УДК 620.193

О, О′-ДИГИДРОКСИАЗОСОЕДИНЕНИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОЦИДЫ – ИНГИБИТОРЫ КОРРОЗИИ В ПРИСУТСТВИИ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS*

© А.Н. Завершинский, В.И. Вигдорович

Zavershinsky A.N., Vigdorovitch V.I. O, O'-dihydroxyazocompounds as potential inhibitors of corrosion in the presence of *Desulfovibrio desulfuricans***.** The influence of some O, O'-dihydroxyazocompounds on the Desulfovibrio desulfuricans is considered. The dependence of the studied compound construction is shown. A weak influence of the substitutes in the benzene ring on the bacteriostatic effect is discovered.

Среди большого числа известных видов коррозионных разрушений самых разнообразных материалов особое место занимает микробиологическое повреждение металлов. Из литотрофных бактерий наиболее активными агентами биоповреждений являются сульфатредуцирующие (СРБ), тионовые, нитрифицирующие и железобактерии [1]. Коррозионные разрушения металлов, вызываемые ими, достигают колоссальных размеров.

В природных и промышленных средах с ограниченной или отсутствующей аэрацией биоповреждения вызываются, обычно, СРБ. Наибольший вред такие микроорганизмы наносят при эксплуатации подземных коммуникаций, в замкнутых системах охлаждения и особенно – в процессах добычи и хранения нефтепродуктов. В последнем случае ущерб, причиняемый бактериями рода *Desulfovibrio*, усугубляется еще и тем, что последние могут усваивать углеводороды нефти и, воздействуя на них продуктами своего обмена веществ, изменять состав топлив, масел и смазок, ухудшать их физико-химические и эксплуатационные характеристики [2].

Бактерии этого рода широко распространены в природе, поэтому они легко могут быть занесены в скважину (при бурении или заводнении) или в резервуар для хранения нефти и нефтепродуктов. Так, в ходе проводимых исследований с использованием подтоварной воды, взятой из резервуара для хранения нефтепродуктов на нефтебазе г. Тамбова, были выделены бактерии, определенные как *Desulfovibrio desulfuricans* [3].

В процессе обмена веществ бактерии поглощают водород и восстанавливают сульфаты. Одновременно происходит снижение pH, что способствует коррозии металла. Присутствие сульфатвосстанавливающих бактерий в воде, содержащей минеральные соли, увеличивает ее коррозионную агрессивность до 60 % [2].

Продукты окисления железа, вступая в реакцию с сероводородом, образуют нерастворимый в воде сульфид железа – эффективный катод при коррозии стали. Осаждаясь на поверхности металла, сульфид железа покрывает значительные участки поверхности, в результате чего образуются сравнительно малые по площади активные зоны. Коррозия железа и стали под действием СРБ обычно носит локальный характер. Продукты коррозии черного цвета, имеют запах сероводорода, слабо прилегают к поверхности металла, который под их слоем сохраняет металлический блеск. Механизм биокоррозии под действием СРБ достаточно сложен, поскольку параллельно протекает несколько многостадийных процессов [4, 5]. Наряду с сульфатами восстанавливаются фосфаты [1].

Основу современных представлений о механизме электрохимической коррозии с участием СРБ составляет положение о непосредственном участии бактерий в процессе катодной деполяризации [6]. Установлено [1], что способность СРБ принимать участие в катодной деполяризации зависит от их свойства усваивать элементарный водород в процессе метаболизма, т. е. от активности фермента гидрогеназы. Чем последняя более выражена у данного штамма, тем более интенсивно протекает коррозия. Однако при повышенном содержании в среде сульфида железа даже штаммы с очень малой гидрогеназной активностью могут вызвать эффективную катодную деполяризацию. В связи с этим было высказано предположение, что при высокой доле поверхности, занятой сульфидом железа, на металлах группы железа он образует гальваническую пару, в частности, с железом, в которой сульфид является катодом, а железо – анодом.

Активность сульфида железа как катода со временем снижается вследствие связывания им атомарного водорода. Благодаря гидрогеназной активности бактерий водород высвобождается, и катодная функция сульфида железа восстанавливается. Таким образом, непосредственное участие бактерий в коррозионном процессе, вследствие потребления водорода, определяет стимуляцию катодной деполяризации твердыми сульфидами железа, образующимися в результате взаимодействия ионов железа с сульфид-ионами, являющимися конечными продуктами бактериального восстановления сульфатов.

В условиях бактериального заражения агрессивной среды борьба с коррозией оборудования должна проводиться в двух направлениях: снижение скорости коррозии эксплуатируемого оборудования и подавления различными методами (физическими, химическими) жизнедеятельности СРБ.

В настоящей работе оценена возможность использования в качестве потенциальных биоцидов некоторых о,о′-дигидроксиазосоединений. Ранее [7], показана их эффективность в качестве ингибиторов коррозии. Выбор именно этих соединений обуслов-

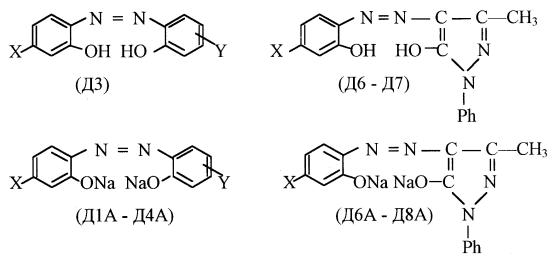

Рис. 1. Строение изучаемых соединений

лен их полифункциональным действием: помимо подавления коррозии углеродистой стали в подтоварной воде, эти препараты являются стабилизаторами топлива при хранении и проявляют свойства присадок – деактиваторов металлов [8, 9].

Строение изучаемых соединений приведено на рис. 1, где Ph – фенильный радикал, а *X, Y* – заместители (табл. 1).

В качестве модельного объекта исследования взяты, выделенные нами, природные штаммы *D. desulfuricans*, полностью соответствующие коллекционным образцам [13], выращенные на среде следующего состава:

NH_4Cl – 1,0 г; K_2HPO_4 – 0,5 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,0 г; Na_2SO_4 – 0,5 г; $CaCl_2$ – 0,1 г; 60%-раствор лактата Na – 6 мл; вода – до 1 л.

В ряд стерильных колб с одинаковым объемом питательной среды дозированно вводили исследуемые реагенты из расчета 10 и 5 мг/л. Растворы нагревали до кипения (для снижения концентрации растворенного кислорода) и быстро охлаждали под струей холодной воды. Затем в каждую колбу добавляли по 1 мл раствора чистой культуры *D. desulfuricans*, содержащего около 10^6 живых клеток СРБ. Растворы в колбах встряхивали, переливали в стерильные пробирки, доливали средой до верхнего края и, закрывая пробкой, следили, чтобы на ее поверхности отсутствовали пузырьки воздуха. Растворы помещали в воздушный термостат при температуре 32(±1)° С, специально сконструированный именно для этих целей.

Для каждой концентрации закладывалось по 3 параллельных опыта с пятью повторностями. Две пробирки без добавки реагентов служили контрольной пробой. Статистическая обработка полученных в ходе эксперимента данных, проведенная по методу малых выборок с доверительной вероятностью 0,95 (коэффициент Стьюдента $t_{0,95} = 2{,}571$), показала, что относительная ошибка эксперимента не превышала 12 %.

После завершения жизненного цикла СРБ (через 7 суток) в пробирках определялись наиболее важные показатели жизни микроорганизмов: степень подавления, число бактериальных клеток в культуре, концентрация сероводорода, pH среды и т. д.

Степень подавления СРБ (оценка бактериальной активности, основанная на анализе подавления выделения бактериями их основного метаболита – сероводорода) вычислялась по формуле:

$$S = \frac{C - C'}{C} 100\%,$$

где S – степень подавления СРБ (%); C и C' – содержание сероводорода в контрольной и исследуемой пробах (мг/л).

Таблица 1

Ингибитор	*X*	*Y*	Ингибитор	*X*	*Y*
Д1А	H	H	Д6, Д6А	H	отсутствует
Д3, Д3А	Cl	5'-NHCOOH	Д7, Д7А	Cl	отсутствует
Д4А	Cl	4'-OH	Д8А	NO_2	отсутствует

Определение концентрации выделяющегося сероводорода проводилось методом обратного йодометрического титрования. Основываясь на данных [8] о степени подавления, можно судить лишь о понижении количества биогенного сероводорода в среде. При этом количество бактериальных клеток в среде остается неизвестным. Это не позволяет делать долгосрочные прогнозы об антимикробном действии изучаемых препаратов, т. к. исследуемые вещества могут лишь подавить выделение сероводорода бактериями, не понизив их численности. Это может очень скоро привести к появлению штаммов микроорганизмов, устойчивых к данному препарату и полностью восстановивших или даже усиливших продуцирование сероводорода за счет усвоения новых органических веществ (в частности – применяемого ингибитора).

Поэтому при проведении любых исследований коррозии в присутствии микроорганизмов необходим постоянный микробиологический контроль [10]. Основными его задачами являются: оценка чистоты используемой культуры микроорганизмов (при недостаточной чистоте культуры полученные результаты часто недостаточно хорошо воспроизводимы из-за влияния на жизненный цикл бактерий других микроорганизмов); оценка соответствия используемой культуры микробиологическим коллекциям. Используемые в лабораториях микроорганизмы из-за многократного пересева могут смутировать и потерять качества, свойственные данному виду, поэтому культуру необходимо обновлять по возможности чаще [11].

В данной работе применялся бинокулярный микроскоп Микмед-1, позволяющий получить увеличение до 2500 раз при использовании маслопогруженных объективов.

Подсчет общего числа бактериальных клеток производился методом Дрейера – Королева. Помимо этого для подсчета числа живых клеток СРБ применялся метод стандартных разведений. Однако в связи с тем, что живые клетки СРБ подвижны, при подсчете общего количества бактериальных клеток методом Дрейера – Королева в аликвоту бактериальной культуры попадают в основном живые клетки, т. к. мертвые вследствие своей неподвижности оседают на дно пробирки и таким образом не просчитываются. По этой причине оба метода дают примерно одинаковые результаты (в пределах доверительного интервала). Это позволяет говорить о том, что в ходе проводимых исследований определялось число именно живых клеток СРБ.

По результатам метода Дрейера-Королева, путем разведения бактериальной культуры стерильной средой (при работе с контрольными засевами) либо средой с добавлением соответствующего количества применяемого ингибитора были получены калибровочные кривые в координатах: оптическая плотность – число бактериальных клеток.

Построение такой калибровочной кривой ускорило определение числа бактериальных клеток в куль-

Таблица 2

Влияние исследуемых соединений на СРБ

Препарат	Концентрация, мг/л	Концентрация H_2S (мг/л) в культуре СРБ на			Степень подавления,% СРБ	Число бактериальных клеток (в % от контроля)
		2-е сутки	5-е сутки	7-е сутки		
Отсутствует	–	25	90	160	–	100
Д1А	5	20	81	152	5	98
Д1А	10	17	73	120	25	89
Д3	5	18	74	134	17	94
Д3	10	12	65	100	37,5	81
Д3А	5	13	76	138	14	93
Д3А	10	12	62	94	41	69
Д4А	5	20	80	152	5,3	97
Д4А	10	8	76	141	12	94
Д6	5	11	71	131	18	91
Д6	10	8	68	114	29	85
Д6А	5	17	74	128	20	91
Д6А	10	12	67	106	34	83
Д7	5	10	74	124	21	95
Д7	10	6	45	66	59	54
Д7А	5	16	73	120	25	92
Д7А	10	3	20	48	70	45
Д8А	5	13	77	139	18	92
Д8А	10	8	47	88	45	70

турах фотоколориметрическим методом, что особенно важно при проведении большого числа параллельных опытов (фотоэлектроколориметр КФК-2УХЛ 4.2).

Определение pH среды и окислительно-восстановительного потенциала среды проводилось с помощью универсального иономера ЭВ-74.

Результаты исследований приведены в таблице 2.

При использовании изучаемых препаратов в качестве ингибиторов коррозии углеродистой стали в [7] рекомендуется концентрация 5 мг/л. Это связано с тем, что именно такая концентрация достигается при экстракции подтоварной водой присадки из топлива с коэффициентом распределения их в системе топливо/вода, близким к 3. Одновременно данные коррозионных испытаний, приведенные в [7], позволяют сделать вывод о том, что при использовании вышеназванных ингибиторов оптимальной следует считать концентрацию 5 мг/л. При дальнейшем повышении концентрации изучаемых препаратов защитный эффект возрастает незначительно. Наибольший бактериостатический эффект проявляется при более высоких концентрациях. Максимум ингибирования коррозии зафиксирован при достижении ингибиторами концентрации насыщения (10–20 мг/л в питательной среде, состав которой приведен выше). Все исследуемые вещества обладают повышенной маслорастворимостью. При использовании ингибиторов сходного химического строения обычно наблюдается взаимосвязь между липофильностью биоцидов и их токсичностью. Это показано И.В. Золочевской для фенолов и бензохинонов (цитируется по [1]) и связано с тем, что для проникновения любого вещества через стенку бактериальной клетки необходимо преодолеть плазматическую мембрану, являющуюся наиболее труднопроходимым барьером для биоцидов.

У бактерий клеточная стенка обычно отделена от плазматической мембраны узким периплазматическим пространством. Внутренний слой клеточной стенки состоит из пептидогликана (муреина). Его основу составляет полимер, образованный чередующимися остатками N-ацетил-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанных β-1,4-связями. Такие гетерополисахаридные цепи расположены в стенке параллельно, будучи соединенными друг с другом в поперечном направлении короткими олигопептидными мостиками. Помимо пептидогликана стенки бактериальных клеток содержат сопутствующие компоненты: полисахариды, белки, тейхоевые кислоты, липиды и липополисахариды.

Сами плазматические мембраны построены в основном из веществ трех классов: липидов (преимущественно – фосфолипидов), белков и сахаров, остатки последних химически связаны с липидами или с белками. Основу мембран образует двойной слой липидных молекул, расположенных гидрофильными «головками» наружу, а гидрофобными «хвостами» (остатками жирных кислот) внутрь. В эту липидную основу встроены белки. Поэтому при транспорте любого вещества через клеточную мембрану основным препятствием является именно гидрофобный липидный слой. Обычно различают три типа мембранного транспорта: пассивная диффузия, облегченная диффузия (осуществляемая специальными мембранными переносчиками) и активный, энергозависимый транспорт. Перенос изучаемых веществ через клеточную стенку осуществляется, по-видимому, путем пассивной диффузии. Для веществ, растворимых в липидах (основных веществах биомембран), ее скорость определяется их растворимостью в мембране, градиентом концентраций (снаружи и внутри клетки), а также коэффициентом диффузии. Более подробное исследование этой проблемы показало в [1], что имеет значение не просто способность растворяться в липидах, а величина коэффициента распределения «масло/вода». Объясняется это, видимо, тем, что биоцид, проникая в клетку, должен преодолевать как липидный, так и белковый гидрофильный слой, что предполагает двойную растворимость.

Изучаемые препараты не вызывают полной гибели культуры СРБ даже при введении максимально возможных концентраций, т. е. данные вещества являются бактериостатами, не вызывающими гибель микроорганизмов, а лишь приостанавливающими скорость их развития. Установлено, что они не определяют видимых морфологических изменений бактериальных клеток. Все изучаемые вещества не обладают резко выраженным кумулятивным действием и мутагенностью по отношению к СРБ. Наибольшим бактериостатическим эффектом обладают соединения Д7; Д7А и Д8А, имеющие в своем строении азот пирозольного кольца. При этом роль заместителей невелика. Заметное влияние оказывает лишь атом хлора, который, по-видимому, придает молекуле некоторую полярность, вследствие которой бактериостатический эффект усиливается. Действие нитрогруппы вследствие ее меньшей полярности выражено явно слабее. Бактериостатический эффект у веществ подобного ряда явно связан с наличием пирозольного кольца. При этом его действие усиливается при присоединении к фенильному радикалу, соединенному с пирозольным кольцом какого-либо полярного заместителя. Это подтверждается данными [12].

Для остальных веществ бактериостатический эффект выражен слабее. Более сильное действие препа-

ратов Д3 и Д3А объясняется присутствием в их составе группировки NHCOOH, однако механизм ее действия выяснить не удалось. Не удалось найти и объяснение большей бактериостатической активности полярных заместителей.

Действие пирозольного кольца объясняется наличием в нем атомов азота, связанных с ароматической системой. По [2], большинство подобных соединений являются достаточно активными бактериоцидами независимо от различий в строении. Бактериоцидное действие указанных веществ является функциональной особенностью всего ряда, что и было подтверждено в [12]. Механизм действия этих соединений на клеточные структуры был изучен на пиридинах и хинолинах. Он заключается в блокировании ферментных систем, регулирующих обмен веществ живой клетки [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Биоповреждения. М.: Высш. шк., 1987. 352 с.
2. *Литвиненко С.Н.* Защита нефтепродуктов от действия микроорганизмов. М.: Химия, 1977. 143 с.
3. *Красильников С.Н.* Определитель бактерий и актиномицетов. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1949. 829 с.
4. *Trudinger P.A.* Mikrobes, metals and minerals // Minerals, Sci. Eng. 1971. № 3. P. 13-25.
5. *Заварзин Г.А.* Литотрофные микроорганизмы. М.: Мир, 1972. 319 с.
6. *Андреюк Е.И., Козлова И.А.* Литотрофные бактерии и микробиологическая коррозия. Киев: Наукова думка, 1977. 155 с.
7. *Вигдорович В.И., Романцова С.В., Нагорнов С.А.* Использование ряда соединений для ингибирования коррозии углеродистой стали в подтоварной воде нефтепродуктов // Вестн. ТГУ. Сер. Естеств. и технич. науки. Тамбов, 1999. Т. 4. Вып. 2. С. 180-181.
8. *Вигдорович В.И., Нагорнов С.А., Романцова С.В*. Стабилизация дизельных топлив в условиях длительного хранения // Вестн. ТГУ. Сер. Естеств. и технич. науки. Тамбов, 1999. Т. 4. Вып. 3. С. 312-315.
9. *Вигдорович В.И., Романцова С.В., Нагорнов С.А., Арзамасцев А.А.* Ингибирование коррозии стали в подтоварной воде при хранении нефтепродуктов // Вестн. ТГУ. Сер. Естеств. и технич. науки. Тамбов, 1999. Т. 4. Вып. 3. С. 316-319.
10. *Липович Р.Н., Асфандияров Ф.Н., Низамов К.Р., Гоник А.А., Рождественский Ю.Г., Тихова Е.Н., Калимукин А.А.* Методика оценки защитного действия реагентов, подавляющих микробиологическую коррозию. Уфа: ВНИИСПТнефть, 1977. 35 с.
11. *Виноградский А.Н.* Микробиология почвы. М.: Изд-во АнСССР, 1952. 265 с.
12. *Завершинский А.Н., Вигдорович В.И., Спицын И.П.* Влияние некоторых о, о′-дигидроксиазосоединений потенц иальных ингибиторов коррозии металлов на *Desulfovibrio desulfuricans* // Вестн. ТГУ. Сер. Естеств. и технич. науки. Тамбов, 1999. Т. 4. Вып. 3. С. 320-323.

Поступила в редакцию 5 октября 1999 г.

Адрес журнала в сети Интернет:
www.chat.ru/~tsureports