

УДК 579.23+579.25:631.4

Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка, вул. Гетьмана
Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ КОРОЗІЙНО АКТИВНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ ФЕРОСФЕРИ ГАЗОПРОВОДУ, ПРОКЛАДЕНОГО У ПІЩАНОМУ ГРУНТІ

Метою роботи було комплексне дослідження сульфідогенного угруповання мікроорганізмів феросфери вуличного газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті та визначення його складу. *Методи.* Виявлення та виділення компонентів угруповання бактерій та комплексу мікроскопічних грибів проводили методом граничних розведень при висіві клітинної суспензії на відповідні рідкі елективні середовища. За чисельністю та якісним складом бактерій сульфідогенне угруповання феросфери є корозійно небезпечним. Чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій одержували шляхом багаторазових пересівів окремих колоній на твердому та рідкому середовищах Постгейта «В». *Результати.* Виділено переважальний штам сульфатвідновлювальних бактерій – М-4.1, який охарактеризовано за фенотиповими ознаками та ідентифіковано за методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням універсальних праймерів до фрагментів генів 16S рРНК. При порівнянні секвенсів ділянок ДНК, що кодують ген 16S рРНК досліджуваних бактерій з аналогічними послідовностями штамів із бази даних GenBank штам сульфатвідновлювальних бактерій М-4.1 віднесено до роду *Desulfovibrio*. Мікроскопічні гриби виділяли висіваючи відповідні розведення ґрунтової суспензії в чашки Петрі з агаризованим середовищем Чапека-Докса. Ідентифікацію грибів проводили на основі їх морфолого-культуральних особливостей за визначниками. Ізольовано 78 культур грибів (12 видів 5 родів групи *Anamorphic fungi*). *Висновки.* Таким чином, проведені дослідження показали, що у феросфері на поверхні пошкодженого вуличного газопроводу, за умов піщаного ґрунту формується корозійно небезпечний за чисельністю та видовим складом комплекс фізіологічних груп бактерій та мікроміцетів.

Ключові слова: сульфідогенне мікробне угруповання, мікроміцети, групи *Anamorphic fungi*.

Природне мікробне угруповання ґрунту під впливом антропогенного навантаження зазнає змін, наслідками яких є формування корозійно небезпечного мікробного угруповання у феросфері, яке є важливим чинником

© Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк, 2013



руйнування металів у ґрунті [1]. Процес формування агресивних мікробних сукупностей стимулюється сталевими та залізобетонними конструкціями. При цьому змінюється якісний та кількісний склад мікроорганізмів корозійного угруповання, що сприяє виникненню осередків біокорозії [1, 2]. Багаторічні мікробіологічні дослідження формування агресивного мікробного угруповання у феросфері газо- та нафтопроводів підтверджують, що панівну роль у мікробній корозії сталі відіграють сульфатвідновлювальні бактерії [1, 13]. Мікроскопічні гриби також здатні пошкоджувати захисні покриття і метал трубопроводів [8, 9]. Слід зазначити, що структура ґрунту та глибина залягання трубопроводу визначає швидкість корозії металу, так як від них залежить дифузія кисню. Зокрема, особливості структури піщаного ґрунту, а саме достатня аерація та водопроникність, уможлиблює участь як бактерій, так і мікроскопічних грибів в процесах біопшкодження матеріалів. Саме в таких ґрунтах прокладено більшість вуличних газопроводів у північній частині Чернігівської області.

Дослідження сульфідогенних природних угруповань мікроорганізмів феросфери, що вносять свій вклад у створення екстремальних корозійних ситуацій при експлуатації вуличних газопроводів, прокладених у піщаному ґрунті, є актуальним.

Метою роботи було комплексне дослідження сульфідогенного угруповання мікроорганізмів феросфери піщаного ґрунту та визначення його складу.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було сульфідогенне мікробне угруповання, яке виділене нами із феросфери кородуючої поверхні та ґрунту поза зоною вуличного газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті (с. Малійки, Чернігівського району Чернігівської області). Характеристика підземного газопроводу надана співробітниками ВАТ «Чернігівгаз»: тиск низький; довжина та діаметр труби — 808 м та 159 см відповідно; матеріал труби — сталь 20; глибина укладання від верху труби до поверхні землі — 0,8 м; тип ізоляції — БНІ–ІV; товщина ізоляції — 7,5 мм; питомий електроопір ґрунту — 20 Ом · м. Зразки відібрано згідно до ДСТУ 3291-95 [7]. Ґрунт має такі характеристики: за механічним складом — пісок зв'язний; рН водної витяжки — 7,4; рН сольової витяжки — 6,4; вміст P_2O_5 — 100 мг / кг; K_2O — 30 мг / кг; азоту — 7 мг / кг; кальцію — 2,2 мгекв. / 100 г ґрунту; магнію 0,63 — мгекв. / 100 г ґрунту; вміст загального заліза 1,92%; вміст загальної сірки 4,05%; гумусу — 0,15%; вологість — 9%.

Виявлення та виділення компонентів природного угруповання бактерій та комплексу мікроскопічних грибів проводили методом граничних розведень при висіві клітинної суспензії на відповідні рідкі елективні середовища: сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ) — на середовище Постгейта «В»; залізовідновлювальні бактерії (ЗВБ) — на середовище Каліненка; денітрифікувальні бактерії (ДНБ) — на середовище Гільтая;



амоніфікувальні бактерії (АМБ) — на м'ясопептонний бульйон; мікроміцети — на агаризоване середовище Чапека-Докса (АЧД). Чисельність бактерій перераховували на 1 г абсолютно сухого ґрунту.

Чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій одержували шляхом багаторазових пересівів окремих колоній на твердому та рідкому середовищах Постгейта «В». Очищення культури контролювали мікроскопічно та висівом на середовище для виявлення кластридальних бактерій, які викликають бродіння, такого складу (г /л): пептон — 4; глюкоза — 10; Na_2SO_4 — 2; MgSO_4 — 1; агар — 15. Додатки, що стерелізували окремо, вносили безпосередньо перед використанням: сіль Мора (5% р-н солі Мора в 1% HCl) — 10 мл; 1% Na_2S — 2 мл.

Мікроскопічні гриби виділяли, застосовуючи метод ґрунтових розведень. Розведення ґрунтової суспензії висівали в чашки Петрі з АЧД. Після появи на чашках видимого росту мікроміцетів морфологічно різні колонії висівали на скошене АЧД [10]. Ідентифікацію грибів проводили на основі їх морфолого-культуральних особливостей, використовуючи визначники [4–6].

Морфотип бактерій у сульфідогенному природному угрупованні (після фіксації та забарвлення фуксином) та мікроскопічних грибів досліджували за допомогою оптичного мікроскопу (Ч1050) Мікромед-1 («ЛОМО», Росія), для монокультури сульфатвідновлювальних бактерій використовували фазово-контрастну мікроскопію (Ч1000, Меїї МТ5300Н). Препарати клітин монокультури забарвлювали для визначення грамнегативних та грампозитивних бактерій [11]. Здатність мікроорганізмів до спороутворення перевіряли шляхом нагрівання суспензії клітин у запаяних ампулах на водяній бані при температурі 80° протягом 10, 20, 30 хвилин з наступним висівом на поживне середовище Постгейта «В».

Молекулярно-генетичний аналіз генів 16S рРНК здійснювали згідно з [3].

Результати та їх обговорення

Мікробіологічне дослідження зразків ґрунту та феросфери виявило мікробне угруповання, до складу якого входять сульфатвідновлювальні, залізовідновлювальні, денітрифікувальні, амоніфікувальні бактерії та мікроскопічні гриби (рис. 1).

Чисельність сульфатвідновлювальних, залізовідновлювальних та денітрифікувальних бактерій у феросфері перевищує таку у ґрунті: СВБ (переважальна група) та ДНБ — на 2 порядки; ЗВБ — на порядок. Останні сприяють відновленню Fe (III) до Fe (II), накопичення якого знижує окисно-відновний потенціал, що сприяє розвитку як СВБ, так і ДНБ. Гетеротрофні асоціанти — амоніфікувальні бактерії забезпечують створення анаеробних умов. Все це призводить до розвитку та підвищення активності сульфатвідновлювальних бактерій [1, 2].



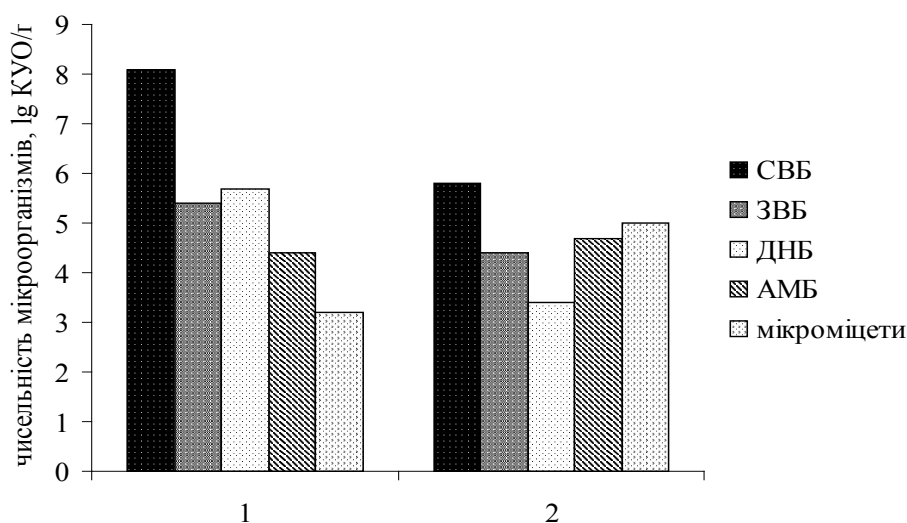


Рис. 1. Чисельність еколого-фізіологічних груп бактерій та мікроскопічних грибів сульфідогенного природного угруповання у феросфері (1) та у зразку ґрунту (2)

Fig. 1. Number of ecology-physiological groups of bacteria and microscopic fungi of sulfidogenic microbial community of ferrosphere (1) and soils (2)

Чисельність амоніфікувальних бактерій у ґрунті в 2 рази більша ($5,0 \times 10^4$ кл /г) ніж у феросфері ($2,5 \times 10^4$ кл /г). Досить висока кількість амоніфікувальних бактерій у ґрунті може свідчити про наявність у ґрунті доступних джерел Карбону та Нітрогену. Розвиток АМБ у феросфері може пригнічуватися інтенсивним розвитком інших членів корозійного угруповання, зокрема СВБ та ЗВБ, оскільки залежно від екологічних умов та наявності джерел живлення в угрупованні відбувається послідовна зміна переважальних груп мікроорганізмів під час перебігу процесу руйнування металу. Таким чином, за чисельністю та якісним складом бактерій сульфідогенне угруповання феросфери можна віднести до корозійно небезпечного [1].

Нами виділено штам сульфатвідновлювальних бактерій М-4.1 — переважального компонента угруповання феросфери. Визначено морфотип бактерій монокультури: короткі палички з заокругленими кінцями.

Бактерії мезофільні, грамнегативні, факультативні анаероби, спор не утворюють (табл. 1).

Для визначення родової належності штаму М-4.1 було проведено ідентифікацію із використанням методу полімеразної ланцюгової реакції. Одержано і секвеновано ампліфіканти гена 16S рРНК. За допомогою програми BLASTN порівняно нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК штаму М-4.1 з такими у бактерій роду *Desulfovibrio* з банку нуклеотидних послідовностей GenBank. Встановлено 100 % гомологію з

депонованою послідовністю *Desulfovibrio* sp. H1 (FJ225426.1) та 92 % — з послідовністю *Desulfovibrio* sp. SM12803 (AJ251630.1) табл. 2. Таким чином, підтверджено належність штаму М-4.1 до роду *Desulfovibrio*.

Таблиця 1

Характеристика штаму М-4.1

Table 1

The characteristic of strain M-4.1

Ознака	Характеристика ознаки	Наявність(+) чи відсутність (-) ознаки
Морфологія клітин	Забарвлення за Грамом	грамнегативні
	Форма клітин	Короткі палички з заокругленими кінцями
	Рухливість	+
	Спороутворення	—
Ріст за температури, °С	20	+
	30	++
	40	+
	50	—
Ріст за присутності NaCl, %	3	+
	5	—
Відношення до кисню	Відношення до кисню	Факультативний анаероб

Примітка: «+» — наявність ознаки; «—» — відсутність ознаки.

Note: «+» — presence of characteristic; «—» — absence of characteristic.

Особливістю дослідженого мікробного угруповання піщаного ґрунту та феросфери є наявність мікроскопічних грибів, які можуть брати участь у процесах біопшкодження бітумного покриття та біокорозії сталі [8]. Нами встановлено, що чисельність мікроміцетів у зразках ґрунту $[(9,3 \pm 0,6) \times 10^4$ КУО /г] більша у 55 разів $[(1,7 \pm 0,2) \times 10^3$ КУО /г] ніж у феросфері. Поширення мікроскопічних грибів зумовлено особливостями піщаного ґрунту, які створюють сприятливі умови для їх функціонування у комплексі з бактеріями. До того ж, бітумні покриття, що використовуються для захисту підземних споруд можуть бути додатковим джерелом живлення для мікроміцетів. Наявність мікроскопічних грибів у відібраних зразках свідчить про їх участь в процесах біопшкодження покриття та сталі завдяки оксидазному комплексу ферментів [9]. Тому актуально було дослідити видовий склад комплексу мікроскопічних грибів, що входять до складу корозійного мікробного угруповання і можуть бути його активним компонентом.



Таблиця 2

Визначення гомології гена 16S рРНК штаму М-4.1

Table 2

Determination of homology 16s rRNA gene of strain M-4.1

Довжина фрагменту гена, пн	Результати BLASTN-аналізу		
	Подібність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
436	100%	Desulfovibrio sp. H1	FJ225426.1
	92%	Desulfovibrio sp. SM12803	AJ251630.1

Ізольовано 78 культур грибів, які після ідентифікації [4–6] віднесено до 12 видів 5 родів групи *Anamorphic fungi* (табл. 3).

Таблиця 3

Видовий склад комплексу мікроскопічних грибів

Table 3

Specific composition of complex of microfungi

Вид	Ґрунт	Феросфера
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) von Keissl.	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) Cohn	+	+
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	–	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	+	–
<i>Cladosporium</i> sp.	+	–
<i>Penicillium corylophyllum</i> Dierckx	+	–
<i>P. cyclopium</i> Westl.	+	–
<i>P. chrysogenum</i> Thom	–	+
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	+	–
<i>Penicillium</i> sp.	+	–
<i>Fusarium oxysporum</i> (Schlecht.) Snyd. et Hans	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	–	–

Примітка: «+» — наявність виду; «–» — вид не виявлено

Note: «+» — presence of the species; «–» — the species is not found.



Видове представництво мікроміцетів у ґрунті різноманітніше ніж у феросфері. Зокрема, у ґрунті ідентифіковано 9 видів (відносяться до 5 родів), а у феросфері — 5 видів (відносяться до 4 родів). У ґрунті та феросфері зустрічаються *Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae* та *Fusarium oxysporum*. Для ґрунту спостерігається найбільше видове різноманіття представників роду *Penicillium*.

Таким чином, у феросфері на поверхні пошкодженого вуличного газопроводу, за умов піщаного ґрунту формується корозійно небезпечний за чисельністю та видовим складом комплекс фізіологічних груп бактерій та мікроміцетів. Наявність мікроскопічних грибів родів *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* у ґрунті і феросфері може слугувати додатковою характеристикою, важливою у прогнозуванні агресивності ґрунтів та розробці ефективних засобів захисту підземних споруд.

Н.Р. Демченко, И.Н. Курмакова, А.П. Третяк

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,
ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ КОРРОЗИОННО АКТИВНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ФЕРРОСФЕРЫ ГАЗОПРОВОДА, ПРОЛОЖЕННОГО В ПЕСЧАНОМ ГРУНТЕ

Реферат

Целью работы было комплексное исследование сульфидогенного сообщества микроорганизмов ферросферы уличного газопровода, проложенного в песчаном грунте и определение его состава. **Методы.** Обнаружение и выделение компонентов сообщества бактерий и комплекса микроскопических грибов проводили методом предельных разведений, высевая суспензию клеток на соответствующие жидкие селективные среды. По количественному и качественному составу бактерий сульфидогенное сообщество ферросферы является коррозийно опасным. Чистые культуры сульфатовосстанавливающих бактерий получали путем многочисленных посевов отдельных колоний на твердой и жидкой средах Постгейта «В». **Результаты.** Выделен доминирующий штамм сульфатовосстанавливающих бактерий — М-4.1, который охарактеризован по морфолого-культуральным признакам и идентифицирован методом полимеразной цепной реакции с использованием универсальных праймеров к фрагментам генов 16S рРНК. При сравнительном анализе секвенсов участков ДНК, которые кодируют ген 16S рРНК исследуемых бактерий с аналогичными последовательностями штаммов из базы данных GenBank, штамм сульфатовосстанавливающих бактерий М-4.1 отнесен к роду *Desulfovibrio*. Микроскопические грибы выделяли посевом соответствующих разведений ґрунтовой суспензии



в чашки Петри с агаризованной средой Чапека-Докса. Идентификацию грибов проводили на основе их морфолого-культуральных особенностей, используя определители. Изолировано 78 культур микромицетов, которые отнесены к 12 видам 5 родам группы *Anamorphic fungi*. **Выводы.** Таким образом, проведенные исследования показали, что в ферросфере на поверхности поврежденного уличного газопровода, в условиях песчаного грунта формируется коррозионно опасный по численности и видовому составу комплекс физиологических групп бактерий и микромицетов.

Ключевые слова: сульфидогенное микробное сообщество, микромицеты группы *Anamorphic fungi*.

N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, A.P. Tretiak

Chernihiv Shevchenko State Pedagogical University,
53, Getman Polubotok Str., Chernihiv, 14013, Ukraine,
tel.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

FEATURES OF CORROSION ACTIVITY OF MICROBIAL COMMUNITIES OF GAS-PIPELINE FERROSPHERE LAID IN SANDY SOIL

Summary

Aim. To study the sulfidogenic microbial communities road gas-pipeline ferrospheres laid in the sandy soil and the determination of its composition was the aim of this research work. **Methods.** The method of limiting dilution (plating cell suspension to appropriate liquid selection medium) was used for detection and isolation of the components of communities of bacteria and microscopic fungi complex. Due to quantitative and qualitative composition, sulfidogenic community of ferrospheres in corrosive dangerous. Pure cultures of sulfate-reducing bacteria were obtained by planting numerous individual colonies on solid and liquid medium Postgate «B». **Results.** The dominant strain of sulfate-reducing bacteria — M-4.1 described by morphological and cultural characteristics has been isolated and identified by using PCR, with the use of universal primers to the fragments of 16S rRNA genes. When conducting a comparative analysis of DNA sequencer which encodes 16S rRNA gene of tested bacteria with the strains of similar sequences from the GenBank database, sulfate reducing bacteria strain M-4.1 belonging to *Desulfovibrio* genus has been confirmed. Microfungi were isolated by planting soil suspension dilutions with agar Czapek-Dox in Petri dishes. Fungal identification was carried out on the basis of their morphological and cultural features using determinants. 78 microfungi cultures belonging to *Anamorphic fungi* group (12 species of 5 genera), have been isolated. **Conclusions.** Thus, this scientific study has shown that in the ferrospheres on the surface of damaged road gas-pipeline laid in the



sandy soil the corrosion dangerous abundance and species composition of complex physiological bacteria group and micromycetes is formed.

Key words: sulfidogenic microbial community, microfungi of *Anamorphic fungi* group.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев К.І., Козлова І.П., Коптева Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуриш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. — Київ: Наук. думка, 2005. — 259 с.
2. Абдуліна Д.Р. Розповсюдження корозійно агресивних бактерій у ґрунтах різних біотопів / Д. Р. Абдуліна, Л. Г. Асауленко, Л. М. Пуриш // Біологічні студії. — 2011. — Т. 5, № 1. — С. 1–16.
3. Асауленко Л.Г. Таксономічне положення окремих представників сульфідогенного корозійно-агресивного мікробного угруповання / Л.Г. Асауленко, Д. Р. Абдуліна, Л. М. Пуриш // Мікробіол. журн. — 2010. — Т. 72, № 4. — С. 3–10.
4. Билай В.И. Фузарии / Билай В. И. — К.: Наук. думка, 1977. — 442 с.
5. Билай В.И. Аспергиллы / В. И. Билай, Э.З. Коваль — Киев: Наук. думка, 1988. — 204 с.
6. Визначник грибів України / [Морочковський С.Ф., Зерова М.Я., Лавітська З.Г., Сміцька М.Ф.]. — Київ: Наук. думка, 1969. — Т. 2. — 517 с.
7. Єдина система захисту від корозії та старіння. Методи оцінки біокорозійної активності ґрунтів і виявлення наявності мікробної корозії на поверхні підземних металевих споруд : ДСТУ 3291-95. — [Чинний від 1997-01-01]. — К. : Держстандарт України, 1997. — 28 с. — (Держстандарт України).
8. Микодеструкторы промышленных материалов / Коваль Э.З., Сидоренко Л.П.; Отв. ред. Билай В. И.; АН УССР. Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. — Киев: Наук. думка, 1989. — 192 с.
9. Герасименко А.А. Микробиотная коррозия металлов. II. Коррозионные электрохимические исследования. Электронная микроскопия. Механизм / А.А. Герасименко // Защита металлов. — 1998. — Т. 34, № 4. — С. 350–359.
10. Методы экспериментальной микологии: Справочник. — Киев: Наук. думка. — 1982. — 550 с.
11. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. — М.: Изд-во Моск. ун-та., 1976. — 306 с.
12. Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н.А. — М: Издательство МГУ, 2002. — 120 с.
13. Hamilton W. A. Sulfate-reducing bacteria and anaerobic corrosion / W.A. Hamilton // Ann. Rev. Microbiol. — 1985. — Vol. 39. — P. 195–217.

Стаття надійшла до редакції 04.07.2013.

