

## АННОТАЦИЯ

Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060700 - Биология

Тапешовой Шаттык Жанибековны

**Биологические свойства и нефтеразжижающий потенциал микроорганизмов пластовых вод месторождения «Акинген»**

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена изучению биологических (морфолого-культуральных, физиолого-биохимических) и молекулярно-генетических свойств микроорганизмов, выделенных из заводненных нефтепластовых вод законсервированного месторождения «Акинген» путём определения их филогенетической родовой принадлежности и генов *lchAA*, *rhlA*, *srfa*, ответственных за образование биосурфактантов связанных с нефтеразжижающими свойствами, для последующей разработки микробных методов увеличения нефтеотдачи (МУН).

**Актуальность темы исследования.** В мире запасы тяжелой и высоковязкой нефти в 5 раз превышают объем извлекаемых запасов нефти малой и средней вязкости, поэтому трудноизвлекаемая нефть является основным резервом мировой добычи нефти.

В настоящее время, большинство нефтяных месторождений Казахстана, за исключением крупных проектов, уже прошли пик добычи, находятся в стадии поздней разработки и характеризуются высокой вязкостью и обводненностью нефти, что относит их запасы к категории трудно извлекаемых, т.е. проблемой Казахстана и всех нефтедобывающих стран, является не отсутствие запасов, а трудность их извлечения на поверхность. Продукция, остающаяся в недрах после первичных и вторичных методов нефтедобычи, по причине высокого уровня обводненности пласта месторождения, составляет 60-70 %.

В настоящее время особенно актуальным являются научные, опытные и промышленные исследования по извлечению тяжелого углеводородного сырья. Для экономически рентабельного освоения трудноизвлекаемых запасов нефти разрабатываются третичные способы добычи нефти. Одним из таких способов является использование микроорганизмов, который обладает огромным потенциалом. Микробные методы увеличения нефтеотдачи пластов позволяют увеличить извлечение нефти на 10-15%, что сравнимо с открытием нового месторождения и относятся к ресурсосберегающим, экологически безопасным технологиям.

В нефтепластовых водах жизнедеятельность микроорганизмов сопровождается образованием нефтевытесняющих соединений, что является основой микробных методов извлечения сырья из заводненных пластов. Высокая биохимическая активность микроорганизмов повышает выход продуктов их жизнедеятельности таких как газы, ПАВ, кислоты, спирты и др.,

обладающих нефтеразжижающими и нефтевытесняющими свойствами, что способствует увеличению подвижности нефти в пласте и дополнительному извлечению сырья.

**Цель исследования:** изучение морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и нефтеразжижающих свойств микроорганизмов пластовых вод месторождения «Акинген», расположенного в Атырауской области РК.

**Задачи исследования:**

1. Выявить состав нефтепластовых вод месторождения «Акинген», включающих общую минерализацию, рН, жесткость, содержание основных солей.

2. Установить количественный и качественный микробиологический состав нефтепластовых вод месторождения «Акинген».

3. Определить морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод.

4. Провести филогенетическую идентификацию микроорганизмов на основе 16S рРНК нуклеотидных последовательностей.

5. Определить у микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод, наличие генов *lchAA*, *rhlA*, *srfA*, ответственных за продукцию биосурфактантов, участвующих в нефтеэмульгировании.

6. Отбор микроорганизмов, обладающих высокими нефтеразжижающими и нефтевытесняющими свойствами.

7. Создать ассоциации микроорганизмов с высокими нефтеразжижающими и нефтевытесняющими свойствами.

**Объекты исследования:** в работе использованы нефтепластовые воды законсервированного месторождения «Акинген», расположенного в Атырауской области и 31 культура микроорганизмов, выделенные из нефтепластовых вод месторождения «Акинген».

**Методы исследования.** В ходе работы были использованы традиционные микробиологические (метод Коха, методы микроскопии, метод перпендикулярных штрихов и др.), генетические (секвенирование фрагмента генов 16S RNA), физико-химические методы (метод Купера, потенциометрический метод, спектрофотометрический метод, электрометрический метод, титриметрический метод, комплексонометрический метод, жидкостная хроматография).

**Научная новизна исследования.** Впервые дана количественная и качественная микробиологическая характеристика нефтепластовых вод месторождения «Акинген». Показано, что аэробная микрофлора нефтепластовых вод составляет  $96,1 \times 10^7$  КОЕ/мл, а содержание анаэробов значительно меньше –  $14 \times 10^4$  КОЕ/мл, качественный состав представлен псевдомонадами и бациллами, причем, количественно доминируют представители р. *Bacillus* -  $13 \times 10^3$  КОЕ/мл. Выделены и идентифицированы 31 культура бактерий, из них 17 бацилл: *B. subtilis subsp. spizizenii* S1; *Bacillus paramycoides* M1; *B. subtilis* A5; *B. haynesii* S3; *B. safensis* D7X; *Brevibacillus*

*borstelensis* SR3, 9 штамм - *B. licheniformis* (A1, A2 A3, A4, S2, SR1, SR2, CL1, CL2); 2 штамм - *B. pumilus* (M2, D1X).

14 штамм псевдомонадтар - *P. aeruginosa* (D5; D6; D7; D1; D2; D3; D8; T1; T2; T3; T4; T5; T6; D4).

Впервые определены и опубликованы в международной базе данных *GenBank* нуклеотидная последовательность геномов 31 культуры бактерий, выделенных из нефтепластовых вод законсервированного месторождения «Акинген». Показано наличие генов (*lchAA*, *rhlA*, *srfA*), ответственных за продукцию биосурфактантов, участвующих в эмульгировании нефти:

ген *srfA* - у 10-и штаммов *P. aeruginosa* - D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1, T2, T4, T6;

ген *rhlA* – у 12-и штаммов *P. aeruginosa* - T2, T3, T4, T5, T6, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1;

ген *lchAA* – у 10-и бациллярных культур: *B. haynesii* S3, *B. pumilus* M2 и 8 штаммов *B. licheniformis* (A1, A3, A4, S2, CL-1, CL-2, SR-1, SR-2).

Впервые определен нефтеразжижающий потенциал микроорганизмов нефтепластовых вод месторождения «Акинген», в частности, отобраны микроорганизмы с высокими нефтеэмульгирующими свойствами (с индексом эмульгирования выше 51%) и созданы на их основе микробные ассоциации, перспективные для разработки микробных методов увеличения нефтеотдачи.

#### **Научно–практическая значимость исследования.**

Для разработки методов повышения нефтеотдачи созданы перспективные ассоциации микроорганизмов с высокими нефтеразжижающими и нефтевытесняющими свойствами на основе идентифицированных микроорганизмов пластовых вод месторождения «Акинген».

Выделенные 31 культура микроорганизмов включены в коллекцию углеводородокисляющих микроорганизмов КазНУ им. аль-Фараби для дальнейшего их использования в биотехнологиях.

Зарегистрированы и опубликованы в *GenBank* нуклеотидные последовательности 16S rRNA 31-ой культуры бактерий. Регистрационные номера доступа для культур: *B. subtilis subsp. spizizenii* S1 - MW386842; *B. paramycooides* M1 - MW386841; *B. pumilus* M2 - MW386840; *B. licheniformis* A1 - MW386831; *B. licheniformis* A2 - MW386832; *B. licheniformis* A3 - MW386833; *B. licheniformis* A4 - MW386834; *B. subtilis* A5 - MW386835; *B. licheniformis* S2 - MW386843; *B. haynesii* S3 - MW386844; *B. pumilus* D1X - MW386836; *P. aeruginosa* D5 - MW386837; *B. licheniformis* CL1 - MW600501; *B. licheniformis* CL2 - MW600502; *B. safensis* D7X - MW600506; *B. licheniformis* SR1 - MW600508; *B. licheniformis* SR2 - MW600509; *Brevibacillus borstelensis* SR3 - MW600510; *P. aeruginosa* D8 - MW600507; *P. aeruginosa* D6 - MW386838; *P. aeruginosa* D7 - MW386839; *P. aeruginosa* D1 - MW600503; *P. aeruginosa* D2 - MW600504; *P. aeruginosa* D3 - MW600505; *P. aeruginosa* T1 - MW617329; *P. aeruginosa* T2 - MW617330; *P. aeruginosa* T3 - MW617331; *P. aeruginosa* T4 - MW617332; *P. aeruginosa* T5 - MW617334; *P. aeruginosa* T6 - MW617335; *P. aeruginosa* D4 - MW617336.

Результаты, полученные в ходе научного исследования, включены в содержание учебного предмета «Микробные препараты и продукты восстановления экосистем» специальности «6М070100-Биотехнология» Казахского национального университета имени аль-Фараби (Приложение А).

#### **Основные положения, выносимые на защиту диссертации:**

1. Выделены и идентифицированы на основе фенотипических и генетических свойств 31 культура бактерий нефтепластовых вод месторождения «Акинген».

2. Нефтеэмульгирующие свойства микроорганизмов нефтепластовых вод месторождения «Акинген» связаны с наличием генов *lchAA*, *rhlA*, *srfA*, ответственных за продукцию биосурфактантов, участвующих в эмульгировании нефти.

3. 16 культур микроорганизмов, включающих *B.safensis* D7X, *B. subtilis* A5, *B. subtilis subsp. spizizenii* S1, 2 штамма *B. pumilus* (D1X, M2), 5 штаммов *Bacillus licheniformis* (S2, SR1, SR2, CL1, CL2) и 6 штаммов *P. aeruginosa* (D5, D6, D7, D8, T2, T3), выделенных из нефтепластовых вод, имеют высокие нефтewытесняющие и нефтеразжижающие свойства с индексом эмульгирования выше 51% и способны к обильному газообразованию и подкислению среды с добавлением мелассы.

4. Созданы активные ассоциации микроорганизмов, обладающие высокими нефтеразжижающими и нефтewытесняющими свойствами, которые могут быть использованы для разработки микробных методов увеличения нефтеотдачи заводненных пластов.

#### **Основные результаты исследования и выводы:**

Полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Показано, что нефтепластовые воды месторождения «Акинген» высокоминерализованы, преобладают ионы натрия и хлора и относятся к натриево-хлористому типу пластовых вод, рН составил 6,34 ед.

2. Установлено, что аэробная микрофлора нефтепластовых вод месторождения «Акинген» составляет  $96,1 \times 10^7$  КОЕ/мл, тогда как содержание анаэробов значительно меньше –  $14 \times 10^4$  КОЕ/мл, качественный состав представлен псевдомонадами и бациллами, причем, количественно доминируют представители р. *Bacillus* -  $13 \times 10^3$  КОЕ/мл.

3. Выделены и идентифицированы на основании морфолого-культуральных, физиолого-биохимических свойств и анализа нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК 31 культура бактерий, из них 14 штаммов *P. aeruginosa* (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, T1, T2, T3, T4, T5, T6); 17 бациллярных культур – *B. subtilis subsp. spizizenii* S1; *B. paramycoides* M1; *B. subtilis* A5; *B. haynesii* S3; *B.safensis* D7X; *Brevibacillus borstelensis* SR3, *B. pumilus* (M2, D1X); 9 штаммов *B. licheniformis* (A1, A2, A3, A4, S2, SR1, CL1, CL2, SR2).

Зарегистрированы и опубликованы в *GenBank* нуклеотидные последовательности 16S rRNA 31 культуры бактерий. Регистрационные номера доступа: *B. subtilis subsp. spizizenii* S1 - MW386842; *B. paramycoides* M1 -

MW386841; *B. pumilus* M2 - MW386840; *B. licheniformis* A1 - MW386831; *B. licheniformis* A2 - MW386832; *B. licheniformis* A3 - MW386833; *B. licheniformis* A4 - MW386834; *B. subtilis* A5 - MW386835; *B. licheniformis* S2 - MW386843; *B. haynesii* S3 - MW386844; *B. pumilus* D1X - MW386836; *P. aeruginosa* D5 - MW386837; *B. licheniformis* CL1 - MW600501; *B. licheniformis* CL2 - MW600502; *B. safensis* D7X - MW600506; *B. licheniformis* SR1 - MW600508; *B. licheniformis* SR2 - MW600509; *Brevibacillus borstelensis* SR3 - MW600510; *P. aeruginosa* D8 - MW600507; *P. aeruginosa* D6 - MW386838; *P. aeruginosa* D7 - MW386839; *P. aeruginosa* D1 - MW600503; *P. aeruginosa* D2 - MW600504; *P. aeruginosa* D3 - MW600505; *P. aeruginosa* T1 - MW617329; *P. aeruginosa* T2 - MW617330; *P. aeruginosa* T3 - MW617331; *P. aeruginosa* T4 - MW617332; *P. aeruginosa* T5 - MW617334; *P. aeruginosa* T6 - MW617335; *P. aeruginosa* D4 - MW617336.

4. Выявлено наличие генов, ответственных за нефтеэмульгирующие свойства бактерий: *srfA* – у 10-и штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1, T2, T4, T6); ген *rhlA* – у 12-и штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (T2, T3, T4, T5, T6, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1); ген *lchAA* - у 10-и бациллярных культур бактерий: *B. haynesii* S3 *B. pumilus* M2 и 8-и штаммов *B. licheniformis* (A1, A3, A4, S2, SR1, SR2, CL1, CL2).

5. Отобраны 16 культур микроорганизмов, обладающие высокой целевой активностью на среде E8 с добавлением мелассы: индекс эмульгирования составил выше 51 %, способны к обильному газообразованию и подкислению среды.

6. Для конструирования высокоактивных ассоциаций микроорганизмов отобраны 5 культур микроорганизмов на основе изучения антагонистических взаимоотношений 16-и культур: *P. aeruginosa* D5 - нефтеэмульгатор, кислотообразователь, газообразователь, *P. aeruginosa* D6 - нефтеэмульгатор, кислотообразователь, газообразователь, *Bacillus sp.* D1X - нефтеэмульгатор, газ образователь, *B. licheniformis* SR1 – кислотообразователь, газообразователь и *B. licheniformis* CL1 - кислотообразователь, газ образователь.

7. Из исследованных 12-и ассоциаций микроорганизмов, по совпадению минимум 4-х показателей из 6-и целевых свойств - нефтеэмульгирование, кислотообразование, газообразование в аэробных и анаэробных условиях - были отобраны следующие 5 ассоциаций микроорганизмов, из них: 2 ассоциации состоящие из 2-х монокультур - D6 : SR 1; D6 : CL1; 2 ассоциации из 3 монокультур - D6 : SR1 :CL1; D6 : CL1 : D1X и одна ассоциация из 4-х монокультур D6 : SR1: CL1 : D1X.

Все поставленные задачи в диссертации выполнены.

**Личный вклад автора.** Анализ литературных данных касающихся исследуемой проблемы, проведение экспериментальных исследований, анализ полученных результатов и статистическая обработка, изложение диссертационной работы выполнены лично автором.

**Связь с планом основной научной работы.** Диссертационная работа выполнена в рамках проекта АР 05134797 «Создание технологической схемы проведения повышения нефтеотдачи пластов микробиологическим методом» № 188РК00166 (2018-2020 гг.).

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

- XXXV международная научная конференция «Развитие науки в XXI в.», 16 мая 2018 г., Харьков, Украина;

- Международная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі», 9-10 апреля 2019 г., Алматы, Казахстан;

- Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биоразнообразия и биотехнологии», 1 октября 2019 г., Нур-Султан, Казахстан.

**Публикации.** Основные результаты диссертации опубликованы в 9-и печатных научных работах, в том числе 1 статье в международном научном журнале с импакт-фактором, входящем в базу данных *Scopus*; 3 статьи в республиканских научных журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК; 4 тезиса в материалах международных конференций; 1 статья в материалах зарубежной международной конференции.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа написана на 110 текстовых страницах и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение и список использованных источников из 200 наименований; содержит 21 рисунок, 22 таблицы и 2-х приложений.