

ХИМИЯ, ХИМИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 620.193.8

В.Р. Карташов¹, М.В. Челнокова¹, А.А. Калинина¹,
Т.Н. Соколова¹, С.Ю. Радостин², А.А. Москвичев²

ГЕНЕРАЦИЯ O_2^- МИКРООРГАНИЗМАМИ И ЕГО РОЛЬ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРОЗИИ МЕТАЛЛОВ

Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева¹,
Нижегородский филиал Института машиноведения им. А. А. Благонравова РАН²

Установлена способность микроорганизмов, в частности некоторых видов бактерий и микромицетов, вызывать коррозию цинка. Показана роль на начальной стадии процесса супероксидного анион-радикала O_2^- , выделяемого в окружающую среду микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности.

Ключевые слова: супероксидный анион-радикал, бактериальная коррозия металлов, микромицетная коррозия металлов, активные формы кислорода, нитросиний тетразолий.

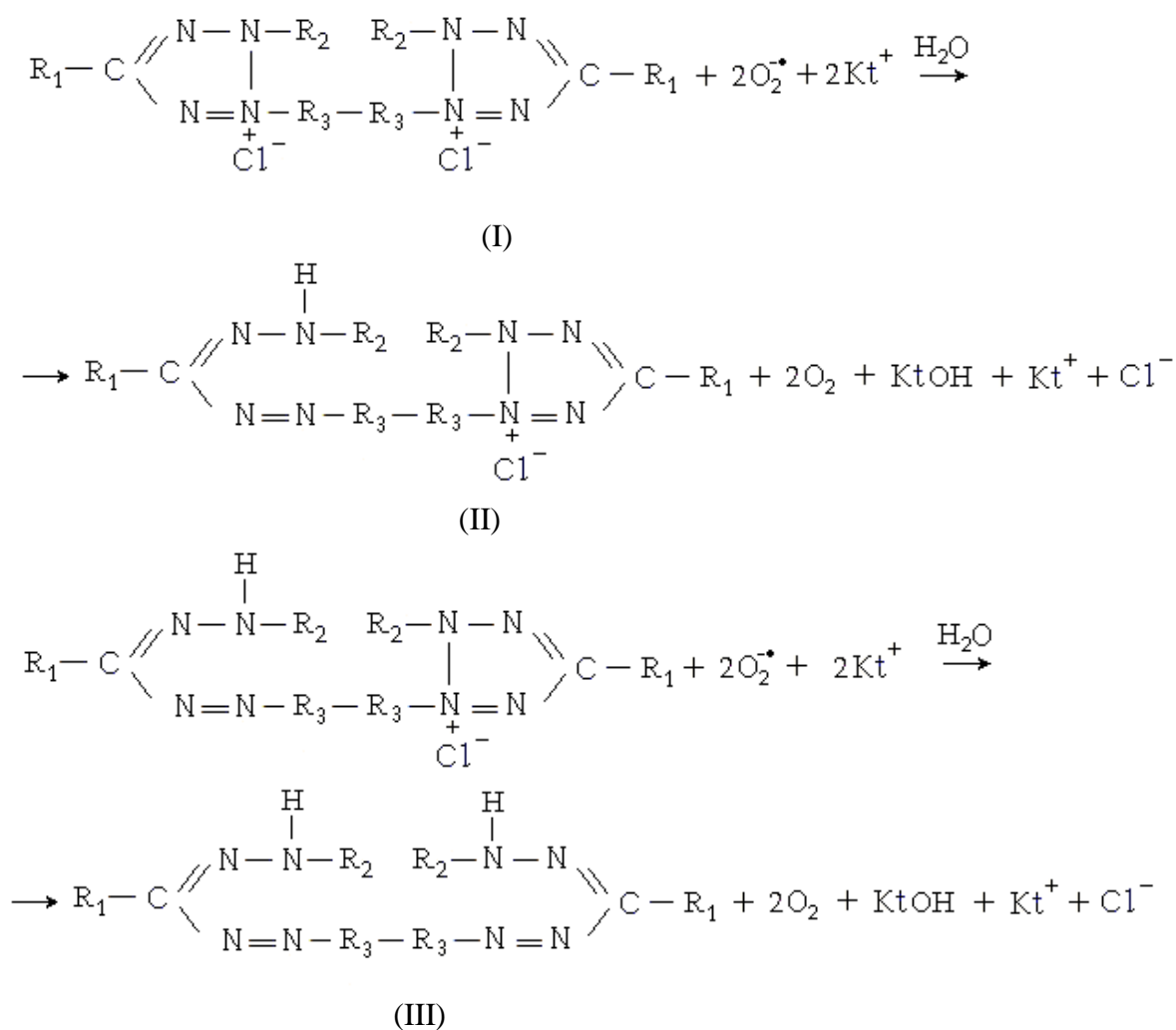
Исследование динамики коррозии ряда металлов при воздействии на них микроскопических грибов и бактерий-органотрофов позволило выявить нам ранее не описанные явления [1-5]. Наиболее важное из них состоит в том, что на начальном этапе, спустя 3 – 5 суток с начала экспозиции, на торцах металлов происходит накопление прозрачной жидкости (экссудата) с рН 8...11. Качественный микрохимический анализ экссудата [6] показал присутствие в нем ионов Na^+ и K^+ (вероятно, как противоионов OH^-), которыми микроорганизмы обмениваются с внешней средой, а также H_2O_2 [7]. На основании этих данных нами было сделано предположение, что отмеченные особенности могут быть обусловлены участием в коррозионном процессе супероксидного анион-радикала O_2^- , образующегося при жизнедеятельности микроорганизмов. Хотя образование O_2^- характерно для всех форм жизни [8], его роль в биокоррозии металлов ранее не обсуждалась.

В настоящей работе приводятся данные, которые показывают, что O_2^- , генерируемый микромицетами и бактериями, способен переходить в окружающую среду и принимать участие в реакциях на поверхности металла.

Для регистрации внеклеточного O_2^- использовали нитросиний тетразолий (HCT^{2+}), который широко применяется для этих целей в разнообразных химических и биохимических исследованиях, образуя при этом моно- и диформааны, характеризующиеся максимумами поглощения при 530 и 560 нм соответственно (схема 1) [9].

На семисуточный газон микроскопических грибов наносили в виде нарастающей капли 0,01 М водный раствор HCT^{2+} в количестве 0,5 мл и оставляли в оптимальных условиях роста микромицетов. Через некоторое время в месте контакта раствора HCT^{2+} с мицелием наблюдали появление синей окраски, вызванное осаждением на поверхность плохо растворимых в воде моно- и диформаанов. Продукты восстановления HCT^{2+} экстрагировали хлороформом, после чего анализировали спектрофотометрическим методом (рис. 1). В качестве контроля использовали раствор HCT^{2+} с добавлением супероксиддисмутазы (СОД, 15 ед. акт.), которая очень быстро ($1,9 \times 10^9 M^{-1}c^{-1}$) с абсолютной специфичностью разлагает O_2^- до H_2O_2 и O_2 [10].

Схема 1



где $\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}_2 = p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$; $\text{R}_3 = m\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$, Kt^+ —противоионы.

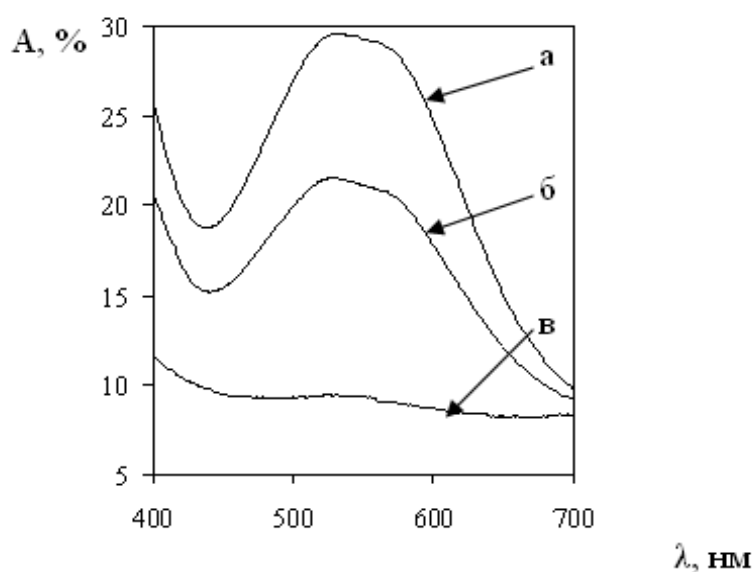
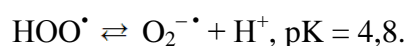


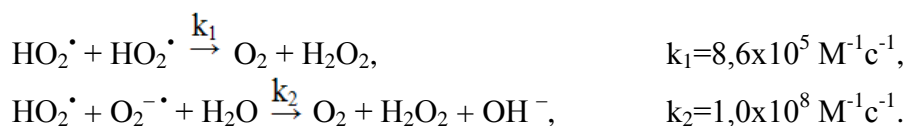
Рис. 1. Спектры поглощения продуктов восстановления NCT^{2+} , десорбированных с поверхности мицелия микромицетов после трех сут. экспозиции: а – *Alt. alternata*; б – *P. ochro-chloron*; в – *Alt. alternata* с СОД через 6 ч

Возможность генерации O_2^- бактериями исследовалась при использовании их суспензии с количеством 930 млн клеток *Escherichia coli* 321-5 и 2200 млн клеток *Pseudomonas aeruginosa* 969 в 1 мл. К 2 мл бактериальной суспензии добавляли 0,5 мл 0,01 М НСТ²⁺, в контрольном опыте сначала добавляли 0,15 мл СОД (15 ед. акт.), а затем НСТ²⁺. После 15-минутной инкубации в опытах с НСТ²⁺ наблюдали появление синей окраски разной интенсивности. В контрольных опытах водная суспензия бактерий не окрашивалась. Полученные данные показывают, что O_2^- , образующийся при жизнедеятельности микроорганизмов, через транспортные каналы [11] может переходить во внеклеточную среду.

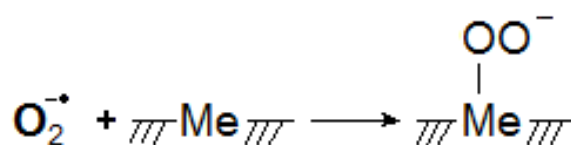
В настоящее время установлено, что супероксидный анион-радикал является основанием Бренстеда, которое находится в равновесии с гидропероксидным радикалом – сопряженной ему кислотой [12]:



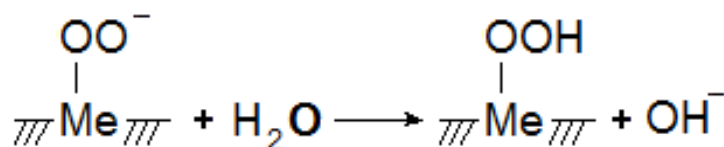
Гидропероксидный радикал и $O_2^{-\bullet}$ быстро превращаются в H_2O_2 и OH^- в результате двух параллельно протекающих реакций [13]:



На отдельных участках поверхности металла, покрытой оксидной пленкой, могут адсорбироваться ионы OH^- с противоионами и H_2O_2 . С участием воды, извлекаемой из питательной среды, на этих участках постепенно формируется эксудат с основными свойствами (рис. 2, а, б). При накоплении значительного количества OH^- происходит разрушение оксидной пленки. В условиях высокого рН, в соответствии с константой кислотности HO_2^{\bullet} , главным реагентом становится $O_2^{-\bullet}$, который, после разрушения оксидной пленки, способен непосредственно хемосорбироваться на поверхности металла. При взаимодействии с водой соединение (I) переходит в поверхностный продукт (II):



(I)



(II)

На этой стадии продолжается накопление эксудата, а рН достигает своего максимального значения. Поверхностное соединение (II) в силу его окислительных свойств со временем превращается в конечные продукты коррозии (оксиды, гидроксиды металлов). На долю последних приходится 50 – 80% от общего количества субстанции, собранной с поверхности металлов (рис. 2, в).

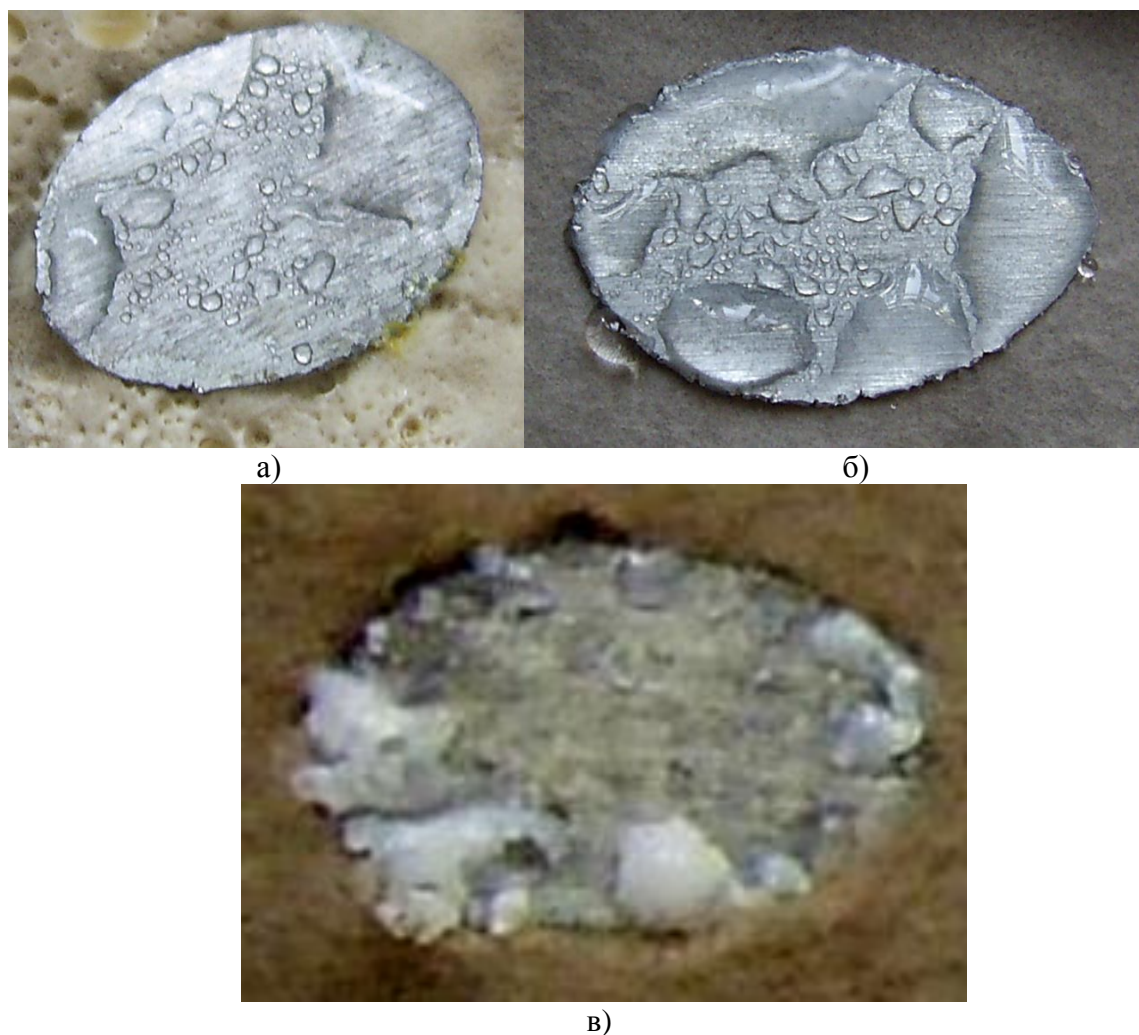


Рис. 2. Внешний вид поверхности цинка:

a – при воздействии *P. ochro-chloron* на 5-е сутки экспозиции; *б* – при воздействии *Alt. alternata* на 1-е сутки экспозиции; *в* – при воздействием *Alt. alternata* на 60-е сутки экспозиции

Если инициировании биокоррозии действительно происходит при участии O_2^- , должна наблюдаться определенная связь между свойством микроорганизмов секретировать O_2^- и степенью коррозионного разрушения. Возможная корреляция такого рода исследовалась нами на примере коррозии цинка под воздействием микромицетов *Alt. alternata* и *P. ochro-chloron*. Из рис. 1 видно, что свойства *Alt. alternata* транспортировать O_2^- в окружающую среду существенно выше, чем у микромицета *P. ochro-chloron*. С другой стороны, характерные признаки начального этапа коррозии металла под воздействием *Alt. alternata* также выражены значительно сильнее, чем при использовании *P. ochro-chloron*. Если под воздействием последнего спустя 5 суток наблюдаются локальные образования экссудата ($pH > 8$) (рис. 2, *a*), то в случае *Alt. alternata* экссудат покрывает существенно большую поверхность уже через одни сутки (рис. 2, *б*). На завершающих стадиях коррозия металла под воздействием *Alt. alternata* проходит также более глубоко (рис. 2, *в*).

Библиографический список

1. О роли активных форм кислорода в инициировании коррозии металлов микроскопическими грибами / Д.В. Белов [и др.] // Коррозия: материалы, защита. 2009. № 11. С. 43–48.
2. Коррозия алюминия и его сплавов под воздействием микроскопических грибов / Д.В. Белов [и др.] // Коррозия: материалы, защита. 2007. № 9. С. 36–41.
3. Коррозия алюминия и алюминиевых сплавов под воздействием микроорганизмов / Д.В. Белов [и др.] // Изв. вузов. Сер. Химия и химическая технология. 2007. Т. 50. № 6. С. 60–64.

4. Роль супероксидного анион-радикала в бактериальной коррозии цинка / Д.В. Белов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3. С. 302–307.
5. Соединения – акцепторы электронов в исследовании биокоррозионных явлений / А.А. Калинина [и др.] // Коррозия: материалы, защита. 2011. № 12. С. 29–32.
6. Столяров, К.П. Руководство по микрохимическим методам анализа: учеб. пособие / К.П. Столяров. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та. 1981. – 248 с.
7. **Bailey, R.** Differential Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide Using 1,10-Phenanthroline and Bathophenanthroline / R. Bailey, D.F. Boltz // Anal. Chem. 1959. V. 31. № 1. P. 117 – 119.
8. **Auchere, F.** What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo? / F. Auchere, F. Rusnak // J. Biol. Inorg. Chem. 2002. V. 7. P. 664–667.
9. **Bielski, B.H.J.** Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2 and O_2 radicals / B.H.J. Bielski, G. S. Grace, S. Bajuk // J. Phys. Chem. 1980. V. 84. P. 830–833.
10. **Фридович, И.** Свободные радикалы в биологии. Т. 1 / И. Фридович. – М.: Мир, 1979. С. 273–314.
11. **Mao, G.D.** Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes / G.D. Mao, M.J. Poznansky // FEBS Letters. 1992. V. 305. № 3. P. 233–236.
12. **Bielski, B.H.J.** Reevaluation of the spectral and kinetic properties of HO_2 and O_2^- free radicals / B.H.J. Bielski // Photochemistry and Photobiology. 1978. V. 28. P. 645–649.

Дата поступления
в редакцию 28.11.2012

**V.R. Kartashov¹, M.V. Chelnokova¹, A.A. Kalinina¹, T.N. Sokolova¹,
S.J. Radostin², A.A. Moskvichev²**

O_2^- GENERATION MICRO-ORGANISMS AND THEIR ROLE IN BIOLOGICAL CORROSION OF METALS

Nizhny Novgorod state technical university n.a. R.E. Alexeev¹,
Nizhny Novgorod branch of Institute of mechanical engineering n.a. A.A. Blagonravov²

Purpose: Explore the possibility of participating in the corrosion process of the superoxide anion radical produced when microorganisms.

Design / methodology / approach: A review of literature and previously published data on the possibility of living organisms release of reactive oxygen species, particularly superoxide anion in the environment. Spectrophotometrically installed capacity allocation superoxide anion micromycetes and bacteria.

Findings: Installed capacity of microorganisms, particularly certain types of bacteria and micromycetes corrosive zinc. The role of the initial stage of the superoxide anion radical O_2^- , released into the environment by microorganisms during their life.

Research limitations/implications: Examined some of the factors initiating biological corrosion.

Originality/value: A certain connection between the properties of microorganisms secrete superoxide anion and the degree of corrosion damage.

Key words: superoxide anion radical, bacterial corrosion of metals, mikromitsetnaya corrosion of metals, reactive oxygen species, NBT.