

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A01N 63/00

A01N 25/00 A61F 2/00

A61K 47/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821297.2

[43] 公开日 2004 年 7 月 14 日

[11] 公开号 CN 1512838A

[22] 申请日 2001.10.23 [21] 申请号 01821297.2

[30] 优先权

[32] 2000.10.26 [33] US [31] 60/243, 881

[86] 国际申请 PCT/US2001/051103 2001.10.23

[87] 国际公布 WO2002/040746 英 2002.5.23

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.24

[71] 申请人 康涅狄格州大学

地址 美国康涅狄格州

共同申请人 南加州大学

[72] 发明人 T·K·伍德 D·奥内克

F·B·曼斯菲尔德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘元金 孟凡宏

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 10 页

[54] 发明名称 利用有益生物膜防止腐蚀

[57] 摘要

本发明提供一种形成保护性生物膜的细菌, 保护性生物膜可以防止和/或减少金属表面的腐蚀。本发明还提供一种形成保护性生物膜并且分泌作为金属腐蚀抑制剂的聚阴离子化学成分的细菌。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种金属, 包括有一个外表面的底材; 和减少所述外表面腐蚀的位于所述外表面上的保护性生物膜; 其中所述金属不是钢、铜或铝。
2. 权利要求1的金属, 其中所述金属是黄铜UNS-C26000。
- 5 3. 权利要求1的金属, 其中所述生物膜是细菌。
4. 权利要求3的金属, 其中所述细菌是需氧菌。
5. 权利要求4的金属, 其中所述细菌是枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。
6. 权利要求1的金属, 其中所述生物膜的厚度在约10 μ m至20 μ m之间。
- 10 7. 一种减少金属腐蚀的方法, 包括: 提供具有外表面的金属; 在所述外表面上应用减少所述外表面腐蚀的保护性生物膜; 其中所述金属不是铜、铝或钢。
8. 权利要求7的方法, 其中所述提供步骤包括提供金属黄铜UNS-15 C26000的步骤。
9. 权利要求7的方法, 其中所述应用步骤包括应用保护性生物膜是细菌的步骤。
10. 权利要求9的方法, 其中所述应用步骤包括应用细菌是需氧菌的步骤。
- 20 11. 权利要求10的方法, 其中所述应用步骤包括应用细菌是枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌的步骤。
12. 权利要求7的方法, 其中所述应用步骤包括应用厚度约为10 μ m至20 μ m之间的保护性生物膜的步骤。
13. 权利要求7的方法, 其中所述提供步骤包括提供浸入液体的金属的步骤。
- 25 14. 权利要求13的方法, 其中所述提供步骤包括提供浸于人造海水或L-B介质中的金属的步骤。
15. 一种金属, 包括有一个外表面的底材; 和减少所述外表面腐蚀的位于所述外表面上的保护性生物膜; 其中所述保护性生物膜是分30 泌聚阴离子化学成分的细菌。
16. 权利要求15的金属, 其中所述金属选自铝、铝合金、铜、铜合金、钛、钛合金、镍和镍合金。

17. 权利要求15的金属, 其中所述金属是钢。
18. 权利要求17的金属, 其中所述钢是低碳钢-1010。
19. 权利要求15的金属, 其中所述细菌是需氧菌。
20. 权利要求19的金属, 其中所述细菌是大肠杆菌。
- 5 21. 权利要求15的金属, 其中所述细菌已经利用基因工程设计能分泌聚阴离子化学成分。
22. 权利要求15的金属, 其中所述聚阴离子化学成分是聚磷酸盐。
23. 权利要求15的金属, 其中所述生物膜的厚度在约10 μm 至20 μm 之间。
- 10 24. 一种减少腐蚀的方法, 包括提供具有外表面的金属; 在所述外表面上应用减少所述外表面腐蚀的保护性生物膜; 其中所述保护性生物膜是分泌聚阴离子化学成分的细菌。
25. 权利要求24的方法, 其中所述提供步骤包括提供选自铝、铝合金、铜、铜合金、钛、钛合金、镍和镍合金的金属的步骤。
- 15 26. 权利要求24的方法, 其中所述提供步骤包括提供金属是钢的步骤。
27. 权利要求26的方法, 其中所述提供步骤包括提供金属是低碳钢-1010的步骤。
28. 权利要求24的方法, 其中所述应用步骤包括应用细菌是需氧菌的步骤。
- 20 29. 权利要求28的方法, 其中所述应用步骤包括应用细菌是大肠杆菌的步骤。
30. 权利要求24的方法, 其中所述应用步骤包括应用细菌已经利用基因工程设计能分泌聚阴离子化学成分的步骤。
- 25 31. 权利要求24的方法, 其中所述应用步骤包括应用聚阴离子化学成分是聚磷酸盐的步骤。
32. 权利要求24的方法, 其中所述应用步骤包括应用生物膜的厚度在约10 μm 至20 μm 之间的步骤。
33. 权利要求24的方法, 其中所述提供步骤包括提供浸入液体的金属的步骤。
- 30 34. 权利要求24的方法, 其中所述提供步骤包括提供浸于人造海水或L-B介质中的金属的步骤。

利用有益生物膜防止腐蚀

技术领域

- 5 本发明涉及防止和/或降低金属的腐蚀。更详细地,本发明提供带有保护性生物膜的金属以及利用保护性生物膜防止和/或降低金属腐蚀的方法。

背景技术

- 10 对于材料,例如金属、混凝土和灰泥的腐蚀损坏在现代经济中是一项重大的开支。例如腐蚀损坏的年费用已经估算是国民生产总值的一个相当大的部份。保护腐蚀敏感的材料,特别是金属,免受腐蚀损坏的优越的方法能够显著地降低这些耗费。

- 多种阴离子型有机和无机化合物,如羧酸盐(例如(C₆-C₁₀)直链脂肪族单羧酸,(C₃-C₁₄)二羧酸,聚马来酸和聚丙烯酸),多肽和聚磷酸
15 盐抑制金属,例如钢、铜、和铝的腐蚀(此处引入 Sekine 等人,Electrochem. Soc., Vol. 139,11 : 3167 - 3173,1992,作为参考;此处引入 Hefter 等人,Corrosion. 53,8 : 657-667,1997,作为参考;Wranglen 的“An Introduction to the Corrosion and Protection of Metals”,Halsted 出版,New York, NY, 1972)。这样,对金属
20 施用这些抑制剂是一种减少腐蚀损坏的方法。

- 减少腐蚀损坏的另一种方法是防止生物膜在如金属这样的腐蚀敏感材料上生长。由需氧菌组成的生物膜在自然环境中迅速地在金属表面上生长,这引起表面腐蚀速率的增加。代谢活跃的细菌显示出增加的附着于表面并且利用充足的养料生产外多糖以形成成熟生物膜的倾向。
25 因此,生物膜是附着于表面上的包在外多糖基质中的微生物种群。外多糖有助于使细菌固定到表面并且对于生物膜的进一步发展是重要的。

- 微生物被认为使电化学反应的速率提高,因此使大多数金属的腐蚀速率增加并且没有改变腐蚀机理(Little 等,Int. Mat Rev.
30 36,6,1,1991)。发生腐蚀也可能由于金属表面上不均匀生物膜的形成和小菌落的生长,这导致金属表面附近的氧浓度梯度和氧差电池。典型地,位于金属表面附近的需氧生物膜的区域是缺氧的,因为细菌呼

吸造成氧气减少。硫酸盐还原菌能够在厌氧的区域生长并且导致多种金属表面很大程度的腐蚀损坏。

常规的抗微生物造成的腐蚀的对策包括改变 pH、控制氧化还原电势、无机涂层、阴极保护和抗微生物剂。通常使用例如油漆和环氧树脂的防护涂层，但是其施用和维护是昂贵的。阴极保护需要结合一个牺牲阳极或从外电源提供电流穿过耐腐蚀的阳极来促进金属表面上的阴极反应。电流降低了金属表面上的电势，这样防止了金属阳离子的形成以及随之发生的腐蚀。

抗微生物剂可能是最常用的减少微生物造成的腐蚀的方法。抗微生物氧化剂，像氯、氯胺和氯化物化合物常常用于淡水系统。氯和氯化衍生物是最经济效益和最有效的抗微生物剂。然而氯和氯化物化合物活性依赖于 pH、光及温度，而且这些卤素衍生物通常不防止生物膜的生长。

非氧化性的抗微生物剂，例如季盐、胺-类化合物和蒽醌是稳定的并且可被用于许多环境。然而，这些抗微生物剂是价格昂贵而且可能导致严重的环境破坏。

控制微生物造成的腐蚀的另一对策是通过控制养分来抑制特别是有害微生物的生长。另外，防止细菌附着到表面的聚合物可以用来涂敷表面，这样防止了生物膜的形成。

令人惊讶的是，最近的调查已经证明需氧菌能够抑制金属腐蚀，其通过在如钢、铜和铝的金属表面形成保护性的生物膜抑制金属腐蚀（（在这里引入 K. M. Ismail 等人, *Electrochimica Acta*, in press; K. M. Ismail 等人, submitted to *Corrosion* ; A. Jayaraman 等人, *Journal of Industrial Microbiology* 18: 396-401, 1997; A. Jayaraman 等人, *Journal of Applied Microbiology* 84: 485-492, 1997; A. Jayaraman 等人, *Applied Microbiology & Biotechnology* 47: 62-68, 1997, A. Jayaraman 等人, *Applied Microbiology & Biotechnology* 52: 787-790, 1997 作为参考）。需氧菌可以通过呼吸耗尽氧气，否则氧气能够氧化金属（在这里引入 A. Jayaraman 等人, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 48: 11-17, 1997 作为参考）。

然而，氧气减少也可能为厌氧的硫酸盐还原菌创造机会在金属表

面繁殖并且导致严重的腐蚀损坏。这样,利用生物膜来抑制金属腐蚀可能被硫酸盐还原菌造成的腐蚀抵消。最近,有一个可能解决上述问题的方案:利用基因工程设计的需氧菌已经用于形成防止不锈钢的一般性腐蚀,这种利用基因工程设计的需氧菌分泌抑制硫酸盐还原菌生长的抗微生物蛋白(这里引入 A. Jayaraman 等人, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22: 167-175, 1999, A. Jayaraman 等人, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 267-275 1999, 作为参考)。

虽然生物膜减少或防止钢、铜或铝的腐蚀的性能最近已经被证明,但使用生物膜防止或减少其它金属的腐蚀还没有研究。此外,利用基因工程设计的分泌聚阴离子化学成分的细菌来形成保护性生物膜以防止一般化金属腐蚀也还没有研究。这样的发明将要成为本领域的一个重要进步,因为生物膜比防腐剂和抗微生物剂便宜得多,原因是它们自然地形成并且自生自存。

15 发明内容

本发明针对这种需要提供了一种形成保护性生物膜的细菌,保护性生物膜可以防止和/或减少金属表面的腐蚀。本发明还提供一种形成保护性生物膜并且分泌作为金属腐蚀抑制剂的聚阴离子化学成分的细菌。

20 一方面,本发明提供一种金属,它不是钢、铜、或铝,金属具有一个有外表面的底层。保护性的生物膜位于外表面上减少外表面的腐蚀。

在一实施方案中,金属是黄铜 UNS-C26000。在另一个实施方案中,生物膜是一种细菌。优选地,细菌是一种需氧菌,更优选地,细菌是枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。优选地,生物膜厚度约在 10 μm 至 20 μm 之间。

另一个方面,本发明提供减少金属腐蚀的方法。在该方法中,不为钢、铜或铝的金属具有一外表面,保护性生物膜用于外表面以减少腐蚀。

30 在一实施方案中,金属是黄铜 UNS-C26000。在另一个实施方案中,生物膜是一种细菌。优选地,细菌是一种需氧菌,更优选地,细菌是枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌。优选地,生物膜厚度约在 10 μm 至 20 μm

之间。在一实施方案中，金属浸泡在液体中。优选地，该液体是人造海水或 L-B 介质。

还有另一个方面，本发明提供一种金属，其作为一种具有外表面的底材。一种分泌聚阴离子化学成分的保护性生物膜位于外表面上减少外表面的腐蚀。

在一实施方案中，金属是铝、铝合金、铜、铜合金、钛、钛合金、镍或镍合金。在另一个实施方案中，该金属是钢。在一个优选实施方案中，钢是低碳钢- 1010。

优选地，细菌是一种需氧菌，更优选地，细菌是大肠杆菌 (E. coli)。在一实施方案中，细菌已经利用基因工程设计能分泌聚阴离子化学成分。在另一个实施方案中，该聚阴离子化学成分是聚磷酸盐。优选地，生物膜厚度约在 $10\mu\text{m}$ 至 $20\mu\text{m}$ 之间。

最后一个方面，本发明提供了另外一种减少金属腐蚀的方法。在该方法中，金属具有一外表面，保护性生物膜用于外表面以减少腐蚀。该保护性生物膜是一种分泌聚阴离子化学成分的细菌。

在一实施方案中，金属是铝、铝合金、铜、铜合金、钛、钛合金、镍或镍合金。在另一个具体实施方案中，该金属是钢。在一个最优方案中，钢是低碳钢- 1010。

优选地，细菌是一种需氧菌，更优选地，细菌是大肠杆菌。在一实施方案中，细菌已经利用基因工程设计能分泌聚阴离子化学成分。在另一个实施方案中，该聚阴离子化学成分是聚磷酸盐。优选地，生物膜厚度约在 $10\mu\text{m}$ 至 $20\mu\text{m}$ 之间。在一实施方案中，金属浸没在液体中。优选地，液体是人造海水或 L-B 介质。

附图说明

图 1 说明一种具有外表面的腐蚀敏感底材，外表面被保护性生物膜所覆盖。

图 2 表明黄铜 UNS-C26000 于 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中暴露 5.5 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图 (Bode plot) 中将该频谱作图。

图 3 表明在有枯草芽孢杆菌 WB600 存在的情况下，黄铜 UNS-C26000 于 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中暴露 5.5 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 4 表明黄铜 UNS-C26000 在 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中暴露 10.0 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 5 表明在能产生聚天冬氨酸的枯草芽孢杆菌 WB600/pBE92-Asp 存在下，黄铜 UNS-C26000 在 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中暴露 10 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 6 表明在能分泌 γ -谷氨酸盐的地衣芽孢杆菌存在下，黄铜 UNS-C26000 在 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中暴露 10 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 7 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中相对腐蚀速率 $1/R_p$ 与时间的关系曲线。

图 8 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液中电容 C 与时间的关系曲线。

图 9 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 7.5 的 Vataanen 9 盐溶液过程中 E_{corr} 与时间的关系曲线。

图 10 表明黄铜 UNS-C26000 在 pH 6.5 的 L-B (卢里亚-贝尔塔尼) 介质中暴露 8 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 11 表明黄铜 UNS-C26000 在 pH 6.5 的 L-B 介质中暴露 8 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 12 表明黄铜 UNS-C26000 在 pH 6.5 的 L-B 介质中暴露 8 天的过程中得到的电阻抗频谱。在博德图中将该频谱作图。

图 13 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 6.5 的 L-B 介质过程中相对腐蚀速率 $1/R_p$ 与时间的关系曲线。

图 14 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 6.5 的 L-B 介质过程中电容 C 与时间的关系曲线。

图 15 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 6.5 的 L-B 介质过程中 E_{corr} 与时间的关系曲线。

图 16 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 6.5 的 L-B 介质过程中 E_{corr} 与时间的关系曲线。

图 17 表明在若干不同的情况下，黄铜 UNS-C26000 暴露在 pH 6.5 的 L-B 介质过程中相对腐蚀速率 $1/R_p$ 与时间的关系曲线。

发明详述

现在详细介绍本发明的优选实施方案。虽然发明结合优选实施方案进行描述，但很清楚这不是要将本发明限制于优选的实施方案。相反地，其意图是覆盖包括在权利要求书所定义的本发明的精神和范围之内的替换、修饰以及等同物。

5 本发明的金属 102 在图 1 中图解。金属 102 可以使用具有至少一外表面 104 的任何可能形状。这样，例如，底材的选择不受用途或形状的限制。底材的外表面也不受用途或形状的限制。通常，如图 1 所示，保护性生物膜 106 位于底材的外表面上以减少或防止外表面的腐蚀。

10 在一个优选实施方案中，包裹在多糖层中的附着的细菌在金属上形成保护性的生物膜。优选地，保护性的生物膜厚度约在 10 μ m 至 20 μ m 之间。一个优选实施方案中，保护性的生物膜由需氧菌形成。

优选的保护性生物膜厚度通过本领域已知的技术测量，例如共聚焦扫描激光显微术 (A Jayaraman 等人, J. Appl. Microbiol., 84: 15 485, 1998; A Jayaraman 等人, J. Ind. Microbiology & Biotechnology, 22: 167, 1999; 1999 年 3 月 31 日提交的美国专利申请, 序列号 09/282, 277)。从生物膜获得的共聚焦扫描激光显微术数据的图像处理和分析还可以通过本领域已知的方法进行 (A Jayaraman 等人, J. Appl. Microbiol., 84: 485, 1998; A Jayaraman 20 等人, J. Ind. Microbiology & Biotechnology, 22: 167, 1999; 1999 年 3 月 31 日提交的美国专利申请, 序列号 09/282, 277)。

一般地，在一优选实施方案中，细菌形成保护性生物膜时，金属是除铜、铝或钢以外的任何金属。优选地，金属是铁、铝合金、钛、钛合金、铜合金、镍、镍合金或其混合物。更优选地，金属是黄铜 25 UNS-C26000，UNS-C26000 用于指示符合工业标准的黄铜的特定等级。

优选地，当细菌形成保护性生物膜并且还分泌阴离子型化学成分时，使用的金属是铝、铝合金、钛、钛合金、铜、铜合金、镍、镍合金、低碳钢、不锈钢或其混合物。优选地，金属是钢，更优选地，金属是低碳钢-1010，低碳钢-1010 用于指示符合工业标准的钢的特定等 30 级。

一般的，为了减少或防止底材外表面的腐蚀，细菌必须与金属周围的环境相容。例如，如果需要防护一种金属在海水中的腐蚀，则细

菌必须适应海水。相反地,如果需要防护一种金属在淡水中的腐蚀,则细菌必须适应淡水。

优选地,金属浸于一种液体中。更优选地,液体是 Vataanen 9 盐溶液(pH 优选约 7.5)或 L-B 介质(pH 优选约 6.5)。

- 5 选择的细菌应能够在金属表面形成生物膜。确定某种细菌在不同环境中形成生物膜的能力的方法是本领域已知的(Jayaraman 等人, Appl. Microbiol. Biotechnol., 48: 11-17, 1997)。优选地,用于金属上形成生物膜的细菌选自芽孢杆菌属、假单胞菌属、沙雷氏菌属或埃希氏杆菌属。用于在金属上形成生物膜的细菌更优选芽孢杆菌属。最优选枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌用于金属外表面上形成生物膜。在另一个优选实施方案中,使用大肠杆菌在金属外表面上形成生物膜。

- 15 另外,用于形成生物膜的细菌应该能够在金属周围环境的温度和 pH 条件下生长。本领域技术人员使用本领域已知的知识能够常规地确定大多数细菌种属的温度、pH、其它环境要求和耐受性。这样,本领域的技术人员能够确定一种特定细菌是否能够在金属周围的环境中生长。

- 20 细菌可以通过能够与底材表面接触的任意方法施用于底材的外表面。因此,例如可以通过接触、喷雾、刷涂、用软管冲或滴注细菌或含有细菌的混合物将细菌施用于腐蚀敏感材料的外表面上。细菌可以位于有裂纹的表面上,裂纹产生了生物膜存在于其中的空间,或者在没有裂纹的表面上。

- 25 生物膜能保护金属外表面免受腐蚀。本领域技术人员熟知,电化学阻抗频谱术是优选的用于检测金属表面腐蚀的方法。电化学阻抗频谱术已经用于微生物引起的腐蚀的实验室研究并用于该领域的腐蚀监测(Jayaraman 等, Appl. Microbiol. Biotechnol., 48: 11-17, 1997)。电化学阻抗频谱术是一种非侵入性的方法,是一种用于测量连续培养试验中的腐蚀的理想方法。因此,本领域的技术人员将能使用例如电化学阻抗频谱术的方法迅速地测定在特殊环境中生物膜是否保护金属的外表面免于腐蚀。

30 可以通过使用能分泌减少腐蚀的化学成分(优选聚阴离子化学成分)的细菌形成生物膜来加强生物膜的防蚀作用。细菌可以天然地分泌

减少腐蚀的化学成分或者利用基因工程设计分泌减少腐蚀的化学成分。

例如，氨基酸作为有效的腐蚀抑制剂是本领域众所周知的。最近，多肽，例如聚谷氨酸、聚甘氨酸、聚天冬氨酸或这些氨基酸的组合已经被证明在减少金属腐蚀方面是有效的。因此，分泌化学成分，例如聚谷氨酸、聚甘氨酸、聚天冬氨酸或这些氨基酸的混合物的需氧的生物膜在减少金属腐蚀方面可能是有效的。

聚阴离子作为有效的腐蚀抑制剂也是本领域众所周知的。因此，分泌聚阴离子化学成分的需氧生物膜在减少腐蚀方面可以是有效的。在一优选实施方案中，已经使用利用基因工程设计的分泌聚阴离子化学成分例如聚磷酸盐的细菌在金属上形成生物膜。

铁载体例如副球菌素(从脱氮副球菌中分离)和肠杆菌素(从大肠杆菌中分离)是细菌产生和分泌的相对低分子量的螯合剂，用于溶解铁离子使之转运并且能够抑制铁的腐蚀。因此，铁载体也可以减少铁的腐蚀。

铁载体基因可能受一种强构造启动子的控制，在正常分泌这些螯合剂的细菌中过度表达。另外，可以利用基因工程设计分泌包括铁载体的化学成分的细菌。然后，这些细菌可以用来形成生物膜以保护金属的腐蚀。

用于本发明的细菌可以分泌多于一种的防蚀剂。如果细菌分泌的两种试剂能协同地减少金属腐蚀，那么使用分泌两种或更多种防蚀剂的细菌可能是有益的。例如，细菌可以利用基因工程设计产生防蚀剂，例如聚天冬氨酸、聚谷氨酸、由这两种肽组成的多肽、副球菌素、肠杆菌素、其它的铁载体、如聚磷酸盐的聚阴离子或其混合物。

可以通过本领域众所周知的用于表达基因的技术 DNA 重组技术，利用基因工程设计分泌多肽例如聚谷氨酸或聚天冬氨酸或铁载体或聚阴离子的细菌。这些方法包括，例如，体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组技术。编码防蚀多肽、铁载体或聚阴离子表达系统组件的核苷酸序列的 DNA 和 RNA 可以使用如商业可获得的合成器化学合成。

许多宿主表达载体系统可以用于表达防蚀多肽、铁载体或聚阴离子化合物。用于本发明目的的表达系统包括但不限于细菌，例如用重

组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的 *E. coli* 或 *B. subtilis*, 载体包含编码防蚀多肽、铁载体或聚阴离子表达系统组件的核苷酸序列。

使用生物技术领域技术人员已知的表达系统, 包括防蚀多肽、铁载体或聚阴离子表达系统组件的化学成分能够在原核细胞中表达。对于本发明实际操作有用的表达系统在美国专利 5,795,745; 5,714,346; 5,637,495; 5,496,713; 5,334,531; 4,634,677; 4,604,359; 4,601,980 中描述, 其中所有内容作为参考并入本发明。

因此, 向细菌细胞引入 DNA, 包括异源 DNA 并且表达合成的基因产物的大量技术是已知的。转化细菌并且表达防蚀多肽、铁载体或聚阴离子的化学成分的方法对于本发明的实际操作并不是决定性的。在一种优选实施方案中, 使用包含多磷酸激酶基因和磷酸盐特定转运系统的质粒转化 *E. coli*。这样得到的转染物分泌聚磷酸盐。

15 实施例

提供下列实施例仅仅为了说明本发明的特征, 而不以任何方式用于限制本发明的范围。

实施例 1

铜锌合金 (UNS-C26000, 70%铜/ 30%锌) 板 (10 cm x 10 cm 正
20 方形, 厚度 2 mm) 从薄板切下, 然后用 240 目砂纸 (Buehler, Lake Bluff, IL) 抛光。人造海水是 Vataanen 9 盐溶液 (VNSS, pH 7.5) (G. Hernandez 等, Corrosion Science, 50, 603, 1994)。Luria Bertani (LB, pH 6.5) 培养基是一种丰富的菌种生长培养基, 由每升中 10 g 胰蛋白胨, 5g 酵母抽提物和 10g NaCl 制成 (T. Maniatis
25 等, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor, 1982)。枯草芽孢杆菌 WB600 从卡尔加里大学的 Sui-Lam Wong 博士处获得, 是一种蛋白酶缺失菌株 (这里使用抗卡那霉素衍生株) (X.-C. Wu, 等, J. Bacteriol. 173., 4952, 1991)。地衣芽孢杆菌 9945a 从 American Type Culture Collection 获得。黄铜 UNS-C26000
30 上的生物膜在玻璃/聚四氟乙烯的柱形连续反应器内 LB 或 VNSS 中约 30 °C 下生长, 液体营养物流动速率约为 0.2 mL/min (A. Jayaraman 等, Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 11, 1997)。气流以大约 200

mL/min 的速度到达顶部空间，反应器的工作体积约 100mL 或 150mL，试验电极暴露的表面积约 28.3cm^2 。连续反应器（无菌且接种过的）操作时存在约 $100\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素以保证无菌（除了地衣芽孢杆菌）。悬浊培养 16 小时得到的 1 % (vol/vol) 细菌种菌用于接下来的试验。

5

实施例 2

一种钛反电极 (11.3cm^2 表面积) 和耐高压加热的 Ag/AgCl 参比电极 (105053334 型 Ingold Silver Scavenger DPAS 电极, Mettler-Toledo Process Analytical, Inc., Wilmington, MA) 用于黄铜 UNS-C26000 上按照实施例 1 制备的生物膜，进行电阻抗频谱术测定。

10

电化学阻抗数据采用如下方法获得：使用具有 16 道多路转接器的 IM6 电化学阻抗分析器 (Bioanalytical Systems - Zahner, West Lafayette, IN)，频率范围是 20kHz 到 1.3mHz 的开路电势 E_{corr} ，运行联接于 Gateway Pentium GP6 300 MHZ 计算机上的 THALES 阻抗测量和等效电路合成/模拟/拟合软件。(North Sioux City, SD)。

15

在 VNSS 和 LB 介质中对黄铜 UNS-C26000 进行的实验列于表 I。一部分测试进行了重复实验。

表 I

实验号	介质	pH	菌株	分泌的抑制剂
174	VNSS	7.5	无菌	
239	VNSS	7.5	无菌	
238	VNSS	7.5	枯草芽孢杆菌 WB600	
176	VNSS	7.5	枯草芽孢杆菌 WB600/pBE92 - 聚天冬氨酸	聚天冬氨酸
175	VNSS	7.5	<i>B. licheniformis</i>	γ -聚谷氨酸
166	LB	6.5	无菌	
130	LB	6.5	枯草芽孢杆菌 WB600	
131	LB	6.5	枯草芽孢杆菌 WB600/pBE92- 聚天冬氨酸	聚天冬氨酸
168	LB	6.5	枯草芽孢杆菌 WB600/pBE92- 聚天冬氨酸	聚天冬氨酸
132	LB	6.5	地衣芽孢杆菌	γ -聚谷氨酸
167	LB	6.5	地衣芽孢杆菌	γ -聚谷氨酸

5 图 2 显示了在无菌的 VNSS (pH 7.5) 中得到的博德图 (Bode plots), 图 3 显示了在有枯草芽孢杆菌存在的情况下对应的博德图。图 2 与图 3 阻抗频谱的比较定性表明生物膜的存在形成了腐蚀防护。图 4 显示了黄铜暴露在 VNSS 中 1, 3 和 10 天之后得到的阻抗频谱, 图 5 和 6 分别图解在产生聚天冬氨酸的枯草芽孢杆菌 WB600/pBE92-
10 polyasp 存在的情况下和产生 γ -聚谷氨酸的地衣芽孢杆菌存在的情况下得到的阻抗频谱。

 如图 4 所示, 在强腐蚀的 VNSS 中, 观察到的阻抗数据低并且若干次是恒定的。然而, 图 5 和图 6 中能够看出在有生物膜的情况下, 随着主要电容性能的变化, 观察到阻抗大大地增加。图 7 显示了极化电阻的标准化倒数 $1/R_p$ 随时间的变化, $1/R_p$ 与腐蚀速率成正比, 图 8 显
15

示了电容 C 随时间的变化。图 7 表明, 附着生物膜的黄铜的腐蚀速率大致相同, 而低于单独的黄铜。无菌溶液的电容 C 在本试验的初始阶段稍低。然而, 在暴露的最后, 溶液中的黄铜包上了生物膜, 所有三种溶液的 C 值十分接近。

- 5 生物膜对于 VNSS 中黄铜 UNS-C26000 的保护作用不是由于黄铜表面氧浓度的减少, 因为腐蚀电势 (E_{corr}) 随时间升高了。因此, 如图 9 所示, 在 VNSS 中观察到有生物膜的黄铜的贵金属化 (ennoblement)。10 天之后, 没有细菌的 VNSS 中 E_{corr} 降低了大约 100 mV。

- 10 暴露于 VNSS 中的样品覆盖了一层黑色的薄膜, 而暴露于含有细菌的 VNSS 的样品保持光泽并且没有被腐蚀破坏的迹象。在 H_2SO_4 / $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液中除去腐蚀产物后, 没有发现暴露于无菌 VNSS 的样品有局部侵蚀的迹象。因此, 认为该腐蚀过程的改进是通过一般可接受的黄铜脱锌的机理。

- 在 $\text{pH} = 6.5$ 的 LB 介质中进行的实验 (表 I) 得到了相似的结果。15 如图 10 所示, 无菌的 LB 介质中得到的阻抗频谱与扩散控制过程中观察到的阻抗频谱相似, 这是通过瓦尔堡阻抗与 R_p 串联 (Randles 电路) 作图。在产生聚天冬氨酸的生物膜 (图 11) 或产生 γ -聚谷氨酸的 (图 12) 生物膜存在的情况下, 阻抗随着主要电容性能的变化提高很多, 这与在 VNSS 中 (图 2-6) 得到的结果类似。图 13 和 14 分别显示了用 $1/R_p$ 表示的相对腐蚀速率和电容 C 随时间的变化。20

- 通过比较图 10、11 和 12 可知, 在无菌 LB 介质中的腐蚀速率较有25 两种生物膜存在下的腐蚀速率高一个数量级以上, 有两种生物膜存在下的腐蚀速率十分接近。如图 13 所示, 在 LB 介质中有生物膜存在的情况下测定的 R_p 值与相同条件下在 VNSS 中测定的相似。 R_p 的平均值约为 10^5 欧姆/ cm^2 , 相当于腐蚀速率约为 $2\mu\text{m}/\text{年}$, 这是相当低的。表 I 中在 LB 介质中的各种条件下, 电容值是相似的 (图 14)。平行试验得到了可比较的 R_p 和 C 值, 分别如图 13 和 14 所示。图 14 的结果似乎显示生物膜的形成是通过未知机理防止腐蚀的破坏。

- 30 暴露于无菌 LB 介质后, 样品覆盖了一层黑色的腐蚀产物膜。当薄膜在 H_2SO_4 / $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液中除去后, 没有发现局部侵蚀的迹象。用于有细菌的试验的样品仍然是光泽的并且没有显示腐蚀破坏的任何迹象。这些系统还观察到在 E_{corr} 约为 200 mV 时, 在无菌溶液 (实验号

166)和含有产生 γ -聚谷氨酸的地衣芽孢杆菌(实验号132和167)的溶液之间的贵金属化不同,产生 γ -聚谷氨酸的地衣芽孢杆菌的贵金属化似乎较产生聚天冬氨酸的枯草芽孢杆菌WB600/pBE92 polyasp(实验号131和168)更明显。

- 5 用于黄铜UNS-C26000在VNSS和LB介质中腐蚀性能研究的微生物能显著地减少腐蚀损坏。有细菌存在的情况下,没有观察到在无菌介质中形成的腐蚀产物的黑色膜。观察到的腐蚀防护不是由于在黄铜表面氧浓度的明显减少,因为如果是这样,则在阴极方向会产生 E_{cor} 的变化。

10 实施例 3

- E. coli MV1184、含有 ppk 大肠杆菌多磷酸激酶基因的质粒 pBC29,这种酶催化磷酸基从ATP到多磷酸链的可逆转移、以及含有大肠杆菌的 pst 操纵子的质粒 pEP02.2,该操纵子编码磷酸盐特异性转运系统,从日本广岛大学的 Kato 教授那里获得(Kato 等, Applied and
15 Environmental Microbiology 59,11: 3744,1993,这里引入作为参考)。通过电穿孔将质粒引入 E. coli MV1184 菌株构造 E. coli MV1184 (pBC29 + pEP02.2)。这种重组体在 IPTG(Fisher Scientific Co. Pittsburgh, Pa)存在的情况下能够分泌聚磷酸盐,并且抗 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 氯霉素(pEP02.2 质粒)和 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 氯苄青霉素(pBC29 质粒)。E.
20 coli MV1184 抗 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素。E. coli MV1184 和 E. coli MV1184 (pBC29+pEP02. 2)从-80 $^{\circ}\text{C}$ 甘油储液接种到有 25 mL LB 介质的 250 mL 振荡瓶中, LB 介质中补充有必需的抗生素,然后 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 转下过夜培养(系列 25 振荡器, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) (Maniatis 等, "Molecular cloning: A laboratory manual" Cold
25 Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982.)。

实施例 4

- 用人造海水(即 Vataanen 9 盐溶液(VNSS))测试 1g/L 提纯的聚磷酸盐(Sigma Chemical 公司, St. Louis, Mo)对低碳钢腐蚀速率的
30 作用。从薄板(Yarde Metals 公司, Bristol, CT)上切下 10cm 正方形(厚度 1.2mm)的低碳钢 1010 (UNS-G10100)并且用 240 目砂纸抛光(Buehler Lake Bluff, IL)。连续实验最后,将金属表面置于自来水

下冲洗并用橡皮擦洗干净。

取自指数生长期晚期的培养物的 1 % (vol/vol) 种菌用于所有连续培养实验。为了在流动系统中利用电阻抗频谱术监控腐蚀速率, 设计并且构造了连续式反应器系统。同时监控多至 8 个反应器。金属样品加工形成了该反应器的底部(该金属样品的四角不是反应器的一部分), 玻璃杯(直径 5.5cm 或 6.0cm) 形成该系统的器壁并且 1cm 厚的聚四氟乙烯板(12.6cm x 12.6cm) 加工形成反应器的顶壁。反应器的工作容积是 100 mL 或 150 mL, 气流速率 200 mL/min (FM1050 塞里流量计, (Matheson Gas Company, Cucamonga, CA)。利用加热带绕在反应器周围使生长温度保持在 37℃。使用带有 10-转电位计的 Masterflex 精密标准驱动装置以 12 mL / hr 的速度连续注入无菌介质 (Cole Parmer, Niles, IL)。该反应器(无菌且接种的)含有必需的抗生素以确保无菌或 E. coli 菌株的存在。生物膜可以以间歇的方式生长 15 - 18 小时, 然后连续地补充养分, 使用电化学阻抗频谱术监控生物膜形成。样品试样在反应器底部, 在反应器中心有一个钛反电极(直径为 3.8 cm, 位于金属板上方 1.5 cm) 和一个在边缘位置的(金属板之上 3.0 cm)耐高压加热的参比电极(105053334 型 Ingold Silver Scavenger DPAS 电极, Mettler-Toledo Process Analytical Inc., Wilmington, MA)。所有实验至少重复操作两次。

极化电阻 (R_p) 和开路电势数据 (E_{cor}) 是通过交流阻抗数据获得的, 使用 BAS - Zahner IM6, 联接于 Gateway PC 计算机并运行 THALES 软件。在 20 kHz 到 1.3 mHz 的频带上进行测定。使用等效电路(BC) 解析法分析实验得到的阻抗频谱。极化电阻 (R_p) 与腐蚀电流强度 i_{cor} (或腐蚀速率) 成反比 (Stern 等, Journal of Electrochemical Society, 104: 56, 1957)。给出 Stern-Geary 方程式如下:

$$i_{cor} = \frac{\beta_A \beta_C}{2.303(R_p)(\beta_A \beta_C)}$$

其中 β_a 和 β_c 分别是阳极和阴极的塔费尔斜率。使用阻抗频谱术的优点是生物膜覆盖的金属的腐蚀速率能够在不干扰该生物膜的情况下测定。因此, 生物膜在防止金属腐蚀中的作用能够准确地测定。

在 pH 7.5、温度 30℃ 的条件下，纯化的聚磷酸盐 (1g/L) 加到 VNSS 中，并发现低碳钢的腐蚀速率 ($1/R_p$) 较无菌 VNSS 中的减少接近 5 倍。含有聚磷酸盐的介质是清澈的，且这种介质中的金属也相对没有变色。相反，没有聚磷酸盐的介质是浑浊的 (稍褐色) 且金属在 3 天间歇式操作中生锈。

然后研究了在基因工程菌产生的聚磷酸盐存在的情况下，连续式反应器中低碳钢的腐蚀性，在实施例 3 中描述基因工程菌的制备 (*E. coli* MV1184/pBC29+pEP02.2)。为了使这种菌株产生并分泌聚磷酸盐，必须向培养基中添加磷酸盐和 0.5mM 浓度的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)。然后细菌将磷酸盐转化为聚磷酸盐并分泌聚磷酸盐。因此，对于产生聚磷酸盐的菌株和不产生聚磷酸盐的对照菌株 MV1184，将 0.1-5.0 g/L K_2HPO_4 以 12mL/h 的流速不断地注入反应器以加到介质中。用这种方法评价形成聚磷酸盐对于减少腐蚀的作用超过了单独使用磷酸盐。

E. coli MV 1184 (pBC29 + pEP02.2) 和 *E. coli* MV 1184 均生长良好，图 16 表明，形成生物膜得到的腐蚀电位 E_{cor} 较无菌对照的腐蚀电位增加了 300-400mV (Jayaraman 等, Applied Microbiology and Biotechnology, 48: 11-17, 1997)。这种向更高值的明显变化表明该表面膜的保护性更高。在五天实验过程中，低碳钢的 E_{cor} 连续地增加。

对于带有 *E. coli* MV1184 / (pBC29+pEP02.2) 的低碳钢，含有 0.1、1.0 和 5 g / L K_2HPO_4 和 0.5 mM IPTG 的 LB 介质在 pH 7.0 和 37℃ 的条件下被用于连续式反应器，以使聚磷酸盐生产最大化。不分泌聚磷酸盐的 *E. coli* MV1184 用作生物膜形成的对照。表 2 中给出了 LB 介质中不同的 K_2HPO_4 浓度下低碳钢的极化电阻 (R_p)。用一次常数模型 (OTCM) 或瓦尔堡模型测定了低碳钢在含有 0.1 至 5.0 g / L K_2HPO_4 的 LB 介质中的极化电阻，表 2 中列出了 5 日实验中最后 3-5 天的 $R_p \times A$ 平均值。

A 表示极化电阻乘以金属试片的暴露表面积 (A) (45.4 cm^2) 在 3-6 天求出的平均值。 R_p 是通过一次常数模型获得的。

表 2

培养物	K_2HPO_4 g/L	$R_p \times A$, ohm/cm ²
<i>E. coli</i> MV1184	0.1	8126
<i>E. coli</i> MV1184 (pBC29+pEP02.2)	0.1	5334
<i>E. coli</i> MV1184	1	18,000
<i>E. coli</i> MV1184 (pBC29+pEP02.2)	1	23925
<i>E. coli</i> MV1184	1	15,200
<i>E. coli</i> MV1184 (pBC29+pEP02.2)	1	28,450
<i>E. coli</i> MV1184	5	25,151
<i>E. coli</i> MV1184 (pBC29+pEP02.2)	5	24,879

5 阻抗分析表明含有 1g/L K_2HPO_4 的 *E. coli* MV1184/pBC29 + pEP02.2 (产生聚磷酸盐)同 *E. coli* MV1184 比较,低碳钢的腐蚀速率减少 2.3 倍。然而,在含有 0.1 或 5 g / L K_2HPO_4 的 LB 中产生聚磷酸盐是没有作用的。

10 图 17 显示低碳钢暴露于 LB 中大肠杆菌培养物里 5 天过程中拟合参数 $1/R_p$ (相对腐蚀速率)随时间的变化。阻抗分析表明加入 MV1184 (pBC29+pEP02.2)及 MV1184 与无菌 LB 介质相比,低碳钢的腐蚀速率降低了 3.8 和 1.6 倍(5 日实验的最后 4 天的平均值)。因此,产生聚磷酸盐的利用基因工程设计的 *E. coli* MV1184(pBC29+pEP02.2)的生物膜与 *E. coli* MV1184 相比(以模型试验结果为基础)能使低碳钢的腐蚀速率降低 2.3 倍。

15 暴露于含有 *E. coli* 的 LB 和无菌 LB 之后,对低碳钢试片的表面状况进行了检验。外观检查显示低碳钢的表面全部黑色(无菌 LB 介质)。然而,当生物膜存在时(所有大肠杆菌培养物),低碳钢完全未改变;因此在金属表面形成生物膜使低碳钢腐蚀降低。

最后,应该注意的是本发明的操作和仪器有可选择替换的实施途

- 径。例如，不同的细菌可以用于形成生物膜而这些细菌可以分泌不同的防蚀化学成分。生物膜可以在不同金属上生长而不同的生物膜可以在不同于人造海水的环境中于金属上生长。本实施方案是说明性的而不是用于限制的，本发明不限于这里给出的详述，而是包括在附加权利要求书的范围之内的变化和同等物。
- 5

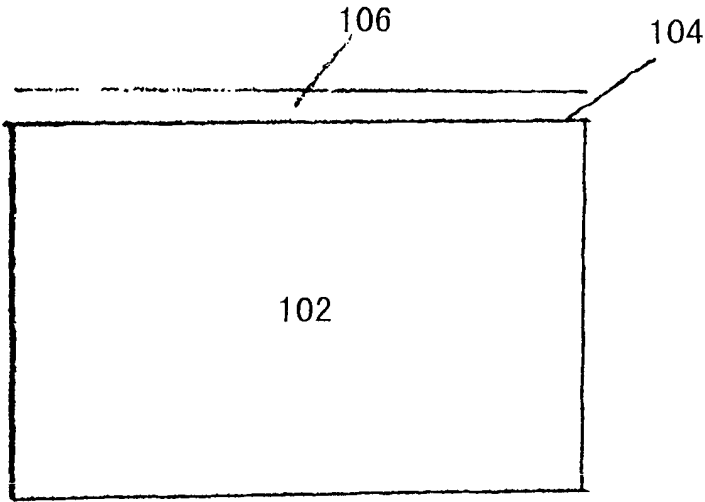
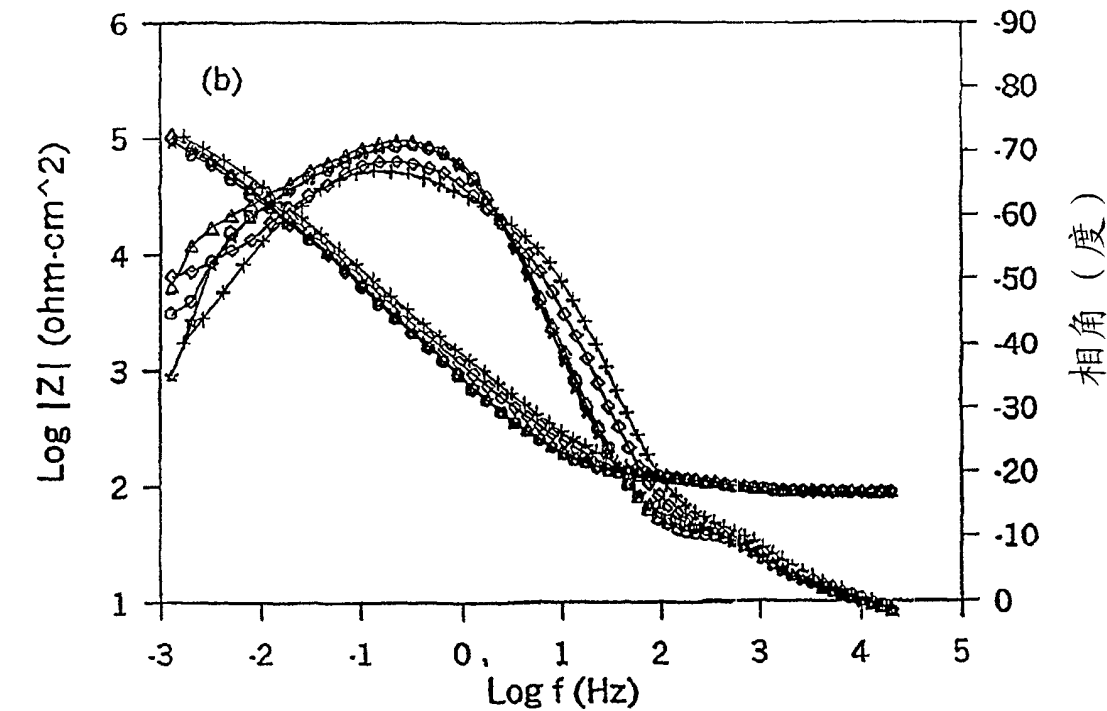
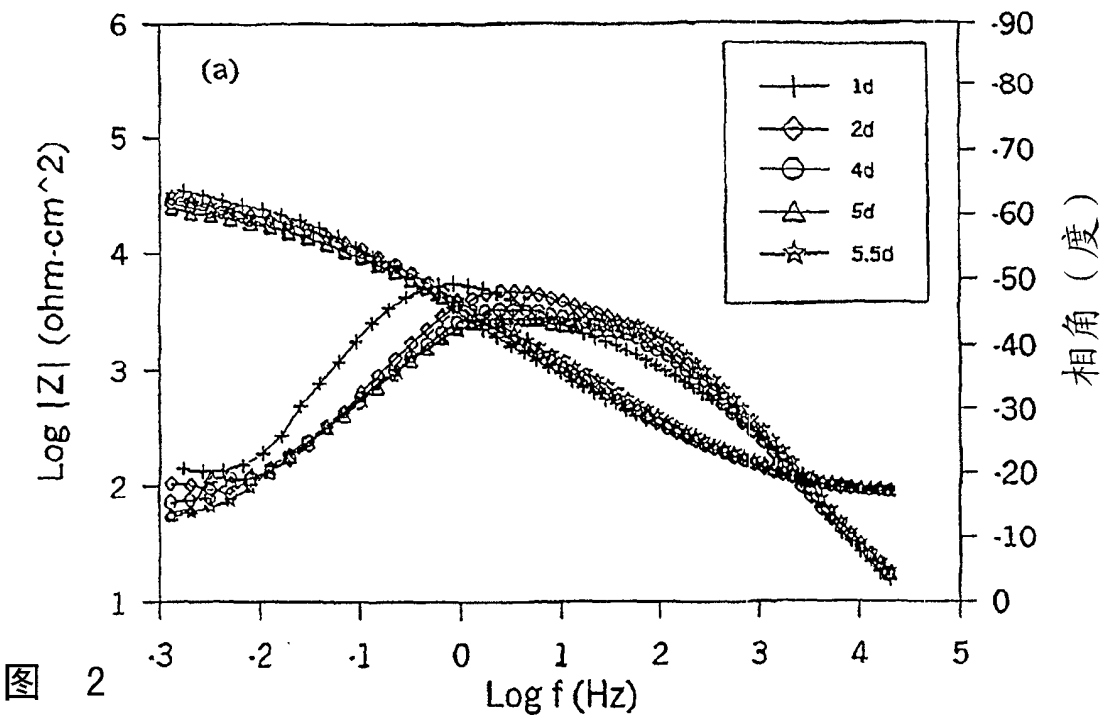


图 1



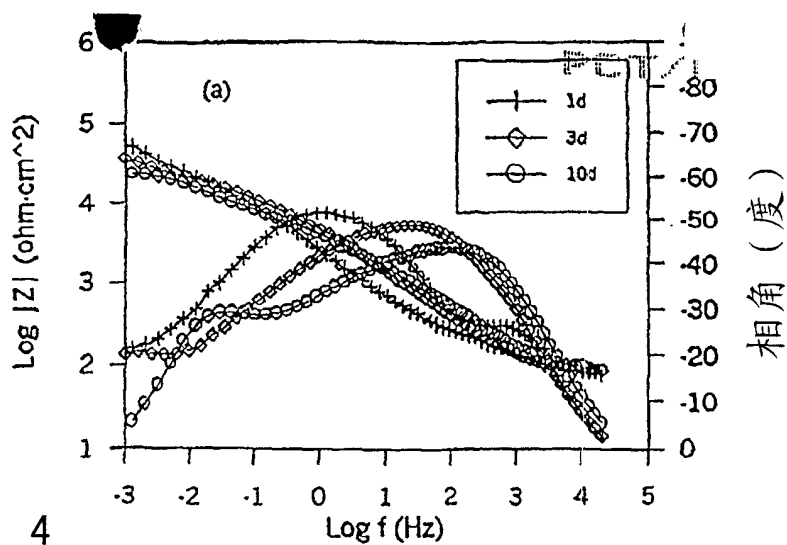


图 4

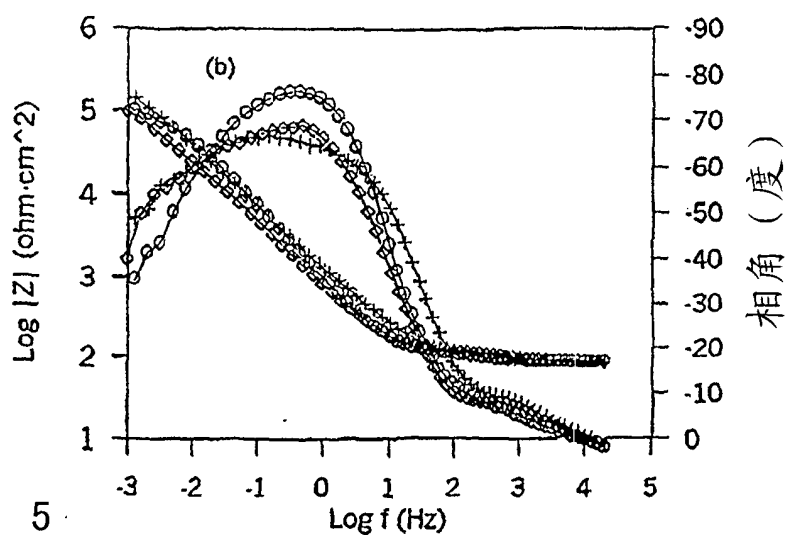


图 5

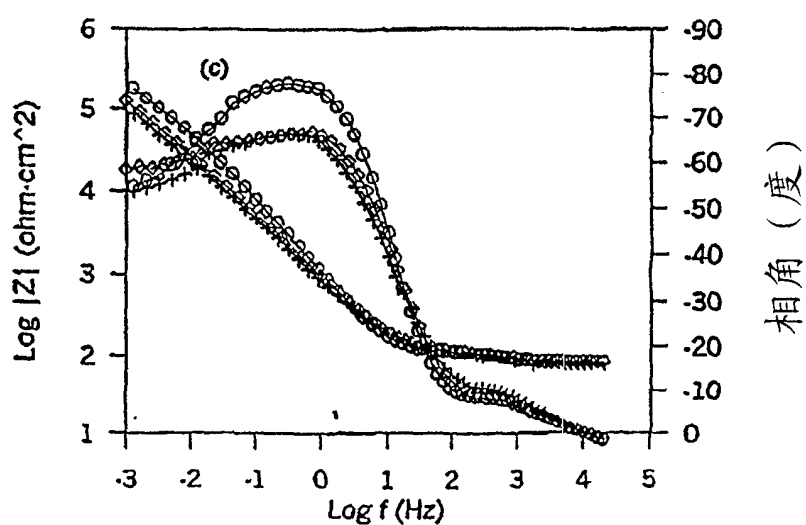


图 6

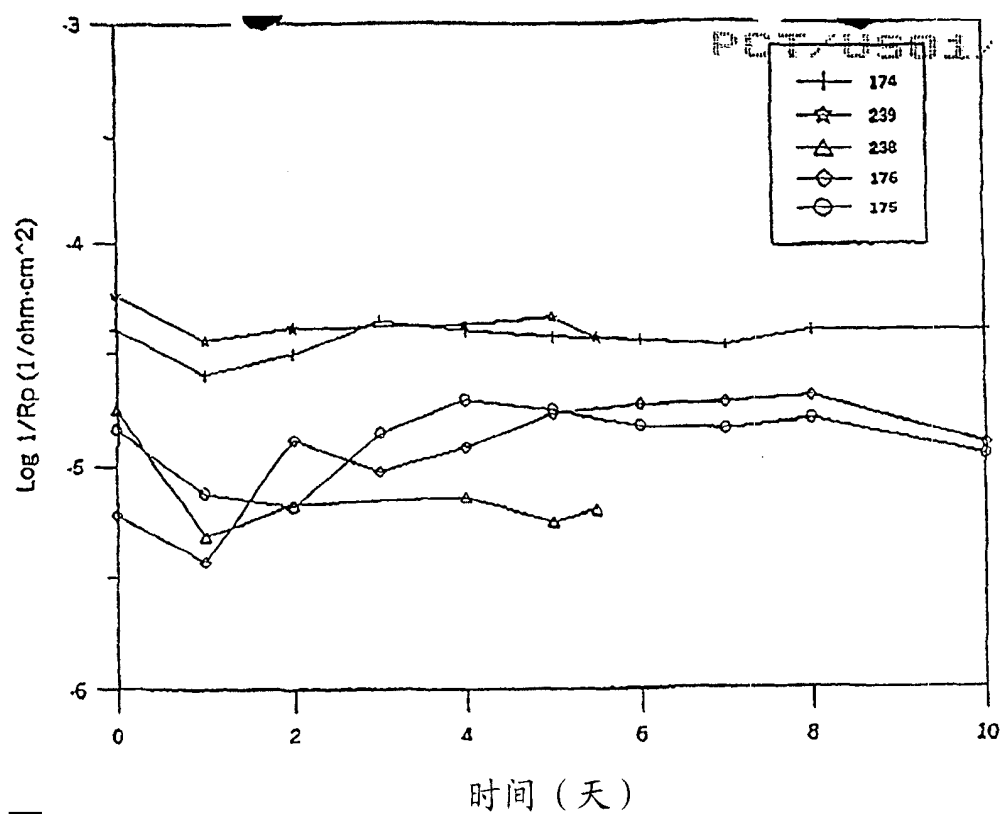


图 7

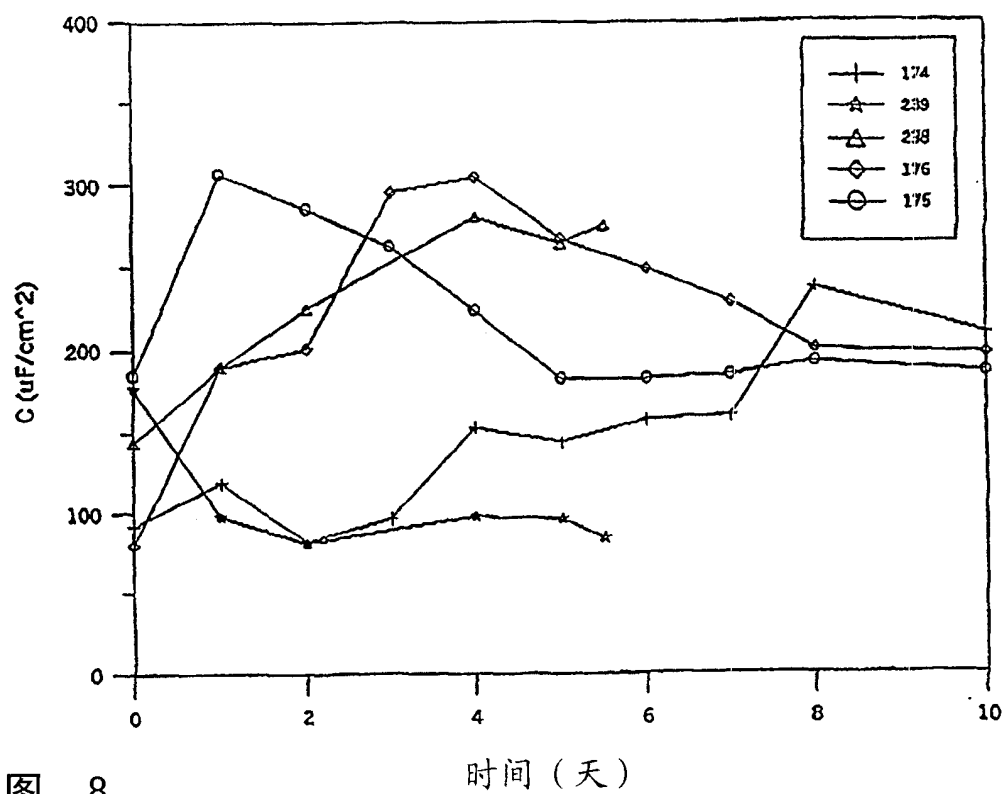


图 8

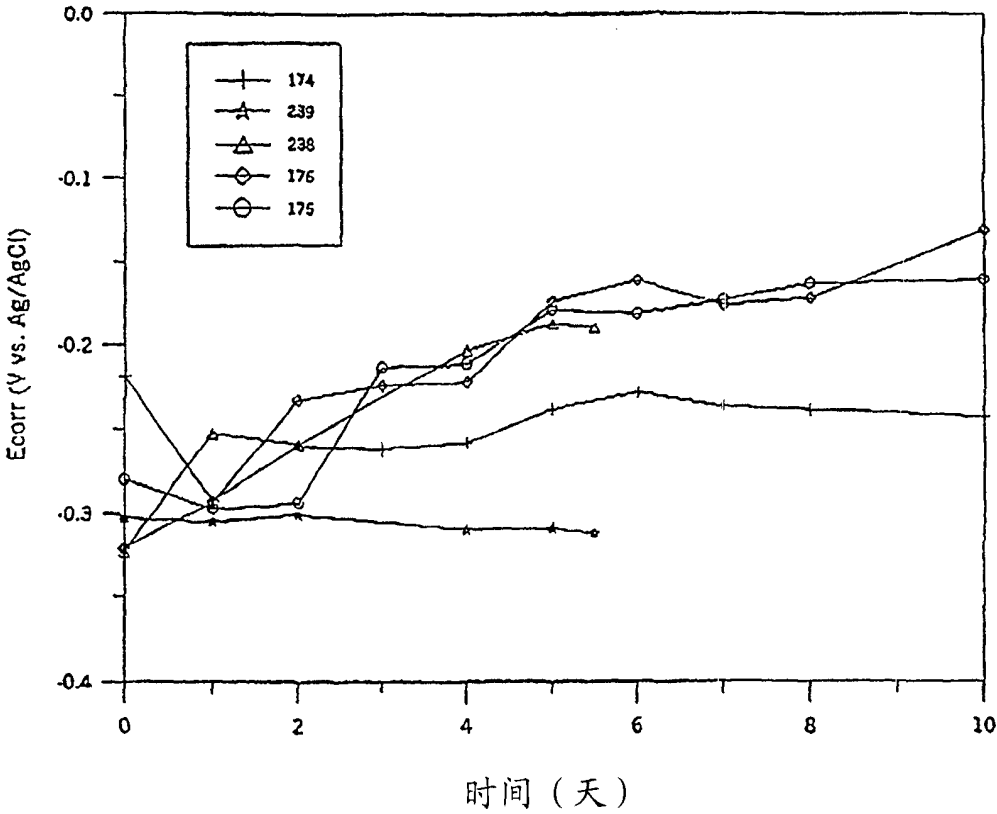
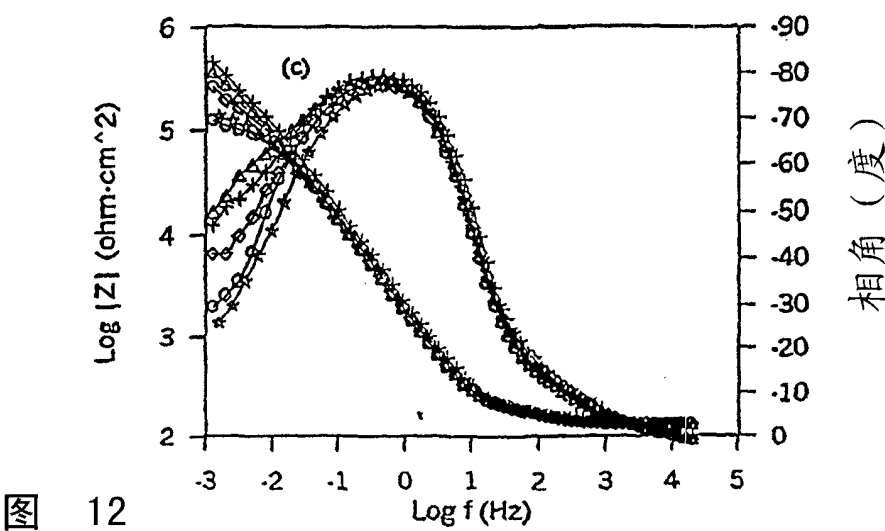
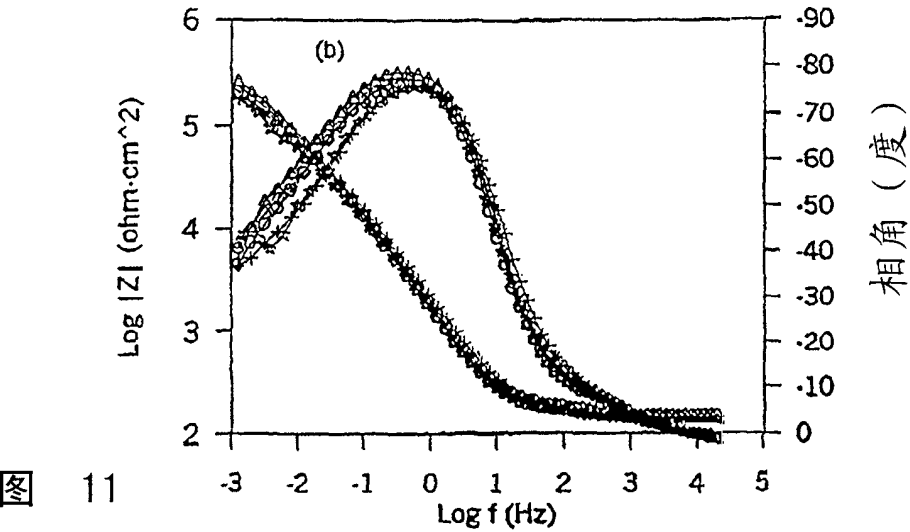
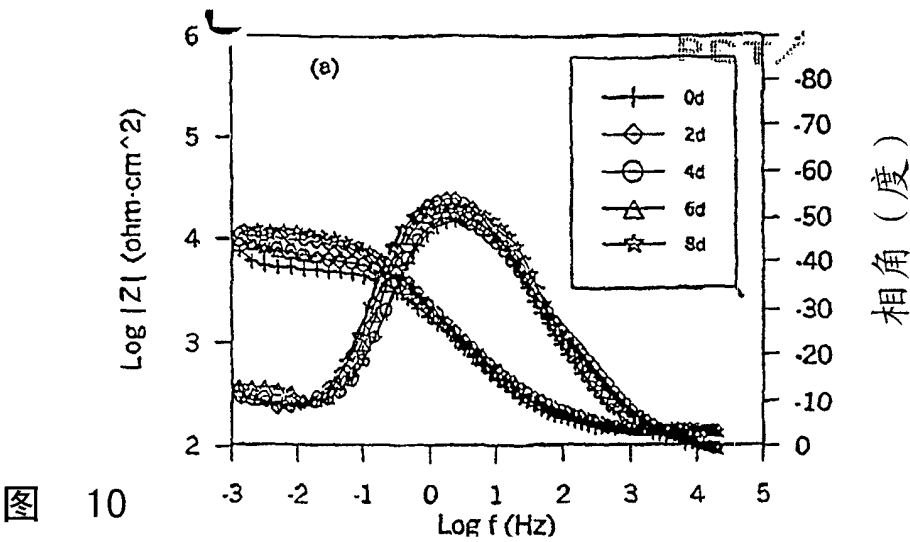


图 9



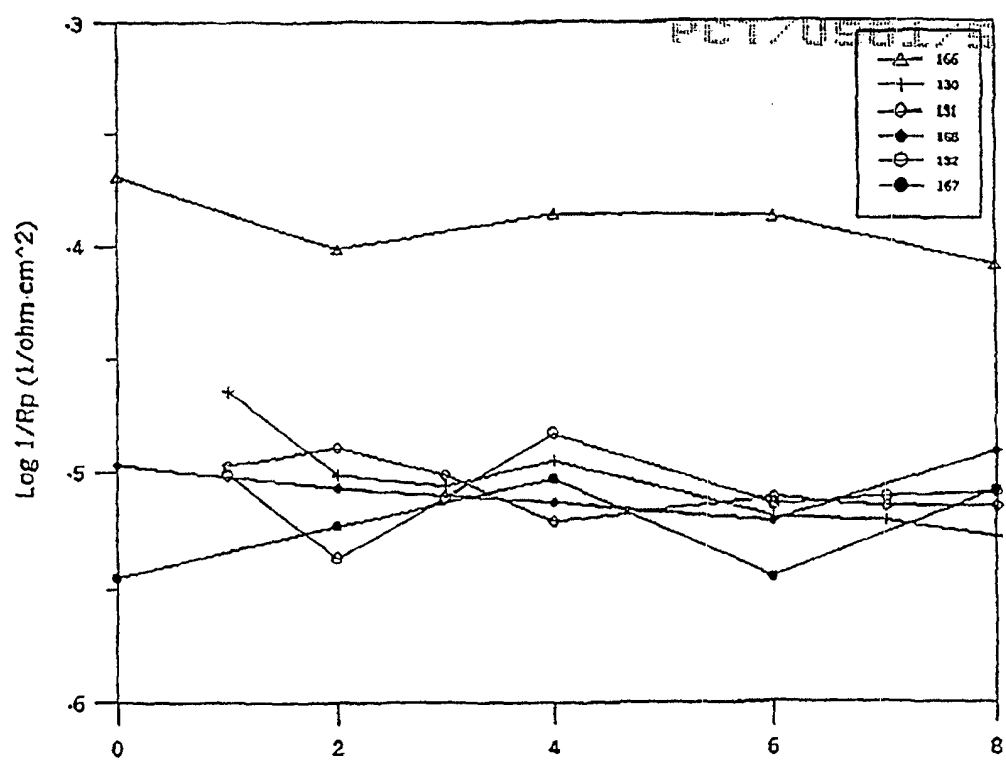


图 13 时间 (天)

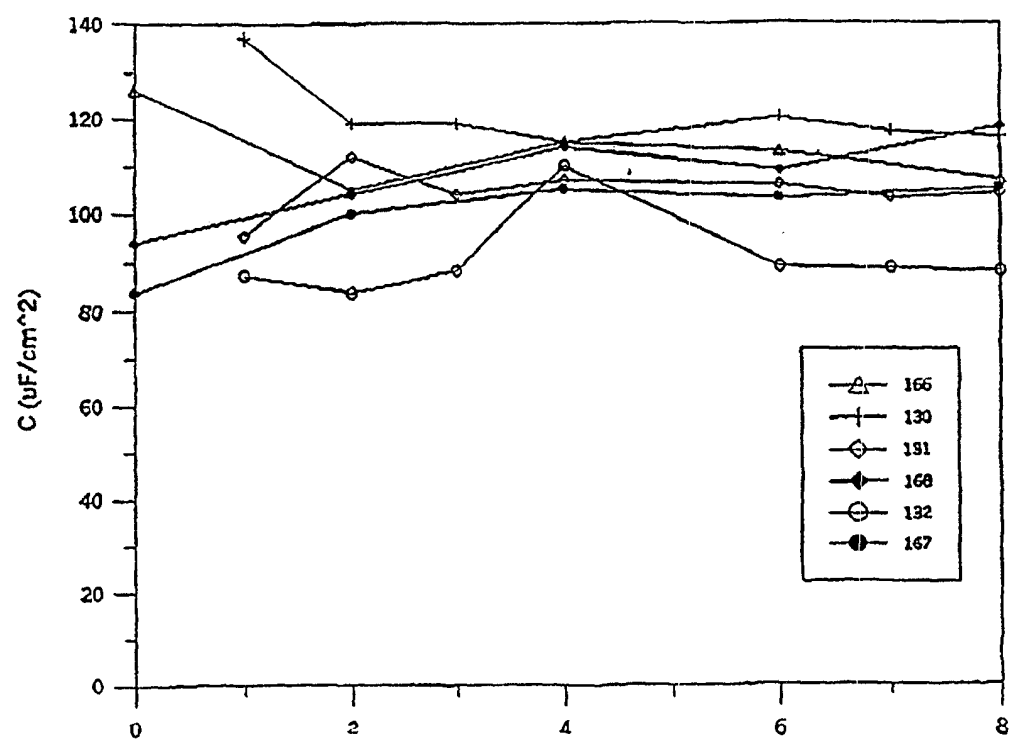


图 14 时间 (天)

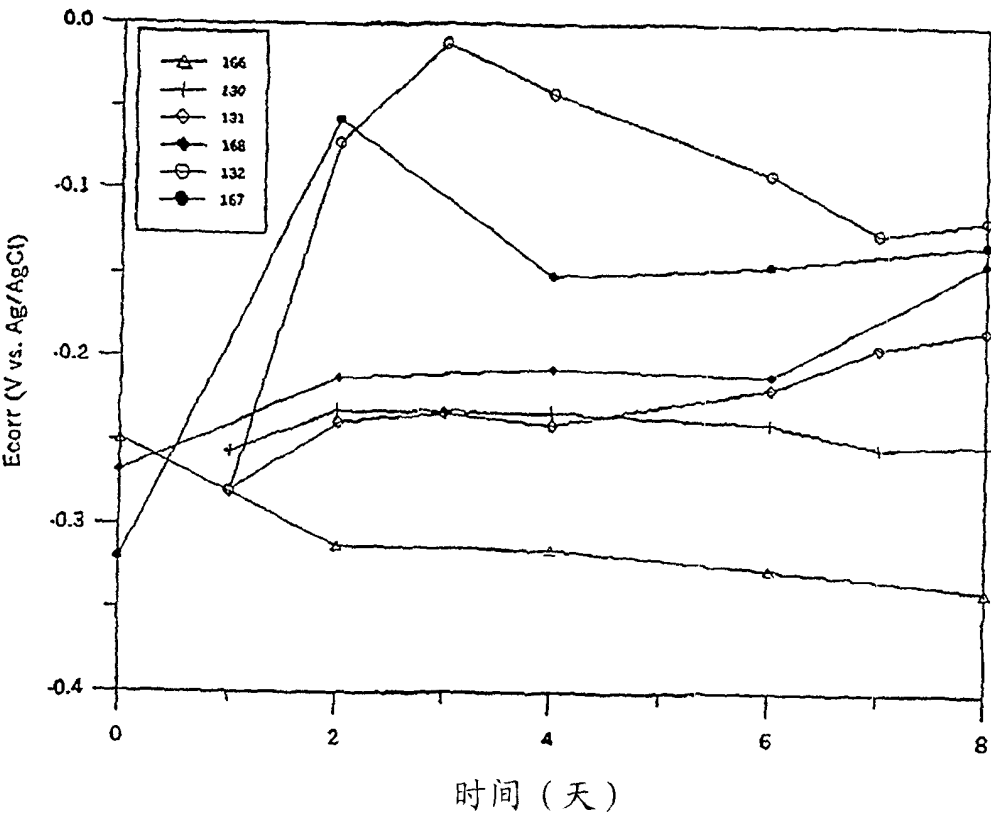


图 15

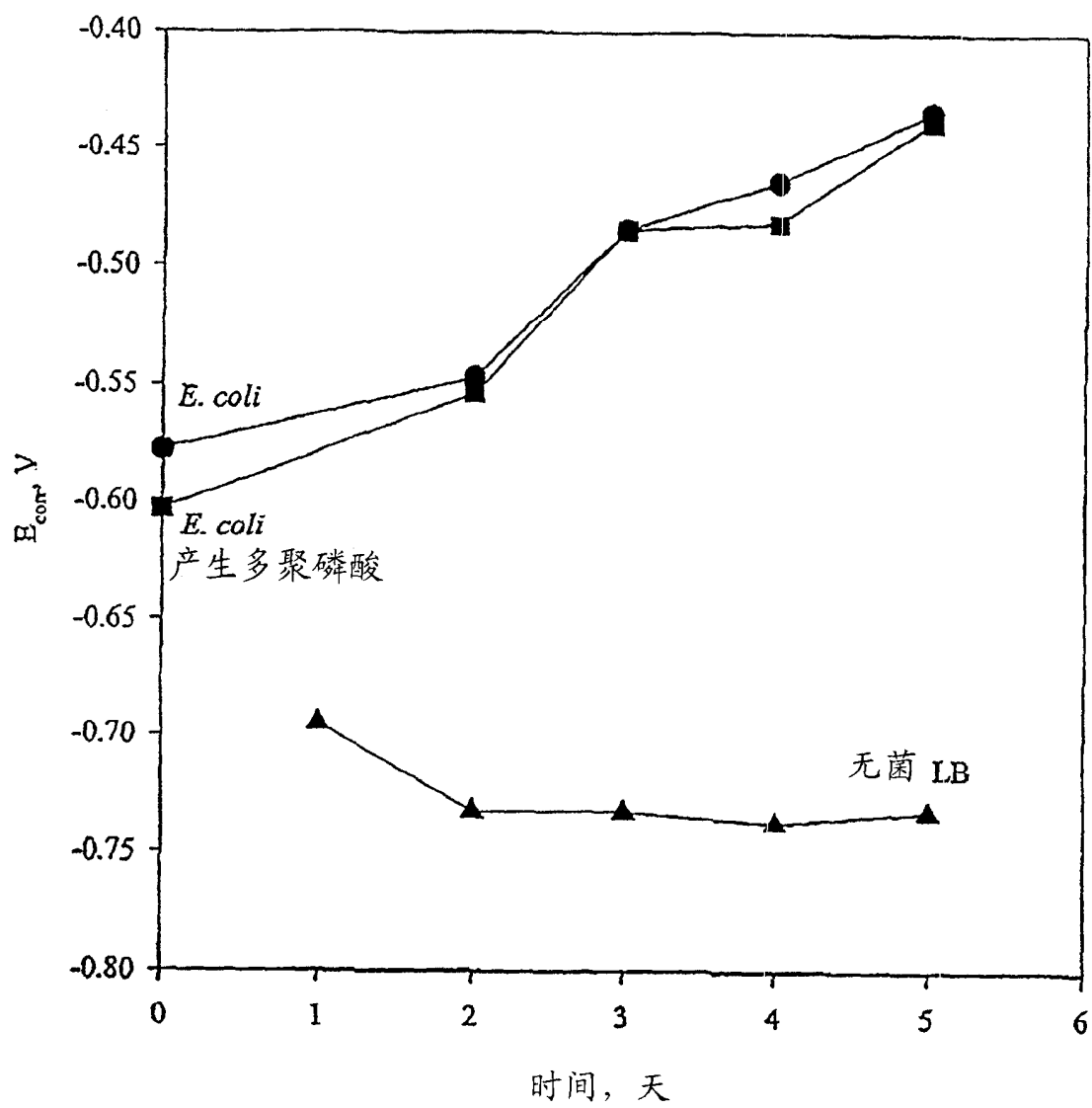


图 16

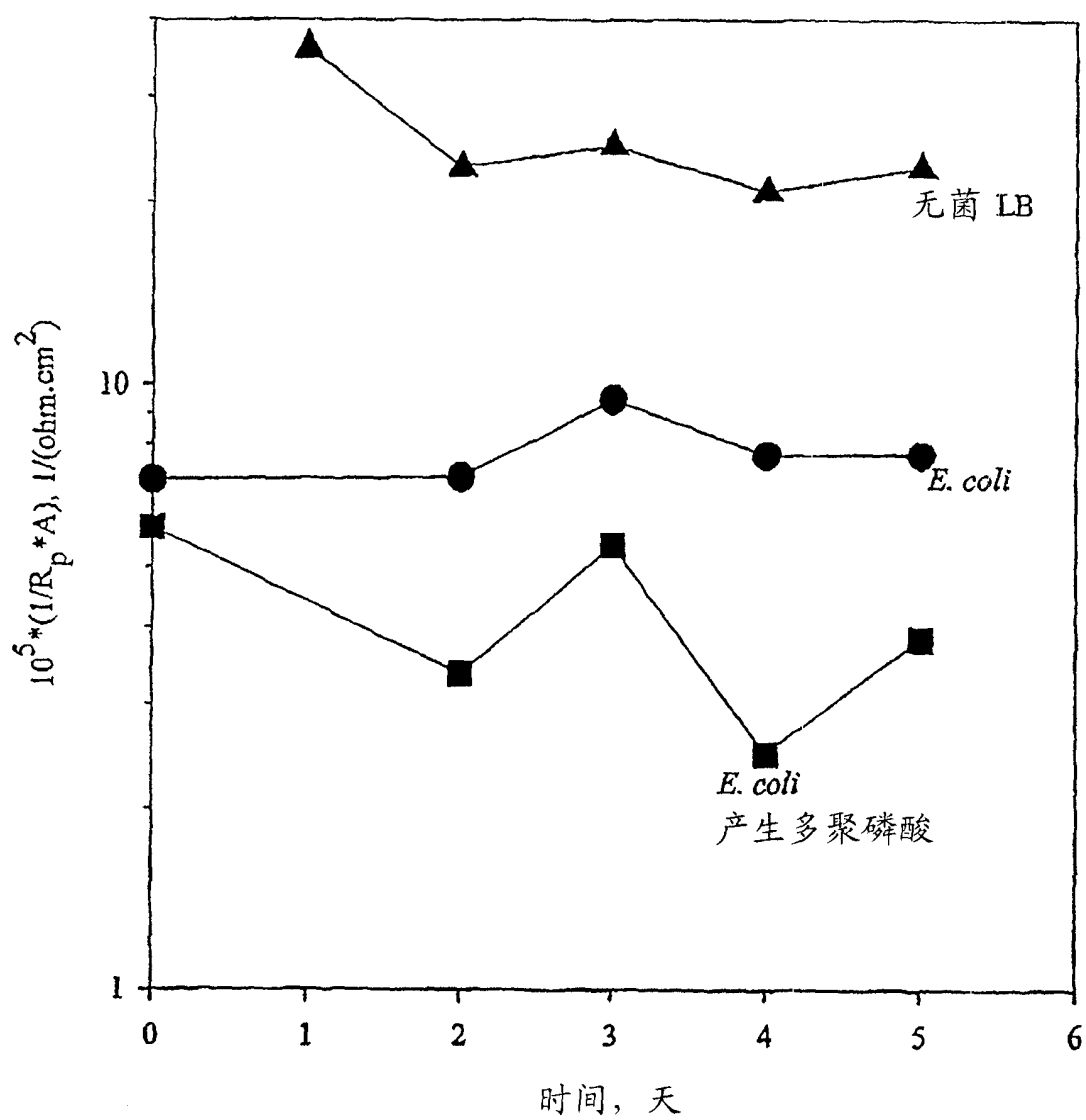


图 17