

土壤腐蚀网站硫酸盐还原菌的研究*

吕人豪 李栋 刘琦

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

从我国东北、西北、西南和华北的 10 多种土壤的腐蚀试验站的钢件周围及腐蚀产物中, 分离、纯化了 13 株硫酸盐还原菌 (SRB), 测定了它们的形态、生理生化特性及氢化酶活性, 据以确定我国广大地区土壤中分布的钢铁腐蚀厌氧腐蚀菌主要为普通脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) 和脱硫脱硫弧菌 (*D. desulfuricans*)。它们对钢的腐蚀速率和其氢化酶活性存在着很好的相关性。

关键词 硫酸盐还原菌; 氢化酶; 微生物腐蚀

SRB 是主要的金属腐蚀微生物。与土壤接触的地下构筑物, 尤其是管线的腐蚀半数以上是由该菌引起或参与的^[1,2]。因此, 在一些野外调查和室内研究中对这类菌的分类、代谢、腐蚀机制及其控制已进行了不少工作^[3-7]。但对一个国家广阔地区代表不同土壤类型的腐蚀网站系统的金属厌氧腐蚀菌进行较系统的研究还未见报道。本工作对分布在我国东北、西北、华北及西南代表 10 多种土壤的腐蚀网站钢件周围及腐蚀产物中的 SRB 进行了计量、分离、纯化和鉴定, 并对其氢化酶活性及其对钢铁腐蚀活性作了研究。为今后开展土壤中该类菌的代谢、腐蚀行为及控制研究提供了依据。

材料与方 法

(一) 样品来源

土样采自我国东北、华北、西北及西南 10 多种土壤的 13 个土壤腐蚀试验站 (表 1)。采集的样品均为各站埋设 20 多年的钢件周围土和腐蚀产物, 低温保存 (4℃) 并及时进行分析。

(二) SRB 的分离、纯化和计量

用无菌生理盐水将土样制成悬液, 接种于除氧的 Postgate^[7] 培养基中, 30℃ 恒温培养。待生长后重复富集培养, 直至出现明显的硫化铁沉淀时即可进行固体滚管单菌落分离, 反复多次。同时进行厌氧、好氧伴生菌检测直至镜检一致。SRB 定量采用最大可能菌量 (MPN) 计数。

(三) SRB 的有关生理生化特性测定

1. 绿色蛋白 (Desulfovibridin): 液体培养 2 天, 取 15ml 离心 (1000r/min, 5 分钟), 收集菌体, 悬浮于蒸馏水中, 加 1 滴 NaOH (20% W/V), 在紫外光 (365nm) 下观察红荧光出现。

2. 细胞色素 C 测定: 收集 1g 湿菌体, 磷酸缓冲液洗涤三次, 用超声波破碎或 200 目石英砂冰浴研磨, pH7.2 磷酸缓冲液洗涤, 在冰浴中继续浸出 15 分钟。离心 (13,000r/min, 5 分钟), 取上清液在紫外分光光度计 (Beckman DU-7HS) 上测定

本文于 1991 年 2 月 13 日收到。

* 本课题为国家自然科学基金资助的重大项目。

表 1 试验网站土壤主要理化性质及 SRB 数量
Table 1 The main physical and chemical properties of soil and the bact. counts of SRB

站名 Site	土壤名称 Soil name	采样深度 Sample depth (cm)	土壤主要理化性质 The main physical and chemical properties of soil							SRB菌量 Bact. counts of SRB ($\times g^{-1}$)
			pH	含水量(%) Water con- tent	含氧量(%) Oxygen con- tent	有机质(%) Organic content	含N量(%) Nitrogen content	SO ₄ ²⁻ (%)	Total salts 总盐量(%)	
大庆 DQ	苏打盐土 Soda saline	100	9.9	饱和 saturated	饱和 satur.	0.28	0.015	0.003	1.967	1.4×10^6
张掖 ZY	内陆盐土 Inland saline	140	8.8	39.9	饱和 satur.	0.52	0.026	0.021	0.085	2.5×10^4
玉门 YZ	灰钙土 Sierozem	140	8.6	21.9	3.9	0.41	0.026	0.005	0.041	9.5×10^3
长辛店 CX	草甸褐土 Meadow soil	50—140	8.0	21.1	1.5	0.44	0.028	0.029	0.085	1.1×10^6
兰州(2) LY	紫色土 Purple soil	85—90	8.3	18.7	9.2	0.32	0.030	0.006	0.037	7.5×10^3
冷湖 LH	灰棕荒漠土 Gray desert	170—200	8.7	4.6	38.68	0.13	0.006	0.696	2.699	4.5×10^3
南充 NC	紫色土 Purple soil	90—150	8.2	24.1	7.7	0.47	0.065	0.001	0.039	9.5×10^3
西安 XA	黑钙土 Argiustoll	100—150	8.3	14.5	30.8	0.55	0.031	0.038	0.128	4.0×10^4
泸州(1) LF	冲积土 Fluvisols	80	8.3	16.9	17.1	0.70	0.037	0.001	0.014	1.5×10^4
成都(2) CD	草甸土 Meadow soil	80	7.4	25.3	14.7	0.59	0.040	0.078	0.025	4.5×10^4
成都(1) CD	草甸土 Meadow soil	110	9.0	22.9	11.8	0.88	0.058	0.007	0.030	4.5×10^4
济南 JN	冲积土 Fluvisols	80—90	8.2	20.7	13.4	0.60	0.038	0.020	0.081	2.0×10^4
玉门(2) YD	灰棕荒漠土 Gray desert	150	8.4	6.4	38.4	0.90	0.009	1.449	2.020	2.0×10^3
敦煌 DH	灰棕荒漠土 Gray desert	150	8.8	16.1	19.8	0.043	0.012	1.452	3.053	3.0×10^3

其氧化型及还原型(测定前加少量 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 吸收光谱。

3. 氢化酶测定: 用氢饱和美蓝溶液的脱色来快速定性测定菌体氢化酶的存在。其酶活测定参照前文报道^[17]。

4. SRB 的 DNA 中 G + Cmol% 含量测定: 参照 Marmur^[8] 方法, 用热裂法测定 Tm 值。对照菌株为大肠杆菌 (*E. coli* AS 1.365), 每株测三次, 取其平均值。

(四) 菌体对钢铁腐蚀试验

在 20% 的柠檬酸铵溶液中, 将低碳钢片 ($0.15 \times 2.0 \times 5.0\text{cm}$) 煮沸除锈, 乙醇去油, 干燥称重。酒精灯火焰灭菌, 浸入装满 SRB 纯菌种的去氧液体培养基广口瓶中, 厌氧密封, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 30 天, 测定钢片失重来确定其腐蚀速率。

结 果

(一) 网站各类土壤主要物化性质及 SRB 菌量分布

表 1 结果表明, 不同土壤 pH 对 SRB 的生长影响不明显。Eh 值除大庆站完全处于水位线以下较低外, 其它站均在 348—576mV, 相对好氧。最低含水量为 4.6%, 最高达水饱和, 均非 SRB 菌量决定性限制因子。如含水量最低的冷湖站仍有 10^4 个/g·土的菌量。从土壤化学组成看, 不同土壤相差悬殊。如可作为给氢体的有机物含量在 0.043—0.88%, 相差 20 倍; 作为 N 源的土壤含 N 量在 0.006—0.066%, 相差 11 倍; SRB 的受氢体 SO_4^{2-} 在 0.001—1.452%, 相差 1450 倍。对照各站钢件周围的菌量, 大多数站在 10^3 — 10^4 个/g·土, 只有大庆和长辛店站高达 10^6 个/g·土。看来单一土壤物化因子与 SRB 菌量间缺乏相关性, 土壤中 SRB 的存在和增殖是受综合因子所制约。

(二) 土壤中 SRB 的纯化及其形态

特征

所试土壤中, 除成都(1)站因土壤严重污染未分离其中 SRB 外, 其它站均获得了纯菌株。编号依次为 DQ-2、ZY-5、YZ-1、CX-7、LY-7、LH-4、NC-12、XA-15、LF-9、CD-5、JN-4、YD-3、DH-2 等 13 株菌。其中除 YZ-1、YD-3 和 DH-2 呈较短粗弧形外, 其它均为端圆弧状。细胞大小多数为 $1 \times 2.5 \mu\text{m}$, 极生单鞭毛, 无孢子(图 1、图 2)。

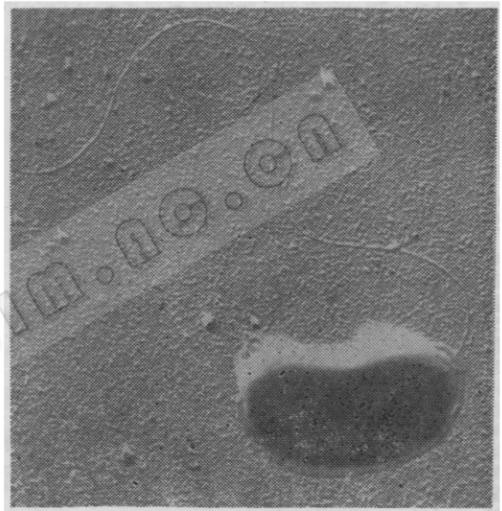


图 1 CX-7 菌株的形态(15,000×)

Fig.1 The microscopic morphology of CX-7 strain



图 2 LF-9 菌株的形态(10,000×)

Fig.2 The microscopic morphology of LF-9 strain

(三) SRB 菌株的生理生化特性

1. 有机供氢体的利用：对有机供氢体的利用是鉴别 SRB 的重要分类特征。实验结果表明,除泸州(1)分离的 LF-9 菌株能利用乳酸盐、丙酮酸、苹果酸、胆碱 ($\pm \text{SO}_4^{2-}$) 为供氢体外,其它站分离的菌株在以 SO_4^{2-} 为最终电子受体下,均只能利用乳酸盐和丙酮酸为供氢体。

2. 细胞色素 C 测定：细胞色素 C 在 SRB 的代谢过程中起电子传递作用,也是该菌氢化酶的重要辅基。测定结果表明,所纯化的菌株均含该色素。图 3 所示还原型光谱中 420、525 及 552nm 处均有吸收峰,这是 SRB 典型的色素系统。

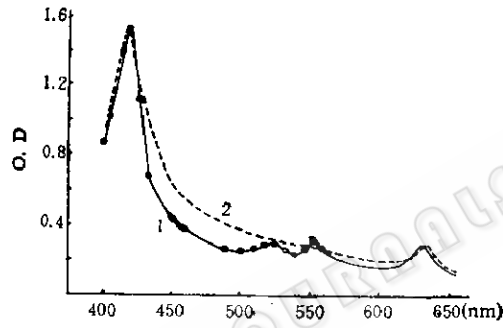


图 3 DH-2 菌株细胞粗提液吸收光谱
Fig.3 The absorption spectrum of crude extract of DH-2 strain.

1.还原型 Reduced form
2.氧化型 Oxidized form

3. 绿色蛋白 (Desulfoviridin):绿色蛋白是 SRB 硫酸盐还原中起重要作用的亚硫酸还原酶,也是脱硫弧菌属菌株所特有的。它不受氧化还原剂的影响。经测定所分离的菌株均有该酶存在。图 4 可见,在 630nm 处为绿色蛋白的特征吸收峰。

4. DNA 的 G + C 含量:DNA 的 G + C% 克分子含量已广泛地应用于 SRB 的分类中。根据所分离 SRB 菌株的形态、生理生化特征,我们挑选了 2 株代表性菌株 CX-7 和 LF-9 作了碱基分析。经计算其

G + C% 克分子含量分别为 $63.9 \pm 0.15 \text{ mol\%}$ 和 $58.2 \pm 0.12 \text{ mol\%}$, 对照菌株为 $50.5 \pm 0.15 \text{ mol\%}$ 。

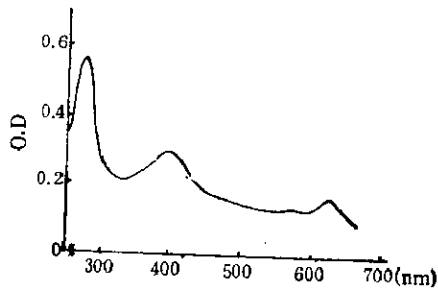


图 4 CX-7 菌株的绿色蛋白吸收光谱
Fig.4 The absorption spectrum of desulfoviridin of CX-7 strain

氢化酶是 SRB 厌氧下导致阴极氢去极化,进而导致金属腐蚀的重要酶。其存在与否直接关系菌的腐蚀性。定性测定表明,所分离的 13 株菌均有不同的氢化酶活力,其中以 LF-9、YD-3 及 DH-2 菌株酶活性最高。表 2 综合了供试菌株的部分生理生化特性。

根据以上分析结果,参照 Postgate^[7]及 Widdel^[9] 等有关文献,确定除 LF-9 菌株属脱硫脱硫弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) 外,其它菌株均属普通脱硫弧菌 (*D. vulgaris*)。

(四) 菌对钢铁的腐蚀作用

按金属腐蚀电化学理论,在厌氧、中性环境中,由于缺氧限制了腐蚀电池阴极氢去极化作用,钢铁腐蚀倾向于停止下来。当有 SRB 存在时,由于它能利用阴极区积累的氢原子层,使腐蚀过程得以继续。这种氢去极化作用决定于 SRB 氢化酶活性强弱。为了解供试菌株的这种腐蚀作用,我们测定了其氢化酶活力,并进行了单一菌株对钢的腐蚀强度试验。

图 5 结果表明,DH-2、YD-3 和 LF-9 菌株的氢化酶活力最高,达 30—35.5u/g 湿

表 2 13 株硫酸还原菌某些生理生化特性
Table 2 Some physiological and biochemical characteristics of SRB

菌株 Strain	菌株 Strain											
	DQ-2	ZY-5	YZ-1	CX-7	LY-7	LH-4	NC-12	XA-15	LF-9	CD-5	JN-4	YD-3 DH-2
性状 Characters												
最适生长温度(℃) Optimal growth temp.	33—35	33—35	33—35	33—36	33—35	33—35	33—35	33—35	32—34	33—36	33—36	31—33 30—33
洗必泰抗性 Hibitane resistance	2mg/L						20mg/L					
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氢化酶活性 Hydrogenase activity	2mg/L						20mg/L					
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
绿色蛋白 Desulfoviridin	2mg/L						20mg/L					
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
细胞色素 C Cytochrome C	2mg/L						20mg/L					
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
过氧化氢需求 Extra NaCl require	2mg/L						20mg/L					
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G + C mol% in DNA	63.9±0.15						58.2±0.12					

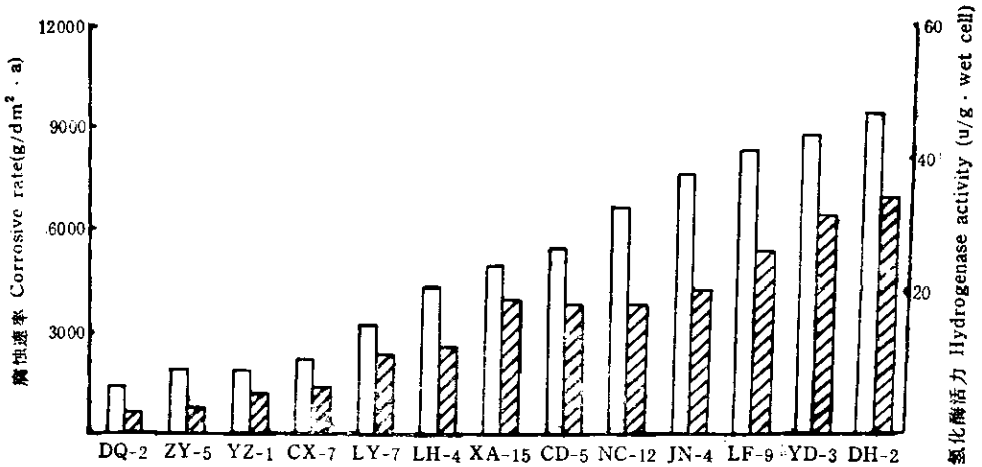


图 5 SRB 菌株氢化酶活力与钢腐蚀关系

Fig. 5 Relationship between hydrogenase activity and steel corrosion

□ 腐蚀速率 Corrosive rate ▨ 氢化酶活力 Hydrogenase activity

菌体。对照各菌株对钢的腐蚀速率,可清楚地看到,除西安、泸州(2)少数站不明显外,纯菌株的氢化酶活力与钢腐蚀速率间存在着不错的正比关系。

讨 论

从我国代表 10 多种土壤的大庆等 13 个腐蚀网站分离、纯化了 13 株代表性的 SRB。测定了菌株的形态、生理生化特性,确定了分类地位,并结合氢化酶活力比较了其对于钢腐蚀强度。在土壤腐蚀网站工作中对腐蚀菌进行如此广泛系统的调查研究,国际上还未见报道。

在一些国家的土壤腐蚀调查中发现代表性厌氧腐蚀 SRB 多数是脱硫脱硫弧菌 (*D. desulfuricans*), 而我国广阔地区不同土壤代表性腐蚀菌为普通脱硫弧菌 (*D. vulgaris*)。按目前分类资料^[7,9],这两种菌的主要区别是前者除 DNA G + C% 克分子含量低于后者外,它还能利用苹果酸及胆碱为供氢体,其它生理生化特性几乎完全一致。从腐蚀角度看,这两种菌都具有引起金属腐蚀的氢化酶。因此,它们

之间任何一种在我国土壤中的广泛分布,都将构成微生物厌氧腐蚀的严重威胁。这不仅在国外类似报道^[11,13]中已证明,同时在我们的试验中也得以证实。

SRB 氢化酶参与钢铁腐蚀中阴极去极化过程。这同 Booth^[16]等腐蚀速度与菌氢吸收系数 ($-Q_{SO_4^{2-}}^{H_2}$) 成正比的结果相吻合,也与 Daumas^[13], Iverson^[14], Hardy^[15] 的 SRB 能利用阴极氢的报道是一致的。

参 考 文 献

- [1] Booth, G. H.: *J. Appl. Bacteriol.* 27: 174—181, 1964.
- [2] Patenaude, R.: In "Biologically Induced Corrosion", edited by Stephen, C. D., Published by NACE, Texas, pp. 92—95, 1986.
- [3] Tiller, A. K.: *Corrosion Processes* (edited by R. N. Parkins), Applied Science publ., New York, pp. 115—159, 1982.
- [4] Cragnolino, G. et al.: *Int. Biodeterior. Bull.*, 20(1): 9—26, 1984.
- [5] Iverson, W. P.: *Material Performance*, 23(3): 28—30, 1984.
- [6] Pankhania, J. P.: *Biojouling*, 1(1): 27—47, 1988.
- [7] Postgate, J. R.: *The Sulfate-reducing Bacteria* (2nd. ed.), Cambridge Univ. Press, London, 1984.

- 1984.
- [8] Marmur, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [9] Widdel, F. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th., Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 663—679, 1984.
- [10] Wormell, F. et al.: *Corros. Technol.*, 11(4): 26—27, 1971.
- [11] Miller, J. D. A. et al.: *Microbial Aspects of the Deterioration of Materials*, Acad. Press, London, pp. 83—103, 1975.
- [12] Costello, J. A.: *Int. Biodeterior. Bull.*, 5(3): 101—108, 1969.
- [13] Daumas, S. et al.: *Corrosion Science*, 28(11): 1041—1050, 1988.
- [14] Iverson, W. P.: *Science*, 151: 986—988, 1966.
- [15] Hardy, Y. A.: *Br. Corros. J.*, 18: 190—193, 1983.
- [16] Booth, G. H.: *ibid.*, 3: 242—245, 1968.
- [17] 李 栋等: *微生物学报*, 30(4): 267—272, 1990.

STUDY ON THE MAIN ANAEROBIC CORROSIVE BACTERIA—SRB IN THE NATIONAL SOIL CORROSION TEST SITES

Lü Renhao Li Dong Liu Qi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Thirteen strains in the soil corrosion test sites representing more than ten types of soil in the northeast, southwest, northwest and north of China were isolated and their morphological and physiological, biochemical characteristics were examined. It is confirmed that the main anaerobic corrosive bacteria in our country are *Desulfovibrio vul-*

garis and *D. desulfuricans*. The satisfactory correlation between corrosive rate of the steel and the hydrogenase activity of the strains were observed.

Key words

Sulfate reducing bacteria; Hydrogenase; Microbiologically induced corrosion