

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**БАКТЕРИООБРАСТАНИЯ СИСТЕМ ТЕХНИЧЕСКОГО
ВОДОСНАБЖЕНИЯ АТОМНЫХ ЭЛЕКТРОСТАНЦИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Савельевой Александры Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

Е.В. Глинская

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

С.А. Степанов

Саратов 2020

Актуальность темы. Бактериальные обрастания гидротехнических сооружений являются актуальной проблемой в различных отраслях промышленности, в том числе в атомной энергетике. Биопленки развиваются на поверхностях всех металлоконструкций, которые имеют непосредственный контакт с водой (трубы, насосы, погруженные в воду емкости и технологическое оборудование) [1].

Биологические обрастания вызывают не меньшее, а нередко и значительно большее снижение эффективности систем оборотного водоснабжения, чем солевые отложения. Объясняется это гораздо большей скоростью образования биологических обрастаний. В экстремальных случаях биологические обрастания в течение нескольких суток могут привести к снижению общих коэффициентов теплопередачи теплообменных аппаратов на 60 - 70 % и даже вызвать полную закупорку трубок. Биообрастание служит основой для развития водорослей и моллюсков, понижает уровень pH, ускоряет коррозию бетона и металлов [2].

Установлено, что более 50 % повреждений металлических сооружений и коммуникаций от коррозии связано с воздействием микроорганизмов. Процесс коррозии в системах оборотного водоснабжения начинается с отложения на поверхности металла тонкого слоя, состоящего из микроорганизмов и продуктов их метаболизма. Микробиологическое загрязнение ведет к ускорению коррозионного процесса вследствие активации поверхности металла при участии продуктов жизнедеятельности микроорганизмов [3].

Для решения проблем, связанных с биообрастанием и развитием коррозии металлов гидротехнических сооружений, необходимо комплексное изучение видового состава биоплёнок для создания эффективных методов борьбы с ними.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось определение видового состава и количественных показателей бактерий,

участвующих в обрастании металлических конструкций систем технического и обратного водоснабжения Балаковской и Нововоронежской АЭС.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить микробиологические показатели исследуемых объектов атомных электростанций.
2. Изучить биологические свойства изолированных культур микроорганизмов.
3. Определить биоцидную активность веществ, применяемых для борьбы с биообрастаниями.

Материал и методы исследования. Материалом для исследования послужили пробы, отобранные на Балаковской и Нововоронежской атомных электростанциях. С Нововоронежской АЭС было исследовано 6 проб в 2018 году, 3 пробы из которых были отобраны с машинного зала и 3 пробы с центральной насосной станции, с Балаковской АЭС в 2019 году было отобрано 37 проб, пробы так же отбирались с насосных станций, машинных залов и с брызгальных бассейнов. Всего в ходе экспериментальной работы было исследовано 43 пробы биообрастаний систем технического водоснабжения АЭС.

Отбор проб бактериообрастаний осуществляли стандартными методами с использованием стерильной лабораторной посуды, предназначенной для взятия образцов биологического материала и их последующей, безопасной транспортировки в лабораторию для анализа в ограниченные сроки. Образцы хранились в условиях низких температур не более 4 часов [4].

Для оценки качества воды и процессов самоочищения водоемов использовали показатели количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), сульфитредуцирующих клостридий, плесневых грибов, азотфиксирующих бактерий [5]. Определение КМАФАнМ осуществляли стандартными

методами [6]. Для получения чистых культур микроорганизмов использовали метод последовательных разведений. Титровали до 10^{-4} . Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24 - 48 ч. Далее проводили количественный учет выросших колоний. Для изучения биологических свойств и определения видовой принадлежности выделенные культуры отсеивали на скошенный ГРМ-агар в пробирки.

Выделение сульфитредуцирующих клостридий проводили на железосульфитном агаре при температуре 28 - 37 °С в течение 24 - 48 ч.

Азотфиксирующие бактерии выделяли на безазотистой среде Эшби, плесневые грибы – на среде Сабуро при температуре 28 - 37 °С в течение 24 - 48 ч.

Морфологические и культуральные признаки изучали как на первичных посевах, так и на полученных чистых культурах.

При изучении биохимической активности определяли наличие у выделенных штаммов каталазы и оксидазы, способность использовать различные сахара (глюкозу, сахарозу, лактозу, ксилозу, арабинозу, маннозу, сорбит, фруктозу), маннит, цитрат натрия, способность к гидролизу крахмала, желатина, казеина, способность к азотфиксации, ассимиляционной и диссимиляционной нитратредукции.

При определении устойчивости выделенных штаммов к абиотическим факторам изучали способность к росту при различных показателях рН среды (5, 7, 9, 10), концентрациях NaCl в среде (7, 10, 15 %), действию температурного фактора (+10 °С и +43 °С).

Индекс встречаемости рассчитывали как число проб, в которых обнаружены бактерии данного вида, к общему числу проб, выраженное в процентах. Индекс общности определяли как отношение числа видов, общих для двух сравниваемых объектов, к общему количеству выделенных из них видов, выраженное в процентах [7].

Постановку всех тестов проводили по общепринятым методикам [8].

Идентификацию выделенных штаммов проводили по определителям бактерий Берджи [9, 10].

Для изучения антимикробной активности биоцидов использовали акварезалты, рекомендованные для обработки воды в брызгальных бассейнах (Россия, Санкт-Петербург, «Акватрейд»). Для этой цели были выбраны три варианта препаратов: «Акварезалт 1010», «Акварезалт 1020Б» и «Акварезалт 1010Б».

«Акварезалт 1010» ингибирует процессы коррозии стальных и медьсодержащих сплавов. Предотвращает отложения солей жесткости, силикатов и оксидов железа. Обеспечивает мягкую отмывку оборудования от ранее образовавшихся железо-окисных и карбонатно-кальциевых отложений. Применяется в водах средней и высокой жесткости. Стабилен в широком интервале pH. Продукт не токсичен.

«Акварезалт 1020Б» – реагент на основе биоцидов неокисляющего действия. Применяется для исключения биологического обрастания трубопроводов, градирен и других элементов водооборотных циклов, а также для систем обратного осмоса.

«Акварезалт 1010Б» – реагент, который разработан на основе «Акварезалт 1010» с добавлением бактерицидных средств неокисляющего действия. Применяется для исключения биологического обрастания трубопроводов, градирен и других элементов водооборотных циклов [11].

Эффективность акварезалтов изучали в отношении стандартных тест-культур грамположительных неспорообразующих кокковых форм (*Staphylococcus aureus* 209-P), грамположительных спорообразующих палочковидных форм (*Bacillus cereus* 8035), грамотрицательных неспорообразующих палочковидных форм (*Escherichia coli* 113-13) бактерий, предоставленных ГИСК имени Л. А. Тарасевича (г. Москва).

Для исследования были взяты концентрации «Акварезалтов» в диапазоне от минимальной 0,98 мкл/л до максимальной 10 мл/л. Штаммы

тест-культур бактерий культивировали на ГРМ-агаре в течение 24 ч при 28 °С. Далее из суточных культур по стандарту мутности готовили исходные взвеси с концентрацией 10^9 м.к./мл. Исходную взвесь каждого штамма методом последовательных разведений доводили до рабочей концентрации 10^3 м.к./мл.

Тестирование лакокрасочных средств защиты оборудования от обрастания проводили:

– с добавлением закиси меди (Cu_2O) с различным содержанием биоцида (30 %, 35 %, 45 %) в покрытии.

– с добавлением полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГГХ).

Структура и объём работы. Работа изложена на 50 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 13 таблицами и 5 рисунками. Список использованных источников включает 47 наименований.

Научная новизна. Впервые установлен видовой состав бактерий, участвующих в процессе биообрастания систем технического водоснабжения Балаковской и Нововоронежской АЭС. Определены индексы встречаемости и количественные показатели бактерий в биопленках. Показано, что бактерии рода *Bacillus* доминируют в бактериообрастаниях систем водоснабжения АЭС.

Научная значимость. Полученные данные позволяют более грамотно разрабатывать методы борьбы с биообрастаниями и рекомендовать биоцидный препарат «Акварезалт 1020Б» в системах технического водоснабжения АЭС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ассоциации бактерий рода *Bacillus* образуют биопленки на металлических конструкциях систем технического и обратного водоснабжения атомных электростанций.

2. Бицидные препараты на основе закиси меди и полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, а также препарат «Акварезалт» оказывают ингибирующее влияние на процессы биообращения.

Основное содержание работы

В основной части работы представлен анализ литературных данных о механизмах и этапах формирования биопленок, физиологических группах микроорганизмов, которые образуют биопленки, и их взаимодействиях, о физико-химических условиях, необходимых для формирования биообрастаний, а так же методах борьбы с биологическими обрастаниями в системах водоснабжения.

В главе «Результаты исследования» представлены экспериментально полученные данные о видовом составе микробных ассоциаций, образуемых на металлических конструкциях исследуемых АЭС, определены микробиологические показатели и биологические свойства выделенных бактерий, а так же изучена антимикробная активность биоцидных веществ, применяемых для борьбы с обрастателями в системах водоснабжения атомных электростанций.

Всего в ходе экспериментальной работы было исследовано 43 пробы биообрастаний систем технического водоснабжения АЭС.

На первом этапе работы было проведено исследование микробиологических показателей биологических пленок, отобранных с поверхностей объектов АЭС (насосная станция подпитки водоема-охладителя, брызгальный бассейн, машинный зал, береговая насосная станция). Количественные показатели МАФАНМ достигали 10^9 КОЕ в 1 мл для Балаковской АЭС и 10^8 КОЕ в 1 мл для Новоронежской АЭС. Азотфиксирующие бактерии и плесневые грибы, которые являются показателями самоочищения водоемов, не были обнаружены. Показатели фекального загрязнения - сульфитредуцирующие клостридии - отсутствовали во всех пробах. Результаты свидетельствуют о незавершенности процессов самоочищения водоемов.

На следующем этапе исследования определяли видовой состав биопленок, образуемых на металлических конструкциях АЭС, который был

представлен бактериями рода *Bacillus*: *B. halodurans*, *B. horikoshii*, *B. pseudofirmus*, *B. clausii* и *B. psychrodurans*. Выделенные микроорганизмы представлены широко распространенными в природных водных и почвенных экологических системах видами бактерий, обнаружение их в водоемах и системах водоснабжения может быть связано с благоприятными для сохранения и размножения условиями, в первую очередь значениями температурного фактора.

На заключительном этапе работы мы изучали биоцидную активность акварезалтов и лакокрасочных средств защиты оборудования. Реагенты серии «Акварезалт» представляют собой композицию водных форм аминокислотных и фосфонокислотных кислот и/или их солей с добавлением полимеров-дисперсантов и бактерицидных средств. Акварезалты являются реагентами широкого спектра действия, их используют как для подавления роста биопленок, так и для ингибирования образования минеральных солей, процессов коррозии металлов и предотвращения загрязнения мембранных фильтров.

Нами было проведено тестирование средств «Акварезалт 1020Б», «Акварезалт 1010» и «Акварезалт 1010Б». В исследовании использовали стандартные тест-культуры *Staphylococcus aureus* 209-Р, *Bacillus cereus* 8035, *Escherichia coli* 113-13.

Результаты исследований показали, что максимальное антимикробное действие оказывает «Акварезалт 1020Б», в отношении *Escherichia coli* 113-13 и *Staphylococcus aureus* 209-Р бактерицидный эффект наблюдается при использовании концентрации 3,9 мкл/л, в отношении *Bacillus cereus* 8035 – 1,95 мкл/л. «Акварезалт 1010» в концентрации 15,63 мкл/л оказывает бактерицидное действие на все исследуемые тест-культуры. «Акварезалт 1010Б» оказывает бактерицидное действие в концентрации 62,50 мкл/л.

Таким образом, максимальное антимикробное действие оказывает «Акварезалт 1020Б».

Тестирование лакокрасочных средств защиты оборудования от обрастания с добавлением закиси меди (Cu_2O) и полигексаметиленгуанидин гидрохлорида не выявило статистически достоверных различий в количественных показателях и видовом разнообразии бактерий-обрастателей.

Обработка оборотной воды биоцидами широкого спектра действия, которые, на данный момент, являются наиболее надежной системой защиты от биопленок, позволят предотвратить их появление, но важно понимать, что результатов от всех мер, направленных на уничтожение и профилактику биообрастаний, возможно добиться в случае регулярного мониторинга качества воды в системах оборотного водоснабжения [12].

Выводы

1. Биопленки на поверхности металлических конструкций систем технического водоснабжения атомных электростанций образуют бактерии рода *Bacillus*. Бактерии *Bacillus halodurans* (ИВ 55 %), *Bacillus horikoshii* (ИВ 62%), *Bacillus pseudofirmus* (ИВ 33 %) изолированы из объектов Балаковской АЭС, бактерии *Bacillus clausii* (ИВ 50 %) и *Bacillus psychrodurans* (ИВ 50 %) – из объектов Нововоронежской АЭС.

2. Количественные показатели мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в биопленках систем технического и оборотного водоснабжения достигали 10^8 КОЕ в 1 мл в пробах Нововоронежской АЭС и 10^9 КОЕ в 1 мл в пробах Балаковской АЭС. Плесневые грибы, азотфиксирующие бактерии и сульфитредуцирующие клостридии на исследуемых объектах не обнаружены.

3. Использование лакокрасочных средств защиты оборудования от биообрастаний с добавлением закиси меди (Cu_2O) и полигексаметиленгуанидина гидрохлорида (ПГМГГХ) не оказывает влияния на количественные показатели и видовое разнообразие бактерий.

4. Наиболее эффективное антимикробное действие на тест-культуры микроорганизмов оказывает «Акварезалт 1020Б», в отношении *Escherichia coli* 113-13 и *Staphylococcus aureus* 209-Р бактерицидный эффект наблюдается при использовании концентрации 3,9 мкл/л, в отношении *Bacillus cereus* 8035 - 1,95 мкл/л. «Акварезалт 1010» оказывает бактерицидное действие в концентрации 15,63 мкл/л, «Акварезалт 1010Б» - в концентрации 62,50 мкл/л в отношении всех тест-культур.

Список использованных источников

1. Селезнева, А. В. Селезнев, В. А. Проблемы восстановления экологического состояния водных объектов / А. В. Селезнева, В. А. Селезнев // Водное хозяйство России. - 2010. - № 2. - С. 28-44.
2. Наливайко, Н. Г. Микробиология воды / Н. Г. Наливайко. - Томск.: Издательство ТПУ, 2006. - 139 с.
3. Хасанова, Д. И., Сафин, Д. Х. Анализ причин биоотложений в системах оборотного водоснабжения нефтехимических производств / Д. И. Хасанова, Д. Х. Сафин // Экология и промышленность России. - 2014. - №4. - С. 48-52.
4. МУК 4.2.1018-01. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды. Москва. Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001.
5. МУК4.2.1884-04.Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005.75 с.
6. Бактериообрастания в системе технического водоснабжения Балаковской атомной электростанции / А.В. Кириллов [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. - 2018. - Т.18, № 4. - С. 451-454.
7. Петерсон, А. М., Чиров, П. А. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам / А. М. Петерсон, П. А. Чиров. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. - 24 с.
8. Попкова, К. В. Общая фитопатология: учебное пособие для вузов / К.В. Попкова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 2005. 445 с.
9. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. Том 1. М.: Мир, 1997. - 432 с.

10. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. Том 2. М.: Мир, 1997. - 325 с.

11. Ингибиторы комплексного действия «Акварезалт» [Электронный ресурс]: - URL: <http://aquatrade-spb.ru/ingibitory-kompleksnogo-deystviya-akvarezalt-1> (дата обращения: 17.05.20). - Загл. с экрана. - Яз.рус.

12. Шошина, Н. А. Борьба с биообрастанием в системах ГВС / Н. А. Шошина // Сантехника. Информационно-издательское предприятие «АВОК-ПРЕСС». - 2017. - № 5. - С. 56-59.