

4  
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>



# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Хоментовский А.С.



Лазаренко Ф.М.

2024

**УЧРЕДИТЕЛЬ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2024

УДК. 577.29

А.С. Бурлаченко<sup>1,3</sup>, Л.Г. Данилов<sup>2,3</sup>, О.С. Глотов<sup>1,3</sup>

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ НЕФТЯНЫХ ОБРАЗЦОВ

<sup>1</sup> ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> БУ ВО «Сургутский государственный университет», Сургут, Россия.

*Цель.* Оптимизация метода выделения бактериальной ДНК из сложных образцов, таких как нефть, керн, шлам, буровой раствор.

*Материалы и методы.* Для работы использовали 30 образцов нефти, керна, шлама, бурового раствора. Для сравнительного анализа были использованы пять методов выделения ДНК: колоночный метод с использованием набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil; метод с использованием магнитных частиц «Meta Soil» Raissoil; фенол-хлороформный метод; выделение набором «Meta Soil» Raissoil с заменой оригинальных буферов производителя на буферы из литературных данных; метод с использованием набора «RIBO-prep».

*Результаты.* Более чем для 50% образцов наибольшую эффективность продемонстрировал метод выделения ДНК с набором «Meta Soil» Raissoil с заменой оригинальных буферов производителя на буферы из литературных данных. Однако для образцов нефти более высокие значения концентраций ДНК получены при выделении фенол-хлороформным методом. Самым неподходящим методом для выделения ДНК из бактериальных культур нефтяных образцов оказался набор «RIBO-prep», у 15 образцов из 30 ДНК выделить не удалось.

*Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что метод выделения ДНК с набором «Meta Soil» Raissoil с заменой оригинальных буферов оказался достаточно эффективным, вероятно, по причине введения дополнительного этапа по связыванию гуминовых кислот и других органических примесей.

*Ключевые слова:* нефть, керн, шлам, буровой раствор, выделение ДНК, бактерии.

---

---

A.S. Burlachenko<sup>1,3</sup>, L.G. Danilov<sup>2,3</sup>, O. S. Glotov<sup>1,3</sup>

## OPTIMIZATION OF BACTERIAL DNA EXTRACTION METHOD FROM OIL SAMPLES

<sup>1</sup> Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Surgut State University, Surgut, Russia

*Aim.* Optimization of the method of bacterial DNA extraction from complex samples such as oil, core, cuttings, drilling mud.

*Materials and methods.* We used 30 samples of oil, core, cuttings, drilling mud. Five methods of DNA extraction were used for comparative analysis: column method using FastDNA™ SPIN Kit for Soil; method using magnetic particles “Meta Soil” Raissoil; phenol-chloroform method; extraction using “Meta Soil” Raissoil kit with replacement of original buffers of the manufacturer with buffers from literature data; method using “RIBO-prep” kit.

*Results.* For more than 50% of the samples the highest efficiency was demonstrated by

the method of DNA extraction with the kit “Meta Soil” Raissoil with replacement of the original buffers of the manufacturer with buffers from literature data. However, for the oil samples, higher values of DNA concentrations were obtained with the phenol-chloroform method. The most unsuitable method for DNA isolation from bacterial cultures of oil samples was the “RIBO-prep” kit, 15 out of 30 samples failed to isolate DNA.

*Conclusion.* The obtained data indicate that the method of DNA extraction with the “Meta Soil” Raissoil kit with the replacement of the original buffers was quite effective, probably due to the introduction of an additional step to bind humic acids and other organic impurities.

*Key words:* oil, core, cuttings, drilling mud, DNA extraction, bacteria.

## Введение

В настоящее время углеводородные биомаркеры широко используются для определения источника нефти и термической зрелости, оценки вертикальной и латеральной непрерывности пласта, прогнозирования распределения и качества нефти в коллекторах [1, 2]. По этой причине для решения прикладных задач нефтяной промышленности необходимо углублять понимание взаимосвязи между нефтяными системами и микробиологическими объектами.

Известно, что нефть и различные нефтяные образцы, такие как керн, шлам, буровой раствор являются неблагоприятной средой для жизни. Однако последние исследования доказали, что микроорганизмы некоторых таксонов, например: *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Bacillales*, *Sphingobium* и *Burkholderia*, присутствуют в нефти и сопутствующих породах [3, 4]. Бактерии также были обнаружены в сырой нефти [5]. Кроме того, существуют микробы, устойчивые к экстремальным условиям – очень высоким и очень низким температурам. Например, в Японии бактерии были обнаружены в нефтяном месторождении с очень высокой температурой [6], а в Канаде – в мезотермальном нефтяном месторождении [7].

Нефтяная среда представляет собой смесь гидрофильной и гидрофобной фаз. В одном из исследований в сырой нефти были обнаружены бактерии *Archaea* и бактерии-деструкторы углеводов, а в водной фазе - микроорганизмы *Deltaproteobacteria* [8]. Обнаружение живых организмов в нефти меняет наше представление о функциональных возможностях микроорганизмов, поскольку нефть является высокогидрофобной средой [9].

Известно также, что для нефтяных месторождений характерно наличие нескольких нефтеносных пластов разной глубины. Очевидно, что среда для микроорганизмов будет отличаться из-за изменения давления и температуры. То есть характеристики бактерий могут варьировать [10, 11].

В нефтегазовой промышленности проблемы микробиологических исследований встречаются в различных областях, таких как окисление или ухудшение проницаемости пласта, коррозия оборудования, снижение нефтеотдачи и т.д. Совсем недавно различными исследовательскими группами были разработаны и использованы технологии секвенирования для изучения микробиологии нефтяных пластов [12].

Одним из наиболее распространенных способов определения микробного состава является метатаксономия, при которой определяется нуклеотидная последовательность маркерных генов (в частности, 16S рРНК) микроорганизмов. Таксономический состав образцов в данном случае определяется на основе сходства последовательностей в имеющихся базах данных. Ген 16S рРНК используется в качестве маркера для бактерий и архей. В генах 16S есть так называемые гипервариабельные области, такие последовательности могут быть использованы для определения таксономического ранга, их фланкирующие консервативные области могут служить мишенью для праймеров [13].

Полученные новые данные о микроорганизмах могут помочь в изучении естественного процесса биodeградации нефти, характеристике свойств нефти, а также быть полезны в процессах нефтедобычи.

Стоит отметить, что на сегодняшний день не описаны эффективные методы для выделения бактериальной ДНК из нефтяных образцов, что обуславливает актуальность исследования.

Целью работы явилась оптимизация метода выделения ДНК из сложных образцов, таких как нефть, керн, шлам, буровой раствор.

### **Материалы и методы**

Для реализации настоящего исследования были получены 30 образцов нефти, керна, шлама, бурового раствора.

Для проведения сравнительного анализа выбраны 5 вариантов выделения ДНК, некоторые из которых включали в себя комбинацию существующих методов выделения бактериальной ДНК:

1. Колоночный метод с использованием набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil.
2. Метод с использованием магнитных частиц «Meta Soil» Raissoil.
3. Фенол-хлороформный метод.
4. Выделение набором «Meta Soil» Raissoil с заменой оригинальных буферов производителя на буферы из литературных данных.
5. Метод с использованием набора «RIBO-prep».

Перед началом работы с каждым из методов была проведена предварительная подготовка образцов с использованием изооктана. Это сделано для того, чтобы удалить из образцов гуминовые кислоты и органические вещества, которые являются ингибиторами ДНК-полимеразы. Также стоит отметить, что образцы нефти и бурового раствора представляют собой тягучую смесь. Образцы керна и шлама являются твердыми, поэтому были предварительно измельчены в порошок.

Метод пробоподготовки образцов состоял из следующих этапов:

1. В стерильных фальконах объемом 50 мл взвешивали суспензии образцов керна, шлама, бурового раствора и нефти в количестве 20 грамм.
2. В каждый фалькон с образцами добавляли изооктан массой 20 грамм.
3. Каждый из образцов тщательно перемешивался.
4. Образцы центрифугировали при +4 °С в течение 60 минут при максимальных оборотах для разделения осадка и жидкой фазы.
5. После центрифугирования надосадочную жидкость осторожно сливали; в осадке содержалась ДНК.
6. В фальконы к осадку добавляли от 15 до 20 граммов изооктана для достижения одинаковой массы образцов.
7. Каждый из образцов тщательно перемешивался.
8. Образцы центрифугировали при +4 °С в течение 30 минут при максимальных оборотах.
9. Повтор шагов 5-8 до получения прозрачной надосадочной жидкости. Количество промывок каждого образца варьировалось от 5 до 17 раз.

Затем отбирали осадок каждого из образцов в количестве до 1 грамма в зависимости от необходимого количества образца, описанного в протоколе производителя. Выделение бактериальной ДНК методами 1, 2, 5 были проведены в соответствии с протоколами производителя. Выделение ДНК методом №3 было проведено в соответствии с исследованием по оптимизации протокола для выделения ДНК из различных почв и других гуминовых веществ [14].

Для выделения ДНК методом №4 использовали протокол производителя «Meta Soil» Raissoil, в котором был изменен состав буферов производителя. Известно, что соли фосфата кальция образуют нерастворимые комплексы с гуминовыми кислотами [14]. В нефтяных образцах их достаточно много и для дополнительного удаления этих веществ в буфер для лизиса из набора «Meta Soil» Raissoil был добавлен раствор, содержащий фосфат в concentra-

ции 1 М. В дальнейшем этапе был добавлен раствор соли  $\text{CaCl}_2$  с концентрацией 150мМ, образующий с фосфатами нерастворимые соли [15].

Также известно, что катионный детергент СТАВ при концентрации NaCl не более 600 мМ образует комплекс с молекулами ДНК, который легко осаждается при центрифугировании [14, 15]. Кроме того, использование данного раствора стабилизирует молекулы ДНК, делая их менее восприимчивыми к различным соединениям, которые могут потенциально повредить нуклеиновую кислоту [14]. Таким образом, метод №4 включает в себя сочетание методов 2, 3 и состоит из следующих этапов:

*Лизис.*

1. В пробирки объемом 2 мл помещали 150 мг полученного осадка.
2. К каждой навеске добавляли 400 мкл деионизированной воды.
3. К образцам добавляли 400 мкл лизирующего буфера (с заранее внесенным раствором растворимой соли, содержащей фосфат-ион с конечной концентрацией фосфат-ионов в буфере 1М), 20 мкл Протеиназы К и стерильные абразивные шарики.
4. Пробирки помещали в гомогенизатор и встряхивали при максимальной скорости 2 раза в течение 30 секунд.
5. Пробирки инкубировали в термостате при температуре 56°C в течение 2 часов, периодически перемешивая.
6. Капли сбрасывали с помощью кратковременного центрифугирования.
7. Пробирки помещали на лед или в холодный штатив и инкубировали в течение 3 минут. В случае отсутствия охлаждающих элементов инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут до полного остывания смеси.

*Осаждение гуминовых кислот.*

1. В пробирку добавляли 500 мкл 150мМ раствора хлорида кальция и 350 мкл связывающего буфера.
2. Содержимое пробирок перемешивали, переворачивая их 8-10 раз.
3. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут.
4. Центрифугировали на максимальной скорости в течение 5 минут.
5. Перенесли супернатант в новые пробирки.

*Осаждение ДНК из супернатанта.*

1. В пробирки добавляли равный объем раствора следующего состава: 5% СТАВ, 3% Triton X100, 50 мМ ЭДТА, и тщательно перемешивали.
2. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут.

3. Комплекс ДНК-СТАВ осаждали центрифугированием в течение 5 минут на максимальной скорости.

4. Удалили супернатант из пробирок.

5. К осадку добавляли 500 мкл раствора следующего состава: 400 мМ NaCl, 1.5% СТАВ, 20 мМ ЭДТА, и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая.

6. Осаждали центрифугированием в течение 5 мин на максимальной скорости.

7. Удаляли супернатант.

*Освобождение ДНК.*

1. К осадку добавляли 400 мкл 1М раствора хлорида натрия и инкубировали при комнатной температуре, периодически интенсивно встряхивая.

2. К раствору добавляли равный объем смеси хлороформа-изоамилового спирта (24:1), и после интенсивного встряхивания разделяли водную и органическую фазы центрифугированием на максимальной скорости в течение 5 мин.

3. Переносили водную фазу в новую пробирку.

*Сорбция ДНК.*

1. В пробирки добавляли 50 мкл магнитных частиц и 240 мкл изопропанола; пробирки интенсивно перемешивали на вортексе.

2. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая.

3. Капли сбрасывали с помощью кратковременного центрифугирования.

4. Инкубировали на магнитном штативе в течение 5 минут.

5. Аккуратно, не задевая осадок частиц, удаляли супернатант.

Далее следовали этапы из протокола «Meta Soil» Raissoil, начиная с этапа «Промывка НК».

### **Результаты и обсуждение**

После проведения всех этапов выделения пятью методами каждого из 30 образцов были измерены полученные концентрации ДНК, значения которых представлены в таблице 1.

Из полученных данных видно, что для более чем 50% образцов наибольшую эффективность продемонстрировал метод №4. Однако для образцов нефти (№№ 15 и 30) более высокие значения концентраций ДНК получены при выделении фенол-хлороформным методом. Самым неподходящим методом для выделения ДНК из бактериальных культур нефтяных об-

разцов оказался набор «RIBO-prep», у 15 образцов из 30 ДНК выделить не удалось.

Таблица 1 - Сравнение концентраций ДНК, выделенной различными методами

№	Образец*	Метод 1, С, нг/мкл	Метод 2, С, нг/мкл	Метод 3, С, нг/мкл	Метод 4, С, нг/мкл	Метод 5, С, нг/мкл
1	842 с	0,02	0,71	2,1	0,29	0
2	776 с	0,345	0,36	1,08	0,33	0
3	840,2 с	0,09	0,81	0,8	0,129	0
4	774 s	0,123	0,87	0,56	2,14	0,004
5	815,5 с	0	0,94	1,56	0,155	0,03
6	802,24 с	0	0,32	0	1,34	0,001
7	816,5 с	0,01	0,44	0	1,22	0
8	815 s	0,01	0,31	0,002	1,05	0,2
9	550 s	0	0,20	0	0,77	0,05
10	410 s	0,9	0,94	0,02	0,56	0
11	730 d	0	0,92	0	0,55	0
12	775 s	0,45	0,47	0,34	3,92	0
13	827,5 s	0,23	0,90	0,3	0,9	0
14	776 s	0,12	0,86	0,4	0,547	0,04
15	17 о	0,02	0,29	1,89	0,36	0,025
16	820 s	0,78	0,77	1,2	1,65	0
17	831,2 с	0,07	0,12	1,5	3,31	0,002
18	809,5 с	0,87	0,29	0	0,234	0
19	817,5 с	0	0,55	0	2,05	0
20	610 с	0	0,78	0,06	0,127	0,03
21	818,5 с	0	0,46	0,06	0,21	0,02
22	837,2 с	0,01	0,47	0	2,1	0
23	778,5 с	0,02	0,31	0,1	3,85	0,02
24	828,2 с	0	0,68	0,05	0,88	0,45
25	826,5 с	0,34	0,18	0,143	0,94	0
26	802 с	0	0,28	0,002	1,34	0,33
27	830,2 с	0,88	0,38	0,003	2,8	0,03
28	819,5 с	0	0,78	0,043	1,09	0,2
29	360 d	0	0,44	0,78	1,9	0
30	118 о	0	0,88	1	0,76	0

Примечание: \* - «s» - шлам; «d» - буровой раствор; «с» - керн; «о» - нефть.

Можно предположить, что метод № 4 оказался достаточно действенным из-за введения дополнительного этапа по связыванию гуминовых кислот и других органических примесей.

## Заклучение

Нефтяные образцы являются крайне сложными для молекулярно-генетических исследований. Первостепенной причиной является то, что работа с данными образцами на первом этапе затруднена большим количеством загрязнений, что не допустимо в генетической лаборатории. Поэтому нами также рекомендуется отделить зону первичной пробоподготовки образцов.

От качества полученной ДНК после этапа выделения зависят последующие результаты определения биологического разнообразия нефтяных месторождений. Поэтому работы по оптимизации протоколов выделения ДНК из нефти и сопутствующих пород остаются крайне актуальными.

В результате выполненного исследования был проведен сравнительный анализ полученных значений концентраций ДНК, выделенных известными и наиболее распространенными методами на сегодняшний день, и оптимизирован протокол выделения ДНК из нефти и сопутствующих пород.

*(Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Научно-Технологического Развития Югры - грант № 2023-568-05).*

## ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Semenov M. Metabarcoding and metagenomics in soil-ecological research: successes, problems and opportunities. Zhurnal obshchei biologii. 2019. 80: 403-417. DOI: 10.1134/S004445961906006X.
2. Dvoyashkin N.K., Burkhanov R.N. On the correlation of molecular parameters of nuclear magnetic resonance and geological and field data in oil samples of Yamashinskoye oil field of the Republic of Tatarstan. Geology, Geophysics and Development of Oil and Gas Fields. 2019. 9: 28-33. DOI: 10.30713/2413-5011-2019-9(333)-28-33.
3. Yoshida N. et al. Bacterial communities in petroleum oil in stockpile. J. Biosci. Bioeng. 2005. 99: 143-149.
4. Yamane K. et al. Diversity and similarity of microbial communities in petroleum crude oils produced in Asia. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. 72: 2831-2839.
5. Kobayashi H. et al. Phylogenetic diversity of microbial communities associated with the crude-oil, large- insoluble-particle and formation-water components of the reservoir fluid from a non-flooded high-temperature petroleum reservoir. J. Biosci. Bioeng. 2012. 113: 204-210.
6. Meckenstock R.U. et al. Water droplets in oil are microhabitats for microbial life. Science. 2014. 345: 673-676.
7. Lennon J.T. & Jones S.E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. Nat. Rev. Microbiol. 2011. 9: 119-130.
8. Gibbons S.M. et al. Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. 110: 4651-4655.
9. Zhou J. et al. Stochasticity, succession, and environmental perturbations in a fluidic ecosystem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. 111: E836-E845.
10. Pham V.D. et al. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. Environ. Microbiol. 2009. 11: 176-187.
11. Bose S., Aggarwal S., Singh D.V., Acharya N. Extracellular vesicles: An emerging platform

- in gram-positive bacteria. *Microb Cell*. 2020. 5. 7(12): 312-322. DOI: 10.15698/mic2020.12.737.
12. Kim D.D., O'Farrell C., Toth C.R.A., Montoya O., Gieg L.M., Kwon T.H., Yoon S. Microbial community analyses of produced waters from high-temperature oil reservoirs reveal unexpected similarity between geographically distant oil reservoirs. *Microb Biotechnol*. 2018. 11(4): 788-796. DOI: 10.1111/1751-7915.13281.
  13. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977. 74(11): 5088-5090. DOI: 10.1073/pnas.74.11.5088.
  14. Pinaev A.G., Kichko A.A., Aksenova T.S., Safronova V.I., Kozhenkova E.V., Andronov E.E., RIAM: A Universal Accessible Protocol for the Isolation of High Purity DNA from Various Soils and Other Humic Substances. *Methods Protoc*. 2022. 5. 99. DOI: 10.3390/mps5060099.
  15. Alvarez R., Evans L., Milham P.J. Wilson M.A. Effect of humic material on calcium phosphate precipitation. *Geoderma*. 2004. 118: 245-260. DOI: 10.1016/S0016-7061(03)00207-6.

*Поступила 09 декабря 2024 г.*

*(Контактная информация: Бурлаченко Анастасия Сергеевна – аспирант, младший научный сотрудник НИО экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России; адрес: 197022, Санкт-Петербург, улица Профессора Попова, д. 9 литера, Россия; E-mail: [nas-tya\\_sergeevna99@mail.ru](mailto:nas-tya_sergeevna99@mail.ru))*

---

---

**Образец ссылки на статью:**

Бурлаченко А.С., Данилов Л.Г., Готов О.С. Оптимизация метода выделения бактериальной ДНК из нефтяных образцов. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН* 2024. 4: 9с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2024-4/Articles/BAS-2024-4.pdf>) DOI: 10.24411/2304-9081-2024-14001.