

УДК 57.083.18

DOI: <https://doi.org/10.26456/2226-7719-2023-1-39-46>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧИПОВ В ДЕТЕКЦИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРОЗИИ

О.Ю. Сурсимова¹, Ю.О. Букина²

¹ ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», г. Тверь

² ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт»,
г. Пушино

Коррозия материалов, индуцированная деятельностью микроорганизмов, является главной причиной разрушения трубопроводов и резервуаров нефтедобывающих компаний. Своевременное выявление и идентификация бактерий и архей позволяет снизить экологические риски эксплуатации металлоконструкций. В статье рассматриваются возможности использования биологических чипов в природопользовании, приводится их обобщенная классификация и принцип работы.

Ключевые слова: биологический чип, биопленка, микробные сообщества, коррозия, экология и природопользование.

Введение и постановка проблемы. Одним из аспектов современной экологии является изучение воздействия живых организмов на техногенные системы. Процессы коррозии, вызванные деятельностью бактерий и архей (microbiologically influenced corrosion – MIC), и борьба с ними представляют серьезную проблему для современных технологий и эксплуатации инженерных сооружений. Неконтролируемое образование кислот микроорганизмами может привести к коррозии бетона, цемента, металлических конструкций. Грандиозной по своим катастрофическим последствиям стала авария на ТЭЦ-3 Норильско-Таймырской энергетической компании (НТЭК, дочерняя компания ГК «Норильский никель») произошедшая 29 мая 2020 г. Из-за коррозии днища резервуара разлилось около 21000 т. нефтепродуктов, попавших в грунт и реки Амбарную и Далдыкан. Общая площадь загрязнения составила 180000 м². Предупреждение подобных экологических бедствий является одной из задач современной экологии и природопользования. Следовательно, необходимо использовать технологии, позволяющие своевременно выявлять микроорганизмы, вызывающие коррозию металлов. В 21 в. широкое распространение получил метод применения биологических чипов. Он позволяет быстро и одновременно анализировать сотни или тысячи образцов

© Сурсимова О.Ю.,
Букина Ю.О., 2023

биологических материалов. Данная технология способна идентифицировать различные внутриклеточные процессы, анализировать генетическую информацию, а также обнаруживать биологически значимые молекулы.

Целью работы является изучение возможности применения технологии биологических чипов в детекции коррозии трубопроводов, вызванной деятельностью микроорганизмов.

В настоящей работе использовался анализ современных научных источников в области микробиологии и данные компании ООО «ФОСКО БИО» (г. Пущино, Россия), занимающейся научными исследованиями и разработками в области биотехнологии. Для изучения текущей обсемененности микроорганизмов проводится забор образцов технической жидкости и слизи на различных участках трубопровода. Из полученных образцов выделяются ДНК, которые используются с целью последующего синтеза зондов для гибридизации с биочипом. В качестве метода определения микробной обсемененности используется метод секвенирования (NGS – Next Generation Sequencing), позволяющий определить все микроорганизмы, присутствующие в образце, и метод биочипа, позволяющий определить группы микроорганизмов, вовлеченных в процесс биокоррозии.

Биологические микрочипы (биочипы) – это миниатюрные платформы, способные используя небольшое количество исходного материала осуществлять многопараметрический анализ в сжатые сроки [1, 5]. Конструкция биочипов представляет собой компактные пластинки с многочисленными ячейками (подложка), которые содержат набор индикаторов, определяющих тот или иной биологический объект (зонды).

В качестве подложек используются различные материалы. Первый тип – это стекло, кремний и ряд других материалов электронной промышленности. Второй – пластмассы и полимеры, обладающие высокой биосовместимостью, быстрым прототипированием, низкой тепло- и электропроводностью. Третий – биологические материалы – белки, клетки и ткани, которые можно использовать в устройствах BioMEMS (платформы «орган на чипе») [4, 5]. При производстве биочипов используются технологии микроэлектроники и разработки в области полупроводников. Как правило, для изготовления структуры микро- или наномасштаба на плоских подложках необходимо повторение определённых структур фотолитографии (придаёт свойство инертности) с применением методов травления и этапов осаждения тонкой плёнки [5].

Существуют различные типы биочипов, отличающиеся по размерам наносимых фрагментов, методам иммобилизации биологических объектов, системам детекции и т.д. Популярна

классификация, основанная на природе иммобилизованных на биочип зондов [1], которая выделяет следующие типы:

- 1) ДНК-чипы и РНК-чипы – гелевые пластинки с ячейками, содержащими набор ДНК- или РНК-зондов, расположенными на стекле или мембране.
- 2) Белковые микрочипы – подложка с ковалентно «пришитыми» белками (ферменты, антигены, антитела и др.), которые формируют область высокой концентрации на микрочипе.
- 3) Клеточные (микрофлюидные) микрочипы – модель органов или тканей, представляющая собой компактную пластину, в которой перемещаются по микроканалам малые объёмы жидкостей [3].

В основном, технология биочипов широко используется для высокоэффективного детектирования в различных областях биомедицины и биологии – диагностика, лечебная терапия, доставка лекарств, биосенсоры и тканевая инженерия [5, 7]. Отдельным, пока мало применяемым направлением, является определение состава микробиологических сообществ в различных средах, что особенно актуально для решения проблем в области экологии и природопользования [12]. Подходы к биомониторингу окружающей среды требуют измерения либо определённых биомаркеров, либо специфических биологических профилей. Микрочипы способны успешно справиться с этими задачами, позволяя анализировать свыше сотни маркеров одновременно [11]. Понимание структуры и состава микробных сообществ, а также их реакций в ответ на токсикологическое загрязнение, изменение климата, хозяйственную и промышленную деятельность имеет важное значение для поддержания функций и восстановления нарушенных экосистем. Однако, высокое видовое разнообразие микроорганизмов, сложность их обнаружения и культивирования значительно затрудняют работу исследователей. Традиционные методы выращивания на питательных средах зачастую дают ограниченную информацию о разнообразии и динамике микробных сообществ, кроме того, требуют значительных временных затрат [6].

В настоящее время для диагностики микробиологического заражения в нефтегазовой сфере общепринятым является метод культивирования в жидкой среде. Это простой и дешёвый метод, но он имеет ряд существенных недостатков, которые практически полностью нивелируют его достоинства. Он позволяет тестировать, в основном, сульфат восстанавливающих бактерий, при этом длительность теста составляет около 28 дней. За это время MIC может вызвать видимые повреждения металла. WebCorr Services [13] отмечает, что железоокисляющие бактерии в течение месяца перфорируют резервуар из нержавеющей стали толщиной 5 мм. Кроме того, далеко не все микроорганизмы, вовлеченные в биокоррозию, являются культивируемыми, количество живых серовосстанавливающих бактерий занижено на 3–4 порядка.

Применение биочипов позволяет достаточно эффективно определять микробиологический состав сред. Viveiros S. с коллегами применили платформу магниторезистивного биочипа для идентификации бактерий *Escherichia coli*, видов *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* и *Streptococcus agalactiae* в пунктах оказания помощи [12]. Неоспоримым преимуществом применения микрочипов является возможность их использования в труднодоступных средах. В 2022 г. группа китайских учёных во главе с Li P. разработали технологию специфических ДНК-зондов на основе фрагментов гена 18S рибосомной ДНК для обнаружения токсичных водорослей в прибрежных водах [8].

Рассмотрим общий принцип работы микрочипов для биомониторинговых анализов и детекции микробиологических сообществ.

На первом этапе происходит определение типов микроорганизмов, вызывающих биокоррозию (мишени для детекции). Далее, осуществляется экстракция ДНК (РНК) выявленных бактерий и археи. Затем с применением цифровых технологий разрабатывается дизайн последовательности зондов, чтобы обеспечить специфичность анализа [8]. После этого пробы фрагментируют, амплифицируют и помечают флуоресцентной меткой. На следующем этапе производят заливку пробы в биочип. Если анализируемая последовательность комплементарна фрагменту ДНК (РНК) в зонде, то образуется стабильный дуплекс [1]. После этого биочип облучают лазером и считывают флуоресцентный сигнал (если связывания не произошло – флуоресцентной метки не наблюдают). На завершающем этапе производят качественный (число флуоресцентных меток) и количественный (яркость свечения флуоресцентных меток) анализ результатов при помощи специализированного программного обеспечения (рис. 1).



Рис. 1. Процедура анализа образцов при помощи тест-системы «ТБ-биочип»

Перспективным направлением применения биочипов в экологии и природопользовании является борьба с МІС. Биокоррозии подвержены большинство инженерных материалов, она является результатом

электрохимических реакций, происходящих в результате жизнедеятельности микроорганизмов (в свободном состоянии или в виде биопленки) [2]. Биоплёнка – это сложное сообщество бактерий и архей, взаимодействующих друг и с другом, и с окружающей средой. Биоплёнка на объектах промышленности характеризуется гетерогенным составом и создаётся хемотрфными, гетеротрофными, аэробными и анаэробными микроорганизмами, способными выживать в экстремальных условиях (высокое давление и критические температуры) [9]. Внутри биоплёнки сообщество бактерий и архей успешно размножаются, растут и взаимодействуют с друг другом за счёт каскада биохимических реакций. Регулярный мониторинг и своевременная детекция бактерий и архей, ассоциированных с МІС, позволит предотвратить экологические катастрофы, связанные с прорывом нефте- и газопроводов и оборудования.

Рассмотрим специфику использование биочипа для детекции основных групп микроорганизмов, вовлечённых в биокоррозию и бактерий, ускоряющих их рост (компания ООО «ФОСКО БИО», Россия). Данная технология позволит провести быструю оценку бактериального заражения нефтепромысловых объектов и значительно снизить сумму экономических потерь от биокоррозии. Было установлено, что самые значительные повреждения нефте- и газопроводов появляются в местах существования биоплёнок, которые защищают бактерии и архей от неблагоприятных условий окружающей среды. В таких сообществах одни микроорганизмы обеспечивают функции защиты и успешного роста, другие создают стратегические запасы железа, обеспечивая питанием. Чем разнообразнее видовой состав биоплёнок, тем больший вред наносится инженерным сооружениям [9]. Поэтому важным этапом работы является определение бактерии и архей, участвующие в биокоррозии нефтегазового оборудования. Были идентифицированы основные группы микроорганизмов: сульфат восстанавливающие бактерии (СВБ), железо окисляющие бактерии, железо восстанавливающие бактерии, метаногены, ацетогены и ферментативные бактерии, а также, микроорганизмы, которые тем или иным образом усиливают коррозию металлоконструкций – кислотообразующие бактерии, сероокисляющие бактерии и др [2, 10]. Сульфат восстанавливающие прокариоты (бактерии и архей) – одна из самых значительных и агрессивных групп микроорганизмов, вовлеченных в коррозию металлов. Все вышеперечисленные виды бактерий участвуют в жизнедеятельности СВБ. Они нарушают защитный слой труб и/или обеспечивают дополнительное питание для бактерий и архей, вовлечённых МІС [6]. Затем были выбраны и синтезированы фрагменты ДНК ключевых генов микроорганизмов (специфические ферменты), задействованных в биокоррозии. Для специфического узнавания

микроорганизмов эти фрагменты были собраны в одноцепочечные ДНК-кассеты, содержащие флуоресцентную метку, и помещены на стеклянную подложку биочипа. Когда проба, содержащая в себе бактерии и археи, ассоциированные с МИС, помещается на биочип происходит взаимодействие комплементарных цепей (гибридизация). Одна из них иммобилизована на стеклянной подложке, а вторая находится в исследуемом образце. Для визуализации микрочип облучают лазером, полученное изображение анализируют посредством специализированного программного обеспечения. Наличие свечения свидетельствует о присутствии микроорганизмов, а интенсивность метки, позволяет получить сведения о количественных характеристиках исследуемого образца (рис. 2).

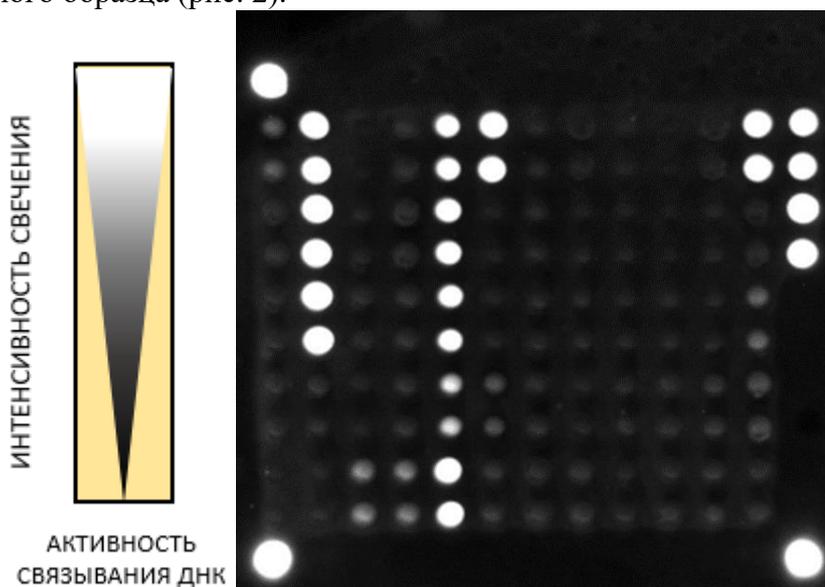


Рис. 2. Матрица биочипа с флуоресцирующими ячейками

Визуализация флуоресцентного изображения биочипа при возбуждении лазерами с длинами волны 532 нм и 655 нм проводится на приборе ImaGeWare, используется программное обеспечение «ImaGeWare».

В результате данная технология позволяет достаточно точно и в сжатые сроки не только детектировать бактерий и археи, участвующих в МИС, но и эффективно подобрать соответствующий биоцид.

Выводы

Использование биочипа для исследований биокоррозии имеет значительные преимущества по сравнению с другими методами. Микрочипы могут быть использованы в труднодоступных и/или

неблагоприятных для человека местах, что позволяет снизить стоимость экологических изысканий.

Анализ микробной популяции методом биочипа в течении нескольких часов позволяет выявить качественный и количественный состав микробиома, наличие микроорганизмов прямо или косвенно вовлеченных в коррозию, эффективность использования биоцидов и на основании полученной информации прогнозировать угрозы функционированию трубопроводов.

Использование технологии микрочипов при регулярном мониторинге и быстром обнаружении микроорганизмов позволит значительно снизить сумму экономических потерь от биокоррозии.

Таким образом, биологические чипы - перспективное направление современной науки, которое позволяет эффективно решать задачи определения микробиологического состава технических объектов.

Список литературы

1. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с.
2. Вайштейн М.Б. Абашина Т.Н. Biogeotechnology, Biocorrosion, and Remediation-Three Areas of Modern Applied Environmental Microbiology // *Microorganisms*, 2022. № 10(8). С. 1611.
3. Вирясова Г. Органы-на-чипе: когда технология сплетается с жизнью [Электронный ресурс] // *Биомолекула* (эл. ж.). 2021. Режим доступа: <https://biomolecula.ru/articles/organy-na-chipe-kogda-tekhnologiya-spletaetsya-s-zhizniu> (дата обращения:8.01.2023).
4. Ahadian S., Civitarese R., Bannerman D. et al. Organ-On-A-Chip Platforms: A Convergence of Advanced Materials, Cells, and Microscale Technologies // *Advanced healthcare materials*, 2018. V. 7(2).
5. Azizipour N., Avazpour R., Rosenzweig D.H. et al. Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip // *Micromachines* 2020. V. 11(6). P. 599.
6. Biochips and rapid methods for detecting organisms involved in microbially influenced corrosion (MIC) / Al-Humam A. A., Zinkevich V., Sapojnikova N., Asatiani N., Kartvelishvili T. // Saudi Arabian Oil Company, Patent, United States Patent Application 2018/0298429
7. Chi J., Wu D., Su M., Song Y. All-printed nanophotonic biochip for point-of-care testing of biomarkers // *Science bulletin (Beijing)*, 2022. V. 67(12). P. 1191-1993.
8. Li P., Qiang L., Han Y. et al. A Sensitive and Portable Double-Layer Microfluidic Biochip for Harmful Algae Detection // *Micromachines (Basel)*, 2022. V. 13(10).
9. Nasser B., Saito Y., Alarawi M. et al. Characterization of microbiologically influenced corrosion by comprehensive metagenomic analysis of an inland oil field // *Gene*, 2021. V. 774.

10. Parthipan P., Cheng L., Dhandapani P. Metagenomics diversity analysis of sulfate-reducing bacteria and their impact on biocorrosion and mitigation approach using an organometallic inhibitor // *Science of The Total Environment*, 2023. V. 556(2).
11. Rivas L. A, Garcia-Villadangos M., Moreno-Paz M. et al. A 200-Antibody Microarray Biochip for Environmental Monitoring: Searching for Universal Microbial Biomarkers through Immunoprofiling // *Analytical chemistry*, 2008. V. 80(21). P. 7970-7979.
12. Viveiros S., Rodrigues M., Albuquerque D. et al. Multiple Bacteria Identification in the Point-of-Care: an Old Method Serving a New Approach // *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2020. V. 20(12). P. 3351.
13. WebCorr Corrosion consulting services [Электронный ресурс] / Компания «WebCorr Corrosion consulting services». Режим доступа: <https://www.corrosionclinic.com/> (дата обращения: 9.01.2023).

Об авторах:

СУРСИМОВА Ольга Юрьевна – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой физической географии и экологии. ФГБОУ ВО «Тверской государственной университет» (170021, г. Тверь-21, Прошина, д. 3 корп.2, e-mail: voroni-olga@yandex.ru), ORCID: 0000-0002-0993-3144, SPIN-код: 4111-8066.

БУКИНА Юлия Олеговна – магистр биологии. ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт», г. Пушкино (142290 Московская область, г. Пушкино, пр. Науки, д.3, e-mail: Ailin_7@mail.ru), ORCID: 0000-0002-2115-539X.

THE USE OF BIOLOGICAL CHIPS IN THE DETECTION OF MICROBIOLOGICAL CORROSION

O.Yu. Sursimova¹, Yu.O. Bukina²

¹Tver State University, Tver

²Pushchino State Natural Science Institute, Pushchino

Corrosion of materials induced by the activity of microorganisms is the main cause of the destruction of pipelines and reservoirs of oil companies. Timely detection and identification of bacteria and archaea can reduce the environmental risks of the operation of metal structures. The article discusses the possibilities of using biological chips in nature management, provides their generalized classification and principle of operation.

Keywords: *biological chip, biofilm, microbial communities, corrosion, ecology and nature management*

Рукопись поступила в редакцию 22.01.2023

Рукопись принята к печати 3.02.2023