

УДК 579.222.2:543.553

А.А. ВЕТРОВА, А.А. ОВЧИННИКОВА, А.Е. ФИЛОНОВ,  
И.Ф. ПУНТУС, А.М. БОРОНИН

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино  
Пущинский государственный университет

## ДЕСТРУКЦИЯ НЕФТИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*, СОДЕРЖАЩИМИ РАЗЛИЧНЫЕ ПЛАЗМИДЫ БИОДЕГРАДАЦИИ\*

**Аннотация.** Исследованы микроорганизмы, содержащие следующие плазмиды биodeградации — pWWO (толуола), CAM (камфоры) и pBS1141, pBS216, pOV17 (нафталина). Присутствие плазмиды в клетках микроорганизмов приводит к увеличению степени деструкции нефти по сравнению с бесплазмидными штаммами. Наибольший вклад в деструкцию нефти вносят бактерии, содержащие нафталиновые плазмиды. Максимальную степень деструкции демонстрировал штамм *P. chlororaphis* PCL1391 с плазмидой pBS216.

**Введение.** Существующие способы разработки месторождений нефти не дают возможность извлекать из пластов более 50% нефтяных запасов. В большинстве случаев, подобная проблема возникает с увеличением вязкости нефти в процессе нефтеизвлечения [1]. На первых этапах нефтедобычи используются различные химические и физико-химические методы воздействия на нефтяные пласты с целью повышения нефтеотдачи. На следующем этапе применяются микробиологические методы повышения эффективности нефтедобычи, которые привлекают внимание высокой эффективностью, широким разнообразием, экологической безопасностью, относительно невысокими затратами [2].

---

\*Работа поддерживалась Российским фондом фундаментальных исследований в рамках проекта РФФИ-08-04-99019-р\_офи, Международным научно-техническим центром (проект МНТЦ 2366), грантом Министерства образования и науки; гос. контрактом Тема РНП 2.1.1.7789; РНП 2.1.19290; CRDF RUB2-010001-PU-05.

Еще в начале XX в. была показана способность микроорганизмов к окислению нефтей или их отдельных компонентов [3, 4]. Бекманом [5] было высказано предположение о возможности использования бактерий для разрушения тяжелых фракций нефти, остающихся в нефтематеринской породе. Смолы и асфальтены, входящие в состав тяжелой фракции, относятся к высокомолекулярным углеводородным соединениям нефти. В составе нефти они играют важную роль, определяя во многом ее физические свойства и химическую активность. По данным Петрова А.А. [6] асфальтены являются наименее подверженной бактериальному окислению частью нефти. Биodeградация асфальтенов сопровождается в основном окислением длинных парафиновых цепей [6]. Возможно, что ферменты, расщепляющие циклические соединения способны трансформировать каркас асфальтенов, состоящий из фрагментов гетероциклических и алициклических углеводов.

Известно, что гены, кодирующие ферменты, расщепляющие циклические углеводороды (такие как толуол, камфора, салицилат, нафталин), находятся в составе бактериальных плазмид. Так, плазида pWWO кодирует ферменты полного пути окисления толуола. Гены катаболизма толуола организованы в 2 оперона: верхний оперон, кодирующий ферменты расщепления толуола и ксилолов до бензоатов и толуатов, и нижний оперон, кодирующий ферменты деградации бензоатов и толуатов до интермедиатов цикла трикарбоновых кислот [7]. Архитипичная плазида биodeградации нафталина NAH7 кодируют ферменты полного пути минерализации нафталина [8]. Ключевой фермент пути окисления камфоры (кислородосодержащее гетероатомное соединение) – камфора-5-монооксигеназа локализован на SAM плазмиде. Известно, что нафталин-1,2-диоксигеназа катализирует 76 химических реакций, в то время как толуол монооксигеназа способствует расщеплению толуола и ксилолов (4 реакции), а камфора-5-монооксигеназа окисляет помимо камфоры, еще 3 гомологичных ей субстрата [9].

Конъюгативные плазмиды биodeградации способны к горизонтальному переносу между бактериальными популяциями, что расширяет их деградативный потенциал и способствует адаптации микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей среды [10]. Поскольку псевдомонады являются хорошими реципиентами плазмид биodeградации [11], представляется перспективным совмещение в определенных штаммах *Pseudomonas* способностей к биodeградации различных углеводов. Ранее было продемонстрировано, что присутствие катаболических плазмид в штаммах-деструкторах, в том числе ризосферных, увеличивает прирост биомассы и степень деструкции нефти [12].

Целью данной работы являлось изучение степени деструкции нефти и изменения доли ее спирто-бензольной фракции в результате биодеградации бесплазмидными и плазмидосодержащими бактериями рода *Pseudomonas*.

## Методика

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали 9 микроорганизмов рода *Pseudomonas* из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН г. Пущино. В работе использовались 3 плазмиды биодеградации нафталина рBS1141, рBS216 и рOV17, плазмиды биодеградации камфоры САМ и плазмиды биодеградации толуола рWWO.

**Сокращения:** способность к росту: Nah<sup>+</sup> — на нафталине, Tol<sup>+</sup> — толуоле, Gnt<sup>+</sup> — гентизиновой кислоте, Phn<sup>+</sup> — фенантрене, Cam<sup>+</sup> — камфаре, Sal<sup>+</sup> — салицилате, Dsf<sup>+</sup> — дизельном топливе, Nph<sup>+</sup> — нефти, Hde<sup>+</sup> — гексадекане.

**Питательные среды и условия культивирования.** В качестве минеральной среды использовали среду Эванса [13], полноценной — агаризованная среда Лурия-Бертани (ЛБ) [14].

Агаризованные среды с диспергированной нефтью готовили, как было описано ранее [12].

Способность использовать нефть в качестве источника углерода и энергии изучали в колбах Эрленмейера со 100 мл минимальной среды Эванса с добавлением нефти до конечной концентрации 1,5 % весовых. Для этого штаммы выращивали сначала на агаризованной среде Эванса с добавлением нафталина в качестве источника углерода и энергии для плазмидосодержащих штаммов и с добавлением сукцината для бесплазмидного микроорганизма. Затем производили высев штаммов на чашки Петри с использованием дизельного топлива в качестве ростового субстрата. Инокулирование колб с нефтью проводили суспензией микроорганизмов (1 мл на 100 мл среды, посевная доза  $1-5 \times 10^6$  кл/мл). После засева колбы помещали на круговую качалку (120 об/мин) и инкубировали микроорганизмы в течение 7 суток при 24 °С.

Через 7 суток роста отбирали пробы выращенных культур 0,5 мл и проводили серийные десятикратные разведения. Затем полученные суспензии высевали в трех повторах на чашки Петри с богатой питательной средой Лурия – Бертани для точного определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ), характеризующего прирост биомассы.

**Определение степени деструкции нефти.** Деградацию нефти исследуемыми штаммами оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде, определяемому весовым методом (гравиметрия) [15].

Таблица 1

## Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм	Плазида	Характеристика штамма	Источник получения
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391		Продуцент феназин-1-карбоксамида Phn <sup>-</sup> Nah <sup>-</sup> Sal <sup>-</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Ризосферный штамм, Б. Люхтенберг, Нидерланды
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	pBS216, IncP-9δ	Продуцент феназин-1-карбоксамида Phn <sup>+</sup> Nah <sup>+</sup> Sal <sup>+</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Коллекция лаборатории биологии плазмид
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	pOV17, IncP-9δ	Продуцент феназин-1-карбоксамида Phn <sup>+</sup> Nah <sup>+</sup> Sal <sup>+</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Коллекция лаборатории биологии плазмид
<i>P. putida</i> BS3701	pBS1141, IncP-9β pBS1142	Sal <sup>+</sup> Nah <sup>+</sup> Gnt <sup>+</sup> Phn <sup>+</sup> Tol <sup>+</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Коллекция лаборатории биологии плазмид
<i>P. putida</i> BS3701E	pBS1142	Sal <sup>+</sup> Nah <sup>-</sup> Gnt <sup>-</sup> Phn <sup>-</sup> Tol <sup>-</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Настоящая работа
<i>P. putida</i> BS237	CAM	Cam <sup>+</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Коллекция лаборатории биологии плазмид
<i>P. putida</i> BS237E		Cam <sup>-</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Настоящая работа
<i>P. putida</i> mt-2E		Tol <sup>-</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Настоящая работа
<i>P. putida</i> mt-2	pWWO, IncP-9	Tol <sup>+</sup> Nph <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Коллекция лаборатории биологии плазмид

Определение фракционного состава нефти. Оценку фракционного состава остаточной нефти проводили с помощью жидкостно-адсорбционной хроматографии [15].

## Результаты и их обсуждение

В данной работе были исследованы микроорганизмы, содержащие следующие плазмиды биodeградации - pWWO (толуола), CAM (камфоры) и pBS1141, pBS216, pOV17 (нафталина). Следует отметить, что перечисленные выше плазмиды биodeградации нафталина структурно аналогичны известной плазмиде pDTG1 [16], и относятся к группе несовместимости P-9 [17]. Плазмида биodeградации толуола pWWO также относится к P-9 группе несовместимости, в то время как плазмида биodeградации камфоры относится к группе несовместимости P-2.

Бесплазмидные штаммы BS237E и mt-2E были получены в результате спонтанной элиминации плазмид CAM и pWWO при длительном культивировании в жидкой среде ЛБ. Штамм BS3701E является элиминантом, содержащем только криптоическую плазмиду pBS1142, не несущую генов биodeградации.

Для сравнительного изучения влияния различных плазмид в клетках бактерий на степень деструкции нефти исследуемые штаммы выращивали на минеральной среде, содержащей нефть в качестве единственного источника углерода в течение 7 суток при 24 °C. Дeградацию нефти оценивали по суммарному показателю её убыли в жидкой среде, определяемому гравиметрическим методом. Данные, представленные на рис. 1 показывают, что присутствие плазмиды в клетках микроорганизмов приводило к увеличению степени деструкции нефти по сравнению с бесплазмидными штаммами. Как видно из полученных результатов (рис.1) наибольший вклад в деструкцию нефти вносят бактерии, содержащие нафталиновые плазмиды. Из всех исследуемых бактерий максимальную степень деструкции (48%) демонстрировал штамм *P. chlororaphis* PCL1391 с плазмидой pBS216. Известно, что первый фермент деградации нафталина - нафталин-1,2-диоксигеназа обладает широкой субстратной специфичностью. Этот фермент катализирует 76 реакций, представляющих 5 основных групп (реакции диоксигенирования, монооксигенирования, дегидратации, O- и N- деалкилирования и сульфокисления).

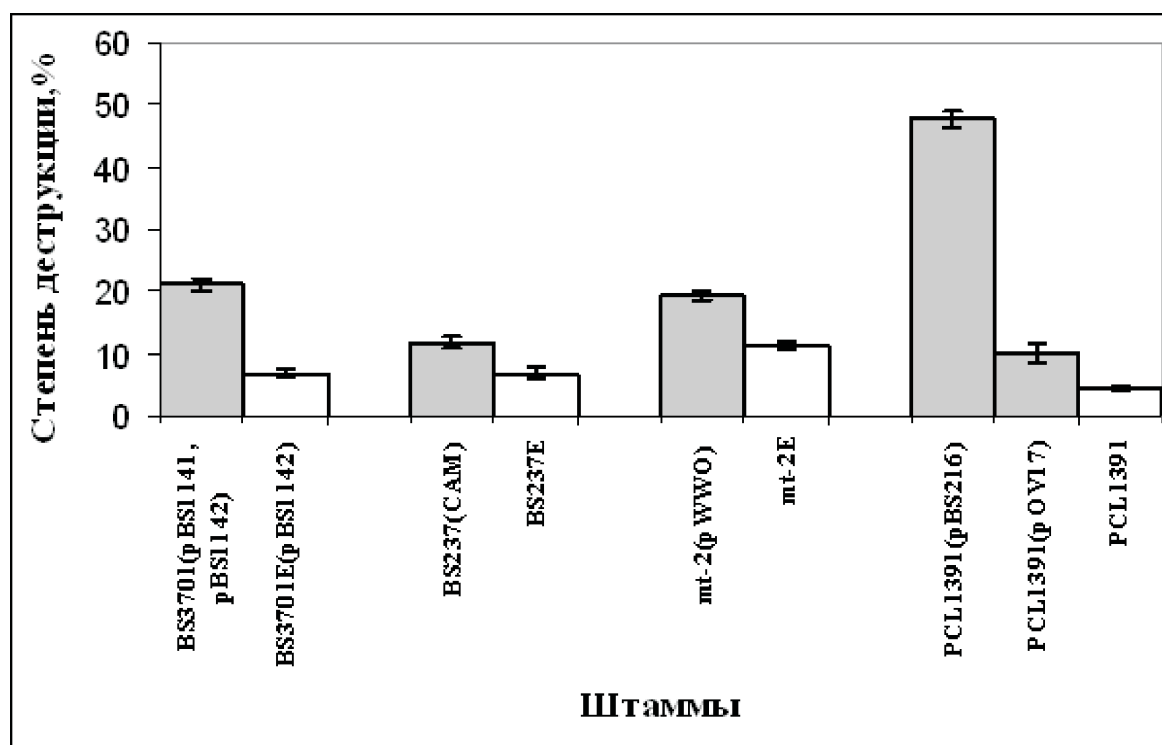


Рис.1. Степень деструкции нефти штаммами рода *Pseudomonas* через 7 суток роста при 24 °С.

Для изучения степени микробной трансформации тяжелой фракции нефти определяли убыль ее спирто-бензольной фракции методом жидкостно-адсорбционной хроматографии. Данный аналитический метод применяется для группового разделения углеводородов на алкано - циклоалкановую и ареновую части, а также для разделения аренов по степени цикличности. Изменение процентного содержания каждой фракции отражает не абсолютную величину, а изменение доли фракций в остаточном содержании нефти относительно контроля. Как видно из данных рис.2, большая убыль спирто-бензольной фракции нефти наблюдается в случае плазмидосодержащих штаммов по сравнению с бесплазмидными бактериями. Максимальная убыль спирто-бензольной фракции 26 % наблюдалась для штамма PCL1391 с плазмидой pBS216, в то время как убыль этой фракции для бесплазмидного штамма PCL1391 составляла 9 %, что демонстрирует эффект наличия данной катаболической плазмиды. Наибольший вклад в убыль спирто-бензольной фракции нефти (8 – 17 %) вносят плазмиды биodeградации нафталина. Несмотря на то, что исследуемые плазмиды биodeградации нафталина были структурно аналогичными, вклад, вносимый в деградацию спирто-бензольной фракции, был различным. Это возможно обусловлено различиями в экспрессии плазмидных генов.

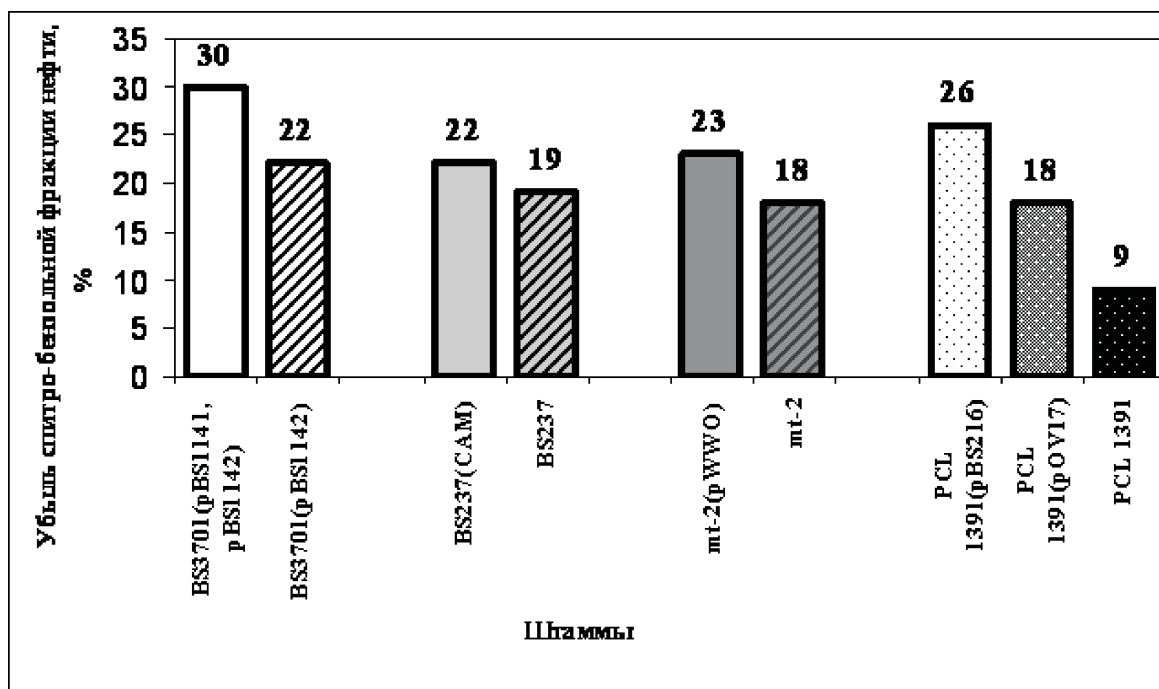


Рис.2. Убыль спирто-бензольной фракции нефти после ее разложения штаммами-деструкторами относительно содержания в контроле через 7 суток роста при 24 °С

Таким образом, бактерии рода *Pseudomonas*, содержащие нафталиновые плазмиды, наиболее эффективно трансформируют тяжелую фракцию нефти, что может приводить к снижению вязкости и увеличению нефтеизвлечения на микробиологическом этапе разработки нефтяных месторождений. Поскольку исследуемые плазмиды являются конъюгативными, это создает предпосылку для расширения деградационного потенциала природных микроорганизмов, участвующих в процессе нефтедобычи, за счет переноса каталитических генов, локализованных на плазмидах.

Авторы выражают благодарность сотруднику Центра инструментальных методов анализа ИБФМ РАН А.М. Одиноквой за проведение гравиметрического анализа и жидкостно-адсорбционной хроматографии.

### Библиографический список

1. Беляев С.С. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения / С.С. Беляев [и др.] // Микробиология. –2004. –Т. 73. –№ 5.
2. Розанова Е.П. Микробиологические методы повышения нефтеотдачи пластов / Е.П.Розанова [и др.]. – М.: ВНИИОЭНГ, 1987
3. Таусон В.О. К вопросу об усвоении парафина микроорганизмами/ В.О. Таусон // Журнал русского ботанического общества. –1925. –Т. 9. –С. 161-179.
4. Таусон В.О. Бактериальное окисление сырых нефтей/ В.О. Таусон // Нефтяное хозяйство. –1928. –Т. 14. –№ 2. –С. 220-230.
5. Beckman J.W. Action of bacteria on mineral oil / J.W.Beckman // Industr. Engineer. Chem. –1926. –V. 4. –№ 21. –Р. 3-7.

6. Петров А.А. Углеводороды нефти/ А.А.Петров. –М.: Наука, 1984.
7. Worsey M.J. Metabolism of toluene and xylenes by *P. putida* (arvilla)mt-2; evidence for a new function of the TOL plasmid/ M. J. Worsey, P. A.Williams // J. Bacteriol. –1975. – V. 124. –P. 7-13.
8. Tsuda M. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon / M. Tsuda, T. Iino // Mol. Gen. Genet. –1990. –V. 223. –P. 33-39.
9. <http://umbbd.msi.umn.edu/>
10. Кочетков В.В. Плазмиды биодegradации нафталина у бактерий рода *Pseudomonas* /В.В. Кочетков // Дис. канд. биол. наук. – Пушино, 1985.
11. Hill K.E. Gene transfer in soil systems using microcosms/ К.Е.Хилл, Е.М.Топ // FEMS Microbiol. Ecol. –1998. –V. 25. –P. 319-329.
12. Ветрова А.А. Влияние катаболических плазмид на физиологические параметры бактерий рода *Pseudomonas* и эффективность биодеструкции нефти/ А.А.Ветрова [и др.] // Микробиология. –2007. –Т. 76. –№ 3. –С. 310-316.
13. Evans C. The continuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a Chemostat. / C. Evans, D. Herbert, D. Tempest // Methods in Microbiology. –1970. –V. 2. –№ 4. –P. 277-327.
14. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual/ J. Sambrook, H. Fernley, T. Maniatis.- New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
15. Барышникова Л.М. Биодegradация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде/ Л.М. Барышникова [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. –2001. –Т. 37. –№ 5. –С. 542-548.
16. Dennis J. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4/ J. Dennis, G. Zylstra // J. Mol. Biology. –2004. –V. 341. –№ 3. –P. 753-768.
17. Боронин А.М. Биология плазмид / А.М.Боронин // Успехи микробиологии. –1983. –Вып. 18. –С.143-163.

Поступило 20.06.2008