

微生物作用下碳钢阴极保护氢渗透研究方法

刘相局^{1,2,3,4}, 黄彦良^{1,3,4}

(1.中国科学院海洋研究所 海洋环境腐蚀与生物污损重点实验室, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院大学, 北京 100049; 3.中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4.青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋腐蚀与防护开放工作室, 山东 青岛 266237)

摘要: 为研究微生物、氢渗透和阴极保护三者关系, 介绍了微生物生长代谢的测定方法和氢渗透测试的研究方法。分别介绍了微生物生长曲线、菌量及代谢的测试方法。氢渗透测试主要采用 Devanathan-Stachurski 双电解池技术, 试样常采用单面镀镍或镀钯处理, 对阴极池施加阴极保护, 试样表面产生的氢渗透到阳极池一侧后, 利用恒电位仪记录试样表面氢的氧化电流即氢渗透电流。

关键词: 微生物; 阴极保护; 氢渗透

DOI: 10.7643/issn.1672-9242.2018.10.013

中图分类号: TG174 **文献标识码:** A

文章编号: 1672-9242(2018)10-0079-05

Investigation Methods for Hydrogen Permeation of Carbon Steel with Cathodic Protection in Presence of Microorganisms

LIU Xiang-ju^{1,2,3,4}, HUANG Yan-liang^{1,3,4}

- (1. Key Laboratory of Marine Environmental Corrosion and Bio-fouling, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;
4. Open Studio for Marine Corrosion and Protection, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

ABSTRACT: The paper aims to research the relationships among microorganism, hydrogen permeation and cathodic protection. Methods for the determination of the growth and metabolism of microorganisms and the research methods for hydrogen penetration tests were given. Methods for the determination of the population growth curve, bacterial count and metabolism were introduced separately. Devanathan-Stachurski double cell technology was adopted for the hydrogen permeation test. Samples were often treated with single-sided nickel or palladium plating. A cathodic protection was applied to the cathode cell. After the hydrogen produced on the surface of the sample permeated to the side of the anode cell, a potentiostat was used to record the oxidation current of hydrogen on the surface of the sample, that is, the hydrogen permeation current.

KEY WORDS: microbiology; cathodic protection; hydrogen permeation

氢鼓泡、氢致裂纹、氢致塑性损失(氢脆)、高温氢腐蚀、氢化物相的产生或氢致马氏体相变等是碳

收稿日期: 2018-07-13; 修订日期: 2018-07-13

基金项目: 国家自然科学基金钢铁联合基金(U1660112)

作者简介: 刘相局(1990—), 男, 博士研究生, 主要研究方向为腐蚀与防护。

通讯作者: 黄彦良(1966—), 男, 研究员, 主要研究方向为腐蚀与防护、海洋生物污损。

钢在制造和服役过程中最为常见的氢损伤形式^[1]。目前，常用氢脆泛指以上氢损伤形式。阴极保护作为碳钢在服役过程中最为常见的腐蚀防护方法之一，在其抑制碳钢阳极溶解的同时，会促进析氢反应的发生，使碳钢表面产生更多的氢原子，进而增加了碳钢发生氢脆的可能性。研究表明，即使施加的阴极保护电位未达到析氢电位，材料表面没有明显的析氢现象，仍有氢进入金属材料内部，使材料发生氢脆^[2-3]。

微生物腐蚀是指附着在材料表面的生物膜中的微生物自身生命活动及其代谢产物直接或间接地加速材料腐蚀过程的现象。参与材料腐蚀的微生物多是环境中铁硫循环的参与者。腐蚀微生物种类繁多，根据细菌种类及作用的不同，可以分为硫酸盐还原菌 SRB、硫氧化菌 SOB、产酸菌 APB、铁氧化细菌 IOB、铁还原细菌 IRB、硝酸盐还原菌 NRB 以及产粘液细菌 SFB 等^[4]。研究发现，对金属材料施加阴极保护，会抑制其表面生物膜的附着和生长，进而抑制微生物腐蚀^[5]。目前，对阴极保护抑制金属腐蚀的研究主要集中在静电作用力^[6-8]、阴极氧还原反应^[9-10]对生物膜的形成，以及阴极保护对已附着生物膜的影响^[11]等方面。然而在研究阴极保护对微生物腐蚀抑制的过程中，往往会忽略阴极极化对材料氢脆的影响。Vigdorovich 和 Zavershinski^[12]研究了 St3 钢在含有 SRB 和 H₂S 的培养基中的氢渗透电流，发现氢渗透电流在有菌的培养基中比在无菌培养基中高 2 倍以上。Romero 等^[13]在研究利用氢渗透测试技术来表征金属/生物膜界面上 SRB 的生物活性时发现，该菌的存在明显增加了金属的氢渗透电流。Javaherdashti 等^[14]研究发现，SRB 对 3.5%NaCl 溶液中碳钢的氢致开裂有明显的促进作用。因此，在对碳钢施加阴极保护时，不仅要考虑氢脆等问题，还需要考虑到其所处服役环境中微生物对氢脆是否有协同作用。

1 微生物生长代谢的测定

微生物的生长和代谢是影响金属腐蚀的重要因素之一。因此，在研究微生物对阴极保护作用下碳钢氢渗透的影响前，首先要测定微生物的生长和代谢基本参数，如微生物生长曲线、代谢产物和对环境 pH 的影响等。

1.1 微生物生长曲线的测定

1) 分光光度法，也称浊度法。该方法方便、快捷，可连续测定，是目前最为常用的测试方法。测试细菌浊度最常用的波长有 480nm (蓝光)、540nm (绿光)、600nm (橙光) 和 660nm (红光)^[15]。浊度测试时，在较短的波长下灵敏度最好。对于细胞密集的悬液，在较长波长下准确度更高。浊度的单位为某波长下的光密度 (Optical density, OD)。浊度测量的缺

点是不能区分活菌和死菌，因此对于微生物衰亡期的测定不明显。

2) 活菌计数法，又称平板菌落计数法，包括平板涂布法和倾倒平板法。其优点是可直接反映样品中活菌数量，缺点是操作繁琐。对于厌氧菌，可在厌氧手套箱内进行操作，或利用 Hungate 滚管技术，对细菌进行计数。

3) 显微计数法，即利用计数室 (板) 对微生物进行直接计数。其优点是操作简单、迅速、成本低，且能直接观察微生物细胞的大小以及形态特征。缺点是不能区分测定死活微生物的数目。

1.2 菌量测定

1) 浊度与菌体数量之间的关系。对于单细胞生物，浊度在一定程度上和细胞数量成比例。可通过建立标准曲线，将细胞数量 (活菌或显微计数)、干重或蛋白质含量与浊度联系起来。当细胞浓度过高时，测试浊度会低于理论值，此时可对菌悬液稀释后再做测量。为保证测试结果的准确性，所测样品的浊度应尽量保持在 0.1~0.65 之间。

2) 三磷酸腺苷 (ATP) 法。该方法是 Littman 等^[16]提出的，用于测定油田注水中 SRB 的相对含量。其主要检测步骤包括：取样、样品 ATP 提取、添加荧光素-荧光素酶、测定生物发光值、计算 ATP 的浓度和活菌数量。其优点是灵敏、快速、简便、稳定。缺点是荧光强度 (RLU) 和菌落形成单位 (CFU) 之间没有直接关系^[17]。

3) 最大可能菌数法 (The Most Probable Number, 简称 MPN 法)。根据 API RP-38，该方法采用以乳酸钠为碳源的液体培养基，用以测定 SRB 的细菌数量。培养基具体成分见表 1。

表 1 MPN 法培养基组成

药品	含量	药品	含量
乳酸钠	4.0 mL	酵母粉	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.01 g	维生素 C	0.1 g
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.2 g	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	10 g	蒸馏水	1000 mL

4) 其他方法。菌量的测定方法还有很多，如上所述的活菌计数法和显微计数法不仅可以用于测定微生物的生长曲线，同样可用于菌量的测定。其他方法还有电子计数器计数法、测定细胞质量法、测定细胞总氮量或总碳量法等。

微生物生长曲线及菌量测试方法各有优缺点，实验人员应根据不同的测试精度要求、仪器设备、测试时间等因素，综合考虑，选择最适宜的测试方法。

1.3 其他参数的测定

1) pH 值的测定。pH 值是影响微生物腐蚀的重

要因素之一, 同样也是影响阴极保护过程中碳钢氢渗透的重要因素。特别是当周围环境处于酸性状态时, 阴极保护会促进碳钢表面氢的形成, 加速氢脆的发生。

2) 代谢产物的测定。微生物代谢产物具有多样性, 对氢渗透的影响也各不相同。SRB 的代谢产物 H_2S 微溶于水后会产生 H_2 , 造成氢脆^[18-19]。F. Huang 等^[20]研究发现, H_2S 对 X65 钢的腐蚀产物 FeS 在基体表面附着, 可阻碍其氢渗透。产酸菌如硝酸盐及亚硝酸盐氧化菌、硫杆菌属、醋酸杆菌等能够代谢产生乙酸、甲酸、 H_2NO_3 和 H_2SO_4 等^[4]。这些酸的存在会显著降低周围环境的 pH 值, 使金属发生腐蚀以及促进阴极保护过程中氢的产生, 导致氢脆。

常用的微生物代谢产物检测手段有气相色谱法和高效液相色谱法等。若对精度要求较高, 可将色谱和质谱联用, 使两者优势互补。例如气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 和高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS)。核磁共振技术 (NMR) 同样也可用于

高精度代谢产物分析。

2 氢渗透测量系统

2.1 试样的选择及测试前处理

氢渗透试样可以是片状或者管状的。其尺寸应能用于分析基于一维扩散的瞬态渗透电流。根据 ASTM G148—97^[21], 片状试样暴露于电解质溶液的半径与厚度比应大于 10:1, 管状试样需根据平面扩散方程分析实验结果, 其外径与内径比值应小于 1:1。考虑到原子氢从充氢面扩散至另一面所需的响应时间、氢渗透电流密度达到稳态扩散电流密度所需的时间以及长时间实验导致试样被腐蚀等问题, 还需要选择具有合适厚度的试样。

试样在阳极池的一面常采用金属镍^[22-23]或金属钯^[24-25]作镀层, 以提供试样表面原子氢被氧化的催化活性, 并阻止金属试样表面发生腐蚀反应, 增加测量结果的准确性^[26]。几种镀层工艺条件见表 2。

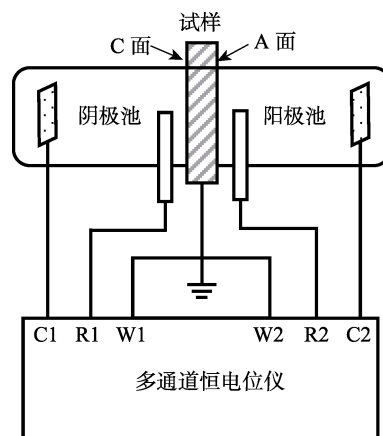
表 2 常见镀镍/镀钯配方及工艺条件

序号	药品及含量	电流密度/(mA·cm ⁻²)	时间/min	镀层厚度/nm
1	NiSO ₄ ·6H ₂ O (250 g/L); NiCl ₂ ·6H ₂ O (45 g/L); H ₃ BO ₃ (40 g/L)	3	3	180
2	NiSO ₄ ·7H ₂ O (215 g/L); NaCl (11 g/L); H ₃ BO ₃ (33 g/L); Na ₂ SO ₄ (25 g/L); MgSO ₄ (35 g/L)	1	5	
3	PdCl ₂ (5 g/L); 28%氨水溶液	2	4	

2.2 Devanathan-Stachurski 双电解池及测试系统

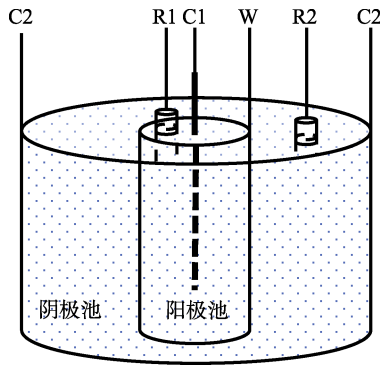
氢渗透测试目前多采用 Devanathan-Stachurski 双电解池技术^[30]。以片状试样所适用装置为例。如图 1 所示, 装置由金属试样分成互不相通的左右两室, 分别为阴极池和阳极池。右侧阳极池一般充入优级纯的氢氧化钠溶液, 并对试样 A 面施加恒定的阳极极化电位。若阳极池填充 0.1 mol/L NaOH 溶液, 通过测定镀镍层在其中的钝化区间 (约为 0~+300 mV (vs. Hg/HgO))^[31], 可确定对阳极池施加的阳极极化电位, 例如 +300 mV (vs. Hg/HgO) 的极化电位。当测得电流密度小于 0.1 $\mu A/cm^2$ 后, 即可满足背景电流要求^[21], 可进行下一步氢渗透测试。将待测电解质溶液 (例如含待测菌体的培养基、无菌培养基或其他溶液等) 充入阴极池, 对试样 C 面施加阴极电位或电流, 发生反应 $H^+ + e \rightarrow H^0$, 产生的原子氢 H^0 一部分复合成分子氢放出, 另一部分通过表面吸附和扩散作用进入试样内部。氢原子扩散至 A 面后, 将在 A 面被氧化 ($H^0 \rightarrow H^+ + e$) 而产生阳极电流, 利用恒电位仪将该电流记录下来, 减去背景电流后即即为即时的氢渗透电流。

若待测电解质溶液为无菌/有菌培养基, 则测试前须将装置放入灭菌锅内 121℃ 灭菌 20~25 min, 不能灭菌的装置用 75% 酒精擦拭, 并用紫外线灭菌灯照射灭菌 30 min。管状试样用 Devanathan-Stachurski 双电解池模型如图 2 所示。



C1: 对电极 1; R1: 参比电极 1; W1: 工作电极; C2: 对电极 2; R2: 参比电极 2; W2: 工作电极

图 1 Devanathan-Stachurski 双电解池模型



C1: 对电极 1; R1: 参比电极 1; W: 工作电极; C2: 对电极 2;
R2: 参比电极 2

图 2 圆筒试样用氢渗透行为测量装置模型

3 结语

微生物在环境中无处不在,且具有生物多样性和代谢产物多样性。关于微生物的研究目前主要集中在其对金属材料的腐蚀情况,而对于微生物、氢渗透和阴极保护三者之间关系的研究报道很少。在已有报道中可以看出,微生物的存在促进了阴极保护下金属的氢渗透^[19,23,29],起抑制作用的微生物鲜有报道。因此,研究微生物作用下碳钢阴极保护对氢渗透的影响对实际工程应用中阴极保护电位的选取具有重要的意义。

参考文献:

- [1] JIN T Y, LIU Z Y, CHENG Y F. Effect of Non-metallic Inclusions on Hydrogen-induced Cracking of API5L X100 Steel[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(15): 8014-8021.
- [2] 邱开元, 魏宝明, 方耀华. 16Mn 钢在 3%氯化钠水溶液中的阴极保护及其氢脆敏感性[J]. *南京工业大学学报(自然科学版)*, 1992, 14(2): 8-14.
- [3] 文丽娟. 保护电位对典型海洋用钢腐蚀阴极过程和力学性能的影响[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [4] 黄烨, 刘双江, 姜成英. 微生物腐蚀及腐蚀机理研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1699-713.
- [5] 李霞, 杜敏. 阴极极化对微生物腐蚀的影响研究进展[J]. *腐蚀科学与防护技术*, 2017, 29(5): 561-566.
- [6] DE SARAVIA S G G, DE MELE M F L, VIDELA H A, et al. Bacterial Biofilms on Cathodically Protected Stainless Steel[J]. *Biofouling*, 1997, 11(1): 1-17.
- [7] BUSALMEN J P, DE SÁNCHEZ S R. Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to Nonpolarized and Polarized Thin Films of Gold[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3188-3194.
- [8] HONG S H, JEONG J, SHIM S, et al. Effect of Electric Currents on Bacterial Detachment and Inactivation[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2008, 100(2): 379-386.
- [9] EASHWAR M, SUBRAMANIAN G, PALANICHAMY S, et al. Cathodic Behaviour of Stainless Steel in Coastal Indian Seawater: Calcareous Deposits Overwhelm Biofilms[J]. *Biofouling*, 2009, 25(3): 191-201.
- [10] ISTANBULLU O, BABAUTA J, NGUYEN H D, et al. Electrochemical Biofilm Control: Mechanism of Action[J]. *Biofouling*, 2012, 28(8): 769-778.
- [11] 李相波, 王佳. 阴极极化对金属电极表面微生物膜的影响[J]. *装备环境工程*, 2004, 1(6): 27-31.
- [12] VIGDOROVICH V I, ZAVERSHINSKII A N. The Effect of SRB on the Hydrogen Diffusion through a Steel Membrane, and the Bactericide Action of Dihydroxyazo Compounds[J]. *Protection of Metals*, 2003, 39(1): 93-97.
- [13] DE ROMERO M F, DUQUE Z, DE RINCÓN O T, et al. Microbiological Corrosion: Hydrogen Permeation and Sulfate-Reducing Bacteria[J]. *Corrosion*, 2002, 58(5): 429-435.
- [14] JAVAHERDASHTI R, SINGH RAMAN R K, PANTER C, et al. Microbiologically Assisted Stress Corrosion-Cracking of Carbon Steel in Mixed and Pure Cultures of Sulfate Reducing Bacteria[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2006, 58(1): 27-35.
- [15] MADIGAN M T, MARTINKO J M, PARKER J. *Brock Biology of Microorganisms* [M]. 14th edn. New York: Pearson, 2017.
- [16] LITTMANN E S. Oilfield Bactericide Parameters as Measured by ATP Analysis[J]. *Journal of Petroleum Technology*, 1975, 5312: 171-175.
- [17] 唐倩倩, 叶尊忠, 王剑平, 等. ATP 生物发光法在微生物检验中的应用[J]. *食品科学*, 2008, 29(6): 460-465.
- [18] RAMAN R K S, JAVAHERDASHTI R, PANTER C, et al. Hydrogen Embrittlement of a Low Carbon Steel during Slow Strain Testing in Chloride Solutions Containing Sulphate Reducing Bacteria[J]. *Metal Science Journal*, 2014, 21(9): 1094-1098.
- [19] BIEZMA M V. The Role of Hydrogen in Microbiologically Influenced Corrosion and Stress Corrosion Cracking[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001, 26(5): 515-520.
- [20] HUANG F, CHENG P, ZHAO X Y, et al. Effect of Sulfide Films Formed on X65 Steel Surface on Hydrogen Permeation in H₂S Environments[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, 42(7): 4561-4570.
- [21] ASTM G148—97. Standard Practice for Evaluation of Hydrogen Uptake, Permeation, and Transport in Metals by an Electrochemical Technique[S].
- [22] DIETZEL W, PFUFF M, JULIFS G G. Hydrogen Permeation in Plastically Deformed Steel Membranes[J]. *Materials Science*, 2006, 42(1): 78-84.
- [23] WANG D, XIE F, WU M, et al. The Effect of Sulfate-reducing Bacteria on Hydrogen Permeation of X80

- Steel under Cathodic Protection Potential[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(44):27206-27213.
- [24] MOSHREF-JAVADI M, EDRIS H, SHAFYEI A, et al. Diffusion Behavior of Hydrogen Through Thermally Sprayed Coating of 316L Stainless Steel[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(9): 6409-6419.
- [25] 陈业新, 常庆刚. 20 g 纯净钢中氢陷阱对氢扩散系数的作用[J]. 金属学报, 2011, 47(5): 548-552.
- [26] 王潇健. 电化学氢渗透传感器的性能研究[D].长沙: 湖南大学, 2013.
- [27] YOSHIZAWA S, TSURUTA T, YAMAKAWA K. Development of Nickel Plating Method in Electrochemical Measurement of Hydrogen Content in Steel[J]. Corrosion Engineering, 1975, 24(10): 511-515.
- [28] HUANG Y. Corrosion Failure of Marine Steel in Sea-Mud Containing Sulfate Reducing Bacteria[J]. Materials & Corrosion, 2004, 55(2): 124-127.
- [29] 朱永艳, 黄彦良, 黄偲迪, 等. 16Mn 钢在海泥中的氢渗透行为研究[J]. 腐蚀科学与防护技术, 2008, 20(2): 118-120.
- [30] DEVANATHAN M A V, STACHURSKI Z. The Adsorption and Diffusion of Electrolytic Hydrogen in Palladium[J]. Proceedings of the Royal Society of London, 1962, 270(1340): 90-102.
- [31] 赵大朋. 阴极保护下 X80 钢及焊接影响区的氢渗透行为和氢脆敏感性研究[D].青岛: 中国石油大学(华东), 2014.