

УДК 620.193.81

## КОРРОЗИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАСТАНИЙ КОНСТРУКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ В ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2023 г. Д. Ю. Власов<sup>1, 6, \*</sup>, А. Л. Брюханов<sup>2</sup>, Г. Г. Няникова<sup>3</sup>,  
М. С. Зеленская<sup>1</sup>, И. М. Царовцева<sup>4</sup>, А. Р. Изатулина<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),  
факультет химической и биотехнологии, Санкт-Петербург, 190013 Россия

<sup>4</sup>АО Всероссийский научно-исследовательский институт гидротехники  
им. Б.Е. Веденеева, Санкт-Петербург, 195220, Россия

<sup>5</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Институт наук о Земле, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>6</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Исследованы потенциально коррозионно-активные микроорганизмы, выделенные с конструктивных материалов с признаками биообрастаний на побережье Кислой губы (Баренцево море, Россия): сульфатредуцирующие, железоокисляющие и сероокисляющие бактерии. По результатам определения нуклеотидных последовательностей гена 16S rPHK идентифицированы культуры сульфатредуцирующих бактерий (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.), сероокисляющих бактерий (*Dietzia* sp.) и железоокисляющих бактерий (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp.). Методами сканирующей электронной микроскопии, энергодисперсионного микроанализа химического состава и рентгенофазового анализа выявлены значительные изменения структуры и химического состава поверхностного слоя образцов стальной арматуры, экспонированных в течение 28 сут в присутствии выделенных культур микроорганизмов, что свидетельствовало об их активном участии в биокоррозионных процессах. Показано, что образование аналогов минералов в продуктах коррозии зависит от штаммов указанных бактерий и, очевидно, связано с особенностями их метаболизма. Наибольшую активность в развитии коррозионных процессов проявили сульфатредуцирующие бактерии, выделенные из литоральной зоны Баренцева моря.

**Ключевые слова:** сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), сероокисляющие бактерии, железобактерии, Баренцево море, конструкционные материалы, биокоррозия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), рентгенофазовый анализ (РФА)

**DOI:** 10.31857/S0555109923040189, **EDN:** QZTZAQ

Коррозионное разрушение различных строительных и конструкционных материалов может быть вызвано не только воздействием физико-химических факторов внешней среды, такими, как перепады температуры, атмосферные осадки, повышенная влажность, ветровая эрозия, изменения pH и концентрации кислорода, реакции с химически активными соединениями, но и развитием микроорганизмов. Биокоррозии подвержены практически все материалы, в том числе бетон, кирпич, металлы и их сплавы, древесина и

даже полимеры [1–4]. Особенно подвержены биокоррозии гидротехнические и портовые сооружения, что приводит к снижению их прочности и долговечности, а также увеличивает расходы на их содержание и ремонт.

Существенный вклад в повреждения металлических и железобетонных конструкций вносят микроорганизмы, которые проникают в их толщу, а также размножаются на поверхности материалов, формируя биопленки и обрастания. Нали-

чие биопленок непосредственно на поверхности материала приводит к резкому изменению физико-химических параметров приграничного слоя относительно водной фазы, что оказывает значительное влияние на кинетику коррозионных процессов [5–9]. Биологические, физические и химические процессы, приводящие к коррозии, очень тесно взаимосвязаны.

В целом, механизмы повреждения конструкционных материалов микроорганизмами можно разделить на два типа: биофизические (механическое разрушение в результате развития микроорганизмов непосредственно в материале) и биохимические (воздействие метаболитов, выделяемых клетками микроорганизмов, и использование самого материала в качестве источника получения энергии или химических элементов для роста и развития микроорганизмов) [10, 11].

Биохимическое воздействие микроорганизмов на конструкционные материалы, в свою очередь, может происходить различными путями [2, 3, 10–12]: 1) путем непосредственного воздействия химически активных и реакционноспособных продуктов метаболизма микроорганизмов ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ , органические и неорганические кислоты и т.д.) на металлы, бетоны и др.; 2) через образование органических продуктов, которые могут действовать как деполяризаторы гальванической коррозии или катализаторы химических реакций, приводящих к коррозии; 3) через коррозионные реакции, являющиеся отдельной частью метаболического цикла микроорганизмов.

Ключевыми группами микроорганизмов – агентов биокоррозии являются сульфатредуцирующие, железо- и марганец-окисляющие, сероокисляющие, нитрифицирующие и аммонифицирующие бактерии, а также микромицеты. Они особенно активны в морских экосистемах, где создаются благоприятные условия для формирования и жизнедеятельности микробных сообществ, и потому скорость биокоррозионных процессов достаточно высока [13]. В микроразделах поверхностного слоя материалов, а именно, в трещинах, порах, углублениях и кавернах происходит адсорбция клеток микроорганизмов. На поверхности материалов образуются биопленки, которые способствуют прикреплению клеток к субстрату. Под биопленками могут создаваться анаэробные условия, оптимальные для развития коррозионно-активных сульфатредуцирующих бактерий [14, 15]. Как сами микробные клетки, использующие компоненты материалов в качестве источника энергии, донора или акцептора электронов, так и внеклеточные метаболиты микроорганизмов (неорганические и органические кислоты, гликаны, сероводород, аммиак и другие) оказывают серьезное воздействие на конструкционные материалы. Это приводит к изменению не только визуальных при-

знаков проявления биоповреждений (обрастание поверхности мицелием грибов или колониями бактерий, появление каверн и трещин), но и к изменению физико-механических свойств, потере прочности и других практически важных свойств материалов [8].

Аэробную коррозию стальных и бетонных конструкций, то есть идущую в присутствии достаточного количества кислорода, осуществляют, в основном, сероокисляющие, нитрифицирующие и железобактерии [2, 5]. В результате жизнедеятельности сероокисляющих и нитрифицирующих бактерий в окружающей среде в качестве агрессивных конечных продуктов их метаболизма накапливаются, соответственно, серная и азотная кислоты.

Сероокисляющие бактерии, играющие ключевую роль в окислении неорганических восстановленных соединений серы (элементарная сера, сульфид, тиосульфат, сульфит, тритионат, тетратионат) и выщелачивании металлов, широко распространены в морских и пресных водоемах, почвах, а также в разрушающихся горных породах. Они являются хемолитотрофами, среди них встречаются и термофилы, обитающие в термальных водных источниках вулканического происхождения. Известно, что скорость бактериального окисления дисульфида железа (пирита) в кислой среде многократно выше скорости его химического окисления [16, 17]. В процессе бактериального окисления пирита протекает несколько химических реакций, в результате которых образуется серная кислота и резко снижается pH среды (вплоть до 1.0):  $\text{FeS}_2 + 3.5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $2\text{FeSO}_4 + 0.5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeS}_2 + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \rightarrow 3\text{FeSO}_4 + 2\text{S}^0$ ;  $\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O} + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$ . Необходимо отметить, что роль сероокисляющих бактерий в биокоррозионных процессах сводится не только к образованию серной кислоты. Например, *Acidithiobacillus ferrooxidans* окисляет сульфат железа(II) до сульфата железа(III), являющегося чрезвычайно агрессивным по отношению к металлическим конструкциям окислителем. Принимая электроны с поверхности железа или стали, сульфат железа(III) восстанавливается до сульфата железа(II), которое снова окисляется клетками *A. ferrooxidans*. В условиях, благоприятных для развития сероокисляющих бактерий, этот процесс может идти постоянно, из-за чего существует угроза быстрого разрушения металла [18].

Образование агрессивной для металлов кислоты происходит также и в результате жизнедеятельности хемолитоавтотрофных нитрифицирующих бактерий, обитающих в почве и природных водах [19]. Процесс нитрификации приводит к образованию азотной кислоты за счет двухстадийного процесса окисления аммиака, связанного с получением энергии:  $\text{NH}_3 + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ;

$\text{HNO}_2 + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_3$ . Первую стадию нитрификации осуществляют нитрозобактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* и *Nitrosospira*, а вторую стадию нитрификации обеспечивают нитробактерии родов *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* и *Nitrospina*.

Железобактерии очень широко распространены в природе, в том числе в пресных и морских водоемах, и играют большую роль в круговороте железа, образуя отложенные руды железа на дне болот и морей. Эти аэробные микроорганизмы являются хемотрофами, способными окислять двухвалентное железо ( $\text{Fe}^{2+}$ ) до трехвалентного ( $\text{Fe}^{3+}$ ) в реакции  $4\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2 + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{Fe}(\text{OH})_3 + 8\text{CO}_2$ , используя освобождающуюся энергию на усвоение углерода из углекислого газа или карбонатов. Участие железобактерий в коррозионных процессах связывают, преимущественно, с формированием дифференцированно аэрируемых ячеек на поверхности корродируемого материала [20–22]. Сущность этого процесса состоит в следующем — железобактерии прочно закрепляются на поверхности металла, образуя слизистые скопления. Участки металлоконструкций, не подвергшиеся колонизации железобактериями, аэрируются хорошо, но участки, покрытые минерализованными охристыми отложениями за счет метаболизма железобактерий, подвергаются воздействию кислорода в меньшей степени. Соответственно, аэрируемые участки поверхности имеют более высокий потенциал и выполняют роль катода, тогда как менее аэрируемые участки функционируют как анод. В анодной зоне железо растворяется и начинается процесс коррозии. Кроме того, железобактерии могут синтезировать пероксид водорода, являющийся сильным окислителем и активным коррозионным агентом [20].

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) — облигатно анаэробные микроорганизмы. Основным конечным акцептором электронов для клеток СРБ является сульфат, который восстанавливается до сероводорода в процессе диссимиляционной сульфатредукции (сульфатного дыхания). Многие сульфатредукторы могут восстанавливать также сульфиты, тиосульфаты и, реже, молекулярную серу. Донорами электронов служат преимущественно низкомолекулярные органические соединения, которые образуются при анаэробном разложении биомассы, а также молекулярный водород ( $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$ ) [23].

Сульфатредуцирующие микроорганизмы являются филогенетически неоднородной группой, наибольшее количество родов принадлежит классу *Deltaproteobacteria* типа *Proteobacteria*, также много СРБ обнаружено в типе *Firmicutes*. Существуют по меньшей мере три рода сульфатредуцирующих архей. СРБ, в особенности представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*, очень широко распространены в различных анаэробных экосисте-

мах, например, в морских донных осадках и илах сточных вод, являясь важным звеном в биогеохимическом цикле серы [24].

Механизмы анаэробной коррозии железа, стали и алюминия в присутствии СРБ заключаются как в прямом взаимодействии образуемого ими сероводорода с металлами, так и в катодной деполяризации участков поверхности корродирующего металла за счет потребления СРБ молекулярного водорода в приэлектродном слое и формирования дополнительных гальванических пар неравномерно растущими биопленками и отложениями сульфидов, образующихся в результате взаимодействия ионов металла с сульфид-ионами — конечным продуктом бактериального восстановления сульфатов. Такие процессы часто ведут к стрессовой коррозии за счет растрескивания металла из-за проникновения водорода, образующегося в катодной зоне [25–28].

То есть СРБ используют биопленку, обогащенную сульфидами, как катод, осуществляя катодную деполяризацию с использованием водорода, слой которого в кислой среде защищает металл от коррозии, для последующего восстановления сульфатов. Водород утилизируется клеточными трансмембранными гидрогеназными комплексами, что приводит к ускорению коррозии железа. Коррозионное разрушение за счет этих электрохимических реакций происходит на металле (аноде), и оно идет в десятки раз более интенсивно, чем просто химическая сероводородная коррозия. В целом, масштабы анаэробной коррозии, вызываемой СРБ, огромны, ущерб от нее в мире превышает несколько миллиардов долларов в год [7].

Известны микробиоценозы из железоокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий, ускоряющие коррозию стальных труб [29]. Описаны также сообщества из мицелиальных грибов, бактерий рода *Pseudomonas* (представители которого характеризуются чрезвычайной лабильностью метаболизма) и СРБ, корродирующие алюминиевые и стальные конструкции [30, 31].

В связи с вышеизложенным крайне актуальными вопросами являются выявление, идентификация и изучение коррозионно-активных микроорганизмов с целью специфического подбора и разработки эффективных средств для защиты различных конструкционных материалов от микробной коррозии, на долю которой, по некоторым оценкам, приходится свыше 20% от всех коррозионных повреждений [5]. Особый практический интерес представляет изучение процессов биокоррозии различных конструкционных материалов в суровом морском климате арктических широт, где сейчас активно развивается экономическая деятельность. Важными объектами, подвергающимися процессам биоповреждений, являются портовые сооружения, морские суда, платформы

**Таблица 1.** Образцы конструкционных материалов, размещенных на испытательных стендах в прибрежной зоне Кислой губы (Баренцево море)

| Маркировка образца | Описание образца                                   |
|--------------------|----------------------------------------------------|
| 1А                 | Бетон. Кубики. Грань 10 см                         |
| 2А                 | Дерево. Кубики без защитного покрытия. Грань 10 см |
| 3А                 | Дерево. Кубики с защитным покрытием*. Грань 10 см  |
| 4А                 | Стальная арматура Ø 10 мм                          |
| 5А                 | Стальная арматура Ø 16 мм                          |
| 6А                 | Стальная арматура Ø 16 мм с защитным покрытием     |
| 7Л                 | Бетон. Кубики. Грань 10 см.                        |
| 8Л                 | Дерево. Кубики без защитного покрытия. Грань 10 см |
| 9Л                 | Дерево. Кубики с защитным покрытием*. Грань 10 см  |
| 10Л                | Стальная арматура Ø 10 мм                          |
| 11Л                | Стальная арматура Ø 16 мм                          |
| 12Л                | Стальная арматура Ø 16 мм с защитным покрытием*    |

Примечание: А – атмосферная зона, Л – литоральная зона

\* Защитное покрытие на основе четвертичных аммониевых соединений предложено для испытаний Институтом химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН.

по добыче полезных ископаемых на шельфе, трубопроводы, гидротехнические сооружения и др.

Цель исследования – изучение коррозионной активности сульфатредуцирующих, сероокисляющих и железоокисляющих бактерий, выделенных в чистые культуры из обрастаний конструкционных материалов, которые были экспонированы на климатических испытательных стендах в прибрежной зоне Баренцева моря в районе Кислой губы (Мурманская область, Россия), в отношении конструкционной стали.

## МЕТОДИКА

**Исследуемые материалы.** Образцы конструкционных материалов (стальная арматура, а также бетон и дерево), применяющихся в гидротехническом строительстве, экспонировали на испытательных стендах в натуральных условиях в литоральной и атмосферной зонах Баренцева моря в районе Кислогубской приливной электростанции (Мурманская область, Россия) с марта по сентябрь 2020 г. Описание образцов представлено в табл. 1. Литоральный стенд с прикрепленными к нему образцами материалов подвергался периодическому затоплению морской водой и осушению, что было связано с приливно-отливными ритмами, а атмосферный стенд с теми же материалами располагался на суше в непосредственной близости к береговой линии. Следует отметить, что прибрежная зона Кислой губы Баренцева моря – интересный и уникальный арктический биотоп, а микробиологические исследования проводились здесь впервые.

**Культивирование коррозионно-активных микроорганизмов.** Для получения накопительных и чистых культур коррозионно-активных микроорганизмов использовали селективные питательные среды, в которые помещали соскобы образцов соответствующих конструкционных материалов после их снятия с испытательных стендов.

Для органотрофных железоокисляющих бактерий использовали питательную среду Захаровой [32], г/л:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 5.9;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0.5;  $\text{NaNO}_3$  – 0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0.5; лимонная кислота – 10.0; сахароза – 2.0; триптон – 1.0; pH 6.5–6.8.

Для сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) использовали питательную среду Видделя для морских форм СРБ [33], г/л:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – 4.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.2;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0.25;  $\text{NaCl}$  – 13.5;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  – 0.4;  $\text{KCl}$  – 0.5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  – 0.1; витамины по Видделю – 1.0 мл; микроэлементы SL-10 – 1.0 мл; 0.2 М фосфатный буферный раствор (pH 7.2) – 1 мл; лактат Na (50%-ный раствор) – 5.0 мл; ацетат Na (2 М) – 10.0 мл; дрожжевой экстракт (5%-ный раствор) – 10.0 мл;  $\text{NaHCO}_3$  (10%-ный раствор) – 10.0 мл;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  (5%-ный раствор) – 10.0 мл;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (5%-ный раствор) – 0.5 мл; pH 7.4. Приготовление питательных сред для культивирования СРБ проводили в строго анаэробных условиях в соответствии с модифицированной техникой Хангейта [34]. Кислород из питательных сред удаляли с помощью вакуумной установки дегазации, замещая его инертным газом аргоном.

Для сероокисляющих бактерий использовали питательную среду Бейеринка [35], г/л:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O} - 5.0$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.1$ ;  $\text{NaHCO}_3 - 1.0$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O} - 0.2$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0.01$ ; pH 9.2.

Нитрифицирующие бактерии выращивали на питательной среде Виноградского [36], г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2.0$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O} - 1.0$ ;  $\text{MgSO}_4 - 0.5$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0.01$ ;  $\text{NaCl} - 2.0$ ;  $\text{CaCO}_3 - 1.0$ ; pH 7.5.

Для приготовления плотных питательных сред добавляли агар в количестве 2%. Среды стерилизовали в автоклаве при давлении  $P_{\text{изб.}} = 5.05 \times 10^4$  Па в течение 30 мин.

Выделение чистых культур осуществляли методом предельных разведений (в диапазоне разведений от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ ) с отбором выросших колоний на агаризованных питательных средах и многократными пересевами. Доминирующая в микробных сообществах прибрежных вод Кислой губы бактерия *Pseudomonas fluorescens* штамм ССМ 2115 была депонирована в Ведомственную коллекцию полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) под регистрационным номером RCAM05389 как рекомендованная в качестве тест-культуры коррозионно-активных микроорганизмов.

Культивирование анаэробных микроорганизмов проводили в герметично закрытых пробирках Хангейта с жидкой или агаризованной питательной средой, пересевы осуществляли с помощью стерильных шприцев, инкубировали культуры при температуре 23–25°C в темноте в течение 3–25 сут. Рост сульфатредуцирующих бактерий с использованием различных доноров электронов оценивали на жидкой питательной среде Видделя для морских форм СРБ с сульфатом в качестве акцептора электронов, заменяя лактат на исследуемый субстрат. Все используемые субстраты готовили в виде концентрированных растворов и стерилизовали автоклавированием при  $P_{\text{изб.}} = 5.05 \times 10^4$  Па в течение 30 мин.

**Изучение физиолого-биохимических свойств чистых культур микроорганизмов.** Микроскопирование после окрашивания фуксином и по Граму осуществляли с использованием светового микроскопа ЛОМО Микмед-1 (Россия) при увеличении 400× и 900×.

Рост чистых культур СРБ оценивали по увеличению оптической плотности при  $\lambda$  575 нм, концентрацию сероводорода измеряли колориметрическим методом с N,N-диметил-*n*-фенилендиамином и железозамещенными квасцами [37]. Отношение к кислороду определяли методом укола в столбики соответствующей агаризованной питательной среды. Для определения влияния температуры на рост бактерии культивировали на плотных и в жидких питательных средах в температурном диапазоне 4–57°C. Для изучения влияния pH среды на рост бактерии культивировали в

диапазоне pH 3.5–10.5 с шагом 0.5 при оптимальной для их роста температуре. Для определения галофильности культивирование проводили в пробирках с соответствующей жидкой питательной средой, содержащей NaCl и  $\text{MgCl}_2$ , в диапазоне концентраций 0–10% с шагом 0.25%.

**Выделение ДНК и идентификация культур микроорганизмов по гену 16S рРНК.** Для выделения тотальной ДНК из биомассы микроорганизмов использовали набор Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), следуя инструкциям производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК для таксономической идентификации выделенных чистых культур проводили в компании “Бигль” (Россия) и в ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big-Dye Terminator v. 3.1 (“Applied Biosystems”, США) на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3730 (“Applied Biosystems”, США). Для секвенирования использовали праймеры 341f и 805r (на V3–V4 регион гена 16S рРНК), а также праймеры 11f и 1492r (на V1–V9 регион гена 16S рРНК), чтение проводили в перекрывающихся направлениях [38, 39]. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLASTN [40] и RDP Classifier [41]. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК выделенных чистых культур бактерий депонированы в GenBank под номерами OM416237 – OM416243.

**Анализ физико-химических свойств стали, подвергнутой биокоррозии.** Жидкие питательные среды разливали в бактериологические пробирки и анаэробные пробирки Хангейта (в случае СРБ) по 10 мл в каждую. В пробирки с питательной средой вносили стерильные бруски стальной арматуры (ГОСТ 5781-82) длиной 2–3 см и диаметром 0.5 см. Стерилизацию брусков проводили в автоклаве при давлении  $P_{\text{изб.}} = 10.1 \times 10^4$  Па в течение 60 мин. Затем в пробирки с соответствующей питательной средой и стальными брусками вносили суспензию соответствующей чистой культуры микроорганизмов в концентрации  $10^8$  кл./мл по 1 мл в каждую пробирку (кроме контрольных). Контрольные пробирки не содержали клеток бактерий. Инкубирование культур в пробирках проводили при температуре 14 и 28°C в течение 4 нед.

После месяца инкубирования брусков арматуры (ГОСТ 5781–82) в пробирках с выделенными из прибрежной зоны Баренцева моря чистыми культурами потенциально коррозионно-активных микроорганизмов проводили анализ физико-химических изменений материала с использованием комплекса аналитических методов. Первоначально образцы корродирующей стальной арматуры исследовали с применением цифрового оптиче-

ского стереомикроскопа Leica M250C (“Leica Microsystems”, Германия), интегрированного с цифровой камерой Leica DFC290 для захвата изображения. При этом были выбраны участки поверхности с признаками заметных изменений, которые в дальнейшем анализировали методом сканирующей электронной микроскопии. Эти исследования были выполнены с использованием настольного растрового сканирующего электронного микроскопа ТМ 3000 (“Hitachi”, Япония), оснащенного приставкой энергодисперсионного микроанализа Oxford, в ресурсном центре “Микроскопия и микроанализ” Санкт-Петербургского государственного университета (Россия).

Для определения качественного фазового состава образцов был использован порошковый дифрактометр D2 Phaser (“Bruker”, Германия) с кобальтовым анодом. Рентгенограммы получали при комнатной температуре в интервале  $2\theta = 5\text{--}70^\circ$ . Фазовый анализ проводили с помощью базы данных PDF-2 (ICDD, США).

Все микробиологические, биохимические и аналитические эксперименты осуществляли в трех независимых повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение и идентификация чистых культур коррозионно-активных микроорганизмов.** Развитие выделенных накопительных культур потенциально коррозионно-активных микроорганизмов на соответствующих питательных средах оценивали визуально и спектрофотометрически ( $\lambda$  575 нм) на 3 и 7 сут культивирования. На 3 сут культивирования в накопительных культурах, полученных из соскобов обрастаний с конструкционных материалов, расположенных на стенде в литоральной зоне, наблюдали рост аммонифицирующих микроорганизмов. Также на 3 сут наблюдали рост железоокисляющих микроорганизмов в накопительных культурах, полученных из соскобов биопленок с исследуемых конструкционных материалов, расположенных в атмосферной зоне. Рост сероокисляющих, сульфатредуцирующих и нитрифицирующих микроорганизмов на 3 сут культивирования отсутствовал. На 7 сут культивирования наблюдали рост всех исследуемых групп аэробных микроорганизмов, наиболее интенсивный — при высеве из образцов, экспонированных в атмосферной зоне. Следует отметить, что рост сероокисляющих бактерий, выделенных из обрастаний арматуры с защитным покрытием, был слабее в атмосферной зоне, но активнее — в литоральной. Активно растущие железоокисляющие гетеротрофные микроорганизмы выделялись, в основном, из атмосферной зоны. При этом наиболее интенсивный их рост наблюдали при высеве из обрастаний стальной арматуры. Культуры железоокисляющих бактерий из обрастаний образцов как с за-

щитным покрытием, так и без него, экспонированных в атмосферной зоне, показывали лучший рост по сравнению с культурами из литоральной зоны. Отсутствовал рост железобактерий только при посеве соскобов с бетона из литоральной зоны. Накопительные культуры анаэробных СРБ на 7 сут показывали рост и образование сероводорода только с образцов соскобов обрастаний бетона и стальной арматуры, экспонированных в литоральной зоне. При этом защитное покрытие на стальной арматуре не способствовало ингибированию роста СРБ.

Для получения чистых культур бактерий и последующей их идентификации по гену, кодирующему 16S рРНК, были отобраны накопительные культуры сульфатредуцирующих, железоокисляющих и сероокисляющих бактерий, выделенных с соскобов обрастаний на образцах бетона, дерева и стальной арматуры, экспонированных в атмосферной и литоральной зонах.

По результатам секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК полученные чистые культуры бактерий были идентифицированы следующим образом: сульфатредуцирующие из литоральной зоны — *Desulfovibrio* sp. 7Л (96.16% сходства с *Desulfovibrio vulgaris* DP4), *Halodesulfovibrio* sp. 10Л (99.6% сходства с *Halodesulfovibrio* sp. МК-HDV); железоокисляющие из атмосферной зоны — *Rhodococcus* sp. 1А (94.19% сходства с *Rhodococcus* sp. PDD-25b-12), *Micrococcus* sp. 3А (96.89% сходства с *Micrococcus luteus* U2 ecto 7), *Bacillus* sp. 4А (97.57% сходства с *Bacillus velezensis* PM19) и *Pseudomonas fluorescens* (99.8% сходства с *Pseudomonas* sp. ADAK22), из литоральной зоны — *Acinetobacter* sp. 11Л (95.72% сходства с *Acinetobacter johnsonii* NF114); сероокисляющие из атмосферной зоны — *Paracoccus* sp. 1А (93.53% сходства с *Paracoccus* sp. 49B05), из литоральной зоны — *Dietzia* sp. 12Л (96.41% сходства с *Dietzia* sp. J4S9).

**Микробиологические и физиолого-биохимические свойства выделенных коррозионно-активных микроорганизмов.** Проведенный нами молекулярный анализ филогенетического состава сообществ микроорганизмов в пробах воды, отобранных на литорали Кислой губы Баренцева моря, показал, что до 20% от всех бактерий, ассоциированных с частичками взвеси, приходилось на представителей рода *Pseudomonas* [11]. Культура *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 на агаризованной питательной среде Захаровой для железоокисляющих бактерий образовывала маслянистые колонии кремового цвета с гладкой поверхностью и каплевидным профилем. Клетки представляли собой слегка изогнутые подвижные палочки с округлыми концами, часто располагались в цепочках по 2–4 клетки. Грамотрицательные, но в старых культурах клетки могли окрашиваться как грамположительные. *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 —

аэробная хемоорганогетеротрофная бактерия. Оптимальная температура роста 28–29°C, медленно растет при 4°C, не растет при 45°C. Оптимальный диапазон pH для роста – 5.5–8.5; наблюдали также замедленный рост при pH 9.5–10.5, поэтому этот микроорганизм можно отнести к щелочеустойчивым нейтрофилам с оптимумом pH 6.5. Был отмечен рост на питательной среде Захаровой с концентрацией NaCl от 0 до 5%, при большей концентрации NaCl (от 6 до 10%) рост отсутствовал.

Бактерии *Bacillus* sp. на агаризованной питательной среде Захаровой для железоокисляющих бактерий образовывали белые матовые колонии. Клетки имели форму палочек с закругленными концами, часто формировали парные сочетания. Эти грамположительные бактерии, образующие овальные эндоспores, были отнесены к мезофильным (оптимальная температура для роста 28°C), факультативно анаэробным микроорганизмам.

Культура сероокисляющих бактерий *Dietzia* sp. на агаризованной питательной среде Бейеринка образовывала прозрачные, точечные колонии. Клетки очень мелкие (преимущественно парные кокки, также встречались и одиночные кокки), окрашивались по Граму положительно, оптимум pH для роста 7.0–8.0. Это аэробные, психротолерантные мезофилы (температурный оптимум для роста 28°C, наблюдался слабый рост при 4°C). При росте данной культуры на жидкой питательной среде Бейеринка для сероокисляющих бактерий, содержащей тиосульфат, в ходе микроскопирования отмечались отложения молекулярной серы (как промежуточного продукта окисления тиосульфата) вне клеток и снижение pH среды за счет образования сульфатов.

Температурный оптимум роста для сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. составил 25–30°C. При этом *Desulfovibrio* sp. являлся мезофилом, а *Halodesulfovibrio* sp. мог быть отнесен к психротолерантным мезофилам (наблюдали замедленный рост при 4°C). Облигатные анаэробы. Выделенные в чистые культуры *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. были способны активно расти с образованием H<sub>2</sub>S при pH от 6.0 до 8.5; оптимальное значение pH для роста обеих сульфатредуцирующих бактерий – 7.5 (нейтрофилы). Установлено, что изменение концентрации NaCl и MgCl<sub>2</sub> в составе питательной среды в диапазоне 0–2.5% практически не влияло на рост и образование сероводорода культурами *Desulfovibrio* sp. Однако культура *Halodesulfovibrio* sp. резко снижала скорость роста при концентрации NaCl ≤ 0.5%, а наилучший рост и образование сероводорода наблюдали при концентрации NaCl, равной 3%, то есть это галотолерантная бактерия. При изучении способности *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. использовать различные доноры электронов было показано, что обе куль-

**Таблица 2.** Рост сульфатредуцирующих бактерий, выделенных в чистые культуры из литоральной зоны Кислой губы Баренцева моря, при использовании различных доноров электронов

| Донор электронов (мМ) | <i>Desulfovibrio</i> sp. | <i>Halodesulfovibrio</i> sp. |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------|
| Формиат (10)          | +                        | +                            |
| Ацетат (10)           | –                        | +                            |
| Пропионат (15)        | –                        | –                            |
| Бутират (10)          | –                        | –                            |
| Лактат (20)           | +                        | +                            |
| Пируват (20)          | +                        | +                            |
| Малат (10)            | –                        | +                            |
| Фумарат (10)          | +                        | –                            |
| Глицерол (10)         | +                        | +                            |
| Серин (10)            | –                        | +                            |
| Хлорид холина (5)     | –                        | +                            |
| Бензоат (1)           | –                        | +                            |

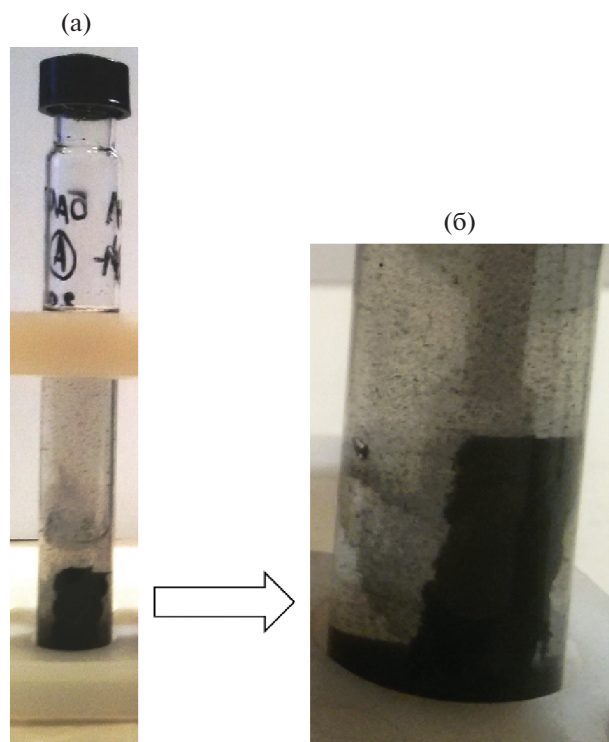
Примечание: (+) – наличие роста; (–) – отсутствие роста.

туры хорошо росли и образовывали сероводород на лактате, пирувате, формиате и глицероле в качестве донора электронов. Бактерии *Halodesulfovibrio* sp. проявляли способность к использованию более широкого спектра доноров электронов, в частности, серина, хлорида холина и бензоата (табл. 2).

*Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. на агаризованных питательных средах Видделя для морских форм СРБ и Постгейта С в строго анаэробных условиях образовывали на 5–7 сут культивирования ярко выраженные черные (из-за осаждения FeS) круглые колонии диаметром 1–2 мм. Клетки подвижные, неспорообразующие, вибрион-подобные, изогнутые палочки размерами 0.5–1.0 × 3.0–5.0 мкм, грамотрицательные, каталазоположительные.

**Биокоррозия стальной арматуры с участием выделенных в чистые культуры микроорганизмов.** Для эксперимента с биокоррозией брусков арматуры (ГОСТ 5781–82) были изначально взяты 7 культур железоокисляющих бактерий (выделенных из образцов 1А, 3А, 4А, 11Л и 12Л), 2 культуры сероокисляющих бактерий (выделенных из образцов 1А и 12Л) и 2 культуры сульфатредуцирующих бактерий (выделенных из образцов 7Л и 10Л). Контролем служили бруски арматуры, помещенные в соответствующие стерильные питательные среды, не засеянные микроорганизмами.

На 6 сут культивирования при температуре 28°C был отмечен рост *Pseudomonas fluorescens* и культур бактерий *Bacillus* sp., выделенной из образца 4А. При этом визуально наблюдалось расслоение: вокруг бруска арматуры культуральная жидкость была прозрачная, затем шла полоса ко-



**Рис. 1.** Брусек стальной арматуры в питательной среде Видделя, инокулированной *Desulfovibrio* sp., на 14 сут культивирования (а, б — при увеличении, виден черный осадок нерастворимого в воде сульфида железа FeS).

ричного цвета (по всей видимости, состоящая из оксидов железа) и вверху — светло-зеленая культуральная жидкость. На 13 сут культивирования рост наблюдали во всех пробирках, отмечалось потемнение и помутнение питательной среды Захаровой для железобактерий. На 18 сут культивирования питательная среда в пробирках с железобактериями еще сильнее потемнела, особенно при температуре 28°C.

В пробирках с сероокисляющими бактериями на 13 сут культивирования наблюдали лишь легкое помутнение питательной среды Бейеринка. При температуре 28°C был более интенсивный рост всех выделенных чистых культур железобактерий, чем при температуре 14°C. Через месяц культивирования питательная среда в пробирках с культурами выделенных железобактерий, растущих при 28°C, стала черно-коричневой, непрозрачной, прозрачная полоса рядом с брусом арматуры исчезла. В культурах, растущих при 14°C, питательная среда за месяц лишь слегка потемнела, полоса рядом с брусом арматуры сохранилась. В контрольных пробирках с питательной средой Захаровой (исходно светло-зеленого цвета) только через четыре недели наблюдалось незначительное потемнение, что связано, очевидно, с химическим окислением. В пробир-

ках с сероокисляющими бактериями изменения цвета питательной среды Бейеринка в течение всего процесса культивирования не наблюдали.

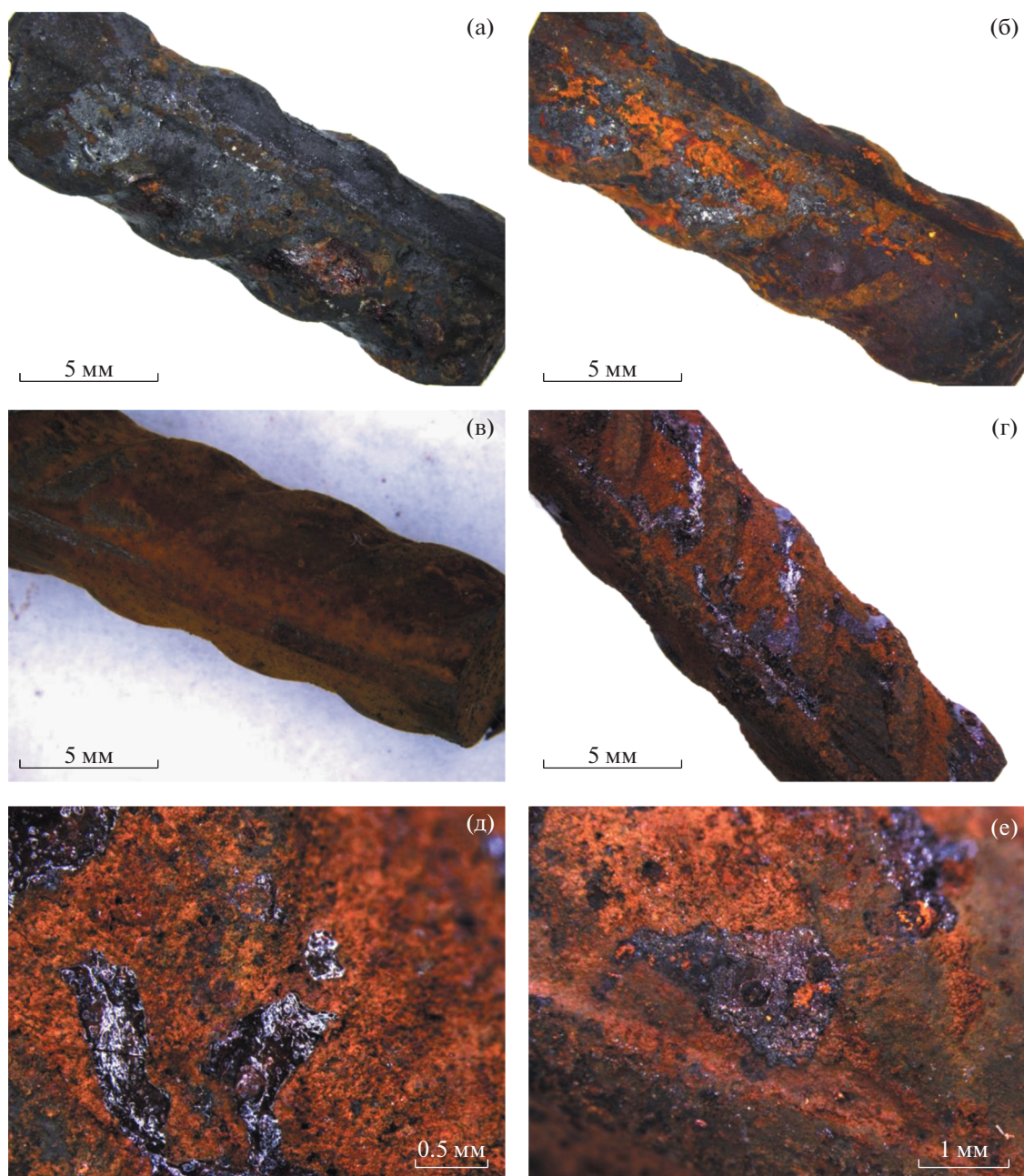
На 3 сут культивирования при температуре 28°C был отмечен хороший рост чистых культур *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp., выделенных из литоральных образцов 7Л (бетон) и 10Л (стальная арматура) соответственно. При этом визуально в течение культивирования наблюдалось возрастающее накопление в пробирках черного осадка FeS, нерастворимого в воде и формирующегося при взаимодействии железа с образующимся бактериями сероводородом (рис. 1). На 20 сут культивирования питательная среда в пробирках с культурами СРБ еще сильнее почернела, частицы сульфида железа полностью покрыли густым слоем бруски стальной арматуры.

**Электронно-микроскопический и рентгенофазовый анализ (РФА) биокоррозионных повреждений.** Для определения степени коррозионной активности бактерий из Баренцева моря в отношении арматурной стали (ГОСТ 5781-82) были взяты образцы стальной арматуры после культивирования в течение 1 месяца с *Bacillus* sp. (из образца арматуры 4А, атмосферная зона), *Pseudomonas fluorescens* (из образца бетона 1А, атмосферная зона), *Dietzia* sp. (из образца арматуры с защитным покрытием 12Л, литоральная зона), *Desulfovibrio* sp. (из образца бетона 7Л, литоральная зона) и *Halodesulfovibrio* sp. (из образца арматуры 10Л, литоральная зона).

Как видно из рис. 2б, в присутствии аэробных железобактерий *P. fluorescens* на стальной арматуре в течение месяца появлялись интенсивные пятна ржаво-коричневого цвета (аналогичную картину наблюдали и для *Bacillus* sp.), в отличие от контроля (рис. 2а). В случае сероокисляющих бактерий ржавые зоны биокоррозии были незначительными, мало отличавшимися от контрольного варианта.

Под воздействием сульфатредуцирующих бактерий на стальной арматуре протекали активные коррозионные процессы, приводившие к заметным изменениям поверхностного слоя материала. Были отмечены существенные изменения поверхности в сравнении с контрольным вариантом (рис. 2в), что проявлялось в отложении продуктов биокоррозии на поверхности арматуры, а также в образовании глубоких каверн (рис. 2г–2е). В контроле было зафиксировано незначительное и равномерное отложение продуктов коррозии арматуры, однако образования каверн не происходило.

С использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) была изучена микроструктура поверхности образцов арматуры (ГОСТ 5781–82), находящихся в течение месяца в соответствующих питательных средах (контроль) и в питательных средах, засеянных выделенными чистыми культурами коррозионно-активных бактерий раз-



**Рис. 2.** Арматура из конструкционной стали (ГОСТ 5781–82) после 28 сут экспозиции, вид под бинокляром. В питательной среде Захаровой: а – контроль; б – в присутствии культуры *Pseudomonas fluorescens*; в питательной среде Видделя: в – контроль; г – в присутствии культуры *Desulfovibrio* sp.; коррозия под действием сульфатредуцирующих бактерий: д – *Desulfovibrio* sp.; е – *Halodesulfovibrio* sp.

личных физиологических групп (рис. 3). В образцах арматуры, подвергнутых воздействию железо- и сероокисляющих бактерий, а также в особенности анаэробных сульфатредуцирующих бактерий, на поверхности металла были хорошо заметны значительные биокоррозионные повреждения, в том числе питтинги и каверны. На таких участках зафиксированы продукты коррозии различной морфологии. Так, в варианте с культурой *Dietzia* sp. отмечены ламеллярные кристаллические образо-

вания на поверхности стали (рис. 3б), которые отсутствовали в контроле (рис. 3а). В варианте с *Bacillus* sp. зафиксировано образование призматических кристаллов (рис. 3г), а в варианте с *Pseudomonas fluorescens* обнаружено формирование многочисленных глобулярных структур (рис. 3д) на поврежденной поверхности стали, которые также отсутствовали в контроле (рис. 3в).

СЭМ-анализ образцов показал, что поверхностные биокоррозионные отложения на стальной ар-

матуре в вариантах с сульфатредуцирующими бактериями также характеризовались формированием кристаллических структур. При этом проявление коррозии стали существенно отличалось от того, что наблюдали во всех вариантах с аэробными железо- и сероокисляющими бактериями. При экспозиции брусков арматуры с обоими выделенными штаммами СРБ образовывались характерные каверны (рис. 3ж–3з), которые отсутствовали в контроле (рис. 3е). Наиболее активное формирование каверн на поверхности стальной арматуры наблюдали в варианте с *Desulfovibrio* sp.

Ниже приведены суммарные результаты по анализу химических элементов, идентифицированных на поверхности образцов стальной арматуры после 28 сут экспозиции (спектральный энергодисперсионный микроанализ 3–6 точек зондирования).

В контроле с питательной средой Захаровой для железоокисляющих бактерий (атомный процент, ат. %): С (9.844), **Fe (35.233)**, О (54.923).

В образце с культурой железоокисляющей бактерии *Bacillus* sp. (ат. %): Р (0.045), S (0.133), Mn (0.159), Al (0.187), Si (0.459), Na (0.474), Ca (3.738), C (10.423), **Fe (28.847)**, О (55.535).

В образце с культурой железоокисляющей бактерии *Pseudomonas fluorescens* (ат. %): S (0.089), Р (0.098), Mn (0.176), Al (0.354), Si (1.052), Na (1.572), C (12.530), **Fe (27.479)**, О (56.650) – рис. 4а.

В контроле с питательной средой Бейеринка для сероокисляющих бактерий (ат. %): S (0.117), Si (0.282), Na (0.316), Mn (0.352), Ca (0.473), C (10.610), **Fe (32.366)**, О (55.484).

В образце с культурой сероокисляющей бактерии *Dietzia* sp. (ат. %): Si (0.145), S (0.214), Mg (0.488), Mn (0.776), Ca (3.192), C (12.091), **Fe (26.809)**, О (56.285).

В контроле с питательной средой Видделя для морских сульфатредуцирующих бактерий (ат. %): Cl (0.516), Р (0.591), Si (1.864), **Fe (32.482)**, О (64.547).

В образцах с культурами сульфатредуцирующих бактерий (ат. %), для *Desulfovibrio* sp.: Cl (0.110), Р (0.220), Ca (0.524), Si (0.539), Na (1.686), S (9.927), **Fe (24.317)**, О (62.677); для *Halodesulfovibrio* sp.: Si (0.726), Na (1.194), Ca (1.592), S (18.667), **Fe (27.411)**, О (50.410) – рис. 4б.

Состав химических элементов в нескольких точках исследованных образцов поверхности стальной арматуры с кристаллическими структурами показал высокое содержание серы в образцах, экспонировавшихся с чистыми культурами СРБ, что отличалось от образцов с аэробными коррозионно-активными культурами железо- и сероокисляющих бактерий, где содержание серы было незначительно. При этом в контрольном варианте (питательная среда Видделя для морских форм СРБ) сера выявлена не была.

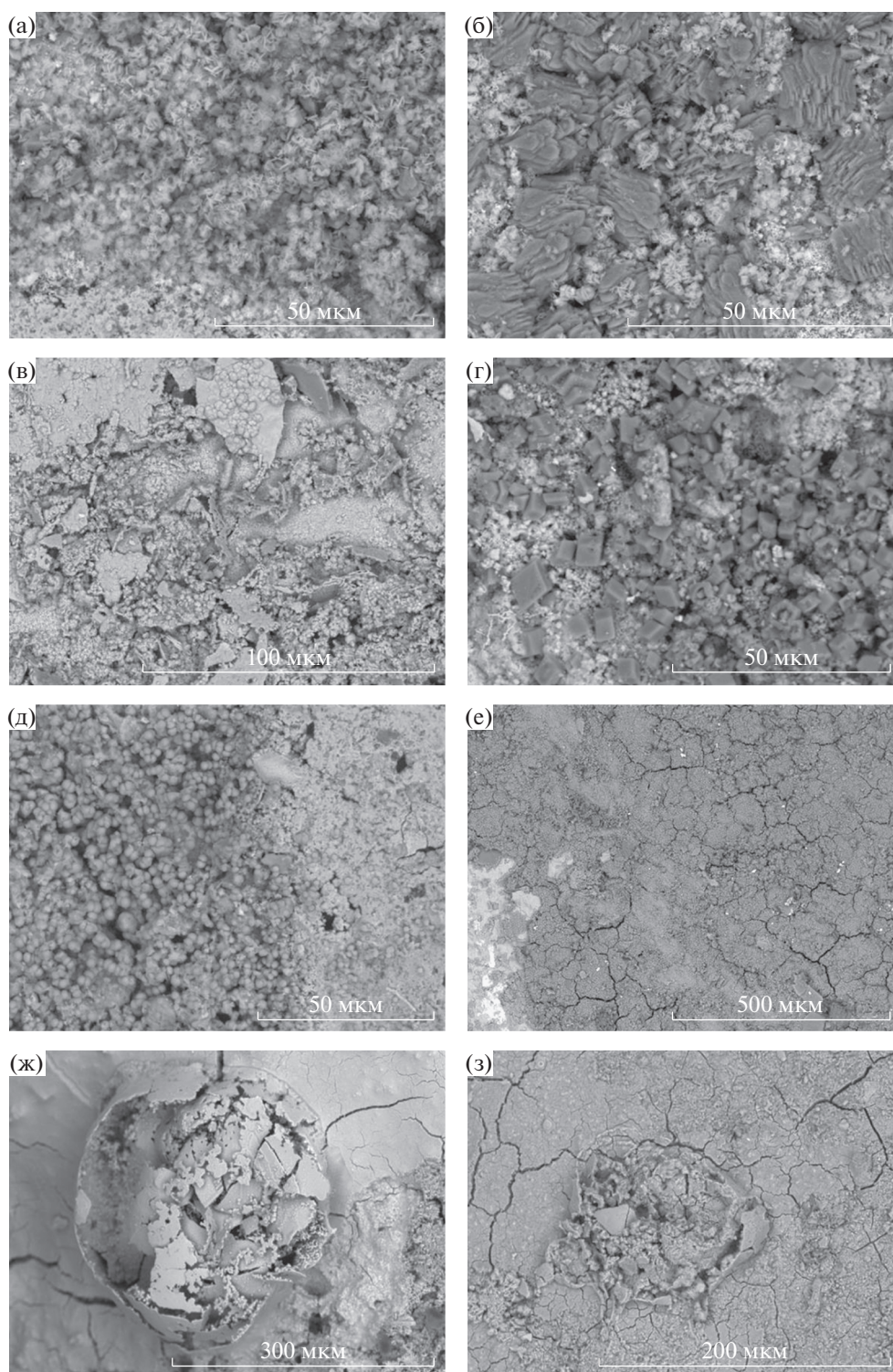
При анализе рентгенограмм, полученных для образцов стальной арматуры при культивировании с железо- и сероокисляющими бактериями, дифракционные максимумы не обнаружены, образцы оказались рентгеноаморфны. Этот результат, несмотря на наличие в продуктах коррозии кристаллических структур (по результатам сканирующей электронной микроскопии), может быть связан с низким содержанием кристаллического материала для определения методом рентгенофазового анализа (**РФА**).

РФА продуктов биокоррозии арматуры из конструкционной стали ГОСТ 5781–82 (рис. 5) продемонстрировал, что в присутствии выделенных чистых культур СРБ родов *Desulfovibrio* и *Halodesulfovibrio* в результате коррозии стали образуется фосфат железа  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  (аналог минерала вивианита), а также вследствие восстановления серы до степени окисления 2 образуется сульфид кальция CaS (аналог минерала ольдгамита). Кроме того, в случае *Halodesulfovibrio* sp. на рентгенограмме определяется сера, которая является продуктом восстановления сульфат-ионов. На электронных (СЭМ) микрофотографиях были отмечены кристаллы различной морфологии – призматические кристаллы вивианита и уплощенные пирамидальные кристаллы серы.

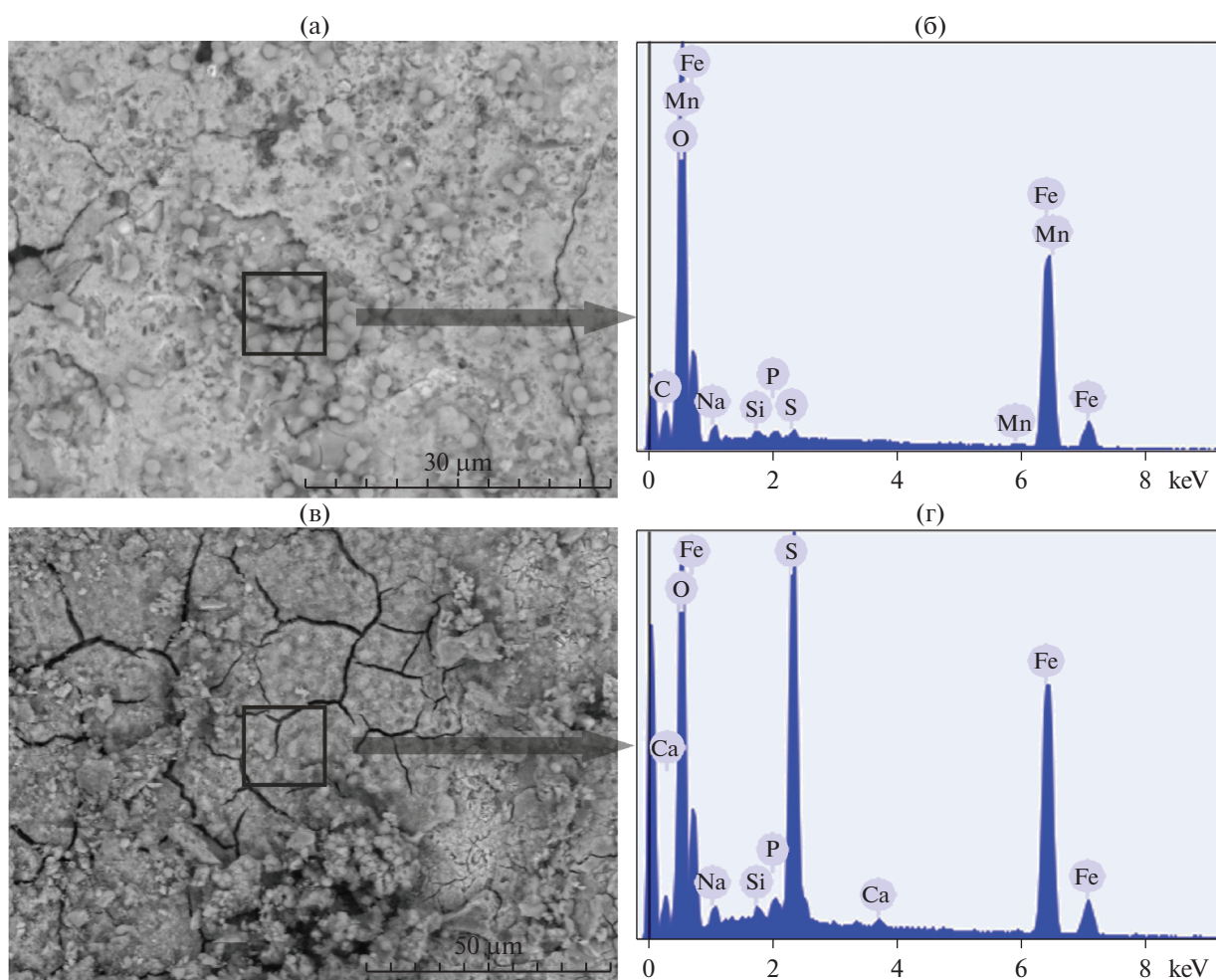
\*\*\*

Таким образом, из образцов обрастаний различных конструкционных материалов (стальная арматура, бетон, дерево), экспонированных в литоральной и атмосферной зонах в районе Кислой губы Баренцева моря, были получены накопительные и чистые культуры бактерий, относящихся к ключевым группам коррозионно-активных микроорганизмов – железоокисляющим, сульфатредуцирующим, сероокисляющим, нитрифицирующим и аммонифицирующим. По результатам определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК идентифицированы чистые культуры железоокисляющих (*Rhodococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*), сульфатредуцирующих (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.) и сероокисляющих (*Paracoccus* sp., *Dietzia* sp.) бактерий.

Отмечено проявление биокоррозии на образцах арматуры (ГОСТ 5781–82), инокулированных выделенными в чистые культуры железоокисляющими (*Pseudomonas fluorescens*) и сульфатредуцирующими (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.) бактериями, а также изменения структуры и минерального состава поверхностного слоя стальной арматуры, что показано с помощью сканирующей электронной микроскопии и РФА. Расширено представление о проявлениях биокоррозии, связанных с конкретными видами микроорганизмов. При этом наибольшую активность в раз-



**Рис. 3.** Электронные (СЭМ) микрофотографии структуры поверхности стальной арматуры после 28 сут экспозиции. В питательной среде Бейеринка: а — контроль; б — с культурой *Dietzia* sp.; в питательной среде Захаровой: в — контроль; г — с культурой *Bacillus* sp.; д — с культурой *Pseudomonas fluorescens*; в питательной среде Видделя: е — контроль; ж — с культурой *Desulfovibrio* sp.; з — с культурой *Halodesulfovibrio* sp.



**Рис. 4.** Спектры, полученные в ходе энергодисперсионного микроанализа химического состава поверхности стальной арматуры после 28 сут экспозиции: а – в питательной среде Захаровой с культурой *Pseudomonas fluorescens*; в – в питательной среде Видделя с культурой *Desulfovibrio* sp. На а и в показаны точки, где были получены соответствующие спектры (б, г).

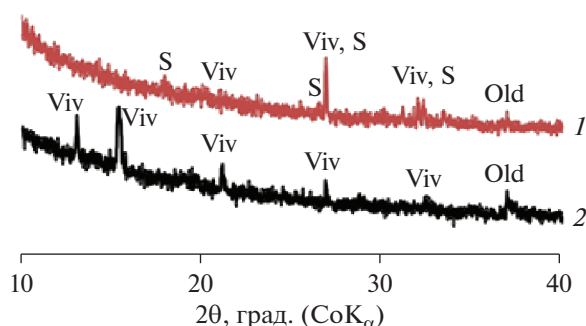
витии коррозионных процессов проявили сульфатредуцирующие бактерии, выделенные из литоральной зоны Баренцева моря. Очевидно, что их роль в сочетании с коррозионной активностью морской воды способна заметно влиять на состояние материалов и конструкций в прибрежной зоне арктических морей.

Полученные результаты свидетельствуют об активном участии бактерий различных физиологических групп, в особенности СРБ, в процессах трансформации поверхностного слоя стальной арматуры. Образование минеральных фаз в продуктах коррозии зависит от штаммов указанных бактерий и, очевидно, связано с особенностями их метаболизма. Все выделенные в чистые культуры из литоральной зоны Баренцева моря штаммы могут быть отнесены к представителям коррозионно-активного микробного сообщества. Очевидно, что биопленки, сформированные бактериями из различных таксономических групп, могут также

играть ключевую роль для последующего развития на поверхности различных конструкционных материалов макрообрастаний за счет создания условий, способствующих их закреплению и дальнейшему развитию. Полученные данные важны для понимания процессов биокоррозии сталей и железобетонных, применяемых в морском климате арктических широт.

Авторы выражают благодарность техническому директору Кислогубской ПЭС (АО “Ленинградская ГАЭС” ПАО “РусГидро”) М.М. Нурмагомедову за помощь в проведении натурных испытаний конструкционных материалов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-17-00141 по теме “Современное минералообразование при участии микроорганизмов”, а также в рамках государственного задания кафедры микробиологии МГУ по теме “Физиология и биохимия фототрофных и хемотротных микроорганизмов” (ЦИТиС № 121032300094-7). Иссле-



**Рис. 5.** Рентгенограммы фазового состава поверхности образцов стальной арматуры после 28 сут экспозиции с культурами *Halodesulfobivrio* sp. (1) и *Desulfovibrio* sp. (2) в питательной среде Видделя. Viv – вивианит, S – сера, Old – ольдгамит.

дования проведены с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ “Рентгенодифракционные методы исследования” и “Микроскопии и микроанализа”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Beech I.B., Sunner J. // *Biotechnol.* 2004. V. 15. № 3. P. 181–186.
- Kip N., van Veen J.A. // *ISME J.* 2015. V. 9. № 3. P. 542–551.
- Bryukhanov A.L., Vlasov D.Y., Maiorova M.A., Tsarovtseva I.M. // *Power Technol. Eng.* 2021. V. 54. № 5. P. 609–614.
- Nyanikova G., Bryukhanov A., Vlasov D., Mayorova M., Nurmagedov M., Akhaev D., Tsarovtseva I. // *E3S Web Conf.* 2020. V. 215. P. 1–9 (04001). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021504001>
- Videla H.A., Herrera L.K. // *Int. Microbiol.* 2005. V. 8. № 3. P. 169–180.
- Ma Y., Zhang Y., Zhang R., Guan F., Hou B., Duan J. // *Biotechnol.* 2020. V. 104. № 2. P. 515–525.
- Procópio L. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 35. № 5. P. 73. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2647-4>
- Procópio L. // *Arch. Microbiol.* 2022. V. 204. № 2. P. 138. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02755-7>
- Amendola R., Acharjee A. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 806688. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.806688>
- Loto C.A. // *J. Adv. Manuf. Technol.* 2017. V. 92. P. 4241–4252.
- Bryukhanov A.L., Majorova M.A., Tsarovtseva I.M. // *Limnol. Freshw. Biol.* 2020. V. 3. № 4. P. 969–970.
- Kim B.H., Lim S.S., Daud W.R., Gadd G.M., Chang I.S. // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 190. P. 395–401.
- Moura V., Ribeiro I., Moriggi P., Capao A., Salles C., Bitati S., Procópio L. // *Arch. Microbiol.* 2018. V. 200. № 10. P. 1447–1456.
- Enning D., Venzlaff H., Garrelfs J., Dinh H.T., Meyer V., Mayrhofer K. et al. // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. № 7. P. 1772–1787.
- Etim I.N., Wei J., Dong J., Xu D., Chen N., Wei X., Su M., Ke W. // *Biofouling.* 2018. V. 34. № 10. P. 1121–1137.
- Mustin C., Berthelin J., Marion P., de Donato P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. № 4. P. 1175–1182.
- López A.I., Marín I., Amils R. // *Microbiologia.* 1994. V. 10. № 1–2. P. 121–130.
- Inaba Y., Xu S., Vardner J.T., West A.C., Banta S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. № 21. e01381–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01381-19>
- Huang Y., Xu D., Huang L.Y., Lou Y.T., Muhadesi J.B., Qian H.C., Zhou E.Z., Wang B.J., Li X.T., Jiang Z., Liu S.J., Zhang D.W., Jiang C.Y. // *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021. V. 7. № 1. P. 6.
- Emerson D. // *Biofouling.* 2018. V. 34. № 9. P. 989–1000.
- Maeda T., Negishi A., Komoto H., Oshima Y., Kamimura K., Sugio T. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 88. № 3. P. 300–305.
- Makita H. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 8. P. 110.
- Ravenschlag K., Sahm K., Knoblauch C., Jørgensen B.B., Amann R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 8. P. 3592–3602.
- Muyzer G., Stams A.J.M. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. № 6. P. 441–454.
- Hamilton W.A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1985. V. 39. P. 195–217.
- Dinh H.T., Kuever J., Mussmann M., Hassel A.W., Strattmann M., Widdel F. // *Nature.* 2004. V. 427. № 6977. P. 829–832.
- Enning D., Garrelfs J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 4. P. 1226–1236.
- Videla H.A. // *Biofouling.* 2000. V. 15. № 1–3. P. 37–47.
- Ziadi I., Alves M.M., Taryba M., El-Bassi L., Hassairi H., Bousselmi L., Montemor M.F., Akrou H. // *Bioelectrochemistry.* 2020. V. 132. P. 107413.
- Yang S.S., Lin J.Y., Lin Y.T. // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 1998. V. 31. № 3. P. 151–164.
- Zhang Y., Ma Y., Duan J., Li X., Wang J., Hou B. // *Biofouling.* 2019. V. 35. № 4. P. 429–442.
- Захарова Ю.Р., Парфенова В.В. // *Известия РАН. Серия Биологическая.* 2007. № 3. С. 290–295.
- Widdel F., Bak F. *The Prokaryotes*. 2 Ed. / Eds. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer. N.Y.: Springer-Verlag. 1992. V. 4. P. 3352–3378.
- Брюханов А.Л., Непрусов А.И., Шестаков А.И., Комова И.Б. *Методы исследования анаэробных микроорганизмов*. М.: Научная библиотека МГУ, 2015. 178 с.
- Beijerinck M.W. // *Archs. Neerl. Science Series.* 1904. V. 29. P. 131–157.
- Issayeva A.U., Pankiewicz R., Otarbekova A.A. // *Pol. J. Environ. Stud.* 2020. V. 29. № 6. P. 4101–4108.
- Trüper H.G., Schlegel H.G. // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1964. V. 30. P. 225–238.
- Lane D.J. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfello. Chichester: John Wiley & Sons. 1991. P. 115–175.
- Herlemann D.P., Labrenz M., Jurgens K., Bertilsson S., Waniek J.J., Andersson A.F. // *ISME J.* 2011. V. 5. № 10. P. 1571–1579.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. // *BMC Bioinformatics.* 2009. V. 10. P. 421.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267.

## Corrosive Activity of Microorganisms Isolated from Fouling of Structural Materials in the Coastal Zone of the Barents Sea

D. Yu. Vlasov<sup>a, f, \*</sup>, A. L. Bryukhanov<sup>b</sup>, G. G. Nyanikova<sup>c</sup>, M. S. Zelenskaya<sup>a</sup>,  
I. M. Tsarovtseva<sup>d</sup>, and A. R. Izatulina<sup>e</sup>

<sup>a</sup>*Saint Petersburg State University, Faculty of Biology, Saint Petersburg, 199034 Russia*

<sup>b</sup>*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234 Russia*

<sup>c</sup>*Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University),  
Faculty of Chemical and Biotechnology, Saint Petersburg, 190013 Russia*

<sup>d</sup>*Vedeneev All-Russian Scientific Research Institute of Hydraulic Engineering, Saint Petersburg, 195220 Russia*

<sup>e</sup>*Saint Petersburg State University, Institute of Earth Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia*

<sup>f</sup>*Komarov Botanical Institute of RAS, Saint Petersburg, 197376 Russia*

\**e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru*

Potentially corrosive active microorganisms isolated from structural materials with signs of biofouling on the coast of Kislaya Bay (Barents Sea, Russia) were studied: sulfate-reducing, iron-oxidizing and sulfur-oxidizing bacteria. Cultures of sulfate-reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.), sulfur-oxidizing bacteria (*Dietzia* sp.), and iron-oxidizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp.) were identified on the basis of the determining the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene. The methods of scanning electron microscopy, energy dispersive microanalysis of the chemical composition and X-ray phase analysis revealed significant changes in the structure and chemical composition of the surface layer of steel reinforcement samples exposed for 28 days in the presence of isolated microorganisms that demonstrated their active participation in corrosion processes. It has been shown that the formation of mineral analogues in corrosion products depends on the strains of studied bacteria and peculiarities of their metabolism. Sulfate-reducing bacteria isolated from the littoral zone of the Barents Sea showed the highest activity in the development of corrosion processes.

**Keywords:** sulfate-reducing bacteria (SRB), sulfur-oxidizing bacteria, iron bacteria, Barents Sea, structural materials, biocorrosion, scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction