

УДК 547.415.1:579.66

## ОЦЕНКА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ МЕТОДОМ БИОЦИДНЫХ СВОЙСТВ ИНГИБИТОРОВ КОРРОЗИИ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

И.Т. Исмаилов, Н.А. Степанов, Е.Н. Ефременко, В.М. Аббасов

(кафедра химической энзимологии; e-mail: elena\_efremenko@list.ru)

С помощью биолюминесцентного метода определения концентрации внутриклеточного АТФ исследована биоцидная активность ингибиторов углекислотной коррозии (ИК), синтезированных на основе жирных кислот разных растительных масел, по отношению к клеткам бактерий, катализирующих развитие биокоррозионных процессов. Показано, что все полученные ИК обладают биоцидной активностью, однако наиболее эффективны амидные комплексы жирных кислот. Их активность в 4,6 раза превышает активность неамидных комплексов. Минимальная ингибирующая концентрация, приводящая к полной гибели всех групп бактерий, была установлена для большинства ИК в диапазоне 100–170 мг/л, при этом наилучшие биоцидные свойства по отношению к нефтеокисляющим бактериям рода *Pseudomonas* были отмечены у ИК, полученных на основе кукурузного масла (27 мг/л).

**Ключевые слова:** ингибиторы коррозии, биоцидная активность, минимальная ингибирующая концентрация (МИК), биолюминесцентный метод, АТФ

В промышленности, в первую очередь нефтяной, важной проблемой является процесс коррозии, который постепенно разрушает все коммуникационные системы, что приводит ежегодно к миллиардным убыткам [1]. Поскольку современные магистральные трубопроводы эксплуатируются в условиях повышенных требований к обеспечению экологической безопасности, выраженной в отсутствии протечек из-за коррозии, уделяется повышенное внимание проблемам их противокоррозионной защиты.

Половина всех коррозионных разрушений связана с деятельностью микроорганизмов, которые ускоряют деструкцию металла в 2-3 раза по сравнению с обычной электрохимической коррозией в тех же средах [2]. В качестве антикоррозионной защиты наибольший интерес вызывают вещества, которые одновременно можно использовать и как ингибиторы коррозии (ИК), и как биоциды [3].

Ингибиторы коррозии представлены различными классами органических соединений, большинство из которых синтезируются специально для этих целей [4–5]. Негативное влияние на окружающую среду высокотоксичных и трудноразлагаемых соединений хорошо известно [6], поэтому ведутся разработки новых ИК, которые должны

выгодно отличаться от имеющихся не только эффективностью действия, но и экологической безопасностью [7]. Защита конструкционных материалов от химической коррозии, наличие биоцидной активности наряду с низкой экотоксичностью – вот основные требования, предъявляемые сегодня к ИК [8].

Известен целый ряд коммерческих препаратов ИК на основе амидных соединений, имеющих высокую биоцидную активность: Каспий-1, Каспий-2, Каспий-4 и Азери [9]. Однако эти соединения характеризуются высокой экотоксичностью, и их применение ограничено.

В связи с этим поиск новых веществ, обеспечивающих защиту одновременно от химической и биологической коррозии, является важной задачей современной химии. Для экологической безопасности окружающей среды и снижения расхода ИК необходимо определить его минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) для всех основных типов клеток, участвующих в развитии биокоррозионных процессов, при которой за определенный промежуток времени происходит их полная гибель<sup>1</sup>.

Многие жирные кислоты (ЖК), как известно, обладают антибактериальными и противогриб-

<sup>1</sup> Исходная концентрация клеток  $10^6$ – $10^8$  кл/мл.

ковыми свойствами [10]. Различные длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты проявляют высокую биоцидную активность против грамположительных бактерий [11], поэтому они привлекают внимание в качестве основы для синтеза ИК [12]. В качестве ИК применяются также сложные по составу композиции, содержащие преимущественно азотсодержащие соединения с длинными углеводородными цепями в виде производных алифатических ЖК. Так, известна композиция, синтезированная на основе отходов производства растительного масла, не содержащая токсичных соединений. При этом она отличается низкой стоимостью при 78–95%-й степени защиты металла от коррозии [13].

Цель данной работы – оценка биоцидной активности ИК, синтезированных на основе солей и эфиров жирных кислот, выделенных из растительных масел (подсолнечного, кукурузного, пальмового и хлопкового), по отношению к гетеротрофным бактериям родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и сульфатовосстанавливающим бактериям *Desulfovibrio*, провоцирующим развитие биокоррозии.

Для решения поставленной задачи необходимо было определить МИК для каждого ИК. Определение микробиологическим методом числа выживших клеток является довольно длительным и трудоемким процессом [14], не всегда позволяющим выявить выжившие клетки, находящиеся в некультивируемом состоянии, вызванном бактериостатическим воздействием ИК. В связи с этим для оценки биоцидного действия ИК по отношению к разным бактериальным клеткам мы применяли биолюминесцентный метод определения концентрации внутриклеточного АТФ с использованием рекомбинантного фермента люциферазы светлячков, который, согласно ранее полученным данным, позволяет выявить и оценить биоцидные свойства ИК экспрессно, достоверно и с высокой чувствительностью [15–16].

### Методика эксперимента

В работе использовали клетки бактерий<sup>2</sup> *Rhodococcus ruber* В-1513, *Pseudomonas putida* В-1091 и *Desulfovibrio vulgaris* В-1388.

Для выращивания клеток *R. ruber* использовали питательную среду (рН 7,0) следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  (1,0);  $KH_2PO_4$  (0,5);  $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$  (0,5);  $(NH_4)_2SO_4$  (1,0);  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (0,1);  $CaCl_2 \times 3H_2O$  (0,05);  $FeCl_3 \times 6H_2O$  (0,02); дрож-

жевой экстракт (1,0); глюкоза (10,0); цитрат натрия (5,0).

Для выращивания бактерий *P. putida* использовали питательную среду (рН 7,0) следующего состава, (г/л): триптон (10,0); дрожжевой экстракт (5,0); NaCl (5,0). Культивирование обоих видов клеток проводили в колбах Эйрленмейера объемом 750 мл, содержащих 200 мл питательной среды указанного состава, на термостатируемом шейкере (28°C, 180 об/мин).

За ростом биомассы бактериальных клеток следили спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность суспензии клеток при 540 нм (спектрофотометр «Agilent UV-853», Германия), а точную концентрацию клеток определяли по калибровочным графикам, устанавливающим линейную зависимость оптической плотности от точно известной концентрации клеток (мг/мл) в образце.

Для культивирования бактерий *D. vulgaris* использовали среду Постгейта следующего состава (г/л): лактат натрия (6,0); дрожжевой экстракт (0,25); аскорбиновая кислота (0,1);  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (0,06);  $K_2HPO_4$  (0,5);  $NaSO_4$  (4,5);  $NH_4Cl$  (1,0). Культивирование клеток велось анаэробно при 30°C.

ИК синтезированы на основе сульфатированных жирных кислот, выделенных из растительных масел (подсолнечного, кукурузного, хлопкового и пальмового). Сульфатированную жирную кислоту брали в эквимолярном соотношении с растворами NaOH, KOH,  $NH_4OH$ , моно- и диэтаноламином (МЭА, ДЭА) при комнатной температуре с образованием солей натрия, калия, аммония и моно- или диэтаноламинных комплексов [17]. Были синтезированы вещества следующего состава:  $[R-CH-(OSO_3X)-(CH_2)_n-COOX]$  (комплекс I) (где X –  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $-NH_2^+-CH_2-CH_2-OH$  (МЭА),  $-NH^+-CH_2-CH_2-OH)_2$  (ДЭА),  $-NH^+-(CH_3)_2$  (ДМА), а также амидные комплексы:  $[R-CH-(OSO_3M)-(CH_2)_n-CONH-CH_2-CH_2-OH]$  (комплекс II) и  $[R-CH-(OSO_3M)-(CH_2)_n-CON-(CH_2-CH_2-OH)_2]$  (комплекс III) (где M – МЭА, ДЭА,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ).

При определении МИК концентрацию ИК варьировали от 25 до 400 мг/л, использовали суспензии клеток бактерий родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* ( $10^6$  кл/мл) в физиологическом растворе в течение 7 суток. Температура экспонирования исследуемых проб составляла 28°C.

Для оценки биоцидных свойств ИК по отношению к клеткам бактерий *Desulfovibrio vulgaris* экс-

<sup>2</sup>Бактерии получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

понирование проводили в среде Постгейта (концентрация клеток  $10^8$  кл/мл), в которую вносили исследуемые ИК (25–400 мг/л) и через 3 сут экспонирования определяли остаточную концентрацию внутриклеточного АТФ.

Концентрацию АТФ определяли люциферин-люциферазным методом, как это описано ранее [18], с использованием стандартного АТФ-реагента на основе рекомбинантной люциферазы светляков (ООО «Люмтек», Россия). Интенсивность биолюминисценции в образцах измеряли с помощью люминометра «MicroLuminometr 3560» («New horizons diagnostics Co», США).

Для определения МИК проводили линеаризацию полученных данных с расчетом достоверности аппроксимации [15]. При обработке всех экспериментальных данных рассчитывали средние значения величин и значения стандартного отклонения. Все эксперименты проводили как минимум в трех повторностях.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Ранее нами было установлено, что ИК, полученные на основе сульфатированных жирных кислот, входящих в состав различных растительных масел (табл. 1), являются эффективными ингибиторами коррозии мягкой стали в  $\text{CO}_2$ -насыщенных солевых растворах при 50°C с 99,9%-й эффективностью ингибирования при 100 мг/л [19]. Установлено, что эффективность действия ИК, полученных на основе кукурузного масла, выше по сравнению с ИК, полученными на основе других растительных масел при тех же условиях.

При исследовании биоцидной активности новых высокоэффективных ИК по отношению к различным бактериальным клеткам, провоцирующим развитие биокоррозии [20], были определены МИК ИК, вызывающие снижение численности бактерий в образцах до недетектируемого уровня (табл. 2). Оказалось, что все полученные ИК обладают биоцидными свойствами по отношению к клеткам бактерий, катализирующим коррозионные процессы. При этом ингибирующее действие ИК возрастает с увеличением концентрации в среде с клетками. Значения МИК для амидных комплексов ЖК были в 1,1–4,6 раза ниже по сравнению с неамидными комплексами, т.е. эффективность их биоцидного действия была выше, что могло быть связано с их способностью накапливаться на поверхности клеточных стенок бактерий [21] и вызывать резкое снижение поверхностного натяжения, приводящего к нарушению нормаль-

Т а б л и ц а 1

#### Жирнокислотный состав растительных масел [17]

Масло	Жирные кислоты	Содержание от общей суммы, %
Подсолнечное	Олеиновая (C18:1)	19
	Линолевая (C18:2)	68
	Линолевая (C18:3)	1
	Пальмитиновая (C16:0)	7
	Стеариновая (C18:0)	5
Кукурузное	Олеиновая (C18:1)	28
	Линолевая (C18:2)	58
	Линолевая (C18:3)	1
	Пальмитиновая (C16:0)	11
	Стеариновая (C18:0)	2
Хлопковое	Олеиновая (C18:1)	19
	Линолевая (C18:2)	54
	Линолевая (C18:3)	1
	Пальмитиновая (C16:0)	22
	Стеариновая (C18:0)	3
	Миристиновая (C14:0)	1
Пальмовое	Олеиновая (C18:1)	40
	Линолевая (C18:2)	10
	Пальмитиновая (C16:0)	45
	Стеариновая (C18:0)	4
	Миристиновая (C14:0)	1

ного функционирования клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

Значения МИК, установленные для большинства ИК, синтезированных на основе ЖК растительных масел, по отношению к исследованным клеткам попали в диапазон 100–170 мг/л. Такие концентрации свидетельствуют о невысокой токсичности данных соединений и их относительной экологической безопасности при применении.

Т а б л и ц а 2

**МИК для ИК, синтезированных на основе растительных масел, в отношении разных видов бактерий, катализирующих процессы коррозии**

ИК	Клетки <i>Desulfovibrio vulgaris</i>					
	М 1	М 2	М 3	М 4	М 5	М 6
А	215±10	232±11	243±10	188±7	174±6	–
А–МЭА	181±7	176±8	160±7	145±5	150±5	178±6
А–ДЭА	129±5	166±8	144±5	114±3	148±5	118±3
Б	209±9	207±10	223±10	181±8	188±	–
Б–МЭА	164±7	164±7	149±4	135±4	139±4	150±5
Б–ДЭА	171±7	155±6	148±4	144±4	160±5	174±6
С	263±12	284±12	270±12	212±10	222±9	228±8
В–МЭА	148±5	155±5	141±5	127±3	128±3	133±4
В–ДЭА	247±10	170±7	154±5	142±4	160±5	173±6
Д	232±10	230±10	222±10	185±8	207±8	334±15
Г–МЭА	155±5	156±5	141±4	134±4	137±3	145±5
Г–ДЭА	188±8	180±5	161±5	155±5	169±6	196±7
Клетки <i>Pseudomonas putida</i>						
А	111±4	125±4	101±4	116±4	118±5	–
А–МЭА	52±2	27±1	75±2	48±2	46±2	55±2
А–ДЭА	92±3	108±4	120±4	115±4	96±3	109±4
Б	101±5	97±3	97±3	136±4	129±5	–
Б–МЭА	178±6	171±6	56±2	81±3	181±6	148±6
Б–ДЭА	100±4	100±4	96±3	118±4	105±4	99±3
В	147±4	122±4	110±4	119±4	103±4	123±5
В–МЭА	141±4	174±6	100±4	103±4	92±3	171±6
В–ДЭА	207±9	215±9	129±4	109±4	122±5	143±5
Г	114±3	86±3	110±4	66±3	56±2	83±3
Г–МЭА	117±3	112±3	76±3	50±2	91±3	70±2
Г–ДЭА	77±3	109±3	112±4	86±2	89±3	79±3
Клетки <i>Rhodococcus ruber</i>						
А	97±3	198±7	159±6	203±7	102±5	–
А–МЭА	81±2	113±5	77±3	99±3	185±6	70±3
А–ДЭА	145±5	148±6	233±8	170±6	112±5	142±6
Б	102±4	117±5	134±5	196±7	110±5	–
Б–МЭА	136±4	120±5	54±2	58±2	182±7	103±5
Б–ДЭА	120±4	137±5	130±5	122±5	151±6	121±5
В	168±6	180±7	113±5	119±4	124±5	107±5
В–МЭА	118±4	123±5	103±4	132±5	117±5	105±5
В–ДЭА	240±8	108±5	108±4	99±3	105±4	105±5
Г	99±3	93±3	163±6	124±	104±4	105±5
Г–МЭА	90±3	112±4	83±3	55±2	186±6	115±5
Г–ДЭА	121±5	112±4	135±5	108±4	143±6	158±6

П р и м е ч а н и е. Сульфатированные жирные кислоты, выделенные из масел: кукурузного (А), хлопкового (Б), пальмового (В), подсолнечного (Г); МЭА-комплекс –  $[R-CH-(OSO_2M)-(CH_2)_n-CONH-CH_2-CH_2-OH]$ , ДЭА-комплекс –  $[R-CH-(OSO_2M)-(CH_2)_n-CON-(CH_2-CH_2-OH)_2]$ ; М1 –  $NH_2^+-CH_2-CH_2-OH$ , М2 –  $NH_3^+-(CH_2-CH_2-OH)_2$ , М3 –  $Na^+$ , М4 –  $K^+$ , М5 –  $NH_4^+$ , М6 –  $NH_3^+-(CH_3)_2$

Следует отметить, что многие допустимые к применению ИК на практике используются в концентрации 100–200 мг/л [22].

Наилучшими биоцидными свойствами по отношению к бактериям *P. putida* и *R. ruber* обладали ИК, полученные на основе ЖК кукурузного и подсолнечного масел. Это может быть связано с тем, что ЖК с большим числом двойных связей (в данном случае линолевая), как правило, имеют хорошо известную ярко выраженную антибактериальную активность [23]. По отношению к клеткам *P. putida* максимальным биоцидным свойством обладает  $\text{NH}^+(\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH})_2\text{—МЭА}$ -комплекс ЖК кукурузного масла (27 мг/л). В отношении клеток *R. ruber* лучшие биоцидные свойства проявлял  $\text{K}^+\text{—МЭА}$ -комплекс подсолнечного масла (55 мг/л). При этом клетки грамотрицательных бактерий *P. putida* более чувствительны ко всем исследованным в работе ИК, что может быть связано со строением клеточных стенок данных бактерий. Известно, что в клеточной стенке грамположительных бактерий основным компонентом является многослойный пептидогликан, составляющий до 90% массы клеточной стенки, с которым ковалентно связан слой полисахарида арабиногалактана. Эта структура отличается повышенной стабильностью и крайне низкой проницаемостью для всех высокомолекулярных и подавляющего большинства низкомолекулярных соединений, включая спирты, кислоты и щелочи. Грамотрицательные бактерии имеют тонкий пептидогликановый слой, который составляет 5–10% от веса клеточной стенки бактерий, и большой липопротеиновый слой [24].

Наименьшую биоцидную эффективность проявляют ИК, полученные на основе ЖК из пальмового масла. Вероятно, это связано с тем, что пальмовое масло содержит одинаковое количество насыщенных и ненасыщенных кислот (по 50%), а известно, что ненасыщенные ЖК больше проявляют биоцидную активность, чем насыщенные [25].

По отношению к клеткам *D. vulgaris* самым эффективным биоцидом оказался  $\text{K}^+\text{—ДЭА}$ -комплекс кукурузного масла (114 мг/л). При этом сульфат-восстанавливающие клетки бактерий *D. vulgaris* были наименее чувствительны ко всем исследованным ИК. Это может быть обусловлено тем, что данные клетки образуют биопленки за счет синтезируемых ими экзополисахаридов, защищающие клетки от негативного воздействия ИК.

Таким образом, с помощью биолюминесцентного люциферин-люциферазного метода была исследована биоцидная активность ИК, синтезированных на основе ЖК из разных растительных масел, по отношению к разным бактериальным клеткам в концентрациях, допускающих их применение на практике.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Popoola L.T., Grema A.S., Latinwo G.K., et al. // Int. J. Ind. Chem. 2013. Vol. 35. N 4. P. 2.
2. Gu T. // J. Microbial. Biochem. Technol. 2012. 4. N 4. P. 3.
3. Hussein M.H.M., El-Hady M.F., Shehata H.A.H., et al. // J. Surfact. Deterg. 2013. Vol. 16. N. P. 233.
4. Negm N.A., Zaki M.F., Salem M.A.I. // J. Surfact. Deterg. 2009. Vol. 12. P. 321.
5. Negm N.A., El Faragy A.F., Al Sabagh A.M., Abdelrahman N.R. // J. Surfact. Deterg. 2011. Vol. 14. P. 505.
6. Obot I.B., Ebenso E.E., Gasem Z.M. // Int. J. Electrochem. Sci. 2012. Vol. 7. P. 1997.
7. Patni N., Agarwal S., Shah P. // Chin. J. Eng. 2013. 2013. P 1.
8. Rajeev P., Surendranathan A.O., Murthy Ch.S.N. // J. Mater. Environ. Sci. 2012. Vol. 3. N 5. P. 856.
9. Efremenko E.N., Azizov R.E., Makhlis T.A., et al. // Processes Petrochem Oil Refining. 2003. Vol. 4. N 15. P. 70.
10. Agoramoorthy G.; Chandrasekaran M.; Venkatesalu V.; Hsu M.J. // Braz. J. Microbiol. 2007. Vol. 38. N 4. P. 739.
11. Sugawara Y., Takeuchi M.A. // Plant science. 1997. Vol. 130. P. 107.
12. Abbasov V.M., Abd El-Lateef H.M., Aliyeva L.I., et al. // J. Kor. Chem. Soc. 2013. Vol. 57. N P. 25.
13. Жуков А.Ю., Мухамадиев А.А. // Нефтяное хозяйство. 2010. № 8. С. 138.
14. Desbois, A.P. // Recent Pat. Antiinfect. Drug. Discov. 2012. Vol. 7. P. 111.
15. Efremenko E.N., Azizov R.E., Makhlis T.A., et al. // Appl. Microbiol. 2005. Vol. 41. P. 377.
16. Aragonés L., Escude C., Visa P., et al. // J. App. Microbiol. 2012. Vol. 113. P. 114.
17. Abbasov V. M., Ismayilov I.T., Abd El-Lateef H. M., Akhmadbeyova S.F. // Eur. Chem. Bull. 2014. Vol. 3. N 5. P. 437.
18. Ефременко Е.Н. // Микробиология. 2007. № 76. С. 383.
19. Abd El-Lateef H. M., Ismayilov I.T., Abbasov V.M., et al. // Am. J. Phys. Chem. 2013. Vol. 2. N 1. P. 16.
20. Beech I.B., Sunne J. // Curr. Opin. Biotechnol. 2004. Vol. 15. P. 181.
21. Feng W., Swift S., Singh N. // Colloid Surf. B-Biointerfaces. 2013. Vol. 105. P. 43.
22. Sastri V.S. Green corrosion inhibitors: theory and practice. Hoboken, 2011. 328 p.
23. McGaw L.J.; Jäger A.K.; Van Staden J. // Fitoter. 2002. Vol. 73. P. 431.
24. Beveridge T. J. J. // Bacteriol. 1999. Vol. 181. P.4725.
25. Desbois A. P. Smith V.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 85. P. 1629.

## ESTIMATION OF BIOCIDAL PROPERTIES OF CORROSION INHIBITORS BASED ON VEGETABLE OILS BY BIOLUMINESCENT ENZYMATIC METHOD

I.T. Ismayilov, N.A. Stepanov, E.N. Efremenko, V.M. Abbasov

*(Chemical Enzymology Department)*

Using bioluminescent method for determination of intracellular ATP concentration the biocidal activity of new corrosion inhibitors (CI), synthesized on the basis of fatty acids of different vegetable oils, in relation to bacterial cells, provoking development of biocorrosion processes was investigated. All obtained CI possessed biocidal activity, but amide complexes of fatty acids demonstrated the highest effectiveness of action (up to 4.6 times higher) as compared to non-amide complexes. The value of minimal inhibitory concentration resulting in a total cell death of all bacterial groups, have been established to be in the range 100–170 mg/l for most of the CI and a maximum bactericidal activity have been observed for CI obtained on base of fatty acids from corn oil (27 mg/l) in relation to oil-oxidizing bacteria of the genus *Pseudomonas*.

**Key words:** corrosion inhibitors, biocidal activity, minimal inhibitory concentration (MIC), bioluminescent method, ATP

**Сведения об авторах:** *Исмаилов Исмаил Тейюб оглы* – докторант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (ismayil999@gmail.com); *Степанов Николай Алексеевич* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. техн. наук (na.stepanov@gmail.com); *Ефременко Елена Николаевна* – зав. лаб. экобиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук (elena\_efremenko@list.ru); *Аббасов Вагиф Магеррам оглы* – директор ИНХП НАНА, чл.-корр. НАНА профессор, докт. хим. наук (vagif\_abbasov@hotmail.com).