

УДК 640

**МЕТАНОГЕННАЯ КОНСОРЦИЯ НА ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ: КОМПОНЕНТЫ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА И ИХ ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ***Е.М. Семенова, Д.С. Груздев, Т.П. Турова, Т.Н. Назина**Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия*

Разработка нефтяных месторождений, содержащих легкую кондиционную нефть, приводит к биодеградации нефти и снижению ее качества [Head et al., 2003, 2014; Jones et al., 2008]. Нефть является основным источником органического вещества для микроорганизмов нефтяных пластов. Процесс микробной трансформации нефти может протекать как аэробно, так и анаэробно. В нефтяных месторождениях, эксплуатирующихся с применением заводнения, аэробное окисление нефти протекает наиболее интенсивно в призабойной зоне нагнетательных скважин, куда с нагнетаемой водой поступает растворенный кислород [Magot et al., 2000; Nazina et al., 2017]. Ряд аэробных микроорганизмов – деструкторов углеводородов нефти применяется в микробных биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения и очистки от нефтяных загрязнений. Скорость процесса анаэробной трансформации нефти существенно ниже аэробной, однако анаэробный процесс протекает в пласте постоянно и не зависит от поступления кислорода. Возможными акцепторами электронов для микроорганизмов в пластах могут быть углекислота, сульфат и другие окисленные соединения серы, гидроксиды железа [Magot et al., 2000]. Нитрат и иные оксиды азота отсутствуют в пластовых водах. Целью настоящего исследования было получение метаногенного сообщества, анаэробного деградирующего нефть, изучение его разнообразия, метаболического потенциала и возможной экофизиологической функции в процессе биотрансформации нефти в пласте.

В работе исследовали микробное сообщество Черемуховского нефтяного месторождения (г. Нурлат, Россия). Нефтяные горизонты расположены на глубине 890–920 м, и имеют температуру около 20 °С. Плотность добываемой нефти составляет 0.932 г./см<sup>3</sup> при 25 °С, что позволяет отнести ее к группе тяжелой нефти. Месторождение разрабатывается с использованием нагнетания отделенной от нефти попутно добываемой воды, смешанной с поверхностной пресной водой. В июне 2016 г. проба нагнетаемой воды была отобрана на устье скважины 5600. Отобранная вода имела соленость 0.621 г./л, рН 7.9 и величину окислительно-восстановительного потенциала Eh –28.9 мВ.

Пластовую воду использовали для посева на минеральную среду, не содержащую акцепторов электронов, со стерильной тяжелой нефтью этого месторождения. Культивирование проводили анаэробно (аргон в качестве газовой фазы), в темноте, в стационарных условиях при комнатной температуре. Через 210 и 270 сут. культивирования в газовой фазе было зарегистрировано образование 15000 ppm и 17500 ppm метана, соответственно. Образование метана было исследовано в динамике (рис. 1). На начальных этапах культивирования было зарегистрировано образование молекулярного водорода, который в дальнейшем использовался метаногенами. Основным газообразным продуктом биодеградации нефти был метан, который образовывался со скоростью 12.4 микромоль/сут.

Через 270 сут. культивирования был определен состав метаногенной консорции НО-5600 методом высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК. Состав сообщества не был разнообразным (табл. 1). Домен *Archaea* был представлен водород-использующими метаногенами рода *Methanobacterium* (1 % от выявленных последовательностей). Среди *Bacteria* преобладали представители родов *Sedimentibacter* (49 %) и *Actinotalea* (26 %).

Представители рода *Sedimentibacter* – анаэробные грамположительные бактерии, растущие на аминокислотах и пирувате и не использующие углеводы. Как правило, для роста требуется присутствие дрожжевого экстракта в среде. Некоторые бактерии рода *Sedimentibacter* способны использовать фенол, катехол и бензоат, являющийся центральным промежуточным соединением при разрушении ароматических соединений [Breitenstein et al., 2002; Imachi et al., 2016]. Представители этого рода были выявлены в нефтяных пластах, в накопительных культурах, разрушающих углеводороды [Kleinstueber et al., 2012; Fowler et al., 2016], и в метаногенных накопительных культурах из морских осадков [Imachi et al., 2016]. Вероятно, в исследованной нами накопительной культуре бактерии рода *Sedimentibacter* осуществляли функцию синтрофных бактерий.

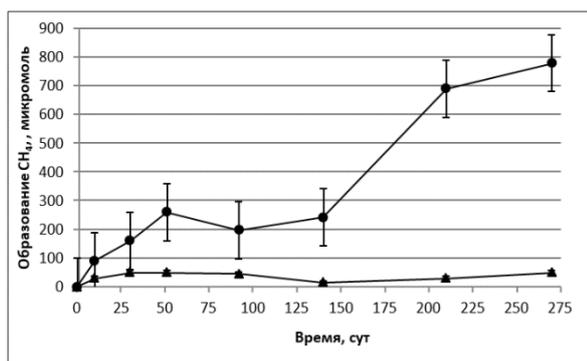


Рис. 1. Образование метана в среде с тяжелой нефтью накопительной культурой HO-5600 в динамике. ● – Накопительная культура HO-5600, ▲ – Контроль, стерильная среда.

Таблица 1. Состав метаногенной консорции HO-5600 после 270 сут. культивирования, определенный методом высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК

Домен	Род	% от общего числа последовательностей
Archaea	<i>Methanobacterium</i>	1.0
Bacteria	<i>Sedimentibacter</i>	49.1
	<i>Actinotalea</i>	26.8
	<i>Nocardioides</i>	8.3
	Unclassified	6.8
	<i>Coriobacteriaceae</i>	6.8
	<i>Acidovorax</i>	2.8
	<i>Paeniclostridium</i>	2.2
	Other	3.0

Бактерии рода *Actinotalea* являются факультативно анаэробными мезофильными органотрофными микроорганизмами. Минорные компоненты сообщества принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Tepidimonas*, *Paeniclostridium*, *Rhodoferrax* и *Pusillimonas*, часто встречающимся в подземных экосистемах. Метаногенный и бродильный компоненты микробного сообщества были выделены в чистую культуру и исследованы.

Метаногенная архея, штамм HO-Met1, была выделена из культуры HO-5600 методом последовательных пересевов в среде с водород-углекислотной смесью. Ген 16S рРНК штамма HO-Met1 имел 100 % сходства с соответствующим геном *Methanobacterium aarhusense*, что позволило отнести штамм к этому виду. Ген 16S рРНК штамма HO-Ch2 имел 98.8 % сходства с геном 16S рРНК бактерии *Actinotalea ferrariae*, и вероятно, принадлежит к новому виду этого рода. Для уточнения таксономического положения штамма HO-Ch2 был секвенирован его геном.

Геном штамма *Actinotalea* sp. HO-Ch2 содержал 4,027,363 п.н. Большинство выявленных генов отвечали за метаболизм углеводов (415 генов), синтез аминокислот и их производных (288), метаболизм белков (224) и образование кофакторов, витаминов и пигментов (198) (рис. 2). Выявлены гены, ответственные за образование биопленок, анаэробное дыхание, устойчивость к тяжелым металлам и кислороду.

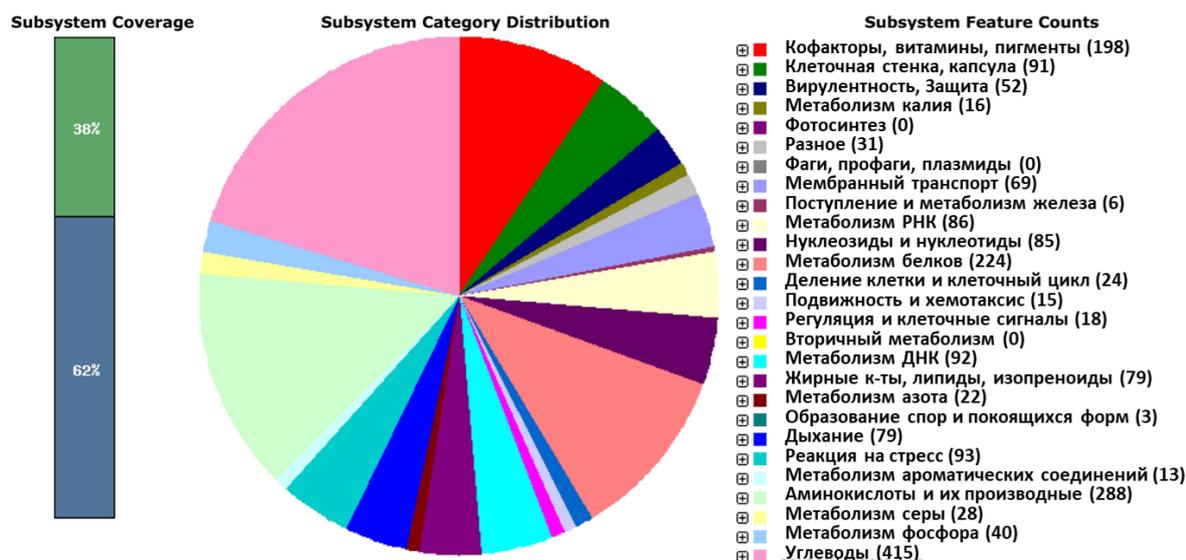


Рис. 2. Характеристика генома штамма *Actinotalea* sp HO-Ch2 согласно базе данных SEED

Вероятно, факультативные анаэробные бактерии рода *Actinotalea* могут использовать ароматические соединения и микробную биомассу с образованием низкомолекулярных соединений, используемых, в свою очередь, метаногенными археями рода *Methanobacterium* с образованием метана.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что аэробные и факультативно-анаэробные бактерии могут входить в состав сообществ, анаэробно деградирующих нефть, включающих также бродильные и метаногенные прокариоты, и быть метаболически активными в анаэробной зоне нефтяных пластов.

**Секвенирование и анализ генома были выполнены при поддержке Российского Научного Фонда (грант 16-14-00028). Физиологические и таксономические исследования штаммов были проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.**

#### ЛИТЕРАТУРА

- Breitenstein A., Wiegel J., Haertig C., Weiss N., Andreesen J.R., Lechner U. Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. No. 3. P. 801–807.
- Fowler S.J., Toth C.R., Gieg L.M. Community structure in methanogenic enrichments provides insight into syntrophic interactions in hydrocarbon-impacted environments. *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. Article. 562.
- Head I.M., Jones D.M., Larter S.R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature.* – 2003. – V. 426. No. 6964. P. 344–352.
- Head I.M., Gray N.D., Larter S.R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management. *Front. Microbiol.* – 2014. – V. 5. Article 566.
- Imachi H., Sakai S., Kubota T., Miyazaki M., Saito Y., Takai K. *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – V. 66. No. 3. P. 1293–1300.
- Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature.* – 2008. – V. 451. No. 7175. P. 176–180.
- Kleinsteuber S., Schleinitz K.M., Vogt C. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – V. 94. No. 4. P. 851–873.
- Magot M., Ollivier B., Patel B.K. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2000. – V. 77. No. 2. P. 103–116.
- Nazina T.N., Shestakova N.M., Semenova E.M., Korshunova A.V., Kostrukova N.K., Tourova T.P., Min L., Feng Q., Poltarau A.B. Diversity of metabolically active *Bacteria* in water-flooded high-temperature heavy oil reservoir. *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. Article 707.