

УДК 57.083.12:[502.65:665.6]

Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С.Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский нефтяной научно-исследовательский геологоразведочный институт» (ФГУП «ВНИГРИ»), Санкт-Петербург, Россия, ins@vnigri.ru

К ПРОБЛЕМЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Проведён анализ литературных данных на предмет биологического окисления различных классов углеводородов нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами. Рассмотрены различные механизмы биоокисления углеводородов, а также биогенное окисление нефтей различных по химическому составу.

***Ключевые слова:** углеводороды, механизм окисления, углеводородокисляющие микроорганизмы, нефть, нефтепродукты.*

Нефть и нефтепродукты являются одними из самых распространённых загрязнителей окружающей среды. Её разливы вызывают гибель организмов, изменение свойств экосистем и их деградацию. Проблема нефтяного загрязнения приобрела глобальные масштабы в конце XX века. Это связано с тем, что нефть стала самым используемым источником энергии. Потери при современных объёмах добычи нефти исчисляются десятками миллионов тонн в год. Процесс самовосстановления биоценозов в регионах, которые подверглись нефтяному загрязнению, занимает весьма продолжительное время и протекает в течение 10-25 лет.

Из многочисленных методов, которые позволяют уменьшить концентрацию нефти в экосистемах, наиболее перспективными считаются биологические методы, основанные на естественных процессах разложения нефти в природе, участие в которых принимают углеводородокисляющие микроорганизмы: бактерии, микроскопические грибы и дрожжи.

Биологические методы утилизации основаны на применении микроорганизмов, способных использовать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода. Это дает возможность снизить содержание нефти до фоновых значений (значения фоновых концентраций в различных регионах изменяются в широких пределах) при низких эксплуатационных затратах и простоте решения.

Среди мер, предпринимаемых с целью очистки окружающей среды от загрязнений, важное место занимает интенсификация микробиологических способов деструкции нефти. При этом предполагается активизация не только аборигенной микрофлоры загрязнённых объектов, но и внесение биопрепаратов, содержащих штаммы активных нефтеструкторов

[Рогозина, Шиманский, 2007; Бабаев, Мовсумзаде, 2009; Киреева, Григориади, Хайбулина, 2009; Матенькова, Наплекова, 2009; Киреева и др., 2010; Рогозина и др., 2010].

При этом важно знать механизмы и степень биоокисления различных классов нефтяных углеводородов, конкретными родами углеводородоокисляющих микроорганизмов. Ниже изложены результаты проведенного анализа по проблеме окисления.

Современное состояние вопроса о механизмах окисления углеводородов микроорганизмами

Процессы биогенного окисления углеводородов настолько сложны, что в настоящее время ещё не имеется достаточно чёткого и определённого представления об их механизме. Вопрос этот сложен уже потому, что на направление процесса биогенного окисления оказывают влияние многие факторы: кислотность среды (Ph), окислительно-восстановительные условия (Rh_2), температура, освещение, осмотическое давление и так далее. Помимо перечисленных факторов, имеют значение и физиологические особенности самих микроорганизмов, проявляющиеся при окислении индивидуальных углеводородов и их смесей [Преобразование нефтей..., 1970].

Микроорганизмы обладают свойством избирательного отношения к различным углеводородам, причём эта способность определяется не только различием в структуре вещества, но даже и количеством углеродных атомов, входящих в структуру. Так, например, выделенные и описанные И. Таучем и В. Петровым *Bacterium aliphaticum* и *Bacterium aliphaticum liquefaciens* окисляли *n*-гексан, *n*-октан, декан, гексадекан, триаконтан и тетра триоктан, а выделенная ими же *Bacterium paraffinicum* окисляла только высшие гомологи этого ряда, начиная с гексадекана [Feist, Hegeman, 1969; Кодина, 1988; Cerniglia, 1992; Кошелева и др., 2000].

Окисление углеводородов большинством известных микроорганизмов осуществляется с помощью адаптивных энзимов (ферментов). Этот факт установлен многочисленными экспериментами по окислению углеводородов клетками микроорганизмов, выращенных на неуглеводородных субстратах. Было показано, например, что клетки гептаноокисляющих бактерий, выращенные на глюкозе, не могут окислять углеводороды в присутствии хлорамфеникола. Это соединение угнетает протеиновый синтез и таким образом препятствует возникновению адаптивных энзимов [Успехи микробиологии..., 1968а; Преобразование нефтей..., 1970].

Распространение углеводородоокисляющих микроорганизмов в природе

Микроорганизмы, использующие углеводороды, широко распространены в природе. Были описаны 22 рода бактерий, 31 род микроскопических грибов и в том числе 19 родов

дрожжей, выделенных из почвенных экосистем, способных к биодegradации различных нефтяных углеводов. Из морской среды обитания выделено 25 родов углеводороддеградирующих бактерий и 27 родов углеводородиспользующих микроскопических грибов. В их числе: бактерии (*Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Desulfovibrio*, *Eneribacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Serratia*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Vibrio*), мицелиальные грибы (*Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*), дрожжи (*Candida*, *Debaryomyces*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*), цианобактерии (*Agmenellum*, *Aphanocapsa*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*). Большинство углеводородокисляющих микроорганизмов встречаются как в почвенных, так и в водных местообитаниях [Розанова, Кузнецов, 1974].

Пути поступления углеводов в клетки микроорганизмов

На сегодняшний день отсутствуют экспериментальные данные относительно окисления углеводов внеклеточными ферментами микроорганизмов. Специальные исследования показали, что при развитии в среде с гексадеканом дрожжей *p. Candida* ферменты, ответственные за окисление углеводов, а также продукты первичного окисления субстрата – цетиловый спирт и пальмитиновый альдегид – содержались только в клетках и не были обнаружены в культуральной среде. Имеющиеся разнообразные данные о поступлении углеводов в клетки микроорганизмов, локализации углеводородокисляющих ферментов и образующихся продуктов не оставляют сомнений в том, что углеводороды окисляются внутриклеточно. Отсюда вытекает необходимость объяснить поступление нерастворимого в воде субстрата в клетку [Успехи микробиологии..., 1968б].

Различают следующие виды транспорта углеводов в клетки микроорганизмов:

- пассивный перенос:

а) *простая диффузия* – неспецифическое поступление веществ в клетку, при котором различные соединения проникают в клетку, не взаимодействуя с каким-либо переносчиком;

б) *облегчённая диффузия* – специфический процесс, при котором переносимое вещество обратимо связывается с переносчиком, находящимся в мембране, и поступает в клетку в виде субстрат-белкового комплекса;

При этом скорость поступления веществ равна скорости его выхода из клетки.

Оба эти процесса не требуют энергии, и скорость их зависит от концентрации субстрата в среде.

- **активный перенос** – вещество поступает в клетку против градиента концентрации в среде; процесс требует затрат энергии и происходит с помощью специфических белков-переносчиков (пермеаз).

Дальнейшие ограничения связаны с растворимостью субстрата в воде. Поступление субстрата в микробную клетку может осуществляться либо из состояния истинного раствора, либо при непосредственном контакте его с клеткой [Успехи микробиологии..., 1968б; Готтшлак, 1976; Kastner, Breuer-Jammali, Mahro, 1994; Fuenniayor et al., 1998].

Процесс поглощения определяется как активный транспорт в соответствии со следующими параметрами.

- специфичность по отношению к субстрату; на наружной поверхности мембраны образуется комплекс переносчик — субстрат;

- потребность в метаболической энергии; переносчик обладает высоким сродством к субстрату, если он обращен к внешней поверхности мембраны, и низким сродством к нему, если обращен к ее внутренней поверхности. На эти изменения переносчика и расходуется энергия;

- транспорт соответствующего субстрата против градиента концентрации; это происходит за счет изменения сродства переносчика к субстрату при переходе снаружи внутрь;

- освобождение в цитоплазму немодифицированного субстрата (в отличие от переноса групп) [Crawford, Frick, 1975; Готтшлак, 1976; Samanta, Singh, 2002].

Только низкомолекулярные жидкие углеводороды от C₅ до C₁₁, а также некоторые ароматические углеводороды могут незначительно растворяться в воде, более высокомолекулярные гомологи практически нерастворимы [Успехи микробиологии..., 1968б].

Микробиологическое окисление углеводородов нефти и нефтепродуктов

Микробиологические превращения углеводородов представляют собой особую область из-за некоторых особенностей этих процессов. Их специфика обусловлена своеобразием углеводородов как химических соединений с предельной восстановленностью связанными с этим гидрофобными свойствами. Оказалось, что гидрофобность углеводородной молекулы имеет большое значение для химизма микробиологического окисления этих соединений, их транспорта в микробную клетку, динамики роста культур, их физиологии, многих аспектов

технологии процессов, связанных с применением субстратов углеводородной природы [Скрябин, Головлёва, 1976].

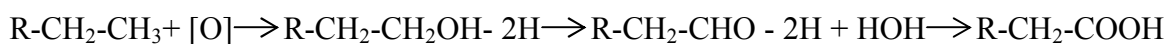
Все реакции микробиологического превращения углеводов являются окислительными. Предельная восстановленность этих веществ делает необходимым для их окисления присутствие кислорода. Гидрофобный характер молекулы является причиной того, что процессы окисления осуществляются оксигеназами, в отличие от окисления более гидрофильных веществ, происходящего под действием дегидрогеназ. Гидрофобность углеводородных субстратов и их плохая растворимость в воде определяют способы транспорта веществ в клетку, рассмотренные выше [Розанова, Кузнецов, 1974].

Характерной особенностью процесса ассимиляции углеводов в качестве источника углерода является часто встречающееся накопление промежуточных продуктов в культуральной среде микроорганизмов, растущих за счёт таких субстратов [Скрябин, Головлёва, 1976; Birnboim, Doly, 1979; Dua, Meera, 1981; Восстановление нефтезагрязнённых..., 1988; Saemori et al., 1995].

Окисление нормальных парафинов

Пути окисления нормальных парафинов микроорганизмами, использующими эти соединения в качестве источников углерода и энергии, изучены достаточно подробно [Успехи микробиологии..., 1968a].

В преобладающем большинстве случаев в результате первичной ферментативной атаки молекулы *n*-парафина происходит окисление терминального атома углерода. Первыми стабильными продуктами окисления углеводов являются первичные спирты. Следующий этап составляют обычные биологические превращения спирта в альдегид и альдегида в кислоту. Общая схема реакций выглядит следующим образом [Скрябин, Головлёва, 1976]:



Дальнейший механизм усвоения жирных кислот, возникающих при окислении углеводов, протекает путем β -окисления, заключающегося в последовательном отщеплении двууглеродных фрагментов в виде активного ацетата, поступающего в цикл трикарбоновых кислот [Преобразование нефтей..., 1970; Скрябин, Головлёва, 1976].

Дальнейшая редукция жирной кислоты, образовавшейся в результате микробиологического окисления *n*-алканов наряду с классическим β -окислением может включать ряд минорных вариантов: 1) ω -гидроксилирование, приводящее к образованию ω -оксикарбоновых, а затем дикарбоновых кислот с дальнейшей фрагментацией. Этот путь

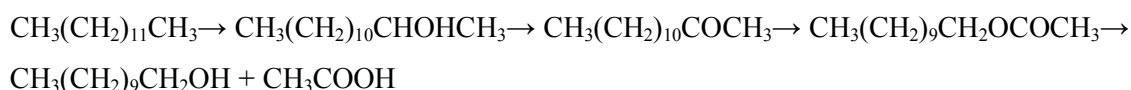
окисления получил экспериментальные доказательства у многих микроорганизмов; 2) α -окисление, декарбоксилирование, которое доказано в тех случаях, когда субтерминальный атом углерода несет кетогруппу или гидроксил; 3) дегидрогенизация жирной кислоты с последующим окислительным расщеплением двойной связи. Предположение о существовании этого механизма высказано группой исследователей W.R. Finnerty, R.E. Kallio [Скрябин, Головлёва, 1976].

Описанный выше механизм терминального окисления не является единственным путем деградации *n*-алканов. У некоторых микроорганизмов описано окисление субтерминального или внутренних углеродных атомов, что приводит к образованию вторичных спиртов и кетонов. Этот путь иногда функционирует как минорный наряду с терминальным окислением.

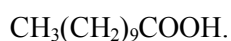
Н.В. Lukins и J.W. Foster установили, что некоторые микобактерии метаболизируют *n*-алканы через метилкетоны с промежуточным образованием перекиси и вторичного спирта [Скрябин, Головлёва, 1976]. Дальнейшее окисление кетонов изучено пока недостаточно. В опытах J.R. Vestal и J.J. Perry *Brevibacterium sp.* окисляла пропан через ацетон с дальнейшей атакой на терминальный метил и декарбоксилированием [Скрябин, Головлёва, 1976]:



На основании работ F.W. Forney и A.J. Markovetz деградация тридекана культурой *Pseudomonas aeruginosa* представляется следующим образом [Скрябин, Головлёва, 1976]:



↓



Окисление алкенов

Микробиологическое окисление алкенов может включать следующие реакции: а) окисление метильной группы с образованием ненасыщенных кислот; б) образование эпоксидов по двойной связи; в) образование диолов. Ненасыщенные углеводороды могут окисляться одновременно и по метильной концевой группе и по двойной связи молекулы. Еще в 60-е гг. Стюарт с сотрудниками показали, что эфиробразующие бактерии *Micrococcus cerificans* окисляли метильную группу алкенов-1, не затрагивая двойную связь молекулы. Впоследствии детальные исследования, проведенные Ван-дер-Линденом и Тийссе выявили и другой путь окисления алкенов, ведущий к образованию эпоксидов, диолов, α -оксикислот и ненасыщенных кислот [Преобразование нефтей..., 1970; Dunn, Gunsalus, 1973;

Скрябин, Головлёва, 1976; Kiyohara, Nagdd, Yana, 1982; Восстановление нефтезагрязнённых..., 1988].

Изучая окисление тетрадецена культурой *Pseudomonas aeruginosa*, А.И. Марковец с сотрудниками обнаружили оба пути окисления. Ими были выделены и идентифицированы тетрадеценовая-13 кислота и тетрадеканол-2. Это свидетельствовало о том, что и метильная группа и терминальная двойная связь подвергались атаке этой культурой. Позже были обнаружены оба пути окисления гексадецена-1 и октадецена-1 культурой *Micrococcus cerificans*. Относительно окисления диенов можно отметить, что культура *Pseudomonas oleovorans*, способная эпоксидировать октен-1, может эпоксидировать и октадиен-1,7, причем образуется моноэпоксид.

На основании этих работ можно дать схему реакций окисления алкенов бактериями, представленную на рис. 1:

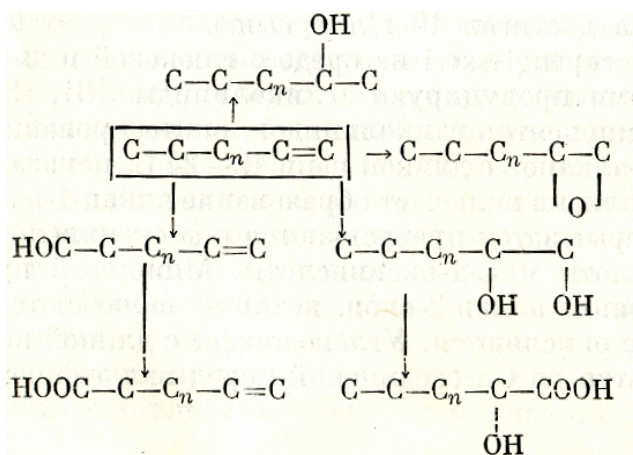


Рис. 1. Схема реакций окисления алкенов бактериями [Скрябин, Головлёва, 1976]

Многочисленные исследования по окислению олефинов дрожжами и грибами также свидетельствуют о наличии терминального и субтерминального окисления, в результате чего образуются соответствующие ω -ненасыщенные кислоты, насыщенные кислоты, ω -ненасыщенные спирты, эпоксиды, диолы и т. д. [Скрябин, Головлёва, 1976].

Окисление циклоалканов

Описано несколько примеров полной деградации циклопарафинов и их производных, причем показано, что деградации циклоалканов нередко предшествует их ароматизация [Преобразование нефтей..., 1970].

Впервые микробиологическая трансформация циклопарафинов описана J.S. Ооуата и J.W. Foster. Микроорганизм *Mycobacterium vaccae*, способный усваивать изоалканы, в частности 2-метилбутан, окислял циклические алканы до соответствующих кетонов суспензиями отмытых клеток [Скрябин, Головлёва, 1976].

Гомологи ряда циклопарафинов от C_3 до C_8 превращалась в соответствующие цикломонокетоны. Вещества окислялись неполностью, с увеличением концентрации исходного циклопентана до 300 мкг/мл количество циклопентанона не повышалось. Максимальный выход кетонов составлял 0,1-0,3 г/л. Окисление циклоалканов до циклокетонов, по-видимому, происходило через образование цикломоноспиртов [Розанова, Кузнецов, 1974; Kalb, Bernlohr, 1977; Восстановление нефтезагрязнённых..., 1988].

Детально исследовалось окисление циклоалканов G.S. Fonken с сотрудниками. Была изучена большая группа грибов и бактерий на способность окислять циклопентаны при росте на различных субстратах: пептоне, декстрозе, солодовом и кукурузном экстрактах. Авторам удалось с помощью этих организмов провести окисление циклогексана, фенилциклогексана, циклогексилсульфонов, циклопентилсульфонов и других до соответствующих оксипроизводных. Концентрация окисленных производных достигала 0,1 г/л. Ниже на рис. 2 и 3 приводятся типичные примеры окислительных трансформаций циклоалканов:

Ассимиляция микроорганизмами ароматических углеводов достаточно хорошо изучена. Рассмотрим деградацию микробными культурами фенантрена, антрацена и флуорена [Скрябин, Головлёва, 1976].

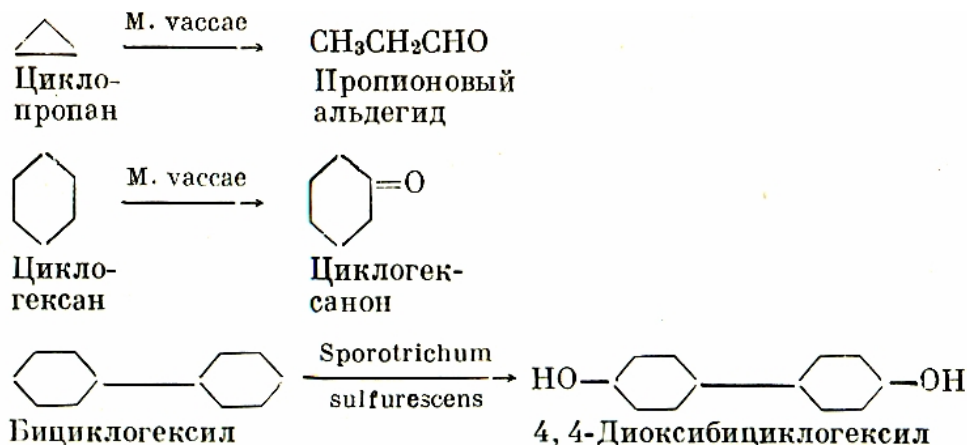


Рис. 2. Схема реакций окисления циклопропана, циклогексана и бициклогексила [Скрябин, Головлёва, 1976]

Деградация фенантрена и антрацена. К настоящему времени описано 2 различных пути деградации фенантрена, которые представлены на рис. 4. Сначала фенантрен в результате последовательных реакций трансформируется до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты. Дальнейшие биохимические пути деградации этого соединения могут быть различны: 1-гидрокси-2-нафтойная кислота метаболизируется либо через салицилат и катехол, либо через образование *o*-фталата и прокатехата. Катехол и протокатехат далее

расщепляется по орто- или мета-пути до интермедиатов цикла Кребса. Существует альтернативный путь окисления через гентизиновую кислоту [Evans, Fernley, Griffiths, 1965; Kiyohara, Nagao, Nomi, 1976; Пунтус и др., 2008].

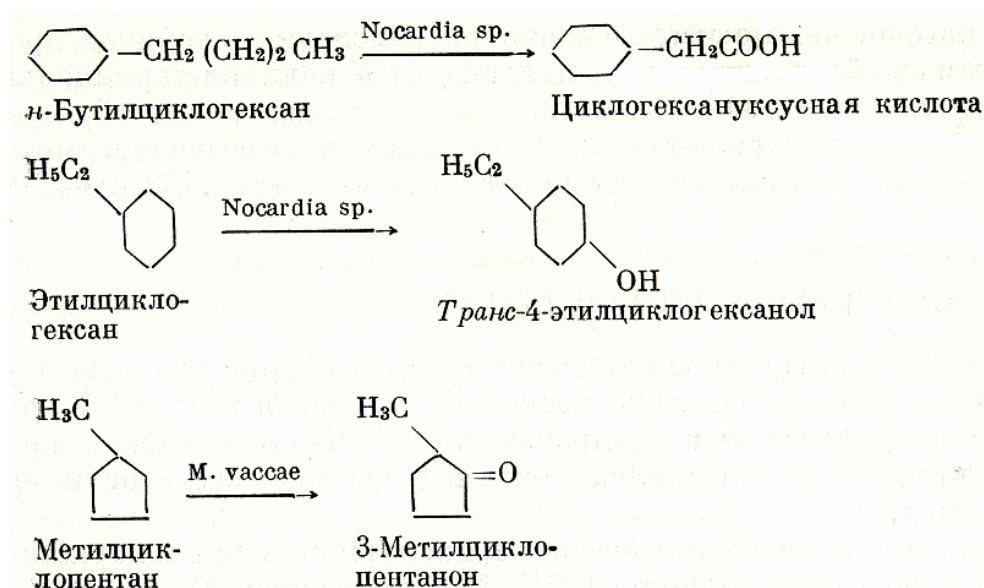


Рис. 3. Схема реакций окисления *n*-бутилциклогексана, этилциклогексана и метилциклопентана [Скрябин, Головлёва, 1976]

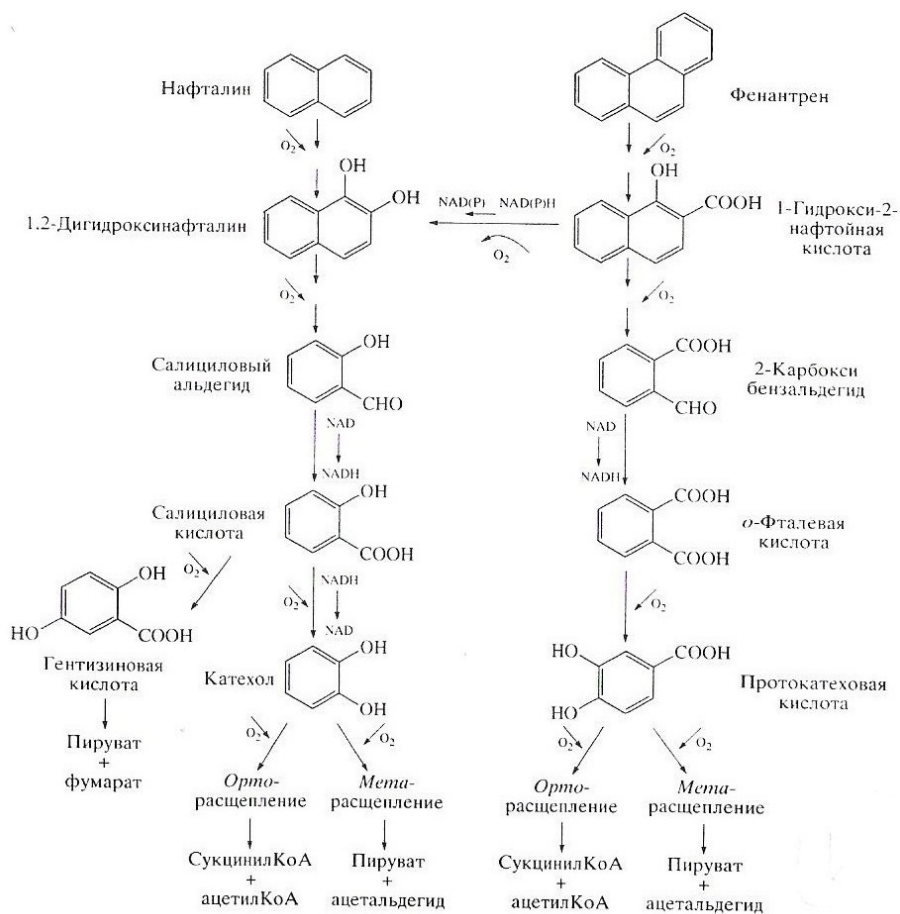


Рис. 4. Пути микробной деградации нафталина и фенантрена [Пунтус и др., 2008]

Окисление ароматических углеводов

Известны несколько микроорганизмов, трансформирующих и утилизирующих фенантрен как единственный источник углерода и энергии: *Comamonas testosterone* GZ38A, GZ39, GZ42, *Burkholderia* sp., *Alcaligenes faecalis* AFK2, *Sphingomonas* sp. P2, *Mycobacterium* sp. PYR-1, *Pseudomonas putida* NCBI9816, *Nocardiodes* sp. KP7. Сообщений о микроорганизмах, способных метаболизировать антрацен еще меньше: *Burkholderia* sp. RP007, *Rhodococcus* sp., бактерии рода *Mycobacterium*. Помимо биоремедиации почв, приследуется цель использования микроорганизмов как биокатализаторов для получения соединений, представляющих интерес для биомедицины. Это, прежде всего, труднодоступные для химического синтеза изомерные дигидродигидрокси- и дигидроксифенантрены, необходимые для последующего синтеза препаратов, обладающих антиаллергенными и антиканцерогенными свойствами [Churchill, Harper, Churchill, 1999].

В работе Н.А. Ленёвой [Ленёва и др., 2009] изучались пути трансформации фенантрена и антрацена бактериями *R.opacus* 412 и *R.rhodnii* 135, для чего проводили адаптацию микроорганизмов путем многократного пересева. Были предложены пути превращения фенантрена исследуемыми родококками (*R.opacus* 412 и *R.rhodnii* 135). Предполагается, что *R.opacus* 412 способен утилизировать фенантрен по пути, показанному на рис. 5а, через начальное дигидроксилирование фенантрена с образованием 3,4-дигидродиола и затем 3,4-дигидроксифенантрена, с последующим образованием 7,8-бензокумарина, 1-гидрокси-2-нафтоальдегида и 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты через салицилат и катехол до цикла трикарбоновых кислот.

Повышенное содержание 3-гидроксифенантрена, а также появление и накопление дигидроксилированного не в *орто*-положении фенантрена в адаптированном варианте штамма *R.opacus* 412 (рис. 5б) могут говорить о возможно повышенной экспрессии ферментов, осуществляющих монооксигенирование, после предварительной адаптации. То, что такое соединение накапливается со временем, свидетельствует о неспособности штамма к их дальнейшей утилизации. Таким образом, можно выделить новый, но тупиковый путь трансформации фенантрена штаммом.

Учитывая рост адаптированного варианта штамма *R.rhodnii* 135, а также присутствие в культуральной жидкости следовых количеств салицилальдегида, салицилата, катехола и гидроксимуконового полуальдегида, можно предположить существование пути а, через который осуществляется основная минерализация фенантрена адаптированными клетками. Однако, скорее всего, трансформация фенантрена через данный путь происходит с большими

скоростями по сравнению с штаммом *R. oracus* 412. Предварительная адаптация *R. rhodnii* 135 к фенантрону также приводит к повышенному накоплению метаболитов пути б, что может также свидетельствовать об активации ферментов, катализирующих последовательное монооксигенирование фенантрена [Moody et al., 2001; Ленёва и др., 2009].

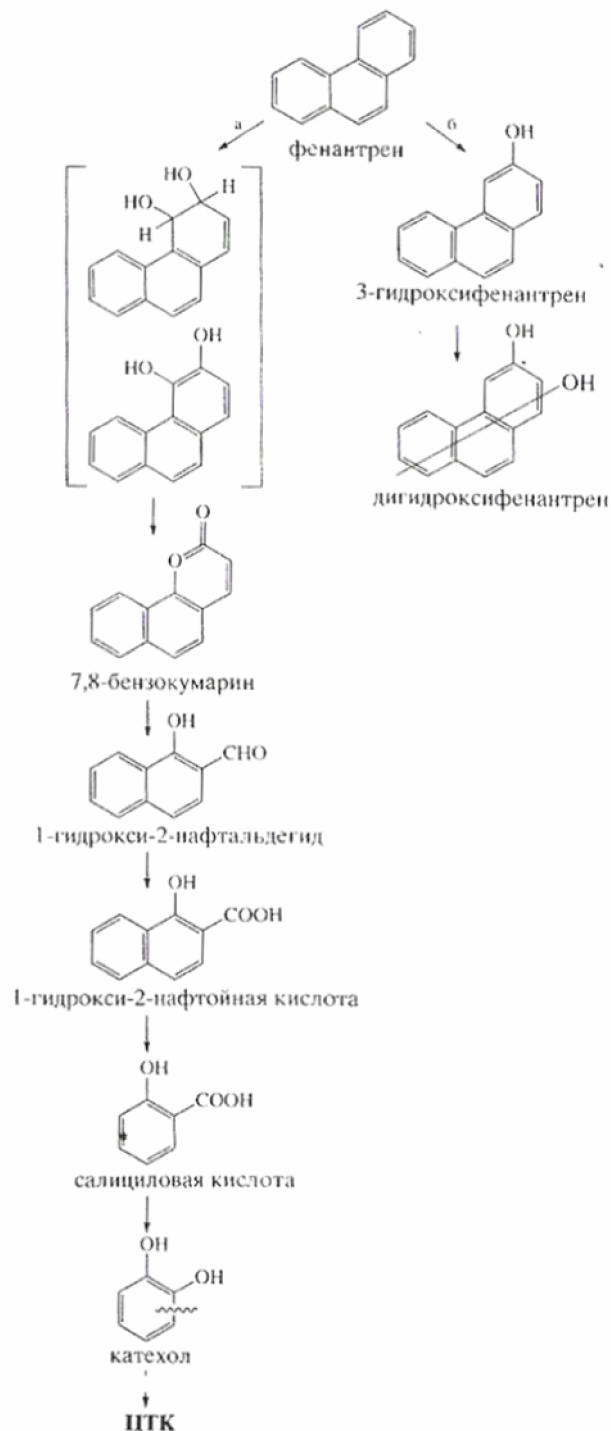


Рис. 5. Схема превращения фенантрена *R. oracus* 412 и *R. rhodnii* 135 [Ленёва и др., 2009]
В скобках показаны предполагаемые интермедиаты. ЦТК - цикл трикарбонных кислот.

Имеющиеся в литературе данные нельзя считать исчерпывающими, поскольку число потенциально возможных реакций деградации фенантрена и антрацена намного больше, чем известно в настоящее время, особенно с учетом дальнейшего метаболизма первичных продуктов окисления. В большинстве работ внимание сосредоточено на штаммах, осуществляющих как можно глубокую деградацию субстрата, вплоть до полной минерализации. Причина этого заключается как в цели исследований (разработка методов биодegradации), так и в методах выделения штаммов (накопительные культуры). Вероятно, при таком подходе бактерии, осуществляющие неполную деструкцию молекулы субстрата, ускользают из поля зрения.

В работе М.А. Бабошина [Бабошин и др., 2005] проверяли 46 коллекционных штаммов, что позволило отобрать два штамма, способных трансформировать фенантрен - *Rhodococcus rhodnii* 135 и *Pseudomonas fluorescens* 26К, еще один штамм был выделен из сточных вод тракторного завода. Штамм был идентифицирован как *Arthrobacter sp.* КЗ. Наибольшее количество метаболитов фенантрена дает штамм *P. fluorescens* 26К. Он трансформирует фенантрен с образованием фенантреона, 7,8-бензокумарина и продуктов расщепления одного из ароматических колец – 1-карбокси-2-нафтилбутановой, 1-карбокси-2-нафтилпропионовой, 1-карбокси-2-нафтойной кислот. Биоконверсия до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты происходит довольно быстро, а для дальнейшего превращения 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты до 2-гидрокси-нафталина и *орто*-фталата требуется определенный лаг-период.

При инкубации штамма *R. rhodnii* 135 на среде с фенантrenom обнаруживается единственный продукт трансформации фенантрена – 3-гидроксифенантрен (фенантренол).

Изучалось окисление фенантрена штаммом *Arthrobacter sp.* КЗ в неростовых условиях. Трансформация фенантрена осуществляется по пути моно- и дигидро-ксилирования, образующийся 3,4-дигидроксидигидрофенантрен метаболизируется через 7,8-бензокумарин в 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, которая также является ключевым продуктом, но в данном случае она быстро превращается в *о*-фталевую кислоту. Предложены пути превращения фенантрена этими штаммами, представленные на рис. 6 [Samunta, Chakrabarti, Jain, 1999; Бабошин и др., 2005].

Большим катаболическим потенциалом в отношении ароматических углеводов обладают бактерии рода *Pseudomonas*. Они способны полностью утилизировать или частично трансформировать такие соединения, как нафталин, фенантрен, флуорен и др. Структурное сходство нафталина и фенантрена и данные относительно ферментов,

участвующих в катаболизме этих соединений, позволили предположить возможность модификаций генетических систем биodeградации нафталина с приобретением ими способности детерминировать деградацию фенантрена.

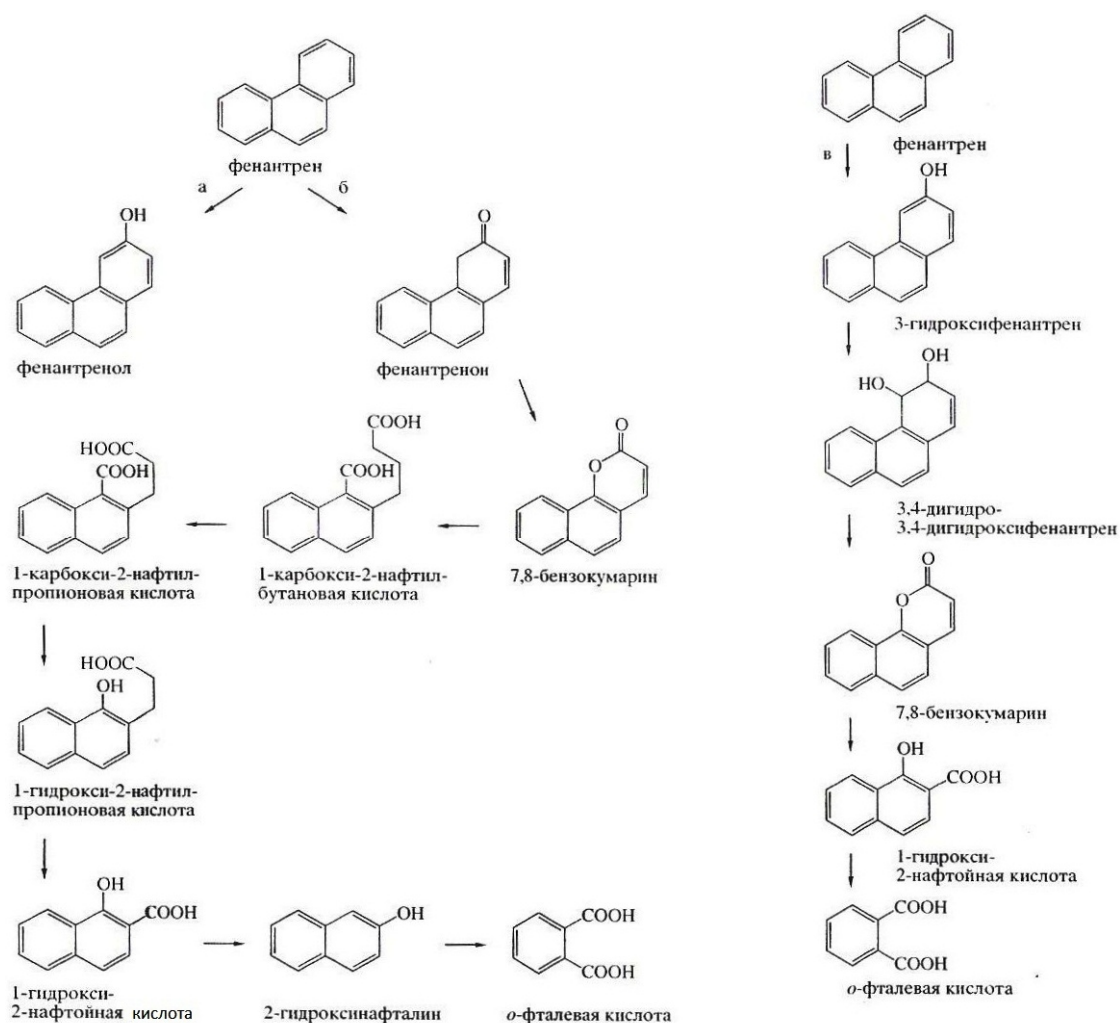


Рис. 6. Схема превращения фенантрена штаммами:
а - *R. rhodnii* 135, б - *P. fluorescens* 26K, в - *Arthrobacter* sp. K3 [Бабошин и др., 2005]

В работе И.А. Кошелевой [Кошелева и др., 2000] проверка 40 штаммов-деструкторов нафталина из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН показала, что все они способны к трансформации фенантрена, однако использовать этот субстрат в качестве единственного источника углерода и энергии оказались способны только три штамма. В результате культивирования на минеральной среде с фенантrenom в течение 1,5 мес. еще 5 штаммов *Pseudomonas putida* BS202, BS3701-N, BS590, BS3749 и BS575 приобрели способность к росту на фенантрене. Два независимо изолированных мутанта штамма BS202 были обозначены BS202-P1 и BS202-P2, производные других штаммов получили обозначения BS3701-P, BS590-P, BS3750 и BS575-P соответственно.

Исследуемые микроорганизмы были проверены на способность к росту на промежуточном продукте метаболизма фенантрена 1-гидрокси-2-нафтоате. Все мутантные штаммы приобрели способность к росту на этом соединении в концентрации 1 г/л, тогда как исходные штаммы не росли на этом субстрате.

При выращивании на фенантрена штамма BS3701-P на начальных этапах роста происходит образование 1-гидрокси-2-нафтоат, далее его количество уменьшается и происходит накопление двух новых продуктов: 2-гидрокси-1-нафтоат и дигидрокси-2-нафтоат. Также в культуральной жидкости обнаруживаются следовые количества 2-нафтола, который может образовываться в результате окисления 2-гидрокси-1-нафтоата. Таким образом, путь утилизации фенантрена штаммом BS3701-P отличается от описанных ранее. При выращивании BS3701-P на 1-гидрокси-2-нафтоате не наблюдается образования ни 2-гидрокси-1нафтоата, ни дигидрокси-2-нафтоата. Анализ продуктов утилизации 1-гидрокси-2-нафтоата позволил обнаружить следовые количества салицилата, который далее расщепляется до продуктов цикла Кребса.

Исследования других четырех штаммов показало, что при выращивании на фенантрена происходит образование как 1-гидрокси-2-нафтоата, так и 2-гидрокси-1-нафтоатау всех тестируемых организмов, дигидрокси-2-нафтоат не обнаруживался [Кошелева и др., 2000]. Биохимический путь утилизации фенантрена исследуемыми штаммами показан на рис. 7.

При биотрансформации антрацена, антрахинон является тупиковым соединением и часто накапливается в культуральной жидкости микроорганизмов. 6,7-бензокумарин является продуктом спонтанного замыкания кольца продукта экстрадиольного расщепления *цис*-1,2-дигидроксиантрацена, что предполагает обязательное существование и антрацен *цис*-1,2-дигидродиола – первого интермедиата в пути разложения антрацена, найденного у других микроорганизмов. Исходя из выделенных и идентифицированных в работе Е.П. Розановой, С.И. Кузнецова [Розанова, Кузнецов, 1974] интермедиатов трансформации антрацена штаммом *R. orcasus* 412, были предложены два пути частичной конверсии антрацена штаммом (рис. 8), включающие трансформацию антрацена в антрахинон и параллельный процесс последовательного превращения антрацена через *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидроантрацен, 1,2-дигидроантрацен в 6,7-бензокумарин [Herwijnen et al., 2003; Ленёва и др., 2009].

В работе ... [Бабошин и др., 2005] штаммы *Pseudomonas fluorescens* 26K и *Arthrobacter* sp. K3 проверяли еще и на способность трансформировать антрацен. Культурой *P. fluorescens* 26K он трансформируется значительно медленнее, чем фенантрена. Через 14 суток еще

остаётся 54 % неиспользованного субстрата. Основным продуктом трансформации антрацена является 2-гидрокси-3-нафтойная кислота.

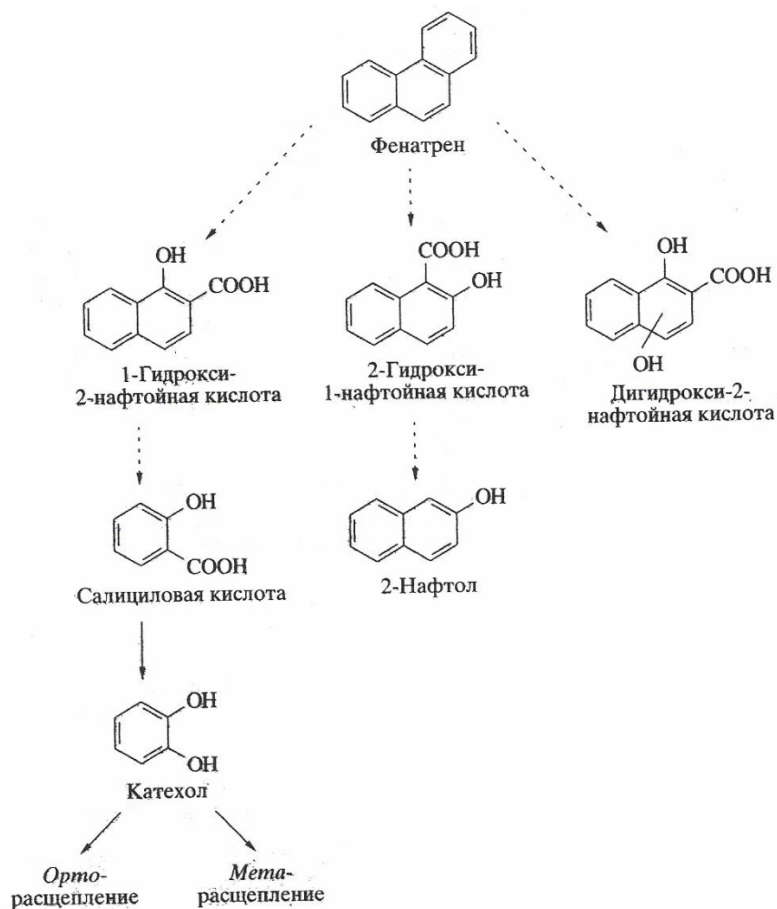


Рис. 7. Биохимический путь утилизации фенатрена исследуемыми штаммами *P. putida* [Кошелева и др., 2000]

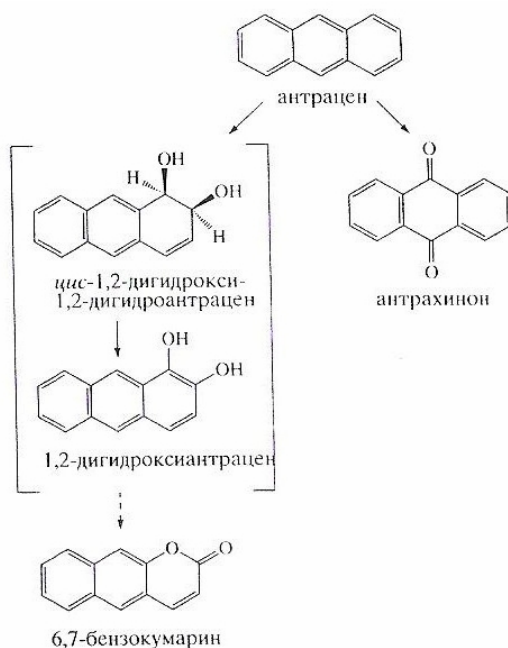


Рис. 8. Схема биоконверсии антрацена *R. oracus* 412 [Ленёва и др., 2009]

Обнаруживаются также 2-гидрокси-3-нафтилпропионовая и 2-гидрокси-3-нафтилбутановая кислоты, бензокумарин и 2,3-дигидроксинафталин и антрахинон, являющийся неметаболизируемым продуктом. В случае культуры *Arthrobacter sp.* К3 наблюдаются те же интермедиаты антрацена. На основании анализа структур выделенных интермедиатов и динамики их концентрации предложена схема превращения антрацена культурами *Pseudomonas fluorescens* 26К и *Arthrobacter sp.* К3 (рис. 9).

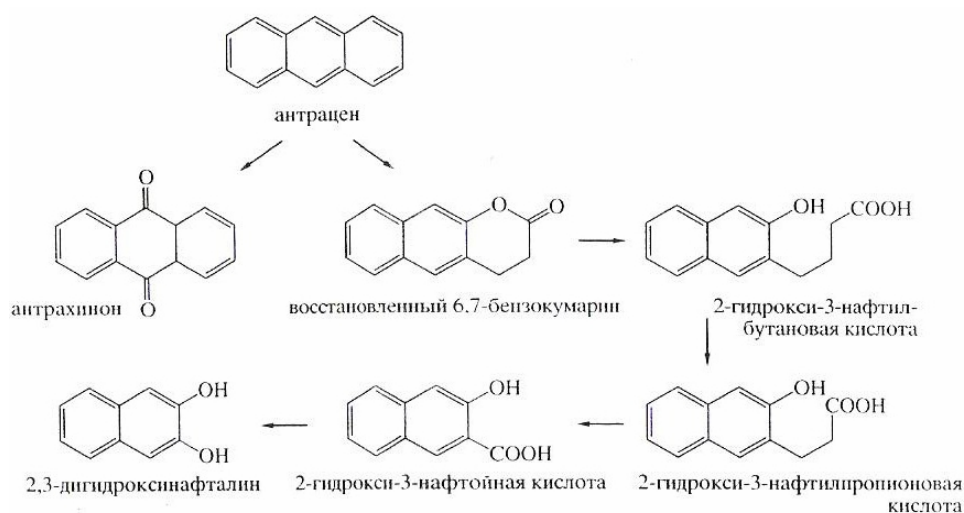


Рис. 9. Схема превращения антрацена штаммами *P.fluorescens* 26К и *Arthrobacter sp.* К3 [Бабошин и др., 2005]

Наибольший интерес представляют штаммы *Rhodococcus rhodnii* 135, осуществляющий одностадийное превращение фенантрена в гидроксированный продукт, и *Arthrobacter sp.* К3, трансформирующий фенантрен с высокими выходами продуктов. Поскольку среди выделенных продуктов есть целый спектр соединений, представляющих большой интерес в связи с трудностью их получения химическим путем (это прежде всего продукты гидроксирования, изомерные бензокумарины, гидрокси-нафтилалкановые кислоты), полученные данные послужат основой для целенаправленного биосинтеза соединений, ценных как химические препараты, антиоксиданты, полезных для медицины и косметики [Бабошин и др., 2005].

Деградация флуорена. Изучение превращения флуорена микроорганизмами проводилось как смешанными, так и чистыми культурами. Учитывая, что большую роль в детоксикации флуорена и ряда других ароматических углеводородов играют бактерии рода *Rhodococcus*, широко распространенных в окружающей среде, авторы работы [Chakrabarty, 1977; Grifoll et al., 1992; Финкельштейн и др., 2003] искали родоккоков, окисляющих флуорен. В результате исследований были отобраны четыре штамма *R.rhodochrous* 172, *R.opacus* 10a и 557, *R.rhodnii* 135, способных трансформировать флуорен. Штаммы

R.rhodochrous 172, *R.opacus* 10a и 557 окисляют флуорен при его использовании в качестве единственного источника углерода (12-25 мг/л) в среде за 10-14 суток полностью. При внесении 50-100 мг/л через 14 суток остается около 50 % исходного субстрата. Добавление казаминовых кислот или дрожжевого экстракта способствовало более быстрой убыли флуорена. Так, в вариантах с внесением казаминовых кислот или дрожжевого экстракта при исходной концентрации флуорена 100 мг/л в культуральной жидкости с *R.rhodochrous* 172 через 10 суток оставалось 37 % флуорена, в то время как без этих добавок оставалось около 50 % флуорена. При внесении в качестве дополнительного источника углерода сахарозы в концентрации 1-5 г/л штамм *R.rhodochrous* 172 полностью потреблял флуорен из культуральной жидкости в течение 2-5 суток. Отобранные штаммы трансформируют флуорен различными путями, представленными на рис. 10.

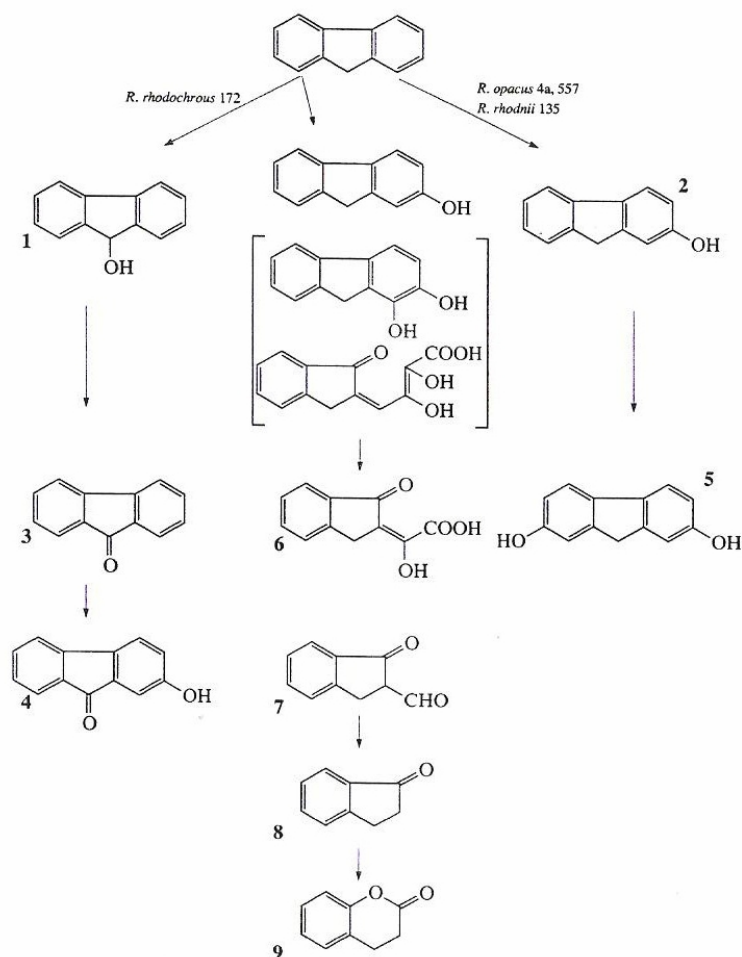


Рис. 10. Предполагаемые пути трансформации флуорена родококками [Финкельштейн и др., 2003]

1 – 9-гидроксифлуорен; 2 – 2-гидроксифлуорен; 3 – 9-флуоренон; 4 – гидроксифлуоренон; 5 – дигидроксифлуорен; 6 – β -инданон- β -гидроксиуксусная кислота; 7 – формилинданон; 8 – 1-инданон; 9 – 3,4-дигидрокумарин.

В работе З.И. Финкельштейна [Финкельштейн и др., 2003] образование 2,7-дигидроксифлуорена в процессе микробного разложения было обнаружено впервые.

Штамм *R.rhodochrous* 172 накапливает соединения 1, 3, 4. А интермедиаты 2, 6-9 присутствуют в следовых количествах, что свидетельствует об их дальнейшем превращении.

Совсем другая картина наблюдалась при трансформации флуорена *R.opacus* 4a и 557, *R.rhodnii* 135. Все три штамма трансформировали флуорен преимущественно в 2-гидрокси- и 2,7-дигидроксифлуорен. Такой путь превращения флуорена микроорганизмами ранее не был описан [Yang, Chen, Shiaris, 1994; Stringfellow, Aitren, 1995; Финкельштейн и др., 2003].

Окисление алкилзамещённых ароматических углеводов

Использование микроорганизмами алкилзамещённых ароматических углеводов для роста достаточно хорошо известно, хотя и не является обычным свойством микробных культур. Описано окисление толуола культурами *Nocardia* и *Pseudomonas*, *m*- и *p*- ксилолов, кумола, - *n* цимола, псевдокумола, 1- и 2-метилнафталинов различными видами рода *Pseudomonas* [Преобразование нефтей..., 1970; Скрябин, Головлёва, 1976].

Ассимиляция простейшего метилпроизводного бензола - толуола - свойственна небольшому числу микроорганизмов. Описано всего несколько культур *Nocardia* и *Pseudomonas*, способных потреблять это соединение как субстрат для роста. У разных организмов начальные этапы окисления толуола связаны или с первоочередным окислением метила, или гидроксигированием ядра [Скрябин, Головлёва, 1976].

В литературе очень редки сведения о микробиологическом окислении этилбензола. Известно, что в животных клетках этилбензол окисляется до метилфенилкарбинола. Недавно D.T. Gibson с сотрудниками установили два пути окисления этилбензола культурой *Pseudomonas putida* [Скрябин, Головлёва, 1976]:

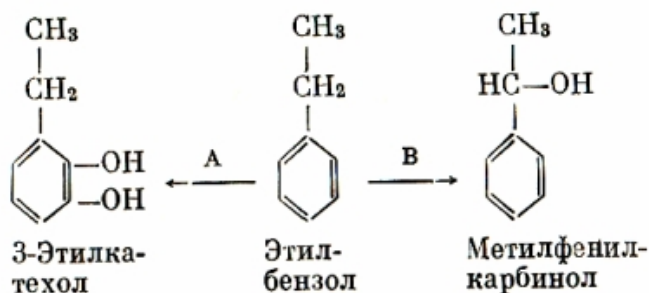


Рис. 11. Окисление этилбензола *Pseudomonas putida* [17]

В основном окисление идет по пути А, путь В - минорный и соответствует микросомальному окислению этилбензола [Скрябин, Головлёва, 1976].

Алкилнафталины как субстрат для роста микроорганизмов изучены значительно более поверхностно. Тем не менее, показано, что культуры *Pseudomonas* окисляют 1- и 2-метилнафталины [Преобразование нефтей..., 1970; Скрыбин, Головлёва, 1976].

Микроорганизм рода *Pseudomonas* E. Leibnitz с сотрудниками в опытах окислял ксиленолы до соответствующих оксикислот в процессе роста на среде с кукурузным экстрактом [Скрыбин, Головлёва, 1976]:

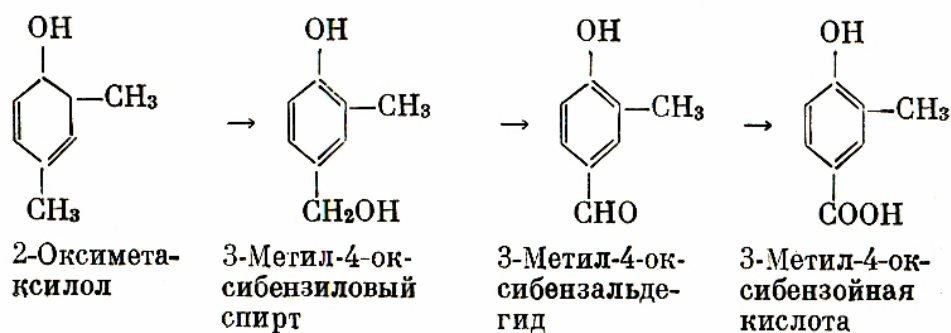


Рис. 12. Окисление 2-оксиметаксилонла бактериями рода *Pseudomonas* [Скрыбин, Головлёва, 1976]

Выход 3-метил-4-оксибензойной кислоты через 10-12 дней культивирования в микроаэрофильных условиях составлял 65 % от веса внесенного ксиленола [Скрыбин, Головлёва, 1976].

По данным М. Tanabe с соавторами, *Pseudomonas*, выделенный из резервуара с топливом, окисляла *n*-диэтилбензол до *n*-этилфенилуксусной кислоты с 20—30%-ным выходом (М. Tanabe, R.L. Dehn, М.Н. Куо, 1971). Алкилзамещенные ароматические углеводороды с длинной алифатической цепью также окисляются до кислот микроорганизмами родов *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*. При этом алифатическая цепочка служит источником углерода, фрагментируясь в процессе β-окисления, и редуцируется до одного, двух или трех углеродных атомов. Соответственно в культуральной среде накапливаются бензойная или фенилуксусная кислота, в некоторых случаях фенилакриловая. Ароматические кислоты могут образовываться таким образом в значительных количествах [Преобразование нефтей..., 1970; Розанова, Кузнецов, 1974; Скрыбин, Головлёва, 1976; Восстановление нефтезагрязнённых..., 1988].

Биогенное окисление нефтей различных по химическому составу

В процессе окисления нефти большую роль играет взаимное влияние углеводородных и неуглеводородных компонентов, входящих в её состав [Преобразование нефтей..., 1970].

При анаэробном и аэробном микробиальном разрушении независимо от типа нефтей повышается их плотность, увеличивается содержание смолисто-асфальтеновых соединений,

серы и уменьшается концентрация парафиновых углеводородов в системе. При этом отмечено остаточное накопление нефтяных углеводородов [Bayley, Morris, Broda, 1979; Чахмахчѐв, 1983; Boldrin, Tiehm, Fritzsche, 1993].

Снижение парафинового потенциала нефтей при биохимическом окислении происходит за счёт удаления из модельных систем *n*-алканов как веществ, преимущественно потребляемых микроорганизмами. Среди *n*-алканов бактериями лучше усваиваются низкомолекулярные соединения, что было доказано на углеводородах ряда от C₁₄ до C₂₀. Кроме того, не установлено какой-либо избирательности в биоокислении углеводородов с чётным или нечётным числом атомов С в молекуле [Yamada, Horiguchi Takahashi, 1965; Чахмахчѐв, 1983; Narayana, Don, 1985; Gasellas et al., 1998].

От физиологических особенностей каждого рода микроорганизмов зависит направленность процесса деструкции индивидуальных углеводородов и их смесей, обладающих различной степенью устойчивости к окислению (табл. 1).

Таблица 1

Классификация компонентов нефтей по их способности к биодegradации [12]

Группа	Отношение к воздействию микроорганизмов	Степень биодegradации, % к исходн. содержанию	Компоненты нефти
I	Высоко чувствительные	80-100	<i>n</i> -алканы; изо-алканы
II	чувствительные	60-80	цикланы с 6, 1, 5 и двумя кольцами; S-ароматика; моноароматика
III	умеренно чувствительные	45-60	циклоалканы с 3 и 4 кольцами; триароматические УВ
IV	устойчивые	30-45	тетраароматические УВ; стераны; тритерпаны; нефтяноароматические УВ
V	высокоустойчивые	0-30	пентаароматические УВ; асфальтены; смолы

Перечисленное выше, несомненно, осложняет получение однозначных результатов исследования закономерностей преобразования различных классов нефтей. Тем не менее, нефтяная микробиология располагает научно-исследовательскими работами, по результатам которых можно проследить геохимические изменения в составе нефтей при биодegradации [Преобразование нефтей..., 1970].

В 1960-1970-х гг. во ФГУП «ВНИГРИ» под руководством доктора биологических наук Т.Л. Симаковой были проведены многолетние комплексные детальные исследования

закономерностей изменения различных по химическому составу нефтей, некоторых их фракций и индивидуальных углеводородов при биодegradации. Биоценозы микроорганизмов были выделены из пластовых вод тех же скважин, из которых отбирались нефти для экспериментов [Преобразование нефтей..., 1970].

В результате этих исследований на большом фактическом материале было показано, что в результате биогенного окисления в аэробных условиях происходят значительные изменения в групповом углеводородном составе нефтей, приводящих к переходу одного геохимического типа нефтей в другой (рис. 13).

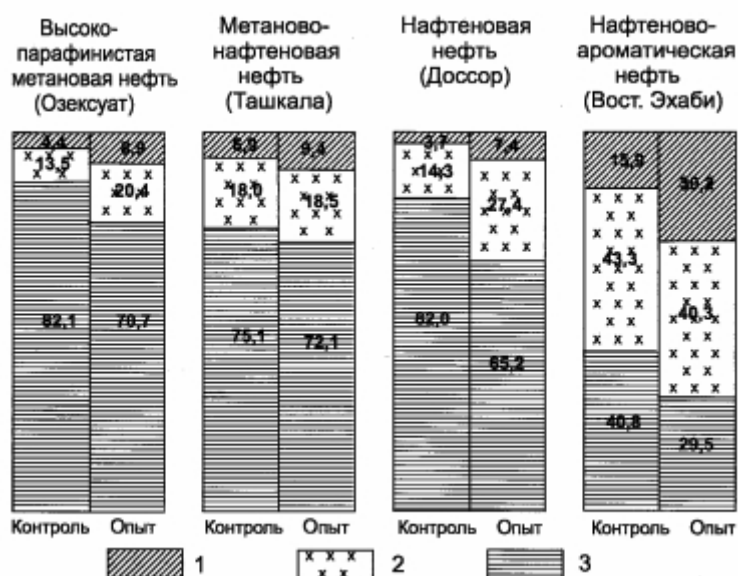


Рис. 13. Изменение группового химического состава нефтей под влиянием биогенного фактора [Преобразование нефтей..., 1970]

1 - асфальтово-смолистые компоненты; 2 - ароматические углеводороды; 3 - метановые и нафтеновые углеводороды.

Авторы [Преобразование нефтей..., 1970] пришли к следующим основным выводам:

- Нефть высокопарафинистая метанового типа под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов становится более тяжелой, повышается ее вязкость и содержание асфальтово-смолистых веществ, уменьшается содержание твердых парафинов. В групповом углеводородном составе ее происходит перераспределение в содержании отдельных групп углеводородов с уменьшением количества метановых (нормального и изостроения), а также ароматических углеводородов, входящих в состав керосиновых фракций. Общее содержание нафтеновых и ароматических углеводородов в нефти в целом возрастает. Таким образом, метановые нефти под влиянием биогенного фактора изменяются с приближением к метаново-нафтеновому типу.

- Нефть метаново-нафтенового типа под влиянием биогенного фактора изменяется в том же направлении, в результате чего она утяжеляется, в ней также повышается содержание асфальто-смолистых веществ, число омыления за счет эфирного числа, уменьшается количество твердых парафинов. Углеводородный состав ее изменяется, как и в метановой нефти, с уменьшением количества метановых углеводородов и ароматических углеводородов, но последние только в керосиновых фракциях. В общем метаново-нафтеновые нефти изменяются с увеличением в их составе содержания нафтеновых и ароматических углеводородов.

- Нефть нафтенового типа с высоким содержанием нафтеновых углеводородов в условиях биогенного окисления изменяется с повышением удельного веса, вязкости, содержания асфальто-смолистых компонентов и кислотного числа в маслах. В углеводородном составе ее уменьшается содержание метановых и нафтеновых углеводородов. В отличие от вышеуказанных типов нефтей количество ароматических углеводородов, входящих в состав керосиновых фракций, увеличивается. Таким образом, в результате жизнедеятельности микроорганизмов окисление нафтеновой нефти сопровождается увеличением в ее составе доли ароматических и уменьшением метановых и нафтеновых углеводородов.

- Окисление тяжелой нефти нафтеново-ароматического типа сопровождается дальнейшим ее осмолением со значительным повышением удельного веса и вязкости. В отличие от других изученных авторами типов нефтей, в результате биогенного окисления в маслах нафтеново-ароматической нефти повышается и кислотное, и эфирное число. В углеводородном составе данной нефти уменьшается содержание всех групп углеводородов: метановых, нафтеновых и ароматических - за счет повышения асфальто-смолистых компонентов.

Согласно вышеизложенному, при биодegradации исследованных типов нефтей в их групповом составе происходят серьезные изменения: возрастает в 1,4-2 раза относительное содержание асфальто-смолистых компонентов, в 1,02-1,9 раз ароматических углеводородов (исключение составляет нафтеново-ароматическая нефть). Относительное содержание метановых и метаново-нафтеновых углеводородов, по сравнению с контролем, снижается в 0,12-1,4 раз [Преобразование нефтей..., 1970].

Изменение группового состава нефтей необходимо учитывать при разработке технологии очистки почв от нефтяного загрязнения.

Практическая помощь нефтяной микробиологии в решении этой проблемы заключается в выделении чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов, установлении их родовой принадлежности и степени активности в окислении нефтей и нефтепродуктов.

Наиболее активные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов, окисляющие в значительной степени устойчивые к биodeградации компоненты нефти, являются наиболее перспективными для создания на их основе биопрепаратов по очистке почв от нефтяного загрязнителя.

Исследование же способности микроорганизмов окислять конкретные классы углеводородов в составе нефтей, как было показано выше, позволяет в перспективе создавать биопрепараты целевого назначения.

Таким образом, согласно опубликованным результатам теоретических и экспериментальных работ, установлена важная роль углеводородокисляющих микроорганизмов в процессах биодеструкции различных классов углеводородов нефти и нефтепродуктов [Rueter et al., 1994; Bruheim, Eimhjellen, 1998; Sukplanga, Thongmee, Roland, 1999].

Микроорганизмы способны окислять различные компоненты нефти, такие как алифатические, моно- и полиароматические углеводороды, гетероциклические, галогенированные и метилированные органические соединения.

Несомненно, результаты этих работ имеют большое практическое значение в решении проблемы очистки природных экосистем от нефтяного загрязнения.

Литература

Бабаев Э.Р., Мовсумзаде М.Э. Преобразование нефти в процессе её микробиологической деградации в почве // Башкирский химический журнал, 2009. – Т.16. - №3. – С. 80-87.

Бабошин М.А., Баскунов Б.П., Финкельштейн З.И., Головлев Е.Л., Головлева Л.А. Микробная трансформация фенантрена и антрацена // Микробиология, 2005. - №3. – С. 357-364.

Готтилак Г. Метаболизм бактерий. / Под редакцией Е.Н. Кондратьевой. Пер. с английского Г.П. Мирошниченко и Т.Ю. Переслени. – М.: Наука, 1976. – 322 с.

Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. Под редакцией М.А. Глазовской. – М.: Наука, 1988. – 253 с.

Киреева Н.А., Григориади А.С., Хайбулина Е.Ф. Ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязнённых почв // Вестник Башкирского университета, 2009. – Т.14. - №2. – С. 391-394.

Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Григориади А.С., Новосёлова Е.И., Багаутдинова Г.Г., Гареева А.Р., Лобастова Е.Ю. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления плодородия техногенно-загрязнённых почв // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2010. – Т.12. - №1(4). – С. 1023-1026.

Кодина Л.А. Геохимическая диагностика нефтяного загрязнения почвы // Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 112-122.

Кошелева И.А., Балашова Н.В., Измалкова Т.Ю., Филонов А.Е., Соколов С.Л., Слепенькин А.В., Боронин А.М. Деградация фенантрена мутантными штаммами – деструкторами нафталина // Микробиология, 2000. - №6. – С. 783-789.

Ленёва Н.А., Коломыцева М.П., Баскунов Б.П., Головлёва Л.А. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода *Rhodococcus* // Прикладная биохимия и микробиология, 2009. - №2. – С. 188-194.

Матенькова Е.А., Наплекова Н.Н. Состав микробных ассоциаций дерново-подзолистых почв с нефтяным загрязнением // Достижения науки и техники АПК, 2009. - №4. – С. 20-21.

Петриков К.В., Якишина Т.В., Власова Е.П., Пунтус И.Ф., Нечаева И.А., Самойленко В.А., Филонов А.Е. Изучение выживаемости микроорганизмов-деструкторов нефти родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* при различных способах хранения. Материалы международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», 2-6 июня 2008. - Минск, 2008. - С. 223-225.

Преобразование нефтей микроорганизмами // Тр. ВНИГРИ. Под редакцией Б.Г. Хотимского и А.И. Акопиан. – Л.: ВНИГРИ, 1970. - 281с.

Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Карпов А.В., Боронин А.М. Деградация фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельных почвенных системах // Микробиология, 2008. - №1. – С. 11-20.

Рогозина Е.А., Шиманский В.К. Некоторые теоретические аспекты восстановления нефтезагрязнённых почвенных экосистем // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2007. - №4. – <http://www.ngtp.ru/rub/7/012.pdf>

Рогозина Е.А., Андреева О.А., Жаркова С.И., Мартынова Д.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнений нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2010. – Т.5. - №4. – http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf

Розанова Е.П., Кузнецов С.И. Микрофлора нефтяных месторождений. – М.: Наука, 1974. – 197 с.

Скрябин Г.К., Головлёва Л.А. Использование микроорганизмов в органическом синтезе. – М.: Наука, 1976. – 332 с.

Успехи микробиологии. / Под редакцией А.А. Имшеницкого. – М.: «Наука», 1968а. – Т. 5. – 165 с.

Успехи микробиологии. / Под редакцией А.А. Имшеницкого. – М.: «Наука», 1968б. – Т. 15. – 225 с.

Финкельштейн З.И., Баскунов Б.П., Головлев Е.Л., Вервурт Ж., Ритъенс И.М., Бабошин М.А., Головлева Л.А. Превращения флуорена бактериями рода *Rhodococcus* // Микробиология, 2003. - №6. – С. 746-751.

Чахмахчёв В.А. Геохимия процесса миграции углеводородных систем. - М.: Недра, 1983. – 230 с.

Bayley S.A., Morris D.W., Broda P. The relationship of degradative and resistance plasmids of *Pseudomonas* belonging to the same incompatibility group // Nature, 1979. - Vol. 280. - P. 338-339.

Birnboim H.C., Doly J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Research. - 1979. - Vol. 7. - P. 1513-1519.

Boldrin B., Tiehm A., Fritzsche C. Degradation phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by *Mycobacterium* sp. // Applied and Environmental Microbiology. - 1993. - Vol. 59. - P. 1927-1930.

Bruheim P., Eimhjellen K. Chemically emulsified crude oil as substrate for bacterial oxidation: differences in species response // Canadian Journal of Microbiology. - 1998. -Vol. 44(2). - P. 195– 204.

Cerniglia CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons //Biodegradation. - 1992. –Vol. 3. - P. 351-368.

Chakrabarty A. M. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas* // Journal of Bacteriology. - 1977. - Vol. 112. - P. 815-823.

Churchill S.A., Harper J.P., Churchill P.F. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons // Applied and Environmental Microbiology. - 1999. -Vol. 65. - P. 549 – 552.

Crawford R.L., Frick T.D. Purification and properties of gentisate-1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis* // *Journal of Bacteriology*. - 1975. - Vol. 121. - P. 794-799.

Dua R.D., Meera S. Purification and characterisation of naphthalene oxygenase from *Corynebacterium renale* // *European J Biochem.* – 1981. - Vol. 120. - P. 461-465.

Dunn N.W., Gunsalus I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida* // *Journal of Bacteriology*. - 1973. - Vol. 114. – P. 974-979.

Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonads // *Biochemical Journal*. - 1965. - Vol. 98. - P. 819-831.

Feist C.F., Hegeman G.D. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida* of tangential pathways // *Journal of Bacteriology*. - 1969. - Vol. 100. - P. 869-877.

Fuenniayor S.L., Wild M., Boyles A.L., Williams P.A. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2 // *Journal of Bacteriology*. - 1998. - Vol. 180. - P. 2522-2530.

Gasellas M., Grifoll M., Sebate J., Solanas A.M. Isolation and characterization of a fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium // *Canadian Journal of Microbiology*. - 1998. - Vol. 44. - P. 734-742.

Grifoll M., Gasellas M., Bayona J., Solanas A.M. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1992. – Vol. 58. - P. 2910-2917.

Harayama S., Don R. H. Catabolic plasmids: their analysis and utilization in the manipulation of bacterial metabolic activities // *Genetic engineering: principles and methods*. - 1985. - Vol. 7. - P. 283-307.

Herwijnen R., Sprigael D., Slot P., Govers H., Parsons J. Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB 501T proceeds via a novel pathway, through o-phthalic acid // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - Vol. 69. - P. 186-190.

Kalb V.F., Bernlohr R.W. A new spectrophotometric assay for protein in cell extract // *Analytical Biochemistry*. - 1977. - Vol. 82. – P. 362-366.

Kastner M., Breuer-Jammali M., Mahro H. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 1994. - Vol. 41. - P. 267-273.

Kiyohara H., Nagao K., Nomi R. Degradation of phenanthrene through o-phthalic acid by an *Aeromonas* sp. // *Agricultural and biological chemistry*. - 1976. - Vol.40. - P. 1075-1082.

Kiyohara H., Nagao K. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria // *Journal of General Microbiology*. - 1978. - Vol. 105. - P. 69-75.

Kiyohara H., Nagadd K., Yana K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1982. - Vol. 43. - P. 454-457.

Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. - Vol. 67. - P. 1476-1483.

Rueter P., Rabus R., Wilkest H., Aeckersberg F., Rainey Fred A., Holger W. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria // *Nature*. - 1994. -Vol. 372. - P. 455 – 458.

Samunta S.K., Chakrabarti A.K. Jain R.K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 1999. - Vol. 53. - P. 98-107.

Samanta S.K., Singh O.V. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation // *Trends in Biotechnology*. - 2002. - Vol. 20. - P. 243-248.

Saemori A., Nakajima K., Kiirane R., Nakamura Y. Production of 3,4-dihydroxyphthalate from phthalate by a membrane-bound two enzyme system from *Rhodococcus erythropolis* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 1995. - Vol. 43. - P. 470-472.

Stringfellow W., Aitren M.D. Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonas* // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1995. - Vol. 61. - P. 357-362.

Sukplanga P., Thongmee A., Velaa G. Roland. Degradation of Linseed Oil Vapors by Soil Bacteria in Tricking Biofilters // *Bioremediation Journal*. - 1999. -Vol. 3. - P. 189-200.

Vetrova A.A., Ovchinnikova A.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. An enhanced biodegradation of crude oil by Pseudomonas plasmid-bearing strains in model soil systems // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2010. - Vol. 46. - P. 719-725.

Yamada K., Horiguchi S., Takahashi J. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms // Agricultural and biological chemistry. - 1965. - Vol. 29. - P. 943-948.

Yang Y., Chen R.F., Shiaris M.P. Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from Pseudomonas putida NCIB9816 // Journal of Bacteriology. - 1994. - Vol. 176. - P. 2158-2154.

Timergazina I.F., Perekhodova L.S.

All-Russia Petroleum Research Exploration Institute (VNIGRI), Saint Petersburg, Russia, ins@vnigri.ru

BIOLOGICAL OXIDATION OF OIL AND PETROLEUM PRODUCTS USING HYDROCARBON-OXIDIZING MICROORGANISMS

An analysis of published data concerning biological oxidation of various classes of hydrocarbons and petroleum products using hydrocarbon-oxidizing microorganisms has been carried out. The different mechanisms of hydrocarbon bio-oxidation have been discussed. The biogenic oxidation of oils of different chemical composition has been studied.

Key words: hydrocarbons, oxidation mechanism, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, oil, petroleum products.

References

Babaev E.R., Movsumzade M.E. *Preobrazovanie nefii v protsesse ee mikrobiologicheskoy degradatsii v pochve* [Transformation of oil in the process of microbial degradation in soil]. Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal, 2009, vol. 16, no. 3, pp. 80-87.

Baboshin M.A., Baskunov B.P., Finkel'shteyn Z.I., Golovlev E.L., Golovleva L.A. *Mikrobnaya transformatsiya fenantrena i antratsena* [Microbial transformation of phenanthrene and anthracene]. Mikrobiologiya, 2005, no. 3, pp. 357-364.

Gottshlak G. *Metabolizm bakteriy* [Metabolism of bacteria]. Editor E.N. Kondrat'eva. Moscow: Nauka, 1976, 322 p.

Vosstanovlenie neftezagryaznennykh pochvennykh ekosistem [Recovery of contaminated soil ecosystems]. Editor M.A. Glazovskaya. Moscow: Nauka, 1988. – 253 s.

Kireeva N.A., Grigoriadi A.S., Khaybulina E.F. *Assotsiatsii uglevodorodokislyayushchikh mikroorganizmov dlya bioremediatsii neftezagryaznennykh pochv* [Association of hydrocarbon-oxidizing microorganisms for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soils]. Vestnik Bashkirskogo universiteta, 2009, vol. 14, no. 2, pp. 391-394.

Kireeva N.A., Vodop'yanov V.V., Grigoriadi A.S., Novoselova E.I., Bagautdinova G.G., Gareeva A.R., Lobastova E.Yu. *Effektivnost' primeneniya biopreparatov dlya vosstanovleniya plodorodiya tekhnogennozagryaznennykh pochv* [The effectiveness of biological products for restoration of fertility of soils contaminated with technogenic]. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk, 2010, vol. 12, no. 1(4), pp. 1023-1026.

Kodina L.A. *Geokhimicheskaya diagnostika neftyanogo zagryazneniya pochvy* [Geochemical diagnostics of oil pollution of soil]. Vosstanovlenie neftezagryaznennykh pochvennykh ekosistem. Moscow: Nauka, 1988, pp. 112-122.

Kosheleva I.A., Balashova N.V., Izmailova T.Yu., Filonov A.E., Sokolov S.L., Slep'kin A.V., Boronin A.M. *Degradatsiya fenantrena mutantnymi shtammami – destruktorami naftalina* [Degradation of phenanthrene mutant by strains - destructors of naphthalene]. Mikrobiologiya, 2000, no. 6, pp. 783-789.

Leneva N.A., Kolomytseva M.P., Baskunov B.P., Golovleva L.A. *Degradatsiya fenantrena i antratsena bakteriyami roda Rhodococcus* [Degradation of phenanthrene, anthracene by bacteria of the *Rhodococcus* genus]. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya, 2009, no. 2, pp. 188-194.

Maten'kova E.A., Naplekova N.N. *Sostav mikrobykh assotsitsiy dervno-podzolistykh pochv s neftyanym zagryazneniem* [Composition of microbial associations of turf-podzolic soils with oil pollution]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK, 2009, no. 4, pp. 20-21.

Petrikov K.V., Yakshina T.V., Vlasova E.P., Puntus I.F., Nechaeva I.A., Samoilenko V.A., Filonov A.E. *Izuchenie vyzhivaemosti mikroorganizmov-destruktorov nefti rodov Pseudomonas i Rhodococcus pri razlichnykh sposobakh khraneniya* [Study of survival of microorganisms-destructors of oil of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genus using various methods of storage]. Proceedings of International Conference «Sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya mikrobiologii i biotekhnologii» [Current status and prospects of development of microbiology and biotechnology]. Minsk, 2008, pp. 223-225.

Preobrazovanie neftey mikroorganizmami [Transformation of oils by microorganisms]. Trudy VNIGRI. Editor B.G. Khotimskiy and A.I. Akopian. Leningrad: VNIGRI, 1970, 281p.

Puntus I.F., Filonov A.E., Akhmetov L.I., Karpov A.V., Boronin A.M. *Degradatsiya fenantrena bakteriyami rodov Pseudomonas i Burkholderia v model'nykh pochvennykh sistemakh* [Degradation of phenanthrene by bacteria of *Pseudomonas* and *Burkholderia* genus in model soil systems]. Mikrobiologiya, 2008, no. 1, pp. 11-20.

Rogozina E.A., Shimanskiy V.K. *Nekotorye teoreticheskie aspekty vosstanovleniya neftezagryaznennykh pochvennykh ekosistem* [Some theoretical aspects of the contaminated soil ecosystems recovery]. Neftegazovaya geologiya. Teoriya i praktika, 2007, no. 4, available at: <http://www.ngtp.ru/rub/7/012.pdf>

Rogozina E.A., Andreeva O.A., Zharkova S.I., Martynova D.A. *Sravnitel'naya kharakteristika otechestvennykh biopreparatov, predlagaemykh dlya ochistki pochv i gruntov ot zagryazneniy nef'tyu i nefteproduktami* [Comparative characteristic of native biopreparations proposed for cleanup of soils and grounds from pollution]. Neftegazovaya geologiya. Teoriya i praktika, 2010, vol. 5, no. 4, available at: http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf

Rozanova E.P., Kuznetsov S.I. *Mikroflora neftyanykh mestorozhdeniy* [The microflora of oil fields]. Moscow: Nauka, 1974, 197 p.

Skryabin G.K., Golovleva L.A. *Ispol'zovanie mikroorganizmov v organicheskom sinteze* [The use of microorganisms in organic synthesis]. Moscow: Nauka, 1976, 332 p.

Uspekhi mikrobiologii [Successes of Microbiology]. Editor A.A. Imshenitskiy. Moscow: Nauka, 1968, vol. 5, 165 p.

Uspekhi mikrobiologii [Successes of Microbiology]. Editor A.A. Imshenitskiy. Moscow: Nauka, 1968, vol. 15, 225 p.

Finkel'shteyn Z.I., Baskunov B.P., Golovlev E.L., Vervurt Zh., Rit'ens I.M., Baboshin M.A., Golovleva L.A. *Prevrashcheniya fluorena bakteriyami roda Rhodococcus* [Transformation of fluorene by bacteria of the *Rhodococcus* genus]. Mikrobiologiya, 2003, no. 6, pp. 746-751.

Chakhmakhchev V.A. *Geokhimiya protsessa migratsii uglevodorodnykh sistem* [Geochemistry of hydrocarbon systems' migration]. Moscow: Nedra, 1983, 230 p.

Bayley S.A., Morris D.W., Broda P. The relationship of degradative and resistance plasmids of *Pseudomonas* belonging to the same incompatibility group. *Nature*, 1979, vol. 280, pp. 338-339.

Birnboim H.C., Doly J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 1979, vol. 7, pp. 1513-1519.

Boldrin V., Tihm A., Fritzsche C. Degradation phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, pp. 1927-1930.

Bruheim P., Eimhjellen K. Chemically emulsified crude oil as substrate for bacterial oxidation: differences in species response. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, vol. 44(2), pp. 195-204.

Cerniglia SE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 1992, vol. 3, pp. 351-368.

Chakrabarty A. M. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 1977, vol. 112, pp. 815-823.

Churchill S.A., Harper J.P., Churchill P.F. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, pp. 549-552.

Crawford R.L., Frick T.D. Purification and properties of gentisate-1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 121, pp. 794-799.

Dua R.D., Meera S. Purification and characterisation of naphthalene oxygenase from *Corynebacterium renale*. *European J Biochem*, 1981, vol. 120, pp. 461-465.

Dunn N.W., Gunsalus I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 1973, vol. 114, pp. 974-979.

Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonads*. *Biochemical Journal*, 1965, vol. 98, pp. 819-831.

Feist C.F., Hegeman G.D. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida* of tangential pathways. *Journal of Bacteriology*, 1969, vol. 100, pp. 869-877.

Fuenniayor S.L., Wild M., Boyles A.L., Williams P.A. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to centisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *Journal of Bacteriology*, 1998, vol. 180, pp. 2522-2530.

Gasellas M., Grifoll M., Sebaste J., Solanas A.M. Isolation and characterization of a fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, vol. 44, pp. 734-742.

Grifoll M., Gasellas M., Bayona J., Solanas A.M. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, vol. 58, pp. 2910-2917.

Harayama S., Don R. H. Catabolic plasmids: their analysis and utilization in the manipulation of bacterial metabolic activities. *Genetic engineering: principles and methods*, 1985, vol. 7, pp. 283-307.

Herwijnen R., Sprigael D., Slot P., Govers H., Parsons J. Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB 501T proceeds via a novel pathway, through *o*-phthalic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, vol. 69, pp. 186-190.

Kalb V.F., Bernlohr R.W. A new spectrophotometric assay for protein in cell extract. *Analytical Biochemistry*, 1977, vol. 82, pp. 362-366.

Kastner M., Breuer-Jammali M., Mahro H. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, vol. 41, pp. 267-273.

Kiyohara H., Nagao K., Nomi R. Degradation of phenanthrene through *o*-phthalic acid by an *Aeromonas* sp. *Agricultural and biological chemistry*, 1976, vol. 40, pp. 1075-1082.

Kiyohara H., Nagao K. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1978, vol. 105, pp. 69-75.

Kiyohara H., Nagao K., Yana K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 43, pp. 454-457.

Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, pp. 1476-1483.

Rueter P., Rabus R., Wilkest H., Aeckersberg F., Rainey Fred A., Holger W. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 1994, vol. 372, pp. 455-458.

Samunta S.K., Chakrabarti A.K., Jain R.K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 53, pp. 98-107.

Samanta S.K., Singh O.V. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, pp. 243-248.

Saemori A., Nakajima K., Kiirane R., Nakamura Y. Production of 3,4-dihydroxyphthalate from phthalate by a membrane-bound two enzyme system from *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, vol. 43, pp. 470-472.

Stringfellow W., Aitren M.D. Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonas*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, pp. 357-362.

Sukplanga P., Thongmea A., Velaa G. Roland. Degradation of Linseed Oil Vapors by Soil Bacteria in Tricking Biofilters. *Bioremediation Journal*, 1999, vol. 3, pp. 189-200.

Vetrova A.A., Ovchinnikova A.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. An enhanced biodegradation of crude oil by *Pseudomonas* plasmid-bearing strains in model soil systems. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46, pp. 719-725.

Yamada K., Horiguchi S., Takahashi J. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. *Agricultural and biological chemistry*, 1965, vol. 29, pp. 943-948.

Yang Y., Chen R.F., Shiaris M.P. Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB9816. *Journal of Bacteriology*, 1994, vol. 176, pp. 2158-2154.