



УДК 579.262.541.13.

ХАРАКТЕРИСТИКА СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТЕХНОГЕННИХ ЕКОТОПІВ

Д. Р. Абдуліна¹, К. Г. Тринчук², Л. М. Пуріш¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології НАН України
вул. Заболотного, 154, Київ ДСП 03680, Україна
e-mail: adara@ukr.net

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології"
пр-т Академіка Глушкова, 2, Київ 03022, Україна

Досліджено метаболічну та корозійну активності сульфатвідновлювальних бактерій, виділених із техногенних екотопів. Сульфатвідновлювальні бактерії продукували високі концентрації сірководню (представники роду *Desulfovibrio* – від 430 ± 14 до 475 ± 23 мг/л, роду *Desulfotomaculum* – 410 ± 16 – 460 ± 20 мг/л). Найбільшу кількість цієї сполуки (до 485 ± 24 мг/л) продукував штам *Desulfomicrobium* sp. TC4. Досліджувані сульфатвідновлювальні бактерії є корозійно агресивними. Найбільшу корозійну агресивність проявляли штами, виділені з ґрунту, що прилягав до поверхні труби газопроводу. Швидкості корозії сталі на 5-ту добу експозиції за наявності *Desulfotomaculum* sp. K1/3 та *Desulfovibrio* sp. K2/3 становили $0,1 \pm 0,004$ та $0,09 \pm 0,0031$ г/м²×год, відповідно. За наявності бактерій, виділених у тепломережах, а саме *Desulfotomaculum* sp. TC3 і *Desulfomicrobium* sp. TC4 корозійні пошкодження сталі на 5-ту добу становили $0,086 \pm 0,0035$ і $0,07 \pm 0,0021$ г/м²×год. Колекційний штам *Desulfovibrio vulgaris* 644 на початку експозиції проявляв найменшу корозійну агресивність ($0,047 \pm 0,0023$ г/м²×год), порівняно зі штамми, виділеними з техногенних екотопів. По закінченню експозиції швидкість корозії за дії цього штаму зростала і становила $0,081 \pm 0,0036$ г/м²×год. Відмічено взаємозв'язок між продукуванням сірководню та швидкістю корозії сталі за наявності досліджених штамів бактерій.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, сірководень, мікробна корозія, корозійна агресивність.

ВСТУП

Сульфатвідновлювальні бактерії розповсюджені у біосфері, особливо у різноманітних водоймах (*Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfobulbus*), заболочених ґрунтах, стічних водах (*Desulfotomaculum*), нафтових і газових родовищах (*Desulfotomaculum nigrificans*) [7, 10, 14].

Невід'ємною метаболічною властивістю сульфатвідновлювальних бактерій є продукування біогенного сірководню, наслідком чого є утворення сіркових родовищ, сульфідних покладів металів, лікувальних грязей мінеральних вод і содових озер. У той же час відомо, що сульфатвідновлювальні бактерії відіграють важливу роль у корозії підземних споруд, беручи безпосередню участь у біоелектрохімічних процесах, що відбуваються на поверхні металу [1, 3, 6]. Крім того, сірководень, продукт метаболізму сульфатредукторів, реагуючи з іонами заліза, може утворювати ферум сульфід, який, слугуючи додатковим катодом, підсилює корозійний процес [6].

У наших попередніх дослідженнях встановлено, що в місцях, які перебувають під техногенним навантаженням, зокрема, в місцях прокладення підземних комунікацій, газо- і теплопроводів розвиваються сульфатвідновлювальні бактерії родів *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* і *Desulfomicrobium* [2, 7, 12]. В останні роки з'явилися дані, що корозійна агресивність різних родів сульфатвідновлювальних бактерій дуже варіабельна і може бути у представників одного роду від високої до практично невираженої та залежить від індивідуальних особливостей штаму [4, 5]. Зважаючи на зазначене вище, метою цієї роботи було вивчення метаболічної та корозійної активності сульфатвідновлювальних бактерій, виділених із різних екоотопів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були сульфатвідновлювальні бактерії – *Desulfovibrio* sp. 10 (УКМ В-11503), *Desulfotomaculum* sp. TC3 (УКМ В-11505), *Desulfomicrobium* sp. TC4 (УКМ В-11506), *Desulfotomaculum* sp. K1/3, *Desulfovibrio* sp. K2/3. Штами бактерій ізолювані з різних екоотопів і попередньо ідентифіковані [2, 7, 12]. Зони виділення бактерій наведені у таблиці. Штам *Desulfovibrio vulgaris* 644 (УКМ В-11502) отримано з німецької колекції DSMZ. Бактерії зберігаються в Українській Колекції Мікроорганізмів ІМВ НАН України.

Місця виділення штамів сульфатвідновлювальних бактерій

Sources of isolation of sulfate-reducing bacteria strains

| № | Штам | Місце виділення бактерій |
|----|--|--|
| 1. | <i>Desulfovibrio vulgaris</i> 644 УКМ В-11502 | Ґрунт (колекція DSMZ, Німеччина) |
| 2. | <i>Desulfovibrio</i> sp. 10 УКМ В-11503 | Продукти корозії сталльної арматури ДніпроГЕСу (Запоріжжя) |
| 3. | <i>Desulfovibrio</i> sp. K2/3 | Ґрунт, прилеглий до поверхні труби діючого газопроводу в Карпатах (Івано-Франківська обл.) |
| 4. | <i>Desulfotomaculum</i> sp. K1/3 | |
| 5. | <i>Desulfotomaculum</i> sp. TC3 УКМ В-11505 | Продукти корозії та слизу з поверхні труб і з'єднувальних конструкцій тепломереж (Київ) |
| 6. | <i>Desulfomicrobium</i> sp. TC4 УКМ В-11506 | |

Дослідження метаболічної та корозійної активності сульфатвідновлювальних бактерій проводили в умовах лабораторного досліду у флаконах об'ємом 50 мл, заповнених рідким поживним середовищем Постгейта "В", інокульованим відповід-

ними штамми сульфатвідновлювальних бактерій. Кількість інокуляту становила 10 % від загального об'єму середовища. У флакони підвішували на волосіні стерильні зразки сталі КП-08 розміром 48×15×2 мм, попередньо зважені та оброблені 6н H₂SO₄ для зняття оксидних плівок і активації електрохімічних процесів [13]. Флакони герметично закривали гумовими пробками і стаціонарно культивували за температури 28 °С. Тривалість експозиції становила 5, 8, 11, 14 діб. Після певного терміну експозиції відповідні флакони вилучали та визначали такі показники: продукування біомаси (за білком), продукування сірководню та швидкість корозії сталевих зразків. Вміст клітинного білка визначали методом Лоурі, накопичення сірководню в середовищі – методом йодометричного титрування [9]. Про корозійну агресивність бактерій судили по зменшенню маси сталі порівняно з початковою на одиницю площі поверхні сталеві пластини за одиницю часу. Як контроль використовували стерильне середовище Постгейта "В", у яке були занурені сталеві пластинки [11].

Досліди проводили у 3-х повторностях. Результати представлені як середнє значення ± стандартне відхилення. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Microsoft Office Excel 2010, використовуючи критерій Стьюдента (дані статистично достовірні при p≤0,05).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Результатом розвитку та метаболічної активності сульфатвідновлювальних бактерій є накопичення біомаси, а саме продукування білка. Встановлено, що упродовж експозиції досліджувані штами сульфатвідновлювальних бактерій продукували значну кількість білка (рис. 1).

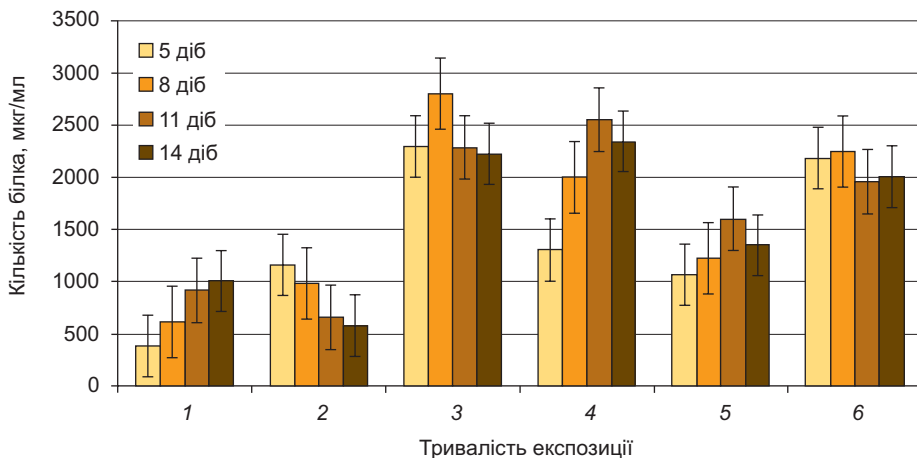


Рис. 1. Продукування білка сульфатвідновлювальними бактеріями: 1 – *Desulfovibrio vulgaris* 644; 2 – *Desulfovibrio* sp. 10; 3 – *Desulfovibrio* sp. K2/3; 4 – *Desulfotomaculum* sp. K1/3; 5 – *Desulfotomaculum* sp. TC3; 6 – *Desulfomicrobium* sp. TC4

Fig. 1. Protein synthesis by sulfate-reducing bacteria: 1 – *Desulfovibrio vulgaris* 644; 2 – *Desulfovibrio* sp. 10; 3 – *Desulfovibrio* sp. K2/3; 4 – *Desulfotomaculum* sp. K1/3; 5 – *Desulfotomaculum* sp. TC3; 6 – *Desulfomicrobium* sp. TC4

Найінтенсивніше розвивались культури *Desulfovibrio* sp. K2/3 та *Desulfotomaculum* sp. K1/3, виділені з ґрунту, прилеглого до поверхні труби газопроводу в Карпатах. Штам *Desulfovibrio* sp. K2/3 накопичував максимальну кількість білка на 8-му,

а *Desulfotomaculum* sp. K1/3 – на 11-ту добу культивування (2800 ± 120 мкг/мл та 2500 ± 125 мкг/мл, відповідно).

Сульфатвідновлювальні бактерії, виявлені на поверхні труб тепломереж, продукували значну кількість білка протягом усієї тривалості експозиції, також досягаючи максимальної кількості на 8-му та 11-ту доби культивування. Штам *Desulfotomaculum* sp. TC3 продукував 1600 ± 80 мкг/мл білка, а *Desulfomicrobium* sp. TC4 – 2250 ± 100 мкг/мл білка. Штам *Desulfovibrio* sp. 10, ізольований з пошкодженої арматури, та колекційний штам *Desulfovibrio vulgaris* 644 розвивались менш активно.

Важливим фактором біогеохімічної активності сульфатвідновлювальних бактерій є сірководень, що продукується бактеріями у процесі дисимільаторної сульфатредукції, а саме сульфідогенезу. Відомо, що наявність у середовищі сірководню може значно прискорювати розчинення заліза, тобто анодний процес корозії [1, 8]. Тому вважали за доцільне провести порівняльне дослідження здатності до продукування сірководню сульфатвідновлювальними бактеріями, виділеними з різних техногенних зон.

Для усіх штамів сульфатвідновлювальних бактерій, незалежно від місця виявлення, було властиве високе продукування сірководню. Дані наведені на рис. 2.

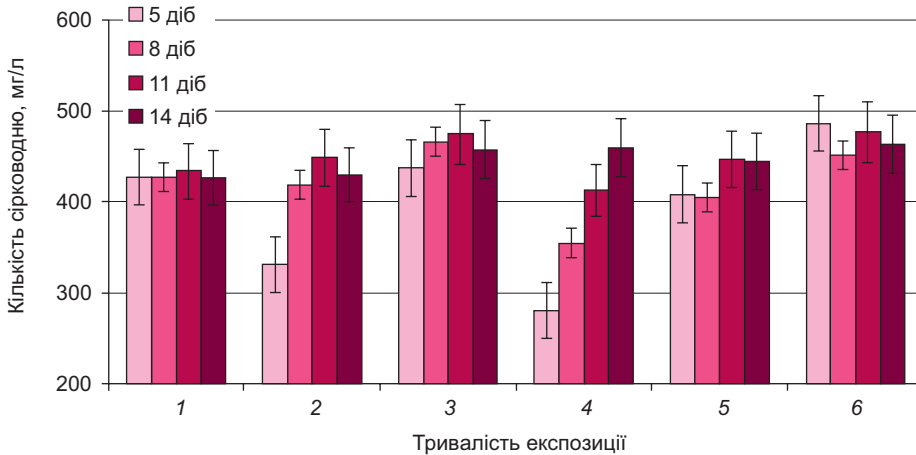


Рис. 2. Продукування сірководню сульфатвідновлювальними бактеріями: 1 – *Desulfovibrio vulgaris* 644; 2 – *Desulfovibrio* sp. 10; 3 – *Desulfovibrio* sp. K2/3; 4 – *Desulfotomaculum* sp. K1/3; 5 – *Desulfotomaculum* sp. TC3; 6 – *Desulfomicrobium* sp. TC4

Fig. 2. Hydrogen sulfide synthesis by sulfate-reducing bacteria: 1 – *Desulfovibrio vulgaris* 644; 2 – *Desulfovibrio* sp. 10; 3 – *Desulfovibrio* sp. K2/3; 4 – *Desulfotomaculum* sp. K1/3; 5 – *Desulfotomaculum* sp. TC3; 6 – *Desulfomicrobium* sp. TC4

Штами *Desulfovibrio vulgaris* 644, *Desulfovibrio* sp. 10 та *Desulfovibrio* sp. K2/3 продукували 430 ± 14 та 475 ± 23 мг/л сірководню упродовж терміну експозиції. Бактерії роду *Desulfotomaculum* максимальну кількість сірководню накопичували на 14-ту добу культивування – 410 ± 16 – 460 ± 20 мг/л. Серед відібраних штамів найбільшу кількість сірководню вже на 5-ту добу культивування продукував штам *Desulfomicrobium* sp. TC4 – 485 ± 24 мг/л.

Згідно з даними літератури, кількість сірководню, що продукують сульфатвідновлювальні бактерії, в середньому, становить від 250 до 300 мг/л [11, 12]. Оскільки сульфатвідновлювальні бактерії, виділені з техногенних екотопів, продукували

значно більше сірководню, можна припустити, що їм притаманна висока як метаболічна, так і корозійна активність.

Установлено, що найбільшу корозійну агресивність проявляли штами *Desulfovibrio* sp. K2/3 та *Desulfotomaculum* sp. K1/3, виділені з ґрунту, що прилягав до поверхні труби газопроводу (рис. 3). Після 5 діб експозиції за наявності вищевказаних бактерій швидкість корозії сталевих зразків була $0,09 \pm 0,0031$ та $0,1 \pm 0,004$ г/м²×год, відповідно. На 14-ту добу експозиції за наявності *Desulfotomaculum* sp. K1/3 швидкість корозії сталі знижувалася майже на 45 %, а за дії штаму *Desulfovibrio* sp. K2/3 на 63 %, порівняно з початковою.

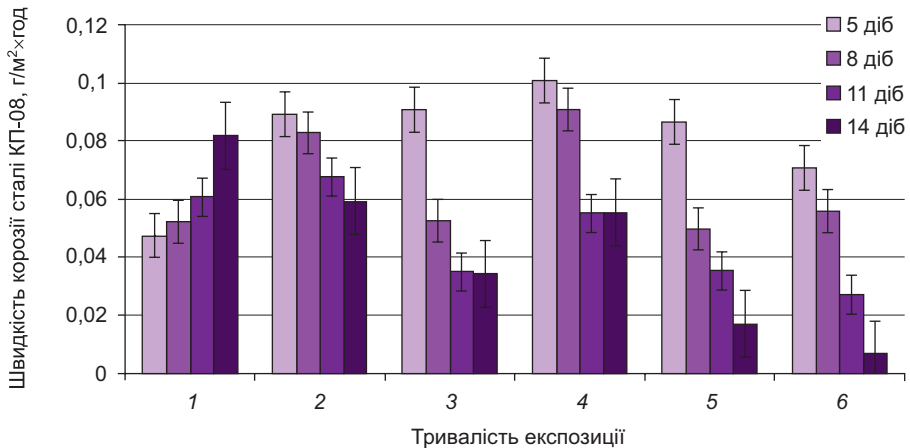


Рис. 3. Зміни швидкості корозії сталі марки КП-08 досліджуваних штамів сульфатвідновлювальних бактерій: 1 – *Desulfovibrio vulgaris* 644; 2 – *Desulfovibrio* sp. 10; 3 – *Desulfovibrio* sp. K2/3; 4 – *Desulfotomaculum* sp. K1/3; 5 – *Desulfotomaculum* sp. TC3; 6 – *Desulfomicrobium* sp. TC4

Fig. 3. Changes of corrosion rate of steel KP-08 under the influence of sulfate-reducing bacteria: 1 – *Desulfovibrio vulgaris* 644; 2 – *Desulfovibrio* sp. 10; 3 – *Desulfovibrio* sp. K2/3; 4 – *Desulfotomaculum* sp. K1/3; 5 – *Desulfotomaculum* sp. TC3; 6 – *Desulfomicrobium* sp. TC4

Швидкість корозії сталі за наявності бактерій, виділених у тепломережах, а саме штамів *Desulfotomaculum* sp. TC3 і *Desulfomicrobium* sp. TC4, була високою і становила $0,086 \pm 0,0035$ та $0,07 \pm 0,0021$ г/м²×год, але з закінченням експозиції істотно знижувалась на 80–90 %. На нашу думку, таке зниження швидкості корозії сталі може бути обумовлене утворенням на поверхні сталевих зразків щільної плівки ферум сульфїду, яка проявляє на цьому етапі захисні властивості. З часом сульфїдна плівка може порушуватися, що призводить до корозійних руйнувань (наприклад, для *Desulfovibrio* sp. 10), або зберігатися цілісною і суттєво зменшувати швидкість корозії (як для *Desulfotomaculum* sp. TC3 і *Desulfomicrobium* sp. TC4).

Відомо, що ферум сульфїд стимулює анодний корозійний процес. Зважаючи на те, що саме *Desulfotomaculum* sp. K1/3 та *Desulfovibrio* sp. K2/3 продукували значну кількість сірководню і проявляли найбільшу корозійну агресивність, можемо припустити, що корозія сталі за дії цих штамів відбувається за механізмом анодної деполаризації [1, 8].

Швидкість корозії сталі, обумовлена дією колекційного штаму *Desulfovibrio vulgaris* 644, зростала упродовж усієї тривалості експозиції, досягаючи на 14-ту добу $0,081 \pm 0,0036$ г/м²×год. Можливо, корозійний процес за наявності цього штаму відбувається за механізмом катодної деполаризації [3, 5, 8].

Порівнюючи швидкість корозії з продукуванням сірководню, можемо припустити, що біокорозія за наявності вищевказаних штамів сульфатвідновлювальних бактерій може відбуватися за різними механізмами: катодної і анодної деполяризації. Вважаємо, що відмінності у корозійних і метаболічних властивостях досліджених штамів обумовлюється їхньою прилежністю до різних родів і ектопами, з яких були виділені сульфатвідновлювальні бактерії.

ВИСНОВКИ

Сульфатвідновлювальним бактеріям, виділеним із техногенних ектопів, власне значне продукування сірководню та висока корозійна агресивність. Встановлено взаємозв'язок між продукуванням сірководню та швидкістю корозії сталі за наявності досліджених штамів бактерій.

1. *Andreyuk E.I., Kozlova I.A., Kopteva Zh.P.* et al. **Microbial corrosion of underground constructions**. Kyiv: Naukova Dumka, 2005. 260 p. (In Ukrainian).
2. *Asaulenko L.G., Purish L.M., Abdulina D.R.* Taxonomic position of certain representatives of sulfidogenic corrosive microbial community. **Mikrobiologichny Zhurnal**, 2010; 72(4): 3–10. (In Ukrainian).
3. *Booth G.H.* Microbiological corrosion. London: Mills and Boon Limited, 1971. 63 p.
4. *Cordas C.M., Guerra L.T., Xavier C., Moura J.G.* Electroactive biofilms of sulphate-reducing bacteria. **Electrochimica Acta**, 2008; 54(1): 29–34.
5. *Enning D., Garrelfs J.* Corrosion of Iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. **Applied and Environmental Microbiology**. 2014; 80(4): 1226–1236.
6. *Hamilton W.A.* Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. **Ann. Rev. Microbiol.**, 1985; 39: 195–217.
7. *Iutynska G.A., Purish L.M., Abdulina D.R.* **Corrosive-relevant sulfidogenic microbial communities of man-caused ecotopes**. Lambert Academic Publishing. 2014. 173 p. (In Russian).
8. *Iverson W.P.* Microbiological corrosion. **Corros Prev. Cont.**, 1969; 16(1): 15–19.
9. *Lur'e Yu. Yu.* **Standardized methods for water analysis**. Moscow: Khimiya, 1971. 194 p. (In Russian).
10. *Nazina T.N., Shestakova N.N., Grigor'yan A.A.* et al. Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang Oil Field (P.R. China). **Microbiology**, 2006; 75(1): 55–66. (In Russian).
11. *Purish L.M., Asaulenko L.G., Abdulina D.R.* et al. Role of polymer complexes in the formation of biofilms by corrosive bacteria on steel surfaces. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 2012; 48(3): 262–269. (In Russian).
12. *Purish L.M., Asaulenko L.G., Abdulina D.R., Iutynska G.A.* Biodiversity of sulphate-reducing bacteria growing on object of heating system. **Mikrobiologichny Zhurnal**, 2014; 76(3): 11–17. (In Russian).
13. *Shrayer L.L.* **Corrosion: a handbook**. Moscow: Metalurgiya, 1981. 72–79 p. (In Russian).
14. *Torres-Sanchez R., García-Vargas J., Alfonso-Alonso A., Martínez-Gómez L.* Corrosion of AISI 304 stainless steel induced by thermophilic sulfate-reducing bacteria (SRB) from a geothermal power unit. **Mater. Corros**, 2001; 52(8): 614–618.

CHARACTERISTICS OF SULFATE-REDUCING BACTERIA ISOLATED FROM TECHNOGENIC ECOTOPES

D. R. Abdulina¹, K. G. Trynchuk², L. M. Purish¹

¹ *Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
154, Zabolotny St., Kyiv D03680, Ukraine
e-mail: adara@ukr.net*

² *ESC Institute of Biology, Taras Shevchenko National University of Kyiv
2, Glushkov Ave., Kyiv 03022, Ukraine*

The metabolic and corrosion activity of sulfate-reducing bacteria isolated from technogenic ecotopes was investigated. The sulfate-reducing bacteria had significant hydrogen sulfide production (representatives of *Desulfovibrio* genus had synthesized hydrogen sulfide up to 430 ± 14 – 475 ± 23 mg/L, *Desulfotomaculum* genus – 410 ± 16 – 460 ± 20 mg/L. Strain *Desulfomicrobium* sp. TC4 had the highest production of this compound (485 ± 24 mg/L). Investigated sulfate-reducing bacteria were corrosive-relevant. The most corrosive bacteria were isolated from soils near the surface of the gas main pipeline. Under the action of *Desulfotomaculum* sp. K1/3 and *Desulfovibrio* sp. K2/3 corrosion rates of the steel coupons were 0.1 ± 0.004 and 0.09 ± 0.0031 g/m²×hour, respectively at 5 exposition day. Under the action of *Desulfotomaculum* sp. TC3 and *Desulfomicrobium* sp. TC4 strains isolated from heating systems corrosion rates were 0.086 ± 0.0035 and 0.07 ± 0.0021 g/m²×hour, respectively. Collection strain *Desulfovibrio vulgaris* 644 had the smallest corrosion rate (0.047 ± 0.0023 g/m²×hour) among investigated bacteria from technogenic ecotopes. Corrosion rate is significantly increased to 0.081 ± 0.0036 g/m²×hour during the exposition period. Correlation was noted between hydrogen sulfide production and corrosion activity of investigated sulfate-reducing bacterial strains.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, hydrogen sulfide, microbial corrosion, corrosive aggressiveness.

ХАРАКТЕРИСТИКА СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Д. Р. Абдулина¹, К. Г. Тринчук², Л. М. Пуриш¹

¹ *Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
ул. Заболотного, 154, Киев ГСП Д03680, Украина
e-mail: adara@ukr.net*

² *Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко
ННЦ “Институт биологии”, пр-т Академика Глушкова, 2, Киев 03022, Украина*

Исследована метаболическая и коррозионная активность сульфатвосстанавливающих бактерий, выделенных из техногенных экотопов. Сульфатвосстанавливающие бактерии продуцировали высокие концентрации сероводорода (представители рода *Desulfovibrio* от 430 ± 14 до 475 ± 23 мг/л, рода *Desulfotomaculum* – 410 ± 16 – 460 ± 20 мг/л). Наибольшее количество этого соединения – до 485 ± 24 мг/л продуцировал штамм *Desulfomicrobium* sp. TC4. Исследуемые сульфатвосстанавливающие бактерии являются коррозионно агрессивными. Наибольшую коррозионную агрес-

сивность проявляли штаммы, выделенные из грунтов, прилегающих к трубе газопровода. Скорости коррозии стали на 5-е сутки экспозиции при наличии *Desulfotomaculum* sp. K1/3 и *Desulfovibrio* sp. K2/3 составляли $0,1\pm 0,004$ и $0,09\pm 0,0031$ г/м²×час, соответственно. В присутствии бактерий, выделенных в теплосетях, а именно *Desulfotomaculum* sp. TC3 и *Desulfomicrobium* sp. TC4 коррозионные разрушения стали на 5-е сутки составляли $0,086\pm 0,0035$ и $0,07\pm 0,0021$ г/м²×час. Коллекционный штамм *Desulfovibrio vulgaris* 644 в начале экспозиции проявлял наименьшую коррозионную агрессивность ($0,047\pm 0,0023$ г/м²×час), сравнительно со штаммами, выделенными из техногенных экотопов. По окончании экспозиции скорость коррозии под действием этого штамма возрастала и составляла $0,081\pm 0,0036$ г/м²×час. Отмечена взаимосвязь между продуцированием сероводорода и скоростью коррозии стали в присутствии исследованных штаммов бактерий.

Ключевые слова: сульфатвосстанавливающие бактерии, сероводород, микробная коррозия, коррозионная агрессивность.

Одержано: 28.01.2015