

УДК 579.66

АДСОРБЦИЯ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНКАХ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИОБСКОГО НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ¹

© 2007 О.В. Зайцева²

В статье представлены характеристики накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения, а также данные по антибактериальным свойствам церия и лантана и адсорбции лантана на клеточные стенки накопительных культур сульфатвосстанавливающих бактерий.

Введение

В настоящее время считается, что микроорганизмы вносят огромный вклад в развитие стресс-коррозии магистральных трубопроводов. Например, сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) считаются основными возбудителями анаэробной питтинговой коррозии, в результате которой выходят из строя трубопроводы, различные виды оборудования нефтяной и газовой промышленности [1].

Из литературных данных известно, что химический состав поверхности может позитивно влиять на развитие бактериальной популяции, облегчая прикрепление клеток путем связывания ионов Fe с бактериальными экзополисахаридами [2], или, напротив, препятствовать колонизации бактерий за счет токсического действия некоторых ионов металлов, например Cr (Percival, 1997, цит. по [2]).

Наблюдаемая в некоторых экспериментах [3,4] адсорбция СВБ на катоде может быть объяснена участием катионов, в большом количестве присутствующих в культуральной среде, в преодолении сил электростатического отталкивания между отрицательно заряженными поверхностями катода и бактериальной клетки [5].

¹ Представлена доктором биологических наук профессором О.Н. Макуриной.

² Зайцева Ольга Владимировна (biomig@rambler.ru) кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

В ранее нами проведенных исследованиях [6] было показано, что церий, являясь компонентом стали, снижает количество СВБ на поверхностях данных сталей. В литературе имеются данные об использовании церия в составе сложных комплексных органических веществ как ингибиторов бактериальной коррозии металлов [7]. Все данные по влиянию церия, лантана и других РЗМ на бактериальную коррозию сводятся к изменению микроструктуры стали (включения становятся мелкими), снижению содержания серы и других примесей, повышению механических свойств и особенно ударной вязкости [8]. Однако данных по механизму действия РЗМ на СВБ в литературе нами не найдено. В связи с этим **целью** данного исследования было изучение влияния церия и лантана на рост СВБ и адсорбцию РЗМ на бактериальные клетки.

Материалы и методы

Для исследования антибактериальных свойств церия и лантана на рост СВБ был проведен эксперимент с выращиванием накопительной культуры СВБ в средах с разными концентрациями исследуемых РЗМ и без РЗМ. Накопительная культура СВБ была выделена из Приобского нефтяного месторождения. Выделение культуры осуществляли путем посева продуктов коррозии, взятых с корродировавших труб, на жидкую питательную среду Постгейта С. Среда содержала в качестве источника углерода лактат кальция в концентрации 3,5 г/л. Содержание СВБ в инокуляте достигало 10^6 кл/мл. Эксперименты с различными концентрациями РЗМ проводили в стеклянных колбах объемом 50 мл. Конечные концентрации церия и лантана в колбах со средой Постгейта С были: 0,0063, 0,0125%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,3%. Стандартные водные растворы РЗМ готовили из хлоридов церия и лантана. Среда с разными концентрациями церия заражали культурами СВБ, вводя в среду по 1 мл инокулята. Инкубацию проводили в течение 2-х недель в анаэроостате в термостате при 30°C. Ежедневно проводили контроль роста бактерий по почернению сред, а через 2 недели в каждой среде измеряли количество белка методом Лоури и сероводорода методом Пахмайера.

Эксперименты по адсорбции РЗМ на бактериальных клетках СВБ были проведены в стеклянных флаконах объемом 50 мл. Использовали вышеуказанную культуру СВБ. Данная накопительная культура СВБ была отделена от среды центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут, а затем отмыта три раза с 1% раствором NaCl при том же режиме центрифугирования. Для стандартизации результатов определяли вес сырой биомассы и количество белка по методу Лоури.

Готовили стандартные водные растворы лантана, из которых путем разведения приготовили растворы следующих концентраций: 2-7 г/л. pH растворов поддерживали на уровне 2,5-4,5 добавлением HCl, для поддержания РЗМ в виде свободных катионов. В растворы добавляли NaCl до конечных концентраций 1% для поддержания ионной силы. Эксперименты проводили при 30°C. В растворы

вводили накопительную культуру СВБ. Содержание лантана в среде измеряли через 1,5 часа, через 1 сутки и через 2 суток. Для этого отбирали 10 мл среды, которые пропускали через бактериальный фильтр (0,45 мкм, Millipore). Содержание лантана в фильтратах измеряли на энергодисперсионном рентгенофлуоресцентном анализаторе БРА-18 (производство НПП «Буревестник»). Параметры измерения: 46 кВ, 116 мкА, время экспозиции 60 секунд. Содержание лантана определяли по интенсивности аналитического пика LaK_α . Калибровочную кривую строили по стандартным растворам лантана. Корректировку дрейфа линии проводили по одному реперному образцу. Кратность измерений проб равнялась трем. Все расчеты проводили с использованием комплексной программы КОРСА-W. Статистическую обработку данных проводили с применением критерия Стьюдента.

Характеристика накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

Для определения приблизительного родового состава СВБ, присутствующих в коррозионных отложениях Приобского нефтяного месторождения, был произведен посев продуктов коррозии на среду Постгейта С с различными органическими субстратами: лактатом натрия (4 г/л), ацетатом натрия (1,5 г/л), бензоатом натрия (1 г/л), этанолом (5 мл/л). Проводили учет численности СВБ и содержание сероводорода в конечных разведениях (табл. 1). Также для более четкого разграничения родов данной накопительной культуры провели окрашивание клеток по Грамму и изучили их внешние морфологические признаки (форму клетки и размеры).

Таблица 1

Численность СВБ в продуктах коррозионных отложений Приобского нефтяного месторождения, определяемая на средах с различными субстратами

Субстрат	Количество СВБ в пробе, кл/мл	Количество сероводорода в конечном разведении, мг/л
Лактат	10^7	$25 \pm 3,9$
Ацетат	10^2	$4 \pm 0,3^*$
Бензоат	0	$0 \pm 0,0^*$
Этанол	10^2	$3 \pm 0,3^*$

Примечание: * - достоверны ($p < 0,05$) по отношению к среде с лактатом.

Анализ роста накопительной культуры на разных субстратах показал, что данная культура включает в себя сульфидогенные бактерии различных метаболических путей. Окраска клеток по Грамму показала преобладание в культуре грам(+) бактерий, хотя небольшое количество грам(-) бактерий присутствовало.

Морфология изученных клеток сильно различалась. В культуре присутствовали в основном прямые палочковидные клетки размером 0,5-1 x 1-4 мкм, реже встречались изогнутые палочки и кокковидные клетки. Также присутствовали в большом количестве спорообразующие клетки. Мы считаем, что преобладают бактерии рода *Desulfotomaculum*, так как этот род является грам(+), клетки могут долго сохраняться в продуктах коррозии, находящихся на воздухе, за счет спорообразования, данный род использует лактат, ацетат и этанол как доноры электронов [9]. Рода *Desulfovibrio* и *Desulfobacter* являются грам(-). *Desulfovibrio* использует лактат и некоторые штаммы этанол, *Desulfobacter* – ацетат. Ни один из этих двух родов не использует бензоат [10]. Бактерии данной культуры являются облигатными анаэробами, мезофилами, рост и образование сероводорода наблюдали в диапазоне температур от 15⁰ до 45⁰ С с оптимумом 30-32⁰ С. Культура растет при концентрации от 1 до 5% NaCl в среде, оптимальной является среда, содержащая 1% NaCl. Штамм хорошо растет на среде без дрожжевого автолизата, но его внесение увеличивает продукцию сероводорода в среднем на 7%.

Исходя из данных результатов, мы сделали заключение, что в накопительной культуре СВБ преобладает род *Desulfotomaculum*, в меньшем количестве присутствуют бактерии родов *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*.

Наибольшее количество сероводорода (до 80 мг/л) и белка (до 140 мг/л) клетки образовывали на среде Постгейта С с лактатом.

В ходе дальнейшего изучения культуры мы провели анализ её спектра поглощения и стадий роста на среде Постгейта С с лактатом. Изучение спектра выделенной культуры СВБ показало, что максимум поглощения данной культуры находится в области 700 нм и практически не изменяется во время роста культуры (рис. 1).

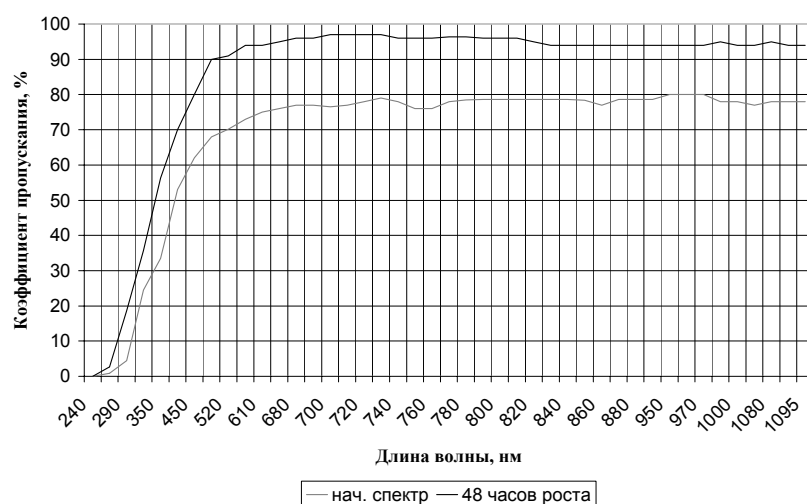


Рис. 1. Изменение спектра СВБ во время роста накопительной культуры, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

Нами были прослежены стадии роста культуры по оптической плотности при 700 нм, прирост бактериального белка, производство культурой сероводорода (рис. 2) и изменение дегидрогеназной активности (рис. 3) в течение 132 часов роста культуры.

Лag-период культуры СВБ длился в течение 12 часов инкубации, затем происходил экспоненциальный рост культуры, и через 108 часов роста культура выходила на стационарную фазу роста. В качестве кинетических параметров роста определяли удельную скорость роста и время удвоения биомассы.

Удельная скорость роста культуры СВБ в течение экспоненциальной фазы роста в среднем составляла $0,026 \text{ час}^{-1}$, время удвоения биомассы 26,65 часов.

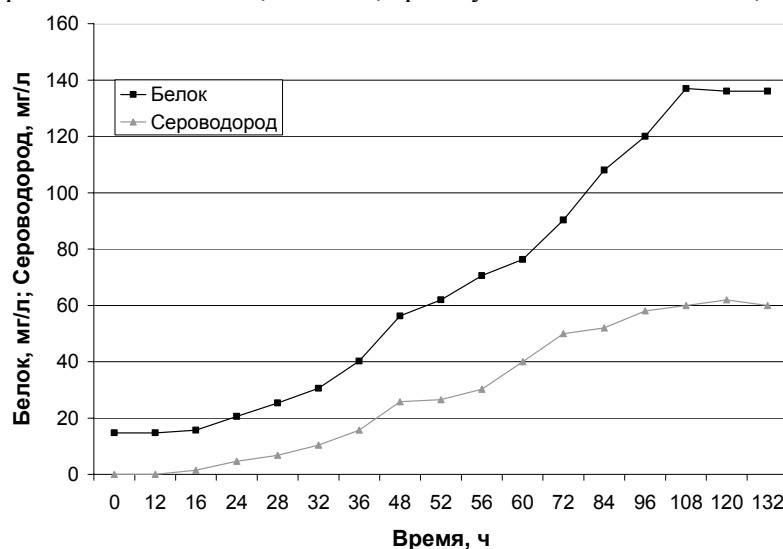


Рис. 2. Изменение концентрации белка и сероводорода в среде во время роста накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

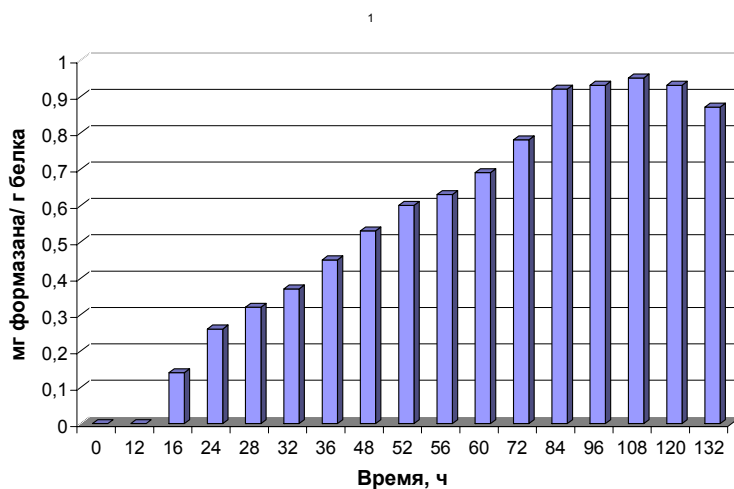


Рис. 3. Изменение дегидрогеназной активности накопительной культуры СВБ, выделенной из Приобского нефтяного месторождения

Результаты и обсуждение

В результате проведенных нами исследований по влиянию церия и лантана на рост СВБ было выявлено, что церий и лантан в концентрациях выше 0,05 % полностью подавляют рост бактерий (рис. 4,5). Однако о прямом токсическом действии РЗМ на бактериальные клетки утверждать не стоит, так как механизм воздействия может быть различным. При введении церия и лантана в среду Постгейта С наблюдается выпадение осадка, состоящего из лактата. Возможно, осаждение лактата делает невозможным его потребление СВБ, а также в литературе есть информация о нейтрализации зарядов на поверхности бактериальных клеток [11], что способствует их гибели.

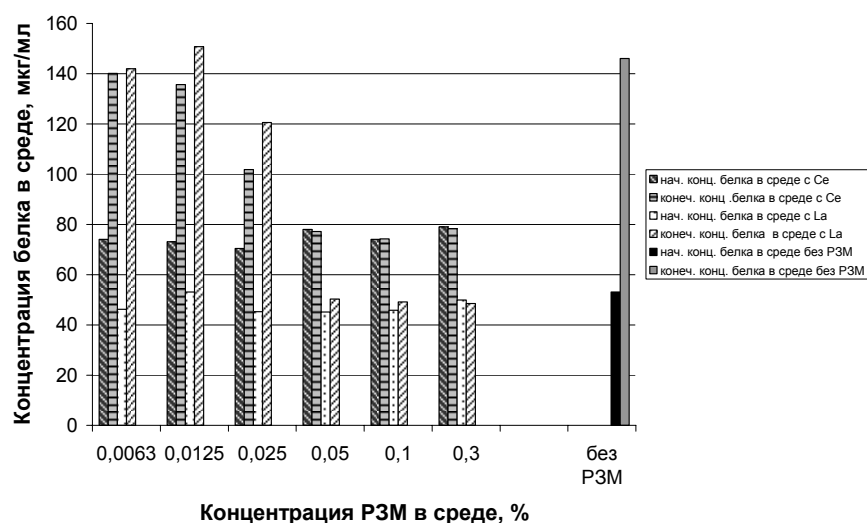


Рис. 4. Изменение концентрации бактериального белка в средах с разными концентрациями церия, лантана и без РЗМ

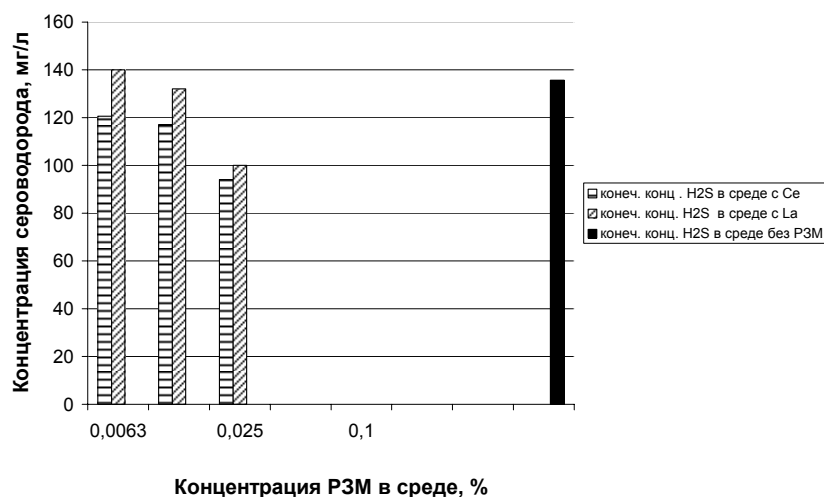


Рис. 5. Изменение концентрации сероводорода, выделяемого СВБ, в средах с разным содержанием церия, лантана и без РЗМ

Однако при концентрациях церия и лантана в среде менее 0,0125% изменений в росте СВБ не наблюдается по сравнению со средой без РЗМ – содержание белка и сероводорода не отличаются от показателей контрольного варианта без РЗМ.

Таким образом, лишь довольно высокие концентрации исследуемых РЗМ (0,05% и выше) могут ингибировать рост СВБ и предотвращать вызываемую ими коррозию стали.

Из литературных данных [12] известно, что микробные илы СВБ Накафузского горячего источника в Префектуре Нагано (Япония) могут накапливать до 19,5 мг/кг Се и 8,58 мг/кг La. Содержание Се в водах данного источника составляет 18,4 нг/кг, а La 6,08 нг/кг. В своих экспериментах мы взяли растворы с высокими концентрациями лантана с целью определения максимальной концентрации La, которая может адсорбироваться на клеточных стенках бактерий. Через 1,5 часа инкубации бактерий с растворами лантана было выявлено снижение концентрации лантана во всех растворах (табл. 2).

Таблица 2

Адсорбция лантана на клеточных стенках сульфатовосстанавливающих бактерий за разные промежутки времени

Начальная концентрация La в среде, г/л	Концентрация La в среде через 1,5 часа, г/л	Концентрация La в среде через сутки, г/л	Концентрация La в среде через 2 суток, г/л
2,001 ± 0,001	1,981 ± 0,003 *	1,992 ± 0,005 *	2,000 ± 0,004
3,002 ± 0,001	2,973 ± 0,004*	2,974 ± 0,003 *	3,001 ± 0,003
4,001 ± 0,001	3,980 ± 0,005 *	3,982 ± 0,004 *	4,000 ± 0,006
5,002 ± 0,001	4,982 ± 0,005*	4,983 ± 0,005 *	5,002 ± 0,004
6,001 ± 0,001	5,972 ± 0,005*	5,970 ± 0,004 *	5,990 ± 0,003
7,003 ± 0,001	6,986 ± 0,004*	6,986 ± 0,004 *	7,002 ± 0,005

Примечание: * различия достоверны ($P < 0,05$) по отношению к начальной концентрации

По данным японских исследователей [12], в течение 1,5 часов инкубации *E. coli* и *Bacillus subtilis* с растворами РЗМ (при начальной концентрации каждого 100 мкг/л) достигалось равновесие между концентрацией РЗМ в растворе и на поверхности бактериальных клеток. Данные исследователи установили, что РЗМ связываются с карбоксильными и фосфатными группировками биополимеров, вырабатываемых бактериями.

По данным иностранной литературы [2], основную роль в адгезии СВБ на поверхности металла играют экстрацеллюлярные полимеры (экзополимеры), которые обволакивают клетки бактерий. Экстрацеллюлярные полимеры состоят из

липидов, полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот. Состав полимеров зависит от вида бактерий и условий выращивания. Полианионным характером гетерополисахаридов можно объяснить одно из важнейших свойств экзополимеров - способность к образованию комплексов с ионами металлов [2].

В ходе наших исследований мы выявили, что через сутки инкубации изменений в количестве поглощенного бактериями лантана не наблюдалось, а через двое суток весь адсорбированный бактериями лантан был отдан ими назад в раствор. Полученные данные можно объяснить связыванием лантана фосфатными и карбоксильными группами бактериальных экзополимеров в первые часы инкубации и удерживанием лантана в течение первых суток. Через двое суток происходит отдача катионов лантана в раствор, возможно, в связи с ослаблением электростатических взаимодействий катионов с группами биополимеров. Также этот факт можно объяснить денатурацией бактериальных белков, так как в данных растворах отсутствуют питательные элементы для бактерий, и происходит гибель СВБ.

Максимум адсорбции лантана на поверхности бактериальных клеток составил от 0,11 до 0,16 г La на 1 г сырой биомассы. Содержание бактериального белка в растворах составило 40-70 мкг/мл.

Таким образом, максимум адсорбции La бактериальными клетками СВБ достигается уже в первые часы и удерживается в первые сутки, а затем происходит десорбция, так как клетки изменяют свои свойства.

Выводы

1. Накопительная культура СВБ, выделенная из Приобского нефтяного месторождения, представлена преимущественно грам(+) бактериями рода *Desulfotomaculum*. Также в культуре присутствуют грам(-) бактерии родов *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*.

2. Лантан и церий лишь в концентрациях 0,05% и выше могут полностью подавлять рост накопительных культур сульфатвосстанавливающих бактерий, выделенных из Приобского нефтяного месторождения, что подтверждается данными по белку и сероводороду.

3. В течение 1,5 часов инкубации СВБ с лантаном, был достигнут максимум адсорбции лантана на поверхности бактериальных клеток, который составил 0,11-0,16 г La на 1 г сырой биомассы, при содержании белка в растворах 40-70 мкг/мл.

Литература

- [1] Химико-микробиологические аспекты стресс-коррозионных разрушений магистральных трубопроводов и способы их профилактики / В.А. Чугунов [и др.] // Обз. информ. Сер. Транспорт и подземное хранение газа. – М.: ООО «ИРЦ Газпром», 2002. – 32 с.
- [2] Beech, I.B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms - current understanding and state-of-art methods of study / I.B. Beech // International Bio-deterioration & Biodegradation. – 2004. – Vol. 53. – P. 177-183.
- [3] Емец, Г.П. "Влияние поляризации на адсорбции пресноводных гетеротрофных бактерий / Г.П. Емец, В.И. Лубянова, С.А. Баздеркина // Гидробиологический журнал. – 1992. – Т. 28. – № 2. – С. 52-56.
- [4] Электрокинетические свойства сульфатовосстанавливающих бактерий / И.Б. Улановский [и др.] // Микробиологическая коррозия металлов в морской воде; некоторые методы защиты. – М.: Наука, 1983. – С. 94 - 99.
- [5] Повышение экологической безопасности при использовании биоцидов для борьбы с коррозией, индуцируемой микроорганизмами / С.К. Жиглецова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 6. – С. 694-700.
- [6] Разработка комплексной методики исследования биопленки, включающей биохимические и микробиологические методы исследования и высокоразрешающую растровую электронную микроскопию / О.В. Зайцева [и др.] // Вестник Самарского государственного университета. Естественнонаучная серия. – 2006. – №7(47). –С. 60-65.
- [7] Blin, F. The nature of the surface film on steel treated with cerium and lanthanum cinnamate based corrosion inhibitors / F. Blin, S.G. Leary, G.B. Deason // Corrosion Sciences. – 2006. – 48. – P. 404-419.
- [8] Гольдштейн, Я.Е. Микролегирование стали и чугуна / Я.Е. Гольдштейн. – М.: Наука, 1959. – С. 152-171.
- [9] Widdel, F. The Genus Desulfotomaculum / F. Widdel // The Prokaryotes. – New York: Springer-Verlag Inc., 1992. – V. 2. – P. 1792-1799.
- [10] Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Университет. Книжный дом, 2001. – 257 с.
- [11] Звягинцев, Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями / Д.Г. Звягинцев. – М: МГУ, 1973. – 175 с.
- [12] Takahashi, Y. Adsorption of rare earth elements onto bacterial cell walls and its implication for REE sorption onto natural microbial mats / Y. Takahashi, X. Chatellier // Chemical Geology. – 2005. – 219. – P. 53-67.

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

**ADSORPTION OF RARE EARTH ELEMENTS ONTO
CELL WALLS OF ENRICHMENT CULTURE OF SULFATE
REDUCING BACTERIA ISOLATED FROM
PRIOBSKOE OILFIELD³**

© 2007 O.V. Zaitseva⁴

The information dealing with antibacterial properties of cerium and lanthanum and adsorption of lanthanum onto cell walls of enrichment culture of sulfate reducing bacteria are presented.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Macurina.

⁴ Zaitseva Olga Vladimirovna, (biomig@rambler.ru), Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.