

әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті

ӘОЖ 60:622.7(574.1)(043)

Қолжазба құқығында

ШАЙМЕРДЕНОВА ҰЛЖАН ТҰРҒАНБЕКҚЫЗЫ

**Батыс Қазақстан кен орындарындағы аборигендік микроорганизмдер
негізінде пласттардан мұнайдың шығуын арттыру**

8D05105-Биотехнология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:
Отандық ғылыми кеңесшісі б.ғ.к.,
доцент м.а. Ерназарова А.К.

Шет елдік ғылыми кеңесшісі prof.,
dr.hab. Swiecicka Izabela
(Белосток Университеті, Польша)

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2025

МАЗМҰНЫ

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР.....	4
НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР.....	5
КІРІСПЕ.....	6
1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ.....	11
1.1 Мұнай кен орындарына жалпы сипаттама және қазіргі жағдайы.....	11
1.1.1 Ақінген кен орнына жалпы сипаттама.....	15
1.1.2 Шығыс Мақат кен орнына жалпы сипаттама.....	16
1.2 Мұнай пласттарынан мұнай шығару әдістері.....	18
1.2.1 Мұнай пласттарынан микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру әдісі.....	21
1.3 Мұнай пласттарының микробтық алуантүрлілігі.....	27
1.4 Микроорганизмдер мен олардың метаболиттерінің микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру процесіндегі рөлі	31
1.4.1 Биосурфактанттар және олардың микробиологиялық мұнай шығаруды арттырудағы рөлі.....	35
1.4.2 Биополимерлер және олардың микробиологиялық мұнай шығаруды арттырудағы рөлі.....	38
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ.....	40
2.1 Зерттеу материалдары.....	40
2.1.1 Мұнай пласт суларының сынамалары.....	40
2.1.2 Қоректік орталар.....	40
2.2 Зерттеу әдістері.....	42
2.2.1 Пласт су сынамаларын химиялық талдау.....	42
2.2.2 Пласт су сынамаларын метагеномды талдау.....	42
2.2.3 Микробиологиялық әдістер.....	43
2.2.4 Аборигенді микроорганизм дақылдарының биосурфактант түзу қабілеті бойынша скрининг жүргізу әдістері	43
2.2.5 Белсенді аборигенді бактериялардың идентификациясы	45
2.2.6 Биосурфактант пен биополимер гендерін анықтау және олардың экспрессиясы	48
2.2.7 Шикі биосурфактантты бөліп алу және химиялық сипаттамасы	49
2.2.8 Шикі биополимерлерді бөліп алу және химиялық сипаттамасы	50
2.2.9 Лабораториялық жағдайда <i>Bacillus subtilis</i> штамдары негізінде мұнай шығару	50
2.3 Тәжірибе нәтижелерін статистикалық өңдеу	52
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	53
3.1 Батыс Қазақстан кен орындарын физика-химиялық бағалау	53
3.2 Батыс Қазақстан кен орындарын микробиологиялық бағалау	56
3.3 Аборигенді микроорганизм дақылдарының биосурфактант түзу қабілеті бойынша сапалық скринингі	64

3.4	Іріктелген бактерия дақылдарының морфология-дақылдық, физиология-биохимиялық, молекулалық-генетикалық идентификациясы	69
3.5	<i>Bacillus sp.</i> штамдарында биосурфактант және биополимер синтезіне жауапты гендердің анықталуы және олардың экспрессиясы	75
3.6	Шикі биосурфактантты өндіру және олардың функциональдық топтарын анықтау	82
3.7	Шикі леван өндіру және олардың функциональдық топтарын анықтау	86
3.8	Биосурфактанттың жоғары өнімділігін қамтамасыз ететін оңтайлы қоректік ортаны таңдау	90
3.9	Белсенді штамм микроорганизмдері негізінде мұнай шығаруды арттыру үлгісін лабораториялық жағдайда жүргізу	92
	ҚОРЫТЫНДЫ	96
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	97
	ҚОСЫМША А	119
	ҚОСЫМША Ә	120
	ҚОСЫМША Б	121
	ҚОСЫМША В	122
	ҚОСЫМША Г	123

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТЫЛҒАН СӨЗДЕР

MEOR	Microbial enhanced oil recovery (микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру)
МША	мұнай шығаруды арттыру
ММША	микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру
ЖМС	жалпы микроорганизмдер саны
КТБ	колония түзуші бірлік
ЕПА	ет-пептонды агар
ЕПС	ет-пептонды сорпа
SMSS	stone mineral salt solution – минералды тұздары бар орта
pH	орта қышқылдылығы
t °C	Цельсий бойынша температура
ОТ	оптикалық тығыздық
ПТР	полимеразалық тізбекті реакция
pPHҚ	рибосомалық рибонуклеин қышқылы
NCBI	Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығы
BLAST	Basic local alignment search tool – жергілікті туралауды іздеу құралы
ANOVA	дисперсионды талдау
MEMCT	Мемлекеттік стандарт

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Диссертацияда келесі стандарттар мен ережелерге сілтеме жасалды:

МЕМСТ 26449.1-85. Стационарлық айдау және тұзсыздандыру қондырғылары. Тұзды суларды химиялық талдау әдістері.

МЕМСТ 23268.11-78. Минералды ауыз емдік сулар, емдік ас сулары және табиғи ас сулары. Темір иондарын анықтау әдісі.

МЕМСТ 23268.15-78. Минералды емдік ас сулары және табиғи ас сулары. Бромид иондарын анықтау әдістері.

МЕМСТ 23268.16-78. Минералды емдік ас сулары және табиғи ас сулары. Йодид иондарын анықтау әдістері.

МЕМСТ 18995.1-73. Сұйық химиялық өнімдер. Тығыздығын анықтау әдістері.

ҚР СТ 445-2011. Мөлдір және мөлдір емес сұйықтықтардың кинематикалық тұтқырлығын анықтау әдісі (динамикалық тұтқырлықты есептеу).

МЕМСТ 7.32 – 2001. Ғылыми зерттеу жұмысы туралы есеп. Құрылымы және дайындау ережелері.

МЕМСТ 7.1 – 2003. Библиографиялық жазба, библиографиялық сипаттама. Жалпы талаптар және құрастыру ережелері.

КІРІСПЕ

Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс Батыс Қазақстан кен орындарының пласт сулары сынамаларындағы микробтық алуантүрлілікті зерттеуге және олардан бөлініп алынған биосурфактант пен биополимер өндіруші микроорганизмдерді іріктеуге арналған. Микроорганизм штамдарының филогенетикалық тиесілігін анықтау мақсатында олардың микробиологиялық (морфологиялық-дақылдық, физиологиялық-биохимиялық) және молекулалық-генетикалық сипаттамалары зерттелді. Биосурфактант және биополимер өндіруші микроорганизмдердің қасиеттерін анықтауға бағытталған химиялық зерттеулер және белсенді штамдардың мұнай шығуын арттыру тиімділігін зерттеу үшін зертханалық бағалаулар жүргізілді.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Мұнай-газ өнеркәсібі Қазақстан экономикасында негізгі орындардың бірін алады. Кен орындарын дәстүрлі әдістермен игеру кезінде және өндірілетін өнімдерде судың жоғары деңгейімен игерілгенде, әртүрлі бағалаулар бойынша мұнай қорының 25%-дан 70%-ға дейін жер қойнауында қалады. Еліміздегі кен орындарының көпшілігі төмен өткізгіштігімен, мұнайдың жоғары тұтқырлығымен және күрделі геологиялық құрылымымен сипатталады, бұл оларды алу қиын қорларға жатқызады.

Осыған байланысты мұнайды қарқынды өндіру аясында кен орындарынан мұнай шығаруды арттыру мәселесі өзекті болды. 1960 жылдардан бастап Қазақстанда мұнай шығаруды арттыру бойынша пилоттық жобалар жүзеге асырылды. Қазіргі уақытта термиялық және термиялық емес мұнай шығаруды арттыру әдістері қолданылады.

Микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру (ММША) мұнай өндірудің тартымды балама тәсілі болып табылады. Дегенмен, далалық жағдайда ММША технологиясын практикалық қолдану үшін осы салада жүргізілген іргелі зерттеулер жеткіліксіз. Бұл әдіс шет елдерде сәтті қолданылады, бірақ мұнай құрамы мен ұңғымаларды пайдалану шарттары аймаққа байланысты айтарлықтай өзгереді. Сондықтан Қазақстандағы игерудің кеш сатысындағы мұнай кен орындарында ММША технологиясын қолдану бойынша зерттеулер қажет.

ММША технологиясы микроорганизмдерді және олардың метаболиттерін пайдаланады, олардың ішінде биосурфактанттар мен биополимерлер үлкен қызығушылық тудырады. Биосурфактанттар мұнай мен су арасындағы фазааралық және беттік керілуді төмендету, су-мұнай эмульсияларын қалыптастыру, жерасты жынысының суланғыштығын мұнайдан суға өзгерту сияқты механизмдердің арқасында мұнайдың шығуын арттыруға көмектеседі. Биополимерлер ығыстыратын сұйықтықтың тұтқырлығын арттырып, айдау бейінін жақсартып, коллектордың жоғары өткізгіштігі бар аймақтарын селективті түрде жауып, төмен өткізгіштігі бар аймақтардан қалдық мұнайды тиімдірек ығыстыруға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, биосурфактанттар мен биополимерлердің синтетикалық беттік белсенді заттарға қарағанда бірқатар

артықшылықтары бар: олар аз уытты, биологиялық ыдырайтын, экстремалды жағдайларға (рН, температура, тұздылық) төзімді және неғұрлым үнемді, өйткені оларды жаңартылатын шикізаттан немесе өнеркәсіптік қалдықтардан алуға болады.

Зерттеу мақсаты: Ақінген және Шығыс Мақат кен орындары пласт суларының микробтық алуантүрлілікті сипаттау және мұнай шығуын арттыру үшін белсенді биосурфактант және биополимер өндіруші микроорганизмдерді бөліп алу.

Зерттеу жұмысының міндеттері

1. Батыс Қазақстан мұнай кен орындарының пласт суларының физика-химиялық талдауын жүргізу;
2. Батыс Қазақстан кен орындарының пласт суларының микробтық алуантүрлілігін анықтау;
3. Пласт суларынан бөлініп алынған биосурфактант өндіруші микроорганизмдерді іріктеу және идентификациялау;
4. Бөлініп алынған микроорганизм штамдарында биосурфактанттар (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, *srfp*, *lchAA*) және биополимер (*sacB*) синтезін кодтайтын гендерді анықтау;
5. Бөлініп алынған микроорганизмдер штамдары түзетін биосурфактанттар мен биополимерлердің құрылымдық сипаттамаларын зерттеу;
6. Батыс Қазақстан мұнай кен орындарынан бөлініп алынған биосурфактант және биополимер өндіруші микроорганизмдер негізінде мұнайды шығару коэффициентін анықтау.

Зерттеу объектілері. Зерттеу жұмысының объектілері ретінде Батыс Қазақстан кен орындарының пласт су сынамалары және сынамалардан бөлініп алынған микроорганизмдердің таза дақылдары қолданылады.

Зерттеу әдістері. Диссертациялық жұмыс барысында тәжірибелер зертханалық жағдайда заманауи *Illumina* MiSeq жүйесінде микробтық алуантүрлілігін талдау, дәстүрлі микробиологиялық және физика-химиялық әдістер, молекулалық-генетикалық (16S рРНҚ генінің фрагментін секвенирлеу, ПТР, qPCR), тензиометр, ИҚ-Фурье спектофометрі әдістерін қолдана отырып жүргізілді.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы.

Алғаш рет Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының пласт суларына кешенді микробтық алуантүрлілігіне сипаттама жүргізілді, нәтижесінде осы екі кен орнының микробтық қауымдастықтарының құрылымдық ерекшеліктері анықталды. Талдау нәтижесінде класс деңгейінде Ақінген кен орнының пласт суларында *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* және *Bacilli* басым болса, ал Шығыс Мақат кен орны пласт суларында *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia* және *Methanomicrobia* басым класс өкілдері анықталды.

Батыс Қазақстан кен орындарынан 33 микроорганизм бөлініп алынып,

штамдар арасында алғаш рет биосурфактант өндірісіне сапалық және сандық іріктеу жүргізіліп, іріктелген микроорганизмдер түр деңгейінде анықталды: *Bacillus safensis* A2, *Bacillus subtilis* A8, A9 және A12, *Bacillus paralicheniformis* R4 және *Bacillus licheniformis* PW2. Таңдалған штамм микроорганизмдердің биосурфактанттар мен биополимерлерге жауапты гендердің бар-жоғы анықталып, олардың экспрессиясы зерттелді:

srfAA гені – 4 штамдарда *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12), *Bacillus licheniformis* PW2.

srfAB гені – 2 штамдарда *Bacillus subtilis* (A8, A9).

srfAC гені – 3 штамдарда *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12).

srfAD гені – 3 штамдарда *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12).

srfp гені – 4 штамдарда *Bacillus safensis* A2, *Bacillus subtilis* (A8, A9).

lchAA гені – *Bacillus licheniformis* PW2.

sacB гені – 4 штамдарда *Bacillus subtilis* (A8, A9), *Bacillus licheniformis* PW2.

Алғаш рет таңдалған штамдардың биосурфактант және биополимер өндіру қабілеті анықталды. *B. subtilis* A8 штамындағы биосурфактанттың ең жоғарғы шығымы (1,33 г/л) көміртегі көзі ретінде меласса бар ортада өсіру кезінде алынды. *B. subtilis* A12 биополимерінің ең жоғарғы шығымы (0,42 г/л) қоректік ортада сахароза мен соя ұнын қолданғанда байқалды.

Алғаш рет зерттелетін кен орнының табиғи жынысөзегін, пласт суын, сондай-ақ микроорганизмдер ассоциациясын пайдалана отырып, зертханалық бағалау кезінде мұнай шығару коэффициенті белгіленді: *B. subtilis* A9 штамы үшін $23,2 \pm 2,5\%$ және *B. subtilis* A8: *B. subtilis* A9 ассоциациясы үшін $24,4 \pm 3,1\%$, бұл микроорганизмді бақылаусыз пайдалану мәнінен (4%) айтарлықтай асып түсті.

Жұмыстың ғылыми – практикалық маңыздылығы.

Халықаралық GenBank дерекқорына тіркелген келесі биосурфактант өндіруші штамдар бөлініп алынып, идентификацияланды: *Bacillus safensis* subsp. *safensis* A2 (OP565012), *Bacillus subtilis* A8 (OP565013), *Bacillus subtilis* A9 (OP565014), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A12 (OP565015), *Bacillus paralicheniformis* R4 (OP565016) және *Bacillus licheniformis* PW2 (OP565017).

Барлық микроорганизм штамдары «Республикалық микроорганизмдер коллекциясы» ЖШС-да (РМК) келесі тіркеу нөмірлерімен депозиттелді: №B-RKM 1109 *Bacillus safensis* subsp. *safensis* A2, №B-RKM 1110 *Bacillus subtilis* A8, №B-RKM 1111 *Bacillus subtilis* A9, №B-RKM 1112 *Bacillus paralicheniformis* R4, №B-RKM 1113 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A12, №B-RKM 1114 *Bacillus licheniformis* PW2 (29.12.2023 ж. күнімен).

Модельдік мұнай шығаруды арттыру тәжірибелері барысында *B. subtilis* A9 штамын қолдану мұнай шығару коэффициентін $23,2 \pm 2,5\%$ деңгейінде көрсететіні, ал *B. subtilis* A8 : *B. subtilis* A9 ассоциациясын қолдану $24,4 \pm 3,1\%$ көрсеткішіне жететіні анықталды. Бұл бақылау үлгілерімен салыстырғанда (мұнай өндіру 4%-дан аспады) сәйкесінше 19,2 және 20,4 пайыз жоғары

нәтижені көрсетті.

2024 жылғы 2 ақпанда *Bacillus subtilis* A9 штамына қатысты №9060 «Қабаттан мұнай бергіштікті микробиологиялық арттыру үшін қолданылатын биосурфактант өндіруші *Bacillus subtilis* A9 штамы» атты пайдалы модельге ҚР патенті алынды.

Қорғауға шығарылған негізгі қағидалар

1. Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының пласт суларының микробтық алуантүрлілігі *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* және *Bacilli*, сондай-ақ *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* және *Methanomicrobia* өкілдерін қамтыды.

2. Биосурфактант өндіруші штамдар анықталып, GenBank дерекқорына тіркелді: *Bacillus safensis subsp. safensis* A2 (OP565012), *Bacillus subtilis* A8 (OP565013), *Bacillus subtilis* A9 (OP565014), *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A12 (OP565015), *Bacillus paralicheniformis* R4 (OP565016), *Bacillus licheniformis* PW2 (OP565017).

3. *B. subtilis* A8 штамының биосурфактант өнімінің ең жоғары шығымы мелассаны көміртек көзі ретінде қолданылған жағдайда 1,33 г/л құрады, ал сүт сарысуын қолданылғанда 0,1 г/л болды.

4. Мұнай өндірудің жоғары коэффициенттері *B. subtilis* A9 ($23,2 \pm 2,5\%$) штамын және *B. subtilis* A8 пен *B. subtilis* A9 ассоциациясын ($24,4 \pm 3,1\%$) қолдану нәтижесінде алынды, бұл көрсеткіштер бақылау үлгісінің (4%) деңгейінен сәйкесінше 19,2 және 20,4 пайыз жоғары болды.

Автордың жеке үлесі

Зерттелетін мәселеге қатысты әдеби деректерге талдау, жұмыстың мақсат міндеттерін анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді статистикалық өңдеу және талдау, ғылыми мақалалар мен диссертацияны жазу, қол жазбаны рәсімдеу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың мемлекеттік ғылыми зерттеу бағдарламаларымен байланыстылығы

Диссертациялық жұмыс AP19577160 «Биосурфактанттарды өндіретін микроорганизмдерді және олардың мұнайды шығуын жоғарылату үшін қолданылуын зерттеу» №0123PK00131 (2023-2025 жж.) жоба аясында орындалды.

Жұмыстың сыннан өтуі

Диссертациялық жұмыстың нәтижелері төмендегідей халықаралық ғылыми конференциялар баяндалды және талқыланды:

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» VI Халықаралық ғылыми конференциясы, 2021 ж., Алматы, Қазақстан;
- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» VI Халықаралық ғылыми конференциясы, 2022 ж., Алматы, Қазақстан;

- «Цифрландыру дәуіріндегі ғылым мен әлемдік қауымдастықтың дамуының заманауи тенденциялары» XII халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференция, 2023 ж., Мәскеу, Ресей;
- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» VI Халықаралық ғылыми конференциясы, 2023 ж., Алматы, Қазақстан;
- «Биология ғылымдарының тұрақты дамуының заманауи тенденциялары» атты Халықаралық форумы, 2024 ж., Алматы, Қазақстан;
- ICASET-2024 International Conference on Advance in Science, Engineering and Technology, 23-24 august 2024, Hanoi, Vietnam.

Басылымдар

Диссертацияның негізгі нәтижелері баспадан шыққан 12 ғылыми еңбекте жарияланды, оның ішінде 3 мақала Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған отандық мерзімді журналдарда; 3 мақала *Scopus* және *Web of science* халықаралық деректер базасына кіретін журналдарда: *Scientific Report* (процентілі-92, Q1), *Frontiers in Microbiology* (процентілі-73, Q2); *Journal of Environmental Management and Tourism*; 4 тезис отандық халықаралық конференция материалдарында; 2 мақала шетелдік және отандық халықаралық конференция материалдарында жарияланды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі

Диссертациялық жұмыс 117 мәтіндік бетте жазылды. Оның құрамына нормативтік сілтемелер, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 210 пайдаланылған әдебиеттер тізімі кіреді. Диссертация құрамында 26 сурет, 15 кесте, 4 қосымша бар.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Мұнай кен орындарына жалпы сипаттама және олардың қазіргі жағдайы

Халықаралық энергетикалық агенттіктің жылдық нәтижелері көрсеткендей, қазба отындарын, атап айтқанда мұнайды пайдалану энергияның 85% - дан астамын қамтамасыз ететін әлемдік ауқымдағы жетекші энергия көзі болып қала береді. 2023 жылы әлемде тәулігіне шамамен 102 миллион баррель шикі мұнай пайдаланылды, бұл әлемдік экономиканың мұнай ресурстарына тәуелділігінің жоғары деңгейін растайды [1].

Қазақстан контекстінде әлемдегі ең ірі мұнай өндірушілердің бірі ретінде мұнай өндіру мен экспорттау көлеміне назар аударған жөн. 2023 жылғы мәліметтер бойынша, Қазақстанда 90 миллион тонна мұнай өндіріліп, 70 миллион тонна экспортталды. Бұл сандар Қазақстанның әлемдік мұнай нарығындағы елеулі рөлін және оның әлемдік энергетикалық қамтамасыз етуге қосқан үлесін айғақтайды [2]. Елдің дәлелденген мұнай қоры шамамен 30 миллиард баррельді құрайды, бұл оны әлемдегі көмірсутегі қорларының ең ірі он акционерінің біріне айналдырады [3]. 2019 жылдың 1 қаңтарындағы жағдай бойынша Қазақстанда 250-ден астам мұнай-газ кен орындары бар. Мұнай қорының жалпы көлемі әлемдік мұнай қорының шамамен 1,8% құрайды [4]. Дәлелденген қорлардың көлемі бойынша Қазақстан Республикасы Таяу Шығыс, Латын Америкасы, Ресей және Америка Құрама штаттарынан кейін екінші орында. Каспий теңізінің қазақстандық бөлігінде 12-17 миллиард тоннаға бағаланатын үлкен геологиялық ресурстар бар [5].

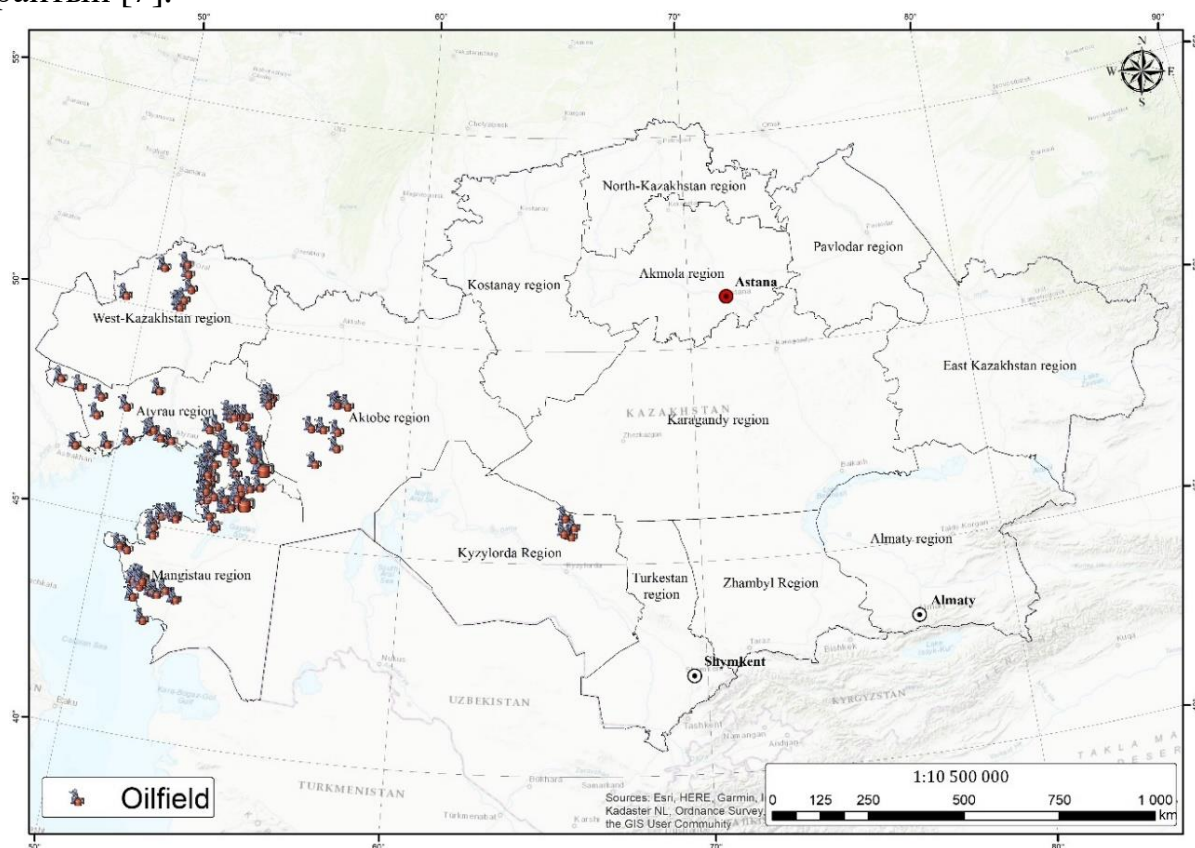
Кен орындары Қазақстанның он төрт облысының алтауының аумағында: Ақтөбе, Атырау, Батыс Қазақстан, Қарағанды, Қызылорда және Маңғыстау облыстарында кездеседі. Басым бөлігі Қазақстанның батыс аймағында шоғырланған (сурет 1). Бұл аймақта классикалық шикі мұнай кен орындарынан бастап мұнай-газ конденсатына дейінгі әртүрлі типтегі кен орындары бойынша бөлінген айтарлықтай мұнай қоры бар. Карбонатты, құм-сазды және сазды-құмды формациялар басым.

Батыс Қазақстанды көмірсутектерді барлау негізінде Блэкборн анықтаған үш аймаққа жіктеуге болады [6]:

- Солтүстік-батыстағы Каспий Маңы немесе Солтүстік Каспий бассейні;
- Маңғышлақ, Каспийдің Шығыс жағалауымен шектесетін кең түбегі;
- Үстірт, Маңғышлақ пен Арал Теңізінің арасында жатыр.

Солтүстік Каспий бассейнінде 45,8 миллиард баррель мұнай эквиваленті бар, оның 57% газ. Көмірсутектердің алғашқы резервуарлары карбонатты түзілімдерде кездеседі. Ірі шөгінділер жоғарғы девон мен төменгі пермь аралығындағы тұзасты тізбегінде, құрылымдық тұзақтар мен рифтерде кездеседі. Көмірсутектер жүйесі өнімді, бұрғыланған бассейнің барлық шеттерінде өнімділігі жоғары. Ең өнімді горизонттар юра және бор дәуіріндегі жыныстарында 1000 м-ден аз тереңдіктегі тұзды күмбез тәрізді тұзақтарда

орналасқан. Мұнай бассейнінің шығыс шетіндегі тұзға дейінгі терригендік су резервуарларында кездесетін ұсақ шөгінділерден табылды. Тұз үстіндегі шөгінділердегі майлардың көпшілігі орташа, ауыр және биологиялық ыдырайтын [7].



Сурет 1 – Қазақстан мұнай кен орындарының орналасу картасы. Карта Arcgis 10.4 көмегімен жасалды.

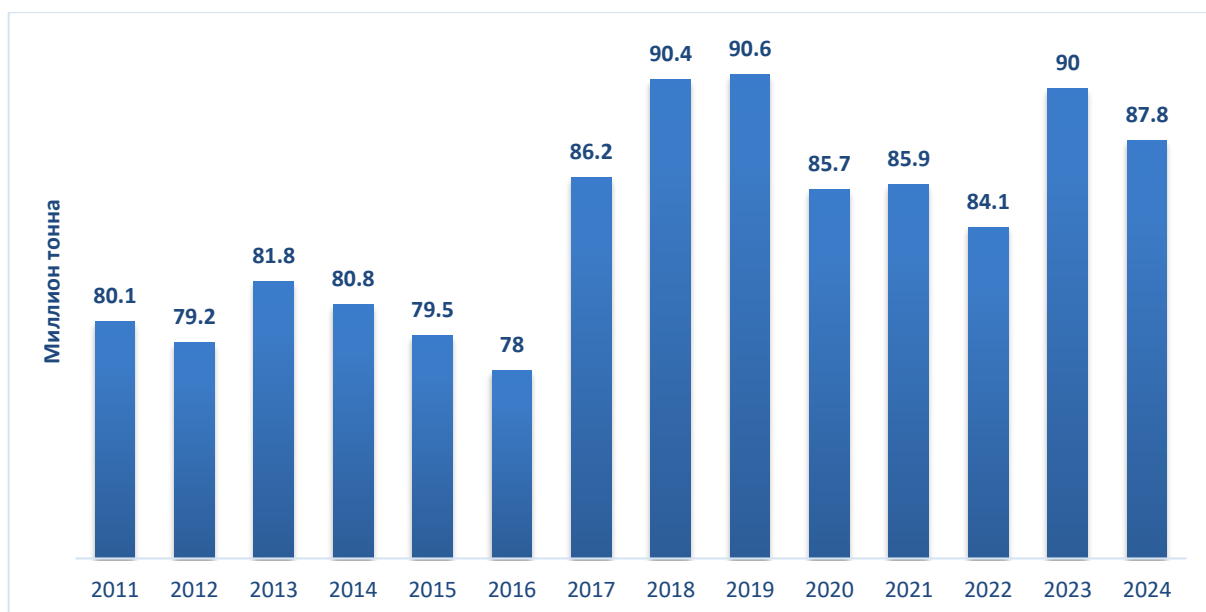
Оңтүстік Маңғышлақ бассейнінде 40-тан астам мұнай және газ кен орындары бар, негізінен төменгі орта юра құмтастарында. Ең ірі ашылмаған ресурстар Маңғышлақ мегантиклинінің батыс беткейіндегі жағалау бөлігінде орналасқан. Кейбір көмірсутектер юра дәуіріндегі жыныстарынан түзілген болуы мүмкін, бірақ олардың қоры аз деп болжамданған [8].

Үстірт бассейні Каспий теңізі мен Арал көлінің арасында орналасқан, кеш палеозой және триас бүктелген белдеулерімен шектелген. Шамамен 2,4 миллиард баррель мұнай мен 2,4 триллион текше фут газдан тұратын үш мұнай жүйесі анықталды. Мұнай қоры Бузачинск доғасында және оған іргелес жалпы мұнай жүйесінің аудандарында, ал мұнай мен газ кен орындары Солтүстік Үстірт юра жалпы мұнай жүйесінде орналасқан. Солтүстік Үстірт палеозойдың жалпы мұнай жүйесі іс жүзінде зерттелмеген, бірақ шығыс бөлігіндегі көмір қайраңының карбонаттарында екі газ ағыны мен мұнай-газ көріністері табылған [9].

Мемлекеттік бағдарлама туралы Жарлықтың жобасында көрсетілген Каспий теңізінің қазақстандық секторын игеру үшін өндірудің болжамды

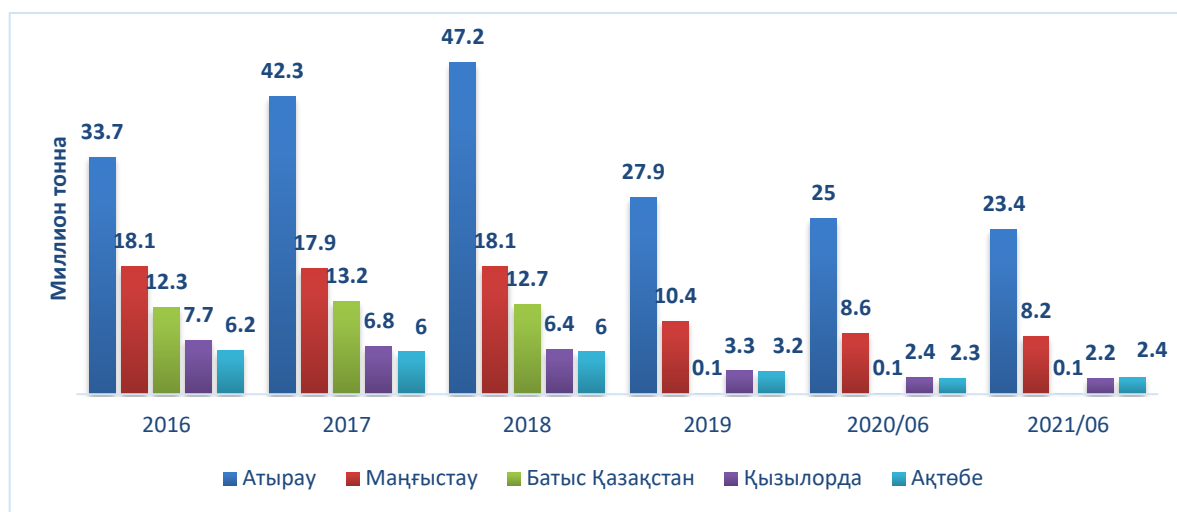
көлемі: 4,356 млн тонна мұнай, 61 млн тонна газ конденсаты және 518 млрд текше метр табиғи газды құрайды [10]. 2-суретте көрсетілгендей, Қазақстан Республикасындағы мұнай өндірудің жылдық көлемі 2011-2024 жылдар аралығындағы ауытқуларды көрсетеді. 2011–2016 жылдардағы 78–81,8 миллион тонна аралығындағы тұрақты көрсеткіштерден кейін өндіріс айтарлықтай өсті, 2018–2019 жылдары максимумға (90,4–90,6 миллион тонна) жетті. 2020–2022 жылдары құлдырау болды, бірақ өндіріс 2023 жылы қайтадан 90 миллион тоннаға жетті, ал 2024 жылы 87,8 миллион тоннаға дейін аздап төмендеді.

2023 жылғы энергетикалық ресурстар жөніндегі нұсқаулыққа сүйенсек, 2018 жылы мұнай өндіру тәулігіне 1,814 млн баррельге жетті. 2020 жылғы жағдай бойынша мұнай өндіру 6,84% - ға артып, тәулігіне 1,811 млн баррельге жетті. 2021 жылы мұнай өндіру тәулігіне 1,8 млн баррельге жетті. Қазақстан Республикасы Статистика комитетінің деректері бойынша мұнай өндірудің басым бөлігі Атырау облысына тиесілі, онда 23,4 млн тонна мұнай өндірілді, бұл өткен жылмен салыстырғанда 6,6% - ға аз. Екінші және үшінші орындарды Маңғыстау (8,2 млн тонна, 4,2% - ға төмендеу) және Ақтөбе (2,4 млн тонна, 0,4% - ға өсу) облыстары иеленді (сурет 3). Атырау облысындағы шикі мұнай мен ілеспе газдың негізгі өндірушілері «North Caspian Operating Company» филиалы (Қашаған кен орны), «Tengizchevroil» ЖШС (Теңіз кен орны) және «Ембімұнайгаз» АҚ болып табылады. Маңғыстау облысында «Қаражанбасмұнай» АҚ, «Маңғыстаумұнайгаз» АҚ және «Қарақұдықмұнай» ЖШС сияқты мұнай компаниялары жұмыс істейді. Қызылорда облысында мұнай өндірумен «Joint Venture Kuatam-Munai» ЖШС, «Торғай Петролеум» АҚ, «Казгермұнай» ЖШС және «Oil Company Kor» АҚ айналысады.



Сурет 2 – Қазақстан Республикасы мұнай өндірудің жылдық көрсеткіші.

Бүгінгі таңда Қазақстанда геология және өндіру тұрғысынан күрделі болып табылатын мұнай кен орындарының едәуір саны бар. Бұл кен орындары мұнайдың жоғары тұтқырлығымен, коллекторлардың төмен өткізгіштігімен және күрделі геологиялық құрылымымен сипатталады, бұл мұнай өндіруші компаниялар үшін үлкен қиындықтар туғызады. Мұндай кен орындарында тиімді жұмыс істеу мамандандырылған технологияларды пайдалануды, қабаттардың геологиялық құрылымдары мен қасиеттеріне терең зерттеулер жүргізуді талап етеді. Бұл осындай күрделі кен орындарынан мұнайдың тұрақты өндірілуін қамтамасыз ету үшін Қазақстанның мұнай өнеркәсібінде тұрақты даму мен инновациялардың қажеттілігін көрсетеді.



Сурет 3 – Қазақстан облыстары бойынша мұнай өндірудің жылдық көрсеткіші.

Батыс Қазақстанда геологиялық, технологиялық, экономикалық және экологиялық факторларды қоса алғанда, мұнай өндірудің негізгі аспектілері айқындалған. Күрделі геологиялық өндіріс жағдайлары арнайы әдістер мен технологияларды қолдануды талап етеді, сонымен қатар осы аймақтағы мұнай өндіру мен өңдеудің бүкіл тізбегіне әсер ететін экология, салық салу және энергиямен жабдықтау саласындағы қиындықтарға тап болады.

Қазақстанда мұнай өнеркәсібін дамытудың басым бағыттарының бірі қолданыстағы кен орындарында мұнай шығаруды арттыру болып табылады. Ол үшін жаңа технологияларды енгізу, кен орындарының сипаттамаларын мұқият зерделеу және өндіру процестерін оңтайландыру қажет. Бұл кешенді тәсіл жетілген кен орындарындағы қалдық қорларды тиімдірек пайдалануға мүмкіндік береді, бұл өндірістік көрсеткіштерді жақсартуға және қоршаған ортаға теріс әсерді азайтуға ықпал етеді.

Осылайша, Қазақстанда мұнай өнеркәсібін дамыту осы саланы дамыту стратегияларын қалыптастыру кезінде аталған барлық аспектілерді ескеруді талап етеді.

1.1.1 Ақінген кен орнына жалпы сипаттама

Ақінген кен орны Каспий маңы ойпатының оңтүстік-шығыс бөлігінде орналасқан, әкімшілік жағынан Атырау облысының Жылыой ауданына жатады. Құлсары қаласынан оңтүстік-шығысқа қарай 40 км жерде, ең жақын Қосшағыл, Құлсары және Қаратон елді мекендері тиісінше 35 км, солтүстікке қарай 50 км және оңтүстік-батысқа қарай 45 км қашықтықта орналасқан. Орографиялық тұрғыдан алғанда, бұл жартылай шөлді жазық, жұмсақ рельефті және топырақ құрамы сортаң, сор және құмды келген. Аудан күрт континентальды климатпен сипатталады, жазда +40°C-тан қыста -30°C-қа дейін және жылына 200 мм-ден аспайтын жауын-шашын аз болады.

Кен орны 1980 ж. ашылды. Барлығы 25 ұңғыма пайдалануда, оның 23-і белсенді, 2-уі белсенді емес және 7-уі жойылған.

Ақінген кен орны төменгі пермь дәуірінен төрттік шөгінділеріне дейінгі әртүрлі геологиялық қабаттарды қамтиды. Барлау ұңғымаларының мәліметтері бойынша кунгур, пермо-триас, юра, бор және палеогенді қоса алғанда, әртүрлі кезеңдердің болуы байқалады. Төменгі юрада сұр құмдар мен құмтастар, ортаңғы юрада қабат аралық құмды-сазды шөгінділер, ал жоғарғы юрада мергель мен саз балшықтары басым. Бор саздан, құмнан және бордан тұрады, ал палеоген әртүрлі реңктегі мергельдер мен саздармен ұсынылған. Төрттік шөгінділерге әртүрлі қоспалары бар құмдар, саздар және әкті мергельдер жатады. Тектоникалық тұрғыдан Ақінген құрылымы күмбездің күмбезді бөлігімен және күмбез бөлігіндегі жиекпен сипатталатын тұз күмбезді құрылым болып табылады. Тұз ядросы антиклиналь тәрізді, оңтүстік-батыстан солтүстік-шығысқа қарай созылған, екі беткейі бар: солтүстік-батыс және оңтүстік-шығыс.

Құрылымы тұз үстіндегі шөгінділер бойынша екі қанатқа бөлінеді: солтүстік-батыс - жоғары және оңтүстік-шығыс - төмен. Солтүстік-батыс қанатында терең іздеу ұңғымалары бұрғыланды, бірақ олар өнімді көкжиектерді ашпады. Оңтүстік-шығыс қанатында екі тектоникалық қорғалған тұзақтар бор шөгінділерінде. Құрылымының оңтүстік өрісі оңтүстік-батысқа қарай құлаған радиалды аз амплитудалық разряд бойынша екі блокқа бөлінген. Оңтүстік-шығыс қанатында ұңғымалар бұрғыланды, олар альб, апт және неоком шөгінділерінде өнімді горизонттарын ашты.

Ақінген күмбезіндегі барланған мұнай мен газ кен орындары оның шығыс қанатындағы антиклинальды құрылымды құрайтын төменгі бор шөгінділерімен байланысты. Оңтүстік-шығыс қанатында 7 өнімді горизонт орнатылған: I альб - мұнай; аралық - мұнай; II альб - мұнай; апт - неоком - газ-мұнай; I неоком - мұнай, II неоком (I пласт - газ-мұнай; II пласт - газ, III пласт - газ-мұнай); III неоком - газ-мұнай. Алынатын мұнай қоры горизонт бойынша келесідей бөлінеді:

- I - альб: 169,8 мың тонна;
- II-альб: 35,2 мың тонна;
- Апт-неокомда: 38,7 мың тонна;

- I неокомда: 153,8 мың тонна;
- II неокомда, I пласт: 41,7 мың тонна;
- II неокомда, III пласт: 38,4 мың тонна;
- III неокомда: 56,5 мың тонна.

Кен орнында өндірілетін мұнай қорының жалпы көлемі 597,2 мың тоннаны құрайды. Ал кен орнында өндірілетін еріген газ қорларының жалпы көлемі 102,3 млн. м³ құрайды. Еріген газдың алынатын қорлары горизонт бойынша келесідей:

- I-альб: 27,7 млн. м³;
- II-альб: 19,3 млн. м³;
- АПТ-неоком: 10,4 млн. м³;
- I неоком: 22,2 млн. м³;
- II неоком, I пласт: 9,8 млн. м³;
- II неоком, III пласт: 9,6 млн. м³;
- III неоком: 4,3 млн. м³;

Қойнауқаттық, резервуар, серпімді-су қысымды режимі бар, резервуар бөліктеріне аз амплитудалық антиклинальды қатпарлар орайластырылған.

Өнімді горизонттардың шоғырлану тереңдігі 660- 682 м, 927 м және 1028-1111 м. Альбтық мұнай шоғырларының биіктігі 10-16 м. Мұнайдың бастапқы дебиті 27-51 м³/тәул, газ 452,8-716,9 мың м³/тәул. Бастапқы мұнай пласт қысымы 6,2-12,8 МПа, температура 34-47°С. Мұнайдың тығыздығы 842-905 кг/м³. Аз күкіртті мұнайлар (0,15-0,28 %), аз парафинді мұнайлар - 0,88 %. Бос күйіндегі газдар метаннан (94,2-97,3 %), этаннан (0,95-3,68 %), пропаннан (0,17 %), изобутаннан (0,06-0,2 %), н- бутаннан (0,04-0,19 %), азот (0,98-1,73 %), көмірқышқыл газы 0,25 % тұрады. Мұнай шоғырларының режимі серпімді, газды - серпімді-газды-суағысты. Тығыздығы 1078-1105 кг/м³ және минералдылығы 127,1-162,5 г/л хлоркальцийлі типті мұнай пласт сулар [11, 12].

Осылайша, Ақінген кен орны стратегиялық маңызды аймақта орналасқан мұнай мен газдың мол қоры бар маңызды актив болып табылады. Оның геологиялық әртүрлілігі мен өндірудің жоғары әлеуеті оны аймақтың мұнай-газ индустриясын дамытудың негізгі объектісіне айналдырады.

1.1.2 Шығыс Мақат кен орнына жалпы сипаттама

Мақат - Қазақстандағы мұнай кен орны. Атырау облысының Мақат ауданында, оның Әкімшілігінің жанында орналасқан. Мақат орталығы, Атырау қаласынан шығысқа қарай 100 км жерде. Кен орны 1913 жылы ашылған.

Ол екі бөлікке бөлінеді: Мақат а (Мақат поселкесінің батысында) және Мақат в (оның шығысында). Төменгі бор, орта Юра және пермотриастың мұнай кен орындары, мұнда неоком және газ-мұнай мұнай горизонттары бөлінген. Кен орны консервацияда. Бірақ жетілген Мақат кен орнының қайта игерілуімен, Шығыс Мақат, Жаңа Мақат кен орындарынан мұнай өндіру жұмыстары қазіргі кезге дейін жүргізіліп келеді [13].

Шығыс Мақат кен орны Қазақстанның Атырау облысы Мақат ауданында

орналасқан. Ол Мақат кентінің жанында (0,5 км), ал Мақат мұнай кен орны Атырау қаласының облыс орталығынан 7 км қашықтықта орналасқан, ол батысқа және оңтүстік-батысқа қарай 120 км қашықтықта орналасқан. Аумақта «Қандыағаш-Атырау» темір жолы өтеді, ал автомобиль жолдары арқылы кіру маусымға байланысты Атырау қаласынан Доссор кентіне дейінгі асфальтталған жолдармен, сондай-ақ қара жолдармен қамтамасыз етіледі. Жер бедері-құмды учаскелері бар жазық және төмен биіктіктер. Климат күрт континентальды, жаздың ыстық $+41^{\circ}\text{C}$ -тан және қыстың суық -36°C -қа болуымен сипатталады, жауын-шашын аз.

Шығыс Мақат кен орнын екі жер қойнауын пайдаланушы әзірлейді: «Ембімұнайгаз» АҚ және «5A OIL (5A ОЙЛ)» ЖШС (бұрынғы атауы - «Манаш» ЖШС Петролеум). Кен орнының әрбір келісімшарт аумағында өндірілетін өнімді жинау және дайындау дербес технологиялық схема бойынша жүргізіледі.

Кен орнында готерив және баррем деңгейлерін қамтитын неоком шөгінділері бар. Баррем деңгейінде үш мұнай көкжиегі бар. Литологиялық тұрғыдан баррем саз қабаттары бар құмдар мен құмтастармен сипатталады. Құм сұр және қою сұр түсті, жұқа және ұсақ дәндері бар, кейде орташа түйіршікті, жерлерде карбонаттар бар. Құмтас сонымен қатар жұқа және ұсақ түйіршікті, әлсіз сазды және карбонатты. Саз жасыл және жасыл-сұр үлгілермен ұсынылған, тығыз, құмды қосындылары бар және әлсіз карбонатты. Минералогиялық талдау гранаталар (13%), циркон (34%), рутил (1,8%), турмалин (0,6%), эпидот (1,1%), сондай-ақ мүйіз, слюда және сфен (0,1%) сияқты төзімді минералдардың басым болуын анықтады.

Шығыс Мақат мұнай мен газдың едәуір кен орындарының пайда болуымен сипатталатын неоком кезеңіне жатады. Бұл аймақта әдетте үш негізгі неоком горизонттарына бөлінеді: I, II және III неоком горизонттары. I неоком горизонтыда мұнайдың жалпы ауданы 7941 мың м^2 құрайды. I неоком Оңтүстік алаңда 134 ұңғыманың 102-сі мұнаймен қаныққан, 8-і сумен қаныққан, ал 19-ы фациальды түрде ауыстырылған. Пайда болу тереңдігі минус 629,8 м-ден минус 734,8 м-ге дейін. Тиімді мұнаймен қаныққан қалыңдығы 1,1-ден 9,2 м-ге дейін. Солтүстік-шығыс далада 31 ұңғыманың 25-і мұнаймен қаныққан, 3-і сумен қаныққан және 3-і фациальды түрде ауыстырылған. Кен орнының тереңдігі минус 650,9 м-ден минус 717,4 м-ге дейін, тиімді мұнаймен қаныққан қалыңдығы 1,4-тен 5,1 м-ге дейін. Оңтүстік-батыс далада 17 ұңғыманың 9-ы мұнаймен қаныққан, 3-і сумен қаныққан және 5-і фациальды түрде ауыстырылған. Пайда болу тереңдігі 657,6 м-ден 703,0 м-ге дейін, тиімді мұнаймен қаныққан қалыңдығы 2,0 м-ден 8,2 м-ге дейін. қабылданған

II неоком горизонты мұнай көлемі 4601 мың м^2 құрайды. Оңтүстік алаңда 97 ұңғыманың 67-сі мұнаймен қаныққан, 5-і суға қаныққан, 20-сы суға қаныққан, 5-і коллектор сазданған. Пайда болу тереңдігі минус 652,8-ден минус 749,3 м-ге дейін, жалпы және тиімді мұнаймен қаныққан қалыңдығы 1,1-ден 20,0 м-ге дейін. Кеуектілік пен мұнаймен қанығу коэффициенттерінің орташа

мәні сәйкесінше 0,293 және 0,792 д. д. құрайды. Солтүстік-шығыс алаңда 23 ұңғыманың 12-сі мұнаймен қаныққан, 2-і мұнай-сумен қаныққан, 9-ы су қаныққан. Шөгінділердің тереңдігі минус 672 м-ден минус 768 м-ге дейін, тиімді мұнаймен қаныққан қалыңдығы 1,8-ден 12,3 м-ге дейін.

III неоком горизонтында мұнай көлемі 1116 мың м² құрайды. Оңтүстік далада 7 ұңғымадан, 2-і ластанған коллектор, 1-і суға қаныққан, ал 4-і мұнайға қаныққан. Пайда болу тереңдігі минус 684,8 М - 710,7 м аралығында болады. Жалпы және тиімді мұнаймен қаныққан қалыңдығы 1,0 - 4,5 м аралығында болады. Солтүстік-шығыс бөлігінде тек 2 ұңғыма (209, 217) бар. Жалпы тиімді және мұнайға қаныққан қалыңдығы 1,0 - 1,2 м құрайды.

Мұнай бойынша жалпы есептелген қорлар құрады:

- I неоком горизонты бойынша мұнайдың геологиялық қоры – 2692,67 мың тонна, алынатын мұнай қоры - 1362,49 мың тонна;
- II неоком горизонты бойынша мұнайдың геологиялық қоры - 5314,29 мың тонна, алынатын мұнай қоры - 3146,06 мың тонна;
- III неоком горизонты бойынша мұнайдың геологиялық қоры - 446,74 мың тонна, алынатын мұнай қоры - 213,54 мың тонна.

Еріген газ қоры бойынша:

- I неоком горизонты бойынша газдың геологиялық қорлары – 51,16 млн. м³, алынатын газ қорлары – 25,89 млн. м³;
- II неоком горизонты бойынша газдың геологиялық қорлары – 5314,29 млн. м³, алынатын газ қорлары – 3146,06 млн. м³;
- III неоком горизонты бойынша газдың геологиялық қоры - 446,74 млн. м³, алынатын газ қоры - 213,54 млн. м³.

Осылайша, Шығыс Мақат

Осылайша, Қазақстанның Атырау облысында орналасқан Шығыс Мақат кен орны неокомдық горизонттары дамыған елеулі мұнай-газ кен орны болып табылады. Үш негізгі неокомиялық горизонты бар кен орны мұнайдың жоғары қанықтылығымен және ұңғымалардың өнімділігімен сипатталады, бұл оны әрі қарай игеру мен пайдалану үшін перспективалы етеді.

1.2 Мұнай пласттарынан мұнай шығару әдістері

Мұнай өндіру - жер асты кен орындарынан шикі мұнайды алу процесі. Бұл мұнай өнімдерін өндірудің негізгі кезеңдерінің бірі. Мұнай өнеркәсібінде тиімді мұнай өндіру өте маңызды, өйткені ол мұнай өндіру операцияларының экономикалық орындылығы мен тұрақтылығына тікелей әсер етеді. Мұнай өндіру әдістері әртүрлі геологиялық сипаттамалары бар пласттардан шикі мұнайды алуға арналған көптеген әдістер мен технологияларды қамтиды. Бұл әдістер өндіріс қарқынын оңтайландыруды, пласттардың максималды мұнай шығымдылығын және қоршаған ортаға әсерді азайтуды ескере отырып жасалған.

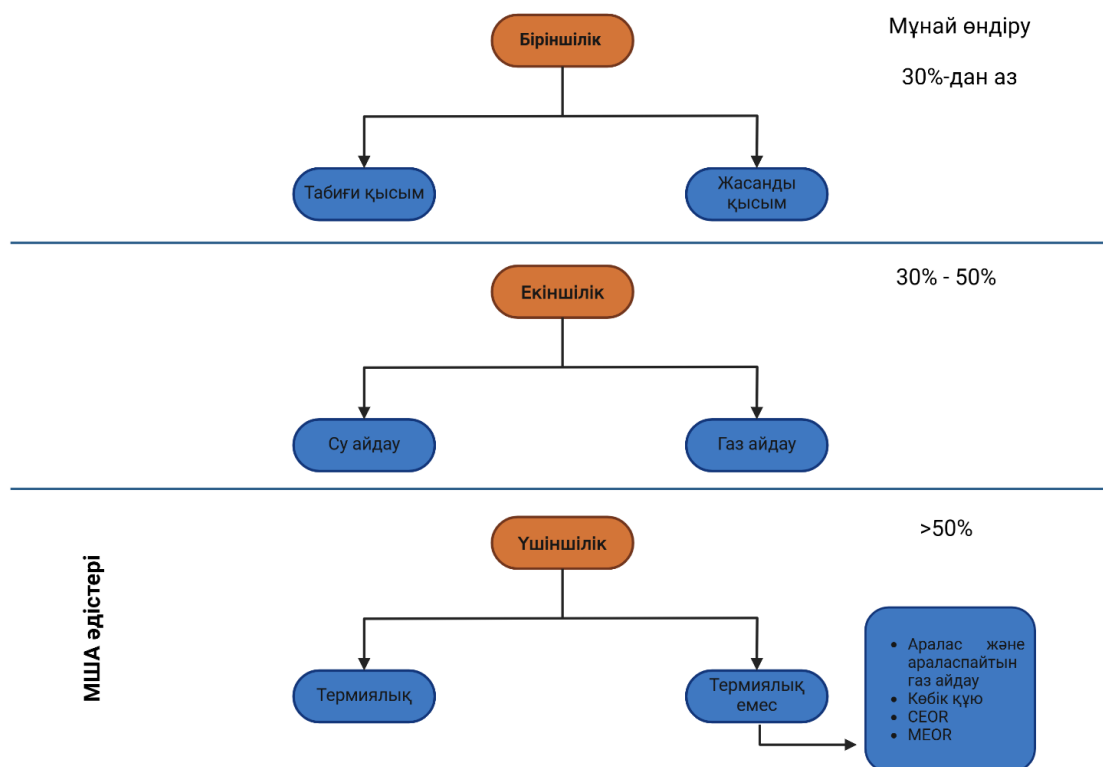
Әдетте кен орнын игеру жүйесі жүйелі түрде кезеңдермен жүреді: біріншілік, екіншілік және үшіншілік мұнай өндіру [14].

Біріншілік мұнай өндіру - пласттың табиғи қысымын немесе ұңғымаға мұнайдың гравитациялық ағынын пайдалану процесін, сондай-ақ мұнайды жер бетіне шығарудың механикаландырылған әдістерін қолдануды қамтиды. Табиғи қозғаушы күштерге мыналар жатады: сулы горизонттан су беру; мұнайдан газдың бөлінуі нәтижесінде пайда болатын еріген газдың берілуі; қысымның төмендеуі; газ сорғыш жетек; таужынымары мен сұйықтықтың кеңеюі; гравитациялық дренаж. Бұл кезеңнің көлемі бастапқы мұнай өндіру көлемінің 5-20% құрайды [15, 16].

Екіншілік мұнай өндіру кезеңі, су немесе газ (табиғи газ, көмірқышқыл газы немесе азот) айдау сияқты мұнайды ығыстыру және оны өндірістік ұңғымаға бағыттау арқылы кен орнының өнімділігін ұзарту үшін қолданылады [17]. Бұл кен орындағы бар мұнайдың 20-40%-ын алуға мүмкіндік береді [15, 18].

Мұнайды үшіншілік, сондай-ақ мұнай шығуын арттыру (МША) ретінде белгілі, мұнай қорынан мұнай өндіру үшін қолданылатын үшінші кезең. Үшінші өндіру әдістері мұнай өндіруді жеңілдету үшін мұнай мен кен орындарының қасиеттерін өзгертуге бағытталған. Бұл әдістер бастапқы мұнайдың қосымша 30-60%-ын өндіре алады [19, 20].

Әдетте, МША термиялық қалпына келтіру, chemical enhanced oil recovery (CEOR), газды айдау және микробиологиялық әдістерді қамтиды, оларды екі топқа бөлуге болады: термиялық және термиялық емес әдістер (сурет 4) [18, 21].



Сурет 4 - Мұнай өндіру әдістері.

Термиялық әдістер (бу айдау, орнында жағу, ыстық су басу) шикі мұнайды пластта қыздыру арқылы коллектордың температурасын жоғарылатады, сондықтан оның тұтқырлығын төмендетеді және/немесе мұнайдың бір бөлігін буландырады және осылайша қозғалғыштығын төмендетеді. Температураның жоғарылауы беттік керілуді азайтады және майдың өткізгіштігін арттырады, сонымен қатар резервуардан сүзу жағдайларын жақсартады. Қыздырылған май да буланып, содан кейін өнім алу үшін конденсациялануы мүмкін. Алайда, бұл операция арнайы жабдыққа айтарлықтай инвестицияларды қажет етеді [22].

Резервуарға буды айдау үздіксіз немесе циклді болуы мүмкін, бұл бу ағынын оңай басқаруды және орнында жанумен салыстырғанда жылдамырақ жауап беру уақытын қамтамасыз етеді [22].

Орнында жағу газдың мұнаймен реакциясын қамтиды, мұнайды сұйылтатын және оны ұңғымаларға қарай итеретін жоғары температуралы жану фронтын жасайды. Бу айдау және орнында жағу, мұнайдың тұтқырлығын төмендету және өндіруді арттыру үшін тиімді. Дегенмен, олар айтарлықтай инвестицияларды қажет етеді және коррозия және құм өндірудің жоғарылауы сияқты проблемаларды тудыруы мүмкін [23].

Ыстық су тасқыны мұнайдың қозғалғыштығын арттыру және тұтқырлықты азайту арқылы өндірісті жақсартады, бірақ тесіктердің бітелу мәселелеріне әкелуі мүмкін. Сол себепті сирек қолданылады [24].

CEOR келесі жолдармен мұнай шығуын арттыру және су тасқынының тиімділігін арттыру үшін айдалатын сұйықтықтағы суға химиялық қоспаларды пайдаланады: (1) судың тұтқырлығын арттыру (полимердің тасқыны); (2) суға қатысты салыстырмалы өткізгіштіктің төмендеуі (полимердің айкаспалы су басуы); (3) мұнайдың салыстырмалы өткізгіштігін арттыру (мицеллярлық және сілтілі су тасқыны) [22].

Полимер айдау: полимерлер судың қатынасын төмендетіп, айдаудың тік және аумақтық тиімділігін арттырады. Полимерлер қалдық мұнайды ығыстыру үшін ұңғымалар арқылы енгізіледі [25].

Мицеллярлық полимер айдау: мұнай мен су арасындағы фазааралық кернеуді азайту үшін үшінші компонент, беттік белсенді заттар (ББЗ) қосылады. Мицеллярлық шешім сұйықтықтарды пластта, әсіресе сілтінің (натрий карбонаты) қатысуымен араластыратындықтан, мұнайды 100% -ға ығыстыруы мүмкін. Алайда, кен орнындағы жыныстарының гетерогенділігіне байланысты алынған мұнай мөлшері азаяды [26].

Сілтілі-ББЗ-полимер айдау: су айдау кезінде судың төмен тұтқырлығы мен су-мұнай аралық керілуінің салдарынан қалдық мұнай алынбайды. Мәселені шешуде тағы бір әдіс үш химиялық затты айдау болып табылады: беттік адсорбцияны азайту үшін сілті; бет аралық кернеуді төмендету мен эмульсияны тұрақтандыру үшін ББЗ; тұтқырлықты арттыру мен тазалау тиімділігін арттыру үшін полимер қолданылады [25].

Аралас газды айдау және араласпайтын газды айдау - бұл мұнай өндіруді арттыру үшін қолданылатын МША әдістері. Аралас газды айдау - мұнаймен

араласатын газды қолданып, мұнайды өндіру. Қысым ең төменгі араластыру қысымынан асқанда бұл әдісті қолдану тиімді. CO_2 әдетте аралас материалдарды айдау кезінде қолданылады және оның сәттілігіне температура, қысым және мұнайдың қасиеттері сияқты факторлар әсер етеді [27]. Араласпайтын газды айдау кезінде таусылған көмірсутек газы сияқты газдар қолданылады. Пласт қысымын ұстап тұру, мұнайды көлденең және тігінен ығыстыру және сұйық көмірсутек компоненттерін буландыру сияқты механизмдер арқылы мұнай шығаруды арттыру болып табылады. Бұл әдіс қысымды ұстап тұру және әртүрлі типтегі пласттардың мұнай шығаруын арттыру үшін қолданылған [28].

Көбік айдау — өндірісті жақсарту үшін мұнай пласттарына көбік енгізуді қамтитын әдіс. Бұл процесс таусылған кен орындары үшін перспективалы болып табылады, қысым мен температура сияқты инъекция жағдайларын мұқият бақылауды қажет етеді және көбік тұрақтылығын жақсарту үшін әртүрлі заттарды (нанобөлшектер, полимерлер, иондық сұйықтықтар және бинарлы ББЗ) қосу арқылы жетілдірілуі мүмкін [29].

Алайда, бұл әдістер көбінесе әртүрлі экономикалық немесе экологиялық тәуекелдерді қамтиды. Мысалы, белгілі бір химиялық ББЗ қолдану қоршаған ортаға зиян келтіріп қана қоймай, оларды өндіруге қажетті улы химикаттарды қолдану арқылы зиян әсер етуі мүмкін [30].

Осы тәуекелдерді азайту үшін экологиялық тұрақты және үнемді баламаларды іздеуге ерекше назар аударылады. Осындай баламалардың бірі - микроорганизмдерді қолдана отырып, пласттардың МША әдістерін қолдану. Осы технологияның бір бөлігі ретінде қалдық мұнай пластқа микроорганизмдерді, қоректік заттарды немесе екеуінің комбинациясын енгізу арқылы жұмылдырылады.

Осылайша, мұнай өндіру әлемдік экономикада шешуші рөл атқарады және энергетикалық қауіпсіздікті қамтамасыз етеді. Мұнай өндіруді арттырудың бастапқы әдістерінен үшінші әдістеріне дейін өндіру процесінің әр кезеңі кен орындарынан мұнайды тиімді және тұрақты алу үшін маңызды. Микроорганизмдер негізінде микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру - ММША пайдалану сияқты мұнай өндіруді жақсартудың озық технологиялары мен әдістерін енгізу өндірістің тиімділігін айтарлықтай жақсартып, оның экологиялық әсерін азайтуы мүмкін. Бұл экономикалық және экологиялық пайданы біріктіретін әдіс. Дегенмен, ықтимал тәуекелдерді ескеру және тұрақты баламаларды іздеу маңызды. Әртүрлі аспектілерді ескеретін теңдестірілген тәсіл ғана мұнай өнеркәсібінің тұрақты дамуын және қоршаған ортаны сақтауды қамтамасыз етеді.

1.2.1 Мұнай пласттарынан микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру әдісі

1926 ж. Бекман алғаш рет кеуекті ортадан мұнай өндіру үшін микроорганизмдерді қолдануды ұсынғаннан бері, бактерияларды айдауды

қолданатын ММША әдісі (microbial enhanced oil recovery - MEOR) іске асырылып, әр түрлі өткізгіштігі бар карбонатты коллекторларда да қолданылды [31]. Алайда 1946 ж. Зобелл және оның әріптестері Бекманның теориясын растау үшін бірінші болып нақты эксперименттік жұмыстарды жүргізді [32]. Олардың жұмысы 1955 ж. дейін жалғасты. Олар анаэробты бактерияларды, көмірсутек ыдыратушы және сульфат редуцирлеуші бактерияларды (СРБ) пайдалана отырып, мұнайды өндіру процесін патенттеді. 1954-1970 ж. аралығында АҚШ, КСРО, Чехословакия, Венгрия және Польшада қарқынды зерттеулер жүргізілді [33, 34]. 1970-2000 ж. аралығында ММША негізгі зерттеулері микробтық экологияға және мұнай резервуарларын сипаттауға бағытталған [35]. 1995 ж. АҚШ-тағы 322 ММША жобаларының 81% мұнай өндіруді сәтті жүргендігін көрсетті [36].

2007 жылға қарай АҚШ - тағы 322 ММША жобасын зерттеулер бойынша 78% -ы пласттардан мұнай өндірудің сәтті артуына әкелгенін көрсетті [37].

2012 жылға дейін жеті араб елінде (Сауд Арабиясы, Египет, Кувейт, Катар, Біріккен Араб Әмірліктері, Ирак және Сирия) ММША өтінімдерін зерттейтін 300-ден астам қауымдастық болды [37].

2018 жылы АҚШ-тың SBIR компаниясы дәстүрлі емес коллекторлардан мұнайды алу үшін New Aero Technology LLC жүргізген тақтатасты ұңғымасынан мұнай өндіруге арналған әлемдегі алғашқы ММША пилоттық жобасының демеушісі болды [38].

2019 жылға дейін Қытайда ММША әдісі кең қолданылады, оның аясында 4600-ден аз далалық сынақтар жүргізілді. Оның ішінде 500-ге жуық ұңғымаларда микробиологиялық айдау (microbial flooding recovery - MFR) арқылы мұнай өндірген. Қытайдағы жалпы 47, ал Дацин кен орнында 12 MFR далалық сынақтары өткізілді. Барлық далалық сынақтардың нәтижелері мұнай өндіруде өзгерістерді көрсетті. Қытайдағы MFR жүйесі коммерциялық қолдануға өте жақын [39].

Бүгінгі таңда ММША өзінің төмен құнына (қосымша баррель үшін 10 доллардан аз) және күрделі шығындарға қойылатын талаптарға байланысты көбірек назар аударуда [40]. 1-кестеде әртүрлі мемлекеттердегі ММША далалық сынақтары, соның ішінде қолданылатын техникалық құралдар, микроорганизмдер және қоректік заттар келтірілген.

Кесте 1 – Әлемдік ММША әдісінің оң нәтижелі далалық сынақтары.

Мемлекет	Технологиясы	Микроорганизмдер	Қоректік орталар	Нәтижесі	Сілтеме
Қытай	MFR, MSPR, MWR, CMR	<i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> және <i>Bacillus</i>	Фосфат тұздары, аммоний, ашытқы сығындылары, пептон	Мұнай өндіру 8700 тоннаға артқан	[41]

		<i>Brevibacillus brevis</i> және <i>Bacillus cereus</i>	Ашытқы сығындысы, фосфаттар, аммоний тұздары	Жалпы мұнай өсімі 9175,5 тонна	[42]
		<i>Bacillus</i> штаммдары	Меласса 0,545%, фосфор және азот көзі	Микробиологиялық өңдеуден кейін мұнайдың орташа өндірісі тәулігіне 2,2-ден 3,5 тоннаға дейін өсті.	[43]
		Аборигенді микроорганизмдер	Жүгері сығындысы, натрий нитраты, диаммоний фосфаты	Мұнай өндіру 3068 тоннаға артқан	[44]
Ресей	MFR	Аборигенді микроорганизмдер	Аэрация, фосфор, азот	Қосымша 41.08 тонна мұнай өндірілді	[45]
		Аралас аэробты және анаэробты бактериялар	4% меласса	Мұнай өндіру 4 айда 8% өсті	[46]
		Көмірсутек тотықтырғыш бактериялар	Азот пен фосфор	Қосымша 1250 тонна мұнай өндірілді	[47]
АҚШ	MFR, CMR	<i>Bacillus</i> және <i>Clostridium</i>	4% меласса	Мұнай өндіру 19,6% артқан	[48]
		<i>Clostridium</i> туысының дақылы	4-10% меласса, мочевина; аммоний нитраты; гликолат ацетаты	5 ай ішінде мұнай өндірудің айтарлықтай артты	[35]
		Аборигенді микроорганизмдер	Бейімделетін қоректік орта	Ұңғыманың дебитін 20-дан 80 тоннаға дейін артқан	[49]
Аргентина	MFR	Анаэробты факультативті микроорганизмдер	Фосфор, калий және азот қосылыстары	Мұнай өндіру 26% артқан	[50]
Әзірбайжан	MFR	Аборигенді микроорганизмдер	Меласса және сүт сарысуы	Ұңғыманың дебиті тәулігіне 0,7-ден 1,8 т-ға дейін артқан	[51]
Канада	MFR	Эндогенді микробтық популяция	Фосфаттар, аммоний нитраты, органикалық қосылыстар	Дебиттің өсуі тәулігіне 1,4-тен 8 м³-ке дейін	[52]
Мьянма	EEOR	Экзогенді микроорганизмдер	Бейімделген қоректік заттар	Күніне қосымша 90 баррель мұнай өндірілді	[53]

ММША микроорганизмдерді (in situ) қолдану арқылы немесе ұңғымаларға (ex situ) метаболизмнің жанама өнімдерін енгізу арқылы жүзеге асырылады [54].

Мұнай шығарудың селективті микробтық арттыру (Microbial Selective Plugging Recovery - MSPR) резервуардағы жоғары өткізгіштік аймақтарын

таңдамалы түрде жабу үшін микроорганизмдерді пайдалануға бағытталған. Мұндай айдалатын сұйықтықтардың бағытталуы көбірек мұнай қаныққан аймақтарды қамтуға көмектесе, мұнай өндіру тиімділігін арттырады. Микробтардың көбеюі және биопленканың түзілуі жоғары өткізгіштігі бар арналарды бітеу үшін пайдаланылады, бұл су айдау пайдаланылмаған мұнай аймақтарына бағытталуын қамтамасыз етеді, осылайша ығысу тиімділігін арттырады [55].

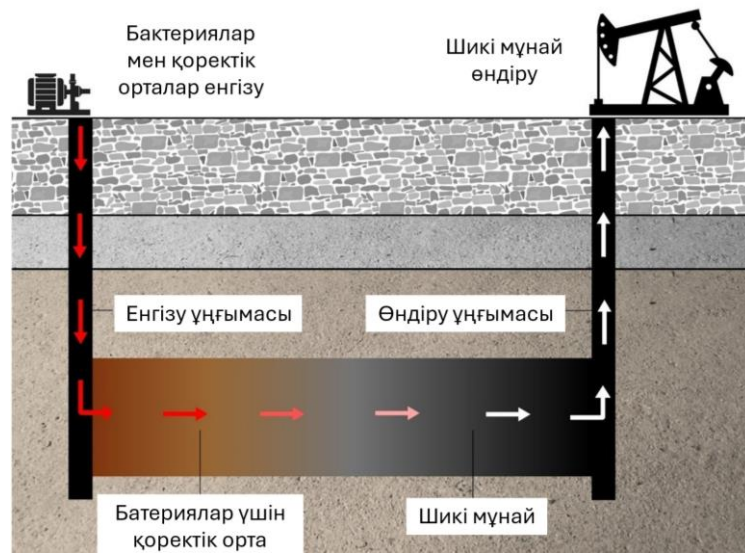
Парафинді микробиологиялық жою (Microbial Wax Removal - MWR) стандартты ММША әдісі емес, бірақ құбырлар мен ұңғымалардың бітелуіне жол бермей, парафинді ыдырату үшін микроорганизмдерді қолдануды білдіреді. Бұл микробиологиялық тәсіл химиялық өңдеуге тұрақты балама ұсынады және мұнай ағынын жақсарту және экстракция процестерінің тиімділігін қолдау арқылы ММША әдісін толықтыра алады [56].

Микробиологиялық әсер етудің жиі қолданылатын технологиялары - бұл жекелеген айдау ұңғымаларды микробиологиялық ынталандыру және ұңғымаларда микробиологиялық айдау. Ұңғымаларды микробиологиялық ынталандыру немесе циклдік микробиологиялық рекуперация (CMR) бүкіл әлемде коммерциялық мақсатта қолданылады. CMR әдісінде инъекция кезінде микроорганизмдер мен қоректік заттардың ерітіндісі мұнай пластына енгізіледі. Содан кейін айдау ұңғымасы инкубациялық кезеңге жабылады, бұл микроорганизмдерге көмірқышқыл газын (CO_2) және мұнайды мобилизациялауға көмектесетін биосурфактанттарды шығаруға мүмкіндік береді. Содан кейін ұңғыма ашылып, мұнай мен өңдеу өнімдері алынады. Бұл CMR процесін қайталауға болады. Парафинді және асфальтенді шөгінділермен байланысты ауыр мұнай пласттарында жиі қолданылады. Қолданудың негізгі бағыттарына АҚШ, Венесуэла, Қытай, Индонезия және белгілі бір дәрежеде Үндістан кіреді.

Ұңғымаларда микробиологиялық айдау (microbial flooding recovery - MFR) қоректік заттарды резервуар ішінде ұзақ қашықтыққа тасымалдауды талап етеді. MFR әдісімен мұнай мен газ өндіру пластта микробиологиялық ерітіндіні қолдану арқылы жүзеге асырылады. Әдетте резервуар алдын-ала сумен жуылады, содан кейін оған микроорганизмдер мен қоректік заттардың ерітіндісі енгізіледі. Ерітінді жұмыс суының әсерінен резервуар арқылы итерілгенде, онда метаболиттер түзіліп, мұнайдың ығысуына ықпал етеді (Patel 2015)[57].

ММША процесін жүзеге асыруда екі жағдайда бөлініп алынған белсенді микроорганизмдерді қолдануға болады: экзогенді және эндогенді (аборигенді микроорганизмдер) [58]. Ұңғымалардағы микроорганизмдер әртүрлі және олар метаболизм өнімдерінің кең спектрін шығара алады. Бұл микроорганизмдер коллекторлық жыныстары мен шикі мұнайдың химиялық және физикалық қасиеттеріне әсер етуі мүмкін [33]. Микроорганизмдердің метаболиттерінің бірқатар артықшылықтары бар: биологиялық ыдырау қабілеті, төмен уыттылығы және қабат ортасындағы белсенділігі [59].

ММША процесі кезінде микроорганизмдер су мен қоректік заттардың қоспасына енгізіледі, содан кейін мұнай ұңғымаларының ішіндегі кеуекті жерлерге айдалады (сурет 5). Микроорганизмдер резервуардағы мұнаймен әрекеттесіп, әртүрлі биоөнімдерді шығарады. Бұл метаболиттер мұнайдың тұтқырлығын төмендетуге, өткізгіштігін арттыруға және мұнай-жыныс пен мұнай-су интерфейсінің қасиеттерін өзгертуге ықпал етеді, бұл кеуекті ортадағы мұнай ағынын жақсартуға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, бұл микроорганизмдер ауыр мұнайдан күкіртті, парафиндерді және ауыр металдарды кетіру арқылы мұнай сапасын жақсарты алады [33].



Сурет 5 - ММША процесінің схемасы.

Мұнай өндіруде ММША қолдануға әсер ететін негізгі параметрлер [60–62]:

1. Су резервуарының жағдайы:
 - Қысым;
 - Кеуектілігі және өткізгіштігі;
 - Температура;
 - рН.
 2. Еріген қатты заттар және тұздылық:
 - Микроорганизмдер үшін қоректік заттардың болуы;
 3. Қолданылатын микроорганизмдердің түрі мен сипаттамалары:
 - Су резервуарының экстремальді ортасында өсу қабілеті;
 - Биосурфактанттар, биополимерлер, еріткіштер, газдар және т.б. сияқты пайдалы метаболиттерді өндіру қабілеті.
 4. Шикі мұнайдың қасиеттері:
 - Тұтқырлық;
 - Құрамы (мысалы, ауыр фракциялар);
- ММША резервуар жағдайында (қысым, температура, тұздылық және т.б.)

айдалатын микроорганизмдердің өсуі мен белсенділігін сақтаған кезде және микробтар мұнайды ығыстыру үшін қажетті метаболиттерді шығара алатын кезде тиімді екенін көрсетеді. Микробтарды мұқият таңдау және қоректік заттарды оңтайландыру ММША табысы үшін өте маңызды [60–62].

ММША әдісінің артықшылықтары [35, 63]:

- мұнай кен орындарының өнімділігін арттыру;
- мұнай өндірудің жиынтық көлемін және ұңғымалар мен кен орындарын тиімді пайдалану мерзімін ұлғайту;
- пластты сұйықтықтағы судың құрамын азайту;
- биомассаның және еритін биополимерлердің, микроорганизмдердің тіршілік ету өнімдерінің есебінен пласт суының тұтқырлығын арттыру;
- мұнай және газ ұңғымалары мен кен орындарындағы күкіртті сутегі құрамының азаюы, оның жабдыққа теріс әсері төмендейді;
- жабдықтың тұрып қалу уақытының азаюы.

Басқа МША технологияларымен салыстырғанда ММША кемшіліктерін келесідей көрсетуге болады [39]:

- Микроорганизмдердің қоректік заттардың (мысалы, сахароза немесе меласса) айтарлықтай мөлшеріне деген қажеттілік оның теңізде қолдануға жарамдылығын шектеуі мүмкін;
- Микроорганизмдердің экзогендік түрлерін енгізуді көздейтін ММША әдістері микробтарды өсіру үшін қосымша жабдықты қажет етеді;
- ММША модельдеу және оңтайландыру күрделі *in situ* реакцияларына байланысты қиын;
- Ұңғымадағы микроорганизмдердің жағдайын дәл бақылауға қол жеткізу қиын міндет болып табылады. Өйткені ол аборигенді микроорганизмдердің ықтимал бәсекелестігін және қоректік заттар мен микроорганизмдердің тасымалдануын болжаудағы қиындықтарды қамтиды.

Қазіргі уақытта ММША әдістерінде мұнай өндірудің жаңа тәсілдеріне қызығушылық артып келеді. Мысалы:

- Генетикалық түрлендірілген микроорганизмдер негізінде ММША (Genetically engineered microbial enhanced oil recovery - GEMEOR) мұнай биотехнологиясындағы инновациялық тәсіл болып табылады. Генетикалық түрлендірілген микроорганизмдер рекомбинантты технологияны, протопласт синтезін және мутагенезді қоса алғанда, гендік инженерия әдістерін қолдану арқылы жасалады. Бұл тәсілдер әртүрлі организмдердің пайдалы сипаттамаларын біріктіруге мүмкіндік береді, нәтижесінде тиімді штаммдар пайда болады (Niu et al., 2020) [64]. Бұл әдіс ММША әлеуетін кеңейтіп, өнеркәсіптік секторда үнемді және жоғары тиімді қолдануды қамтамасыз етеді. Гендік инженериядағы жетістіктер метаболиттердің едәуір мөлшерін өндіру және оңай қол жетімді субстраттарды пайдалану арқылы экстремалды жағдайларда өмір сүре алатын микробтарды құрудың жаңа перспективаларын ашады. Сонымен қатар, генетикалық әдістер ММША аборигенді микроорганизмдер кездесетін шектеулерді жеңе отырып, метаболикалық

қасиеттері жақсартылған микроорганизмдерді жасауға мүмкіндік береді [63].

- Нано-және биоматериалдарды енгізу сұйықтық ағынының қасиеттерін өзгерте алады, беттік керілуді азайтады және пласт суының тиімділігін арттырады, нәтижесінде пласттардың мұнай шығымы артады. Мысалы, Хадемолхоссейни мен оның әріптестерінің зерттеуі [65] бір мезгілде нанокремний диоксиді мен биосурфактантты инъекцияның шыны микромодельдегі ауыр мұнай ығысуына әсерін зерттеді. Эксперименттердің нәтижелері нанобөлшектер мен биоөнімдердің бір мезгілде болуы синергетикалық әсер арқылы мұнай өндіруді арттыратынын көрсетеді. Бұған беттік керілуді азайту, ұтқырлық коэффициентін жақсарту және сұйықтықтың тұтқырлығын арттыру арқылы қол жеткізіледі, нәтижесінде пласттардың мұнай шығымы шамамен 58% -ға артады. Сонымен қатар, нанобөлшектер асфальтендердің тұнбаға түсуіне жол бермейтін ингибиторлар ретінде әрекет ете алады.

- МША ферментативті әдісі (Enzyme enhanced oil recovery - EEOР) - бұл пласттардан мұнай өндірудің тиімділігін арттыру үшін ферменттерді қолданатын әдіс. Табиғи ақуыздар болып табылатын ферменттер белгілі бір химиялық реакцияларды каталитикалық түрде белсендіруге қабілетті. Ылғалдылықты арттыру және беттік керілуді азайту үшін резервуарға ферменттер қосылады. Ферменттер әсіресе ауыр заттарды жеңіл заттарға айналдыру қабілетіне байланысты сұранысқа ие. Ферменттердің әртүрлі түрлері, соның ішінде протеазалар, гидролазалар, дегидрогеназалар және басқалары EEOР әдісінде кеңінен қолданылады. Фермент пен беттік белсенді заттан (тұрақтандырғыштан) тұратын *Greenzyme* EEOР үшін ең көп қолданылатын коммерциялық ферменттердің бірі [64, 66].

1.3 Мұнай пласттарының микробтық алуантүрлілігі

Соңғы жылдары мұнай резервуарларындағы мекендеу орындарының микроорганизмдері үлкен назар аудартады. Тереңдіктегі сулы және мұнайлы горизонттарда жұмыс агенттерінің суды және су ерітінділерін бұрғылау немесе айдау кезінде жер үсті ерітінділерімен келіп түсетін микроорганизмдермен қатар аборигендік микрофлораның болуы дәлелденген.

Микробтық қауымдастықтар мұнай резервуарларында шешуші рөл атқарады, онда олар мұнайды ыдыратады және оның сапасының өзгеруіне ықпал етеді. Бұл микроорганизмдер жоғары уыттылықпен, гидрофобтылықпен және судың төмен белсенділігімен, сондай-ақ жоғары температурамен, тұздылықпен және қысыммен сипатталатын мұнай пласттарының экстремалды жағдайында дамиды.

Мұнай резервуарлары - бұл микроорганизмдер белсенді дами алатын әртүрлі фазалары бар күрделі жүйелер. Бұл фазаларға шикі мұнай, қабат суы, сондай-ақ қатты жыныстары мен органикалық материалдар жатады [67]. Микробтардың суда және мұнайда қалай таралатынын түсіну үшін мұнай резервуарындағы ортаның ерекшеліктерін түсіну маңызды. Жалпы алғанда,

мұнайдың микробтық деградациясы электронды акцепторлардың болуымен шектеледі, өйткені термодинамикалық шектеулерге байланысты көмірсутектер сутегі мен ацетатты кетіру процесінсіз ашыта алмайды. Алайда, микробтар энергияны май фазасының электронды донорларымен де, сулы фазаның электронды акцепторларымен де тікелей байланыста болған жағдайда ғана сақтай алады [68, 69]. Бұл жағдай микробтардың өсуінің және мұнайдың деградациясының ыстық нүктесі болып табылатын мұнай сілемінің астындағы мұнай-су өтпелі аймағында байқалады [70, 71]. Мұнда май фазасы электрон донорларын қамтамасыз етеді, ал су фазасы микроорганизмдердің тіршілік ету ортасын қамтамасыз етеді. Демек, мұнайдың биodeградация жылдамдығы мұнай-су интерфейсінің бетінің мөлшеріне байланысты.

Зерттеулер көрсеткендей, мұнай пластының микробтық қауымдастықтары өте алуан түрлі және түрлердің кең спектрімен ұсынылған. Мысалы, өткізгіштігі төмен мұнай резервуарындағы микробтар қауымдастығын талдайтын зерттеу бұл резервуарда бактериялардың 58 түрі мен 830 туысты қоса алғанда, әртүрлі микробтық популяциялар бар екенін көрсетті [72]. Тағы бір зерттеуде темір, марганец немесе нитраттарды қалпына келтіруге қабілетті *Thermotoga* бактериялардың болуы анықталды. Бұл бактериялар СРБ микроорганизмдерімен тығыз байланысты және микробиологиялық коррозияның түзілуіне, сонымен қатар адамдардың интоксикациясына алып келуі мүмкін [72].

Мұнай микробтық қауымдастығын зерттеуде көпшілігі мұнай ұңғымаларынан алынған үлгілерді мұнай және су фазаларына жіктейді. Табиғи су фазасы негізінен кеуекті жыныста табиғи түрде болатын пласт суынан тұрады [73, 74]. Пласт суының мөлшері мен құрамы, оның табиғи ағыны және мұнай кен орны арқылы өтетін ағын жолы микробтар қауымдастығына әсер етуі мүмкін [74–76]. Зерттеулердің көпшілігі негізделі, пласт суынан оқшауланған ДНҚ бүкіл резервуардың микробтық қауымдастығы екенін көрсетеді [73, 77, 78]. Алайда, су және мұнай фазаларын талдау олардың микробтық қауымдастығының құрамындағы үлкен айырмашылықтарды анықтады [68]. Май фазасындағы бактериялық әртүрлілігі және түрлердің байлығы су фазасына қарағанда айтарлықтай жоғары болды [67]. Кейбір бактериялар майдың бетіне тікелей жабысып қалуы мүмкін, ал басқалары су фазасында қалады. Май фазасынан көбінесе *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Nitrospira*, *Pseudomonadales* және *Thermodesulfobacteria* бөлінеді, ал су фазасынан негізінен *Alphaproteobacteria*, *Atribacteria*, *Bacterioidetes*, *Betaproteobacteria*, *Campylobacteriales*, *Chloroflexi*, *Synergistetes* және *Thermotogae* [73, 79].

Мұнай пластындағы микробтық қауымдастықтың құрамына антропогендік факторлар (бұрғылау, су басу, ыстық бу және су айдау), абиотикалық (температура, тұздылық және pH) және биотикалық (микроорганизмдердің өзара әрекеттесуі) әсер етуі мүмкін. Бұл өзгерістер микробтық қауымдастықтың популяциясының сандық және сапалық

өзгерістеріне, өз кезегінде мұнай өндіретін ұңғымалардың физикалық немесе химиялық өзгерістеріне де алып келуі мүмкін [72, 75].

Мұнай компаниялары айдау үшін әртүрлі су көздерін, соның ішінде теңіз, тұщы су немесе айналымдағы пласт суын пайдаланады. Теңіз кен орындарында теңіз суы жиі пайдаланылады, ал басқа кен орындарында жер асты немесе жер үсті сулары қолданылуы мүмкін [77, 80]. Кейде айдалатын суды резервуардағы микробтар қауымдастығына әсер ету үшін химиялық немесе қоректік заттармен байытуға болады. Мысалы, нитраттар мен нитриттерді қолдану күкіртсутектің пайда болуына әкелетін микробтық процестерді тежеуі мүмкін. Ал оттегі айдау көмірсутектердің биологиялық деградациясын ынталандыруы мүмкін. Сонымен қатар, өндірілген судың құрамы сулану деңгейіне байланысты өзгеруі мүмкін, бұл микробтық қауымдастықтарға да әсер етеді [81].

Мұнай резервуарларының геологиялық ерекшеліктері температура, рН және тұздылық микробтық қауымдастықтарға әсер етеді. Тереңдікке байланысты жоғары температура резервуарлардағы микроорганизмдердің өмірін шектеуі мүмкін. Алайда, кейбір гипертермофильді организмдер 131°C - қа дейінгі температурада табылды, дегенмен олардың мұндай жағдайда өміршеңдігі күмән тудырады [82]. Микробтардың әртүрлілігі көбінесе температурасы шамамен 55°C болатын орташа ыстық су айдындарында байқалады [83]. Микробтық қауымдастықтардың құрамы микроорганизмдердің температураға бейімделуіне қарай өзгереді. Мысалы, 50°C-тан жоғары температуралы мұнай пласттарында, әдетте *Firmicutes*, *Thermotogae* және *Thermodesulfobacteria* сияқты гаммапротеобактериялары кездеседі. Мұнай пласттарында 50°C-тан төмен температурада *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Chloroflexi*, *Marinobacterium*, *Paracoccus*, *Donghicola* және *Planctomycetes* жиі кездеседі. *Haloferacales*, *Thermoproteales*, *Sulfolobales*, *Nitrososphaerales*, *Halobacteriales*, *Fervidicoccales* және *Thermoplasmatales* сияқты кейбір архейлер тек 50°C-тан жоғары температуралы мұнай кен орындарында кездеседі. *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Desulfurococcales* және *Methanocellales* мұнай пласттарында 50°C-тан төмен температурада жиі кездеседі [72, 79].

Мұнай пласттарында тұздылығы тұщы судан тұзды суға дейін өзгереді, бұл микробтық қауымдастықтарға қатты әсер етеді және олардың өсуін шектейді. Мысалы, *Clostridia* тұздылығы төмен (3,8%) болған кезде жиі кездеседі, ал *Petrotoga* және *Desulfotomaculum* тұздың жоғары (7,2%) деңгейін жақсы көреді [76]. Тұздылықтың 10%-дан асуы пласттардағы микроорганизмдердің санын азайтады [84]. СРБ тұздылықтың кең ауқымына (0-17%) төзімді [79].

Әдетте, мұнай пласттарындағы рН мәндері 3-тен 7-ге дейін болады [74]. СРБ тұздылықтың кең ауқымына ғана емес, сонымен қатар рН мәндерінің кең ауқымына (рН 4-9,5) төзімді [79]. Қытайдағы 22 географиялық бөлінген мұнай резервуарларын зерттеу кезінде, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* және *Actinobacteria* бактериялары бейтарап және сілтілі резервуарларда жиі кездесетінін көрсетті. *Pseudomonas* рН мәні 5,5-7,6 диапазон аралығында

кездесетінді анықталды. *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* және *Epsilonproteobacteria* рН мәні 5,5-6,5 қышқыл ортаны жақсы бейімделетіндігі анықталды [75].

Мұнай резервуарларындағы микробтық қауымдастықтарға әсер ететін биотикалық факторларға микроорганизмдердің түрлері, олардың өзара әрекеттесуі және резервуарлардағы төтенше жағдайларға бейімделуі жатады. Мұнай қабаттарындағы микробтық қауымдастықтың құрамы сульфат -, нитрат - және темір тотықсыздандырғыштар, ферменттерлер, ацетогендер және метаногендер сияқты ерекше бактериялар мен архейлердің болуы сияқты әртүрлі биотикалық факторлардың әсерінен қалыптасады.

Бұл микроорганизмдер мұнайдың ыдырауында шешуші рөл атқарады, мұнайдың сапасына және жалпы резервуардың экожүйесіне әсер етеді. Сонымен қатар, микробтар қауымдастығының құрамына микроорганизмдердің мұнай-су өтпелі аймағында және мұнайдың сумен қаныққан бөліктерінде таралуы, сондай-ақ вирустардың болуы әсер етеді. Пласттың мұнай және су фазаларындағы бактериялардың әртүрлі таксондарының әртүрлілігі мен көптігі мұнай пласттарының микробтық қауымдастықтарына әсер ететін жалпы биотикалық факторларға ықпал етеді [85, 86].

Қытайдағы Цинхай су басқан мұнай кен орнының өндіру ұңғымасынан алынған су-мұнай қоспасының үлгілері пироксенолитизация және geochip4.0 қолдану әдісімен мұнай және су фазаларындағы микробтық қауымдастықтардың таксономиялық және функционалдық құрамымен салыстырылды. Бұл зерттеуде вирустың 40 генінің 38-і анықталды. Табылған гендердің үшеуі шикі мұнай мен су фазасы арасындағы санның айтарлықтай айырмашылығын көрсетті. Бактериялық лизиске арналған 3 типті холин май фазасында жиі кездеседі, ал T2 иесін тану түрі және репликацияға арналған T4 су фазасында жоғары болды. Су фазасында фаг гендерінің көп болуына байланысты микробтар фагтардан май фазасымен қорғалған деген болжам жасалды. Алайда, 3 типті холиннің мөлшері май фазасында су фазасына қарағанда жоғары болды, бұл фагтардың өзара әрекеттесуін және бактериялық лизисті тікелей май фазасында көрсетеді [87].

Осылайша, мұнай пласттарындағы микробтық қауымдастықтар мұнайдың деградация процестерінде және оның сапасын өзгертуде шешуші рөл атқаратын күрделі және әртүрлі экожүйе болып табылады. Мұнай пласттарының әртүрлі бөліктерінде микроорганизмдердің таралуына және олардың температура, тұздылық және рН сияқты әртүрлі экологиялық факторларға бейімделу қабілетіне ерекше назар аударылады. Мұнай ішіндегі су фазасын зерттеу бұл микроорганизмдер үшін тіршілік ету ортасы және мұнайдың белсенді биодеградация аймағы ретіндегі маңыздылығын көрсетеді. Микроорганизмдердің күрделі экожүйесін түсіну мұнай шығаруды арттыру әдістерін оңтайландыру үшін өте маңызды.

1.4 Микроорганизмдер мен олардың метаболиттерінің микробиологиялық мұнай шығаруды арттыру процесіндегі рөлі

Әр түрлі микроорганизмдер ММША процесінде динамикалық рөл атқаратын алты негізгі метаболиттерді (биосурфактанттар, биополимерлер, биогаз, биомасса, биоқышқылдар және еріткіштер) продуцирлейді (кесте 2) [60, 61].

Кесте 2 - Микроорганизмдер және олардың метаболиттерінің ММША әдісіндегі рөлі [36, 64, 88, 89].

Микробтық өнімдер	Өнім түрі	Продуцирлейтін микроорганизмдер	ММША әдісіндегі рөлі
Биоқышқыл	Пропион, май, сірке және май қышқылдары	<i>Clostridium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.	Өткізгіштік пен кеуектіліктің жоғарылауы, эмульсиялануы, жынысының еруі кезінде түзілетін CO ₂
Биогаз	Метан және CO ₂	<i>Clostridium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Methanobacterium</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.	Қысымның жоғарылауы, мұнайдың ісінуі, тұтқырлықтың төмендеуі, өткізгіштігінің және кеуектілігінің жоғарылауы
Микробтық биомасса		<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Xanthomonas</i> sp.	Селективті бітелу, ылғалдылықтың өзгеруі, тұтқырлықтың төмендеуі, мұнайдың деградациясы
Биополимер	Ксантан шайыры, пуллулан, леван, курдлан, декстран склероглюкан, полиглутамин қышқылы, поли-β-гидроксibuтират	<i>Xanthomonas</i> sp., <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Sclerotium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Azotobacter</i> sp.	Селективті бітелу, ығыстыратын сұйықтықтың тұтқырлығын жақсарту және судың/мұнайдың қозғалғыштығын төмендету
Биосурфактант	Сурфактин, рамнолипид, лихенизин, эмульсан, аласан, вискозин, трегалоза липидтері	<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.	Беттік немесе фазааралық керілудің төмендеуі, суланудың өзгеруі, мұнайдың эмульсиясы, кеуектерден

			масштабтың шығарылуын жақсарту, тұтқырлықтың төмендеуі
Еріткіштер	Ацетон, бутанол, пропан-2-диол, этанол	<i>Clostridium</i> , <i>Zymomonas</i> , <i>Klebsiella</i>	Мұнай өткізгіштігін жақсарту және тұтқырлығын төмендету үшін жыныстарын еріту

• Биоқышқылдар мен биогаздар коллектордағы жыныстарды өзгерте алады. Бұл процесс жыныстарын ерітуді қамтиды, бұл өз кезегінде коллектордың кеуектілігі мен өткізгіштігін арттырады және ортаның рН деңгейін төмендетеді. Сонымен қатар, газдардың пайда болуы пласт қысымының жоғарылауына әкеліп соғады, бұл мұнайдың тұтқырлығының төмендеуіне, мұнайдың ісінуіне және қабаттың кеуектілігі мен өткізгіштігінің жоғарылауына әкеледі (сурет 6) [37]. Еріткіштер ММША процесінде майдың қозғалғыштығын арттыруда шешуші рөл атқарады. Бұған мұнайды еріту және оның тұтқырлығын төмендету арқылы қол жеткізіледі. Сонымен қатар, еріткіштер мұнай-жыныс бетінің сулануын өзгерте алады, нәтижесінде кеуекті матрицадан мұнай бөлінеді [90]. Резервуарда кездесетін бактериялар көмірсуларды ашытуға қабілетті, нәтижесінде CH_4 , CO_2 және H_2 түзіледі. Газдардан басқа, ашыту процесінде сірке және пропион қышқылдары сияқты органикалық қышқылдар, сондай-ақ ацетон, этанол, 1-бутанол және бутанон-аминон сияқты еріткіштер түзіледі [35, 36, 64]. Зобель аборигенді бактерияларды пласттық қысымды қалпына келтіре алатын CO_2 және метан түзуге ынталандыру мақсатында ММША процесінде микробтық биогазды қолдану тұжырымдамасын енгізді [91]. *Enterobacter sp.*, *Vibrio sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Clostridium*, *Bacillus polymyxa* және *Streptococcus sp.* - бұл биогаздар продуцирлейтін ММША үшін қолдануға болатын дәлелденген тиімді микроорганизмдер. Метаногенез - шикі мұнайды шығарудың қарапайым әдісі. Резервуарда газ жеткілікті ісінген кезде биогаздың бөлінуі тоқтап, құнды заттардың пайда болуына ықпал етуі мүмкін. Сондықтан метаногенезді бәсеңдету үшін ингибиторларды қолдануға болады (метилфторид және 2-бром этансульф қышқылы) [37]. Органикалық қышқылдарды, атап айтқанда ацетат пен бутиратты *Clostridium* және *Enterobacter* сияқты микроорганизмдермен өндіру пласт жыныстарының еруіне әкелуі мүмкін, осылайша өткізгіштігін арттырады [92].

• Биосурфактант - микроорганизмдер продуцирлейтін амфифильді молекула. Биосурфактанттар шикі мұнаймен әрекеттескенде эмульсияға айналады. Олар мұнайдың сулануын өзгерте алады, оның тұтқырлығын төмендетеді және су мен мұнай арасындағы беттік керілуді азайтады (сурет 6) [35, 93]. ММША үшін биосурфактанттарды қолдану жетілген мұнай кен

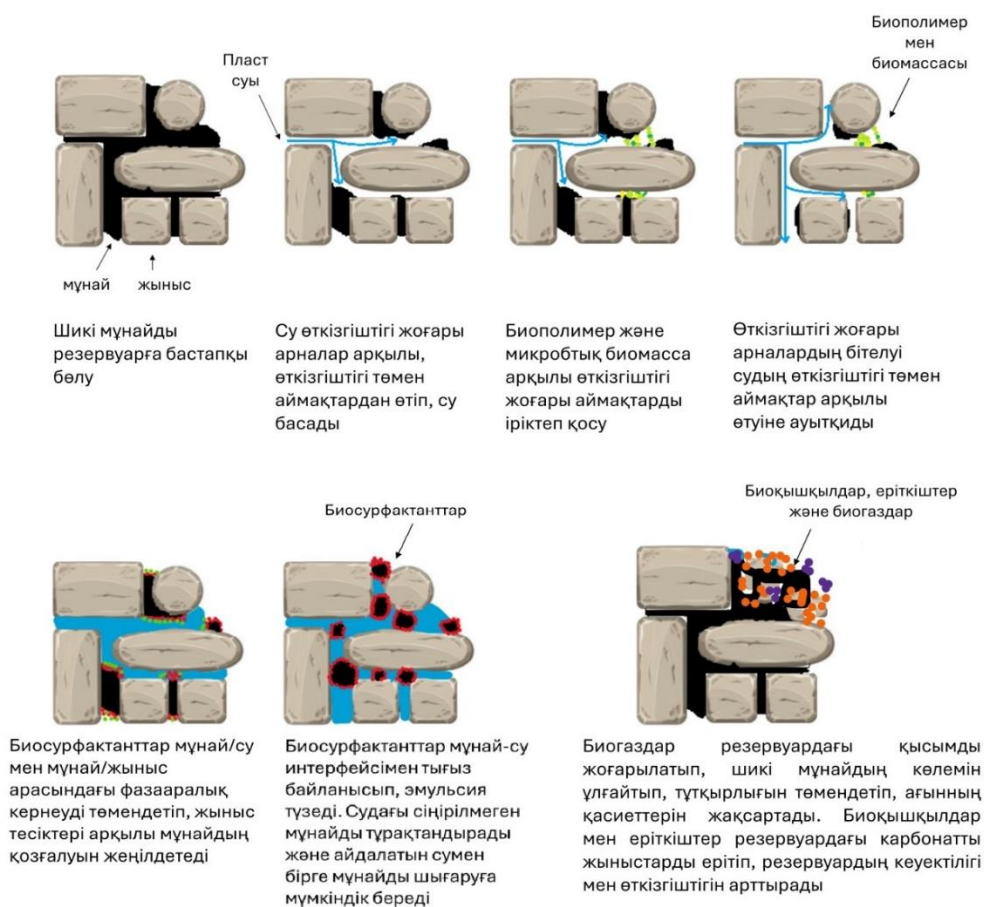
орындарынан қалдық мұнай алудың үлкен әлеуетін көрсетті [94]. Мұнай пласттарындағы микроорганизмдер әртүрлі биосурфактанттарды, соның ішінде липопептидтерді, гликолипидтерді, фосфолипидтерді, полимерлі биосурфактанттарды және май қышқылдарын шығарады. *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* және *Pseudomonas* липопептидтерді, соның ішінде сурфактин мен лихенизинді өндіретіні белгілі [95]. Төмен молекулалы биосурфактанттар (мысалы, липопептидтер) беттік және фазааралық керілуді тиімдірек төмендетсе, ал жоғары молекулалы биосурфактанттар (мысалы, эмульгаторлар) ең тиімді биоэмульгаторлар болып табылады [96]. Алынған биосурфактанттардың сапасы мен саны микробтық консорциумдарға берілетін қоректік ортаға және көміртегі субстратына байланысты. Олардың белсенділігіне NaCl және pH концентрациясы да әсер етеді (оңтайлы диапазон 4-тен 10-ға дейін) [37].

- Биополимерлер селективті бітелуді тудырып, бұл мұнай шығаруды арттырады (сурет 6) [97]. Енетін судың тұтқырлығы бүкіл пласттың өткізгіштігін теңестіру арқылы мұнайды шығару тиімділігін және ұтқырлық стехиометриясын жақсарту үшін ұтқырлықты реттейтін құралдың көмегімен одан әрі артады. Микробтық биомассаның түзілуімен бірге биополимерді қатар қолдану, көмірсутек пласттының сулануын тиімді өзгертеді [88]. Ең танымал коммерциялық бактериялық биополимер - *Xanthomonas sp.* компаниясы шығарған ксантан сағызы. Ол термиялық тұрақты, беріктігі мен тұзға төзімділігі жоғары, бұл оны тиімділікті арттыруға әлеуетті үміткер етеді [98]. *Bacillus* түрінің бактериялары шығаратын биополимер - леван. Полимер күшті адгезияға, май мен суда жоғары ерігіштікке, төмен ішкі тұтқырлыққа ие, гельдер түзбейді, биоүйлесімділік және пленка түзеді [99].

- Микробтық биомассаны резервуарларды селективті бітеу үшін пайдалануға болады (сурет 6). Микроорганизмдердің көбеюі жоғары өткізгіштік аймағындағы су ағынын шектеп, суды жоғары қаныққан коллекторлық аймақтарға бағыттайды [90]. Микробтық биофильмдердің 27% - ын құрайтын бұл кластер жасушадан тыс өнімдерімен, су арналарымен және жасушалар арасындағы кеңістікпен (жалпы санның 73% -дан 98% -на дейін) шешуші рөл атқарады. Бактерия жасушаларының саны әр 20-30 минут сайын екі есе артуы мүмкін. Ал аэробты жағдайда олар тез, 20 есеге дейін көбейе алады. Бұл процесс микроорганизмдердің өсуін күшейту үшін резервуарды таңдамалы түрде бітеп тастауды қамтиды, бұл жыныс тесіктері арқылы қажетсіз су ағынын шектейді. Бұл қысыммен судың кішірек тесіктерден өтуіне мүмкіндік беру арқылы ұсталған мұнайдың ұңғымалардан қозғалуына ықпал етеді. Сонымен қатар, бұл шикі мұнайдың тұтқырлығы мен қатаю температурасын төмендетеді және мұнайдың күкіртсізденуіне және эмульсиялануына ықпал етеді, бұл ММША стратегияларын тиімдірек етеді [37, 100].

Микробтар мұнай пласттарының экстремальді жағдайында органикалық қосылыстардың, соның ішінде көмірсутектердің биологиялық ыдырауында

шешуші рөл атқарады. Бұл жағдайлар әдетте жоғары температураны, жоғары қысымды, тұздылықты және әртүрлі улы қосылыстардың болуын қамтиды [85]. Мұндай жағдайларда микробтардың метаболизм жолдарын түсіну әртүрлі қолданбалар үшін, соның ішінде МША үшін маңызды.



Сурет 6 – ММША стратегиясындағы метаболиттер әсерінің схемалық көрінісі.

Мұнда метаболизмнің негізгі жолдарына шолу жасалады:

- Аэробты және анаэробты тыныс алу: оттегі жеткілікті ортада *Pseudomonas* сияқты мұнай резервуарларындағы спецификалық микробтар оттегін метаболизм жолдарында соңғы электрон акцепторы ретінде пайдалана алады, көмірсутектерде көміртегі мен энергия көзі ретінде дамиды [101]. Алайда, көптеген мұнай резервуарларында оттегі шектеулі немесе мүлдем жоқ. Анаэробты жағдайда бұл микробтар тыныс алу үшін нитрат, сульфат және темір сияқты балама электронды акцепторларды қолдану арқылы бейімделеді. Мысалы, сульфатты редуцирлейтін бактериялар мұнай резервуарларында жиі кездеседі және сульфатты күкіртсутекке (H_2S), зиянды қосылысқа айналдырады [102].

- Метаногенез: мұнай резервуарларындағы кейбір аноксикалық орталарда метаногендік архейлер әртүрлі органикалық қосылыстарды, соның ішінде

қалдық көмірсутектерді метанға (CH_4) айналдыра алады. Бұл табиғи газдың биогендік түзілуіндегі маңызды қадам [103].

- Ферментация: қолайлы электронды акцепторлар жетіспейтін жағдайларда кейбір микроорганизмдер көмірсутектерді метаболиздеу құралы ретінде ферментацияға жүгінеді. Бұл метаболикалық ауысым әртүрлі органикалық қышқылдардың, спирттердің, газдардың түзілуіне әкеледі. Факультативті анаэробтар оттегінің болуына жауап ретінде метаболизм жолдарын модуляциялау қабілетін көрсетеді. Оттегі болған кезде олар тиімдірек тыныс алу процесін таңдайды; дегенмен, болмаған кезде олар тиімділігі төмен ферментация жолына ауысады [104].

- Көмірсутектердің ыдырау жолдары: мұнай резервуарларында биодеградацияның екі негізгі стратегиясын ажыратуға болады: аэробты және анаэробты. Бұл стратегиялар оттегінің болуына және органикалық қосылыстардың ыдырауы үшін қолданылатын арнайы метаболикалық жолдарға байланысты ерекшеленеді. Аэробты биодеградация негізінен оттегі бар айдау ұңғымаларының жанында жүреді, ал анаэробты биодеградация негізінен оттегі шектеулі немесе жоқ резервуарлардың терең қабаттарында байқалады [104]. Аэробты биодеградация органикалық көмірсутектерді ыдырату үшін оттегін пайдаланатын микроорганизмдерді қамтиды, бұл анаэробты процестермен салыстырғанда тезірек ыдырауға әкеледі. Анаэробты деградация көп бос энергияны қажет етеді және реакцияға аз энергия шығарады. Деградацияның екі процесінде де белгілі бір ферменттер шешуші рөл атқарады, соның ішінде монооксигеназа, диоксигеназа, пероксидаза, редуктаза, гидроксилаза және дегидрогеназа. Бактериялардың әртүрлі түрлері көмірсутектердің әртүрлі кластарын метаболиздеуге мүмкіндік беретін әртүрлі ферменттерді синтездей алады. Мысалы, кейбір бактериялар алкандардың ыдырауына маманданған, ал басқалары хош иісті көмірсутектердің ыдырауын жақсы біледі [37, 69].

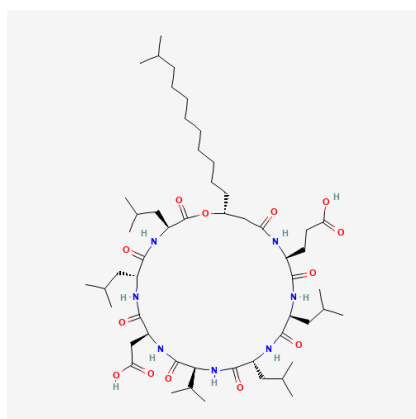
- Биопленка түзілуі: мұнай резервуарларындағы микробтар көбінесе жыныстардың бетінде және су резервуарларының кеуек кеңістігінде биопленка түзеді. Биопленкалар қоршаған ортаның қатал жағдайларынан қорғауды қамтамасыз етеді және әртүрлі микробтық түрлер арасындағы метаболикалық ынтымақтастыққа ықпал етеді [85].

Осылайша, метаболикалық жолдарды түсіну микробтармен байытылған ММША процестерін оңтайландыру және СРБ байланысты қышқылдықты бақылау үшін өте маңызды. Мұнай резервуарларының микробтарын және олардың метаболизм жолдарын зерттеу көмірсутектерді өндірудің қоршаған ортаға әсерін барынша азайту мақсатымен су резервуарларын басқарудың инновациялық стратегияларын жасауға ықпал етеді.

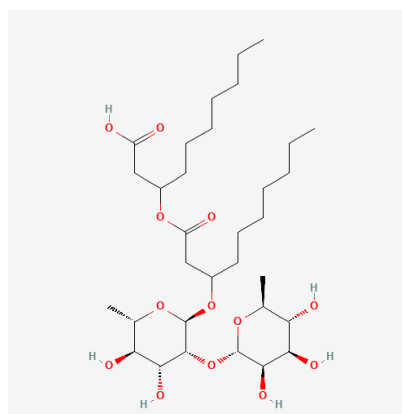
1.4.1 Биосурфактанттар және микробиологиялық мұнай шығаруды арттырудағы рөлі

Биосурфактанттар – МША әдісінде пайдалану үшін маңызды әлеуеті бар биологиялық текті беттік белсенді заттар. Олар бірегей физикалық-химиялық

қасиеттерімен, экологиялық қауіпсіздігімен және экстремалды жағдайларда жұмыс істеу қабілетімен ерекшеленеді. Жоғарыда айтылып кеткендей, бұл молекулалар табиғатта амфифильді - гидрофильді және гидрофобты домендерге ие. Бұл олардың негізінен полярлы және полярлы емес орталардың интерфейсында өмір сүруіне мүмкіндік береді (сурет 7). Осылайша, беттік белсенді заттар интерфейстерде (ауа-су және май-су), сондай-ақ ауа-қатты және сұйық-қатты беттерде жиналуға бейім. Интерфейстерде немесе беттерде беттік белсенді заттардың жиналуы гетерогенді фазалар арасындағы итеру күштерінің төмендеуіне әкеледі және екі фазаның оңай араласуына және өзара әрекеттесуіне мүмкіндік береді. Атап айтқанда, беттік белсенді заттар беттік (сұйық-ауа) және фазааралық (сұйық-сұйық) керілуді төмендетуі мүмкін. Шын мәнінде, беттік белсенді заттың тиімділігі оның беттік керілуді төмендету қабілетімен анықталады, бұл молекуланы көлемдік фазадан бетке ауыстыру үшін қажетті аудан бірлігіне шаққандағы бос беттік энергияның өлшемі [105].



Сурфактин



Рамнолипид

Сурет 7 – Биосурфактанттардың құрылымдары. Мысал ретінде сурфактин (гликолипид) және рамнолипид (липопептид) көрсетілген.

Химиялық ББЗ полярлығына қарай жіктелсе, ал биосурфактанттар микробтық шығу тегі мен химиялық құрамы бойынша жіктеледі (кесте 3) [106]. Бұл қосылыстар әртүрлі микроорганизмдер, соның ішінде бактериялар (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus sp.*), саңырауқұлақтар (*Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhodotorula sp.*), ашытқылар (*Saccharomyces sp.*, *Yarrowia sp.*) және актиномицеттер (*Streptomyces sp.*), олардың өсуі мен метаболизм процестерінің ажырамас компоненттері ретінде синтезделеді және бөлінеді [63, 107].

Биосурфактанттардың негізгі сипаттамаларының бірі олардың беттік және фазааралық керілуді тиімді төмендету қабілеті болып табылады. Мысалы, судың фазааралық кернеуі 72 мН/м-ден 30 мН/м-ге дейін төмендеуі мүмкін, ал мұнаймен фазааралық керілу 3 мН/м дейін төмендеуі мүмкін [120, 121].

Кесте 3 - Кең таралған биосурфактанттардың мысалдары және олардың шығу тегі.

Негізгі тобы	Биосурфактанттар	Жауапты гендер	Микроорганизмдер	Сілтеме
Липопептидтер	Сурфактин	<i>srfA (srfAA, srfAB, srfAC, srfAD), srfp</i>	<i>B.subtilis, Bacillus sp.</i>	[108]
	Лихенизин	<i>lchAA</i>	<i>B.licheniformis, B.subtilis</i>	[109]
	Грамицидин	<i>grsA, grsB</i>	<i>B.subtilis</i>	[110]
	Субтилизин	<i>aprE</i>	<i>B.subtilis,</i>	[111]
	Итурин	<i>ituD</i>	<i>B.aryabhatai</i>	[112]
	Вискозин	<i>vreI</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	[107]
Гликолипидтер	Рамнолипид	<i>rhlA</i>	<i>Bacillus sp.</i>	[113]
	Трегалозды липид	<i>trehalolipid synthase</i>	<i>Serratia</i>	[114]
	Софоролипид	<i>sophorolipid synthase</i>	<i>P.aeruginosa</i>	[115]
	Маннозилэритритол липидтері	<i>mannosyltransferase</i>	<i>Rhodococcus sp., Arthrobacter sp., N. erythropolis, Gordonia sp.</i>	[107]
Май қышқылдары, фосфолипидтер және бейтарап липидтер	Фосфолипид		<i>Starmarella bombicola, T.apicola, T.petrophilum, T. bombicola</i>	[116]
	Спикулиспоралы қышқылы		<i>Pseudozyma, Candida antartica, Ustilago maydis, M. antarcticus</i>	[107]
	Бейтарап липидтер		<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	[105, 117]
	Май қышқылы		<i>Talaromyces trachyspermus</i>	
Полимерлі биосурфактанттар	Эмульсан	<i>Emulsan B</i>	<i>N. erythropolis</i>	
	Аласан	<i>alnA</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>	
	Маннан	<i>OCH1</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	[107]
Бөлшектер түріндегі биосурфактанттар	Везикулалар		<i>A. radioresistens</i>	[118]
	Тұтас микробтық клеткалар		<i>C. tropicalis</i>	[119]
				[117]

Сонымен қатар, биосурфактанттар экстремалды жағдайларда тұрақты болып қалады: олар 120°C-қа дейінгі температурада, рН кең диапазонында (2–12) және жоғары тұздылықта (10–25%) белсенді болып қалады [122, 123]. Олардың экологиялық тазалығы оларды химиялық беттік белсенді заттарға тартымды балама етеді: олардың уыттылығы төмен, биологиялық тұрғыдан тез ыдырайтын және жаңартылатын қалдықтардан өндірілуі мүмкін [96].

Биосурфактанттар әртүрлі әсер ету механизмдерінің арқасында МША-да маңызды рөл атқарады. Біріншіден, олар гидрофобты беттерді гидрофильді беттерге айналдыру арқылы пластың сулануын өзгерте алады, бұл кеуектерден мұнайдың бөлінуін жеңілдетеді [122]. Екіншіден, олар мұнайды тиімді

шығаратын тұрақты микроэмульсиялардың пайда болуына ықпал етеді [124]. Кейбір жағдайларда биосурфактанттар микроорганизмдермен бірге пласт саңылауларын биопломбалаудың әсерін жасайды, сұйықтық ағындарын қайта бағыттайды және мұнай кен орындарына қол жетімділікті жақсартады [125].

МША-да биосурфактанттарды қолдану зертханалық жағдайда мұнай алу коэффициентін 20-40% - ға арттыруға мүмкіндік береді [126]. Сонымен қатар, жүгері шәрбаты немесе пайдаланылған майлар сияқты қалдықтардан өндірудің төмен құнына байланысты биосурфактанттар химиялық аналогтарға үнемді балама болып табылады [123].

Биосурфактанттар бірегей қасиеттеріне, тиімділігіне және экологиялық қауіпсіздігіне байланысты МША әдісінде әлеуетті бағыт болып табылады, бұл оларды мұнай өндіруді арттырудың маңызды құралына айналдырады.

1.4.2 Биополимерлер және олардың микробиологиялық мұнай шығаруды арттырудағы рөлі

Биополимерлер - тірі организмдер синтездейтін табиғи макромолекулалар, олардың биоүйлесімділігі, биологиялық ыдырауы және экологиялық қауіпсіздігі арқасында кеңінен қолданылады. Олар биологиялық процестер мен өнеркәсіпте шешуші рөл атқаратын полисахаридтерден, полиэфирлерден, полиамидтерден және басқа биологиялық қосылыстардан тұрады [127].

Биополимерлер мұнай пласттарының физика-химиялық қасиеттерін өзгертудің бірегей қабілетіне ие, бұл оларды ММША процесінің негізгі компоненттеріне айналдырады. Бұл заттар судың тұтқырлығын арттырады, бұл ұтқырлық коэффициентін төмендетеді, мұнайды кеуекті ортадан тиімдірек ығыстыруға мүмкіндік береді (кесте 2). Мысалы, ксантан шайыры инъекциялық сұйықтықтың реологиялық қасиеттерін жақсартуда, пластта қысымның біркелкі таралуын қамтамасыз етуде жоғары тиімділікпен дәлелденді [128].

Жоғары өткізгіш аймақтардың селективті бітелуі биополимерлердің тағы бір маңызды әсер ету механизмі болып табылады. Микроорганизмдер түзетін биоқабат су ағындарын мұнаймен қаныққан аймақтарға бағыттайтын жоғары өткізгіш аймақтарды бітеуде шешуші рөл атқарады. Бұл қалдық мұнайды тиімдірек алуға мүмкіндік береді. Мысал ретінде кеуекті ортаның өткізгіштігін азайту және сұйықтықтың бағытталған ағындарын құру үшін сәтті қолданылатын декстранды келтіруге болады [129].

Биополимерлер сонымен қатар жоғары тұздылық пен температураны қоса алғанда, экстремалды жағдайларға ерекше төзімділікті көрсетеді. Поли-глутамин қышқылы (PGA) және ксантан сағызы сияқты материалдар 80°C және 200 г/л NaCl [89]. Бұл оларды химиялық аналогтарды қолдану шектеулі жағдайларда қолдану үшін тиімді шешім етеді.

Биополимерлердің маңызды ерекшеліктерінің бірі - олардың тұрақтылығы. Биологиялық шығу тегі мен биологиялық ыдырау қабілетінің арқасында бұл материалдар қоршаған ортаға теріс әсерді азайтады, бұл әсіресе өсіп келе жатқан экологиялық талаптар жағдайында маңызды. Сонымен қатар, олардың

өндірісі тамақ қалдықтары сияқты арзан субстраттарға негізделуі мүмкін, бұл оларды химиялық полимерлерге үнемді балама етеді [36].

Биополимерлер мен биоқабат арасындағы синергия мұнайды жақсарту үшін кешенді шешімдерді жасауға мүмкіндік береді. Мысалы, полигидроксibuтират және ксантан шайыры селективті бітелу және реологиялық қасиеттерді жақсарту үшін бірге қолданылуы мүмкін. Бұл мұнайды тиімді ығыстыруды ғана емес, сонымен қатар артық суды азайтуды қамтамасыз етеді [130].

Биополимерлер қалдық мұнайды өндіруді ұлғайта отырып, мұнай өндіру коэффициентін 10-25% -ға арттырады. Олардың механикалық және химиялық әсерлерге төзімділігі материалдарды жиі ауыстыру қажеттілігін азайтады [131].

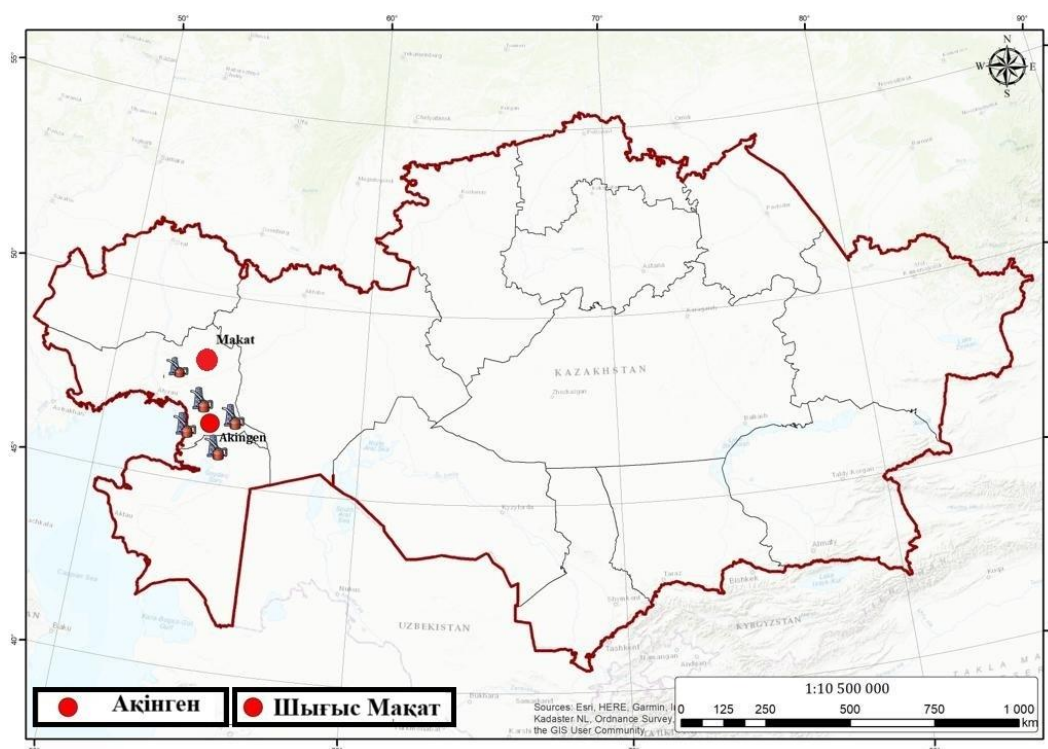
Осылайша, биополимерлер ММША тиімділігін арттырудың перспективті болып табылады, жоғары өнімділікті, күрделі жағдайларға төзімділікті және қоршаған ортаға ең аз әсерді қамтамасыз етеді. Оларды пайдалану мұнай өндіру көлемін ұлғайтуға ғана емес, сонымен бірге бұл процесті тұрақты және экономикалық тұрғыдан тиімді етуге мүмкіндік береді.

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу материалдары

2.1.1 Мұнай пласт суларының сынамалары

Зерттеу материалдары ретінде Батыс Қазақстанның «Ақінген» мұнай кен орны мен «Шығыс Мақат» кен орны алынды (Сурет 8). «Ақінген» мұнай кен орнының ұңғымасынан (№302, 329, Блокты шоқтық сорғы станциясы - БШСС) қыс және көктем мезгілдерінде 2021 ж. және 2022 ж. мұнай пласт суларының үлгісі алынды (Қосымша А, Ә). «Шығыс Мақат» кен орнының ұңғымасынан (№129, №145, №121) көктем мезгілінде 2021 ж. мұнай пласт суларының үлгісі алынды (Қосымша Б).



Сурет 8 – «Ақінген» және «Шығыс Мақат» мұнай кен орындарының орналасуы. Карта Arcgis 10.4 көмегімен жасалды.

Зерттеу материалы MEMСТ 2517 «Мұнай және мұнай өнімдері. Сынама алу әдістері» стандарт негізінде сынама алғыш арқылы алынды. $+5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ температураларда 5–10 сағат уақыт аралықта тасымалданып, үлгілерге микробиологиялық және химиялық талдау жүргізілді.

2.1.2 Қоректік орталар

Микроорганизмдерді дақылдауда және жалпы микроб санын анықтауда келесі қоректік орталар қолданылды:

Nutrient Broth (NB), (*HiMedia*, Үндістан): 13,0 г ұнтақты 1000 мл дистилденген суға араластырылады. Бөлшектерді толығымен еріту үшін қайнатылады. Тиісті шыны колбаларға құйылып, 15 минут ішінде 1,1 атм. (121°C) кезінде автоклавтаумен залалсыздандырады.

Nutrient Agar (NA), (HiMedia, Үндістан): 28,0 г ұнтақты 1000 мл дистилденген суға араластырылады. Бөлшектерді толығымен еріту үшін қайнатылады. Шыны колбаларға құйылып, 15 минут ішінде 1,1 атм. (121 °C) кезінде автоклавтаумен залалсыздандырады. 45-50 °C температурада салқындатып, Петри табақшаларына құйылады.

LB Broth (Oxoid, Ұлыбритания): 25,0 г ұнтақты 1000 мл дистилденген суға араластырылады. Бөлшектерді толығымен еріту үшін қайнатылады. Шыны колбаларға құйылып, 15 минут ішінде 1,1 атм. (121 °C) кезінде автоклавтаумен залалсыздандырады.

Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Oxoid, Ұлыбритания): 37,0 г ұнтақты 1000 мл дистилденген суға араластырылады. Бөлшектерді толығымен еріту үшін қайнатылады. Шыны колбаларға құйылып, 15 минут ішінде 1,1 атм. (121 °C) кезінде автоклавтаумен залалсыздандырады.

Stone Mineral Salt Solution (SMSS) биосурфактант продуцирлейтін бактерияларды бөліп алу үшін қолданылатын орта (г/л): 2,5 г NH_4NO_3 , 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г CaCO_3 , 1 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г KH_2PO_4 , 1 % ашытқы сығындысы, 2 % фильтрмен стерильденген шикі мұнай (0.2 μm Filtropur V50, Sarstedt, Германия) [121].

Mineral Salt Solution (MSS) биосурфактант продуцирлейтін бактерияларды дақылдау үшін қолданылатын орта (г/л): 4,0 г NH_4NO_3 , 7,12 г Na_2HPO_4 , 4,08 г KH_2PO_4 , 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [108].

Шикі мұнай - бұл жер асты резервуарларынан алынатын табиғи көмірсутек ресурсы. Бұл көмірсутектер мен органикалық қосылыстардың күрделі қоспасы, олар отын мен басқа да өнімдер үшін өңделеді [132].

Сахароза - глюкоза мен фруктоза моносахаридтерінен тұратын дисахарид. Ол - фотосинтез өнімі және көптеген организмдердің өсуі мен метаболизмі үшін негізгі көмірсулар ресурсы болып табылады. Сахарозаның экономикалық көздеріне қант қамысы мен қант қызылшасы жатады, мұнда шикі салмақтағы сахарозаның концентрациясы 9-21% құрайды [133].

Меласса көмірсуларға, минералдарға және органикалық қосылыстарға бай қант қамысы мен қант қызылшасын өңдеудің жанама өнімі болып табылады. Оның құрамы шикізат пен өңдеу әдістеріне байланысты өзгеруі мүмкін, бірақ негізгі компоненттерге мыналар жатады: көмірсулар (қант) - 40-60% (глюкоза, фруктоза, сахароза); су-15-25%; органикалық қышқылдар — (қымыздық, сүт, сірке суы); күл (минералдар) - 5-15% (кальций, калий, магний, темір); ақуыздар мен аминқышқылдары — 3% дейін; В тобындағы дәрумендер — (әсіресе ниацин, рибофлавин) [134].

Сүт сарысуы ірімшік өндірісінің жанама өнімі болып табылады және көптеген биологиялық белсенді компоненттерден тұрады. Оның негізгі компоненттері: ақуыздар — 0,6–0,8% (β -лактоглобулин, α -лактальбумин, иммуноглобулиндерді қоса алғанда); лактоза — 4-5%, негізгі көмірсу; минералдар — кальций, калий, магний, фосфор; майлар — фосфолипидтерді қоса алғанда 1% — дан аз [135, 136].

Соя ұны - тамақ өнеркәсібінде кеңінен қолданылатын ақуыздың және функционалды компоненттердің бай көзі. Оның негізгі компоненттері: белоктар – 50-55% (маңызды аминқышқылдарын қоса алғанда: валин, изолейцин, тирозин, аланин); майлар – фосфолипидтер мен линол қышқылы сияқты қанықпаған май қышқылдарын қоса алғанда 1-6%; көмірсулар – диеталық талшықтарды қоса алғанда 30-35%; минералдар – кальций, фосфор, темір, калий, магний [137].

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Пласт су үлгілерін химиялық талдау

Үлгілердің химиялық сипаттамалары МЕМСТ стандарттарына сәйкес зерттелді. HCO_3^- иондары мен рН электрометриялық әдіспен, ал қалқымалы заттар мен тұздылық МЕМСТ 26449.1-85 бойынша гравиметриялық әдіспен анықталды. SO_4^{2-} , Cl^- , Ca^{2+} , $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ және Mg^{2+} иондары МЕМСТ 26449.1-85 және МТ №13-2020 сәйкес гравиметриялық, сынаптық, комплексометриялық, есептеу және иондық хроматографиялық әдістермен талданды. Темір иондары МЕМСТ 23268.11-78 сәйкес комплексометриялық әдіспен анықталды. Йод және бромид иондары МЕМСТ 23268.16-78, 23268.15-78, МТ №13-2020 бойынша иондық хроматография, фотометриялық және титриметриялық талдау арқылы анықталды. Тұтқырлық ҚР СТ 445-2011 стандартына сәйкес вискозиметр көмегімен анықталды. Тығыздық МЕМСТ 18995.1-73 сәйкес ареометр көмегімен анықталды.

2.2.2 Пласт су үлгілерін метагеномды талдау

Пласт су үлгілерін метагеномды талдау MiSeq жүйесінде (*Illumina*, АҚШ) жүзеге асырылды. Amplicon (2013) ұсынған нұсқаулық бойынша 16S рРНҚ молекуласы генінің метагеномдық секвенирлеу үшін кітапхана дайындалды [138]. 16S рРНҚ генінің V3 және V4 аймақтарын амплификациялау үшін арнайы праймер жұптары қолданылды. Праймерлердің ұштарына *Illumina* адаптерлерімен үйлесімді арнайы оверхэнг тізбектері қосылып, олар үшінші тарап жеткізушілерінен тапсырыспен алынды. Ампликон ПТР 2x КАРАHiFi HotStart ReadyMix (*KAPA Biosystems*, АҚШ) көмегімен 25 циклде орындалды. Реакция көлемі 25 мкл құрап, құрамында микробтық ДНҚ (2.5 мкл), форвард және реверс праймерлері (әрқайсысы 5 мкл), және 2x ферменттік қоспа (12.5 мкл) болды. ПТР өнімінің шамамен 550 bp мөлшері Bioanalyzer (*Agilent Technologies*, АҚШ) арқылы тексерілді.

ПТР өнімдері AMPure XP моншақтары (*Beckman Coulter*, АҚШ) көмегімен тазартылды. Одан кейін Nextera XT Index Kit (*Illumina*, АҚШ) арқылы индекстік ПТР жүргізіліп, қос индекстер мен *Illumina* адаптерлері қосылды. Бұл кезең 8 циклмен жүзеге асырылды. Соңғы кітапхана екінші рет AMPure XP моншақтарымен тазартылады және 10 mM Tris-HCl буферінде (*Sigma-Aldrich*, АҚШ) ерітіледі.

Кітапханалар флуорометриялық әдіспен (*Qubit*, *Thermo Fisher Scientific*,

АҚШ) мөлшерленіп, концентрациясы 4 nM теңестірілді. Әрбір кітапханадан 5 мкл алынып, біріккен кітапхана пулына дайындалды. Секвенирлеуге дейін pooled кітапхана жаңа дайындалған 0,2N NaOH ерітіндісімен денатурацияланып, HT1 гибридизациялық буферімен (*Illumina*, АҚШ) сұйылтылды. Ішкі сапа бақылау ретінде PhiX бақылау кітапханасы (*Illumina*, АҚШ) кемінде 5% мөлшерде қосылды. Қорытынды қоспа MiSeq жүйесіне (*Illumina*, АҚШ) жүктеліп, 2x300 bp paired-end секвенирлеу жүргізілді.

Секвенирлеуден кейін алынған деректер MiSeq Reporter бағдарламасындағы «*Metagenomics Workflow*» (<http://greengenes.lbl.gov/>) көмегімен талданды. Таксономиялық классификация Greengenes дерекқоры негізінде патшалық, тип, класс, қатар, тұқымдас, туыс және түр деңгейінде жүзеге асырылды.

2.2.3 Микробиологиялық әдістер

Мұнайпласт суларының жалпы микробтық санын (ЖМС) анықтау

Зерттеу жұмысында мұнайпласт үлгілерінің аэробты және анаэробты жағдайда жалпы микроб саны анықталды [139]. Үлгілерден Кох әдісі бойынша НА қоректік ортасы бар Петри табақшаларына отырғызу жүргізіліп, өсіп шыққан колониялардың жалпы микроб саны есептелді. Анаэробты жағдайдағы ЖМС анықтау анаэростатта (АЭ-01, Ресей) дақылдау әдісімен жүзеге асырылды.

ЖМС мына формула арқылы жүзеге асады:

$$m = \frac{n \times 10^n}{V} \quad (1)$$

мұндағы, n – Петри табақшасында өсіп шыққан колония саны; 10^n – сұйылту деңгейі; V – егу жүргізу үшін енгізілген суспензияның көлемі.

Аборигенді микроорганизмдердің таза дақылын бөліп алу әдісі

Микроорганизмдердің таза дақылын алу үшін талдамалы (3 сегментті) егу әдісі қолданылды. НА қоректік ортасы егілген дақылдар 40 °C температурада бір тәулік өсіріліп, жеке колониялар қиғаш ағарлы НА қоректік ортасына егілді. Қиғаш ағарда өсіп шыққан таза дақылдар +4 °C±1 температурада сақталды.

2.2.4 Аборигенді микроорганизм дақылдарының биосурфактант түзу қабілеті бойынша скрининг жүргізу әдістері

SMSS қоректік ортасында микроорганизм дақылдарының өсу қабілетін анықтау әдісі

Аборигенді микроорганизм дақылдарын көміртектің жалғыз көзі ретінде 2% стерильді шикі мұнайды қосып, 100 мл SMSS ортасына егілді және 40°C температурада 72 сағатқа өсірілді. 3, 6 және әрбір 24 сағат сайын 5 мл көлемінде сынама алынып, олардың оптикалық тығыздығы спектрофотометрде анықталды.

Микроорганизм дақылдарының мұнай ығыстыру қабілетін анықтау әдісі

Микроорганизм дақылдарының биосурфактант түзу қабілетін анықтау Morikawa ұсынған, әрі Youssef және серіктестерінің модификациясымен жетілдірілген мұнай ығыстыру әдісімен жүргізілді [140, 141]. Диаметрі 90 мм болатын Петри табақшасына 50 мл дистилденген су құйып, су бетіне 20 мкл мұнай қосылды. Содан кейін мұнай бетіне 10 мкл клеткасыз супернатант қосылады. Көрінетін жарықта ығысқан аралық 30 секундтан кейін өлшенді.

Микроорганизм дақылдарының мұнай эмульгирлеу қасиетін анықтау әдісі

Микроорганизм дақылдарының эмульгирлеу белсенділігі, биосурфактанттың мұнайға қатысты қабілеті Купер мен Голденберг әдісін қолдану арқылы анықталды [142]. 1:1 қатынасты мұнай мен микроорганизм дақылдарының клеткасыз супернатантты пробиркаға құйылып, 2 минут ішінде тұрақты эмульсия алу үшін вортексте жоғары жылдамдықта араластырылды. Өлшеу 24 сағаттан кейін жүргізілді. Эмульгирлеу белсенділігі эмульгирлеу индексімен анықталды. Өлшем мына формула бойынша жүргізіледі:

$$E_{24}(\%) = (V_e/V_n) \times 100 \quad (2)$$

мұндағы V_e – эмульсия көлемі, V_n – сұйықтықтың жалпы көлемі.

Микроорганизм дақылдарының беттік керілу белсенділігін сталогмометрикалық анықтау әдісі

Сталогмометрлік немесе тамшы санау әдісі сұйық-сұйық фаза шекарасындағы беттік керілуді анықтау үшін қолданылды. [143]. Ол иілген құйрықты сталогмометрден су қабаты арқылы, содан кейін судағы беттік-белсенді зат ерітіндісінің қабаты арқылы ағып жатқанда жеке көмірсутек тамшыларының санын өлшеуге негізделген.

Түзілген тамшылардың саны сұйық-сұйық фаза шекарасындағы беттік керілу мәніне байланысты, сондықтан мына қатынас сақталды:

$$\frac{\sigma_{A/B}}{\sigma_{A/C}} = \frac{N_{A/C}}{N_{A/B}} \quad (3)$$

мұндағы - $\sigma_{A/B}$ және $\sigma_{A/C}$ — сәйкесінше А сұйықтығының В және С сұйықтықтарымен шекараларындағы беттік керілу мәндері. Егер А мен С сұйықтықтарының арасындағы $\sigma_{A/C}$ беттік керілу белгілі болса, онда тиісті теңдеу арқылы А сұйықтығының В сұйықтығымен беткейлік беттік керілуін есептеу келесідей болды:

$$\sigma_{A/B} = \sigma_{A/C} \frac{N_{A/C}}{N_{A/B}} \quad (4)$$

Микроорганизм дақылдарының беттік керілу белсенділігін тензиометрде анықтау әдісі

Микроорганизм дақылдарының беттік керілу белсенділігін анықтау Дю-

Нуи-Ринг әдісімен тікелей тензиометрде жүргізіледі [144]. 10 мл клеткасыз супернатант шыны ыдысқа құйылып тензиометрде (СТ-1 күштік тензиометр, Ресей) өлшенді.

2.2.5 Белсенді аборигенді бактериялардың идентификациясы

Белсенді бактериялардың API тест идентификациясы

Скринингтік сынақтардан таңдалған аборигенді бактериялар қоректік агарға (NA) (HiMedia, Үндістан) егіліп, түні бойы 40°C температурада инкубацияланды және фазалық контрастты микроскоппен (Olympus BX61, Жапония) зерттелді. Дақылдардың биохимиялық сипаттамасы API 50 CH және API 20 E тесттері (Biomerieux, Франция) арқылы анықталды [145].

Белсенді аборигенді бактериялардың 16S рРНҚ негізінде идентификациясы

Бактериялық дақылдар LB агарында (Oxoid, Ұлыбритания) 40°C температурада 24 сағат бойы өсірілді. Содан кейін әрбір штаммнан бір колония 3 мл LB қоректік ортасына (Oxoid, Ұлыбритания) егілді және қатты шайқау жағдайында 40°C температурада түнгі дақылдауға қойылды. Дақылдаудан кейін штамдар 5000 айн/мин жылдамдықта центрифугаланды, ал клеткалар қышқылмен жуылған шыны моншақтармен 425-600 мкм (Sigma-Aldrich, Германия) бөлінді. Геномдық ДНҚ DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Германия) көмегімен өндірушінің грам-оң бактерияларға арналған нұсқаулығымен бөлінді. ДНҚ бидистилденген және нуклеазасыз суда суспензияланды. ДНҚ концентрациясы мен тазалығы NanoDrop 2000 спектрофотометрінде (ThermoScientific, АҚШ) бағаланды. ДНҚ ары қарай пайдалану үшін -20°C температурада сақталды.

Бактериялардың идентификациясы 16S рРНҚ генінің фрагментінің тікелей нуклеотидтік тізбегін анықтау негізінде жүргізілді. Артынша нуклеотидтік тізбектердің GenBank мәліметтер қорында депоненттелген тізбектермен сәйкестігі бағаланды. 16S rDNA генінің 777 жұп негізді фрагменті ПТР әдісі арқылы жүргізілді, бұл үшін 4-кестеде көрсетілген *UnF* және *UnR* праймерлері қолданылды [146]. ПТР қоспасының жалпы көлемі 20 мкл болды және құрамына 150 нг ДНҚ, 1 бірлік Maxima Hot Start Taq ДНҚ полимеразасы (ThermoScientific, АҚШ), әрбір dNTP 0,2 mM, 1X ПТР буфері (ThermoScientific, АҚШ), 2,5 mM MgCl₂ және әрбір праймер 10 мкмоль мөлшерінде енгізілді. ПТР күшейту бағдарламасына: 95°C температурада 7 минуттық бастапқы денатурация, одан кейін 30 цикл (95 °C – 30 с, 55 °C – 40 с, 72 °C – 1 мин), соңында 72°C температурада 7 минуттық соңғы ұзарту кірді. Реакция BioRad T100 термоциклінде (BioRad, АҚШ) жүргізілді.

ПТР өнімдерінің тиімділігі 1% агарозды геледе бағаланды, гель MIDORI Green Advance бояғышымен (Nippon Genetics Europe, Германия) боялып, геле-документтеу жүйесімен (BioRad, АҚШ) визуалды түрде талданды. Маркер ретінде GeneRuler 1 кб ДНҚ сатылы маркері (ThermoScientific, АҚШ) қолданылды.

ПТР өнімдері байланыспаған праймерлерден Clarridge әдісі бойынша экзонуклеаза I және FastAP сілтілі фосфатаза (*ThermoScientific*, АҚШ) көмегімен ферментативті әдіспен тазартылды [147]. Секвенирлеу ПТР өндірушінің нұсқаулығына сәйкес BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*, АҚШ) жиынтығы арқылы жүргізілді. Фрагменттерді ажырату 3730xl DNA Analyzer автоматты генетикалық анализаторында (*Applied Biosystems*, АҚШ) іске асырылды.

16S рРНҚ генінің алынған тізбегі SeqMan бағдарламалық жасақтамасы (*Applied Biosystems*, АҚШ) арқылы жинақталып, консенсус тізбегі түзілді. Праймерлік тізбектер мен сапасы төмен фрагменттер жойылды. Нуклеотидтік тізбектің гомологиясы Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығының (NCBI) *GenBank* деректер қорында BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) бағдарламасы арқылы анықталды (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Кесте 4 - Зерттеуде қолданылған праймерлер.

Өнім	Ген	Праймерлер реттілігі	ПТР өнімнің ұзындығы (bp)	Отжиг температурасы (°C)
16S рРНҚ генін анықтау үшін қолданылған праймерлер				
16S rRNA	16S rDNA	UnF: 5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' UnR: 5'- GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'	777	55
Биосурфактантты және биополимер гендерін анықтау үшін қолданылған праймерлер				
Сурфактин	srfAA	F: 5'- AAGGGCCATTGCCAATACGA-3' R: 5'- ACTTTGCCGTTTGCCGTAAC-3'	501	58
	srfAB	F: 5'- GTCACGAATCATTGCGGACG-3' R: 5'- GTAACGGAGCCGATGACGAT-3'	631	58
	srfAC	F: 5'- CGGAAAGCCGATCAGCAATG-3' R: 5'-	665	58

		CTCCGAGCGCAAAGAAATCG-3'		
	<i>srfAD</i>	F: 5'- GGATCTCGAAGAGCTGACGG-3' R: 5'- CTTCTTCCACCCTTCCGCAT-3'	430	58
	<i>srfp</i>	F-5' ATGAAGATTTACGGAATTTA 3' R-5' TTATAAAAGCTCTTCGTACG 3'	675	50
Лихенизин	<i>lchAA</i>	F: 5'- TGAACGGCACA AAAATGCAGG-3' R: 5'- CGTTTGATCGATTTCGCGCTT-3'	678	60
Леван	<i>sacB</i>	F: 5'- TGTCGCAA ACTATCACGGCT-3' R: 5'- TCAATCATACCGAGAGCGCC-3'	663	64
qPCR үшін қолданылған праймерлер				
Сурфактин	<i>srfAA</i>	F-5' TTGTGCTTGCCGTTGATCAA 3' R-5' CACCTCTTGAAACGTTGGCA 3'	225	60
	<i>srfAB</i>	F: 5'- GTCAAAACAGCCAGCCTTCA-3' R: 5'- TATCCTCTTCACGCTCGACC-3'	241	60
	<i>srfAC</i>	F: 5'- CCGGGAGATGAGATGCTGAT-3' R: 5'- GCGTTCAC TGCTTCCTTGAA-3'	248	60
	<i>srfAD</i>	F: 5'- GGCGGAATGATCACCTTCAG-3' R: 5'-	225	

		TGATCGGAAAGAAGGCAGGA-3'		
	<i>lchAA</i>	F: 5'- CGCTCGTCAACAACCTATGGG-3' R: 5'- TTCCTCCGGCTTGTTCAGAT-3'	218	60
Леван	<i>sacB</i>	F: 5'- ACCTTTACTACCGCACTGCT-3' R: 5'- TTTGTAATGGCCAGCTGTCC-3'	235	57

Филогенетикалық талдау

Нуклеотидтік тізбектердің туралануы MEGA11 бағдарламалық платформасында MUSCLE алгоритмі көмегімен жүзеге асырылды [148]. Тураланған тізбектер негізінде филогенетикалық шежіре құру үшін Neighbor-Joining (NJ) әдісі қолданылды [149, 150]. NJ әдісі генетикалық қашықтық матрицасын пайдалану арқылы филогенетикалық шежірені ең қысқа жалпы бұтақ ұзындығымен (minimum total branch length) құруға мүмкіндік берді. Эволюциялық қашықтықтар Tamura-Nei үлгісі бойынша есептелді [150].

Алынған филогенетикалық шежіренің статистикалық сенімділігін бағалау үшін 1000 қайта үлгілеу (bootstrap) репликасы орындалды. NJ әдісі Bayesian ақпараттық критерийінің (Bayesian Information Criterion – BIC) ең төменгі мәні бойынша ең қолайлы модель ретінде таңдалды. Штамдардың және салыстырмалы референт штамдардың 16S рРНҚ ген тізбектері *GenBank* дерекқорынан жүктеліп алынды (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide).

2.2.6 Биосурфактант пен биополимер гендерін анықтау және олардың экспрессиясы

Биосурфактант пен биополимер гендерін ПТР-те анықтау

Сурфактин, лихенизин және леван гендерінің болуына скрининг 4-кестеде келтірілген праймерлерді пайдалана отырып жүргізілді. Праймер тізбегі Primer-BLAST көмегімен NCBI дерекқорында табылды. ПТР реакциясы жалпы көлемі 12 мкл болатын: 6,25 мкл StartWarm HS-PCR Mix (A&A Biotechnology, Польша), 1,0 мкл F праймер, 1,0 мкл R праймер, 2,75 нуклеазасыз стерильді H₂O (A&A Biotechnology, Польша) және сәйкесінше әрбір штаммның 1 мкл ДНҚ. Термиялық цикл Agilent Technologies SureCycler 8800 (Agilent Technologies, АҚШ) жүйесінде ПТР температура режимі: кезең 1 – 5 мин. 95°C – 1 цикл; кезең 2 – 1 мин. 95 °C, 1мин. 56–64 °C, 1 мин. при 72 °C – 30 цикл; кезең 5 мин. при 72 °C – 1 цикл, 4 мин- ∞.

ПТР өнімін MIDORI Green Advance (Nippon Genetics Europe, Германия) боялған 1% агарозды геледе визуальді шолу жасалып, геледокументтеуші

жүйені (BioRad, АҚШ) пайдалана отырып талданды. GeneRuler 1 кб DNA Ladder маркер ретінде пайдаланылды (ThermoScientific, АҚШ).

РНҚ бөліп алу, кері транскрипция және qPCR талдаулары

Биосурфактант және биополимерді өндіретін *Bacillus sp.* штамдары BHIВ ортасында 20°C, 30°C, 40°C және 50°C температурада және NaCl (Sigma-Aldrich, АҚШ) әртүрлі концентрацияларында (10, 50 және 100 г/л) өсірілді. РНҚ өндірушінің нұсқаулығына сәйкес Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Польша) көмегімен штамдардың түнгі дақылдарынан бөлініп алынды [151]. РНҚ саны мен тазалығы NanoDrop 2000 спектрофотометрі және MIDORI Green Advance (Nippon Genetics Europe, Германия) боялған 1% агарозды геледегі электрофорез, УК визуализациясы арқылы бағаланды.

кДНК синтезі үшін кері транскрипция Veriti 96 Well термиялық циклында (Applied Biosystems, АҚШ) жоғары сыйымдылықтағы кДНК кері транскрипция жинағы (Applied Biosystems, АҚШ) арқылы келесі нұсқаулықпен орындалды: 10 мин 25°C, 37°C температурада 120 мин, 85°C температурада 5 мин және 4 °C температурада 5 мин. Соңында, барлық салқындатылған үлгілер qPCR үшін пайдаланылды. Нақты уақыттағы амплификациялар StepOne Plus термоциклінде (ThermoScientific, АҚШ) орындалды. Соңғы көлемі 20 мкл болатын бұл реакциялар құрамында 10 мкл RT 2x PCR MasterMix A жинағы (A&A Biotechnology, Польша), әрбір праймердің 1 мкмоль, 2 мкл кДНК және 6 мкл нуклеазасыз стерильді H₂O (A&A Biotechnology, Польша). Бұл зерттеуде Primer3 Output дерекқорында құрастырылған праймерлер пайдаланылды (кесте 4). Салыстырмалы экспрессияның әлеуетті өзгерістері Pfaffl моделі бойынша эндогенді бақылау ретінде 16S рРНҚ генімен есептелді [152]. Бұл геннің экспрессиясы сыналған орта мен температураның барлық диапазонында ұқсас екендігі расталды.

2.2.7 Шикі биосурфактантты бөліп алу және химиялық сипаттамасы

Bacillus sp. штамдарының биосурфактантты өндіру әртүрлі көміртегі көздерімен (сахароза, шикі мұнай, сүт сарысуы, меласса) көмегімен бағаланды, MSS коректік ортасында 10% көміртек көздері қосылды.

Бисурфактанттар Nitschke мен Pastore сипаттаған қышқылды тұндыру әдісі арқылы экстракцияланды [153, 154]. Клеткасыз супернатант 8000 × *g* жылдамдықта 10 мин. центрифугалау арқылы бөлініп алынды. Содан кейін супернатанттың рН мәні 6 М HCl көмегімен 2,0-ге дейін төмендетіліп, биосурфактанттың толық тұнбаға түсуі үшін 4 °C температурада түнгі уақытқа қалдырылды. Түзілген тұнба 8000 × *g* жылдамдықта 10 мин. қайта центрифугаланып жинақталды және рН 2,0-ге реттелген қышқыл сумен екі рет жуылды. Тазартылмаған биосурфактанттар кептіру шкафында 110 °C температурада 24 сағат бойы кептірілді және кейін массасы дәл өлшенді.

Кептірілген биосурфактанттардың ИҚ-Фурье спектрі Agilent Cary 660 FTIR спектрофотометрінде (Agilent, АҚШ) құрғақ атмосферада алынды. Спектрлер 400–4000 см⁻¹ толқын сандары диапазонында тіркелді.

2.2.8 Шикі биополимерлерді бөліп алу және химиялық сипаттамасы

Леван биополимерінің сапалық скринингі

Bacillus sp. штамдарын леван өндіру қабілеті келесідей тексерілді: 24 сағаттық бактериялық дақыл келесі қоректік ортасы бар Петри табақшаларына штрих әдісімен егілді (г/л): 5 г ашытқы сығындысы, 10 г триптон, 15 г агар, 100 г NaCl, 2,5 г K_2HPO_4 , 200 г сахароза [155]. Егілген Петри табақшаларын 40 °C температурада 2 тәулік дақылданды. Леван өндіретін бактериялар шырышты мукоидты колониялардың түзілуімен анықталды.

Леван биополимерін өндіру және экстракциясы

Құрамында 0,3 г $MgSO_4$ (магний көзі), 5 г сахароза (көміртегі көзі және левансахараза үшін негізгі субстрат көзі), 0,7 г KH_2PO_4 (фосфор көзі), 5 г соя ұны (көміртегі көзі және ашытқы сығындысын алмастыратын азот көзі) және 16 г стерильді $CaCO_3$ бар қоректік орта пайдаланылды [156]. Содан кейін оған орта көлемінің 10% мөлшерінде 24 сағаттық бактериялық дақыл қосылды. Леван өндірісін зерттеу үшін 5 тәулік үзіліссіз араластыра отырып, 40 °C температурада дақылдау жүргізілді.

Леван биополимерін экстракциялау үшін үлгілерді 2000 айн/мин 10 минут бойы центрифугалады, алынған көлемнің үштен біріне дейін азайту үшін үлгілерді су моншасына 90°C орналастырылды. Бірінші және екінші кезеңде әрбір 100 мл концентрлі ерітіндіге тиісінше 60 және 90 мл 95% суық этанол қосылды. Алынған биополимердің мөлшерін анықтау үшін алынған үлгілер кептіру шкафында 80°C температурада кептіріліп, содан кейін массасы өлшенді [156].

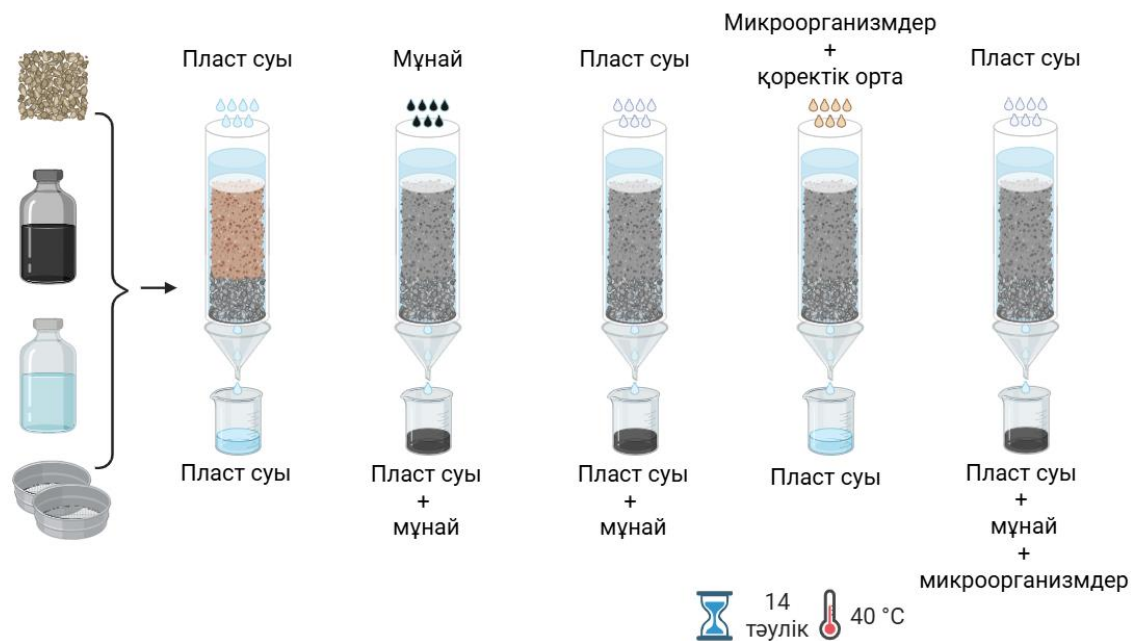
Ішінара тазартылған леван биополимердегі функционалды топтар ИҚ-Фурье спектрі ИҚ-Фурье Carry 660 Agilent спектрофотометрінде (Agilent, АҚШ) зерттелді. ИҚ-Фурье спектрлері 400-4000 толқын сандары (см-1) диапазонында жиналды.

2.2.9 Лабораториялық жағдайда *Bacillus subtilis* штамдары негізінде мұнай шығару

Мұнай шығуын арттыруды бағалау мақсатында мұнай пластының жағдайын үлгілеуге негізделген модельдік құм бағаналарында зертханалық тәжірибелер жүргізілді (сурет 9) [157].

Құм бағандарын дайындау

Көлемі 250 мл тік пластик колонналары алдын ала зарарсыздандырылған құрғақ кварц құмы мен кен орны жынысөзектері араластыра толтырылды. Құмды шайып кетпеу үшін колонналардың екі шетіне сүзгі мембраналары орнатылды. Кіріс және шығыс саңылаулары сұйықтықтың берілуін және ағуын қамтамасыз етті.



Сурет 9 - Құм бағана процесінің схемалық көрінісі.

Мұнайдың қанығуының қалыптасуы

Кеуек көлемін (PV) анықтау үшін колонналар 3 мл/мин тұрақты ағын жылдамдығында стерильді пласт суымен алдын ала қанықтырылды. Кеткен пласт су көлемі кеуек көлемі (PV) ретінде есептейміз. Содан кейін шикі мұнай су толығымен ығысқанша енгізілді, мұнайдың бастапқы қанығу көлемі (OOIP) болып есептеледі. Бастапқы қаныққан мұнайды ($Soi, \%$) келесі формуламен есептейміз:

$$Soi = \frac{OOIP}{PV} \times 100 \quad (5)$$

Мұнай шығару тәжірибесі

Колонна 24 сағат бойы 40 °C температурада инкубацияланды, содан кейін мұнайдың шығуы тоқтағанға дейін пласт суымен жуылады. Қалдық мұнайдың қанығуын ($Sor, \%$) келесі формуламен анықтайды:

$$Sor = \frac{OOIP - Sorwf}{OOIP} \times 100 \quad (6)$$

мұндағы $Sorwf$ - бастапқы су ығысуынан алынған мұнай көлемі.

Микробтық әсер ету

Бағанға минералды орталарда дайындалған 50 мл бактериялық суспензия ($OD_{600} = 0,2$) енгізілді. Микроорганизмдердің метаболиттік процестерін белсендіру үшін колонналар 40 °C температурада 14 тәулік бойы инкубацияланды.

Қосымша мұнай шығару

Инкубациядан кейін екінші пласт сумен жуу жүргізілді және қосымша алынған мұнайдың көлемі ($Sormf$) өлшенді. Микробтық әсердің тиімділігін сандық бағалау үшін қосымша мұнай шығару ($AOR, \%$) мына формула бойынша есептелді:

$$AOR = \frac{Sormf}{OOIP - Sorwf} \times 100 \quad (7)$$

Мұнда $OOIP$ - бастапқы мұнай қанығу көлемі, мл; $Sorwf$ – бастапқы су ығысуынан кейін алынған мұнай көлемі, мл; $Sormf$ - микробтық әсерден кейін қосымша алынған мұнай көлемі, мл.

2.3 Тәжірибе нәтижелерін статистикалық өңдеу

Барлық тәжірибелер үш қайталымда жүргізілді. Қайталымдар арасындағы орташа мән мен стандартты ауытқулар MS Excel 2019 бағдарламасында есептелді. Қайталымдар арасындағы айырмашылықтардың статистикалық мәнділігін бағалау үшін бір факторлы One-Way ANOVA Kruskal–Wallis тесті қолданылды. Бұл параметрлік емес тест деректердің қалыпты таралмауы немесе дисперсиялардың біртекті болмауы жағдайында бірнеше тәуелсіз топтардың медианалары арасында айырмашылық бар-жоғын анықтау үшін пайдаланылады.

Анализ R бағдарламалық тілінде, *Stratix* пакеті көмегімен орындалды, онда *kruskal_test()* функциясы қолданылды. Бұл функция әр топтағы мәліметтердің рангілерін есептеу арқылы Kruskal–Wallis H статистикасын және оған сәйкес p мәнін анықтайды. Анализ нәтижелері визуализациялау және нәтижелерді графикалық түрде көрсету мақсатында *BioRender* онлайн-платформасында (<https://app.biorender.com/>) өңделді.

Микроорганизмдердің өсу динамикасын визуализациялау үшін Seaborn кітапханасының *heatmap* функциясы пайдаланылды. Деректерді өңдеу Python 3.9 ортасында Pandas, NumPy, Matplotlib арқылы жүргізілді. Түстердің градиенті өсу қарқынын көрсету үшін «coolwarm» палитрасымен таңдалды.

Филогенетикалық шежіренің статистикалық сенімділігін бағалау үшін 1000 қайта үлгілеу (bootstrap) репликасы орындалды. NJ әдісі Bayesian ақпараттық критерийінің (Bayesian Information Criterion – BIC) ең төменгі мәні бойынша ең қолайлы модель ретінде таңдалды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Батыс Қазақстан кен орындарын физика-химиялық бағалау

Мұнай пласттарындағы микробтық қауымдастықтар Жердің ең көне биоценоздары ретінде белгілі. Микроорганизмдер ондаған жылдар бойы мұнай резервуарларында, құбырларда және шикі мұнай өңдеу қондырғыларында табылған [70]. Мұнай резервуарлары көптеген бактериялар мен архейлердің түрлілігімен бай болғанына қарамастан, олар экстремалды экожүйелер болып табылады. Бұл орта жоғары қуаттылықпен, гидрофобтылықпен, сондай-ақ жоғары температурамен және қысыммен сипатталады.

Қалдық мұнайды алу үшін ММША процестерін пайдалану кезінде бірнеше параметрлерді ескеру қажет, олардың ішінде қалдық мұнайдың қанығуы, пласт химиясы, пласт тереңдігі, температурасы, тұздылығы, мұнайдың күтілетін өсімі және экономикалық факторлар маңызды рөл атқарады [158, 159]. Осы параметрлердің ішінде температура шешуші фактор болып табылады, өйткені ол микроорганизмдердің өсуіне және олардың метаболизм өнімдерінің түзілуіне айтарлықтай әсер етеді. Тым төмен температура тасымалдау процесін баяулатуы мүмкін, ал тым жоғары температура ферменттер мен ақуыздардың бұзылуына әкеліп, микроорганизмдердің өміршеңдігін төмендетеді.

Тұздылық та маңызды параметр болып табылады, өйткені ол температурамен және қысыммен өзара байланысты және мұнай тұтқырлығының төмендеуіне әсер етеді. Мысалы, жоғары тұздылық жағдайында биосурфактанттардың, газдардың, спирттер мен қышқылдардың метаболизмдік түзілу жылдамдығы төмендеуі мүмкін [160]. Осы факторларды ескере отырып, Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының пласт су сынамаларының физикалық-химиялық сипаттамалары зерттелді (сурет 10) [161]. Бұл зерттеу олардың ММША процестерінде қолдану мүмкіндігін бағалауға бағытталған.



Сурет 10 – Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарынан алынған пласт су сынамалары

5-кестеде көрсетілгендей, алынған пласт су сынамалары бойынша 18

параметр зерттелді. Сынамалар Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының әртүрлі ұңғымаларынан алынды.

Пласт суларының минералдану дәрежесі бойынша сулы горизонттар тұщы (1–6 г/л), тұзды (6–150 г/л) және өте тұзды (150–250 г/л) болып бөлінеді [162]. Бұл классификацияға сүйене отырып, зерттелген пласт суларының минералдану деңгейі әртүрлі екенін көруге болады. 5-кестеге сәйкес, Ақінген кен орнының пласт сулары негізінен тұзды сулар санатына жатады, себебі олардың жалпы минералдануы $111\ 848,35 \pm 0,01$ – $148\ 021,64 \pm 0,01$ мг/дм³ аралығында. Ал Шығыс Мақат кен орнының пласт сулары өте тұзды категориясына сәйкес келеді, өйткені олардың минералдану көрсеткіші $261\ 760,0 \pm 0,05$ – $417\ 420,0 \pm 0,05$ мг/дм³ аралығында анықталды. Бұл пласт суларының химиялық құрамындағы тұз концентрациясының жоғары екенін және олардың мұнай өндіру процесіне ықпал ететінін көрсетеді. Na⁺ және Cl⁻ иондарының жер асты суларының химиялық құрамындағы үстемдігі олардың экожүйелерге техногендік әсер етудің маңызды индикаторларына айналатынын көрсетеді. Мұнай өндіру процесінде натрий тұздары (әсіресе NaCl) пласт суларымен бірге ортаға түсіп, қоршаған ортаның тұздылығын арттырады. Нәтижесінде, натрий иондары сіңірілген катиондардың жалпы сомасының 25-35%-ына жетуі ықтимал, бұл топырақтың техногендік сортадануына алып келуі мүмкін [161]. Сонымен қатар, жер асты суларына пласт сулардың араласуы олардың минералдану деңгейінің жоғарылауына және хлоридтер үлесінің артуына себеп болады [163].

Темір, кальций, магний иондарының концентрациясы ұңғымалар арасында өзгеріп отырды, бұл пласт суларының қалыптасу ерекшеліктерін көрсетеді. Сонымен қатар, сульфат иондары Ақінген кен орнында анықталмағанымен, Шығыс Мақат кен орнында олардың концентрациясы $66,0 \pm 0,05$ – $254,0 \pm 0,05$ мг/дм³ аралығында өзгерді. Бұл екі кен орнының пласт суларының геохимиялық ерекшеліктерін айқындайды.

Тығыздық көрсеткіштері минералдану деңгейіне сәйкес келетін жоғары мәндерді көрсетті. Ақінген кен орнында ол $1,0759 \pm 0,001$ – $1,1002 \pm 0,005$ г/см³ аралығында болса, Шығыс Мақат кен орнында тығыздықтың төмен мәндері ($0,810 \pm 0,001$ – $0,835 \pm 0,006$ г/см³) де, жоғары мәндері ($1,1730 \pm 0,005$ г/см³) де тіркелді. Бұл пласт суларының әртүрлі геологиялық және гидрохимиялық жағдайларда қалыптасқанын көрсетеді.

Зерттелген үлгілердің сутегі көрсеткіші (pH) негізінен бейтарапқа жақын ($6,39 \pm 0,009$ – $6,76 \pm 0,01$) болды, бұл пласт суларының микробиологиялық процестер үшін салыстырмалы түрде қолайлы екенін білдіреді. Жалпы алғанда, мұнай қабаттарындағы pH мәні 3-тен 10-ға дейін өзгеруі мүмкін, ал микробтардың тиімді дамуы үшін ол 7-ге жақын болуы қажет [157].

Температураның да ММША тиімділігіне айтарлықтай әсері бар. Guo және әріптестерінің [164] зерттеулерінде, ММША үшін 20–80 °C аралығындағы резервуарлар қолайлы болса, 30–60 °C температура аралығы оңтайлы деп саналады. Зерттелген пласт суларының температурасы 35–42,1 °C аралығында

Кесте 5 - Пласт су сынамаларының физика-химиялық сипаттамасы

№	Параметрлер	Өлшем бірліктер	Ақінген кен орны			Шығыс Мақат кен орны		
			БШСС, шығыс	№302 ұңғыма	№329 ұңғыма	№129 ұңғыма	№145 ұңғыма	№121 ұңғыма
1	Гидрокарбонат-ионы HCO_3^-	мг/дм ³	161,65±0,006	158,60±0,006	137,25±0,006	244,0±0,005	244,0±0,01	244,0±0,005
2	Карбонат-ионы CO_3^-		табылған жоқ	табылған жоқ	табылған жоқ	табылған жоқ	табылған жоқ	табылған жоқ
3	Сульфат-ионы SO_4^{2-}		табылған жоқ	табылған жоқ	табылған жоқ	табылған жоқ	66,0±0,005	254,0±0,005
4	Хлорид –ионы Cl^-		90849,49±0,001	80161,31±0,02	68582,46±0,02	160322,63±0,02	163601,7±0,05	163601,7±0,05
5	Кальций-ионы Ca^{2+}		3406,80±0,006	3106,20±0,006	3006,00±0,006	9018,0±0,05	3807,6±0,006	5811,6±0,01
6	Магний-ионы Mg^{2+}		1672,00±0,05	1641,60±0,006	1094,40±0,006	2675,20±0,005	2067,0±0,005	2188,8±0,005
7	(Натрий+ калий) иондары $\text{Na}^+ + \text{K}^+$		51931,70±0,005	45398,55±0,001	39028,24±0,00	88616,70±0,001	185798,2±0,005	161143,6±0,005
8	Темір Fe^{3+}		23,80±0,001	4,48±0,001	7,56±0,001	11,76±0,001	4,2±0,005	15,3±0,005
	Темір Fe^{2+}		4,34±0,001	12,60±0,001	табылған жоқ	17,64±0,001	-	-
9	Жалпы минералдануы		148021,64±0,01	130466,26±0,02	111848,35±0,01	261760,0±0,05	366875,0±0,05	417420,0±0,05
10	Өлшенген заттар		80,00±0,005	93,50±0,006	21,00±0,001	табылған жоқ	6140,0±0,006	13192,0±0,006
11	Ерітілген оттегі O_2		4,88±0,001	2,28±0,001	4,92±0,001	-	-	-
12	Тығыздығы 20 °С	г/см ³	1,1002±0,005	1,0891±0,001	1,0759±0,001	1,1730±0,005	0,835±0,006	0,810±0,001
13	Сутегі көрсеткіші рН	рН бірлік	6,40±0,1	6,39±0,009	6,65±0,1	6,76±0,01	6,64±0,01	6,44±0,01
14	Йод I^-	мг/дм ³	2,94±0,001	1,68±0,005	2,10±0,001	3,78±0,001	-	-
15	Бром Br^-	мг/ дм ³	128,18±0,006	112,58±0,006	103,22±0,001	197,08±0,005	-	-
16	Кинематикалық тұтқырлық	мм ² /с	1,27±0,005	1,21±0,005	1,195±0,005	1,25±0,001	1,23±0,001	1,22±0,006
17	Нитраттар NO_3^-	мг/ дм ³	0,438±0,001	0,540±0,001	0,865±0,001	-	-	-
18	Температура	°С	-	35-41	37-41	42,1	41,0	42,1

болғандықтан, олар ММША үшін қолайлы ғана емес, сонымен қатар оңтайлы температура диапазонына да сәйкес келеді.

Хлорид иондары пласт суларының негізгі анионы болып табылады. Ақінген кен орнында олардың мөлшері $68\,582,46 \pm 0,02 - 90\,849,49 \pm 0,001$ мг/дм³ аралығында болса, Шығыс Мақат кен орнында $160\,322,63 - 163\,601,7$ мг/дм³ деңгейіне жеткен. Натрий мен калий иондарының концентрациясы да жоғары, әсіресе, Шығыс Мақат кен орнында олардың мөлшері $160\,322,63 \pm 0,02 - 163\,601,7 \pm 0,05$ мг/дм³ аралығында анықталды. Бұл кен орындарының пласт суларының хлорлы-натрий типіне жататынын және олардың минералдану дәрежесі жоғары екенін көрсетеді.

Осылайша, зерттелген пласт сулары ММША үшін ішінара қолайлы, өйткені температура мен рН мәндері оңтайлы диапазонда. Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының пласт сулары жоғары минералдану деңгейімен ерекшеленеді. Ақінген кен орнының сулары тұзды, ал Шығыс Мақат сулары өте тұзды санатына жатады, бұл олардың мұнай өндіру процесіне және қоршаған ортаға ықпал етуі мүмкін. Сондықтан ММША тиімділігін арттыру үшін тұзға төзімді микроорганизмдер немесе бейімделген штамдар қолдану қажет.

3.2 Батыс Қазақстан кен орындарын микробиологиялық бағалау

Мұнай кен орны пласт суларының микробтық қауымдастығы мұнайдың биодеградациясында маңызды рөл атқаратын және оның сапасына әсер ететін күрделі экожүйе болып табылады. Мұнай өндірісінен алынған пласт суларындағы микробтық қауымдастықтарды талдау әртүрлі әлеуетті қолданбаларға ие, соның ішінде биодеградация процестерін түсіну, МША және қоршаған ортаға әсерді бағалау. Бұл микробтық қауымдастықтарды зерттеу мұнайдың биодеградация механизмі туралы тереңірек түсінік беріп, мұнай сапасына және микроорганизмдердің мұнайды қалпына келтіру әдістеріне әсерін бағалауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, қауымдастықтарды талдау микроорганизмдердің метаболиттік белсенділігін пайдалану арқылы ММША стратегияларын дамытуға ықпал етеді [85].

Осылайша, пласт суларының микробтық қауымдастықтарын зерттеу олардың мұнай жүйесіндегі таралу ерекшеліктерін ғана емес, сонымен қатар олардың қандай жағдайларда белсенді болатынын анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әсіресе мұнай-су өтпелі аймағында айқын көрінеді, себебі дәл осы жерде микроорганизмдердің белсенділігі ең жоғары болады.

Мұнай коллекторлары микроорганизмдер тіршілік ете алатын әртүрлі фазалардан тұрады, соның ішінде шикі мұнай, пласт суы, сондай-ақ жыныстар мен органикалық материалдардан тұратын қатты беттер [67]. Микроорганизмдер энергияны тек май фазасындағы электронды донорлармен және су фазасындағы электронды акцепторлармен тікелей байланыста болған жағдайда ғана сақтай алады [85]. Бұл жағдай микроорганизмдердің белсенді өсу аймағы болып табылатын мұнай-су өтпелі аймағында байқалады, өйткені дәл

осы жерде мұнайдың биодеградациясы қарқынды жүреді [68].

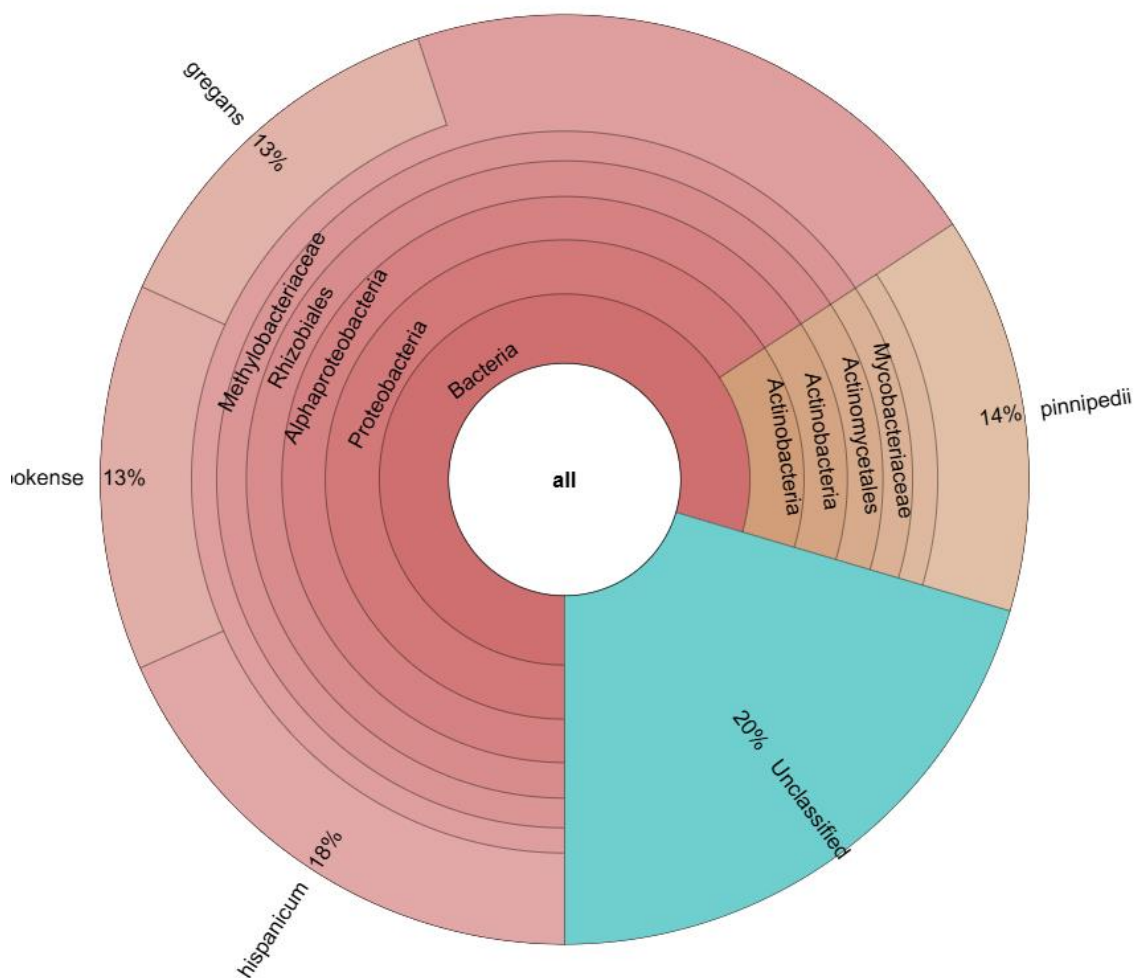
Зерттеу жұмысы 16S рРНҚ генінің ампликонын секвенирлеу арқылы талданды. Шығыс Макат және Ақінген кен орындарынан алынған пласт су сынамаларына жүргізілген 16S метагеномдық анализ нәтижелері көрсетіліп, салыстырылады. 6-кестедегі секвенирлеу статистикасының нәтижесіне сүйенсек, Шығыс Макат кен орнында өткен оқылымдардың пайызы (62,6%) жоғары, бұл деректер сапасының жақсы екенін көрсетеді. Ақінген кен орнында бұл көрсеткіш 42,4%-ды құрап, орташа сапаны көрсетеді.

Кесте 6 – Шығыс Макат және Ақінген кен орындарындағы оқылымдардың өту пайызы

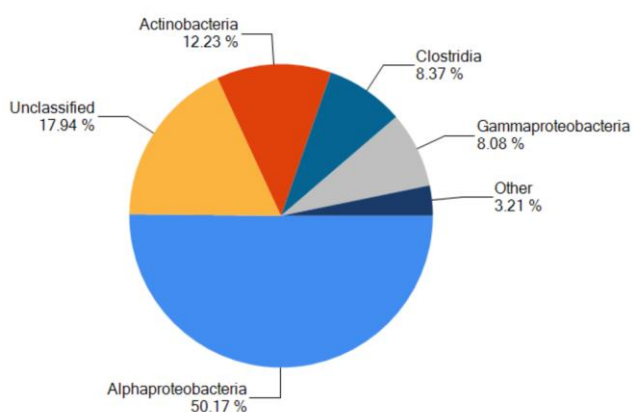
Кен орны	Жалпы оқылған оқылымдар	Сапа фильтрінен өткен оқылымдар	Өткен оқылымдардың пайызы (%)
Шығыс Макат	963 957	603 665	62,6
Ақінген	1 702 134	721 528	42,4

Шығыс Макат кен орнын метагеномдық талдау нәтижелері бойынша зерттелген сынамада *Bacteria* 98,61%-ды құрады, ал *Archaea* үлесі 0,63% болды (Сурет 11, Ә). Басым Тип (Phylum) ретінде *Proteobacteria* (92,45%) анықталды, сонымен қатар аз мөлшерде *Firmicutes* (1,76%), *Actinobacteria* (0,90%), *Euryarchaeota* (0,63%) және *Bacteroidetes* (0,39%) кездескен. Класс (Class) деңгейде үлгінің негізгі бөлігі *Gamma proteobacteria* (79,82%) өкілдерінен тұрса, аз мөлшерде *Delta proteobacteria* (5,36%), *Epsilon proteobacteria* (2,31%) және *Alpha proteobacteria* (2,15%) анықталды. Қатар (Order) деңгейінде ең көп кездескен *Alteromonadales* (66,65%) болып, *Oceanospirillales* (6,12%) және *Desulfobacterales* (3,87%) де тіркелген. Тұқымдас (Family) деңгейінде *Alteromonadaceae* (66,30%) мен *Halomonadaceae* (5,08%) басым болды. Туыс (Genus) құрамында *Marinobacter* (65,95%) ең жоғары үлеске ие, одан кейін *Halomonas* (4,66%) және *Desulforhopalus* (2,43%) анықталды. Түр (Species) деңгейінде ең жоғары үлесті *Marinobacter santoriniensis* (41,42%) құрады, ал басқа түрлер қатарында *Marinobacter sediminum* (5,86%), *Marinobacter haloterrigenus* (3,51%), *Desulforhopalus singaporensis* (2,43%) және *Arcobacter marinus* (2,22%) тіркелді.

Бұл нәтижелер мұнай пласттарының экстремалды жағдайларына бейімделген теңіз және галофильді микроорганизмдердің басым екендігін көрсетеді.

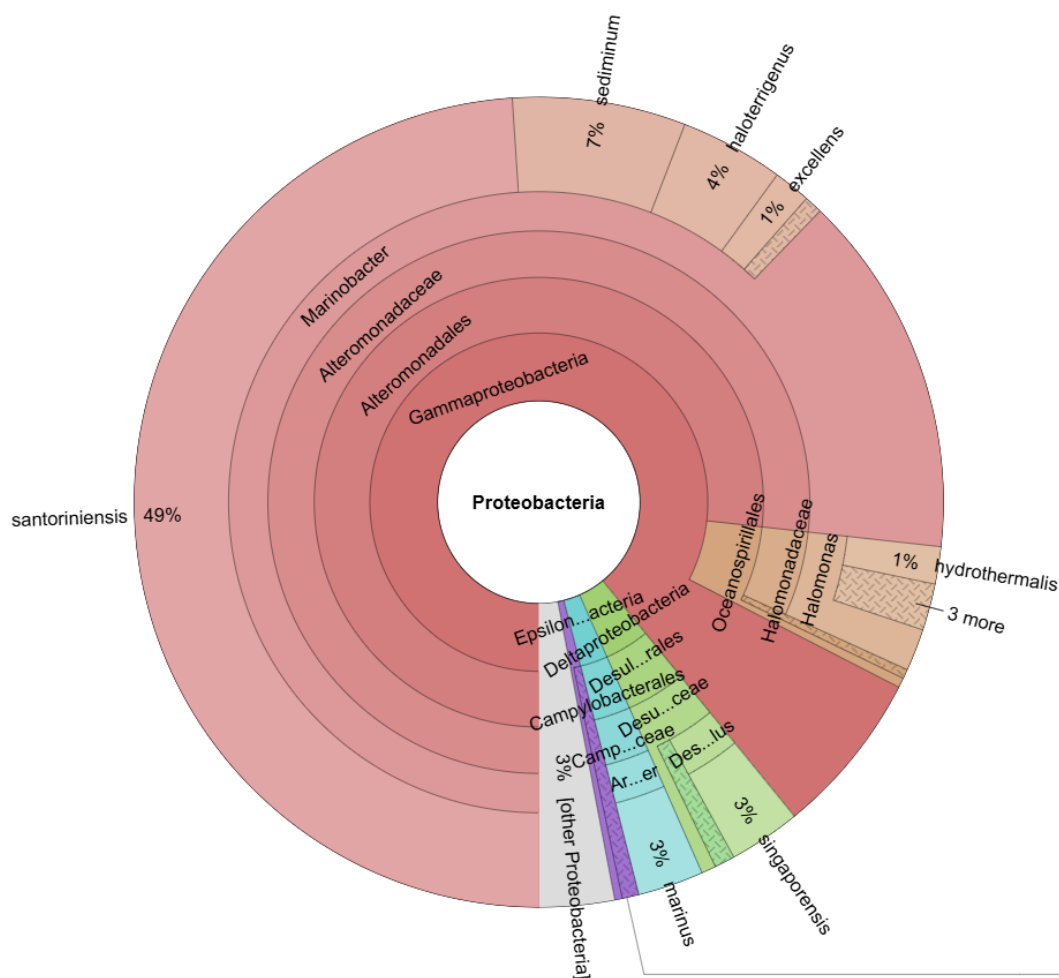


Top Class Classification Results

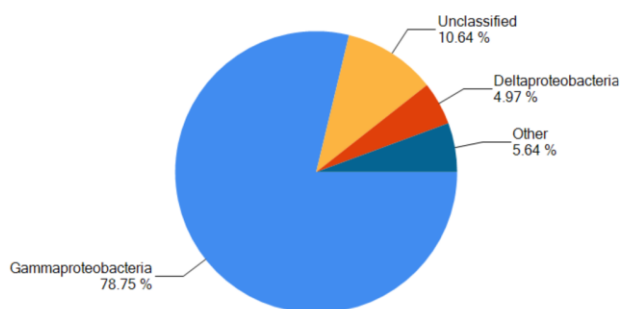


Классификация	Оқылым саны	Жалпы оқылымның үлесі (%)
<i>Alphaproteobacteria</i>	369 421	51,20 %
Класс деңгейінде жіктелмеген	95 698	13,26 %
<i>Actinobacteria</i>	94 891	13,15 %
<i>Clostridia</i>	64 104	8,88 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	62 918	8,72 %
<i>Betaproteobacteria</i>	12 843	1,78 %
<i>Bacilli</i>	7 938	1,10 %
<i>Deltaproteobacteria</i>	4 247	0,59 %

А) Ақінген кен орнының пласт суындағы микробтық қауымдастықтың таксономиялық таралуы. Класс деңгейінде барлығы 56 таксон анықталды, олардың ішінде алғашқы 7 таксон кестеде көрсетілген. «Басқалар» санаты құрамында үлесі 3,5%-дан төмен барлық таксондар біріктірілген.



Top Class Classification Results



Классификация	Оқылым саны	Жалпы оқылымның үлесі (%)
<i>Gammaproteobacteria</i>	481 824	79,82 %
Класс деңгейінде жіктелмеген	34 777	5,76 %
<i>Deltaproteobacteria</i>	32 331	5,36 %
<i>Epsilonproteobacteria</i>	13 952	2,31 %
<i>Alphaproteobacteria</i>	12 971	2,15 %
<i>Clostridia</i>	7 808	1,29 %
<i>Actinobacteria</i>	4506	0,75 %
<i>Methanomicrobia</i>	3193	0,53 %

Ә) Шығыс Мақат кен орнының пласт суындағы микробтық қауымдастықтың таксономиялық таралуы. Класс деңгейінде барлығы 54 таксон анықталды, олардың ішінде алғашқы 7 таксон кестеде көрсетілген. «Басқалар» санаты құрамында үлесі 5,64 %-дан төмен барлық таксондар біріктірілген.

Сурет 11 - 16S рРНҚ метагеномдық талдау негізіндегі микробтық алантүрлілігі

Ал Ақінген кен орнының су сынама метагеномдық талдау нәтижелері бойынша *Bacteria* басым болып, олардың үлесі 94,13%-ды құрады, ал *Archaea* 0,08% ғана болды (сурет 11, А). Тип (Phylum) деңгейде *Proteobacteria* (65,81%) негізгі топ ретінде анықталды, одан кейін *Actinobacteria* (13,21%), *Firmicutes* (10,35%) және *Bacteroidetes* (0,28%) шағын үлеспен тіркелді. Класс (Class) деңгейде *Alphaproteobacteria* (51,20%) басым болып, одан кейін *Actinobacteria* (13,15%), *Clostridia* (8,88%), *Gammaproteobacteria* (8,72%) және *Bacilli* (1,10%) анықталды. Қатар (Order) деңгейінде *Rhizobiales* (45,05%) айтарлықтай көп үлеске ие болды, ал *Actinomycetales* (13,09%) және *Halanaerobiales* (6,82%) де жиі кездесетін топтар болды. Тұқымдас (Family) деңгейінде *Methylobacteriaceae* (35,92%) басым болып, *Mycobacteriaceae* (8,84%) және *Xanthomonadaceae* (6,74%) де үлес қосты. Туыс (Genus) деңгейде *Methylobacterium* (35,92%) негізгі топ ретінде тіркелді, оған қоса *Mycobacterium* (8,84%) және *Labrys* (5,49%) де анықталды. Түр (Species) деңгейінде ең жоғары үлес *Methylobacterium hispanicum* (9,40%) болып, одан кейін *Mycobacterium pinnipedii* (7,08%) және *Methylobacterium dankookense* (6,89%) анықталды (сурет 11, А).

Жоғарыда сипатталған нәтижелерді басқа мұнай кен орындарындағы зерттеулермен салыстырғанда, ұқсас микробтық құрылым байқалады. Мысалы, Норвегия теңізіндегі мұнай резервуарлары зерттеулерінде микробтық қауымдастықтардың негізінен Бактериялардан тұратыны анықталған, ал Архейлер аз үлеске ие болған [163]. Бұл зерттелген кен орындарымен сәйкес келеді.

Сондай-ақ, Бразилиядағы мұнай ұңғымаларында жоғары температуралы, тұзды резервуарларда *Marinobacter* және *Marinobacterium* бактерияларының басым болатыны анықталды, бұл Шығыс Мақат кен орнындағы нәтижелерге ұқсас. Ал басқа мұнай кен орындарында *Alphaproteobacteria* басым болған, бұл Ақінген кен орнының микробтық құрылымымен сәйкес келеді [164]. Қытайдағы Шэнли мұнай кен орнында жүргізілген зерттеулер де ұқсас нәтижелер көрсетті. Бұл жерде *Gammaproteobacteria* мен *Alphaproteobacteria* басым екені анықталған, ал негізгі көмірсутек ыдыратушы бактериялар ретінде *Pseudomonas* және *Arcobacter* тіркелген. Бұл мәліметтер Шығыс Мақат пен Ақінген кен орындарының ерекшеліктерін ескере отырып, олардың белгілі бір экологиялық жағдайларға бейімделгенін көрсетеді [73].

Әлемдік мұнай қорларының мета-анализ нәтижелерінде *Proteobacteria* типінің (әсіресе *Gammaproteobacteria* және *Alphaproteobacteria*) басым болуын және олардың құрамы геологиялық жағдайларға байланысты өзгеретінін көрсетті [165]. Сонымен қатар, Қытайдағы Хуабэй мұнай кен орнындағы зерттеулер орташа температуралы ұңғымаларда *Alphaproteobacteria* мен *Gammaproteobacteria* басым екенін, ал жоғары температуралы резервуарларда метаногенді Архейлер көп кездесетінін көрсетті [77].

Ақінген кен орнында анықталған микробтық қауымдастықтың құрамында *Methylobacterium* туысының басым болуы олардың көмірсутектерді ыдырату қабілетімен байланысты болуы мүмкін. Бұған дейінгі зерттеулерде

Methylobacterium sp. strain ZASH мұнай өңдеу қалдықтарынан бөлініп алынып, алифатикалық көмірсутектерді (C12–C36) тиімді ыдырататыны анықталған. Бұл штамм қысқа тізбекті алкандарды (мысалы, C12) 90%-ға дейін, ал ұзын тізбекті алкандарды (C36) 30%-ға дейін ыдырату қабілетін көрсеткен. Осыған байланысты, Ақінген кен орнындағы *Methylobacterium* өкілдері көмірсутектердің биодеградациясына белсенді қатысуы мүмкін [166].

Осы зерттеулердің нәтижелерін біріктіре отырып, Шығыс Мақат пен Ақінген кен орындарындағы микробтық қауымдастықтардың ерекшеліктері олардың қоршаған орта жағдайларына бейімделуіне байланысты екенін көруге болады. Шығыс Мақат кен орнында теңіз және тұзға төзімді бактериялар басым болса, Ақінген кен орнында метилотрофты және актинобактериялар көп кездесуімен ерекшеленді.

Зерттеудің келесі сатысында мұнай пласт сулары сынамаларына микробиологиялық талдау жүргізілді. Ең алдымен алынған үлгілердің аэробты және анаэробты жағдайда 40 °C температурада ЖМС анықталынды (кесте 7).

Кесте 7 – Батыс Қазақстан кен орындарынан мұнай пласт суларының аэробты және анаэробты микроорганизмдерінің жалпы саны, КТБ/мл

№	Сынама атауы	Аэробты, КТБ/мл	Анаэробты, КТБ/мл
1	№302 ұңғыма	$2,75 \times 10^2 \pm 0,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1 \pm 0,2 \times 10^2$
2	№329 ұңғыма	$4 \times 10^2 \pm 0,4 \times 10^2$	$2,5 \times 10^1 \pm 0,4 \times 10^2$
3	БШСС, шығыс	$3,5 \times 10^2 \pm 0,5 \times 10^2$	-
4	№129 ұңғыма	$2 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^2$	-
5	№145 ұңғыма	$2 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^2$	-
6	№121 ұңғыма	$2 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^2$	-

Алайда кейбір сынамаларда анаэробты микроорганизмдер анықталмаған, бұл бірнеше факторларға байланысты болуы мүмкін:

- Лабораториялық жағдайда экстремалды ортаның нақты жағдайларын толықтай қайта жасау мүмкін болмауы;
- Мұнай ұңғымаларының 660–1111 м тереңдікте орналасуына байланысты үлгілерде микроорганизмдердің бастапқы тіршілік ортасының толық көрінісі берілмеуі.

Зерттеу барысында 33 микроорганизм бөлініп алынды. Олардың ішінде 7 микроорганизм Шығыс Мақат кен орнынан, ал 26 микроорганизм Ақінген кен орны сынамаларынан бөлініп алынды. Барлық аборигенді микроорганизмдер макро- және микроморфологиялық сипаттамалары бойынша сипатталды (кесте 8). 8-кестеде көрсетілгендей, сипатталған штамдардың көпшілігі грам-оң және таяқша тәрізді болып табылады. Ал грам-теріс таяқша тәрізді микроорганизмдер сирек кездеседі.

Кесте 8 – Батыс Қазақстан кен орындарынан бөлінген микроорганизмдердің макро- және микроморфологиялық сипаттамасы

№	Дақыл	Клетка морфологиясы	Грам бойынша боялуы	Колония морфологиясы
1.	A1	Моно, дипло, - стрептобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті дөңес, кедір-бұдыр, шеті иректелген, жылтыр, шырышты, 8 мм
2.	A2	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ашық сары, беті тегіс, кедір-бұдырлы, шеті иректелген, жылтыр, 5 мм
3.	A3	Монобактериялар	Гр-	Дөңгелек, ақ, беті тегіс, шеті тегіс, жылтыр, 7 мм
4.	A4	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, қатпарлы, құрғақ, 12 мм
5.	A5	Моно, дипло, - стрептобактериялар	Гр+	Пішіні амеба тәріздес, ақ, қатпарлы, шеті ризоидты, құрғақ, іші шырышты, 16 мм
6.	A6	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, шеті тегіс, құрғақ, шеттері жылтыр, 15 мм
7.	A7	Монобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ақ, беті дөңес, шеті тегіс, жылтыр, 3 мм
8.	A8	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті кедір-бұдырлы, шеті иректелген, құрғақ, іші шырышты, 9 мм
9.	A9	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ақ, беті тегіс, шеті тегіс, құрғақ, 11 мм
10.	A10	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, сары, беті тегіс, шеті иректелген, құрғақ, іші шырышты, 5 мм
11.	A11	Монобактериялар	Гр+	Пішіні амеба тәріздес, ақ, беті кедір-бұдыр, шеті иректелген, шырышты, 6 мм
12.	A12	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ-сары, беті тегіс, қатпарлы, шеті иректелген, құрғақ, 6 мм
13.	A13	Монобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ашық сары, беті тегіс, шеті иректелген, жылтыр, 5 мм
14.	A14	Монобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ашық сары, беті дөңес, шеті иректелген, жылтыр, 5 мм
15.	R1	Моно, дипло, - стрептобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті қатпарлы, шеті иректелген, жылтыр, 14 мм
16.	R2	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақсары, беті дөңес, шеті тегіс, 7 мм

17.	R3	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті дөңес, кедір-бұдыр, шеті иректелген, жылтыр, 5 мм
18.	R4	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті кедір- бұдыр, шеті иректелген, құрғақ, 11 мм
19.	R5	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, шеті иректелген, жылтыр, 13 мм
20.	R6	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ашық ақ түсті, беті дөңес, шеті тегіс, жылтыр, 2 мм
21.	R7	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, шеті иректелген, жылтыр, 9 мм
22.	R8	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, қатпарлы, шеті иректелген, құрғақ, 5 мм
23.	R9	Моно, дипло, - стрептобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, шеті тегіс, күңгірт, 15 мм
24.	R10	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, шеті иректелген, жылтыр, 4 мм
25.	PW1	Монобактериялар	Гр-	Дөңгелек, сары, беті тегіс, шеті тегіс, жылтыр, 6 мм
26.	PW2	Моно, дипло, - стрептобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті дөңес, кедір-бұдыр, шеті иректелген, 10 мм
27	M145-1	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ақшыл-сары, беті тегіс, шеті иректелген, жылтыр, 3 мм
28	M145-2	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті дөңес, кедір-бұдырлы, шеті тегіс, шырышты консистенция, 10 мм
29	M121-1	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ақ, беті тегіс, шеті иректелген, құрғақ, 3,5 мм
30	M121-2	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ақ, жалпақ, тегіс, шеттері тегіс, жылтыр, 3,5 мм,
31	M121-3	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Бұрыс пішінді, ақ, беті тегіс, шеті иректелген, құрғақ, 6,5 мм,
32	M129-1	Моно, - диплобактериялар	Гр+	Дөңгелек, ақ, беті бұдырлы, шеті иректелген, құрғақ, 3,5 мм,
33	M129-2	Монобактериялар	Гр-	Бұрыс пішінді, дөңес, шеттері тегіс емес, шырышты консистенция, 2 мм,

Кен орындары бойынша алынған деректер мұнай пласт суларының микробиологиялық құрамын тек сандық тұрғыдан ғана емес, сапалық тұрғыдан да зерттеу қажеттілігін көрсетеді. Өйткені мұнай өндіру кезінде өнім су, мұнай

және газ қоспасы түрінде шығады, ал бұл қоспа жер қойнауындағы микробтық қауымдастықтардың нақты құрамын толық көрсетпеуі мүмкін.

Жалпы, мұнай резервуарларындағы микроорганизмдер әртүрлі фазаларда кездеседі. Бұл фазаларға шикі мұнай, пласт суы және қатты жыныстар жатады. Мұнай микробтық қауымдастығын зерттеу барысында үлгілерді көбінесе су және май фазаларына бөліп талдайды. Су фазасы негізінен кеуекті жыныстарда кездесетін пласт суынан тұрады және оның химиялық құрамы мен ағыны микроб қауымдастықтарының таралуына әсер етеді [74, 167].

Көптеген зерттеулер пласт суынан бөлініп алынған ДНҚ бүкіл резервуардың микробтық қауымдастығы ретінде қарастырылатынын көрсетеді [73]. Дегенмен, май және су фазаларының микроб қауымдастықтарын жеке зерттеу барысында олардың айтарлықтай айырмашылықтары бары анықталған [68]. Май фазасында бактериялық әртүрлілік су фазасына қарағанда айтарлықтай жоғары болған [73]. Кейбір микроорганизмдер мұнайдың бетінде тікелей тіршілік етсе, ал басқалары су фазасында қалады.

Сондықтан пласт суындағы микробиологиялық қауымдастық тек резервуардағы микроорганизмдердің бір бөлігін ғана қамтиды. Май фазасында өзіндік микробтық экожүйе бар, ал кейбір микроорганизмдер мұнай ішінде дисперленген су тамшыларында кездеседі [79]. Осы себепті кен орындарындағы микроб қауымдастықтарының толық бейнесін алу үшін екі фазаны да жеке-жеке метагеномдық талдау жүргізу қажет.

Осылайша, Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының микробтық қауымдастықтары олардың қоршаған орта жағдайларына бейімделуіне байланысты ерекшеленеді. Шығыс Мақат кен орнында жоғары тұздылыққа төзімді *Marinobacter* және *Halomonas*, ал Ақінген кен орнында көмірсутектерді ыдыратушы *Methylobacterium* және *Mycobacterium* басым екені анықталды.

Метагеномдық анализ екі кен орнында да *Bacteria* үлесінің басым екенін көрсетті, алайда таксономиялық әртүрлілік бойынша айтарлықтай айырмашылық тіркелмеді. Аэробты микроорганизмдер саны анаэробтарға қарағанда жоғары. Жалпы, зерттеу нәтижелері ММША процестеріне бейімделген тұзға төзімді микроорганизмдер анықталды, олардың болашақта мұнай өндіруде қолданылу әлеуетін көрсетеді.

3.3 Аборигенді микроорганизм дақылдарының биосурфактант түзу қабілеті бойынша сапалық скринингі

ММША – биотехнологияға негізделген әдіс, онда микроорганизмдер (көмірсутек метаболизмі, бітелу) және олардың метаболиттері (биомасса, биополимерлер, газдар, қышқылдар, еріткіштер, ферменттер және биосурфактанттар) мұнай ұңғымаларынан қалдық мұнайды өндіруді жақсарту үшін қолданылады [168, 169].

Биосурфактанттар негізінен бактериялар, саңырауқұлақтар және ашытқылар арқылы продуцирленеді [170–172] және олардың құрылымы әртүрлі: гликолипидтер, липопептидтер, фосфолипидтер және т.б. [173].

ММША процесінде биосурфактанттар мұнай мен су арасындағы фазалық кернеуді және беттік керілуді төмендетіп, су-мұнай эмульсиясын қалыптастыру арқылы мұнай өндіруді жақсартады [96, 174]. Сонымен қатар, биосурфактанттар синтетикалық ББЗ-ға қарағанда бірқатар артықшылықтарға ие: олар төмен уыттылыққа ие, биологиялық ыдырауға қабілетті және жаңартылатын шикізаттан өндірілген жағдайда арзанырақ болады. Сондай-ақ, олар ерекше функцияларға ие және экстремалды жағдайларға (рН, температура, тұздылық) жоғары төзімділік көрсетеді [174, 175].

Зерттеуде мұнай пласт суларынан бөлігіп алған 33 микроорганизмдердің биосурфактант түзу қабілетін бірнеше әдістер (SMSS қоректік ортасында өсу қабілеті, мұнайығыстыру әдісі, мұнайэмульгирлеу әдісі, беттік керілу белсенділігін анықтау әдісі) негізінде анықтап, іріктеу жүргізілді.

33 микроорганизм дақылдарын көміртектің жалғыз көзі ретінде 2% шикі мұнайы бар 100 мл SMSS ортасына егіліп, 40 °С температурада 5 тәулікке дейін өсу динамикасы анықталды. Өсу динамикасын 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120 сағат аралығында оптикалық тығыздығын (OD600) анықтау арқылы жүргізілді (сурет 12).

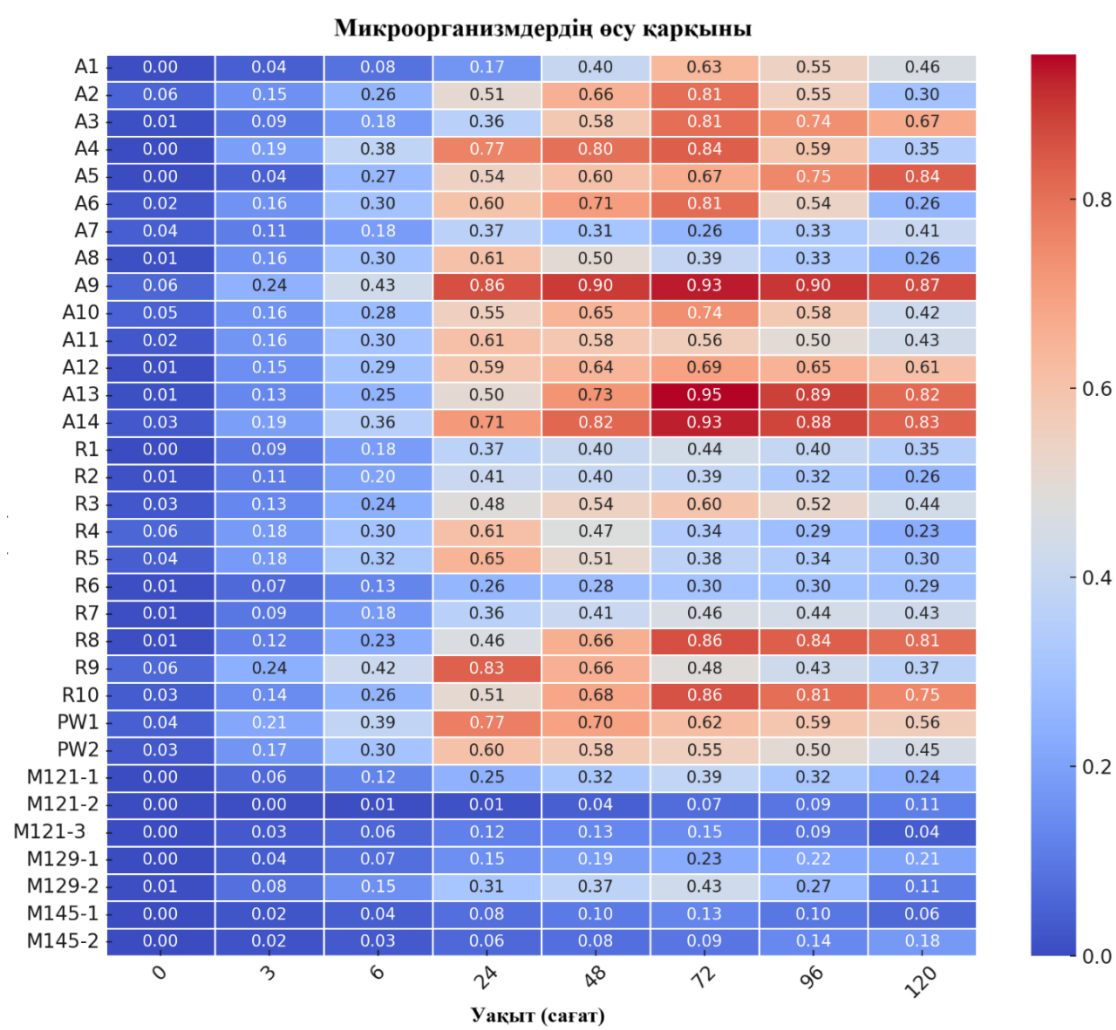
Талдау нәтижелері көрсеткендей, микроорганизмдердің стационарлық фазаға жету уақыты төмендегідей:

- 48–72 сағатта стационарлық фазаға жеткендер (19 штамм): A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, R4, R8, R9, R10, PW1, PW2;
- 96–120 сағатта стационарлық фазаға жеткендер (14 штамм): A7, R1, R2, R3, R5, R6, R7, M121-1, M121-2, M121-3, M129-1, M129-2, M145-1, M145-2.

Жылу картасында қызыл түстер микроорганизмдердің максималды өсу кезеңдерін, ал көк түстер бастапқы немесе төменгі өсу деңгейлерін көрсетеді. Кейбір микроорганизмдер белсенді өсу фазасына ерте (24-48 сағатта) өтсе, басқалары 96 сағаттан кейін ғана тұрақтанады. Бұл олардың орта жағдайларына бейімделу ерекшеліктеріне байланысты (сурет 12).

Зерттеу нәтижесінде микроорганизмдердің биосурфактант түзу қабілеті бойынша скрининг жасау уақыты - 72 сағат таңдалынды, бұл уақытта барлық дақыл бойынша орташа стационар фазасына өтетіндігі анықталынды.

Зерттеудің келесі кезеңінде 72 сағаттық өсіруден кейін микроорганизмдердің қасиеттері сапалық әдістермен анықталды: мұнай ығыстыру қабілеті, мұнай эмульгирлеу индексі және сталагмометриялық әдіс арқылы беттік керілуі бағаланды (кесте 9) [161]. Бақылау ретінде 1%-дық ББЗ Tween-20 суспензиясы қолданылды. Барлық әдістерде микроорганизмдердің клеткасыз супернатанты пайдаланылды. Клеткасыз супернатант 10 000 айн/мин жылдамдықта, 4 °С температурада 10 минут бойы центрифугалау арқылы алынды.



Сурет 12 – Абorigенді микроорганизмдердің өсу қарқынының жылу картасы (Heatmap)

Кесте 9 нәтижелері бойынша мұнай ығыстыру әдісі арқылы 0,2 см - 2,9 см аралығында мұнай ығысуы тіркелді (сурет 12). Ең жоғары мұнай ығысуы A12, PW2 және M129-1 дақылдарында 2,9 см болды. Ал бақылау ретінде қолданылған 1%-дық Tween-20 үшін бұл көрсеткіш $4,8 \pm 0,3$ см құрады. Мұнай ығыстыру әдісі биосурфактанттардың скринингін жүргізуде жиі қолданылатын сапалық әдістердің бірі болып табылады [176].

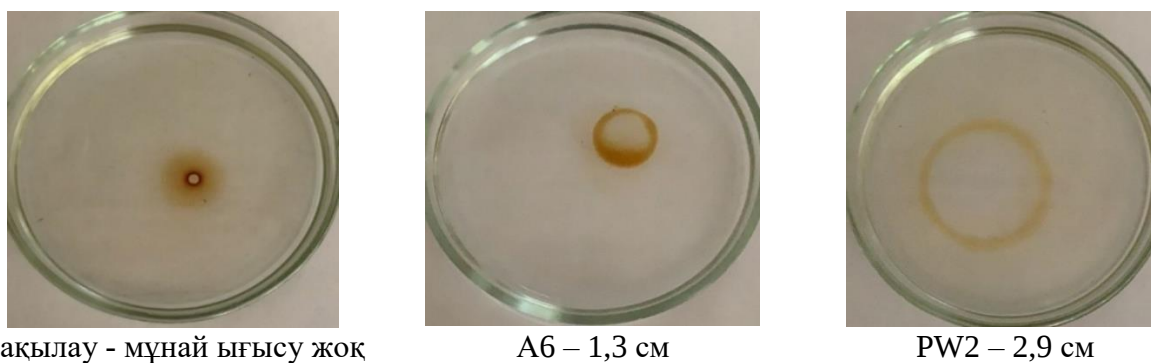
Кесте 9 – Абorigенді микроорганизмдердің биосурфактант түзу қабілеті

Дақыл ^a	Мұнай ығыстыру [см]	Эмульгирлеу индексі [%]	Беттік керілу [мН/м]
A1	$1,1 \pm 0,1$	$42,6 \pm 0,5$	$68,6 \pm 0,5$
A2*	$2,7 \pm 0,1$	$62,6 \pm 0,5$	$64,2 \pm 0,4$
A3	$0,7 \pm 0,1$	$33,1 \pm 0,2$	$68,6 \pm 0,5$
A4*	$2,6 \pm 0,1$	$65,3 \pm 0,5$	$60,3 \pm 0,5$
A5	$2,0 \pm 0,2$	$58,2 \pm 0,2$	$68,0 \pm 0,1$

A6	1,3±0,3	41,2±0,4	67,1±0,2
A7	1,1±0,2	51,1±0,2	66,5±0,4
A8*	2,6±0,1	61,2±0,1	66,0±0,1
A9*	2,8±0,1	60,1±0,1	51,2±0,3
A10	1,1±0,1	34,1±0,1	68,6±0,5
A11*	2,6±0,1	65,5±0,4	65,8±0,3
A12*	2,9±0,1	66,5±0,4	65,7±0,4
A13	1,8±0,3	44,3±0,2	67,3±0,2
A14	0,9±0,1	41,2±0,4	66,5±0,4
R1*	2,7±0,1	60,2±0,4	66,0±0,2
R2	2,2±0,2	55,4±0,2	68,3±0,5
R3	2,2±0,1	45,2±0,4	68,6±0,5
R4*	2,8±0,1	60,3±0,3	64,2±0,4
R5	2,0±0,1	41,6±0,1	68,6±0,5
R6	1,6±0,2	33,1±0,2	68,7±0,2
R7	1,6±0,1	36,0±0,1	68,0±0,1
R8	2,3±0,1	42,1±0,1	68,1±0,2
R9	0,8±0,3	26,2±0,3	67,3±0,2
R10	1,7±0,6	58,1±0,2	68,1±0,1
PW1	1,6±0,1	44,0±0,1	67,1±0,2
PW2*	2,9±0,2	61,2±0,3	64,0±0,1
M145-1	0,2±0,3	0	68,1±0,5
M145-2	0,7±0,3	20±0,1	69,6±0,1
M121-1	0,2±0,3	0	70,2±0,3
M121-2	0,3±0,6	0	69,2±0,1
M121-3	0,7±0,3	0	68,6±0,3
M129-1	2,9±1,5	0	67,9±0,3
M129-2	1,5±1	0	70,6±0,2
1% Tween-20	4,8±0,3	74,2±0,3	52,7±0,6
p-value	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05
^a Ең белсенді дақылдар жұлдызшамен белгіленген.			

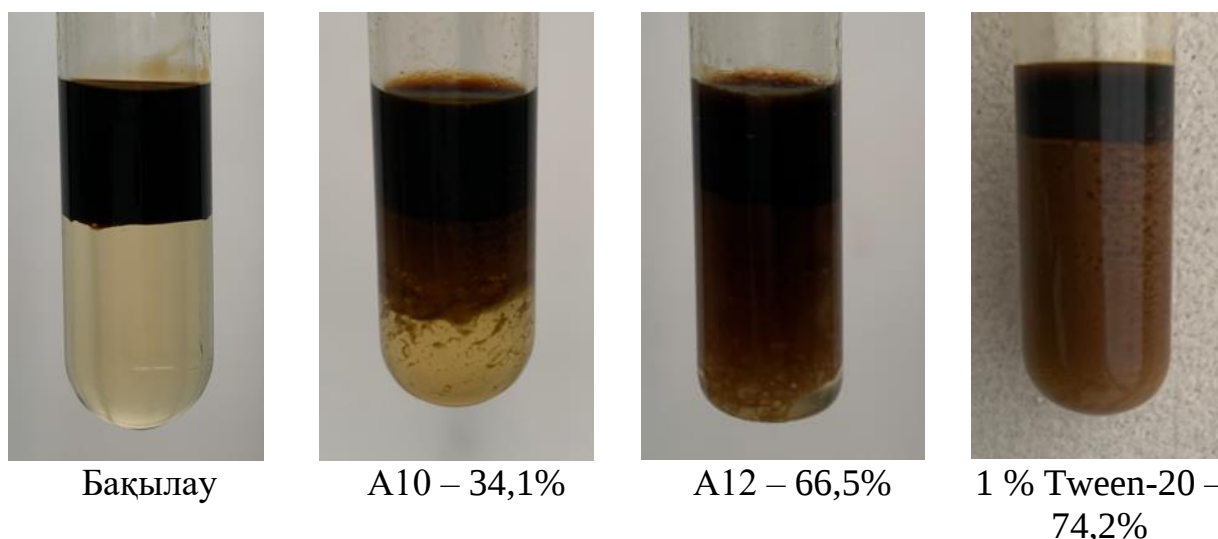
Plaza және бірлескен авторлар [143], сондай-ақ Youssef және бірлескен авторлар [141] бұл әдістің әртүрлі микроорганизмдердің биосурфактант түзу қабілетін анықтауда сенімді екенін көрсетті. Plaza зерттеулерінде 11 штамм мұнай ығыстыру әдісі бойынша оң нәтиже берген [143]. Ал Youssef және т.б. зерттеулерінде микроорганизмдердің мұнай ығысу көрсеткіштері 0,5-тен 3 см аралығында болған [141].

Зерттеуде Cooper мен Goldenberg ұсынған әдіс бойынша мұнайды эмульгирлеу белсенділігі анықталды [142]. Кесте 9 деректеріне сәйкес, дақылдардың мұнай эмульгирлеу индексі 20-74,2% аралығында болды (Сурет 13). Ең жоғарғы эмульгирлеу индексі A12 дақылында тіркеліп, 66,5±0,4% құрады.



Сурет 13 – Дақылдардың мұнай ығыстыру қабілеті

Ұқсас зерттеулерде Ibragim және бірлескен авторлар эмульгирлеу индексінің 39-87% аралығында өзгергенін көрсеткен [51]. Ерназарова және т.б. жүргізілген зерттеулер нәтижесінде *Bacillus sp.* штамдарының шикі мұнаймен жұмыс жасағанда эмульгирлеу индексі 21–80% аралығында, ал гексан үшін 12–63% аралығында өзгертіні анықталды [177]. Жалпы, әдеби деректерге сәйкес, эмульгирлеу индексі 50%-дан жоғары микроорганизмдер ММША әдісінде биосурфактант өндірушілер ретінде перспективті болып саналады [178, 179].



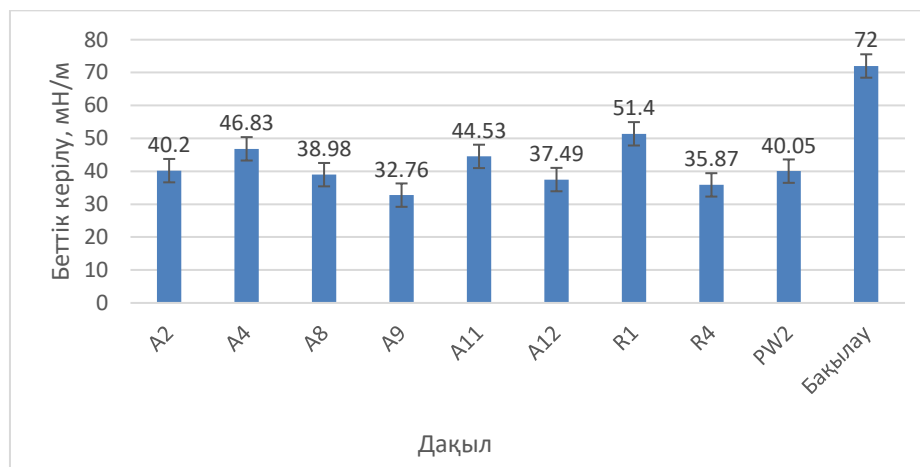
Сурет 14 – Дақылдардың мұнай эмульгирлеу белсенділігі

Траубе сталагмометрінің көмегімен сыналған беттік керілу $51,2 \pm 0,3$ -тен $70,6 \pm 0,2$ мН/м-ге дейін өзгерді.

Ең белсенді дақылдар (A2, A4, A8, A9, A11, A12, R1, R4, PW2) келесі критерийлер бойынша іріктелді: (1) мұнай ығысу аймағы 2,6 см-ден жоғары, (2) эмульгирлеу индексі 60%-дан жоғары және (3) беттік керілу 66 мН/м-ден төмен. Бұл дақылдар әрі қарай мақсатты микроорганизмдер ретінде зерттеу үшін іріктелді.

Жұмыстың келесі сатысында сандық скрининг жүргізіліп, бактериялардың беттік керілуі ST1 Power тензометрінде анықталды [161]. Сурет 15

көрсетілгендей, зерттелген дақылдардың беттік керілу мәндері $32,76 \pm 0,3$ – $51,40 \pm 0,4$ мН/м аралығында болды. Бақылау ретінде дистилденген судың беттік керілуі $72 \pm 0,1$ мН/м құрады. Әдеби деректер бойынша дистилденген судың беттік керілуі 22 °C температурада шамамен 72 мН/м құрайды [180]. Ең төменгі беттік керілу А9 дақылында тіркеліп, $32,76 \pm 0,3$ мН/м көрсетті, бұл оны ең перспективті дақыл ретінде қарастыруға мүмкіндік берді.



Сурет 15 – Белсенді дақылдардың беттік керілуі, мН/м

Жалпы қабылданған қағида бойынша, ММША үшін белсенді микроорганизмдер сұйық ортадағы беттік керілуді 40 мН/м немесе одан төмен деңгейге дейін төмендетуі керек [176].

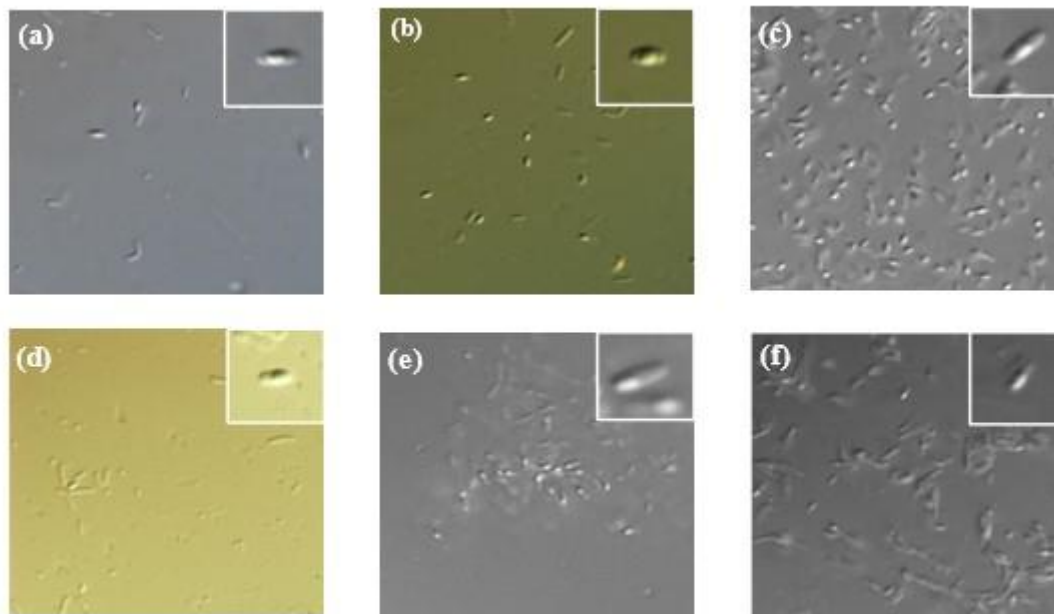
Осылайша, биосурфактант өндіруші бактериялардың сапалық скрининг нәтижесінде 33 микроорганизм дақылдары ішінен 9 (А2, А4, А8, А9, А11, А12, R1, R4, PW2) дақыл іріктеліп, сандық скринингі бойынша таңдалған 9 дақылдың беттік керілуі < 40 мН/м болған 6 (А2, А8, А9, А12, R4 және PW2) дақыл іріктелді.

3.4 Іріктелген бактерия дақылдарының морфология-дақылдық, физиология-биохимиялық, молекулалық-генетикалық идентификациясы

ММША әдісінде перспективті қолдану үшін іріктелген дақылдар оттегінің қатысуымен коректік ортада өсті. Морфологиясы бойынша грам-оң және эллипсоидты эндоспоралар түзді. Бұл белгілер дақылдар *Bacillus* туысына жіктеуге мүмкіндік берді (сурет 16).

Дақылдардың физиология-биохимиялық қасиеттерін анықтау үшін API тесті жүргізілді (кесте 10) [161]. Зерттеуде API 20E және API 50CH тест жүйелері қолданды. API тест нәтижелері мұнаймен байланысты дақылдардың биохимиялық профильдері олардың *Bacillus sp.* тобына жататынын айқын көрсетті. Кесте 10 көрсетілгендей, барлық дақылдар 13 қосылысты ыдыратты: L-арабиноза, D-рибоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза, D-маннитол, метил- α -D-глюкопиранозид, арбутин, эскулин, салицин, D-целлобиоза, D-сахароза және D-трегалоза. Сонымен қатар, 21 көмірсу: эритритол, D-арабиноза, L-

ксилоза, D-адонитол, метил- β -D-ксилопиранозид, L-сорбоза, дульцитол, D-сорбитол, метил- α -D-маннопиранозид, N-ацетилглюкозамин, D-мелезитоза, ксилит, гентиобиоза, D-ликсоза, D-фукоза, L-фукоза, D-арабитол, L-арабитол, калий глюконаты, калий 2-кетоглюконат және калий 5-кетоглюконат бұл бактериялармен ыдырамады.



Сурет 16 – Фазалық-контрастты микроскоп арқылы қаралған іріктелген дақылдардың микросуреттері. а) центральды орналасқан эллипсоидты споралы А2 дақылы; б) центральды орналасқан эллипсоидты споры А8 дақылы; с) субтерминальды орналасқан эллипсоидты споралы А9 дақылы; d) субтерминальды орналасқан эллипсоидты споралы А12 дақылы; е) субтерминальды орналасқан эллипсоидты споралы R4 дақылы; f) субтерминальды орналасқан эллипсоидты споралы PW2 дақылы. Барлық дақылдар 40 °C температурада 48 сағат бойы NA қоректік ортасында өсірілді. Суреттер Olympus BX61 көмегімен 1000x үлкейтумен түсірілген.

10 қосылыс (глицерин, D-ксилоза, инозитол, амигдалин, D-мальтоза, D-мелибиоза, D-рафиноза, крахмал, гликоген, D-тагатоza) 5 дақылда ыдырағанымен, А2 штамында анықталған жоқ. Тек А12 дақылы D-лактозаны ыдыратты. Сонымен қатар, А8, А9 және R4 инулин мен D-туранозаны, ал R4 және PW2 D-галактозаны ашытады (кесте 10).

API 20E жүйесінде жүргізілген 11 сынақтың нәтижелері изоляттар арасында айтарлықтай биохимиялық айырмашылықтарды көрсеткен жоқ. Барлық дақылдар β -галактозидазаны (ONPG сынағы) және сұйылтылған желатинді гидролиздеді, бірақ L-аргинин, L-лизин және L-орнитинді декарбоксилдемеді. Сонымен қатар, барлық дақылдар цитратты пайдалануда, H_2S өндірісінде, уреаза белсенділігінде, триптофан деаминазасында және индол

өндірісінде теріс нәтиже көрсетті. Тек 3 дақыл (A12, R4 және PW2) Voges-Proskauer тестінде ацетоин өндірді (кесте 10).

Кесте 10 – *Bacillus sp.* физиология-биохимиялық профильдері

Жүйе	Тест	Белсенді қосылыстары	Дақыл					
			A2	A8	A9	A12	R4	PW2
API 20E	ONPG	2-нитрофенил-βD-галактопиранозид	+	+	+	+	+	+
	ADH	L-аргинин	-	-	-	-	-	-
	LDC	L-лизин	-	-	-	-	-	-
	ODC	L-орнитин	-	-	-	-	-	-
	CIT	тринатрий цитрат	-	-	-	-	-	-
	H2S	тиосульфат натрия	-	-	-	-	-	-
	URE	мочевина	-	-	-	-	-	-
	TDA	L-триптофан (триптофан дезаминаза)	-	-	-	-	-	-
	IND	L-триптофан (индол түзілуі)	-	-	-	-	-	-
	VP	пируват натрия	-	-	-	+	+	+
	GEL	желатин	+	+	+	+	+	+
API 50CH	control	Бақылау	-	-	-	-	-	-
	GLY	глицерин	-	+	+	+	+	+
	ERY	эритрит	-	-	-	-	-	-
	DARA	D-арабиноза	-	-	-	-	-	-
	LARA	L-арабиноза	+	+	+	+	+	+
	RIB	D-рибоза	+	+	+	+	+	+
	DXYL	D-ксилоза	-	+	+	+	+	+
	LXYL	L-ксилоза	-	-	-	-	-	-
	ADO	D-адонитол	-	-	-	-	-	-
	MDX	метил-β-D-ксилопиранозид	-	-	-	-	-	-
	GAL	D-галактоза	-	-	-	-	+	+
	GLU	D-глюкоза	+	+	+	+	+	+
	FRU	D-фруктоза	+	+	+	+	+	+
	MNE	D-манноза	+	+	+	+	+	+
	SBE	L-сорбоза	-	-	-	-	-	-
	RHA	L-рамноза	-	V	-	-	V	-
	DUL	дульцитол	-	-	-	-	-	-
	INO	инозитол	-	+	+	+	+	+
	MAN	D-маннитол	+	+	+	+	+	+
	SOR	D-сорбитол	-	-	-	-	-	-
	MDM	метил-α-D-маннопиранозид	-	-	-	-	-	-
	MDG	метил-α-D-глюкопиранозид	+	+	+	+	+	+

NAG	N-ацетилглюкозамин	-	-	-	-	-	-
AMY	амигладин	-	+	+	+	+	+
ARB	арбутин	+	+	+	+	+	+
ESC	эскулин (темір цитраты)	+	+	+	+	+	+
SAL	салицин	+	+	+	+	+	+
CEL	D-целлобиоза	+	+	+	+	+	+
MAL	D-мальтоза	-	+	+	+	+	+
LAC	D-лактоза	-	-	-	+	-	-
MEL	D-мелибиоза	-	+	+	+	+	+
SAC	D-сахароза	+	+	+	+	+	+
TRE	D-трегалоза	+	+	+	+	+	+
INU	инулин	-	+	+	-	+	+
MLZ	D-мелезитоза	-	-	-	-	-	-
RAF	D-рафиноза	-	+	+	+	+	+
AMD	крахмал (амидон)	-	+	+	+	+	+
GLYG	гликоген	-	+	+	+	+	+
XLT	ксилит	-	-	-	-	-	-
GEN	гентиобиоза	-	-	-	-	-	-
TUR	D-тураноза	-	+	+	-	+	+
LYX	D-ликсоза	-	-	-	-	-	-
TAG	D-тагатоза	-	+	+	+	+	+
DFUC	D-фукоза	-	-	-	-	-	-
LFUC	L-фукоза	-	-	-	-	-	-
DARL	D-арабиноза	-	-	-	-	-	-
LARL	L-арабиноза	-	-	-	-	-	-
GNT	калий глюконаты	-	-	-	-	-	-
2KG	калий 2-кетоглюконаты	-	-	-	-	-	-
5KG	калий 5-кетоглюконаты	-	-	-	-	-	-

Ескерту: «+» - оң; «-» - теріс; «V» - күмәнді.

16S рРНҚ гендік секвенирлеу әдісін қолданылып, ММША үшін перспективті дақылдардың түрлік классификациясы анықталды. Алынған 16S рРНҚ генінің нуклеотидтік реттілігін талдау негізінде дақылдар келесідей жіктелді: *Bacillus safensis* (бір штамм), *Bacillus paralicheniformis* (бір штамм), *Bacillus licheniformis* (бір штамм) және *Bacillus subtilis* (үш штамм). 16S рРНҚ генінің фрагменттерінің нуклеотидтік тізбегі GenBank-ке (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) жүктелді: *Bacillus safensis subsp. safensis* A2 - OP565012; *Bacillus subtilis* A8 - OP565013; *Bacillus subtilis* A9 - OP565014; *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A12 - OP565015; *Bacillus paralicheniformis* R4 - OP565016; *Bacillus licheniformis* PW2 - OP565017. Түрлерді сәйкестендіру туралы толық ақпарат 11-кестеде берілген [161].

Сонымен қатар, бөлініп алынған бактериялардың (n = 6) 16S рРНҚ генінің

нуклеотидтік тізбегі және GenBank-тегі *Bacillus* туысына жататын репрезентативті 18 штамның тізбегі негізінде филогенетикалық ағаш құрылды (сурет 17).

Кесте 11 - BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> көмегімен 16S рРНҚ генінің нуклеотидтер тізбегін талдау әдісімен идентификация нәтижелері

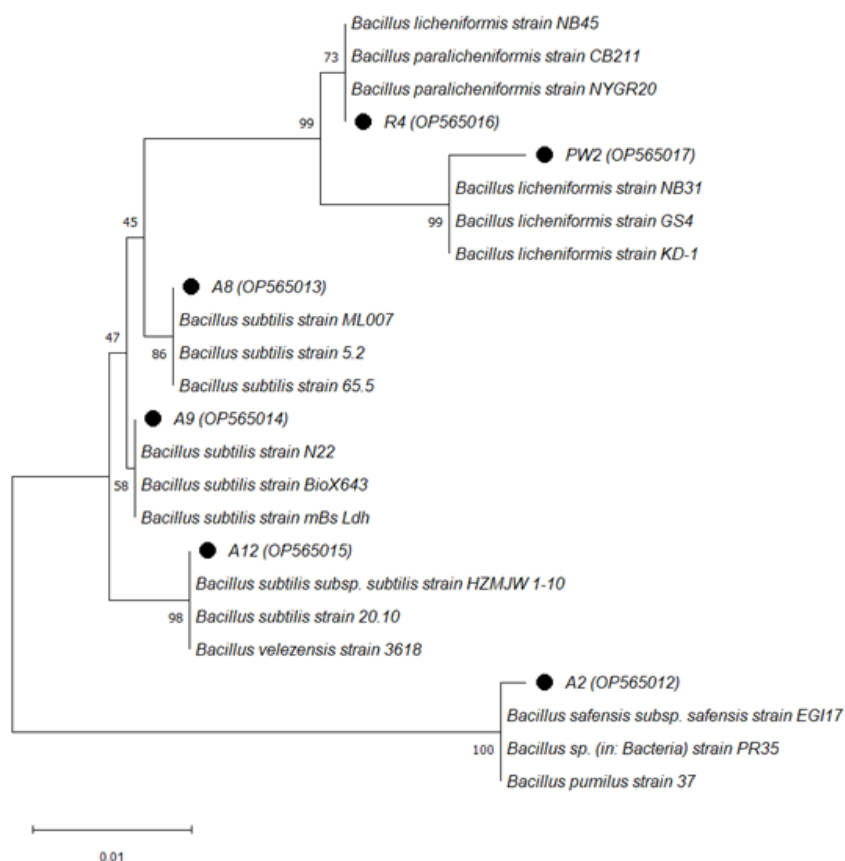
Дақыл	Жақын таксон, GenBank-тегі тіркеу нөмірі	Сәйкестендіру пайызы %	Идентификациясы
A2	MN704393.1	99.85	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>
A8	MT636460.1	99.85	<i>Bacillus subtilis</i>
A9	ON795918.1	100	<i>Bacillus subtilis</i>
A12	MT605412.1	100	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
R4	MN922812.1	99.58	<i>Bacillus paralicheniformis</i>
PW2	MT214222.1	99.15	<i>Bacillus licheniformis</i>

Филогенетикалық талдау нәтижесінде дақылдар екі негізгі кластерге бөлінді: 1-кластерде *Bacillus safensis* subsp. *safensis* штамына ең жақын туыстық байланыста A2 штамы орналасқан; 2-кластерде қалған бес штамды қамтитын қосалқы кластерге бөлінген. *Bacillus* sp. барлық штамдарының 16S рРНҚ генінің тізбегі 99%-дан жоғары ұқсастық көрсетті, бұл олардың референтті штамдармен тығыз филогенетикалық байланыста екенін көрсетті.

17-ші суретте көрсетілгендей, жүктеу нәтижесінде (1000 көшірме) сәйкес топтастырылған таксондар пайызы кластер жанында көрсетілген. GenBank базасына тіркелген тіркеу нөмірлері жақшада берілген. Филогенетикалық шежіре бұтақтардың ұзындығымен масштабталған, олар филогенетикалық талдау үшін қолданылған эволюциялық қашықтықтармен бірдей бірліктерде көрсетілген.

Эволюциялық қашықтық p-distance әдісі арқылы есептелді және әрбір бөлім үшін базалық айырмашылықтар санының бірліктерімен өрнектелді. Бос орындар мен жетіспейтін деректерді қамтитын барлық позициялар толық жою (complete deletion option) опциясы арқылы алынып тасталды. Қорытынды деректер жиыны жалпы 619 нуклеотидтік элементті қамтыды.

Мұнай пластына төзімділігімен және қоршаған ортаға бейімделгіштігімен ерекшеленетін *Bacillus* түрінің бактериялары мұнай қорларында кездесетіні және олардың төзімділік механизмдері зерттелгені шетел әдебиеттерінде белгілі. Мысалы *Bacillus subtilis* және *Bacillus cereus* мұнай қорларынан табылып, биосурфактанттар өндіру қабілеті дәлелденген. Бұл қасиет олардың мұнайды эмульгациялауға және мұнай өндіру процесін жақсартуға қатысу мүмкіндігін көрсетеді [181].



Сурет 17 - *Bacillus* туысы арасында бөлініп алынған микроорганизмдердің нуклеотидтер тізбегінің орнын көрсететін филогенетикалық шежіресі

B. licheniformis мұнай шығаруда қолданылатын биополимерлер мен биосурфактанттар өндіреді, бұл микробиологиялық әдіспен МША тиімділігін арттырады [182]. Сонымен қатар, *B. licheniformis* таңдамалы бітелу стратегиясы арқылы жоғары өткізгіштігі бар аймақтарды жауып, төмен өткізгіштікті пласттардан мұнай ағынын күшейтеді [183]. Сондай-ақ, бұл бактерия СРБ басу үшін антибиотикалық қосылыстар синтездейді [184].

B. safensis мұнай биодеградациясы мен қалпына келтіру процестерінде белсенді. *B. safensis* J2 ауыл шаруашылық қалдықтарынан биосурфактант өндіре отырып, мұнайды 46,5% тиімді ығыстырады [185].

Осылайша, ММША үшін таңдалған *Bacillus* sp. дақылдары аэробты және анаэробты жағдайларда өсу, сондай-ақ қоршаған орта стресс факторларына (гидростатикалық қысым кезінде жоғары температуралардың әсері, жоғары тұздылық) төзімділік сияқты маңызды қасиеттерге ие. Олардың мұнаймен байланыстылығы биохимиялық талдау нәтижелерімен расталды, ал филогенетикалық зерттеулер *Bacillus safensis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus licheniformis* және *Bacillus subtilis* түрлеріне жататынын көрсетті. Бұл штаммдардың эндоспора түзу қабілеті олардың мұнай пласттарындағы тұрақтылығын қамтамасыз етіп, ММША процесінде аборигенді микробтық қауымдастықтарды белсендіру немесе экзогендік инокуляция арқылы қолдану

үшін әлеуетті штамдар ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

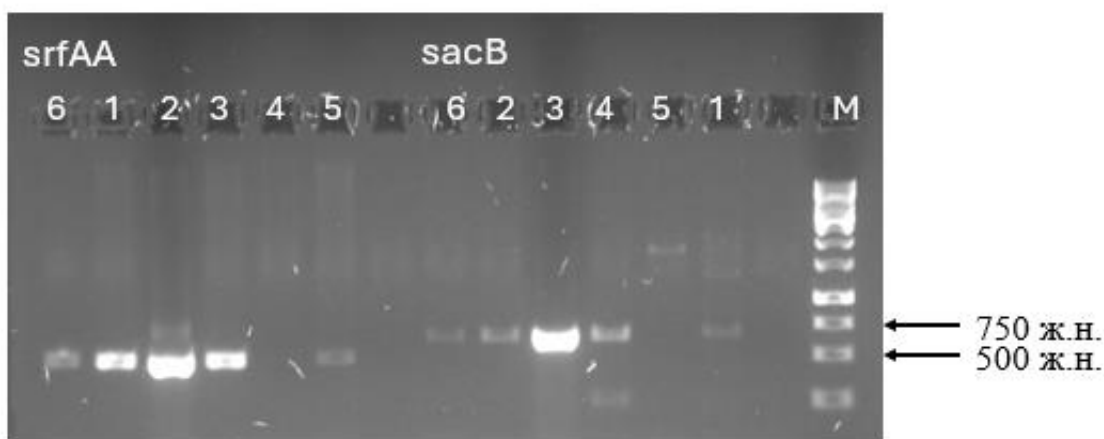
3.5 *Bacillus* sp. штамдарында биосурфактант және биополимер синтезіне жауапты гендердің анықталуы және олардың экспрессиясы

Bacillus туысына жататын бактериялар биотехнологияда кеңінен қолданылады, себебі олар әртүрлі биологиялық белсенді қосылыстар, соның ішінде антибиотиктер, ферменттер, биополимерлер және биосурфактанттар өндіруге қабілетті. Биосурфактанттар ішінде сурфактин және лихенизин ерекше қызығушылық тудырады. Олар мұнай пластында мұнай эмульгирлеу, мұнай-су фазасында беттік керілуді төмендетіп, тұтқырлықты азайту арқылы мұнайдың қозғалғыштығын арттырады.

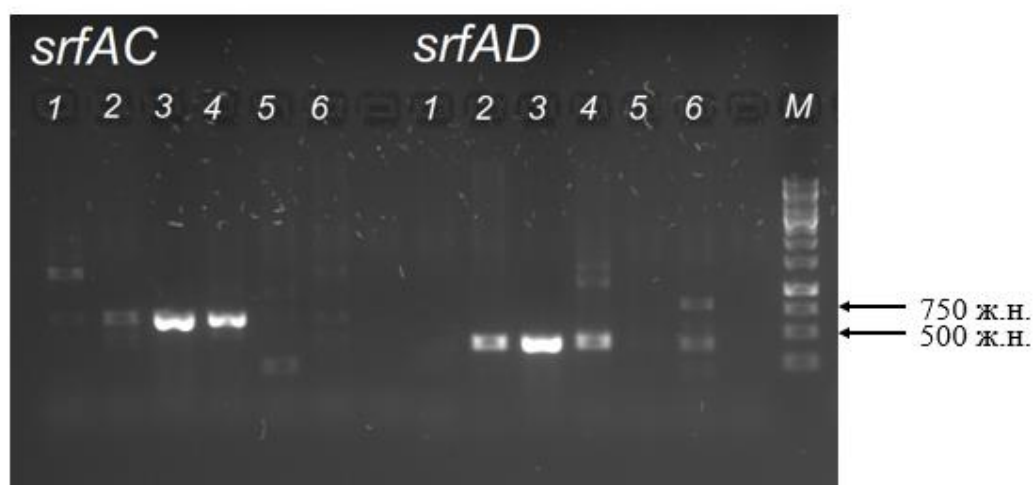
Bacillus sp. бактериялары (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*) биосурфактанттармен қатар әртүрлі экзополисахаридтерді, соның ішінде леванды синтездеуге қабілетті [186]. Леван – фруктозадан құралған биополимер, оның жоғары ерігіштігі, биосәйкестігі және антиоксиданттық қасиеттері бар. Леван суда жақсы еритіндіктен және тұтқырлықты арттыратын қабілетінен мұнай кеніштеріндегі мұнайды тиімді ығыстыру үшін қолданылады. Сонымен қатар, ол мұнай қабатында микроорганизмдердің өміршендігін арттырып, мұнайдың жылжуын жеңілдетеді [186–188].

Бұл қосылыстарды өндіруге жауапты гендер *Bacillus* спора түзуші бактерияларында әртүрлі таралуы мүмкін. Сондықтан *Bacillus* штамдарында осы гендердің болуын зерттеу олардың биотехнологиялық әлеуетін анықтауда маңызды болып табылады.

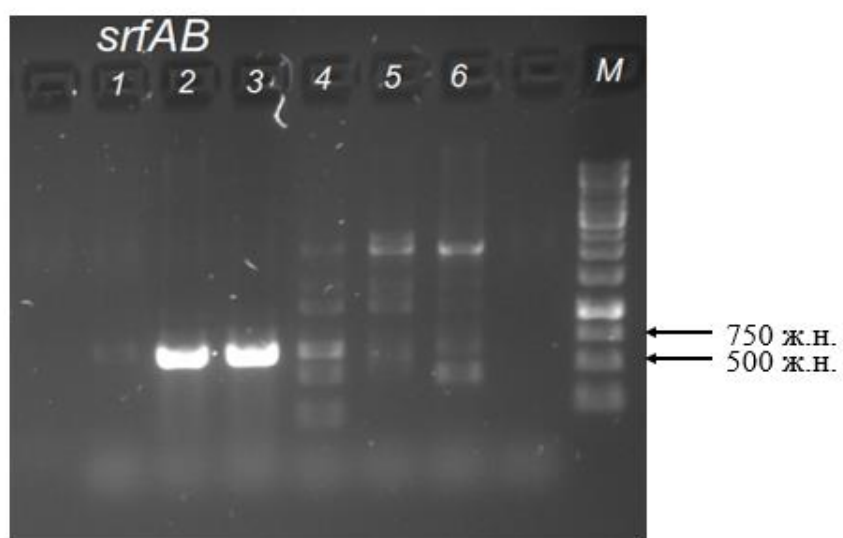
Bacillus sp. штамдары сурфактин синтетазасының суббірліктерін кодтайтын сурфактин оперонының *srfA* (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, *srfp*) болуына сынақтан өткізілді. Сонымен қатар, лихенизинді кодтайтын *lchAA* және леван кодтайтын *sacB* гендері де зерттелді. ПТР скринингінің нәтижелері көрсеткендей, сурфактиннің барлық бес гені *B. subtilis* A8 және A9 штамдарында анықталды (сурет 18) [161].



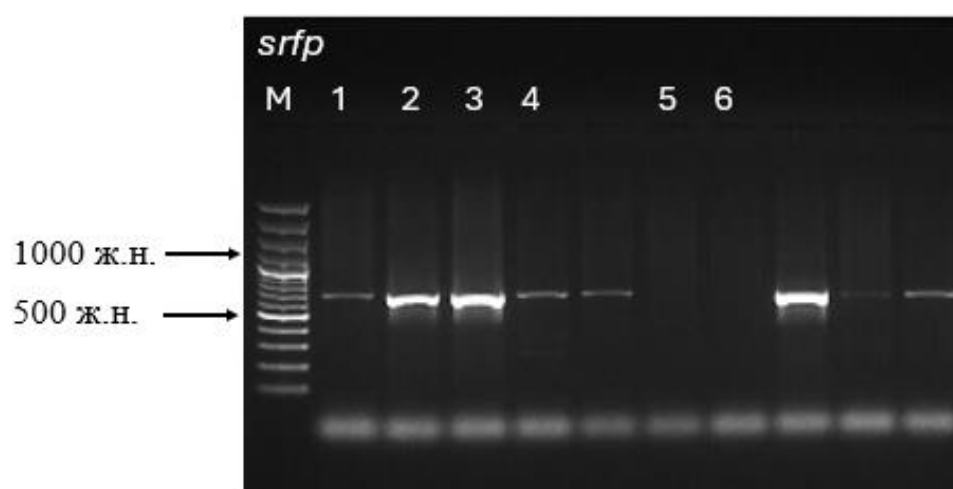
А)



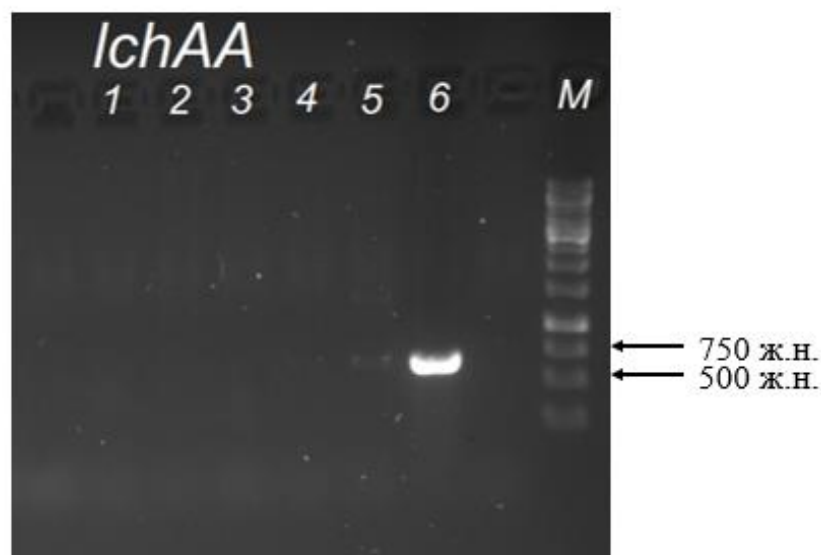
Ә)



Б)



В)



Г)

Сурет 18 - Биосурфактант пен биополимер гендерінің ПТР өнімдерінің агарозды гель электрофорезі. М: GeneRuler 1 kb ДНҚ маркері. А) *srfAA* және *sacB* гені; Ә) *srfAC* және *srfAD* гені; Б) *srfAB* гені; В) *srfp* гені; Г) *lchAA* гені. 1 – *B. safensis* A2; 2 – *B. subtilis* A8; 3 – *B. subtilis* A9, 4 - *B. subtilis* A12, 5 – *B. paralicheniformis* R4; and 6 – *B. licheniformis* PW2

Ал *B. subtilis* A12 штамында *srfAA*, *srfAC*, *srfAD* және *srfp* гендері ғана табылды (кесте 12). *B. safensis* A2 штамында *srfp* гені ғана табылды (сурет 18, В). *B. licheniformis* PW2 штамында *srfAA*, *lchAA* гендері анықталды. Сонымен қатар, *B. paralicheniformis* R4 штамында зерттелген гендердің ешқайсысы табылған жоқ.

Сонымен қатар, *sacB* гені алты штамның төртеуінде леванды кодтайды: *B. subtilis* A8, *B. subtilis* A9, *B. subtilis* A12 және *B. licheniformis* PW2 (сурет 18, А). Осылайша, *B. subtilis* A8 және A9 штамдары сурфактин синтезіне толық қабілетті болуы мүмкін, ал *B. licheniformis* PW2 тек лихенизинді өндіре алады.

Кесте 12 – *Bacillus* sp. штамдарында биосурфактанттарды (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, *srfp*, *lchAA*) және биополимерді (*sacB*) кодтайтын гендердің болуы.

Штамм	Ген						
	<i>srfAA</i>	<i>srfAB</i>	<i>srfAC</i>	<i>srfAD</i>	<i>srfp</i>	<i>lchAA</i>	<i>sacB</i>
<i>B. safensis</i> A2	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. subtilis</i> A8	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. subtilis</i> A9	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. subtilis</i> A12	+	-	+	+	+	-	+
<i>B. paralicheniformis</i> R4	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> PW2	+	-	-	-	-	+	+
Ескертпе: «+» анықталды; «-» анықталмады							

Осы зерттеудегі *Bacillus sp.* арасындағы биосурфактант пен биополимер гендерінің салыстырмалы экспрессиясы үш тәсілмен бағаланды:

- *B. subtilis* A9 және A12 штамдарындағы *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD* және *sacB* салыстырмалы экспрессиясын *B. subtilis* A8 қатысты салыстыру;

- әртүрлі температурада өсетін штамдардағы гендердің салыстырмалы экспрессиясының өзгеруін бағалау;

- NaCl әртүрлі концентрациясында өсетін штамдардағы салыстырмалы гендердің экспрессиясының өзгерістерін салыстыру.

Ең алдымен, *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, *sacB* гендерінің экспрессиясы тексерілген штамдар арасында анық ерекшеленетіні анықталды. 13-кестеде көрсетілгендей, *B. subtilis* A9 штамы барлық зерттелген гендер бойынша ең жоғары экспрессия деңгейін көрсетті. Атап айтқанда, *srfAA* және *srfAB* гендерінің экспрессия деңгейі $49\,773,5 \pm 1,7$ және $57\,606,7 \pm 0,9$ есе жоғары болды. Бұл көрсеткіштер *B. subtilis* A8 штамына қарағанда айтарлықтай жоғары болып, осы штамның биосурфактант синтезіне жауапты гендер белсенділігінің артуын көрсетеді. *srfAC* ($191,1 \pm 0,8$) және *srfAD* ($167,55 \pm 0,3$) гендері де жоғары экспрессия көрсетті, бұл *B. subtilis* A9 штамының синтетикалық белсенділігі артық екенін білдіреді. *sacB* генінің экспрессиясы $3,50 \pm 0,1$ есе жоғары болды, бұл биополимер синтезіне әсер етуі мүмкін.

Ал *B. subtilis* A12 штамы салыстырмалы түрде төмен экспрессия көрсетті. *srfAA* ($21,16 \pm 0,04$), *srfAB* ($37,63 \pm 0,07$), *srfAC* ($86,21 \pm 0,1$) және *srfAD* ($2,82 \pm 0,1$) экспрессиясы A9 штамымен салыстырғанда төмен болды. *sacB* генінің салыстырмалы экспрессиясы бар болғаны $0,03 \pm 0,1$ есе, бұл биополимер синтезінің айтарлықтай төмен екенін көрсетеді.

Кесте 13 - *B. subtilis* A8 штамына қатысты сыналған штамдардың салыстырмалы ген экспрессиясының өзгеруі (есе)

Штамм	Ген				
	<i>srfAA</i>	<i>srfAB</i>	<i>srfAC</i>	<i>srfAD</i>	<i>sacB</i>
<i>B. subtilis</i> A9	$49\,773,5 \pm 1,7$	$57\,606,7 \pm 0,9$	$191,1 \pm 0,8$	$167,55 \pm 0,3$	$3,50 \pm 0,1$
<i>B. subtilis</i> A12	$21,16 \pm 0,04$	$37,63 \pm 0,07$	$86,21 \pm 0,1$	$2,82 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,1$

Екіншіден, температуралық жағдайлардың *Bacillus sp.* штамдарындағы биосинтетикалық гендердің салыстырмалы экспрессиясына әсері Pfaffl әдісі арқылы 40 °C-пен салыстыра отырып бағаланды (кесте 14). Зерттеу *Bacillus sp.* штамдарындағы гендердің экспрессиясы температураға тәуелді екенін және әр ген үшін оңтайлы температуралық диапазонның ерекшеленетінін көрсетті.

srfAB генінің экспрессиясы A9 штамында 30 °C температурада $8,9 \pm 1,3$ есе артты, бұл осы ген үшін ең жоғары деңгей болып тіркелді. A8 және A12 штамдарында 20 °C температура кезінде тиісінше $2,6 \pm 0,4$ және $1,2 \pm 0,2$ есе

жоғарылады.

srfAC генінің салыстырмалы экспрессиясы A9 штамында 20 °C-та $5,6 \pm 0,8$ есе, ал 30 °C-та $3,2 \pm 0,5$ есе артқаны байқалды. A8 штамында 20 °C-тағы экспрессия деңгейі $2,1 \pm 0,3$ есе болды.

srfAA гені үшін A8 және A9 штамдарында 20–30 °C аралығында экспрессия деңгейінің ең жоғары мәндері тіркелді – сәйкесінше $4,7 \pm 0,7$ – $7,1 \pm 1,1$ және $5,9 \pm 0,9$ – $6,5 \pm 1,0$ есе.

sacB гені A12 штамында 30 °C-та $2,9 \pm 0,4$ есе артты, ал басқа штамдарда салыстырмалы түрде төмен деңгейде болды ($0,5$ – $0,7$ есе аралығында).

srfAD генінің экспрессиясы A9 штамында 30 °C температурада $3,1 \pm 0,5$ есе жоғарылады.

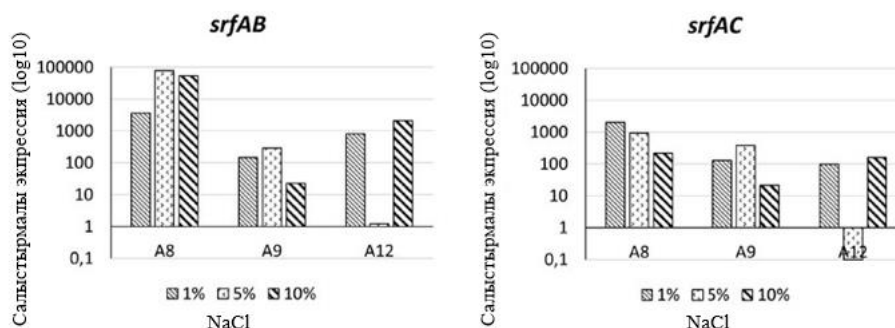
Кесте 14 - *Bacillus* sp. штамдарында температуралық жағдайларға байланысты гендердің салыстырмалы экспрессиясының Pfaffl әдісімен есептелген нәтижелері (есе)

Ген	Штамм	20°C	30°C	50°C
<i>srfAB</i>	A12	$1,2 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$
	A8	$2,6 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
	A9	$2,7 \pm 0,4$	$8,9 \pm 1,3$	$1,8 \pm 0,3$
<i>srfAC</i>	A12	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,1$
	A8	$2,1 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
	A9	$5,6 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,3$
<i>srfAA</i>	A12	$2,3 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
	A8	$4,7 \pm 0,7$	$7,1 \pm 1,1$	$0,6 \pm 0,1$
	A9	$5,9 \pm 0,9$	$6,5 \pm 1,0$	$2,0 \pm 0,3$
<i>sacB</i>	A12	$0,2 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,3$
	A8	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
	A9	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
<i>srfAD</i>	A12	$1,8 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
	A8	$0,2 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,9$	0
	A9	$1,9 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,2$

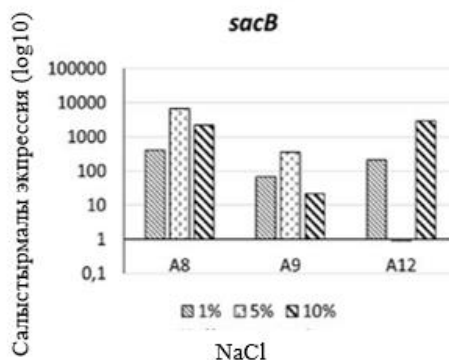
Үшіншіден, тұздылықты 1% -ға дейін арттыру *srfAB* экспрессиясының 3604 есеге дейін артуына әкелетіні анықталды, ал 5% тұздылық бұл геннің экспрессиясын тіпті $78218 \pm 1,7$ есе арттырады. Алайда жоғары тұздылық *srfAB* экспрессиясының одан әрі жоғарылауына әкелмейді. Тек A12 штамы 5% NaCl қосылған ортада *srfAC* азайған экспрессияны көрсетті. Сол сияқты, тек осы штамм *sacB* үшін 5% тұз концентрациясының төмендеуімен жауап берді, ал басқа штамдар $357,6 \pm 0,8$ - $6636,0 \pm 1,1$ есе жоғарылауды көрсетті (сурет 19, А). Ал *srfAA*, *srfAD* гендері бойынша, A8 штамы 10% NaCl ($11,77 \pm 0,1$) ортасында ең жоғары экспрессияны көрсетті, бұл оның жоғары тұз концентрациясына

бейімделу қабілетін көрсетеді. A12 штамында 10% NaCl ($9,76 \pm 0,1$) ортасында жоғары деңгейде экспрессияланғанымен, 5% NaCl жағдайында айтарлықтай төмендеу ($2,79 \pm 0,2$) байқалды. A9 штамы барлық жағдайларда төмен экспрессия көрсетті, әсіресе 10% NaCl ($1,79 \pm 0,3$) ортасында (сурет 19, Ә). A12 штамы *srfAD* генінің салыстырмалы жоғары экспрессиясын 10% NaCl ($5,71 \pm 0,3$) жағдайында көрсетті, бұл оның жоғары тұз концентрацияларына бейімделуін растайды. A9 штамының экспрессия деңгейі тұрақсыз болды, 1% NaCl ($4,12 \pm 0,1$) жағдайында жоғары экспрессияны көрсетіп, 10% NaCl ортасында $0,81 \pm 0,1$ есеге дейін төмендеді. A8 штамының экспрессиясы 1% NaCl ($0,74 \pm 0,1$) деңгейінде төмен болғанымен, 10% NaCl ($2,94 \pm 0,3$) деңгейінде артты (сурет 19, Ә).

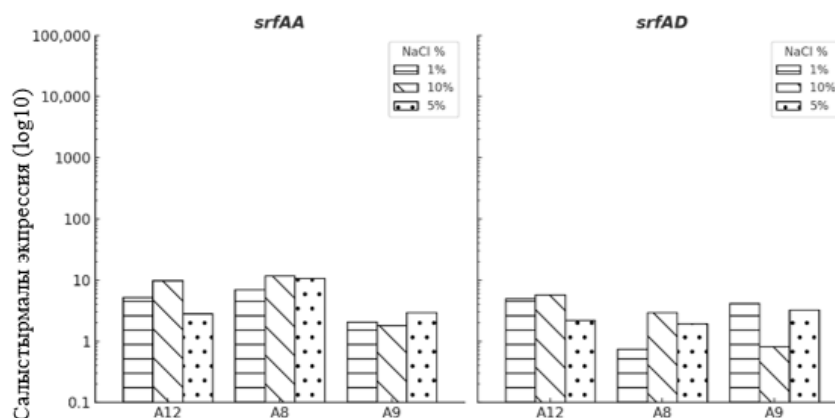
PW2 штамы мен *Bacillus sp.* референт штамы арасындағы салыстырмалы *sacB* және *IchAA* гендері бойынша ген экспрессиясы әртүрлі NaCl концентрацияларында және температуралық жағдайларда есептелді. *sacB* гені бойынша 10% NaCl жағдайында ең жоғары салыстырмалы экспрессия ($1,94 \pm 0,1$ есе) байқалды, бұл PW2 штамының жоғары тұз концентрациясына төзімділігін көрсетуі мүмкін. 1% және 5% NaCl жағдайында салыстырмалы экспрессия $1,62 \pm 0,1$ және $1,55 \pm 0,3$ аралығында болды, бұл тұз концентрациясының орташа деңгейлерінде PW2 штамының тұрақты жауап беретінін көрсетеді. 40°C жағдайында салыстырмалы экспрессия $1,59 \pm 0,1$ деңгейінде, яғни PW2 штамы жоғары температурада тұрақты экспрессия деңгейін сақтайды.



А)



Ә)



Б)

Сурет 19 - *B. subtilis* A8, A9 және A12 штамдарында 1%, 5% және 10% NaCl қосылған ортада биосурфактант және биополимер синтезіне жауапты гендердің салыстырмалы экспрессиясының бақылау жағдайымен салыстырғандағы өзгерісі

lchAA генінің 5% NaCl жағдайында ең жоғары салыстырмалы экспрессиясы ($2,1 \pm 0,1$ есе жоғары) байқалды, бұл орташа тұз концентрациясында геннің белсенділігі артатынын көрсетеді. 10% NaCl ортасында салыстырмалы экспрессия $1,37 \pm 0,1$ есе төмендеді, бұл тұз концентрациясының жоғарылауы *lchAA* белсенділігін төмендетуі мүмкін екенін білдіреді. 40°C жағдайында салыстырмалы экспрессия $1,51 \pm 0,1$ көрсетті. PW2 штамы барлық жағдайларда *Bacillus sp.* референт штамынан жоғары экспрессия көрсетеді, бұл оның экстремалды ортаға бейімделу қабілетін дәлелдейді.

Plaza et al. *B. subtilis* және *B. licheniformis* штамдарында *srfAA* генінің бар екенін анықтаған [189]. Сонымен қатар, Xu et al. *Bacillus* туысына жататын 47 штамға тұтас геномдық талдау жүргізіп, *srfAA*, *srfAB* және *srfAC* гендерінің *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* және *B. paralicheniformis* түрлерінде кездесетінін көрсетті [190]. Алайда, авторлар кейбір штамдарда *srfA* оперонының толық емес екенін, яғни кейбір гендердің жетіспейтінін атап өтті. Зерттеуде де осыған ұқсас нәтижелер алынды (кесте 12), бұл *srfA* оперонының гендердің қайталануы, жоғалуы, қайта құрылуы және көлденең тасымалдануы сияқты динамикалық эволюциялық процестерге бейім екенін көрсетеді.

Сурфактин тобының опероны төрт геннен (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC* және *srfAD*) тұрады, олар сурфактин синтетазасының суббірліктерін кодтайды [191]. *Bacillus* құрамындағы *sfp* гені фосфопантетейнилтрансферазаны кодтайды және *srfA* мультиферменттік кешенін белсендіреді. *sfp* генінің белсенділігі сурфактин биосинтезі үшін шешуші рөл атқарады, өйткені ол белсенді емес ақуызды функционалды сурфактин синтетазасына айналдырады [191].

Bacillus licheniformis штамдарында *lchAA* гені лихенизин биосинтезіне жауапты және лихенизинсинтетазасы (*lchA*) арқылы жүзеге асырылады. Бұл

фермент сурфактинге ұқсас құрылымға ие, бірақ беткі кернеуді төмендету қабілеті жоғары [192].

sacB гені *B. subtilis* хромосомасының бөлігі болып табылады және сахарозаның қатысуымен бөлінетін левансукраза экзоферментін кодтайды. Бұл фермент фруктозаның полисахариді леванның биосинтезіне қатысады [193]. Сондай-ақ, *B. licheniformis* штамында эндогенді *sacB* бар, оны сахароза бар ортада өсіргенде левансукразаны синтездейді [194].

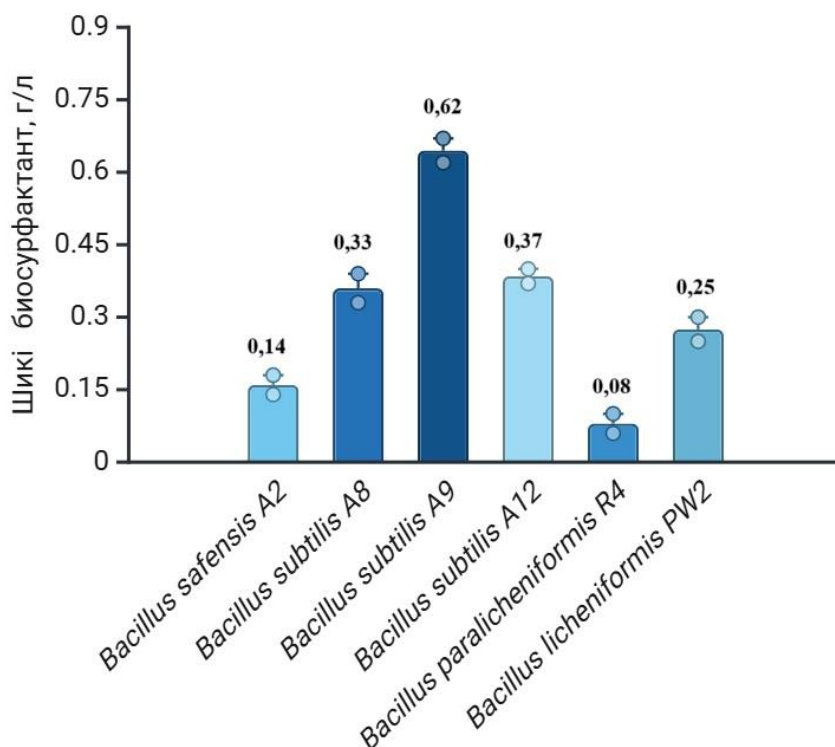
Осылайша, бұл зерттеу *Bacillus* штамдарында биосурфактант (сурфактин, лихенизин) және биополимер (леван) синтезіне жауапты гендердің таралуы мен экспрессиясын анықтады. *B. subtilis* A9 штамы *srfa* оперонының барлық гендерін жоғары деңгейде экспрессиялай отырып, сурфактин өндіруде жоғары белсенділік көрсетті. Ал *sacB* гені төрт штамда анықталып, леван синтезіне қабілеттілікті көрсетті. Жалпы, зерттеу *B. subtilis* A9 және *B. licheniformis* PW2 штамдарының биотехнологиялық әлеуеті жоғары екенін дәлелдейді.

3.6 Шикі биосурфактантты өндіру және олардың функциональдық топтарын анықтау

Bacillus туысына жататын бактериялар табиғи биосурфактант продуценттері болып табылады, және олардың әртүрлі штамдарының синтетикалық белсенділігін зерттеу үлкен биотехнологиялық маңызға ие. Осыған орай, зерттеу барысында *Bacillus* sp. әртүрлі штамдарын пайдалана отырып, көміртегі көзі ретінде шикі мұнай негізінде биосурфактанттар өндіру мүмкіндігі зерттелді (сурет 20). Kruskal-Wallis статистикалық талдауы жүргізіліп, зерттеудің кемінде үш қайталануы арасында салыстырмалы айырмашылық байқалды (Kruskal-Wallis статистикасы = 10,538, p-value = 0,051).

20-суретте көрсетілгендей, барлық *Bacillus* sp. штамдары биосурфактанттар синтездей алатындығын көрсетті [161]. Ең жоғары биосурфактант шығымы *B. subtilis* A9 штамында тіркеліп, $0,62 \pm 0,03$ г/л деңгейінде болды. Бұл көрсеткіш басқа штамдармен салыстырғанда айтарлықтай жоғары екенін көрсетеді. *B. subtilis* A12 және *B. subtilis* A8 штамдары тиісінше $0,37 \pm 0,02$ г/л және $0,33 \pm 0,04$ г/л биосурфактант өндіру қабілетін көрсетті, бұл олардың өндірістік әлеуетінің салыстырмалы түрде жоғары екенін көрсетеді. *B. licheniformis* PW2 штамы $0,25 \pm 0,03$ г/л деңгейінде биосурфактант синтездеді, бұл штамдармен салыстырғанда орташа деңгейде өнімділік көрсетті. *B. safensis* A2 штамы $0,14 \pm 0,02$ г/л биосурфактант өндіріп, салыстырмалы түрде төмен нәтиже көрсетті.

Зерттеудің келесі кезеңінде штамдардың синтездеген шикі биосурфактанттарының химиялық құрамын анықтау үшін ИҚ-Фурье спектроскопиясы қолданылды. Алынған спектрлер нәтижесінде алты штамға тән биосурфактанттарда пептидтік және алифаттық компоненттердің бар екені анықталды (сурет 21) [161].

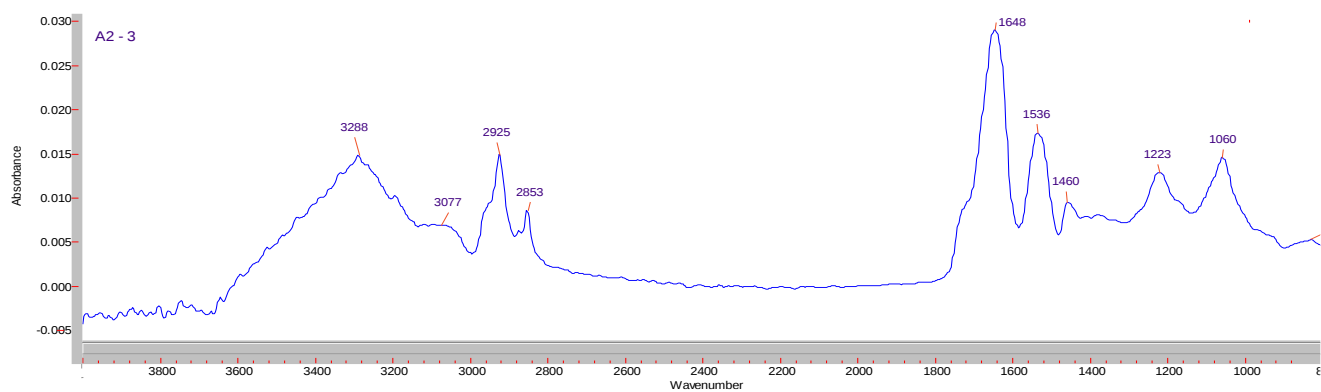


Сурет 20 - *Bacillus sp.* штамдарынан шикі биосурфактанттарды өндіру, г/л

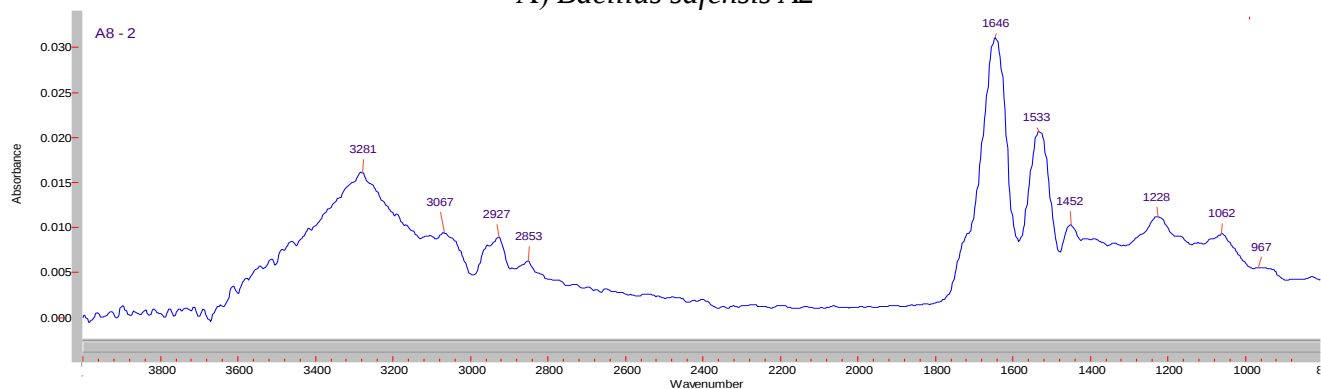
Зерттелген *Bacillus sp.* штамдардың өндірген биосурфактанттарының ИҚ спектрлерінде 3288 см^{-1} , 3281 см^{-1} , 3286 см^{-1} , 3304 см^{-1} , 3303 см^{-1} және 3280 см^{-1} аралығында сіңіру жолақтары байқалды, бұл спектрлер N–H байланысының болуын дәлелдейді. Сонымен қатар, A2 штаммы үшін - 1648 см^{-1} және 1536 см^{-1} , A8 штаммы үшін - 1646 см^{-1} және 1533 см^{-1} , A9 штаммы үшін - 1648 см^{-1} және 1536 см^{-1} , A12 штаммы үшін - 1647 см^{-1} және 1538 см^{-1} , ал PW2 штаммы үшін - 1638 см^{-1} және 1536 см^{-1} диапазондарындағы жолақтар C=O–N (амидтік) байланыстарының болуын растайды.

Сонымен қатар, $2927\text{--}2853\text{ см}^{-1}$ және $1452\text{--}1228\text{ см}^{-1}$ диапазондарындағы жолақтар -CH, CH₂ және CH₃ топтарының созылу тербелістеріне сәйкес келеді, бұл A8 штамының алифаттық тізбектерінің болуын көрсетеді. Ұқсас сипаттамалар *Bacillus sp.* басқа штамдары үшін де анықталды. 1730 см^{-1} аймағында байқалған абсорбция шыңы күрделі эфир (C=O) карбонил топтарының болуын дәлелдейді.

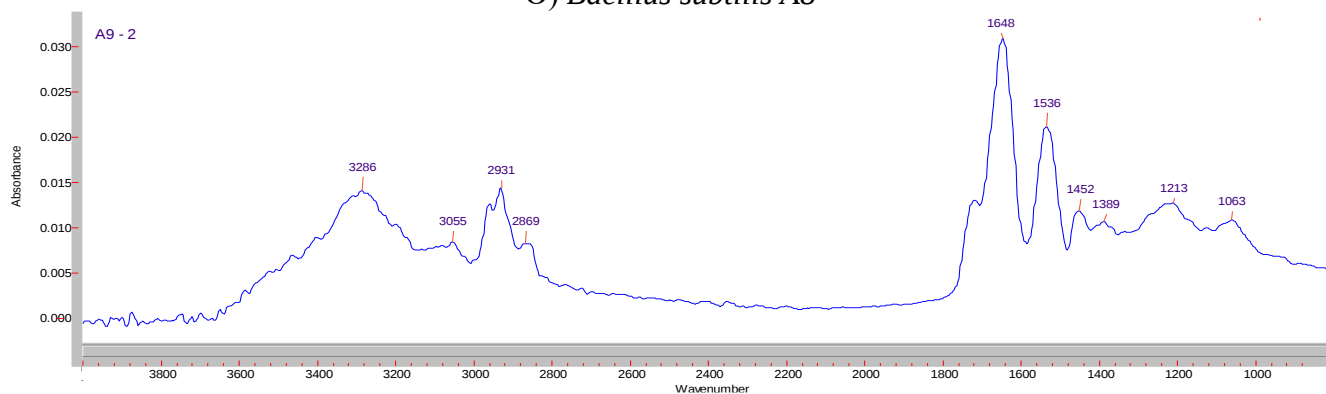
Алынған нәтижелер барлық зерттелген *Bacillus sp.* штамдарының биосурфактанттарында пептидтік және алифатикалық компоненттердің бар екенін көрсетті.



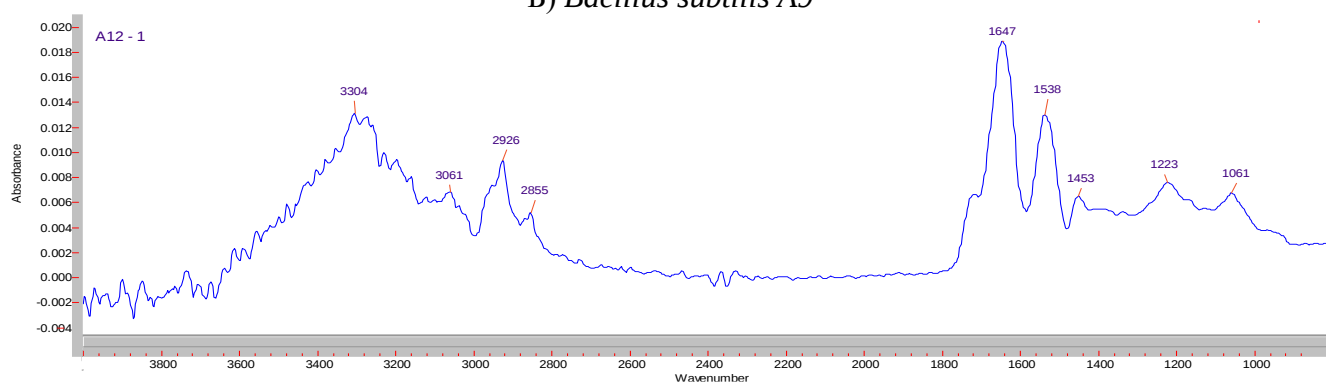
A) *Bacillus safensis* A2



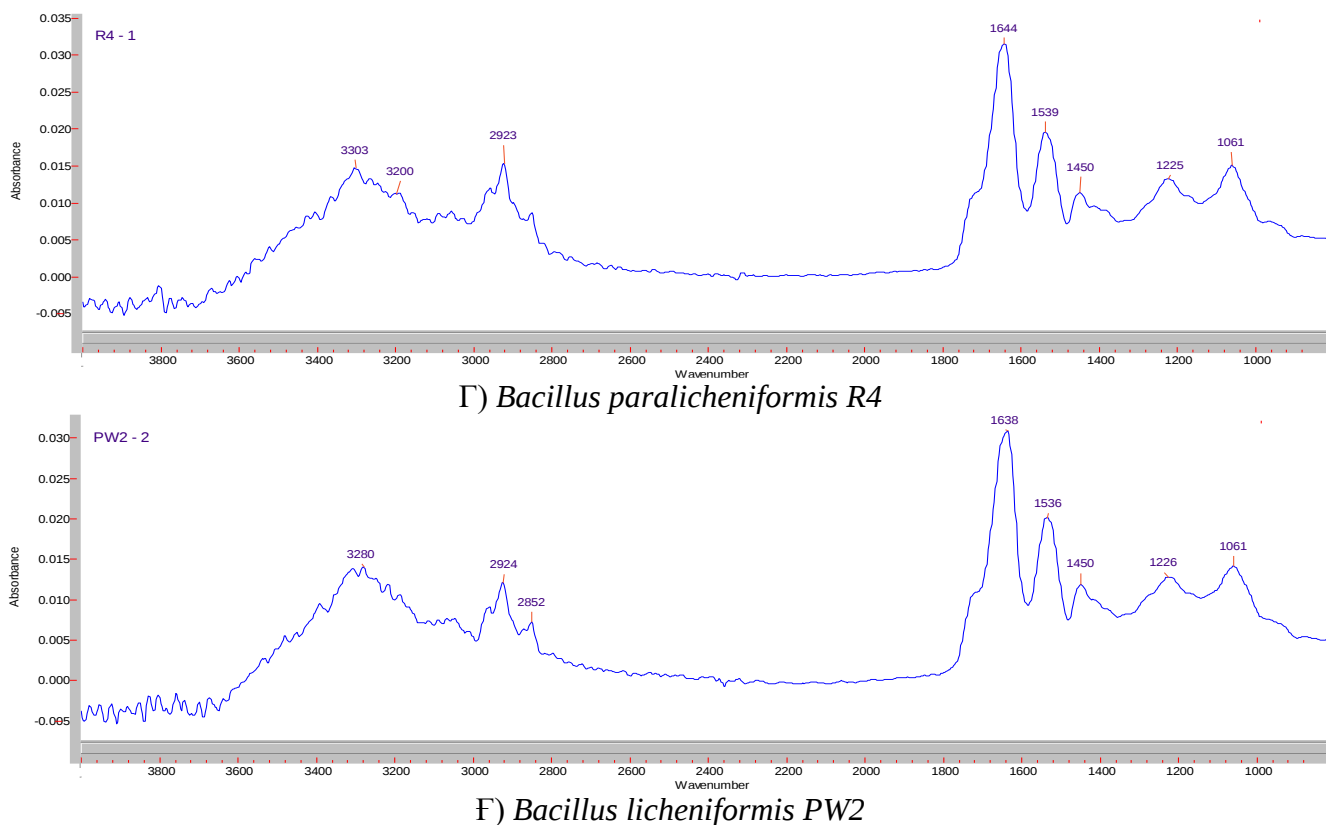
Θ) *Bacillus subtilis* A8



Β) *Bacillus subtilis* A9



B) *Bacillus subtilis* A12



Сурет 21 - *Bacillus* sp. штамдары өндіретін биосурфактанттардың ИҚ спектрлері

Шикі мұнай биосурфактант өндіру үшін көміртегі көзі ретінде пайдаланылуы мүмкін, және зерттеулер бұл мақсатта әртүрлі бактерия штамдардың әлеуетін анықтады. Purwasena және т.б. зерттеуіне сәйкес, *Bacillus licheniformis* DS1 штамы көміртегі көзі ретінде шикі мұнайды пайдаланып, 0,4 г/л биосурфактант шығымдылығын көрсеткен [121]. Сол сияқты, Das және Mukherjee зерттеуінде *Bacillus subtilis* DM-04 штамы шикі мұнай негізінде 0,65 г/л биосурфактант өндірген [195].

Жүргізілген ИҚ-Фурье спектофотометрлі талдау нәтижелері бұрын De Faria және т.б. зерттеуінде сипатталған деректермен сәйкес келді [196]. *B. subtilis* LSFM-05 штамының биосурфактант спектрінде пептидтік компоненттердің бар екенін дәлелдейтін жолақтар анықталды. 1650 cm^{-1} жолағы C=O–N байланысының созылуын, ал 1540 cm^{-1} жолағы C–N байланысының созылуы мен N–H байланысының деформациясын көрсетеді, бұл пептидтердің болуын дәлелдейді. Алифаттық тізбектердің бар екендігі 2970–2850 cm^{-1} және 1450–1380 cm^{-1} диапазонындағы C–H созылу тербелістері арқылы расталды. Сонымен қатар, 1730 cm^{-1} жолағы күрделі эфирлердің карбонил (C=O) топтарының болуын көрсетті.

Joshi et al. зерттеуінде *B. subtilis* 20B штамының биосурфактант спектрінде пептидтердің бар екенін растайтын сипаттамалық жолақтар анықталды. 3305 cm^{-1} жолағы N–H байланысының, ал 1643 cm^{-1} жолағы C=O–N байланысының созылуын көрсетті. 2956–2924 cm^{-1} , 2869 cm^{-1} , 1463 cm^{-1} және 1377 cm^{-1}

диапазондарындағы жолақтар алифаттық тізбектердің (CH_3 , CH_2) болуын дәлелдеді. 1734 см^{-1} аймағында байқалған сіңіру жолағы карбонил ($\text{C}=\text{O}$) топтарының бар екенін көрсетті [197].

Бұл нәтижелер зерттелген *Bacillus* sp. штамдарынан алынған биосурфактанттардың липопептидтік табиғатын және олардың биотехнологиялық маңыздылығын растайды.

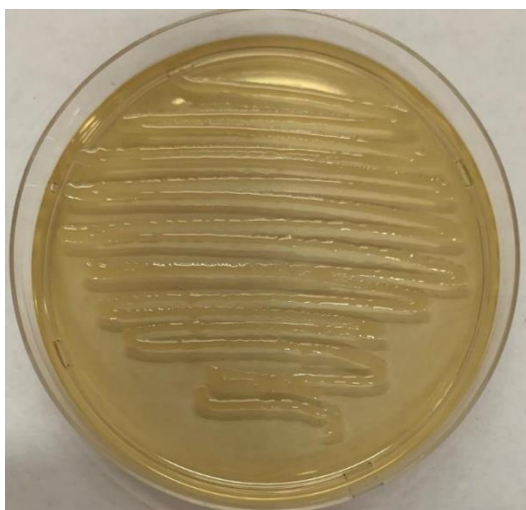
3.7 Шикі леван өндіру және олардың функциональдық топтарын анықтау

Леван — фруктозадан түзілетін экзополисахарид. Оны синтездеуге жауапты негізгі фермент — левансукраза, ол *sacB* генімен кодталады және кейбір *Bacillus* туысты бактерияларда табиғи түрде кездеседі [198, 199].

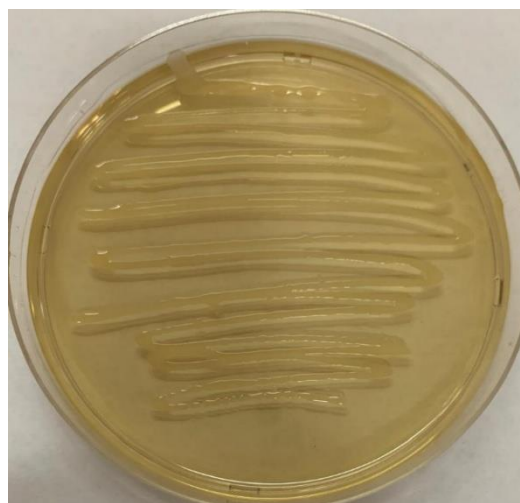
Осы зерттеу жұмысында төрт штамм — *B. subtilis* A8, A9, A12 және *B. licheniformis* PW2 — *sacB* генінің болуына байланысты леван синтездей алатын қабілетке ие деп танылып, әрі қарай шикі леван өндіру және оның функциональдық топтарын анықтау бағытында зерттелді.

Ең алдымен, *Bacillus* sp. штамдары леван өндіру қабілеті бойынша сапалық скрининг жүргізілді. 24 сағаттық бактерия штамдары қоректік ортаға штрих әдісімен егілді. Егілген Петри табақшалары 40°C температурада 48 сағат инкубацияланды. Инкубация нәтижесінде леван синтездейтін бактерияларға тән шырышты (мукоидты) колониялар қалыптасты (сурет 22). 22-суретте көрсетілгендей, *B. licheniformis* PW2 штаммы салыстырмалы айқын мукоидты колония түзілуін көрсетті. Ал қалған штамдарда шырышты колониялар салыстырмалы әлсіз байқалып, ұқсас нәтижелер көрсетті.

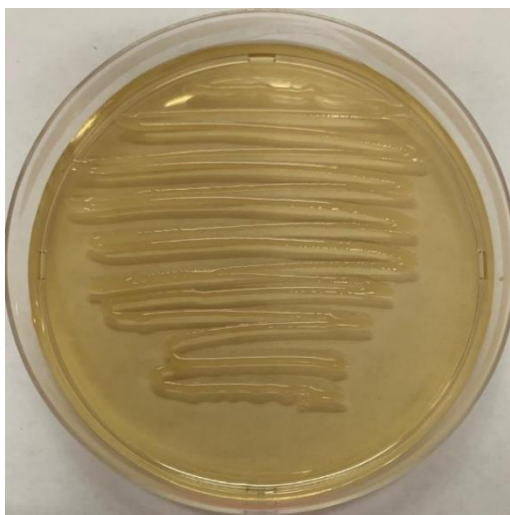
Леван биополимерінің синтезі үшін сахароза, соя ұны, MgSO_4 , KH_2PO_4 және стерильденген CaCO_3 қосылған арнайы қоректік орта қолданылды. Ортаға 10% көлемінде 24 сағаттық бактерия штамдары қосылып, 40°C температурада 5 тәулік бойы араластырыла дақылдандырылды. Леван экстракциясы зерттеу әдісіне сай жүргізіліп, құрғақ массасы өлшенді (сурет 23).



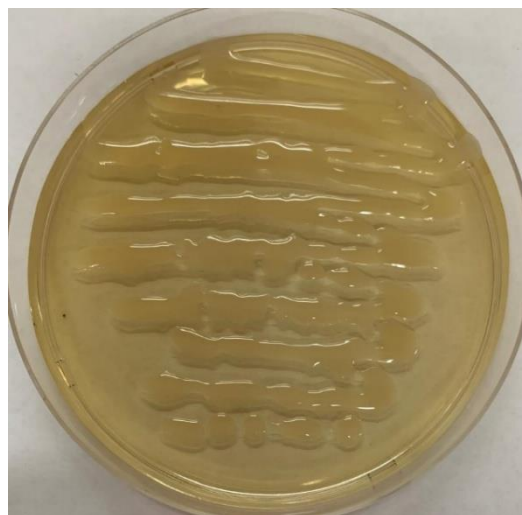
B. subtilis A8



B. subtilis A9



B. subtilis A12



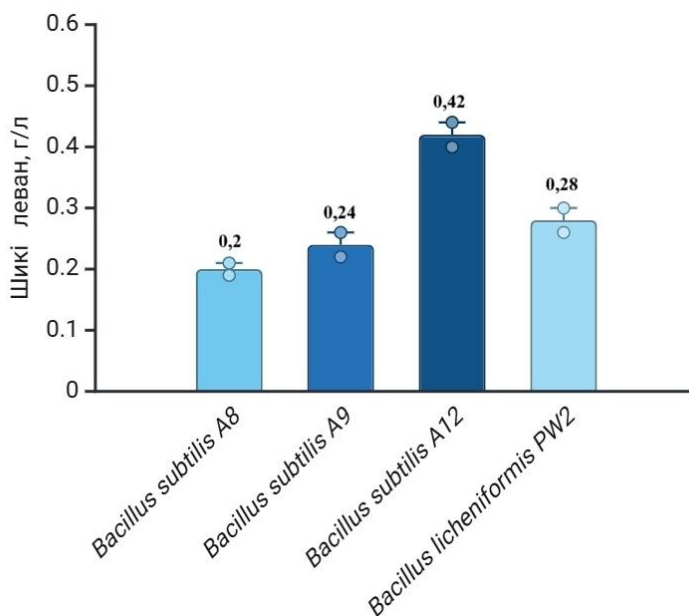
B. licheniformis PW2

Сурет 22 - *Bacillus* sp. штамдарының шырышты колониялар түзуі

Алынған нәтижелерге сәйкес, ең жоғары шикі леван шығымы *Bacillus subtilis* A12 штамында тіркеліп, $0,42 \pm 0,02$ г/л деңгейінде болды. Бұл көрсеткіш басқа штамдарға қарағанда айтарлықтай жоғары.

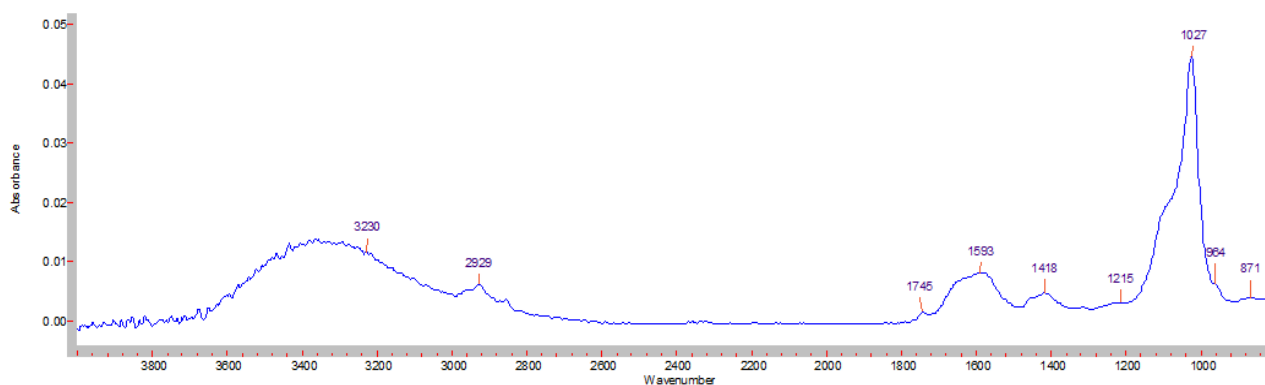
Bacillus licheniformis PW2 штамы $0,28 \pm 0,02$ г/л леван синтездеу қабілетін көрсетті, бұл *B. subtilis* A8 ($0,2 \pm 0,01$ г/л) және *B. subtilis* A9 ($0,24 \pm 0,02$ г/л) штамдарына қарағанда біршама жоғары. Ең төменгі көрсеткіш *B. subtilis* A8 штамында байқалды.

Алынған нәтижелердің статистикалық маңыздылығын бағалау үшін Kruskal-Wallis статистикалық анализі жүргізілді. Талдау нәтижелері кемінде үш қайталым арасында айтарлықтай айырмашылық байқалмағанын көрсетті (Kruskal-Wallis статистикасы = 6,452, p-value = 0,046).

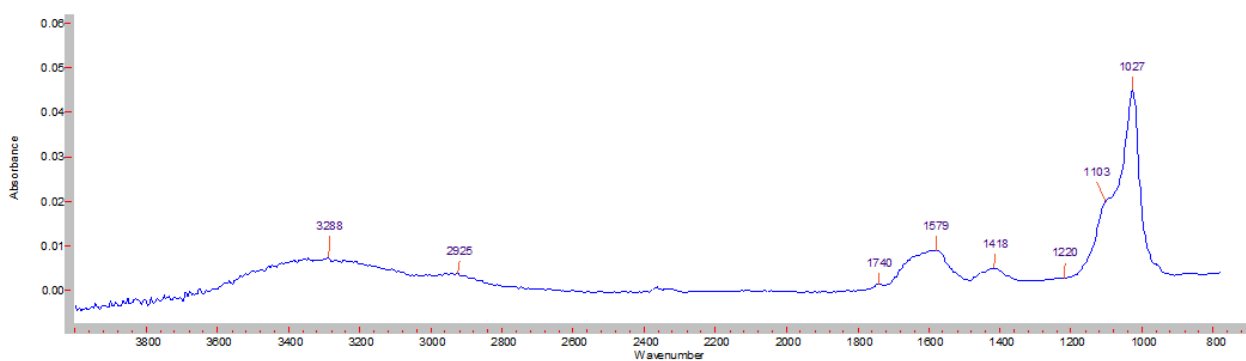


Сурет 23 - *Bacillus* sp. штамдарының шикі леван құрғақ массасы, г/л

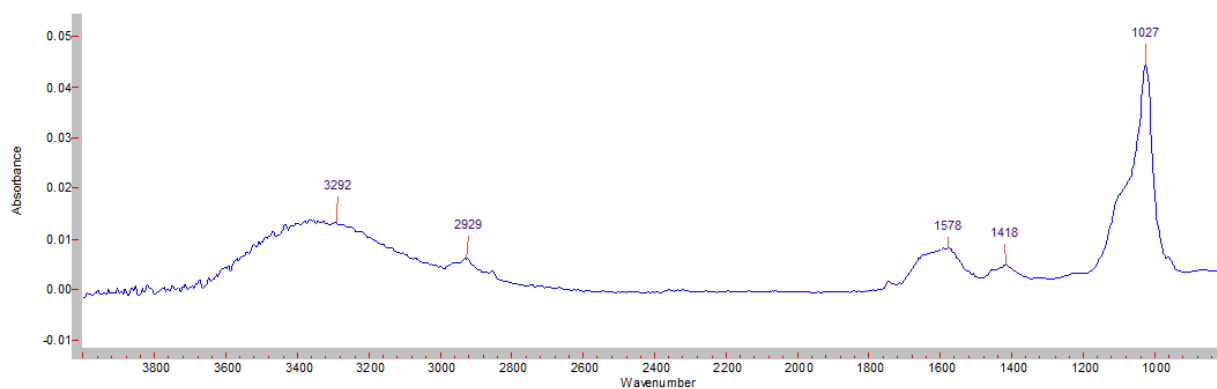
Зерттеуде *Bacillus* sp. штамдары синтездейтін леванның химиялық құрылымын анықтау үшін ИҚ-Фурье спектофометрі әдісі қолданылды. Алынған спектрлік мәліметтер леванның негізгі функционалдық топтарын сипаттауға мүмкіндік берді (сурет 24).



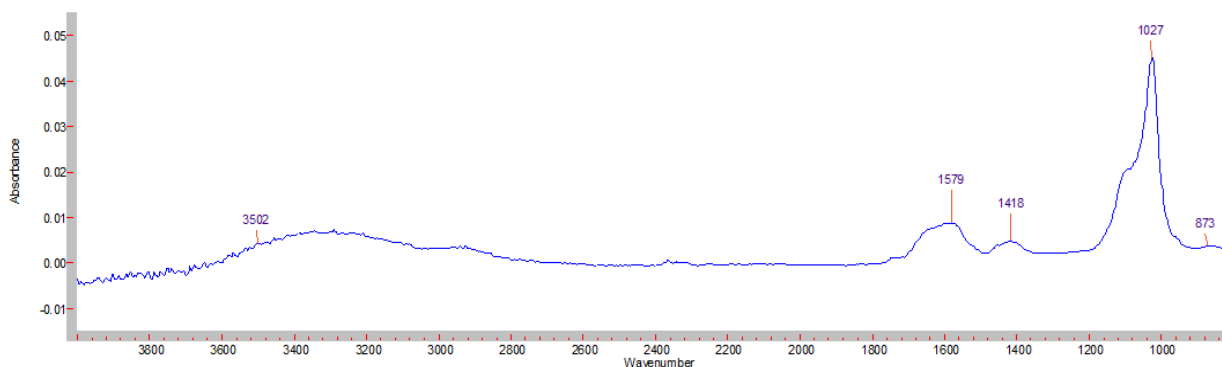
A) *Bacillus licheniformis* PW2



Ә) *B. subtilis* A12



Б) *B. subtilis* A9



В) *B. subtilis* A8

Сурет 24 - *Bacillus* sp. штамдары өндіретін леванның ИҚ спектрлері

B. licheniformis PW2 штамның ИҚ спектрінде: 3300–3400 см⁻¹ аймағында гидроксил (-ОН) топтарының кең сіңіру жолағы байқалды, бұл полисахаридтерге тән. 1600–1700 см⁻¹ диапазонында карбонил (C=O) топтарының сіңіру жолағы тіркелді, бұл ацетилденген немесе күрделі эфирлі құрылымның болуын білдіруі мүмкін. 1000–1200 см⁻¹ аралығында C-O-C байланыстарының сіңіру жолағы байқалды, бұл гликозидтік байланыстарға сәйкес келеді (сурет 24, А).

B. subtilis A12 штамның ИҚ спектрі 3300 см⁻¹ аймағында гидроксил (-ОН) топтарының кең сіңіру жолағы тіркелді, бұл оның жоғары гидрофильді қасиетін көрсетеді. 1640–1650 см⁻¹ диапазонында C=O топтарының сіңіру жолағы байқалды, бұл амид немесе күрделі эфир топтарының бар екенін дәлелдейді. 900–1150 см⁻¹ аралығында C-O-C байланыстары тіркелді, бұл гликозидтік құрылымның бар екенін көрсетеді (сурет 24, Ә).

B. subtilis A9 штамның ИҚ спектрі 3350 см⁻¹ аймағында гидроксил (-ОН) топтарының айқын сіңіру жолағы байқалды, бұл полисахарид құрылымына тән. 1650 см⁻¹ аймағында карбонил (C=O) топтарының сіңіру жолағы анықталды, бұл полисахаридтік немесе ацетилденген құрылымның болуын көрсетеді. 1150 см⁻¹ маңында C-O-C байланыстарының сіңіру жолағы тіркелді, бұл гликозидтік құрылымға сәйкес келеді (сурет 24, Б).

B. subtilis A8 штамның ИҚ спектрі 3400 см⁻¹ аймағында гидроксил (-ОН) топтарының кең сіңіру жолағы байқалды, бұл полисахаридті құрылымның негізгі белгісі. 1650 см⁻¹ аймағында C=O топтарының сіңіру жолағы анықталды, бұл ацетил немесе карбонил топтарының болуын білдіреді. 900–1200 см⁻¹ диапазонында C-O-C байланыстарының айқын сіңіру жолағы тіркелді, бұл гликозидтік құрылымға тән белгі (сурет 24, В).

Барлық *Bacillus* sp. штамдары синтездейтін леван құрылымында гидроксил (-ОН) топтары, карбонил (C=O) топтары, гликозидтік C-O-C байланыстары тіркелді. Бұл мәліметтер леванның көмірсулар негізіндегі полисахаридті құрылымын, сондай-ақ оның гидрофильді қасиеттерін дәлелдейді. Сонымен қатар, кейбір штамдарда ацетилденген немесе күрделі эфирлі құрылымдар

байқалды, бұл олардың биофункционалдық ерекшеліктерін көрсетуі мүмкін.

Әдебиет көздеріне сүйене отырып, *Bacillus subtilis* MZ292983.1 және *Bacillus licheniformis* штамдарынан алынған инфрақызыл (ИҚ) спектр мәліметтері арасында ұқсастық байқалды [169, 200]. *B. subtilis* MZ292983.1 штамының 3417 см^{-1} , ал *B. licheniformis* штамының 3316.55 см^{-1} аймағында тіркелген жолақтар гидроксил (-ОН) топтарының кең сіңіруін көрсетіп, бұл олардың полисахаридтік құрылымын дәлелдейді. Бұрын зерттелген *B. subtilis* A8, A9, A12 және *B. licheniformis* PW2 штамдарының спектрлерінде де $3300\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ аралығында ұқсас гидроксил сіңіру жолақтары тіркелген, бұл олардың жоғары гидрофильді қасиетке ие полисахаридтер екенін растайды. *B. subtilis* MZ292983.1 штамының спектрінде 1639 см^{-1} аймағында карбонил (C=O) байланысының сіңіру жолағы анықталды, ал *B. licheniformis* штамында $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ диапазонында осыған ұқсас C=O топтары тіркелді. Алдыңғы зерттелген *B. subtilis* A8, A9, A12 және *B. licheniformis* PW2 спектрлерінде $1640\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ диапазонында тіркелген сіңіру жолақтары ацетил немесе күрделі эфир топтарының болуын көрсетеді. Сонымен қатар, *B. subtilis* MZ292983.1 спектрінде $1126\text{--}900\text{ см}^{-1}$ аралығындағы жолақтар гликозидтік C-O-C байланыстарының бар екенін көрсетті.

Осылайша, жүргізілген зерттеу нәтижелері *Bacillus sp.* штамдарының леван өндіру қабілеті мен оның химиялық құрылымының жоғары ұқсастықта екенін көрсетті. *Bacillus subtilis* A12 штамының леван өндіру қабілеті жоғары екенін көрсетті. ИҚ-Фурье спектрлік мәліметтер барлық штамдарда гидроксил, карбонил және гликозидтік C-O-C байланыстарының бар екенін дәлелдеп, олардың көмірсулар негізіндегі полисахаридті табиғатын растады. Алынған нәтижелер әдеби дереккөздермен үйлесіп, леванның құрылымдық тұрақтылығын және штаммаралық ұқсастығын көрсетті. Бұл мәліметтер *Bacillus* туысты бактериялардан алынған леванның биотехнологиялық әлеуеті жоғары екенін дәлелдейді.

3.8 Биосурфактанттың жоғары өнімділігін қамтамасыз ететін оңтайлы коректік органы таңдау

Өнеркәсіп қалдықтары ретінде алынатын меласса, сахароза және сүт сарысуы биосурфактант өндірісінде көміртегі көзі ретінде әлеуетті субстраттар болып табылады. Түрлі зерттеулер мелассаның көміртек көзі ретінде биосурфактант синтезін тиімді арттыратынын көрсетті, бұл агроөнеркәсіптік қалдықтарды қайта өңдеу мүмкіндігін кеңейтеді [197]. Сонымен қатар, құрамында көмірсулар, ақуыздар, минералдар және басқа да органикалық қосылыстардың жоғары концентрациясы бар сүт сарысуының да биосурфактант өндіруге әлеуеті бар [201].

Зерттеулер көрсеткендей, меласса биосурфактанттардың өнімділігін едәуір арттыра алады. Маккар және Cameotra зерттеулерінде *Bacillus* бактерияларының екі штамы термофильді жағдайларда биосурфактант өндіру үшін мелассаны субстрат ретінде пайдаланған, нәтижесінде тиімді өнім алынған [202]. Nitschke

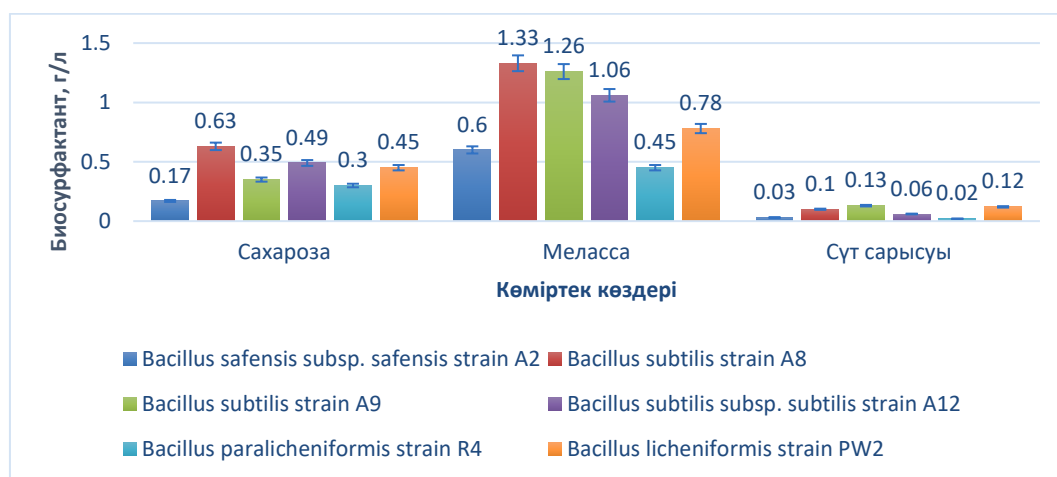
және т.б. агроөнеркәсіптік қалдықтар ретінде меласса мен сүт сарысуын қолданудың тиімділігін зерттеп, оң нәтижелерге қол жеткізген [203].

Жүргізілген зерттеу барысында *Bacillus* sp. штамдарының әртүрлі көміртегі көздеріндегі биосурфактант өндіру деңгейі бағаланды (сурет 25). Алынған мәліметтер бойынша (сурет 25).

- Меласса ең тиімді көміртек көзі ретінде анықталды, әсіресе *B. subtilis* A8 (1,33 г/л), *B. subtilis* A9 (1,26 г/л) және *B. subtilis* A12 (1,06 г/л) штамдарында биосурфактант синтезін ең жоғары деңгейге жеткізген.

- Сахароза орташа өнімділік көрсетті, бұл көміртегі көзі ретінде оның мелассаға қарағанда төмен тиімділігін көрсетеді. Мысалы, *B. subtilis* A8 (0,63 г/л) және *B. subtilis* A12 (0,49 г/л) штамдары мелассамен салыстырғанда төмен деңгейде биосурфактант синтездеді.

- Сүт сарысуы ең төменгі өнімділік көрсетті, барлық штамдарда биосурфактант мөлшері 0,13 г/л-ден аспады. Бұл оның құрамындағы көміртегі мөлшерінің салыстырмалы түрде төмен болуы немесе микроорганизмдер үшін қолжетімділігі шектеулі болуы мүмкін екенін көрсетеді.



Сурет 25 - *Bacillus* sp. штамдарының әртүрлі көміртегі көздерімен өсірілген биосурфактант шығымы

Joshi және т.б. зерттеуінде *Bacillus licheniformis* K51, *Bacillus subtilis* 20B және *B. subtilis* R1 штамдары 45 °C температурада мелассаны жалғыз қоректік зат көзі ретінде қолданып, жоғары биосурфактант синтездеу қабілетін көрсетті. Сонымен қатар, мелассаның 5–7% (салм/көлем) концентрациясында ең жоғары өнімділікке қол жеткізілетіні анықталды [197]. Saimmai және т.б. зерттеулері де *Bacillus* штамдарын қолдана отырып мелассаның биосурфактант өндірісіндегі тиімді субстрат екенін растады [204]. Al-Bahri және т.б. *B. subtilis* B20 штамы арқылы құрма мелассасын көміртек көзі ретінде қолдану арқылы мұнайдың берілуін жақсартудағы тиімділігін зерттеді және құрма мелассасы биосурфактант өндірісіне қолайлы екенін анықтады [205]. Al-Wahaibi және т.б. мұнай алу тиімділігін арттыру үшін *B. subtilis* B30 штамның биосурфактант

өндірісіне мелассаның оң әсерін дәлелдеді [206]. Verma және т.б. қант қамысы мелассасын *B. subtilis* RSL-2 штамы көмегімен жоғары өнімді биосурфактант синтездеу үшін пайдалануға болатынын көрсетті [207].

Сонымен, жүргізілген зерттеу нәтижелері мелассаның биосурфактант өндірісі үшін ең тиімді көміртек көзі екенін көрсетті. *B. subtilis* A8, A9, және A12 штамдары мелассаны көміртегі көзі ретінде пайдаланғанда ең жоғары өнімділікке жетті, бұл оны өнеркәсіптік қолдану үшін әлеуетті субстрат ретінде қарастыруға мүмкіндік береді. Сүт сарысуы көміртек көзі ретінде де қолданылуы мүмкін, бірақ оның биосурфактант өндірісіндегі тиімділігі мелассаға қарағанда төмен.

3.9 Белсенді штамм микроорганизмдері негізінде МША үлгісін лабораториялық жағдайда жүргізу

Микроорганизмдер көмегімен мұнай шығымын арттыру (МША) технологиясын зерттеу мақсатында лабораториялық жағдайда модельдік тәжірибелер жүргізілді. Алдымен биосурфактант пен биополимер синтездеу қабілеті жоғары белсенді штамдарды іріктеу жүзеге асырылды. Бұл үшін *Bacillus* туысына жататын микроорганизмдер келесі биотехнологиялық көрсеткіштер негізінде бағаланды:

- Эмульгирлеу индексі $\geq 60\%$;
- Мұнай ығыстыру қабілеті $\geq 2,6$ см;
- Беттік керілу мәні ≤ 40 мН/м;
- Шикі биосурфактант мөлшері ≥ 1 г/л;
- *srfA* және *sacB* гендерінің болуы, яғни биосурфактант пен биополимер кодтаушы гендердің бір мезгілде анықталуы.

Осы критерийлер негізінде *Bacillus subtilis* түріне жататын үш штамм – A8, A9 және A12 – ең жоғары белсенділік көрсетіп, әрі биосурфактант пен биополимер синтезіне жауапты гендердің болуымен ерекшеленді. Аталған штамдардан келесі микробтық ассоциациялар құрылды:

- *Bacillus subtilis* A8;
- *Bacillus subtilis* A9;
- *Bacillus subtilis* A12;
- *Bacillus subtilis* A8 : *Bacillus subtilis* A9;
- *Bacillus subtilis* A8 : *Bacillus subtilis* A12;
- *Bacillus subtilis* A9 : *Bacillus subtilis* A12;
- *Bacillus subtilis* A8 : *Bacillus subtilis* A9 : *Bacillus subtilis* A12.

Бұл ассоциациялар келесі кезеңде модельдік жүйеде (құм бағаналарда) мұнайды ығыстыру тиімділігін зерттеу үшін қолданылды.

Құм бағаналары зарарсыздандырылған кварц құмы мен кен орны жынысөзегінің қоспасымен толтырылып, сұйықтықтың тұрақты ағымын қамтамасыз ететін кіріс және шығыс жүйелерімен жабдықталды (сурет 26). Құрастырылған құм бағаналарының стерильді пласт суын пайдалана отырып

кеуектілік көлемі (PV) анықталды, бағаналар мұнаймен қанықтырылғаннан кейін микроорганизмдердің әсері бағаланды.

Микроорганизмдер $OD_{600} = 0,2$ оптикалық тығыздық мәніне дейін өсіріліп, бағаналарға енгізілді. Микробтық метаболизмнің тиімділігін арттыру мақсатында колонналар 40 °C температурада 14 тәулік бойы инкубацияланды. Зерттеу барысында *Bacillus subtilis* A8 және A9 штамдары мелассаны көміртегі көзі ретінде пайдалана отырып биосурфактант өндірушілер ретінде, ал *B. subtilis* A12 штамы сахароза мен соя ұны қосылған қоректік ортада биополимер өндіруші ретінде қолданылды.



Сурет 26 – Мұнаймен қаныққан құм бағанасының үлгісі

Зерттеуде жеке штамдармен мен олардың ассоциациялары құм бағаналарына енгізілді. Бұл комбинациялар әртүрлі метаболиттік өнімдердің (биосурфактанттар мен биополимерлердің) бірігуі арқылы мұнайды тиімді ығыстыру әсерін арттыру мақсатында таңдалды. Ассоциация құрамындағы штамдар бір-бірінің функционалдық қасиеттерін толықтыра отырып, синергиялық әсер көрсетуі мүмкін.

Құм бағаналарда әртүрлі нұсқалардан қосымша мұнай шығару коэффициенті зерттелді. Микробиологиялық өңдеуден кейін мұнайдың қосымша алынған көлемі есептеліп, *B. subtilis* штамдары мен олардың ассоциацияларының мұнай шығару әлеуеті бағаланды. Бұл модельдік жүйе микроорганизмдердің метаболиттік белсенділігінің мұнайды ығыстыру процесіне ықпалын сенімді бағалауға мүмкіндік берді.

15-кестеде *B. subtilis* штамдары мен олардың ассоциацияларын пайдалана отырып жүргізілген модельдік ММША тәжірибелерінің нәтижелері ұсынылған. Аталған тәжірибелер барысында келесі негізгі параметрлер анықталды: кеуектілік көлемі (PV), пластағы бастапқы мұнай көлемі (OOIP), бастапқы мұнай қанықтылығы (S_{oi}), сумен жуғаннан кейінгі қалған мұнай көлемі ($OOIP - S_{orwf}$), қалдық мұнай қанықтылығы (S_{or}), микробтық өңдеуден кейін алынған

мұнай көлемі (Sormf) және қосымша мұнай шығару коэффициенті (AOR). Бұл көрсеткіштер микробтық ассоциациялардың мұнай ығыстыру тиімділігін сандық тұрғыдан салыстыруға және бағалауға негіз болды.

Кесте 15 - *Bacillus subtilis* штамдары мен ассоциацияларын пайдалана отырып жүргізілген ММША тәжірибелерінің нәтижелері

Ассоциация нұсқалары Параметрлер	Бақылау	A8	A9	A12	A8 : A9	A8 : A12	A9 : A12	A8 : A9 : A12
Кеуек көлемі (PV, мл)	120±2,8	120±1,4	125±0,01	130±2,8	125±7,1	135±7,1	128±1,4	130±0,1
Пласттағы бастапқы мұнай көлемі (OOIP, мл)	82±2,8	80±1,4	87±4,2	83±4,2	89±1,4	85±7,1	85±0,2	80±2,8
Бастапқы мұнай қанықтылығы (Soi, %)	68,3±4,0	66,6±0,4	69,6±3,4	63,8±1,9	71,2±5,2	62,9±8,5	66,4±0,7	61,5±2,2
Сүмен жуғаннан кейінгі мұнай көлемі (OOIP– Sorwf, мл)	40±1,4	42±2,8	43±1,4	44±1,4	45±0,1	39±0,7	41±1,4	46±2,8
Қалдық мұнай қанықтылығы (Sor, %)	48,7±0,9	52,2±2,6	49,4±4,0	53±1,0	50,5±0,8	45,8±4,8	48,2±1,7	57,5±1,5
Микробтық өңдеуден кейін алынған мұнай көлемі (Sormf, мл))	1,6±0,4	8±2,8	10±1,4	6±2,8	11±1,4	9±2,8	8,5±0,7	10±2,8
Қосымша мұнай шығару коэффициенті (AOR, %)	4±0,4	19±7,0	23,2±2,5	13,6±6,0	24,4±3,1	23±6,6	20,7±2,4	21,7±4,8

Нәтижелер барлық өңделген нұсқалардың бақылау тобымен салыстырғанда мұнайды қосымша шығару коэффициентінің жоғары екенін көрсетті. Ең жоғары қосымша мұнай шығару коэффициенті *B. subtilis* A9 штамында $23,2 \pm 2,5\%$, ал *B. subtilis* A8 : *B. subtilis* A9 ассоциациясында $24,4 \pm 3,1\%$ және *B. subtilis* A8 : *B. subtilis* A12 ассоциациясында $23 \pm 6,6\%$ болды (кесте 15). Бұл штамдар биосурфактант пен биополимердің тиімді үйлесімі арқылы мұнайдың пласттан ығысуына әсер еткенін көрсетеді. *B. subtilis* A12 штамы жеке қолданылғанда AOR - $13,6 \pm 6,0\%$ көрсетті, бұл штамның биополимер өндіру қабілеті болғанымен, мұнай алу тиімділігі биосурфактант

өндіруші штамдармен салыстырғанда төмен екенін көрсетеді. *B. subtilis* A8 жеке қолданылғанда $19 \pm 7,0 \%$, ал үш штамм комбинациясы (A8 : A9 : A12) кезінде AOR - $21,7 \pm 4,8\%$ тіркелді.

Құм бағаналарында *Bacillus subtilis* штамдарын қолдану арқылы мұнай шығару коэффициенті бойынша жүргізілген бірқатар ғылыми зерттеулер олардың ММША әдісіндегі тиімділігін көрсетті.

Gudina және әріптестері шикі мұнай үлгілерінен бөлініп алынған *Bacillus subtilis* штамдарын пайдаланып, көмірсутек түріне байланысты қосымша мұнай шығару коэффициенті AOR - 6–24%-ға арттырғанын көрсетті. Бұл зерттеу құм бағаналарында биосурфактанттардың өндірісін және мұнай тұтқырлығының төмендеуін нақтылады [157]. Gudina және әріптестерінің 2012 жылғы жұмысында, үш түрлі *Bacillus subtilis* штамдары шикі мұнай қолданылған жағдайда AOR - 19–21% көрсетті, ал парафин қолданылғанда бұл көрсеткіш 35%-ға дейін жетті [94]. Сонымен қатар, Gudina және әріптестерінің 2011 жылғы зерттеуінде *B. subtilis* 309, 311 және 573 штамдары парафинмен қаныққан құм бағаналарда сәйкесінше 35,0%, 23,5% және 19,8% мұнай өндірісін қамтамасыз еткені анықталды [208].

Fernandes және әріптестері жүргізген зерттеуде *B. subtilis* RI4914 штамы биосурфактанттар мен полимерлерді қатар өндіру арқылы 88%-ға дейін мұнай шығаруды қамтамасыз еткені анықталды. Қалдық мұнайдың шығуы биосурфактант концентрациясына байланысты артып, бейтарап рН және орташа тұздылық жағдайында оңтайлы нәтиже көрсетті [209].

Pathak және Keharia биосурфактант өндіруші *B. subtilis* K1 штамының мотор майымен қаныққан құм бағаналарында пайдалану арқылы 43% мұнай өндіруге қол жеткізгенін көрсетті [210].

Осылайша, бұл зерттеулердің нәтижелері *Bacillus subtilis* штамдарының лаборатория жағдайында қалдық мұнайды тиімді шығаруға қабілетті екенін дәлелдейді және олардың ММША үшін әлеуетті биотехнологиялық агент екенін растайды. Атап айтқанда, *B. subtilis* A9 штамы AOR - $23,2 \pm 2,5\%$ етсе, ассоциациялар ішінде *B. subtilis* A8 : *B. subtilis* A9 – 24,4% нәтиже көрсетті. Бұл нәтижелер микробтық синергия мен метаболиттік өнімдердің үйлесімділігі ММША маңызды рөл атқаратынын дәлелдейді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Жұмыста алынған нәтижелер келесі қорытынды жасауға мүмкіндік береді:

1. Ақінген кен орнының пласт сулары жоғары минералданған, тұзды және натрий-хлорлы түріне, ал Шығыс Мақат кен орнының пласт сулары өте тұзды және натрий-хлорлы түріне жатқызылды.

2. Ақінген және Шығыс Мақат кен орындарының пласт суларының микробтық алуантүрлілігі *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* және *Bacilli*, сондай-ақ *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* және *Methanomicrobia* өкілдерін қамтыды. Барлығы 33 микроорганизм дақылдары, соның ішінде Ақінген кен орнынан 26 дақыл және Шығыс Мақат кен орнынан 7 дақыл бөлініп алынды.

3. Биосурфактант түзуші штамдардың скринингі негізінде 6 белсенді дақылдар: A2, A8, A9, A12, R4 және PW2 іріктелді. Іріктелген алты штамның таксономиялық сәйкестігі анықталып, олардың 16S рРНҚ тізбектері GenBank дерекқорына тіркелді: *Bacillus safensis subsp. safensis* A2 (OP565012), *Bacillus subtilis* A8 (OP565013), *Bacillus subtilis* A9 (OP565014), *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A12 (OP565015), *Bacillus paralicheniformis* R4 (OP565016) және *Bacillus licheniformis* PW2 (OP565017).

4. Іріктелген штамдарда *srfA*, *lchAA* және *sacB* гендерінің бар екені анықталды. Липопептидті биосурфактант синтездейтін *B. subtilis* A9 штамы *srfAB* генінің ең жоғары экспрессиясын (57 606,7) көрсетті. Төрт штамда *sacB* гені анықталды.

5. Биосурфактанттарда липопептид құрылымына тән пептидтік және алифаттық байланыстар, ал биополимер құрылымында гидроксил (-ОН) топтары, карбонил (C=O) топтары, гликозидтік C-O-C байланыстары тіркелді.

6. Қосымша мұнай шығару коэффициентінің ең жоғары мәндері *B. subtilis* A9 штамын ($23,2 \pm 2,5\%$) және *B. subtilis* A8 пен A9 ассоциациясын ($24,4 \pm 3,1\%$) қолданған жағдайларда байқалды, бұл көрсеткіштер бақылау үлгісіндегі мәнмен (4%) салыстырғанда айтарлықтай жоғары болды.

Диссертацияда алға қойылған міндеттердің барлығы орындалды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. (2023) Oil Market Report - November 2023 – Analysis. In: IEA. <https://www.iea.org/reports/oil-market-report-november-2023>. Accessed 5 May 2024
2. (2024) В 2023 году в Казахстане добыли 90 млн тонн нефти. In: Деловой портал Капитал.кз. <https://kapital.kz/economic/123756/v-2023-godu-v-kazakhstane-dobyli-90-mln-tonn-nefti.html>. Accessed 5 May 2024
3. Orazgaliyev S (2018) State intervention in Kazakhstan’s energy sector: Nationalisation or participation? *Journal of Eurasian Studies* 9:143–151. <https://doi.org/10.1016/j.euras.2018.06.001>
4. Karatayev M, Clarke ML (2014) Current Energy Resources in Kazakhstan and the Future Potential of Renewables: A Review. *Energy Procedia* 59:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.10.354>
5. Rustam M (2011) Assessment of Central Asia’s oil and gas reserves and their budding sales markets (the EU and China). *Central Asia and the Caucasus* 12:157–170
6. Blackbourn (2015) The Petroleum Geology of Kazakhstan, #10711.
7. Ulmishek GF (2001) Petroleum geology and resources of the North Caspian Basin, Kazakhstan and Russia
8. Ulmishek GF (2001) Petroleum geology and resources of the middle Caspian Basin, Former Soviet Union
9. Ulmishek GF (2001) Petroleum geology and resources of the North Ustyurt Basin, Kazakhstan and Uzbekistan. US Department of the Interior, US Geological Survey
10. О проекте Указа Президента Республики Казахстан “О государственной программе освоения казахстанского сектора Каспийского моря” - ИПС “Әділет.” https://adilet.zan.kz/rus/docs/P030000302_. Accessed 5 Apr 2023
11. Қазақстан Республикасы магистарльді мұнай құбырларымен тасымалданатын тауарлы мұнай мен мұнай қоспалары, Анықтамалық 1 бөлім, Алматы - 2005. - С. 222.
12. Нефтяная энциклопедия Казахстана, Алматы – 2005. – С. 237.
13. Справочник: Месторождения нефти и газа, Алматы — 2007.
14. Ahmad MA, Samsuri S, Amran NA, Ahmad MA, Samsuri S, Amran NA (2019) Methods for Enhancing Recovery of Heavy Crude Oil. In: *Processing of Heavy Crude Oils - Challenges and Opportunities*. IntechOpen
15. Ragab A, Mansour EM, Ragab A, Mansour EM (2021) Enhanced Oil Recovery: Chemical Flooding. In: *Geophysics and Ocean Waves Studies*. IntechOpen
16. (2015) Open-File Report
17. Papavinasam S (2014) Oil and Gas Industry Network. In: *Corrosion Control in the Oil and Gas Industry*. Elsevier, pp 41–131
18. Thomas S (2008) Enhanced Oil Recovery - An Overview. *Oil & Gas*

- Science and Technology - Rev IFP 63:9–19. <https://doi.org/10.2516/ogst:2007060>
19. Donaldson EC, Chilingarian GV, Yen TF (1985) Enhanced oil recovery, I: fundamentals and analyses. Elsevier
 20. Nazar MF, Shah SS, Khosa MA (2011) Microemulsions in Enhanced Oil Recovery: A Review. *Petroleum Science and Technology* 29:1353–1365. <https://doi.org/10.1080/10916460903502514>
 21. Shafiai SH, Gohari A (2020) Conventional and electrical EOR review: the development trend of ultrasonic application in EOR. *J Petrol Explor Prod Technol* 10:2923–2945. <https://doi.org/10.1007/s13202-020-00929-x>
 22. Alagorni AH, Yaacob ZB, Nour AH (2015) An overview of oil production stages: enhanced oil recovery techniques and nitrogen injection. *International Journal of Environmental Science and Development* 6:693
 23. Jelmert TA, Chang N, Høier L (2010) Comparative study of different EOR methods
 24. Kermen E (2011) Thermal enhancement of water-flooding in medium-heavy oil recovery
 25. Raney K, Ayirala S, Chin R, Verbeek P (2012) Surface and subsurface requirements for successful implementation of offshore chemical enhanced oil recovery. *SPE Production & Operations* 27:294–305
 26. Zare A (2011) Simulation study of micellar/polymer flooding process in sandpack. In: *Proc. The 2011 IAJC-ASEE International Conference*
 27. Ahdaya M, Imqam A (2020) Miscible gas injection application for enhanced oil recovery: Data analysis. In: *ARMA US Rock Mechanics/Geomechanics Symposium. ARMA, p ARMA-2020*
 28. Zhang N, Wei M, Bai B (2018) Statistical and analytical review of worldwide CO₂ immiscible field applications. *Fuel* 220:89–100
 29. Bello A, Ivanova A, Cheremisin A (2023) Foam EOR as an Optimization Technique for Gas EOR: A Comprehensive Review of Laboratory and Field Implementations. *Energies* 16:972. <https://doi.org/10.3390/en16020972>
 30. Negin C, Ali S, Xie Q (2017) Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. *Petroleum* 3:197–211
 31. Beckman, JW. The action of bacteria on mineral oil (1926). *Industrial and Engineering Chemistry*, 4, 23–26.
 32. Zobell CE (1952) Role of microorganisms in petroleum formation. *Am Petroleum Inst Research Project A* 43:
 33. Shibulal B, Al-Bahry SN, Al-Wahaibi YM, Elshafie AE, Al-Bemani AS, Joshi SJ (2014) Microbial Enhanced Heavy Oil Recovery by the Aid of Inhabitant Spore-Forming Bacteria: An Insight Review. *The Scientific World Journal* 2014:1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/309159>
 34. Sarkar AK, Goursaud JC, Sharma MM, Georgiou G (1989) A critical evaluation of MEOR processes. *situ* 13:207–238
 35. Lazar I, Petrisor IG, Yen TF (2007) Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *Petroleum Science and Technology* 25:1353–1366.

<https://doi.org/10.1080/10916460701287714>

36. Sen R (2008) Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science* 34:714–724. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.05.001>

37. Quraishi M, Bhatia SK, Pandit S, Gupta PK, Rangarajan V, Lahiri D, Varjani S, Mehariya S, Yang Y-H (2021) Exploiting Microbes in the Petroleum Field: Analyzing the Credibility of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *Energies* 14:4684. <https://doi.org/10.3390/en14154684>

38. Pavia MR (2019) Field Pilot Test of Novel Biological EOR Process for Extracting Trapped Oil from Unconventional Reservoirs. *New AERO Technology*

39. Ziwei B, Xiangchun Z, Yiyang W, Lusha W, Yifei W, Hanning W (2021) Review on microbial enhanced oil recovery in China: mechanisms, potential disadvantages, and application of genetic engineering. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 1–16. <https://doi.org/10.1080/15567036.2021.1897192>

40. Udosoh NE, Nwaoha TC (2020) Demonstration of MEOR as an alternative enhanced oil recovery technique in Nigeria offshore oilfield. *Journal of Mechanical and Energy Engineering* 4:

41. Jinfeng L, Lijun M, Bozhong M, Rulin L, Fangtian N, Jiaxi Z (2005) The field pilot of microbial enhanced oil recovery in a high temperature petroleum reservoir. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 48:265–271. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2005.06.008>

42. Guo WK, Hou Z -w (2007) The recovery mechanism and application of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus cereus* in extra-low permeability reservoir of Daqing. *Petroleum Exploration and Development* 34:73

43. Sun S, Luo Y, Zhou Y, Xiao M, Zhang Z, Hou J, Wei X, Xu Q, Sha T, Dong H, Song H, Zhang Z (2017) Application of *Bacillus* spp. in Pilot Test of Microbial Huff and Puff to Improve Heavy Oil Recovery. *Energy Fuels* 31:13724–13732. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02517>

44. Le J, Liu F, Zhang J, Bai LL, Wang R, Liu XB, Hou ZW, Lin WX (2014) A field test of activation indigenous microorganism for microbial enhanced oil recovery in reservoir after polymer flooding. *Acta Petrolei Sinica* 35:99–106

45. Ivanov MV, Belyaev SS, Borzenkov IA, Glumov IF, Ibatullin RR (1993) Additional Oil Production During Field Trials in Russia. In: *Developments in Petroleum Science*. Elsevier, pp 373–381

46. Senyukov VM, Yulbarisov ME, Taldykina NN, Shisherina PE (1970) Microbial method of treating a petroleum deposit containing highly mineralized stratal waters. *Mikrobiologiya* 39:705–710

47. Nazina T, Sokolova D, Grouzdev D, Semenova E, Babich T, Bidzhieva S, Serdukov D, Volkov D, Bugaev K, Ershov A (2019) The potential application of microorganisms for sustainable petroleum recovery from heavy oil reservoirs. *Sustainability* 12:15

48. Bryant RS, Stepp AK, Bertus KM, Burchfield TE, Dennis M (1994)

Microbial enhanced waterflooding field tests. In: SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium. OnePetro

49. Zahner B, Sheehy A, Govreau B (2010) MEOR success in southern California. In: SPE Improved Oil Recovery Conference? SPE, p SPE-129742

50. Strappa LA, De Lucia JP, Maure MA, Llopiz ML (2004) A novel and successful MEOR pilot project in a strong water-drive reservoir Vizcacheras Field, Argentina. In: SPE Improved Oil Recovery Conference? SPE, p SPE-89456

51. Ibragimov KhM, Abdullayeva F., Guseynova NI (2015) Experience of Microbial Enhanced Oil Recovery Methods At Azerbaijan Fields. In: All Days. SPE, Baku, Azerbaijan, p SPE-177377-MS

52. Town K, Sheehy AJ, Govreau BR (2010) MEOR success in southern Saskatchewan. SPE Reservoir Evaluation & Engineering 13:773–781

53. Sabut B, Salim MAH, Hamid ASA, Khor SF (2003) Further evaluation of microbial treatment technology for improved oil production in Bokor field, Sarawak. In: SPE International Improved Oil Recovery Conference in Asia Pacific. SPE, p SPE-84867

54. Cui QF, Sun SS, Luo YJ, Yu L, Zhang ZZ (2017) Comparison of in-situ and ex-situ microbial enhanced oil recovery by strain *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 in laboratory sand-pack columns. Petroleum Science and Technology 35:2044–2050. <https://doi.org/10.1080/10916466.2017.1380042>

55. She H, Kong D, Li Y, Hu Z, Guo H (2019) Recent Advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China. Geofluids 2019:1–16. <https://doi.org/10.1155/2019/1871392>

56. Ke C-Y, Sun R, Wei M-X, Yuan X-N, Sun W-J, Wang S-C, Zhang Q-Z, Zhang X-L (2024) Microbial enhanced oil recovery (MEOR): recent development and future perspectives. Crit Rev Biotechnol 44:1183–1202. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2270578>

57. Altunina LK, Kuvshinov VA, Stasyeva LA, LAKATOS I (2003) Effect of in situ Generated CO₂ and Alkaline Buffers on Rheological Properties of High Viscosity Oils. Progress in Mining and Oilfield Chemistry 123–132

58. Yernazarova A, Kayirmanova G, Zhubanova AB and A, Yernazarova A, Kayirmanova G, Zhubanova AB and A (2016) Microbial Enhanced Oil Recovery. IntechOpen

59. Nielsen SM, Nesterov I, Shapiro AA (2016) Microbial enhanced oil recovery—a modeling study of the potential of spore-forming bacteria. Comput Geosci 20:567–580. <https://doi.org/10.1007/s10596-015-9526-3>

60. Sharma N, Lavania M, Singh N, Lal B, Sharma N, Lavania M, Singh N, Lal B (2022) Microbial Enhanced Oil Recovery: An Overview and Case Studies. In: Enhanced Oil Recovery - Selected Topics. IntechOpen

61. Nikolova C, Gutierrez T (2020) Use of Microorganisms in the Recovery of Oil From Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives. Front Microbiol 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02996>

62. Wu B, Xiu J, Yu L, Huang L, Yi L, Ma Y (2022) Research advances of microbial enhanced oil recovery. *Heliyon* 8:e11424. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11424>
63. Patel J, Borgohain S, Kumar M, Rangarajan V, Somasundaran P, Sen R (2015) Recent developments in microbial enhanced oil recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52:1539–1558
64. Niu J, Liu Q, Lv J, Peng B (2020) Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 192:107350
65. Khademolhosseini R, Jafari A, Shabani MH (2015) Micro Scale Investigation of Enhanced Oil Recovery Using Nano/Bio Materials. *Procedia Materials Science* 11:171–175. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.11.069>
66. Rahayyem M, Mostaghimi P, Alzahid Y, Halim A, Evangelista L, Armstrong R (2019) Enzyme Enhanced Oil Recovery EEOR: A Microfluidics Approach
67. Kobayashi H, Endo K, Sakata S, Mayumi D, Kawaguchi H, Ikarashi M, Miyagawa Y, Maeda H, Sato K (2012) 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. *Journal of bioscience and bioengineering* 113:204–210
68. Ridley CM, Voordouw G (2018) Aerobic microbial taxa dominate deep subsurface cores from the Alberta oil sands. *FEMS microbiology ecology* 94:fiy073
69. Sierra-Garcia IN, de Oliveira VM (2013) Microbial hydrocarbon degradation: efforts to understand biodegradation in petroleum reservoirs. *Biodegradation-engineering and technology* 10:55920
70. Head IM, Jones DM, Larter SR (2003) Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426:344–352
71. Abbasnezhad H, Gray M, Foght JM (2011) Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:653–675. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3589-4>
72. Liu J, Wu J, Lin J, Zhao J, Xu T, Yang Q, Zhao J, Zhao Z, Song X (2019) Changes in the Microbial Community Diversity of Oil Exploitation. *Genes (Basel)* 10:556. <https://doi.org/10.3390/genes10080556>
73. Wang L-Y, Ke W-J, Sun X-B, Liu J-F, Gu J-D, Mu B-Z (2014) Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4209–4221. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5472-y>
74. Magot M, Ollivier B, Patel BKC (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77:103–116. <https://doi.org/10.1023/A:1002434330514>
75. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China | *Scientific Reports*. <https://www.nature.com/articles/srep20174>. Accessed 8 May 2024

76. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle | The ISME Journal | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/ismej/article/11/9/2141/7538052>. Accessed 8 May 2024
77. Tang Y-Q, Li Y, Zhao J-Y, Chi C-Q, Huang L-X, Dong H-P, Wu X-L (2012) Microbial communities in long-term, water-flooded petroleum reservoirs with different in situ temperatures in the Huabei Oilfield, China. *PloS one* 7:e33535
78. Wang L-Y, Duan R-Y, Liu J-F, Yang S-Z, Gu J-D, Mu B-Z (2012) Molecular analysis of the microbial community structures in water-flooding petroleum reservoirs with different temperatures. *Biogeosciences* 9:4645–4659
79. Li X-X, Mbadinga SM, Liu J-F, Zhou L, Yang S-Z, Gu J-D, Mu B-Z (2017) Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120:170–185
80. Lenchi N, Inceoglu Ö, Kebbouche-Gana S, Gana ML, Llíros M, Servais P, García-Armisen T (2013) Diversity of microbial communities in production and injection waters of Algerian oilfields revealed by 16S rRNA gene amplicon 454 pyrosequencing. *PloS one* 8:e66588
81. Kowalewski E, Rueslåtten I, Steen KH, Bødtker G, Torsæter O (2006) Microbial improved oil recovery—bacterial induced wettability and interfacial tension effects on oil production. *Journal of Petroleum science and Engineering* 52:275–286
82. Kaster KM, Bonaunet K, Berland H, Kjeilen-Eilertsen G, Brakstad OG (2009) Characterisation of culture-independent and -dependent microbial communities in a high-temperature offshore chalk petroleum reservoir. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:423–439. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9356-1>
83. Lin J, Hao B, Cao G, Wang J, Feng Y, Tan X, Wang W (2014) A study on the microbial community structure in oil reservoirs developed by water flooding. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 122:354–359
84. Röling WF, Head IM, Larter SR (2003) The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology* 154:321–328
85. Pannekens M, Kroll L, Müller H, Mbow FT, Meckenstock RU (2019) Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *N Biotechnol* 49:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.006>
86. Voskuhl L, Akbari A, Müller H, Pannekens M, Brusilova D, Dyksma S, Haque S, Graupner N, Dunthorn M, Meckenstock RU, Brauer VS (2021) Indigenous microbial communities in heavy oil show a threshold response to salinity. *FEMS Microbiology Ecology* 97:fiab157. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab157>
87. Cai M, Nie Y, Chi C-Q, Tang Y-Q, Li Y, Wang X-B, Liu Z-S, Yang Y, Zhou J, Wu X-L (2015) Crude oil as a microbial seed bank with unexpected functional potentials. *Sci Rep* 5:16057. <https://doi.org/10.1038/srep16057>
88. Zhang J, Gao H, Xue Q (2020) Potential applications of microbial enhanced oil recovery to heavy oil. *Critical Reviews in Biotechnology* 40:459–474.

<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1739618>

89. Couto MR, Gudiña EJ, Ferreira D, Teixeira JA, Rodrigues LR (2019) The biopolymer produced by *Rhizobium viscosum* CECT 908 is a promising agent for application in microbial enhanced oil recovery. *New Biotechnology* 49:144–150. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.002>

90. Youssef N, Elshahed MS, McInerney MJ (2009) Chapter 6 Microbial Processes in Oil Fields. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp 141–251

91. Zobell CE (1946) Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological reviews* 10:1–49

92. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews* 67:503–549

93. Hosseininoosheri P, Lashgari HR, Sepehrmoori K (2016) A novel method to model and characterize in-situ bio-surfactant production in microbial enhanced oil recovery. *Fuel* 183:501–511. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.06.035>

94. Gudiña EJ, Pereira JFB, Rodrigues LR, Coutinho JAP, Teixeira JA (2012) Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation* 68:56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001>

95. Dong H, Zheng A, He Y, Wang X, Li Y, Yu G, Gu Y, Banat IM, Sun S, She Y, Zhang F (2022) Optimization and characterization of biosurfactant produced by indigenous *Brevibacillus borstelensis* isolated from a low permeability reservoir for application in MEOR. *RSC Adv* 12:2036–2047. <https://doi.org/10.1039/D1RA07663A>

96. Geetha SJ, Banat IM, Joshi SJ (2018) Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal Agric Biotechnol* 14: 23–32

97. Jeong MS, Noh D-H, Hong E, Lee KS, Kwon T-H (2019) Systematic Modeling Approach to Selective Plugging Using *In Situ* Bacterial Biopolymer Production and Its Potential for Microbial-enhanced Oil Recovery. *Geomicrobiology Journal* 36:468–481. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1573277>

98. Rayung: Bio-based polymer electrolytes for electrochemical... - Академия Google. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Bio-based+polymer+electrolytes+for+electrochemical+devices:+Insight+into+the+ionic+conductivity+performance&author=Rayung,+M.&author=Aung,+M.M.&author=Azh ar,+S.C.&author=Abdullah,+L.C.&author=Su%E2%80%99ait,+M.S.&author=Ahma d,+A.&author=Jamil,+S.N.A.M.&publication_year=2020&journal=Materials&volume=13&pages=838&doi=10.3390/ma13040838&pmid=32059600. Accessed 9 May 2024

99. TOMULESCU: Levan-a mini review. - Академия Google. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Levan-A+Mini+Review&author=Tomulescu,+C.&author=Stoica,+R.&author=Sevcenco,+C.&author=C%C4%83%C5%9F%C4%83ric%C4%83,+A.&author=Moscovici,+M.&author=Vamanu,+A.&publication_year=2016&journal=Sci.+Bull.+Ser.+F.+Biotechno

l.&volume=20&pages=309%E2%80%93317. Accessed 9 May 2024

100. Cui K, Zhang Z, Zhang Z, Sun S, Li H, Fu P (2019) Stimulation of indigenous microbes by optimizing the water cut in low permeability reservoirs for green and enhanced oil recovery. *Scientific reports* 9:15772

101. Das N, Chandran P (2010) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol Res Int* 2011:941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>

102. Tian H, Gao P, Chen Z, Li Y, Li Y, Wang Y, Zhou J, Li G, Ma T (2017) Compositions and Abundances of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Microorganisms in Water-Flooded Petroleum Reservoirs with Different Temperatures in China. *Front Microbiol* 8:143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00143>

103. Zamanpour MK, Kaliappan RS, Rockne KJ (2020) Gas ebullition from petroleum hydrocarbons in aquatic sediments: A review. *Journal of Environmental Management* 271:110997. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110997>

104. Xiao H, Amir Z, Mohd Junaidi MU (2023) Development of Microbial Consortium and Its Influencing Factors for Enhanced Oil Recovery after Polymer Flooding: A Review. *Processes* 11:2853. <https://doi.org/10.3390/pr11102853>

105. Soberón-Chávez G, Maier RM (2011) Biosurfactants: A General Overview. In: Soberón-Chávez G (ed) *Biosurfactants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–11

106. Vijayakuma S, Saravanan V (2015) Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research J of Microbiology* 10:181–192. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192>

107. Chabhadiya S, Acharya DK, Mangrola A, Shah R, Pithawala EA (2024) Unlocking the potential of biosurfactants: innovations in metabolic and genetic engineering for sustainable industrial and environmental solutions. *Biotechnology Notes*

108. Cooper DG, Macdonald CR, Duff SJB, Kosaric N (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental microbiology* 42:408–412

109. Yakimov MM, Kröger A, Slepak TN, Giuliano L, Timmis KN, Golyshin PN (1998) A putative lichenysin A synthetase operon in *Bacillus licheniformis*: initial characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1399:141–153

110. Krätzschar J, Krause M, Marahiel MA (1989) Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol* 171:5422–5429. <https://doi.org/10.1128/jb.171.10.5422-5429.1989>

111. Corvey C, Stein T, Düsterhus S, Karas M, Entian K-D (2003) Activation of subtilin precursors by *Bacillus subtilis* extracellular serine proteases subtilisin (AprE), WprA, and Vpr. *Biochemical and biophysical research communications* 304:48–54

112. Velho RV, Medina LFC, Segalin J, Brandelli A (2011) Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiol* 56:297–303. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0056-7>
113. Lin T-P, Chen C-L, Chang L-K, Tschen JS-M, Liu S-T (1999) Functional and Transcriptional Analyses of a Fengycin Synthetase Gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181:5060–5067. <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.5060-5067.1999>
114. Qiu H, Xiao Y, Shen L, Han T, He Q, Li A, Zhang P, Cai X (2023) Genome-driven discovery of new serrawettin W2 analogues from *Serratia fonticola* DSM 4576. *Organic & Biomolecular Chemistry* 21:9029–9036
115. Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PØ, Christophersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tolker-Nielsen T, Pier GB, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2009) Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* 117:537–546. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02466.x>
116. Gaur: Biosynthesis and characterization of sophorolipid... - Академия Google. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Biosynthesis%20and%20characterization%20of%20sophorolipid%20biosurfactant%20by%20Candida%20spp._%20Application%20as%20food%20emulsifier%20and%20antibacterial%20agent&author=V.K.%20Gaur&publication_year=2019&pages=1-4. Accessed 26 Jan 2025
117. Miao Y, To MH, Siddiqui MA, Wang H, Lodens S, Chopra SS, Kaur G, Roelants SL, Lin CSK (2024) Sustainable biosurfactant production from secondary feedstock—recent advances, process optimization and perspectives. *Frontiers in Chemistry* 12:1327113
118. Das P, Mukherjee S, Sen R (2008) Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 25:165–186. <https://doi.org/10.5661/bger-25-165>
119. Hernández-Chávez MJ, Clavijo-Giraldo DM, Novák Á, Lozoya-Pérez NE, Martínez-Álvarez JA, Salinas-Marín R, Hernández NV, Martínez-Duncker I, Gácsér A, Mora-Montes HM (2019) Role of protein mannosylation in the *Candida tropicalis*-host interaction. *Frontiers in Microbiology* 10:2743
120. Ashish MD (2018) Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.PETROL.2018.06.034>
121. Purwasena IA, Astuti DI, Syukron M, Amaniyah M, Sugai Y (2019) Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 183:106383
122. Liu Q, Niu J, Yu Y, Wang C, Lu S, Zhang S, Lv J, Peng B (2021) Production, characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus*

licheniformis L20 for microbial enhanced oil recovery. Journal of Cleaner Production. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.127193>

123. Sarubbo L, Luna JM, Rufino R, Brasileiro PPF (2016) Production of a Low-cost Biosurfactant for Application in the Remediation of Sea Water Contaminated with Petroleum Derivates. Chemical engineering transactions 49:523–528

124. Ganji-azad E, Javadi A, Veshareh MJ, Ayatollahi S, Miller R (2021) Bacteria Cell Hydrophobicity and Interfacial Properties Relationships: A New MEOR Approach. Colloids and Interfaces. <https://doi.org/10.3390/colloids5040049>

125. Armstrong R, Wildenschild D (2012) Investigating the pore-scale mechanisms of microbial enhanced oil recovery. Journal of Petroleum Science and Engineering 155–164. <https://doi.org/10.1016/J.PETROL.2012.06.031>

126. Elakkiya V, Sureshkumar P, Alharbi N, Kadaikunnan S, Khaled JM, Govindarajan M (2020) Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. Saudi Journal of Biological Sciences 27:1892–1899. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.001>

127. Rehm B (2009) Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. 1:

128. Ghasemi M, Tofigh S, Parsa A, Najafi-Marghmaleki A (2021) Numerical simulation of impact of biopolymer production and microbial competition between species on performance of MEOR process. Journal of Petroleum Science and Engineering 196:. <https://doi.org/10.1016/j.petro.2020.107643>

129. Kwon T, Ajo-Franklin J (2013) High-frequency seismic response during permeability reduction due to biopolymer clogging in unconsolidated porous media. Geophysics 78:117–127. <https://doi.org/10.1190/GEO2012-0392.1>

130. Biopolymer plugging effect: laboratory-pressurized pumping flow studies - Consensus. https://consensus.app/papers/biopolymer-plugging-effect-laboratorypressurized-khachatoorian-petrisor/d083da736eed573fb78b1ac9fe267f8f/?utm_source=chatgpt. Accessed 27 Jan 2025

131. Construction and Performance Evaluation of Dual-Metabolite Oil-Producing Engineering Bacteria Suitable for Low-Permeability Reservoir - Consensus. https://consensus.app/papers/construction-and-performance-evaluation-of-yang-zhihua/671a0a5616a95a7698944d5aead65eb7/?utm_source=chatgpt. Accessed 27 Jan 2025

132. Coe AE, Demand TM, Travelled D, Journeys I, Stoppages C, Buying H, Mile CT (2020) Crude Oil. Commodity Derivatives. <https://doi.org/10.1515/iupac.73.0180>

133. McGrath JM, Fugate KK (2012) Analysis of sucrose from sugar beet

134. Palmonari A, Cavallini D, Sniffen CJ, Fernandes L, Holder P, Fagioli L, Fusaro I, Biagi G, Formigoni A, Mammi L (2020) *Short communication: Characterization of molasses chemical composition*. Journal of Dairy Science

103:6244–6249. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17644>

135. Baer R, Frank J, Loewenstein M, Birth G (1983) Compositional Analysis of Whey Powders Using Near Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Journal of Food Science* 48:959–961. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1983.TB14940.X>

136. Khramtsov A, Blinov A, Blinova A, Serov A (2017) Influence of the whey type on composition and properties of its mineralizates. *Foods and Raw materials* 5:30–40. <https://doi.org/10.21179/2308-4057-2017-1-30-40>

137. Porter MA, Jones AM (2003) Variability in soy flour composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80:557–562. <https://doi.org/10.1007/S11746-003-0737-6>

138. Amplicon PCR, Clean-Up PCR, Index PCR (2013) 16s metagenomic sequencing library preparation. Illumina: San Diego, CA, USA 21:

139. Н.С.Егоров. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. In: Microbius. <https://microbius.ru/library/n-s-egorov-rukovodstvo-k-prakticheskim-zanyatiyam-po-mikrobiologii>. Accessed 25 Feb 2025

140. Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., 2000. A study on the structure – function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488, 211 – 218.

141. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods* 56:339–347

142. Cooper DG, Goldenberg BG (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology* 53:224–229

143. Płaza GA, Zjawiony I, Banat IM (2006) Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50:71–77

144. Tadros TF (2006) *Applied surfactants: principles and applications*. John Wiley & Sons

145. Logan NA, Berkeley RCW (1984) Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Microbiology* 130:1871–1882

146. Alexeeva I, Elliott EJ, Rollins S, Gasparich GE, Lazar J, Rohwer RG (2006) Absence of *Spiroplasma* or Other Bacterial 16S rRNA Genes in Brain Tissue of Hamsters with Scrapie. *Journal of Clinical Microbiology* 44:91–97. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.91-97.2006>

147. Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>

148. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32:1792–1797

149. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

150. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
151. Kaminska PS, Yernazarova A, Murawska E, Swiecicki J, Fiedoruk K, Bideshi DK, Swiecicka I (2014) Comparative analysis of quantitative reverse transcription real-time PCR and commercial enzyme immunoassays for detection of enterotoxigenic *Bacillus thuringiensis* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 357:34–39. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12503>
152. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
153. Nitschke M, Pastore GM (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour Technol* 97:336–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>
154. Zhang J, Xue Q, Gao H, Lai H, Wang P (2016) Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. *Microbial Cell Factories* 15:168. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0574-8>
155. Nasir DQ, Wahyuningrum D, Hertadi R (2015) Screening and characterization of levan secreted by halophilic bacterium of *Halomonas* and *Chromohalobacter* genres originated from Bledug kuwu mud crater. *Procedia Chemistry* 16:272–278
156. Taran M, Etemadi S, Safaei M (2017) Microbial levan biopolymer production and its use for the synthesis of an antibacterial iron(II,III) oxide–levan nanocomposite. *J of Applied Polymer Sci* 134:app.44613. <https://doi.org/10.1002/app.44613>
157. Gudina EJ, Pereira JF, Costa R, Coutinho JA, Teixeira JA, Rodrigues LR (2013) Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. *Journal of hazardous materials* 261:106–113
158. Mindiola GL, Flores M, Rondón AE (2021) Factibilidad de aplicación de la tecnología de recuperación mejorada de hidrocarburos con microorganismos (MEOR) en yacimientos del campo Pílon, distrito Morichal, estado Monagas. *INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD* 23:e20710539–e20710539. <https://doi.org/10.25100/iyc.v23i2.10539>
159. Safdel M, Anbaz MA, Daryasafar A, Jamialahmadi M (2017) Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 74:159–172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.045>
160. Donaldson EC, Chilingarian GV, Yen TF (1989) Development in Petroleum Science: Microbial Enhanced Oil Recovery. University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, USA, and, University of Southern California, Los Angeles, California, USA
161. Shaimerdenova U, Kaiyrmanova G, Lewandowska W, Bartoszewicz M,

Swiecicka I, Yernazarova A (2024) Biosurfactant and biopolymer producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield. *Scientific Reports* 14:2294

162. Колесник ВЮ (2014) Сточные воды при бурении, добыче, транспорте и хранении нефти и газа

163. Lewin A, Johansen J, Wentzel A, Kotlar H, Drabløs F, Valla S (2014) The microbial communities in two apparently physically separated deep subsurface oil reservoirs show extensive DNA sequence similarities. *Environmental microbiology* 16 2:545–58. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12181>

164. Sierra-Garcia IN, Belgini DR, Torres-Ballesteros A, Páez-Espino D, Capilla R, Neto EVS, Gray N, Oliveira VM de (2020) In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. *The Science of the total environment* 715:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136646>

165. Hidalgo K, Sierra-Garcia IN, Zafra G, Oliveira VM de (2021) Genome-Resolved Meta-Analysis of the Microbiome in Oil Reservoirs Worldwide. *Microorganisms* 9:. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091812>

166. Harumain ZAS, Mohamad MAN, Nordin NFH, Shukor MYA (2023) Biodegradation of Petroleum Sludge by *Methylobacterium* sp. Strain ZASH. *Trop Life Sci Res* 34:197–222. <https://doi.org/10.21315/tlsr2023.34.2.10>

167. Vigneron A, Alsop EB, Lomans BP, Kyrpides NC, Head IM, Tsesmetzis N (2017) Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle. *The ISME journal* 11:2141–2154

168. Zhao F, Shi R, Cui Q, Han S, Dong H, Zhang Y (2017) Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing bacteria for microbial enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 157:124–130

169. Dhanarajan G, Rangarajan V, Bandi C, Dixit A, Das S, Ale K, Sen R (2017) Biosurfactant-biopolymer driven microbial enhanced oil recovery (MEOR) and its optimization by an ANN-GA hybrid technique. *Journal of biotechnology* 256:46–56

170. Jahanbani Veshareh M, Ganji Azad E, Deihimi T, Niazi A, Ayatollahi S (2019) Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces. *J Petrol Explor Prod Technol* 9:233–245. <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0457-0>

171. Da Silva AF, Banat IM, Giachini AJ, Robl D (2021) Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:2003–2034. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5>

172. Chaprão MJ, Ferreira IN, Correa PF, Rufino RD, Luna JM, Silva EJ, Sarubbo LA (2015) Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electronic Journal of Biotechnology* 18:471–479

173. Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews* 61:47–64
174. Кайырманова ГК, Ерланулы АА, Исламова АР, Ерназарова АК, Абитбекова АУ, Шаймерденова УТ (2024) Приемы консервации перспективных в нефтяной промышленности бактерий для сохранения биологических свойств. *Вестник нефтегазовой отрасли Казахстана* 6:110–119
175. Marchant R, Banat IM (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology* 30:558–565
176. Walter V, Syltatk C, Hausmann R (2010) Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. In: Sen R (ed) *Biosurfactants*. Springer New York, New York, NY, pp 1–13
177. Ерназарова АК, Кайырманова ГК, Шаймерденова УТ, Магмияев РБ, Исламова АР (2024) ИДЕНТИФИКАЦИЯ АБОРИГЕННЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *BACILLUS* И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕОТДАЧИ ПЛАСТОВ. *Микробиология және вирусология* 1:158–175
178. Тапешова Ш Өндірістік пласт суларынан бөлініп алынған псевдомонадтардың мұнайэмульсиялық белсенділігін зерттеу
179. Kaiyrmanova G, Abitbekova A, Shaimerdenova U, Asylbek A, Yernazarova A (2024) Oil dispersion characterization of microorganisms producing biosurfactants. In: *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences, p 02018
180. Parkinson M (1985) Bio-surfactants. *Biotechnology advances* 3:65–83
181. Amani H, Sarrafzadeh MH, Haghighi M, Mehrnia MR (2010) Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 75:209–214
182. Ramsay JA, Cooper DG, Neufeld RJ (1989) Effects of oil reservoir conditions on the production of water-insoluble Levan by *Bacillus licheniformis*. *Geomicrobiology Journal* 7:155–165. <https://doi.org/10.1080/01490458909377859>
183. Suthar H, Hingurao K, Desai A, Nerurkar A (2009) Selective plugging strategy based microbial enhanced oil recovery using *Bacillus licheniformis* TT33. *Journal of microbiology and biotechnology* 19:1230–1237
184. Korenblum E, Sebastián GV, Paiva MM, Coutinho CMLM, Magalhães FCM, Peyton BM, Seldin L (2008) Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:97–103. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1401-x>
185. Das A, Kumar R (2019) Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2019.100450>
186. Yernazarova A, Shaimerdenova U, Akimbekov N, Kaiyrmanova G, Shaken M, Izmailova A (2024) Exploring the use of microbial enhanced oil recovery in Kazakhstan: a review. *Frontiers in Microbiology* 15:1394838
187. Belghith KS, Dahech I, Belghith H, Mejdoub H (2012) Microbial

production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International journal of biological macromolecules* 50:451–458

188. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:427–444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>

189. Płaza G, Chojniak J, Rudnicka K, Paraszkievicz K, Bernat P (2015) Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *J Appl Microbiol* 119:1023–1034. <https://doi.org/10.1111/jam.12893>

190. Xu Y, Wu J-Y, Liu Q-J, Xue J-Y (2023) Genome-Wide Identification and Evolutionary Analyses of *SrfA* Operon Genes in *Bacillus*. *Genes (Basel)* 14:422. <https://doi.org/10.3390/genes14020422>

191. Jacques P (2011) Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chávez G (ed) *Biosurfactants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 57–91

192. Nerurkar A (2010) Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity. *Advances in experimental medicine and biology* 672:304–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_23

193. Steinmetz M, Coq D, Aymerich S, Gonzy-Treboul G, Gay P (2004) The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Molecular and General Genetics MGG* 200:220–228. <https://doi.org/10.1007/BF00425427>

194. Omar MM (2023) Purification and Characterization of Recombinant Levansucrase From *Bacillus licheniformis* MJ8. *Kirkuk University Journal For Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.58928/ku23.14212>

195. Das K, Mukherjee AK (2007) Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology* 98:1339–1345

196. de Faria AF, Teodoro-Martinez DS, de Oliveira Barbosa GN, Vaz BG, Silva ÍS, Garcia JS, Tótola MR, Eberlin MN, Grossman M, Alves OL (2011) Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry* 46:1951–1957

197. Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ (2008) Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour Technol* 99:195–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.010>

198. Cote GL, Ahlgren JA (1993) Metabolism in microorganisms, part I: levan and levansucrase. *Science and technology of fructans* 141–168

199. Gu Y, Zheng J, Feng J, Cao M, Gao W, Quan Y, Dang Y, Wang Y, Wang S, Song C (2017) Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied microbiology and biotechnology* 101:4163–4174

200. Hamada MA, Hassan RA, Abdou AM, Elsaba YM, Aloufi AS, Sonbol H, Korany SM (2022) Bio_Fabricated Levan Polymer from *Bacillus subtilis* MZ292983.1 with Antibacterial, Antibiofilm, and Burn Healing Properties. *Applied Sciences* 12:6413. <https://doi.org/10.3390/app12136413>
201. (PDF) Antimicrobial Activity of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* Strain M104 Grown on Whey. ResearchGate. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000200011>
202. Makkar RS, Cameotra SS (1997) Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *J Americ Oil Chem Soc* 74:887–889. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0233-7>
203. Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM (2004) Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* 35:81–85
204. Saimmai A, Sobhon V, Maneerat S (2011) Molasses as a Whole Medium for Biosurfactants Production by *Bacillus* Strains and Their Application. *Appl Biochem Biotechnol* 165:315–335. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9253-8>
205. Al-Bahry SN, Al-Wahaibi YM, Elshafie AE, Al-Bemani AS, Joshi SJ, Al-Makhmari HS, Al-Sulaimani HS (2013) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation* 81:141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>
206. Al-Wahaibi Y, Joshi S, Al-Bahry S, Elshafie A, Al-Bemani A, Shibulal B (2014) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114:324–333
207. Verma R, Sharma S, Kundu LM, Pandey LM (2020) Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. *Journal of Water Process Engineering* 38:101632
208. Gudiña EJ, Pereira JF, Rodrigues LR, Coutinho JA, Teixeira JA (2011) Enhanced oil recovery under laboratory conditions using biosurfactant-producing microorganisms
209. Fernandes PL, Rodrigues EM, McInerney MJ, Tótola MR (2024) Microbial enhanced oil recovery: Use of metabolic products of *Bacillus subtilis* RI4914 in non-consolidated porous media and influence of environmental parameters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.134431>
210. Pathak K, Keharia H (2013) Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *3 Biotech* 4:41–48. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0119-3>

ҚОСЫМША А



Атырауский филиал
ТОО «КМГ «Инжиниринг»

Ф01,ДП2/020(3)-2019

НГДУ «Жылыоймұнайгаз»

УСН «Ақжыген»

14.12.21

Акт отбора

Мы, нижеподписавшиеся, представитель Атырауского филиала ТОО «КМГ Инжиниринг»: инженер ЛПХ Нсанов М., представитель НГДУ «Жылыоймұнайгаз»: Умаржанов В. А. составили акт о том, что на м.р. «Ақжыген» отобрали пробы жидкости (неф. эмульсии).

Пробы отбирались по ГОСТу 2517- «Нефть и нефтепродукты. Методы отбора проб» в пластиковую тару объемом 5л.

Точки отбора проб: с.в. 1319; с.в. 1321; БКНС Выход.

Представитель Атырауского филиала ТОО «КМГ Инжиниринг»:

Инженер ЛПХ

Нсанов М.

Представитель НГДУ «Жылыоймұнайгаз»:

У.О. Исмаилов

Умаржанов В. А.

Умаржанов В. А.

от КазНУ:

Шаймерденова У. Т.

Шаймерденова У. Т.

ҚОСЫМША Ә



Атырауский филиал
ТОО «КМГ Инжиниринг»

Ф01ДП2/020(2304)-2019

НГДУ «Жылыоймунайгаз»

М/р Аккинген

03.06.2022г.

АКТ.

Мы, нижеподписавшиеся представитель НГДУ «Жылыоймунайгаз» м/р Аккинген мастер ДНГ Сабыр И.С. и представитель КМГ ИНЖИНИРИНГ старший инженер ЛИПФ Сиранов Р.К. составили настоящий акт о том, что были отобраны пробы попутно-добываемого жидкости с скв № 329; №302, БКНС выход.

Примечание: С каждой точки по 3 бутылки 0,5л.+ 1 бутылка 1,5л.

Представитель НГДУ «Жылыоймунайгаз»

м/р Аккинген мастер ДНГ

Сабыр И.С.

Представитель КМГ ИНЖИНИРИНГ

Старший инженер ЛИПФ

Сиранов Р.К.

ҚОСЫМША Б



Атырауский филиал
ТОО «КМГ Инжиниринг»

Ф03ДП2/020(2303) -2022

Лаборатория исследований нефти, газа и воды
г. Атырау, сельский округ Геолог, пос. Бірлік,
промышленная зона Телемунара, строение 4.

дата отбора: 17.07.2023г

время отбора: 14:30

АКТ отбора проб

1.Заказчик, адрес: АО «Эмбамунайгаз», г. Атырау, ул. Валиханова, д. 1.

2.Место отбора: НГДУ «Доссормунайгаз», м/р. Вост.Макат.

НД на отбор проб	СТ РК 51592-03 (вода), ГОСТ 2517-2012 (нефть), ГОСТ 31370-08 (газ) Пробоотборник – МКБ-300, ПГО-400			
Наименование продукции	Точка отбора	Горизонт	Интервал перфорации, м	Количество проб
Нефть	скв. №145	J ₂ -VII	---	1
Вода	скв. №22	J ₂ -I	---	1
Вода	скв. №83	Ne	---	1
Вода	скв. №93	PT	---	1
Вода	скв. №130	J ₂ -II	---	1

Представитель филиала

ТОО «КМГ Инжиниринг»:

Инженер ЛИНГИБ

Мугаюпов Н.Ш.

Представитель Заказчика:

НГДУ «Доссормунайгаз»

Геолог м/р. «Восточный Макат»

Курманкулова С.К.

конец документа

Акт отбора распространяется только на представленные образцы

ҚОСЫМША В


ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН
REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
ПАТЕНТ
PATENT
№ 9060
ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2024/0245.2
(22) 20.02.2024
(45) 26.04.2024

(54) ҚАБАТТАРДЫҢ МҰНАЙБЕРУІН МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ АРТТЫРУ ҮШІН
ҚОЛДАНЫЛАТЫН BACILLUS SUBTILIS A9 ШТАММЫН ӨНДІРУШІ
БИОСУРФАКТАНТ
БИОСУРФАКТАНТ ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ШТАММ BACILLUS SUBTILIS A9,
ИСПОЛЗУЕМЫЙ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПОВЫШЕНИЯ НЕФТЕОТДАЧИ
ПЛАСТОВ
BIOSURFACTANT PRODUCING STRAIN BACILLUS SUBTILIS A9, USED FOR
MICROBIOLOGICAL ENHANCEMENT OF OIL RECOVERY

(73) Шаймерденова Ұлжан Тұрғанбекқызы (KZ) Shaimerdenova Ulzhan Turganbekkyzy (KZ)
(72) Шаймерденова Ұлжан Тұрғанбекқызы (KZ) Shaimerdenova Ulzhan Turganbekkyzy (KZ)
Кайырманова Гульжан Кайыржановна (KZ) Kaiyrmanova Gulzhan Kaiyrzhanovna (KZ)
Ерназарова Алия Кулахметовна (KZ) Yernazarova Aliya Kulakhmetovna (KZ)



ЭЦК қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
Е. Оспанов
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of RSE «National institute of intellectual property»

ҚОСЫМША Г



«Микроорганизмдердің
республикалық коллекциясы»
жауапкершілігі шектеулі
серіктестігі

Қазақстан Республикасы, 010000,
Астана қ., Ш. Уәлиханов к., 13/1
тел./факс: + 7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru;
www.rcm.kz
БСН 061140003586

«Republican Collection
of Microorganisms»
Limited Liability
Partnership

Republic of Kazakhstan , 010000,
Astana city, str. Ualikhanov, 13/1
Tel./ fax: + 7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru; www.rcm.kz
BIN 061140003586

Товарищество с ограниченной
ответственностью
«Республиканская коллекция
микроорганизмов»

Республика Казахстан, 010000, г.
Астана, ул. Ш. Уалиханова, 13/1
тел./ факс: + 7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru; www.rcm.kz
БИН 061140003586

29.12.2023 № 0542-610

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМА

Кому: Шаймерденовой Ұ.Т., Ерназаровой А.К., Кайырмановой Г.К.
(имя и/или наименование организации и адрес депозитора, которым выдается
свидетельство о депонировании)
НАО «КазНУ им. аль-Фараби»

1. НАЗВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМА

Bacillus subtilis

Опознавательная ссылка (номер, ссылка и
т.п., присвоенный штамму депозитором)

A9

Коллекционный номер,
присвоенный коллекцией

B - RKM 1111

2. НАУЧНОЕ ОПИСАНИЕ И/ИЛИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМА

Род: *Bacillus*
Вид: *subtilis*

Микроорганизмы, поименованные в пункте 1, сопровождаются ходатайством о
депонировании, включающем



¹ Паспорт



¹ Заключение об исследовании
класса опасности

Қазақстан Республикасы, 010000, Астана қаласы,
«Байқоңыр» ауданы, Уәлиханов к., 13/1 үй

Republic of Kazakhstan , 010000, Astana city,
«Baikonyr» district, str. Ualikhanov, house 13/1

Республика Казахстан, 010000, город Астана,
район «Байқоңыр», ул. Уәлиханова, дом 13/1

000361