

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»


Кафедра морфологии и экологии животных

**БАКТЕРИООБРАСТАНИЕ В СИСТЕМЕ ТЕХНИЧЕСКОГО
ВОДОСНАБЖЕНИЯ АЭС**


АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 242 группы
направления 06.04.01 Биология
биологического факультета
Кириловой Анны Вячеславовны

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук


_____ М.Ю. Воронин

Заведующий кафедрой:
профессор, док. биол. наук


_____ Г.В. Шляхтин

Саратов 2019

Введение

Биообрастания являются разновидностью развивающейся в воде биопленки. Они развиваются на поверхностях труб, насосов и на погруженных в воду поверхностях ёмкостей и технологического оборудования. В системе водоснабжения они ухудшают качество воды и санитарно-техническое состояние водопроводной сети, забивают сетки, решетки, фильтры и трубы. При биообрастании значительно снижается пропускная способность трубопроводов, ухудшается работа теплообменников, возрастают затраты энергии на перекачку воды [3].

Целью работы было выявление и идентификация микроорганизмов, входящих в состав биопленок и участвующих в процессе биообрастания конструкций в системах технического и оборотного водоснабжения Балаковской и Нововоронежской АЭС. В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:

1. Установить численность микроорганизмов, обитающие в системе технического водоснабжения Балаковской и Нововоронежской АЭС.
2. Идентифицировать микроорганизмы, обитающие в системе технического водоснабжения Балаковской и Нововоронежской АЭС.

Работа изложена на 51 странице машинописного текста и включает 5 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, выводы, список использованных источников, содержащий 35 наименований.

Отбор проб бактериообрастаний с поверхностей водонесущего оборудования осуществляли стандартными методами с использованием стерильных тупферов, предназначенных для взятия образцов биологического материала, с последующей безопасной транспортировкой в лабораторию для проведения анализа в ограниченные сроки.

Пробы с Балаковской АЭС были отобраны на следующих объектах: резервный дизель-генератор 3-го энергоблока (РДЭС-3), насосная станция подпитки пруда-охладителя (НСПО), береговые насосные станции

энергоблока № 3 (БНС-3) и № 4 (БНС-4), машинные залы энергоблока № 3 (МЗ-3) и № 4 (МЗ-4).

Отбор проб с Нововоронежской АЭС проводился в осенний период 2017 г. Пробы с Нововоронежской АЭС были отобраны на следующих объектах: МЗ-5 (гидробокс, установленный в машинном зале энергоблока № 5), БЛ6 (биоотложения на водоочистной машине брызгального бассейна *12URR*), ЦНС-3,4 (гидробокс, установленный в циркуляционной насосной станции энергоблоков №3, 4), БНС-1,2 (гидробокс, установленный в береговой насосной станции энергоблоков №1, 2).

Для получения чистых культур микроорганизмов использовали метод последовательных разведений. Исследуемые пробы титровали до 10^{-4} .

При исследовании проб бактериообрастаний осуществляли глубинный посев в ГРМ-агар – сухой питательный агар для культивирования микроорганизмов. Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24–48 часов. Далее проводили количественный учет выделенных штаммов микроорганизмов и отсеивали их на скошенную среду с целью дальнейшего изучения биохимических свойств, а так же идентификации полученных штаммов.

Также исследовали биохимические свойства выделенных штаммов с целью их дальнейшей идентификации. Для изучения сахаролитических свойств, применяли среды Гисса с добавлением глюкозы, сахарозы, арабинозы, ксилозы, лактозы, мальтозы, сорбита и маннита.

При изучении устойчивости к абиотическим факторам выявляли способность роста штаммов при различных показателях температуры (+10 и +43 °С), рН среды (5, 9, 11) и концентраций NaCl в среде (2, 5, 7, 10, 15 %).

Идентификация проводилась по определителю бактерий Берджи путем анализа 30 фенотипических признаков.

Видовую принадлежность бактерий определяли на основании анализа молекулярных маркеров гена 16S рРНК в ООО «Синтол» (г. Москва).

Основное содержание работы

Результаты исследования бактериообрастания в системе технического водоснабжения Балаковской АЭС.

Всего было исследовано 14 проб в три периода отбора: август, сентябрь, октябрь.

Из биопленок, образуемых на исследуемых металлических конструкциях, выделены грамположительные и грамотрицательные бактерии 8 видов, являющихся сапрофитами, хемоорганотрофами. Микроорганизмы находятся в ассоциациях. Численность микроорганизмов, входящих в состав биопленок и участвующих в процессе биообрастания, была довольно высокой и варьировала от 10^2 до 10^8 микробных клеток в 1 мл (м.к./мл).

В пробах, отобранных в августе 2017 г., обнаружены только неспорообразующие бактерии. Видовое разнообразие представлено 4 видами, относящимися к 3 родам. Во всех пробах присутствуют бактерии рода *Rheinheimera*. Количественные показатели микроорганизмов варьируют от 10^2 до 10^3 микробных клеток в 1 мл. (таблица 1).

Таблица 1 - Видовой состав и количественные показатели (м.к./мл) биообрастаний металлических конструкций в системах технического и оборотного водоснабжения Балаковской АЭС (02.08.2017 г.)

Виды бактерий	Объекты БАЛАЭС					
	МЗ-3	МЗ-4	БНС-3	БНС-4	НСППО	РДЭС
<i>Rheinheimera</i> sp.	10^3	10^3	10^3	10^3	10^2	10^2
<i>Vibrio</i> sp.	10^3	10^3	10^3	-	-	10^3
<i>Rheinheimera chironomi</i>	10^2	10^2	10^2	10^2	-	-
<i>Dietzia maris</i>	-	-	-	10^3	10^3	10^3

Видовой состав микроорганизмов, выделенных в сентябре 2017 г. из биологических пленок, образующихся на металлических конструкциях в

системах технического и оборотного водоснабжения Балаковской АЭС, существенно отличается. Изолировано 4 вида бактерий, среди которых в пробах присутствуют грамположительные спорообразующие палочки рода *Bacillus* и грамотрицательные неспорообразующие палочки родов *Rheinheimera* и *Aeromonas* (таблица 2).

Таблица 2 - Видовой состав и количественные показатели (м.к./мл) биообрастаний металлических конструкций в системах технического водоснабжения БАЛАЭС (06.09.2017 г.)

Виды бактерий	Объекты БАЛАЭС			
	БНС-3	НСППО	РДЭС-3	МЗ-3
<i>Rheinheimera chironomi</i>	10^7	10^7	10^7	10^6
<i>Bacillus halotolerans</i>	10^7	10^5	-	10^7
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	10^7	-
<i>Aeromonas sp.</i>	-	-	10^5	10^5

Во всех пробах присутствуют бактерии рода *Rheinheimera*. Численность микроорганизмов значительно выше, показатели находятся в интервале 10^5 – 10^7 микробных клеток в 1 мл.

Биологическое разнообразие микроорганизмов, выделенных в октябре 2017 г. в пробах с различных объектов Балаковской АЭС, представлено 5 видами. В микробных ассоциациях определяются грамотрицательные неспорообразующие бактерии родов *Rheinheimera* и *Aeromonas* и грамположительные спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. Во всех пробах присутствуют бактерии рода *Rheinheimera*, максимальная численность которых достигает 10^8 микробных клеток в 1 мл в НСППО. Количественные показатели микроорганизмов изолированных видов варьируют от 10^3 до 10^7 микробных клеток в 1 мл. (таблица 3).

Таблица 3 - Видовой состав и количественные показатели (м.к./мл) биообрастаний металлических конструкций в системах технического водоснабжения БАЛАЭС (02.10.2017 г.)

Виды бактерий	Объекты БАЛАЭС			
	БНС-3	НСППО	РДЭС-3	МЗ-3
<i>Rheinheimera chironomi</i>	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁴
<i>Bacillus halotolerans</i>	10 ⁷	-	-	10 ⁶
<i>Bacillus vallismortis</i>	10 ⁵	-	10 ⁵	-
<i>Bacillus subtilis</i>			10 ⁵	
<i>Aeromonas sp.</i>	-	-	10 ³	10 ³

В целом результаты проб, отобранных с Балаковской АЭС за три периода исследований (август, сентябрь и октябрь), выглядит так (таблица 4).

Таблица 4 - Видовой состав и количественные показатели (м.к./мл) бактериообрастаний в системе технического водоснабжения Балаковской АЭС

Виды бактерий	Объекты БАЭС											
	МЗ-3		МЗ-4		БНС-3		БНС-4		НППО		РДЭС-3	
	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %	lg м.к./мл	ИВ, %
<i>Aeromonas p.</i>	$\frac{2,7}{0-5}^{**}$	70	-	-	-	-	-	-	-	-	$\frac{2,7}{0-5}$	70
<i>Bacillus halotolerans</i>	$\frac{4,3}{0-7}$	70	-	-	$\frac{2,3}{0-7}$	30	-	-	$\frac{1,7}{0-5}$	30	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\frac{4,0}{0-7}$	70
<i>Bacillus vallismortis</i>	-	-	-	-	$\frac{1,7}{0-5}$	30	-	-	-	-	$\frac{1,7}{0-5}^5$	30
<i>Dietziamaris</i>	-	-	-	-	-	-	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30
<i>Rheinheimer asp.</i>	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{0,7}{0-2}$	30	$\frac{0,7}{0-2}$	30
<i>Rheinheimer achironomi</i>	$\frac{4,0}{2-6}$	100	$\frac{0,7}{0-2}$	30	$\frac{4,7}{2-7}$	100	$\frac{0,7}{0-2}$	30	$\frac{5,0}{0-8}$	70	$\frac{4,0}{0-7}$	70
<i>Vibriosp.</i>	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	$\frac{1,0}{0-3}$	30	-	-	-	-	$\frac{1,0}{0-3}$	30

Анализ данных показал, что количественные показатели микроорганизмов варьируют от 10² до 10⁸ микробных клеток в 1 мл и зависят

от места отбора проб. Индекс встречаемости для разных видов бактерий составляет от 30 до 100%. Во всех пробах присутствуют бактерии рода *Rheinheimera*.

На водонесущих конструкциях береговых насосных станций энергоблоков № 3 и № 4 образуются биопленки, основу которых составляют бактерии *Rheinheimera* и *Bacillus*. Пробы бактериообрастаний с оборудования береговой насосной станции энергоблока №3 включают 5 видов бактерий, численность отдельных видов варьирует от 10^2 до 10^7 микробных клеток в 1 мл, индекс встречаемости достигает 100%. Биопленки с конструкций береговой насосной станции энергоблока № 4 менее разнообразны (3 вида), численность бактерий не превышает 10^3 микробных клеток в 1 мл.

На конструкциях машинных залов энергоблоков № 3 и № 4 обнаружено 5 видов бактерий 4 родов. Из проб биопленок, образуемых на оборудовании машинного зала энергоблока № 3, чаще изолировались бактерии *Rheinheimera chironomi* (100 %), *Aeromonas sp.* (70 %) и *Bacillus halotolerans* (70 %). Численность указанных видов также была максимальной и достигала 10^7 микробных клеток в 1 мл, что позволяет говорить о доминировании бактерий родов *Rheinheimera*, *Aeromonas* и *Bacillus* в биопленках. Пробы, отобранные на конструкциях машинного зала энергоблока № 4, отличались меньшим видовым разнообразием (3 вида, 2 рода), низкими показателями численности (до 10^3 микробных клеток в 1 мл) и встречаемости (до 30%).

Результаты исследования бактериообрастания в системе технического водоснабжения Нововоронежской АЭС.

Из биопленок, образуемых на исследуемых металлических конструкциях, выделены грамположительные и грамотрицательные бактерии 5 видов *Kurthia zopfii*, *Microbacterium lacticum*, *Nocardioides simplex*, *Azomonas agilis*, *Bacillus halmapalus*, являющихся сапрофитами, хемоорганотрофами (таблица 5).

Таблица 5 – Количественные показатели и индекс встречаемости бактерий, выделенных из биообрастаний конструкций в системах водоснабжения НВАЭС

Виды бактерий	Численность, м.к./мл				Индекс встречаемости, %
	МЗ-5	6БЛ	ЦНС-3,4	БНС-1,2	
<i>Kurthia zopfii</i>	10 ⁷	0	0	10 ⁶	50
<i>Microbacterium lacticum</i>	10 ⁶	0	0	0	25
<i>Nocardioides simplex</i>	0	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵	75
<i>Azomonas agilis</i>	0	10 ⁵	10 ⁴	0	50
<i>Bacillus halmapalus</i>	0	0	0	10 ⁵	25

Выделенные микроорганизмы представлены широко распространенными в природных водных и почвенных экологических системах видами бактерий.

Численность микроорганизмов, входящих в состав биопленок и участвующих в процессе биообрастания металлических конструкций в системах технического и оборотного водоснабжения Нововоронежской АЭС, варьирует от 10⁴ до 10⁷ микробных клеток в 1 мл. Видовое разнообразие на каждом объекте представлено 2 – 3 видами бактерий. Индекс встречаемости *Kurthia zopfii* составляет 50%, *Microbacterium lacticum* – 25%, *Nocardioides simplex* – 75%, *Azomonas agilis* – 50%, *Bacillus halmapalus* – 25%. Изолированные микроорганизмы являются сапрофитными хемоорганотрофными мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными бактериями. Хемолитотрофные бактерии из группы железобактерий, образующие биообрастания и находящиеся в ассоциации, обнаружены во всех пробах. Выделенные микроорганизмы представлены широко распространенными в природных водных и почвенных экологических системах видами бактерий.

Выводы

1. На металлических конструкциях в системах технического и оборотного водоснабжения Балаковской АЭС формируется микробное биообрастание (биопленка), в его составе обнаружены сапрофитные хемоорганотрофные мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные бактерии 8 видов, а также хемолитотрофные бактерии из группы железобактерий, находящиеся в ассоциации, и образующие основу биопленки. Количественные показатели изолированных из биопленки видов варьировали от 10^2 до 10^8 микробных клеток в 1 мл.

2. Численность микроорганизмов, входящих в состав биопленок и участвующих в процессе биообрастания металлических конструкций в системах технического и оборотного водоснабжения Нововоронежской АЭС, варьирует от 10^4 до 10^7 микробных клеток в 1 мл.

3. Из биопленок, образуемых на водонесущих конструкциях Балаковской АЭС, были выделены грамположительные и грамотрицательные бактерии 8 видов: *Rheinheimera sp.*, *Rheinheimera chironomi*, *Vibrio sp.*, *Dietzia maris*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis*, *Aeromonas sp.*

Выделенные микроорганизмы представлены широко распространенными в природных водных и почвенных экологических системах видами бактерий, однако некоторые виды изолированных родов бактерий являются патогенными и могут вызывать инфекционные заболевания у человека и животных, такие как *Aeromonas sp.* и *Vibrio sp.* Обнаружение их в водоемах может быть связано с благоприятными для сохранения и размножения условиями, в первую очередь, значениями температурного фактора.

4. Из биопленок, образуемых на исследуемых металлических конструкциях Нововоронежской АЭС, выделены грамположительные и грамотрицательные бактерии пяти видов: *Kurthia zopfii*, *Microbacterium lacticum*, *Nocardioides simplex*, *Azomonas agilis*, *Bacillus halmapalus*, являющихся сапрофитами, хемоорганотрофами. Патогенных бактерий среди них не обнаружено.

Видовое разнообразие на каждом объекте представлено 2 – 3 видами бактерий. Индекс встречаемости *Kurthia zopfii* составляет 50%, *Microbacterium lacticum* – 25%, *Nocardioides simplex* – 75%, *Azomonas agilis* – 50%, *Bacillus halmapalus* – 25%.