

**Н. Р. Демченко, С. В. Приходько, І. М. Курмакова, О. П. Третяк**

Чернігівський державний педагогічний університет імені Т. Г. Шевченка,  
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,  
тел.: 8 (0462) 95 69 88, e-mail: demch@micro.net.ua; kurmakova@mail.ru

## **СУКЦЕСІЯ КОРОЗІЙНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ ПРИ ФОРМУВАННІ БІОПЛІВКИ НА СТАЛІВІЙ ПОВЕРХНІ ЗА ПРИСУТНОСТІ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК**

*Експериментально доведено, що органічні інгібітори корозії з біоцидною дією впливають на динаміку чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі. Присутність четвертинної солі триазолоазепінію та похідного метилкарбамату значно затримує розвиток сульфатвідновлювальних бактерій у біоплівці, яка формується за умов домінування амоніфікувальних та денітрифікувальних бактерій.*

*К л ю ч о в і с л о в а:* корозійне мікробне угруповання, сукцесія, біоплівка, органічні сполуки.

Важливим аспектом у дослідженні мікробної корозії є вивчення формування та функціонування біоплівки, де протікають біоелектрохімічні процеси руйнації металу. Біоплівка як особлива форма організації мікроорганізмів забезпечує фізіологічну та функціональну стабільність корозійного мікробного угруповання та гарантує конкурентне виживання за несприятливих умов [1, 11].

В корозійному мікробному угрупованні при формуванні біоплівки на поверхні металу змінюється якісний та кількісний склад мікроорганізмів, що визначає швидкість мікробної корозії металу [7, 8]. Присутність гетеротрофних бактерій забезпечує формування біоплівки на металевій поверхні за рахунок синтезу екзополімерів, які сприяють стабілізації її структури. Визначено [8], що першими металеву поверхню колонізують амоніфікувальні та денітрифікувальні бактерії, які створюють анаеробні умови для розвитку сульфатвідновлювальних та залізо-відновлювальних бактерій.

Одним із способів інгібування мікробної корозії є введення в агресивне середовище органічних сполук, які одночасно виявляють біоцидну дію щодо корозійно активних мікроорганізмів та гальмують електрохімічну корозію металу [1, 4]. Нами знайдено інгібітори корозії сталі з біоцидними властивостями в ряді четвертинних солей триазолоазепінію [2] та серед хімічних засобів захисту рослин [5, 6, 10]. При цьому сукцесія бактерій агресивного мікробного угруповання біоплівки на поверхні сталі вивчена недостатньо.

Метою роботи було дослідити вплив органічних інгібіторів з біоцидною дією на динаміку чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі.



**Матеріали і методи.** Для проведення досліджень використовували природне корозійно активне мікробне угруповання, яке було виділене нами із феросфери кородуючої поверхні підземного газопроводу методом накопичувальної культури на середовищі Постгейта „В”. Склад мікробного угруповання визначали методом граничних розведень при висіві клітинної суспензії на відповідні рідкі елективні середовища. Сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ) виділяли на середовищі Постгейта „В”, залізовідновлювальні бактерії (ЗВБ) — на середовищі Каліненка, денітрифікувальні бактерії (ДНБ) — на середовищі Гільтая, амоніфікувальні бактерії (АМБ) — на м'ясопептонному бульйоні [9]. Асоціантами домінуючих сульфатвідновлювальних бактерій ( $10^{10}$  кл/мл) в корозійному мікробному угрупованні є денітрифікувальні ( $10^6$  кл/мл), залізовідновлювальні ( $10^7$  кл/мл) та амоніфікувальні ( $10^6$ ) бактерії.

Культивування мікробного угруповання проводили за умов періодичного на суміші рідких середовищ Постгейта „В”, Каліненка, Гільтая, м'ясопептонного бульйону в співвідношенні 5:1; 5:1; 5:1 для забезпечення ефективного розвитку бактерій усіх фізіологічних груп за температури  $28 \pm 2$  °С. Подальшу роботу проведено із зазначеним угрупованням. Кількість корозійно активних бактерій у мікробному угрупованні становила:

СВБ —  $6 \cdot 10^5$  кл/мл, ЗВБ —  $6 \cdot 10^7$  кл/мл, ДНБ та АМБ —  $2,5 \cdot 10^8$  кл/мл.

Аналіз сукцесії корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки без, та за присутності органічних сполук (концентрація 0,1 г/л) на поверхні маловуглецевої сталі вивчали за умов лабораторного експерименту. Досліди проводили в герметичних скляних ємкостях об'ємом 100 мл, які заповнювали зазначеною сумішшю середовищ із внесенням 10 мл суспензії мікробного угруповання (3-х добова культура), в які занурювали підвішені на жилці зразки сталі СтЗпс (площа поверхні 24 см<sup>2</sup>). Зразки знежирювали ацетоном і активували у розчині 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Повторність дослідів трикратна.

Динаміку розвитку мікробної асоціації досліджували при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі за присутності інгібіторів мікробної корозії сталі — четвертинної солі триазолоазепінію та похідного метилкарбамату (діюча речовина пестициду бетанал). Облік бактерій на поверхні маловуглецевої сталі проводили на 3, 6, 9, 24, 48, 72, 168, 240 та 336 годину експозиції. Клітини бактерій біоплівки знімали у фіксований об'єм (40 мл) 0,1N фосфатного буфера (рН 7) за допомогою ультразвуку з частотою 25 кГц (30 сек) двічі з інтервалом 60 сек на приладі УЗМ-003/н. Отриманий змив використовували для приготування розведень.

Визначення чисельності бактерій, що адгезувалися за 3 та 6 годин експозиції, проводили методом висіву із розведень на тверді поживні середовища Каліненка, Гільтая та м'ясопептонний агар, анаеробні сульфатвідновлювальні бактерії виявляли глибинним методом Штурм на агаризованому середовищі Постгейта „В” [9]. Кількість колоній бактерій виражали у колонієутворювальних одиницях (КУО). Титр бактерій у біоплівці після 9, 24, 48, 72, 168, 240 та 336 годин експозиції визначали методом граничних десятикратних розведень при висіві суспензії на відповідні рідкі поживні середовища. Чисельність бактерій перераховували на 1 см<sup>2</sup> поверхні металевого зразка.

### Результати та їх обговорення

Після 3 год експозиції у складі біоплівки, що формувалася без та за присутності органічних речовин, виявлені денітрифікувальні, залізовідновлювальні



та амоніфікувальні бактерії. При цьому домінуючими групами бактерій є АМБ та ДНБ, кількість колонієутворювальних одиниць на  $1 \text{ см}^2$  відповідно складає  $(98,9 \pm 1,6) \cdot 10^3$  та  $(77,1 \pm 0,8) \cdot 10^3$  у контролі,  $(113,1 \pm 1,3) \cdot 10^3$  та  $(103,1 \pm 1,1) \cdot 10^3$  за присутності похідного метилкарбамату  $(126,5 \pm 0,6) \cdot 10^3$  та  $(113,1 \pm 0,5) \cdot 10^3$  за наявності четвертинної солі. Чисельність ЗВБ у досліджених біоплівках практично однакова та становить  $65,4 \cdot 10^3$  -  $71,7 \cdot 10^3$  КУО/см<sup>2</sup>. Співвідношення чисельності ДНБ: ЗВБ: АМБ складає 1,2:1,0:1,5 у контролі, 1,4:1,0:1,6 в досліді з похідним метилкарбамату та 1,7:1,0:1,9 — з четвертинною сіллю триазолоазепінію. Отже, наявність досліджених інгібіторів стимулює ріст денітрифікувальних та амоніфікувальних бактерій у біоплівці.

При збільшенні часу експозиції до 6 годин у контролі чисельність денітрифікувальних та залізовідновлювальних бактерій збільшується в 1,3 рази, а амоніфікувальних бактерій зменшується в 1,4 рази. У досліді з похідним метилкарбамату чисельність ДНБ збільшується у 1,1 рази, а ЗВБ та АМБ зменшується в 9,7 та 1,2 рази. У досліді з четвертинною сіллю триазолоазепінію чисельність ДНБ не змінюється, а ЗВБ та АМБ зменшується в 4,4 та 2,4 рази. Присутність органічних речовин призводить до зміни у кількісному співвідношенні корозійно активних бактерій у складі агресивного угруповання біоплівки. Пригнічення залізовідновлювальних бактерій компенсується значним розвитком денітрифікувальних та амоніфікувальних бактерій, які здатні трансформувати первинні субстрати, створювати анаеробні умови та забезпечувати низький окисно-відновний потенціал [3].

Динаміка чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі при культивуванні від 9 до 336 год наведена на рис. 1 та рис. 2.

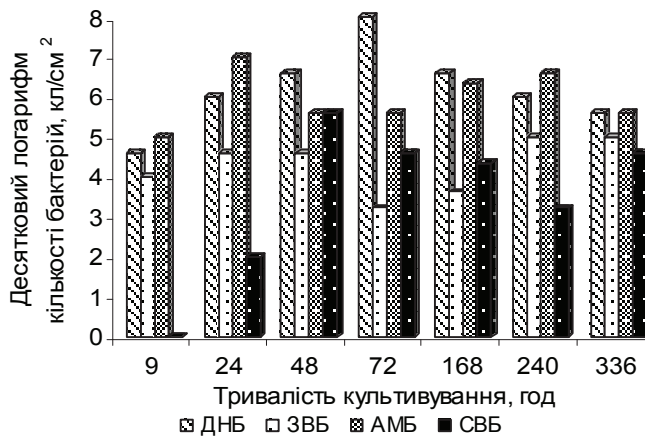


Рис. 1. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі без органічних сполук

Fig. 1. Bacteria quantity dinamica in the biofilm on the low-carbon steel surface without organic compounds

Після 9 та 24 год експозиції в контролі домінують АМБ, після 48, 72 та 168 год — ДНБ, після 240 год знов АМБ, а після 336 год домінування бактерій певної еколого-трофічної групи не спостерігається (рис. 1). Мінімум чисельності залізовідновлювальних бактерій ( $1,7 \cdot 10^3$  кл/см<sup>2</sup>) зафіксовано після 72 год

культивування. Слід відзначити, що сульфатвідновлювальні бактерії — найбільш агресивні бактерії корозійного мікробного угруповання, виявлені у контролі через 24 год експозиції, що узгоджується з [8]. Отже, в результаті сукцесії утворюється корозійно активне угруповання бактерій, яке є чинником біокорозії сталі.

За присутності похідного метилкарбамату при експозиції 9 та 24 год домінують амоніфікувальні бактерії, при 48, 72 та 168 год — денітрифікувальні бактерії, при 240 год чисельність АМБ та ДНБ зрівнюється, а після 336 год — домінують АМБ. Визначено два мінімуми чисельності залізовідновлювальних бактерій — при 24 та 336 год (рис. 2 а). За присутності четвертинної солі при 9, 72 та 168 год домінують ДНБ, а при 24, 48, 240 та 336 год — АМБ. При цьому мінімальна чисельність залізовідновлювальних бактерій у складі біоплівки спостерігається після 24 та 72 год експозиції (рис. 2 б).

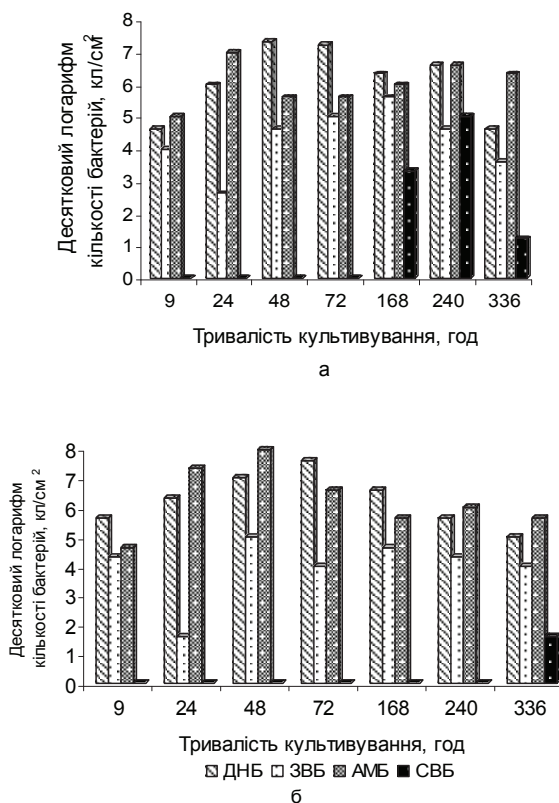


Рис. 2. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі за присутності органічних сполук: а — похідне метилкарбамату, б — четвертинна сіль триазолоазепінію

Fig. 2. Bacteria quantity dinamica in the biofilm on the low-carbon steel surface in the presence of organic compounds: a — derivative methhylcarbamate; b — quaternary salt of triazoloazepinium

У біоплівці, сформованій за присутності похідного метилкарбамату, сульфатвідновлювальні бактерії виявляються через 168 год (рис. 2 а), а за присутності четвертинної солі триазолоазепінію — лише через 336 год експозиції (рис. 2 б). Це може бути пояснено біоцидною дією похідного метилкарбамату та



четвертинної солі триазолоазепінію, що показано нами раніше [2, 6]. При цьому четвертинна сіль має більшу біоцидну дію, що узгоджується з часом початку розвитку СВБ.

За присутності органічних сполук біоплівка формується на поверхні маловуглецевої сталі без участі сульфатвідновлювальних бактерій, що певним чином пояснює інгібувальну дію речовин за умов мікробної корозії: захисний ефект для четвертинної солі триазолоазепінію становить 74,0 %, для похідного метилкарбамату – 71,8 %.

Отже, під час руйнування металу залежно від складу агресивного середовища корозійне мікробне угруповання проходить сукцесійний цикл домінуючих груп бактерій. На кожному етапі сукцесії домінують ті групи бактерій, які найбільшою мірою адаптувалися як до умов існування, так і до трансформації наявного джерела живлення. Домінування бактерій певної фізіологічної групи у мікробному угрупованні створює оптимальні умови для розвитку наступної. Це сприяє взаємовигідному функціонуванню корозійно небезпечних бактерій у мікробній сукупності. Експериментально доведено, що четвертинна сіль триазолоазепінію та похідне метилкарбамату з біоцидною дією щодо СВБ впливають на динаміку чисельності бактерій корозійного мікробного угруповання при формуванні біоплівки на поверхні маловуглецевої сталі. Присутність органічних речовин значно затримує розвиток сульфатвідновлювальних бактерій у біоплівці, яка формується за умов домінування амоніфікувальних і денітрифікувальних бактерій та забезпечує захист сталі від мікробної корозії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Андреев К.І., Козлова І. П., Коптева Ж. П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В. В., Пуриш Л. М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 259 с.
2. Демченко Н. Р., Курмакова І. М., Третяк О. П. Біоцидна дія четвертинних триазолоазепінієвих солей на корозійно небезпечні мікробні угруповання // Науковий вісник Ужгородського університету. – Серія Біологія. – Вип. 20, 2007. – С. 18-21.
3. Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. Введение в природоведческую микробиологию. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2001. – 255 с.
4. *Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений.* Справочник в 2 т. / Под ред А. А. Герасименко. – М.: Машиностроение, 1987. – Т. 2. – 784 с.
5. Курмакова И. Н., Третяк А. П., Лохова В. И., Смыкун Н. В. Пестициды как ингибиторы биокоррозии // Экотехнологии и ресурсосбережение. – 2000. – № 2. – С. 14-17.
6. Курмакова І., Приходько С., Демченко Н., Третяк О. Пестициди як антропогенний фактор біопшкодження сталі у ґрунті // Фізико-хімічна механіка матеріалів. – 2008. – Спец. вип. № 7. – С. 634-638.
7. Протасова М. О., Лазарев В. Г., Козлова І. П. Дослідження структури біоплівок, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях // Мікробіол. журн. – 2006. – Т. 68, № 5. – С. 80-86.
8. Пуриш Л. М., Асауленко Л. Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфидогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Мікробіол. журн. – 2007. – Т. 69, № 6. – С. 19-25.
9. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Ленинград: Наука, 1974. – 196 с.
10. Смыкун Н. В., Третяк А. П., Курмакова И. Н. Анतिकоррозионное действие некоторых пестицидов в условиях почвенной коррозии // Мікробіол. журн. – 2001. – Т. 63, № 4. – С. 85-90.
11. Lewandowski Z. Structure and function of bacterial biofilms // Biofilms: recent advances in their study and control / Ed. by L. V. Evans. – Haywood: Haywood Acad. publ., 2000. – P. 2-17.



**Н. Р. Демченко, С. В. Приходько, І. М. Курмакова, А. П. Третяк**

Черниговский государственный педагогический университет  
имени Т. Г. Шевченко

ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,  
тел.: 8 (0462) 95 69 88, e-mail: demch@micro.net.ua; kurmakova@mail.ru

## **СУКЦЕССИЯ КОРРОЗИОННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНКИ НА СТАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

### **Реферат**

Показана сукцессия коррозионного микробного сообщества биопленки при разрушении стали. Экспериментально установлено, что органические вещества с биоцидным действием по отношению к сульфатовосстанавливающим бактериям влияют на динамику численности микроорганизмов коррозионного микробного сообщества при формировании биопленки на поверхности малоуглеродистой стали. Присутствие четвертичной соли триазолоазепиния и производного метилкарбамата значительно задерживает развитие сульфатовосстанавливающих бактерий в биопленке, которая формируется при доминировании аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий, и обеспечивает защиту стали от микробной коррозии.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** коррозионное микробное сообщество, сукцессия, биопленка, органические соединения.

**N. R. Demchenko, S. V. Prichodko, I. N. Kurmakova, A. P. Tretyak**

Chernihiv Shevchenko State Pedagogical University  
Getman Polubotok Str., 53, Chernihiv, 14013, Ukraine

## **SUCCESSION OF CORROSION MICROBIAL ASSOCIATION AT BIOFILM FORMING ON THE STEEL SURFACE IN THE PRESENCE OF ORGANIC COMPOUNDS**

### **Summary**

The succession of corrosive microbial association of biofilm at steel destruction is shown. It is experimentally determined that organic compounds with biocide action influence on the dynamics of bacteria quantity corrosive microbial association at forming of biofilm on the low-carbon steel surface. The presence of quaternary salt of triazoloazepinium and derivative methylcarbamate considerably detains the development of sulphate-restored bacteria in biofilm, formed under condition of dominance of ammonifying and denitrifying bacteria and provides protection of steel from microbial corrosion.

**К e y w o r d s:** corrosion microbial association, successions, biofilm, organic compounds.

