

## Evidenze di inibizione della corrosione di un ottone alimentare ad opera di *Pseudomonas Fluorescens*

G. Ghiara, R. Spotorno, P. Piccardo, P. Cristiani

Questo studio è volto a valutare l'effetto di un ceppo batterico di *Pseudomonas Fluorescens* su trafilate di ottone (CuZn40 Pb 0,20 wt.%) comunemente utilizzate nell'industria della pasta durante lo stoccaggio. L'effetto dei batteri e dei metaboliti sul processo di corrosione è stato studiato dal punto di vista elettrochimico in condizioni che simulino quelle effettive di conservazione adottate da terze parti. I risultati hanno evidenziato la diretta influenza dei batteri sul fenomeno, agendo sulla disponibilità di ossigeno in soluzione e sulla formazione e la natura dei prodotti di corrosione superficiali i quali risultano più protettivi rispetto a quelli rilevati in condizioni di assenza di batteri (controllo, inoculo di metaboliti).

**PAROLE CHIAVE:** CORROSIONE, MICI, INDUSTRIA ALIMENTARE, BRONZI, STOCCAGGIO.

### INTRODUZIONE

La manutenzione e lo stoccaggio di leghe di ottone utilizzate come trafilate per applicazioni alimentari è diventato negli anni un punto fondamentale per il conseguimento della loro idoneità al contatto con alimenti (1). I MOCA (materiali od oggetti a contatto diretto con alimenti) sono definiti sulla base della loro sicurezza a livello sanitario in quanto non devono rilasciare nell'alimento ioni in quantità tale da poter essere potenzialmente dannosi per la salute umana (2). Le direttive europee regolamentano le buone pratiche di manifattura ed i parametri associati, definendo livelli di igiene adeguati al consumo umano. Sulla base di ciò trattamenti scorretti e manutenzioni inadeguate (basti pensare ai residui alimentari lasciati dopo la trafilatura della pasta) possono favorire la proliferazione di microorganismi che a loro volta possono agire sulla corrosione di queste leghe se le condizioni sono favorevoli (corrosione microbiologica o MIC).

L'influenza dell'attività microbiologica sulla corrosione di queste leghe è generalmente collegata a modifiche della stabilità del sistema e a spostamenti del potenziale di corrosione verso valori positivi o negativi a seconda del loro effetto sul meccanismo di corrosione (3). Nella maggior parte dei casi si parla di accelerazione dei processi corrosivi e si evidenziano meno frequentemente batteri che possono determinarne una inibizione (MICI, inibizione di corrosione microbiologica). Tra questi vi è la famiglia degli *Pseudomonas* che possono favorire processi diversi a seconda del tipo di ambiente in cui si trovano. Le cause di questa inibizione sono da ricercarsi in: i)

**Giorgia Ghiara, Roberto Spotorno,  
Paolo Piccardo**

DCCI-Università degli studi di Genova, Via Dodecaneso 31,  
16146 Genova, Italia

**Pierangela Cristiani**

RSE-Ricerca sul Sistema Energetico S.p.A., Via Rubattino 54,  
20134 Milano, Italia

consumo di ossigeno in soluzione attraverso processi respiratori; ii) competizione fra agenti corrosivi e non; iii) sovrapproduzione di metaboliti che promuovono la nobilitazione del potenziale di libera corrosione (4,5).

Lo scopo di questo lavoro è la valutazione degli effetti da parte del ceppo *Pseudomonas fluorescens* sulla corrosione di un ottone alimentare (OT60) in una soluzione di NaCl 0.1M. Sono state effettuate prove elettrochimiche per caratterizzare il meccanismo di corrosione e prove di corrosione ad immersione per 120 ore in condizioni aerate considerando tre sistemi differenti (controllo, inoculo di metaboliti, inoculo di

*Pseudomonas fluorescens*) per verificare gli effetti dei batteri e dei metaboliti sul processo di dezincificazione. I campioni sono stati caratterizzati all'inizio ed alla fine del periodo

di immersione tramite tecniche microscopiche (microscopia ottica-LOM e microscopia elettronica a scansione-SEM).

## MATERIALI E METODI

Per i test è stato scelto un ottone (OT60) comunemente utilizzato per trafilare la pasta, la cui composizione è indicata in tabella 1. La lega presenta delle varianti rispetto agli ottoni di

produzione di massa poiché non presenta elementi che possono mitigare significativamente la dezincificazione (quali As o Sb) in quanto elementi pericolosi per la salute umana.

**Tab. 1** - Composizione nominale in wt% della lega studiata / Nominal composition in wt. % of the alloy studied

MASSA PERCENTUALE [Wt%]											
MATERIALE	LEGA	Al	As	Cu	Fe	Ni	Pb	Sb	Si	Sn	Zn
OT60	2	≤ 0.3	-	59-61	≤ 0.7	-	≤ 0.5	-	≤ 0.3	≤ 1	RESTO

La lega è stata caratterizzata preliminarmente mediante tecniche metallografiche classiche (6) e successivamente sono stati preparati campioni circolari con superficie finale di esposizione di un 1 cm<sup>2</sup>. Il ceppo *Pseudomonas Fluorescens* N3 è stato preparato seguendo un protocollo descritto altrove (7) e poi risospeso nella soluzione finale di NaCl 0.1M fino ad ottenere una concentrazione di 3x10<sup>7</sup> CFU/mL. Sono stati successivamente messi a punto test di corrosione (replicati tre volte per avere una significatività a livello statistico) per la durata di 120 ore al fine di valutare l'impatto dei batteri e dei metaboliti sul sistema rispetto ad un test di controllo.

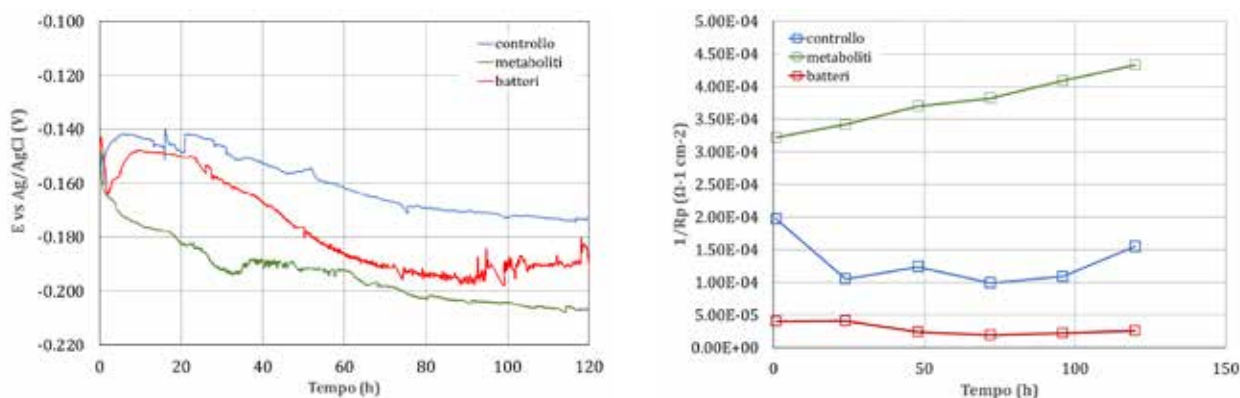
Le prove elettrochimiche hanno previsto l'utilizzo di una cella con configurazione a tre elettrodi con il campione come elettrodo di lavoro (WE), un contro elettrodo di Pt (CE) e un elettrodo di riferimento di Ag/AgCl 3M (RE). Le analisi di po-

tenziale di circuito aperto (OCP), resistenza a polarizzazione (Rp) e di spettroscopia ad impedenza elettrochimica (EIS) sono state effettuate mediante un potenziostato Solartron 1287 ed un analizzatore di risposta in frequenza Solartron 1260. Le misure di Rp attorno al potenziale di libera corrosione (-20 mV vs OCP; +20 mV vs OCP), hanno previsto una velocità di scansione di 4 mV/min. Le misure di Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica sono state effettuate all'OCP, applicando un'ampiezza del segnale a.c. di 10mV nell'intervallo di frequenza 200kHz-0.01Hz. La caratterizzazione post-sperimentale è stata eseguita utilizzando: microscopia ottica (LOM), al fine di osservare lo sviluppo dei prodotti di corrosione e il grado di dezincificazione; microscopia elettronica a scansione (SEM) e analisi elementare (EDS) al fine di verificare lo stato della superficie dei campioni.

## RISULTATI

Le misure di potenziale a circuito aperto (OCP) evidenziano andamenti concordanti fra i diversi sistemi presi in considerazione (Fig. 1A). Vi è globalmente un abbassamento nel tempo

dell'OCP, con valori più marcati in presenza di *Pseudomonas fluorescens* e dei soli metaboliti.



**Fig. 1** - A: evoluzione dell'OCP per i tre sistemi (controllo, metaboliti e batteri) per 120 ore. B: evoluzione di di 1/Rp per i sistemi considerati / A: Evolution of the OCP of control, metabolites and bacteria rich system for 120 hours. B: evolution of parameter 1/Rp for the considered systems.

Per ciò che riguarda il campione immerso nella soluzione batterica, vi è stato un aumento del potenziale di circuito aperto per le prime 24 ore di immersione coerente con i valori assunti dal controllo, seguito da un abbassamento più pronunciato nelle successive 96 ore coerentemente con il trend dei soli metaboliti.

Le misure di resistenza a polarizzazione ( $R_p$ ) hanno permes-

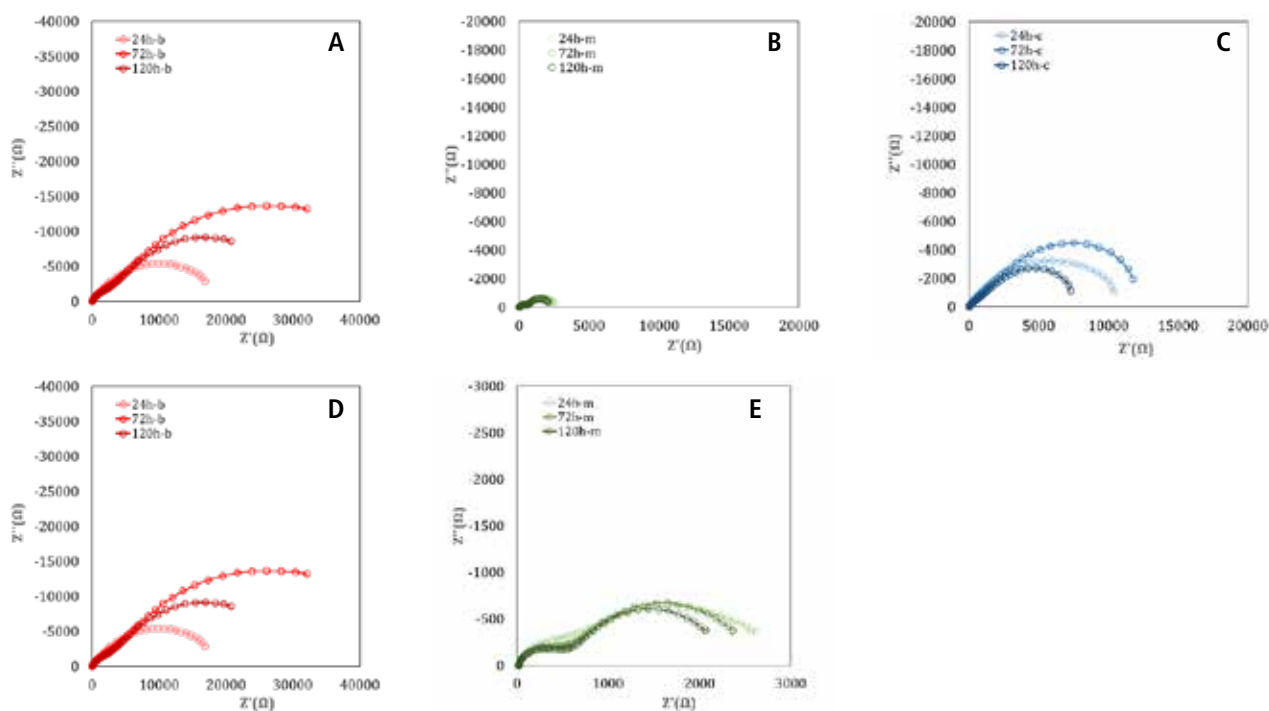
so di descrivere più accuratamente l'evoluzione del processo corrosivo per i differenti sistemi a livello puramente qualitativo. Ciò è stato fatto mediante l'imposizione di un potenziale di polarizzazione nelle vicinanze del potenziale di corrosione e misurando la corrente risultante ( $J$ ) secondo il modello di Stern-Geary (8):

$$J = \frac{\beta_a \beta_c}{2.303(\beta_a + \beta_c) R_p} \quad \text{eq. 1}$$

Dalla pendenza della curva è quindi teoricamente possibile ricavare la velocità di corrosione di un sistema. Questo modello implica tuttavia che la formula sia applicabile in situazioni di pura attivazione, quando cioè il fattore limitante del sistema sia il trasporto di carica. In presenza di fenomeni di diffusione associabili a presenza di biofilm, formazione di strati spessi di prodotti di corrosione o di fenomeni di passivazione, la determinazione della velocità di corrosione non può avere una base quantitativa. Si è dunque deciso di misurare l'evoluzione del sistema mediante un parametro puramente qualitativo ( $1/R_p$ ) e la sua evoluzione nel tempo. La Fig. 1B mostra l'andamento del parametro considerato. È evidente dai dati ottenuti tramite elaborazione che il sistema con i batteri presenta

i valori più bassi di  $1/R_p$ , seguito da controllo e metaboliti. Ipotizzando valori del coefficiente  $B$  compresi tra 5 e 60mV, si ottengono correnti di corrosione, per le 120 ore, negli intervalli di 0.1 - 2 mA/m<sup>2</sup>, 2.2 - 30 mA/m<sup>2</sup>, 0.8 - 10 mA/m<sup>2</sup>, per batteri, metaboliti e controllo rispettivamente. Ciò sembra indicare che i batteri possano inibire il processo corrosivo in queste condizioni ambientali e che la presenza di metaboliti sia un fattore di accelerazione del fenomeno.

La spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) ha permesso di confermare le ipotesi formulate precedentemente. Le misurazioni che mostrano i risultati più significativi per ogni sistema considerato, sono riportate in Fig. 2.



**Fig. 2** - Spettri di impedenza elettrochimica sui sistemi considerati a diversi tempi di immersione. A: batteri; B: metaboliti; C: controllo; D: spettro completo batteri; E: ingrandimento metaboliti. / Impedance spectra of the considered systems at different immersion times. A: control; B: metabolites, C: bacteria; D: bacteria overall spectrum; E: metabolites spectrum detail.

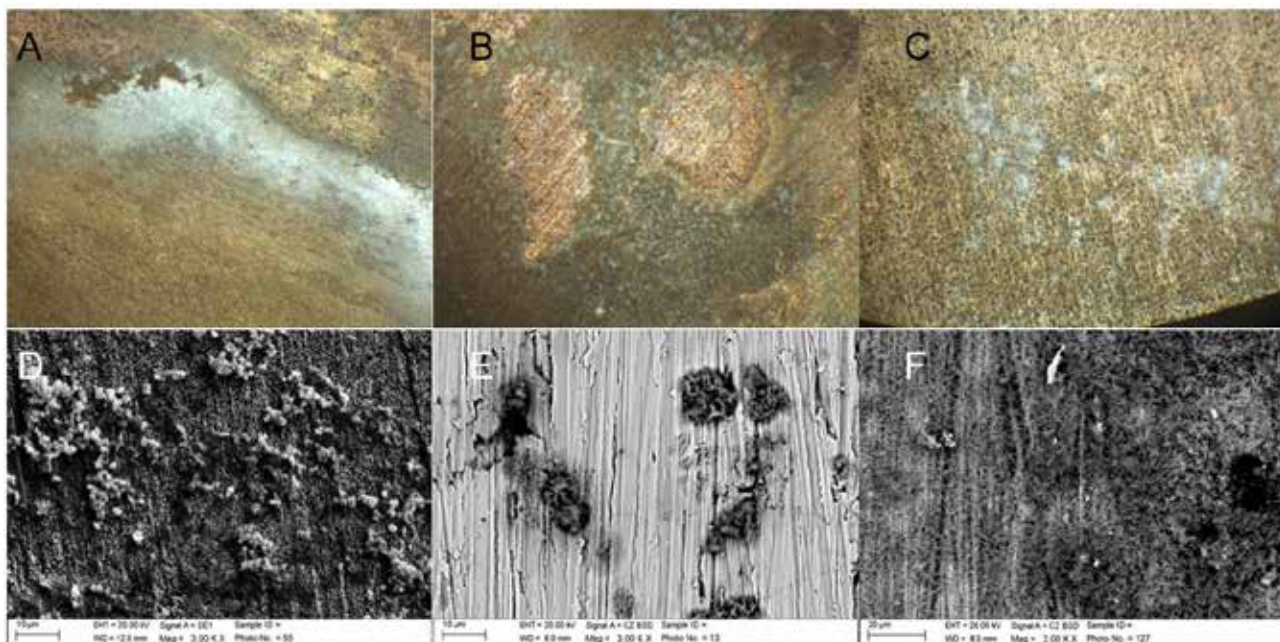
Gli spettri di impedenza sono caratterizzati da più archi di forma appiattita, coerentemente con la presenza di più processi associati a fenomeni dispersivi legati alle proprietà capacitive e derivanti da eterogeneità superficiali. Si evidenziano valori di impedenza molto più elevati per i gli spettri dei campioni immersi nella soluzione di *Pseudomonas Fluorescens* e caratterizzati da archi di maggiori dimensioni, indice della formazione di uno strato di ossidazione più protettivo.

I prodotti di corrosione sviluppatasi sulla superficie della lega dopo 120 ore di esposizione sono diversi per natura, distribuzione e morfologia a seconda del sistema (Fig. 3).

Il controllo presenta prodotti di corrosione coerenti con quanto studiato in letteratura (Fig. 3A, 3D), con ossidi di rame e zinco ( $\text{Cu}_2\text{O}$  e  $\text{ZnO}$ ) e prodotti secondari del tipo ossicloruri di zinco ( $\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), derivanti dalla trasformazione

dell'ossido di Zn in presenza di cloruri (9). Il campione immerso nella soluzione di metaboliti è caratterizzato da prodotti di corrosione più localizzati e coerenti con la presenza di cloruri di rame e ossicloruri di Zn (Fig. 3B, 3E). È possibile ipotizzare per questo sistema un fenomeno di complessazione degli ioni rame e zinco all'interfaccia metallo soluzione che accelera il fenomeno.

L'influenza dei batteri è visibile già dalle prime 24 ore in quanto si notano colonie che si estendono sulla superficie del campione formando strutture più complesse dopo 72 ore (biofilm). La superficie esposta presenta prodotti di corrosione uniformemente distribuiti, coerenti con la formazione di ossidi e idrossidi di zinco e zone di dezincificazione meno estese rispetto a quelle osservate per i metaboliti e per il controllo (Fig. 3C, 3F).



**Fig. 3** - Micrografie LOM e SEM dei diversi sistemi che mostrano la superficie dei campioni a 120 ore di esposizione: riga superiore 25x LOM. A: controllo; B: metaboliti; C: batteri; riga inferiore SEM 3000x. D: controllo; E: metaboliti; F: batteri. / LOM and SEM micrographs of different systems showing the surface of the samples at 120 hours of immersion: upper row 25 x LOM. A: control; B: metabolites; C: bacteria; Lower row SEM 3000x. D: control; E: metabolites; F: bacteria.

L'entità dello strato dezincificato è stata osservata tramite analisi in sezione trasversale dei campioni come è riportato in tabella 2. I risultati sono coerenti con i dati ottenuti dal rilascio ionico sul medesimo materiale nelle stesse condizioni

sperimentali (10) in cui si evidenzia una buona inibizione della dezincificazione in presenza di batteri rispetto al controllo e ai soli metaboliti.

**Tab. 2** - Grado di penetrazione del processo di dezincificazione (in  $\mu\text{m}$ ) ottenuto tramite analisi d'immagine delle sezioni trasversali dei campioni / Dezincification degree of penetration (in  $\mu\text{m}$ ) from image analyses of the cross sections of the samples

DENOMINAZIONE	DEZINCIFICAZIONE ( $\mu\text{m}$ )
<b>batteri</b>	$0.9 \pm 0.3$
<b>metaboliti</b>	$8.4 \pm 1.8$
<b>controllo</b>	$5.6 \pm 2.1$

## CONCLUSIONI

Le analisi ottenute hanno potuto dimostrare che la presenza di *Pseudomonas fluorescens* determina un'inibizione del processo corrosivo dell'ottone OT60 in condizioni di immersione in una soluzione di NaCl 0.1M. I batteri promuovono la formazione di ossidi superficiali che risultano più protettivi rispetto ad altre condizioni, come confermato dalle prove

elettrochimiche effettuate. In particolare, si sono potute evidenziare le differenze di comportamento in presenza dei soli metaboliti che producono l'effetto contrario (accelerazione del fenomeno corrosivo). Saranno necessari successivi studi al fine di comprendere in maniera più dettagliata i meccanismi associati a questo tipo di processo.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Gray D.R, Chinnaswamy R. (1995) In: Food Processing: Recent Developments, A. G. Gaonkar, ed., Elsevier Science & Technology Books, London, pp. 241-268.
- [2] Lelieveld H.L.M., Holah J., Gabric D., eds (2016). Handbook of Hygiene Control in the Food Industry, Woodhead Publishing, Cambridge.
- [3] Kip N., van Veen J.A. (2015). The dual role of microbes in corrosion, ISME 9, pp. 542–551
- [4] Ornek D., Wood T.K., Hsu C.H., Mansfeld F. (2002), Corrosion control using regenerative biofilms (CCURB) on brass in different media, Corros. Sci. 44 pp. 2291–2302.
- [5] Videla H.A., Herrera L.K. (2009). Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview, Int. Biodeter. Biodegrad. 63(7) pp. 896-900.
- [6] Ghiara G., Spotorno R., Trasatti S.P., Cristiani P. (2018). Effect of *Pseudomonas fluorescens* on the electrochemical behaviour of a single-phase Cu-Sn modern bronze, Corros. Sci. 139 pp. 227-234.
- [7] Ghiara G., Grande C., Ferrando S., Piccardo P. (2018). The Influence of *Pseudomonas fluorescens* on Corrosion Products of Archaeological Tin-Bronze Analogues, JOM 70(1) pp. 81-85.
- [8] Stern, M. and Geary, A.L. (1957) Electrochemical Polarization. I. A Theoretical Analysis of the Shape of Polarization Curves. J Electrochem. Soc. 104, pp. 56-63.
- [9] Zhou P., Hutchison M.J., Erning J.W., Scully J.R., Ogle K., (2017). An in situ kinetic study of brass dezincification and corrosion, Electrochimica Acta, 229, p. 141-154.
- [10] Ghiara G., Spotorno R., Delsante S., Tassistro G., Piccardo P., Cristiani P., (2019) Dezincification inhibition of a food processing brass OT60 in presence of *Pseudomonas fluorescens*, Corrosion Science, 157, p. 370-381.