

УДК 579.26:579.68:550.72

ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ГЛУБОКИХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД ПУЧЕЖ-КАТУНКСКОЙ ИМПАКТНОЙ СТРУКТУРЫ

Г.В. Кондакова¹, Н.В. Верховцева², С.А. Остроумов

(лаборатория физикохимии биомембран; e-mail: gykondakova@mail.ru)

Установлено присутствие жизнеспособных углеводородоокисляющих микроорганизмов в подземных водах, вскрытых Воротиловской глубокой скважиной (Пучеж-Катункская астроблема, 75 км севернее г. Н. Новгород, глубины 1900 и 3200 м) с использованием метода хромато-масс-спектрометрического анализа специфических биомаркеров клеточных стенок микроорганизмов и классических бактериологических методов. Несколько видов микроорганизмов были выделены в чистой культуре и идентифицированы. Два вида бацилл *Bacillus pumilus* КТБ-2 и *Bacillus subtilis* КТБ-4 сохранялись в чистых культурах при пересевах. Изучено влияние минерализации среды и степень ее аэрации на ростовые характеристики штамма *Bacillus pumilus* КТБ-2 в периодической культуре.

Ключевые слова: глубинные подземные воды, углеводородоокисляющие бактерии, *Bacillus pumilus*, кинетические параметры роста бактерий.

Проблема загрязнения окружающей среды углеводородами нефти весьма актуальна в настоящее время. Одно из первых звеньев сложной цепи процессов, приводящих к разрушению углеводородов нефти в природных экосистемах, — воздействие углеводородоокисляющих микроорганизмов. Для поверхностных экосистем показано широкое распространение данной группы микроорганизмов, активно разрабатываются методы биоремедиации загрязненных территорий с использованием аборигенных или специально отселектированных штаммов или бактериальных сообществ, а также микробиологических препаратов на их основе. Исследования углеводородоокисляющих микроорганизмов подземной среды проводятся в основном в зонах залегания нефтеносных пластов и имеют значение для повышения нефтеотдачи пластов. Среди подземных вод изучаются главным образом пластовые воды нефтяных месторождений с низкой или умеренной минерализацией (до 40 г/л) [1, 2]. В связи с вышесказанным интересным представляется обнаружение углеводородоокисляющих микроорганизмов в таких специфических по экологическим факторам биотопах, как высокоминерализованные подземные воды. Подобные исследования в перспективе открывают возможности получения новых углеводородоокисляющих штаммов-деструкторов для биоремедиации территорий с комплексным загрязнением, поскольку очень часто при разработке нефтяных месторождений происходит не только загрязнение территорий углеводородами, но и их засоление.

В задачи исследования входило обнаружение углеводородоокисляющих микроорганизмов в высокоминерализованных подземных водах, выделение чистых культур, способных использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии, и изучение их свойств.

Объекты и методы

Объектом исследования служили подземные воды, вскрытые Воротиловской глубокой научной скважиной — ВГС (Пучеж-Катункская астроблема, 75 км севернее г. Н. Новгород, достигнутая глубина бурения 5374 м). Воды бромного хлоридно-кальциевого состава с общей минерализацией до 160—190 г/л, азотного класса с гелием и водородом. Растворенное органическое вещество представлено газообразными и жидкими н-алканами, а также ароматическими углеводородами, которые имеют как естественное, так и техногенное происхождение — сформировались в результате контаминации вод добавками нефти и торфогуматными компонентами бурового раствора [3]. В процессе бурения ВГС произошло заполнение проницаемых пластов фильтратом бурового раствора, что оказало определенное влияние не только на химический состав вод, но и, как было показано нами ранее, существенно отразилось на функциональном разнообразии и составе микробных сообществ подземных вод [4]. В данной работе изучали воды из зон максимального водопритока — глубины 1900 и 3200 м, поскольку микробный ценоз здесь, по результатам

¹ Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, 150057, г. Ярославль.

² Факультет почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Таблица 1

Основные физико-химические параметры подземных вод ВГС

Глубина, м	t°, С	рН	Минерализация, г/л	Основной ионный состав, г/л*						Σ УВГ, об. %	РОВ, мг/л
				Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ + K ⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻		
1900	32	7,8	129	42,57	0,06	4,21	0,17	80,99	1,22	0,07	11,4
		8,0	188	61,32	0,12	6,86	0,11	118,79	0,78	0,03	—
3200	60	7,8	115	36,89	0,10	5,01	0,22	72,20	1,39	0,04	9,7
		6,7	187	59,32	0,12	8,67	0,10	117,97	0,90	0,03	—

Примечание. *Числитель — уровень 1995 г, знаменатель — уровень 2000 г; — — нет данных; УВГ — углеводородные газы; РОВ — растворенное органическое вещество.

предыдущих исследований, был наиболее близок к аборигенному [5]. Отбор проб воды и их физико-химическое изучение проводило Федеральное государственное унитарное предприятие “Научно-производственный центр по сверхглубокому бурению и комплексному изучению недр Земли” — ФГУП НПЦ “Недра”, г. Ярославль (табл. 1).

Реконструирование состава и структуры микробного сообщества вод, а также идентификацию культур проводили по специфическим химическим маркерам (жирным кислотам, альдегидам и оксикислотам) методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ-МС) с использованием хромато-масс-спектрометра AT5973 D фирмы “Agilent Technologies” (США) в соответствии с методикой [6, 7]. Анализ липидных маркеров проводил докт. биол. наук Г.А. Осипов (г. Москва). Учет различных групп бактерий осуществляли методами классической бактериологии путем посева проб воды на селективные питательные среды, которые готовили на основе подземной воды с соответствующей глубины. Использовали два варианта сред: В-1 — уровень минерализации 2000 г., В-2 — уровень минерализации 1995 г. (примерно в 1,5 раза ниже). Культивирование вели при температурах, близких к глубинным (табл. 1). Как уже было показано нами ранее, сочетание температурного фактора с большей или меньшей минерализацией питательных сред позволяет отсеять аллохтонные бактерии и выделить аборигенные [8]. Количественный учет углеводородоксилирующих бактерий (УОБ) проводили методом десятикратных разведений в жидкой среде Раймонда с добавлением нефти или гексадекана в качестве источника углерода и энергии, а также на среде К для бактерий, использующих газообразные (пропан:бутан) углеводороды. Изучение физиолого-биохимических свойств проводили на стандартных дифференциально-диагностических средах [9, 10]. При изучении влияния минерализации на рост чистых культур использовали жидкую среду К, приготовленную на дистиллированной воде, в которую добавляли хлорид кальция (табл. 1) в концентрации от 5 до 200 г/л. Культивирование вели в периодическом режиме при интенсивной аэрации (на качалке) и в микроаэробных условиях (без перемешивания среды, которой заполняли 1/3 объема колб). О росте

физиологической активности культуры судили по изменению оптической плотности культуральной жидкости, которую регистрировали на КФК-56 при 610 нм в кювете 0,5 см. На основании полученных кривых периодического роста рассчитывали удельную скорость роста [11].

Результаты и обсуждение

Реконструирование состава микробных ценозов проб вод на основе проведенной методом ГХ-МС хе-модиагностики показало, что в составе исследованных вод присутствуют микроорганизмы, способные использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии (УОБ). Это представители родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, а также актинобактерии родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и дрожжи. В целом доля УОБ в составе микробценозов составила 20 и 23% на глубинах 1900 и 3200 м соответственно, из них более 17% представлены актинобактериями. Среди последних следует выделить род *Rhodococcus*, на долю которого приходилось 43—51%. Представители этого рода, по данным многих авторов, характеризуются высоким уровнем адаптации к экстремальным условиям существования и использованию в качестве источников углерода и энергии как высших газообразных гомологов метана, так и жидких n-алканов [12, 13]. В результате посевов

Таблица 2

Численность микроорганизмов, способных использовать углеводороды, кл/мл

Глубина, м	T, °C	Вариант посева*	Среда для УОБ, содержащая в качестве источника углерода и энергии:		
			нефть	гексадекан	пропан:бутан
1900	32	В-1	10 ²	10 ¹	+
		В-2	10 ¹	10 ¹	+
3200	60	В-1	10 ³	10 ⁰	0
		В-2	10 ²	10 ¹	0

Примечание. *В-1 — уровень минерализации 2000 г; В-2 — уровень минерализации 1995 г.

проб вод на питательные среды на всех исследованных глубинах были обнаружены жизнеспособные УОБ (табл. 2).

Среди них преобладали микроорганизмы, использовавшие жидкие углеводороды, газотрофные УОБ были обнаружены только на глубине 1900 м в незначительном количестве. Численность термофильных УОБ была на один—два порядка выше по сравнению с мезофильными, причем максимальное их количество (до 1000 кл/мл) отмечено на высокоминерализованной среде (В-1). Это указывает на то, что данная группа является аборигенной в составе микробиоценоза подземных вод.

При выделении обнаруженных УОБ в чистые культуры была изолирована ассоциация углеводородокисляющих микроорганизмов с глубины 1900 м, способных использовать газообразные алканы (пропан:бутан) в качестве единственного источника углерода и энергии. Полученный изолят в ходе последу-

ющих пересевов был разделен на несколько штаммов (ГМВ-1, КТБ-2, КТБ-4, КБ-1). Три из них по хе-модиагностике и по ряду морфологических и биохимических признаков были отнесены: 1) ГМВ-1 — к базидиомицетным дрожжам *Rhodotorula rubra* ($k = 0,604$), 2) КТБ-2 — к виду *Bacillus pumilus* ($k = 0,579$), 3) КТБ-4 — к виду *Bacillus subtilis* ($k = 0,412$). Штамм КБ-1 по совокупности морфологических и биохимических признаков был отнесен к роду *Rhodococcus*. Результаты по видовой идентификации культур согласуются с данными ГХ-МС-анализа микробного сообщества подземных вод с данной глубины, который также показал присутствие в них маркеров бацилл, родококков и микроскопических грибов. В процессе изучения свойств чистых культур было установлено, что штаммы *Rhodococcus* sp. КБ-1 и *Rhodotorula rubra* ГМВ-1 вне ассоциации обладали низкой жизнеспособностью и в чистых культурах постепенно теряли способность к росту и пересеву.

Таблица 3

Некоторые физиолого-биохимические свойства выделенных культур

Тест	Штамм			
	<i>Bacillus pumilus</i> КТБ-2	<i>Bacillus subtilis</i> КТБ-4	<i>Rhodococcus</i> sp. КБ-1	<i>Rhodotorula rubra</i> ГМВ-1
Потребление:				
Глюкозы	+	+	+	+
Сахарозы	+	+	—	+
Мальтозы	+	+	+	+
Лактозы	+	+	—	529
Маннитола	+	+	+	—
Пропан:бутана	+	+	+	+
Гексадекана	+	+	+	+
Нефти	+	+	+	+
Гидролиз:				
Желатина	+	+	н/о	—
Мочевины	+	+	—	+
Казеина	—	—	н/о	н/о
Крахмала	—	+	—	н/о
Образование крахмала	н/о	н/о	н/о	—
Рост на МПА	+	+	+	н/о
Сбраживание сахарозы до кислоты	+	—	н/о	—
Реакция Вогес—Проскауэра	+	+	н/о	н/о
Отношение к O ₂	ФА	ОА	ОА	А
Восстановление нитратов	+	+	н/о	н/о
Наличие каталазы	+	+	н/о	н/о
Образование псевдомицелия	н/о	н/о	н/о	+
T, °C:	20—37	20—37	28	20—60

Примечание. ФА — факультативный анаэроб; ОА — облигатный аэроб; А — аэрофил; н/о — не определяли; T, °C — температура.

Видимо, *in situ* между ними существуют тесные синтрофные взаимоотношения, чего невозможно достичь в лабораторных условиях при раздельном культивировании. Штаммы *Bacillus pumilus* КТБ-2 и *Bacillus subtilis* КТБ-4 оказались жизнеспособными и сохранялись в чистых культурах. В целом по результатам выделения чистых культур можно сказать, что обнаружение некультивируемых в лабораторных условиях штаммов свидетельствует об уникальности микробных сообществ подземных вод.

У выделенных культур были изучены необходимые для идентификации физиолого-биохимические свойства (табл. 3). Следует отметить, что все штаммы могли использовать как газообразные, так и жидкие углеводороды, а также другие источники углерода и энергии (белки, сахара, спирты).

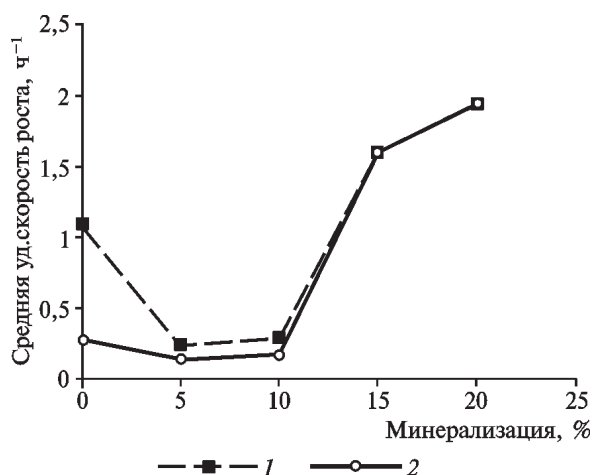
С учетом перспектив использования выделенных штаммов в целях биоремедиации необходимо выяснить их способность активно функционировать в условиях высокой минерализации среды, которая может создаваться при комплексном загрязнении территорий, а также в присутствии кислорода, так как для окисления углеводов требуется аэрация среды.

Способность к росту в условиях высокой минерализации исследовали у факультативно анаэробного штамма *Bacillus pumilus* КТБ-2 в периодической культуре. Установлено, что на неминерализованной питательной среде (без добавления хлорида кальция) скорость роста культуры в условиях аэрации была в 4 раза выше, чем без аэрации (рисунок). При увеличении минерализации до 50 и 100 г/л удельная скорость роста культуры снижалась по сравнению с неминерализованной средой примерно в 5 раз в условиях аэрации и в 2 раза в микроаэробных условиях. При высокой степени аэрации среды культура также росла интенсивнее, скорость роста была примерно в 1,5 раза выше. С последующим увеличением минерализации до 150 и 200 г/л удельная скорость роста возрастала как при аэрации, так и без нее, достигнув

наибольшего значения $1,95 \text{ ч}^{-1}$ при минерализации 200 г/л. Однако максимальные значения оптической плотности культуры, которая пропорциональна количеству клеток, а также продолжительность ее роста при такой высокой минерализации были в 2 и более раз ниже, чем в низко- и неминерализованных средах. Кроме того, происходило измельчение клеток и изменение их морфологии. Это указывает на неблагоприятные условия для роста культуры в условиях высокой минерализации. Таким образом, можно заключить, что штамм *Bacillus pumilus* КТБ-2 является галотолерантным, наиболее благоприятный диапазон роста — до 10% солей, присутствие кислорода стимулирует рост клеток. Вероятнее всего, в условиях природного биотопа при минерализации вод до 188 г/л и недостатке кислорода бактерии находятся в неактивном состоянии.

Полученные данные согласуются с существующими представлениями о том, что реальная скорость метаболизма микроорганизмов в глубоких горизонтах чрезвычайно низка [14], функционирование микробиоты направлено скорее на сохранение и поддержание, чем на рост микробной популяции. На это указывают и результаты ГХ-МС-анализа микробного сообщества изученных подземных вод, по данным которого значительную часть подземного микробиоценоза составляют спорообразующие виды [5]. Это может свидетельствовать о том, что существенная доля гетеротрофных микроорганизмов находится в подземной высокоминерализованной среде с лимитированным содержанием кислорода в состоянии переживания неблагоприятных условий, составляя так называемый микробный пул. Однако, как показали исследования особенностей роста штамма *Bacillus pumilus* КТБ-2, они способны активизироваться при изменении экологической обстановки (снижение минерализации, повышение парциального давления кислорода), что подтверждает мнение о значительных потенциальных метаболических возможностях бактерий из глубоко залегающих экстремальных местобитаний [15].

Таким образом, с помощью современных молекулярных и традиционных микробиологических методов исследования удалось не только установить присутствие жизнеспособных УОБ в подземных водах ВГС с глубин 1900 и 3200 м, но и выделить и идентифицировать ряд чистых культур, способных расти на лабораторных питательных средах. Это позволяет изучать ростовые характеристики выделенных штаммов УОБ при варьировании условий выращивания (минерализация, аэрация и т.п.), приближая их к условиям природной среды. Учитывая возможность использования выделенных штаммов для очистки нефтезагрязненных территорий в условиях засоления, экспериментальные исследования в дальнейшем должны быть направлены на изучение способности полученных культур к окислению углеводов при различной минерализации среды.



Изменение средней удельной скорости роста штамма *Bacillus pumilus* КТБ-2 в зависимости от минерализации и аэрации среды:
1 — с аэрацией, 2 — без аэрации

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Григорьян А.А., Сюэ Я.Ф., Беляев С.С., Иванов М.В. Образование нефтевытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин (КНР) // Микробиология. 2003. Т. 72. № 2. С. 206—211.
2. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Ивойлов В.С., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В. Микробиологические исследования пластовой воды Ромашкинского нефтяного месторождения в процессе испытания биотехнологии повышения нефтеотдачи // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 214—221.
3. Воронцов А.К., Рабинович Ю.И. Химический состав и газы подземных вод центрального поднятия Пучеж-Катунской астроблемы по результатам бурения Воротиловской скважины // Разведка и охрана недр. 1996. № 7. С. 19—23.
4. Кондакова Г.В., Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Бактериальные процессы циклов углерода и азота в глубинных водах литосферы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2002. № 4. С. 26—33.
5. Кондакова Г.В., Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Изучение микробного разнообразия подземных вод при мониторинге глубоких горизонтов земной коры // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2007. № 2. С. 23—29.
6. Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов. Патент РФ № 2086642. С12N 1/00, 1/20, С12Q 1/4. Приоритет от 24 дек. 1993.
7. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии — масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза // Проблемы агрохимии и экологии. 2008. № 1. С. 51—54.
8. Верховцева Н.В., Кондакова Г.В. Микробиологические исследования пород и подземных вод // Сверхглубокое бурение Пучеж-Катунской импактной структуры. СПб: ВСЕГЕИ, 1999. С. 176—186.
9. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 286 с.
10. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
11. Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов. М.: Наука, 1991. 300 с.
12. Ившина И.Б. Алканотрофные родококки: биоразнообразие, детекция и видовая дифференциация // Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, экологические проблемы: Мат-лы Междунар. конф., Пермь. 8—11 окт. 1996. Ин-т экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. Пермь, 1996. С. 37.
13. Balkwill D.L., Boone D.R. Identify and diversity of microorganisms cultured from subsurface environments. The microbiology of the terrestrial deep subsurface. New York: Lewis publishers, 1997. P. 105—117.
14. Оборин А.А., Рубинштейн Л.М., Хмурчик В.Т., Чурилова Н.С. Концепция организованности подземной биосферы. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 148 с.
15. Phels T.J., Murphy E.M., Pfiffner S.M., White D.C. Comparison between geochemical and biological estimates of subsurface microbial activities // Microb. Ecol. 1994. Vol. 28. P. 335—349.

Поступила в редакцию
03.10.11

STUDIES OF THE HYDROCARBON-OXIDIZING MICROORGANISMS IN DEEP UNDERGROUND WATERS OF THE PUCHEZH-KATUNKI IMPACT STRUCTURE

G.V. Kondakova, N.V. Verkhovtseva, S.A. Ostroumov

The presence of viable hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the underground waters opened with the Vorotilovskaya deep well (Puchezh-Katunki astroblem, at the distance of 75 km from Nizhny Novgorod, at the depth of 1900 and 3200 m) with the use of a method of the chromat-mass spectrometer analysis of the cellular wall specific biomarkers of microorganisms and classical bacteriological methods is established. Some species of microorganisms have been isolated in pure culture and identified. Two species of bacilli *Bacillus pumilus* KTB-2 and *Bacillus subtilis* KTB-4 remained in pure cultures at reinoculation. Influence of the medium mineralization and the degree of its aeration on the growth characteristics of *Bacillus pumilus* KTB-2 in the periodic culture is studied.

Key words: deep underground waters, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, *Bacillus pumilus*, high mineralization of medium, kinetic parameters of growth of microorganisms.

Сведения об авторах

Кондакова Галина Вячеславовна — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии факультета биологии и экологии Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова. Тел.: (0852) 44-29-28; e-mail: gvkondakova@mail.ru

Верховцева Надежда Владимировна — докт. биол. наук, проф. кафедры агрохимии и биохимии растений факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-43-27; e-mail: verh48@list.ru

Остроумов Сергей Андреевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории физикохимии биомембран биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-22-60; e-mail: ar55@yandex.ru