

УДК 579:66:553.988:579.222

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2014 г. А.В. Брянская, Ю.Е. Уварова, Н.М. Слынько, Е.А. Демидов,
А.С. Розанов, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: alla@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30 сентября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

В статье рассмотрены теоретические вопросы биологического окисления углеводородов нефти от алканов до полициклических ароматических углеводородов. Показаны механизмы биохимических процессов разложения компонентов нефти и сделан обзор данных, представленных в популярных базах данных. Подробно описаны результаты исследований микробных сообществ естественных нефтепроявлений кальдеры Узон. Впервые изучены экофизиологические характеристики микроорганизмов нефтедеструкторов, выделенных из термальных источников нефтепроявлений кальдеры Узон.

Ключевые слова: биологическое окисление, нефть, углеводороды, микроорганизмы, кальдера Узон.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение особенностей биологического окисления углеводородов нефти микробными сообществами необходимо как для решения фундаментальных задач микробиологии, биохимии, экологии, так и для практического применения в области биотехнологии. Биотехнологический подход к переработке нефти позволяет устранять результаты загрязнений нефтепродуктами почвы и воды, облегчать процессы добычи и переработки нефти и получать нефтепродукты, легко утилизируемые микроорганизмами (Нуртдинова, 2005).

Местообитаниями естественных комплексов нефтеокисляющих микроорганизмов служат экстремальные экосистемы, такие как: естественные выходы и нефтепроявления на поверхности почвы, в водоемах, нефтеносные пласты почв, антропогенно-загрязненные почвы и воды. Рост микроорганизмов на нефти как единственном источнике углеводородов предполагает наличие у них соответствующих

ферментных систем для деградации углеводородов и механизмов подавления токсического действия нефти. Изучение свойств микроорганизмов, утилизирующих углеводороды нефти, позволяет расширять знания о биохимии, экологии и физиологии микроорганизмов; находить новые метаболические пути деградации трудноутилизуемых субстратов; составлять карты метаболических превращений компонентов нефти; выделять и описывать свойства ферментов, разрушающих углеводороды; использовать исследуемые микроорганизмы для создания эффективных биотехнологических и биоремедиационных процессов.

Разнообразие микроорганизмов, способных к утилизации нефти, обусловлено высокой конкуренцией и большим количеством путей деградации различных фракций нефти (Тимергазина, Переходова, 2012). Микроорганизмы обладают свойством избирательного отношения к различным углеводородам; эта способность определяется различием в структуре углеводородов, а также количеством

углеродных атомов, входящих в эту структуру. В природных условиях микроорганизмы образуют консорциумы, составляя единую цепь окисления углеводородов нефти. Каждый из микроорганизмов консорциума, обладая специфичными ферментными системами, направленными на использование определенного субстрата (как самих углеводородов, так и их производных) использует данный субстрат в своем метаболизме. Поэтому при совместном воздействии микроорганизмов консорциума происходит извлечение как большего количества, так и более широкого спектра нефтяных углеводородов. В работах, посвященных процессам биологического окисления нефти и нефтепродуктов, рассмотрены преимущественно микроорганизмы, принадлежащие к родам: *Rhodococcus* (Чугунов и др., 2000; Margesin *et al.*, 2003), *Pseudomonas* (Baryshnikova *et al.*, 2001; Hamme, Ward, 2001), *Azotobacter* (Градова и др., 2003), *Bacillus* (Стабникова и др., 1995; Rahman *et al.*, 2002), *Arthrobacter* (Логинов и др., 2004), *Acinetobacter* (Hanson *et al.*, 1997), *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Nocardia* и др. (Андреева и др., 2006). Также в ряде работ встречается описание штаммов дрожжей, утилизирующих нефть (Суржко и др., 1995; Андреева и др., 2006). Целью данной работы было изучение ряда теоретических и практических аспектов биологического окисления углеводородов микроорганизмами на примере углеводородокисляющих организмов нефтяных полей полуострова Камчатка.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Механизмы деградации углеводородов нефти микроорганизмами

В углеводородной части нефти выделяют основные группы: метановые (алканы, циклоалканы), нафтеновые и ароматические. К более тяжелым фракциям нефти относятся асфальтосмолистая (асфальтены, смолы) и золистая (Сафиева, 1998). В зависимости от месторождения нефть имеет различный количественный состав данных химических групп

углеводородов. Так, например, бакинская нефть богата циклопарафинами и сравнительно бедна предельными углеводородами. Значительно больше предельных углеводородов в грозненской и ферганской нефти. Пермская нефть содержит большое количество ароматических углеводородов (Большаков, Бейко, 1988). При изучении процессов биологического окисления нефти в качестве субстратов выбирают вещества, преобладающие в составе нефтей различных месторождений; отдельные нефтяные фракции и вещества, доступные для деградации широким спектром групп микроорганизмов, с целью изучения различных метаболических путей.

Наиболее изучены пути деградации микроорганизмами алканов, так как это одни из самых доступных для деградации соединений, которые могут служить единственным источником углерода и энергии для сапрофитных микробактерий и родственных им организмов, для ряда видов псевдомонад, нескольких видов дрожжей и некоторых грибов (Павликова, 2004). Микробная деградация алканов возможна благодаря наличию в клетке структур, обеспечивающих поглощение гидрофобного и не растворимого в воде субстрата. Ферменты микроорганизмов, осуществляющие деградацию алканов, относятся к классу оксидоредуктаз смешанных функций (оксигеназ) и связаны с мембранными структурами клеток. Оксигеназы катализируют включение одного атома кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода (Ветрова, 2010). Углеводороды, имеющие в составе молекулы разветвленную цепь атомов, практически недоступны биохимическому окислению, так как взаимодействие «субстрат – фермент» затруднено из-за конформации молекул субстрата (Dutta, Nagayama, 2001). На сегодня в базе данных KEGG представлено описание ферментных систем, использующих в качестве субстрата неразветвленные алканы, для следующих родов микроорганизмов: *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Burkholderia* и др.

Циклоалканы поддаются биологическому разложению труднее алканов, что связано с наличием цикла, который окисляется сложнее, чем молекулы с линейной структурой (Суржко, 1999). Штаммы, способные деградировать циклоалканы, имеют специфические фер-

ментные системы, окисляющие циклогексан до циклогексанола, а его – до адипиновой, валериановой, муравьиной кислот. Белок, катализирующий первую реакцию, гомологичен бутанмонооксигеназе (Ветрова и др., 2013). На рис. 1 приведен пример реакции превращения циклогексана в циклогексанол под действием бутанмонооксигеназы, представленной в базе данных KEGG.

В работе Тарановой и Ждановой (1996) показано, что олефины легко окисляются микроорганизмами. Ферментные системы микроорганизмов при окислении олефинов образуют насыщенные кислородом продукты, в которых двойная связь оказывается неразрушенной. Поскольку продуктом распада является тетрадеценная кислота, считают, что имеет место прямая атака на метильную группу олефина. Кроме этого описан еще один путь окисления олефинов – эпоксидирование двойной связи (Cooper, Goldenberg, 1987). Ароматические углеводороды наиболее токсичны для живых организмов (Емельянова, 2009). Микроорганизмы гидроксилируют ароматические углеводороды с последующим раскрытием бензольного кольца. Субстраты, полученные в ходе подобных реакций, легко утилизируются до продуктов цикла Кребса через о- и м-расщепление (Connors, Barnsley, 1982).

Алкилированные бензолы окисляются значительно интенсивнее, чем сам бензол. При этом соединение окисляется в основном за счет боковых алкильных цепей. Наиболее изучены пути деградации толуола (Dockyu et al., 2002). На сегодня известны пять путей деградации

толуола, которые начинаются либо с атаки монооксигеназы или диоксигеназы на ароматическое кольцо, либо с окисления метильной группы с последующей атакой ароматического кольца. Формирующиеся гидрокселированные ароматические углеводороды подвергаются расщеплению с разрывом ароматического кольца, образуя карбоксилированные соединения, которые при наличии в штамме ферментов дальнейшего окисления могут утилизироваться до продуктов цикла Кребса (Marchai *et al.*, 2003).

Существование большого количества путей деградации моноароматических углеводородов связано с конкурентными взаимоотношениями микроорганизмов и их адаптацией к изменяющимся условиям окружающей среды (Киреева и др., 2002). При культивировании микроорганизмов в анаэробных условиях наиболее конкурентоспособным является путь с участием толуол-2-монооксигеназы. При культивировании микроорганизмов на субстрате с малым количеством толуола наименее конкурентоспособным является путь с ферментом толуол-4-монооксигеназой. В анаэробных условиях при культивировании микроорганизмов на субстрате с малым количеством толуола наименее конкурентоспособен путь с ферментом толуол монооксигеназой (Балашова и др., 1997).

В различных базах данных (KEGG, NCBI, GenNet и др.) описаны генные сети метаболизма большого числа ароматических углеводородов. Так, в базе данных KEGG представлены генные сети и метаболиты для многих реакций деградации моноароматических углеводородов нефти микроорганизмами. В качестве примера

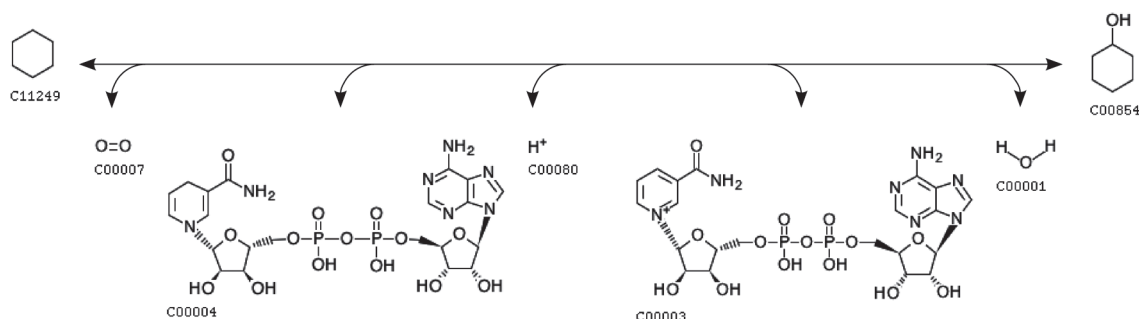
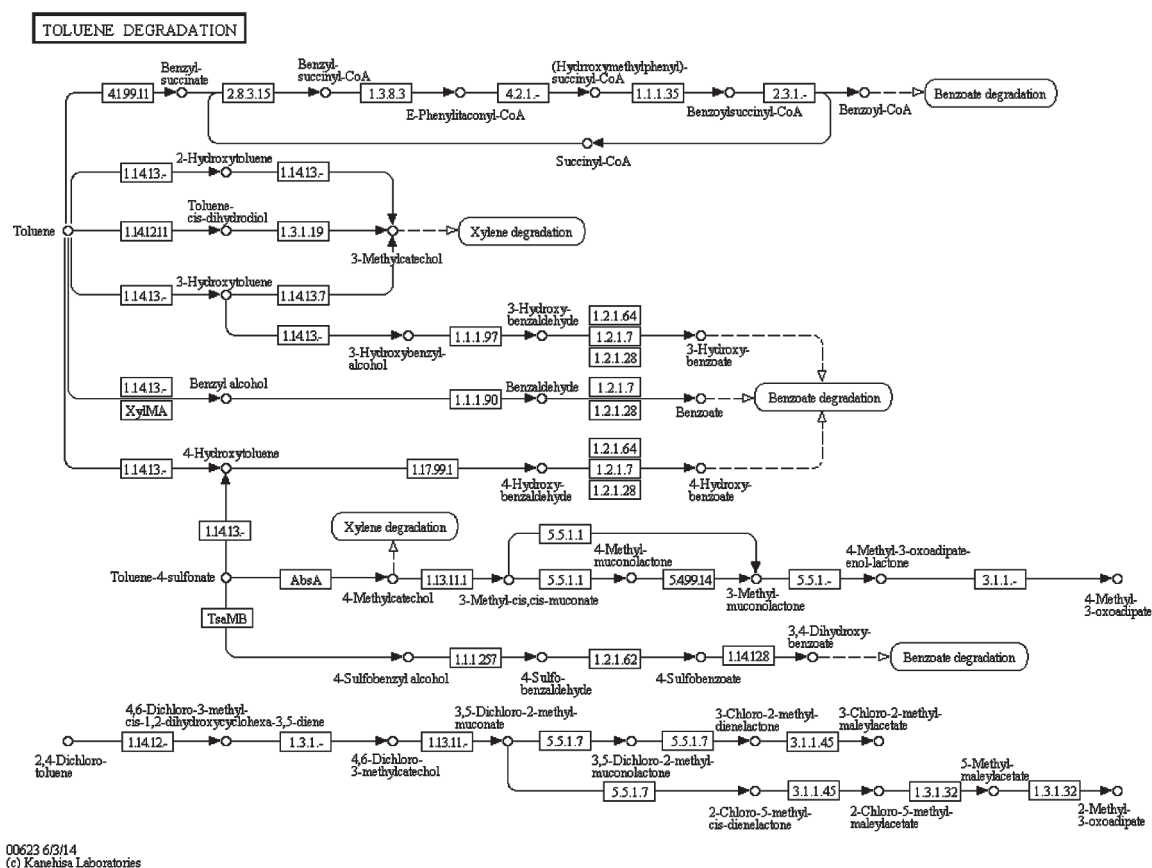


Рис. 1. Схема превращения циклогексана (C11249) в циклогексанол (C00854) под действием бутанмонооксигеназы (фермент на рисунке не указан). Реакция является NADH-зависимой. NAD⁺, NADH (C00004, C00003), H⁺ (C00080), H₂O (C00001), O₂ (C00007).



00623 6/3/14
(c) Kanehisa Laboratories

Рис. 2. Метаболическая карта преобразования толуола углеводородокисляющими организмами.

представлена карта метаболизма толуола, указаны ферменты, участвующие на каждом этапе реакции и связи с другими цепями деградации, например, бензоата (рис. 2).

Фермент бензоат/толуат диоксигеназа расщепляет циклические углеводороды, такие как камфора, толуол, салицилат, нафталин, деградирует толуол до 3-метилкатехола, который в дальнейшем поступает в сеть метаболизма ксилотола.

Существуют фундаментальные различия в механизмах расщепления полициклических ароматических молекул, осуществляемых различными классами микроорганизмов (Нечаева, 2009). Бактерии и некоторые зеленые водоросли окисляют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), используя оба атома молекулярного кислорода (реакция катализируется диоксигеназой), при этом получается *цис*-гидродиол, который затем подвергается гидрогенизации, образуя катехол. Некоторые грибы способны окислять ПАУ с помощью

цитохрома Р-450 монооксигеназ посредством включения одного из атомов молекулы кислорода в ПАУ. Скорость деградации ПАУ обратно пропорциональна числу колец в молекуле. Это связано с низкой водной растворимостью, которая снижается с увеличением числа ароматических колец. Ферментативная атака колец ПАУ происходит только в аэробных условиях (Александров, 2010).

Но некоторые ферментативные системы, такие как метан монооксидазы и лигнин пероксидазы, участвуют в анаэробном разложении ПАУ. Штаммы *Pseudomonas* и *Flavobacterium* способны окислять антрацен и фенантрен, образуя в качестве промежуточных продуктов салициловую кислоту и пирокатехин (Борзенков и др., 2006; Коршунова, Егорова, 2010). В качестве примера приведена схема деградации диоксинов углеводородокисляющими микроорганизмами, опубликованная в базе данных KEGG (рис. 3). Таким образом, в литературе имеются данные

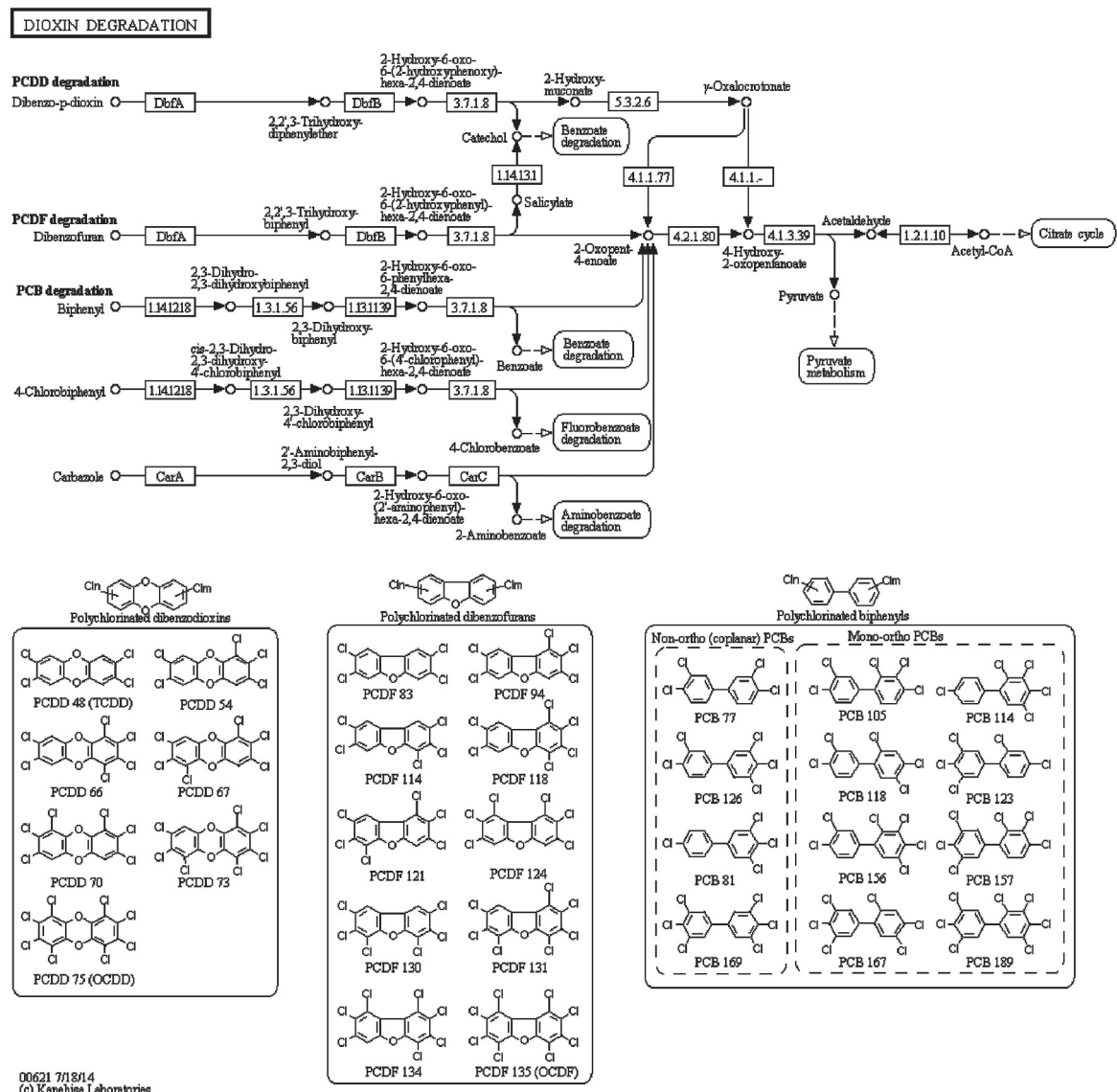


Рис. 3. Схема деградации диоксинов микроорганизмами.

о биодegradации многих компонентов нефти, таких как алканы, циклоалканы, моноароматические и полиароматические соединения. Установлены метаболические пути использования компонентов нефти такими родами микроорганизмов, как *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Psychrobacter*, *Burkholderia*; выявлены ферменты и генные сети, участвующие в метаболизме компонентов нефти, построены метаболические карты, доступные в популярных базах данных. Показано, что различные штаммы микроорганизмов имеют избирательную

способность к окислению углеводов, что объясняется большим количеством путей деградации различных фракций нефти. Так, например, выделенные и описанные J. Tausz и M. Peter *Bacterium aliphaticum* и *Bacterium aliphaticum liquefaciens* окисляли н-гексан, н-октан, декан, гексан, триоктан и тетра триоктан, а выделенная ими же *Bacterium paraffinicum* окисляла только высшие гомологи этого ряда, начиная с гексадекана (Feist, Hegeman, 1969; Кодина, 1988; Cerniglia, 1992; Кошелева и др., 2000).

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Кальдера вулкана Узон – район естественных нефтепроявлений

Уникальной экосистемой, в которой были обнаружены источники естественного выхода нефти на поверхность, является кальдера вулкана Узон (Курило-Камчатский вулканический пояс). В кальдере Узон сосредоточены многие уникальные проявления, связанные с деятельностью неглубоко залегающих магматических очагов, таких как: самостоятельные выходы нефти в источниках с сульфатно-хлоридно-кальциевым составом, скопления рудных минералов – сульфидов мышьяка, сурьмы, железа, ртути, образующихся в настоящее время (Карпов и др., 2013), высокотемпературные хлоридно-натриевые термальные источники с высоким содержанием рудных элементов – As, Sb, Hg, Au, Ag, сероводородсодержащие и углекислые источники. В приповерхностной зоне термальных полей здесь формируется оруденение As–Sb–Hg-состава, а на глубине первых сотен метров предполагается золотосеребряное оруденение (Карпов и др., 2008). Нефть кальдеры Узон имеет уникальный вещественный состав, по исследованиям НИИ вулканологии и сейсмологии РАН совместно со Швейцарским федеральным техническим университетом Цюриха, возраст узонской нефти составляет около 1 000 лет (Varfolomeev *et al.*, 2011).

В групповом составе нефтепроявлений из кальдеры вулкана Узон доминируют углеводороды (УВ) (90–93 %). Среди них по массе насыщенных УВ в 2 раза больше, чем ароматических (Конторович и др., 2011). Концентрация гетероциклических соединений составляет 7–10 %. Асфальтенов в изученных образцах очень мало (не более 0,3 %). Во фракции насыщенных углеводородов идентифицированы n-алканы C_{10} – C_{37} , алифатические изопренаны – C_{13} – C_{25} , стераны (C_{21} – C_{22} и C_{27} – C_{30}) и терпаны (C_{19} – C_{35}). Соотношение концентраций n-алканов C_{27} и C_{17} в нефти < 0,2. В составе изоалканов идентифицированы монометилалканы и изопренаны. Среди алифатических изопренанов преобладают фитан и пристан (до 53 % от суммы изопренанов).

Отношение концентраций пристана к фитану (Pr/Ph) в нефтепроявлениях < 0,5. Концентрация нормальных алканов превышает изопренаны в три раза. Высокомолекулярные циклоалканы из кальдеры вулкана Узон представлены стеранами, терпанами и углеводородами гомологического ряда алкилциклогексанов. В ароматической фракции нефтепроявлений присутствуют фенантрены, метилфенантрены, моно- и триароматические стероиды, а также дибензотиофены (Бескровный и др., 1970). Среди этих соединений по концентрации преобладают триароматические стероиды (51,96–80,40 %). Концентрация фенантронов и дибензотиофенов не превышает 2,69 и 0,91 % от суммы полициклических ароматических соединений. Концентрации алкилбензолов и метилбензолов сопоставимы с концентрациями алкилциклогексанов (Лукин, Пиковский, 2004).

Состояние изученности природных комплексов нефтеокисляющих микроорганизмов Камчатки

Различные коллективы исследователей занимались изучением микрофлоры термальных полей кальдеры Узон, Долины гейзеров и других выходов термальных вод на поверхность в Курило-Камчатском вулканическом поясе (Kublanov *et al.*, 2009; Заварзин, 2010; Марданов, Равин, 2012; Бонч-Осмоловская, 2013, и др.). Была частично изучена и микрофлора районов нефтепроявлений кальдеры Узон (Mardanov *et al.*, 2009; Гумеров, 2011). Установлено огромное разнообразие микроорганизмов, населяющих эти экосистемы. В зависимости от периода изучения и методической базы данные микробные сообщества изучались классическими микробиологическими методами, молекулярно-биологическими, методами геномики, протеомики и биоинформатики (Лобкова, Лобков, 2003). В результате этих работ получены массивы данных о микроорганизмах Камчатки в целом и районов нефтепроявлений в частности (Марданов и др., 2008).

Так, например, коллективом исследователей под руководством Е.А. Бонч-Осмоловской были исследованы эколого-функциональные свойства микроорганизмов-термофилов из термальных источников Долины гейзеров и кальдеры

Узон (Perevalova *et al.*, 2005; Slepova *et al.*, 2006; Kublanov *et al.*, 2009; Bonch-Osmolovskaya *et al.*, 2011, и др.). В этих работах показано, что богатое разнообразие термопроявлений в кальдере Узон, отличающееся широким диапазоном температуры, рН, окислительно-восстановительного потенциала, солевого и микроэлементного состава воды и т. д., определяет высокое разнообразие термофильных прокариот, обитающих в этих источниках. Установлено, что в исследованных экосистемах широко распространены такие группы микроорганизмов как *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Aquificales*, *Deinococcus-Thermus*, *Thermodesulfobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes* и др.

Современными методами метагеномики хорошо изучен ряд микробных сообществ термальных источников кальдеры Узон, различающихся температурой и значениями рН среды. Так, в работе В.М. Гумерова (2011) проведен метагеномный анализ сообществ микроорганизмов следующих источников: Заварзин, 1884, 1810, 1805, 1807, Бурлящий (Гумеров, 2011). Более подробно остановимся на описании микробных сообществ источников 1884 и Бурлящего, которые расположены вблизи нефтяного поля кальдеры Узон.

Микробное сообщество источника 1884, представляющего собой искусственно вырытую, заполненную грунтовой водой яму, в месте выноса на поверхность углеводов термальными водами, имело необычный состав. В нем доминировали не бактерии, а археи, составлявшие более 70 % всех микроорганизмов. Почти 90 % обнаруженных архей относились к различным линиям, не имеющим культивируемых представителей. Источник 1884 характеризовался высоким содержанием архей порядка *Fervidicoccales*. Около трети (30 %) обнаруженных последовательностей принадлежали бактериям. Доминирующими были типы *Proteobacteria* (род *Acidithiobacillus*) и *Verrucomicrobia*. Преобладание данных групп микроорганизмов обеспечивает первичную продукцию органических веществ в отсутствие фотосинтеза за счет использования субстратов вулканического происхождения, к которым относятся метан, водород и восстановленные соединения серы. Представители рода *Acidithiobacillus* окисляют неорганические со-

единения серы и/или металлы. *Verrucomicrobia* используют в качестве источника углерода метан. Другие группы микроорганизмов, обнаруженные в сообществе, являются органотрофами (*Fervidicoccales*, *Geobacillus*, *Actinobacteria*), или же их функциональная роль не может быть предсказана, исходя из таксономической принадлежности (некультивируемые линии бактерий и архей). Поэтому можно предположить, что в сообществе присутствуют неизвестные группы термофильных литоавтотрофов либо это сообщество зависит от притока органических веществ извне, с дождевыми водами, поступающими из окружающих более холодных районов и/или от углеводов из глубинных слоев с геотермальным потоком.

Источник Бурлящий, расположенный рядом с основным нефтяным полем кальдеры Узон, также был подробно изучен. В высокотемпературном Бурлящем доминируют всего две группы хемолитоавтотрофных микроорганизмов: *Aquificales* среди бактерий (69 %) и *Thermoproteales* среди архей (91 %), причем последняя группа представлена почти исключительно родом *Pyrobaculum*, который отсутствовал в менее горячей точке 1884. Различия в значениях температуры и рН источников обуславливают разнообразие процессов первичной продукции и деструкции органических веществ.

Так как 1884 и Бурлящий относятся к высокотемпературным источникам и располагаются в местах выноса углеводов на поверхность почвы, можно предположить, что микроорганизмы, составляющие данные сообщества, имеют ферментные системы, позволяющие утилизировать компоненты нефти, такие как высокомолекулярные n-алканы, циклоалканы, полициклические ароматические углеводороды, терпены, пристан, фитан и другие трудноутилизуемые соединения, и/или выживать в местообитаниях с их высокой концентрацией. Подобные микроорганизмы имеют способность осуществлять ряд биохимических превращений углеводов нефти, который не был известен ранее. В работе Слуцкой с соавт. (2012) показано, что метагеномные исследования Камчатки позволяют находить новые группы не культивированных ранее микроорганизмов с уникальными биохимическими свойствами. Из проб, взятых в источниках с очень низкими

значениями рН и высокими температурами, выделяются перспективные для биотехнологии штаммы, утилизирующие компоненты нефти при экстремальных условиях культивирования. Знания о естественных сообществах микроорганизмов, полученных в результате метагеномного анализа, позволяют более эффективно составлять консорциумы микроорганизмов для препаратов биоремедиации и биотехнологий нефтепереработки (Слущкая и др., 2012).

ЭКОЛОГО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Выделение и характеристика нефтеструктур Камчатки

В 2010–2012 гг. в ИЦиГ СО РАН проводились экспедиционные работы в кальдере вулкана Узон с целью поиска и изучения природных микробных сообществ экстремальных экосистем. В период исследований было изучено более 100 различных биотопов, в том числе из района нефтепроявлений (рис. 4).

В результате исследований были отобраны образцы воды, почвы и микробных сообществ, из которых выделены в коллекцию микроорганизмов ИЦиГ СО РАН более 300 чистых и накопительных культур экстремофилов, из них – более 30 штаммов-нефтеструктур. Штаммы микроорганизмов-нефтеструктур

ров изначально выделялись на средах с оригинальной камчатской нефтью, затем, ввиду недостаточного количества данного субстрата, были переведены на другие источники углеводов.

В качестве минеральной среды использовали среду Ворошиловой – Диановой, следующего состава г/л: NH_4NO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, KH_2PO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,2, CaCl_2 – 0,02, FeCl_3 – две капли концентрированного раствора, вода дистиллированная – 1000 мл, агар 15 г. Культивирование проводили в условиях термостата при 37 °С в течение 1–21 суток. В качестве источников углеводов использовали сырую нефть Западно-Сибирского месторождения, дизельное топливо, вазелиновое масло, скипидар. В качестве полноценной питательной среды для поддержания коллекции микроорганизмов использовали мясопептонный агар и мясопептонный бульон.

Из более чем 30 штаммов нефтеструктур было выделено 16 штаммов, активно растущих на сырой нефти, и 23 штамма, более активно растущих на дизельном топливе. Фенотипическую характеристику штаммов проводили на основании результатов биохимических тестов и микроскопирования. Размеры клеток и их подвижность были определены при помощи микроскопов фирмы Carl Zeiss. Филогенетическую характеристику проводили на основании анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, результаты секвенирования сравнивали



Рис. 4. Район нефтепроявлений (место отбора проб), кальдера вулкана Узон: слева нефтяное поле, справа источник Ящерца.

с последовательностями базы данных BLAST и на основании этого строили филогенетические деревья методом минимальной эволюции.

Для изучения способности штаммов к использованию углеводов мясопептонный агар или среду Ворошиловой – Диановой разливали в чашки Петри. После застывания среды на поверхность наносили 50 мкл нефти либо другого источника углеводов (дизельное топливо и др.), затем в центр чашки высевали культуру. Штаммы культивировали в течение 24 ч при температуре 37 °С. После окончания культивирования измеряли диаметр зоны просветления. Диаметр зоны просветления свидетельствует о количестве углеводов, использованных исследуемым штаммом в процессе метаболизма.

Для определения способности к росту при различных значениях рН готовили среду Ворошиловой – Диановой. После застывания среды на поверхность наносили 50 мкл нефти, в центр чашки высевали культуру. Культивировали в течение 48 ч при температуре 37 °С. Отсутствие/наличие роста оценивали визуально. Для определения способности к росту микроорганизмов на субстрате с низкими значениями рН (2 и 4) в среду добавляли H_2SO_4 до необходимого значения рН (2 или 4), добавляли 3 % нефти и культивировали 48 ч при 37 °С.

Определение способности роста на различных субстратах проводили на агаризованной среде Ворошиловой – Диановой. После застывания среды на ее поверхность наносили 50 мкл источника углеводорода (нефть, вазелиновое масло, дизельное топливо, керосин), культуру высевали штрихом. Штаммы культивировали от 7 до 21 суток при температуре 37 °С. После культивирования способность к росту на различных субстратах оценивали визуально.

Изучение ростовых характеристик штаммов на различных субстратах проводили на планшетном спектрофотометре ×Mark BioRad по оптической плотности, с интервалом в 1 ч в течение 16 ч, при длине волны 590 нм. Штаммы культивировали при температуре 37 °С на среде Ворошиловой – Диановой с добавлением дизельного топлива или вазелинового масла.

Изучение свойств естественного комплекса нефтеокисляющих микроорганизмов кальдеры Узон

Для 11 штаммов была установлена таксономическая принадлежность (рис. 5). Выявлено, что большинство штаммов, деградирующих нефть, принадлежит к роду *Bacillus*, семейству Bacillaceae, классу Bacilli, типу Firmicutes.

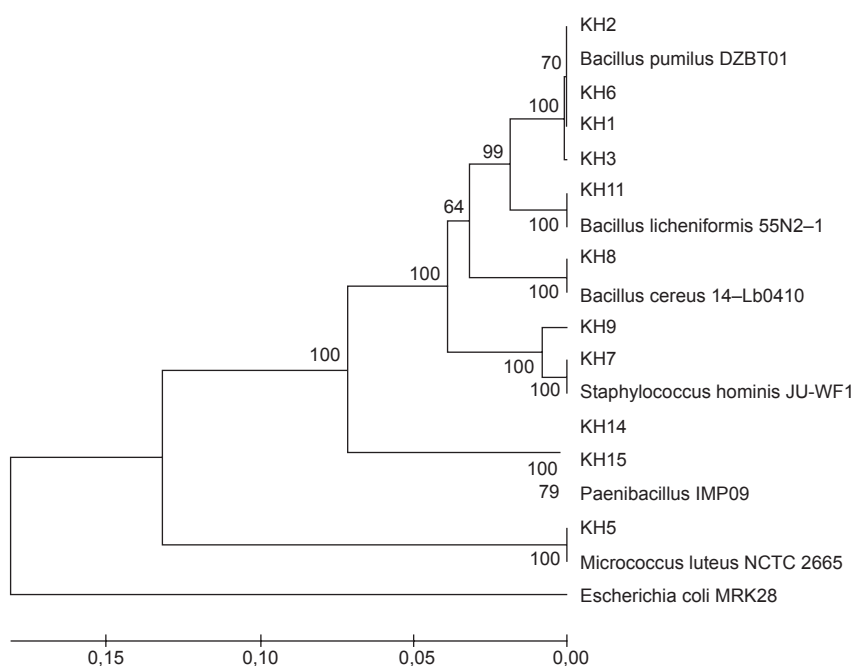


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена 16S рРНК.

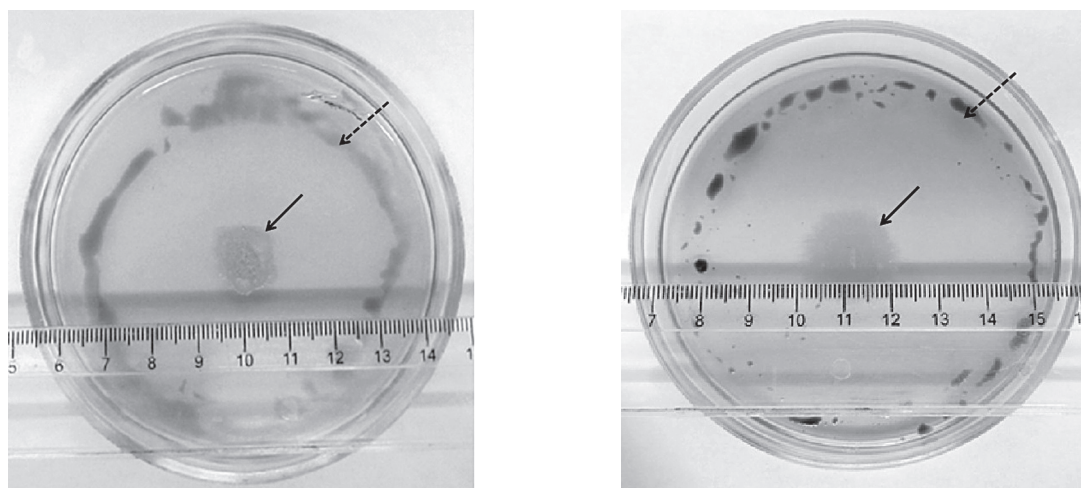


Рис. 6. Рост различных штаммов микроорганизмов (слева – КН2, справа – КН3) на сырой нефти. Сплошными стрелками показаны колонии. Штриховыми стрелками обозначена граница зоны просветления.

Была изучена способность микроорганизмов к окислению углеводов при различных значениях температуры и pH среды. Также были проведены эксперименты по использованию микроорганизмами таких источников углерода, как нефть, дизельное топливо, вазелиновое масло, скипидар, глюкоза (рис. 6).

Наибольшие диаметры зоны просветления при различных pH наблюдали у штаммов КН2, КН3, КН6, КН10. У штаммов КН1, КН5, КН9, КН11, КН12 в данном эксперименте наблюдали меньшие диаметры зоны просветления. Штаммы КН2, КН3, КН9, КН11, КН13, КН14 имели наибольшие диаметры зоны просветления в эксперименте при культивировании микроорганизмов при различных значениях температур. В результате проведенных экспериментов установлены штаммы, обладающие способностью к интенсивной деградации нефти при высоких и низких значениях температуры культивирования и при высоких и низких значениях pH.

В ряде экспериментов была определена способность исследуемых штаммов к использованию различных источников углерода. Установлено, что пять штаммов при температуре 37 °С росли на минеральной среде Ворошиловой – Диановой с вазелиновым маслом, дизельным топливом, нефтью и глюкозой. Штаммы КН1-КН7, КН9, КН11, КН15, КН16 обладали способностью к использованию скипидара в качестве единственного источника углерода. При определении скорости роста штаммов на

минеральной среде с добавлением вазелинового масла было определено, что наибольшей скоростью роста обладали штаммы КН1, КН2, КН3, КН5, КН6, КН9, КН12, КН13. Наибольшей скоростью роста на минеральной среде с добавлением дизельного топлива обладали штаммы КН1, КН5, КН7, КН9. На среде с дизельным топливом рост штаммов был слабее, чем на среде с вазелиновым маслом, потому что вазелиновое масло состоит из легкоутилизируемых парафинов, а дизельное топливо относится к более тяжелой фракции. На графиках приведены кривые роста для штаммов КН1 и КН9, выращенных на двух различных источниках углерода (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время наиболее изучены процессы биологического окисления алканов и ароматических соединений, так как эти вещества могут использоваться микроорганизмами в качестве единственного источника углерода и энергии и имеют структуру, доступную для широкого спектра ферментов микроорганизмов. Наименее изучены пути деградации полициклических ароматических углеводов, разветвленных алканов и других веществ, имеющих более сложную химическую структуру. Установлено, что в процессах деградации нефти и ее соединений участвуют различные группы микроорганизмов. В настоящее время в научной

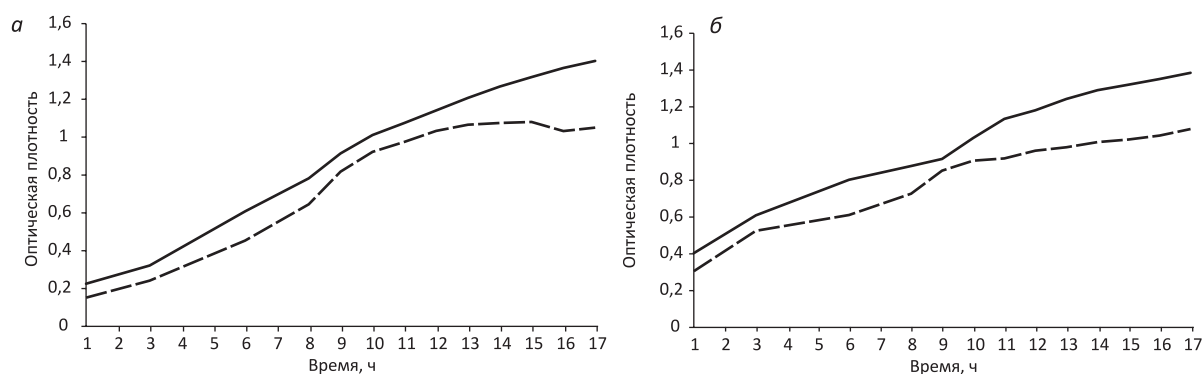


Рис. 7. Кривые роста микроорганизмов на среде Ворошиловой – Диановой с добавлением вазелинового масла (сплошная линия) и дизельного топлива (штриховая): *а* – штамм КН1, *б* – КН9.

литературе имеются значительные массивы данных о микроорганизмах Камчатки в целом и районов нефтепроявлений в частности. Исследованы эколого-функциональные свойства микроорганизмов-термофилов из термальных источников Долины гейзеров и кальдеры Узон. Показано, что богатое разнообразие термопроявлений в кальдере Узон определяет высокое разнообразие прокариот, обитающих в этих источниках. В процессе изучения естественного комплекса нефтеокисляющих микроорганизмов районов нефтепроявлений установлено, что ряд микроорганизмов обладают способностью к синтезу органического вещества за счет использования различных субстратов, например соединений серы и металлов, метана. Большинство же микроорганизмов данных систем являются органотрофами, использующими в своем метаболизме широкий спектр соединений.

Исследования микроорганизмов, выделенных из районов нефтепроявлений Камчатки, расширяют знания о процессах окисления углеводов, позволяют проводить поиск новых путей окисления, а также возможности деградации трудноутилизуемых компонентов нефти, увеличивают объем информации о нефтедеструкторах в целом и нефтедеструкторах Камчатки в частности. В настоящей работе охарактеризованы штаммы, выделенные из районов нефтепроявлений кальдеры Узон и эффективно разлагающие нефтепродукты. Выявлены некоторые эколого-функциональные аспекты биологического окисления углеводов исследуемыми микроорганизмами. Выделенные штаммы обладают способностью

к деградации углеводов при различных условиях культивирования, способностью к росту на различных углеводородсодержащих субстратах, способностью к росту в широком диапазоне температуры и рН, что позволяет предположить наличие у исследуемых микроорганизмов специфических ферментных систем, не изученных ранее. Исследование путей метаболизма этих штаммов является важной теоретической и прикладной задачей.

Комплексный подход к исследованиям углеводородокисляющих микробных сообществ, включающий в себя генетическую и метаболическую составляющие, важен для биотехнологии, поскольку дает более полную картину знаний об исследуемых экологических системах и процессах, а также позволяет находить наиболее эффективные пути утилизации нефтепродуктов из различных нефтяных месторождений. Проведенные исследования по изучению теоретических и практических аспектов проблемы биологического окисления углеводов микроорганизмами-нефтедеструкторами позволят перейти к решению важных биотехнологических и биоремедиационных задач, таких как производство промышленно-важных веществ для добычи и переработки нефти, очистка нефтезагрязненных почв и вод и др.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят доктора геолого-минералогических наук Г.А. Карпова и сотрудников Кроноцкого государственного природного биосферного заповедника за содействие в ор-

ганизации работ в кальдере Узон.

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционных проектов СО РАН № 92, 93, 94; бюджетного проекта VI.58.1.3.

ЛИТЕРАТУРА

- Александров А.Ю. Влияние состава среды и условий культивирования на рост углеводородокисляющих микроорганизмов: дис. ... канд. биол. наук. Волгоград, 2010.
- Андреева И.С., Емельянова Е. К., Загребельный С. Н. и др. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. 2006. № 1. С. 43.
- Балашова Н.В., Кошелева И.А., Филонов А.Е. и др. Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 – деструктор фенантрена и нафталина // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 488–493.
- Бескровный Н.С., Лебедев Б.А., Главатских С.Ф. Металлы и нефть в гидротермальных растворах кальдеры Узон // Современные минералообразующие растворы. Петропавловск-Камчатский, 1970. С. 21–22.
- Большаков Г.Ф., Бейко О.А. Химический состав нефтей Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1988. 285 с.
- Бонч-Осмоловская Е.А. Микробные сообщества глубинных подземных местобитаний Южной Африки и Западной Сибири: биологическое разнообразие и биотехнологический потенциал // Научно-исследовательский отчет по государственному контракту № 11.519.11.2029. М., 2013. 92 с.
- Борзенков И.А., Милехина Е.И., Готоева М.Т. и др. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири, Вьетнама // Микробиология. 2006. Т. 75. № 1. С. 82–89.
- Ветрова А.А. Биодegradация углеводородов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами: дис. ... канд. биол. наук. М., 2010.
- Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонова А.Е. и др. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводородов нефти // Известия ТулГУ. Естеств. науки. 2013. № 2-1. С. 241–257.
- Градова Н.Б., Горнова И.Б., Эддауди Р., Салина Р.Н. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв // Прикл. биохим. микробиол. 2003. Т. 39. № 3. С. 318–321.
- Гумеров В.М. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов термальных источников Камчатки: дис. ... канд. биол. наук. М., 2011.
- Емельянова Е.К. Микроорганизмы природных биоценозов для биоремедиации почв и водных объектов Сибири, загрязненных нефтепродуктами: дис. ... канд. биол. наук, Кольцово, 2009.
- Заварзин Г.А. Начальные этапы эволюции биосферы // Вестник Российской академии наук. 2010. Т. 80. № 12. С. 1085–1098.
- Карпов Г.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Заварзин Г.А., Лупкина Е.Г. К характеристике термофильных микроорганизмов кальдеры Узон (Восточная Камчатка) // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2008. № 280. С. 109–112.
- Карпов Г.А., Мороз Ю.Ф., Николаева А.Г. Геохимия гидротерм и глубинное строение кальдеры Узон // Труды Кроноцкого государственного природного биосферного заповедника. Воронеж, 2013. С. 163.
- Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Онегова Т.С. Активность каталазы и дегидрогеназы в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Агрохимия. 2002. № 8. С. 64–72.
- Кодина Л.А. Геохимическая диагностика нефтяного загрязнения почвы // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 112–122.
- Конторович А.Э., Бортникова С.Б., Карпов Г.А. и др. Кальдера вулкана Узон (Камчатка) – уникальная природная лаборатория современного нафтидогенеза // Геология и геофизика. 2011. Т. 52. № 8. С. 986–990.
- Коршунова И.О., Егорова Д.О. bph-Гены галотолерантных бактерий рода *Rhodococcus*, контролирующие первый этап окисления бифенила // Биология будущего: традиции и инновации. Екатеринбург, 2010. С. 98.
- Кошелева И.А., Балашова Н.В., Измалкова Т.Ю. и др. Дegradация фенантрена мутантными штаммами – деструкция нафталина // Микробиология. 2000. № 6. С. 783–789.
- Лобкова Л.Е., Лобков Е.Г. Роль биологических компонентов в экосистемах термальных полей Узона и Долины гейзеров и некоторые аспекты охраны термальных биоценозов. // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2003. С. 258–262.
- Логинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф. и др. Оценка эффективности нового биопрепарата «Ленойл» для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2004. № 1. С. 77–82.
- Лукин А.Е., Пиковский Ю.И. Новые данные об изотопном составе гидротермальной нефти (кальдера Узон на Камчатке) // Докл. АН. 2004. Т. 398. № 1. С. 90–93.
- Марданов А.В., Равин Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Скрябин К.Г. Определение и анализ новых геномов термофильных архей // Генетика микроорганизмов и биотехнология. 2008. Т. 20. С. 62.
- Марданов А.В., Равин Н.В. Роль геномики в исследовании разнообразия и эволюции архей // Биохимия. 2012. Т. 77. № 8. С. 965–980.
- Нечаева И.А. Биодegradация углеводородов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами: дис. ... канд. биол. наук, Пушкино, 2009.
- Нуртдинова Л.А. Исследование процессов ремедиации нефтезагрязненных природных объектов с использованием биопрепарата «Ленойл»: дис. ... канд. биол. наук, Уфа, 2005.
- Павликова Т.А. Дegradация нефти ассоциацией аэробных углеводородокисляющих микроорганизмов в различных типах почв: дис. ... канд. биол. наук. М., 2004.

- Сафиева Р.З. Физикохимия нефти: физико-химические основы технологии переработки нефти: дис. ... д-ра тех. наук, М., 1998.
- Слуцкая Э.С., Безсуднова Е.Ю., Марданов А.В. и др. Характеристика новой M42 аминопептидазы из кренархеи *Desulfurococcus kamchatkensis* // Доклады Академии наук. 2012. Т. 442. С. 551–554.
- Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 1995. Т. 31. № 5. С. 534 – 539.
- Суржко Л.Ф. Очистка природных и сточных вод от нефтезагрязнений иммобилизованными углеводород-окисляющими микроорганизмами: дис. ... канд. тех. наук. СПб., 1999.
- Суржко Л.Ф., Финельштейн З.И. Баскунов Б.П. и др. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Микробиология. 1995. Т. 64. № 3. С. 393–398.
- Таранова Л.В., Жданова Е.Б. Влияние бактерий и дрожжей на биохимическое окисление нефти. // Нефть и газ Западной Сибири: Тез. докл. междунар. научн.-техн. конф. Тюмень, 1996. Т. 2. С. 126.
- Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. Т. 7. № 1.
- Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К. и др. Разработка и испытания биосорбента «Экосорб» на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 6. С. 666–671.
- Baryshnikova L.M., Grishchenkov V.G., Arinbasarov M.U. et al. Biodegradation of oil products by individual degrading strains and their associations in liquid media // Applied Biochemistry Microbiology. 2001. V. 37. No. 5. P. 463–468.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Kochetkova T.V., Rusanov I.I. et al. Anaerobic transformation of carbon monoxide by microbial communities of Kamchatka hot springs // Extremophiles. 2011. V. 15. No. 3. P. 319–325.
- Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Biodegradation. 1992. V. 3. P. 351–368.
- Connors M.A., Barnsley E.A. Naphthalene plasmid in *Pseudomonas* // J. Bacteriol. 1982. V. 149. P. 1096.
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. P. 224–229.
- Dockyu K., Young-Soo K., Seong-Ki K. et al. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK1 // Applied environmental Microbiology. 2002. No. 7. P. 3270–3278.
- Dutta T. K., Harayama S. Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. No. 4. P. 1970–1974.
- Feist C.F., Hegeman G.D. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida* of tangential pathways // J. Bacteriology. 1969. V. 100. P. 869–877.
- Hamme J., Ward O. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 69. P. 4874–4879.
- Hanson K.G., Nigam A., Kapadia M., Desai A.J. Bioremediation of crude oil contamination using *Acinetobacter* sp. A3 // Curr. Microbiol. 1997. V. 35. No. 3. P. 191–193.
- Kublanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B. et al. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon caldera, Kamchatka (Russia) // App. Env. Microbiology. 2009. V. 75. No. 1. P. 286–291.
- Marchai R., Penet S., Solano-Screna F., Vandecasteele J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation // Oil Gas Science Technology. 2003. V. 58. No. 4. P. 441–448.
- Mardanov A.V., Ravin N.V., Svetlichnyi V.A. et al. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a Siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 4580–4588.
- Margesin R., Labbé D., Schinner F. et al. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 3085–3092.
- Perevalova A.A., Svetlichny V.A., Kublanov I.V. et al. *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, and emended description of the genus *Desulfurococcus* // International journal systematic evolutionary microbiology. 2005. V. 55. No. 3. P. 995–999.
- Rahman K.S., Rahman T., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I.M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils // J. Basic Microbiol. 2002. V. 42. No. 4. P. 284–291.
- Slepova T.V., Sokolova T.G., Lysenko A.M. et al. *Carboxydocella sporoproducens* sp. nov., a novel anaerobic CO-utilizing/H₂-producing thermophilic bacterium from a Kamchatka hot spring // Inter. J. Systematic Evolutionary Microbiology. 2006. V. 56. No. 4. P. 797–800.
- Varfolomeev S.D., Karpov G.A., Synal H.-A. et al. The youngest natural oil on earth // Doklady Chemistry. MAIK Nauka/Interperiodica. 2011. V. 438. No. 1. P. 144–147.

**THEORETICAL AND PRACTICAL ISSUES OF BIOLOGICAL
OXIDATION OF HYDROCARBONS BY MICROORGANISMS**

A.V. Bryanskaya, Yu.E. Uvarova, N.M. Slynko, E.A. Demidov, A.S. Rozanov, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: alla@bionet.nsc.ru

Summary

The paper deals with the theoretical issues of biological oxidation of oil hydrocarbons from alkanes to polycyclic aromatics. We analyze the mechanisms of biochemical processes of decomposition of oil components and provide an overview of data from common databases. Studies of microbial communities of natural oil seeps in the Uzon caldera are described in detail. It is the first study of ecophysiological characteristics of oil-degrading microorganisms isolated from thermal oil seeps of the caldera.

Key words: biological oxidation, oil, hydrocarbons, microorganisms of the Uzon caldera.