

*На правах рукописи*

Ершов Алексей Павлович

**РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НЕФТЯНЫХ  
ПЛАСТОВ И СПОСОБЫ ПОДАВЛЕНИЯ СУЛЬФИДОГЕНОВ**

1.5.11 – Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

**Научный руководитель:**

**Назина Тамара Николаевна**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией нефтяной микробиологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

**Официальные оппоненты:**

**Ившина Ирина Борисовна**, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

**Галушко Александр Сергеевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Агрофизический научно-исследовательский институт»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Защита состоится 25 декабря 2024 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН [https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii\\_ershov-a-p.html](https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_ershov-a-p.html)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета**

доктор биологических наук  
Хижняк Татьяна Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В нефтяных пластах обитают анаэробные микробные сообщества, активность которых существенно возрастает при эксплуатации пластов с применением заводнения поверхностной или отделённой от нефти пластовой водой (Назина, Беляев, 2004; Magot, 2005). Заводнение приводит к увеличению давления, водо- и массообмена в нефтяном пласте и поступлению кислорода, растворённого в нагнетаемой воде, что стимулирует биodeградацию нефти (Беляев и соавт., 1982; An et al., 2013; Head et al., 2014; Vigneron et al., 2017). В нефтяных пластах, не содержащих сульфатов в пластовой воде, основным терминальным процессом биodeградации нефти является метаногенез, тогда как при наличии сульфатов в пластовой или нагнетаемой воде более активны сульфатовосстанавливающие прокариоты и преобладает сульфидогенез (Orphan et al., 2000; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Nazina et al., 2017a). Наряду с сульфатовосстанавливающими бактериями (СВБ) и археями ряд бродильных бактерий способен восстанавливать окисленные соединения серы (сульфит, тиосульфат, серу) до сульфида. Образование сероводорода приводит к снижению качества нефти и газа, закупориванию пор пласта сульфидами, коррозии стального оборудования и экологическим проблемам (Agrawal et al., 2014; Gieg et al., 2011; Liang et al., 2016; Knisz et al., 2023). Жизнедеятельность сульфидогенов необходимо учитывать особенно при выборе нефтяных пластов для применения микробиологических методов увеличения нефтеотдачи (ММУН).

ММУН основаны на внесении окислителей и биогенов для активации пластовой (или интродуцированной) микробиоты, деградирующей нефть или углеводородные субстраты, внесённые с поверхности (Беляев и соавт., 2004; Ибатуллин и соавт., 2005; Youssef et al., 2009; Wu et al., 2022). Образуемые микроорганизмами нефтевытесняющие метаболиты включают органические кислоты, спирты, поверхностно-активные вещества (биоПАВ, биосурфактанты), биополимеры и газы ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ). Наиболее часто применяются ММУН, основанные на образовании биоПАВ аэробными бактериями родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* и др. (Raaijmakers et al., 2010; Ivshina et al., 2024). Нагнетание окислителя или органических субстратов в пласт приводит к активации микроорганизмов всех физиологических групп, включая сульфидогенов (Назина и соавт., 1999a), которые способны расти на *n*-алканах и ароматических компонентах нефти (Galushko et al., 2001, 2003). В этой связи актуален поиск способов воздействия, позволяющих активировать целевые группы микроорганизмов, образующих нефтевытесняющие метаболиты, при одновременном подавлении роста сульфидогенов.

Одним из способов подавления роста СВБ является нагнетание в пласт биоцидов, которые селективно ингибируют рост СВБ и способствуют снижению образования сульфида в пластовой воде (Gieg et al., 2011; Senthilmurugan et al., 2019). Однако формирование в пласте биоплёнок повышает устойчивость микробного сообщества к биоцидам (Elumalai et al., 2021; Shi et al., 2021; Pereira et al., 2021).

Альтернативным методом подавления биогенного образования сульфида является нитратное заводнение (Davidova et al., 2001; Grigoryan et al., 2009; Prajapat et al., 2023). Нагнетание нитратов активирует рост денитрифицирующих бактерий (ДНБ) в нефтяном пласте. Поскольку процесс денитрификации энергетически более выгоден,

чем сульфатредукция, возникает конкуренция ДНБ с СВБ за доступные органические субстраты (Da Silva et al., 2014). Кроме того, образуемый в ходе денитрификации нитрит связывается с сульфидом, а также ингибирует активность альфа-субъединицы диссимиляционной сульфитредуктазы DsrA, тем самым снижая образование сульфида в пластовой воде (Vødtker et al., 2009; Gittel et al., 2009). Важно отметить, что многие ДНБ способны расти аэробно за счёт окисления углеводородов нефти, образуя при этом биоПАВ, что обуславливает значимость этих бактерий как для биотехнологий увеличения нефтеизвлечения, так и для снижения содержания сульфида в пласте.

Нефтяные месторождения, расположенные в Республике Татарстан (РФ) и Республике Казахстан, длительное время эксплуатируются с применением заводнения. Значительная доля остаточных запасов извлекаемой нефти залегает в пластах с высокоминерализованной пластовой водой. В настоящее время существует необходимость в разработке микробиологических методов увеличения нефтеизвлечения для пластов с высокой солёностью пластовой воды. Выбор ММУН возможен только после предварительного анализа экологических условий и состава микробного сообщества нефтяного пласта, что и определяет актуальность настоящего исследования.

**Степень разработанности темы.** Накоплена научная информация о составе микробных сообществ нефтяных пластов с низкоминерализованными водами, тогда как микроорганизмы нефтяных пластов с высокосолёной пластовой водой, эксплуатирующихся путем нагнетания морской воды, остаются малоизученными. Физиологические и геномные признаки галофильных и галотолерантных бактерий из нефтяных пластов, равно как и механизмы их адаптации к экологическим условиям обитания, описаны в меньшей степени, чем пресноводных изолятов. Несмотря на широкое применение нитрата и различных групп биоцидов для подавления роста сульфидогенной микробиоты, влияние этих соединений на разнообразие и функциональную активность прокариотных сообществ нефтяных пластов изучено фрагментарно. Лишь в отдельных публикациях исследована устойчивость биоплёнок, образуемых пластовыми микроорганизмами, к воздействию биоцидов. Эти исследования необходимы как с фундаментальной точки зрения для расширения научного знания в области нефтяной микробиологии, так и для использования микроорганизмов в практике нефтедобывающей промышленности в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения и подавления продукции сульфида в нефтяных пластах.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы было определение филогенетического разнообразия микроорганизмов в нефтяных пластах с высокой солёностью пластовой воды, выделение углеводородокисляющих и денитрифицирующих бактерий и оценка возможности их применения в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения и подавления сульфидогенеза.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выполнить сравнительный анализ состава микробных сообществ нефтяных пластов России и Казахстана, различающихся экологическими условиями.
2. Оценить влияние заводнения морской водой на филогенетическое разнообразие микробных сообществ нефтяных пластов месторождения Узень и выявить микробные агенты, ответственные за образование сульфида.

3. Определить влияние биоцидов и нитрата на планктонный и биоплёночный рост сульфидогенных микроорганизмов.

4. Выделить чистые культуры углеводородокисляющих и денитрифицирующих бактерий из нефтяных пластов, определить их таксономическое положение, фенотипические и геномные характеристики и потенциал для применения в биотехнологиях вытеснения нефти и подавления сульфидогенеза.

**Научная новизна.** С помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК и функциональных генов *dsrAB* определён состав микробных сообществ нефтяных пластов с высокосолёной пластовой водой и разными физико-химическими условиями, расположенных в России и Казахстане. Впервые проведено сравнение устойчивости планктонных и биоплёночных форм пластовых микроорганизмов к воздействию коммерческого биоцида (на основе четвертичных солей аммония), глутарового альдегида и нитрата, а также выявлены ограничения для биотехнологического применения биоцида. Из нефтяных пластов выделено и охарактеризовано 16 штаммов углеводородокисляющих, в том числе галотолерантных, и денитрифицирующих бактерий. Получены последовательности геномов бактерий *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 (GCF\_013371285.1), *Halomonas* (= *Vreelandella*) *titanicae* TAT1 (GCF\_013371485.1) и *Ensifer oleiphilus* HO-A22<sup>T</sup> (GCF\_013371465.1). В результате биоинформатического анализа геномов были подтверждены данные феноменологических наблюдений и выявлены гены, детерминирующие деградацию алканов и устойчивость к повышенной солёности, определяющие биотехнологическое применение штаммов. На основе фенотипических исследований и геномного анализа описан и таксономически узаконен новый вид бактерий *Ensifer oleiphilus* sp. nov., способных к окислению алканов нефти с образованием нефтевытесняющих метаболитов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты оценки влияния биоцидов на планктонный и биоплёночный рост сульфидогенов показали необходимость корректировки концентраций коммерческих биоцидов, применяемых на нефтяных месторождениях, с учетом большей устойчивости к ним бактерий, формирующих биоплёнку. Выделены и охарактеризованы бактерии родов *Marinobacter*, *Rhodococcus* и *Gordonia*, эффективно деградирующие нефть с образованием поверхностно-активных веществ. Защищённый патентом штамм *Rhodococcus erythropolis* HO-KS22 перспективен для использования в биотехнологиях биоремедиации загрязнённых нефтью местообитаний, увеличения нефтеизвлечения и очистки нефтепромыслового оборудования от асфальтосмолопарафиновых отложений.

**Методология и методы исследования.** В процессе выполнения настоящей работы для получения и анализа результатов был применён широкий спектр микробиологических, молекулярно-биологических и аналитических методов, а также биоинформатического и статистического анализа. Разнообразие использованных методов и комплементарное подтверждение результатов с их помощью свидетельствует о достоверности и воспроизводимости полученных данных.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В микробных сообществах нефтяных пластов России и Казахстана присутствуют аэробные органотрофные, анаэробные бродильные, сульфатвосстанавливающие бактерии и метаногенные археи, преимущественно

относящиеся к классам *Desulfovibrionia*, *Methanococci*, *Synergistia* и *Thermotogae*, приспособленные к условиям местообитания.

2. На участках нефтяного месторождения Узень с низким содержанием сульфата преобладают бродильные бактерии и метаногенные археи рода *Methanothermococcus*. Заводнение пласта морской водой, богатой сульфатом, приводит к смене микробного сообщества на сульфидогенное и доминированию бактерий родов *Desulfonauticus*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulforhabdus* и *Defluviitoga*.

3. Подавление роста сульфидогенов в нефтяном пласте биоцидами не всегда эффективно вследствие формирования биоплёнок, а внесением нитрата – из-за его восстановления денитрифицирующими бактериями до молекулярного азота. В связи с этим необходим предварительный метагеномный анализ подземного микробного сообщества и использование комплементарных способов воздействия на сульфидогенов.

4. Нефтяные пласты России и Казахстана населены углеводородокисляющими и денитрифицирующими бактериями, в том числе относящимися к родам *Marinobacter*, *Halomonas*, *Rhodococcus* и *Ensifer*, которые приспособлены к условиям обитания и могут быть использованы в биотехнологиях повышения нефтеизвлечения и подавления сульфидогенеза.

5. Геном углеводородокисляющего штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> демонстрирует значимые отличия от геномов валидно описанных видов рода *Ensifer*. Анализ геномных и фенотипических признаков этого штамма позволяет отнести его к новому виду *Ensifer oleiphilus* sp. nov.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты диссертационной работы получены с использованием современных микробиологических, молекулярно-биологических и аналитических методов на сертифицированном оборудовании, адекватны поставленным задачам и статистически обработаны. Достоверность результатов подтверждается опубликованием материалов в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих российских и международных научных конференциях: International Biotechnology and Research Conference (Rome, Italy, 2018), Международный молодежный научный форум «Ломоносов» (Москва, 2018, 2019), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020), 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 2021), 8<sup>th</sup> International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (Virtual Symposium, 2021), Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology: The Thirteenth International Multiconference (Novosibirsk, 2022), XXXIV и XXXV международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2022, 2023).

**По теме диссертационной работы опубликовано** 17 печатных работ, в том числе 8 статей в журналах Перечня ВАК РФ и международных реферативных баз, 1 патент РФ на изобретение и 8 тезисов конференций.

**Объём и структура диссертационной работы.** Диссертация изложена на 127 страницах и включает 27 рисунков и 17 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, а также экспериментальной части, включающей описание объекта и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения,

выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы из 243 наименований, в том числе 23 на русском и 220 на английском языке.

**Связь работы с научными программами и личный вклад соискателя.** Работа выполнена в соответствии с планами лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, определяемыми Госзаданиями Минобрнауки РФ (АААА-А19-119010590007-3 и 122040800164-6), поддержана грантами Российского научного фонда №№ 16-14-00028, 16-14-00028-П и 21-64-00019), договором 274109/2019/1 с ТОО «КМГ Инжиниринг» «КазНИПИМунайгаз» и стипендией Правительства Российской Федерации на 2021/2022 учебный год для аспирантов по специальностям или направлениям подготовки, соответствующим приоритетным направлениям модернизации и технологического развития российской экономики. Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных источников по теме работы, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании научной работы, статей и тезисов и представлении работы на научных конференциях.

**Место проведения работы и благодарности.** Работа выполнена в лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН с 2016 по 2024 годы. Соискатель выражает глубокую признательность сотрудникам ФИЦ Биотехнологии РАН д.б.н., профессору А.В. Марданову и к.б.н. В.В. Кадникову за секвенирование геномов и определение состава микробных сообществ; к.б.н. Н.Г. Лойко за электронно-микроскопические исследования выделенных штаммов; к.б.н. Е.А. Януцевич за анализ фосфолипидов бактерий; а также к.б.н. А.Б. Полтараусу (ИМБ РАН) за секвенирование генов чистых культур и к.б.н. А.Н. Автуху (ИБФМ РАН) за хемотаксономический анализ изолятов. Особая благодарность к.б.н. Д.С. Груздеву и д.б.н. Т.П. Туровой за помощь в биоинформатическом анализе геномов, сотрудникам нефтедобывающих компаний за предоставление проб пластовых флюидов, а также коллегам по лаборатории к.б.н. Е.М. Семеновой, к.б.н. Т.Л. Бабич, к.б.н. Д.Ш. Соколовой и к.б.н. С.Х. Биджиевой за помощь в освоении новых методов, в анализе полученных результатов и за моральную поддержку в трудные моменты. Наибольшую благодарность соискатель выражает своему научному руководителю д.б.н. Тамаре Николаевне Назиной за профессиональные наставления, за помощь в выборе и построении собственного научного пути, за неустанную генерацию новых идей и скрупулёзную огранку старых, за понимание и поддержку в тяжёлые периоды жизни и за неугасимую веру в соискателя, несмотря ни на что.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектом исследования были микроорганизмы пластовой и нагнетаемой воды нефтяных месторождений Республики Татарстан (РФ) и Республики Казахстан. Для культивирования микроорганизмов использовали модифицированные минеральные среды Адкинса (Adkins et al., 1992) и Видделя-Пфеннига (Widdel, Pfennig, 1981) и богатые среды ТЕГ (Ershov et al., 2023) и Постгейта (Postgate, 1984). В качестве носителя для формирования биоплёнок использовали стальной купон, в качестве биоцидов – Ранцид-7005 и глутаровый альдегид. Морфологию клеток изучали с использованием светового микроскопа Olympus CX41 и сканирующего электронного

микроскопа Thermo Fisher Scientific Quattro S. Фенотипические признаки штаммов бактерий определяли с помощью тестов bioMérieux API® ZYM, API® 20E и API® 50CH и дисков HiMedia с антибиотиками.

Выделение ДНК из биомассы чистых культур бактерий проводили с использованием набора «Diatom™ DNA Prep 100» ("Лаборатория Изоген"). Для амплификации генов 16S рРНК использовали праймеры 8-27f и 1492r, для *dsrA* – DSR-1Fdeg и PJdsr853Rdeg, для *dsrB* – DSR 2060F и DSR 4R. Секвенирование очищенных ПЦР-продуктов этих генов проводили с использованием автоматического секвенатора 3730 DNA Analyzer и набора «ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 reagent kit» (Applied Biosystems). Выделение тотальной ДНК из проб пластовой воды проводили стандартным методом (Маниатис и соавт., 1984); секвенировали V3–V4 регионы генов 16S рРНК с использованием набора реагентов «Illumina MiSeq Reagent Kit v3». Геномную ДНК выделяли с помощью набора «QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit» и секвенировали в лаборатории геномики микроорганизмов и метагеномики (рук. д.б.н., профессор А.В. Марданов) ФИЦ Биотехнологии РАН с использованием платформы Illumina HiSeq 2500.

Оптическую плотность образцов оценивали с использованием спектрофотометра Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro. Формирование биоплёнок на плотных носителях (керн и стальной купон) и рост планктонной культуры определяли методом окрашивания с МТТ и ДМСО на основе предложенного ранее метода (Wang et al., 2010; Плакунов и соавт., 2016). Содержание сульфид-иона измеряли колориметрическим методом (Trüper, Schlegel, 1964). Поверхностное и межфазное натяжение определяли с помощью полуавтоматического тензиометра Cole-Parmer Surface Tensiomat 21 методом отрыва платиноиридиевого кольца. Алканы нефти анализировали на газовом хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.1». Остаточное содержание алканов рассчитывали относительно контрольной пробы по методу внутренней нормализации (Богомолов, Абрютина, 1984).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ В НЕФТЯНЫХ ПЛАСТАХ РОССИИ И КАЗАХСТАНА**

Исследованные нефтяные пласты Республики Татарстан (РФ) и Республики Казахстан различались физико-химическими условиями (температурой, рН и солёностью пластовой воды, содержанием сульфатов и сульфида), типом нефти и вмещающих пород. Ряд исследованных нефтяных пластов эксплуатировался с применением заводнения, что оказывало влияние на общую минерализацию пластовой воды, а также приводило к поступлению в пласт кислорода, растворённого в нагнетаемой воде. На большей части месторождений пластовую воду, отделённую от нефти, смешивали с нагнетаемой водой из других источников, а полученную смесь снова закачивали в пласт.

Нефтяные пласты, расположенные в Республике Татарстан, характеризовались температурой 20–40°C; нефтяные пласты месторождений Каражанбас и Узень в Республике Казахстан преимущественно были высокотемпературными (до 75°C). Нефтяные месторождения Казахстана характеризовались высокой солёностью

пластовой воды до 80 г/л и отсутствием сульфатов и сульфидов в воде. На месторождении Узень для поддержания пластового давления нагнетали морскую воду из Каспийского моря, с минерализацией 11–12 г/л и содержанием сульфатов до 3 г/л. В результате заводнения общая минерализация пластовой воды на ряде участков снижалась до 14–37 г/л, пластовая вода обогащалась сульфатами, содержание которых достигало 1,28 г  $\text{SO}_4^{2-}$ /л, что приводило к активации сульфидогенных процессов и образованию около 160 мг сульфида/л в отдельных пробах.

Из 80 исследованных проб для детального анализа было выбрано 18 наиболее показательных проб пластовой воды. В этих пробах культуральными методами были обнаружены бродильные бактерии (от 10 до  $10^8$  кл/мл), аэробные органотрофные бактерии (от  $10^2$  до  $10^4$  кл/мл) и метаногенные археи (не более  $10^4$  кл/мл). Сульфатвосстанавливающие прокариоты, как правило, отсутствовали в пробах бессульфатной пластовой воды; в большинстве исследованных проб они не обнаруживались на среде с лактатом, однако в некоторых пробах из нефтяного месторождения Узень их численность составляла  $10^2$ – $10^8$  клеток/мл, что создавало условия для сульфидогенеза и коррозии нефтепромыслового оборудования.

В библиотеках генов 16S рРНК исследованных проб значительная доля филоотипов относилась к классам *Desulfovibrionia*, *Methanococci*, *Synergistia* и *Thermotogae*. Многие представители этих филогенетических групп осуществляют процессы сульфидогенеза и метаногенеза в нефтяных пластах, что согласуется с данными о физико-химических характеристиках отобранных проб. Обнаружены бактерии классов *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacilli*, к которым относятся многие аэробные углеводородокисляющие бактерии, в том числе выделенные в настоящей работе чистые культуры.

Методом канонического корреляционного анализа выполнено сопоставление состава микробных сообществ физико-химическим параметрам местообитания (температура, общая солёность, pH среды и содержание в ней сульфата и сульфида) (Рисунок 1). Исследованные сообщества кластеризовались по геохимическим характеристикам в три обособленные группы, обозначенные как кластеры «А», «Б» и «В». Изолированность этих кластеров была подтверждена статистическим алгоритмом ANOSIM (значение  $p$  равнялось 0,012). Анализ микробных сообществ в получившихся кластерах показал, что для них было характерно присутствие разных родов микроорганизмов.

Высокая температура от 55°C и невысокое содержание сульфата ( $\leq 0,23$  г/л) в пластовой воде из скважин кластера «А» коррелировали с присутствием сульфатвосстанавливающих бактерий родов *Desulfonauticus*, *Desulfoglaeba* и *Thermodesulfobacterium*. Эти бактерии способны осуществлять трансформацию окисленных серных соединений в термофильных условиях, что согласуется с их присутствием в соответствующих нефтяных пластах.

Пробы пластовой воды из скважин кластера «Б», из нефтяных пластов Татарстана, характеризовались высоким содержанием сульфата до 6,4 г/л и минеральных солей до 116 г/л, а нефтяные пласты имели низкую температуру 22–24°C. Для этих сообществ было характерно присутствие бактерий родов *Desulfoplanes*, *Desulfotignum*, *Desulfovermiculus*, *Halanaerobium* и *Halomonas*, которые способны расти в мезофильных условиях при высокой минерализации среды. Эти

сульфатовосстанавливающие и бродильные бактерии в процессе своей жизнедеятельности продуцируют сульфид, который и был зарегистрирован в указанных пробах пластовой воды.

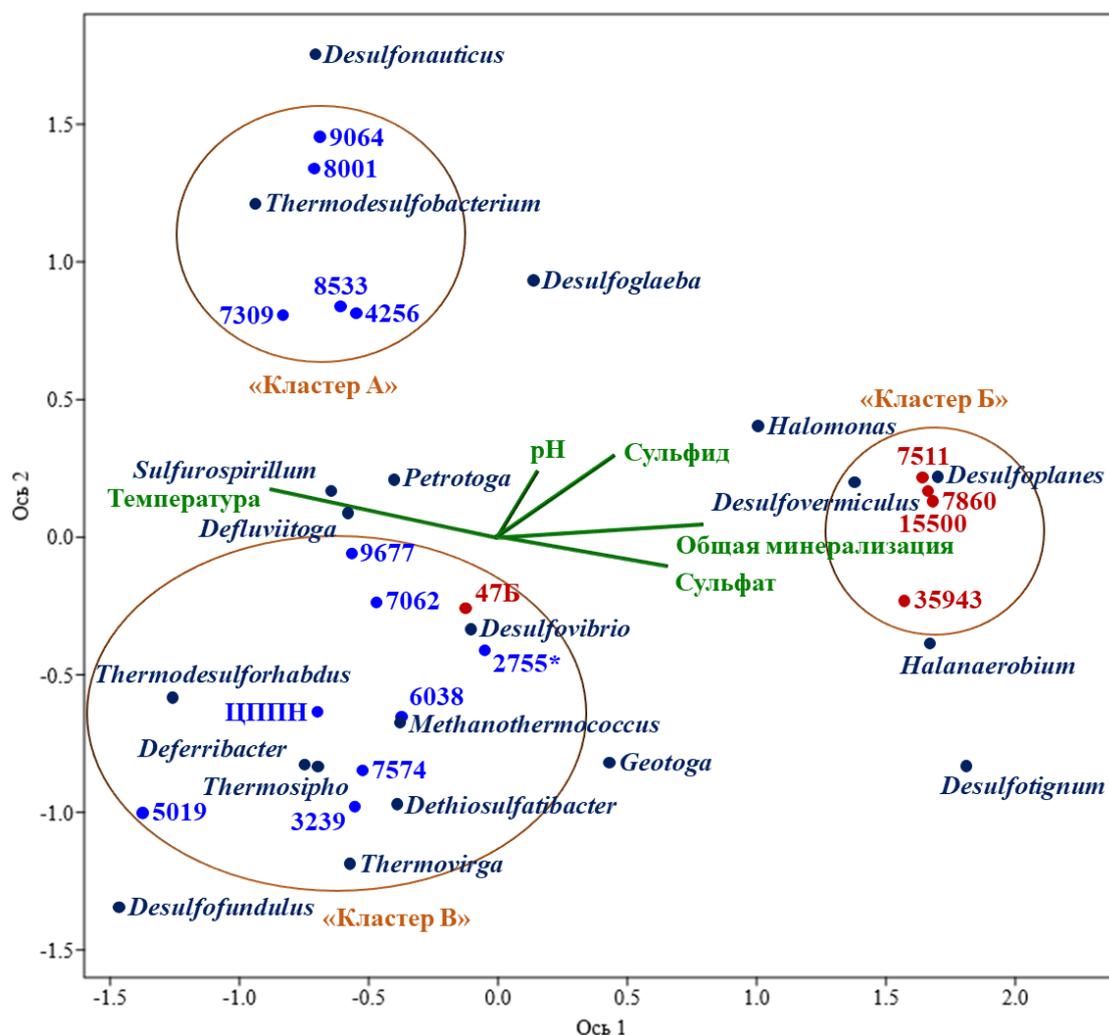


Рисунок 1 – Канонический корреляционный анализ филогенетического разнообразия прокариот и геохимических параметров пластовой воды.

Низкое содержание сульфата или его отсутствие и температура не выше 55°C были характерны для проб пластовой воды из скважин кластера «В». В этих микробных сообществах присутствовали метаногенные археи рода *Methanothermococcus* и бродильные и СВБ родов *Thermosipho*, *Thermovirga*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfovibrio*, *Desulfofundulus*, *Deferribacter*, *Defluviitoga*, *Geotoga*, *Petrotoga* и *Dethiosulfatibacter*, способные восстанавливать окисленные соединения серы. Эпсилон-протеобактерии рода *Sulfurospirillum* могут также вносить вклад в анаэробное окисление сульфида при наличии нитрата в среде обитания.

Таким образом, в исследованных сообществах присутствовали аэробные органотрофные и анаэробные бродильные и сульфатовосстанавливающие бактерии и метаногенные археи. Представленность прокариот этих функциональных групп в микробных сообществах коррелировала с физико-химическими параметрами соответствующих нефтяных пластов, что свидетельствует о приспособленности исследованных микроорганизмов к условиям местообитания.

## МИКРООРГАНИЗМЫ НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ УЗЕНЬ И ВЛИЯНИЕ НАГНЕТАНИЯ МОРСКОЙ ВОДЫ НА СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

Состав микробных сообществ пластовой воды из месторождения Узень и нагнетаемой воды Каспийского моря был определён методом анализа V3–V4 региона генов 16S рРНК. Результаты представлены в виде тепловой карты на Рисунке 2.

Большинство полученных последовательностей архей в библиотеках генов 16S рРНК принадлежало термофильным галотолерантным гидрогенотрофным метаногенам рода *Methanothermococcus* филума *Methanobacteriota* (до 81,6% от суммы последовательностей в библиотеках проб пластовой воды, отобранных на незаводняемых участках месторождения Узень). В зоне поступления нагнетаемой морской воды произошла смена доминирующих микробных популяций. Метаногенные археи рода *Methanothermococcus* были замещены термофильными сульфатовосстанавливающими бактериями рода *Desulfonauticus*.

Доминирующие в пробах пластовой воды прокариоты практически не встречались в нагнетаемой морской воде (доля их флотипов в библиотеках морской воды не превышала 0,1%). Это позволяет констатировать, что нагнетание морской воды стимулирует рост не привнесённых, а именно аборигенных микроорганизмов нефтяного пласта.

Методом высокопроизводительного секвенирования генов *dsrA* в ряде проб пластовой воды 8001, 8533 и 9064 были обнаружены флотипы бактерий, осуществляющих восстановление окисленных соединений серы. Последовательности *dsrA* генов принадлежали бактериям более чем 10 родов, включая *Desulfonauticus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfoglaeba*, *Thermodesulfobacteria*, *Desulfomicrobium* и *Moorella*. Таким образом, была подтверждена ведущая роль СВБ рода *Desulfonauticus* в процессах сульфидогенеза на месторождении Узень.

Оценка функциональной активности микробных сообществ, выполненная с помощью KEGG-анализа, показала наибольший потенциальный вклад метаногенов рода *Methanothermococcus* в метаболизм метана в пробах из зон пласта, не подверженных влиянию заводнения, тогда как СВБ рода *Desulfonauticus* вносили наибольший вклад в зоне поступления морской воды. Основной вклад в метаболизм серы вносили СВБ рода *Desulfonauticus* и тиосульфатовосстанавливающие бактерии рода *Thermovirga*. В бессульфатной пластовой воде на участках, не затронутых заводнением, основной вклад в метаболизм серы вносили метаногены рода *Methanothermococcus*, вероятно, за счёт ассимиляционных процессов.

Приведённые материалы показывают, что состав микробных сообществ оригинальной пластовой воды месторождения Узень и пластовой воды на участках, подверженных заводнению каспийской морской водой, значительно различался. В бессульфатной пластовой воде ведущую роль в циклах метана, серы и азота играли метаногенные археи рода *Methanothermococcus*. Нагнетание морской воды, содержащей сульфаты, привело к изменению состава микробных сообществ и доминированию сульфат- (*Desulfonauticus* spp.) и тиосульфатовосстанавливающих (*Thermovirga* spp.) бактерий, не встречающихся в нагнетаемой морской воде, но

присутствующих в пластовой воде в минорных количествах. Таким образом, использование морской воды для заводнения нефтяных пластов Узени создаёт высокие риски коррозии стального нефтепромыслового оборудования и резервуаров в системе подготовки воды.

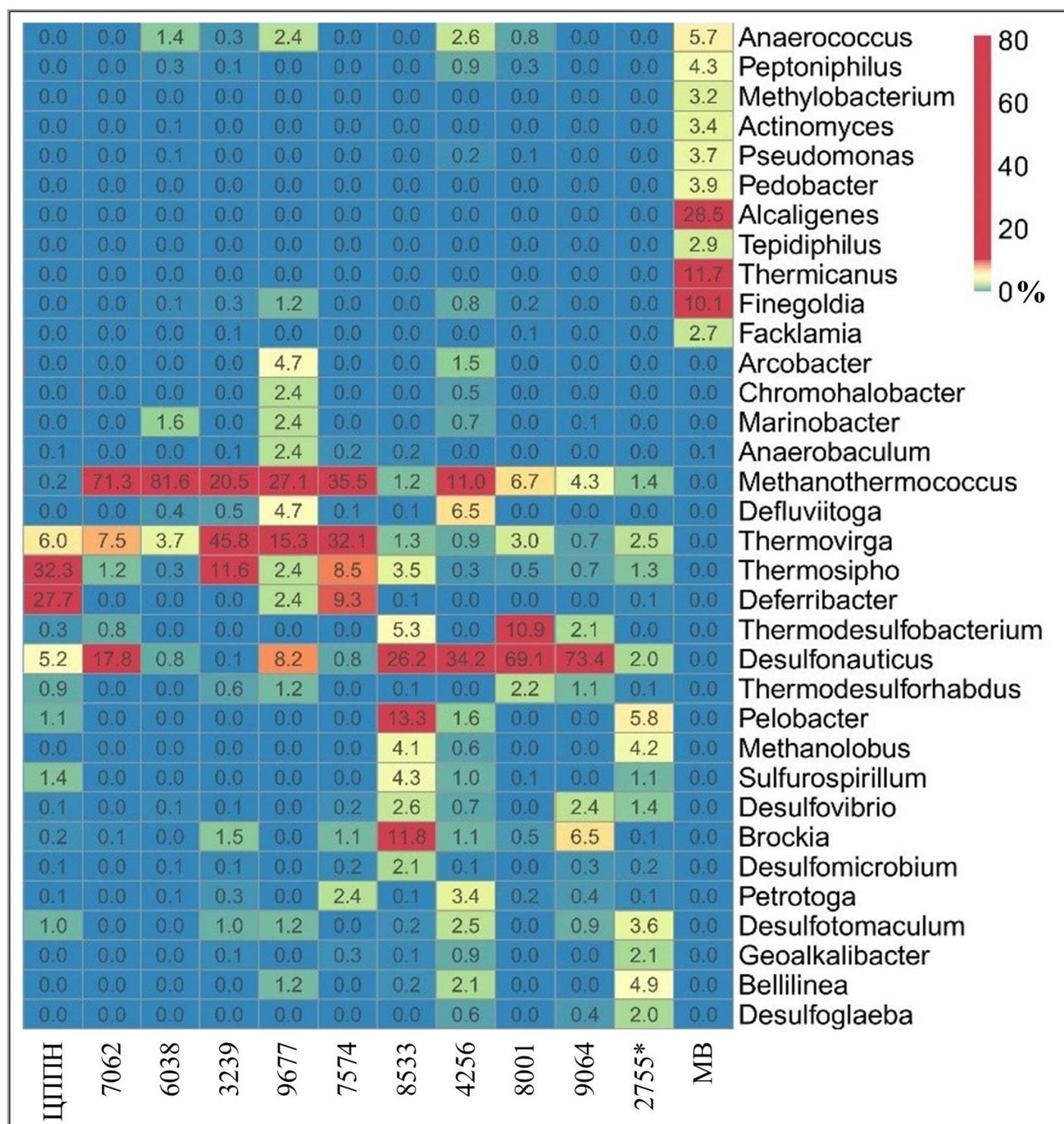


Рисунок 2 – Тепловая карта распределения доминирующих родов бактерий и архей в библиотеках фрагментов генов 16S рРНК прокариотных сообществ из месторождения Узень. Цветовой переход от синего к красному соответствует изменению относительных величин содержания отдельных родов в библиотеках от менее представленных к более представленным. Числами на тепловой карте обозначены проценты от общего количества последовательностей в библиотеке каждой пробы. Обозначения: MB, морская вода.

## ВЛИЯНИЕ БИОЦИДОВ И НИТРАТА НА ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ

Для выяснения источников образования сульфида на месторождении Узень пробы пластовой воды были посеяны на селективные среды для сульфат- и тиосульфатвосстанавливающих бактерий. В результате были получены накопительные культуры, образующие сульфид, которые были использованы для дальнейших исследований по подавлению процессов сульфидогенеза.

Для экспериментов с биоцидами было выбрано микробное сообщество 2755\* из призабойной зоны нагнетательной скважины, поскольку оно продемонстрировало высокую продукцию сульфида и характеризовалось значительным филогенетическим разнообразием микроорганизмов. Из него была выделена чистая культура СВБ *Desulfovibrio alaskensis* Kaz19, с которой проводились аналогичные эксперименты для сравнения полученных результатов.

Устойчивость микробных сообществ пластовой воды к влиянию биоцидов тестировали с использованием глутарового альдегида (в качестве положительного контроля), широко применяемого для подавления роста сульфидогенов, и промышленного биоцида Ранцид-7005, содержащего четвертичную аммониевую соль. Глутаральдегид использовали в концентрации 100 мг/л, Ранцид-7005 – в одинарной концентрации (40 мг/л), рекомендуемой производителем, а также в двойной и тройной концентрациях (80 и 120 мг/л соответственно). В течение 13 суток оценивали содержание сульфида в средах культивирования накопительной культуры из пробы 2755\* (Рисунок 3а) и штамма *D. alaskensis* Kaz19, выделенного из этой пробы (Рисунок 3б), чтобы оценить ингибирующий эффект используемых биоцидов.

Ранцид-7005 в концентрации 40–80 мг/л оказался малоэффективным против накопления сульфида как накопительной, так и чистой культурой, а концентрация 120 мг/л, превышающая рекомендуемые значения втрое, оказывала непродолжительный и слабо выраженный подавляющий эффект. Добавление глутарового альдегида полностью препятствовало накоплению сульфида в обоих вариантах эксперимента и позволяло подавить рост сульфатвосстанавливающих бактерий.

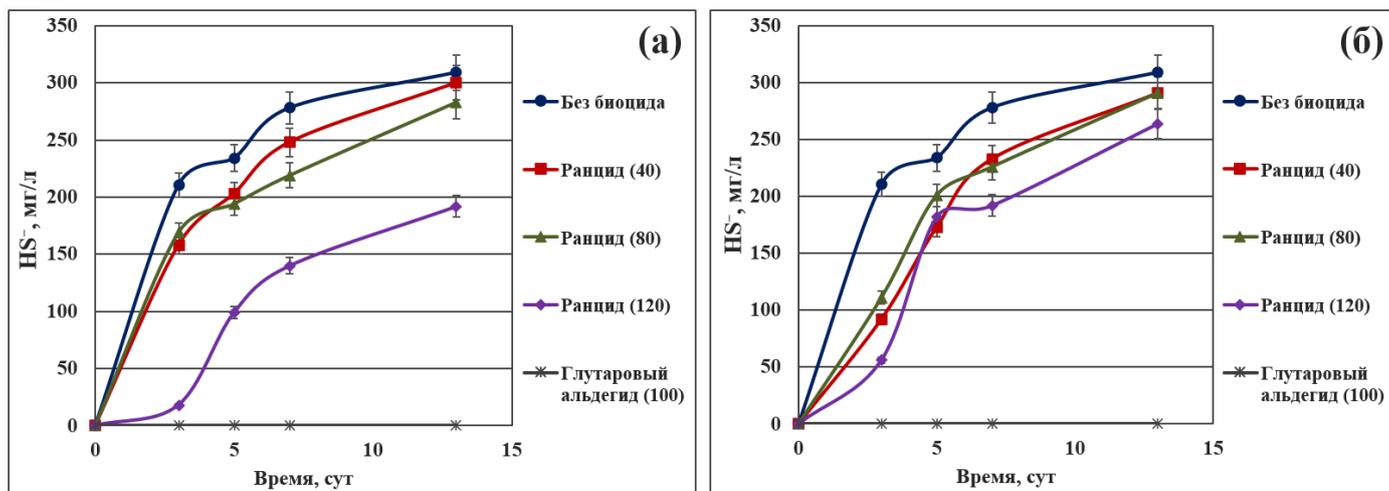


Рисунок 3 – Накопление сульфида накопительной культурой из пробы 2755\* из нефтяного месторождения Узень (а) и СВБ *Desulfovibrio alaskensis* Kaz19 (б) в присутствии глутарового альдегида (100 мг/л), биоцида Ранцид-7005 (40, 80 и 120 мг/л) и в отсутствие биоцидов в среде.

Устойчивость к Ранциду-7005 планктонных форм и биоплёнок, сформированных на стальном купоне, оценивали для накопительной и чистой культуры с помощью МТТ-теста по доле сохранивших жизнеспособность клеток. Вносили двойную и тройную концентрацию Ранцида (80 и 120 мг/л соответственно).

Накопительная культура 2755\* из призабойной зоны нагнетательной скважины месторождения Узень была чувствительна к воздействию Ранцида, однако при внесении двойной и даже тройной рекомендуемых концентраций этого биоцида 59% и 34% планктонных клеток этой культуры соответственно сохраняли жизнеспособность. Чистая культура *D. alaskensis* Kaz19, выделенная из этой же пробы 2755\*, продемонстрировала резистентность к воздействию Ранцида-7005. Биоплёнки накопительной культуры были несколько более устойчивы к этим соединениям, обеспечивая 80% и 37% выживаемости клеток при внесении 80 и 120 мг Ранцида/л соответственно, что согласуется с литературными данными о большей резистентности биоплёнок к воздействию биоцидов. Биоплёнки, образованные штаммом *D. alaskensis* Kaz19, были также практически нечувствительны к такому воздействию. Полученные результаты свидетельствуют о том, что перед масштабным применением биоцидов на месторождении необходимо оценивать их влияние как на планктонные клетки, так и на биоплёнки сульфидогенных сообществ этих нефтяных пластов.

Для исследования конкурентного подавления образования сульфида нитратом были выбраны 7 сульфидогенных микробных сообществ, восстанавливающих сульфат и тиосульфат, полученных из проб пластовой воды месторождения Узень. Накопительные культуры инкубировали на соответствующих средах, на которых они были получены, к которым добавляли нитрат кальция в концентрациях 0–2 г/л в пересчёте на нитрат-ион. Спустя 14 суток измеряли содержание растворённого сульфида (Рисунок 4а) и нитрит-иона (Рисунок 4б) в средах культивирования.

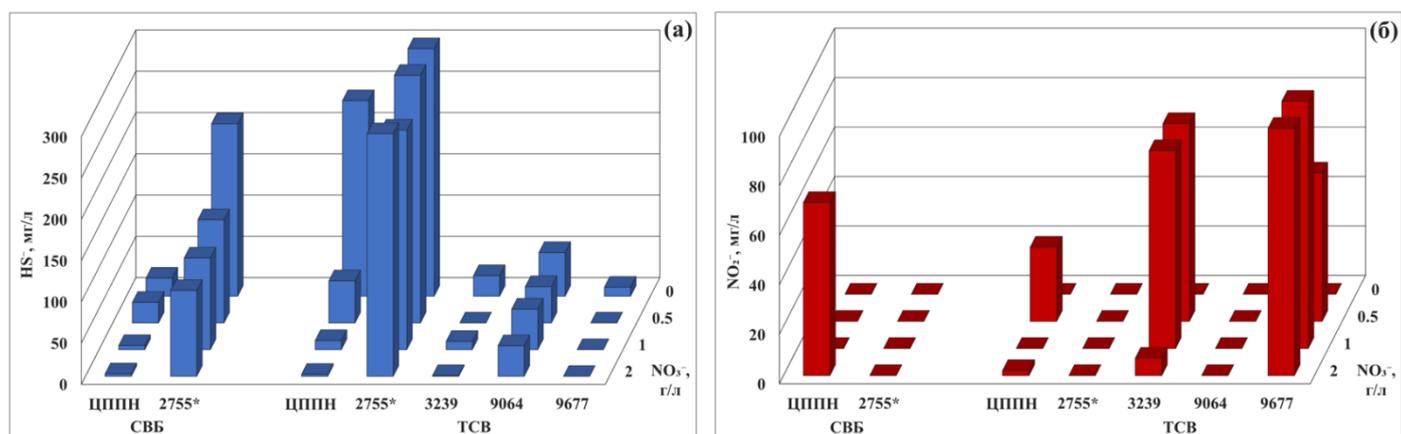


Рисунок 4 – Накопление сульфида (а) и нитрита (б) сульфат- (СВБ) и тиосульфатвосстанавливающими (ТСВ) бактериями пластовой воды месторождения Узень в присутствии разных концентраций нитрата кальция.

Культуры мезофильных сульфат- и тиосульфатвосстанавливающих бактерий из призабойной зоны нагнетательной скважины (проба 2755\*) обладали высокой устойчивостью к проверенным концентрациям нитрат-иона: при внесении 2 г  $\text{NO}_3^-$ /л нитрит не накапливался, а в газовой фазе было отмечено образование значительного количества молекулярного азота, что свидетельствует о полном восстановлении

нитрата денитрифицирующими бактериями рода *Pseudomonas* и/или другими представителями этой функциональной группы. Таким образом, большое разнообразие этого микробного сообщества препятствовало накоплению нитрит-ионов и подавлению процессов сульфидогенеза.

Образование сульфида термофильными культурами из проб ЦППН, 3239, 9064 и 9677 значительно подавлялось в присутствии 0.5–1.0 г внесённого  $\text{NO}_3^-/\text{л}$ . В культуральной жидкости исследуемых образцов накапливалось до 100 мг  $\text{NO}_2^-/\text{л}$ , что, вероятно, являлось основным механизмом подавления образования сульфида в этих культурах. В проведённых экспериментах нитрит образовывался термофильными бактериями, тогда как в мезофильных условиях присутствовали денитрифицирующие бактерии, восстанавливающие нитрат до молекулярного азота без стадии накопления нитрита. Используемые концентрации нитрата не подавляли рост мезофильных бактерий из призабойной зоны нагнетательной скважины и из поверхностных резервуаров цеха первичной подготовки нефти (ЦППН).

Для более детального анализа микробного сообщества пробы 2755\* его высевали на селективные среды с сульфатом, тиосульфатом и нитратом и определяли филогенетический состав полученных накопительных культур. Накопительные культуры на сульфате и тиосульфате из проб 2755\* и ЦППН ожидаемо были обогащены сульфидогенными бактериями родов *Desulfovibrio*, *Thermosiphon*, *Thermovirga*, *Anaerovirgula*, *Geotoga* и *Petrotoga*. Однако в библиотеках из накопительных культур на нитрате значительную (>50%) долю филоципов составляли денитрифицирующие бактерии рода *Marinobacter*, хотя эти бактерии являлись минорным компонентом исходных микробных сообществ (<0,1% от общего количества филоципов). Эти результаты свидетельствуют о возможном участии бактерий рода *Marinobacter* в подавлении сульфидогенной микробиоты при нитратном заводнении, что обуславливает необходимость изучения чистых культур бактерий этого рода, их фенотипических и геномных характеристик.

Настоящая работа с пробами из месторождения Узень проводилась в рамках договора с Товариществом с ограниченной ответственностью «КМГ Инжиниринг» (Республика Казахстан) через филиал ТОО «КМГ Инжиниринг» «КазНИПИМунайгаз», тема договора – «Исследование микробного сообщества нефтяного пласта и изучение возможности применения биотехнологий». Результаты, приведённые в отчёте по договору, были использованы нефтедобывающей компанией для корректировки концентраций биоцидов, применяемых на этом месторождении, что подтверждается опубликованием статьи Имамбаева и соавт. (2021), в которой частично приводятся полученные материалы со ссылкой на отчёт по договору.

Таким образом, показана резистентность биоплёнок сульфидогенных прокариот к коммерческому биоциду Ранцид-7005, а также устойчивость мезофильных накопительных культур, включающих денитрифицирующие бактерии, к нитратному заводнению. Наиболее эффективным способом предотвращения образования сульфида и, как следствие, коррозии нефтепромыслового оборудования в исследованных нефтяных пластах может быть одновременное нагнетание растворов биоцидов и нитратов в эффективных концентрациях.

## УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ И ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ, И ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНОМНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Из проб пластовой и нагнетаемой воды, отобранных на месторождениях Татарстана и Казахстана, было выделено 16 чистых культур аэробных органотрофных бактерий. Штаммы были идентифицированы методом анализа генов 16S рРНК и отнесены к родам *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Nocardia* и *Ensifer*. У всех штаммов был подтверждён рост на сырой нефти, определены интервалы температуры и солёности среды для роста, а также способность к восстановлению нитрата (Таблица 1). Штамм *Rhodococcus erythropolis* HO-KS22, выделенный из нагнетаемой воды Восточно-Анзирского нефтяного месторождения в Татарстане, защищён патентом РФ как перспективный продуцент биоПАВ с высокой уреазной активностью, способный увеличивать рН пластовой воды до 9,4.

Таблица 1 – Выделенные штаммы углеводородокисляющих и денитрифицирующих бактерий и их основные физиологические характеристики

Штамм	Ближайший вид	Сходство генов 16S рРНК, %	Интервал NaCl, г/л	Интервал температуры, °С	ПР
HO-A4	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	99,9	0–150	22–55	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
HO-A6	<i>Bacillus altitudinis</i>	99,6	0–100	10–45	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
HO-A7	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9	0–140	24–45	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
HO-A12	<i>Nocardia asteroides</i>	99,6	0–80	10–35	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
HO-A13	<i>Gordonia amicalis</i>	99,1	0–80	15–35	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
HO-A22 <sup>T</sup>	<i>Ensifer</i> sp.	99,0	0–35	15–33	N <sub>2</sub> O
HO-A23	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	100,0	0–20	4–37	N <sub>2</sub>
HO-A24	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99,7	0–8	4–35	N <sub>2</sub>
HO-A25	<i>Halomonas alimentaria</i>	99,0	0–150	22–55	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
HO-KS22	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	99,8	0–80	5–37	–
K21-G3	<i>Pseudomonas guguanensis</i>	98,8	0–60	5–47	N <sub>2</sub>
K21-L5	<i>Marinobacter lutaoensis</i>	99,9	2–120	30–47	–
K21-M8	<i>Halomonas meridiana</i>	99,8	0–60	5–37	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
K21-P5	<i>Marinobacter persicus</i>	100,0	2–90	30–37	–
KAZ22	<i>Marinobacter lutaoensis</i>	99,9	0–140	22–55	–
TAT1	<i>Halomonas titanicae</i>	99,7	0–200	4–42	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>

Обозначения: ПР, продукт восстановления нитрата; –, штамм не восстанавливал нитрат.

Для более детального изучения были выбраны три штамма углеводородокисляющих бактерий. Два штамма принадлежали к родам *Marinobacter* и *Halomonas*, которые вносили значительный вклад в метаболизм азота в пробах из месторождения Узень и нефтяных пластов Татарстана соответственно. Третий штамм, HO-A22<sup>T</sup>, выделенный из Черёмуховского месторождения тяжёлой нефти (Республика Татарстан), рос на сырой нефти, снижал межфазное натяжение на границе

культуральной жидкости и гексадекана, что могло свидетельствовать о синтезе нефтявытесняющих метаболитов, а также имел низкий уровень сходства гена 16S рНК с геном филогенетически близкого вида *Ensifer morelensis* (99,0%).

Штамм *Marinobacter lutaensis* KAZ22 был выделен из пластовой воды, отобранной из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755\* (излив 30 м<sup>3</sup>) высокотемпературного месторождения Узень и представлял собой умеренно термофильную галотолерантную бактерию. Штамм *M. lutaensis* KAZ22 являлся умеренным термофилом (оптимум 37°C) и рос в диапазоне от 0 до 140 г NaCl/л с оптимумом при 20–120 г/л. Штамм *Halomonas titanicae* TAT1, выделенный из Архангельского месторождения в Татарстане, обладал широким температурным диапазоном роста (от 5 до 42°C с оптимумом 37°C) и был способен расти при высокой солёности среды, достигающей 200 г NaCl/л, то есть являлся психро- и галотолерантной бактерией. Мезофильный штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> рос в интервале от 0 до 35 г NaCl/л (оптимум 0–12 г/л). В анаэробных средах с нитратом штамм HO-A22<sup>T</sup> восстанавливал его до закиси азота (N<sub>2</sub>O), а штамм TAT1 – только до нитрита; рост штамма KAZ22 в анаэробных средах отсутствовал, то есть он являлся облигатно аэробной бактерией.

На платформе Illumina HiSeq были секвенированы полные геномы этих трёх штаммов и проанализированы 120 коровых белков для уточнения их филогенетического положения. Значения ANI и dDDH для штамма HO-A22<sup>T</sup> свидетельствовали о его принадлежности к новому виду рода *Ensifer*, описание которого приведено ниже. Секвенирование геномов и определение общих индексов геномного родства штаммов KAZ22 и TAT1 подтвердило их принадлежность к видам *M. lutaensis* и *H. titanicae* соответственно. В геномах этих штаммов были аннотированы гены окисления алканов и осмопротекции (Рисунок 5).

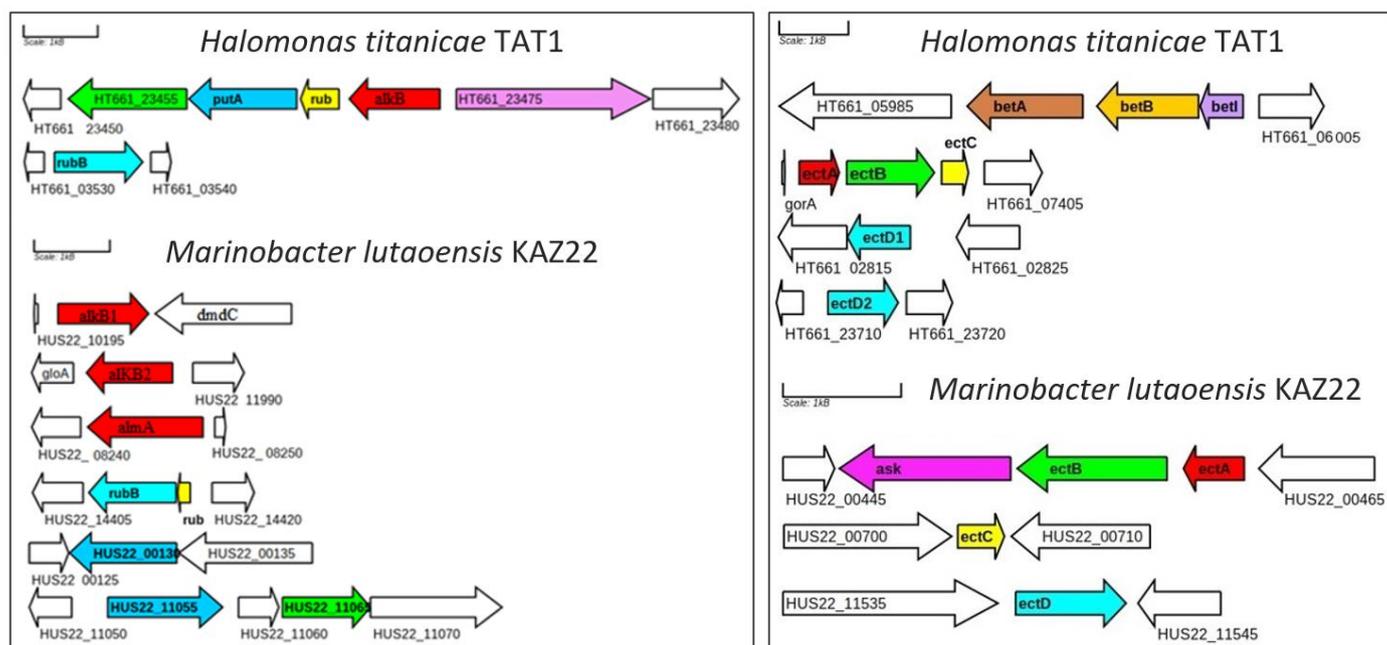


Рисунок 5 – Гены окисления алканов (*alkB* и *almA*) и метаболизма осмопротекторов (*bet* и *ect*) у бактерий *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaensis* KAZ22.

В геноме *H. titanicae* TAT1 присутствовал ген *alkB*, кодирующий фермент алкан-1-монооксигеназу AlkB, ответственную за деградацию короткоцепочечных алканов. В

геноме штамма *M. lutaoensis* KAZ22 были обнаружены две копии гена *alkB*, имеющие отличную друг от друга структуру, а также ген флавин-зависимой монооксигеназы *almA*, позволяющей ему использовать алканы с длиной углеродной цепи более 30 атомов. Штамм *H. titanicae* TAT1 обладал генами синтеза бетаина и эктоина, в то время как штамм *M. lutaoensis* KAZ22 потенциально был способен только к синтезу эктоина, что подтверждает способность обоих штаммов расти в условиях высокой солёности.

Таким образом, из нефтяных пластов России и Казахстана были выделены два штамма углеводородокисляющих бактерий *M. lutaoensis* KAZ22 и *H. titanicae* TAT1, исследованы их фенотипические характеристики и проанализированы их геномы. Галотолерантный и термофильный штамм KAZ22 представляет интерес для микробиологических методов увеличения нефтеизвлечения за счёт эффективного роста на алканах нефти при высокой минерализации пластовой воды, однако в отличие от многих других представителей рода *Marinobacter* он является облигатно аэробной бактерией. Гало- и психротолерантный штамм TAT1 способен расти на углеводородах сырой нефти при солёности среды до 200 г NaCl/л в аэробных условиях, а в отсутствие кислорода *H. titanicae* TAT1 восстанавливает нитраты до нитритов, используя неуглеводородные органические субстраты, что обуславливает возможность его биотехнологического применения для подавления активности сульфидогенных прокариот нитритом.

## **ОПИСАНИЕ НОВОЙ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *ENSIFER OLEIPHILUS SP. NOV.* И ЕЁ ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> был выделен в чистую культуру из пробы, представленной смесью пресной речной воды и пластовой воды, нагнетаемой в Черёмуховское нефтяное месторождение (Татарстан, Россия). Клетки штамма HO-A22<sup>T</sup> были представлены неспорообразующими, подвижными, грамотрицательными палочками размером 1,0–1,5 × 0,3–0,5 мкм. Рост штамма на сырой нефти сопровождался использованием короткоцепочечных *n*-алканов и снижением межфазного натяжения среды культивирования на 5–10 мН/м, что свидетельствует об образовании ПАВ клетками штамма и возможности применения штамма HO-A22<sup>T</sup> в биотехнологиях повышения нефтеизвлечения.

Анализ генов 16S рРНК показал наибольшее сходство штамма HO-A22<sup>T</sup> с бактериями родов *Ensifer* (99,0–99,9%) и *Sinorhizobium* (97,4–98,8%) семейства *Rhizobiaceae*. Для уточнения таксономического положения штамма HO-A22<sup>T</sup> были исследованы его морфологические, физиологические и хемотаксономические свойства, а также проанализирован его геном.

Геном штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> состоит из 6762417 пар нуклеотидов и включает 32 скаффолда, значение N<sub>50</sub> 1120613 пар нуклеотидов, содержание G+C 61,7% и покрытие 225×. В результате аннотации генома было идентифицировано 6343 гена, в том числе 6114 белок-кодирующих последовательностей, 174 псевдогена и 55 генов РНК. На филогеномном дереве (Рисунок 6) штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> формировал отдельную ветвь в кластере бактерий рода *Ensifer* (*E. morelensis*, *E. adhaerens* и *E. sesbaniae*), которая располагалась на удалении от типовых видов рода *Sinorhizobium*.

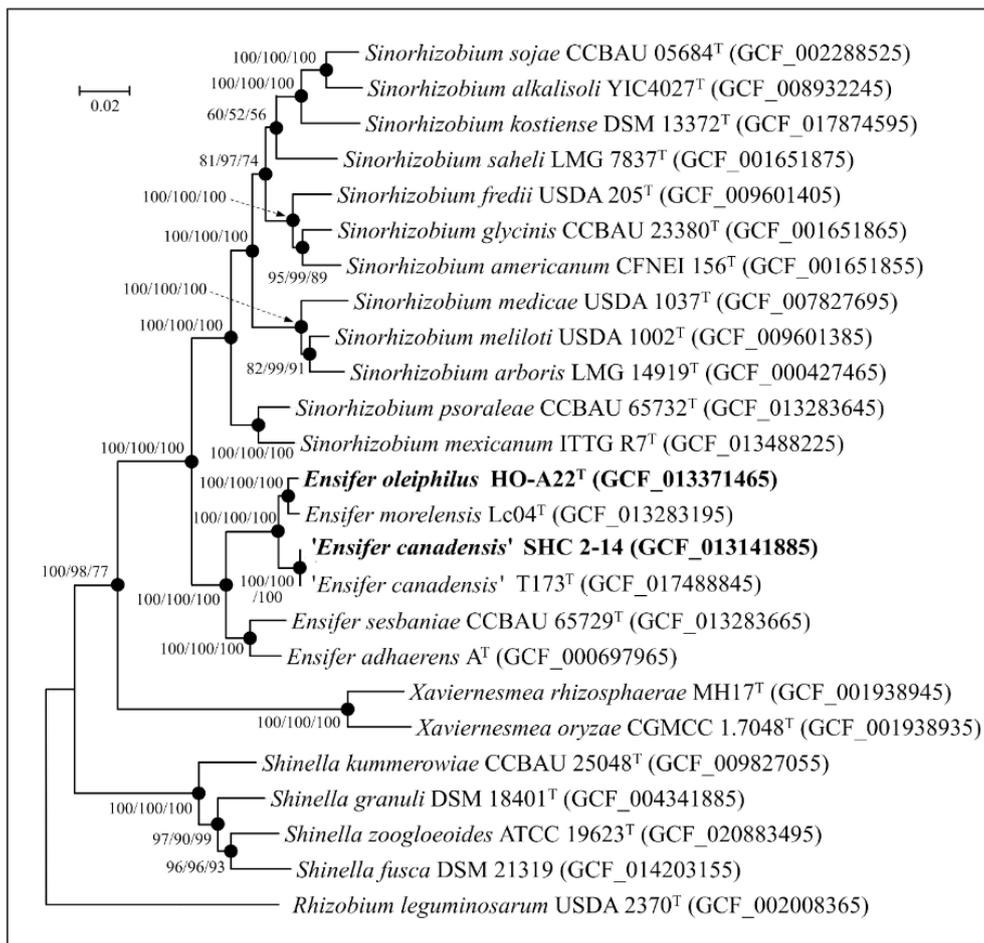


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево 120 объединённых однокопийных белков, показывающее положение штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> относительно близкородственных представителей семейства *Rhizobiaceae*. Бар, 0,02 аминокислотных замены на позицию. Дерево было укоренено с использованием генома *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> как внешней группы.

Расчётные значения AAI и РОСР между новым штаммом и бактериями рода *Ensifer* составили 83,5–95,1% и 74,1–87,4% соответственно. Эти значения превышали пороговые значения для выделения бактерий в отдельный род (AAI для семейства *Rhizobiaceae* <76,5%) и РОСР <50–60%. Эти результаты свидетельствуют о принадлежности штамма HO-A22<sup>T</sup> к роду *Ensifer*. Значения средней нуклеотидной идентичности (ANI) генома HO-A22<sup>T</sup> с геномами типовых штаммов известных видов рода *Ensifer* находились в диапазоне 83,8–92,4%, что было ниже границы выделения видов (95–96%). Значения цифровой ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) по отношению к референтным геномам находились в диапазоне 25,4–45,9% и были ниже порога в 70% для разделения видов. Таким образом, анализ генома штамма HO-A22<sup>T</sup> свидетельствует о его принадлежности к новому виду.

Пангеном, состоящий из семнадцати геномов клады *Ensifer/Sinorhizobium*, включал в себя 117350 генов, сгруппированных в 22072 генных кластера (Рисунок 7). Среди этих кластеров 2504 присутствовали во всех проанализированных геномах, включая гены, участвующие в транспорте и метаболизме аминокислот, в трансляции и в углеводном обмене, а также кластер *exo* для биосинтеза и продукции экзополисахарида сукциногликанового типа. Геномы также содержали гены ассимиляционной нитрат- и сульфатредукции. Геном штамма HO-A22<sup>T</sup> содержал 339

генных кластеров, уникальных для клады *Ensifer/Sinorhizobium*, 75 из них были аннотированы и участвовали в транскрипции, передаче сигналов, метаболизме аминокислот, а также транспорте и метаболизме неорганических ионов. Эти результаты показывают генетическое разнообразие внутри этой клады и дают представление об адаптации штамма НО-A22<sup>T</sup> к среде обитания.

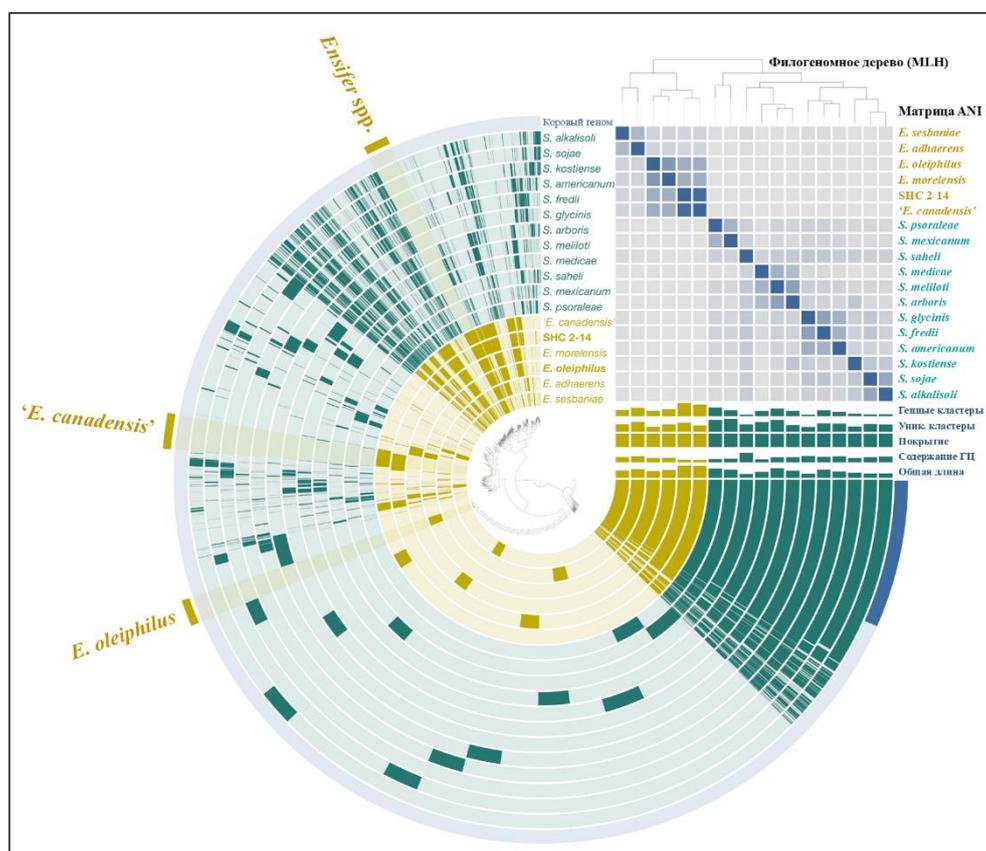


Рисунок 7 – Пангеномный анализ 22072 кластеров однокопийных генов (117350 генов), показывающий положение штамма НО-A22<sup>T</sup> и членов клады *Ensifer/Sinorhizobium*. Тёмные круглые области представляют собой гены, обнаруженные в этих областях для каждого генома. Тепловая карта ANI варьирует от 70 до 100%.

Штамм НО-A22<sup>T</sup> имел гены гликолиза (путь Эмбдена-Мейергофа) и глюконеогенеза, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного пути и пути Энтнера-Дудорова. Штамм НО-A22<sup>T</sup> обладал генами *napADEF*, *nirKV* и *norDEQ*, т.е. был способен восстанавливать нитрат до закиси азота. В геноме штамма НО-A22<sup>T</sup> обнаружены гены *epsF* и *exoFQZ*, что потенциально позволяет штамму образовывать экзополисахариды и повышать вязкость среды культивирования, а также гены *rhaIMS* и *rfbCD*, ответственные за ключевые стадии синтеза экзополисахаридов сукциногликанового типа. Геном содержал также гены деградации алканов и детоксикации различных тяжелых металлов, что позволяет штамму расти в нетипичных для представителей этого рода условиях среды и подтверждает его приспособленность к обитанию в нефтяном пласте.

Для сравнительного анализа фенотипических признаков были получены типовые штаммы *E. adhaerens* A<sup>T</sup> (= NBRC 100388<sup>T</sup>) и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (= NBRC 100387<sup>T</sup>) из Центра биологических ресурсов, NITE (NBRC) в Японии. Виды *Ensifer adhaerens* и *Sinorhizobium morelense* были описаны сравнительно давно, и было необходимо

привести их описание в соответствие с современными требованиями. В связи с этим оба типовых штамма были так же детально исследованы, как и *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>.

Сравнительная характеристика штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> и валидно описанных представителей рода *Ensifer* приведена в Таблице 2. Бактерии этого рода являются грамотрицательными, подвижными, аэробными, неспорообразующими палочками. Они могут восстанавливать нитраты до нитритов, расти в присутствии 1% (но не 4%) NaCl, при 28°C и pH 7,0–9,0, образовывать кислоту из D-арабинозы, D-глюкозы, D-ксилозы, D-лактозы, D-мальтозы, D-маннозы, D-мелибиозы, D-раффинозы, D-рибозы, D-трегалозы, D-фруктозы и эритрита, но не из инулина или крахмала. Основными жирными кислотами для членов рода являются C<sub>18:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub> и C<sub>18:0</sub>, а основными полярными липидами – фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилэтаноламины (ФА), фосфатидилглицеролы (ФГ) и дифосфатидилглицеролы (ДФГ).

Таким образом, на основании филогенетического и фенотипического анализа штамм HO-A22<sup>T</sup> отнесён к новому виду *Ensifer oleiphilus* sp. nov., валидированному в 2024 году. Штамм HO-A22<sup>T</sup> может быть использован в биотехнологиях увеличения нефтеотдачи, благодаря использованию алканов нефти и образованию внеклеточных полисахаридов и биоПАВ.

Таблица 2 – Дифференцирующие признаки штаммов HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup>, *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> и *E. sesbaniae* ССВАУ 65729<sup>T</sup>

Характеристика	HO-A22 <sup>T</sup>	<i>E. adhaerens</i> A <sup>T</sup>	<i>E. morelensis</i> Lc04 <sup>T</sup>	<i>E. sesbaniae</i> ССВАУ 65729 <sup>T</sup>
Каталаза	+	w	+	–
Уреаза	–	+	–	+
Использование цитрата	–	–	–	+
Рост при:				
2% NaCl	+	+	+	–
15°C	+	+	+	–
37°C	–	w	w	+
Выделение кислоты (API® 50CH) из:				
Дульцит	+	–	w	–
D-мелицитоза	–	w	–	+
Салицин	+	–	+	+
L-сорбоза	+	–	w	+
Жирные кислоты	C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:0</sub> , C <sub>14:0</sub> 3-ОН	C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:0</sub> 3-ОН, C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:1</sub> , C <sub>12:0</sub> aldehyde, C <sub>16:0</sub>
Полярные липиды	ФХ, ФА, ДФГ, ФГ	ФА, ФХ, ФГ, ДФГ	ФА, ДФГ, ФХ, ФГ	ФХ, ФА, ФГ
Содержание G + C в геноме, %	61.7	62.8 <sup>a</sup>	61.7 <sup>b</sup>	60.4
Источник выделения	Нагнетаемая в пласт вода	Почва <sup>a</sup>	Корневые клубеньки <sup>b</sup>	Корневые клубеньки

Данные для *E. sesbaniae* ССВАУ 65729<sup>T</sup> взяты из Wang et al. (2013). Другие результаты получены в этой работе кроме: <sup>a</sup>, Tóth et al. (2017); <sup>b</sup>, Wang et al. (2002). Обозначения: +, положительный; –, отрицательный; w, слабый рост.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование микробного сообщества нефтяного пласта является необходимым этапом при выборе биотехнологий увеличения нефтеизвлечения. Разнообразие микробных сообществ обусловлено разным сочетанием физико-химических характеристик нефтяного пласта, состава пластовой и нагнетаемой воды, нефти и вмещающих пород. Определение разнообразия и функциональной активности прокариотных сообществ нефтяных пластов, воздействия на них привносимых с нагнетаемой водой соединений и физиологических и геномных характеристик ключевых компонентов пластового сообщества является актуальной задачей, как с фундаментальной, так и с научно-практической точки зрения.

В настоящей работе были исследованы микроорганизмы Ромашкинского, Архангельского, Ново-Елховского, Восточно-Анзирского и Черёмуховского месторождений нефти в Республике Татарстан (РФ) и нефтяных месторождений Каражанбас и Узень в Республике Казахстан. Нефтяные пласты характеризуются высокой солёностью пластовой воды. В пластовой воде культуральными и молекулярно-биологическими методами были обнаружены аэробные органотрофные бактерии, анаэробные бродильные, метаногенные и сульфатвосстанавливающие прокариоты. Среди архей преобладали метаногены класса *Methanococci*; доминирующие бактерии относились к классам *Desulfovibrionia*, *Synergistia* и *Thermotogae*. Филогенетический состав сульфидогенных бактерий больше всего коррелировал с температурой нефтяного пласта и солёностью пластовой воды: в пробах из месторождений Татарстана (7511, 7860, 15500 и 35943), для которых была характерна высокая минерализация и температура около 22°C, сульфатредуцирующие бактерии были представлены родами *Desulfoplanae*, *Desulfovermiculus* и *Desulfotignum*, а в высокотемпературных ( $\geq 55^\circ\text{C}$ ) пробах из месторождения Узень (4256, 7309, 8001, 8533 и 9064) преобладали термотолерантные и термофильные бактерии родов *Desulfonauticus*, *Desulfoglaeba* и *Thermodesulfobacterium*.

Микробные сообщества из месторождения Узень были исследованы более детально. Исследованные пробы включали в себя как оригинальную бессульфатную пластовую воду, так и пробы участков, заводняемых каспийской морской водой, с высоким содержанием сульфата и растворённого сульфида. В первой группе сообществ доминирующей функциональной группой являлись метаногенные археи рода *Methanothermococcus*. В зоне смешения пластовой и морской воды преобладали сульфидогенные бактерии рода *Desulfonauticus*. Таким образом, показана сукцессия от метаногенных к сульфатвосстанавливающим микробным сообществам на нефтяном месторождении Узень при его заводнении морской водой. Это привело к появлению сульфида в пластовой воде и резервуарах системы подготовки воды и нефти.

Сульфидогенное микробное сообщество из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755\* месторождения Узень было использовано для оценки влияния на него биоцидов и нитрата с целью подавления образования сульфида. Коммерческий биоцид Ранцид-7005 на основе четвертичных солей аммония, применяемый на месторождениях Республики Казахстан для предотвращения накопления сульфида в пластовой воде, не подавлял процессы сульфидогенеза в одинарной (40 мг/л), двойной и тройной дозах, рекомендованных к применению, в отличие от глутарового альдегида, который в

концентрации 100 мг/л снижал продукцию сульфида до нуля. Аналогичные результаты были получены для чистой культуры штамма *Desulfovibrio alaskensis* Kaz19, выделенного из этого сообщества. Сравнение выживаемости клеток при добавлении двойной и тройной концентрации Ранцида-7005 для планктонных и биоплёночных форм в сообществе 2755\* продемонстрировало большую устойчивость биоплёнок относительно свободноплавающих клеток, однако и в планктонной культуре выживаемость этих микроорганизмов была не ниже 34%. Штамм *D. alaskensis* Kaz19 был ещё более резистентен к Ранциду-7005 чем накопительная культура, из которой он был выделен. Более 80% клеток штамма Kaz19 сохраняли жизнеспособность при добавлении 80 и 120 мг биоцида/л. При добавлении 0–2 г нитрата/л к сульфат- и тиосульфатвосстанавливающим микробным сообществам из месторождения Узень наблюдалась положительная корреляция между количеством образуемого нитрита и ингибированием сульфидогенеза в этих пробах, однако филогенетические богатые микробные сообщества, такие как 2755\*, были устойчивы к такому воздействию. Проведённые эксперименты позволили сделать вывод о необходимости комбинированного применения этих двух технологий подавления сульфидогенеза на месторождении Узень и проведения аналогичных исследований на других месторождениях перед использованием биотехнологий этой группы.

В целях поиска эффективных штаммов-продуцентов нефтewытесняющих метаболитов и денитрифицирующих бактерий для подавления роста сульфидогенов, из исследуемых нефтяных пластов были выделены 16 чистых культур углеводородоокисляющих бактерий родов *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Williamsia*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Nocardia* и *Ensifer*. Все они были способны расти в аэробных условиях на сырой нефти как единственном источнике углерода и энергии, и большая часть из них восстанавливала нитраты в анаэробных условиях до нитрита, закиси азота и молекулярного азота. Несмотря на доминирование фило типов рода *Marinobacter* в библиотеках V3–V4 фрагментов генов 16S рРНК из накопительных культур месторождения Узень при их стимуляции нитратом, выделенные штаммы этого рода не были способны к нитратредукции, в связи с чем их потенциальное биотехнологическое применение ограничивалось ММУН. Штамм *Halomonas titanicae* ТАТ1, напротив, накапливал до 100 мг нитрит-иона/л при росте на нитрате в анаэробных условиях, и может представлять интерес для биотехнологий подавления сульфидогенеза путём нитратного заводнения пласта. Оба штамма имели геномные детерминанты окисления алканов и устойчивости к высокой солёности и обладали потенциалом для применения в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения на месторождениях с высокой солёностью пластовой воды.

Денитрифицирующий штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> восстанавливал нитрат с образованием N<sub>2</sub>O, но не накапливал нитрит в среде. В геноме этого штамма были обнаружены детерминанты деградации алканов нефти и синтеза экзополисахаридов, что свидетельствует о потенциале для ММУН. Результаты изучения фенотипических характеристик штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> методами полифазной таксономии, а также низкие значения ANI и dDDH с геномами валидно описанных членов рода *Ensifer* позволили описать новый вид *Ensifer oleiphilus* sp. nov.

## ВЫВОДЫ

1. В исследованных нефтяных пластах России и Казахстана температура, солёность и состав пластовой воды определяют филогенетическое и функциональное разнообразие микроорганизмов. В высокотемпературных нефтяных пластах, не содержащих сульфатов в пластовой воде, основными функциональными группами являются бродильные бактерии и метаногенные археи рода *Methanothermococcus*; в низкотемпературных пластах с высокоминерализованной водой, содержащей сульфаты, преобладают бактерии родов *Desulfoplanes*, *Desulfovermiculus*, *Desulfotignum*, *Halomonas* и *Halanaerobium*.

2. Нагнетание морской воды с сульфатом в нефтяные пласты высокотемпературного месторождения Узень приводит к смене доминирующей популяции метаногенов рода *Methanothermococcus* и бродильных бактерий рода *Thermovirga* микроорганизмами цикла серы и доминированию термофильных сульфидогенов родов *Desulfonauticus*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulforhabdus* и *Defluviitoga*.

3. Сульфидогенные микробные сообщества из нефтяных пластов формируют биоплёнки, снижающие эффект применяемых биоцидов. Использование нитратного заводнения для конкурентного подавления роста сульфидогенов может быть неэффективным из-за присутствия в пласте денитрифицирующих бактерий, восстанавливающих нитрат и нитрит до молекулярного азота, что обуславливает необходимость предварительного метагеномного анализа подземного микробного сообщества и комплементарных способов воздействия.

4. Бактерии родов *Halomonas*, *Marinobacter* и *Rhodococcus*, выделенные из нефтяных пластов, растут на нефти при высокой солёности среды с образованием нефтевытесняющих метаболитов, что свидетельствует о возможности их применения в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения. В геномах бактерий *Halomonas titanicae* ТАТ1 и *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 выявлены гены деградации *n*-алканов и синтеза осмопротекторов, подтверждающие приспособленность к условиям местообитания. Штамм *Halomonas titanicae* ТАТ1 восстанавливает нитрат с накоплением нитрита и может быть использован для подавления роста сульфидогенов.

5. На основании изучения фенотипических признаков и геномного анализа штамма НО-А22<sup>Т</sup> и бактерий рода *Ensifer* описан новый вид углеводородокисляющих бактерий *Ensifer oleiphilus* sp. nov. В геноме штамма НО-А22<sup>Т</sup> выявлены гены деградации углеводов, восстановления нитрата, синтеза внеклеточных полисахаридов и детоксикации тяжёлых металлов, что подтверждает потенциал его биотехнологического применения.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в журналах перечня ВАК и международных реферативных баз:

1. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., **Ершов А.П.**, Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86 (6). – С. 748–761. doi: 10.7868/S002636561706012X.
2. Nazina T., Sokolova D., Grouzdev D., Semenova E., Babich T., Bidzhieva S., Serdukov D., Volkov D., Bugaev K., **Ershov A.**, Khisametdinov M., Borzenkov I. The potential application of microorganisms for sustainable petroleum recovery from heavy oil reservoirs // *Sustainability*. – 2020. – Vol. 12 (1). – 15. doi: 10.3390/su12010015.
3. Семенова Е.М., **Ершов А.П.**, Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Назина Т.Н. Разнообразие и биотехнологический потенциал нитратредуцирующих бактерий из месторождений тяжелой нефти (Россия) // *Микробиология*. – 2020. – Т. 89 (6). – С. 675–687. doi: 10.31857/S0026365620060166.
4. Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Груздев Д.С., **Ершов А.П.**, Биджиева С.Х., Иванова А.Е., Бабич Т.Л., Сисенбаева М.Р., Бисенова М.А., Назина Т.Н. Микробное разнообразие и потенциальные продуценты сероводорода в нефтяном месторождении Каражанбас (Казахстан) // *Микробиология*. – 2020. – Т. 89 (4). – С. 462–473. doi: 10.31857/S002636562004014X.
5. Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Babich T.L., Loiko N.G., **Ershov A.P.**, Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zhaparov N.S., Nazina T.N. Sulfidogenic microbial communities of the Uzen high-temperature oil field in Kazakhstan // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9 (9). – 1818. doi: 10.3390/microorganisms9091818.
6. Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., **Ершов А.П.**, Груздев Д.С., Назина Т.Н. Геномные и физиологические характеристики галофильных бактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов // *Микробиология*. – 2022. – Т. 91 (3). – С. 285–299. doi: 10.31857/S0026365622300036.
7. **Ershov A.P.**, Babich T.L., Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Semenova E.M., Avtukh A.N., Poltaraus A.B., Ianutsevich E.A., Nazina T.N. Genome analysis and potential ecological functions of members of the genus *Ensifer* from subsurface environments and description of *Ensifer oleiphilus* sp. nov. // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11 (9). – 2314. doi: 10.3390/microorganisms11092314.
8. Kadnikov V.V., Ravin N.V., Sokolova D.S., Semenova E.M., Bidzhieva S.K., Beletsky A.V., **Ershov A.P.**, Babich T.L., Khisametdinov M.R., Mardanov A.V., Nazina T.N. Metagenomic and culture-based analyses of microbial communities from petroleum reservoirs with high-salinity formation water, and their biotechnological potential // *Biology*. – 2023. – Vol. 12 (10). – 1300. doi: 10.3390/biology12101300.

### Патент РФ на изобретение:

Борзенков И.А., Семенова Е.М., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., **Ершов А.П.**, Биджиева С.Х., Назина Т.Н. Штамм *Rhodococcus erythropolis* НО-KS22, обладающий высокой уреазной активностью, способный к генерации в нефтяном пласте

нефтевытесняющего агента (биоПАВ). RU № 2717025 С1. Заявка № 2019114124 от 08.05.2019. Опубликовано: 17.03.2020.

**Тезисы докладов на российских и международных конференциях:**

1. Sokolova D., Babich T., Semenova E., **Ershov A.**, Bidzhieva S., Borzenkov I., Khisametdinov M., Tourova T., Nazina T. Diversity of microorganisms in heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application in MEOR // International Biotechnology and Research Conference (April 25–27, 2018). – Rome, Italy. – 2018. – P. 20.

2. **Ершов А.П.**, Семенова Е.М. Анаэробная биodeградация нефти денитрифицирующими бактериями из нефтяных пластов // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018» (9–13 апреля 2018 г.). – М.: МАКС Пресс. – 2018. – ISBN 978-5-317-05800-5.

3. **Ершов А.П.** Разнообразие денитрифицирующих бактерий из низкотемпературных месторождений тяжелой нефти // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» (8–12 апреля 2019 г.). – М.: МАКС Пресс. – 2019. – ISBN 978-5-317-06100-5.

4. **Ershov A.**, Sokolova D., Babich T., Semenova E., Bidzhieva S., Grouzdev D., Zhaparov N., Nazina T. Sulfidogenic microbial communities of the Uzen oil field and their resistance to biocides // 8<sup>th</sup> International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems (June 8–11, 2021). – 2021. – P. 34–35.

5. Соколова Д.Ш., Семёнова Е.М., Бабич Т.Л., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., **Ершов А.П.**, Жапаров Н.С., Назина Т.Н. Функциональное и филогенетическое разнообразие микроорганизмов в нефтяном месторождении Узень (Казахстан) как основа для создания биотехнологии увеличения нефтеизвлечения // 3-й Российский микробиологический конгресс (26 сен. – 1 окт. 2021 г.). – Псков: Псковский государственный университет. – 2021. – С. 101. – ISBN 978-5-00200-015-9.

6. **Ershov A.**, Sokolova D., Semenova E., Tourova T., Grouzdev D., Nazina T. Halophilic bacteria of the genera *Halomonas* and *Marinobacter* from petroleum reservoirs and their possible applications in biotechnology // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference (04–08 July 2022, Novosibirsk, Russia). Abstracts / Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2022. – P. 521–522. – ISBN 978-5-91291-059-3.

7. **Ершов А.П.**, Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Турова Т.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н. Галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов России и Казахстана и их биотехнологический потенциал // XXXIV международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (8–11 февраля 2022 г.): сборник тезисов. – М.: ИБХ РАН. – 2022. – С. 98.

8. **Ершов А.П.**, Семенова Е.М., Биджиева С.Х., Назина Т.Н. Галофильные микробные сообщества из нефтяных пластов Республики Татарстан и их биотехнологический потенциал // XXXV зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (7–10 февраля 2023 г.): сборник тезисов. – М.: ИБХ РАН. – 2023. – С. 151.