УДК 579.69: 620.193.8

МІКРОБНА КОРОЗІЯ ЯК ПРОЯВ ТЕХНОГЕНЕЗУ У БІОПЛІВЦІ, ЩО ФОРМУЄТЬСЯ НА ПОВЕРХНІ ПІДЗЕМНИХ СПОРУД

І. КОЗЛОВА, Ж. КОПТЄВА, В. ЗАНІНА, Л. ПУРІШ

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

Встановлено, що місцем формування агресивного мікробного угруповання є феросфера – зона ґрунту товщиною до 3 mm, яка безпосередньо контактує з поверхнею металевої підземної споруди. По суті, це і є біоплівка, в якій проявляється біогеохімічна активність бактерій-збудників корозії і пришвидшується перебіг електрохімічних процесів. Показано, що у біоплівці відбуваються популяційні зміни бактерій з домінуванням бактерій певних фізіологічних груп: сульфатвідновлювальних, денітрифікувальних, залізо-відновлювальних. Отримано оригінальні дані про формування у біоплівці сульфатвідновлювальних бактерій на контакті з металом подвійного шару у вигляді піротину і піриту. Досліджено архітектоніку моно- та бінарної біоплівок, утворених бактеріями-деструкторами захисних покривів. Методом конфокальної лазерної сканівної мікроскопії встановлено, що в базальній частині бінарної біоплівки, на поверхні бутилкаучукового шару покриву, розташовуються бактерії роду *Arthrobacter*, які пришвидшують його деградацію. Ефективним засобом захисту матеріалів від мікробних пошкоджень є введення до їх складу біоцидів, які коагулюють білки, окиснюють сульфгідрильні групи у структурах білків, що призводить до загибелі клітин мікроорганізмів.

Ключові слова: *мікробна корозія, біоплівка, бактерії-деструктори, біомінералізація, захисні покриви.*

W. Iverson, один з відомих спеціалістів у галузі мікробної корозії, вважає, що з усіх різновидів корозії найпривабливіший мікробіологічний. Зацікавленість цією проблемою значною мірою зумовлена її різноманіттям.

Як відомо, мікробна корозія підземних споруд – найскладніший вид ґрунтової корозії, оскільки залежно від ступеня зволоженості ґрунту і вмісту кисню вона може протікати анаеробним або аеробним шляхами. При цьому інтенсивність перебігу корозійного процесу у ґрунті суттєво змінюється. Відомі випадки повного руйнування впродовж року газопроводу під Лондоном і повної збереженості зразків стародавньої зброї із заліза упродовж багатьох віків.

Найвідчутніше на корозію металу в підземному середовищі впливають бактерії циклу сірки – тіонові та сульфатвідновлювальні. З їх діяльністю пов’язане утворення самородної сірки, сульфідних родовищ, сірководневих вод, а також виникнення корозійно небезпечних ситуацій. Нерідко масштаби утворення і накопичення сірчаної кислоти, сірководню та елементної сірки біогенного походження настільки великі, що корозійну активність бактерій циклу сірки можна розглядати як один із видів їх геохімічної діяльності.

Стан проблеми і результати досліджень. У 20-ті роки XX століття В. І. Вернадський прогнозував інтенсифікацію геохімічної активності мікроорганізмів під впливом техногенезу [1], яскравим прикладом якого є великомасштабне підземне будівництво. Вперше корозійне руйнування металу в ґрун-

Контактна особа: І. КОЗЛОВА, e-mail: Kozlova@serv.imv.kiev.ua

ті під дією сульфатвідновлювальних бактерій (СВБ) виявили голландські вчені C. H. Khür і L. S. Van Der Vlugt [2]. Вони звернули увагу на активність СВБ у прилеглому до труби ґрунті, яка була під катодним захистом. Саме так виникла блискуча гіпотеза катодної деполяризації бактеріями як механізму корозії в анаеробних умовах траншеї газопроводу. В подальшому цей механізм підтвердили багато науковців [3, 4, 6]. Зокрема, мікробіологічні дослідження зразків ґрунтів з траншей трансконтинентальних газопроводів виявили значну кількість СВБ на поверхні масиву труби [5]. Отже, залізовмісні конструкції, які кородують, створюють відповідні умови для їх росту.

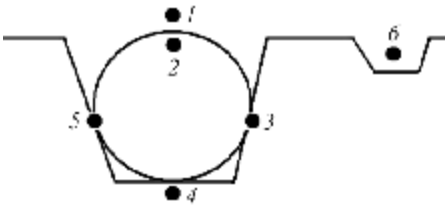

Рис. 1. Схема відбору зразків ґрунту:
1–6 – точки відбору.

Fig. 1. A chart of soil sampling:
1–6 –samplimg points.

Щоб вивчити вплив металевої конструкції на ґрадієнт корозійно небезпечних груп бактерій у ґрунті, розроблено схему відбору зразків ґрунту під час шурфування газопроводів (рис. 1) [7]. Мікробіологічний аналіз виявив чітку закономірність розподілу СВБ у ґрунті траншеї магістрального газопроводу (рис. 2). Залежно від ступеня його агресивності змінювалась чисельність СВБ відносно масиву труби: в потенційно агресивних ґрунтах у траншеї та біля неї – в середньому на один порядок; у малоагресивних біля поверхні газопроводу їх кількість перевищувала таку поза масивом труби в середньому на два порядки, у корозійнонебезпечних – на 3–4 порядки.

Рис. 2. Розподіл
сульфатвідновлювальних бактерій
відносно масиву труби газопроводу:
1–6 – точки відбору;
I – потенційно агресивні ґрунти;
II – малоагресивні;
III – дуже агресивні.

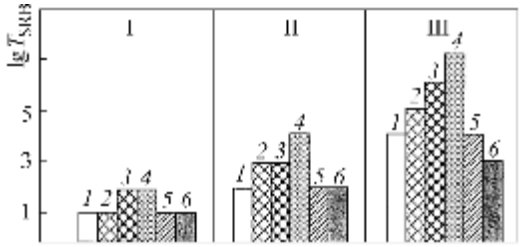

Fig. 2. Distribution of sulfate-reducing bacteria (SRB) with respect to the gas-pipeline body:
1–6 – sampling points; I – potentially aggressive soils; II – low-aggressive; III – very aggressive.

Загалом СВБ скупчуються у точці відбору по нижній твірній газопроводу (рис. 2, точка *4*) [7], яка є анаеробною анодною зоною, де внаслідок корозійних процесів накопичуються Fe(II)-іони та знижується окисно-відновний потенціал, що інтенсифікує життєдіяльність СВБ. Цю зону названо феросферою і подальші модельні експерименти підтвердили її існування.

Таблиця демонструє зміну кількості бактерій циклу сірки у ґрунті відносно сталевого зразка. Чисельність СВБ у зоні 1 на декілька порядків вища, ніж у зоні 2. Аналогічно змінювалась їх гідрогеназна активність: на поверхні металу вона становила майже 2500 nmol/(min·mg) білка, а на відстані 10 mm від нього – 400 nmol/(min·mg) білка. Максимальне накопичення сірководню (450 mg/l) спостерігали також у зоні 1, а мінімальне (220 mg/l) – у зоні 3.

Отже, активізація життєдіяльності бактерій циклу сірки та збільшення їх кількості зумовлені безпосереднім впливом металу. Максимально активізується їх життєдіяльність внаслідок розвитку в ґрунті їх асоціації з тіоновими бактеріями. При цьому швидкість корозії сталі через шість місяців становила

22,07 mg/dm^2 за добу для сукупності бактерій циклу сірки і 3,72 mg/dm^2 за добу для монокультур СВБ, а через 12 місяців, відповідно, 28,8 і 19,07 mg/dm^2 за добу. В середньому швидкість корозії сталі у ґрунті, інокульованому асоціацією бактерій циклу сірки, вища у 6 разів проти стерильного. Посилення руйнування сталі під впливом угруповання *D. desulfuricans* і *T. thioparus* можна пояснити сумарним процесом, що охоплює катодну деполяризацію за участю *D. desulfuricans* і сульфіду заліза, а також формування анодних зон на поверхні внаслідок утворення елементної сірки *T. thioparus*. Виявлена феросфера не що інше, як біоплівка, сформована бактеріями-збудниками корозії на поверхні кородівного металу [8].

Розподіл бактерій циклу сірки в прилеглому до металу ґрунті

Варіанти досліду	Загальна кількість клітин в 1 g ґрунту		Розподіл бактерій по зонах ґрунту					
	СВБ	ТБ	СВБ			ТБ		
			1	2	3	1	2	3
Стерильний ґрунт + метал	0	0	0	0	0	0	0	0
Стерильний ґрунт + метал + СВБ($Г^+$)	10^8	0	10^8	10^8	10^7	0	0	0
Стерильний ґрунт + метал + СВБ($Г^-$)	10^6	0	10^7	10^6	10^6	0	0	0
Стерильний ґрунт + метал + ТБ	0	10^2	0	0	0	10^2	10^2	10^1
Стерильний ґрунт + метал + СВБ($Г^+$) + ТБ	10^{10}	10^3	10^{10}	10^9	10^8	10^3	10^2	10^1

Примітки: 1, 2, 3 – зони ґрунту; 1 – ґрунт, що безпосередньо прилягає до поверхні металу; 2, 3 – віддалений від поверхні металу на 3 і 10 mm відповідно. $Г^+$ – гідрогеназопозитивні бактерії; $Г^-$ – гідрогеназонегативні.

Детальнішим обстеженням феросфери підземних споруд, що зазнали корозійного пошкодження, виявлено, крім СВБ, бактерії інших фізіологічних груп: амоніфікувальні (АМБ), денітрифікувальні (ДНБ), залізовідновлювальні (ЗВБ), вуглеводнеокиснювальні (ВОБ) та тіонові (ТБ), що сформували агресивне мікробне угруповання. Гетеротрофи трансформують первинні субстрати, продукти деградації яких є джерелом живлення для СВБ. Отже, у біоплівці на поверхні споруд, що кородують, функціонує сульфідогенне мікробне угруповання [8, 9, 10].

Доцільно дослідити сукцесію у мікробному угрупованні під час формування на поверхні сталі біоплівки. Для цього виділені в чисту культуру СВБ та їхні природні супутники: ЗВБ, ДНБ, АМБ. З отриманих культур бактерій створено штучну мікробну асоціацію. Співвідношення бактерій в асоціації відповідало їх співвідношенню в природному угрупованні. Динаміку чисельності у мікробній популяції визначали через 3; 6; 9; 24; 48; 72; 144; 192; 240 та 360 h [11].

Установлено, що за формування на поверхні сталі біоплівки в мікробному угрупованні відбувається сукцесія з послідовною зміною домінування досліджуваних фізіологічних груп бактерій. Після 3 h експозиції у біоплівці виявлено у різній кількості ДНБ, АМБ та ЗВБ (рис. 3). Спочатку домінують АМБ, після 6 h експозиції розвиваються ЗВБ. Домінування АМБ у мікробній асоціації призводить до поглинання кисню і створення анаеробіозу, необхідного для подальшого розвитку інших груп бактерій [7, 10, 12, 13].

В анаеробних умовах через 24 h у біоплівці виявлено СВБ. Зафіксовано появу чорного осаду, а на сталевому зразку – тонкого шару сульфіду. На третю

добу СВБ домінують, зростає чисельність ЗВБ, а кількість АМБ та ДНБ зменшується. На шосту добу експозиції спостерігається другий пік розвитку АМБ, що збігся з незначним зменшенням чисельності СВБ. Для 10 доби культивування у мікробному угрупованні характерне стале домінування СВБ. Накопичення білка у біоплівці збіглося з піком розвитку мікробного угруповання (рис. 3).

Отже, під час формування на поверхні сталі біоплівки відбувається сукцесія, тобто зміна популяцій бактерій різних фізіологічних груп, що сприяє взаємовигідному функціонуванню корозійно-небезпечного угруповання. Зі зміною у зрілій біоплівці аеробних та анаеробних зон пришвидшується мікробна корозія металу. Крім того, гетеротрофні бактерії здатні синтезувати екзополімери, які сприяють структуризації біоплівки [14]. На думку James et all [13], у багатовидовій біоплівці, що формується у природних умовах, навіть один вид бактерій, що здатні синтезувати екзополісахариди, сприяє виникненню та зміцненню структури біоплівки [13, 15]. Саме екзополісахариди є основна ланка взаємодії біоплівки з металом, що кородує, оскільки полегшують закріплення у біоплівці продуктів корозії металу [10, 13, 14].

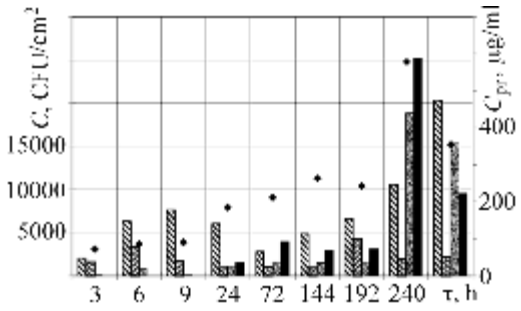

Рис. 3. Динаміка розвитку сульфідогенної мікробної асоціації.

Fig. 3. The dynamics of the sulfidegenic microbal association development.

Визначення структури та хімічного складу екзополімерного комплексу біоплівки, яка формується на сталі, може стати підґрунтям для розкриття механізмів взаємодії металу і бактерій – збудників корозії. Порівняльне дослідження екзополімерного комплексу (ЕПК), що продукується монокультурою *Desulfovibrio sp.* штам Київ-10 і штучно створеними асоціаціями СВБ, ЗВБ, ДНБ, АМБ за біоплівкової та планктонної моделей росту, дало можливість встановити відмінності у розвитку монокультури СВБ та її асоціації з гетеротрофами. Це проявилось у різному за потужністю синтезі ЕПК. Зауважено кореляцію між активністю синтезу екзополімерів у біоплівці та швидкістю корозії сталі: міцніша біоплівка пришвидшувала корозію сталі.

У складі екзополімерів, синтезованих монокультурою *Desulfovibrio sp.* штам Київ-10 під час її розвитку у вигляді біоплівки, виявлено глюкозу, галактозу, манозу, ксилозу та рибозу. Екзополісахарид біоплівкових та планктонних клітин асоціативних культур, крім вищевказаних вуглеводів, містив рамнозу, арабінозу та фукозу, які, можливо, є складниками ЕПМ гетеротрофних супутників СВБ. У складі ЕПМ біоплівки, сформованої гетеротрофними супутниками, було значно більше глюкози (55,9%), ніж в ЕПМ планктонних клітин (24,7%). Це дає змогу припустити, що саме гетеротрофні асоціанти СВБ синтезують екзополісахарид з високим вмістом глюкози. Ці результати узгоджуються з працями Battin T. J. із співавторами [16], які показали, що *Pseudomonas aeruginosa* синтезує полісахариди, які містять рамнозу, галактозу, манозу, ксилозу, арабінозу та глюкозу, вміст якої становить 60% від загального вмісту моносахаридів. Саме представники роду *Pseudomonas* здатні продукувати екзополісахариди, що утворюють стійкі гелі, які зміцнюють структуру біоплівки [12, 17].

Як, керуючись новітніми знаннями, пов'язати біогеохімічні та корозійні процеси в біоплівці, сформованій СВБ? Згідно з даними W. A. Hamilton [8], основним чинником формування мікробної біоплівки є екзополісахарид. Під впливом цих бактерій на металі утворюється біоплівка, яка, крім екзополімеру (екзополісахариду, екзоліпополісахариду), містить сульфіди. Тому біоплівку СВБ на металі, що кородує, потрібно вивчати, враховуючи ці чинники.

Порівняльне дослідження екзополісахаридів, утворених адгезованими та планктонними клітинами СВБ, дало змогу встановити деякі розбіжності властивостей цих екзополімерів залежно від моделей росту. Перш за все питоме продукування екзополісахаридів клітинами біоплівки було на три порядки більше, ніж вільноплавальних. I. Beech спостерігала структурні та хімічні відмінності екзополімерів, які продукували адгезовані та планктонні клітини *Pseudomonas sp.* штам NCIMB 2021 [17]. Z. Lewandowski відзначив, що сталі біоплівки мають тенденцію збільшувати їх щільність й товщину і містили у верхніх шарах більше порожнин, ніж у нижніх [18]. Цілком можливо, що в цьому випадку у біоплівці з віком відбуваються хімічні та структурні зміни, які впливають на її будову. Враховуючи літературні, а також власні результати, можна припустити, що екзополімери, утворені клітинами різних за агресивністю СВБ, мають не тільки різні хімічні властивості, а й різну архітектоніку, що може впливати на розподіл сульфідів у біоплівці та їх взаємодію з металом. Це положення потребує вивчення. На цьому етапі маємо певні відомості про потужність біоплівки СВБ з різною агресивністю, яка обумовлена кількісним і якісним складом сульфідів. Встановлено, що агресивний штам СВБ на тонкій металевій матриці (2000 nm) утворював за добу біоплівку товщиною 800 μm, а неагресивний завтовшки 380 μm [19]. Згідно з рентгенофазовим аналізом, серед продуктів корозії обох штамів СВБ є оксидні форми заліза (магнетит, $Fe(OH)_2$) та сульфіди у формі макінавіту і піриту. Якісних розбіжностей не спостерігали, але на рентгенограмі сигнали агресивного штаму були потужніші, що відповідає накопиченню великої кількості вказаних сполук заліза. Хімічні дослідження показали, що на початковій стадії розвитку біоплівки СВБ за наявності розчинного кисню в її верхніх шарах накопичуються гідрати заліза – основні продукти корозії. Гідроксиди заліза пізніше трансформуються у сульфіди, які діють як катоди, стимулюючи корозію [20].

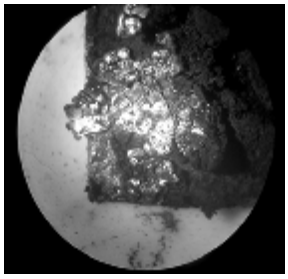

Рис. 4. Біоплівка на поверхні металевого зразка.

Fig. 4. Biofilm on the surface of the metal specimen.

Деякі автори вважають, що внаслідок трансформації залізозбагачених моносульфідів у сіркозбагачений дисульфід останній пришвидшуватиме перебіг корозії [5, 6]. Тому вивчали у динаміці через 10; 40; 50; 60 і 250 діб біомінералізацію, розподілення і якісний склад біогенних сульфідів у біоплівці, сформованій на поверхні сталі 08кп, під час мікробної корозії під впливом *Desulfovibrio sp.*, штам Київ-10 [21]. Для діагностики мінералів і визначення продуктів мінералоутворення (осад і корки на зразках) використовували рентгеноспектральний мікроаналіз (РСМА) і рентгеноструктурний аналіз (РСА).

Сформовані на поверхні сталевого зразка біоплівки, тобто адгезовані СВБ і продукти їх метаболізму, мають пухку структуру (рис. 4). Всім біоплівкам, незалежно від експозиції зразків у культурі *Desulfovibrio sp.* штам Київ-10, властива двошарова структура мінеральних утворень. Чітко диференціюються піротиновий і піри-

товий шари. На контакті їх з поверхнею заліза (сталі) утворюється нижній шар піротину. Згідно з даними РСМА, у ньому є 60...90% піротину, 10...30% магнетиту (Fe_3O_4), 5% кальциту і 3% вуглецю органічного. Особливістю нижнього шару є магнетність (рис. 5*a*). Склад верхнього шару різко відрізняється від нижнього: 15...25% піриту, 15...20% сидериту, 20...25% кальциту, 15...20% апатиту, 5...7% вуглецю органічного. Іноді в місцях кратерів є плівки піриту з жовтим яскравим металевим блиском, а також прозорі білі або голубі кристали – сульфати заліза або кальцію. Верхній шар немагнетний (рис. 5*b*). Виявлене явище можна пояснити наявністю ґрадієнтів термодинамічних параметрів – Eh або концентрації сірки. Бактерії "відривають" катіон заліза від металу і відкладають у вигляді сульфіду, використовуючи енергію реакції сульфідоутворення для своєї життєдіяльності. Тут СВБ належить важлива кінетична роль у здійсненні і пришвидшенні реакції мінералоутворення за нормальної температури. При цьому значну частину літобіохімічних реакцій (близько 30 kJ/mol) бактерії витрачають на 1 mol вуглеводу CH_2O [22, 23].

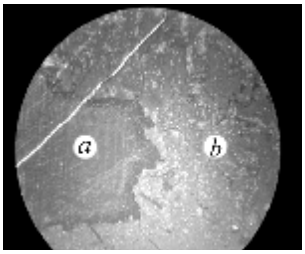

Рис. 5. Зональна біомінералізація на поверхні сталі: *a* – піротиновий шар; *b* – піритовий.

Fig. 5. Zonal biomineralization on the steel surface: *a* – pirrotine layer; *b* – piryte.

Залізо переходить у катіон за участю бактерій згідно з реакцією

$$Fe + 2H^+ \rightarrow Fe^{2+} + H_2,\ \Delta G_{298} = -71\ \text{kJ/mol}.$$

У нижньому шарі за pH 7,8 відкладається піротин як продукт літо-біохімічної реакції, а пірит утворюється у верхньому шарі:

$$Fe^{2+} + (HS)^- = FeS + H^+,\quad \Delta G_{298} = -23\ \text{kJ/mol},$$

$$Fe^{2+} + 2(HS)^- = FeS_2 + H_2,\quad \Delta G_{298} = -92\ \text{kJ/mol}.$$

Необхідно зауважити, що катіон Fe^{2+} для піритового шару СВБ можна "добути" тільки з металевого заліза (Fe^0), а не з піротину, оскільки реакція $Fe_{(1-x)}S + H^+ = Fe^{2+} + (HS)^-$, $\Delta G_{298} = +23$ kJ/mol має позитивний енергетичний ефект і невигідна для бактерій.

Відомо, що корозія маловуглецевої сталі під впливом СВБ протікає за двома механізмами: завдяки катодній деполяризації бактеріями і сульфідами. За час експерименту швидкість корозії зростала з 14 по 40 добу з 0,020 до 0,030 g/dm^2 відповідно. Чисельність СВБ у біоплівці становила 10^6 клітин на 1 cm^2. На 50 і 60 добу швидкість корозії знизилась відповідно до 0,012 і 0,016 g/dm^2. На 250 добу вона досягає 0,063 g/dm^2, тобто значно зростає і при цьому кількість СВБ досягає 10^9 клітин на 1 cm^2. Після зняття продуктів корозії на поверхні зразків як результат взаємодії бактерій і біогенних сульфідів зі сталлю 08кп проявляються виразки у вигляді зон травлення металу.

Отже, отримані дані дещо змінюють наші уявлення про трансформацію сульфідів у біоплівках від залізозбагачених до сіркозбагачених. Коректніше було б стверджувати про загальну біомінералізацію, яка відбувається одночасно у просторі біоплівки.

Надійність металевих підземних споруд залежить насамперед від стану антикорозійного захисту за допомогою ізоляційних покривів. Головне їх призначення – створити бар'єрний шар, що стримує розвиток корозії на поверхні металу, а також обмежити або повністю запобігти накопиченню продуктів

корозії на межі метал–покрив.

З пошкоджених плівкових і нафтобітумних покривів газопроводів і підземних резервуарів виділили бактерії різних еколого-трофічних груп: ДНБ, ВОБ, ЗВБ і СВБ. Таксономічний склад представлено, в основному, бактеріями родів *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio* і *Streptomyces* [1, 24]. Кількість вилучених бактерій з біоплівки пошкоджених покривів була на 1–4 порядки вища на нафтобітумних матеріалах (БНІ-IV), ніж на поліетиленовому (ПЕ) та полівінілхлоридному (ПВХ) покривах.

Досліджено архітектоніку моно- та бінарної біоплівок, утворених вуглеводнеокиснювальними бактеріями *Pseudomonas pseudoalcaligenes* і *Arthrobacter flavescens* за допомогою конфокального лазерного сканівного мікроскопа (CLSM Pascal 5, фірма "Carl Zeiss"). Встановлено, що в базальній частині бінарної біоплівки розташовані бактерії роду *Arthrobacter*, які руйнують бутилкаучуковий шар захисного покриву.

В умовах модельного лабораторного досліду бактеріальна плівка на поверхні ізоляційних покривів формується впродовж 14 діб. Її утворенню передує таксис мікроорганізмів – їх спрямований рух до поверхні. Таксис допомагає бактеріям, які пошкоджують ізоляційні покриви, потрапити до специфічних еконіш, адаптуватись до них і сформувати біоплівку. Виявлено диференційне відношення бактерій до субстратів. ВОБ і ДНБ переважно проявляли позитивний хемотаксис до бітумного покриву (БНІ-IV) та деяких його інґредієнтів. ЗВБ здебільшого індиферентні до досліджених матеріалів. СВБ проявляли негативний таксис до нафтового бітуму (БНІ-IV) та мастики бітумно-гумової (МБГ-90) [25].

Після таксису починається адгезія бактерій до захисних матеріалів. Найбільша їх кількість прикріплюється до поверхні бітумних покривів (БНІ-IV, МБГ-90) – 88 і 77%, відповідно. Помітно менший відсоток адгезії (10%) на бітумному покриві, модифікованому інгібітором корозії з біоцидною дією (БНІ-IV, ОК) [25].

За аеробних умов формування біоплівки на поверхні всіх досліджених покривів домінували АМБ та ВОБ; в анаеробних умовах на поліетилені (Полікен 980-25), поліуретані та нафтовому бітумі (БНІ-IV) – СВБ; на бітумних покривах, модифікованих інгібіторами-біоцидами корозії (БНІ-IV, ОК та БНІ-IV, БЛК) – ДНБ. За дії інгібіторів-біоцидів чисельність АМБ, ВОБ і СВБ знижувалась на 2–4 порядки порівняно з нафтобітумним покривом.

Слід також зауважити, що бактерії, виділені з біоплівки, мають високу денітрифікувальну і сульфатвідновлювальну активність, в результаті чого утворюються агресивні метаболіти (NO_2^-, NH_3, H_2S), які змінюють процеси на поверхні захисних матеріалів. Захисні матеріали по-різному впливали на активність бактерій. Наприклад, Полікен 980-25 і поліуретан незначно пригнічували відновлення нітратів. У присутності БНІ-IV спостерігається стимуляція цього процесу. Цей самий покрив, модифікований інгібіторами-біоцидами корозії ОК і БЛК, пригнічував більш ніж на 50% денітрифікувальну та сульфатвідновлювальну активність бактерій.

Взаємодію мікроорганізмів із твердими поверхнями визначають також гідрофобність і електрокінетичний потенціал. Найвищий показник гідрофобності мали бактерії *Pseudomonas sp.* штам 103, які не утворювали позаклітинний слиз, але добре адгезувалися до плівкових і мастильних покривів. Крім того, їхня поверхня заряджена негативно, що також сприяє адгезії клітин до позитивно заряджених матеріалів [25–28].

Досліджені покриви за ступенем адгезії бактерій на поверхні можна розмістити у такій послідовності: нафтовий бітум (БНІ-IV) > мастика бітумно-гумова (МБГ-90) > поліетиленовий покрив (Полікен 980-25) > бітум, модифікований інгібітором корозії з біоцидною дією (БНІ-IV, ОК).

У біоплівці, що формується на поверхні захисних покривів, відбуваються закономірні зміни бактерій у часі. Під час сукцесії на захисному покриві Полікен 980-25 змінюється таксономічний склад бактерій. На ранніх етапах сукцесії домінують ЗВБ та ВОБ роду *Pseudomonas*, які відновлюють Fe^{+3} і окиснюють вуглеводні. Після двох годин експозиції у біоплівці починають розвиватися бактерії роду *Arthrobacter*, які теж здатні відновлювати тривалентне залізо, нітрати і окиснювати вуглеводні; через 6 h – спороутворювальні бактерії роду *Bacillus*, які домінують у структурі бактеріального комплексу біоплівки (рис. 6).

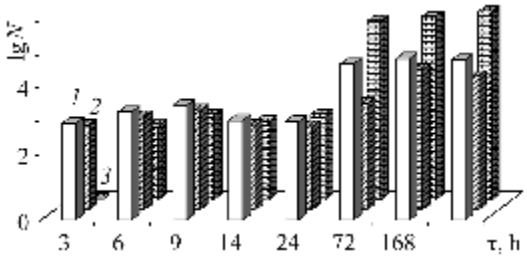

Рис. 6. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні покриву Полікен 980-25 (CFU/cm^2): *1* – залізовідновлювальні бактерії; *2* – вуглеводнеокиснювальні; *3* – бактерії роду *Bacillus*.

Fig. 6. Dynamics of the bacteria number in the biofilm on the Polyken 980-25 surface coating (CFU/cm^2, CFU – colonyforming units): *1* – iron-reducing bacteria; *2* – hydrocarbon-oxidizing; *3* – *Bacillus* bacteria.

Основним структурним компонентом біоплівок є матрикс – позаклітинна полімерна речовина, яка складається з екзополісахаридів, екзоліпополісахаридів, білків, нуклеїнових кислот та інших речовин [29]. Найбільш вивчені екзополісахариди, які відіграють певну роль у структурі та функціях біоплівкових угруповань.

В умовах біоплівкової моделі росту посилюється питома ферментативна активність бактерій, зокрема гідролаз і оксидоредуктаз, які руйнують складні ефірні зв'язки, переносять атоми водню від CH_2–CH_2 груп з утворенням C=C груп. Дегідрування вуглецевих ланцюгів і перетворення насичених сполук у ненасичені підвищує їхню агресивність до покривів.

Ефективним засобом захисту різних матеріалів від мікробних пошкоджень є введення до їх складу біоцидів, які коагулюють білки, окиснюють сульфгідрильні групи у структурах білків, що призводить до загибелі клітин мікроорганізмів. Підсилення мікробної тривкості нафтобітумних покривів досягають їх модифікацією продуктами промислової переробки кам'яновугільної та сланцевої смол.

Відомо, що плівкові покриви, зокрема полімерні поліетиленові матеріали, надійніші, ніж нафтобітумні. Проте під впливом ВОБ, ДНБ та СВБ погіршувались фізико-хімічні властивості цих покривів: зменшувались відносне видовження на 19%, міцність до розриву – на 37%. Суттєво, що після дії цих бактерій на зразках покривів спостерігали пошкодження їх клейової основи. Під дією бактерій *Pseudomonas pseudoalcaligenes* та *Arthrobacter flavescens* адгезійна міцність ізоляційних матеріалів знижувалась на 60% щодо контролю. У варіанті досліду, в якому покрив був єдиним джерелом вуглецю, повністю утилізований його бутилкаучуковий шар. Такий покрив відокремлюється від металу і не може захищати його від корозії.

Отже, біоплівка, як сукупність бактерій і продуктів їх метаболізму, формується на поверхні різних за хімічним складом покривів. Мікроорганізми в біоплівці мають високу метаболічну активність і здатні пошкоджувати ізоляційні покриви, які є потенційним джерелом енергії і живлення.

ВИСНОВКИ

Вперше виявлено феросферу – специфічну зону ґрунту товщиною 1...3 mm, що прилягає до поверхні трубопроводів. У феросфері, що є біоплівкою, проявляється біогеохімічна активність бактерій-збудників корозії і пришвидшується перебіг електрохімічних процесів. У біоплівці, сформованій сульфатвідновлювальними бактеріями, на поверхні маловуглецевої сталі утворюються піротиновий та піритовий шари, що свідчить про загальну біомінералізацію, яка відбувається одночасно у просторі біоплівки. Вперше з використанням методу конфокальної сканівної лазерної мікроскопії досліджено архітектоніку моно- та бінарної біоплівок, утворених бактеріями-деструкторами захисних покривів. Встановлено, що представники роду *Arthrobacter* переважають у базальній частині біоплівки і пришвидшують деградацію покриву Полікен 980-25.

РЕЗЮМЕ. Установлено, что местом формирования агрессивного микробного сообщества является ферросфера – зона грунта толщиной до 3 mm, которая непосредственно контактирует с поверхностью металлического подземного сооружения. По сути это и есть биопленка, в которой проявляется биогеохимическая активность бактерий-возбудителей коррозии и ускоряются электрохимические процессы. Показано, что в биопленке происходят популяционные изменения бактерий с доминированием бактерий определенных физиологических групп: сульфатвосстанавливающих, денитрифицирующих, железовосстанавливающих. Получены оригинальные данные о формировании в биопленке сульфатвосстанавливающих бактерий двухслойной корки: с пирротиновым слоем на контакте с металлом и пиритовым между пирротином и раствором. Исследована архитектоника моно- и бинарной биопленок, образованных бактериями-деструкторами защитных покрытий. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии установлено, что в базальной части бинарной биопленки на поверхности бутилкаучукового слоя покрытия находятся бактерии рода *Arthrobacter*, которые ускоряют его деградацию. Эффективным средством защиты материалов от микробных повреждений является введение в их состав биоцидов, которые коагулируют белки, окисляют сульфгидрильные группы в структурах белков, что приводит к гибели клеток микроорганизмов.

SUMMARY. It has been established for the first time that the place of aggressive microbial community formation is the ferrospere, i. e. a zone of soil with thickness of 3 mm that is in direct contact with the underground metal construction surface. In fact, it is a biofilm in which biogeochemical processes are accelerated. It is shown that in the biofilm the population changes of bacteria take place with prevaing bacteria of some physiological groups: SRB (sulphate-reducing bacteria), DNB (denitrifying bacteria) and FRB (ferro-reducing bacteria). Original data have been obtained on formation in SRB biofilm on the contact with metal of a double leyer in the form of pyrrotine and pyrite. The architectonic of mono- and binary biofilms formed by bacteria-destructors of the protective coatings has been investigated. Using the CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) it has been established that in the basal part of a binary biofilm on the surface of butylrubber layer of the coating there are *Arthrobacter* bacteria which accelerate its degradation. The effective method of material protection against microbial damage is the introduction of biocides into its composition. They coagulate proteins, oxidize sulfhydril groups in the proteine structure that kill microorganism cells.

1. *Мікробна* корозія підземних споруд / К. І. Андреюк, І. П. Козлова, Ж. П. Коптєва та ін. – К.: Наук. думка, 2005. – 259 с.
2. *Von Volzogen Kuhr C. A. H. and Van der Vlugt L. S.* Grafication of cast-iron as an electrobiological process in anaerobic soils // Water. – 1934. – **18**. – P. 147–165.
3. *Booth G. H.* Sulfur bacteria in relation to corrosion // J. Appl. Bacteriol. – 1964. – **27**. – P. 147–181.

4. *Harris J. O.* Bacteria, oxygen and soil relationship in corrosion // Techn. Bull. Eng. Exp.: Stat W. Va Univ. – 1964. – **72**. – P. 257–263.
5. *Mc Comb G. B.* New light on anaerobic corrosion // Corrosion control handbook: Energy Commun. Inc. New York, 1985. – P. 122–125.
6. *Антоновская Н. С., Козлова И. А., Андреюк Е. И.* Распределение сульфатредуцирующих бактерий в почве вблизи магистральных газопроводов // Микробиол. журн. – 1985. – **47**, № 2. – С. 93–94.
7. *Влияние* корродируемой стали на численность и биологическую активность бактерий цикла серы в грунте / Н. С. Антоновская, А. И. Пиляшенко-Новохатный, И. А. Козлова, Е. И. Андреюк // Там же. – 1985. – **47**, № 4. – С. 6–10.
8. *Hamilton W. A.* Biofilms: microbial interactions and metabolic activity // Ecology of Microbial Communities, Cambridge University Press. – 1987. – P. 361–385.
9. *Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н.* Введение в природоведческую микробиологию. – М.: МГУ, 2001. – 255 с.
10. *Hamilton W. A.* Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion // Ann. Rev. Microbiol. – 1985. – **39**. – P. 195–217.
11. *Пуріш Л. М., Асауленко Л. Г.* Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за формування біоплівки на поверхні сталі-3 // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 6. – С. 19–25.
12. *Microbial* Biofilms / J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell et. al. // Ann. Rev. Microbiol. – 1995. – Vol. 49. – P. 711–745.
13. *James G. A., Beaudette L., and Costerton J. W.* Interspecies bacterial interactions in biofilm // J. Ind. Microbiol. – 1995. – **15**, № 4. – P. 237–262.
14. *Lewandowski Z.* Structure and Function of Biofilms // Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed L.V. Evans, 2000, Harwood Academic Publishers. – P. 1–17.
15. *Successional* Development of Sulfate-Reducing Bacterial Populations and Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic / T. Itoh, S. Okabe, H. Saton, Y. Watanabe // Appl. and Environ. Microbiol. – 2002. – **68**, № 3. – P. 1392–1402.
16. *Effects* of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms / T. J. Battin, L. A. Kaplan, J. D. Newbold et al. // Ibid. – 2003. – **69**, № 9. – P. 5443–5452.
17. *Chemical* and structural characterization of the exopolymers produced by *Pseudomonas sp.* NCIMB 2021 in continuous culture / I. Beech, L. Hanjagsit, M. Kalaji et al. // Microbiology. – 1999. – **145**. – P. 1491–1497.
18. *Lewandowski Z.* Structure and function of bacterial biofilms // Corrosion'98 by NACE International. – 1998. – № 296. – P. 1–15.
19. *Новий* підхід до вивчення мікробно індукованої корозії в біоплівках / І. П. Козлова, Ж. П. Коптєва, Л. М. Пуріш та ін. // Фіз.-хім. механіка матеріалів. Спецвипуск. – 2000. – № 1. – С. 626–629.
20. *Мікробно* індукована корозія в біоплівці як аналог біогеохімічного процесу / І. П. Козлова, Ж. П. Коптєва, А. І. Піляшенко-Новохатний та ін. // Там же. – 2002. – № 3. – С. 714–717.
21. *Біомінералізація* на поверхні маловуглецевої сталі як прояв мікробної корозії / І. П. Козлова, Г. Є. Коптєва, Р. Я. Бєлєвцев, С. Д. Співак // Там же. – 2008. – № 7. – С. 45–48.
22. *Белевцев Р. Я., Ковалюх Н. Н., Спивак С. Д.* Термодинамический анализ биогеохимических реакций при глубинном гипергенезе гранитных массивов // Минерал. журн. – 2004. – **26**, № 2. – С. 25–38.
23. *Термодинамика* газового обмена в окружающей среде / Р. Я. Белевцев, С. Г. Бойченко, С. Д. Спивак и др. – К.: Наук. думка, 2007. – 247 с.
24. *Андреюк Е. И., Коптева Ж. П.* Микробное повреждение изоляционных покрытий газопроводов // Микробиол. журн. – 1987. – **44**, № 2. – С. 46–49.
25. *Kopteva Zh. P., Zanina V. V., and Kozlova I. A.* Microbial corrosion of protective coatings // Surface Engineering. – 2004. – **20**, № 4. – P. 275–280.
26. *Гордиенко А. С., Курдиш И. К.* Электрокинетические свойства клеток Methylomonas rubra и их взаимодействие с дисперсными материалами // Микробиол. журн. – 1990. – **52**, № 4. – С. 88–92.
27. *Физико-химические* основы иммобилизации клеток методом сорбции / Е. И. Козляк, М. М. Яхимов, И. Б. Уткин и др. // Прикл. биохимия и микробиология . – 1991. – **27**, № 6. – С. 788–803.
28. *Курдиш И. К.* Взаимодействие микроорганизмов с твердыми материалами и его биотехнологическое значение // Мікробіол. журн. – 1999. – **61**, № 1. – С. 60–70.
29. *Коптєва Ж. П., Заніна В. В.* Мікробні біоплівки на захисних покриттях підземних металевих споруд // Там же. – 2008. – **70**, № 1. – С. 71–85.

Одержано 22.12.2009