

## РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ГРУППЫ КОРРОЗИОННО-АКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Михеева Е.И. (Университет ИТМО), Пушкин А.А. (Университет ИТМО)  
Научный руководитель – доктор химических наук, доцент Виноградов А.В.  
(Университет ИТМО)

**Введение.** Микробиологическая коррозия представляет собой процесс разрушения металлических поверхностей, обусловленный жизнедеятельностью коррозионно активных форм микроорганизмов, преимущественно сульфатовосстанавливающими бактериями [1]. В особенности проблема актуальна для нефтяного сектора, в котором осуществляется мониторинг состояния объектов нефтедобычи на предмет зараженности данными микроорганизмами. С учетом видового разнообразия популяций как в нефтяных пластах, так и на объектах транспортировки и хранения нефти, мониторинг коррозионной нагрузки усложняется большим количеством образцов для анализа. На сегодняшний день в аналитической практике контроль производится на селективных питательных средах культуральными методами, которые не предполагают количественной оценки и не обладают свойством штамм-специфичности [2]. В качестве альтернативных решений могут быть рассмотрены молекулярно-биологические методы [3]. Таким образом, в целях повышения точности и прецизионности методик необходимо не только внедрение новых способов детекции микроорганизмов, но и подходов к оптимизации рутинных операций. Для реализации диагностического решения выполнена разработка и оптимизация протокола сорбции ДНК коррозионно активных микроорганизмов на магнитных частицах для последующего мультиплексного ПЦР-анализа с учетом возможности применения на автоматизированных платформах, обеспечивающих высокую производительность решения.

**Основная часть.** Для разработки протокола были использованы образцы, полученные с нефтяной скважины и представляющие собой водный смыв с поверхности металлов, подверженных коррозии. С использованием микробиологических методов были определены основные группы коррозионно активных микроорганизмов, на основании которых были рассмотрены наиболее эффективные механизмы клеточного лизиса. Критическим параметром при разработке протокола являлось исключение этапа центрифугирования с целью адаптации решения на автоматизированные устройства. Было предложено пять вариантов протоколов экстракции на основе магнитной сепарации, использующих различные механизмы лизиса бактериальных культур (лизоцим, тритон-Х-100 и додецилсульфат натрия). Оценка эффективности предложенного протокола была проведена путем количественной определения выхода суммарной двухцепочечной ДНК методом высокочувствительного флуориметрического измерения. Разработанный протокол показал прецизионность выхода суммарной ДНК в диапазоне 0,01-7,00 нг/мкл. Для оптимизации был проведен дизайн экспериментов с вариациями параметров инкубации и концентрации детергентов в рамках 81 серии экспериментов. Определены оптимальные условия для достижения воспроизводимости с коэффициентом вариации 1,2% в рамках пяти измерений. В результате реализации протокола очищенная суммарная ДНК была использована для количественного определения панели коррозионно активных форм микроорганизмов, представленной шестью видами сульфатовосстанавливающих бактерий, как доминирующих форм в популяции микроорганизмов нефтяных пластов: *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfobacter postgatei*, *Desulfotomaculum ruminis* и *Desulfovibrio desulfuricans*. Кроме того, был разработан диагностический набор для выделения геномной ДНК из образцов, полученных на объектах добычи, транспортировки и хранения нефти. В рамках панели для мониторинга сульфатовосстанавливающих бактерий

была проведена апробация метода на автоматизированной станции выделения с целью повышения производительности основного этапа мониторинга – мультиплексного ПЦР-анализа.

**Заключение.** В рамках работы был разработан протокол экстракции геномной ДНК на основе магнитных частиц для популяции коррозионно-активных форм микроорганизмов, включая сульфатовосстанавливающих бактерий. Данный протокол может быть адаптирован к автоматизированным (роботизированным) станциям выделения ДНК, использующим механизмы магнитной сепарации.

#### **Список использованных источников:**

1. Xu, D., Gu, T. & Lovley, D.R. Microbially mediated metal corrosion. *Nature Reviews Microbiology* 21, 705–718 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00920-3>;
2. Eckert, R., & Skovhus, T. L. Advances in the application of molecular microbiological methods in the oil and gas industry and links to microbiologically influenced corrosion. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126, 169-176 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.019>;
3. Puentes-Cala, E., Tapia-Perdomo, V., Espinosa-Valbuena, D. et al. Microbiologically influenced corrosion: The gap in the field. *Frontiers in Environmental Science*, 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.924842>.