

En los ensayos de permeación con polarización catódica en medio estéril (Figura 9) e inoculado (Figura 10) se determinó lo siguiente:

En medio estéril, a los 165 minutos aproximadamente, se observaron corrientes máximas de permeación de 73 y 65 μA para cada ensayo Ip_1 e Ip_2 respectivamente. Posteriormente, estas corrientes disminuyeron debido a la formación de una película de color ámbar, producida por la precipitación de las sales existentes en el medio de cultivo y el aumento del pH en la interfase metal-solución, producto de la polarización inducida. Los análisis por MEB realizados posteriormente sobre una membrana de acero al carbono, sometida al mismo ensayo, indicaron que esta película está compuesta principalmente de fósforo y calcio.

En el medio inoculado, a los 175 minutos aproximadamente de haberse iniciado el ensayo en medio estéril, se determinaron corrientes máximas de permeación de 50 y 40 μA para cada ensayo Ip_1 e Ip_2 respectivamente y luego una disminución progresiva hasta 30 μA aproximadamente a los 470 minutos, observándose después un incremento progresivo hasta los 80 μA aproximadamente a los 1000 minutos. En este caso la disminución de corriente hasta 30 μA después de la inoculación, también puede deberse a lo expli-

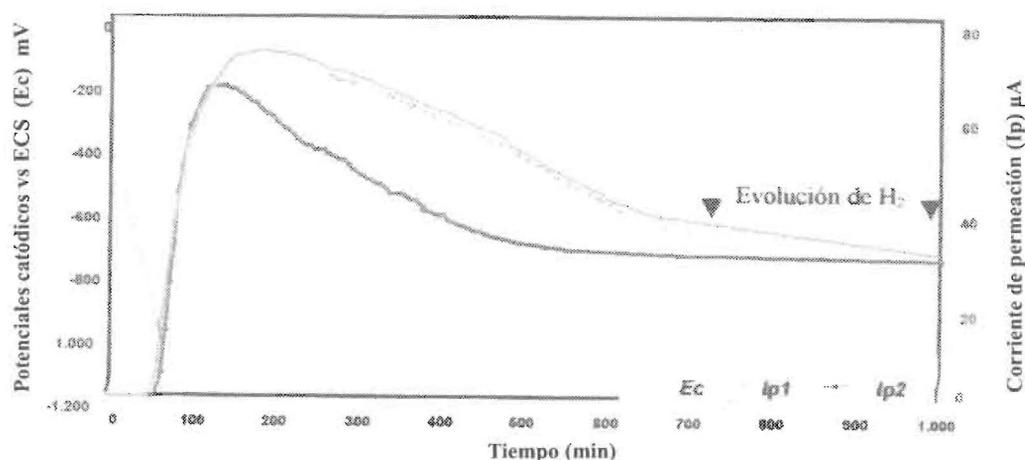


Figura 9. Corriente de permeación por duplicado manteniendo un potencial catódico de -1.000 mV vs ECS en medio estéril.

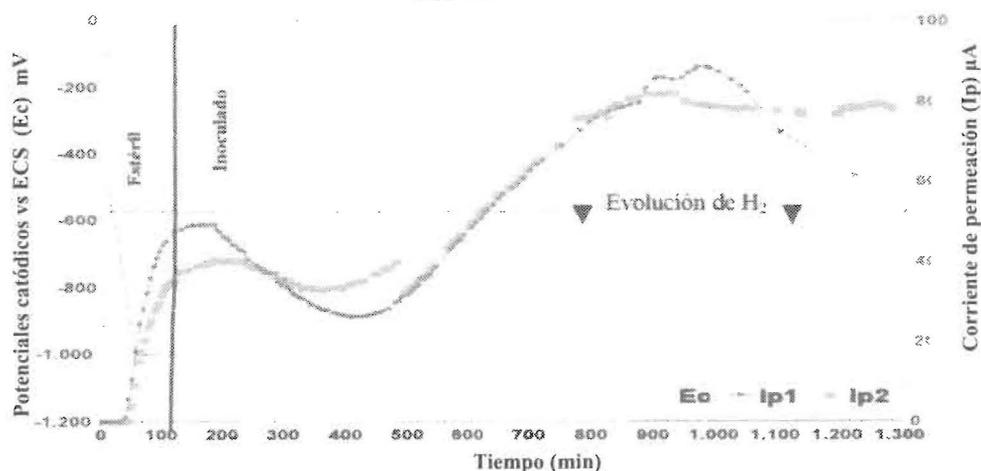


Figura 10. Corriente de permeación por duplicado manteniendo un potencial catódico de -1.000 mV vs ECS en medio inoculado.

cado anteriormente en el ensayo sin bacterias y adicionalmente, a la precipitación de una película no compacta de FeS con sitios activos donde las células bacterianas adheridas al Pd se desarrollan produciendo H^+ ; el cual se reduce y permea, aumentando nuevamente la corriente de permeación a los 470 minutos.

La Figura 11 muestra comparativamente el comportamiento de la permeación en el medio estéril e inoculado, observándose claramente el efecto bacteriano sobre el aumento de la corriente de permeación; debido como se dijo anteriormente a la contribución de los protones (H^+) generados por la disociación del sulfuro de hidrógeno producido localmente por la BSR en su proceso metabólico; los cuales son reducidos rápidamente a H^0 por el potencial catódico aplicado.

Para explicar el aumento de la corriente de permeación una vez inoculado el medio, también se analizó el efecto catódico de la película de FeS adsorbida junto con las bacterias sobre el Pd. Para ello se revisaron las investigaciones realizadas por Ford *et al.* [4] utilizando Pd y BSR. Ellos demostraron que sobre el Pd la película de FeS inhibe la permeación en lugar de promoverla, cuando se burbujea H_2 en la solución. Sin embargo, en el presente trabajo (Figura 11) se observa que aumenta nuevamente la permeación después de los 470 minutos, a pesar del FeS presente, lo cual puede ser atribuido al efecto local de las bacterias sésiles y a la polarización impuesta que permite que los iones H^+ producidos por la bacteria sean reducidos. Según este análisis, sobre el Pd no ocurrirá permeación de hidrógeno en

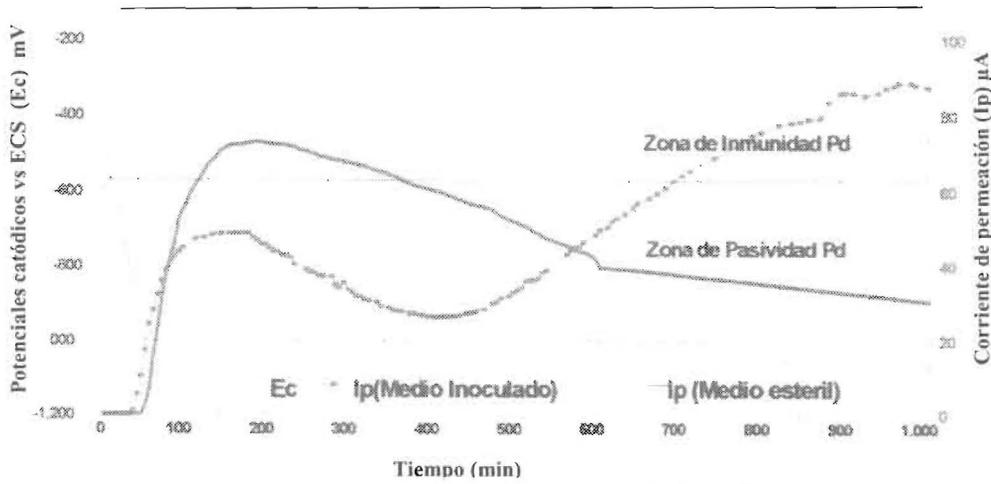


Figura 11. Curvas de permeación comparativas en medio de cultivo estéril e inoculado con polarización catódica.

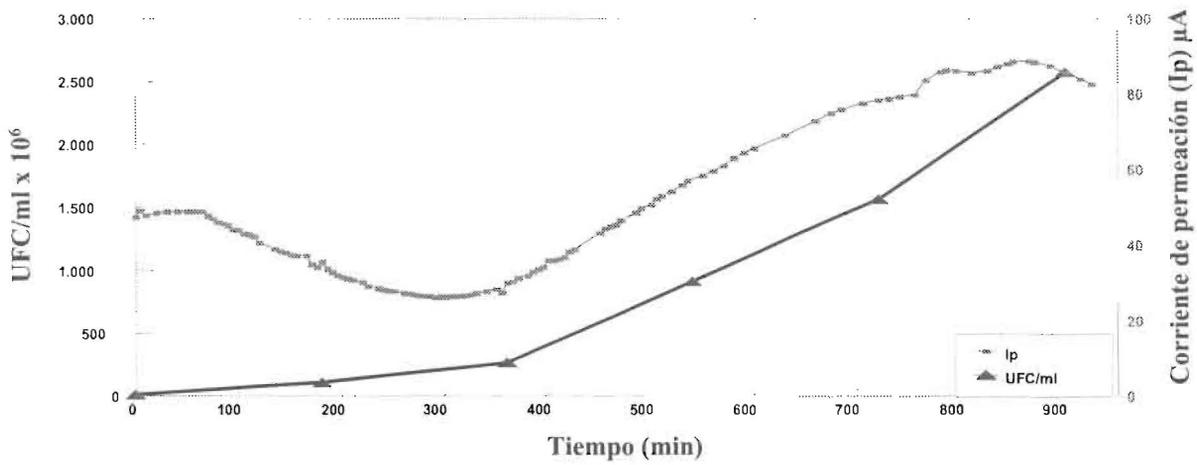


Figura 12. Relación de las Corrientes de Permeación con el Crecimiento poblacional de la *D. desulfuricans* en la celda electrolytica.

medios inoculados con esta bacteria a menos que se induzca una polarización catódica, diferenciándose del acero al carbono donde puede darse la permeación sin polarización catódica, motivado a que el material se corroe, reduciéndose los protones (H^+). En este caso los sulfuros si actúan como venenos catódicos siendo esto perjudicial desde el punto de vista de la fragilización por hidrógeno del acero.

En la Figura 11 también se observa un desfase de 20 A, aproximadamente, entre las máximas corrientes de permeación; lo cual no tiene explicación. Sin embargo, lo mas importante es la reproducibilidad de cada ensayo de manera independiente, lo cual permitió explicar el efecto bacteriano sobre la permeación de hidrógeno.

En la Figura 12 se muestra como el incremento de las corrientes de permeación está asociado a la fase de desarrollo exponencial de la población bacteriana, lo cual confirma que existe una relación entre las BSR, H_2S y los iones H^+ con la corriente de permeación en una superficie de Pd polarizada catódicamente.

Conclusiones

1. La técnica de permeación de hidrógeno permite evaluar la actividad en la interfase biopelícula/metal, siendo ella de gran utilidad para estudios de mecanismos de MIC.
2. La *D. desulfuricans* ssp. *desulfuricans* se desarrolla independientemente de que exista una

superficie metálica polarizada catódicamente cargada de H^0 ; ya que esta bacteria es capaz de generar los H^0 necesarios para reducir a nivel celular los sulfatos a sulfuros, sin producción neta de H^0 .

3. La teoría de despolarización catódica no es el principal mecanismo de acción de las *D. desulfuricans ssp. desulfuricans* en el proceso de MIC. Por lo tanto, estudios de permeación utilizando lámina de acero al carbono serán realizados para aclarar dicho mecanismo.

4. La *D. desulfuricans* no genera condiciones de reducción sobre el Pd para que el H^+ producido por las H_2S se reduzca y permee; no obstante, aumenta significativamente la permeación de hidrógeno bajo condiciones de polarización catódica, por lo cual es importante considerar esta actividad en aceros susceptible a la fragilización por hidrógeno.

Agradecimiento

Al CONICIT por el apoyo financiero, a PDVSA INTEVEP (Dr. José Vera) por el apoyo técnico y al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones del agua de la Universidad del Zulia por cedernos un espacio para instalar el Lab. de Corrosión Microbiológica.

Referencias Bibliográficas

1. Iverson W. "Mechanism of anaerobic corrosion of steel Sulfate Reducing Bacteria". *Materials Performance*. Vol. 23, Nº 3 (1984).
2. Devanathan M., Stachurski Z. "The adsorption and diffusion of electrolytic hydrogen in Palladium" *Proceeding of the Royal Society of London*. Vol. 270 (1962).
3. Ford T., Michell R. "Hydrogen embrittlement. A Microbiological Perspective". *Corrosion* 89. Nº 189, 1989.
4. Ford T.E., Scarson P.C., Harris T. and Mitchel R. "Investigation of Microbiologically Produced Hydrogen Permeation Through Palladium", *J. Electrochemical Society*, Vol. 137, Nº 4 (1991)
5. Anderson J. "Structure of Metallic catalysts", Academic Press. INC. London. LTD, 1975.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Wilkings & Wilkings. Vol. 1, 1984.
7. Brock T., Madigan M. "Microbiología". 6ta. edición. Edit. Prentice Hall Hispanoamericana C.A. México, 1993.
8. Vera, J.R., "Passivity of iron and its breakdown in alkaline sulfide solution". Thesis for Doctor of Philosophy, Houston, Texas, May 1984.

Recibido el 6 de Septiembre de 1999
En forma revisada el 10 de Abril de 2000