

Научная статья

УДК 579.017.8

DOI: 10.18577/2307-6046-2025-0-4-107-128

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ОБРАЗЦОВ ОБОРОТНОЙ ОХЛАЖДАЮЩЕЙ ВОДЫ НЕФТЕПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕГО И НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО ЗАВОДОВ

В.Ю. Ермишев¹

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

Аннотация. Представлены методы выделения бактериальных штаммов потенциальных деструкторов полимерных материалов из образцов оборотной воды предприятий по производству нефтепродуктов. Культуры экспонировали с полимерными материалами и полимерными субстратами. Данные о видовом составе бактериальных культур получены в результате секвенирования ДНК-фрагмента, кодирующего V4-участок 16S рРНК бактерий. Проведена сравнительная оценка кинетики роста чистых культур бактерий рода *Pseudomonas* в минеральной среде с добавлением реактивного и дизельного топлива.

Ключевые слова: биодеструкция, бактериальные штаммы, синтетические полимерные и композиционные материалы, топливо, секвенирование, 16S рРНК, *Pseudomonas*

Для цитирования: Ермишев В.Ю. Выделение бактериальных штаммов деструкторов полимерных материалов из образцов оборотной охлаждающей воды нефтеперерабатывающего и нефтехимического заводов // Труды ВИАМ. 2025. № 4 (146). Ст. 09. URL: <http://www.viam-works.ru>. DOI: 10.18577/2307-6046-2025-0-4-107-128.

Scientific article

ISOLATION OF BACTERIAL STRAINS OF POLYMER MATERIALS DESTRUCTORS FROM SAMPLES OF RECYCLED COOLING WATER FROM OIL REFINERIES AND PETROCHEMICAL PLANTS

V.Yu. Ermishev¹

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

Abstract. The article presents methods for isolating bacterial strains of potential destructors of polymer materials, using the example of recycled water samples from enterprises producing petroleum products. The cultures were exposed with polymer materials and polymer substrates. Data on the species composition of bacterial cultures were obtained as a result of DNA sequencing of a fragment encoding the V4 site of the 16S rRNA of bacteria. The obtained pure cultures of bacteria of the genus *Pseudomonas* were used to obtain comparative growth kinetics in a mineral medium with the addition of jet and diesel fuel.

Keywords: biodegradation, bacterial strains, synthetic polymer and composite materials, fuel, sequencing, 16S rRNA, *Pseudomonas*

For citation: Ermishev V.Yu. Isolation of bacterial strains of polymer materials destructors from samples of recycled cooling water from oil refineries and petrochemical plants. *Trudy VIAM*, 2025, no. 4 (146), paper no. 09. Available at: <http://www.viam-works.ru>. DOI: 10.18577/2307-6046-2025-0-4-107-128.

Введение

Первичные продукты нефтепереработки применяются для синтеза исходных компонентов в производстве полимерных материалов. Полиэфирные и поливиниловые волокна, адгезивные покрытия, связующие и клеи в составе полимерных композиционных материалов могут иметь множество вариантов исполнения в зависимости от назначения конечного продукта. Такие полимерные материалы, как полиэтилентерефталат (ПЭТФ) и поливинилхлорид, полиакрилаты и эпоксидные смолы, широко распространены благодаря уникальным физико-химическим свойствам, механическим характеристикам и стойкости к воздействию окружающей среды.

Учитывая совокупный объем произведенных и импортированных производных олефиновой и ароматической фракций нефти, насчитывающих десятки наименований, можно предположить, что как минимум несколько сотен тысяч тонн полимерных материалов не будут подвергнуты рециклингу или полной переработке и останутся в окружающей среде. Это обстоятельство является серьезной экологической проблемой, поскольку ни один из упомянутых полимерных материалов не подвержен быстрому биологическому разложению [1, 2].

Скорость процесса биодеструкции полимеров в окружающей среде в первую очередь определяется химическим составом и степенью кристалличности материала, а также интенсивностью воздействия климатических факторов, важнейшими из которых являются температура и влажность [3–8]. Происходит изменение физико-механических (потеря формы, массы, снижение вязкости, гибкости, охрупчивание) и химических (разрыв химических связей, снижение молекулярной массы мономеров) свойств материала. На этапе дезинтеграции материал получает необратимые повреждения, которые при участии микроорганизмов сначала приводят к фрагментации материала и в дальнейшем к его минерализации, подразумевающей полную деполимеризацию с образованием диоксида углерода, метана и воды в зависимости от конечного акцептора электронов [9–12].

Одним из наиболее часто упоминаемых бактериальных штаммов биодеструкторов является *Ideonella sakaiensis* 201-F6, для которого установлен биохимический механизм утилизации ПЭТФ, включая структуру и активность ключевых ферментов деполимеризации и дальнейшей метаболической ассимиляции частей мономера – терефталевой кислоты и этиленгликоля [13, 14]. С химической точки зрения ПЭТФ является инертным полимером за счет наличия ароматических компонентов с эфирными связями в составе мономера. Однако ПЭТФ, использованный в эксперименте с культурой *Ideonella sakaiensis* 201-F6, имел достаточно низкую кристалличность (1,9 %), в то время как ПЭТФ, применяемый для изготовления тары и упаковок, имеет кристалличность от 30 до 40 %, что существенно снижает его биодоступность [1, 13, 14].

В данной работе демонстрируется практическая возможность получения из сложных эндемических сообществ микроорганизмов чистых культур бактериальных штаммов рода *Pseudomonas* как наиболее активных в отношении органических соединений, в том числе токсичных, и растворимых в воде полимеров, применяемых в производстве материалов.

Материалы и методы

Химический состав оборотной охлаждающей воды нефтеперерабатывающего (НПЗ) и нефтехимического (НХЗ) заводов определен в испытательном лабораторном

центре ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в республике Башкортостан» в соответствии с сертифицированными методами исследования (см. приложение, табл. 1 и 2).

Для экспонирования с бактериальной культурой использовали образцы материалов размером 25×70×1,5 мм (табл. 1). Перед взаимодействием с микроорганизмами поверхность контрольных и опытных образцов, размещенных на пластиковой подложке, обрабатывали раствором 0,3%-ной соляной кислоты и выдерживали в течение 12 ч при комнатной температуре. Затем дважды образцы выдерживали в течение 6 ч в камере светопогоды в диапазоне длин волн ультрафиолетового излучения 300–400 нм при плотности потока 65 Вт/м² и относительной влажности ~25 %.

Таблица 1

Материалы, использованные для экспонирования с бактериальной культурой

Обозначение материала	Материал	Химическая структура мономера	Производитель	Характеристики
A2	Клеевая пленка ВК-36		НИЦ «Курчатовский институт» – ВИАМ	Полуотвержденный эпоксидный олигомер металлического цвета, температура полного отверждения не менее 120 °С, может содержать наполнитель, включает пластификатор
B2	Клеевая пленка ВК-102А			Полуотвержденный эпоксидный олигомер желтого цвета, температура полного отверждения не менее 175 °С, содержит наполнитель стекловолокно и пластификатор
E1	Клей эпоксидный (компонент А)		Акапол	Пастообразная неотвержденная масса металлического цвета, содержит эпоксидные олигомеры, наполнители и пластификаторы, химически отверждаемая, термостойкая до 120 °С
F2	Отвердитель меркаптанов (компонент Б)			Пастообразная масса белого цвета, содержит тиоловый отвердитель, наполнители и пластификаторы, термостойкая до 120 °С
C3	Сырьевой компонент – стирол-акриловая дисперсия Акрэмос-140		Акрэмос	Водная дисперсия, содержащая 50 % (по массе) сополимера стирола и (мет)акрилатов, не содержащая пластификатора, стабилизированная анионной эмульгирующей системой, средний размер частиц 0,12–0,15 мкм. Частичное отверждение проводили при температуре 75 °С в течение 2 ч

Образцы материалов фотографировали с помощью зеркальной фотокамеры Canon EOS 5D Mark III с объективом EF 100mm f/2.8L Macro.

Для получения первичных бактериальных культур из каждого образца воды НПЗ и НХЗ в соответствии с общим микробным числом (ОМЧ) отбирали определенный объем и переносили в 50 мл базовой минеральной среды с добавлением 1 % (объемн.) стерильного дизельного топлива марки ДТ-Л-40-К2 (ГОСТ 305–2013). Состав среды, мМ: 7 – KH_2PO_4 ; 5 – K_2HPO_4 ; 20 – NH_4Cl ; 10 – NaCl ; 0,8 – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,18 – CaCl_2 ; pH = 7.

Базовую среду стерилизовали автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Для замедления или предотвращения возможного роста микромицетов добавляли 50 мкл раствора амфотерицина В в 50%-ном этиловом спирте с исходной концентрацией действующего вещества 100 мг/мл.

Культуры наращивали в течение не менее 72 ч при температуре 25 °С и скорости перемешивания 140 мин⁻¹.

Полученные первичные бактериальные культуры высевали на твердую базовую минеральную среду, содержащую 1 % агарозы и 0,01 % дрожжевого экстракта, для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) отдельных колоний и идентификации секвенированием.

Для экспонирования материалов подготовленные опытные образцы помещали в 20 мл базовой минеральной среды, содержащей смесь первичных бактериальных культур плотностью ~0,05 ОЕ/мл, полученную смешиванием в равных пропорциях первичных культур для каждого образца воды НПЗ и НХЗ. Контрольные образцы материалов помещали в 20 мл базовой минеральной среды без добавления бактериальных культур. Контрольные и опытные образцы материалов экспонировали в течение 60 дней при температуре 25 °С и скорости перемешивания 50 мин⁻¹. В табл. 2 приведены сведения о соответствии наименований образцов материалов и полученных проб для секвенирования.

Таблица 2

Соответствие наименований образцов материалов и полученных проб для секвенирования на каждом этапе отбора

Этап отбора	Пробы для секвенирования после экспонирования с материалом				
	дизельное топливо ДТ-Л-40-К2	клеевая пленка ВК-36	компонент А	компонент Б	стирол-акриловая суспензия Акрэмос-140
1	D-МС	–	–	–	–
2	–	AG-Mix			
3	–	A2 PVA	E1 PVA	F2 PVA	C3 PVA
4	–	–	E1 SA	F2 SA	–

Примечание. D-МС – проба первичной культуры; AG-Mix – проба после экспонирования первичной культуры с образцами материалов; PVA – поливиниловый спирт; SA – стирол-акриловая суспензия.

Для получения чистых культур штаммов бактерий проводили рассев аликвот культуральной жидкости, полученной после экспонирования первичных культур с материалами, на твердые базовые минеральные среды, содержащие 1 % агарозы и 0,025 % стерильных субстратов акриловой дисперсии или поливинилового спирта. Полученные отдельные колонии снова засеивали в жидкие базовые минеральные среды с теми же субстратами. Полученные отдельные колонии идентифицировали секвенированием.

При подсчете колоний выявлено низкое ОМЧ при экспонировании с клеевой пленкой ВК-102А (В2), поэтому в целях экономии расходных материалов и времени данная проба исключена из дальнейшего отбора.

Для получения данных о показателях роста выделенных чистых культур бактерий на топливах использовали 3 мл базовой минеральной среды с добавлением 3 мл дизельного топлива марки ДТ-Л-40-К2 (ГОСТ 305–2013) или реактивного топлива марки ТС-1 (ГОСТ 10227–86). Данные о кинетике роста получали в течение 96 ч при температуре 25 °С и начальной плотности исследуемых культур 0,025 ОЕ/мл без перемешивания, пробирки в течение всего времени испытаний находились в вертикальном положении. В качестве отрицательного контроля использовали чистую среду с указанными видами топлив.

Оптическую плотность бактериальных культур в контрольных и опытных образцах определяли с помощью спектрофотомера ПЭ-5000 (Экрос, Россия) при длине волны 600 нм. Кинетику роста определяли по формуле

$$K = \lg(A_{24} - A_0),$$

где A_0 и A_{24} – поглощение среды исходное и через 24 ч при длине волны 600 нм.

Для амплификации V4-фрагментов 16S рРНК бактерий использовали модифицированные олигонуклеотидные праймеры 515f и 806r [15]. Концентрацию препаратов ДНК определяли флуориметрическим методом с помощью набора QuDye BR (Люмекс, Россия) согласно инструкции. Геномную ДНК, полученную с помощью набора для выделения ДНК на силикагелевых колонках, в количестве ~50 нг добавляли в 100 мкл смеси для ПЦР, содержащей HS Taq ДНК-полимеразу, реакционный буфер, дезокси-нуклеозидтрифосфаты и соответствующие синтетические олигонуклеотиды (Евроген, Россия). Реакции выполняли в автоматическом цифровом программируемом термоциклере (амплификаторе) с нагреваемой крышкой при следующих параметрах: 95 °С в течение 5 мин; 95 °С в течение 30 с, 60 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 10 с (30 циклов); 72 °С в течение 5 мин. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с помощью реагента фракционирования ДНК на магнитных частицах в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле для молекулярной биологии в однократном трис-ацетат-ЭДТА буфере с красителем бромид этидия в количестве 0,5 мкг/мл (Хеликон, Россия). Для электрофореза использовали четырехканальный источник питания с выходным напряжением 5000 В с постоянным током 8 В/см агарозного геля. Для определения размера ДНК-фрагментов, получаемых в результате ПЦР, использовали маркеры молекулярной массы с размерами 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000, 7000 и 10000 пар нуклеотидов.

Для амплификации ДНК полноразмерного фрагмента 16S рРНК бактерий использовали модифицированные олигонуклеотиды 27f и 1492r [16]. Параметры реакции: 95 °С в течение 5 мин; 95 °С в течение 30 с, 58 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 1 мин (30 циклов); 72 °С в течение 5 мин. Для выделения ДНК из агарозного геля использовали набор LumiPure (Lumiprobe, Россия). Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза с указанными ранее параметрами и оборудованием. Данные о первичной структуре выделенных ДНК-фрагментов получены в компании Евроген (Москва) на генетическом анализаторе 3500xL. Сборка и валидация перекрывающихся прочтений выполнены в специализированной программе [17].

Данные коротких прочтений V4-фрагмента гена 16S рРНК бактерий получены с помощью высокопроизводительного секвенатора с набором реагентов для секвенирования nano kit, v2 (500 cycles), работы выполнены согласно официальному руководству компании изготовителя. Качество прочтений анализировали с помощью

соответствующей программы (см. приложение, рис. 1) [18]. Удаление адаптеров, сборка перекрывающихся прочтений, выравнивание по базе данных первичных структур гена 16S рРНК архей и бактерий, визуализации выполнены с применением модулей программы reporter v.2.6.2.3.

Для ПЦР-исследования отдельных колоний первичных культур использовали специфичные для рода *Pseudomonas* праймеры PSF2 и PAGES-R [19]. Реакции выполняли при следующих параметрах: 95 °С в течение 3 мин; 95 °С в течение 30 с, 60 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 30 с (30 циклов); 72 °С в течение 5 мин. Для выявления наличия плазмид *incP9* использовали олигонуклеотиды ger9F и ger9R [20]. Для поиска генов диоксигеназ ароматических соединений применяли праймеры TOD-F и TOD-R [21]. Реакции выполняли при следующих параметрах: 95 °С в течение 3 мин; 95 °С в течение 30 с, 55 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 30 с (35 циклов); 72 °С в течение 5 мин. Реагенты и оборудование для ПЦР указаны ранее. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза с указанными ранее параметрами и оборудованием.

Работа выполнена при поддержке ЦКП «Климатические испытания» НИЦ «Курчатовский институт» – ВИАМ.

Результаты и обсуждение

Таксономическая идентификация первичных бактериальных культур, полученных на первом этапе отбора, демонстрирует, что образец на 95 % состоит из бактерий рода *Pseudomonas* (рис. 1). Такой результат связан в первую очередь с составом базовой минеральной среды и, по-видимому, с высоким содержанием бактерий указанного рода в исходных образцах оборотной охлаждающей воды НПЗ и НХЗ.

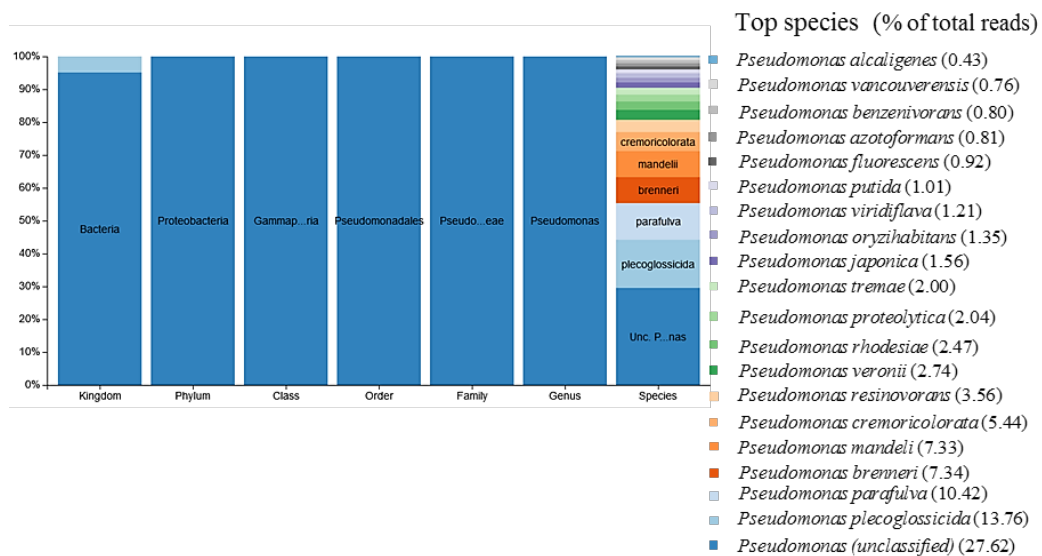


Рис. 1. Наиболее представленные виды бактерий рода *Pseudomonas* в пробе D-МС с указанием абсолютного количества прочтений V4-фрагмента 16S рРНК каждого из идентифицированных видов бактерий в процессе секвенирования (% of total reads). Чем больше абсолютное количество прочтений V4-фрагмента 16S рРНК, тем выше физическое количество клеток бактерий соответствующего таксона в пробе

На этом этапе решено провести ПЦР-исследование отдельных колоний первичных культур для выяснения эффективности такого подхода к поиску целевых фенотипов бактериальных штаммов. Для этого выбраны две последовательности мишени,

одна из которых представляет собой участок плазмидного репликона *incP9*, а вторая – участок гена *todC1*, кодирующего диоксигеназу бензола, толуола и хлорбензола. При этом ген *todC1*, по-видимому, имеет хромосомную локализацию в бактериальной клетке.

С учетом того, что указанные плазмиды и ген *todC1* найдены исключительно в бактериях рода *Pseudomonas*, необходимо установить, что каждая из отобранных колоний относится к этому роду (см. приложение, рис. 2).

Как можно убедиться, каждая из 18 отобранных колоний является представителем рода *Pseudomonas*. Эти данные хорошо согласуются с анализом 16S рРНК первичных культур в пробе D-МС, которые служили источником для ПЦР-исследования.

Дальнейший ПЦР-анализ 18 образцов с олигонуклеотидами *ger9F/ger9R* и *TOD-F/TOD-R* выявил предположительное наличие этих последовательностей ДНК только в одном образце (см. приложение, рис. 3).

Хотя для полной уверенности в том, что амплифицированные фрагменты ДНК действительно являются участками *repA* и *todC1*, необходимо секвенирование полученных в результате ПЦР фрагментов ДНК. Данный образец культуры выбран для дальнейшего анализа в качестве результата применения такого подхода к поиску редких фенотипов бактерий.

Полученный штамм в одном из запусков секвенирования в качестве отдельного образца идентифицирован по V4-фрагменту 16S рРНК как *Pseudomonas plecoglossicida* (см. приложение, рис. 4).

Перед экспонированием с первичной культурой образцы материалов целенаправленно повреждали с помощью соляной кислоты и УФ-излучения (см. приложение, рис. 5). Одним из результатов такого рода воздействий является также полная стерильность каждого образца материала вследствие длительного воздействия перечисленных факторов.

Для экспонирования с первичной культурой бактерий не использовали контрольные образцы материалов, не прошедшие подготовку описанным способом. Это связано с тем, что с учетом указанной цели исследования испытаниям подвергали культуру микроорганизмов, а материалы служили в качестве инструмента, поэтому отрицательными контролями выступили прошедшие соответствующую подготовку материалы без добавления к стерильной среде микроорганизмов.

После 60 дней экспонирования из каждого образца материалов с первичной культурой бактерий отобрана часть среды для получения смешанной культуры в пробе AG-Mix. Анализ пробы AG-Mix демонстрирует существенное увеличение видов бактерий по сравнению с первичной культурой в пробе D-МС, что является следствием появления в ранге класса и ниже дополнительных таксонов (рис. 2 и 3).

Причиной перераспределения таксономического состава популяции бактерий из первичных культур после экспонирования с образцами материалов является изменение химического состава исходной минеральной среды в результате перехода органических и минеральных компонентов материалов в растворимое или коллоидное состояние в течение длительного времени. Кроме того, не исключены различного рода взаимодействия бактерий с поверхностными и подповерхностными участками материалов, включая биопленки или другие структуры. Эти обстоятельства приводят к наращиванию ранее некультивируемых и/или плохо растущих в исходной среде бактерий. В то же время происходит подавление роста или элиминация тех штаммов, которые не способны выжить в данных условиях внешней среды при тотальном сокращении общего микробного числа в пробах.

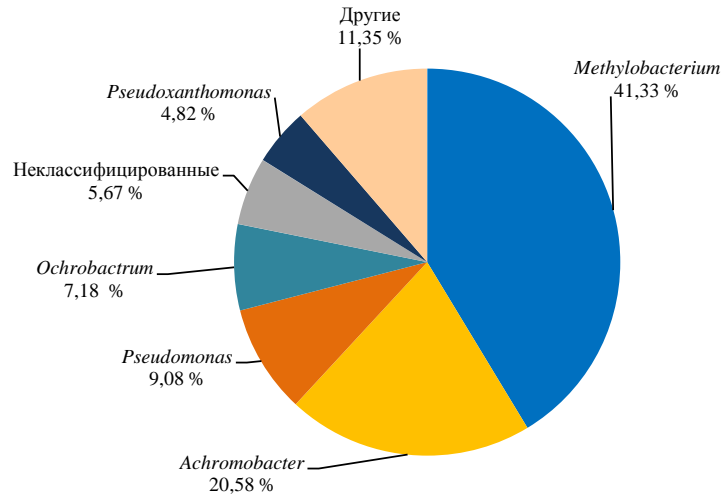


Рис. 2. Наиболее представленные таксоны бактерий в пробе AG-Mix

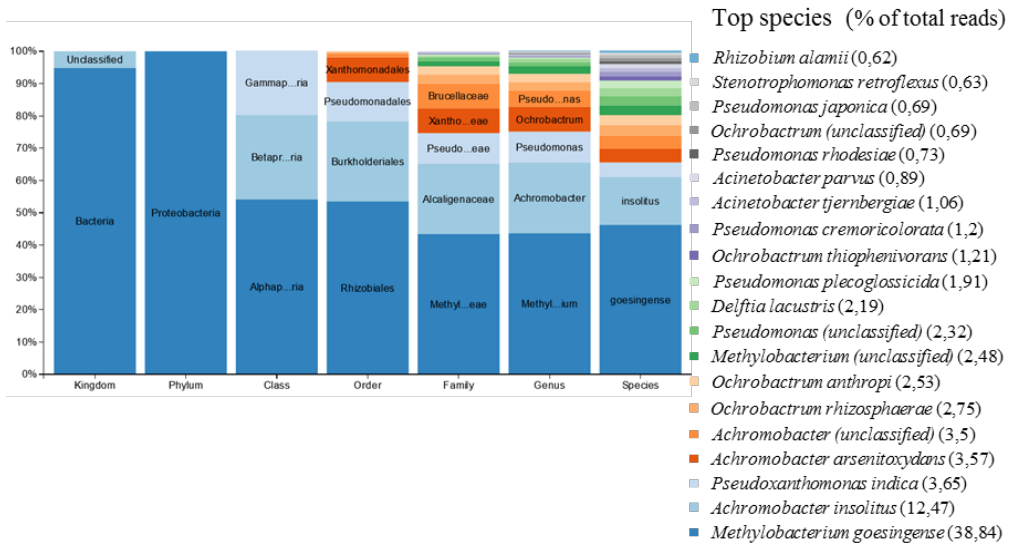


Рис. 3. Видовой состав пробы AG-Mix с указанием абсолютного количества прочтений V4-фрагмента 16S рРНК в процессе секвенирования (% of total reads)

На заключительных этапах отбора отдельные культуры, полученные в результате экспонирования с соответствующими материалами, переносили в базовую минеральную среду с добавлением в качестве единственного источника углерода поливинилового спирта или стирол-акриловой дисперсии. Применение указанных субстратов способствовало дальнейшей дифференциации культур и их обогащению наиболее активными фенотипами (рис. 4; см. приложение, рис. 6). С учетом того факта, что химически и структурно эти субстраты абсолютно разные, они позволяют выявить материал, вносящий наибольший вклад в таксономическое разнообразие культуры, в пробе AG-Mix.

В результате переноса культур после экспонирования с материалами в среду с поливиниловым спиртом происходит обогащение сообщества бактерий изначально мало представленными и плохо культивируемыми штаммами *Pseudomonas*, в то время как в присутствии стирол-акрилатов увеличивается представленность штаммов *Ochrobactrum*, *Delftia*, *Pseudoxanthomonas*, *Achromobacter* и снижается изначально высокая концентрация штаммов *Pseudomonas*. Появление в питательной среде стирол-

акрилатов в составе с анионными эмульгаторами модифицирует среду, смещая фокус отбора на другие таксоны бактерий. Это, в частности, объясняет обогащение пробы AG-Mix видами бактерий, представленность которых увеличилась после экспонирования первичных культур из пробы D-МС с материалом Акрэмос-140.

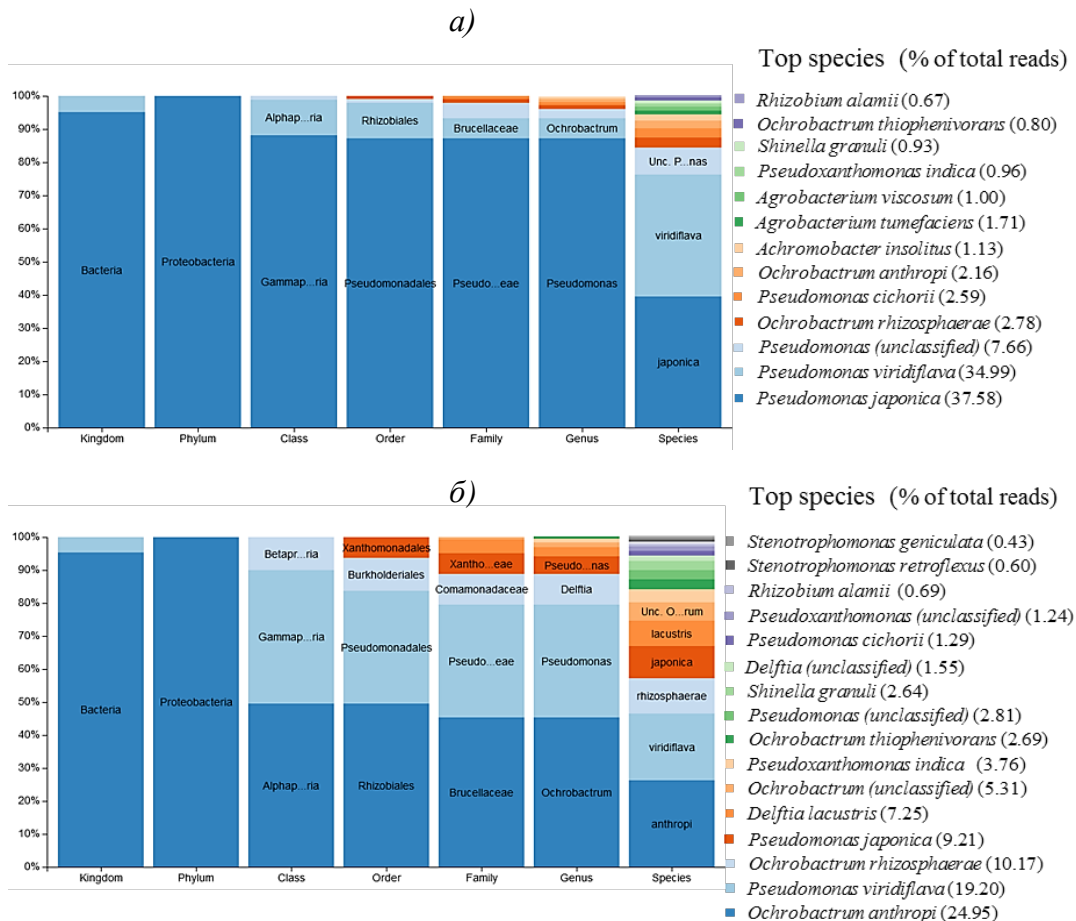


Рис. 4. Видовые составы проб E1 PVA (а) и E1 SA (б) с указанием абсолютного количества прочтений V4-фрагмента 16S рРНК в процессе секвенирования (% of total reads)

Штамм *Methylobacterium goesingense*, высоко представленный в пробе AG-Mix (рис. 2 и 3), при наращивании на соответствующих субстратах практически полностью элиминируется (рис. 4; см. приложение, рис. 6). Это, по-видимому, связано с отсутствием метаболических компетенций в отношении использованных субстратов и возросшей конкуренцией со стороны других штаммов, подавляющих его рост.

На рис. 5 представлена сводная диаграмма наиболее представленных бактериальных штаммов в культурах, полученных в результате отбора.

Для получения чистых культур наиболее активных штаммов *Ps. viridiflava* и/или *Ps. japonica* выбрана бактериальная культура из пробы СЗ PVA, полученная в результате наращивания в поливиниловом спирте бактерий, выделенных после экспозиции первичных культур с отвержденной стирол-акриловой дисперсией Акрэмос-140.

Штамм *Ps. japonica* отдельно идентифицирован путем секвенирования полноразмерной последовательности гена 16S рРНК, полученной из чистой культуры. Данные о нуклеотидной последовательности доступны в GeneBank NCBI (Accession number: PQ432336).

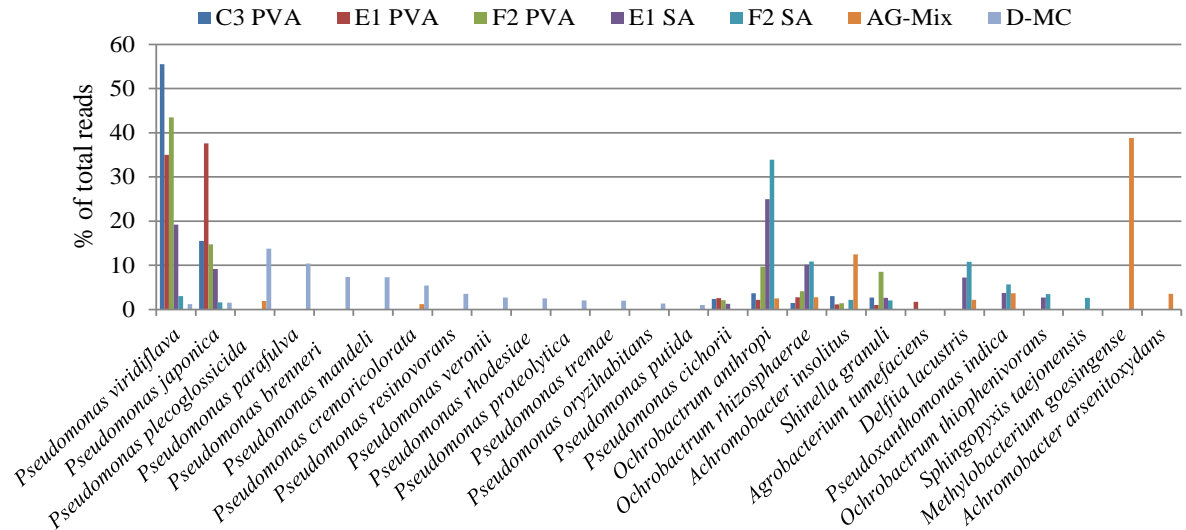


Рис. 5. Представленность идентифицированных видов бактерий в пробах. Идентифицированные в каждой пробе виды бактерий с абсолютным количеством прочтений V4-фрагмента 16S рНК в процессе секвенирования (% of total reads) <1 % не учитывали

Для получения данных о показателях роста на двух видах топлив использовали чистые культуры штаммов *Ps. plecoglossicida* и *Ps. japonica* (см. приложение, рис. 7), выделенные до и после экспонирования с материалами соответственно (рис. 6).

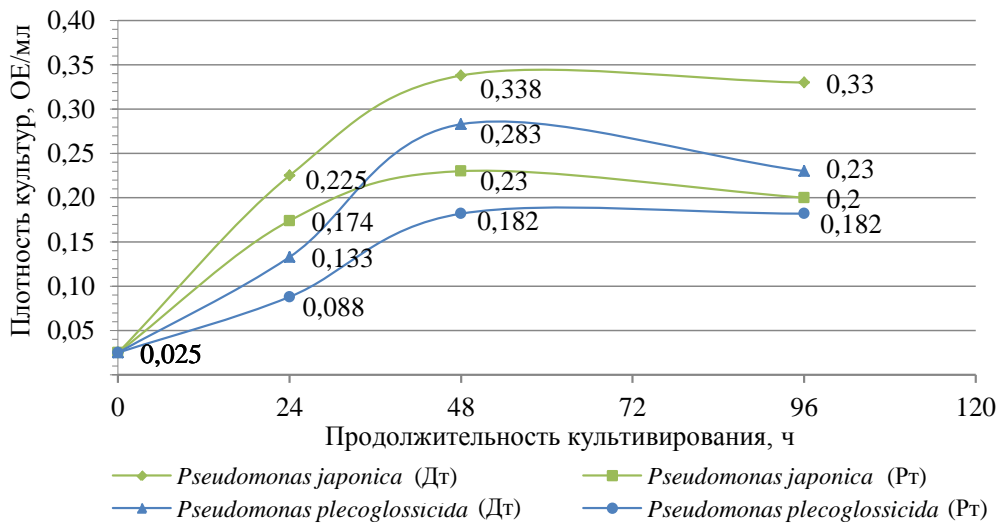


Рис. 6. Кривые роста чистых культур штаммов *Ps. japonica* и *Ps. plecoglossicida* на дизельном (Дт) и реактивном топливе (Рт)

Показано более чем двукратное превышение скорости роста штамма *Ps. japonica* на реактивном топливе и двукратное – на дизельном топливе по сравнению со штаммом *Ps. plecoglossicida* (рис. 7).

Полученные данные хорошо согласуются с результатами секвенирования пробы D-MC (рис. 1), в которой штамм *Ps. plecoglossicida* изначально является одним из доминирующих. На следующих этапах отбора во всех пробах (рис. 1–4; см. приложение, рис. 6) можно наблюдать снижение концентрации этого штамма одновременно с увеличением концентрации других штаммов *Pseudomonas*, главным образом *Ps. viridiflava*

и *Ps. japonica*. Это наблюдение свидетельствует о том, что полученные виды бактерий не являются результатом накопления мутаций (мутагенеза) в процессе длительного экспонирования с материалами, поскольку перечисленные штаммы изначально находились в смеси в равных условиях и имели некоторые шансы накопить при экспозиции полезные мутации. При этом у штамма *Ps. plecoglossicida*, по-видимому, таких шансов было кратно больше, с учетом его концентрации в пробе D-МС (13,76 %), по сравнению с *Ps. japonica* и *Ps. viridiflava* (1,56 и 1,21 % соответственно).

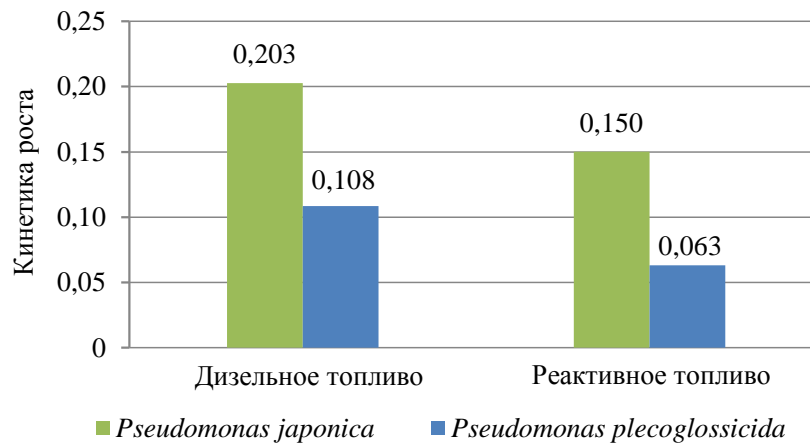


Рис. 7. Кинетика роста чистых культур штаммов *Ps. japonica* и *Ps. plecoglossicida* на дизельном и реактивном топливе, полученных в интервале от начала роста до 24 ч

Полученные данные и результаты их анализа позволяют также констатировать, что ПЦР-исследование как способ поиска желаемых бактериальных фенотипов в таксономически неоднородных сообществах микроорганизмов весьма трудоемко, обладает низкой эффективностью и более пригодно для детального анализа отдельных видов бактерий.

Заключения

Представленный метод может быть полезен для получения из сложных эндемических сообществ микроорганизмов редких фенотипов бактерий, в том числе биодеструкторов, некультивируемых или плохо культивируемых в богатых питательных средах. Гибкость в выборе субстратов и материалов обеспечивает достаточный уровень масштабируемости – предложенный метод может применяться не только в отношении штаммов *Pseudomonas*, но и для поиска желаемых фенотипов бактерий в других таксонах. Некоторые из полученных таким способом микроорганизмов могут оказаться естественными продуцентами ценных биологически активных веществ, в том числе биоцидных препаратов, найти применение в методиках испытаний топлив на стойкость к воздействию микроорганизмов, применяться для утилизации материалов или устранения последствий загрязнения нефтепродуктами окружающей среды.

Список источников

1. Narancic T., Kevin E. Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem // *Microbiology*. 2019. Vol. 165. P. 129–137. DOI: 10.1099/mic.0.000749.
2. Sinha V., Patel M.R., Patel J.V. Pet Waste Management by Chemical Recycling: A Review // *Journal of Polymers and the Environment*. 2010. No. 18. P. 8–25. DOI: 10.1007/s10924-008-0106-7.

3. Kablov E.N., Startsev V.O. Climatic aging of aviation polymer composite materials. II. Development of methods for studying the early stages of aging // *Russian metallurgy (Metally)*. 2020. Vol. 2020. No. 10. P. 1088–1094. DOI: 10.1134/S0036029520100110.
4. 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.
5. 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: 29.03.2024). DOI: 10.18577/2713-0193-2021-0-4-70-80.
6. Каблов Е.Н. Материалы нового поколения и цифровые технологии их переработки // *Вестник Российской академии наук*. 2020. Т. 90. № 4. С. 331–334.
7. Startsev O.V., Krotov A., Mashinskaya G. Climatic Ageing of Organic Fiber Reinforced Plastics: Water Effect // *Journal Polymeric Material*. 1997. Vol. 37. P. 161–171.
8. Frisch H.L. Diffusion in polymers // *Journal of Applied Polymer Science*. 1970. No. 14. P. 1657.
9. Lucas N., Bienaime C., Belloy C. et al. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques // *Chemosphere*. 2008. No. 4. P. 429. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.6.
10. Eskander S., Saleh H. Biodegradation: Process Mechanism // *Environmental Science and Engineering*. 2017. Vol. 8. No. 1. P. 1–31.
11. Ермишев В.Ю., Лаптев А.Б., Старцев В.О. Особенности оценки стойкости полимерных материалов к биодеструкции в лабораторных условиях. Часть 1. Разрушение полимерных материалов в природных средах, выбор штаммов бактерий, питательные среды и условия культивирования // *Труды ВИАМ*. 2023. № 7 (125). Ст. 12. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 29.03.2024). DOI: 10.18577/2307-6046-2023-0-7-138-148.
12. Лаптев А.Б., Павлов М.Р., Новиков А.А., Славин А.В. Современные тенденции развития испытаний материалов на стойкость к климатическим факторам (обзор). Часть 1. Испытания новых материалов // *Труды ВИАМ*. 2021. № 1 (95). Ст. 12. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 29.03.2024). DOI: 10.18577/2307-6046-2021-0-1-114-122.
13. Yoshida S., Hiraga K., Takehana T. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethyleneterephthalate) // *Science*. 2016. Vol. 353. P. 759–769.
14. Ермишев В.Ю. Метаболические возможности бактерий в отношении синтетических углеводов, используемых в производстве неметаллических материалов (обзор) // *Труды ВИАМ*. 2023. № 2 (120). Ст. 11. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 29.03.2024). DOI: 10.18577/2307-6046-2023-0-2-132-146.
15. Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers // *Journal of Microbiological Methods*. 2003. Vol. 55. P. 541–555. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.
16. Polz M.F., Cavanaugh C.M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 11. P. 3724–3730. DOI: 10.1128/AEM.64.10.3724-3730.1998.
17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. A unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
18. Vashishtha K., Gaud C., Andrews S., Krueger C. A quality control tool to analyse sequencing library compositions // *F1000Research*. 2022. Vol. 11. P. 1122. DOI: 10.12688/f1000research.125325.2
19. Nair A.V., Pradeep M.A., Vijayan K.K. Molecular approach for the rapid detection of *Bacillus* and *Pseudomonas* genera dominant antagonistic groups from diverse ecological niches using colony multiplex PCR // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 41. P. 1367–5435. DOI: 10.1007/s10295-014-1441-4.
20. Rainey P. A pair of PCR primers for Incp-9 plasmids // *Microbiology*. 1999. Vol. 145. P. 11. DOI: 10.1099/00221287-145-11-3003.

21. Baldwin B., Nakatsu C., Nies L. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 69. P. 3350–3358. DOI: 10.1128/AEM.69.6.3350-3358.2003.

References

1. Narancic T., Kevin E. Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem. *Microbiology*, 2019, vol. 165, pp. 129–137. DOI: 10.1099/mic.0.000749.
2. Sinha V., Patel M.R., Patel J.V. Pet Waste Management by Chemical Recycling: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 2010, no. 18, pp. 8–25. DOI: 10.1007/s10924-008-0106-7.
3. Kablov E.N., Startsev V.O. Climatic aging of aviation polymer composite materials. II. Development of methods for studying the early stages of aging. *Russian metallurgy (Metally)*, 2020, vol. 2020, no. 10, pp. 1088–1094. DOI: 10.1134/S0036029520100110.
4. 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.
5. 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: March 29, 2024). DOI: 10.18577/2713-0193-2021-0-4-70-80.
6. Kablov E.N. New generation materials and digital technologies for their processing. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*, 2020, vol. 90, no. 4, pp. 331–334.
7. Startsev O.V., Krotov A., Mashinskaya G. Climatic Ageing of Organic Fiber Reinforced Plastics: Water Effect. *Journal Polymeric Material*, 1997, vol. 37, pp. 161–171.
8. Frisch H.L. Diffusion in polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 1970, no. 14, p. 1657.
9. Lucas N., Bienaime C., Belloy C. et al. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*, 2008, no. 4, p. 429. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.6.
10. Eskander S., Saleh H. Biodegradation: Process Mechanism. *Environmental Science and Engineering*, 2017, vol. 8, no. 1, pp. 1–31.
11. Ermishev V.Yu., Laptev A.B., Startsev V.O. Peculiarities of assessing the resistance of polymeric materials to biodegradation in laboratory conditions. Part 1. Degradation of polymeric materials in natural environments, selection of bacterial strains, nutrient media and cultivation conditions. *Trudy VIAM*, 2023, no. 7 (125), paper no. 12. Available at: <http://www.viam-works.ru> (accessed: March 29, 2024). DOI: 10.18577/2307-6046-2023-0-7-138-148.
12. Laptev A.B., Pavlov M.R., Novikov A.A., Slavin A.V. Current trends in the development of testing materials for resistance to climate factors (review). Part 1. Testing of new materials. *Trudy VIAM*, 2021, no. 1 (95), paper no. 12. Available at: <http://www.viam-works.ru> (accessed: March 29, 2024). DOI: 10.18577/2307-6046-2021-0-1-114-122.
13. Yoshida S., Hiraga K., Takehana T. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethyleneterephthalate). *Science*, 2016, vol. 353, pp. 759–769.
14. Ermishev V.Yu. Metabolic possibilities of bacteria with respect to synthetic hydro-carbons used in the production of non-metallic materials (review). *Trudy VIAM*, 2023, no. 2 (120), paper no. 11. Available at: <http://www.viam-works.ru> (accessed: March 29, 2024). DOI: 10.18577/2307-6046-2023-0-2-132-146.
15. Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, vol. 55, pp. 541–555. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.
16. Polz M.F., Cavanaugh C.M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 11, pp. 3724–3730. DOI: 10.1128/AEM.64.10.3724-3730.1998.

17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, pp. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
18. Vashishtha K., Gaud C., Andrews S., Krueger C. A quality control tool to analyse sequencing library compositions. *F1000Research*, 2022, vol. 11, pp. 1122. DOI: 10.12688/f1000research.125325.2
19. Nair A.V., Pradeep M.A., Vijayan K.K. Molecular approach for the rapid detection of *Bacillus* and *Pseudomonas* genera dominant antagonistic groups from diverse ecological niches using colony multiplex PCR. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, vol. 41, pp. 1367–5435. DOI: 10.1007/s10295-014-1441-4.
20. Rainey P. A pair of PCR primers for Incp-9 plasmids. *Microbiology*, 1999, vol. 145, p. 11. DOI: 10.1099/00221287-145-11-3003.
21. Baldwin B., Nakatsu C., Nies L. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, vol. 69, pp. 3350–3358. DOI: 10.1128/AEM.69.6.3350-3358.2003.

Информация об авторах

Ермишев Владимир Юрьевич, старший научный сотрудник, к.б.н., НИЦ «Курчатовский институт» – ВИАМ, admin@viam.ru

Information about the authors

Vladimir Yu. Ermishev, Senior Researcher, Candidate of Sciences (Bio.), NRC «Kurchatov Institute» – VIAM, admin@viam.ru

Статья поступила в редакцию 23.10.2024; одобрена и принята к публикации после рецензирования 19.11.2024.
The article was submitted 23.10.2024; approved and accepted for publication after reviewing 19.11.2024.

Приложение к статье «Выделение бактериальных штаммов деструкторов полимерных материалов из образцов оборотной охлаждающей воды нефтеперерабатывающего и нефтехимического заводов» (автор: В.Ю. Ермишев)

Таблица 1

Химический состав оборотной охлаждающей воды нефтехимического завода

Показатель	Значение показателя для воды водоблока					
	1	2	3	4 (I система)	4 (II система)	АБХМ
Содержание, мг/л:						
нефтепродуктов	0,21	0,15	0,09	5,49	5,40	0,36
железа	0,161	0,195	0,372	0,590	0,610	0,351
взвешенных веществ	10	11	8	16	19	8
хлорид-иона	91	112	289	187	187	233
сульфат-иона	131	128	277	199	388	430
фосфат-ионов	0,24	0,05	0,09	0,05	0,05	0,42
Содержание кальция, ммоль/л	5,5	6,6	12,4	7,9	9,1	12,2
pH	8,5	8,0	8,2	8,5	8,6	8,6
Электропроводность, мкСм/см	1020	1290	2580	1880	1870	2250
Жесткость общая, мг-экв/л	7,2	9,6	19,8	12,3	12,6	16,4
Щелочность общая, мг-экв/л	3,9	4,2	4,2	3,5	3,4	5,4
Общее микробное число, КОЕ/мл	10 ³					
Примечание. В водоблоке 1 (I система) обслуживается установка «Висбрекинг»; в водоблоке 2 (II система) – УПВ-20; в водоблоке 3 (II система) – АКС; в водоблоке 4 (I система) – Л-24-5, Л-24-7, Л-35-5, Л-24-300, «Изориформинг», ЭЛОУ-АВТ-6, «Элементарная сера», Г-43-107М/1, ГОБКК, парк метанола; в водоблоке 4 (II система) – Л-24-5, Л-24-7, Л-35-5, ЦВК-3, Г-43-107М/1, ГОБКК, конденсатная станция; в водоблоке АБХМ (II система) – абсорбционная холодильная машина.						

Таблица 2

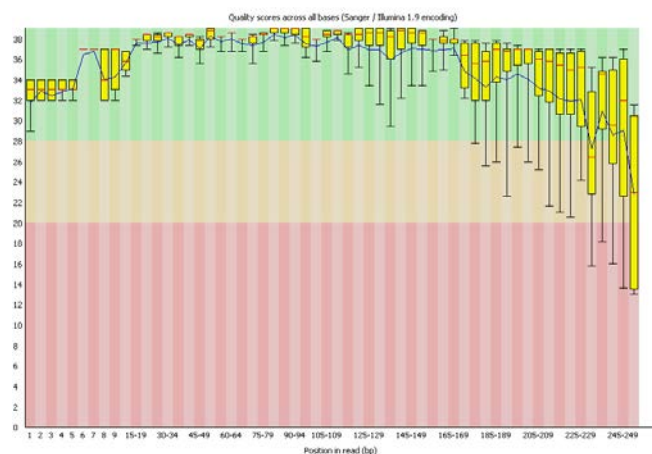
Химический состав оборотной охлаждающей воды нефтеперерабатывающего завода

Показатель	Значение показателя для воды водоблока			
	2	3	4	5
Содержание, мг/л:				
нефтепродуктов	0,76	0,50	0,38	0,60
железа	1,79	0,66	0,81	0,73
взвешенных веществ	17	11	15	7,9
хлорид-иона	383	240	419	254
сульфат-иона	473	298	471	338
фосфат-ионов	1,48	1,37	2,33	1,25
Содержание кальция, ммоль/л	234,46	144,29	232,46	156,3
pH	8,45	8,55	8,68	8,51
Электропроводность, мкСм/см	2440	1676	2005	1605
Жесткость общая, мг-экв/л	15,3	10,8	16,4	10,8
Щелочность общая, мг-экв/л	6,6	4,1	6,5	4,0
Общее микробное число, КОЕ/мл	10 ³			
Примечание. Обслуживаемые установки – потребители охлажденной воды. Водоблок 2 обслуживает: цех 2-3-5/III для производства концентрированного этилена, пропан-пропиленовой фракции, концентрированного пропилена, бутилен-бутадиеновой фракции, жидких продуктов пиролиза; цех 603-609 для производства изопропилбензола; цех 101-615 для производства фенола и ацетона; цех 106-605 для производства инертных газов и сжатого воздуха, холодильного и жидкого аммиака; товарное производство, обеспечивающее прием, хранение, приготовление и откачку сырья, готовой продукции, реагентов и вспомогательных материалов. Водоблок 3 обслуживает: цех 1/II для пиролиза нефтяных углеводородов, компримирования пирогаза, сепарации пирогаза и бутилен-бутадиеновой фракции; цех 1/II для производства олефинов (этилена и пропилена) методом термического расщепления углеводородов нефти; цех 2 для фракционирования пирогаза методом абсорбционной дистилляции, производства концентрированного этилена методом дистилляции и обеспечения соответствующих установок промышленным холодом (пропан-пропиленовая фракция, аммиак). Водоблок 4 обслуживает: цех 202-205 для производства полиэтилена низкой плотности высокого давления в трубчатых реакторах; цех 500-504 для производства полиэтилена низкой плотности высокого давления в автоклавных реакторах; производство полипропилена. Водоблок 5 обслуживает: цех М-1-2 для получения α-метилстирола; цех 400 для производства синтетического этиленпропилендиенового каучука; отделение 8001 для концентрирования пропилена; отделение 405-406 для компримирования газа.				

Basic Statistics

Measure	Value
Filename	NPZminMEDmix_S1_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	213196
Total Bases	53.5 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	208-251
%GC	53

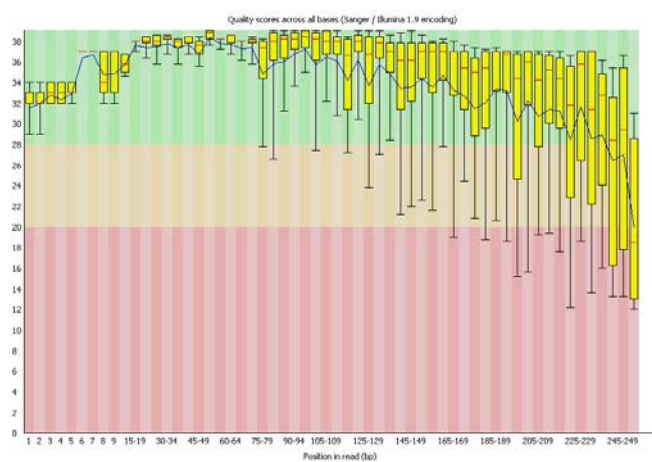
a)



Basic Statistics

Measure	Value
Filename	AGmaterialMIX_S2_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	253319
Total Bases	63.5 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	106-251
%GC	55

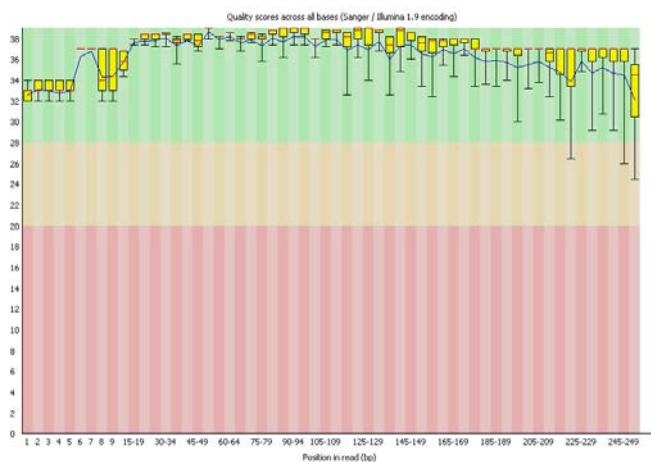
б)



Basic Statistics

Measure	Value
Filename	A2PVA_S1_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	185305
Total Bases	46.5 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	248-251
%GC	54

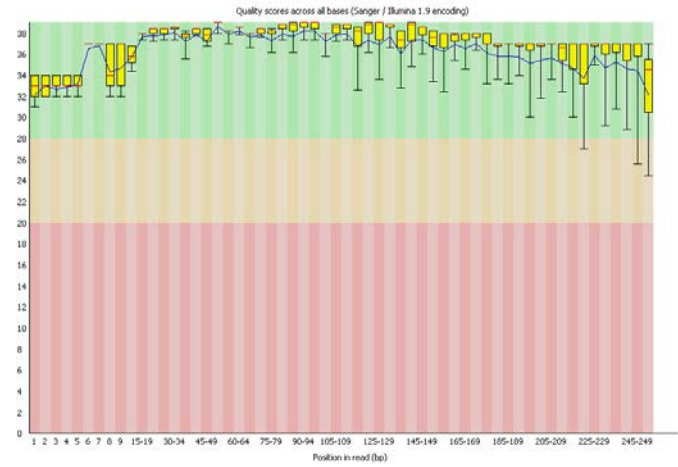
в)



е)

Basic Statistics

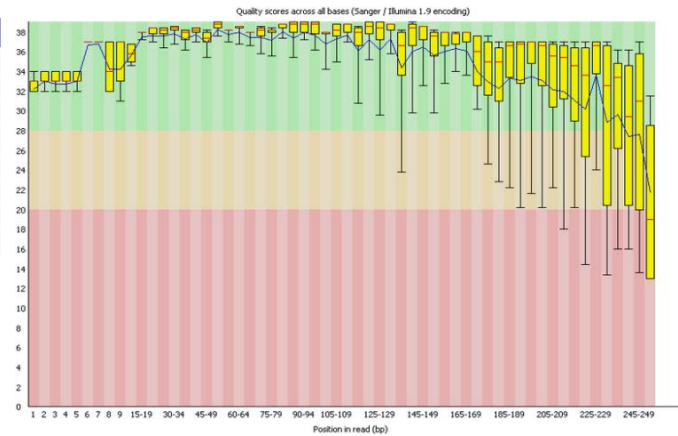
Measure	Value
Filename	C3PVA_S2_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	165082
Total Bases	41.4 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	97-251
%GC	54



д)

Basic Statistics

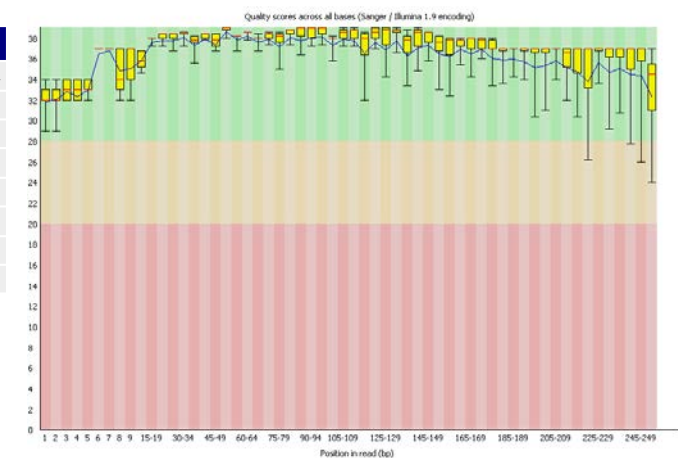
Measure	Value
Filename	E1minMed_S3_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	208549
Total Bases	52.3 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	248-251
%GC	54



е)

Basic Statistics

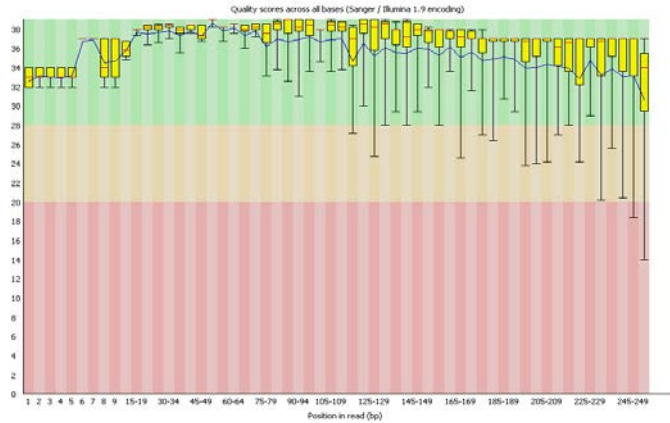
Measure	Value
Filename	F2PVA_S3_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	196938
Total Bases	49.4 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	97-251
%GC	54



ж)

Basic Statistics

Measure	Value
Filename	E2Acrilate_54_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	179762
Total Bases	45.1 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	248-251
%GC	54



з)

Basic Statistics

Measure	Value
Filename	FallAcrilate_55_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	193880
Total Bases	48.6 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	165-251
%GC	54

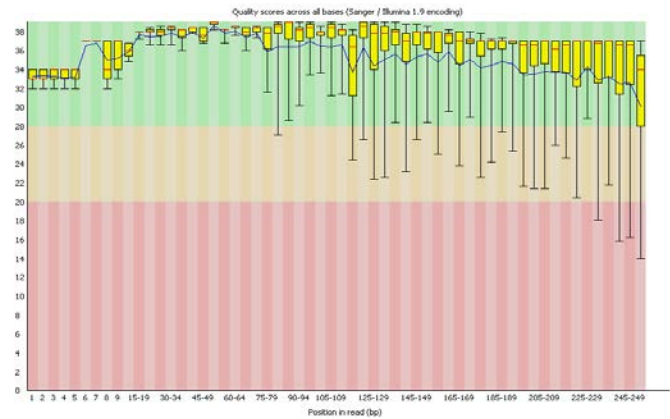


Рис. 1. Результаты анализа качества прочтений проб D-МС (а), AG-Mix (б), А2 PVA (в), С3 PVA (г), E1 PVA (д), F2 PVA (е), E1 SA (ж) и F2 SA (з). Показатель «Quality score» (Q) показывает качество прочтений каждого нуклеотида во всех отсеквенированных фрагментах ДНК участка гена 16S рРНК бактерий. Качество прочтений рассчитывали по формуле $Q = 10\log_{10}P$, где P – вероятность ошибки секвенирования. Например, если $P = 0,001$, то $Q = 30$. Это означает, что только 1 нуклеотид из 1000 может быть встроен в цепь ДНК ошибочно. Поэтому $Q = 30$ является пороговым значением для результатов секвенирования с высоким уровнем доверия. Желтые маркеры показывают интервал значений Q по всем прочтениям выборки, красные метки – среднее значение Q , рассчитанное на основе интервала значений Q . Черные «хвосты» указывают на теоретически возможный разброс значений с учетом полученных интервальных значений Q . Перечисленные параметры являются результатом более сложных расчетов, основанных на Q -весовой матрице, откалиброванной производителем, согласно модели секвенатора и передаваемой программе FastQC в соответствующей кодировке, в данном случае – Sanger/Illumina 1.9

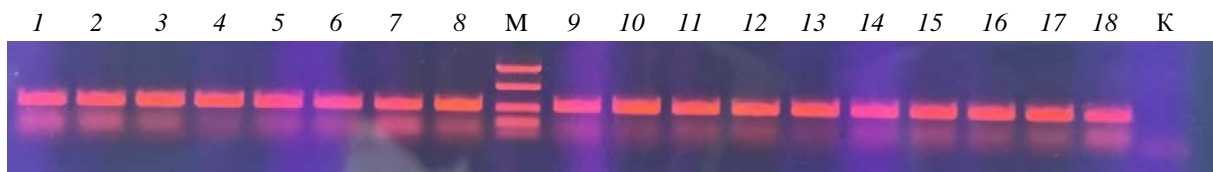


Рис. 2. Результат амплификации участка гена 16S рРНК размером 375 пар нуклеотидов с олигонуклеотидными праймерами PSF2 и PAGES-R, специфичными для бактерий рода *Pseudomonas*. М – маркер длин фрагментов ДНК (#SM1103), К – отрицательный контроль реагентов ПЦР, 1–18 – номера колоний

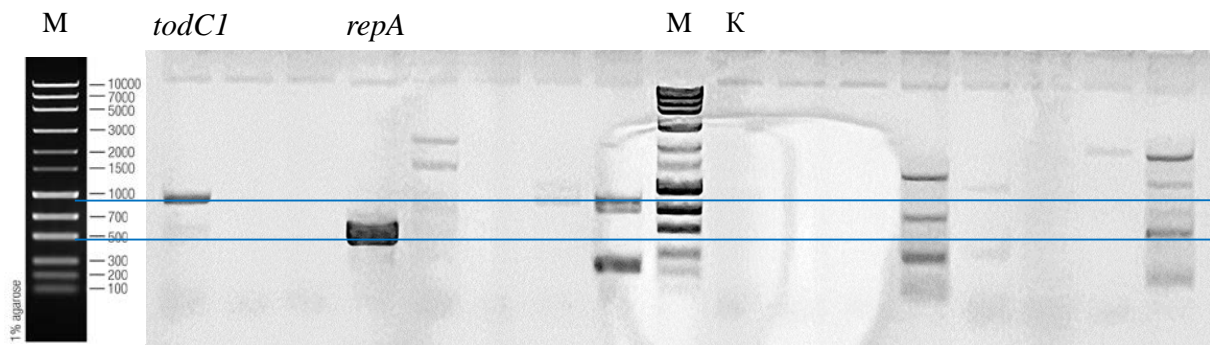


Рис. 3. Результат амплификации ДНК-фрагментов для генов *todC1* (757 пар нуклеотидов) и *repA* (480 пар нуклеотидов). М – маркер длин фрагментов ДНК (#SM1283), К – отрицательный контроль реагентов ПЦР

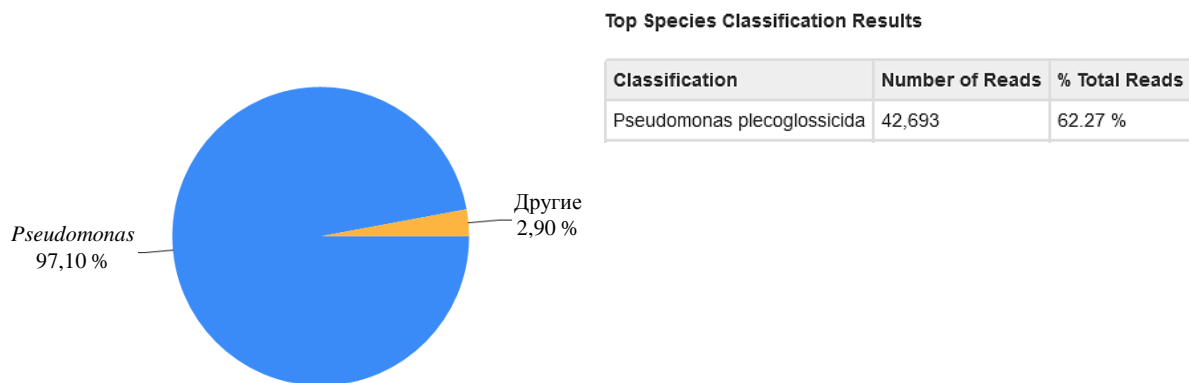


Рис. 4. Результат идентификации по V4-фрагменту 16S рРНК штамма *Pseudomonas plecoglossicida*. Для идентификации использовали культуру, полученную из отдельной колонии. Незначительная примесь посторонних прочтений (2,9 %) связана с экстремально высокой чувствительностью высокопроизводительного секвенатора, который предназначен для анализа сложных сообществ микроорганизмов. Если в смеси присутствует слишком большое количество одинаковых прочтений, могут возникнуть артефакты, связанные с указанной спецификой оборудования

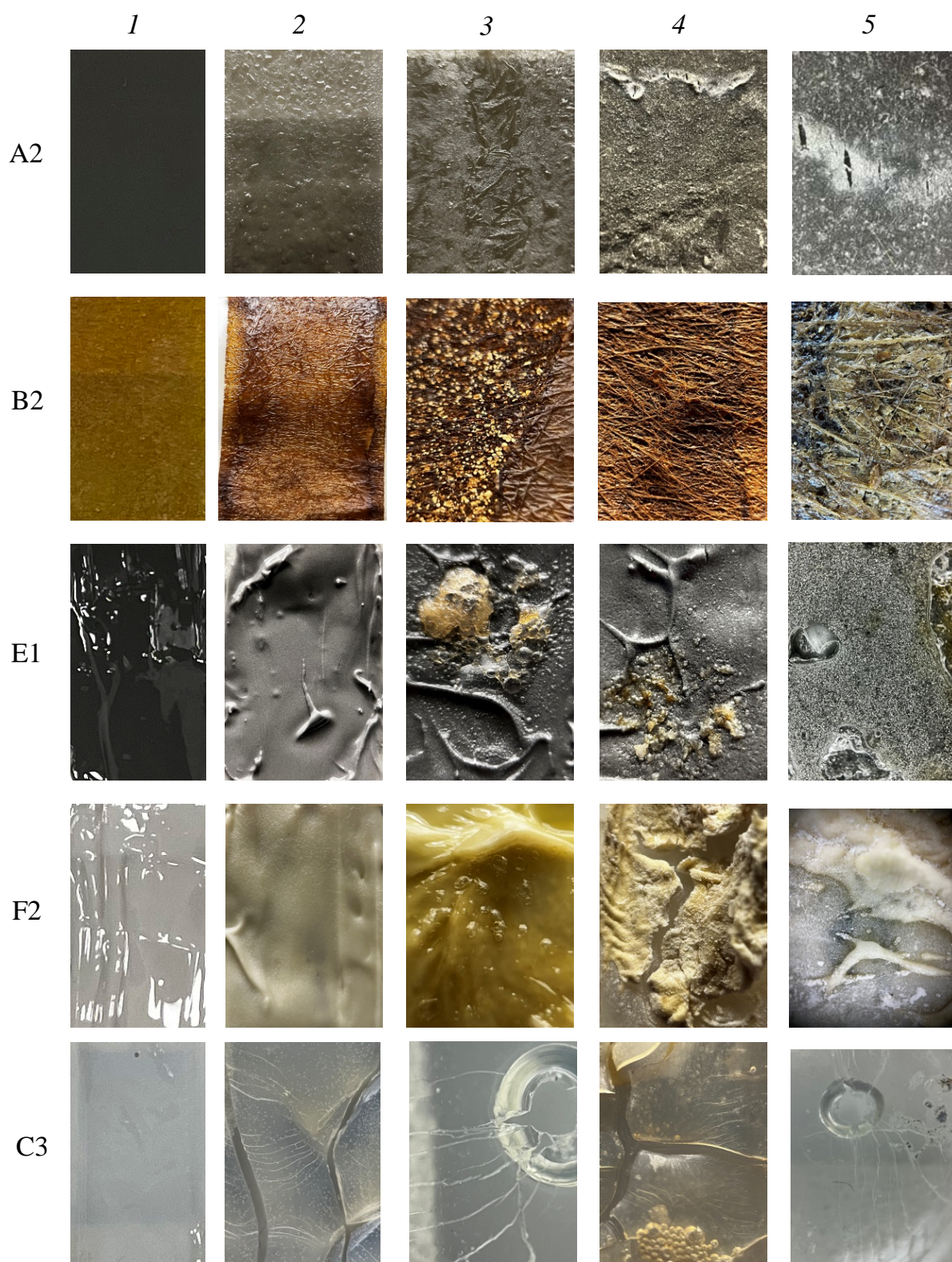
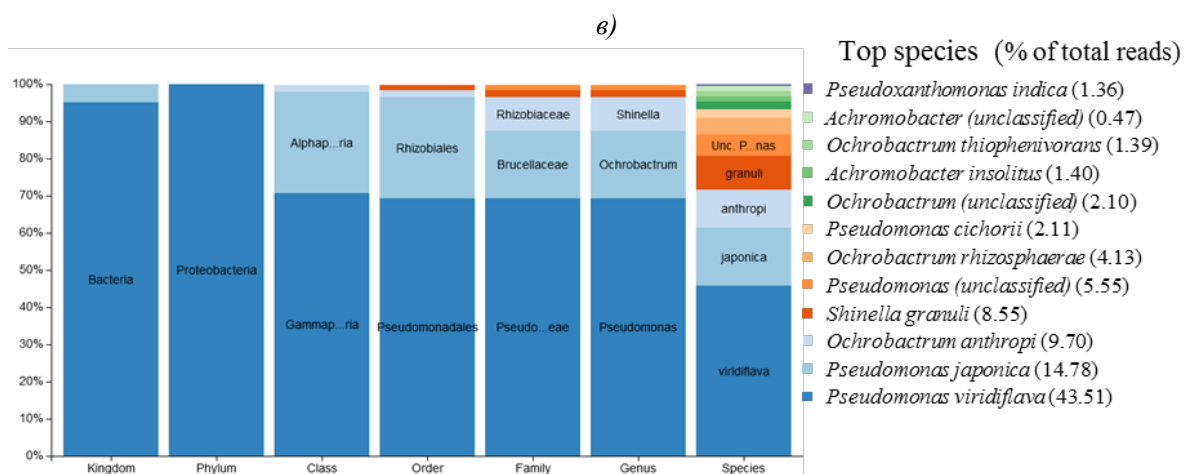
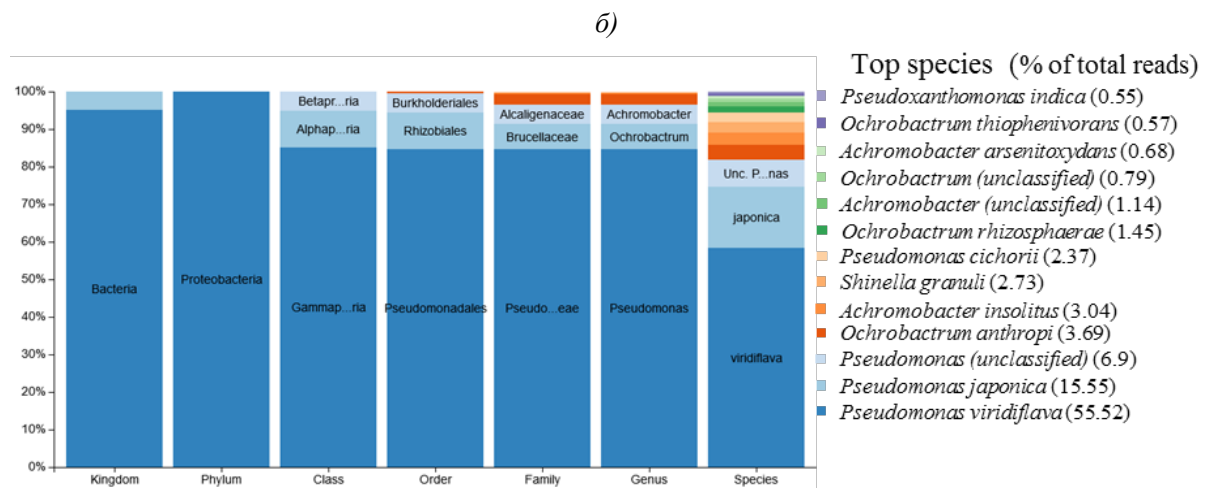
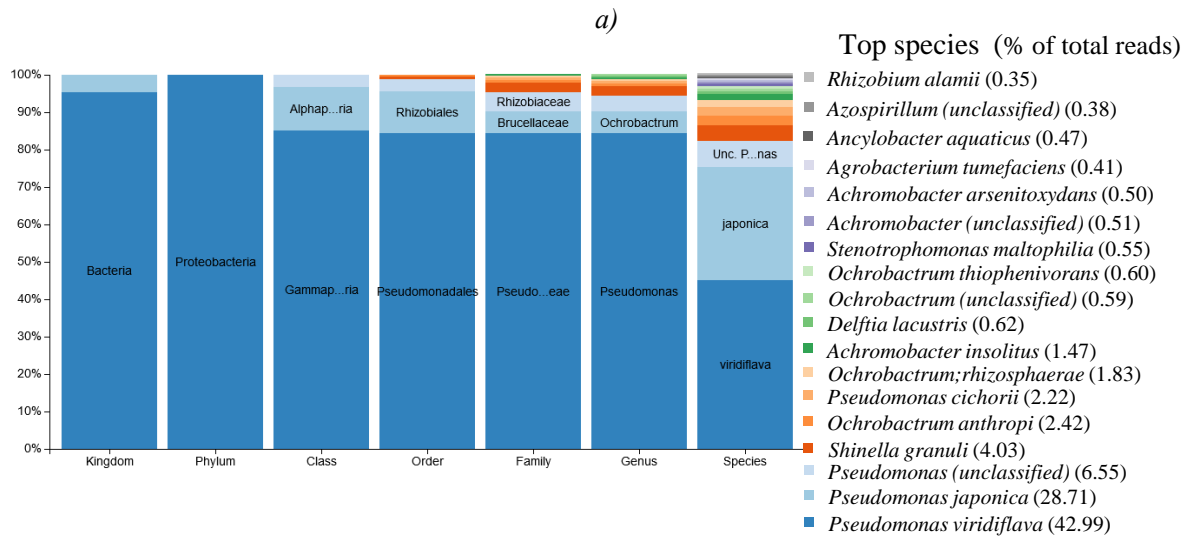


Рис. 5. Образцы материалов А2, В2, Е1, F2 и С3, использованных для экспонирования с бактериальными культурами: 1 – исходные; 2 – после воздействия соляной кислоты и первой выдержки в камере светопогоды; 3 – после второй выдержки в камере светопогоды; 4, 5 – после экспонирования с культурами микроорганизмов



з)

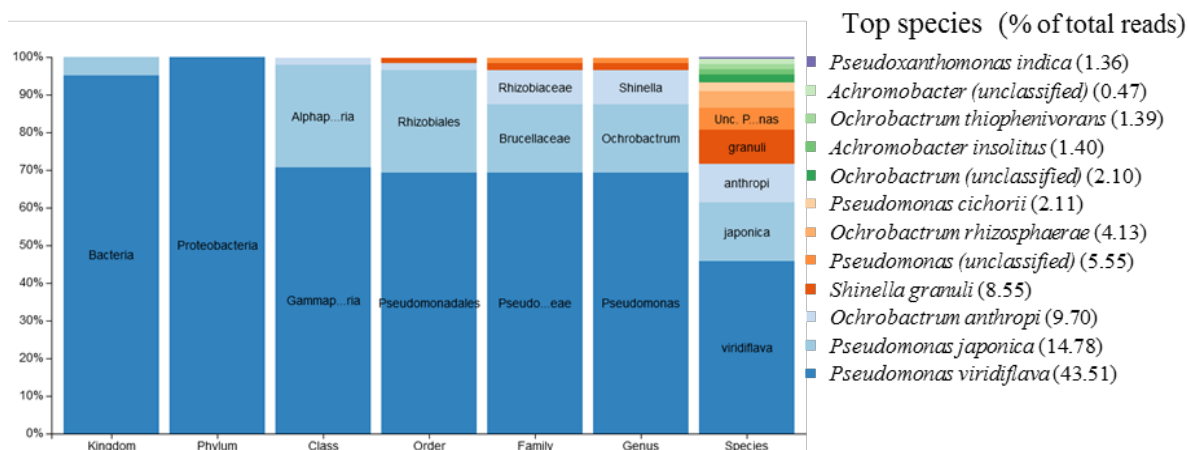


Рис. 6. Видовые составы проб A2 PVA (а), С3 PVA (б), F2 PVA (в) и F2 SA (з) с указанием абсолютного количества прочтений V4-фрагмента 16S рРНК в процессе секвенирования (% of total reads)

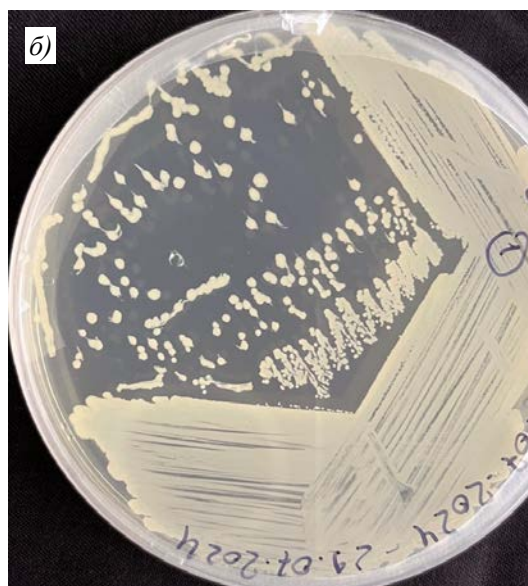
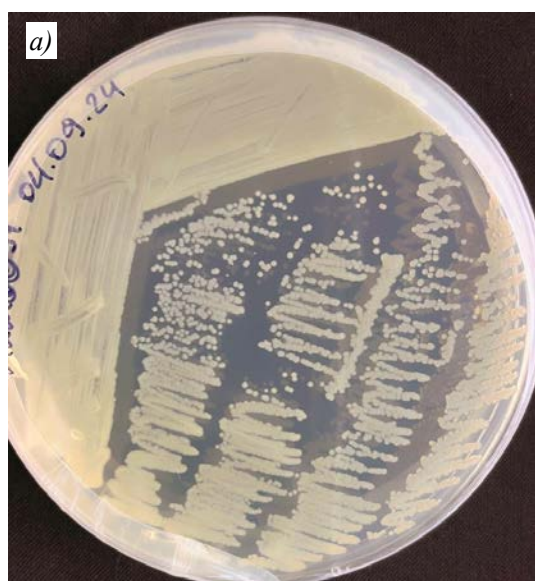


Рис. 7. Чистые культуры бактериальных штаммов *Pseudomonas plecoglossicida* (а) и *Pseudomonas japonica* PQ432336 (б)