

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

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка,  
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,  
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata\_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

## **ВПЛИВ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АМОНІЮ НА РІСТ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ**

**Мета:** порівняти ріст монокультур сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfomicrobium* і *Desulfovibrio* за умов інгібування корозії інгібіторами-біоцидами – четвертинними солями амонію. **Методи.** Біокорозію досліджували гравіметричним методом, використовуючи зразки сталі Ст3пс. Чисельність бактерій у планктоні та біоплівці визначали методом граничних десятикратних розведень, концентрацію біогенного сірководню у середовищі Постгейта «В» – йодометричним титруванням. **Результати.** Планктонна та біоплівкова форми бактерій штаму *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 чутливіші до четвертинної солі амонію, яка містить незаміщений фенільний радикал (ЧСА I). Це зумовило більше пригнічення сульфатвідновлювальної активності та ефективніше інгібування корозії. Планктонна форма бактерій штаму *Desulfovibrio* sp.М-4.1 чутливіша до четвертинної солі амонію з заміщеним фенільним радикалом (ЧСА II). При однаковому пригніченні чисельності бактерій *Desulfovibrio* sp. М-4.1 солями амонію у біоплівці, спостерігається більше зниження сульфатвідновлювальної активності сполукою ЧСА II порівняно з ЧСА I та більший ступінь захисту сталі. **Висновки.** При розробці і використанні інгібіторів-біоцидів в практиці протикорозійного захисту металевих споруд необхідно враховувати переважання в корозійному середовищі певного штаму сульфатвідновлювальних бактерій. Досліджені четвертинні солі амонію є ефективними для попередження мікробної корозії викликаної бактеріями роду *Desulfovibrio*.

**Ключові слова:** штами сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp.М-4.1 та *Desulfomicrobium* sp. ТС 4, біокорозія, четвертинні солі амонію, інгібітори-біоциди.

Одним із факторів впливу на процес корозії металевих конструкцій є корозійне мікробне угруповання з переважанням сульфатвідновлювальних бактерій, які розповсюджені за анаеробних умов (морські і континентальні водойми, підземні води нафтових і рудних родовищ, ґрунти та ін.) [1, 9, 14]. Метаболічна активність сульфатвідновлювальних бактерій у складі корозійно активного угруповання визначає інтенсивність корозійного процесу на поверхні металу. Для попередження мікробної корозії широко використовують інгібітори з біоцидною дією щодо сульфатвідновлювальних бактерій. Їх ефективність може суттєво розрізнятися в залежності від того, який штам бактерій є пере-



важальним у корозійному середовищі [1, 8]. Вивчення особливостей розвитку різних штамів сульфатвідновлювальних бактерій за присутності біоцидів дозволить більш обґрунтовано підходити до розробки та прогнозування захисних властивостей інгібіторів.

Метою роботи було порівняти ріст монокультур сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfomicrobium* та *Desulfovibrio* за умов інгібування корозії інгібіторами-біоцидами – четвертинними солями амонію.

### Матеріали і методи

Досліджували сульфатвідновлювальні бактерії штамів *Desulfovibrio* sp. М-4.1 та *Desulfomicrobium* sp. ТС 4. Штам *Desulfovibrio* sp. М-4.1 виділено нами із сульфідогенного природного угруповання феросфери та ідентифіковано молекулярно-біологічними методами [4]. Штам *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 (із продуктів корозії обростань латунних трубок водогону теплових мереж) взято як тест-об'єкт для вивчення перебігу процесу мікробної корозії з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [9].

Дослідження біокорозії, індукованої зазначеними штамми бактерій, проводили гравіметричним методом [5] в герметичних скляних ємностях об'ємом 100 мл, заповнених середовищем Постгейта «В» та інокульованих відповідною культурою бактерій. Використану культуру бактерій стандартизували прямим підрахунком числа клітин. Використовували зразки конструкційної малоуглецевої сталі марки Ст3пс (площа поверхні 24 см<sup>2</sup>) виробництва підприємства „Криворіжсталь” підготовлені загальноприйнятим методом [5]. Вміст елементів в сталі (% за масою): Fe – 98,876; C – 0,190; Mn – 0,540; Si – 0,070; Ni – 0,010; S – 0,038; P – 0,007; Cr – 0,020; N – 0,007; Cu – 0,02; As – 0,004; Ti – 0,002; B – 0,0006; Al – 0,005. Сталь Ст3пс зазвичай використовують для виготовлення зварних, безшовних конструкцій та деталей, які працюють за позитивних температур.

Після експозиції у корозійному середовищі з поверхні зразків сталі видаляли продукти корозії механічним та хімічним способами. За втратою маси зразків розраховували швидкість корозії ( $K_m$ , г/(м<sup>2</sup>год)), коефіцієнт гальмування корозійного процесу ( $\gamma_m$ ) та ступінь захисту ( $Z_m$  %) за формулами:  $K_m = \Delta m / (S \cdot \tau)$ ;  $\gamma_m = K_m / K_m'$ ;  $Z_m = (1 - 1/\gamma_m) \times 100$  % [8], де  $\Delta m$  – втрата маси зразка (г),  $S$  – площа поверхні зразка (м<sup>2</sup>),  $\tau$  – тривалість експозиції (год),  $K_m$  та  $K_m'$  – швидкість корозії в середовищі без четвертинних солей амонію (ЧСА) та в середовищі з ЧСА, відповідно. Концентрація досліджуваних солей 0,01 ммоль/л. Тривалість експозиції при температурі  $28 \pm 2$  °С становила 14 діб.

Формули досліджених солей амонію з зазначенням зарядів на адсорбційно-реакційних центрах наведено в таблиці 1. Сполуки синтезовано на кафедрі хімії Чернігівського національного педагогічного університету імені Т.Г. Шевченка під керівництвом д.фарм.н. Демченка А.М. Склад та будова сполук підтверджена методами ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопії (Bruker-300) та хроматомас-спектрометричним аналізом (LC/MSD, прилад серії Agilent 1200 (США)).



Таблиця 1

Хлориди (2-гідроксиетил)-N,N-диметиларилкарбомілметил амонію

Table 1

(2-Hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-phenylcarbamoylmethyl-ammonium chlorides

Умовне позначення	Формула	Молярна маса, г/ моль
ЧСА I		258,5
ЧСА II		337,5

Вибір солей для дослідження зумовлено перспективністю сполук даного класу в якості інгібіторів-біоцидів [2]. Для оцінки розвитку сульфатвідновлювальних бактерій штамів за умов мікробної корозії досліджували чисельність бактерій у планктоні та біоплівці методом граничних десятикратних розведень та концентрацію біогенного сірководню – методом йодометричного титрування [3]. Найбільш ймовірне число мікроорганізмів в одиниці об'єму розраховували за таблицями Мак-Креді [7]. Клітини біоплівки, що прикріпились за час експозиції до металевої пластини знімали у фіксований об'єм 0,1н фосфатного буфера (рН 7,0) за допомогою ультразвуку на приладі УЗМ-003/н за частоти 22 кГц (30 с) двічі з інтервалом 60 с.

Відносний ступінь впливу солей на сульфатредукцію бактерій розраховували за формулою:

$$S = (C_{\text{контр.}} - C_{\text{досл.}}) \times 100 / C_{\text{контр.}}$$

де  $S$  – відносний ступінь впливу речовини на сульфатредукцію;  $C_{\text{досл.}}$  та  $C_{\text{контр.}}$  – концентрація сірководню в досліджуваній пробі, що містить речовину, і в контрольній, яка не містить речовини, мг/мл [10].

Статистичне опрацювання даних щодо швидкості корозії (середнє значення та його похибка) здійснювали за допомогою пакету “Описова статистика” програми Microsoft Excel для рівня надійності 95%. Відносна похибка не перевищує 10%. Повторність дослідів триразова.

Показник ліпофільності ЧСА ( $IgP$ ) та їх кватерно-хімічні показники (заряди на адсорбційно-реакційних центрах молекул;  $E_{\text{НОМО}}$  – енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі;  $E_{\text{ЛУМО}}$  – енергія нижньої вакантної молекулярної орбіталі) розраховували з використанням пакету програм ChemOffice 9.0. (Cambridgesoft Inc.).



### Результати та їх обговорення

Штам сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp. М-4.1 представлений клітинами, що мають паличкоподібну форму з заокругленими кінцями. Ці бактерії – мезофільні, грамнегативні, факультативні анаероби, спор не утворюють. За фізіолого-біохімічними ознаками бактерії штаму М-4.1 можуть використовувати сульфати та елементну сірку в якості акцепторів електронів. Як донори електронів та джерело карбону – лактат, етанол, пропанол, ізоаміловий спирт, ацетат, стеарат, малат, олеат, бензоат, фумарат, цитрат, аланін, аргінін, аспарагін, лізин, серин, триптофан. При цьому такі сполуки, як фенол бактерії штаму М-4.1 використовувати не здатні. Штам *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 охарактеризовано авторами в [9]. Певна відмінність у фізіолого-біохімічних властивостях зазначених штамів, зокрема використання аргініну штамом М-4.1 в якості джерела карбону, дозволяють передбачити різницю у впливі інгібіторів-біоцидів на їх розвиток.

Порівняльну оцінку розвитку монокультур сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfomicrobium* та *Desulfovibrio* здійснювали за умов мікробної корозії інгібованої четвертинними солями амонію.

Результати дослідження біокорозії сталі Ст3пс індукованої штамми бактерій *Desulfovibrio* sp. М-4.1 та *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 показали, що чисельність бактерій обох штамів у планктоні однакова (рис. 1, а). Але у перебігу експерименту бактерії штамів утворили різну за щільністю біоплівку: чисельність бактерій штаму *Desulfovibrio* sp. М-4.1 виявилася на порядок більшою порівняно з *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 (рис. 1, б). Більш щільна біоплівка, сформована штамом *Desulfovibrio* sp. М-4.1, може бути зумовлена різницею у хемотаксисі бактерій [1].

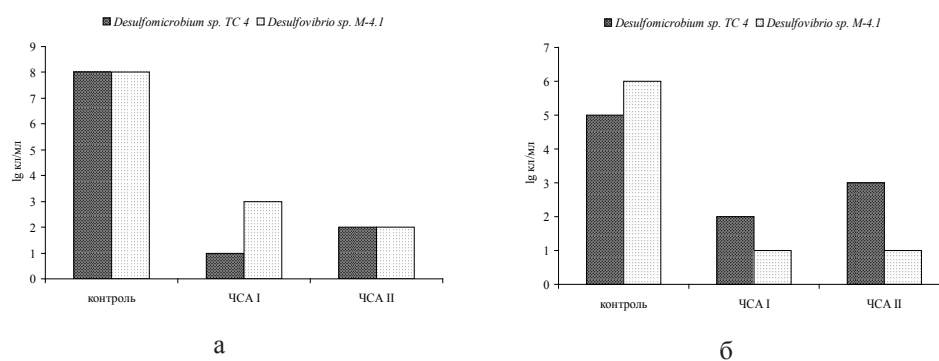


Рис. 1. Кількість клітин сульфатвідновлювальних бактерій за дії ЧСА у планктоні (а) та у біоплівці (б). Контроль – корозійне середовище без додавання солей.

Fig. 1. Quantity of sulphatereducing bacteria cells at the presence of QSA of plankton (a) and biofilm (b). Control – corrosive medium without introducing salts.

За присутності у середовищі четвертинних солей амонію чисельність бактерій обох штамів зменшилась. Але їх вплив на планктонну та біоплівкову



форми штамів різний. Бактерії планктонної форми обох штамів відповіли на біоцидну дію ЧСА II зменшенням чисельності на 6 порядків. Відповідь планктону на ЧСА I була різною: бактерії *Desulfomicrobium* sp. TC 4 знизили свою чисельність на 7 порядків, а *Desulfovibrio* sp. M-4.1 – на 5 порядків.

Бактерії біоплівки (місце активного перебігу біокорозії [13]) по іншому відреагували на присутність ЧСА. Хоча у контролі спостерігалась найбільша чисельність *Desulfovibrio* sp. M-4.1, більше пригнічення розвитку (на 5 порядків) відмічено саме для цього штаму бактерій. Бактерії штаму *Desulfomicrobium* sp. TC 4 зменшили свою чисельність лише на 2–3 порядки. За умов мікробної корозії бактерії штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1 мали вищу в 1,45 рази сульфатвідновлювальну активність порівняно зі штамом *Desulfomicrobium* sp. TC 4 на що вказує концентрація сірководню у корозійному середовищі (табл. 2). Це і зумовлює більшу в 1,53 рази швидкість корозії сталі Ст3пс.

Четвертинні солі амонію впливають на сульфатвідновлювальну активність бактерій обох штамів: ступінь пригнічення становить 77,7–87,8%. Найбільше (87,8%) ЧСА II пригнічує ріст бактерій штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1, що призводить до найбільшого уповільнення швидкості корозії (табл. 2). Це узгоджується з уявленнями про суттєве значення мікробіологічного чинника у процесі мікробної корозії [1, 12, 14].

Таблиця 2

Вплив четвертинних солей амонію на процес мікробної корозії сталі Ст3пс

Table 2

Influence of quarter ammonium salts on the process of biocorrosion St3ps steel

Інгібітор	<i>Desulfomicrobium</i> sp. TC 4				<i>Desulfovibrio</i> sp. M-4.1			
	Вміст H <sub>2</sub> S, мг/л	S, %	K <sub>m</sub> × 10 <sup>-3</sup> , г/(м <sup>2</sup> × год)	γ <sub>m</sub>	Вміст H <sub>2</sub> S, мг/л	S, %	K <sub>m</sub> × 10 <sup>-3</sup> , г/(м <sup>2</sup> × год)	γ <sub>m</sub>
Контроль	175±11	–	15,6±1,2	–	254±8	–	23,9±1,9	–
ЧСА I	31±3	82,3	3,4±0,3	4,6	55±4	78,3	5,5±0,4	4,4
ЧСА II	39±3	77,7	4,8±0,4	3,2	31±2	87,8	2,7±0,2	8,9

Примітка: контроль – корозійне середовище без внесення солей.  
Control – corrosive medium without introducing salts.

Встановлено, що ріст бактерій досліджуваних штамів за присутності інгібіторів корозії виявився різним. Планктонна та біоплівкова форми бактерії *Desulfomicrobium* sp. TC 4 виявилися більш чутливими до сполуки ЧСА I, що зумовило більше пригнічення як сульфатвідновлювальної активності (порівняно з дією ЧСА II), так і ефективніше інгібування корозії.

Планктонна форма бактерій штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1 чутливіша до сполуки ЧСА II (порівняно з ЧСА I). При однаковому пригніченні бактерій



*Desulfovibrio* sp. М-4.1 четвертинними солями амонію у біоплівці, спостерігається більше зниження сульфатвідновлювальної активності сполукою ЧСА II і, відповідно, більший ступінь захисту.

Таким чином, при розробці і використанні інгібіторів-біоцидів в практиці протикорозійного захисту металевих споруд необхідно враховувати переважання в корозійному середовищі певного штаму сульфатвідновлювальних бактерій та їх розвиток за дії інгібітора-біоцида. Досліджені четвертинні солі амонію є ефективними для попередження мікробної корозії викликаной бактеріями роду *Desulfovibrio*.

**Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, Е.С. Бондарь, А.П. Третьак**

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,  
ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,  
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata\_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

## **ВЛИЯНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ СОЛЕЙ АММОНИЯ НА РОСТ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

### **Реферат**

**Цель:** Сравнить рост монокультур сульфатвосстанавливающих бактерий родов *Desulfomicrobium* и *Desulfovibrio* в условиях ингибирования коррозии ингибиторами-биоцидами – четвертичными солями аммония. **Методы.** Исследование биокоррозии проводили гравиметрическим методом, используя образцы конструкционной малоуглеродистой стали марки СтЗпс. Численность бактерий в планктоне и биопленке определяли методом предельных десятикратных разведений. Концентрацию биогенного сероводорода в среде Постгейта «В» – методом йодометрического титрования. **Результаты.** Планктонная и биопленочная формы бактерий штамма *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 более чувствительны к четвертичной соли аммония, которая содержит незамещенный фенильный радикал (ЧСА I). Это обусловило большее угнетение как сульфатвосстанавливающей активности так и более эффективное ингибирование коррозии. Планктонная форма бактерий штамма *Desulfovibrio* sp. М-4.1 более чувствительна к четвертичной соли аммония с замещенным фенильным радикалом (ЧСА II). При одинаковом угнетении численности бактерий *Desulfovibrio* sp. М-4.1 солями аммония в биопленке, наблюдается большее снижение сульфатвосстанавливающей активности веществом ЧСА II и, соответственно, большая степень защиты. **Выводы.** При разработке и использовании ингибиторов-биоцидов в практике противокоррозионной защиты металлических сооружений необходимо учитывать преобладание в коррозионной среде определенного штамма сульфатвосстанавливающих бактерий. Исследованные четвертичные соли аммония являются эффективными для предупреждения микробной коррозии вызванной бактериями рода *Desulfovibrio*.

**Ключевые слова:** штаммы сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio* sp.М-4.1 и *Desulfomicrobium* sp. ТС 4, биокоррозия, четвертичные соли аммония, ингибиторы-биоциды.



**N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, O.S. Bondar, O.P. Tretyak**

Chernigiv National Pedagogical University named after T.G. Shevchenko,  
53, Getman Polubotok Str., Chernigiv, 14013, Ukraine,  
tel.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata\_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

## INFLUENCE OF QUATERNARY SALTS OF AMMONIUM ON GROWTH OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA

### Summary

**Aim.** To compare the growth of the monocultures of sulphate-reducing bacteria of *Desulfomicrobium* and *Desulfovibrio* genera under conditions of corrosion inhibition by biocide inhibitors – quaternary ammonium salts. **Methods.** Biocorrosion was analyzed by means of the gravimetric method, with the application of St3ps steel samples. The quantity of bacteria in plankton and biofilm was calculated by the method of boundary ten-fold dilutions, biogenic hydrogen sulfide concentration in medium Postgate “B” – by the iodometric titration. **Results.** The plankton and biofilm forms of bacteria of *Desulfomicrobium* sp. TC 4 strain turned out to be more sensitive to the quaternary ammonium salt containing the unreplaced phenyl radical (QAS I). This has caused both more extensive inhibition of sulphate-reducing activity and more efficient inhibition of corrosion. The plankton form of the bacteria of *Desulfovibrio* sp. M-4.1 strain has demonstrated a greater sensitivity to the quaternary ammonium salt with the replaced phenyl radical (QAS II). **Under identical inhibition of the quantity of *Desulfovibrio* sp. M-4.1 bacteria by the ammonium salts in biofilm, a greater reduction of sulphate-reducing activity by means of QAS II compound and a greater level of protection have been observed.** **Conclusions.** In the development and use of inhibitors-biocides in the practice of anti-corrosion protection of metal constructions it must be taken into consideration the prevalence of certain corrosive medium sulfate-reducing bacteria strain. Investigated quaternary ammonium salts are more effective in preventing microbial corrosion caused by bacteria of *Desulfovibrio* genus.

**Key words:** strains of sulphate-reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. M-4.1 and *Desulfomicrobium* sp. TC 4, biocorrosion, quaternary ammonium salts, biocide inhibitors.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев К.И., Козлова И.П., Коптєва Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 259 с.
2. Белоглазов С.М. Джафаров З.И., Поляков В.Н., Демушин Н.Н. Четвертичные аммониевые соли как ингибиторы коррозии стали в присутствии СРБ // Защита металлов. – 1991. – Т. 27, № 6. – С. 1041–1045.
3. Васильев В.П. Аналитическая химия : в 2-х ч. Ч. 1. Гравиметрические и титриметрические методы анализа : [учеб. для хим.-технол. спец. вузов.] – М. : Высш. шк., 1989. – 319 с.
4. Демченко Н.Р., Курмакова І.М., Третьак О.П. Особливості корозійно активного мікробного угруповання феросфери газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 90–98.



5. Фокин М.Н., Жигалова К.А. Методы коррозионных испытаний металлов / Под ред. Я. М. Колотыркина. – М. : Металлургия, 1986. – 78 с.
6. Орлов В.Д., Липсон В.В., Иванов В.В. Медицинская химия : [учеб. для студ. хим. спец. высших учеб. зав.] – Х. : Фолио, 2005. – 460 с.
7. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та., 1976. – 306 с.
8. Пуриш Л.М., Погребова И.С., Козлова И.А. Влияние сульфатредуцирующих бактерий на коррозию стали в присутствии ингибиторов // Мікробіол. журн. – 2002. – Т. 64, № 6. – С. 67–72.
9. Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Иутинская Г.А. Биоразнообразие сульфатредуцирующих бактерий, развивающихся на объектах теплосетей / Л.М. Пуриш, Л // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т. 76, № 3. – С. 11–17.
10. Резапова И.Б. Предупреждение биодеструкции химвеществ при разработке нефтяных месторождений: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Уфа, 1999. – 26 с.
11. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* // Second edition, Volume two, Part C, Eds D.Brenner, N.R.Krieg, J.T.Staley. – New York: Springer, 2005. 1388 p.
12. Maluckov B.S. Corrosion of steels induced by microorganisms // Metall. Mater. Eng. – Vol. 18 (3). – 2012. – P. 223–231.
13. Melo I.R., Filho S.L.U., Oliveira F.J.S., França F.P. Formation of Biofilms and Biocorrosion on AISI-1020 Carbon Steel Exposed to Aqueous Systems Containing Different Concentrations of a Diesel/Biodiesel Mixture // International Journal of Corrosion. – Vol. 2011. – 2011. – P. 1706–1712.
14. Liengen T., Feron D., Basseguy R., Beech I.B. Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications. – Woodhead Publishing, 2014. – 446 p.

Стаття надійшла до редакції 15.09.2015 р.

