



Mikrobiální koroze kovových materiálů v hlubinném úložišti radioaktivního odpadu

Microbial corrosion of metallic materials in a deep nuclear-waste repository

Stoulil J.¹, Dobrev D.² ¹**VŠCHT Praha, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství** ²**ÚJV Řež, a.s.** E-mail: jan.stoulil@vscht.cz

Příspěvek shrnuje současné znalosti o mikrobiální korozi v hlubinném úložišti radioaktivních odpadů. V první části je hodnoceno obecné ovlivnění korozních mechanismů mikrobiálními ději. Jsou hodnoceny zejména ovlivnění prostředí produkty mikrobiálního metabolismu a vliv biofilmů na povrchu konstrukčních materiálů. Další část je zaměřena na mikrobiální korozi v hlubinném úložišti radioaktivního odpadu. Předmětem řešení je zejména vývoj prostředí úložiště a v návaznosti na to životaschopnost bakterií v závislosti na pravděpodobných podmínkách prostředí jako vlhkost bentonitu, tlak v kompaktovaném bentonitu, vliv ionizujícího záření, apod. Poslední část je zaměřena na možné techniky pro sledování mechanismu mikrobiální koroze v podmínkách hlubinného úložiště. Diskutovány jsou zejména techniky elektrochemické a mikroskopické.

OBECNÝ VLIV BAKTERIÍ NA KOROZNÍ DĚJE

Bakterie mohou být v prostředí přítomny jako volné (planktonic) nebo navázané na povrchu v tzv. biofilmu (sessile). Jako volné mohou ovlivnit prostředí produkty svého metabolismu (pH, tvorba agresívních aniontů) nebo usnadňovat redukci/oxidaci korozních produktů. Redukcí i oxidací síry dojde ke tvorbě sulfanu, respektive kyseliny sírové, což má za následek výrazné zvýšení korozní rychlosti. Změny oxidačního stavu korozních produktů mají za následek změny objemu a zvýšení porozity či praskání vrstvy a její horší ochranný (bariérový) účinek. Zegeye et al. popsali možnost mikrobiální redukce korozních produktů Fe(III) na magnetit a Fe(II) [1]. V případě pasivní vrstvy vede oxidace/redukce rovněž k poškození celistvosti pasivní vrstvy a průrazu korozivzdorných ocelí [2-4] či kuproniklu [5]. K poškození pasivní vrstvy může dojít i oxidací inkluzí (MnS) v matrici.

Na povrchu kovu se mohou bakterie usadit díky produkci tzv. "extracellular polymeric substances" (EPS), které pomáhají lepší adhezi k povrchu. EPS mohou být The study summarises current knowledge on microbial corrosion in a deep nuclear-waste repository. The first part evaluates the general impact of microbial activity on corrosion mechanisms. Especially, the impact of microbial metabolism on the environment and the impact of biofilms on the surface of structure materials were evaluated. The next part focuses on microbial corrosion in a deep nuclear-waste repository. The study aims to suggest the development of the repository environment and in that respect the viability of bacteria, depending on the probable conditions of the environment, such as humidity of bentonite, pressure in compact bentonite, the impact of ionizing radiation, etc. The last part is aimed at possible techniques for microbial corrosion mechanism monitoring in the conditions of a deep repository. Namely, electrochemical and microscopic techniques were discussed.

všechny druhy organických dlouhých molekul, jako polysacharidy, lipidy, proteiny, apod. V případě biofilmu je možné ovlivnění korozních dějů následujícími základními mechanismy:

- vliv makročlánků s diferenční aerací,
- tvorba okludovaných roztoků metabolitů na povrchu,
- lokalizace anody,
- tvorba dalšího povrchu pro katodickou reakci,
- urychlení katodické reakce.

V případě makročlánku s diferenční aerací, působí biofilm jako štěrbina, ve které je spotřebován kyslík na korozní děj nebo metabolismus aerobních bakterií. Pod biofilmem tak dochází k poklesu potenciálu a zrychlí se anodický děj, naopak katodický děj probíhá na volném povrchu bez biofilmu. V přítomnosti chloridů dochází k jejich migraci (pohyb iontů v elektrickém poli) k anodě pod biofilm, a jejich zakoncentrování (až 24×) [6]. Vlivem hydrolýzy iontů Fe²⁺ ve štěrbině, pak dochází i k okyselení roztoku až na úroveň pH 0 [7].

Pod biofilmem může také docházet k zakoncentrování metabolitů, když uvažujeme malý objem roztoku pod biofilmem v porovnání se zbytkem objemu roztoku.

Dalším negativním účinkem je lokalizace anody (povrchu nepokrytého biofilmem) a lokální zvýšení korozní rychlosti, což vede k výrazné penetraci korozního napadení směrem do materiálu [8-10].

Biofilm může obsahovat korozní produkty podkladového kovu a v případě, že jsou vodivé, jako např. FeS, tak na této vrstvě může probíhat katodická reakce. Kombinovaná vrstva biofilmu s korozními produkty může mít výraznou reálnou plochu, a pokud je korozní děj řízen katodickou reakcí, může zvětšená plocha katody způsobit výrazné zrychlení rozpouštění kovu [11,12].

Některé typy biofilmu nemusí ani obsahovat vodivé korozní produkty a přesto poskytují zvětšenou plochu pro katodickou reakci. Bakterie totiž mohou sami zprostředkovávat přímý přenos elektronů přes elektricky vodivé výběžky na bázi proteinů [12-14]. Jinou možností jsou enzymaticky katalyzované katodické reakce, které mohou vést ke zvýšení korozní rychlosti.

Na druhou stranu může mít přítomnost bakterií i pozitivní vliv. Biofilm může způsobit ztížení transportu a přesycení roztoku u povrchu, což usnadní precipitaci korozních produktů. Síť biofilmu rovněž bude působit jako nukleační místo pro precipitaci korozních produktů, které tak ve výsledku budou kompaktnější [8], s lepším ochranným účinkem [15]. Ten spočívá nejen v omezení anodické rozpouštěcí reakce, ale i v omezení transportu depolarizačních látek nutných pro katodickou reakci v případě nevodivých kombinovaných biofilmů [16-19].

Aby bakterie mohly v systému fungovat, potřebují pro svoji existenci tzv. "nutrienty". Do této skupiny látek patří nejen stavební molekuly, ze kterých bakterie dokáže syntetizovat látky pro stavbu buňky (proteiny, fosfolipidy, apod.), ale i látky účastnící se redoxních reakcí metabolismu. V případě aerobních bakterií je donorem elektronů většinou právě kov a akceptorem kyslík, dusičnany, apod. U anaerobních bakterií je donorem elektronů organická látka. U nejčastěji řešených anaerobních sulfát redukujících bakterií (SRB) může být donorem také kov [12], ale většinou je donorem organická kyselina (např. mléčnan) a akceptorem síran, který se redukuje na sulfid [20].

$$\begin{array}{l} 2\text{CH}_{3}\text{CHOHCOO}^{-} + \text{SO}_{4}^{2-} \rightarrow \\ \rightarrow 2\text{CH}_{3}\text{COO}^{-} + 2\text{HCO}_{3}^{-} + \text{H}_{2}\text{S} \end{array} \tag{1}$$

Xu et al. uvádějí rovněž možnost rozpuštěného plynného vodíku jako donoru pro redukci síranu pomocí SRB za tvorby mackinawitu (FeS) a sideritu (FeCO₃), což je ve shodě s pozorovanými korozními produkty [12].

$$4Fe + SO_4^{2-} + 3HCO_3^{-} + 5H^+ \rightarrow$$

$$\rightarrow FeS + 3FeCO_3 + 4H_2O$$
(2)

Koroze a ochrana materiálu 60(2) 59-67 (2016)

Přítomnost hydrogensulfidového aniontu způsobí jednodušší vodíkovou depolarizaci, což je výzamné zejména v anoxickém prostředí pro měď. Ta se ve vodném elektrolytu bez hydrogensulfidového aniontu nemůže rozpouštět s vodíkovou depolarizací, respektive zastaví se již při extrémně nízkých koncentracích iontů mědi rozpuštěných ve vodě. V přítomnosti HS⁻ již rozpouštění Cu probíhá bez problému. Aerobní a anaerobní mechanismus koroze mědi v prostředí úložiště je v detailu uveden ve zdroji [21]. V aerobním prostředí koroduje měď hlavně za pomoci komplexace chloridovými anionty s depolarizací kyslíkovou či přechodem Fe³⁺/Fe²⁺. Anaerobní je založena u obou reakcí na HS⁻. Možná je i kombinace obou v kombinovaných biofilmech.

Hydrogenázy anaerobních bakterií jsou schopny usnadnit vývoj vodíku i u slabých organických kyselin či částečně neutralizovaných solí silných kyselin. Typickým příkladem může být depolarizace dihydrogenfosforečnanu [13].

$$H_2PO_4^- + e^- \to HPO_4^{2-} + \frac{1}{2}H_2$$
 (3)

Tento typ redukce může být jednoznačně prokázán pomocí tvorby vivianitu $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8(H_2O)$ [22].

Anaerobní bakterie se mohou vyskytovat i v aerobním prostředí v kombinaci s aerobními bakteriemi. Vzniká kombinovaný biofilm, kde ve vnější vrstvě jsou aerobní bakterie, které tvoří pod sebou anaerobní prostředí pro anaerobní bakterie. Nejčastějším případem je kombinace železo oxidujících bakterií (IOB) a sulfát redukujících bakterií (SRB) [23]. Gradient oxidačně-redukčních podmínek je možné najít i v biofilmu čistě anaerobních SRB (Behrends 2012) [24]. Liu et al. detailně popsali přítomnost aniontů síry v různých oxidačních stavech [20]. Na povrchu biofilmu jsou přítomny hlavně sírany a směrem ke kovu se zvyšují obsahy S₂O₃²⁻, SO₃²⁻ a nejspodněji S²⁻.

Dle Férona a Crusseta jsou náchylné k mikrobiální korozi slitiny železa (uhlíkové oceli, korozivzdorné oceli, litiny), mědi a hliníku, zatímco absolutně odolné jsou pouze slitiny titanu a zirkonia [25].

MIKROBIÁLNÍ KOROZE V HLUBINNÉM ÚLOŽIŠTI

King zmiňuje dva základní koncepty uložení vysoce radioaktivních odpadů. První je americký koncept nad hladinou podzemní vody a druhý evropský pod hladinou podzemní vody [26]. V případě amerického konceptu se předpokládá, že povrch ukládacích obalových souborů (UOS) bude vystaven aerobnímu prostředí [27] a dále se předpokládá, že po stovky let se k povrchu UOS dostane jen minimální množství vody [28]. V evropských konceptech budou úložiště po uzavření postupně zaplavena a povrch UOS bude vystaven přechodu z aerobního do anaerobního prostředí, přičemž trvání aerobní fáze bude z hlediska požadované životnosti UOS zane-

dbatelné oproti anaerobní fázi. King [26] dále udává výčet parametrů, které by měly limitovat vliv bakterií v prostředí hlubinného úložiště:

- zvýšená teplota,
- malé množství vody,
- vysoké botnací tlaky,
- salinita podzemní vody či pórového roztoku bentonitu,
- ionizující záření,
- nedostatek nutrientů,
- proměnlivý oxidačně-redukční potenciál.

Nejvyšší teploty pro přežití bakterií jsou udávány 113°C [29], 115°C [25] či dokonce 120°C [30,31]. Pík povrchové teploty je v horizontu prvních 100 let [31], stejně jako pík minimální relativní vlhkosti (RH). Inokulace bentonitu je tak možná nejdříve po této periodě a inokulace povrchu ukládacího obalového souboru až po poklesu teploty na hodnoty příznivé pro bakterie, cca 40°C [26]. Minimální relativní vlhkost pro růst bakterií je obecně 96 %, i když některé kmeny jsou aktivní i při 75 % [26].

Relativní vlhkost je spjata s kompaktizací bentonitu a salinitou, která snižuje aktivitu vody osmoticky. King ukazuje, že pro bentonit MX80 odpovídá RH 96 % kritické hodnotě botnacího tlaku 2 MPa, resp. suché objemové hmotnosti bentonitu 1.6 g cm⁻³ [26]. Přesto se však pozorované hraniční limity pro životnost bakterií liší. Vývoj mikrobiálního oživení v úložišti s botnáním bentonitu nastínil Pedersen [32], mechanismus následně upřesnil Mulligan [33].

Fukunaga et al. pozorovali lepší životaschopnost bakterií v bentonitových suspenzích než v pórovém roztoku, ale naopak pozoroval i v japonském typu Ca-bentonitu kritickou hodnotu pro životnost bakterií při suché objemové hmotnostibentonitu 1.5 g cm⁻³ [34]. Jiní autoři pozorovali tuto hranici při vyšších hustotách. Bengtsson et al. pozorovali přechod na abiotické podmínky mezi 1.75 a 2.0 g cm⁻³ [35]. Masurat et al. pozorovali nárůst tloušťky Cu₂S vlivem koroze mědi v kompaktovaném bentonitu se SRB [36]. Bentonit byl kompaktovaný na suché objemové hmotnosti 1.5; 1.8 a 2.0 g cm⁻³. Rychlost tvorby korozních produktů klesala s mírou kompaktizace řádově a při suché objemové hmotnosti 2.0 g cm-3 už neovlivňovala korozní rychlost při porovnání se sterilním vzorkem. Stroes-Gascoyne et al. pozorovali, že s přídavky kameniva a písku do kompaktovaného bentonitu výrazně sníží botnací tlaky a směs zůstáva biotickou [37]. Hajj et al. studovali vliv tlaku na korozní mechanismus uhlíkové oceli v prostředí se SRB [38]. Při atmosférickém tlaku se korozní rychlost ustálila již po 30 dnech na hodnotě 14 µm a⁻¹ pro sterilní vzorek a 30 µm a⁻¹ pro vzorek inokulovaný. Při tlaku 12 MPa se korozní rychlost ustálila po 300 dnech na hodnotách 11 µm a⁻¹ (sterilní) a 27 µm a⁻¹ (inokulovaný). Vliv tlaku se projevil na době do ustálení a typu korozních produktů, ale korozní rychlost se snížila jen málo a hlavním korozním produktem v inokulovaném prostředí byl mackinawit (FeS). V případě inokulovaného vzorku docházelo k významné lokalizaci korozního napadení a penetrační faktor (průměrná/maximální korozní rychlost na povrchu) se pohyboval kolem 5.

Poškození buněk ionizujícím zářením (IZ) může být jednak přímé, kdy dochází k interakci IZ s danou organickou molekulou anebo nepřímé přes produkty radiolýzy vody. Míra ovlivnění buněk bude záviset jednak na celkové absorbované dávce, ale také na dávkovém příkonu. Na povrchu UOS bude dávkový příkon dán tloušťkou stěny UOS, která odstíní větší část záření. Předběžné výpočty pro český koncept udávají dávkový příkon na povrchu UOS pod 0,4 Gy h⁻¹ [39]. Např.v práci Brown et al. [40] se zabývali vlivem dvou různých dávkových příkonů gama záření 30 Gy h-1 a 0.5 Gy h-1 po dobu 8 týdnů na životnost různých typů bakterií. V prostředí bez organických nutrientů nebyl pozorován žádný vliv IZ na životnost bakterií, naopak Geothrix fermentans a Geobacter sp. byly schopné se množit. Bruhn et al. testovali 22 kmenů při dávkovém příkonu 2 Gy h⁻¹ s celkovou absorbovanou dávkou 4.9 kGy rovněž se žádným dopadem na životnost studovaných organismů [41]. Diósi et al. pozorovali radiosenzitivitu D10 na izoláty z chladicích bazénů a pro anaerobní kmeny byla stanovena jako limitní absorbovaná dávka 2 kGy [2]. Příkladem extremní radiační odolnosti bakterií je Deinococcus radiodurans, která nejeví známky poklesu životaschopnosti ani při absorbovaných dávkách 5 kGy Battista et al. [42].

Na nutnost přítomnosti organických nutrientů upozorňuje [29]. Jejich obsah se většinou sleduje pomocí TOC (total organic carbon) [43,44] a v úložišti pocházejí hlavně z bentonitu [45]. Přestože nutrienty zvyšují obsah bakterií na cca dvojnásobek [31], nejsou pro životnost bakterií nutnou podmínkou.

Oxidačně-redukční potenciál (E_{RED/OX}) se může v bentonitu významně lišit a to především díky proměnlivé koncentraci dusičnanů, které mohou pocházet například ze zemědělské činnosti. E_{RED/OX} se pohyboval v odvzdušněné suspenzi bentonitu Rokle B75 používaném v projektu MPO TIP FR-TI1/362 ("Výzkum vlastností materiálů pro bezpečné ukládání radioaktivních odpadů a vývoj postupů jejich hodnocení") na úrovni -0.4 V/SHE [46], zatímco v bentonitu BaM používané v současnosti pro projekt SO2013-088 ("Výzkum a vývoj ukládacího obalového souboru pro hlubinné ukládání vyhořelého jaderného paliva do stádia realizace vzorku") byl stanoven v pórovém roztoku vysoký obsah dusičnanů (cca 3 mmol dm⁻³), což vedlo k posunu $E_{RED/OX}$ odvzdušněné syntetické bentonitové pórové vody na hodnoty na úrovni +0.15 V/SHE. Počet SRB řádově klesá se zvyšujícím se $E_{\text{RED/OX}}$ [47].

V aerobní fázi uložení jsou hlavním nebezpečím bakterie síru-oxidující (Sulfur oxidizing bacteria – SOB), železo oxidující (Iron oxidizing bacteria – IOB) nebo bakterie produkující Fe komplexující sacharidy (Exopolysaccharide producing bacteria – EPB). Sulfát oxidující bakterie produkují kyselinu sírovou až do pH kolem 1, což má za následek korozi uhlíkové oceli na úrovni 200 μ m a⁻¹ [25]. Není pravděpodobné, že by takto dokázali bakterie okyselit pórový roztok bentonitu, a osídlení povrchu je pravděpodobné až po poklesu teploty povrchu ukládacího obalového souboru, což už v případě evropského konceptu nebude v aerobní fázi. Železo oxidující bakterie působí hlavně na kompaktnost korozních produktů a mohou spolupůsobit s anaerobními bakteriemi v kombinovaném biofilmu.

Aerobní bakterie výrazně urychlí přechod do anoxické fáze uložení. Kyslík je v prostoru úložiště spotřebován:

- korozí ukládacího obalového souboru,
- reakcí s pyritem (FeS₂),
- mikrobiálními mechanismy.

Yang et al. uvádějí modely rychlosti spotřeby kyslíku v granitické vodě pouze na oxidaci FeS_2 po dobu 225 let, v přítomnosti bakterií za 27 let a v případě přítomnosti i organických nutrientů po dobu 4 let [48]. V případě přítomnosti bentonitu pak dojde ke spotřebování kyslíku v přítomnosti bakterií za 1 týden. Choung et al. uvádějí geochemickou spotřebu kyslíku v bentonitu za 300 let, zatímco aerobní bakterie spotřebují kyslík během 35 dní [49].

V anaerobních podmínkách se při korozním mechanismu uplatňují zejména sulfát redukující bakterie (Sulfate reducing bacteria - SRB) a železo redukující bakterie (Iron reducing bacteria - IRB). Pyrit se příliš nerozkládá [50], proto jsou SRB nejvýznamnějším zdrojem iontů HS⁻, případně sulfanu (H₂S), v prostředí úložiště. Jak již bylo zmíněno, zejména v případě mědi se jedná o významný stimulátor korozního napadení a SRB dokážou vytvořit biofilm i na povrchu biocidní mědi [10,51]. Zatímco u čisté mědi nehrozí nebezpečí korozního praskání v prostředí úložiště [52], u uhlíkové oceli je pravděpodobnost tohoto typu napadení výrazně zvýšena v přítomnosti sulfanu či hydrogensulfidových iontů. Tyto ionty snižují pH a působí jako tzv. "rekombinační jed", kdy znesnadňují difúzi adsorbovaných zredukovaných atomů vodíku a tvorbu plynné dvouatomové molekuly. Atomární vodík pak snáze permeuje do hloubky materiálu, kde oslabuje kovovou vazbu mezi atomy konstrukčního materiálu a umožňuje tak snazší porušení nebo se hromadí na krystalografických poruchách a působí značné pnutí v materiálu či dokonce tvoří puchýře díky vysokým tlakům rekombinovaného plynného vodíku. Rozsáhlou práci této tématice věnoval Turnbull [53]. Ve zprávě jsou uvedeny 4 hlavní mechanismy porušení uhlíkové oceli v prostředí sulfidů. První mechanismus v prostředí obsahujícím sulfidy (SSC I) je omezen na značná pnutí, ať už externí či interní v materiálu a nepřichází v prostředí a pro konstrukci úložiště v úvahu. Puchýřování ("blistering") je omezené na velmi kyselá prostředí sulfanu, což rovněž neodpovídá konceptu úložiště. Do úvahy připadají pouze korozní praskání s přispěním intersticiálního vodíku (SSC II) nebo klasické vodíkem vyvolané praskání (HIC).

Vývoj vodíku a schopnost povrchu jej absorbovat by neměl být v úložišti dostatečný pro vznik HIC, a proto je tento typ napadení méně pravděpodobný. Nejpravděpodobnější je napadení mechanismem SSC II, který by ovšem pro svoji iniciaci potřeboval důlek o hloubce 10 mm. K takové situaci může dojít až v horizontu 1000 let. Pravděpodobnost se značně zvýší v případě, že v úložišti bude i po této době vysoká teplota, která značně zvyšuje riziko tohoto typu napadení.

Vliv železo redukujících bakterií (IRB) spočívá hlavně v porušování kompaktnosti korozních produktů a v redukci magnetitu (Fe₃O₄) na korozní produkty s horším ochranným účinkem, jako siderit či "green rust" [54-56]. Tato reakce je však značně energeticky náročná [57,58] a rychlost je značně zvýšena v přítomnosti bakterií obsahujících hydrogenázy (Hydrogen oxidizing bacteria – HOB), [22].

Pitonzo et al. studovali vliv přídavku SRB, IOB a EPB v modelové granitické vodě s agarem na korozní rychlost uhlíkové oceli **[59]**. Ve sterilním prostředí byla po 109 dnech korozní rychlost 30 μ m a⁻¹, s přídavkem IOB 58 μ m a⁻¹, s EPB 71 μ m a⁻¹, se SRB 84 μ m a⁻¹ a při kombinaci všech 3 kmenů 122 μ m a⁻¹. Pík korozní rychlosti byl pozorován vždy mezi 30 a 35 dnem, kdy pravděpodobně došlo k maximálnímu oživení prostředí, ale později už byl povrch blokován biofilmem a korozními produkty.

EXPERIMENTÁLNÍ TECHNIKY PRO STUDIUM MIKROBIÁLNÍ KOROZE

Korozní rychlosti se v dosud publikovaných pracích nejčastěji sledují pomocí hmotnostních úbytků a objemu uvolněného vodíku. Ustálení stacionárního stavu trvá podstatně déle v reálném prostředí bentonitu než v modelových roztocích. Korozní rychlosti v modelových prostředích se u většiny autorů pohybují na úrovni jednotek až desítek µm/rok. Vzhledem ke krátké době experimentů však není jisté, jestli se jedná o finální hodnotu korozní rychlosti ve stacionárním stavu.

Problémem při stanovení korozní rychlosti je v případě hmotnostních úbytků fakt, že se jedná o průměrnou korozní rychlost za celou dobu, a dále nepřesnosti vzniklé nedokonalým mořením. V případě volumetrického sledování vývoje vodíku se jedná sice o kontinuální záznam, nicméně i pokud pomineme nepřesnosti technického charakteru (netěsnost systému, rozpustnost vodíku v roztoku, apod.), je pro stanovení korozní rychlosti nutné znát přesnou stechiometrii korozní rychlosti Nejlepší možností pro kontinuální studium korozní rychlosti jsou rezistometrické sondy, které již jsou pro stu-

Koroze a ochrana materiálu 60(2) 59-67 (2016)

dium korozních jevů v prostředí úložiště používány [46,60,61]. Jedinou nevýhodou této metody je fakt, že dostáváme informaci o maximální hloubce penetrace napadení do materiálu a nikoli průměrnou.

Elektrický signál se nejsnáze monitoruje, proto elektrochemické techniky jsou také vhodné pro kontinuální sledování korozního napadení kovů. Je nutné si uvědomit, že informace je zprostředkovaná a o korozní rychlosti podává pouze nepřímou informaci. Nejčastěji se v korozním inženýrství používá měření lineárního polarizačního odporu (LPR), což je stejnosměrná pomalá polarizace v těsné blízkosti samovolného korozního potenciálu (E_{KOR}). Nicméně je pro stanovení samotné korozní proudové hustoty (j_{KOR}) nutné stanovit Tafelovy konstanty při velkých přepětích, která znehodnotí vzorek. Bez znalosti Tafelových konstant je LPR použitelný hlavně pro porovnávací měření. Polarizační odpor je nepřímo úměrný korozní rychlosti a i když neznáme absolutní hodnoty, zjistíme alespoň, kolikrát se liší korozní rychlost v různých prostředích. Je možné tuto metodu použít i pro hodnocení v rámci mikrobiální koroze [59], ale je nutné zohlednit, že získáváme informaci celého rozhraní, tedy souhrn všech odporů v sérii a polarizační odpor může být překryt odporem elektrolytu v pórech či pomalou migrací rozpuštěných korozních produktů od povrchu.

Mnohem přesnější metodou je elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), která umožňuje detailně popsat i komplikované rozhraní jako je biofilm. Aplikací střídavého signálu v širokém rozmezí frekvencí nám umožňuje při následné analýze celého spektra stanovit přesné hodnoty jednotlivých odporů a kapacit na fázovém rozhraní.



Obr. 1. Nejjednodušší ekvivalentní obvod Randlesova typu pro mikrobiální napadení korozivzdorné oceli [62]

Fig. 1. The simplest equivalent circuit (Randles type) for microbial corrosion of stainless steel [62]

Typy fázových rozhraní a jim odpovídající ekvivalentní obvody se mohou velmi lišit za různých podmínek. EIS se dá použít mi pro monitoring neelektrochemických dějů na povrchu, jako je například depozice proteinu na biomateriálu [63] nebo uvolňování minerálů z dentinu [64]. Stejně tak je EIS vhodná pro studium elektricky inertních biofilmů i v kombinaci s korozním dějem. Bairi et al. (2012) pozorovali při studiu expozice ztavené jednotky obsahující vyhořelé palivo, Zr slitinu a obalovou korozivzdornou ocel v granitické vodě dvou kandidátních úložišť s 2 kmeny bakterií pouze jednoduché rozhraní s jedním RC členem (tzn. paralelně spojený odpor a kondenzátor), viz Obr. 1 [62]. Kapacita kondenzátoru bývá často nahrazena v obvodu prvkem s konstantní fází (constant phase element – CPE), který také bývá označován písmenem Q. Exponent tohoto prvku se pohybuje v rozmezí 0-1 (kdy 1 odpovídá dokonalému kondenzátoru) a je nositelem informace o homogenitě rozložení na povrchu pro daný děj či o možnosti transportního řízení.



Obr. 2. Nejběžnější typ fázového rozhraní s biofilmem a odpovídající ekvivalentní obvody [16]

Fig. 2. The most usual type of biofilm interface and corresponding equivalent circuits [16]

Asi nejčastějším případem je rozhraní pozorované Babautem a Beyenalem (viz Obr. 2), který navrhnul i modifikaci s přidaným kondenzátorem C1 pro případ, kdy je transfer elektronů do biofilmu zprostředkován vodivými výběžky bakterií a ne vodivými korozními produkty [16].

Další variace rozhraní nastínil Li et al. (viz Obr. 3). Varianta b) obsahuje i Warburgovu impedanci, která popisuje transport iontů v biofilmu, c) je situace s biofilmem a lokalizovaným napadením kovového substrátu a varianta d) je biofilm na pasivním substrátu [3].

Jako substráty jsou pro studium mikrobiální koroze používány aktivní kovy, které se účastní dějů na rozhraní s elektrolytem: železo/uhlíková ocel/litina [8,9,11, 15,20,23,65,66], korozivzdorná ocel [4], čistá měď [10,67,68], slitina CuNi30 [5], slitina CuZn30 [69], slitiny hliníku [70-72]. Jako inertní substráty pro studium biofilmů jsou používány hliník [73], platina [74], zlato [18] či "glassy carbon" [75]. Za stejným účelem jsou často využívány i sondy s povlakem inertního Au [19, 76-82] nebo polovodivých oxidů [83]. Sondy jsou výhodné z hlediska kompaktnosti (menších rozměrů a velké relativní ploše) a díky přesné a reprodukovatelné geometrii poskytují i přesnější výsledky.



Obr. 3. Další typy ekvivalentních obvodů pro různá rozhraní kov/biofilm/elektrolyt [3]

Fig. 3. Another types of equivalent circuits for different interfaces metal/biofilm/electrolyte [3]

Aplikované amplitudy perturbačního signálu jsou běžně používány od hodnot 10 mV [9,69] až do 100 mV (Paredes 2013, 2014) [79,81]. Vysoké hodnoty amplitudy jsou vhodné pro studium vlastností silných a kompaktních biofilmů na inertních podkladech. Pro aktivní podklady pro sledování mikrobiální koroze jsou vhodné amplitudy 10-20 mV.

Rozmezí aplikovaných frekvencí je 10 MHz [73] až 1 mHz [69]. Většinou je nabírána širší část spektra 1 kHz – 100 mHz [9], 10 kHz – 1 mHz [69], 100 kHz – – 10 Hz [79], 10 kHz – 10 Hz [78]. Případně po určení rozhodujících frekvencí pro jednotlivé děje je možné použít monitoring na konstantní frekvenci [77]. Informace o biofilmu se nejčastěji nachází na frekvenci kolem 10 Hz [73,79-81]. Pro informace o korozním ději je nutné monitorovat nízké frekvence pod 100 mHz [9,69,71]. Významnou informací může být i posun časové konstanty, která se projeví například posunem maxima fázového posunu [20].

Nejnovějším trendem je pak lokální elektrochemická impedanční spektroskopie (LEIS), která umoňuje sledovat tyto charakteristiky v mikroměřítku a vytvářet mapy elektrochemických vlastností povrchu. Tato metoda byla už použita i pro sledování mikrobiální koroze [11,56,73,84].

Další technikou z portfolia elektrochemických metod jsou potenciodynamická měření. Ta jsou používána pro charakterizaci anodického chování kovu, zejména průrazové křivky bodové koroze [4,62,63,70,85] či kinetiku depolarizačních reakcí na povrchu [63]. Jejich obdobou je cyklická voltametrie, která je více vhodná pro sledování katodických reakcí [56,67], ale lze nalézt uplatnění i pro anodické děje [63].

Pro sledování difúze kyslíku jako řídícího děje korozního mechanismu lze použít rotační elektrody [18]. Ke zvýraznění omezení transportu depolarizačních látek biofilmem a studium jeho kinetiky se často do prostředí přidává ferrikyanid [16,19].

Metoda proudového sledovače (zero resistance ammetry – ZRA) se využívá pro měření proudu v makročlánku. Příkladem může být spojení dvou konstrukčních materiálů (litina/měď) v úložišti a jeho přispění ke korozi litiny [86]. Pomocí ZRA byl sledován i vliv bludných střídavých tellurických proudů na korozi konstrukčních materiálů v úložišti [87].

Pro hodnocení mikrobiální koroze se používá rovněž široké spektrum analytických metod. Křemenné mikrováhy (EQCM) jsou jednou z možností sledovat vývoj biofilmu kontinuálně [88,89]. Nicméně tato metoda je nevhodná do prostředí bentonitu, kde v čase roste botnací tlak, který v podstatě měření, založené na změně rezonanční frekvence krystalu s nárůstem hmotnosti biofilmu, činí nemožným.

Pro studium morfologie povrchu s biofilmem se nejčastěji používají mikroskopické metody s vysokým rozlišením: scanovací elektronový mikroskop (SEM) [4,5,8,10,11,69,90], mikroskopie atomárních sil (AFM) [2-5,10,11] či konfokální mikroskop [90].

Fázové složení korozních produktů na povrchu bývá stanoveno pomocí infračervené spektroskopie (FTIR) [65], Ramanovy spektroskopie [38] nebo rentgenové difrakce (XRD) [69]. Dlouhá vlna infračerveného záření diskriminuje FTIR a Ramana při analýze drobných částic, ale na rozdíl od XRD nejsou omezeny jen na krystalické korozní produkty, ale je možnost analyzovat i amorfní. Pro tenké vrstvy je možno využít spektroskopii fotoelektronů (X-ray photoelectron spectroscopy – XPS) doplněnou o odprašování argonovým svazkem [10,20].

Zajímavé jsou v publikacích některé pomocné metody pro studium mikrobiální koroze a biofilmů. Například modelové biofilmy na bázi želatiny [18] a agaru [91]. Zheng et al. aktivovali povrch elektrod pomocí polypyrrolu pro snazší depozici biofilmu [82]. Pro odstranění bakterií z biofilmu a stanovení vlivu samotného biofilmu bez bakterií (a jejich vlivu na MIC v podobě odběru elektronů či produkce metabolitů) byly použity bakteriofágy [92], antibiotika [72], antibiotika vylučující bakterie [93] či dezinfekční prostředky [78]. Velmi zajímavou, avšak exotickou, metodou je použití síranu z radioaktivní síry S³⁵, která po expozici sloužila jako míra zkorodované mědi, detekovaná ve formě nerozpustných sulfidů na povrchu [36].

Poděkování

Tento příspěvek vznikl v rámci projektu "Výzkumná podpora pro bezpečnostní hodnocení HÚ - Chování UOS pro VJP a RAO/Mikrobiální koroze" podporovaného z prostředků SÚRAO pod číslem PB-2015-ZL-S1411-020-MIC.

LITERATURA

- Zegeye, A., et al., Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite. *Geobiology* 2010, 8 (3), 209-222.
- Diósi, G., et al., Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. *International Biodeterioration* & *Biodegradation* 2003, *51* (2), 151-156.
- Li, F.-s., et al., Corrosion inhibition of stainless steel by a sulfate-reducing bacteria biofilm in seawater. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials* 2012, 19 (8), 717-725.
- Sheng, X., et al., The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. *Corrosion Science* 2007, 49 (5), 2159-2176.
- Yuan, S. J., et al., The Influence of the Marine Aerobic Pseudomonas Strain on the Corrosion of 70/30 Cu-Ni Alloy. *ECS Transactions* 2007, 2 (9), 159-192.
- Mankowski, J.; Szklarska-Smialowska, Z., Studies on accumulation of chloride ions in pits growing during anodic polarization

Corrosion Science 1975, 15, 493-501.

- Suzuki, T., et al., Composition of Anolyte Within Pit Anode of Austenitic Stainless Steels in Chloride Solution. *Corrosion* **1973**, *29*, 18-22.
- Belkaid, S., et al., Effect of biofilm on naval steel corrosion in natural seawater. *Journal of Solid State Electrochemistry* 2010, 15 (3), 525-537.
- Hernández-Gayosso, M. J., et al., Microbial consortium influence upon steel corrosion rate, using the electrochemical impedance spectroscopy technique. *Materials and Corrosion* 2004, 55 (9), 676-683.
- Chen, S., et al., Corrosion behavior of copper under biofilm of sulfate-reducing bacteria. *Corrosion Science* 2014, 87, 407-415.
- Dong, Z. H., et al., Heterogeneous corrosion of mild steel under SRB-biofilm characterised by electrochemical mapping technique. *Corrosion Science* 2011, 53 (9), 2978-2987.
- Xu, P., et al., Chemical and electron microbial influenced corrosion. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2013, 5 (12), 476-481.
- Bergel, A., Recent Advances in Electron Transfer Between Biofilms and Metals. *Advanced Materials Research* 2007, 20/21, 329-334.

 Dinh, H. T., et al., Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* 2004, 427, 829-832.

- 15. Pérez, E. J., et al., Influence of Desulfovibrio sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. *Corrosion Science* **2007**, *49* (9), 3580-3597.
- Babauta, J. T.; Beyenal, H., Mass transfer studies of Geobacter sulfurreducens biofilms on rotating disk electrodes. *Biotechnol Bioeng* 2014, *111* (2), 285-94.
- Deslouis, C.; Tribollet, B., Recent developments in the electro-hydrodynamic (EHD) impedance technique. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2004, *572* (2), 389-398.
- L'Hostis, E., et al., Characterization of Biofilms Formed on Gold in Natural Seawater by Oxygen Diffusion Analysis. *Corrosion* **1997**, *53* (10), 4-10.
- Pires, L., et al., Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor. *Biosens Bioelectron* 2013, 47, 157-63.
- Liu, H., et al., Specification of sulfate reducing bacteria biofilms accumulation effects on corrosion initiation. *Materials and Corrosion* 2007, 58 (1), 44-48.
- King, F., et al., Modelling long term corrosion behaviour of copper canisters in KBS-3 repository. *Corrosion Engineering, Science and Technology* **2011**, *46* (2), 217-222.
- Schutz, M. K., et al., Combined geochemical and electrochemical methodology to quantify corrosion of carbon steel by bacterial activity. *Bioelectrochemistry* 2014, *97*, 61-8.
- Zhang, H., et al., Study of biofilm influenced corrosion on cast iron pipes in reclaimed water. *Applied Surface Science* 2015, 357, 236-247.
- 24. Behrends, T., et al., Implementation of microbial processes in the performance assessment of spent nuclear fuel repositories. *Applied Geochemistry* **2012**, *27* (2), 453-462.
- Féron, D.; Crusset, D., Microbial induced corrosion in French concept of nuclear waste underground disposal. *Corrosion Engineering, Science and Technology* 2014, 49 (6), 540-547.
- King, F., Microbiologically Influenced Corrosion of Nuclear Waste Containers. *Corrosion* 2009, 65 (4), 233-251.
- King, F., Container Materials for the Storage and Disposal of Nuclear Waste. *Corrosion* 2013, 69 (10), 986-1011.
- 28. Supplemental Environmental Impact Statement for a Geologic Repository for the Disposal of Spent Nuclear Fuel and High-Level Radioactive Waste at Yucca Mountain, Nye County, Nevada; DOE/EIS-0250F-S1; 2008.
- 29. Pedersen, K. Microbial features, events and processes in the Swedish final repository for lowand intermediate-level radioactive waste; SKB Technical Report R-01-05; 2001.
- 30. Jolley, D. M., et al., Microbial Impacts to the Near-Field Environment Geochemistry: a model for estimating microbial communities in repository drifts at Yucca Mountain. *Journal of Contaminant Hydrology* **2003**, *62-63*, 553-575.
- Wang, Y.; Francis, A. J., Evaluation of Microbial Activity for Long-Term Performance Assessments of Deep Geologic Nuclear Waste Repositories *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* 2005, 6 (1), 43-50.
- Pedersen, K. Microbial processes in radioactive waste disposal; SKB Technical Report TR-00-04; 2000.
- Mulligan, C., et al., Some effects of microbial activity on the evolution of clay-based buffer properties in underground repositories. *Applied Clay Science* 2009, 42 (3-4), 331-335.
- Fukunaga, S., et al., Investigation of Microorganisms in Bentonite Deposits. *Geomicrobiology Journal* 2005, 22 (7-8), 361-370.

Koroze a ochrana materiálu 60(2) 59-67 (2016)

- 35. Bengtsson, A., et al. Microbial sulphide-producing activity in MX-80 bentonite at 1750 and 2000 kg m⁻³ wet density; SKB Technical Report R-15-05; 2015.
- 36. Masurat, P., et al., Microbial sulphide production in compacted Wyoming bentonite MX-80 under in situ conditions relevant to a repository for high-level radioactive waste. *Applied Clay Science* **2010**, *47* (1-2), 58-64.
- 37. Stroes-Gascoyne, S., Microbial occurrence in bentonitebased buffer, backfill and sealing materials from large-scale experiments at AECL's Underground Research Laboratory. *Applied Clay Science* **2010**, *47* (1-2), 36-42.
- Hajj, H. E., et al., Microbial corrosion of P235GH steel under geological conditions. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 2010, 35 (6-8), 248-253.
- Lovecký, M. Ukládací obalový soubor pro hlubinné úložiště. Výpočet stínění pro palivo Gd-2M.; Škoda JS Ae 15516; 2014.
- Brown, A. R., et al., The impact of gamma radiation on sediment microbial processes. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81 (12), 4014-25.
- Bruhn, D. F., et al., Microbial biofilm growth on irradiated, spent nuclear fuel cladding. *Journal of Nuclear Materials* 2009, 384 (2), 140-145.
- 42. Battista, J. R., et al., Why is Deinococcus radiodurans so resistant to ionizing radiation? *Trends in Microbiology* **1999**, 7 (9), 362-365.
- Lopez-Fernandez, M., et al., Bacterial Diversity in Bentonites, Engineered Barrier for Deep Geological Disposal of Radioactive Wastes. *Microbial Ecology* 2015, 70 (4), 922-935.
- 44. Stroes-Gascoyne, S., et al., Microbial Community Analysis of Opalinus Clay Drill Core Samples from the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland. *Geomicrobiology Journal* 2007, 24 (1), 1-17.
- 45. Stroes-Gascoyne, S.; Gascoyne, M., The Introduction of Microbial Nutrients into A Nuclear Waste Disposal Vault during Excavation and Operation. *Environmental Science* and Technology **1998**, *32* (3), 317-326.
- 46. Stoulil, J., et al., Influence of temperature on corrosion rate and porosity of corrosion products of carbon steel in anoxic bentonite environment. *Journal of Nuclear Materials* 2013, 443 (1-3), 20-25.
- 47. Hallbeck, L.; Pedersen, K., Culture-dependent comparison of microbial diversity in deep granitic groundwater from two sites considered for a Swedish final repository of spent nuclear fuel. *FEMS Microbiol Ecol* **2012**, *81* (1), 66-77.
- 48. Yang, C., et al., Modelling geochemical and microbial consumption of dissolved oxygen after backfilling a high level radiactive waste repository. *Journal of Contaminant Hydrology* **2007**, *93* (1-4), 130-148.
- 49. Choung, S., et al., Biogeochemical changes at early stage after the closure of radioactive waste geological repository in South Korea. *Annals of Nuclear Energy* **2014**, *71*, 6-10.
- King, F. A review of the properties of pyrite and the implications for corrosion of the copper canister; SKB Technical Report TR-13-19; 2013.
- 51. Persson, J., et al. *Microbial incidence on copper and titanium embedded in compacted bentonite clay*; SKB Technical Report R-11-22; 2011.
- 52. King, F. *Stress corrosion cracking of copper canisters*; SKB Technical Report TR-10-04; 2010.

- Turnbull, A. A Review of the Possible Effects of Hydrogen on Lifetime of Carbon Steel Nuclear Waste Canisters; Nagra Technical Report 09-04; 2009.
- 54. Esnault, L., et al., Metallic corrosion processes reactivation sustained by iron-reducing bacteria: Implication on longterm stability of protective layers. *Physics and Chemistry* of the Earth, Parts A/B/C 2011, 36 (17-18), 1624-1629.
- 55. Libert, M., et al., Impact of microbial activity on the radioactive waste disposal: long term prediction of biocorrosion processes. *Bioelectrochemistry* **2014**, *97*, 162-8.
- 56. Moreira, R., et al., Influence of hydrogen-oxidizing bacteria on the corrosion of low carbon steel: Local electrochemical investigations. *Bioelectrochemistry* 2014, *97*, 69-75.
- 57. Amend, J. P.; Shock, E. L., Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25 (2), 175–243.
- 58. Libert, M., et al., Molecular hydrogen: An abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 2011, 36 (17-18), 1616-1623.
- Pitonzo, B. J., et al., Microbiologically Influenced Corrosion Capability of Bacteria Isolated from Yucca Mountain. *Corrosion* 2004, 60 (1), 64-74.
- 60. Kosec, T., et al., Post examination of copper ER sensors exposed to bentonite. *Journal of Nuclear Materials* **2015**, *459*, 306-312.
- 61. Rosborg, B., et al., Corrosion rate of pure copper in an oxic bentonite/saline groundwater environment. *Corrosion Engineering, Science and Technology* **2011**, *46* (2), 148-152.
- 62. Bairi, L. R., et al., Microbially induced corrosion of D9 stainless steel–zirconium metal waste form alloy under simulated geological repository environment. *Corrosion Science* 2012, *61*, 19-27.
- 63. Karimi, S.; Alfantazi, A. M., Electrochemical Corrosion Behavior of Orthopedic Biomaterials in Presence of Human Serum Albumin. *Journal of the Electrochemical Society* 2013, *160* (6), C206-C214.
- 64. Xu, Z., et al., Monitoring bacterial-demineralization of human dentine by electrochemical impedance spectroscopy. *J Dent* 2010, 38 (2), 138-48.
- 65. Beese-Vasbender, P. F., et al., Electrochemical characterization of direct electron uptake in electrical microbially influenced corrosion of iron by the lithoautotrophic SRB Desulfopila corrodens strain IS4. *Electrochimica Acta* 2015, 167, 321-329.
- 66. Castaneda, H.; Benetton, X. D., SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. *Corrosion Science* **2008**, *50* (4), 1169-1183.
- 67. Kuş, E., et al., The effect of different exposure conditions on the biofilm/copper interface. *Corrosion Science* **2007**, *49* (8), 3421-3427.
- Webster, B. J., et al., Microbiologically Influenced Corrosion of Copper in Potable Water Systems—pH Effects. *Corrosion* 2000, 56 (9), 942-950.
- 69. Liu, J., et al., The corrosion behavior of 70/30 copperzinc alloy under the biofilm of sulfate-reducing bacteria. *Materials and Corrosion* **2001**, *52*, 833-837.
- Chang, X., et al., Study of Fe3Al Corrosion Behavior in Simulating Marine Biofilm Environment. *Materials and Manufacturing Processes* 2010, 25 (5), 302-306.

Koroze a ochrana materiálu 60(2) 59-67 (2016)

- Jayaraman, A., et al., Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of copper and aluminum. *Applied Microbiology Biotechnology* 1999, 52, 787±790.
- Zuo, R., et al., The importance of live biofilms in corrosion protection. *Corrosion Science* 2005, 47 (2), 279-287.
- 73. Patel, C., et al., Combined spectrophotometric electrochemical impedance imaging system for biofilm research. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **2005**, *10* (1), 16-23.
- 74. Kim, T., et al., Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. *Water Res* 2011, 45 (15), 4615-22.
- Sridharan, D., et al., Redox behavior of biofilm on glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* 2011, 82 (2), 135-9.
- Estrada-Leypon, O., et al., Simultaneous monitoring of Staphylococcus aureus growth in a multi-parametric microfluidic platform using microscopy and impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry* 2015, 105, 56-64.
- 77. Goncalves, J. J.; Govind, R., Rapid evaluation of biofilm attachment promoters and biofilm growth orientation using a mini-impedimetric device. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2009, 143 (1), 341-348.
- Muñoz-Berbel, X., et al., On-chip impedance measurements to monitor biofilm formation in the drinking water distribution network. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2006, *118* (1-2), 129-134.
- 79. Paredes, J., et al., Comparison of real time impedance monitoring of bacterial biofilm cultures in different experimental setups mimicking real field environments. *Sensors* and Actuators B: Chemical 2014, 195, 667-676.
- Paredes, J., et al., Real time monitoring of the impedance characteristics of Staphylococcal bacterial biofilm cultures with a modified CDC reactor system. *Biosens Bioelectron* 2012, 38 (1), 226-32.
- 81. Paredes, J., et al., Interdigitated microelectrode biosensor for bacterial biofilm growth monitoring by impedance spectroscopy technique in 96-well microtiter plates. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *178*, 663-670.

- 82. Zheng, L. Y., et al., Electrochemical measurements of biofilm development using polypyrrole enhanced flexible sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *182*, 725-732.
- Ben-Yoav, H., et al., An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms. *Electrochimica Acta* 2011, 56 (23), 7780-7786.
- 84. Wang, W., et al., Heterogeneous electrochemical characteristics of biofilm/metal interface and local electrochemical techniques used for this purpose. *Materials and Corrosion* 2009, 60 (12), 957-962.
- 85. Stoulil, J., et al., Corrosion resistance of new powder metallurgy boron-containing stainless steel in the nuclear repository environment. *Materials and Corrosion* **2015**, *66* (4), 342-346.
- Smart, N. R., et al. Galvanic corrosion of copper-cast iron couples; SKB Technical Report TR-05-06; 2005.
- Taxén, C. Possible effects of external electrical fields on the corrosion of copper in bentonite; SKB Technical Report P-11-43; 2011.
- Wang, W., et al., Electrochemical techniques used in MIC studies. *Materials and Corrosion* 2006, 57 (10), 800-804.
- Xie, X. H., et al., EQCM and EIS Study of the Effect of Potential of Zero Charge on Escherichia Coli Biofilm Development. *International Journal of Electrochemical Science* 2010, 5, 1018 - 1025.
- Dheilly, A., et al., Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical impedancemetry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, 79 (1), 157-64.
- Franklin, M. J., et al., Effect of Electrochemical Impedance Spectroscopy on Microbial Biofilm Cell Numbers, Viability, and Activity. *Corrosion* 1991, 47 (7), 519-522.
- 92. Muñoz-Berbel, X., et al., Impedimetric approach for monitoring the formation of biofilms on metallic surfaces and the subsequent application to the detection of bacteriophages. *Electrochimica Acta* **2008**, *53* (19), 5739-5744.
- 93. Zuo, R.; Wood, T. K., Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using gramicidin-S-producing biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 65 (6), 747-53.