

УДК 579.22:579.66:547.912

## ОБРАЗОВАНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ ИЗ БИОМАССЫ ПРОКАРИОТ

### Сообщение 1. ОБРАЗОВАНИЕ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ-БИОМАРКЕРОВ ИЗ БИОМАССЫ АРХЕЙ *THERMOPLASMA* SP.

© 2018 г. Г. Н. Гордадзе<sup>1</sup>, А. Р. Пошибаева<sup>1</sup>,  
М. В. Гируц<sup>1</sup>, А. А. Перевалова<sup>2</sup>, В. Н. Кошелев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Российский государственный университет нефти и газа (НИУ) имени И. М. Губкина, Москва, Россия

E-mail: gordadze@rambler.ru

<sup>2</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.09.2017 г.

Методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы насыщенные углеводороды-биомаркеры (*n*-алканы, изопренаны, прегнаны, стераны, хейлантаны, гопаны) в растворимой части и продуктах термолитической неастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp., выделенных из источника Нефтяная площадка кальдеры вулкана Узон (Камчатка, Россия). Распределение вышеуказанных углеводородов (УВ) напоминает слабообразованные морские нефти, генерированные в глинисто-карбонатных толщах, что подтверждается данными пиролиза Rock-Eval биомассы исследуемых архей.

**Ключевые слова:** происхождение нефти, углеводороды-биомаркеры, биомасса прокариот.

**DOI:** 10.7868/S0028242118020041

В настоящее время в области происхождения нефти основное внимание уделяется эукариотическим организмам (животным, растениям и грибам), а прокариотическим (археям и бактериям), как правило, отводят роль лишь в преобразовании эукариотического органического вещества (ОВ) [1–3]. Вместе с тем, как показали наши недавние исследования, из биомассы бактерий *Arthrobacter* sp. RV и *Pseudomonas aeruginosa* RM были получены нефтяные углеводороды-биомаркеры (УВ-биомаркеры) [4–6].

Археи представляют собой группу организмов, которая эволюционировала параллельно с бактериями и сыграла ключевую роль в возникновении эукариотической жизни [7]. До недавнего времени роль архей в глобальных биогеохимических циклах, а также их филогенетическое и физиологическое разнообразие, оставались значительно недооцененными. Однако за последнее десятилетие, благодаря многочисленным исследованиям, опиравшимся, в основном, на молекулярные методы, было установлено, что археи составляют значительную часть суммарной микробной биомассы Земли и имеют огромное значение в глобальных циклах химических элементов, осуществляя многие уникальные биохимические реакции [8–10].

Представленная работа является продолжением серии работ по образованию нефтяных УВ-биомаркеров из биомассы прокариот, в частности, на примере одного из представителей архей.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлись археи *Thermoplasma* sp., выделенные из источника Нефтяная площадка кальдеры вулкана Узон (Камчатка, Россия), которые являются одними из представителей термоацидофильных архей *Thermoplasmatales*. Отличительная особенность представителей порядка *Thermoplasmatales* – отсутствие клеточной стенки. Содержимое клетки окружено только цитоплазматической мембраной, благодаря чему клетки имеют изменчивую, неправильную форму и непосредственно контактируют с агрессивными условиями среды. Представители рода *Thermoplasma* являются умеренными термофилами и экстремальными ацидофилами и способны расти и при очень низкой ионной силе, и при высокой (до 4%) концентрации NaCl.

*Thermoplasma* sp. штамм Kam2015<sup>T</sup> был выделен из горячего грунта ( $T^{\circ}\text{C}$  63.2, pH 2.9 и Eh +70 мВ) Нефтяной площадки (N54 30.023 E160 00.088, высота 654 м) кальдеры вулкана Узон (Камчатка,

Россия). Характеристика источника Нефтяная площадка и основные биогеохимические параметры места отбора проб описаны в [11–12].

Для выделения и культивирования термофильных архей использовалась среда Пфеннига следующего состава (мг л<sup>-1</sup>): KCl, 330; NH<sub>4</sub>Cl, 330; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 330; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 330; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 330; дрожжевой экстракт 200; раствор микроэлементов [13] 1 мл л<sup>-1</sup>, раствор витаминов [14] 1 мл л<sup>-1</sup>, в качестве субстрата добавляли сахарозу 2 г л<sup>-1</sup> и доводили до нужного значения рН с помощью 6 М HCl. Среду готовили аэробно, штамм культивировали при 60 °С и рН 3.0.

Биомассу *Thermoplasma* sp. выделяли из жидких культур центрифугированием (6 000 мин<sup>-1</sup>). Биомассу исследуемых архей лиофилизировали. Лиофильную сушку проводили при температуре 25 °С, давлении 10 · 10<sup>-6</sup> Бар, в течение 24 ч. Экстракцию лиофильной биомассы исследуемых архей проводили *n*-гексаном при комнатной температуре до полного исчезновения растворимой части. *n*-Гексан предварительно отгоняли на ректификационной колонке.

Нерастворимую часть биомассы исследуемых архей подвергали термолизу при 330 °С в запаянной ампуле. Продукты термолиза анализировали методами капиллярной ГЖХ и хромато-масс-спектрометрии.

Анализ образцов методом капиллярной ГЖХ проводили на приборе Bruker 430-GC с пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Программирование температуры от 80 до 320 °С со скоростью подъема 4 °С/мин. Газ-носитель – водород. Разделение УВ осуществляли на капиллярных колонках HP-1 25 м × 0.25 мм × 0.5 мкм. Анализ образцов методом хромато-масс-спектрометрии проводили на приборе Agilent 6890N/5975С. Использовались характеристические ионы *m/z* 71 для *n*-алканов и изопренанов, *m/z* 217 и 218 для прегнанов и стеранов, *m/z* 177 и 191 для терпанов. Программирование температуры от 70 до 290 °С со скоростью подъема 4 °С/мин. Газ-носитель – гелий. Все спектры были сняты при

энергии ионизации 70 эВ и ускоряющем напряжении 3500 В. Температура в камере ионизации 250 °С. Идентификацию соединений проводили путем добавления к исследуемым образцам предполагаемых эталонных соединений, а также с помощью использования библиотеки масс-спектров NIST.

Помимо этого был проведен пиролиз Rock-Eval биомассы архей *Thermoplasma* sp.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

***n*-Алканы и изопренаны.** В табл. 1 представлена геохимическая характеристика растворимой части и продуктов термолиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по *n*-алканам и изопренанам.

Нетрудно заметить, что как в растворимой части, так и в продуктах термолиза нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. были обнаружены *n*-алканы состава C<sub>10</sub>–C<sub>41</sub> и изопренаны состава C<sub>11</sub>–C<sub>20</sub> (рис. 1, 2). Среди *n*-алканов в обоих случаях наблюдается превалирование высокомолекулярных *n*-алканов состава C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub> над C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub>, C<sub>34</sub> (коэффициент нечетности K<sup>2</sup><sub>нечет.</sub> в растворимой части и продуктах термолиза нерастворимой части равен 3.0 и 1.67, соответственно). Вместе с тем, одновременно наблюдается превалирование четных относительно низкомолекулярных *n*-алканов C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> над нечетными C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>21</sub> (коэффициент нечетности K<sup>1</sup><sub>нечет.</sub> в растворимой части и продуктах термолиза нерастворимой части равен 0.33 и 0.82, соответственно) (табл. 1). Такие распределения *n*-алканов наблюдаются в слабопреобразованных нефтях.

Распределение регулярных изопренанов также соответствует таковому в нефтях. Здесь также отсутствуют регулярные изопренаны состава C<sub>12</sub> и C<sub>17</sub>. Известно, что отсутствие этих изопренанов наблюдается во всех нефтях мира. Величина генетического показателя пристан/фитан в обоих

**Таблица 1.** Геохимическая характеристика растворимой части и продуктов термолиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по *n*-алканам и изопренанам

Образец	пристан фитан	пристан <i>n</i> -C <sub>17</sub>	фитан <i>n</i> -C <sub>18</sub>	пристан + фитан <i>n</i> -C <sub>17</sub> + <i>n</i> -C <sub>18</sub>	K <sup>1</sup> <sub>нечет.</sub>	K <sup>2</sup> <sub>нечет.</sub>
Растворимая часть	0.71	0.60	0.28	0.36	0.33	3.0
Продукты термолиза нерастворимой части	0.82	0.85	1.04	0.95	0.82	1.67

*Примечание:* K<sup>1</sup><sub>нечет.</sub> = (*n*-C<sub>13</sub> + *n*-C<sub>15</sub> + *n*-C<sub>17</sub> + *n*-C<sub>19</sub> + *n*-C<sub>21</sub>)/(*n*-C<sub>14</sub> + *n*-C<sub>16</sub> + *n*-C<sub>18</sub> + *n*-C<sub>20</sub> + *n*-C<sub>22</sub>);  
K<sup>2</sup><sub>нечет.</sub> = (*n*-C<sub>25</sub> + *n*-C<sub>27</sub> + *n*-C<sub>29</sub> + *n*-C<sub>31</sub> + *n*-C<sub>33</sub>)/(*n*-C<sub>26</sub> + *n*-C<sub>28</sub> + *n*-C<sub>30</sub> + *n*-C<sub>32</sub> + *n*-C<sub>34</sub>).

**Таблица 2.** Геохимическая характеристика растворимой части и продуктов термоллиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по прегнанам и стеранам

Образец	Прегнаны $\Sigma$ (C21-C22)/ (Прегнаны $\Sigma$ (C21-C22)+ Стераны $\Sigma$ (C27-C29))	Регулярные стераны			диа/рег	$K_{зр}^1$	$K_{зр}^2$
		$C_{27}/C_{29}$	$C_{28}/C_{29}$	$C_{27}:C_{28}:C_{29}$			
Растворимая часть	0.27	0.87	0.68	34:27:39	0.20	0.43	0.69
Продукты термоллиза нерастворимой части	0.24	0.54	0.69	24:31:45	0.31	0.30	0.59

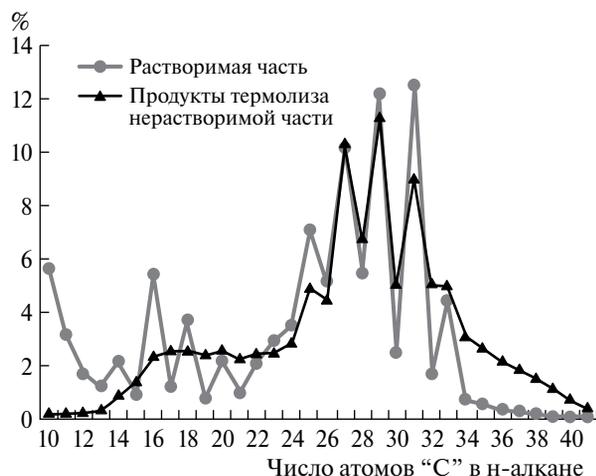
**Таблица 3.** Геохимическая характеристика растворимой части и продуктов термоллиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по терпанам

Образец	$Ts/(Ts+Tm)$	$Ts/Tm$	$\Gamma_{29}/\Gamma_{30}$	$M_{30}/\Gamma_{30}$	$\Gamma_{27}:\Gamma_{29}:\Gamma_{30}:\Gamma_{31}$	три/ пента	тетра/ три	диа $\Gamma_{30}/\Gamma_{30}$	$\Gamma_{30}/C_{T29}$
Растворимая часть	0.46	0.85	0.77	0.2	17:24:32:27	0.34	0.52	0.08	1.44
Продукты термоллиза нерастворимой части	0.44	0.77	0.60	0.21	16:22:36:26	0.08	0.75	0.07	2.83

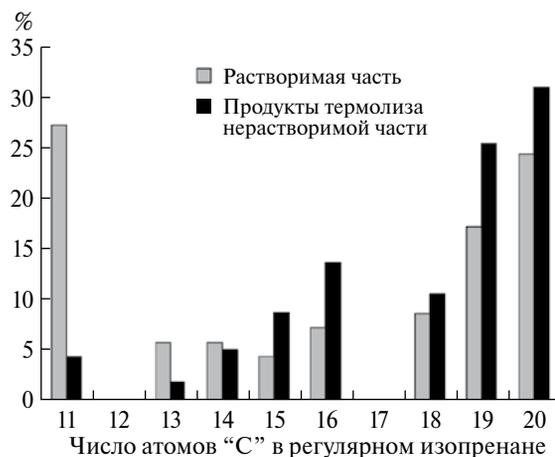
случаях составляет 0.71 и 0.82, соответственно, что характерно для нефтей морского происхождения.

**Стераны и терпаны.** В табл. 2 и 3, рис. 3 и 4 представлена геохимическая характеристика растворимой части и продуктов термоллиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по стеранам и терпанам.

Как в растворимой части, так и в продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. наблюдается нефтяное распределение прегнанов и стеранов состава  $C_{21}-C_{29}$ , а также терпанов (хейлантанов, тетрациклических терпанов и гопанов) состава  $C_{19}-C_{35}$ .



**Рис. 1.** Распределение *n*-алканов в растворимой части и продуктах термоллиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp.



**Рис. 2.** Распределение регулярных изопренов в растворимой части и продуктах термоллиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp.

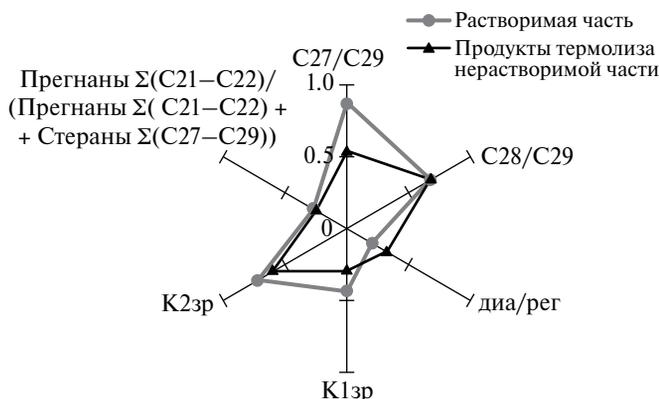


Рис. 3. Сравнительная характеристика растворимой части и продуктов термолитиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по прегнанам и стеранам.

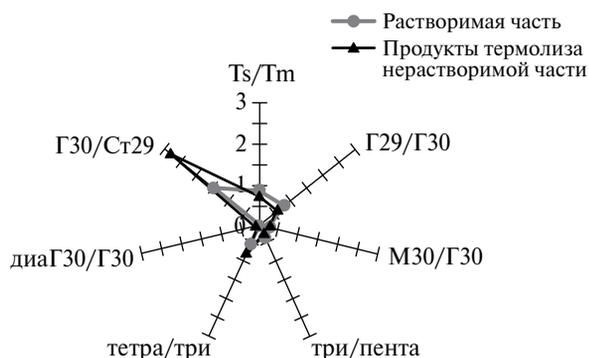


Рис. 4. Сравнительная характеристика растворимой части и продуктов термолитиза (330 °С) нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. по терпанам.

Распределение регулярных стеранов  $C_{27}:C_{28}:C_{29}$  и прегнанов напоминает таковое в слабопреобразованных морских нефтях. Значения коэффициентов зрелости  $K^1_{зр}$  и  $K^2_{зр}$  еще не достигли термодинамически равновесных состояний. Так, в растворимой части биомассы *Thermoplasma* sp.  $K^1_{зр}$  составляет 0.43, а  $K^2_{зр}$  — 0.69, а в продуктах термолитиза нерастворимой части — 0.30 и 0.59, соответственно. В равновесии значения этих коэффициентов составляют 0.55 и 0.78, соответственно [15].

Величины отношений диастеранов к регулярным (диа/рег) напоминают нефти, генерированные в глинисто-карбонатных толщах, и составляют 0.2 в растворимой части и 0.31 — в продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы *Thermoplasma* sp.

Относительное распределение трициклических терпанов (хейлантанов) и гопанов также напоминает слабопреобразованные нефти. Так, в растворимой части биомассы  $T_s/T_m$  составляет 0.85,

а в продуктах термолитиза нерастворимой части исследуемых архей — 0.77. Величины отношения  $M_{30}/G_{30}$  в обоих случаях близки и составляют 0.2. R и S-эпимеры гомогопанов состава  $C_{31}-C_{35}$  практически достигли термодинамически равновесного состояния.

Необходимо отметить, что выводы, основанные на данных пиролиза Rock-Eval биомассы архей *Thermoplasma* sp., полностью соответствуют вышеуказанным заключениям о слабой степени преобразованности ОБ морского генезиса. Так, максимальная температура пиролиза биомассы архей *Thermoplasma* sp.  $T_{max}$  составляет 412 °С (что соответствует низкой степени зрелости ОБ), водородный индекс ИН составляет 454 мг УВ/г Сорг (морское ОБ).

Таким образом, как в растворимой части, так и в продуктах термолитиза нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp. идентифицированы УВ-биомаркеры — *n*-алканы, изопрены, прегнаны, стераны, хейлантаны и гопаны. Распределение этих УВ напоминает таковое в слабопреобразованных нефтях, генерированных в морских условиях.

Пиролиз Rock-Eval был проведен на кафедре теоретических основ поисков и разведки нефти и газа РГУ нефти и газа (НИУ) имени И. М. Губкина.

Данная статья подготовлена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-03-00299). Микробиологическая работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 17-74-30025, Первалова АА).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dedyukhina E.G., Ladygina N., Vainshtein M.B. // A Process Biochemistry. 2006. V. 41. Issue 5. P. 1001.
2. Blumenberg M., Oppermann B., Guyoneaud R., Michaelis W. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 293. P. 73.
3. Rohmer M., Bouvier P., Ourisson G. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 112. P.557.
4. 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. 374].
5. 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].
6. Гордадзе Г.Н. Углеводороды в нефтяной геохимии. Теория и практика. М.: РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина, 2015. 559 с.
7. Koonin E.V. // Genome Biol. 2010. V. 11. № 5. P. 209.

8. *Schleper C., Jurgens G, Jonuscheit M.* // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 6. P. 479.
9. *Sato T., Atomi H.* // Curr Opin Microbiol. 2011 V. 14. № 3. P. 307.
10. *Falkowski P.G., Fenchel T., Delong E.F.* // Science. 2008/ V. 320 № 5879. P. 1034.
11. *Frolov E.N., Merkel A.Y., Pimenov N.V., Khashevskaya A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A.* // Microbiology (English Translation of Mikrobiologiya). 2016. V. 85. P. 471.
12. *Dobretsov N.L., Lasareva E.V., Zhmodik S.M., Bryanskaya A.V., Morozova V.V., Tikunova N.V., Peltek S.E., Karpov G.A., Taran O.P. et al.* // Russian Geology and Geophysics. 2015. V. 56. P. 39.
13. *Kevbrin V.V., Zavarzin G.A.* // Microbiology (English translation of Mikrobiologiya). 1992. V. 61. P. 563.
14. *Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S.* // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 2882.
15. *Петров Ал.А.* Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. 264 с.