

УДК 579.66

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ БИОХИМИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩУЮ РАСТРОВУЮ ЭЛЕКТРОННУЮ МИКРОСКОПИЮ¹

© 2006 О.В. Зайцева, Н.А. Кленова², О.И.Бородина, А.В. Йоффе, Т.В. Тетюева³

Была разработана комплексная методика исследования биопленки сульфатредуцирующих бактерий для оценки влияния легирующих элементов на стойкость стали к биокоррозии. Обнаружено повышение стойкости сталей, легированных церием, к биокоррозии.

Введение

В настоящее время большинство случаев коррозии оборудования в нефтегазовой отрасли вызывается активизацией жизнедеятельности бактерий [1]. Исследования в этой области ведутся с установления в 1934 году воздействия сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) на коррозионное повреждение металлов [2]. Но опасными в коррозионном отношении являются адгезированные формы СРБ, которые могут прикрепляться к шероховатой поверхности металла. Одним из традиционных способов борьбы с бактериями является применение бактерицидов, однако этот метод не всегда эффективен, т.к. участки локализации СРБ покрыты осадками продуктов коррозии (рис.1).

Поэтому **задачей** данного исследования было изучение влияния химического состава низкоуглеродистых трубных сталей на стойкость к биокоррозии. Химический состав стали двояко влияет на ее стойкость по отношению к коррозии. Некоторые легирующие элементы существенно снижают стойкость стали к бактериальной коррозии, в то время как другие элементы, являясь компонентами питания бактерий, могут увеличивать бактериальную коррозию [3].

Для решения поставленной задачи мы разработали методику, включающую наряду с традиционными биохимическими и микробиологическими методами анализа биопленки высокоразрешающую растровую электронную микроскопию.

¹ Представлена доктором биологических наук профессором О.Н. Макуриной.

² Зайцева Ольга Владимировна (zaytseva_o@eor.samara.ru), Кленова Наталья Анатольевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

³ Бородина Ольга Ивановна, Йоффе Андрей Вячеславович (ioffe@eor.samara.ru), Тетюева Тамара Викторовна, ЗАО «Самарский инженерно-технический центр», 443001, Россия, г. Самара, ул. Ярмарочная, 49.

Этапы проведения эксперимента

На первом этапе наших исследований проводились испытания стали различных марок во флаконах с питательной средой Постгейта С, зараженной музейными культурами СРБ (рис. 2).



Рис. 1. Внешний вид язвы с продуктами коррозии на внутренней стенке трубы

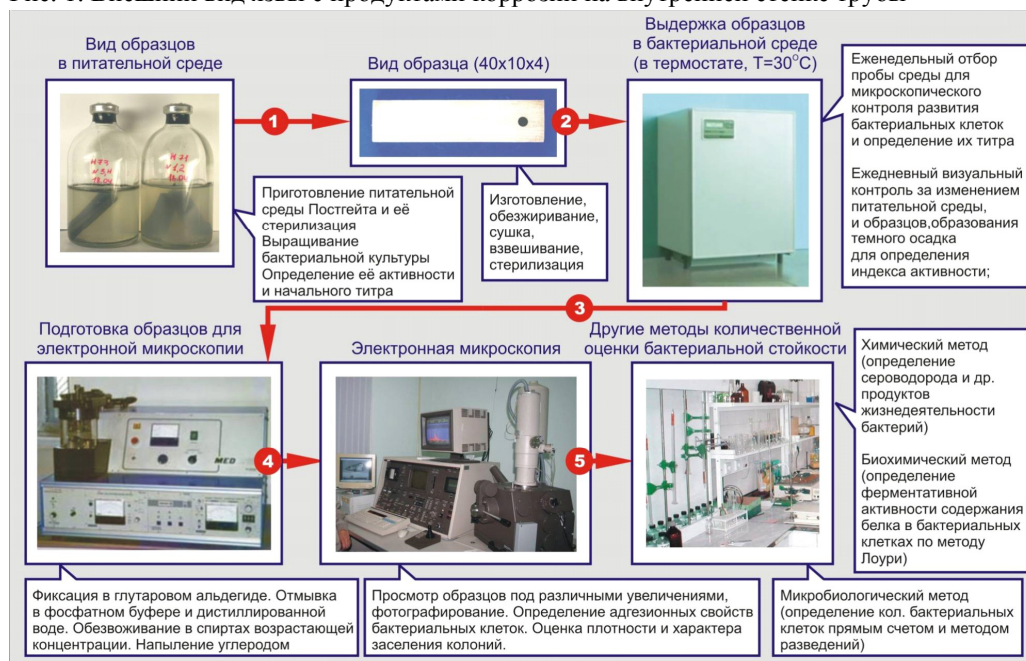


Рис. 2. Этапы проведения испытаний стали на стойкость в среде СРБ

Образцы стали предварительно обезжиривали в ацетоне и обтирали со всех сторон х/б тканью. Флаконы закрывали плотными резиновыми пробками, которые сверху обжимали металлическими колпачками. Инкубацию флаконов проводили при 30°C в термостате в течение 2-х недель. Далее образцы с биопленками исследовали биохимическими методами. Для этого определяли белок в

био пленках по методу Лоури и содержание сероводорода в среде йодометрическим титрованием.

В литературе имеются данные по влиянию легирующих элементов на жизнедеятельность СРБ, но эти данные не систематичны и немногочисленны [3,4].

Для изучения плотности и характера заселения колониями био пленки использовали высокоразрешающую электронную микроскопию. Для электронной микроскопии нами была разработана технология фиксации био пленки на поверхности образца в глутаровом альдегиде, и в дальнейшем образцы напыляли углем в вакуумном посту и просматривали в электронном микроскопе при разных увеличениях. Производили подсчет среднего числа бактериальных клеток на единицу площади био пленки, просматривая 25 случайных полей зрения.

Объектами нашего исследования являлись стали с системой легирования Fe-Mn (09Г2С и 17Г1С), традиционно применяемые в нефтегазовой отрасли, и с системой легирования Fe-Cr (13ХФА), дополнительно модифицированные церием в трех различных концентрациях (35, 75 и 199 ppm) (табл. 1).

Таблица 1

Химический состав сталей, масс %

Сталь	C	Si	Mn	Cr	Ni	Cu	Al	V	P	S	Ce
09Г2С	0,11	0,65	1,45	0,05	0,05	0,05	-	-	0,015	0,015	-
17Г1С	0,18	0,47	1,24	0,03	0,02	0,02	0,04	-	0,011	0,006	-
13ХФА	0,14	0,18	0,52	0,63	0,06	0,06	0,003	0,06	0,018	0,013	0,0035
13ХФА	0,14	0,18	0,52	0,63	0,06	0,06	0,003	0,06	0,018	0,013	0,0075
13ХФА	0,14	0,18	0,52	0,63	0,06	0,06	0,003	0,06	0,018	0,013	0,0199

Результаты и обсуждение

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что стали с системой легирования Fe-Mn, традиционно применяемые в промышленности, являются нестойкими к бактериальной коррозии. Количество белка в био пленке на этих сталях и количество сероводорода в среде культивирования являются на этих сталях максимальными (табл. 2), что также подтверждается данными электронной микроскопии. Количество бактериальных клеток в био пленке было максимальным на данных сталях по сравнению со всеми исследованными (рис. 3).

Био пленка СРБ на сталях с системой легирования Fe-Cr, модифицированных церием в концентрации 199 ppm, располагается лишь небольшими участками и состоит из сравнительно небольшого числа одиночных клеток, поэтому эти стали обладают более высокой стойкостью к бактериальной коррозии по сравнению с традиционно применяемыми сталями 09Г2С и 17 Г1С, на которых био пленка располагается сплошным слоем и содержит в несколько раз больше бактерий. Количество бактериальных клеток уменьшается с увеличением концентрации церия в металле. Это подтверждается данными по белку и сероводороду. Концентрации белка в био пленке и сероводорода в среде уменьшаются при уве-

личении концентрации церия в сплаве. Это можно объяснить с нескольких позиций:

1. В литературе имеются данные по влиянию церия на микроструктуру, химическую и термическую стабильность включений.

Таблица 2

Зависимость количества СРБ в биопленке (по белку и сероводороду) от содержания церия после двух недель экспозиции

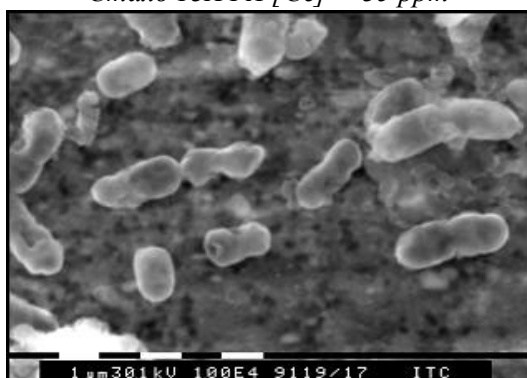
Марка стали	Массовая доля Се в стали, %	Среднее количество бактерий в биопленке, кл/100 мкм ²	Количество белка в биопленке, мкг/мл	Концентрация сульфидов в среде культивирования, мг/л
13ХФА	0,0035	71±4,2	177±15,4	16±1,8
	0,0075	62±3,1	56±2,9	12±0,7
	0,0199	6±0,3	29±1,5	9±0,5
09Г2С	–	97±5,2	265±19,6	18±1,9
17Г1С	–	112±8,5	281±20,2	20±2,0



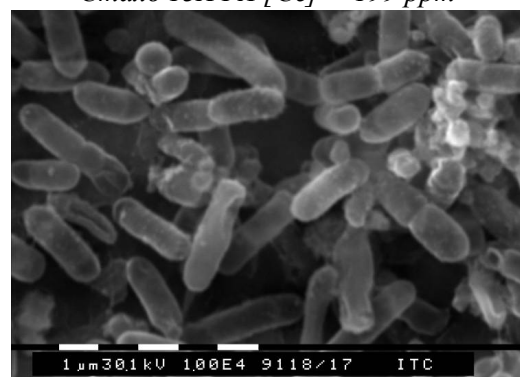
Сталь 13ХФА [Ce] = 35 ppm



Сталь 13ХФА [Ce] = 199 ppm



Сталь 13ХФА [Ce] = 75 ppm



Сталь 09Г2С

Рис. 3. Вид биопленки СРБ на образцах различных марок стали (электронная микроскопия, увеличение 10000)

По мнению Walsh W. Daniel и других ученых [3], прикрепление бактериальных клеток к поверхности стали зависит от формы включений стали. Стали, содержащие церий, как при высоком, так и при низком содержании серы содержат сульфидные включения с высокой степенью округлости и обычно меньшего размера. Стали с низким содержанием церия содержат сульфидные включения продолговатой формы. Плотность этих включений и степень их вытянутости зависят от уровня серы, присутствующей в каждом образце стали. Увеличение содержания серы вызывает изменения в объеме включения (становятся более длинными) и увеличивает пластичность. По данным авторов статьи [3], именно микроструктура стали является в большинстве случаев определяющим фактором в инициации биокоррозии: стали, легированные церием, становятся менее доступными для прикрепления к ним бактериальных клеток из-за малой площади включений. Однако мы вынуждены не согласиться с данным объяснением механизма воздействия церия на развитие процесса биологической коррозии. Большинство трубных сталей в начале эксплуатации в нефтяной промышленности сразу же покрывается слоем сульфидов железа. Следовательно, бактерии образуют биопленку поверх этого сульфидного слоя и непосредственно первое время не контактируют с поверхностью стали. Поэтому только изменением формы сульфидных включений в металле невозможно объяснить механизмы адгезии СРБ на сталях и снижение адгезивных свойств СРБ при введении церия во включения в металле.

2. По данным, полученным нами в результате экспериментов, введение церия во включения наряду с микроструктурой стали изменяет адгезивные свойства СРБ по отношению к поверхности металла. С одной стороны, включения становятся достаточно мелкими для прикрепления к ним бактериальных клеток, но, с другой стороны, церий, действуя на бактериальные клетки, изменяет их способность прикрепляться к поверхности металла. Возможно, церий действует как бактериостат и предотвращает рост бактериальных клеток на поверхности сталей, модифицированных церием. Однако механизм прикрепления бактерий к поверхности металла практически не изучен и требует дальнейших исследований.

Таким образом, микролегирование церием представляет интерес для повышения долговечности трубопроводов.

Выводы:

1. Установлено, что стойкость стали к биокоррозии зависит от химического состава стали.
2. Стали с системой легирования Fe-Mn (09Г2С и 17Г1С) являются нестойкими к бактериальной коррозии, о чем свидетельствует высокая плотность заселения колоний биопленки СРБ, адгезирующих на поверхности образцов стали.

3. Стали с системой легирования Fe-Cr, модифицированные церием, являются устойчивыми к бактериальной коррозии, т.к. адгезионные свойства СРБ уменьшаются при увеличении концентрации церия в сплаве.

Литература

- [1] Андреюк, Е.И. Литотрофные бактерии и микробиологическая коррозия / Е.И. Андреюк, И.А. Козлова; – Киев: Наукова думка, 1977. – 163 с.
- [2] Wolzogen, A. Graphitization of Cast Iron as an Electrobiochemical Process in Anaerobic Soil / A. Wolzogen, A. Kuhr // Water (Neth). – 1934. №18. – P. 147-158.
- [3] Walsh, W.D. The implications of thermomechanical processing for microbiologically influenced corrosion / D.W. Walsh // Corrosion. – 1999. Paper №188.
- [4] Lee, W. Corrosion of Mild Steel Under Anaerobic Biofilm / W. Lee, W.G. Characklis // Corrosion. – March, 1993. – P. 186-199.

Поступила в редакцию 29/IX/2006;
в окончательном варианте – 4/X/2006.

A COMPLEX TECHNIQUE BIOFILM ANALYSIS INCLUDING BIOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION METHODS AND HIGHRESOLUTION RASTER ELECTRONIC MICROSCOPY⁴

© 2006 O.V. Zaytseva, N.A. Klenova⁵, O.I. Borodina, A.V. Ioffe, T.V. Tetyueva⁶

The complex technique biofilm analysis of sulfat reducing bacteria are proposed for the estimation of the alloying elements effect on carbon steel susceptibility to microbiologically influenced corrosion (MIC). The increase in stability of cerium alloyed steel to MIC is found.

Paper received 29/IX/2006.

Paper accepted 4/X/2006.

⁴ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Makurina.

⁵ Zaytseva Olga Vladimirovna (zaytseva_o@eor.samara.ru), Klenova Natal'ya Anatol'yevna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶ Borodina Olga Ivanovna, Ioffe Andrey Vyacheslavovich (ioffe@eor.samara.ru), Tetyueva Tamara Victorovna, Samara Technical Centre, Samara, 443001, Russia.