

УДК 579.22:579.66:547.912

ОБРАЗОВАНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ ИЗ БИОМАССЫ ПРОКАРИОТ СООБЩЕНИЕ 2. ОБРАЗОВАНИЕ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ- БИОМАРКЕРОВ ИЗ БИОМАССЫ БАКТЕРИЙ *GEOBACILLUS JURASSICUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕФТИ

© 2018 г. Г. Н. Гордадзе^{1, *}, А. Р. Пошибаева¹, М. В. Гируц¹, А. А. Гаянова¹,
Е. М. Семенова², В. Н. Кошелев¹

¹Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет)
имени И.М. Губкина, Москва, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

*E-mail: gordadze@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.04.2018 г.

Показано участие бактерии *Geobacillus jurassicus* DS1^T, выделенной из нефтяного месторождения Даган (КНР), в образовании углеводородов (УВ) этой нефти. Методами капиллярной газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии (ХМС) в растворимой части и продуктах термолитиза нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *Geobacillus jurassicus* идентифицированы насыщенные УВ-биомаркеры (*n*-алканы, изопренаны, стераны и терпаны), распределение которых соответствует слабопреобразованному органическому веществу (ОВ) морского генезиса и близко к исходной нефти. Во всех образцах, в том числе и в исходной нефти, обнаружен сквален.

Ключевые слова: происхождение нефти, углеводороды-биомаркеры, прокариоты, бактерии *Geobacillus jurassicus*.

DOI: 10.1134/S0028242118060035

Настоящая работа является продолжением исследований в области моделирования процессов образования нефти из биомассы прокариот [1–5]. В первом сообщении были изучены археи *Thermoplasma* sp., выделенные из источника Нефтяная площадка кальдеры вулкана Узон (Камчатка, Россия) [6]. В растворимой части и продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы архей были идентифицированы насыщенные УВ-биомаркеры (*n*-алканы, изопренаны, стераны и терпаны). Распределение вышеуказанных УВ напоминает слабопреобразованные морские нефти, генерированные в глинисто-карбонатных толщах. Пиролиз Rock-Eval биомассы исследуемых архей подтвердил выводы, основанные на биомаркерных показателях, – максимальная температура пиролиза биомассы архей *Thermoplasma* sp. $T_{\max} = 412^{\circ}\text{C}$ и водородный индекс $\text{IH} = 454 \text{ мг УВ/г } C_{\text{орг}}$ – свидетельствуют о слабой степени преобразованности ОВ морского генезиса [7].

Ранее нами было показано на примере бактерий *Arthrobacter* sp. RV и *Pseudomonas saeruginosa* RM, что как в растворимой части, так и в продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы, образуются нефтяные УВ-биомаркеры. Причем, низкомолекулярные УВ представлены преимущественно *n*-алканами с нечетным числом ато-

мов углерода в молекуле состава $C_7, C_9, C_{11}, C_{13}, C_{15}, C_{17}, C_{19}, C_{21}$; одновременно среди высокомолекулярных *n*-алканов, преобладают *n*-алканы с четным числом атомов углерода в молекуле состава $C_{22}, C_{24}, C_{30}, C_{32}$. Из обоих штаммов бактерий генерируется непредельный нерегулярный изопренен – сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексен), гидрированный аналог которого – сквалан (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракозан) находится в некоторых нефтях морского генезиса. Было установлено, что в отличие от растворимой части, где образуются только *n*-алканы, в продуктах термолитиза нерастворимой части образуются все те же насыщенные УВ-биомаркеры, которые находятся в нефтях, а именно – *n*-алканы, изопренаны, стераны и терпаны [1, 2].

В связи с этим, интересно было выяснить, образуются ли нефтяные УВ-биомаркеры из бактерий, выделенных из конкретного нефтяного месторождения, т.е. участвовали ли эти бактерии в образовании углеводородов этой нефти.

Настоящее (второе) сообщение посвящено бактериям, выделенным из нефтяного месторождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования был выбран штамм *Geobacillus jurassicus* DS1^T, выделенный из нефтяного месторождения Даган (КНР) [8–10], а также сама нефть этого месторождения.

Для выделения и культивирования исследуемых бактерий использовали среду следующего состава (г л⁻¹): бакто-триптон – 5.0, дрожжевой экстракт – 2.5, глюкоза – 1.0. Для получения плотной среды вносили агар до конечной концентрации 20 г/л. Штамм DS1^T выращивали как на плотной среде, так и на жидкой, аэробно в стационарных условиях при 60°C и рН 7.0–7.2 в течение 3 сут. Полученную биомассу снимали с чашки стерильным шпателем или осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об./мин.

Биомассу исследуемых бактерий лиофилизировали при температуре 25°C, давлении 10×10^{-6} бар, в течение 24 ч.

Экстракцию лиофильной биомассы исследуемых бактерий проводили *n*-гексаном при комнатной температуре до полного исчезновения растворимой части, *n*-гексан предварительно отгоняли на ректификационной колонке.

Нерастворимую часть биомассы исследуемых бактерий подвергали термолизу при 330°C в запаянной ампуле.

Анализ УВ в растворимой части, продуктах термолиза нерастворимой части бактерий и в исходной нефти проводили методами капиллярной

газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Капиллярную газожидкостную хроматографию (ГЖХ) проводили на приборе Bruker 430-GC с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), программирование температуры от 80 до 320°C – со скоростью подъема 4°C/мин. Газ-носитель – водород. Разделение УВ осуществляли на капиллярных колонках HP-1 25 м × 0.25 мм × 0.5 мкм. Хромато-масс-спектрометрические исследования (ХМС) в режиме электронной ионизации проводили на приборе Agilent 6890N/5975C. Использовали режим SIM с записью следующих характеристических ионов: *m/z* 71 – для *n*-алканов и изопренанов, *m/z* 217 и 218 – для стеранов, *m/z* 191 и 177 – для терпанов. Программирование температуры от 70 до 290°C со скоростью подъема 4°C/мин. Разделение УВ проводили на капиллярных колонках с аналогичной неподвижной фазой HP-1MS 25 м × 0.25 мм × 0.5 мкм. Газ-носитель – гелий. Все спектры были сняты при энергии ионизации 70 эВ и ускоряющем напряжении 3500 В. Температура камеры ионизации составляла 250°C.

Идентификацию соединений осуществляли путем добавления к исследуемым образцам предполагаемых эталонных соединений, а также с помощью использования библиотеки масс-спектров NIST 2.0.

Ниже представлена схема исследования насыщенных УВ-биомаркеров (схема 1).

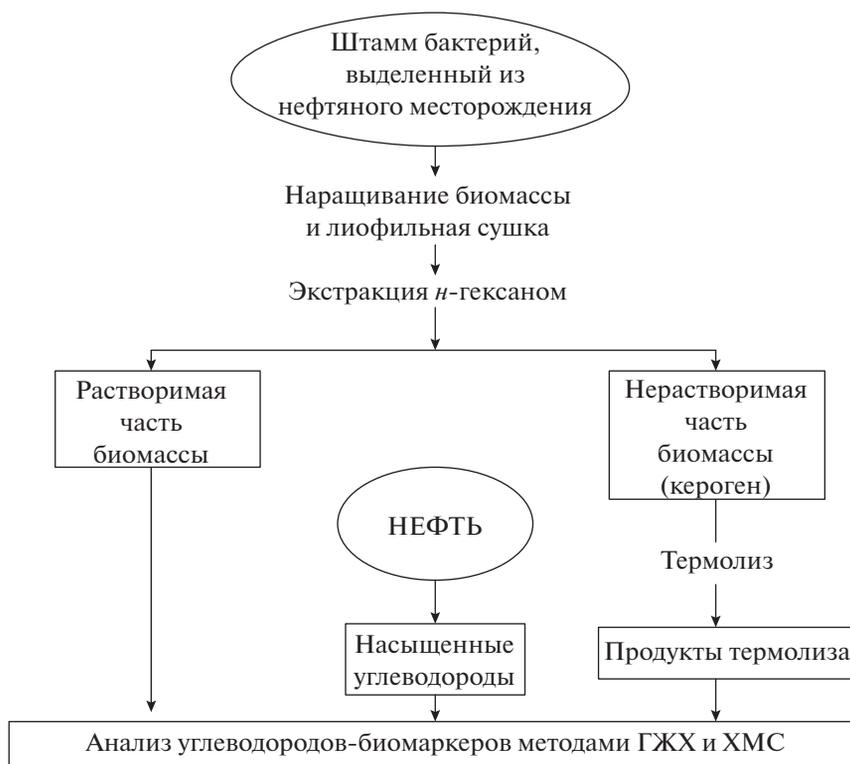


Схема 1. Схема исследования насыщенных УВ-биомаркеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

***n*-Алканы и изопренаны.** В растворимой части и продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus* образуются *n*-алканы состава C_{10} – C_{40} , но относительное содержание *n*-алканов значительно различается между собой. Так, в растворимой части биомассы исследуемых бактерий наблюдаются аномально высокие концентрации *n*-алканов с четным числом атомов углерода в молекуле состава C_{16} , C_{18} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , C_{30} , C_{32} , C_{34} , C_{36} , C_{38} над таковыми алканами с нечетным числом атомов углерода в молекуле состава C_{17} , C_{19} , C_{21} , C_{23} , C_{25} , C_{27} , C_{29} , C_{31} , C_{33} , C_{35} , C_{37} , C_{39} . Необходимо отметить, что такое распределение *n*-алканов не наблюдается ни в одной нефти мира. В продуктах термоллиза преобладают *n*-алканы с четным числом атомов углерода в молекуле состава C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20} , C_{22} , а в нефти, из которой были выделены исследованные бактерии наблюдается преобладание *n*-алканов с нечетным числом атомов углерода в молекуле состава C_{25} , C_{27} , C_{29} , C_{31} , C_{33} над четными C_{26} , C_{28} , C_{30} , C_{32} , C_{34} (рис. 1).

Вместе с тем, для нефтей характерно распределение регулярных изопренанов. Как и во всех нефтях мира, в растворимой части и продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus* обнаружены изопренаны состава C_{11} – C_{20} . Но в отличие от нефтей, присутствует также псевдорегулярный изопренан состава C_{17} . Величина генетического показателя пристан/фитан варьирует в пределах 0.81–1.05, что характерно для нефтей морского происхождения, в том

числе нефти месторождения Даган (табл. 1, рис. 2, 3).

Величины отношений пристан/*n*- C_{17} и фитан/*n*- C_{18} в растворимой части, продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы исследуемых бактерий и в исходной нефти варьируют в пределах 0.24–1.33 и 0.09–1.58, соответственно, что свидетельствует о слабой степени зрелости ОВ.

Необходимо отметить, что в растворимой части и продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus*, как и у ранее изученных бактерий *Arthrobacter* sp. RV, *Pseudomonas aeruginosa* RM и архей *Thermoplasma* sp., был идентифицирован неопределенный нерегулярный изопренан – сквален [1, 2, 6, 11]. Величина отношения сквалена к близко кипящему алкану – *n*- C_{28} в растворимой части, продуктах термоллиза нерастворимой части исследуемых бактерий и в исходной нефти составляет 3.60, 4.16 и 0.62, соответственно (табл. 1).

Известно, что во всех нефтях мира отсутствуют регулярные изопренаны состава C_{12} и C_{17} . Считается, что они образовались из фитола и одновременный разрыв двух связей у третичного атома углерода маловероятен. Наличие псевдорегулярного изопренана C_{17} в нефти месторождения Даган, в растворимой части и продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы бактерий, скорее всего, можно объяснить термическим распадом сквалена [12]. Предполагаемые схемы распада фитола и сквалана (гидрированного аналога сквалена) представлены на схеме 2.

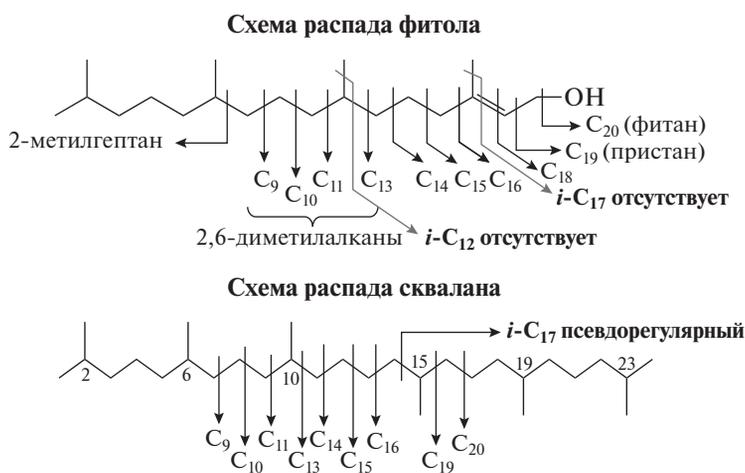


Схема 2. Схема распада фитола и сквалана.

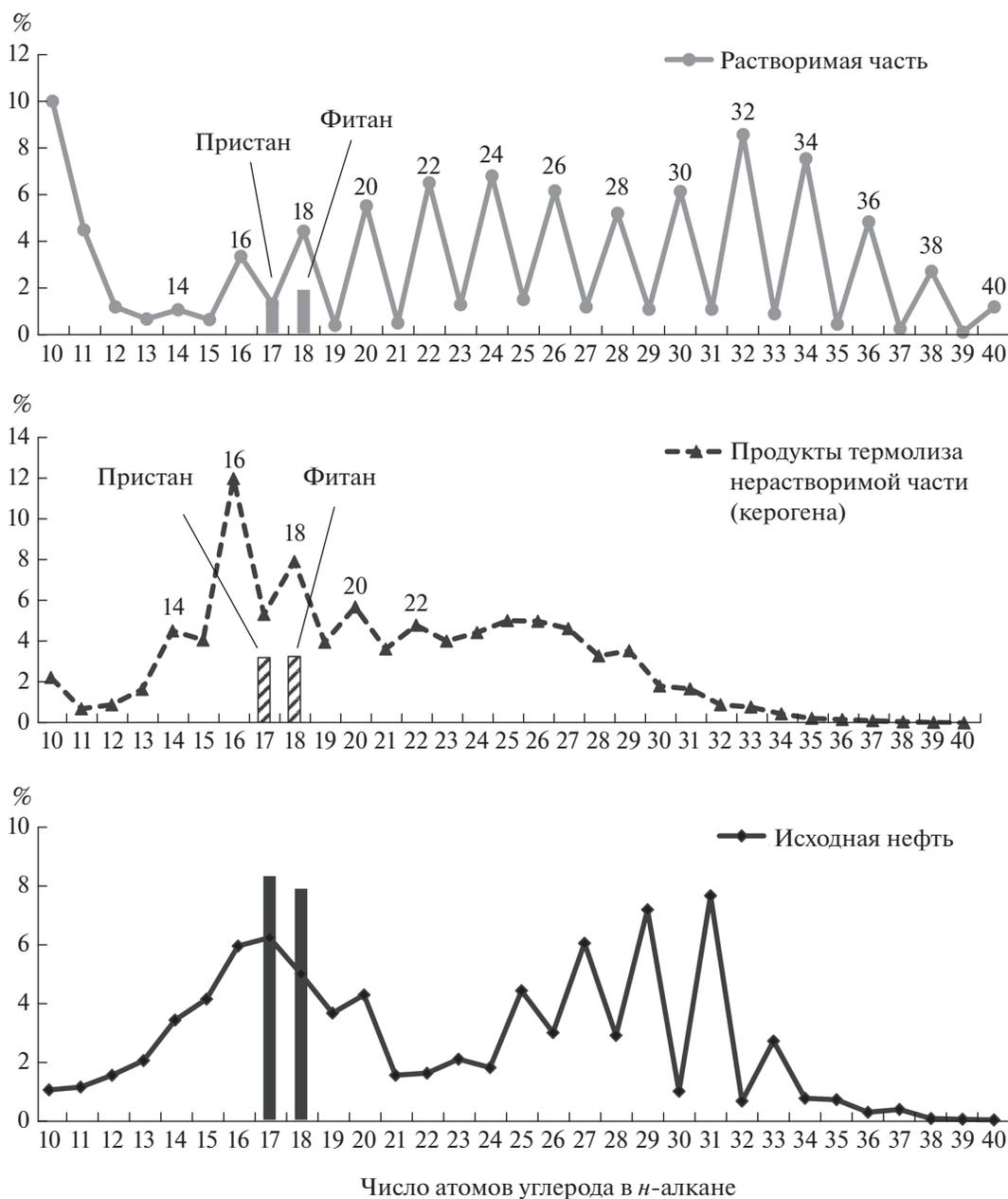
Стераны и терпаны. Важно отметить, что в отличие от растворимой части, в продуктах термо-

лиза нерастворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus* генерируются циклические УВ-био-

Таблица 1. Сравнительная характеристика растворимой части, продуктов термоллиза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган по *n*-алканам и изопренам

Образец	Пристан фитан	Пристан <i>n</i> -C ₁₇	Фитан <i>n</i> -C ₁₈	Пристан + фитан <i>n</i> -C ₁₇ + <i>n</i> -C ₁₈	K ¹ _{нечет.}	K ² _{нечет.}	Сквален/ <i>n</i> -C ₂₈
Растворимая часть	0.81	0.24	0.09	0.12	0.17	0.17	3.60
Продукты термоллиза нерастворимой части (керогена)	0.98	0.60	0.41	0.49	0.53	1.36	4.16
Исходная нефть	1.05	1.33	1.58	1.44	0.87	3.36	0.62

Примечание: $K_{\text{нечет.}}^1 = (n-C_{13} + n-C_{15} + n-C_{17} + n-C_{19} + n-C_{21}) / (n-C_{14} + n-C_{16} + n-C_{18} + n-C_{20} + n-C_{22})$; $K_{\text{нечет.}}^2 = (n-C_{25} + n-C_{27} + n-C_{29} + n-C_{31} + n-C_{33}) / (n-C_{2} + n-C_{28} + n-C_{30} + n-C_{32} + n-C_{34})$.

**Рис. 1.** Распределение *n*-алканов C₁₀–C₄₀ и изопренов C₁₉–C₂₀ в растворимой части, продуктах термоллиза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган.

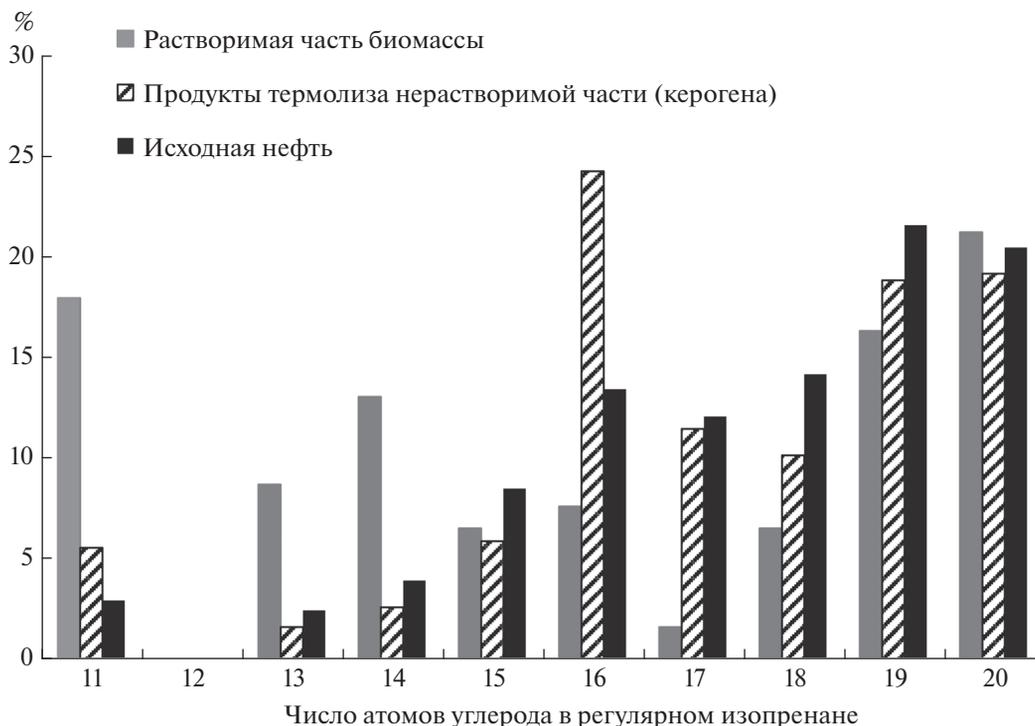


Рис. 2. Распределение изопренов C₁₁–C₂₀ в растворимой части, продуктах термоллиза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган.

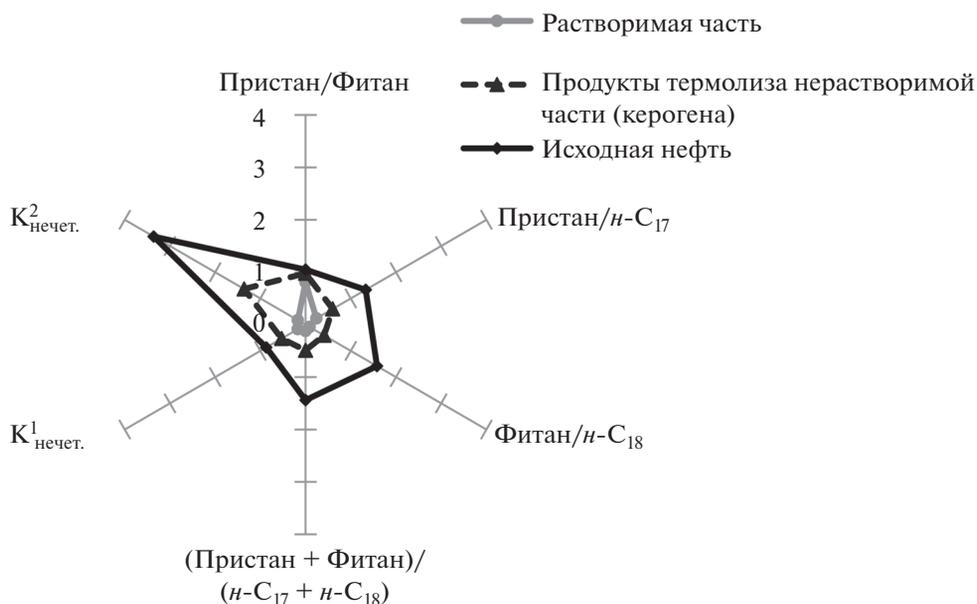


Рис. 3. Сравнительная характеристика растворимой части, продуктов термоллиза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган по *n*-алканам и изопренонам.

Таблица 2. Сравнительная характеристика растворимой части, продуктов термолитиза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган по прегнанам и стеранам

Образец	Прегнаны $\Sigma(C_{21}-C_{22})/$ (Прегнаны $\Sigma(C_{21}-C_{22}) +$ + Стераны $\Sigma(C_{27}-C_{29})$)	Регулярные стераны			Диа/Пер	$K_{зр}^1$	$K_{зр}^2$
		C_{27}/C_{29}	C_{28}/C_{29}	$C_{27} : C_{28} : C_{29}$			
Растворимая часть		Следы					
Продукты термолитиза нерастворимой части (керогена)	0.33	1.11	0.84	41 : 31 : 37	0.28	0.39	0.51
Исходная нефть	0.12	0.87	1.04	30 : 36 : 34	0.18	0.35	0.57

Примечание: $K_{зр}^1 = \alpha S / (\alpha S + \alpha R)$, $K_{зр}^2 = \alpha \beta \beta / (\alpha \beta \beta + \alpha R)$, Диа – диастераны C_{27} , Пер – регулярные стераны C_{27} .

Таблица 3. Сравнительная характеристика растворимой части, продуктов термолитиза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган по терпанам

Образец	$T_s/(T_s + T_m)$	T_s/T_m	Γ_{29}/Γ_{30}	неоАд/Ад	M_{30}/Γ_{30}	$\Gamma_{27} : \Gamma_{29} : \Gamma_{30} : \Gamma_{31}$	три/пента	тетра/три	диа Γ_{30}/Γ_{30}	$\Gamma_{30}/C_{T_{29}}$
Растворимая часть						Следы				
Продукты термолитиза нерастворимой части	0.51	1.05	0.59	0.35	0.19	16 : 21 : 36 : 27	0.14	0.83	0.12	2.83
Исходная нефть	0.46	0.84	0.39	0.44	0.16	12 : 19 : 49 : 20	0.09	0.37	0.07	2.61

Примечание: T_s – 22,29,30-трисноргопан (17 α -метил, 18 α); T_m – 22,29,30-трисноргопан (18 α -метил, 17 α); Γ_{30} – гопан – пентациклический терпан, C_{30} (17 α , 21 β); диа Γ_{30} – диагопан C_{30} ; неоАд – неоадиантан, C_{29} (17-метил, 18 α , 21 β); Ад – адиантан – 30-норгопан, C_{29} (17 α , 21 β); M_{30} – моретан, C_{30} (17 β , 21 α); три – хейлантан, C_{21} (13 β , 14 α); тетра – тетрациклический терпан, C_{24} (13 β , 14 α); $C_{T_{29}}$ – стеран C_{29} .

маркеры, присутствующие во всех нефтях мира – стераны и терпаны (табл. 2 и 3, рис. 4).

Наблюдается близкое распределение стеранов состава $C_{21}-C_{29}$ в продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus* и в нефти, из которой выделены исследуемые бактерии (табл. 2, рис. 5). Причем, величина отношения диа/регулярных стеранов довольно близкая и составляет 0.28 и 0.18 в продуктах термолитиза исследуемых бактерий и нефти. Как продукты термолитиза, так и исходная нефть являются слабозрелыми. Об этом свидетельствуют параметры зрелости по стеранам состава C_{29} $K_{зр}^1$ и $K_{зр}^2$, которые еще не достигли термодинамически равновесного состояния. Так, в продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы *G. jurassicus* $K_{зр}^1$ составляет 0.39, а $K_{зр}^2$ – 0.51, а в исходной нефти – 0.35 и 0.57 против 0.55 и 0.78 в равновесии, соответственно.

Близкие значения величин отношения терпанов наблюдаются также в продуктах термолитиза нерастворимой части исследуемых бактерий и в исходной нефти (табл. 3, рис. 4).

О слабой степени зрелости ОВ свидетельствуют также и низкие значения величины отношения T_s/T_m , которые составляют 1.05 и 0.84 в продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы и в исходной нефти, соответственно, против 19.0 в равновесии.

Таким образом, в растворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus*, выделенных из нефтяного месторождения Даган, идентифицирован только гомологический ряд *n*-алканов состава $C_{10}-C_{40}$ и изопренанов состава $C_{11}-C_{20}$. Обнаружен псевдрегулярный изопренан C_{17} и сквален. Предложен возможный механизм образования псевдрегулярного изопренана C_{17} , отсутствующего во всех нефтях мира. Вместе с тем, необходимо отметить, что найденное относительное распределение *n*-алканов не характерно ни для одной нефти мира, а величина отношения пристан/фитан (меньше единицы) соответствует нефтям морского генезиса и близка к исходной нефти. Циклические нефтяные УВ-биомаркеры в растворимой части биомассы находятся в следовых количествах.

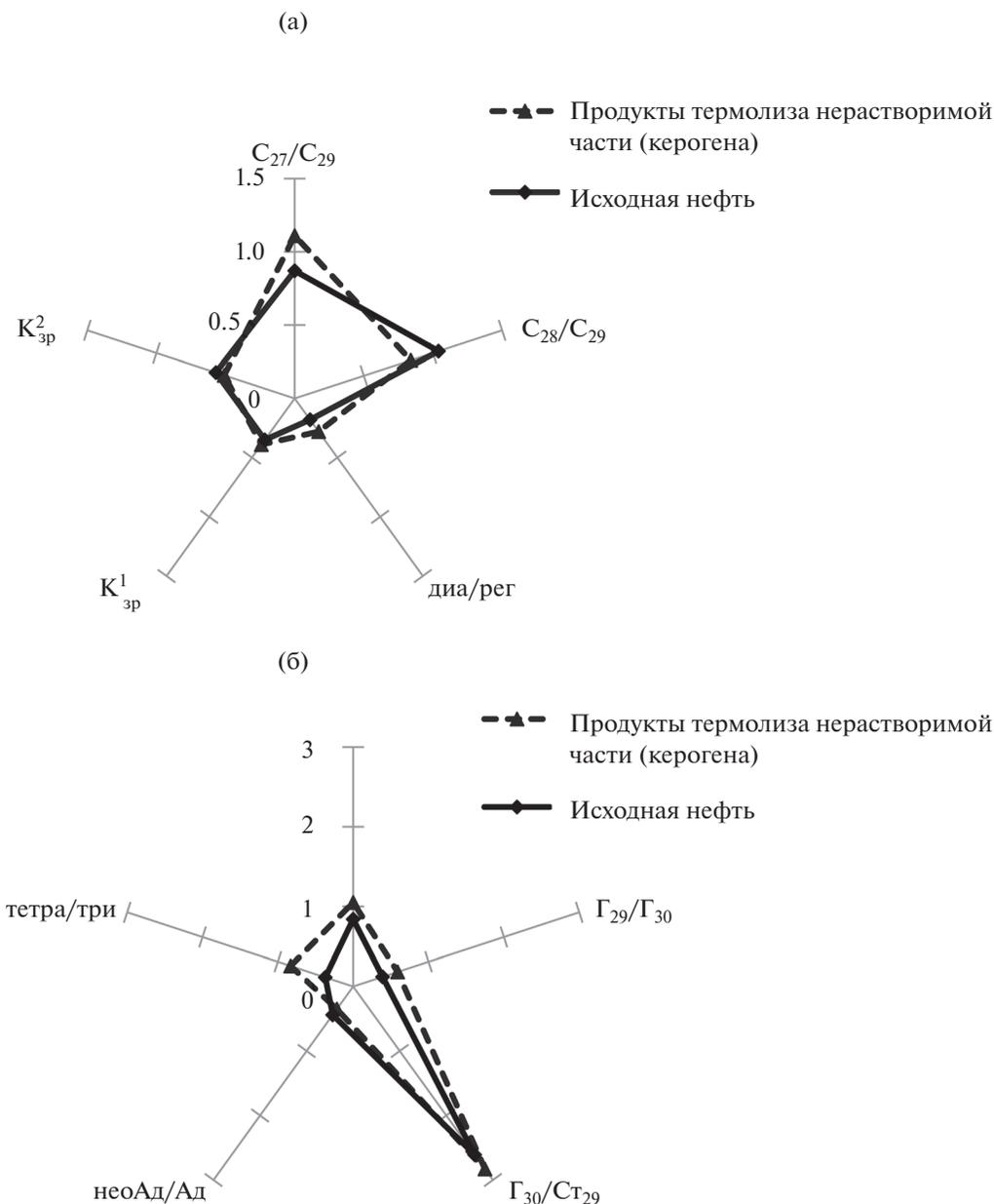


Рис. 4. Сравнительная характеристика продуктов термолитза (330°C) нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* и исходной нефти месторождения Даган: (а) по прегнанам и стеранам; (б) по терпанам.

В продуктах термолитза нерастворимой части биомассы бактерий *G. jurassicus*, наряду с алифатическими УВ-биомаркерами образуются и циклические нефтяные УВ-биомаркеры (стераны и терпаны). Причем их относительное распределение близко к таковым в исходной нефти.

Относительное распределение *n*-алканов, изопренанов, стеранов и терпанов в растворимой части и продуктах термолитза нерастворимой части (керогена) биомассы бактерий *G. jurassicus* свидетельствует о слабой степени зрелости ОВ. Анало-

гичная картина наблюдается и в нефти, из которой были выделены исследуемые бактерии.

Можно заключить, что бактерия *G. jurassicus* DS1^T принимала участие только в образовании изопренанов (пристана, фитана), стеранов и терпанов нефти месторождения Даган.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-03-00299), получение биомассы штамма *Geobacillus jurassicus* выполнялось при поддержке ФАНО России (тема № 01201350928).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Строева А.Р., Гируц М.В., Кошелев В.Н., Гордадзе Г.Н. // Нефтехимия. 2013. Т. 53. № 5. С. 374. [Petrol. Chemistry. 2013. V. 53. № 5. P. 331].
2. Строева А.Р., Гируц М.В., Кошелев В.Н., Гордадзе Г.Н. // Нефтехимия. 2014. Т. 54. № 5. С. 352. [Petrol. Chemistry. 2014. V. 54. № 5. P. 347].
3. Гируц М.В., Гордадзе Г.Н., Строева А.Р., Стоколос О.А., Богатырев С.О., Кошелев В.Н. // Химия и технология топлив и масел. 2014. № 4. С. 15.
4. Гордадзе Г.Н., Плотникова И.Н., Гируц М.В., Пошибаева А.Р., Богатырев С.О., Кошелев В.Н. // Нефтехимия. 2015. Т. 55. № 6. С. 460. [Petrol. Chemistry. 2015. V. 55. № 8. P. 604].
5. Гордадзе Г.Н. Углеводороды в нефтяной геохимии. Теория и практика. М.: РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина, 2015. 559 с.
6. Гордадзе Г.Н., Пошибаева А.Р., Гируц М.В., Перевалова А.А., Кошелев В.Н. // Нефтехимия. 2018. Т. 58. № 2. С. 135. [Petrol. Chemistry. 2018. V. 58. № 3. P. 186].
7. Esplalle I., Laporte I., Mades M. // Rev. IFP. 1977. № 3. P. 23.
8. Nazina T.N., Sokolova D.S., Grigoryan A.A., Shestakova N.M., Mikhailova E.M., Poltarau A.B., Tourova T.P., Lysenko A.M., Osipov G.A., Belyaev S.S. // Systematic and Applied Microbiology. 2005. № 28. P. 43.
9. Jiménez N., Morris B.E.L., Cai M., Gründge F., Yao J., Richnow H.H., Krüger M. // Org. Geochem. 2012. V. 52. P. 44.
10. Cai M., Jiménez N., Krüger M., Huan G., Yao J., Straaten N., Richnow H.H. // Fuel. 2015. V. 141. P. 143.
11. Amdur B.H., Szabo E.I., Socransky S.S. // J. of Bacteriology. 1978. V. 135. № 1. P. 161.
12. Гордадзе Г.Н., Гируц М.В., Пошибаева А.Р., Кошелев В.Н. // Нефтехимия. 2016. Т. 56. № 5. С. 443. [Petrol. Chemistry. 2016. V. 56. № 8. P. 672].