

Л. М. Пуріш, Л. Г. Асауленко, Д. Р. Абдуліна,
член-кореспондент НАН України Г. О. Іутинська

Характеристика сульфатвідновлювальних бактерій, виділених у теплових мережах

*Показано, що на ділянках Київських міських тепломереж, які експлуатуються у різному температурному режимі, розвиваються сульфатвідновлювальні бактерії, що відрізняються за морфолого-фізіологічними властивостями. На ділянках, що експлуатуються при температурі 35–45 °С, виявлені бактерії роду *Desulfovibrio*, а на ділянках з температурою 60 °С – сульфатвідновлювальні бактерії родів *Desulfotomaculum* та *Desulfomicrobium*. Аналіз даних сиквенсу гена 16S рРНК показав, що нуклеотидна послідовність штаму ТС-3 має 92%-ну гомологію з депонованою у GenBank нуклеотидною послідовністю *Desulfotomaculum* sp. ECP-C-5 (AF529223.1), а нуклеотидна послідовність штаму ТС-4 – 99%-ну подібність до послідовності *Desulfomicrobium baculatum* strain DSM 2555 (AY464939.1). Виявлені бактерії несуть потенційну небезпеку для тепломереж і можуть бути збудниками мікробної корозії.*

У зв'язку із збільшенням техногенного навантаження на підземні комунікації, у тому числі тепломережі, зросла кількість аварій та корозійних пошкоджень на цих об'єктах. Зважаючи на появу фактів, що свідчать про поширення в техногенних екосистемах корозійно небезпечних мікроорганізмів [1–3], набуло актуальності з'ясування участі бактерій у процесі корозії міських тепломереж, адже розвиток бактерій у трубопроводі може призводити не лише до корозії металу, а й до зниження якості води та біообростання трубопровідних систем. В умовах, які характерні для тепломереж, найбільш корозійно небезпечними є бактерії циклу сірки. Основними збудниками корозії сталевих трубопроводів є сульфатвідновлювальні бактерії, які можуть брати безпосередньо участь у електрохімічному процесі [4]. Проте роль цих бактерій у пошкодженні тепломереж залишається майже невивченою.

Мета нашого дослідження полягала у визначенні поширеності сульфатвідновлювальних бактерій на поверхні трубопроводу Київських міських тепломереж і вивченні їх властивостей.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктами дослідження були сульфатвідновлювальні бактерії, виявлені в Київських міських тепломережах на ділянках, що експлуатуються у різному температурному режимі.

Накопичувальні культури бактерій отримували при висіві зразків слизу та продуктів корозії трубопроводів на середовище Постгейта "В" з лактатом натрію. Чисті культури бактерій отримували методом очищення на середовищах, рекомендованих Постгейтом [5]. Здатність до спороутворення перевіряли, прогріваючи суспензії клітин у запаяних ампулах на водяній бані в киплячій воді протягом 10, 20 та 30 хв. Накопичення сірководню визначали методом йодометричного титрування [6].

Для вивчення здатності бактерій засвоювати різні джерела вуглецю, як донори електронів, останні вносили в концентраціях 3,5 г/л (для органічних кислот та спиртів) та 2 г/л (для амінокислот) до середовища Постгейта "В" без дріжджового екстракту. Для визначення використання культурами акцепторів електронів у середовище Постгейта "С", позбавлене сульфатів, вносили сульфат або сульфід чи тіосульфат у концентрації 4,5 г/л.

З метою вивчення морфології бактерій використовували фазово-контрастну мікроскопію (мікроскоп Meiji MT5300H) при збільшенні $\times 1000$ та електронну мікроскопію при збільшенні $\times 6000$. Для електронно-мікроскопічного дослідження клітини фіксували 1,5%-м розчином OsO_4 у 0,2 М какодилатному буфері при рН 7,2 та 4 °С протягом 90 хв. Після фіксації і зневоднювання етанолом клітини переносили в розчин пропіленоксиду на 10–15 хв. Зразки заливали епоксидною смолою Епон 812. Ультратонкі зрізи отримували на мікротомі УМТП-6. Контрастування зрізів проводили спиртовим розчином уренілацетату та цитратом свинцю за методикою Рейнольдса [7]. Зразки переглядали на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 при значенні прискорювальної напруги 75 кВ.

Виділення та очищення ДНК проводили з 7–14-добових культур бактерій за допомогою набору “ДНК Сорб-В” згідно з наданою до нього інструкцією виробника. Ген 16S рРНК ампліфікували за допомогою універсальних праймерів: прямого RNF1 5'-CGG-CCC-AGA-CTC-CTA-CGG-GAG-GCA-GCA-3' та зворотного RNNR2 5'-GCG-TGG-ACT-ACC-AGG-GTA-TCT-AAT-CC-3', за такого режиму ампліфікації: 1 цикл — 5 хв 94 °С, 35 циклів — денатурація ДНК 30 с 94 °С, відпал — 30 с 55 °С, елонгація — 30 с 72 °С). Сиквенс гена проводили на сиквенаторі “3130 Genetic Analyzer” з набором реактивів “BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit”. Пошук гомологічних депонованих у GenBank нуклеотидних послідовностей, які кодують ген 16S рРНК, здійснювали за допомогою програми BLASTN.

Результати та їх обговорення. При обстеженні окремих корозійно небезпечних ділянок трубопроводу та інших об'єктів тепломережі м. Київ відзначено, що труби вкриті слизом та продуктами корозії рудого кольору. Для мікробіологічного дослідження були відібрані зразки на ділянках, що експлуатувались при температурі в діапазоні 35–60 °С.

Сульфатвідновлювальні бактерії виявлені в різній кількості на всіх ділянках тепломережі (табл. 1). Зазначимо, що на ділянках, які експлуатувались при температурі 35–45 °С, титр сульфатвідновлювальних бактерій становив 10^2 – 10^3 кл./мл, а при температурі 60 °С титр бактерій досягав 10^4 – 10^8 кл./мл. Отже, підвищення температури сприяло розвитку сульфатвідновлювальних бактерій.

При обстеженні тепломереж зафіксовано відчутний запах сірководню. Оскільки сірководень є активним корозійним агентом, було досліджено продукування його накопичувальними культурами сульфатвідновлювальних бактерій при температурі в діапазоні від 23 до 60 °С (див. табл. 1). Температурний діапазон був вибраний виходячи з умов експлуатації тепломереж. Виявлено певну залежність між продукуванням сірководню бактеріями і температурою експлуатації ділянок тепломережі. Асоціації бактерій із зразків ТС-1, ТС-2, виділені при температурі 35–45 °С, продукували максимальну кількість сірководню (300–325 мг/мл) при температурі 28–42 °С. Сульфатвідновлювальні бактерії (ТС-3, ТС-4), виділені при температурі 60 °С, збільшували продукування сірководню при підвищенні

Таблиця 1. Титр сульфатвідновлювальних бактерій та продукування сірководню

Зразок	Температура експлуатації, °С	Титр бактерій, кл./мл	Продукування сірководню, мг/л			
			23 °С	28 °С	42 °С	60 °С
ТС-1	40–45	10^2	250	300	260	200
ТС-2	35–40	10^3	280	280	325	250
ТС-3	60	10^8	215	280	400	420
ТС-4	60	10^4	225	240	260	280

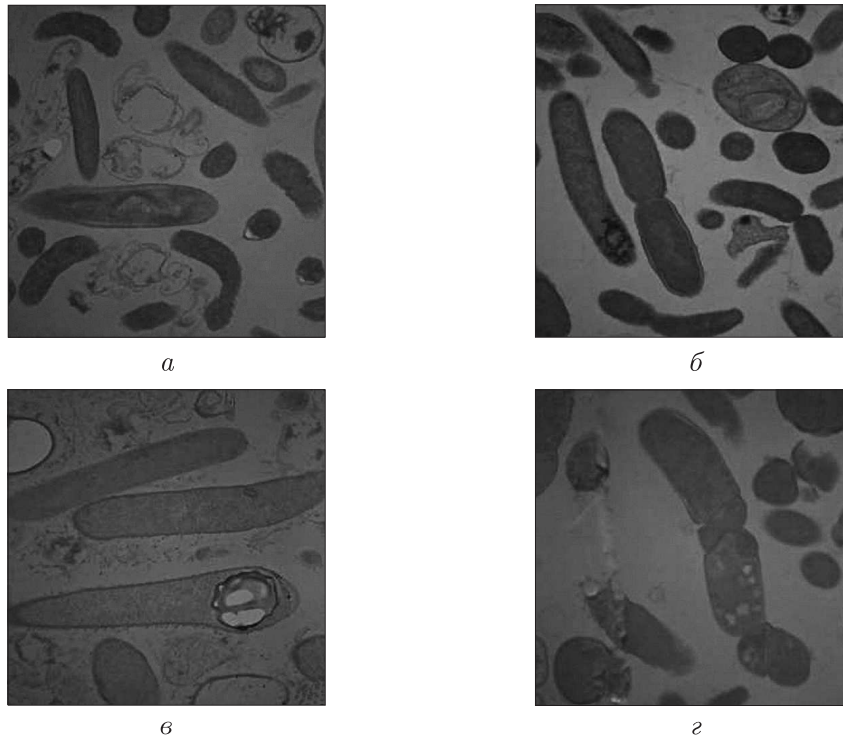


Рис. 1. Клітини культур сульфатвідновлювальних бактерій, електронно-мікроскопічні знімки, збільшення $\times 6000$: а — *Desulfovibrio* sp. шт. ТС-1; б — *Desulfovibrio* sp. шт. ТС-2; в — *Desulfotomaculum* sp. шт. ТС-3; г — *Desulfomicrobium* sp. шт. ТС-4

температури. Найбільшу кількість сірководню накопичувала мікробна асоціація ТС-3 — до 420 мг/мл, що майже на 50% більше, ніж при температурі 23 °С. Така варіабельність продукування сірководню вказує на пристосування сульфатвідновлювальних бактерій до умов існування в тепломережах. Крім того, значне продукування сірководню виділеними сульфатвідновлювальними бактеріями є свідченням їх корозійної агресивності. Біогенний сірководень, реагуючи з іонами заліза, утворює сульфід заліза, який може бути додатковим катодом, що підсилює перебіг електрохімічних процесів на металі [4]. Оскільки виділені асоціації сульфатвідновлювальних бактерій можуть бути потенційними збудниками корозії, становило інтерес більш детально вивчити їх морфологію та фізіологічні властивості. З цією метою з вищевказаних асоціацій були виділені чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій: штами ТС-1, ТС-2, ТС-3, ТС-4.

Мікроскопія препаратів показала, що клітини сульфатвідновлювальних бактерій штаму ТС-1 представлені вібріонами, а штаму ТС-2 — паличками із закругленими кінцями, іноді спареними. Розмір клітин обох штамів варіює у діапазоні $0,5\text{--}0,8 \times 1,5\text{--}3,0$ мкм (рис. 1, а, б). Обидві культури є мезофілами, грамнегативними, факультативними анаеробами, спор не утворюють. Штами ТС-1 та ТС-2 практично не відрізняються за фізіологічними властивостями, джерелами вуглецю та акцепторами електронів. Як донори електронів можуть використовувати лактат, етанол, бутанол, ацетат, сукцинат, піруват тощо, як акцептори електронів — сульфат, сульфід та тіосульфат. За морфологічними та фізіологічними ознаками штами сульфатвідновлювальних бактерій ТС-1 та ТС-2, згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [8], близькі до роду *Desulfovibrio*.

Сульфатвідновлювальні бактерії штаму ТС-3 представлені паличкоподібними клітинами, здатними до утворення термінально розміщених спор. Розмір клітин варіює в межах $0,9\text{--}1,3 \times 2,5$ мкм (див. рис. 1, в). Культура термотолерантна, грамнегативна, факультативний анаероб. Акцепторами електронів можуть бути сульфат, сульфід та тіосульфат. Як донор електронів використовують лактат, за відсутності останнього можуть споживати етанол, бутанол, ацетат, сукцинат, піруват, аланін, лізин, триптофан, аргінін, фенол. За морфологічними та фізіологічними ознаками штаму сульфатвідновлювальних бактерій ТС-3, згідно з Визначником бактерій Берджі [9], близький до роду *Desulfotomaculum*.

Штам ТС-4 представлений клітинами, що мають сигмоподібну та серпоподібну форму, не утворюють спор. Розмір клітин варіює в межах $0,5\text{--}0,7 \times 0,9\text{--}1,9$ мкм (див. рис. 1, з). Культура термотолерантна, грамнегативна, факультативний анаероб. Акцепторами електронів можуть бути сульфат, сульфід та тіосульфат. Як донор електронів можуть використовувати лактат, етанол, бутанол, ацетат, сукцинат, піруват, аланін, серин, лізин, триптофан, аспарагін. За морфологічними та фізіологічними ознаками, згідно з Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [8], близькі до роду *Desulfomicrobium*.

Зважаючи на те, що термотолерантні сульфатвідновлювальні бактерії штамів ТС-3, ТС-4 продукували значну кількість сірководню, що є ознакою потенційних збудників корозії, ми більш детально вивчали ці культури. Для подальшої ідентифікації та підтвердження даних морфолого-фізіологічного аналізу нами був виконаний частковий сиквенс ділянки ДНК, що кодує ген 16S рРНК, штамів ТС-3 та ТС-4.

За результатами аналізу даних сиквенсу гена 16S рРНК виявилось, що нуклеотидна послідовність штаму ТС-3 має 92%-ну гомологію з депонованою у GenBank нуклеотидною послідовністю *Desulfotomaculum* sp. ECP-C-5 (AF529223.1), а нуклеотидна послідовність штаму ТС-4 — 99%-ну подібність до послідовності *Desulfomicrobium baculatum* strain DSM 2555 (AY464939.1) (табл. 2).

Отже, за допомогою молекулярно-біологічних досліджень було підтверджено спорідненість штаму ТС-3 до роду *Desulfotomaculum*, а штаму ТС-4 — до роду *Desulfomicrobium*.

Таким чином, вперше встановлено, що на ділянках тепломереж, які експлуатуються у різному температурному режимі, розвиваються сульфатвідновлювальні бактерії, що відрізняються за морфолого-фізіологічними властивостями. При цьому на ділянках, що експлуатуються при температурі $35\text{--}45$ °С, виявлені бактерії роду *Desulfovibrio*, а на ділянках з температурою 60 °С — сульфатвідновлювальні бактерії родів *Desulfotomaculum* та *Desulfomicrobium*.

Виявлені бактерії несуть потенційну небезпеку для трубопроводів тепломереж, оскільки можуть бути збудниками мікробної корозії. Особливу засторогу викликає поширення в тепломережах спороутворювальних бактерій роду *Desulfotomaculum*, оскільки вони зберігають життєздатність протягом тривалого часу в широкому діапазоні температур.

Таблиця 2. Ідентифікація бактерій за допомогою видоспецифічної ділянки 16S рРНК

Штам	Довжина ділянки, п. н.	Результати BLASTN-аналізу		
		Подібність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
ТС-3	232	92	<i>Desulfotomaculum</i> sp. ECP-C-5	AF529223.1
		90	<i>Desulfotomaculum</i> sp. DSM 7440	Y11579.1
ТС-4	357	99	<i>Desulfomicrobium baculatum</i> strain DSM 2555	AY464939.1
		99	<i>Desulfomicrobium</i> sp. La1.1	AF228113.1

Вивчення поширеності сульфатвідновлювальних бактерій в техногенних еконішах є перспективним і актуальним, оскільки такі дослідження необхідні для вжиття заходів щодо запобігання їх негативному впливу на комунікації та розробки ефективних методів проти-корозійного захисту.

1. Андреев К. И., Козлова И. П., Коптева Ж. П., Заніна В. В., Піляшенко-Новохатний А. І., Пуріш Л. М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 258 с.
2. Lee W., Lewandowski Z., Nielsen P. H., Hamilton W. A. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review // Biofouling. – 1995. – **8**. – P. 164–194.
3. Розанова Е. П., Дубинина Г. А., Лебедева Е. В. и др. Микроорганизмы в тепловых сетях и внутренняя коррозия стальных трубопроводов // Микробиология. – 2003. – **72**, № 2. – С. 212–220.
4. King R. A., Miller J. D. A. Corrosion by the sulphate-reducing bacteria // Nature. – 1971. – **233**, No 5320. – P. 491–492.
5. Postgate J. R. The sulphate-reducing bacteria. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984. – 208 p.
6. Лурье Ю. Ю. Унифицированные методы анализа вод. – Москва: Химия, 1971. – 194 с.
7. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – **17**. – P. 208–212.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 2nd ed. / Eds. D. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. – New York: Springer, 2005. – Vol. 2, pt. C. – 1388 p.
9. *Определитель* бактерий Берджи: В 2 т.: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – Москва: Мир, 1997. – 432 с.

Інститут мікробіології і вірусології
і.м. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 23.07.2009

L. M. Purish, L. G. Asaulenko, D. R. Abdulina,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **G. O. Iutynskaya**

Characteristic of sulfate-reducing bacteria isolated from heating systems

It is shown that, on the sections of Kiev municipal heating systems which are exploited under conditions of different temperatures, sulfate-reducing bacteria developed. Bacteria were variable by their morphological and physiological properties. The bacteria of Desulfovibrio genus were revealed on the sections which are exploited at 35–40 °C, and bacteria of Desulfomicrobium and Desulfotomaculum genera were revealed on the sections at a higher temperature of 60 °C. Based on the 16S rRNA gene analysis data, it is demonstrated that the sequences of TS-3 and TS-4 clones are related to Desulfotomaculum sp. ECP-C-5 (92% sequence similarity) and to Desulfomicrobium baculatum strain DSM 2555 (99% sequence similarity), respectively. The identified bacteria are potentially dangerous for heating systems and can be the microbial corrosion agent.