

На правах рукописи



Зайцева Ольга Владимировна

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ
СТАЛЕЙ К КОРРОЗИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУЛЬ-
ФАТРЕДУКЦИЕЙ, И ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ КОРРОЗИОННОЙ УС-
ТОЙЧИВОСТИ НЕФТЕГАЗОВОГО ОБОРУДОВАНИЯ

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2009

Работа выполнена на кафедре биохимии ГОУ ВПО «Самарский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Кленова Н.А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор Чемерис А.В.

доктор биологических наук, профессор Еремец В.И.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Защита состоится «19» июня 2009 г. в 14-00 часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, д. 69.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте: <http://www.anrb.ru/inbio/sovet.html>

Автореферат разослан «19» мая 2009 года

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук, доцент



Уразгильдин Р.В.

Актуальность проблемы. В настоящее время в связи с использованием вторичных методов добычи нефти, которые заключаются в заводнении нефтяных пластов поверхностными водами для поддержания пластового давления, наблюдается активизация жизнедеятельности сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ). СВБ являются уникальной физиологической группой, получающей энергию в процессе сульфатного дыхания. В результате этого процесса выделяется сероводород, который вызывает интенсивную коррозию нефтегазового оборудования [NACE, 2004, Lee, 1993, Чугунов, 2002].

По оценкам специалистов нефтегазовой промышленности, биокоррозия является причиной от 20 до 80% аварийных случаев в нефтегазовом комплексе, которые приводят к экономическим потерям и ухудшению экологической обстановки [Асфандияров, 1983].

Распространенный способ борьбы с биокоррозией с помощью бактерицидов оказывается малоэффективным, поскольку СВБ прочно адгезируются на поверхности металла и формируют биопленки, покрытые шламом и продуктами коррозии [Сабилова, 1986].

Немногочисленные литературные данные [Geesey, 1996, Walsh, 1993] свидетельствуют о зависимости устойчивости стали к биокоррозии от ее химического состава. Химический состав стали двояко влияет на стойкость стали по отношению к коррозии. Некоторые легирующие элементы существенно повышают стойкость стали к бактериальной коррозии, в то время как другие элементы, являясь потенциальными компонентами питания бактерий, могут увеличивать бактериальную коррозию.

На наш взгляд, одним из возможных путей снижения степени биокоррозии или ее предотвращения, может быть изменение химического состава трубных и конструкционных сплавов. В этой связи, представляется перспективным для легирования трубных сплавов поиск химических элементов, ингибирующих рост коррозионноопасных бактерий и одновременно предотвращающих их адсорбцию на поверхности металлов.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования было изучение коррозионной активности микрофлоры нефтяных месторождений с целью выбора тест-культуры для оценки устойчивости стали к биокоррозии и разработки биотехнологической концепции повышения устойчивости конструкционных сплавов.

В рамках поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1) изучить коррозионноопасную микрофлору некоторых нефтяных месторождений, выделить, охарактеризовать и отобрать накопительные культуры сульфатвосстанавливающих бактерий в качестве тест-объекта оценки коррозионной устойчивости стали;

2) исследовать адгезивные свойства клеток накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения;

3) изучить влияние ионов хрома и редкоземельных элементов в составе сред культивирования на рост, активность процесса сульфатредукции и дегидрогеназную активность накопительной культуры СВБ, выделенной из Приоб-

ского нефтяного месторождения;

4) изучить адсорбцию редкоземельных элементов церия и лантана на клетках накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения;

5) оценить влияние содержания хрома и некоторых редкоземельных металлов в стали на рост на поверхности стали биопленки накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

Научная новизна. Впервые выделена и охарактеризована коррозионно-опасная микрофлора Приобского нефтяного месторождения.

Впервые изучено влияние разных концентраций ионов хрома в среде культивирования на рост накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

Впервые исследовано влияние содержания хрома и редкоземельных элементов в стали на рост на поверхности стали и показатели метаболизма биопленки накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

Впервые оценено влияние разных концентраций редкоземельных элементов в среде культивирования на рост и показатели метаболизма накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

Впервые изучена адсорбция редкоземельных элементов на клетках накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения и исследована сила адгезии клеток данной культуры к поверхности стекла.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведен мониторинг нескольких нефтяных месторождений, в ходе которого получены данные по численности коррозионноопасной микрофлоры в исследованных месторождениях.

Обоснован выбор накопительной культуры Приобского нефтяного месторождения в качестве биотеста для оценки коррозионной устойчивости сталей. Выявлено, что по силе адгезии предложенная накопительная культура СВБ на несколько порядков превосходит музейные культуры.

Установлено, что введение редкоземельных элементов и хрома в трубный сплав повышает стойкость стали к биокоррозии наряду с улучшением механических характеристик.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хлорид хрома (III) оказывает небольшое стимулирующее действие, тогда как хромат (VI) и бихромат (VI) калия оказывают дозозависимое бактериостатическое действие на рост и показатели метаболизма накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

2. Введение хрома в сталь наряду с улучшением механических свойств повышает стойкость к бактериальной коррозии, вызываемой накопительной культурой СВБ.

3. Установлена зависимость между составом стали и развитием на ее поверхности биопленки сульфатовосстанавливающих бактерий. Введение церия во включения наряду с микроструктурой стали изменяет адгезивные свойства

СВБ по отношению к поверхности стали.

4. Количество клеток, содержание белка и дегидрогеназная активность СВБ в биопленке, а также скорость коррозии стали значительно ниже на сталях, модифицированных церием. Наибольшие показатели наблюдались на сталях с системой легирования Fe–Mn.

5. Установлено, что лишь довольно высокие концентрации редкоземельных элементов церия и лантана (0,05% и выше) могут полностью ингибировать рост накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

6. Установлено, что силы адгезии к поверхности субстратов музейной культуры СВБ и накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, на несколько порядков превышают силы адгезии многих других культур бактерий, что может служить основой для объяснения высокой коррозионной опасности адгезированных форм сульфатвосстанавливающих бактерий.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научно-практической конференции «Проблемы и методы обеспечения надежности и безопасности систем транспорта нефти, нефтепродуктов и газа» (Уфа, 2006), молодежной научной конференции «Актуальные проблемы экологии Волжского бассейна» (Тольятти, 2007), на третьей международной научно-технической конференции «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов ELPIT 2007» (Тольятти, 2007), XII международной конференции «Окружающая среда для нас и будущих поколений» (Самара, 2007), IV Всероссийской научно-практической конференции «Нефтегазовые и химические технологии» (Самара, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из которых 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка использованных источников и приложений. Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 21 рисунок, 6 приложений. Библиографический список содержит 178 наименований, в том числе 97 иностранных изданий.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом изучения послужили три физиологические группы коррозионноопасных бактерий: тионовые бактерии, сульфатвосстанавливающие и углеводородокисляющие бактерии. Накопительные культуры данных трех групп бактерий были выделены на специфических селективных средах как из продуктов коррозионных отложений, так и из пластовых вод. На основе микробиологических посевов и значений индексов активности культура СВБ из Приобского нефтяного месторождения была определена как наиболее активная и все дальнейшие исследования проводили в среде с данной культурой. Данная культура СВБ является накопительной, и в ходе биохимических и микробиологических тестов был определен ее приблизительный состав и соответственно ему

были подобраны следующие виды музейных культур бактерий: *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfotomaculum sp.*, *Desulfobacter sp.*

Также объектами 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 (0,0035, 0,0075 и 0,0199 %) и модифицированные кальцием, а также стали 08ХМЧА и 15Х5М с повышенным содержанием хрома. Размер образцов стали составлял 40×10×4 мм.

Состав микробного сообщества пластовых вод анализировали путем посева на жидкие питательные среды для выявления отдельных физиологических групп микроорганизмов. СВБ определяли на жидкой среде Постгейта С с лактатом кальция (3,5 г/л) в качестве донора электронов. Количество хлористого натрия варьировали в зависимости от состава пластовых вод от 10 до 60 г/л. Зараженные 1 мл пластовых вод среды инкубировали в анаэроостате АЭ-01. Анаэроостат помещали в термостат при 30 °С.

Тионовых бактерий (ТБ) определяли на жидкой минеральной среде с тиосульфатом. Флаконы инкубировали в термостате при 30 °С.

Углеводородокисляющих бактерий (УОБ) определяли на среде Раймонда с нефтью. Флаконы инкубировали в термостате при 30 °С.

Учет бактерий вели как по продуктам жизнедеятельности, характерным для той или иной физиологической группы, так и по микроскопии бактерий в световом микроскопе Karl Zeiss (Германия) при увеличении 1600 раз с иммерсией.

Для ориентировочной оценки количества бактерий в среде использовали индекс активности, который рассчитывали по формуле:

$$I = \frac{100}{a}$$

где а – время (сутки) появления черного осадка, бактериальной мути или изменения цвета среды с момента посева пробы.

Для уточненной количественной оценки бактерий в среде использовали метод предельных разведений.

Для определения влияния различных соединений хрома на рост выделенной культуры сульфатвосстанавливающих бактерий, в колбы со средой Постгейта С, зараженной накопительной культурой СВБ, добавляли растворы хлорида хрома (III), хромата (VI) калия и бихромата (VI) калия. Конечные концентрации хлорида хрома (III) в среде составляли 0,205 и 0,410 мг/мл, хромата (VI) калия – 0,261 и 0,522 мг/мл, бихромата (VI) калия – 0,415 и 0,830 мг/мл. Колбы инкубировали в анаэроостате при 30 °С в течение 7 суток. После инкубации определяли концентрации сероводорода в среде методом Пахмайера, белка в среде методом Лоури и дегидрогеназную активность спектрофотометрически по реакции образования формазана. Для удобства сравнения полученных результатов определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК – минимальная концентрация, при которой рост популяции снижается на 50%).

Определение влияния химического состава стали на скорость ее коррозии в среде СВБ проводили путем инкубации образцов стали во флаконах, зараженных культурами сульфатвосстанавливающих бактерий. Через две недели инкубации образцы стали с биопленками подвергали изучению биохимическими методами. Для изучения плотности и характера заселения колониями биопленки использовали высокоразрешающую растровую электронную микроскопию. Производили подсчет среднего числа клеток на единицу площади образца, просматривая 25 случайных полей зрения.

Коррозионную активность СВБ определяли весовым методом (по потере массы стали).

Антибактериальные свойства соединений церия и лантана изучали путем инкубации накопительной культуры СВБ с данными соединениями в конечных концентрациях 0,0063 – 0,3%.

Измерение адсорбционных свойств клеточных стенок СВБ к редкоземельным элементам проводили на энергодисперсионном рентгенофлуоресцентном анализаторе БРА-18.

Определение сил адгезии накопительной и музейных культур СВБ к твердым поверхностям проводили по методу центрифугального отрыва [Звягинцев, 1973].

При математической обработке результатов использовали критерий Стьюдента. Достоверными считали различия с уровнем значимости 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. МОНИТОРИНГ НЕФТЯНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПРОДУКТОВ КОРРОЗИИ ПРИОБСКОГО НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

1.1. Мониторинг нефтяных месторождений

На предмет бактериального заражения нами были обследованы три нефтяных месторождения: Зимняя Ставка (Ставропольский край), Приобское (Нефтеюганск), Дмитровское (Самарская область).

Исследованные месторождения резко различаются по составу пластовых вод, но во всех трех месторождениях основным способом интенсификации добычи нефти является заводнение, так как коллекторы низкопроницаемы.

По химическому составу пластовые воды Дмитровского месторождения относятся к хлоркальциевому типу, имеют минерализацию 244,62 г/л. Пластовые воды Приобского нефтяного месторождения относятся к гидрокарбонатно-натриевому типу, имеют минерализацию 24,3 г/л. Пластовые воды месторождения Зимняя Ставка относятся к хлоркальциевому типу, имеют минерализацию 85,5 г/л.

Нами были исследованы три физиологические группы микроорганизмов, которые мы выделяли как из пластовых вод каждого месторождения, так и из продуктов коррозии, собранных со стенок трубопроводов, вышедших из строя. Это тионовые бактерии, углеводородокисляющие и сульфатвосстанавливаю-

шие, а также определялась численность сапрофитных бактерий, растущих на МПА (табл. 1).

Таблица 1

Микробный состав продуктов коррозии разных месторождений (2005 г.)

Название месторождения	Численность сапротрофных бактерий на МПБ, кл/г продуктов коррозии	Группа тионовых бактерий, кл/г продуктов коррозии	Группа углеводородокисляющих бактерий, кл/г продуктов коррозии	Группа сульфатовосстанавливающих бактерий, кл/г продуктов коррозии
Дмитровское, Самарская область	10^4	10^2	10	10^2
Зимняя Ставка, Ставропольский край	10^6	10^6	10^2	10^6
Приобское, Нефтеюганск	10^6	10^6	10^2	10^7

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что Приобское месторождение и Зимняя Ставка содержат огромное количество коррозионно-опасных бактерий, среди которых преобладают представители тионовых бактерий и СВБ. Причем наибольшее количество СВБ сосредоточено в продуктах коррозионных отложений на стенках труб. Поэтому скорость коррозии трубопроводов на данных месторождениях очень высокая и трубы выходят из строя через 6-8 месяцев после начала эксплуатации. Большинство труб на данных месторождениях выплавлены из стали марок 09Г2С и 17Г1С, которые обладают низкой коррозионной стойкостью. Высокая минерализация вод Дмитровского месторождения предотвращает развитие коррозионноопасной микрофлоры в данном месторождении.

1.2. Характеристика накопительной культуры СВБ, выделенной из продуктов коррозии Приобского нефтяного месторождения

Для определения видового состава СВБ, присутствующих в коррозионных отложениях Приобского нефтяного месторождения, и изучения особенностей их метаболизма был произведен посев продуктов коррозии на среду Постгейта С с различными органическими субстратами: лактатом натрия (4 г/л), ацетатом натрия (1,5 г/л), бензоатом натрия (1 г/л), этанолом (5 мл/л). Производили учет численности СВБ и содержание сероводорода в конечных разведениях (табл. 2). Также для более четкого разграничения родов данной накопительной культуры проводили окрашивание клеток по Граму и изучали их внешние морфологические признаки (форму клетки и размеры).

Анализ роста накопительной культуры на разных субстратах показал, что данная культура включает в себя сульфидогенные бактерии различных метаболи-

ческих путей. Окраска клеток по Граму показала преобладание в культуре грамположительных бактерий, хотя небольшое количество грамотрицательных бактерий присутствовало. Морфология изученных клеток сильно различалась. В культуре присутствовали в основном прямые палочковидные клетки размером 0,5-1 x 1-4 мкм, реже встречались изогнутые палочки и кокковидные клетки. Также присутствовали в большом количестве спорообразующие клетки. Таким образом, можно полагать, что преобладают бактерии рода *Desulfotomaculum*, так как этот род является грамположительным, клетки могут долго сохраняться в продуктах коррозии, находящихся на воздухе, за счет спорообразования, данный род использует лактат, ацетат и этанол как доноры электронов. Рода *Desulfovibrio* и *Desulfobacter* являются грамотрицательными. *Desulfovibrio* использует лактат и некоторые штаммы – этанол, *Desulfobacter* – ацетат. Ни один из этих двух родов не использует бензоат. Бактерии данной культуры являются облигатными анаэробами, мезофилами, рост и образование сероводорода наблюдали в диапазоне температур от 15⁰ до 45⁰ С с оптимумом 30-32⁰ С. Культура растет при концентрации NaCl от 1 до 5% в среде, оптимальной является среда, содержащая 1% NaCl. Культура хорошо растет на среде без дрожжевого автолизата, но его внесение увеличивает продукцию сероводорода в среднем на 7%.

Таблица 2

Численность СВБ в продуктах коррозионных отложений Приобского нефтяного месторождения, определяемая на средах с различными субстратами

Субстрат	Количество СВБ в пробе, кл/мл	Количество сероводорода в конечном разведении, мг/л
Лактат	10 ⁷	25,3±3,9
Ацетат	10 ²	4,2±0,3
Бензоат	0	0
Этанол	10 ²	3,2±0,3

Исходя из данных результатов, мы сделали заключение, что накопительная культура СВБ представляет собой консорциум, на 80% состоящий из бактерий рода *Desulfotomaculum*, в меньшем количестве присутствуют бактерии родов *Desulfovibrio* и *Desulfobacter* (примерно 20%).

Данная накопительная культура выделяет наибольшее количество сероводорода на среде с лактатом (25,3 мг/л в конечном разведении) (табл. 2).

Таким образом, данная накопительная культура СВБ лучше всего растет на среде с лактатом, поэтому все последующие эксперименты были осуществлены на среде Постгейта С с лактатом.

Рост выделенной культуры СВБ осуществляется согласно классической кривой роста бактериальных культур, лаг-фаза длится 12 часов, удельная скорость роста в течение экспоненциальной фазы роста составляет в среднем 0,026 ч⁻¹, время удвоения биомассы 27 часов. Таким образом, выделенная нами накопительная культура СВБ развивается достаточно медленно по сравнению с культурами, выделенными другими исследователями [Луцаева И.В., 2007, Карначук О.В., 1995], но обладает высокой дегидрогеназной активностью и

имеет достаточно продолжительную экспоненциальную фазу роста (четыре суток). Так как дегидрогеназная активность – важнейший показатель во многом определяющий скорость локальной коррозии стали, то данная культура СВБ является высоко коррозионноопасной.

2. ВЛИЯНИЕ ХРОМА В СРЕДЕ И В СТАЛИ НА РОСТ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ СВБ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПРОДУКТОВ КОРРОЗИОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРИОБСКОГО НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

2.1. Влияние содержания хрома в стали на рост биопленки накопительной культуры СВБ на поверхности стали

Повышения коррозионной стойкости металлов можно достигнуть введением компонентов, способствующих образованию более совершенного экранирующего защитного слоя продуктов коррозии на поверхности сплава. Примером такого способа легирования является повышение коррозионной стойкости углеродистой стали при легировании хромом.

Электронная микроскопия биопленок СВБ, образующихся на поверхности сталей, показала различия в количестве бактерий на единицу площади биопленки, а также изменение морфологии бактериальных клеток СВБ в зависимости от марки стали.

Нами было отмечено, что при увеличении концентрации хрома в стали количество бактериальных клеток на поверхности стали уменьшается. Также данные по количеству бактерий в биопленке подтверждаются данными по количеству белка в биопленке (табл. 3). Как известно, с одной стороны, хром является ингибитором роста бактерий, с другой стороны, хром образует защитную оксидную пленку на поверхности металла. Поэтому при увеличении содержания хрома в стали до определенных пределов, можно снизить бактериальное прикрепление к поверхности стали. Биопленка на поверхности стали 15X5М с высоким содержанием хрома (4,6%) располагается отдельными небольшими кусочками. Также существенно меняется морфология клеток. Клетки становятся более тонкими и полупрозрачными, что свидетельствует о процессах ингибирования их жизнедеятельности.

Таблица 3

Зависимость количества СРБ в биопленке от концентрации хрома в стали

Марка стали	Количество бактерий в поле зрения, 1200 мкм ²	Количество белка в биопленке, мкг/мл
09Г2С	124±8	193,2±11
08ХМЧА	103±5*	176,4±9*
15Х5М	78±3*	134,5±6*

Примечание: * - различия достоверны по отношению к контрольным образцам стали (09Г2С), $p < 0,05$

Однако гетерогенность сложно влияет на коррозионную стойкость сплавов. Если анодом является узкая зона границы зерна вследствие обеднения в

этой узкой зоне твердого раствора легирующим элементом (хромом), то это приводит к увеличению коррозии границ зерен, то есть к межкристаллитной коррозии. Увеличение размеров зерна увеличивает межкристаллитную коррозию, так как уменьшается длина границ зерен.

Таким образом, введение хрома в сталь наряду с улучшением механических свойств повышает стойкость к бактериальной коррозии, вызываемой накопительной культурой СВБ. Но возникает риск развития межкристаллитной коррозии.

2.2. Влияние соединений хрома в среде на рост накопительной культуры СВБ, выделенной из продуктов коррозионных отложений Приобского нефтяного месторождения

Многие стали, используемые для изготовления труб для нефтегазовой промышленности, содержат значительные количества хрома. В процессе эксплуатации труб часть хрома может переходить в растворенное состояние и присутствовать в среде внутри трубопроводов. В связи с вышеизложенным, нам представляется важным изучение влияния небольших концентраций соединений хрома на развитие биопленки выделенной нами накопительной культуры СВБ.

В результате исследований было выявлено, что в концентрациях 0,205 и 0,410 мг/мл хлорид хрома (III) является стимулятором роста накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения. Так в средах с хлоридом хрома (III) в концентрациях 0,205 и 0,410 мг/мл содержание сероводорода было выше, чем в контроле, на 4,9 и 2,9% соответственно (рис. 1). В среде с хроматом (VI) калия в концентрациях 0,261 и 0,522 мг/мл содержание сероводорода составляло 44 и 29% соответственно от контроля, а в среде с бихроматом калия (VI) в концентрациях 0,415 и 0,830 мг/мл – 7,5 и 5% от контрольного варианта. Таким образом, бихромат и хромат калия замедляют рост СВБ, являясь в данных концентрациях токсичными для изучаемых бактерий соединениями.

Аналогичная тенденция прослеживалась при измерении содержания белка в среде с накопительной культурой СВБ (рис. 2). В средах с хлоридом хрома (III) в концентрациях 0,205 и 0,410 мг/мл содержание белка на 21,6 и 16,8 % соответственно было выше, чем в контроле, а в средах с хроматом (VI) калия в концентрациях 0,261 и 0,522 мг/мл содержание белка составляет 49,0 и 38% от контрольного варианта, а в средах с бихроматом (VI) калия в концентрациях 0,415 и 0,830 мг/мл – 28,8 и 22% соответственно от контроля. Таким образом, содержание белка в среде с хлоридом хрома (III) было выше по сравнению с контролем, т.к. данное соединение выступает в качестве стимулятора роста СВБ, снижение же концентрации белка при введении соединений хрома (VI) объясняется ингибированием роста СВБ данными концентрациями хромата (VI) и бихромата (VI).

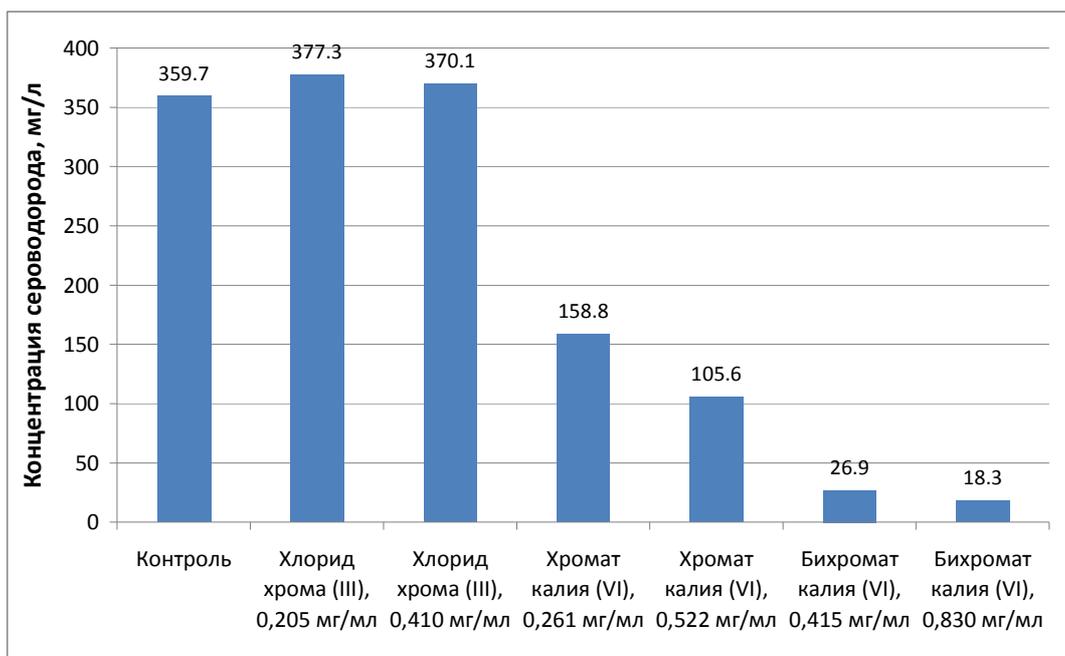


Рис. 1. Влияние различных соединений хрома на активность процесса сульфат-редукции накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

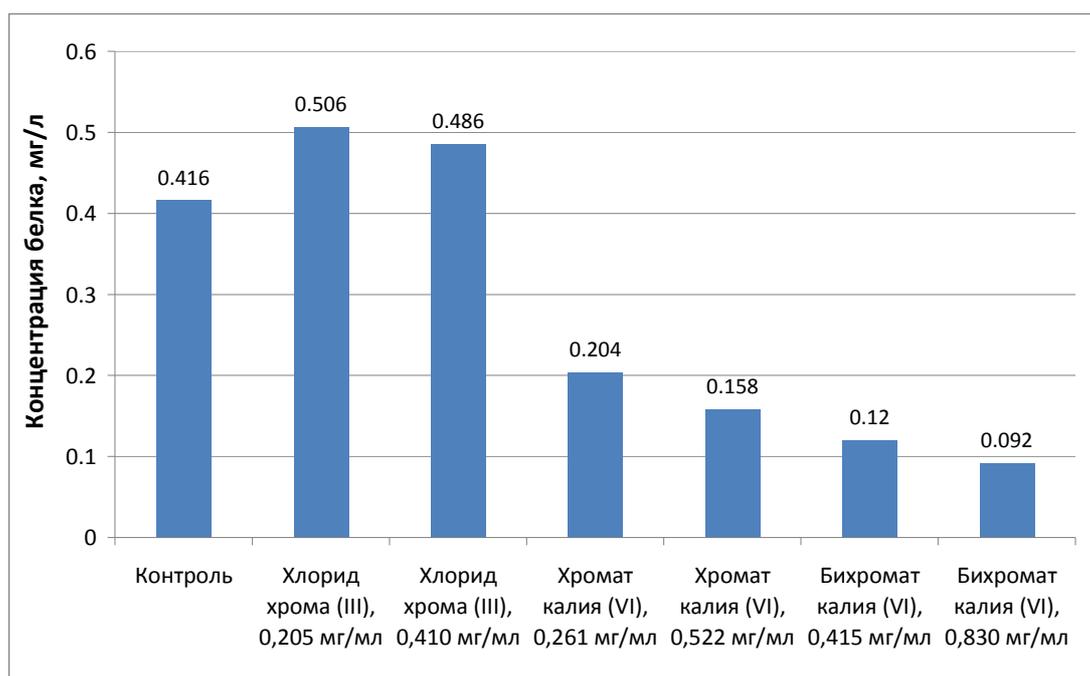


Рис. 2. Влияние различных соединений хрома на рост накопительной культуры СВБ (по белку), выделенной из Приобского нефтяного месторождения

Общая дегидрогеназная активность в средах с хлоридом хрома (III) в концентрациях 0,205 и 0,410 мг/мл повысилась на 16,1 и 9,7 % соответственно по сравнению с контролем, в средах с хроматом (VI) калия в концентрациях 0,261 и 0,522 мг/мл составляет 54,8 и 34,8 % от контроля, а в средах с бихроматом (VI) калия в концентрациях 0,415 и 0,830 мг/мл составляет 16 и 12 % соответственно от контроля (рис. 3).

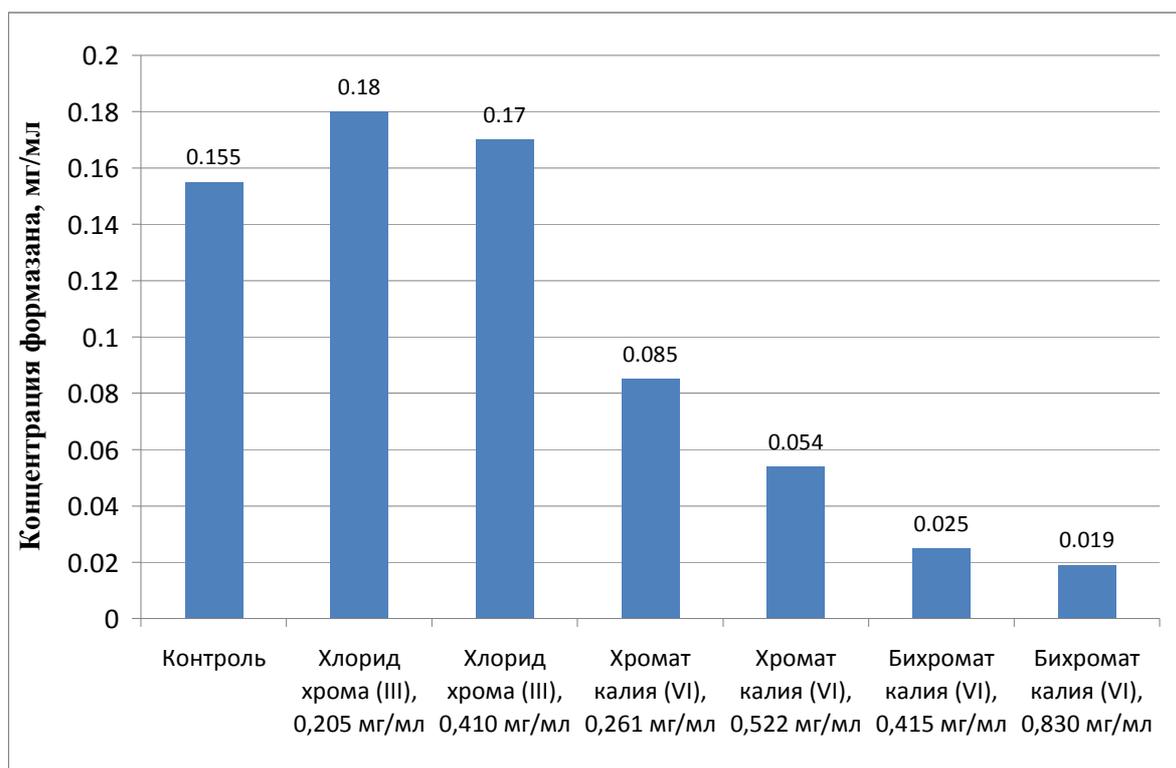


Рис. 3. Влияние различных соединений хрома на общую дегидрогеназную активность накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

Из полученных результатов можно сделать выводы, что хлорид хрома (III) оказывает небольшое стимулирующее действие на рост СВБ. Хромат (VI) и бихромат (VI) калия оказывают дозозависимое бактериостатическое действие на рост СВБ. Минимальная ингибирующая концентрация (концентрация, при которой рост популяции снижается на 50%) хромата калия для выделенной накопительной культуры СВБ – 191 мг/л (51 мг Cr^{+6} /л), а бихромата калия – 125 мг/л (42 мг Cr^{+6} /л).

Можно предположить, что механизм нейтрализации действия соединений хрома сульфатредуцирующими бактериями – это редукция соединений хрома (VI) в соединения хрома (III) в ферментативных реакциях и в реакциях взаимодействия с продуктами метаболизма бактерий (например, сероводорода, который является сильным восстановителем). В то же время нами было выявлено, что соединения хрома (III) являются даже стимуляторами роста для данной культуры и могут служить ей в качестве доноров электронов.

3. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ В СТАЛИ И В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

3.1 Влияние редкоземельных металлов в сталях на развитие биопленки СВБ на поверхности сталей

Одним из традиционных способов борьбы с бактериями является применение бактерицидов, однако этот метод не всегда эффективен, так как участки локализации СВБ покрыты осадками продуктов коррозии (рис. 4).



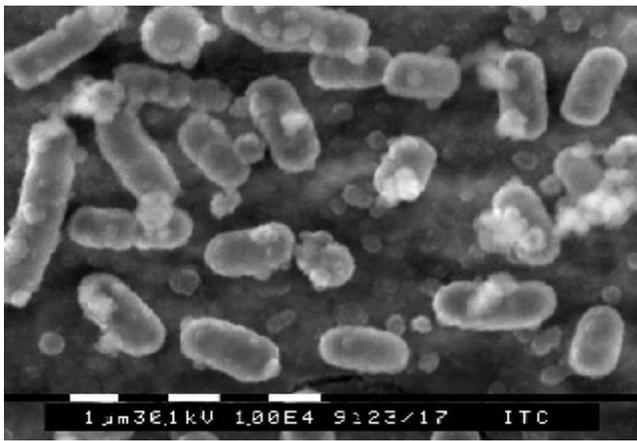
Рис. 4. Внешний вид язвы с продуктами коррозии на внутренней стенке трубы

Стали, модифицированные кальцием и церием, были исследованы нами на предмет стойкости к коррозии, вызываемой накопительной культурой СВБ. Данный способ модификации стали позволяет уменьшить размер включений стали, что улучшает ее механические свойства.

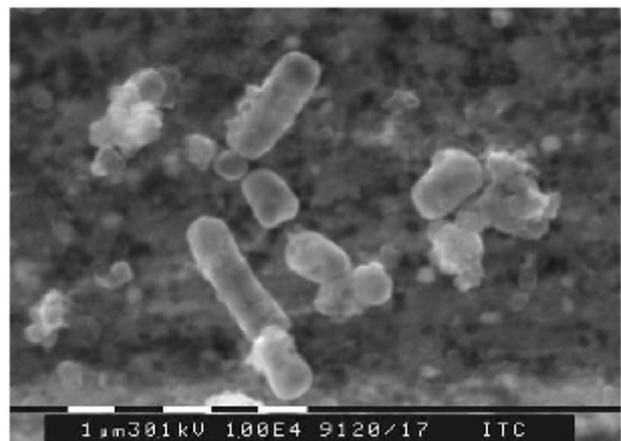
Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что стали с системой легирования Fe–Mn, традиционно применяемые в промышленности, являются нестойкими к биокоррозии. Концентрация бактериального белка и дегидрогеназная активность СВБ в биопленке являются максимальными на этих сталях (табл. 4), что также подтверждается данными электронной микроскопии (рис. 5).

Введение в Fe–Cr стали церия в количестве 0,0035% привело к снижению количества клеток СВБ, адгезированных на поверхности, в 1,6 раза по сравнению со сталями 17Г1С. Что также подтверждается данными, полученными по оценке количества белка. Дальнейшее увеличение массовой доли церия до 0,0199% привело к значительному снижению числа клеток СВБ, а также количества белка в биопленке.

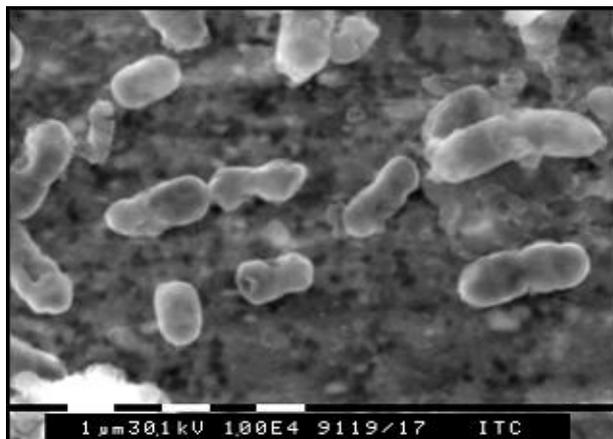
Результаты, полученные при испытании стали в среде с музейными культурами СВБ, были сравнены с результатами, полученными при испытаниях образцов стали в среде с накопительной культурой СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.



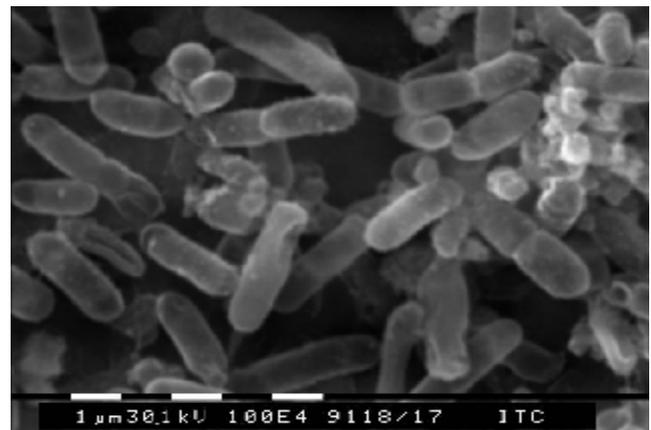
Сталь 13ХФА [Ce] = 0,0035 %



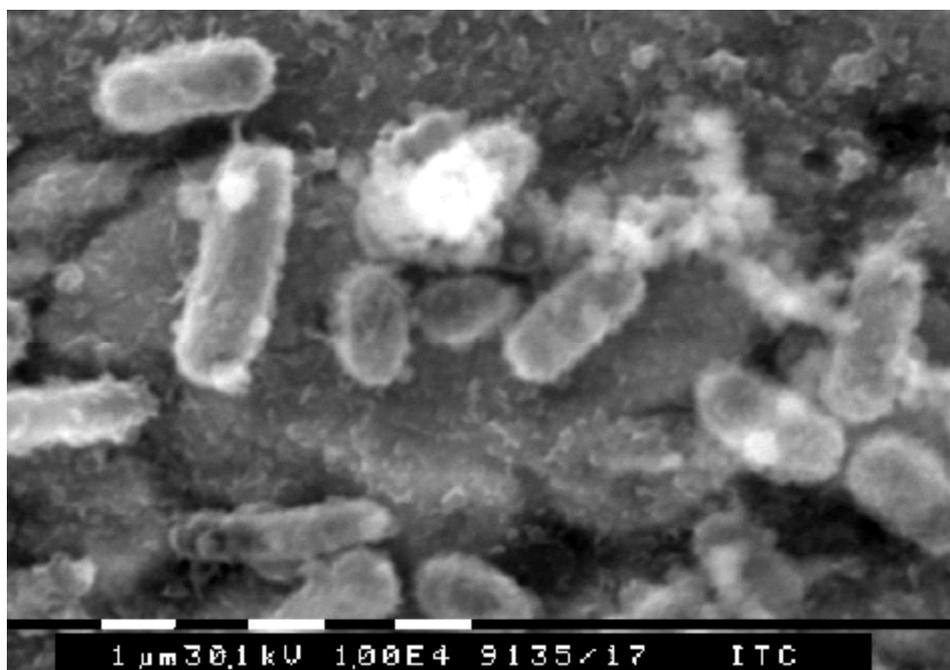
Сталь 13ХФА [Ce] = 0,0199 %



Сталь 13ХФА [Ce] = 0,0075 %



Сталь 09Г2С



Сталь 13ХФА, модифицированная кальцием

Рис. 5. Вид биопленки из ассоциации музейных культур СВБ на образцах различных марок стали (электронная микроскопия, увеличение 10000)

Зависимость концентрации белка и дегидрогеназной активности СВБ в биопленке от химического состава стали

Марка стали	Массовая доля церия в стали, %	Концентрация бактериального белка, мкг/мл	Дегидрогеназная активность, мг формазана/г белка×сутки
13ХФА, модиф. церием	0,0035	77,3±5,4	18,25±1,41
	0,0075	56,6±2,9	13,57±1,22
	0,0199	29,3±1,5	7,65±0,81
13ХФА, модиф. кальцием	-	95,5±9,5	33,54±3,21
09Г2С, легированная марганцем	-	265,7±19,6	56,34±4,54
17Г1С, легированная марганцем	-	281,9±20,2	58,66±4,13

Мы оценивали влияние ассоциации музейных культур, состоящей из трех видов *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfobacter sp.* и накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, на скорость коррозии стали. Наибольшая скорость коррозии после двух недель экспозиции наблюдалась на сталях 09Г2С и 17Г1С. На стали 17Г1С коррозия достигала 0,98 г/м²×сутки при воздействии на нее ассоциации музейных культур и 1,51 г/м²×сутки при действии накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения (рис. 6). Таким образом, скорость коррозии стали 17Г1С под действием накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения в 1,5 раза выше по сравнению с действием ассоциации музейных культур СВБ.

По данным, полученным нами в результате экспериментов, введение церия во включения наряду с микроструктурой стали изменяет адгезивные свойства СВБ 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.

3.2. Влияние церия и лантана в среде на рост накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

В результате проведенных нами исследований по влиянию церия и лантана на рост накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, было выявлено, что церий и лантан в концентрациях выше 0,05 % полностью подавляют рост бактерий (рис. 7). Возможным механизмом воздействия катионов редкоземельных металлов на бактериальные клетки является нейтрализация зарядов на поверхности клеток СВБ при введении катионов лантана или церия в среду с СВБ, что ведет к гибели бактериальных клеток.

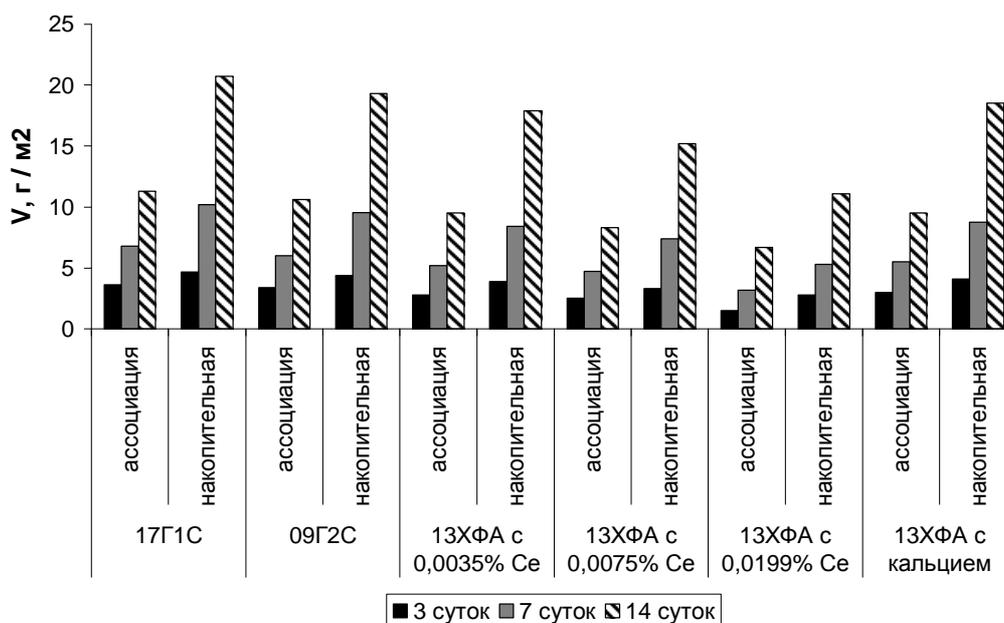


Рис. 6. Скорость коррозии стали различных марок (по потере веса) под действием ассоциации музейных культур СВБ и накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

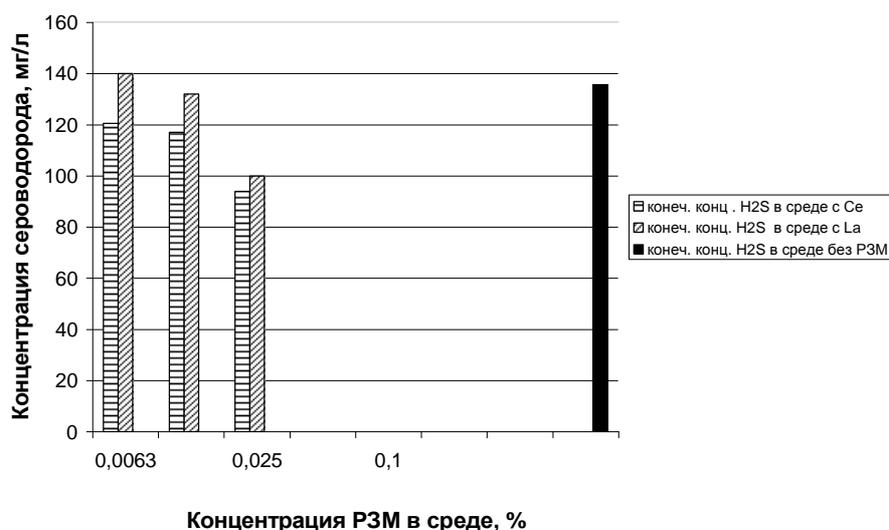


Рис. 7. Изменение концентрации сероводорода, выделяемого СВБ, в средах с разным содержанием церия, лантана и без P3M

4. АДсорбция РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ НА КЛЕТКАХ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ СВБ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПРИОБСКОГО НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ И СИЛА АДГЕЗИИ СВБ К ТВЕРДОЙ ПОВЕРХНОСТИ

4.1. Адсорбция редкоземельных металлов на клетках накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

В своих экспериментах мы взяли растворы с высокими концентрациями лантана с целью определения максимальной концентрации лантана, которая

может адсорбироваться на клеточных стенках бактерий. Через 1,5 часа инкубации накопительной культуры СВБ с растворами лантана было выявлено снижение концентрации лантана во всех растворах (табл. 5).

Полученные данные можно объяснить связыванием лантана фосфатными и карбоксильными группами бактериальных экзополимеров в первые часы инкубации и удерживанием лантана в течение первых суток. Через двое суток происходит отдача катионов лантана в раствор, возможно, в связи с ослаблением электростатических взаимодействий катионов с группами биополимеров. Максимум адсорбции лантана на поверхности бактериальных клеток составил от 0,11 до 0,16 г лантана на 1 г сырой биомассы. Содержание бактериального белка в растворах составило 40-70 мкг/мл.

Таблица 5

Адсорбция лантана на клеточных стенках сульфатовосстанавливающих бактерий за разные промежутки времени

Начальная концентрация La в среде, г/л	Концентрация La в среде через 1,5 часа, г/л	Концентрация La в среде через сутки, г/л	Концентрация La в среде через 2 суток, г/л
2,001 ± 0,001	1,981 ± 0,003 *	1,992 ± 0,005 *	2,000 ± 0,004
3,002 ± 0,001	2,973 ± 0,004 *	2,974 ± 0,003 *	3,001 ± 0,003
4,001 ± 0,001	3,980 ± 0,005 *	3,982 ± 0,003 *	4,000 ± 0,006
5,002 ± 0,001	4,982 ± 0,003 *	4,983 ± 0,005 *	5,002 ± 0,004
6,001 ± 0,001	5,972 ± 0,004 *	5,970 ± 0,004 *	5,990 ± 0,003
7,003 ± 0,001	6,986 ± 0,004 *	6,986 ± 0,003 *	7,002 ± 0,005

Примечание: * – различия достоверны (P < 0,05)

4.2. Сила адгезии к твердой поверхности клеток накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

Исходя из данных, полученных в вышеуказанных экспериментах, удалось установить, что накопительная культура СВБ, выделенная из Приобского нефтяного месторождения, обладает огромной способностью к адгезии к твердым поверхностям.

Учитывая тот факт, что основная часть накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, представлена родом *Desulfotomaculum sp*, были проведены сравнительные эксперименты между накопительной культурой СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, и музейной *Desulfotomaculum* на предмет установления силы адгезии каждой из них к твердой поверхности.

Для удобства сравнения адгезии разных культур вводятся такие показатели как сила адгезии (F₅₀), при которой 50% клеток отрываются от поверхности и условный показатель адгезии P_a, равный отношению силы адгезии (F₅₀) к весу клетки, необходимый для оценки адгезии клеток микроорганизмов разных по размеру. В результате проведенных экспериментов было установлено, что F₅₀

для *Desulfotomaculum sp* равна $10,2 \times 10^{-7}$ Дин/клетку (рис. 8), что в несколько раз выше по сравнению с другими бактериями. Например, данная величина в 7,6 раза выше по сравнению с аналогичными для *Staphylococcus aureus* и *Bacterium prodigiosum*. Также для *Desulfotomaculum sp* P_a равна 3,4, что в 2,7 раза выше по сравнению с *Bacterium prodigiosum* и 1,3 раза выше, чем у *Staphylococcus aureus*. Величину силы адгезии не удалось установить для накопительной культуры СВБ, так как при скоростях центрифугирования, примененных нами в ходе экспериментов, 50%-ный отрыв клеток не был достигнут, а, следовательно, сила адгезии данной накопительной культуры СВБ выше всех, данные которых представлены в литературе [Звягинцев, 1973].

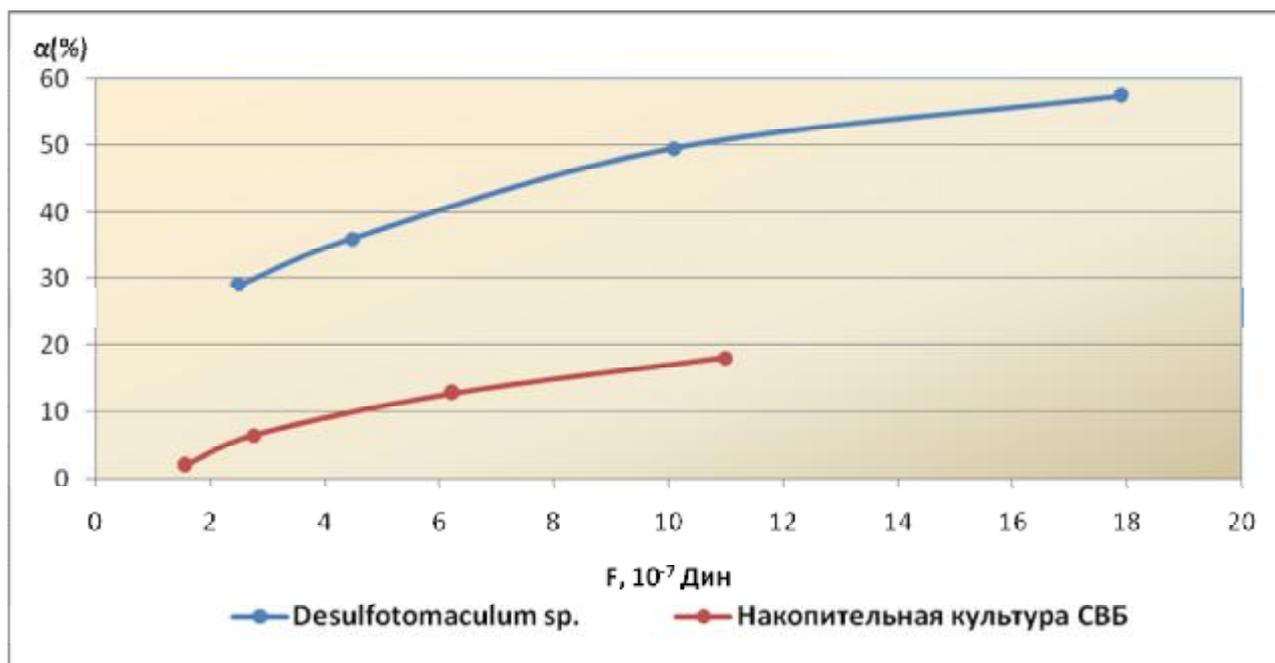


Рис. 8. Интегральные кривые распределения клеток микроорганизмов по силе адгезии, характеризующей долю (α) оторвавшихся от поверхности клеток при данной силе отрыва (F)

Прочное прикрепление клеток *Desulfotomaculum sp*, а в особенности, накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, может быть связано со своеобразием поверхности клеток данных культур.

Внеклеточные полимеры участвуют в связывании клеток в целые кластеры и в удержании клеток на поверхности. Агрегация микробных клеток ведет к градиенту электрохимической активности. Микробные кластеры становятся барьером для диффузии, и площадь под ними является катодом, в то время как площадь между кластерами играет роль анода. В результате скорость электрохимической коррозии увеличивается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время биологическая коррозия занимает одно из ведущих мест среди причин поломки нефтегазовых трубопроводов. Биологическую коррозию можно приостановить, используя бактерициды, но этот метод не всегда эффективен, так как большинство коррозионноопасной микрофлоры обладает

мощной способностью к адгезии на стенках трубопроводов и образует биопленку под продуктами коррозии.

Накопительная культура СВБ, выделенная из Приобского нефтяного месторождения, обладает уникальной особенностью – продолжительной экспоненциальной фазой роста.

Авторами [Fang H.P. Herbert, 2002] установлено, что подавление активности СВБ в среде с ионами тяжелых металлов не ингибирует рост биопленок СВБ на поверхности стальных купонов во всех реакторах.

Исследованная нами накопительная культура СВБ, выделенная из Приобского нефтяного месторождения, является коррозионноопасной. На наш взгляд наиболее эффективным способом борьбы с коррозией стали, вызываемой СВБ, является модификация химического состава трубных сплавов.

Одним из наиболее распространенных способов модификации химического состава низкоуглеродистых сплавов является легирование хромом. Однако легирование стали хромом приводит к увеличению размеров зерен, что в свою очередь, ведет к увеличению скорости межкристаллитной коррозии. Поэтому данный способ модификации химического состава стали не всегда эффективен.

Наиболее эффективным способом модификации стали, при котором сульфидные включения стали становятся более мелкими (3-5 мкм), что улучшает как механическую, так и коррозионную стойкость стали, является модификация сплавов редкоземельными металлами. Данное заключение было сделано нами в результате проведенных исследований с различными образцами стали.

Были исследованы традиционно применяемые стали (09Г2С и 17Г1С) и стали, выплавленные на Таганрогском металлургическом заводе, модифицированные церием или кальцием (13ХФА).

В ходе проведенных испытаний сталей на предмет их стойкости к бактериальной коррозии, вызываемой СВБ, было выявлено, что дегидрогеназная активность биопленок СВБ на сталях, модифицированных церием в концентрации 0,0199 % в 7,5 раз ниже по сравнению с аналогичными показателями для традиционно применяемых сталей 09Г2С и 17Г1С. Содержание белка в биопленках на сталях, модифицированных церием в концентрации 0,0199 %, было в 3,3 раза меньше по сравнению со сталями, модифицированными кальцием. Таким образом, несмотря на то, что модификация включений кальцием делает их тоже более мелкими и по размеру такими же как при модификации сталей редкоземельными металлами, природа кальция не дает ему такого преимущества, какое есть у редкоземельных металлов, и кальций используется бактериями в их процессах жизнедеятельности. Поэтому модификация сталей кальцием не дает желаемой стойкости данным сталям по отношению к коррозии, осуществляемой СВБ.

Также весьма важным является тот факт, что количество бактерий в средах с разными марками стали оставалось высоким и не зависело от присутствия стали той или иной марки. Это подтверждается данными по дегидрогеназной активности и количеству сероводорода в среде. Следовательно, химическая природа стали играет роль в процессах адгезии клеток СВБ на поверхность стали.

Также в проведенных нами экспериментах было установлено, что ско-

рость коррозии традиционно применяемых сталей 17Г1С и 09Г2С под действием накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, в 1,5 раза выше по сравнению со скоростью коррозии данных сталей под влиянием ассоциации музейных культур СВБ. Такие же тенденции прослеживались при испытаниях всех остальных образцов стали. Это можно объяснить метаболическими взаимодействиями, которые сформированы у накопительной культуры СВБ и которых нет у ассоциации музейных культур.

В последующих экспериментах была подтверждена высокая сила адгезии к твердым поверхностям для выделенной культуры СВБ и для музейной культуры *Desulfotomaculum sp*, которая является предпосылкой для быстрого формирования биопленки СВБ на поверхности внутренних стенок трубопроводов. А это ведет к увеличению скорости электрохимической коррозии стали.

Таким образом, одним из самых надежных способов защиты нефтегазовых трубопроводов от поражения коррозионноопасными СВБ является изменение адгезивных свойств СВБ к поверхности стали, а это достигается модификацией химического состава сплавов, используемых для изготовления труб.

Накопительная культура СВБ, выделенная из Приобского нефтяного месторождения, характеризуется рядом свойств, которые в совокупности определяют ее как высоко коррозионноопасный организм: сравнительно небольшой лаг-период, продолжительная экспоненциальная фаза роста, высокая дегидрогеназная активность, способность к сульфатредукции и выделению сероводорода как агрессивного инициатора коррозии, устойчивость к некоторым концентрациям ионов тяжелых металлов (в частности, хрома), присутствующим в средах, и, наконец, огромная сила адгезии к самым различным субстратам.

Поэтому мы предлагаем использовать выделенную накопительную культуру СВБ как тестовую культуру для определения устойчивости сталей, применяемых в нефтегазовой промышленности, к биологической коррозии.

ВЫВОДЫ

1. Накопительная культура СВБ, выделенная из Приобского нефтяного месторождения, на 80% представлена спорообразующим видом *Desulfotomaculum*, остальные 20% составляют бактерии родов *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*. Основным источником углерода в среде для данной культуры является лактат. Удельная скорость роста культуры составляет $0,026 \text{ час}^{-1}$, время удвоения биомассы 26,65 часов.

2. Хлорид хрома (III) оказывает небольшое стимулирующее действие на рост СВБ. Хромат (VI) и бихромат (VI) калия оказывают дозозависимое бактериостатическое действие на рост СВБ. Минимальная ингибирующая концентрация хромата калия для выделенной накопительной культуры СВБ – 191 мг/л (51 мг Cr^{6+} /л), а бихромата калия – 125 мг/л (42 мг Cr^{6+} /л).

3. Введение хрома в сталь наряду с улучшением механических свойств повышает стойкость к бактериальной коррозии, вызываемой накопительной культурой СВБ. Но возникает риск развития межкристаллитной коррозии.

4. Введение церия во включения наряду с микроструктурой стали изменяет адгезивные свойства СВБ по отношению к поверхности стали. Количе-

ство клеток, содержание белка и дегидрогеназная активность СВБ в биопленке значительно ниже на сталях, модифицированных церием. Наибольшие показатели наблюдались на сталях с системой легирования Fe–Mn.

5. Коррозионная активность накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, выше в 1,5-1,7 раз по сравнению с активностью ассоциации музейных культур. Наименьшая скорость коррозии (0,48 г/м²×сутки) наблюдалась на сталях, модифицированных церием в концентрации 0,0199%. Скорость коррозии стали, модифицированной кальцием, а также сталей 17Г1С и 09Г2С равнялась 0,79 г/м²×сутки для ассоциации и 1,35 г/м²×сутки для накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

6. Церий и лантан в концентрациях выше 0,05 % полностью подавляют рост СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения.

7. Максимум адсорбции лантана на поверхности бактериальных клеток составил от 0,11 до 0,16 г лантана на 1 г сырой биомассы при содержании бактериального белка в растворах – 40-70 мкг/мл. Максимум адсорбции лантана бактериальными клетками СВБ достигается уже в первые часы и удерживается в первые сутки, а затем происходит десорбция, так как клетки изменяют свои свойства.

8. Сила отрыва (F_{50}) для *Desulfotomaculum sp* равна $10,2 \times 10^{-7}$ Дин/клетку, что в несколько раз выше по сравнению с другими бактериями. Величину силы адгезии не удалось установить для накопительной культуры СВБ, т.к. при скоростях центрифугирования, примененных нами в ходе экспериментов, 50%-ный отрыв клеток не был достигнут, а, следовательно, сила адгезии данной накопительной культуры СВБ выше многих других культур.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Зайцева О.В. Разработка комплексной методики исследования биопленки, включающей биохимические и микробиологические методы исследования и высокоразрешающую растровую электронную микроскопию. /О.В. Зайцева, Н.А. Кленова, О.И. Бородина, А.В. Йоффе, Т.В. Тетюева // Вестник Самарского государственного университета. Естественнонаучная серия. Биология – 2006 - №7(47) - С. 60-65.

2. Бородина О.И. Разработка методики исследования биопленки с применением растровой электронной микроскопии для оценки влияния легирующих элементов на стойкость стали к биокоррозии /О.И. Бородина, О.В. Зайцева, /Тезисы докладов научно-практической конференции «Проблемы и методы обеспечения надежности и безопасности систем транспорта нефти, нефтепродуктов и газа», 24 мая 2006 г. – Уфа: ТРАНСТЭК, 2006. С. 243-244.

3. Зайцева О.В. Адсорбция редкоземельных элементов на клеточных стенках накопительных культур сульфатовосстанавливающих бактерий, выделенных из Приобского нефтяного месторождения. /О.В. Зайцева // Вестник Самарского государственного университета. Естественнонаучная серия. Биология – 2007 - №8(58) – С. 341-350.

4. Зайцева О.В. Влияние содержания хрома в стали на развитие биопленки сульфатредуцирующих бактерий. /О.В. Зайцева, Н.А. Кленова /Сборник трудов молодых ученых Первого международного экологического конгресса (Третьей международной научно-технической конференции) «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов» ELPIT - 2007 – Том I – С. 206-209.
5. Зайцева О.В. Исследования коррозионноопасной микрофлоры нефтяных месторождений и влияние редкоземельных металлов на рост сульфатвосстанавливающих бактерий. /О.В. Зайцева, Ю.А. Багдасарова //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Специальный выпуск «Проблемы нефти и газа» - 2007 – С. 109-114.
6. Зайцева О.В. Микробиологические аспекты коррозионных разрушений магистральных трубопроводов /О.В. Зайцева /Труды XII Международной конференции «Окружающая среда для нас и будущих поколений», 3-10 сентября 2007 г. С. 58-59.
7. Зайцева О.В. Влияние химического состава стали на развитие биопленки сульфатредуцирующих бактерий /О.В. Зайцева, Н.А. Кленова, Е.В. Ширнина, О.И. Титлова, А.В. Йоффе. /Экологический сборник. Труды молодых ученых Поволжья / под ред. проф. С.В. Саксонова. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2007. С. 45-50.
8. Зайцева О.В. Микробиологическая коррозия нефтегазовых трубопроводов и легирование стали для борьбы с ней /О.В. Зайцева, Н.А. Кленова // Нефтяное хозяйство. №4, 2008. С. 92-95.
9. Багдасарова Ю.А. Микробиологический мониторинг нефтяных месторождений /Ю.А. Багдасарова, О.В. Зайцева /Сборник научных трудов IV Всероссийской научно-практической конференции «Нефтегазовые и химические технологии» - 2008 – С. 19, С. 65.