

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D05105 – «Биотехнология»

Шаймерденова Ұлжан Тұрғанбекқызы

«Повышение нефтеотдачи пластов на основе аборигенных микроорганизмов месторождений Западного Казахстана»

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена исследованию микробного разнообразия образцов пластовых вод месторождений Западного Казахстана и скринингу выделенных из них биосурфактант и биополимер продуцирующих микроорганизмов. Изучены микробиологические (морфолого-культурные, физиолого-биохимические) и молекулярно-генетические характеристики штаммов микроорганизмов с целью установления их филогенетической принадлежности. Проведены химические исследования, направленные на выявление свойств биосурфактант и биополимер продуцирующих микроорганизмов, и лабораторные оценки эффективности перспективных штаммов по извлечению нефти.

Актуальность темы исследования. Нефтегазовая отрасль занимает одно из ключевых мест в экономике Казахстана. При разработке месторождений традиционными методами и высоком уровне обводнённости добываемой продукции, по различным оценкам, от 25% до 70% нефтяных запасов остаются в недрах. Большинство месторождений страны характеризуются низкой проницаемостью коллекторов, высокой вязкостью нефти и сложным геологическим строением, что относит их к категории трудноизвлекаемых запасов.

В связи с этим, на фоне интенсивной добычи нефти, актуальной стала проблема повышения нефтеотдачи месторождений. С 1960-х годов в Казахстане начали реализовываться пилотные проекты по увеличению нефтеотдачи. В настоящее время применяются методы повышения нефтеотдачи, такие как термические и нетермические.

Микробиологическое увеличение нефтеотдачи (МУН) представляет собой привлекательный альтернативный подход в добыче нефти. Однако для практического применения технологии МУН в полевых условиях недостаточно фундаментальных исследований, проведённых в этом направлении. Данный метод успешно применяется в зарубежных странах, при этом состав нефти и условия эксплуатации скважин существенно различаются в зависимости от региона. Поэтому необходимы исследования с использованием технологии МУН на нефтяных месторождениях Казахстана, большинство из которых находятся на поздней стадии разработки.

В технологии МУН используются микроорганизмы и их метаболиты, среди которых наибольший интерес представляют биосурфактанты и биополимеры. Биосурфактанты способствуют повышению нефтеотдачи за счёт таких механизмов, как снижение межфазного и поверхностного натяжения между нефтью и водой, образование водонефтяных эмульсий, а

также изменение смачиваемости породы с масляной на водяную. Биополимеры способны увеличивать вязкость вытесняющей жидкости, улучшать профиль закачки и избирательно блокировать высокопроницаемые зоны пласта, способствуя более эффективному вытеснению остаточной нефти из низкопроницаемых участков. Кроме того, биосурфактанты и биополимеры обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими поверхностно-активными веществами: они менее токсичны, биоразлагаемы, устойчивы к экстремальным условиям (рН, температура, солёность) и потенциально более экономичны, поскольку могут производиться из возобновляемого сырья или промышленных отходов.

Цель исследования: Характеристика микробного разнообразия пластовых вод месторождений Акинген и Восточный Макат и выделение перспективных биосурфактант и биополимер продуцирующих микроорганизмов для повышения нефтеотдачи пластов.

Задачи исследования:

1. Проведение физико-химического анализа пластовых вод нефтяных месторождений Западного Казахстана;
2. Определение микробного разнообразия пластовых вод месторождений Западного Казахстана;
3. Скрининг и идентификация биосурфактант продуцирующих микроорганизмов, выделенных из пластовых вод;
4. Выявление генов, кодирующих синтез биосурфактантов (*surfAA*, *surfAB*, *surfAC*, *surfAD*, *surfP*, *lchAA*) и биополимера (*sacB*), у отобранных штаммов микроорганизмов;
5. Изучение структурных характеристик биосурфактантов и биополимеров, продуцируемых отобранными штаммами микроорганизмов;
6. Определение коэффициента извлечения нефти на основе биосурфактант и биополимер продуцирующих микроорганизмов, выделенных из нефтяных месторождений Западного Казахстана.

Объекты исследования:

Объектами исследования являлись образцы пластовых вод, отобранные с нефтяных месторождений Западного Казахстана для изучения микробного разнообразия, а также чистые культуры микроорганизмов, выделенные из этих образцов.

Методы исследования:

В ходе выполнения диссертационной работы были применены современные методы: метагеномный анализ на платформе *Illumina MiSeq*, классические микробиологические и физико-химические методы, молекулярно-генетические методы (секвенирование фрагмента гена 16S рРНК, наличие генов методом ПЦР, экспрессия генов методом qPCR), а также тензиометр и ИК-Фурье спектроскопия.

Научная новизна исследования:

Впервые была проведена комплексная характеристика микробного разнообразия пластовых вод месторождений Акинген и Восточный Макат.

Выявлены структурные особенности микробных сообществ, характерные для каждого месторождения. На уровне классов в пластовых водах месторождения Акинген доминировали *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* и *Bacill*. В пластовых водах месторождения Восточный Магат преобладали *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia* и *Methanomicrobia*.

В первые были выделены 33 штамма микроорганизмов из месторождений Акинген и Восточный Магат. Был проведён их качественный и количественный скрининг на продуцирование биосурфактантов. Отобраны 6 биосурфактант продуцирующих микроорганизмов, видовая принадлежность которых определена как *Bacillus safensis* A2, *Bacillus subtilis* A8, A9 и A12, *Bacillus paralicheniformis* R4 и *Bacillus licheniformis* PW2. У отобранных штаммов микроорганизмов было выявлено наличие генов, ответственных за синтез биосурфактантов и биополимеров, и исследована их экспрессия:

- ген *urfAA* – у 4 штаммов: *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12), *Bacillus licheniformis* PW2;
- ген *urfAB* – у 2 штаммов: *Bacillus subtilis* (A8, A9);
- ген *urfAC* – у 3 штаммов: *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12);
- ген *urfAD* – у 3 штаммов: *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12);
- ген *urfP* – у 4 штаммов: *Bacillus safensis* A2, *Bacillus subtilis* (A8, A9);
- ген *lchAA* – у *Bacillus licheniformis* PW2;
- ген *sacB* – у 4 штаммов: *Bacillus subtilis* (A8, A9, A12), *Bacillus licheniformis* PW2.

Максимальный выход биосурфактанта у штамма *B. subtilis* A8 (1,33 г/л) был получен при культивировании на среде с мелассой в качестве источника углерода. Максимальный выход биополимера у *B. subtilis* A12 (0,42 г/л) наблюдался при использовании в питательной среде сахарозы и соевой муки.

Впервые при лабораторной оценке с использованием песка, природного керна, пластовой воды и микробных ассоциаций установлен коэффициент извлечения нефти: $23,2 \pm 2,5\%$ для штамма *B. subtilis* A9 и $24,4 \pm 3,1\%$ для ассоциации *B. subtilis* A8 : *B. subtilis* A9, что значительно превышает контрольное значение (4%) без применения микроорганизмов.

Научная и практическая значимость работы:

Выделенны и идентифицированы биосурфактант продуцирующие штаммы, зарегистрированные в международной базе данных GenBank: *Bacillus safensis subsp. safensis* A2 (OP565012), *Bacillus subtilis* A8 (OP565013), *Bacillus subtilis* A9 (OP565014), *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A12 (OP565015), *Bacillus paralicheniformis* R4 (OP565016) и *Bacillus licheniformis* PW2 (OP565017). Все штаммы микроорганизмов депонированы в ТОО «Республиканская коллекция микроорганизмов» (РКМ) под номерами №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 от 29.12.2023 г.

Установлено, что в модельных экспериментах по вытеснению нефти использование штамма *B. subtilis* A9 обеспечивает коэффициент извлечения на уровне $23,2 \pm 2,5\%$, а ассоциация *B. subtilis* A8: *B. subtilis* A9 — $24,4 \pm 3,1\%$, что существенно выше по сравнению с контрольными образцами, в которых извлечение нефти не превышало 4%, с абсолютным приростом на 19,2 и 20,4 процентных пункта соответственно.

Получен патент Республики Казахстан на полезную модель «Биосурфактант продуцирующий штамм *Bacillus subtilis* A9, используемый для микробиологического повышения нефтеотдачи пластов №9060 от 02.02.2024 г.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Микробное разнообразие пластовых вод месторождений Акинген и Восточный Макат представлено *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Clostridia*, *Gammaproteobacteria* и *Bacilli*, а также *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* и *Methanomicrobia*.

2. Биосурфактант продуцирующие штаммы идентифицированы и зарегистрированы в базе данных GenBank: *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. Максимальный выход биосурфактанта у штамма *B. subtilis* A8 при выращивании на мелассе в качестве источника углерода составил 1,33 г/л по сравнению с молочной сывороткой (0,1 г/л).

4. Высокие значения коэффициента извлечения нефти были получены при использовании *B. subtilis* A9 ($23,2 \pm 2,5\%$) и применении ассоциации *B. subtilis* A8 и *B. subtilis* A9 ($24,4 \pm 3,1\%$), что на 19,2 и 20,4 процентных пункта превышает контрольный показатель (4%) соответственно.

Личный вклад автора:

Анализ литературных источников по исследуемой проблеме, формулировка цели и задач исследования, проведение экспериментальных работ, статистическая обработка и анализ полученных результатов, написание научных статей и текста диссертации, оформление рукописи выполнены автором самостоятельно.

Связь работы с государственными программами:

Диссертационная работа выполнена в рамках проекта AP19577160 «Исследование микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты и их применимость для увеличения нефтеотдачи пластов» №0123РК00131 (2023–2025 гг.).

Апробация научной работы:

Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

- VI Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Мир Фараби», 2021 г., Алматы, Казахстан;
- VI Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Мир Фараби», 2022 г., Алматы, Казахстан;

- XII Международная научно-практическая конференция «Современные тенденции развития науки и мирового сообщества в эпоху цифровизации», 2023 г., Москва, Россия;
- VI Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Мир Фараби», 2023 г., Алматы, Казахстан;
- Международный форум «Современные тенденции устойчивого развития биологических наук», 2024 г., Алматы, Казахстан;
- ICASET-2024 International Conference on Advances in Science, Engineering and Technology, 23–24 августа 2024 г., Ханой, Вьетнам.

Публикации:

Основные результаты диссертации опубликованы в 12 научных трудах, среди которых: 3 статьи в отечественных рецензируемых журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования; 3 статьи в журналах, входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science: Scientific Reports (перцентиль 92, Q1), Frontiers in Microbiology (перцентиль 73, Q2), Journal of Environmental Management and Tourism, 4 тезиса в материалах международных конференций, проведенных в Казахстане и 2 статьи в материалах зарубежных и отечественных международных конференций.

Структура диссертации:

Диссертационная работа изложена на 117 страницах основного текста. Состоит из нормативных ссылок, определений, обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и списка использованных источников, включающего 210 наименований. Работа содержит 26 рисунков, 15 таблиц и 5 приложений.