

Л. М. ПУРИШ, Л. Г. АСАУЛЕНКО,  
М. А. ПРОТАСОВА —

Институт микробиологии  
и вирусологии им. Д. К. Заболотного  
НАН Украины, Киев, Украина

УДК 541.13: 620.193.8

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА КОРРОЗИИ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИМЕРОВ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ В БИОПЛЕНКЕ ПЕРИФИТОНА

*АННОТАЦИЯ.* Установлено, что планктонные (свободноплавающие) клетки сульфатвосстанавливающих бактерий продуцируют большее количество экзополисахаридов (ЭПС), чем клетки биопленки, образованной на стали. В присутствии ингибитора коррозии уменьшается количество адгезированных на стали клеток сульфатвосстанавливающих бактерий. Показано, что ингибитор коррозии блокирует синтез ЭПС в биопленке, образованной сульфатвосстанавливающими бактериями на поверхности стали, и при этом стимулирует продукцию ЭПС планктонными клетками бактерий.

*The plankton cells of sulfate-reducing bacteria produced more exopolysaccharides (EPS) than the biofilm cells, which were formed on steel. In presence of inhibitor the amount of adhesion cells of sulfate-reducing bacteria on steel was reduced. It was shown that inhibitor blocked synthesis of EPS in biofilm, which was formed by sulfate-reducing bacteria on steel surfaces and, on contrary, was stimulated in plankton production of EPS.*

Многолетние исследования отечественных и зарубежных ученых показали, что микробная коррозия — это биоэлектрохимический процесс, который протекает в сформированной на поверхности металла биопленке, то есть — перифитоне [1, 13, 14]. Согласно нашим предыдущим исследованиям, мощность биопленки коррелирует с коррозионной активностью сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ), что подтверждает роль биопленки как основного фактора микробной коррозии [3]. Одним из этапов формирования биопленки является процесс адгезии бактерий к металлу [14, 16]. При образовании биопленок главным функциональным звеном между микробной клеткой и металлом являются экзополисахариды (ЭПС) [9, 10, 11, 13, 15, 18]. Однако роль ЭПС в адгезии бактерий к металлу в наше время недостаточно изучена.

Эффективным методом защиты металла от коррозии является использование ингибиторов. Ингибиторы коррозии адсорбируются на поверхности металла, образуя на ней защитную пленку [7]. В наших предыдущих исследованиях показано, что, адсорбируясь на поверхности металла, ингибиторы приводят к снижению каталитической активности сульфатвосстанавливающих бактерий, замедляя доставку водорода с поверхности металла для энергообразующих реакций сульфатредукции [4, 6]. Однако влияние ингибиторов на формирование биопленки, адгезию СВБ к стали и продукцию ЭПС до настоящего времени не исследовали. По данным J. Costerton [11], микроорганизмы, которые находятся в биопленке, обладают большей стойкостью по отношению к ингибиторам, чем свободно плавающие в водной среде, то есть планктонные.

Целью нашей работы было изучение влияния ингибитора коррозии (ДПХ) на адгезию сульфатвосстанавливающих бактерий к стали и продукцию бактериями ЭПС как в биопленке, так и в планктоне различными по агрессивности культурами СВБ.

### Экспериментальная часть

Объектом исследования были сульфатвосстанавливающие бактерии, которые отличались по коррозионной активности: *Desulfovibrio* sp., штамм Kiev-10 и *Desulfovibrio desulfuricans*, штамм Kiev-45. Бактерии были выделены из разных мест: *Desulfovibrio* sp. штамм Kiev-10 — из продуктов коррозии арматуры железобетона ДнепроГЭС, *Desulfovibrio desulfuricans* штамм Kiev-45 — из продуктов коррозии магистрального газопровода в Поволжье. Нашими предыдущими исследованиями показано, что *Desulfovibrio* sp. Kiev-10 более коррозионно активен, чем *Desulfovibrio desulfuricans* Kiev-45 [3]. Бактерии культивировали на среде Постгейта «В» при 28°C [8].

В качестве ингибитора использовали высокомолекулярное соединение азотсодержащего поверхностно активного вещества (ПАВ) катионного типа, коммерческое название — ДПХ. Выбор ингибитора и его концентраций обусловлен нашими предыдущими исследованиями [4, 6].

Исследования проводили в колбах ( $V = 500$  мл), заполненных 3-х суточной культурой бактерий, куда помещали образцы стали-3, размером  $5,0 \times 1,5 \times 0,5$  см, и ингибитор. Концентрация ингибитора — 0,5 и 1,0 г/л. Предварительно образцы погружали на 20 секунд в раствор 6N  $H_2SO_4$  для снятия оксидных пленок с поверхности металла и активизации электрохимических процессов. Колбы закрывали резиновыми пробками. Время экспозиции 14 суток.

По окончании экспозиции металлические образцы вынимали из колб, а культуральную жидкость центрифугировали (10000 g, 40 мин, 20°C). ЭПС осаждали из надосадочной жидкости ацетоном (1:3). Для осаждения кислых полисахаридов к исследуемому объему добавляли несколько капель 20% раствора  $CaCl_2$ , после чего центрифугировали (6000 g, 20 мин). Надосадочную жидкость сливали, а осадок (ЭПС) диализировали и лиофильно высушивали [2].

Биопленку, образовавшуюся на металлических образцах, снимали в фиксированный объем 0,1 N фосфатного буфера (pH 7,0) с помощью ультразвука при частоте 22 кГц (30 с) дважды с интервалом в 30 с на приборе УЗДН 2Т. Центрифугированием осаждали клетки биопленки и планктона СВБ, а из надосадочной жидкости получали ЭПС, как указано выше. Общее количество углеводов в выделенных экзополисахаридах сульфатвосстанавливающих бактерий определяли фенол-серным методом [12].

Адгезию *Desulfovibrio* sp. 10 к стали в присутствии ингибитора фиксировали через 30 и 60 мин. В колбы, заполненные 3-х суточной культурой, помещали металлические образцы размером  $2,0 \times 2,0 \times 0,1$  см и ингибитор определенной концентрации. Адгезированные к поверхности стали бактерии снимали ультразвуком, как указано выше. Количество адгезированных клеток бактерий в полученном смыве подсчитывали методом прямого счета под микроскопом [5].

### Результаты и их обсуждение

Одним из этапов формирования биопленки является процесс адгезии бактерий к металлу [13, 16, 17]. На адгезию могут влиять разнообразные физико-химические и биологические факторы: гидрофобность клеточной поверхности и электрический заряд, наличие жгутиков и фимбрий, подвижность, размер клеток, их общее физиологическое состояние, отдельные поверхностные белки и экзополимеры [13, 17]. До настоящего времени влияние ингибиторов коррозии на адгезию СВБ к стали не изучалось. Из литературных источников известно, что основная масса бактериальных клеток прикрепляется к твердой поверхности в первые 5–30 минут контакта бактерий с поверхностью [16]. Было целесообразно исследовать влияние ингибитора коррозии ДПХ на способность клеток СВБ прикрепляться к поверхности металла на протяжении 30 и 60 минут.

Как видно из рис. 1, наибольшее количество клеток —  $1,87 \times 10^8$  кл/мл, прикрепилось к поверхности стали через 30 мин в среде без ингибитора, то есть в контроле.

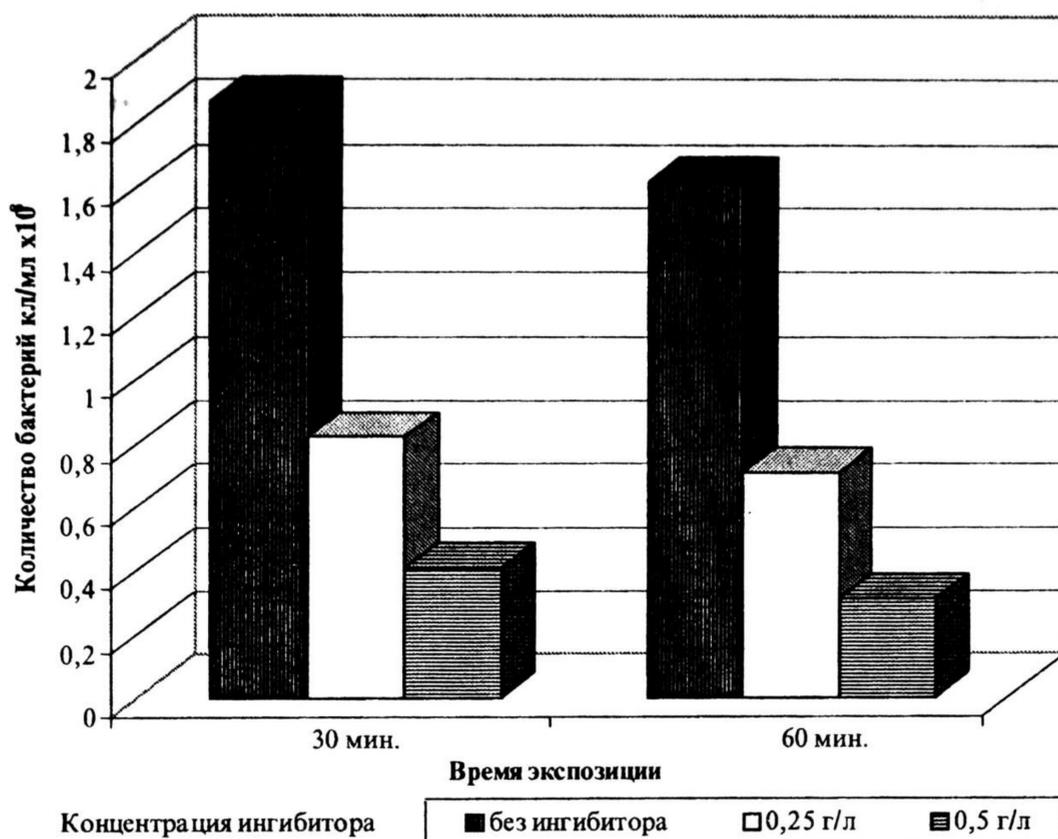


Рис. 1. Адгезия *Desulfovibrio* sp. (штамм Kiev-10) к стали в присутствии ингибитора

Внесение в инокулированную среду 0,25 г/л ингибитора привело к снижению количества прикрепленных к металлу клеток на 56% по сравнению с контролем. При повышении концентрации ингибитора до 0,5 г/л количество адгезированных к поверхности стали клеток снижалось на 78%. Такая же закономерность наблюдалась после 60 мин экспозиции бактерий в присутствии ингибитора.

На наш взгляд, угнетение способности клеток адгезироваться к поверхности стали в присутствии ингибиторов связано с механизмом влияния этих веществ как на жизнедеятельность бактерий, так и на поверхность металла. Используемый в исследовании ингибитор коррозии ДПХ — это высокомолекулярное соединение азотсодержащего ПАВ катионного типа. Известно, что действие этих ингибиторов коррозии обусловлено их адсорбцией на поверхности металла, изменением состояния поверхности и торможением электрохимических реакций, которые протекают в этой системе [7]. Уменьшение адгезии СВБ к стали в присутствии ингибитора, на наш взгляд, обусловлено адсорбцией таких катионоактивных ПАВ на отрицательно заряженной поверхности стали и клетках СВБ, которые также имеют отрицательный заряд. Очевидно, ингибиторы влияют не только на жизнедеятельность СВБ, но и на способность адгезироваться к стали.

Известно, что важную роль при образовании биопленок играют ЭПС [9, 10, 11, 13, 15, 18]. Влияние ингибиторов на продукцию ЭПС сульфатредуцирующими бактериями не изучалось. Учитывая полученные результаты о влиянии ингибитора коррозии ДПХ на адгезию клеток СВБ к стали, мы сочли необходимым определить влияние ингибитора коррозии непосредственно на продукцию ЭПС сульфатвосстанавливающими бактериями. Целесообразно было определить влияние ингибитора ДПХ как на клетки биопленки, так и на планктонные клетки СВБ. Проведенные исследования показали, что в присутствии ингибитора в биопленке, образованной на стали СВБ, экзополисахариды не продуцировались. Однако количество прикрепленных к стали клеток СВБ было высоким и составляло  $10^6$ – $10^7$  кл/мл. На наш взгляд, ингибитор коррозии ДПХ блокировал синтез ЭПС сульфатвосстанавливающими бактериями в биопленке. Отмеченное явление может быть объяснено снижением адгезии СВБ к поверхности стали, которое было установлено в предыдущих опытах.

Кроме того, установлено, что в среде с ингибитором на поверхности стальных образцов отсутствовала сульфидная пленка. Так как численность клеток СВБ в биопленке была значительной ( $10^6$ – $10^7$  кл/мл), можно предположить, что сероводород, который продуцируется СВБ в процессе сульфатредукции, связывался с поверхностно активным веществом, которым является ингибитор. Также молекулы  $H_2S$  и  $HS^-$ , адсорбируясь на поверхности металла, могут принимать участие в формировании защитных пленок, что приводит к образованию более плотных слоев ингибитора, защищающих металл от коррозии [5, 7].

Совсем другая реакция на внесение в инокулированную СВБ среду ингибитора коррозии наблюдалась для планктонных клеток. При концентрации ингибитора 0,5 г/л, количество ЭПС, образованное планктонными клетками агрессивного штамма *Desulfovibrio* sp. Kiev-10, увеличивалась в 30 раз, а неагрессивного *Desulfovibrio desulfuricans* Kiev-45 — в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

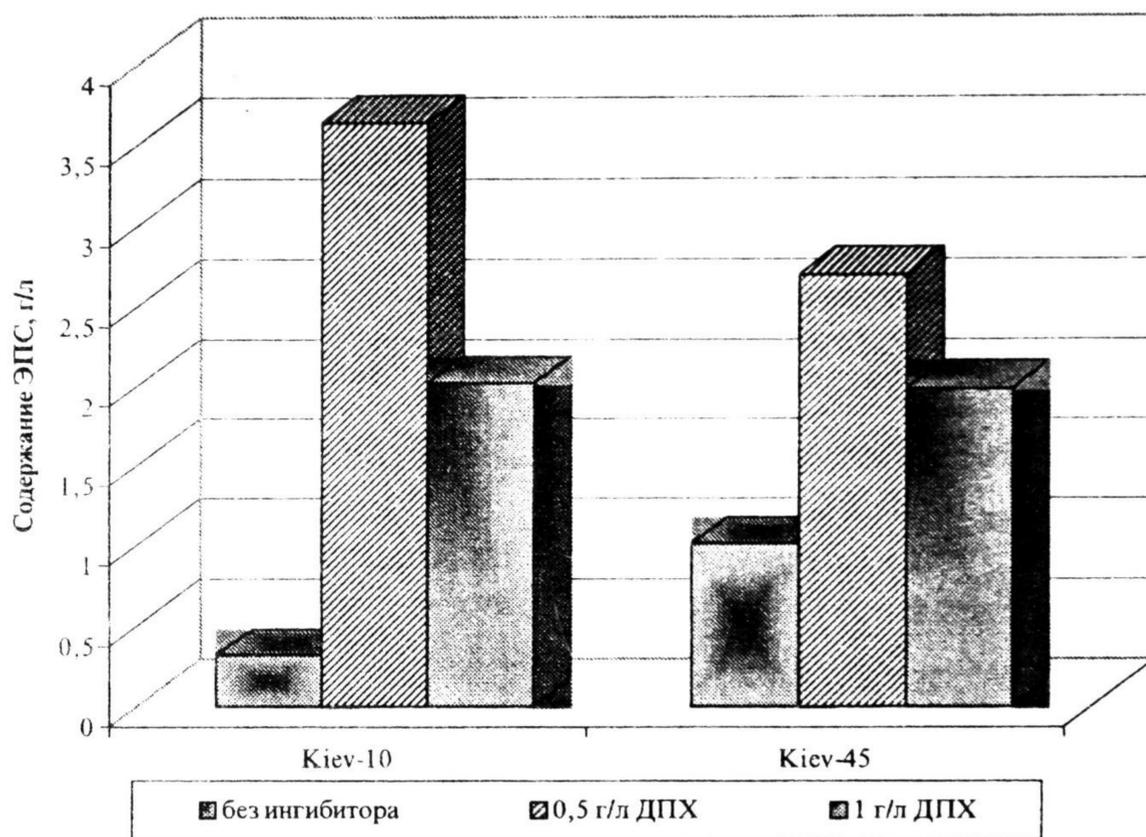


Рис. 2. Влияние ингибитора коррозии на количество ЭПС, образованное планктонными клетками сульфатвосстанавливающих бактерий

Таким образом, ингибитор коррозии ДПХ стимулирует продукцию ЭПС планктонными клетками СВБ. На наш взгляд, резкое увеличение продукции ЭПС под влиянием ингибитора является проявлением защитной реакции клеток бактерий на неблагоприятные условия окружающей среды, ответом на стресс, вызванный ингибитором.

Внесение в инокулированную СВБ среду ингибитора по-разному влияло на состав углеводов в ЭПС планктонных клеток: стимулировалась не только продукция ЭПС, возрастало и общее содержание углеводов (табл. 1). Но большее количество углеводов в процентном отношении было у менее агрессивного штамма *Desulfovibrio desulfuricans* Kiev-45. При концентрации ингибитора ДПХ 1,0 г/л количество углеводов в ЭПС этого штамма было почти в 2,5 раза выше, чем в ЭПС агрессивного штамма *Desulfovibrio* sp. Kiev-10.

Таким образом, разные по агрессивности штаммы СВБ неодинаково реагировали на внесение в среду ингибитора коррозии. Продуцируемые планктонными клетками этих штаммов ЭПС отличались как по количественному, так и по качественному составу.

### Выводы

1. Установлено, что ингибитор коррозии ДПХ угнетает развитие сульфатвосстанавливающих бактерий, их адгезию к поверхности металла, а также блокирует синтез экзополисахаридов в биопленке, то есть перифитоне.

2. Ингибитор коррозии предупреждает образование на металле сульфидной пленки, которая является одним из факторов микробной коррозии металла.

3. Установлена взаимосвязь между коррозионной агрессивностью сульфатвосстанавливающих бактерий и способностью продуцировать экзополисахариды как в биопленке, образованной на стали, так и в планктоне. Изучение механизма влияния ингибиторов на адгезивные и коррозионные процессы, которые протекают в присутствии сульфатвосстанавливающих бактерий, может способствовать созданию эффективной защиты металлов от микробной коррозии.

Таблица 1

Влияние ингибитора коррозии ДПХ на продукцию экзополисахаридов сульфатвосстанавливающими бактериями в планктоне

Варианты эксперимента	Титр бактерий	Количество ЭПС, г/л	Количество углеводов от %, от сухого веса ЭПС
<i>Desulfovibrio sp. Kiev-10</i>	10 <sup>10</sup>	0,558	6,25
<i>Desulfovibrio sp. Kiev-10</i> + 0,5 г/л ДПХ	10 <sup>7</sup>	3,276	следы
<i>Desulfovibrio sp. Kiev-10</i> + 1 г/л ДПХ	10 <sup>8</sup>	2,468	7,10
<i>Desulfovibrio desulfuricans Kiev-45</i>	10 <sup>9</sup>	1,051	9,25
<i>Desulfovibrio desulfuricans Kiev-45</i> + 0,5 г/л ДПХ	10 <sup>7</sup>	2,700	2,50
<i>Desulfovibrio desulfuricans Kiev-45</i> + 1 г/л ДПХ	10 <sup>6</sup>	1,990	16,50

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреюк Е. И., Козлова И. А. Литотрофные бактерии и микробиологическая коррозия. Киев: Наук. думка, 1977. 167 с.
2. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наук. думка, 1982. 182 с.
3. Козлова И. А., Коптева Ж. П., Пуриш Л. М. и др. Таксис сульфатредуцирующих бактерий к Fe(III)-ионам как начальная стадия формирования биопленки на металле // Вісник Одеського національного університету. 2002. Т. 6. № 4. С. 173–176.
4. Погребова И. С., Пуриш Л. М., Козлова И. А., Туовинен О. Х. Электрохимические аспекты ингибирования процесса микробной коррозии стали в присутствии сульфатредуцирующих бактерий // Вопросы химии и химической технологии. 1999. № 1. С. 268–270.
5. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. Изд-во МГУ, 1976. 306 с.
6. Пуриш Л. М., Погребова И. С., Козлова И. А. Влияние сульфатредуцирующих бактерий на коррозию стали в присутствии ингибиторов // Микробиол. журн. 2002. Т. 64. № 6. С. 67–73.
7. Розенфельд И. Л. Ингибиторы коррозии металлов. М.: Химия, 1977. 352 с.
8. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. М.: Наука, 1974. 196 с.
9. Beveridge T. J., Graham L. L., Kadurugamuwa J. L., Li Z. Interactions between biofilms and the environment // FEMS Microbiol. Rev. 1997. 20. № 3–4. P. 291–303.
10. Beyeval H., Lewandowsky Z. Combined effect of substrate concentration and flow velocity of effective diffusivity in biofilm // Wat. Res. 2000. Vol. 34. № 2. P. 528–538.
11. Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D. et al. Biofilms, the Customized Microniche // J. Bacteriol. 1994. 176. № 8. P. 2137–2142.
12. Dubois M., Gelles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. 28. № 3. P. 350–356.
13. Hamilton W. A. Microbially Influenced Corrosion in the Context of metal Microbe Interactions // Microbial Corrosion., C. A. C. Seguirra (ed), London: European Federation of Corrosion, IOM Communication, 2000. P. 3–17.
14. Iverson W. P. Mechanism of anaerobic corrosion of steel by sulphate-reducing bacteria // Mater. Perform. 1984. 23. № 3. P. 28–30.
15. Lewandowski Z. Structure and Function of Bacterial Biofilms // Corrosion. 1998. 296. P. 1–15.

16. Marshall K. C. Mechanism of bacteria adhesion at solid-water interfaces // *Bacterial adhesion*. New York, London: Plenum Press, 1985. P. 133–161.
17. Schie van P. M., Fletcher M. Adhesion of Biodegradative Anaerobic Bacteria to Solid Surfaces // *Appl. and Environ. Microbiol.* 1999. 65. № 11. P. 5082–5088.
18. Sutherland I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // *Microbiology*. 2001. 147. P. 3–9.

**Галина Ивановна РЯЗАНОВА** —  
кафедра энтомологии,  
Биологический факультет,  
МГУ им. М. В. Ломоносова,  
Москва, Россия

УДК 595.733:591.526:597.0

### **ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ СТРЕКОЗ ПЕРИФИТОНА**

**АННОТАЦИЯ.** В экспериментах с 9 видами стрекоз перифитона обнаружено, что внутривидовая территориальная конкуренция и гетероспецифические хищники определяют размещение личинок стрекоз в местах обитания — ярусность популяции и минимальные расстояния между особями. Показаны видовая специфика изучаемого пространственного поведения личинок стрекоз, его адаптивность и связь с экологической плотностью популяции.

*In experiments the larval spatial distribution of 9 species of periphytic Odonata was studied. Larva distribution in the periphyton tiers and minimal distances between individual larvae have been regulated by intraspecific territorial competition and heterospecific predators. Specific features of the spatial behavior of the species, its adaptation and its dependence on the ecological density Odonata were described.*

В области общей биологии и экологии одной из важнейших проблем является изучение закономерностей динамики популяций отдельных видов, их численности и структуры. Настоящее исследование рассматривает поведение и, в частности, внутри- и межвидовые взаимодействия особей насекомых как вероятный механизм их адаптации к среде, определяющий пространственную структуру популяции. Затронуты два фактора, влияющие на поведение — внутривидовая территориальная конкуренция и угроза хищников.

Объектом изучения послужили личинки 9 видов стрекоз из группы перифитона: *Calopteryx splendens* Harris, *C. virgo* L., *Ischnura elegans* V. d. Lind., *I. pumilio* Charp., *Coenagrion hastulatum* Charp., *C. puella* L., *Platycnemis pennipes* Pall., *Lestes sponsa* L., *Aeshna cyanea* Mull.

Все наблюдения индивидуального поведения личинок проведены в аквариумах в условиях, максимально приближенных к природным. Цилиндрические стеклянные аквариумы диаметром 8–24 см, в зависимости от вида и возраста личинок, располагали на открытом воздухе при естественных температуре и освещении. Простые веточки растений, воткнутые в песок перпендикулярно дну, служили для личинок опорой и убежищем, защищающим от хищников, как показано ранее [1]. В зависимости от задачи опыта количество опор превышало (низкая экологическая плотность) или было