

Научная статья

УДК 579.26:678.8

DOI: 10.18577/2307-6046-2022-0-12-121-134

ВЛИЯНИЕ ПРИСУТСТВИЯ ТОКСИЧНЫХ ДОБАВОК В СОСТАВЕ ПОЛИМЕРНОГО МАТЕРИАЛА НА ПРОЦЕССЫ ЕГО БИОДЕСТРУКЦИИ В МОРСКОЙ ВОДЕ

А.Б. Лаптев¹, В.Г. Железняк¹, Т.П. Турова², Д.Ш. Соколова², Т.Н. Назина²

¹Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия; admin@viam.ru

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия; info@fbras.ru

Аннотация. Проведена экспозиция в течение 60 сут образцов отвержденной полиэфирной смолы с добавлением токсичных оксидов металлов и целлюлозы (контрольный образец) в морской воде Геленджикской бухты Черного моря. Показано, что эукариотные диатомовые водоросли, а также прокариотные сине-зеленые водоросли (цианобактерии) были наиболее многочисленными членами сообществ, заселяющих поверхности образцов. Методом секвенирования V4 региона гена 16S рРНК прокариот и биоинформатического анализа этих результатов показано, что в обрастаниях на образцах с оксидами хрома, свинца, цинка и титана возрастала доля бактерий, устойчивых к этим металлам, тогда как бактерии, потенциально способные деградировать полиэфирные смолы, составляли минорную часть сообществ.

Ключевые слова: полиэфирная смола, бактерии, биодеструкция, токсичность, оксиды металлов, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, биоинформатический анализ

Для цитирования: Лаптев А.Б., Железняк В.Г., Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н. Влияние присутствия токсичных добавок в составе полимерного материала на процессы его биодеструкции в морской воде // Труды ВИАМ. 2022. № 12 (118). Ст. 11. URL: <http://www.viam-works.ru>. DOI: 10.18577/2307-6046-2022-0-12-121-134.

Scientific article

THE EFFECT OF THE PRESENCE OF TOXIC ADDITIVES IN THE POLYMER MATERIAL ON THE PROCESSES OF ITS BIODEGRADATION IN SEAWATER

A.B. Laptev¹, V.G. Zheleznyak¹, T.P. Tourova², D.Sh. Sokolova², T.N. Nazina²

¹Federal State Unitary Enterprise «All-Russian Scientific-Research Institute of Aviation Materials» of National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia; admin@viam.ru

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; info@fbras.ru

Abstract. The exposition of samples of cured polyester resin with the addition of metal oxides and cellulose (control sample) in the seawater of the Gelendzhik Bay of the Black Sea was carried out for 60 days. It was shown that eukaryotic diatoms, as well as prokaryotic blue-green algae (cyanobacteria) were the most numerous members of communities inhabiting the surfaces of samples. By sequencing the V4 region of the prokaryotic 16S rRNA gene and bioinformatic analysis of these results, it was shown that in fouling on samples with chromium, lead, zinc, and titanium oxides, the proportion of bacteria resistant to these metals increased, while bacteria potentially capable of degrading polyester resins formed a minor part of the communities.

Keywords: *polyester resin, bacteria, biodegradation, toxicity, metal oxides, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, bioinformatic analysis*

For citation: Laptev A.B., Zheleznyak V.G., Tourova T.P., Sokolova D.Sh., Nazina T.N. The effect of the presence of toxic additives in the polymer material on the processes of its biodegradation in seawater. *Trudy VIAM*, 2022, no. 12 (118), paper no. 11. Available at: <http://www.viam-works.ru>. DOI: 10.18577/2307-6046-2022-0-12-121-134.

Введение

В последние десятилетия разработаны материалы, максимально стойкие к воздействию агрессивных сред, что предполагает насущную необходимость создания способов их утилизации с минимальным ущербом для окружающей среды [1].

Устойчивость полимерных материалов к биодеструкции зависит от различных факторов: шероховатости поверхности, химической структуры и физического состояния полимеров, а также физико-химических условий среды, в которой они эксплуатируются [2–4]. Полимеры с гидролизуемыми химическими связями в основной цепи, такие как полиэтилентерефталат, более подвержены биодegradации [5], чем такие, как полистирол, в структуре которого отсутствуют гидролизуемые функциональные группы [6].

В морской воде на поверхности материалов неизбежно формируются обрастания (микробные биопленки). Биопленки усиливают микробную активность, защищают микроорганизмы от ультрафиолета, радиации, высокой солености, тяжелых металлов и антибиотиков [7, 8]. Однако пока отсутствует понимание, чем в большей степени определяется состав формирующихся биопленок – физико-химическими факторами и микрофлорой окружающей водной среды или свойствами экспонируемых материалов. Имеющиеся в научно-технической литературе данные, полученные в результате изучения биопленок, развивающихся на различных материалах в водных средах, пока не позволяют однозначно ответить на этот вопрос. В частности, установлено, что микробные скопления на пластике и стекле формируются не в зависимости от поверхностных свойств материала, а под влиянием места экспозиции и сезонности [9, 10].

В предыдущих работах авторами показано заметное влияние характера водной среды обитания на состав микробных сообществ обрастаний [11].

Полиэфирные смолы широко производят в виде полимерных композиционных материалов для изготовления корпусов легких судов, биев и других изделий. Такие изделия из полиэфирной смолы длительно контактируют с морской водой и морской микрофлорой, поэтому обеспечение их длительной работоспособности при воздействии влаги и микроорганизмов является актуальной задачей.

Цель данной работы – определение состава бактериальных сообществ обрастаний на образцах отвержденной полиэфирной смолы, содержащей наполнители в виде оксидов металлов различной токсичности, в морской воде Геленджикской бухты Черного моря.

Материалы и методы

Образцы изготовлены из прозрачной полиэфирной смолы для литья марки Norsodyne O 12335 AL, отвержденной отвердителем Бутанокс М50. Для смазки формы использовали восковую разделительную спрей-смазку марки Вс-М. Добавляли наполнители в количестве 10 % (по массе) (рис. 1, а). Образцы размещали на литорали побережья Черного моря в районе г. Геленджика (рис. 1, б). На основании проведенных экспериментов установлено, что заметное обрастание образцов происходило только после 15 сут экспозиции, а полное обрастание – после 60 сут. Поэтому образцы для анализа снимали через 60 сут экспозиции в августе 2020 г. (рис. 1, в). Ионный состав морской воды в месте экспонирования приведен в табл. 1.

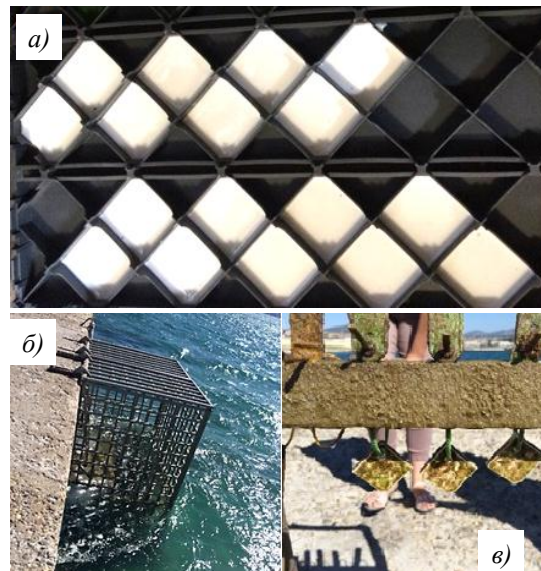


Рис. 1. Подготовка и экспозиция образцов: *а* – образцы полиэфирной смолы с добавлением соединений металлов различной токсичности в форме для отливки; *б* – экспозиция образцов в морской воде; *в* – внешний вид образцов после окончания экспозиции в Черном море

Таблица 1

**Ионный состав морской воды в точке экспонирования
(средние значения и диапазоны полученных значений за период экспозиции образцов)**

Катионы, мг/л			Анионы, мг/л	
K^+	Na^+	Mg^{2+}	Cl^-	SO_4^{2-}
<u>65–170</u> 130	<u>2608–5058</u> 4052	<u>282–622</u> 500	<u>5918–10890</u> 9396	<u>856–1487</u> 1277

* В числителе – минимальное и максимальное значения, в знаменателе – среднее.

Методы анализа состава прокариот в обрастаниях на полимерных материалах

Состав микробных сообществ определяли путем синтеза ампликонов гена 16S рРНК прокариотических организмов и последующей биоинформатической обработки полученных данных. Ампликоны гена 16S рРНК получали путем полимеразной цепной реакции с использованием препаратов тотальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из микробных обрастаний на анализируемых образцах.

Выделение ДНК из образцов (фильтров) осуществляли с использованием коммерческого набора для выделения ДНК FastDNA Spin Kit (фирма MP Bio, США) в соответствии с инструкцией производителя. Соотношение OD 260/280 в полученном препарате ДНК – не менее 1,8. Измерение массовой концентрации ДНК осуществляли флуориметрическим методом. Соотношение OD 260/280 (отношение значения оптической плотности при длине волны пропускаемого света 260 нм к значению оптической плотности при длине волны пропускаемого света 280 нм) измеряли с использованием спектрофотометра. Далее полученный препарат ДНК использовали для амплификации V4 участка гена 16S рРНК путем полимеразной цепной реакции. Получаемые при этом ампликоны за счет наличия на 5'-концах праймеров технических последовательностей могут быть после очистки секвенированы на платформе Illumina MiSeq. Технические последовательности включали в себя адапторы Illumina, сайты посадки секвенирующих праймеров, баркоды и спейсеры гетерогенности. Очистку ампликонов осуществляли путем препаративного агарозного гель-электрофореза и последующего использования стандартных наборов реактивов для очистки ампликонов из агарозного геля и

реакционных смесей со стандартными спин-колонками в соответствии с рекомендациями производителей наборов. Очищенные и готовые для секвенирования ампликоны подготавливали для секвенирования на платформе Illumina MiSeq в соответствии с рекомендациями производителя.

Приготовление библиотек гена 16S рРНК

для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq

Библиотеки гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq приготовлены по схеме, описанной в статье [12]. Для получения ампликонов V4 использовали следующую систему праймеров: прямой праймер 5' Illumina Linker Sequence (Index 1, Heterogeneity Spacer) [13] и 515F праймерной последовательности [14]; обратный праймер 3' Illumina Linker Sequence (Index 2, Heterogeneity Spacer) и Pro-mod-805R праймерной последовательности [15] соответственно.

Высокопроизводительное секвенирование библиотек гена 16S рРНК и первичная обработка полученных данных

Высокопроизводительное секвенирование полученных на предыдущей стадии библиотек выполняли с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (компания Illumina, США) на секвенаторе MiSeq (компания Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя. Предварительная биоинформатическая обработка заключалась в объединении прямых и обратных прочтений, фильтрации последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных нуклеотидов, фильтрации химерных последовательностей, распределении прочтений по образцам на основании последовательностей баркодов и удалении технических последовательностей (в том числе и праймерных последовательностей на V4 фрагмент гена 16S рРНК). Затем полученные последовательности распределяли по операционным таксономическим единицам (ОТЕ) с уровнем сходства последовательностей >97 %. Полученные ОТЕ биоинформатическим путем идентифицировали на основании базы данных Silva. Относительное количество прочтений, входящих в ту или иную ОТЕ, соответствует относительной представленности данного таксона микроорганизмов в исследуемом микробном сообществе [16–18].

Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК из микробных образцов на образцах смолы с наполнителями, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования, депонированы в NCBI SRA биопроект PRJNA856151.

Результаты и обсуждение

Статистический анализ разнообразия микроорганизмов в образцах на образцах полиэфирной смолы с наполнителями

В результате высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК прокариот получено шесть библиотек, содержащих 171049 прочтений (ридов), из которых сформировано 12180 ОТЕ (филотипа) с уровнем сходства последовательностей $\geq 97\%$ (табл. 2).

Уровень покрытия для всех библиотек был относительно невысоким и составлял от 80 до 87 %, что свидетельствовало о том, что максимальная репрезентативность библиотек не была достигнута. Этому заключению соответствовали и высокие значения индекса Чао 1. Однако такой уровень покрытия позволяет достаточно достоверно количественно выявлять все доминирующие таксоны микроорганизмов.

Индекс разнообразия Шеннона–Уивера оказался заметно выше для контрольного образца с целлюлозой и образцов с титаном, чем для образцов с цинком, хромом и

свинцом. Индекс Бергера–Паркера, наоборот, был более низким для образцов с целлюлозой и титаном по сравнению с образцами с цинком, хромом и свинцом, что свидетельствовало о более высоком разнообразии микроорганизмов, т. е. добавление ZnO, PbO₂ и Cr₂O₃ к полимерам способствовало снижению разнообразия микроорганизмов в биообрастаниях на этих полимерах.

Таблица 2

Индексы разнообразия генов 16S рРНК бактерий в обрастаниях на образцах полиэфирной смолы с наполнителями

Параметры	Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК					
	VIAM1L20	VIAM2L20	VIAM3L20	VIAM4L20	VIAM6L20	VIAM7L20
Количество сиквенсов (ридов)	24484	27878	30993	26329	31486	29879
Количество ОТЕ*	3241	3166	3901	3918	4229	3439
Покрытие по Good, %	83	87	83	80	83	87
Индекс Chao 1	7545	7918	9425	10274	10265	8459
Индекс разнообразия Шеннона–Уивера (H)	6,29	5,26	5,78	6,43	6,51	5,83
Индекс доминирования Бергера–Паркера (D)	0,03	0,20	0,25	0,04	0,04	0,13

* Общее количество ОТЕ в библиотеках меньше суммы ОТЕ в каждой библиотеке, потому что значительное количество ОТЕ являются общими для части или всех библиотек.

Группирование библиотек на уровне ОТЕ методом главных компонент (рис. 2) показало обособленное положение контрольного образца с целлюлозой, а также отдаленное положение двух образцов с титаном от группы образцов смол с цинком, хромом и свинцом.

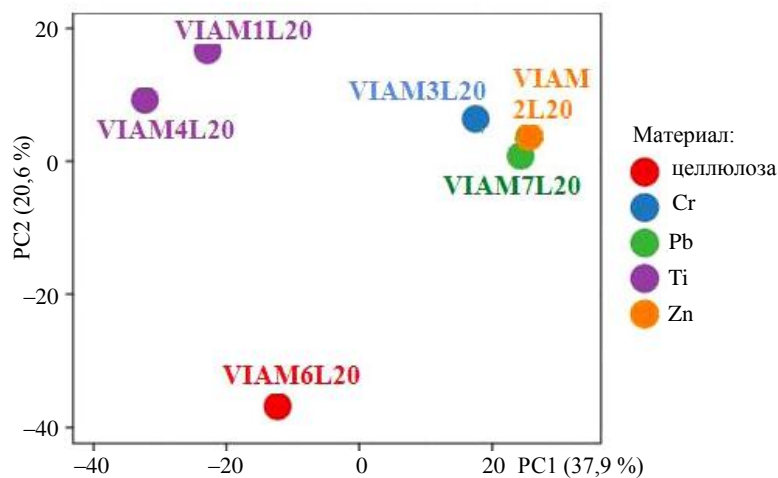


Рис. 2. График группирования таксономических единиц (ОТЕ) в библиотеках фрагментов генов бактерий и грибов по материалу наполнения образцов – титан (Ti), цинк (Zn), хром (Cr), свинец (Pb) и древесные опилки (целлюлоза), полученный методом главных компонент PC1 и PC2 (Principal Components Analysis – PCA) с использованием параметра разложения по сингулярным значениям в программе ClustVis

Таксономический состав микроорганизмов в обрастаниях на образцах полиэфирной смолы с наполнителями

Состав высших таксонов бактерий сходен для всех анализируемых библиотек, при этом представленными в библиотеках и доминирующими в большинстве из них были последовательности бактерий филумов/классов *Alphaproteobacteria*,

Gammaproteobacteria, *Bacteroidota*, хлоропластов эукариотных диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*), *Actinomycetota* и *Cyanobacteria* (прокариотных сине-зеленых водорослей) (рис. 3). Однако наблюдались заметные количественные изменения в составе доминирующих высших таксонов, связанные с природой материала наполнителя.

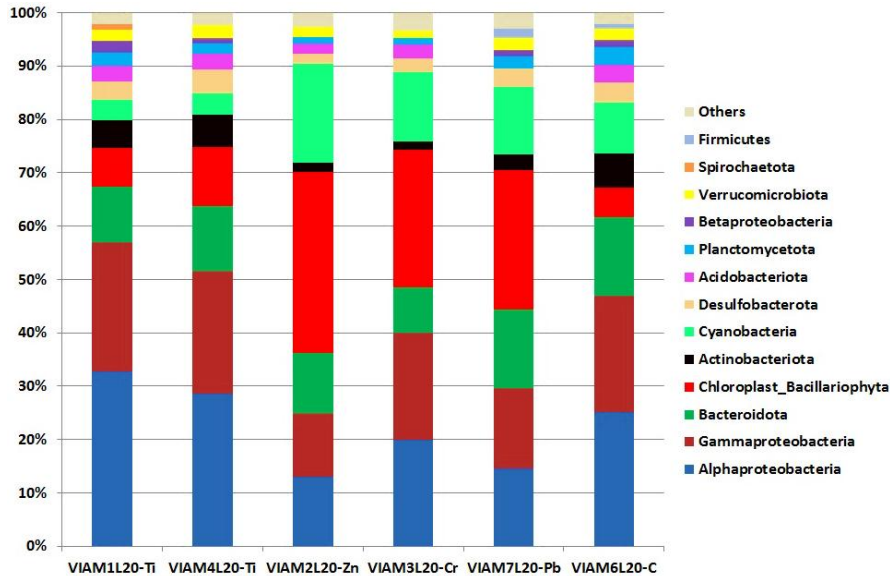


Рис. 3. Относительная доля фрагментов гена 16S рНК бактерий на уровне филумов/классов в библиотеках из обрастаний на образцах полиэфирной смолы с различными токсичными наполнителями и целлюлозой (С), экспонированных в морской воде. Представлены таксоны, составляющие не менее 1 % в каждой библиотеке

Для библиотек контрольного образца с древесными опилками и с оксидом титана характерно преобладание бактерий класса *Alphaproteobacteria* (24,2–32,7 %), среди которых много представителей типичной морской микрофлоры. Различием в этой группе было более низкое содержание в Ti-библиотеках цианобактерий (3,8–4,0 %) по сравнению с библиотекой контрольного образца (9,6 %). В то же время в библиотеках обрастаний на образцах смолы с оксидами цинка, хрома и свинца доля *Alphaproteobacteria* была заметно меньше (13,0–20,0 %), при этом преобладали хлоропласты *Bacillariophyta* (25,7–34,0 %) и цианобактерии (12,6–18,4 %). Таким образом, основным компонентом обрастаний на поверхностях образцов с цинком, хромом и свинцом были фотоавтотрофные эу- и прокариотные микроорганизмы, выделяющие кислород.

В результате последующей классификации ОТЕ в общем составе шести библиотек фрагментов гена 16S рНК выявлены представители 512 родов бактерий, включая неидентифицированные цианобактерии, а также хлоропласты эукариотных диатомовых водорослей *Bacillariophyta*. На рис. 3 приведены преобладающие таксоны родового уровня, последовательности которых составляли не менее 1 % прочтений в каждой библиотеке. В библиотеке контрольного образца с целлюлозой представлено 17 доминирующих родов, среди которых преобладали неидентифицированные цианобактерии (8,2 %) и бактерии рода *Fulvivirga* (филум *Bacteroidota*) (3,0 %); хлоропласты *Bacillariophyta* составляли 5,4 %. Бактерии остальных родов составляли от 1 до 2,5 % каждый от общего состава библиотеки. Похожий уровень разнообразия родов бактерий представлен в обеих библиотеках с титановым наполнителем (по 24 рода), в которых преобладали хлоропласты *Bacillariophyta* (7,3–11,1 %), а филоциты

бактерий составляли от 1 до 2,9 % от общего состава каждой из библиотек. Набор доминирующих родов был похожим для обеих Ti-библиотек и их контроля, но при этом обогащен представителями типичной морской микрофлоры, что свидетельствовало о незначительном влиянии на него (набор) материала образцов и наполнителей в виде целлюлозы и оксида титана.

В то же время состав доминирующих родов в библиотеках с оксидами хрома, свинца и цинка гораздо менее разнообразен, чем вышеприведенные, которые содержали всего 6 родов для образца смолы с оксидом цинка и по 8 родов для образцов с оксидами хрома и свинца. В составе этих библиотек выявлено подавляющее преобладание хлоропластов эукариот *Bacillariophyta* (25,5–33,7 %) и неидентифицированных цианобактерий (11,5–16,2 %), а остальные рода составляли от 1,0 до 4,0 %. Редуцированный состав микробных сообществ на образцах полиэфирных смол с оксидами цинка, хрома и свинца, по-видимому, связан с токсичностью этих наполнителей для микрофлоры обрастаний.

Сопоставление токсичности оксидов металлов в исследуемых образцах полимерной смолы

При создании авиационной и морской техники используется большое количество материалов и металлических сплавов: сталь, хромоникелевые, алюминиевые, титановые и цинксодержащие сплавы. Все эти металлы имеют различную токсичность по отношению к живым организмам. В табл. 3 приведены сравнительные данные о токсичности наполнителей, использованных в данном исследовании, согласно Гигиеническими нормативами СанПиН 1.2.3685–21 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Как видно из данных табл. 3, наиболее опасными являются оксиды хрома и свинца, менее опасным – оксид цинка, а малоопасным – оксид титана. Однако эти нормативы получены на опытах с мелкими животными и рыбами, и для бактерий могут быть использованы только как справочный материал.

Таблица 3

Токсичность наполнителей

Наполнитель	Величина ПДК, мг/м*	Класс опасности**	Особенности действия на организм
Оксид цинка	1,5/0,5	2	–
Свинец и его неорганические соединения/по свинцу	–/0,05	1	–
Триоксид хрома (VI)	0,03/0,01	1	Промышленные канцерогены
Диоксид титана	–/10	4	Аэрозоли преимущественно фиброгенного действия

* Одно значение гигиенического норматива, приведенное в графе, соответствует максимальной разовой предельно допустимой концентрации вещества в воздухе рабочей зоны (ПДК м. р.); если приведено два значения гигиенических нормативов, то это означает, что в числителе стоит значение максимальной разовой (м. р.) предельно допустимой концентрации (ПДК м. р.), а в знаменателе – среднесменной предельно допустимой концентрации (ПДК с. с).

** Химические вещества по величине гигиенических нормативов разделены на четыре класса опасности: 1 класс – чрезвычайно опасные; 2 класс – высокоопасные; 3 класс – умеренно опасные; 4 класс – малоопасные.

В настоящее время ведутся активные исследования в области устойчивости микроорганизмов к тяжелым металлам. Известно, что значительный бактерицидный эффект может дать взаимодействие оксида титана с ультрафиолетовым облучением, в результате которого образуются свободные радикалы, разрушающие клетки патогенных микроорганизмов [19, 20]. Однако в составе образца полиэфирной смолы, глубоко погруженного в морскую воду, такой эффект вряд ли возможен. С этим согласуется

обнаруженное авторами на поверхности образца с титановым наполнителем таксономически разнообразное микробное обрастание (рис. 4, а, б), сравнимое с контрольным образцом с древесными опилками (рис. 4, е). Это свидетельствует о низкой токсичности оксида титана в образце полиэфирной смолы и об отсутствии его бактерицидного эффекта в данных условиях.

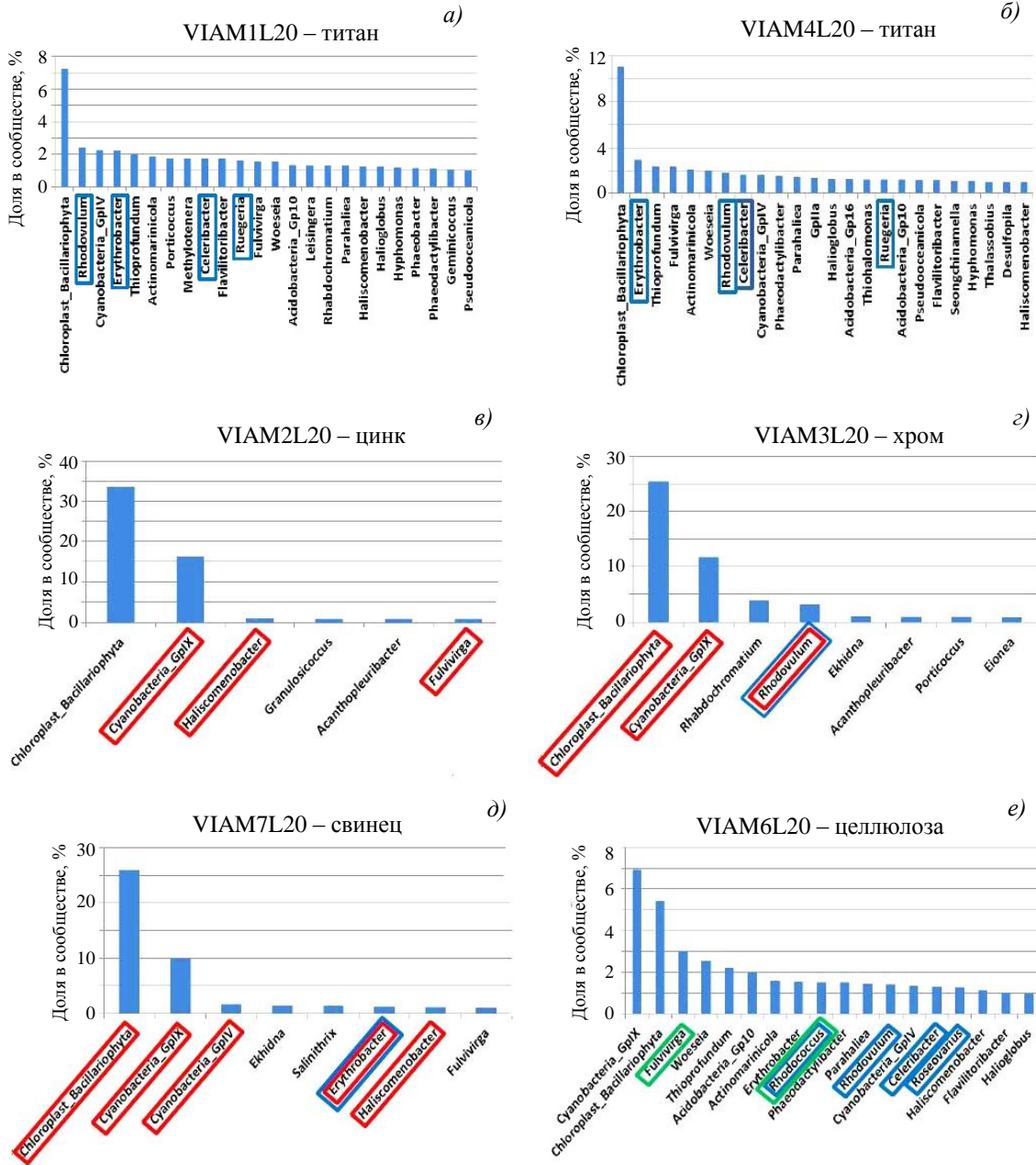


Рис. 4. Относительная доля фрагментов гена 16S рРНК бактерий на уровне родов и классов/порядков (для некультивируемых бактерий) в библиотеках из обрастаний на образцах полиэфирной смолы с различными токсичными наполнителями, экспонированных в морской воде. Представлены таксоны, составляющие не менее 1 % в каждой библиотеке. Красной рамкой выделены таксоны, в геноме которых предполагается наличие генов устойчивости к тяжелым металлам (цинк, хром, свинец). Синей рамкой выделены таксоны, в составе которых предполагается наличие бактерий-деструкторов полимеров (согласно базе данных KEGG). Зеленой рамкой выделены таксоны, в составе которых предполагаются бактерии-деструкторы целлюлозы

Таксономическое разнообразие прокариот на обрастаниях смол с оксидами цинка, хрома и свинца значительно ниже, чем у контрольного образца с целлюлозой, что, по-видимому, связано с отбором резистентной к тяжелым металлам морской микрофлоры. Для многих бактерий обычным способом обеспечения устойчивости к тяжелым металлам является снижение их концентрации с помощью ферментных систем эффлюзного оттока ионов металлов из клеток. Эти ферментные системы детерминируются специальными генами, обычно собранными в кластеры и расположенными на внутриклеточных плазидах или в хромосомах [21].

С помощью базы данных KEGG выполнен сравнительный анализ состава микроорганизмов, доминирующих на образцах с наполнителями из тяжелых металлов, и определены бактерии, в геномах которых предположительно присутствуют гены устойчивости к исследуемым тяжелым металлам. Цинк является мощным ингибитором системы дыхательного транспорта электронов бактерий и митохондрий эукариот. Гены устойчивости к цинку объединены в *czc*-оперон, который также обеспечивает устойчивость к кадмию и кобальту [22]. В результате сравнительного биоинформатического анализа гены *czc*-системы обнаружены в геномах различных цианобактерий, а также у бактерий родов *Haliscomenobacter* и *Fulvivirga*, которые наиболее представлены в микробном сообществе на образце с оксидом цинка (рис. 4, в). Гены устойчивости к оксиду хрома, который производит окислительные повреждения белков клетки, объединены в *chr*-оперон [23]. Гены системы устойчивости к хрому найдены в геномах некоторых диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*), различных цианобактерий, а также фототрофных бактерий рода *Rhodovulum*, доминирующих в сообществе на образце с оксидом хрома (рис. 4, з). Токсичность свинца выражается в повреждениях многих внутриклеточных процессов. Удаление свинца из клеток бактерий осуществляется ферментным комплексом, детерминируемым генами *pbr*-системы [24]. Такие ферментные системы предположительно присутствовали в геномах некоторых диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*), различных цианобактерий, а также бактерий родов *Erythrobacter* и *Haliscomenobacter* (рис. 4, д).

Таким образом, можно предположить, что уменьшение таксономического разнообразия в обрастаниях на образцах полиэфирной смолы с наполнителями тяжелых металлов связано с токсичностью последних. При этом в составе доминирующих в обрастаниях таксонов предположительно присутствуют микроорганизмы, обладающие ферментными системами устойчивости к тяжелым металлам.

*Потенциальные бактерии-деструкторы полимеров
в обрастаниях на исследуемых образцах полиэфирной смолы*

Используемая в данном исследовании полиэфирная смола относится к ненасыщенным смолам, являющимся результатом конденсации этиленгликоля с терефталевой кислотой, с растворением в стироле [25].

Программа iVikodak позволяет на основании таксономического состава (на уровне рода) исследуемых бактериальных сообществ предсказывать их функциональные характеристики, используя геномные базы данных. С использованием модуля программы Global Mapper на рис. 5 представлен результат сравнительного анализа вклада исследуемых бактериальных сообществ в осуществление основных путей метаболизма, а также путей деградации химических соединений-ксенобиотиков на основании базы данных KEGG. Согласно полученным результатам, наибольшим потенциальным функциональным разнообразием для всех путей метаболизма отличались сообщества Ti-образцов и контрольного образца с целлюлозой, что согласуется с большим таксономическим разнообразием этих библиотек.

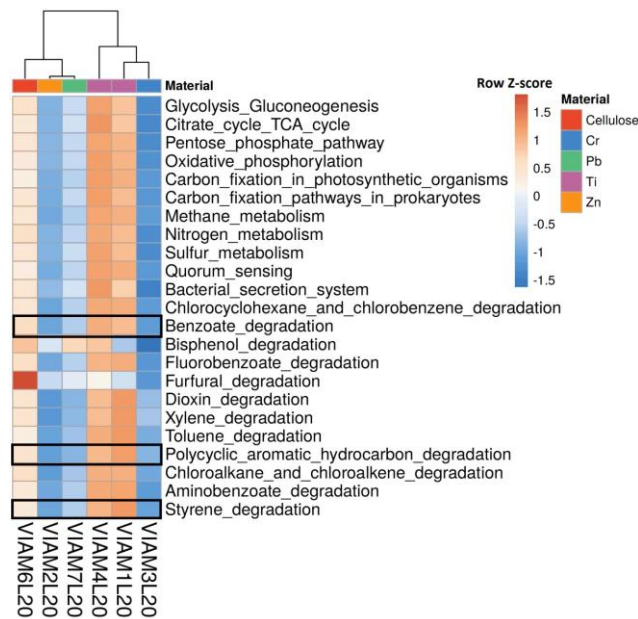


Рис. 5. Результат сравнительного анализа вклада исследуемых бактериальных сообществ в осуществление основных путей метаболизма, а также путей деградации химических соединений-ксенобиотиков на основании базы данных KEGG

С помощью следующего модуля программы Local Mapper на основании родового состава сообществ, сравнительного анализа геномов из базы данных KEGG для выявленных родов, а также представленности в этих геномах генов (ферментов) различных путей метаболизма возможно получение предположительной оценки вклада различных родов бактерий в эти процессы. При этом согласно результатам программы iVikodak, состав наиболее вероятных бактерий-деструкторов не обязательно совпадает с составом количественно доминирующих в сообществах родов.

Ферменты метаболизма этиленгликоля представлены в составе KEGG-пути «Метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата», среди которых ключевым является лактальдегидредуктаза. Основной вклад в деградацию этиленгликоля предположительно осуществляли бактерии родов *Rhodovulum*, *Roseovarius* и *Rhodococcus* (табл. 4).

В составе пути метаболизма «Деградация полициклических ароматических углеводородов» представлены ферменты деградации фталата с последующим включением продукта его деградации через путь «Деградация бензоата» в клеточный метаболизм. Основной вклад в осуществление этих путей вносили альфапротеобактерии родов *Rhodovulum*, *Roseovarius*, *Ruegeria*, *Celeribacter*, *Erythrobacter*, а также актинобактерии рода *Rhodococcus*. Точно такой же состав предположительных деструкторов стирола выявлен программой при анализе ферментов, представленных в составе пути «Деградация стирола». Основной вклад в деградацию целлюлозы в составе пути «Метаболизм крахмала и сахарозы» в контрольном образце вносили бактерии родов *Fulvivirga* и *Rhodococcus* (рис. 4, e).

Сравнительный анализ присутствия потенциальных бактерий-деструкторов компонентов полиэфирной смолы в составе микробных сообществ на различных исследуемых образцах показал, что они представлены среди количественно доминирующих в сообществах родов преимущественно на образцах с целлюлозой и оксидом титана (рис. 4, a, б, e). Исключение составляли только бактерии рода *Rhodovulum* на образце смолы с хромом (рис. 4, з) и рода *Erythrobacter* – на образце смолы со свинцом (рис. 4, д). Известно, что бактерии этих родов обладают генами устойчивости к соответствующим металлам. Таким образом, можно предположить, что добавки тяжелых металлов к образцам полиэфирной смолы уменьшают долю потенциальных бактерий-деструкторов в обрастаниях и повышают устойчивость полимерного материала к биодеструкции, особенно с добавками ZnO.

Таблица 4

**Рода бактерий*, потенциальных деструкторов ксенобиотиков
и компонентов полимерных материалов, согласно программе iVikodak**

Библиотека (наполнитель)	Пути метаболизма по базе данных KEGG и разлагаемые соединения, предсказанные программой iVikodak (предположительный вклад в процесс биодеструкции)			
	Метаболизм гликосилата и дикарбоксилата (этиленгликоль)	Дегградация полициклических ароматических углеводов (фталаат)	Дегградация бензоата (бензоат, катехол, бензол)	Дегградация стирола (стирол)
VIAM1L20: VIAM4L20 (Ti)	<i>Rhodovulum</i> (6,3 %)	<i>Celeribacter</i> (12,0 %); <i>Rhodovulum</i> (10,5 %); <i>Ruegeria</i> (5,1 %)	<i>Rhodovulum</i> (7,3 %); <i>Erythrobacter</i> (6,1 %)	<i>Erythrobacter</i> (6,0 %); <i>Celeribacter</i> (5,3 %); <i>Ruegeria</i> (5,3 %); <i>Rhodovulum</i> (5,1 %)
VIAM2L20 (Zn)	<i>Roseovarius</i> (5,6 %); <i>Rhodovulum</i> (5,4 %)	<i>Celeribacter</i> (9,6 %); <i>Rhodovulum</i> (9,1 %); <i>Roseovarius</i> (7,2 %); <i>Rhodovulum</i> (5,1 %)	<i>Rhodovulum</i> (6,2 %)	<i>Roseovarius</i> (5,1 %)
VIAM3L20 (Cr)	<i>Rhodovulum</i> (16,7 %)	<i>Rhodovulum</i> (27,1 %); <i>Celeribacter</i> (6,8 %); <i>Ruegeria</i> (5,2 %)	<i>Rhodovulum</i> (19,5 %)	<i>Rhodovulum</i> (14,0 %); <i>Ruegeria</i> (5,7 %)
VIAM7L20 (Pb)	<i>Rhodococcus</i> (6,5 %)	<i>Rhodococcus</i> (12,2 %); <i>Celeribacter</i> (9,0 %); <i>Rhodovulum</i> (7,4 %); <i>Roseovarius</i> (5,1 %)	<i>Rhodococcus</i> (12,8 %)	<i>Rhodococcus</i> (8,8 %)
VIAM6L20 (целлюлоза)	<i>Roseovarius</i> (5,1 %); <i>Rhodococcus</i> (5,5 %)	<i>Rhodococcus</i> (12,9 %); <i>Celeribacter</i> (10,2 %); <i>Rhodovulum</i> (7,7 %); <i>Roseovarius</i> (6,1 %)	<i>Rhodococcus</i> (14,0 %); <i>Rhodovulum</i> (5,2 %)	<i>Rhodococcus</i> (9,9 %)

* В скобках указан предсказанный программой iVikodak вклад бактерий данного рода в осуществление соответствующего пути метаболизма, значащими признаются значения >5 %.

Заключения

Проведена экспозиция в течение 60 сут образцов отвержденной полиэфирной смолы с добавлением оксидов металлов и целлюлозы в морской воде Геленджикской бухты Черного моря. С использованием ДНК, выделенной из обрастаний на образцах смолы после экспозиции, выполнено секвенирование V4 фрагмента гена 16S рРНК прокариотных организмов и проведена последующая биоинформатическая обработка полученных данных. Показано, что на поверхности образцов наиболее многочисленными были эукариотные диатомовые водоросли (*Bacteriophyta*) и цианобактерии – прокариотные сине-зеленые водоросли, которые являются фотоавтотрофами и не оказывают воздействия на полиэфирный материал. Наибольшее разнообразие бактерий обнаружено на образцах с добавлением целлюлозы и титана, обладающих минимальной токсичностью. По мере увеличения токсичности металлов снижается разнообразие микроорганизмов, кроме диатомовых водорослей и цианобактерий, однако в обрастаниях возрастает доля бактерий, устойчивых к присутствию металлов в среде, т. е. состав бактерий в обрастаниях предположительно определяется составом микроорганизмов, присутствующих в воде, а не природой материала.

Проведенные исследования показали, что добавление токсичных наполнителей (особенно ZnO) в виде оксидов тяжелых металлов в полиэфирные смолы снижает вероятность их биодеструкции. Использование методов и базы данных по молекулярной экологии позволяет провести более информативную оценку присутствия и активности биодеструкторов в микробных обрастаниях на поверхности полимерных материалов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ с использованием оборудования ЦКП «Климатические испытания» НИЦ «Курчатовский институт» – ВИАМ.

Список источников

1. Каблов Е.Н., Лаптев А.Б., Прокопенко А.Н., Гуляев А.И. Релаксация полимерных композиционных материалов под длительным действием статической нагрузки и климата (обзор). Часть 1. Связующие // *Авиационные материалы и технологии*. 2021. № 4 (65). Ст. 08. URL: <http://www.journal.viam.ru> (дата обращения: 10.05.2022). DOI: 10.18577/2713-0193-2021-0-4-70-80.
2. Каблов Е.Н. Материалы нового поколения и цифровые технологии их переработки // *Вестник Российской академии наук*. 2020. Т. 90. № 4. С. 331–334.
3. Каблов Е.Н., Старцев В.О. Системный анализ влияния климата на механические свойства полимерных композиционных материалов по данным отечественных и зарубежных источников (обзор) // *Авиационные материалы и технологии*. 2018. № 2 (51). С. 47–58. DOI: 10.18577/2071-9140-2018-0-2-47-58.
4. Коган А.М., Николаев Е.В., Голубев А.В., Лаптев А.Б., Мовенко Д.А. Этапы биообрастания и коррозии стали в черноморской воде // *Труды ВИАМ*. 2019. № 6 (78). Ст. 09. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 08.06.2022). DOI: 10.18577/2307-6046-2019-0-6-84-94.
5. Yoshida S., Hiraga K., Takehana T. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) // *Science*. 2016. Vol. 353. P. 759–759. DOI: 10.1126/science.aad6359.
6. Krueger M.C., Seiwert B., Prager A. et al. Degradation of polystyrene and selected analogues by biological Fenton chemistry approaches: Opportunities and limitations // *Chemosphere*. 2017. Vol. 173. P. 520–528. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.089.
7. Лаптев А.Б., Николаев Е.В., Куршев Е.В., Горяшник Ю.С. Особенности биодеструкции термопластов на основе полиэфиров в различных климатических зонах // *Труды ВИАМ*. 2019. № 7 (79). Ст. 10. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 08.06.2022). DOI: 10.18577/2307-6046-2019-0-7-84-91.
8. De Carvalho C.C.C.R. Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications // *Frontiers of Marine Science*. 2018. Vol. 5. Art. 126. DOI: 10.3389/fmars.2018.00126.
9. Oberbeckmann S., Kreikemeyer B., Labrenz M. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 8. Art. 2709. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02709.
10. Dussud C., Meistertzheim A.L., Conan P. et al. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters // *Environment Pollution*. 2018. Vol. 236. P. 807–816. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.027.
11. Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лаптев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных средах // *Микробиология*. 2020. Т. 89. № 1. С. 99–110. DOI: 10.1134/S0026365620010152.
12. Gohl D.M., MacLean A., Hauge A. et al. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Research Square*. 2016. No. 1. Art. 30. DOI: 10.1038/protex.2016.030.
13. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P. et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. No. 2 (1). Art. 6. DOI: 10.1186/2049-2618-2-6.
14. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S. et al. DegePrime, a Program for Degenerate Primer Design for Broad-Taxonomic-Range PCR in Microbial Ecology Studies // *Applied and Environmental Microbiology*. 2014. No. 80 (16). P. 5116–5123. DOI: 10.1128/AEM.01403-14.
15. Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Chernyh N.A., Bonch Osmolovskaya E.A. Occurrence, diversity, and abundance of methanogenic archaea in terrestrial hot springs of Kamchatka and Sao Miguel Island // *Microbiology*. 2015. Vol. 84. P. 577–583.
16. Srikanth M., Sandeep T.S.R.S., Sucharitha K., Godi S. Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review // *Bioresources Bioprocessing*. 2022. Vol. 9. Art. 42. DOI: 10.1186/s40643-022-00532-4.
17. Kanamaru K., Kashiwagi S., Mizuno T. A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942 // *Molecular Microbiology*. 1994. Vol. 13 (2). P. 369–377. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00430.x.
18. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucleic Acids Research*. 2000. Vol. 28. P. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
19. Абдуллин И.Ш., Канарская З.А., Хубатхузин А.А. и др. Нанодисперсные материалы на основе титана в микробиологической, медицинской и пищевой промышленности // *Вестник Казанского технологического университета*. 2012. Т. 15. № 11. С. 158–165.

20. Bonyadi Z., Mirzaee M., Ejtehad M.M., Mokhtari M. The bactericidal effect of simultaneous titanium oxide on common hospital bacteria // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2017. Vol. 189. Art. 342. DOI: 10.1007/s10661-017-6049-5.
21. Nies D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // *Microbiology Review*. 2003. Vol. 27 (2-3). P. 313–339. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2.
22. Choudhury R., Srivastava S. Zinc resistance mechanisms in bacteria // *Current Science*. 2001. Vol. 81. P. 768–775.
23. Viti C., Marchi E., Decorosi F., Giovannetti L. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi // *Microbiology Review*. 2014. Vol. 38 (4). P. 633–659. DOI: 10.1111/1574-6976.12051.
24. Hynninen A., Touzé T., Pitkänen L. et al. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria // *Molecular Microbiology*. 2009. Vol. 74 (2). P. 384–394. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x.
25. Воробьев А.В. Полиэфирные смолы // *Компоненты и технологии*. 2003. № 6. С. 182–185.

References

1. Kablov E.N., Laptev A.B., Prokopenko A.N., Gulyaev A.I. Relaxation of polymeric composite materials under the prolonged action of static load and climate (review). Part 1. Binders. *Aviation materials and technologies*, 2021, no. 4 (65), paper no. 08. Available at: <http://www.journal.viam.ru> (accessed: May 10, 2022). DOI: 10.18577/2713-0193-2021-0-4-70-80.
2. Kablov E.N. Materials of a new generation and digital technologies for their processing. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*, 2020, vol. 90, no. 4, pp. 331–334.
3. Kablov E.N., Startsev V.O. Systematical analysis of the climatic influence on mechanical properties of the polymer composite materials based on domestic and foreign sources (review). *Aviacionnye materialy i tehnologii*, 2018, no. 2 (51), pp. 47–58. DOI: 10.18577/2071-9140-2018-0-2-47-58.
4. Kogan A.M., Nikolayev E.V., Golubev A.V., Laptev A.B., Movenko D.A. Stages of biofouling and corrosion of steel in the Black sea water. *Trudy VIAM*, 2019, no. 6 (78), paper no. 09. Available at: <http://viam-works.ru> (accessed: June 08, 2022). DOI: 10.18577/2307-6046-2019-0-6-84-94.
5. Yoshida S., Hiraga K., Takehana T. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 2016, vol. 353, pp. 759–759. DOI: 10.1126/science.aad6359.
6. Krueger M.C., Seiwert B., Prager A. et al. Degradation of polystyrene and selected analogues by biological Fenton chemistry approaches: Opportunities and limitations. *Chemosphere*, 2017, vol. 173, pp. 520–528. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.089.
7. Laptev A.B., Nikolaev E.V., Kurshev E.V., Goryashnik Yu.S. Features of biodegradation of thermoplastics based on polyesters in different climatic zones. *Trudy VIAM*, 2019, no. 7 (79), paper no. 10. Available at: <http://www.viam-works.ru> (accessed: June 08, 2022). DOI: 10.18577/2307-6046-2019-0-7-84-91.
8. De Carvalho C.C.C.R. Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers of Marine Science*, 2018, vol. 5, art. 126. DOI: 10.3389/fmars.2018.00126.
9. Oberbeckmann S., Kreikemeyer B., Labrenz M. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Frontiers in Microbiology*, 2018 vol. 8, art. 2709. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02709.
10. Dussud C., Meistertzheim A.L., Conan P. et al. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environment Pollution*, 2018, vol. 236, pp. 807–816. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.027.
11. Turova T.P., Sokolova D.Sh., Nazina T.N., Gruzdev D.S., Laptev A.B. Phylogenetic diversity of microbial communities from the surface of polyethylene terephthalate materials during exposure to aquatic environments. *Mikrobiologiya*, 2020, vol. 89, no. 1, no. 99–110. DOI: 10.1134/S0026365620010152.
12. Gohl D.M., MacLean A., Hauge A. et al. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling. *Research Square*, 2016, no. 1, art. 30. DOI: 10.1038/protex.2016.030.
13. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P. et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2014, no. 2 (1), art. 6. DOI: 10.1186/2049-2618-2-6.
14. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S. et al. DegePrime, a Program for Degenerate Primer Design for Broad-Taxonomic-Range PCR in Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, no. 80 (16), pp. 5116–5123. DOI: 10.1128/AEM.01403-14.

15. Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Chernyh N.A., Bonch Osmolovskaya E.A. Occurrence, diversity, and abundance of methanogenic archaea in terrestrial hot springs of Kamchatka and Sao Miguel Island. *Microbiology*, 2015, vol. 84, pp. 577–583.
16. Srikanth M., Sandeep T.S.R.S., Sucharitha K., Godi S. Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresources Bioprocessing*, 2022 vol. 9, art. 42. DOI: 10.1186/s40643-022-00532-4.
17. Kanamaru K., Kashiwagi S., Mizuno T. A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Molecular Microbiology*, 1994, vol. 13 (2), pp. 369–377. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00430.x.
18. Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, pp. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
19. Abdullin I.Sh., Kanarskaya Z.A., Khubathuzin A.A. and other Nanodispersed materials based on titanium in the microbiological, medical and food industries. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, vol. 15, no. 11, pp. 158–165.
20. Bonyadi Z., Mirzaee M., Ejtehadi M.M., Mokhtari M. The bactericidal effect of simultaneous titanium oxide on common hospital bacteria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2017, vol. 189, art. 342. DOI: 10.1007/s10661-017-6049-5.
21. Nies D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *Microbiology Review*, 2003, vol. 27 (2-3), pp. 313–339. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2.
22. Choudhury R., Srivastava S. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science*, 2001, vol. 81, pp. 768–775.
23. Viti C., Marchi E., Decorosi F., Giovannetti L. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *Microbiology Review*, 2014, vol. 38 (4), pp. 633–659. DOI: 10.1111/1574-6976.12051.
24. Hynninen A., Touzé T., Pitkänen L. et al. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 2009, vol. 74 (2), pp. 384–394. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x.
25. Vorobyov A.V. Polyester resins. *Komponenty i tekhnologii*, 2003, no. 6, pp. 182–185.

Информация об авторах

Лаптев Анатолий Борисович, главный научный сотрудник, д.т.н., НИЦ «Курчатовский институт» – ВИАМ, admin@viam.ru

Железняк Вячеслав Геннадьевич, начальник лаборатории, к.т.н., НИЦ «Курчатовский институт» – ВИАМ, admin@viam.ru

Турова Татьяна Павловна, ведущий научный сотрудник, д.б.н., Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, info@fbras.ru

Соколова Дияна Шамилевна, старший научный сотрудник, к.б.н., Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, info@fbras.ru

Назина Тамара Николаевна, заведующая лабораторией, д.б.н., Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, info@fbras.ru

Information about the authors

Anatoly B. Laptev, Chief Researcher, Doctor of Sciences (Tech.), NRC «Kurchatov Institute» – VIAM, admin@viam.ru

Vyacheslav G. Zheleznyak, Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Tech.), NRC «Kurchatov Institute» – VIAM, admin@viam.ru

Tatyana P. Tourova, Leading Researcher, Doctor of Sciences (Bio.), Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, info@fbras.ru

Diyanah Sh. Sokolova, Senior Researcher, Candidate of Sciences (Bio.), Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, info@fbras.ru

Tamara N. Nazina, Head of Laboratory, Doctor of Sciences (Bio.), Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, info@fbras.ru

Статья поступила в редакцию 20.07.2022; одобрена и принята к публикации после рецензирования 29.07.2022.

The article was submitted 20.07.2022; approved and accepted for publication after reviewing 29.07.2022.