

УДК 620.193.8

РОЛЬ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОРРОЗИИ МЕТАЛЛОВ

© 2012 г. Д. В. Белов*, А. А. Калинина*, Т. Н. Соколова*, В. Ф. Смирнов**,
М. В. Челнокова*, В. Р. Каргашов*

* Нижегородский государственный технический университет
им. Р.Е. Алексеева, Нижний Новгород, 603600

** Научно-исследовательский институт химии Нижегородского государственного университета
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru,
biotehno@nntu.nnov.ru

Поступила в редакцию 16.08.2011 г.

Установлена способность 7 штаммов бактерий участвовать в коррозионном повреждении алюминия, его сплавов, а также цинка. Наиболее активными по отношению к изучаемым металлам были бактерии *Proteus vulgaris* 1212 и *Pseudomonas aeruginosa* 969. Показана роль супероксидного анион-радикала в инициировании коррозионного разрушения алюминия и цинка, а также экзометаболитов бактерий – органических кислот в развитии этого процесса.

Многие металлы и промышленные изделия на их основе при контакте с микроорганизмами подвергаются значительным коррозионным повреждениям [1–2]. В работах [3–5], на основе результатов исследования коррозии алюминия и его сплавов под воздействием грибов, нами было сделано предположение, что процесс обусловлен воздействием на поверхность металла супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot -}$, образующегося при жизнедеятельности микроорганизмов. Была предложена схема инициирования коррозии и ее дальнейшего развития, которая хорошо согласуется с данными, полученными при использовании более широкого ряда металлов [6].

Существенный ущерб металлоконструкциям в естественной среде – почве, влажной атмосфере, воде, наносят также бактерии. Механизм воздействия на металл некоторых видов бактерий, таких, как железобактерии, сульфатредуцирующие, нитрифицирующие, тионовые, достаточно широко изучен [7]. В то же время коррозия под воздействием бактерий-органотрофов, способных использовать в качестве питательной среды органические загрязнения на поверхности металлов (технические масла, смазки органической природы, масложировые продукты), является до сих пор мало исследованной. Остается открытым вопрос о начальной стадии инициирования, вызывающей каскад химических превращений на поверхности металла, сопровождающийся глубокими коррозионными повреждениями.

Цель работы – исследование способности бактерий-органотрофов к образованию $O_2^{\cdot -}$, как од-

ного из факторов инициирования коррозии металлов, а также выявление изменений поверхности в динамике и определение роли экзометаболитов в развитии коррозионного процесса.

МЕТОДИКА

В качестве тест-организмов использовали следующие культуры бактерий: *Echerichia coli* 321-5, *Proteus vulgaris* 1212, *Pseudomonas aeruginosa* 969, *Staphylococcus aureus* 956, *Staphylococcus epidermidis* 1061, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus megaterium*, которые были предоставлены Всероссийской коллегией микроорганизмов ИБФМ РАН (г. Пушкино, Московской обл.).

В качестве объектов исследования были выбраны алюминий марки АД0, сплавы на его основе Д16 (Al – 90.8%; Cu – 4.3%; Mg – 1.5%; Mn – 0.6%), Д16Т (Al – 91.7%; Cu – 3.99%; Mg – 1.39%; Mn – 0.5%), В65 (Al – 97.2%; Cu – 4.2%; Mg – 0.25%; Mn – 0.4%), а также цинк (Zn – 99.99%; Pb, Cd, Fe, Sn, Cu, Al – 0.01%), которые широко используются в качестве конструкционных материалов.

Образцы металлов предварительно шлифовались до получения гладкой поверхности и полировались до зеркального блеска. После этого они промывались водой, поверхность обезжиривалась тетрахлорметаном, затем этиловым спиртом, вторично промывались водой и высушивались. Стерилизация образцов до и после экспозиции проводилась фламбированием.

Бактериальные культуры выращивали на МПА в чашках Петри в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 90%. Водную суспензией суточных культур бактерий, выращенных в пробирках на скошенном агаре, высевали на плотную питательную среду. После чего на поверхность питательной среды помещали подготовленные металлические образцы (средняя масса – 0.5 г) и инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 90% в течение 3–90 сут в зависимости от цели эксперимента. Контрольный эксперимент проводили в аналогичных условиях на плотной питательной среде, не засеянной культурами бактерий.

По окончании инкубирования поверхность образцов исследовали визуально для выяснения изменения состояния поверхности. Оценку состояния поверхности производили по разработанной бальной шкале: А – образование жидкого экссудата; Б – локальное потускнение поверхности; В – образование полупрозрачного слоя легко удаляемых продуктов коррозии; Г – коррозия с образованием продуктов аморфного, рыхлого характера (в т.ч. гидроксидов); Д – коррозия по всей поверхности с образованием продуктов коррозии, покрывающих более 50% поверхности образца [3–6].

С образцов, подвергшихся длительной экспозиции (около 90 сут) под воздействием бактерии *Pseudomonas aeruginosa* 969, состояние поверхности которых соответствовало баллам А–Д, механическим способом собирали продукты коррозии, после чего определялся химический состав собранной массы. Эксперимент проводился в шестикратной повторности, в каждой из которых обрабатывалась поверхность 10 образцов.

Полученная масса загружалась в аппарат Соклета для непрерывной экстракции последовательно диэтиловым эфиром, этилацетатом, ацетоном, ацетонитрилом, диоксаном. Полученные экстракционные растворы фильтровались, высушивались над безводным Na_2SO_4 . Органические кислоты, содержащиеся в остатке после полного удаления диэтилового эфира и этилацетата, переводились в метиловые и триметилсилильные эфиры по стандартным методикам и анализировались методами ГЖХ и ТСХ с использованием веществ-свидетелей.

Растворы в ацетоне, ацетонитриле и диоксане концентрировали путем частичного удаления растворителя и анализировали методами ТСХ с использованием веществ-свидетелей на содержание свободных аминокислот и свободных органических кислот соответственно.

Газожидкостная хроматография осуществлялась на хроматографе Кристалл-4000 (Россия, Метта-хром) с плазменно-ионизационным детектором, длина колонки 30 м; сорбент – метилсилико-

новый эластомер с толщиной пленки 0.21 мкм; температура колонки $100\text{--}200^\circ\text{C}$, в зависимости от нанесенного образца; температура испарителя – 270°C , детектора – 180°C ; расход газа-носителя азота – $60\text{ см}^3/\text{мин}$; расход воздуха $300\text{ см}^3/\text{мин}$. Объем пробы составлял от 1 до 5 мкл.

Анализ методом тонкослойной хроматографии проводился на пластинах Silufol UV 254 фирмы “Kavalier” (Чехословакия) по стандартным методикам [8].

Наличие в экссудате ионов калия, натрия и аммония определяли методами микрохимического анализа [9].

Возможность генерации O_2^- бактериями и транспорт его в окружающую среду исследовались нами при культивировании микроорганизмов на плотной питательной среде. Бактерии предварительно выращивались в оптимальных условиях ($37 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность 90%) в течение 24 ч. При проведении опытов суспензию бактерий кишечной группы (9.3×10^6 кл./мл) получали смывом с поверхности твердой среды 0.05 М фосфатным буфером, pH 7.4. К 2 мл полученной суспензии бактерий добавляли 0.5 мл 0.01 М нитросинего тетразолия (НСТ), в параллельном опыте к полученной суспензии бактерий сначала добавлялось 0.15 мл супероксиддисмутазы (СОД, 15 ед. активности), а затем НСТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За динамикой изменения состояния поверхности металлов под воздействием бактерий наблюдали визуально, фиксируя характерные изменения через определенные промежутки времени с начала экспозиции (табл. 1–2).

Как видно из табл. 1, через 5–10 сут после заражения на поверхности алюминия и его сплавов появляются локальные участки с матовыми и темными пятнами, а поверхность в целом утрачивает исходный блеск. Следует отметить, что особенностью коррозионного изменения алюминия и его сплавов при воздействии бактерий *E. coli* 321-5, *P. vulgaris* 1212, *S. aureus* 956, *S. epidermidis* 1061, *S. salivarius*, *B. megaterium*, в отличие от грибов, является отсутствие образования характерного экссудата на отдельных участках поверхности.

Однако при воздействии бактерии *P. aeruginosa* 969 на сплавы алюминия Д16 и Д16Т подобное проявление коррозии имело место через 3–5 сут – на торцах большинства образцов формировался экссудат с $\text{pH} \approx 10\text{--}11$, наряду с полупрозрачным слоем легко удаляемых продуктов коррозии. При коррозии цинка на начальных стадиях процесса образование жидкого экссудата с $\text{pH} \approx 11$ (рис. 1) происходило при воздействии всех исследуемых бактерий, хотя и в разной степени.

Таблица 1. Изменения поверхности сплавов алюминия в процессе коррозии под действием бактерий*

Бактерии	Время экспозиции, сут													
	Сплав В65						Сплав АД0							
	3	5	20	30	40	60	3	5, 10	15	20	30	40	60	
<i>B. megaterium</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	А	Б	Б	Б	В	В	Г	
<i>E. coli 321-5</i>	А	Б	Б	Б	Б	В	А	Б	Б	Б	Б	Б	В	
<i>P. vulgaris 1212</i>	А	Б	Г	Д	Д	Д	А	Б	В	Г	Д	Д	Д	
<i>P. aeruginosa 969</i>	А	Б	Г	Д	Д	Д	А	Б	В	Г	Д	Д	Д	
<i>S. aureus 956</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	А	Б	Б	Б	В	Г	Г	
<i>S. salivarius</i>	А	Б	Б	Б	Б	Б	А	Б	Б	Б	Б	Б	В	
	Сплав Д16							Сплав Д16Т						
	3	5	10	20	30	40	60	3	5	10	20	30	60	
	<i>B. megaterium</i>	А	Б	Б	Б	Б	В	В	А	Б	В	Г	Д	Д
<i>E. coli 321-5</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	Г	А	Б	Б	Б	Б	Б	
<i>P. vulgaris 1212</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	Д	А	Б	Б	В	Г	Д	
<i>P. aeruginosa 969</i>	А	В	Г	Г	Д	Д	Д	А	В	Г	Г	Д	Д	
<i>S. aureus 956</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	Д	А	Б	В	Г	Г	Д	
<i>S. salivarius</i>	А	Б	В	В	Г	Г	Г	А	В	Г	Г	Д	Д	

*А – образование жидкого экссудата; Б – локальное потускнение поверхности; В – образование полупрозрачного слоя легко удаляемых продуктов коррозии; Г – коррозия с образованием аморфных, рыхлых продуктов, в том числе гидроксидов; Д – коррозия по всей его поверхности с образованием продуктов, покрывающих более 50% поверхности.

Таблица 2. Характеристика изменений поверхности при биокоррозии цинка под воздействием бактерий*

Бактерии	Время экспозиции, сут						
	10	20–30	35	40	50–57	64–70	90
<i>E. coli 321-5</i>	А	А	А	А, Б	Б, В	Б, В	В
<i>P. vulgaris 1212</i>	А	А	А,Б	А, Б	Б, В	В, Г	Г
<i>P. aeruginosa 969</i>	А	А, Б	А	А, Б	Б, В	В, Г	Г
<i>S. aureus 956</i>	А	А	А, Б	А	Б, В	В	В
<i>S. epidermidis 1061</i>	А	А	А, Б	А, Б	Б, В	Г	Г

* Обозначения см. в табл. 1.

Как видно из табл. 1–2, по отношению к исследованным металлам бактерии проявляли различную коррозионную активность. Наиболее активными по отношению к алюминию, его сплавам и цинку оказались *P. vulgaris 1212*, *P. aeruginosa 969*, хотя по степени воздействия на эти два типа металлов они существенным образом различались (рис. 2, 3). Так, на поверхности сплавов алюминия под воздействием *P. vulgaris 1212* уже через 5 сут наблюдалось образование полупрозрачных продуктов коррозии, легко удаляемых с поверх-

ности образцов (рис. 2а), а через 40 сут коррозия распространялась на всю поверхность (рис. 2б).

Начальные этапы бактериальной коррозии в ряде случаев были аналогичны вызываемой грибами, хотя ее характерные признаки, отмеченные в работах [3–6], были выражены менее ярко.

Наблюдаемая аналогия дает основание считать, что процесс бактериальной коррозии также инициируется взаимодействием супероксидного анион-радикала, выделяемого клетками бактерий, с поверхностью металла. Происходящие при

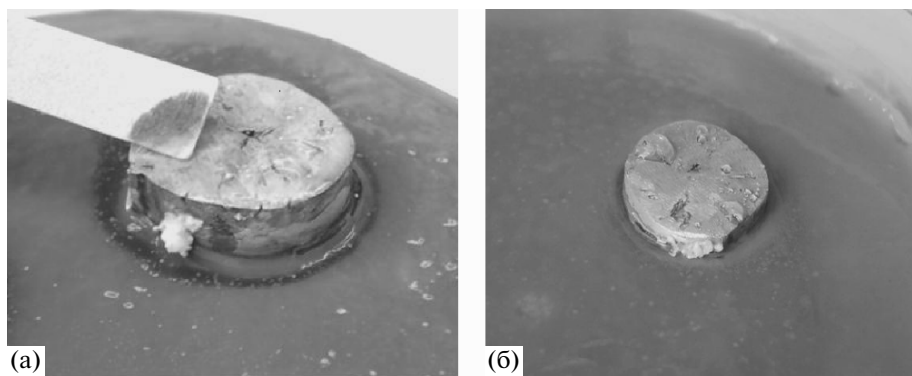


Рис. 1. Изменение поверхности цинка под воздействием бактерий *P. vulgaris* 1212 (а) и *P. aeruginosa* 969 (б) на 3 сут экспозиции.

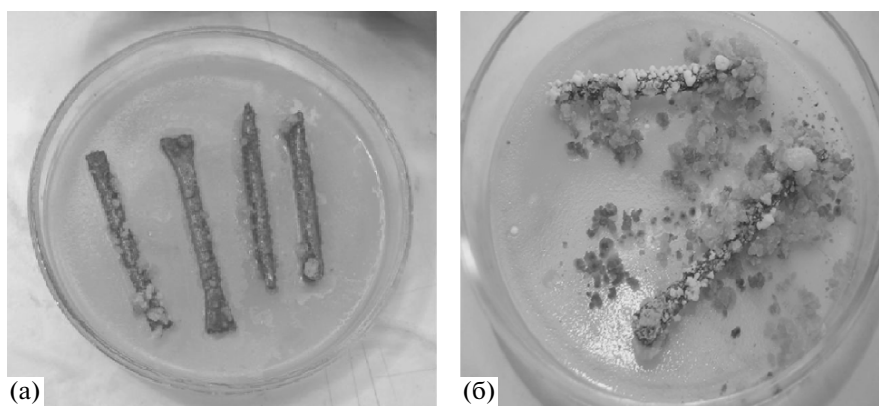


Рис. 2. Динамика коррозионных разрушений образцов сплава В65 при воздействии бактерии *P. vulgaris* 1212: а – 5 сут; б – 40 сут экспозиции.

этом физико-химические изменения состояния поверхности, по-видимому, аналогичны тем, которые описаны в работах [3–6].

Для подтверждения такой интерпретации нами изучалась способность бактерий генерировать супероксидный анион-радикал.

В настоящее время одним из общепринятых методов [10] фиксации внеклеточного $O_2^{\cdot-}$ является его реакция с НСТ. Реакция проходит путем последовательного четырехэлектронного восстановления НСТ (хлорид 2,2'-ди-(4-нитрофенил)-5,5'-дифенил-3,3'-(3',3'-диметокси-4,4'-дифенилен)-дитетразолия) с образованием сначала моно-, а затем диформаза, окрашенных в глубокий сине-фиолетовый цвет [11, 12].

НСТ – реагент высокочувствительный, но не избирательный, поскольку способен восстанавливаться другими относительно слабыми восстановительными системами [13, 14], поэтому для строгого заключения о возможности генерации $O_2^{\cdot-}$ биологическими объектами и его транспорта

во внеклеточную среду анализы с применением НСТ проводятся с использованием фермента СОД [11, 15, 16].

Скорость ферментативной реакции намного выше, чем скорость реакции $O_2^{\cdot-}$ с НСТ. Так, по данным работ [12, 14], скорость реакции $O_2^{\cdot-}$ с НСТ равна $5.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, в то время как константа скорости ферментативного разложения $O_2^{\cdot-}$ имеет значение $1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [10]. Было установлено, что после инкубации бактерий в течение 15 мин в присутствии НСТ наблюдалось появление синей окраски разной интенсивности. Наиболее глубокое окрашивание фиксировалось в опытах с бактериями *P. vulgaris* 1212 и *P. aeruginosa* 969, а наименьшее – с бактерией *S. epidermidis* 1061. В контрольных вариантах опыта, содержащих СОД, водная суспензия бактерий к этому моменту времени оставалась практически неокрашенной. При более длительном выдерживании контрольных образцов они также приобретали синюю окраску. Очевидно, что после дезакти-

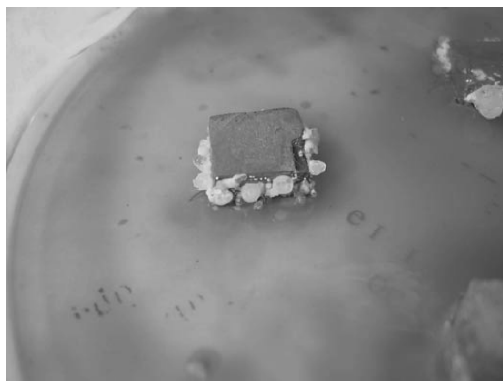


Рис. 3. Внешний вид образца цинка, находящегося под воздействием наиболее активного биодеструктора – бактерии *P. vulgaris* 1212, 90 сут экспозиции.

вазии СОД бактерии продолжали выделять в окружающую среду O_2^- , который и фиксировался реакцией с НСТ.

Полученные данные показывают, что некоторая часть внутриклеточного супероксидного анион-радикала может переходить в окружающую среду и принимать участие в химических реакциях, в том числе и в реакциях на поверхности металла. Наблюдаемую при этом корреляцию между количеством O_2^- , переходящим во внешнюю среду, и интенсивностью коррозии металлов можно рассматривать, как свидетельство участия O_2^- в химических процессах на их поверхности.

Известно, что клеточная стенка бактерий образована фосфолипидами и гликопротеинами (граммотрицательные бактерии) или гликопротеинами, покрытыми слоем фосфорилированных многоатомных спиртов (грамположительные) [17]. Оба типа соединений клеточной стенки, находящиеся в непосредственном контакте с окружающей средой, являются сильнополярными. Поэтому можно предположить, что бактерии легко должны адсорбироваться на полярных адсорбентах, включая поверхность металлов, как это показано в работах [18].

С учетом этих данных литературы можно предположить, что именно на участках с неоднородной поверхностью начинается воздействие бактерий с последующими химическими превращениями с участием O_2^- , описанными в работах [3–6].

По-видимому, динамика коррозии металлов тесно связана с жизнедеятельностью бактерий. Поскольку для выращивания используется среда с полипептидами, то в экспоненциальной фазе роста (более 18 ч) следует ожидать выделения в окружающую среду аммиака, как продукта дезаминирования аминокислот. В экссудате, образующемся на поверхности металлов, подвергшихся

коррозии, после 3 сут экспозиции, методами микрохимического анализа [9] нами, действительно, были обнаружены ионы аммония, а также калия и натрия, последние, по-видимому, диффундируют в экссудат из питательной среды. Наличие ионов калия и натрия в экссудате ранее наблюдали и при грибной коррозии [3–6]. Таким образом, в жидком экссудате с $pH > 7.0$, образующемся на начальных стадиях бактериальной коррозии, присутствуют гидроксиды калия и натрия, а также аммония. Ранее образование жидкого экссудата с основными свойствами, содержащего ионы аммония, было описано также и в работах [3–6].

Образование основного экссудата при бактериальной коррозии хорошо объясняется схемой, предложенной ранее для коррозии под воздействием грибов, и является следствием участия в коррозии металлов супероксидного анион-радикала [3–6].

При длительной экспозиции вследствие автолиза клеток высвобождаются клеточные метаболиты. В качестве главных среди них нами были идентифицированы органические кислоты различных классов. Накопление органических кислот фиксируется уже на 7–10 сут с начала экспозиции и их содержание достигало 50% в продуктах, собираемых с поверхности алюминия после трехмесячной экспозиции. Методом ГЖХ были идентифицированы следующие кислоты (в виде метиловых эфиров): каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, линолевая, олеиновая, стеариновая, арахидиновая, лигноцериновая. В виде триметилсилиловых эфиров были идентифицированы: пировиноградная, лимонная, фумаровая, янтарная; в виде свободных кислот: глюконовая, малоновая, уксусная, пропионовая, глутаровая, α -кетоглутаровая. Аналогичные кислоты найдены среди продуктов коррозии цинка.

Органические кислоты в состоянии взаимодействовать с чистой поверхностью металла с образованием солей, которые во влажной атмосфере проведения эксперимента гидролизуются до свободных кислот и гидроксидов металлов, переходящие со временем в оксидные соединения. На завершающем этапе экспозиции роль органических кислот в коррозионном разрушении металла, по-видимому, является ключевой.

Таким образом, нами установлено, что некоторые штаммы органотрофных бактерий способны вызывать значительные коррозионные разрушения цинка, алюминия и сплавов на его основе. Показана способность бактерий выделять в окружающую среду супероксидный анион-радикал и сделано предположение об участии O_2^- в инициировании коррозии бактериями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасименко А.А. // Защита металлов. 1998. Т. 34. № 2. С. 192–207.
2. Герасименко А.А., Матюша Г.В., Иванов С.Н., Плаксин Ю.В. // Защита металлов. 1998. Т. 34. № 1. С. 51–58.
3. Белов Д.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф., Кузина О.В., Косюкова Л.В., Карташов В.Р. // Коррозия: материалы, защита. 2007. № 9. С. 36–41.
4. Смирнов В.Ф., Белов Д.В., Соколова Т.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 213–218.
5. Белов Д.В., Соколова Т.Н., Карташов В.Р., Смирнов В.Ф., Челнокова М.В., Ляпина М.А. // Известия Вузов. Сер. Химия и химическая технология. 2007. Т. 50. № 6. С. 60–64.
6. Белов Д.В., Челнокова М.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф., Карташов В.Р. // Коррозия: материалы, защита. 2009. № 11. С. 43–48.
7. Андреюк Е.И., Коваль Э.З., Билай В.И., Козлова И.А. Микробная коррозия и ее возбудители. Киев: Наукова думка, 1980. 288 с.
8. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Ред. В.Г. Березкина. Т. 1. М.: Мир, 1981. 616 с.
9. Столяров К.П. Методы микрохимического анализа. Л.: Изд-во ЛГУ, 1960. 192 с.
10. Свободные радикалы в биологии / Ред. У. Прайор. М.: Мир, 1979. Т. 2. 328 с.
11. Auclair C., Voisin E. // Handbook of Methods for Oxygen Radical Research / Ed. R.A. Greenwald. Boca Raton: CRC Press, 1987. P. 123–132.
12. Bielski B.H.J., Shiue G.G., Bajuk S. // J. Phys. Chem. 1980. V. 84. P. 830–833.
13. Van-Catledge F.A., Allinger N.L. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 6272–6273.
14. Bielski B.H.J., Richter H.W. // J. Am. Chem. Soc. 1977. V. 99. P. 3019–3023.
15. Amano D., Kagasaki Y., Usui T. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1975. V. 66. P. 272.
16. Auclair C., Torres M., Hakim Y. // FEBS Lett. 1978. V. 89. P. 26–28.
17. Современная микробиология: Прокариоты. Пер. с англ. / Ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. Т. 1. 656 с.
18. Beech I.B., Sunner J.A., Hiraoka K. // Int. Microbiol. 2005. V. 8. P. 157–168.

Role of Superoxide Anion Radicals in the Bacterial Corrosion of Metals

D. V. Belov^a, A. A. Kalinina^a, T. N. Sokolova^a, V. F. Smirnov^b,
M. V. Chelnokova^a, and V. R. Kartashov^a

^a Nizhni Novgorod State Technical University, Nizhni Novgorod

^b Chemistry Research Institute, Nizhni Novgorod State University, Nizhni Novgorod

e-mail: 777aleksa_87@mail.ru, biotekno@nntu.nnov.ru

Received August 16, 2011

Abstract—It was found that seven strains of bacteria can cause corrosion damage to aluminum, its alloys, and zinc. With respect to the studied metals, the most active bacteria were *Proteus vulgaris* 1212 and *Pseudomonas aeruginosa* 969. Superoxide anion radicals were demonstrated to play a role in the initiation of corrosive damage to aluminum and zinc, while bacterial exometabolites participate in the later stages of this process.