

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

*На правах рукописи*

Ершов Алексей Павлович

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ И  
СПОСОБЫ ПОДАВЛЕНИЯ СУЛЬФИДОГЕНОВ

1.5.11 – Микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Назина Тамара Николаевна

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Актуальность работы .....	4
Степень разработанности темы.....	5
Цель и задачи исследования .....	6
Научная новизна .....	6
Теоретическая и практическая значимость работы .....	7
Методология и методы исследования .....	7
Основные положения, выносимые на защиту .....	7
Степень достоверности и апробация результатов.....	8
Объём и структура диссертационной работы.....	9
Связь работы с научными программами и личный вклад соискателя .....	9
Место проведения работы и благодарности .....	9
Список работ, опубликованных по теме диссертации.....	10
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
ГЛАВА 1. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, ОБИТАЮЩИЕ В НЕФТЯНЫХ ПЛАСТАХ.....	13
1.1. Общая характеристика нефтяных пластов как среды обитания микроорганизмов.....	13
1.2. Основные функциональные группы прокариот, обитающих в нефтяных пластах .....	15
1.2.1. Аэробные бактерии нефтяных пластов и их адаптация к условиям местообитания .....	17
1.2.2. Анаэробные микроорганизмы нефтяных пластов и их участие в биотрансформации нефти .....	19
1.2.3. Облигатно анаэробные прокариоты, осуществляющие терминальные стадии преобразования нефти .....	23
ГЛАВА 2. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ В НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ .....	27
2.1. Способы подавления роста сульфидогенных прокариот, вызывающих коррозию нефтепромыслового оборудования .....	27
2.2. Биотехнологии увеличения нефтеизвлечения, основанные на стимулировании роста микроорганизмов нефтяных пластов.....	33
2.3. Заключение по обзору литературы .....	35
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	37
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	37
3.1. Объект исследования.....	37
3.2. Состав питательных сред и условия культивирования.....	37

3.3. Методы фенотипического анализа.....	39
3.4. Молекулярно-биологические методы.....	40
3.5. Методы биоинформатического анализа.....	41
3.6. Аналитические методы .....	43
ГЛАВА 4. РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ В НЕФТЯНЫХ ПЛАСТАХ РОССИИ И КАЗАХСТАНА.....	47
4.1. Физико-химические условия и культивируемые микроорганизмы исследованных нефтяных пластов .....	47
4.2. Филогенетическое разнообразие прокариот в пробах пластовой воды .....	50
ГЛАВА 5. МИКРООРГАНИЗМЫ НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ УЗЕНЬ И ВЛИЯНИЕ НАГНЕТАНИЯ МОРСКОЙ ВОДЫ НА СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ.....	53
ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ БИОЦИДОВ И НИТРАТА НА ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ .....	60
6.1. Устойчивость планктонных и биоплёночных форм сульфидогенных прокариот к воздействию биоцидов .....	61
6.2. Влияние нитрата на филогенетическое разнообразие микробных сообществ из нефтяных пластов .....	64
ГЛАВА 7. УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ И ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ, И ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНОМНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	70
7.1. Углеводородокисляющие и денитрифицирующие бактерии, выделенные из нефтяных пластов, и их фенотипические признаки .....	70
7.2. Галотолерантные углеводородокисляющие бактерии из нефтяных пластов и анализ их геномов .....	74
ГЛАВА 8. ОПИСАНИЕ НОВОЙ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕЙ БАКТЕРИИ <i>ENSIFER</i> <i>OLEIPHILUS SP. NOV.</i> И ЕЁ ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ .....	78
8.1. Фенотипические признаки штамма <i>Ensifer</i> sp. HO-A22 <sup>T</sup> .....	80
8.2. Характеристика генома штамма <i>Ensifer</i> sp. HO-A22 <sup>T</sup> .....	91
8.3. Анализ генома штамма <i>Ensifer</i> sp. HO-A22 <sup>T</sup> .....	94
8.4. Описание нового вида <i>Ensifer oleiphilus</i> sp. nov. ....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ .....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	103
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

## ВВЕДЕНИЕ

**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 сульфатвосстанавливающие прокариоты и преобладает сульфидогенез (Orphan et al., 2000; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Nazina et al., 2017a). Наряду с сульфатвосстанавливающими бактериями (СВБ) и археями ряд броидильных 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). Образованные 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 (Bødtker 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, эксплуатирующиеся 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. Всё перечисленное обуславливает необходимость изучения состава микробных сообществ нефтяных пластов с высокосолёными водами, влияния биоцидов на планктонный и биопленочный рост сульфидогенов, выделения и изучения фенотипических и геномных характеристик галофильных прокариот. 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 биопленочный 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* проведено сравнение состава микробных сообществ нефтяных пластов с высокосолёной пластовой водой и разными физико-химическими условиями, расположенных в России и Казахстане. Биоинформатический анализ состава микробного сообщества позволяет оценить потенциальную функциональную активность компонентов сообщества и их вклад в циклы серы, углерода и азота и ускорить выбор наиболее подходящей биотехнологии воздействия на нефтяной пласт. Впервые проведено сравнение устойчивости планктонных и биопленочных 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 биоплёнки. 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. Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробиологии в высших учебных заведениях.

**Методология и методы исследования.** В процессе выполнения диссертационной работы для получения и анализа результатов был применён широкий спектр микробиологических, молекулярно-биологических и аналитических методов, а также методов фенотипического, биоинформатического и статистического анализа. Разнообразие использованных методик и перекрёстное подтверждение результатов с их помощью свидетельствуют 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.

### 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). Conference Proceedings*. – Rome, Italy. – 2018. – P. 20. URL: <https://madridge.org/journal-of-biotechnology-and-recent-advances/biotechnology-2018-scientificsession-proceedings/2639-4529.a1.002-s008.pdf>

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.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов*. – 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.) / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов*. – М.: МАКС Пресс. – 2019. – ISBN 978-5-317-06100-5.

4. **Ershov A.**, Sokolova D., Babich T., Semenova E., Bidzhieva S., Grouzdev D., Zhararov 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). Abstract Book*. – Virtual Symposium. – 2021. – P. 34–35. URL:

[https://ismos-8.org/wp-content/uploads/2021/06/07062021\\_ISMOS-8\\_ABSTRACT-BOOKFINALFINAL.pdf](https://ismos-8.org/wp-content/uploads/2021/06/07062021_ISMOS-8_ABSTRACT-BOOKFINALFINAL.pdf)

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.): материалы конгресса. – 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 / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой. – М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – 2022. – С. 98. URL: [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_48245187\\_97765328.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_48245187_97765328.pdf)

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.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. – 2023. – С. 151. URL: [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_53904681\\_36756875.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_53904681_36756875.pdf)

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, ОБИТАЮЩИЕ В НЕФТЯНЫХ ПЛАСТАХ

#### 1.1. Общая характеристика нефтяных пластов как среды обитания микроорганизмов

Нефтеносный горизонт месторождения (нефтяной пласт) представляет собой горную породу, с которой ассоциирована нефть, включающая в себя сотни органических соединений. Нефть, являясь коллоидным раствором органического вещества, содержит в себе углеводородные фракции различной молекулярной массы. Наиболее просто среди таких фракций устроены предельные углеводороды – алканы, они же парафиновые фракции. Длина цепи самых тяжёлых алканов в нефтяных пластах обычно не превышает 30–40 атомов углерода. Это один из наиболее инертных компонентов нефти за счёт устойчивости одинарных химических связей в их молекулах, что препятствует протеканию реакций присоединения с участием алканов нефтяного коллектора. Разветвлённость углеродных цепей также оказывает существенное влияние на свойства, как самих этих молекул, так и всей коллоидной системы. Нефти с преобладанием в них предельных углеводородов среди всех других органических фракций классифицируют как парафиновые нефти (Соболева, Гусева, 1998). Среди всех компонентов нефти, которые присутствуют в пласте, именно предельные углеводороды наиболее активно используются микроорганизмами в качестве субстрата для своего роста и последующего деления.

При замыкании предельных углеводородов нефтеносного горизонта в кольца без образования двойных и тройных химических связей образуются циклические соединения (нафтены, в простейшем случае – циклоалканы). В нефтяных пластах наиболее распространены пяти- и шестичленные циклоалканы, являющиеся прямыми производными циклопентана и циклогексана. Соединения с этой же длиной цепи преобладают в составе живых организмов в виде углеродных цепей полисахаридных молекул, что лишь подтверждает распространённую гипотезу о биогенном происхождении органического вещества нефти (Höök et al., 2010). Нефти с преобладанием этой фракции называют нафтеновыми.

Известно, что на преобразование циклоалканов в линейную форму бактериальные клетки тратят значительное количество энергии, в то же время расщепление самой молекулы не даёт значимой энергетической выгоды (Mbadinga et al., 2011). Принято считать, что скорость потребления циклических углеводородов сравнительно низка относительно окисления микроорганизмами алканов, в связи с этим сообщества пластовой воды коллекторов с нафтеновыми нефтями оказываются обеднены микроорганизмами.

Важную фракцию органического вещества нефти составляют арены, или ароматические углеводороды. В нефтяных коллекторах содержится широкий спектр химических производных бензола: толуол, ксилол, бензоат и их структурные изомеры (Rabus, Widdel, 1996; Ma et al., 2006). Эти компоненты нефти являются важным субстратом для микроорганизмов, обитающих в пластовой воде нефтяных месторождений. В ходе диссимиляционных процессов прокариоты подвергают эти молекулы окислению ферментами класса диоксигеназ, которые осуществляют реакцию разрыва бензольного кольца с образованием дикарбоновой кислоты, которая затем вступает в цикл трикарбоновых кислот. Доля ароматических соединений в структуре нефти в среднем ниже, чем алканов и их циклических производных, однако они часто встречаются в нефтяных пластах и создают благоприятные условия для развития пластовой микробиоты за счёт включения этих молекул в свои метаболические цепи (Mbadinga et al., 2011).

Наиболее тяжёлыми компонентами нефти являются высокомолекулярные смолы и асфальтены: эти нерастворимые соединения придают нефти тёмно-коричневый цвет и обуславливают её повышенную плотность и вязкость. На сегодняшний день накоплено очень мало литературных данных о микробиологическом разложении подобных органических веществ, прежде всего ввиду их высокой молекулярной массы, а также отсутствия у прокариот специфических ферментов для их транспортировки в клетку и окисления. Чаще всего эти соединения являются минорными компонентами нефти, уступающими по содержанию более лёгким фракциям, однако гетероциклические молекулы с атомами азота, кислорода и серы в их составе встречаются в нефтях повсеместно, и их наличие и содержание учитывается при оценке качества сырой нефти и продуктов её переработки (Jobelius et al., 2011). Известно, что высокосернистые нефти менее эффективно перерабатываются в бензин, его гомологи и производные, прежде всего из-за отличий в вязкости и застывании при низких температурах. Они практически не содержат газов и менее эффективно вытесняются из нефтяного пласта, в некоторых случаях возникает необходимость в дополнительной закачке газа в пласт для снижения вязкости коллоидной системы. Работа с нефтями с повышенным содержанием гетероциклических и высокомолекулярных соединений требует дополнительного оборудования и производственных мощностей для удаления серных соединений из нефти и переработки подобного исходного сырья.

Нефти классифицируют на группы согласно их удельному весу. Нефти с плотностью ниже  $830 \text{ кг/м}^3$  принято считать лёгкими, месторождения с такой нефтью считаются наиболее предпочтительными для эксплуатации ввиду наибольшей экономической выгоды при их разработке благодаря минимальным издержкам нефтедобычи по

сравнению с остальными группами месторождений. Большая часть добываемой в настоящее время нефти характеризуется низкой плотностью, однако это одновременно представляет собой и один из наиболее высоких рисков для всей отрасли: запасы лёгкой кондиционной нефти в мире сильно ограничены и потому расходуются крайне высокими темпами (Ибатуллин, 2011). Нефти с плотностью в диапазоне 830–860 кг/м<sup>3</sup> принято называть средними. Ввиду постепенного повышения доли этой нефти в структуре мировых извлекаемых запасов нефти происходит переход предприятий на работу с подобным сырьём.

Наконец, нефти, характеризующиеся плотностью выше 920 кг/м<sup>3</sup>, называют тяжёлыми. Они характеризуются повышенной вязкостью, высоким содержанием ароматических смол и ароматических фракций, нерастворимых в пластовой воде, значительным преобладанием углерода над водородом и наличием органических соединений, содержащих атомы азота, серы и металлов с различной валентностью (Lavania et al., 2012; Romero-Hernández et al., 2021). Высокая плотность нефти значительно осложняет её добычу, повышает затраты на её извлечение, транспортировку, переработку и очистку от примесей, токсичных для сотрудников нефтедобывающих предприятий и вызывающих коррозию нефтепромыслового оборудования.

Микроорганизмы месторождений тяжёлой нефти мало изучены. Причинами этого являются низкая численность прокариот в подобных нефтяных пластах, их замедленный метаболизм и сравнительно невысокая доля эксплуатируемых нефтяных месторождений с тяжёлой нефтью на стадии третичной разработки. Так как применение биотехнологий для коллекторов с высокой плотностью нефти затруднено, микробиологический анализ подобных местообитаний остаётся фрагментарным явлением (Ren et al., 2011; Gao et al., 2015; Orphan et al., 2000, 2003). Необходимо детальное изучение микробных сообществ нефтяных пластов месторождений тяжёлой нефти для оптимизации существующих биотехнологий направленного воздействия на пластовую микробиоту.

## **1.2. Основные функциональные группы прокариот, обитающих в нефтяных пластах**

Нефтеносные горизонты населены микроорганизмами ряда физиологических групп прокариот. Градиент физико-химических условий в разных зонах пласта способствует созданию и поддержанию разветвлённых трофических цепей, включающих аэробные и анаэробные микроорганизмы (Head et al., 2014). Отдельные участки нефтяного пласта различаются по температуре, общей минерализации пластовой воды и её химическому и ионному составу, содержанию отдельных элементов, показателю кислотности (pH) и окислительно-восстановительному потенциалу пластовой воды (Eh). Все эти факторы

определяют различные экологические ниши, благоприятствующие развитию определённых групп микроорганизмов (Magot et al., 2000).

Наиболее детально изучены микроорганизмы заводняемых нефтяных пластов. Месторождения, разрабатываемые в течение длительного времени, с каждым годом становятся всё менее рентабельными, поскольку из-за падения пластового давления в нефтеносном коллекторе количество добываемой нефти за единицу времени планомерно снижается. Чтобы компенсировать это явление при эксплуатации нефтяных пластов часто применяют технологию заводнения (Morrow, Buckley, 2011; Hadia et al., 2012). Исходя из экономической целесообразности, для заводнения используют морскую, пресную речную или отделённую от нефти пластовую воду.

Вода закачивается в нефтяной пласт через нагнетательные скважины. Призабойная зона нагнетательной скважины отличается по физико-химическим характеристикам от нефтяного пласта, в частности, по температуре, содержанию растворённого кислорода, поступающего с нагнетаемой водой, который используется аэробно дышащими микроорганизмами, населяющими эту зону, и часто содержит в себе все химические элементы и органические вещества, не характерные для нефтеносного горизонта (Ren et al., 2011; Gao et al., 2015). По мере удаления от призабойной зоны химический состав нагнетаемой воды постепенно трансформируется и приближается к набору компонентов, характерному для пластовой воды эксплуатируемого нефтяного месторождения.

Основное значение применения метода заводнения заключается в повышении пластового давления и увеличении охвата нефтяного пласта заводнением по всей его площади. Нагнетание воды в нефтяной пласт позволяет физически вытеснять нефть из вмещающей породы за счёт увеличения давления в подземном горизонте. Благодаря этому методу некоторые месторождения десятилетиями поддерживаются в стадии активной эксплуатации без значительного снижения производственных мощностей и экономической эффективности добычи нефти из пласта (Ибатуллин, 2011).

Помимо метода заводнения применяется нагнетание в нефтяной пласт горячего пара. Преимуществом этой технологии является более эффективное повышение давления в нефтеносном горизонте, благодаря чему происходит вытеснение нефти через добывающие скважины. В то же время применение этого метода значительно ограничивается стоимостью производства и эксплуатации оборудования, необходимого для обеспечения каждого из этапов технологии (Pratama, Vabadagli, 2022). Ограничивающим фактором для нагнетания горячего пара является низкая совместимость этого метода с применением биотехнологий основанных на использовании микроорганизмов, обитающих в нефтяном пласте. В условиях резкого повышения температуры в локальных участках нефтеносного горизонта



жизнедеятельность прокариот во многом ограничена, и стимулирование их роста в биотехнологических процессах оказывается неэффективным. Детальное моделирование и учёт преимуществ и недостатков сочетания различных биотехнологий, связанных с процессами добычи нефти из пласта, лежит в основе выбора тех или иных подходов на каждом конкретном месторождении.

Таким образом, применение технологии заводнения нефтяного пласта создаёт на месторождении градиент таких физико-химических характеристик, как температура, общая минерализация, давление и плотность пластовой воды. Призабойная зона нагнетательных скважин нефтяного пласта оказывается наиболее пригодной для обитания и размножения аэробных органотрофных бактерий; в свою очередь, анаэробные участки нефтяного пласта не содержат растворённого кислорода, в связи с чем в них происходит более медленное, но большее по площади развитие анаэробной микробиоты, факультативной или облигатной.

### **1.2.1. Аэробные бактерии нефтяных пластов и их адаптация к условиям местообитания**

Важнейшей и наибольшей по численности физиологической группой микроорганизмов, обитающих в призабойной зоне нагнетательных скважин, являются аэробные бактерии с гетеротрофным метаболизмом, окисляющие органическое вещество нефти и использующие её в качестве источника углерода для построения клеток в ассимиляционных процессах (Nazina et al., 2017b). Филогенетически эта группа крайне разнородна, однако большая часть аэробных органотрофов нефтяного пласта представлена бактериями филумов *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* и *Bacillota*, до недавнего времени традиционно называвшихся *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* соответственно (Oren, Garrity, 2021).

Аэробные бактерии являются первым звеном трофической цепи в заводняемых нефтяных пластах – они инициируют процессы окисления органического вещества нефти. Факультативно анаэробные микроорганизмы потребляют продукты жизнедеятельности аэробов, продуцируя в процессе этого субстраты для облигатно анаэробных прокариот нефтяного пласта (Jones et al., 2008; Head et al., 2014). Таким образом, аэробные бактерии снабжают другие микроорганизмы нефтяного пласта легкодоступными источниками углерода и энергии. Субстратом для аэробных прокариот являются компоненты сырой нефти и органические соединения, поступающие в нефтяной пласт вместе с нагнетаемой водой, к которым относятся некоторые побочные продукты сельскохозяйственных и химических производств, не востребованные для промышленности (Борзенков и соавт., 2006).

Особую группу аэробных органотрофов представляют собой углеводородокисляющие бактерии, использующих в качестве субстрата низкомолекулярные компоненты нефти,

преимущественно ациклические предельные углеводороды, относящиеся к парафиновому ряду, однако известно и немало бактерий, утилизирующих арены – ароматические соединения, имеющие в своём составе одно или несколько бензольных колец (Atlas, 1975; Atlas et al., 1981). Окисление *n*-алканов аэробными органотрофными бактериями подробно описано: расщепление этих длинноцепочечных молекул микроорганизмами оказывается возможным благодаря ферментам группы алкан-гидроксилаз (van Beilen, Funhoff, 2007; Ji et al., 2013). Алкан-1-монооксигеназа AlkB – фермент, катализирующий окисление углеводородов парафинового ряда длиной до 15–20 атомов углерода. Бактерии, содержащие ген *alkB* и способные синтезировать этот фермент, широко используются в микробных биотехнологиях повышения нефтеизвлечения. Алканы с длиной углеродной цепи 15–25 атомов преимущественно расщепляются ферментом CYP153A из суперсемейства цитохромов P450. Гены *ladA* и *ladB*, кодирующие флавин-зависимую алкан-монооксигеназу Lad, позволяют аэробным бактериям окислять углеводороды парафинового ряда из 20–35 атомов. Таким образом, наличие в прокариотическом геноме и скорость экспрессии описанных генов создают возможность для углеводородокисляющих бактерий эффективно потреблять алканы нефти и размножаться в призабойной зоне нагнетательных скважин нефтяных пластов, где сырая нефть является для них единственным источником углерода и энергии (Cai et al., 2015; Nazina et al., 2017b).

Аэробные бактерии нефтяных пластов, которые способны наиболее эффективно расти на сырой нефти, окисляя ациклические непредельные углеводороды парафинового ряда, относятся к порядку *Mycobacteriales* филума *Actinomycetota*; наиболее часто в нефтяных пластах встречаются бактерии родов *Rhodococcus*, *Gordonia* и *Nocardia*. Они представляют собой филогенетическую близкую группу прокариот, имеющих общий фенотипический признак – наличие длинноцепочечных жирных (миколовых) кислот в составе их клеточных стенок (Arenskötter et al., 2004; Wang et al., 2010). Эти соединения придают клеточным оболочкам ярко выраженные гидрофобные (неполярные) свойства, благодаря которым клетки микобактерий, в отличие от других представителей этой функциональной группы прокариот, обитают не в полярной фазе пластовой воды на границе с углеводородами, а целиком находятся в гидрофобной нефти, контактируя с водной фазой лишь для осуществления процессов осморегуляции. Такое приспособление показывает высокую эффективность в окислении *n*-алканов и значительно повышает приспособленность бактерий порядка *Mycobacteriales* к физико-химическим характеристикам этих пластов.

Аэробные микроорганизмы нефтяных пластов способны обитать в широком диапазоне экологических условий. В высокотемпературных нефтяных пластах обитают термофильные бактерии, которые способны окислять органические вещества при

температурах 40–50°C и выше. Для нефтяных пластов с температурой 20–30°C характерны мезофильные бактерии. Микроорганизмы родов *Bacillus* и *Pseudomonas* являются наиболее часто встречающимися компонентами микробных сообществ таких нефтеносных горизонтов (Nazina et al., 2001; Назина, Беляев, 2004; Назина и соавт., 2017). Нефтяные пласты с температурой ниже 20°C населены психрофильными аэробными бактериями, наиболее характерными представителями которых являются микроорганизмы родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus* (Kato et al., 2001; Bharali et al., 2024).

Аэробные органотрофные бактерии нефтяного пласта различаются и по отношению к общей солёности пластовой воды. Пресноводные бактерии характерны для нефтяных пластов с низкоминерализованной пластовой водой, заводняемых пресной водой. В случае заводнения морской водой пласты заселяются галотолерантными аэробными прокариотами, преимущественно семейств *Halomonadaceae* и *Marinobacteriaceae* класса *Gamma*proteobacteria (Fathpure, 2014; An et al., 2017).

### **1.2.2. Анаэробные микроорганизмы нефтяных пластов и их участие в биотрансформации нефти**

Одной из важнейших групп микробной трофической цепи в нефтяных пластах являются бактерии с бродильным типом метаболизма. Это уникальная группа микроорганизмов, которые не нуждаются в экзогенных акцепторах электронов для роста, а осуществляют брожение – диспропорционирование органических соединений, выделяя в окружающую среду окисленные и восстановленные продукты расщепления субстрата. Бродильные бактерии заселяют анаэробную зону нефтеносного горизонта, в которую поступают продукты жизнедеятельности аэробной микробиоты, и способны использовать в качестве субстрата широкий спектр органических соединений (Nazina et al., 2013; Vigneron et al., 2017).

Продукты жизнедеятельности бактерий с бродильным типом метаболизма чрезвычайно разнообразны. К ним относятся органические кислоты, такие как формиат, ацетат, пропионат, бутират, валерат, пируват, а также низкомолекулярные спирты – метанол, этанол и их производные, встречаются среди них альдегиды и кетоны, например, ацетон. Наиболее окисленным продуктом метаболизма этой физиологической группы является углекислый газ. Именно эти соединения являются субстратом для следующих компонентов пластовой трофической цепи, короткоцепочечные карбоновые кислоты и спирты окисляются сульфидогенными (сульфатвосстанавливающими и серовосстанавливающими) прокариотами, углекислота и водород используются автотрофными (водородотрофными) метаногенными археями и сульфатредуцирующими прокариотами. Таким образом,

бродильные бактерии являются центральным звеном в микробной трофической цепи нефтяных коллекторов, поскольку они трансформируют органическое вещество нефти с образованием субстратов, доступных микроорганизмам, осуществляющим конечную стадию его окисления (Adams et al., 2013).

Донорами электронов для бактерий с броодильным типом метаболизма могут служить экзометаболиты аэробной микробиоты пласта и частично преобразованные углеводороды нефти (Magot et al., 2000). Многие бактерии с этим типом метаболизма способны также сбраживать и белковые субстраты.

Важным процессом, который осуществляют броодильные бактерии, является «облегчённое брожение», при котором электроны, образованные в результате окисления органических веществ, переносятся не на частично преобразованную молекулу субстрата, а на окисленные соединения серы – элементную серу и тиосульфат, остаток тиосерной кислоты. Поскольку молекулярный водород является наиболее сильным ингибитором окислительно-восстановительных реакций в клетке, в том числе реакций брожения, проблема утилизации избыточного количества электронов остро стоит перед всеми представителями этой физиологической группы прокариот (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003). При наличии в нефтяном пласте окисленных соединений серы броодильная микробиота способна осуществлять процессы сульфидогенеза, неспецифически восстанавливая эти соединения до сероводорода. Такой процесс наиболее характерен для месторождений нефти, которые эксплуатируются с применением заводнения морской водой. Это явление позволяет рассматривать микроорганизмы с броодильным типом метаболизма как биологические агенты коррозии нефтепромыслового оборудования (Youssef et al., 2009; Liang et al., 2016).

Бродильные бактерии способны обитать в широком диапазоне температуры и общей минерализации нефтеносного горизонта. Встречаются не только мезофильные, но и термофильные (*Thermoanaerobacter*, *Thermotoga*) и гипертермофильные прокариоты (*Thermococcus*), обитающие в высокотемпературных нефтяных пластах и осуществляющие свою жизнедеятельность при температурах выше 80°C (Jeanthon et al., 1995; Fardeau et al., 2000; Magot et al., 2000; Miroshnichenko et al., 2001). Из нефтяных пластов выделены пресноводные (*Soehngenia*, *Sphaerochaeta*), галотолерантные (*Anaerobaculum*) и галофильные (*Geotoga*, *Haloanaerobium*) представители этой функциональной группы микроорганизмов (Davey et al., 1993; Ravot et al., 1997; Rees et al., 1997; Bidzhieva et al., 2020; Nazina et al., 2020b).

Пластовая вода, как правило, не содержит нитратов. Однако при использовании технологии нитратного заводнения в пласте развиваются денитрифицирующие бактерии, преобразующие нитрат в молекулярный азот и его газообразные оксиды. Многие аэробные

органотрофные бактерии способны в бескислородных условиях переключаться на анаэробное дыхание с использованием нитрата и, таким образом, осуществлять процесс денитрификации в анаэробной зоне пласта (Grigoryan et al., 2009). Благодаря гибкости метаболизма денитрифицирующие бактерии могут занимать разное положение в микробной трофической цепи нефтяного пласта. С одной стороны, они могут аэробно окислять *n*-алканы и нагнетаемые с водой доноры электронов в призабойной зоне нагнетательных скважин, с другой стороны, в глубине нефтеносного горизонта в отсутствие кислорода они могут окислять компоненты нефти и низкомолекулярные органические соединения, принесённые с током пластовой воды, восстанавливая нитрат (Hubert, Voordouw, 2007).

Подобная лабильность метаболизма создаёт уникальные возможности для стимулирования роста денитрифицирующих бактерий в нефтеносных горизонтах в биотехнологических целях. Будучи способными развиваться в призабойной зоне нагнетательных скважин, насыщенной кислородом, аэробные органотрофы (потенциально способные к денитрификации) окисляют компоненты нефти с образованием нефтевытесняющих метаболитов и представляют интерес для биотехнологий повышения нефтеизвлечения. При нитратном заводнении эти бактерии способны расти по всей площади нефтяного пласта в анаэробных условиях, восстанавливая нитрат, чем они и представляют интерес для технологий подавления коррозии нефтепромыслового оборудования. Денитрифицирующие/нитратвосстанавливающие бактерии способны вступать в конкурентные взаимоотношения с сульфидогенной коррозионно-активной микробиотой и препятствовать её росту посредством нескольких механизмов, которые будут рассмотрены ниже (Youssef et al., 2009).

Наиболее существенным ограничением для жизнедеятельности денитрифицирующих/нитратвосстанавливающих бактерий нефтяных пластов является отсутствие в пластовой воде нитратов в естественных условиях (Davidova et al., 2001). Окисленные соединения азота практически не встречаются в нефтеносных горизонтах, поэтому для стимулирования роста денитрифицирующих микроорганизмов необходимо применять на этих месторождениях технологию нитратного заводнения: вместе с речной, морской или сточной водой в нефтяной пласт нагнетаются импульсно или постоянно соли нитратов (наиболее часто – кальция, калия или натрия). Распространяясь по нефтяному пласту с током нагнетаемой, а затем и пластовой воды, нитраты проникают в труднодоступные пропластки и селективно активируют денитрифицирующую микробиоту. Поскольку нитраты являются токсичными отходами химической промышленности, утилизация которых сложна и дорога для предприятий, эти соединения выступают в роли

«товара с отрицательной стоимостью» и нередко используются в подобных биотехнологиях в качестве доступного акцептора электронов для денитрифицирующих бактерий.

В процессе аэробного метаболизма денитрифицирующие бактерии могут окислять *n*-алканы нефти, и многие часто встречаемые в нефтяных пластах углеводородокисляющие бактерии способны к восстановлению нитратов (Ehrenreich et al., 2000; Zedelius et al., 2011). Длинноцепочечные парафины преимущественно окисляются факультативными денитрифицирующими бактериями рода *Pseudomonas* класса *Gamma*proteobacteria (Grossi et al., 2008). Накоплены литературные данные об использовании денитрифицирующими бактериями в анаэробных условиях ароматических компонентов нефти, таких как ксилол, пропилбензол, толуол и этилбензол. Наиболее подробно эти процессы описаны для бактерий родов *Azoarcus* и *Thauera* семейства *Rhodocyclales* класса *Beta*proteobacteria (Mechichi et al., 2002; Li et al., 2012). Гены аэробного окисления органических субстратов факультативными нитратвосстанавливающими бактериями гомологичны таковым аэробных органотрофных, в том числе углеводородокисляющих, прокариот. Всё это позволяет рассматривать денитрифицирующие бактерии как составную часть группы аэробных органотрофных бактерий, которая способна также к факультативному анаэробному росту.

В отсутствие молекулярного кислорода нитратвосстанавливающие прокариоты используют в качестве доноров электронов, как органические субстраты, так и восстановленные неорганические соединения, что позволяет отнести их к хемолитоавтотрофным микроорганизмам. Неорганическими донорами электронов чаще всего выступают серосодержащие ионы в своих низших степенях окисления, например сульфид или, реже, тиосульфат и сульфит; также ими могут быть восстановленные металлы – железо, марганец и другие (Head et al., 2014). При высокой концентрации углекислоты в пластовой воде и наличии неорганических доноров электронов денитрифицирующие бактерии демонстрируют способность к автотрофному росту. Значимость вклада автотрофной нитратредукции в функционирование микробных сообществ нефтяных пластов на сегодняшний день остаётся дискуссионным вопросом.

Гены восстановления нитратов пластовыми денитрифицирующими бактериями подробно изучены и описаны (Kraft et al., 2011). В процессе диссимиляционной нитратредукции первую реакцию восстановления нитрата в нитрит осуществляет фермент нитратредуктаза, ассоциированный с цитоплазматической мембраной и кодируемый геном *narG*. У некоторых микроорганизмов, например бактерий рода *Bacillus*, широко распространённых в нефтяных пластах, эта реакция является единственным диссимиляционным процессом восстановления соединений азота. В среде культивирования таких бактерий накапливается в высокой концентрации нитрит-ион, который токсичен для

сульфидогенной (прежде всего сульфатвосстанавливающей) микробиоты и ингибирует альфа-субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы DsrA.

Бактерии рода *Pseudomonas* более полно восстанавливают нитриты, осуществляя ещё три последовательные биохимические реакции (Grossi et al., 2008). Восстановление нитрита до оксида (окси) азота (II) осуществляет нитритредуктаза, кодируемая кластером *nir* генов. Следующий промежуточный (у некоторых микроорганизмов окончательный) продукт денитрификации также представлен газообразным оксидом азота (I), закисью; его синтез возможен благодаря ферменту NOR – NO-редуктазе денитрифицирующих бактерий. Наконец, фермент NOS, N<sub>2</sub>O-редуктаза, катализирует восстановление этого оксида в биологически инертное соединение – молекулярный азот.

В процессе диссимиляционного восстановления нитрата до аммония нитратредуцирующими бактериями первую стадию пути осуществляет периплазматическая нитратредуктаза NapAB (Kraft et al., 2011). Вторая и последняя стадия этого процесса обеспечивается ферментами нитритредуктазой NrfA и цитохром *c* редуктазой ONR, в состав которой входят восемь гемовых простетических групп. Микроорганизмы, восстанавливающие нитраты до аммония, способны использовать как органические, так и неорганические доноры электронов. Из нефтяных пластов выделены автотрофные прокариоты, восстанавливающие нитрат до аммония, в геномах которых обнаружены полные пути ассимиляционной фиксации углекислоты. Наиболее яркими представителями таких микроорганизмов являются нитратвосстанавливающие бактерии рода *Sulfospirillum* (Hubert, Voordouw, 2007).

Нитратвосстанавливающие бактерии выделены из нефтяных пластов с низкой температурой (Ehrenreich et al., 2000; Agrawal et al., 2014), информация о термофильных денитрифицирующих углеводородокисляющих бактериях в научной литературе остаётся фрагментарной. Известны как пресноводные, так и галотолерантные факультативно анаэробные денитрифицирующие бактерии родов *Bacillus*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* и другие (Wang et al., 2007; Luo et al., 2015; Семенова и соавт., 2020).

### **1.2.3. Облигатно анаэробные прокариоты, осуществляющие терминальные стадии преобразования нефти**

Завершающий этап преобразования углеводородов нефти предполагает их трансформацию в углеродсодержащие газообразные продукты – либо углекислый газ как максимально окисленную форму углерода, либо в предельно восстановленный метан. Эти

процессы осуществляют гетеротрофные и автотрофные сульфидогенные (сульфат-, тиосульфат- и серо-восстанавливающие) прокариоты и метаногенные археи.

Субстратом для микроорганизмов, продуцирующих сероводород в нефтяных пластах, являются низкомолекулярные органические соединения, карбоновые кислоты, спирты (Widdel et al., 2007). Некоторые прокариоты способны потреблять короткие углеводные молекулы, моносахариды и дисахариды. Большинство сульфидогенов обладают малоэффективными электрон-транспортными цепями и при расщеплении органических субстратов получают из них минимальное количество энергии.

Наиболее часто используемыми донорами электронов у прокариот, осуществляющих восстановление соединений серы в нефтяных пластах, являются лактат, ацетат, пропионат, бутират и этанол (Voordouw et al., 1992; Chen et al., 2017). Акцепторами электронов могут служить практически все окисленные соединения серы: сульфат, сульфит, тетратионат, тиосульфат, тритионат и элементная сера (Widdel et al., 2007). Автотрофные представители этой функциональной группы используют в качестве донора электронов и источника энергии молекулярный водород, синтезируя органические вещества в метаболических путях ассимиляционной фиксации углекислоты. Для ряда сульфатвосстанавливающих бактерий показан высокий уровень гетеротрофной ассимиляции углекислоты, достигающий 30% от используемого углерода.

Существенную роль в функционировании анаэробного микробного сообщества нефтяного пласта играет способность отдельных сульфатвосстанавливающих бактерий к анаэробному окислению алканов (Davidova et al., 2019). Молекулярные механизмы, задействованные в этом процессе, включают в себя гидрокселирование *n*-алканов с последующим карбоксилированием, присоединение к фумарату и гидрирование одноуглеродных соединений. У некоторых бактерий из этой группы механизмы анаэробного окисления алканов остаются неизвестными (Aeckersberg et al., 1991, 1998; Cravo-Laureau et al., 2004a,b; Callaghan et al., 2006; Grossi et al., 2007; Callaghan, 2013). К использованию алифатических соединений парафинового ряда в бескислородных условиях способны микроорганизмы родов *Desulfatibacillum*, *Desulfosarcina*, *Desulfoglaeba*, *Desulfatiferula* и *Desulfothermus* (Rueter et al., 1994; Davidova et al., 2006; Cravo-Laureau et al., 2007; Kniemeyer et al., 2007). Анаэробное окисление ароматических углеводородов осуществляют сульфатвосстанавливающие бактерии родов *Desulfobacula*, *Desulfotignum* и *Desulfosarcina* (Rabus et al., 1993; Harms et al., 1999; Ommedal, Torsvik, 2007).

Продукция восстановленных соединений серы (сульфида) в нефтяном пласте создаёт наибольшие риски при использовании технологии вторичного заводнения (Youssef et al., 2009). Сероводород является коррозионноактивным агентом, и повышение его концентрации



в пластовых флюидах не только приводит к порче нефтепромыслового оборудования, но и снижает качество нефти, повышает её сернистость и уменьшает стоимость, а также ухудшает экологическую обстановку в регионе нефтедобычи из-за токсичности сероводорода.

Метаногенные археи, обнаруживаемые в нефтяных пластах (Magot et al., 2000), представлены гидрогенотрофами, автотрофно восстанавливающими углекислый газ до метана за счёт окисления молекулярного водорода, ацетокластиками – гетеротрофными микроорганизмами, использующими для синтеза метана уксусную кислоту, и метилотрофами, потребляющими одноуглеродные соединения и трансформирующими их метильные группы в метан. Метаногены играют важную роль в трансформации органического вещества нефти пластовыми микробными сообществами за счёт синтрофного роста с бродильными бактериями: для последних протонвосстанавливающие (гидрогенотрофные) археи являются, по сути, биологическим акцептором электронов. Метаногены предотвращают накопление молекулярного водорода в пластовой воде и тем самым делают возможным дальнейшее сбраживание органических субстратов бактериями (Ножевникова и соавт., 2020); этот синтрофный процесс вносит значительный вклад в окисление длинноцепочечных компонентов нефти и возвращение запасов углерода в атмосферу в виде CO<sub>2</sub> (Semenova et al., 2022). Филогенетически все метаногенные археи относятся к разным классам филума *Methanobacteriota* (Siddique et al., 2011; Jimenez et al., 2012; Cai et al., 2015).

Метаногенные археи находятся в конкурентных взаимоотношениях с сульфидогенной микробиотой за утилизируемые субстраты (Nazina et al., 2017a). Особенно острой эта проблема является для гидрогенотрофных метаногенов, требовательных к концентрации водорода и углекислоты, которые в присутствии сульфатов в среде используются преимущественно автотрофными сульфатредуцирующими бактериями. В нефтяных пластах с карбонатными коллекторами, часто богатых сульфатом, сульфидогенная микробиота получает значительное преимущество и конкурентно подавляет рост метаногенов. Напротив, в песчаных коллекторах в отсутствие окисленных соединений серы условия для развития сульфидогенов оказываются неблагоприятными и терминальную стадию трансформации органического вещества нефти осуществляют метаногенные археи (Kadnikov et al., 2023).

Среди архей встречаются наиболее экстремальные галофилы среди всех организмов на Земле. В адаптивных целях они в ходе своей жизнедеятельности синтезируют в высокой концентрации осмопротекторы, наиболее часто встречаемым из которых является глицин бетаин, синтезируемый археями из четвертичного аммониевого основания – холина (Yang et al., 2022). Осмопротекторы позволяют поддерживать необходимую ионную силу и

минерализацию цитоплазмы клеток этих микроорганизмов и в экстремальных условиях осуществлять метаболические процессы наиболее эффективно.

Многие метаногены являются экстремальными термофилами и гипертермофилами, имеющими оптимум роста при температурах выше 100°C, что особенно характерно для представителей филума *Methanobacteriota* (Jones et al., 2008; Göker, Oren, 2023). Метаногенные археи выработали ряд приспособлений, в числе которых диглицериды вместо триглицеридов жирных кислот в составе клеточных мембран из-за более высоких температурных точек их плавления и гидролиза, модифицированные метаболические пути, а также использование аденозиндифосфата вместо аденозинтрифосфата в силу его большей термостабильности. Таким образом, естественными компонентами микробных сообществ высокотемпературных нефтяных пластов являются термоустойчивые метаногенные археи; низкотемпературные пласты заселены мезофильными представителями этой функциональной группы прокариот (Соколова и соавт., 2020).

## ГЛАВА 2. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ В НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

### 2.1. Способы подавления роста сульфидогенных прокариот, вызывающих коррозию нефтепромыслового оборудования

Коррозия стального оборудования, используемого для нефтеизвлечения, стала первой проблемой, стимулировавшей развитие нефтяной микробиологии. В 1926 году одновременно в СССР (Гинзбург-Карагичева, 1926) и в США (Bastin, 1926) было обнаружено накопление сероводорода в сульфатсодержащих пластовых водах и было сделано предположение о микробной природе этого процесса. В настоящее время не вызывает сомнений ведущая роль сульфатредуцирующих бактерий в коррозии нефтепромыслового оборудования (Назина, Беляев, 2004; Youssef et al., 2009).

Накопление сероводорода/сульфида в пластовых водах известно как процесс «скисания» или «порчи» нефтяного пласта (Gieg et al., 2011). Показано, что сульфатредукция протекает с меньшей скоростью при температурах выше 65–70°C и полностью останавливается при 80°C (Nazina et al., 2017a), а серьёзные экономические убытки наблюдаются на месторождениях с умеренной температурой и солёностью пластовой воды, где условия благоприятны для развития мезофильной микробиоты (Agrawal et al., 2014).

Важно отметить присутствие в заводняемых нефтяных пластах аэробных бактерий, окисляющих сульфиды, например, рода *Thiomicrospira* филума *Gammaproteobacteria* (Ghosh, Dam, 2009). Поскольку в призабойной зоне нагнетательных скважин создаются условия для роста этой группы бактерий, сульфат-ионы потенциально могут накапливаться и в исходно бессульфатных пластовых водах. Наличие в пласте бактерий, осуществляющих окисление и восстановление соединений серы, позволяет предполагать возможность тонкого биотехнологического регулирования соотношения сульфида и сульфата, особенно в наземных частях нефтедобывающего оборудования (Agrawal et al., 2014).

Основные способы подавления биогенной сульфатредукции в нефтяных пластах включают (Gieg et al., 2011):

- Выбор для нагнетания в пласт источников воды с низким содержанием сульфата, летучих жирных кислот, биогенных элементов и микрофлоры;
- Удаление сульфата из воды, предназначенной под закачку в пласт, посредством обратного осмоса и подобных технологий;
- Механическое удаление биоплёнок из системы трубопроводного транспорта посредством скользящих скребков (не применяется в нефтяных коллекторах), с использованием обработки биоцидами или без неё;

- Контроль микробной активности путем закачки биоцидов, особенно на месторождениях, в которых сульфидогенез ограничен зоной нагнетательных скважин;
- Закачка нитрата и/или нитрита с целью ингибировать активность сульфатовосстанавливающих прокариот и/или окислить сульфид;
- Комбинированная обработка пласта: одновременная закачка нитрата с молибдатом и/или биоцидами, закачка биоцидов с хелатирующими агентами;
- Нагнетание в пласт нитратовосстанавливающих бактерий, окисляющих сульфид, или других микроорганизмов-антагонистов сульфидогенов для контроля концентрации сульфида.

Стратегии ограничения последствий сульфидогенеза включают в себя:

- Применение химических поглотителей сульфида для его удаления из технического оборудования;
- Использование неметаллических труб и втулок для защиты поверхностных линий подачи от коррозии и крекинга (растрескивания);
- Внедрение методов контроля безопасности и устранения запаха.

Наиболее часто используемым методом подавления сульфидогенеза является нагнетание в пласт нитрата и/или биоцидов (Prajapat et al., 2018). Использование нитратов представляет собой более дешёвый метод, который несёт минимальные экологические риски и одновременно позволяет удалить с поверхности Земли токсичные химические соединения, захоронив их в подземные горизонты. Известно, что не любая коррозионная активность, связанная с жизнедеятельностью пластовой микробиоты, подавляется даже высокими концентрациями нитратов свыше 2 г/л (Sokolova et al., 2021).

При стимуляции денитрифицирующей микробиоты нефтяных пластов подавление сульфатредукции осуществляется благодаря конкуренции сульфатредуцирующих и денитрифицирующих прокариот за доступные органические субстраты и биогенные элементы, которые в пластах часто находятся в дефиците (Розанова и соавт., 1976). Денитрифицирующие бактерии образуют нитрит-ион в качестве промежуточного продукта восстановления нитратов, который подавляет активность фермента сульфитредуктазы *dsrA*. Нитриты являются токсичными для большинства сульфатовосстанавливающих прокариот. Однако и сами денитрифицирующие бактерии при высокой концентрации нитрит-ионов в среде также не могут расти из-за ингибирования активности их собственных нитритредуктаз (Kuřera et al., 1983).

Нитратное заводнение признано эффективным методом борьбы с накоплением сульфида в нефтяных пластах, поэтому оно активно используется нефтедобывающими компаниями. В Канаде было продемонстрировано снижение концентрации сульфид-ионов в

рециркулируемой пластовой воде, отобранной из нагнетательной скважины, с 112 мг/л до величины ниже уровня детекции всего за 20 суток нагнетания раствора нитратов (Telang et al., 1997). Отмечено, что в сульфатредуцирующем сообществе доминировали представители рода *Desulfovibrio*, роль которых в биокоррозии металлического оборудования была неоднократно показана ранее (Voordouw et al., 1993).

На месторождениях в штатах Оклахома (США) и Альберта (Канада) также было показано, что применение нитратного заводнения приводило к подавлению сульфатредукции, которая исходно протекала со скоростью 0,05–0,16 мкм S<sup>2-</sup>/сутки (Davidova et al., 2001). Одним из выводов, сделанных в этой работе, было отсутствие корреляции между численностью нитратвосстанавливающих бактерий и скоростью денитрификации в пластовых водах.

В ходе исследования месторождений нефти в Северном море норвежскими учеными (Bødtker et al., 2009) было показано влияние нитратного заводнения в течение 180 суток на разнообразие микробных сообществ в пробах нагнетаемых вод. Изучение состава накопительных культур методами ПЦР и ДГГЭ на основе анализа генов 16S рРНК продемонстрировало, что филогенетическое разнообразие сульфатредуцирующих бактерий в таких сообществах значительно снижалось. Кроме того, было показано участие в ингибировании биокоррозии бактерий рода *Terasakiella* порядка *Rhizobiales*, которые не были способны использовать углеводороды нефти, но активно потребляли жирные кислоты, выделяемые другими компонентами сообщества.

Вопрос об оптимальной концентрации нитратов в нагнетаемом растворе остаётся нерешённым и, вероятно, зависит от состава микробного сообщества в нефтяном пласте. Наиболее часто используемое содержание нитрат-ионов в нагнетаемой воде варьирует в диапазоне 2,4–3,0 мМ (Voordouw et al., 2009; Agrawal et al., 2014). Нагнетание воды с большей концентрацией нитратов может вызвать обратный эффект (Lambo et al., 2008). Так как среди сульфидокисляющих прокариот встречаются микроорганизмы, способные восстанавливать нитраты, важно учитывать, что совместное протекание этих процессов может оказывать на нефтяной пласт не менее значимое влияние, чем денитрификация с использованием органических субстратов.

Тем не менее, для пластовых вод с высоким содержанием сульфид-ионов применение этой технологии оказывается необходимым для того, чтобы химически связать растворённый в пласте сероводород. На протекание данного процесса влияет соотношение растворённого сульфида и нитрата в пластовой воде (Vik et al., 2007): если содержание нитрата оказывается вдвое меньше концентрации сульфида, то энергетический выход этой реакции превышает

таковой для реакции образования сульфата, а элементная сера впоследствии может использоваться микроорганизмами других физиологических групп в пласте.

Этот эффект был отмечен и в более ранних исследованиях (Jenneman et al., 1986). В диапазоне концентраций 6–20 мМ нитрат-ионов в нагнетаемой воде ингибирование сульфатредукции происходило только в тех скважинах, где исходное содержание сульфидов было минимальным. В то же время для проб, содержащих 20 мМ растворённого сульфида, необходимая концентрация нагнетаемого раствора нитратов составляла 59 мМ. В дальнейшем при химическом связывании сульфида становилось эффективным и нагнетание более разбавленных растворов нитратов.

Результаты более поздних экспериментов подтвердили эти выводы. Показано снижение концентрации растворённого сероводорода на 70% через 35 суток заводнения нефтяного пласта в Канаде раствором с относительно низким (2 мМ) содержанием нитрат-ионов (Grigoryan et al., 2009). Однако подчёркивается, что такое воздействие не всегда было эффективным: если сульфид-ионы в нагнетаемой воде осаждались в виде нерастворимых солей металлов, например FeS, то такие соединения уже не подвергались дальнейшему окислению нитратами и оставались в нефтяном пласте.

Альтернативным методом подавления роста сульфидогенов является использование химических соединений, обладающих биоцидной активностью – глутарового альдегида и хлорида бензалкония (Gardner, Stewart, 2002). Четвертичные соли аммония часто используются для подавления метаболической активности пластовой микробиоты, в том числе сульфидогенных прокариот нефтяных пластов (Kahrilas et al., 2015; Соколова и соавт., 2020; Vedoya et al., 2021). Очевидным недостатком этого способа является его дороговизна, которая складывается из затрат на разработку новых биоцидов, их синтез в промышленных масштабах на производственных предприятиях, очистку от загрязнений, потенциально способных снижать эффективность их действия, транспортировку к месту закачки в нефтеносные горизонты, а также хранение в условиях, позволяющих сохранять эти вещества активными в отношении конкретных групп пластовой микробиоты. Несмотря на селективное действие некоторых биоцидов, не все представители сульфидогенов как функциональной группы коллектора оказываются к ним чувствительны; образование прокариотами биоплёнок дополнительно повышает на порядки их резистентность к подробного рода ингибиторам роста (Sokolova et al., 2021).

В ряде публикаций выполнено сравнение эффективности нагнетания нитратов в нефтяные пласты с использованием биоцидов для подавления сульфидогенеза (Prajarat et al., 2018). При нагнетании хлорида бензалкония в низкой концентрации (1,5 мМ) снижения сульфидогенеза в нефтяном пласте в Индии отмечено не было. Импульсное нагнетание более

концентрированных растворов этого биоцида было эффективно только в течение 4 суток. Однако заводнение с использованием раствора 0,75 мМ хлорида бензалкония совместно с 2 мМ нитрат-иона через 14 суток показало свою эффективность в подавлении сульфатредукции.

Другим распространённым биоцидом, используемым для подавления биокоррозии, является глутаровый альдегид. Его эффективность была показана на нефтяном месторождении в США и сравнивалась с нагнетанием нитритов по воздействию на биоплёнки (Gardner, Stewart, 2002). Измеряли время, за которое накопительная культура образует 10 мг  $S^{2-}$ /л: для контрольного образца нагнетаемой воды без биоцида оно составляло  $1,7 \pm 1,2$  ч, а после импульсного нагнетания 0,5 г/л глутарового альдегида равнялось  $61 \pm 11$  ч. Нитритное заводнение было эффективно при постоянном поддержании концентрации нитрит-ионов не меньше 15 мг/л.

Относительно новыми соединениями в биотехнологиях борьбы с биокоррозией являются хлорат- и перхлорат-ионы, обозначаемые совместно как (пер)хлораты (Engelbrektsen et al., 2014). Механизм действия этих соединений аналогичен таковому при нитратном заводнении (конкуренция микроорганизмов за органические субстраты). В этом исследовании сравнивали эффективность нагнетания 10 мМ нитрат-ионов и 10 мМ (пер)хлоратов. Снижение концентрации образуемого сероводорода наблюдали во всех случаях, однако использование нитрата давало более явный и продолжительный эффект. Кроме того, было показано влияние нагнетания этих соединений на состав микробных сообществ исследованных нефтяных пластов. Добавление нитратов стимулировало рост бактерий семейств *Xanthomonadaceae*, *Rhizobiaceae* и *Pseudomonadaceae*, а добавление хлоратов способствовало росту *Pseudomonadaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* и *Vibrionaceae*.

Таким образом, для подавления роста сульфатредуцирующих бактерий используют технологии нитратного, нитритного и (пер)хлоратного заводнения, а также нагнетание биоцидов. Использование нитрата оказывается наиболее дешёвым, экологичным и эффективным методом борьбы с сульфидогенами и, как следствие, с коррозией нефтепромыслового металлического обрудования. Денитрифицирующие бактерии и окисление ими компонентов нефти изучено слабо, что и определяет научную и практическую значимость этих исследований. Однако более перспективным биотехнологическим решением представляется комбинированное сочетание этих методов, позволяющих оказать максимальное широкое и продолжительное действие на микробные сообщества нефтяных пластов. Приведённые выше и другие примеры применения биотехнологий подавления сульфидогенеза на нефтяных месторождениях перечислены в Таблице 1.

Таблица 1 – Результаты применения биотехнологий подавления сульфидогенеза на нефтяных месторождениях в разных странах

Действующее вещество	Результат применения	Публикация (ссылка)
6,5 мМ NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Снижение содержания сульфида и элементной серы до 0 мг/л	Wang et al., 2023
6,5 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		
0,4 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Образование сульфида подавлено не было	Da Silva et al., 2014
2 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Снижение концентрации растворённого сульфида на 70%	Grigoryan et al., 2009
10 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Полное удаление сульфида	Nemati et al., 2001
30 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Полное удаление сульфида	Hidaka et al., 2018
6 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Подавление сульфидогенеза при низком содержании сульфида	Jenneman et al., 1986
59 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ингибирование сульфидогенеза в присутствии 20 мМ сульфида	
0,33 мМ NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Подавление сульфидогенеза	Gardner, Stewart, 2002
5 мМ GA	Замедление образования сульфида на порядок	
1,25 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Снижение концентрации сульфида до 0,11 мМ	Prajapat et al., 2021
1,00 мМ ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Снижение концентрации сульфида до 0,08 мМ	
0,75 мМ BAC	Снижение концентрации сульфида до 0,06 мМ	
0,50 мМ THPS	Снижение концентрации сульфида до 0,04 мМ	
10 мМ ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Малоэффективное снижение концентрации сульфида	Engelbrektsen et al., 2014
10 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Более эффективное снижение концентрации сульфида	
1,5 мМ BAC	Подавление сульфидогенеза обнаружено не было	Prajapat et al., 2018
0,75 мМ BAC + 2 мМ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Эффективное подавление образования сульфида	
0,74 мМ THPS/сутки	Образование сульфида подавлялось 17 месяцев	Jurelevicius et al., 2021
0,04 мМ MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Остановка роста культур СВБ	de Jesus, de Andrade Lima, 2021
0,5 мМ MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Подавление роста СВБ	Kögler et al., 2021

Обозначения: GA, глутаровый альдегид (glutaric aldehyde); BAC, хлорид бензалкония (benzalkonium chloride); THPS, сульфат тетракис (гидрокси метил) фосфония (tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate).



## **2.2. Биотехнологии увеличения нефтеизвлечения, основанные на стимулировании роста микроорганизмов нефтяных пластов**

К биотехнологиям, ассоциированным с процессами нефтедобычи, относится группа технологий, объединяемых под названием ММУН – микробиологические методы увеличения нефтеизвлечения. Эти методы основаны на синтезе микробных экзометаболитов, выделяемых в окружающую среду в процессе роста прокариот (Lazar et al., 2007; Youssef et al., 2009; Brown, 2010). Микробиологические методы увеличения нефтеизвлечения относятся к третичным методам добычи нефти, представляющим собой комплекс физических, химических и биотехнологических методов, которые применяются, когда вторичное заводнение речными, морскими и сточными водами становится нерентабельным (Bachmann et al., 2014).

Поверхностно-активные вещества, которые позволяют эффективнее вытеснять нефть на поверхность, могут быть синтезированы химическим или биологическим путём. Химический синтез оказывается дороже из-за высоких экономических затрат на производство, очистку, транспортировку и хранение препаратов. Биотехнологические методы предполагают использование нефтевытесняющих метаболитов, образуемых микроорганизмами либо в ферментёрах на промышленных производствах, либо непосредственно в нефтяном пласте (Silva et al., 2014; De Almeida et al., 2016). Биологический синтез поверхностно-активных веществ (биосурфактантов) непосредственно внутри нефтеносных горизонтов оказывается наиболее экономически рентабельным процессом, при этом решается и проблема доставки этих соединений в нефтяной пласт, поскольку они изначально оказываются распределены в порах пласта. В некоторых случаях используется нагнетание в нефтеносный горизонт заранее выращенной микробной биомассы требуемого состава (Banat et al., 2014). В результате применения этой биотехнологии повышается количество образуемых экзометаболитов, которые влияют на физико-химические характеристики нефтяного пласта, что приводит к увеличению количества добываемой нефти (Nazina et al., 2020c).

Спектр образуемых микроорганизмами нефтевытесняющих метаболитов весьма широк. Многие аэробные органотрофные, в том числе углеводородокисляющие бактерии, выделяют в ходе своей жизнедеятельности внеклеточные метаболиты – в частности, биосурфактанты. Эти поверхностно-активные вещества микробного происхождения снижают поверхностное и межфазное натяжение между нефтью и пластовой водой, позволяя нагнетаемым потокам жидкости вытеснять из коллектора большее количество углеводородов (Antoniou et al., 2015; Gudiña et al., 2015; Kügler et al., 2015; Борзенков и соавт., 2020). Некоторые биосурфактанты являются эмульгаторами: за счёт дробления крупных агрегаций

углеводородов на более мелкие капли увеличивается площадь соприкосновения неполярной фазы нефтеносного горизонта с пластовой водой, в результате чего действие других групп вытесняющих метаболитов и прокариотических ферментов повышается (Shavandi et al., 2011). К экзометаболитам аэробных органотрофов относят и внеклеточные полисахариды, закупоривающие наиболее проницаемые пропластки и увеличивающие охват пласта заводнением (Sun et al., 2011). Рост аэробных бактерий в призабойной зоне нагнетательных скважин приводит к распространению продуктов их жизнедеятельности по нефтяному пласту и, следовательно, более активному высвобождению углеводородов нефти из породы.

Анаэробные микроорганизмы нефтяных пластов выделяют другие группы нефтевытесняющих экзометаболитов (Wachmann et al., 2014). Прежде всего, это карбоновые кислоты – короткоцепочечные органические молекулы, которые повышают пористость и проницаемость карбонатных коллекторов вследствие растворения карбонатов самой породы, высвобождая ассоциированные с ней углеводороды нефти. Короткоцепочечные алифатические спирты, выделяемые бактериями с бродильным типом метаболизма, способствуют лучшей экстракции нефти из породы и повышают её мобильность, что также повышает эффективность процессов её извлечения из коллектора на поверхность. Денитрифицирующие прокариоты, бродильные бактерии и метаногенные археи выделяют в ходе своей жизнедеятельности газообразные соединения (молекулярный азот, водород, углекислоту и метан соответственно), которые потенциально способны повышать давление в нефтеносном горизонте и проявляют нефтевытесняющие свойства. Наконец, сама микробная биомасса способствует вытеснению углеводородов нефти, оказывая действие аналогичное экзополисахаридам: закупоривает наиболее проницаемые участки коллектора, увеличивает охват залежи заводнением, а также влияет на реологические характеристики (поверхностное и межфазное натяжение) нефти (Rellegadla et al., 2017). Основные группы нефтевытесняющих метаболитов, их воздействие на нефтяной пласт и продуцирующие их физиологические группы микроорганизмов обобщены в Таблице 2.

Применение ММУН распространено по всему миру благодаря широкому спектру возможностей роста микроорганизмов и разнообразным эффектам воздействия их метаболитов на вытеснение нефти из коллектора (Niu et al., 2020; Saravanan et al., 2020). Ярким примером успешного применяющегося ММУН является нагнетание мелассы в нефтяные пласты, в том числе на Ромашкинском нефтяном месторождении в Республике Татарстан (РФ), в процессе заводнения которого был отмечен всплеск численности анаэробных бродильных бактерий и метаногенных архей, образующих нефтевытесняющие метаболиты, и, как следствие, увеличение количества нефти, добываемой из этих пластов (Назина и соавт., 1996, 1998, 1999а,б; Brown et al., 2002; McInerney et al., 2005).

Стимулирование роста прокариот в нефтяных пластах, с одной стороны, позволяет извлекать большее количество нефти как за единицу времени, так и в процентах от общих её запасов, и с другой стороны, позволяет нивелировать эффект активации аборигенной сульфидогенной микробиоты пласта, чтобы избежать накопления в пластовой воде растворённого сульфида. В настоящее время актуальна разработка новых биотехнологий, способствующих увеличению извлечения нефти из пластов с разными физико-химическими условиями, типом нефти и вмещающих пород.

Таблица 2 – Воздействие нефтевытесняющих метаболитов на нефтяные пласты

Метаболит	Воздействие на нефтяной пласт	Продуценты
Биосурфактанты (биоПАВ)	Снижают поверхностное и межфазное натяжение на границе воды и нефти	Аэробные органотрофные бактерии
Эмульгаторы	Эмульгируют углеводороды и увеличивают площадь их соприкосновения с пластовой водой	
Внеклеточные полисахариды	Способствуют вытеснению парафинов нефти, селективно закупоривают участки пласта, перенаправляют потоки	
Микробная биомасса	нагнетаемой воды, влияют на реологические характеристики пласта	Микробиота нефтяного пласта
Карбоновые кислоты	Повышают пористость и проницаемость коллекторов, высвобождают из них углеводороды	Бактерии с бродильным типом метаболизма
Алифатические спирты	Способствуют экстракции нефти из породы, повышают эффективность её извлечения из пласта на поверхность	
Биогазы	Повышают давление в пласте и влияют на вытеснение нефти	Денитрифицирующие, бродильные бактерии, метаногенные археи

### Заключение по обзору литературы

В нефтяном пласте обитает многокомпонентное микробное сообщество, состав которого определяется типом нефти и вмещающих пород и сочетанием экологических факторов, таких как температура, солёность, окислительно-восстановительный потенциал и

кислотность пластовой воды, содержанием в ней растворимых органических субстратов и доступных акцепторов электронов, органогенных элементов и их ионов.

Применение ММУН приводит к активации всех групп пластовой микробиоты и формированию трофических цепей, включающих аэробные органотрофные бактерии, развивающиеся в призабойной зоне нагнетательных скважин, где они расщепляют легкодоступные субстраты, используя растворенный кислород, поступающий с нагнетаемой водой. Продукты их жизнедеятельности с током нагнетаемой воды мигрируют в анаэробную зону пласта. Бактерии с бродильным типом метаболизма являются следующим звеном пищевой цепи, они потребляют значительную часть поступающего органического вещества и продуцируют короткоцепочечные органические соединения, которые используются терминальными группами трофической цепи – сульфатвосстанавливающими бактериями или археями при наличии в пластовой воде окисленных соединений серы либо метаногенными археями в бессульфатных пластовых водах. Состав микробного сообщества определяет спектр биотехнологий, которые на этом месторождении будут наиболее эффективны.

ММУН, основанные на стимулировании роста аэробных бактерий, окисляющих нефть, предполагают выделение этими прокариотами биоПАВ (биосурфактантов), эмульгаторов и внеклеточных полисахаридов, которые за счёт своего воздействия на нефтяной пласт повышают эффективность технологии заводнения, что приводит к увеличению количества добываемой нефти. Стимулирование роста анаэробных микроорганизмов приводит к накоплению в пластовой воде прежде всего продуктов жизнедеятельности бродильных бактерий, включающих низшие спирты и карбоновые кислоты, органические растворители. Эти соединения влияют на вмещающую породу коллектора и также позволяют извлечь большее количество связанной с ней нефти на поверхность.

Одним из наиболее значимых рисков применения ММУН является активация сульфидогенных микроорганизмов, из-за которой в пластовой воде накапливаются большие количества растворённого сульфида, что снижает качество нефти, увеличивает стоимость ее переработки и негативно воздействует на экологическую обстановку. Биологические методы борьбы с процессом сульфатредукции включают в себя нитратное заводнение или нагнетание растворов биоцидов для селективного подавления сульфидогенов. Успешность применения этих методов напрямую зависит от состава микробного сообщества, в связи с этим исследования воздействия этих растворов на нефтяные пласты с разным сочетанием экологических характеристик и преобладанием различных функциональных групп микробиоты сохраняют свою актуальность до сегодняшнего дня.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Объект исследования

Объектом исследования являлись микроорганизмы пластовой и нагнетаемой воды нефтяных месторождений Республики Татарстан (РФ) и Республики Казахстан. В Татарстане исследовали Ромашкинское, Архангельское, Ново-Елховское, Восточно-Анзирское и Черёмуховское месторождения. В Республике Казахстан исследовали нефтяные месторождения Узень и Каражанбас. Все исследованные пробы пластовой воды были отобраны в 2016–2021 годах сотрудниками лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН в ходе экспедиций на указанные месторождения.

Пробы пластовой и нагнетаемой воды были отобраны на устье нагнетательных и добывающих скважин соответственно в стерильные пластмассовые бутылки, которые заполняли доверху без пузырьков воздуха и затем хранили при 4°C. Пластовую воду использовали для посева на элективные среды для учёта численности микроорганизмов основных физиологических групп. Для определения состава микробного сообщества молекулярным методом пластовую воду отбирали отдельно и фиксировали 97% этанолом (1:1, об./об.) в момент отбора.

#### 3.2. Состав питательных сред и условия культивирования

Для учёта, выделения и культивирования аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов и проверки их роста на разных источниках углерода использовали модифицированную среду Адкинса (Adkins et al., 1992) следующего состава (г/л дистиллированной воды):  $K_2HPO_4$  – 1,5;  $NH_4Cl$  – 1,0;  $KH_2PO_4$  – 0,75;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2;  $KCl$  – 0,1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0,02; pH 7,0±0,1 (25°C). До стерилизации в среду добавляли раствор микроэлементов (1,0 мл/л) (Pfennig, Lippert, 1966) следующего состава (мг/100 мл дистиллированной воды): трилон Б – 500;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 200;  $H_3BO_4$  – 30;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 20;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 10;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 3;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 3;  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  – 2;  $CuCl_2 \cdot 6H_2O$  – 1. Среду стерилизовали при 1 ати без добавления органических субстратов.

Субстраты вносили в среду из заранее приготовленных стерильных растворов в следующих конечных концентрациях (г/л): ацетат натрия – 2,0; глюкоза – 5,0; сырая нефть – 5,0. В среды добавляли  $NaCl$  в концентрации от 0 до 45 г/л в зависимости от солёности пластовой воды исследованного местообитания или оптимальной солёности для роста

выделенной культуры. Мезофильные микроорганизмы культивировали при температуре 25°C, умеренных термофилов – при 55°C.

Для учёта численности и культивирования аэробных органотрофных бактерий использовали также богатую среду TEG, содержащую (г/л дистиллированной воды): триптон – 5,0, дрожжевой экстракт – 2,5 и глюкозу – 1,0; pH 7,0±0,1 (25°C). Для выделения чистых культур готовили плотную питательную среду TEG с добавлением 20 г агара/л. Оба варианта среды стерилизовали при 0,5 ати.

Облигатно и факультативно анаэробные микроорганизмы культивировали с использованием техники Хангейта (Hungate, 1969). Приготовленную минеральную питательную среду кипятили и разливали горячей в пробирки Хангейта в токе инертного газа, аргона. Минеральную основу стерилизовали при 1 ати, органические субстраты стерилизовали отдельно при 0,5 ати и затем шприцами добавляли в пробирки Хангейта до необходимых конечных концентраций. Для строго анаэробных микроорганизмов после стерилизации в среду вносили восстановитель в виде 0,5 г L-цистеина/л или 0,1–0,5 г Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O/л; индикатором окислительно-восстановительных условий служил резазурин. Для автотрофных прокариот, включая гидрогенотрофных метаногенов, аргон после стерилизации среды заменяли смесью молекулярного водорода и углекислого газа (4:1, об./об.).

Для культивирования бродильных бактерий использовали среду Постгейта (Postgate, 1984) следующего состава (г/л дистиллированной воды): глюкоза – 10,0; пептон – 4,0; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 1,0; соль Мора (FeSO<sub>4</sub>·(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O) – 0,5; pH 7,0±0,1 (25°C). Среду стерилизовали при 0,5 ати. Для культивирования денитрифицирующих бактерий в среду Адкинса вносили соответствующий органический субстрат и NaNO<sub>3</sub> (0,85 г/л) в качестве акцептора электронов.

В качестве минеральной основы для культивирования облигатно анаэробных сульфидогенных и метаногенных прокариот использовали модифицированную среду (Widdel, Pfennig, 1981) следующего состава (г/л дистиллированной воды): KCl – 0,5; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,4; NH<sub>4</sub>Cl – 0,25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,1; раствор витаминов по Волину (Wolin et al., 1963); раствор микроэлементов по Пфеннигу и Липперту – 1,0 мл/л; pH 7,0±0,1 (25°C). Для сульфатредуцирующих бактерий в среду вносили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,8 г/л, лактат натрия – 4,0 г/л и дрожжевой экстракт – 0,5 г/л; для тиосульфатредуцирующих – Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O – 1,6 г/л и сахарозу – 5,0 г/л. Метаногенных архей учитывали по образованию метана в минеральной среде, содержащей ацетат натрия – 2,0 г/л, метанол – 2 мл/л, дрожжевой экстракт – 1,0 г/л и смесь водорода и углекислоты в газовой фазе в соотношении 4:1 (об./об.).

В качестве минерального носителя для формирования биоплёнок использовали стальную купон со средней массой 1,786 г (НПП ООО «КОРСИСТЕМ», Москва, РФ). Питательную среду (25 мл) готовили в герметично закрытых флаконах объёмом 30 мл, куда вносили 0,5 мл инокулята и инкубировали при температуре нефтяного пласта (42–55°C). Отрицательным контролем была аналогичная питательная среда со стальным купоном без инокулята. Бицид Ранцид-7005 вносили в концентрациях 40–120 мг/л, глутаровый альдегид – 100 мг/л. Положительным контролем устойчивости к бицидам была заражённая питательная среда с носителем без бицида.

### 3.3. Методы фенотипического анализа

*Световая микроскопия.* Морфологию клеток изучали, просматривая препараты, приготовленные методом «раздавленная капля», в световом микроскопе CX41 (Olympus, Токио, Япония) с фазово-контрастным устройством и иммерсионным объективом (увеличение 10×100).

*Электронная микроскопия.* Электронные микрофотографии получали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого биомассу выделенных штаммов наращивали на среде TEG с тефлоновыми кубиками, а затем подготавливали для наблюдения с использованием фосфатного буфера (pH 7,0), этилового спирта и ацетона по описанной методике (Sokolova et al., 2021). Образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе Quattro S (Thermo Fisher Scientific Brno s.r.o., Брно, Чешская Республика) при ускоряющем напряжении 15 кВ. СЭМ-исследования были выполнены к.б.н. Н.Г. Лойко (ФИЦ Биотехнологии РАН) в центре “Электронная микроскопия в науках о жизни” Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (уникальное оборудование “Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия”) с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета.

*Определение каталазной активности.* Активность фермента каталазы определяли общепринятым методом с перекисью водорода.

*Анализ спектров синтезируемых ферментов и используемых субстратов.* Активность ферментов и потребление субстратов выделенными штаммами измеряли с помощью тестов API® ZYM, API® 20E и API® 50CH (bioMérieux SA, Марси-л'Этуаль, Франция) при 22°C в течение 3–5 суток.

*Определение антибиотикорезистентности.* Устойчивость к антибиотикам проверяли на среде TEG на чашках Петри с дисками (HiMedia, Мумбай, Индия) с карбенициллином (100 мкг), эритромицином (15 мкг), гентамицином (10 мкг) и канамицином (30 мкг) на

основании диаметра зон чувствительности (подавление роста >10 мм) вокруг дисков с антибиотиками после 5 суток культивирования.

### 3.4. Молекулярно-биологические методы

*Анализ последовательностей гена 16S рРНК.* Таксономическое положение чистых культур бактерий, выделенных из нефтяных пластов, определяли методом анализа гена 16S рРНК. Для этого из единичных колоний аэробных бактерий либо из биомассы анаэробно выращенной культуры выделяли ДНК с помощью набора «Diatom™ DNA Prep 100» (ООО "Лаборатория Изоген", Москва, РФ). Выделенная ДНК являлась матрицей в полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными праймерами 8-27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991; Brunk et al., 1996). Последовательность гена 16S рРНК определяли, объединяя последовательности, получившиеся в результате ПЦР с использованием прямого и обратного праймеров.

ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей матрицу ДНК (10–50 нг), набор дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (по 200 мкМ), 0,5 единицы термостабильной Taq ДНК-полимеразы, по 5 пмоль указанных праймеров и Taq-буфер [50 мМ KCl, 10 мМ Трис-НСl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 8,3]. Амплификация включала в себя активацию полимеразы при 94°C (3 мин), 30 циклов элонгации [денатурация ДНК при 94°C (30 с), отжиг праймеров при 50°C (30 с), элонгацию продукта при 72°C (90 с)] и финальную элонгацию при 72°C (7 мин). Аналитический электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1% агарозном геле, в качестве красителя применяли этидиум бромид, для визуализации амплификата использовали ультрафиолетовый свет.

Амплификат (целевой ДНК-продукт) пересаждали этанолом для очистки от компонентов смеси ПЦР: к амплификату добавляли CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (0,75 М, рН 5,0) и CH<sub>3</sub>COOH (70%), выдерживали при 25°C (20 мин) и центрифугировали при 13000 g (20 мин). Получившийся осадок снова промывали этиловым спиртом (70%) и высушивали, после чего ресуспендировали в деионизованной воде Milli-Q (удельное сопротивление 18,2 МОм·см).

ПЦР-продукты гена 16S рРНК секвенировали с использованием автоматического секвенатора 3730 DNA Analyzer и набора «ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 reagent kit» (Applied Biosystems, Inc., Уолтем, США). Секвенирование проводили в ЦКП «Геном» в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

*Амплификация генов dsrA и dsrB.* Выделенную ДНК использовали для полимеразной цепной реакции с праймерами DSR-1Fdeg (5'-ACSCAYTGGAARCACG-3') и PJdsr853Rdeg (5'-CGGTGMAGYTCRTCCTG-3') (Quillet et al., 2012) для амплификации гена *dsrA* и DSR



2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCAGGG-3') и DSR 4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') (Geets et al., 2006) – для *dsrB*. ПЦР проводили на амплификаторе iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США) в 10 мкл смеси, содержащей 1x Taq-буфер (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 5 пикомолей концевых праймеров, 1 ед. активности Taq ДНК-полимеразы (PerkinElmer, Inc., Шелтон, США) и матричную ДНК. Амплификацию ДНК со специфичными праймерами проводили в следующем режиме: 1 цикл 2 мин при 94°C и затем 40 циклов (0.5 мин при 94°C, 0.5 мин при 54°C, 0.5 мин при 72°C и 5 мин при 72°C). Длину полученных фрагментов проверяли в 1.0% агарозном геле с бромистым этидием.

*Анализ состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 фрагментов генов 16S рРНК.* Тотальную ДНК из фиксированных этанолом проб пластиковой воды выделяли стандартным методом (Маниатис и соавт., 1984); библиотеки генов 16S рРНК получали путём амплификации V3–V4 гипервариабельного региона генов 16S рРНК, которые затем подвергали двойному баркодированию (Fadrosh et al., 2014). Смысловые участки праймеров соответствовали паре праймеров Pro341F–Pro805R (Takahashi et al., 2014). Секвенирование проводили на платформе MiSeq с использованием набора реагентов «MiSeq Reagent Kit v3» (Illumina, Inc., Сан-Диего, США).

*Секвенирование полных геномов микроорганизмов.* Геномную ДНК выделяли из клеток микроорганизмов с помощью набора «QIAamp DNA Mini Kit» (QIAGEN, Джермантаун, США). Высокопроизводительное секвенирование проводили на коммерческой основе в лаборатории геномики микроорганизмов и метагеномики (рук. д.б.н., профессор А.В. Марданов) ФИЦ Биотехнологии РАН с использованием платформы HiSeq 2500 (Illumina, Inc., Сан-Диего, США) и парноконцевых прочтений длиной по 150 пар нуклеотидов.

### 3.5. Методы биоинформатического анализа

*Идентификация чистых культур микроорганизмов.* Анализ последовательностей гена 16S рРНК осуществляли с помощью пакета программ DNASTar и онлайн-сервиса EzBioCloud (Yoon et al., 2017). С использованием сервиса NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) проводили сравнение полученных последовательностей с таковыми у валидно описанных видов прокариот, депонированными в базу данных GenBank, что позволяло определить таксономическое положение исследованных штаммов прокариот.

*Определение состава микробных сообществ.* Контроль качества результатов секвенирования осуществляли с помощью UPARSE (Edgar, 2013). Фрагменты генов 16S рРНК, согласно алгоритму SLIDINGWINDOW:4:15 (Bolger et al., 2014), обрезали в

программе trimomatic-0.36; правосторонние и левосторонние прочтения объединяли, используя программу SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Обработку последовательностей проводили в программе Qiime, при этом применяли демультиплексирование и фильтрацию химер (Caporaso et al., 2010). Группировка последовательностей в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на основании их сходства на уровне 97% проводилась с помощью USEARCH (Edgar, 2010). Таксономическую принадлежность полученных ОТЕ определяли по классификатору RDP (Maidak et al., 2000). Для идентификации ОТЕ использовали онлайн-ресурс SILVA (Quast et al., 2014).

*Сборка полных геномов микроорганизмов.* Сырые чтения были проверены на качество с использованием FastQC v. 0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Квалифицированные чтения были заново собраны с помощью SPAdes v. 3.13.0 (Bankevich et al., 2012) со стандартными настройками и проверены с использованием QUAST v. 5.0 (Gurevich et al., 2013). Покрывания геномов оценивали с помощью QualiMap 2 v. 2.2.2 (Okonechnikov et al., 2016) и Bowtie 2 v. 2.3.5.1 (Langmead, Salzberg, 2012), а их аннотацию проводили через NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline v. 4.7 (Tatusova et al., 2016). Секвенирование и сборка геномов были выполнены д.б.н. А.В. Мардановым и к.б.н. В.В. Кадниковым в лаборатории геномики микроорганизмов и метагеномики ФИЦ Биотехнологии РАН.

*Филогенетический анализ геномов микроорганизмов.* Сравнение собранных геномов проводили на основании объединения 120 однокопийных коровых белков в программе GTDB-Tk version 1.0.2 (Chaumeil et al., 2020). Для определения таксономического положения штаммов по их геному использовали границы, рекомендованные Chun et al. (2018). Цифровую ДНК–ДНК гибридизацию *in silico* (dDDH) осуществляли с помощью Genome-to-Genome Distance Calculator v. 3.0 (Meier-Kolthoff et al., 2013, 2022). Среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) рассчитывали с помощью FastANI v. 1.3 (Jain et al., 2018), средней аминокислотной идентичности (AAI) – CompareM v. 0.0.23 с функцией aai\_wf, доли консервативных белков (POCP) – runPOCP.sh (Grouzdev et al., 2018) на основании ранее описанного подхода (Qin et al., 2014). Кольцевые карты хромосом исследованных штаммов строили с использованием онлайн-сервиса Proksee (<https://proksee.ca>). Пангеномный анализ проводили по методу Delmont и Eren (2018) с использованием Anvi'o version 7.0 (Eren et al., 2015).

*Построение филогенетических деревьев.* Последовательности генов 16S рРНК были выровнены с помощью MUSCLE (Edgar, 2004). Реконструкцию дерева по методу наибольшего правдоподобия проводили с использованием эволюционной модели GTR+F+I+G4, рекомендованной ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) при вычислении

через IQ-TREE (Nguyen et al., 2015); для филогенетического дерева на основе полных геномов использовали также ModelFinder и IQ-TREE. Бутстреп-поддержку ветвей рассчитывали через UFBoot2 (Hoang et al., 2018a). Деревья по методу максимальной экономии строили с использованием MPBoot (Hoang et al., 2018b), а по методу присоединения соседей – в программе MEGA11 (Tamura et al., 2021).

*Анализ потенциальных метаболических путей микроорганизмов.* Для реконструкции путей метаболизма, в том числе осмопротекторов и углеводов, использовали сравнение геномов исследованных штаммов на онлайн-платформах KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) с модулем Local Mapper для прогнозирования индивидуальных профилей ферментов, а также на платформе BV-BRC (PATRIC) 3.34.11 (<https://www.bv-brc.org/>). Кластеры генов деградации алканов и синтеза осмопротекторов сравнивали с использованием онлайн-сервиса Gene Graphics (<https://katlabs.cc/genegraphics/app>).

*Статистический анализ полученных результатов.* Онлайн-ресурс ClustVis (Metsalu, Vilo, 2015) был использован для построения тепловых карт состава исследованных микробных сообществ и для корреляционного анализа полученных результатов по методу главных компонент. Канонический корреляционный анализ был проведён с применением программного обеспечения PAST ver. 4.03 (Hammer et al., 2001). Расчёты осуществляли с помощью пакета vegan программы Rstudio (Oksanen et al., 2007) и Microsoft Excel.

### 3.6. Аналитические методы

*Определение pH.* Кислотность растворов, питательных сред и культуральных жидкостей измеряли с помощью pH-метра/иономера Seven Compact S220 (Mettler Toledo, Грайфензе, Швейцария).

*Определение оптической плотности.* Для нефелометрической оценки концентрации клеток в образцах использовали спектрофотометр Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences, Амершем, Великобритания) и кюветы шириной 1 см. Измерения проводили при 660 нм (OD<sub>660</sub>).

*Анализ планктонного и биоплёночного роста микроорганизмов.* Формирование биоплёнок на плотном носителе (стальной купон) и рост планктонной культуры определяли методом окрашивания с МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) и ДМСО (диметилсульфоксид) на основе предложенного ранее метода (Wang et al., 2010; Плакунов и соавт., 2016). Исследованные микроорганизмы культивировали 14–19 суток. Приготовленную заранее стерильную питательную среду (объёмом 30 мл во флаконах с аргоном в качестве газовой фазы) нагревали до температуры образцов и вносили в неё МТТ

до конечной концентрации 0.2%. Водную фазу (планктонную культуру) переливали из инкубационных флаконов в стерильные флаконы и окрашивали путём добавления 1 мл 0.4% раствора МТТ в среде на 1 мл культуральной жидкости. В оставшуюся твёрдую фазу (носитель с биоплёнкой) добавляли 3 мл 0.2% раствора МТТ в среде. Затем планктонную культуру и биоплёнки инкубировали 120 минут при той же температуре и охлаждали до 25°C. Клетки планктонной культуры осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 7000 об/мин, супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 5 мл химически чистого ДМСО, а носитель с биоплёнками промывали стерильной водопроводной водой и помещали в 3 мл ДМСО. Образующийся формазан ( $H_2NN=CHN=NH$ , азогидразон муравьиной кислоты) экстрагировали в темноте в течение суток, после чего измеряли оптическую плотность экстрактов на спектрофотометре Ultrospec 2100 pro при 540 нм. Показатель окраски биоплёнок пересчитывали на 1 г носителя. Выживаемость культур определяли в процентах к контролю.

*Определение сульфида.* Содержание сульфид-иона в исследованных растворах измеряли колориметрическим методом (Trüper, Schlegel, 1964). К 1 мл 0,5% раствора  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  добавляли 0,02 мл культуральной жидкости, чтобы зафиксировать растворенный сульфид в виде ZnS. Затем последовательно вносили 1 мл 0,1% раствора N,N-диметил-*n*-фенилендиамин дигидрохлорида в 10%  $H_2SO_4$  и 1 мл раствора хлорида железа (0,1%  $FeCl_3$  в 1% серной кислоте) и выдерживали образец при комнатной температуре в течение 20 минут. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Ultrospec 2100 pro в кювете толщиной 1 см при длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ). Концентрацию рассчитывали по калибровочной кривой в диапазоне 20–200 мг  $HS^-/л$ .

*Определение нитрита.* Для измерения концентрации нитрит-иона использовали свежеприготовленный 10% раствор Грисса, полученный растворением сухого реактива Грисса в 12% уксусной кислоте. К 300 мкл пробы добавляли 10 мкл раствора Грисса и спустя 40 сек сравнивали цвет раствора с окраской калибровочных растворов в диапазоне концентраций 2–100 мг  $NO_2^-/л$ .

*Определение  $N_2$  и  $N_2O$ .* Молекулярный азот и оксид (I) азота в газовой фазе определяли с помощью газового хроматографа «Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Йошкар-Ола, РФ) и колонки HayeSep-N 80/100 с температурой 40°C, температурой нагревания 200°C и аргоном в качестве газа-носителя.

*Определение поверхностного и межфазного натяжения.* Поверхностное натяжение культуральных жидкостей на границе с атмосферным воздухом и межфазное натяжение на границе раздела фаз между культуральной жидкостью и гексадеканом определяли с помощью полуавтоматического тензиометра Surface Tensiomat 21 (Cole-Parmer, Вернон-

Хиллз, США) полустатическим методом отрыва платиноиридиевого кольца. Пробы с гексадеканом выдерживали 30 мин (25°C) для получения чёткой границы раздела фаз.

*Экстракция и разделение нефти на фракции.* В культуру, выросшую на нефти, добавляли 25 мл *n*-гексана на 100 мл культуральной жидкости, затем интенсивно перемешивали и из смеси экстрагировали неполярную фракцию в течение 10 мин (25°C). 10 мл неполярной фракции с растворенными в ней компонентами нефти переносили в делительную колонку, содержащую 3 г силикагеля в качестве сорбента. Элюентом – подвижной фазой колонки – являлся гексан. После прохождения через колонку пробу упаривали до 50 мкл, после чего анализировали газохроматографическим методом.

*Газовая хроматография алканов нефти.* Из парафиновой фракции нефти, отделённой по описанной выше методике, отбирали 1 мкл и анализировали на газовом хроматографе «Кристалл 5000.1» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Йошкар-Ола, РФ). Определяли содержание алканов в деградированной микроорганизмами нефти по сравнению с контрольной пробой без инокулята (Борзенков и соавт., 2006). Газовый хроматограф содержал капиллярную колонку ZB-1 с рабочими температурами 100–310°C и пламенно-ионизационным детектором с температурой 320°C. Газом-носителем являлся гелий. Остаточное содержание алканов нефти рассчитывали относительно контрольной пробы по методу внутренней нормализации (Богомолов, Абрютин, 1984).

*Ультрацентрифугирование.* Для выполнения хемотаксономических исследований состава жирных кислот, фосфолипидов и менахинонов биомассу бактерий отделяли от среды культивирования с использованием метода ультрацентрифугирования. Культуры прокариот переносили в пластмассовые стаканы объёмом 500 мл и центрифугировали со скоростью 9000 об/мин в течение 20 мин с охлаждением до 4 °C на центрифуге Sigma 6K15 (Merck KGaA, Дармштадт, Германия).

*Определение масс-спектра менахинонов микроорганизмов.* Изопреноидные хиноны экстрагировали из «мокрой» биомассы, очищали согласно описанной методике (Collins, Jones, 1981) и анализировали с использованием масс-спектрометра Thermo Finnigan LCQ Advantage MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, США) во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) в г. Пущино.

*Определение состава жирных кислот клеточной стенки.* Для анализа жирных кислот использовали газовый хроматограф с масс-спектрометром 7890B+5977B (Agilent Technologies, Санта-Клара, США). Клеточную биомассу подвергали кислотному метанолизу, экстрагированные продукты обрабатывали щёлочью и затем разделяли их на силиконовой капиллярной колонке HP-5MS (0.25 мм × 30 м), анализируя их в сканирующем режиме и идентифицируя с использованием библиотеки масс-спектрометра NIST17. Содержание

жирных кислот определяли как процентные доли от общей площади пиков. Анализ проводили в ВКМ в г. Пущино.

*Определение состава мембранных липидов клеточной стенки.* Экстракт полярных липидов готовили по стандартной методике (Minnikin et al., 1984). Липиды после упаривания и ресуспендирования разделяли с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии на стеклянных пластинах TLC Silica gel 60 (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) и визуализировали с использованием 5% серной кислоты в этаноле. Фосфолипиды идентифицировали с помощью модифицированного молибденового синего и реагента Дитмера-Лестера (Vaskovsky et al., 1975), аминокислотосодержащие липиды – с помощью нингидрина, гликолипиды –  $\alpha$ -нафтолом, холин – реактивом Драгендорфа (Kates, 1972). Анализ был выполнен в группе экспериментальной микологии ФИЦ Биотехнологии РАН (руководитель группы – д.б.н. В.М. Терешина).

## ГЛАВА 4. РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ В НЕФТЯНЫХ ПЛАСТАХ РОССИИ И КАЗАХСТАНА

### 4.1. Физико-химические условия и культивируемые микроорганизмы исследованных нефтяных пластов

Исследованные нефтяные пласты Республики Татарстан (РФ) и Республики Казахстан различались физико-химическими условиями (температурой, pH и солёностью пластовой воды, содержанием сульфатов и сульфида), типом нефти и вмещающих пород. Из более чем 80 исследованных проб для детального анализа было выбрано 18 наиболее показательных проб пластовой воды (Таблица 3). Нефтеносные горизонты месторождения Каражанбас залегали на глубине 230–460 м ниже уровня моря, в то время как отдельные участки месторождения Узень находились на глубине 1370 м. Месторождения Татарстана занимали промежуточное положение между ними по глубине залегания нефтеносных горизонтов.

Нефтяные пласты, расположенные в Республике Татарстан, характеризовались температурой 20–40°C, что способствовало росту мезофильных микроорганизмов. Нефтяные пласты месторождений Каражанбас и Узень в Республике Казахстан преимущественно были высокотемпературными (до 75°C), выделенные оттуда прокариоты являлись умеренными термофилами. Исследованные пробы пластовой и нагнетаемой воды характеризовались значениями pH от 6,3 до 8,5.

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. На нефтяных пластах Татарстана наблюдался градиент минерализации между нагнетаемой пресной водой и пробами пластовой воды из добывающих скважин, где общая минерализация на отдельных участках (Черёмуховское месторождение, данные не представлены) достигала 186 г/л.

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 (Sokolova et al., 2021). В результате заводнения морской водой общая минерализация пластовой воды на ряде участков месторождения Узень 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.

Таблица 3 – Физико-химическая характеристика проб пластовой воды нефтяных месторождений (Соколова и соавт., 2020; Nazina et al., 2020c; Sokolova et al., 2021; Kadnikov et al., 2023)

Месторождение	Скважина	Температура, °С	рН	Общая минерализация, г/л	Содержание, г/л					
					Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup> + K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HS <sup>-</sup>
Архангельское	7860	20	6,5	116,355	15,587	7,318	73,007	94,815	0,768	0
Ново-Елховское	7511	22	6,1	107,218	17,287	11,525	60,000	88,235	0,300	0
Ромашкинское	47Б	40	6,4	81,813	7,014	1,520	22,762	50,101	0,018	0
	15500	22	7,6	75,853	6,998	6,540	48,412	57,633	4,034	0,300
	35943	22	7,5	62,552	3,560	2,543	44,089	43,225	6,362	0,300
Узень	3239	55	6,6	37,902	2,405	1,946	9,129	22,922	1,282	0,020
	7574	55	6,4	36,345	2,405	1,702	8,965	22,546	0,433	0,002
	8533	55	8,0	14,039	1,202	0,730	2,949	8,267	0,086	0,106
	9064	55	6,8	30,839	1,804	1,094	8,370	18,789	0,234	0,161
	2755*	42	6,6	51,411	3,808	1,459	13,763	31,942	0,049	0,003
	ЦППН	55	6,6	41,363	3,006	1,581	1,051	25,928	0,020	0,002
	4256	55	6,3	80,533	4,810	2,432	22,637	50,399	0	0,008
	6038	25	6,4	49,192	3,006	3,040	11,362	31,565	0	0,002
	7062	55	6,3	43,039	2,004	1,338	12,627	26,680	0	0,018
	8001	55	6,7	47,128	2,204	1,338	14,044	29,310	0	0,091
9677	55	7,0	24,210	1,202	0,973	6,587	14,655	0	0,012	
Каражанбас	5019	58	6,7	3,354	0,080	0,049	1,051	1,503	0,061	0,022
	7309	75	6,8	2,212	0,040	0,024	0,690	0,827	0,070	0,034

\*Проба изливающейся воды (30 м<sup>3</sup>) из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755.



Результаты определения численности культивируемых микроорганизмов основных физиологических групп в пробах пластовой воды из нефтяных пластов Татарстана и Казахстана представлены на Рисунке 1.

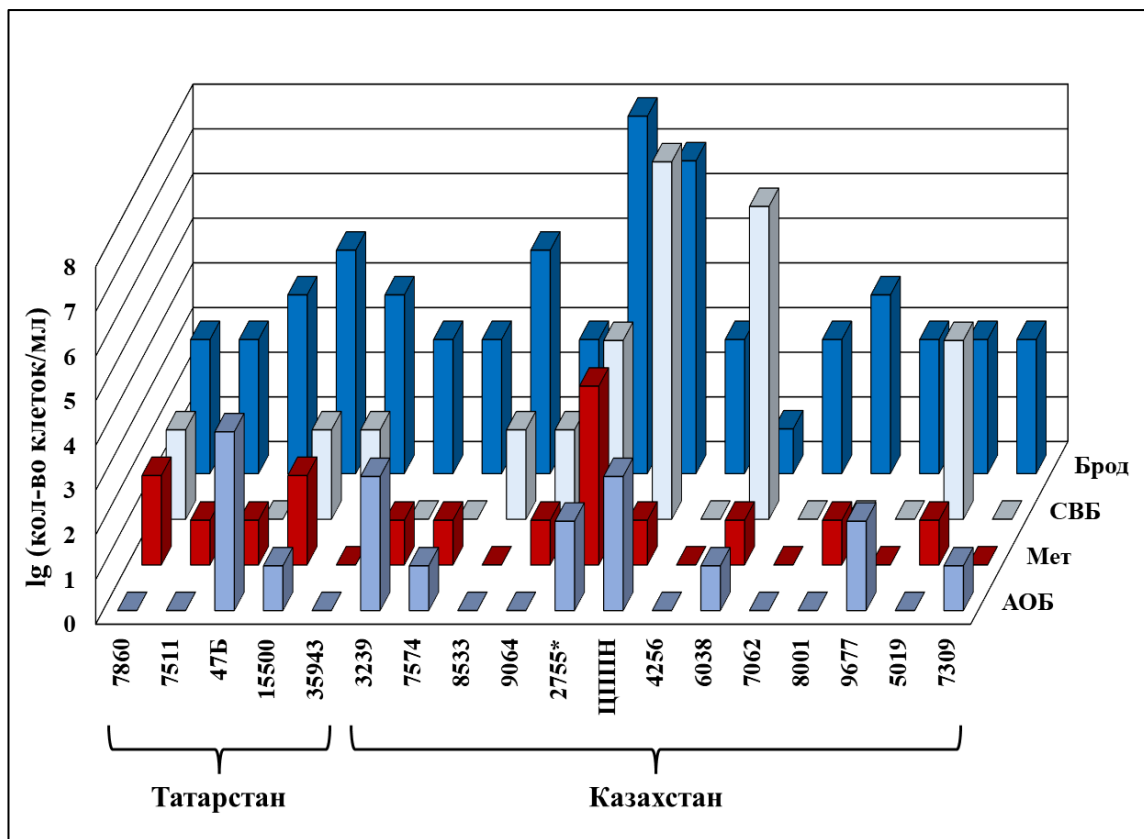


Рисунок 1 – Численность культивируемых микроорганизмов основных физиологических групп в пластовой воде нефтяных пластов. Обозначения: АОБ, аэробные органотрофные бактерии; Met, метаногенные археи; СВБ, сульфатвосстанавливающие бактерии; Брод, прокарियोты с бродильным типом метаболизма.

Практически все исследованные сообщества характеризовались наибольшей численностью бродильных бактерий (от  $10^2$  до  $10^8$  кл/мл). Аэробные органотрофные бактерии численностью (от  $10^2$  до  $10^4$  кл/мл) присутствовали в отдельных пробах пластовой воды из добывающих скважин (47Б, 3239 и 9677), в воде, изливающейся из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755, объем излива  $30 \text{ м}^3$  (проба обозначена 2755\*), и в системе сепарации нефти (ЦППН). СВБ, как правило, отсутствовали в пробах бессульфатной пластовой воды. В большинстве исследованных проб СВБ не обнаруживались на среде с лактатом, однако на отдельных участках нефтяного месторождения Узень (8533, 9064, 2755\* и 6038) и в воде из цеха первичной подготовки нефти (ЦППН) численность СВБ составляла  $10^2$ – $10^8$  клеток/мл, что создавало условия для сульфидогенеза и коррозии нефтепромыслового оборудования. В большей части исследованных сообществ также присутствовали метаногенные археи, численность которых не превышала  $10^4$  кл/мл.

#### 4.2. Филогенетическое разнообразие прокариот в пробах пластовой воды

Состав микробных сообществ пластовой воды, отобранной из нефтяных пластов, был исследован методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона генов 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq. Полученные флотипы прокариот в библиотеках генов каждого из исследованных сообществ были классифицированы на уровне классов и представлены в виде гистограммы на Рисунке 2.

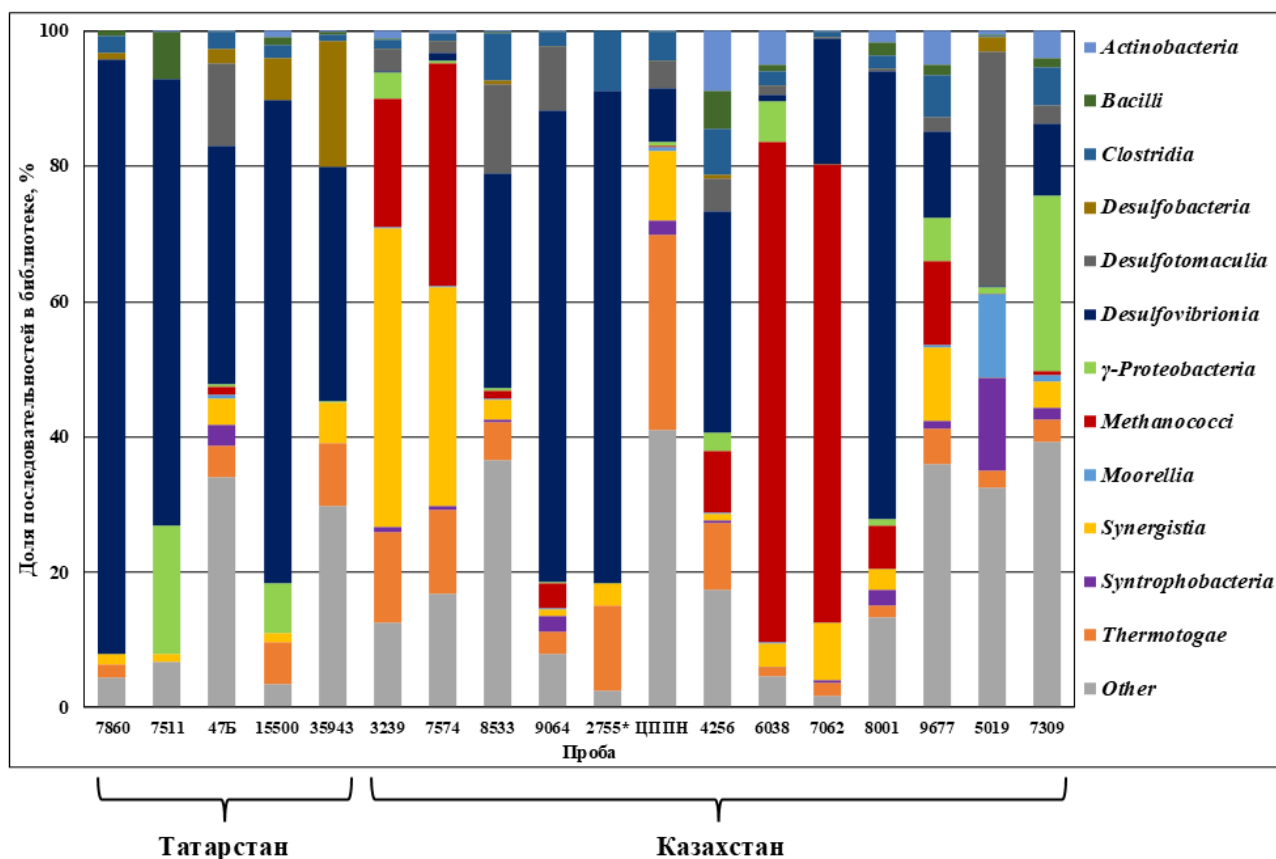


Рисунок 2 – Таксономический состав микробных сообществ на уровне классов в пробах пластовой воды, определенный методом анализа фрагментов генов 16S рРНК.

Значительная доля флотипов прокариот в сообществах пластовой воды исследованных месторождений 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. Сульфатвосстанавливающие бактерии классов *Desulfotomaculia*, *Desulfobacteria*, *Clostridia*, *Moorellia* и *Syntrophobacteria* были менее представлены в этих сообществах. Обнаружены бактерии классов *Gamma-proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacilli*, к которым относятся многие аэробные углеводородокисляющие бактерии. На среде Адкинса с сырой нефтью в качестве

единственного источника углерода были выделены чистые культуры бактерий этой физиологической группы.

Для более детального сопоставления характеристик нефтяных пластов и обитающих в них микроорганизмов был выполнен канонический корреляционный анализ состава этих сообществ относительно значений температуры, общей солёности, кислотности среды и содержания в ней сульфата и сульфида. Результаты анализа представлены на Рисунке 3.

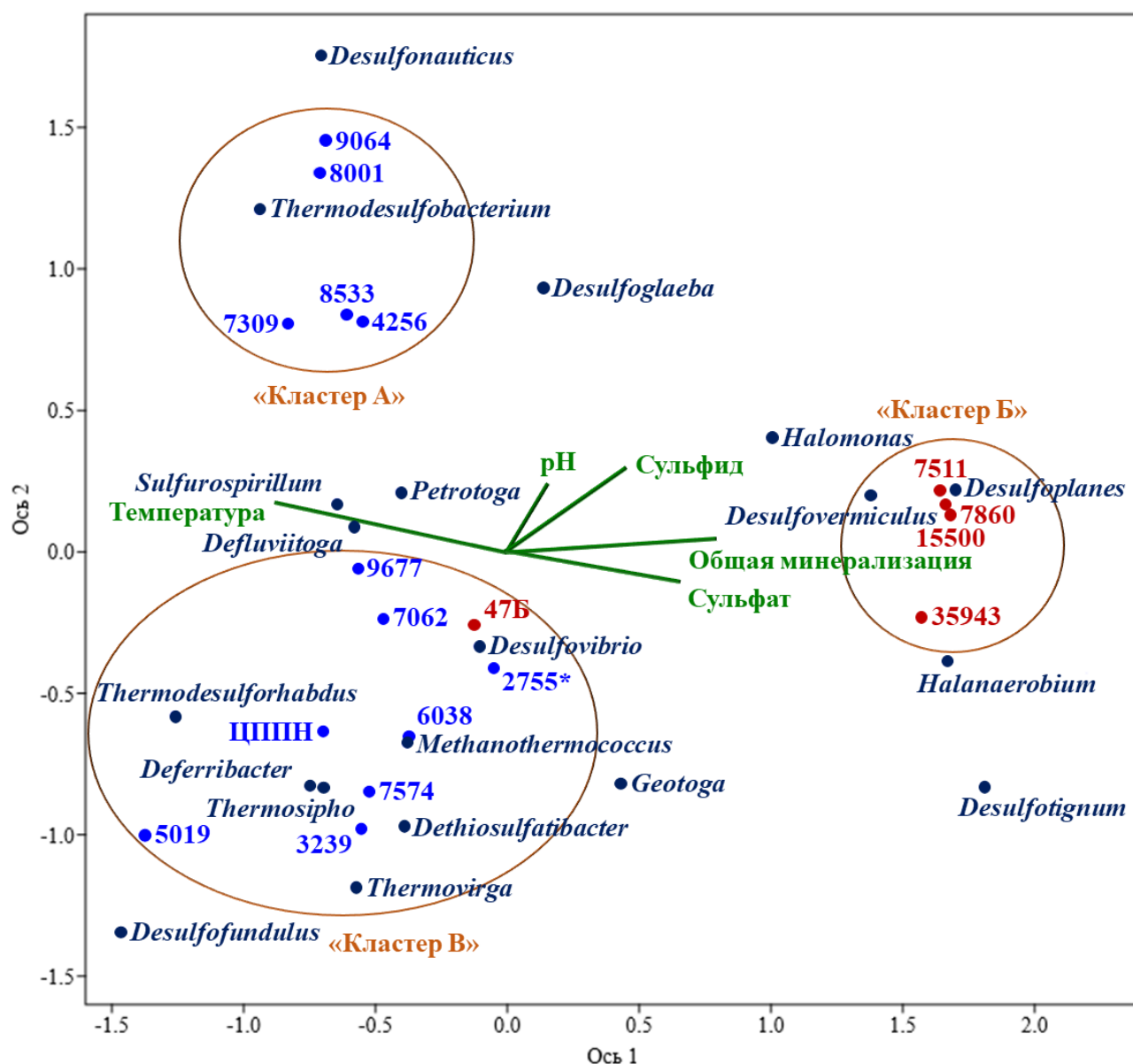


Рисунок 3 – Канонический корреляционный анализ филогенетического разнообразия прокариот и геохимических параметров пластовой воды.

Исследованные сообщества кластеризовались по своим геохимическим характеристикам в три обособленные группы, обозначенные как кластеры «А», «Б» и «В». Изолированность этих кластеров была подтверждена статистическим алгоритмом ANOSIM

(Clarke, 1993), по расчётам которого значение  $p$  для этих групп равнялось 0,012. Анализ микробных сообществ в получившихся кластерах продемонстрировал, 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 4256, 7309, 8001, 8533 и 9064 («Кластер А» на рисунке) 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 7511, 7860, 15500 и 35943 («Кластер Б») характеризовались высоким содержанием сульфата до 6,4 г/л и минеральных солей до 116 г/л, а нефтяные пласты имели низкую температуру до 22°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 сульфатвосстанавливающие и бродильные бактерии в процессе своей жизнедеятельности продуцируют сульфид, который и был зарегистрирован в указанных пробах пластовой воды.

Невысокое содержание сульфида до 22 мг/л и температура не выше 55°C были характерны для проб пластовой воды из скважин 2755\*, 3239, 5019, 6038, 7062, 7574, 9677, 47Б и ЦППН, объединённых на рисунке в «Кластер В». В этих микробных сообществах присутствовали метаногенные археи рода *Methanothermococcus* и сульфидогенные бактерии родов *Thermosipho*, *Thermovirga*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfovibrio*, *Desulfofundulus*, *Deferribacter*, *Defluviitoga*, *Sulfurospirillum*, *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 (Hubert, Voordouw, 2007).

Таким образом, в исследованных сообществах присутствовали аэробные органотрофные и анаэробные бродильные и сульфатвосстанавливающие 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.

## ГЛАВА 5. 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 анализа представлены в виде тепловой карты на Рисунке 4.

Большинство полученных последовательностей архей в библиотеках генов 16S рРНК принадлежало термофильным галотолерантным гидрогенотрофным метаногенам рода *Methanothermococcus* филума *Methanobacteriota*. Последовательности составляли от 11,0 до 81,6% от суммы последовательностей в библиотеках шести проб пластовой воды (3239, 4256, 6038, 7062, 7574 и 9677), отобранных на незаводняемых участках месторождения Узень. В зоне поступления нагнетаемой морской воды (пробы 8001, 8533 и 9064 содержащих сульфат и около 90 мг растворённого сульфида/л) произошла смена доминирующих микробных популяций. Метаногены рода *Methanothermococcus* были замещены термофильными сульфатовосстанавливающими бактериями рода *Desulfonauticus*. Эти бактерии присутствовали также в пластовой воде на участках, не подверженных заводнению, но в меньшем количестве, если судить по их представленности в библиотеках (0,1–34,2%).

Как мезофильные, так и термофильные микробные популяции были выявлены в воде из призабойной зоны нагнетательной скважины (проба 2755\*), где температура снижалась до 40–45°C в результате закачки охлажденной нагнетаемой воды. Мезофильные метилотрофные метаногены рода *Methanolobus*, СВБ родов *Desulfotomaculum*, *Desulfonauticus* и *Desulfoglaeba*, бродильные бактерии родов *Bellilinea* и *Thermovirga*, потенциальные денитрификаторы *Pelobacter* и *Sulfurospirillum*, а также нитрат-, железо- и серовосстанавливающие бактерии рода *Geoalkalibacter* были в этом сообществе основными потенциальными микробными агентами циклов метана, серы и азота. Обитающие в пласте термофильные метаногены и сульфидогены были полиэкстремофилами, приспособленными к высокой солёности местообитания и температуре 55°C.

Все перечисленные выше прокариоты практически не встречались в нагнетаемой морской воде (доля их филотипов в библиотеках морской воды не превышала 0,1%). В морской воде присутствовали факультативно аэробные бета-протеобактерии рода *Alcaligenes* (28,5%), микроаэрофильные бациллы рода *Thermicanus* (11,7%) и анаэробные оппортунистические патогены рода *Finegoldia* класса *Clostridia* (10,1%). Всё это позволяет констатировать, что нагнетание морской воды стимулирует рост не привнесённых, а именно аборигенных микроорганизмов нефтяного пласта.

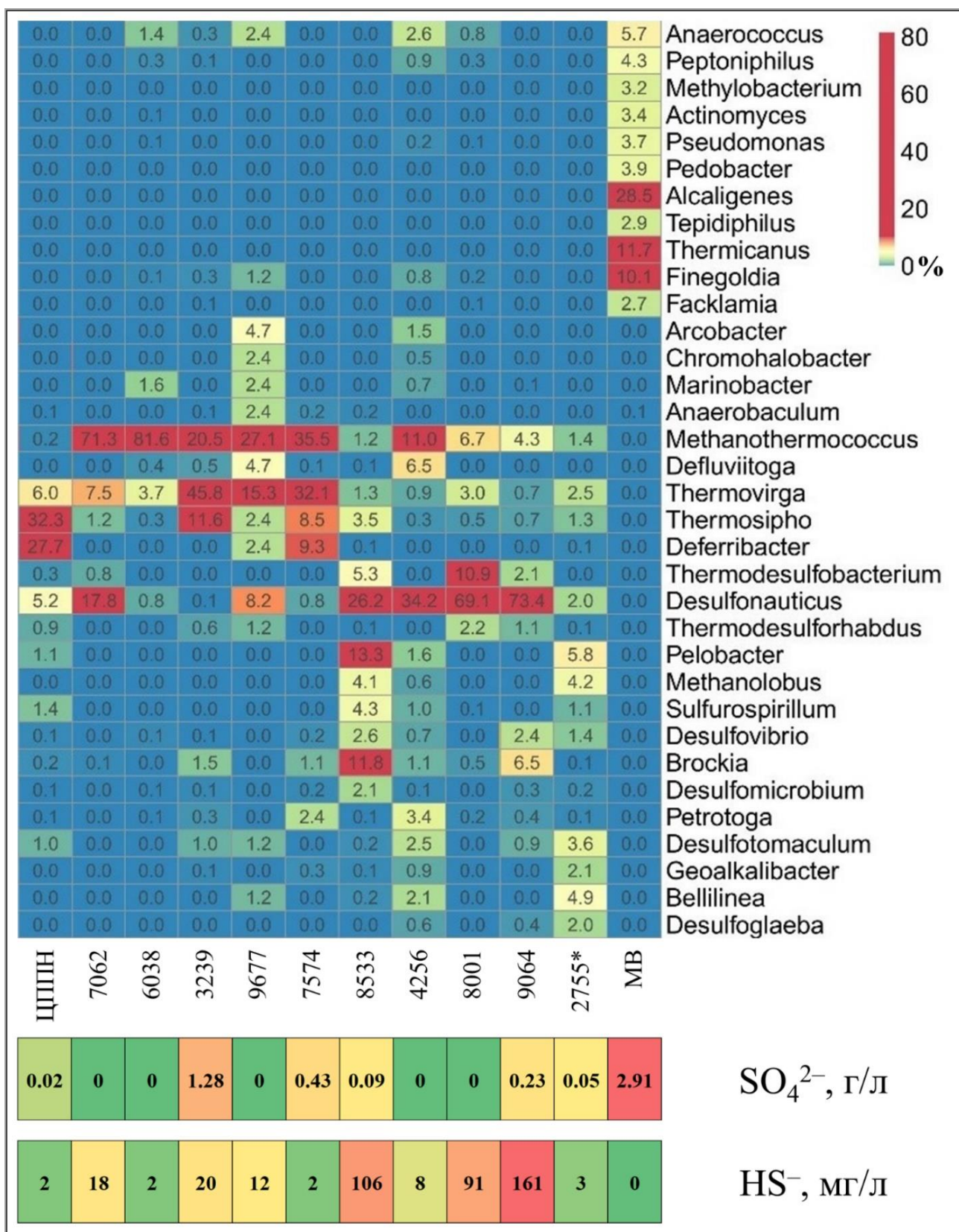


Рисунок 4 – Тепловая карта распределения доминирующих родов бактерий и архей в библиотеках фрагментов генов 16S рНК прокариотных сообществ из месторождения Узень. Цветовой переход от синего к красному соответствует изменению относительных величин содержания отдельных родов в библиотеках от менее представленных к более представленным. Числами на тепловой карте обозначены проценты от общего количества последовательностей в библиотеке каждой пробы. Обозначения: МВ, морская вода.

Методом высокопроизводительного секвенирования генов *dsrA* в ДНК микроорганизмов из проб пластовой воды 8001, 8533 и 9064 были обнаружены флотипы бактерий, осуществляющих восстановление окисленных соединений серы (Sokolova et al., 2021). Результаты анализа состава этих сообществ приведены на Рисунке 5.

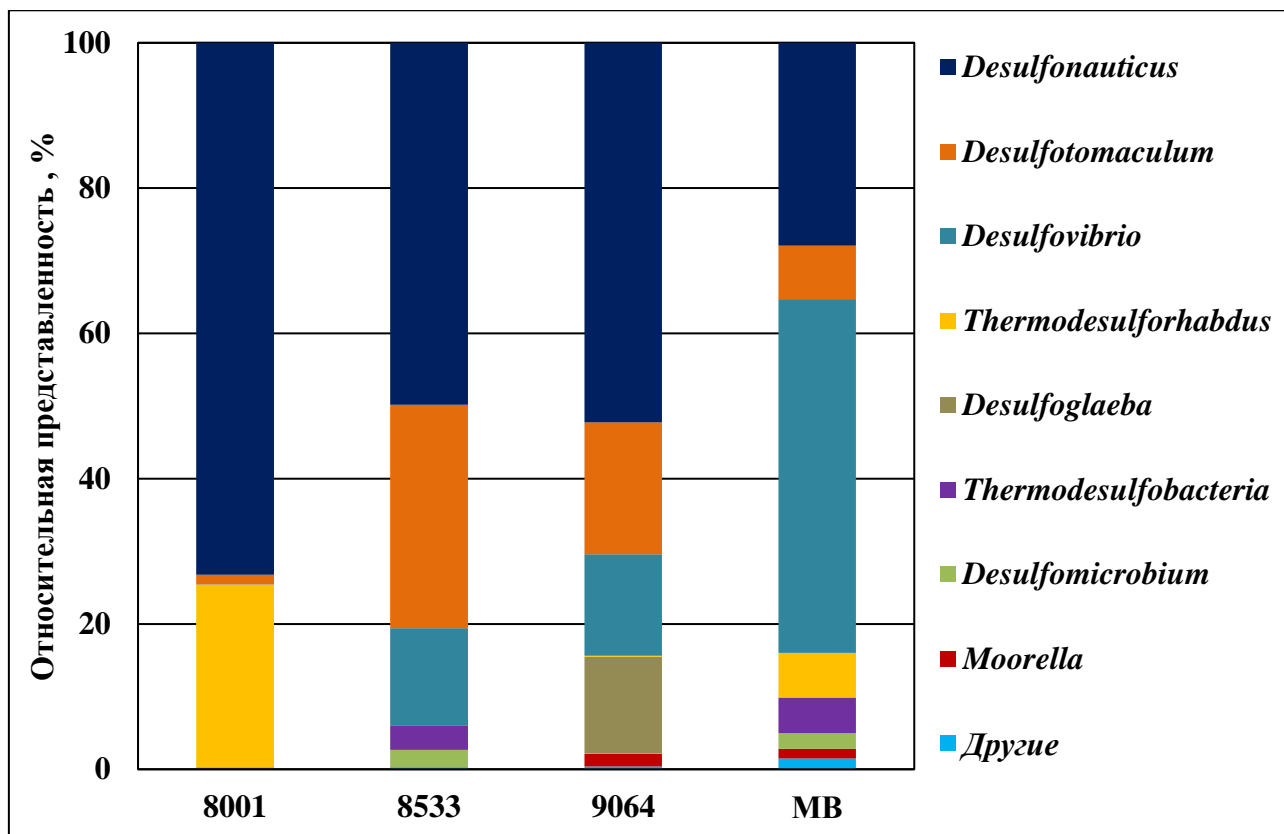


Рисунок 5 – Классификация фрагментов генов *dsrA* на уровне рода в библиотеках микробных сообществ месторождения Узень и морской воды (Sokolova et al., 2021). Обозначения: МВ, морская вода.

В исследованных пробах пластовой воды последовательности *dsrA* генов принадлежали бактериям более чем 10 родов, включая *Desulfonauticus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfogleaba*, *Thermodesulfobacteria*, *Desulfomicrobium* и *Moorella*. Разнообразие сульфидогенных прокариот подтверждено методом ПЦР анализа альфа-субъединицы функционального гена сульфитредуктазы *DsrA*. Таким образом, тремя независимыми методами (высокопроизводительное секвенирование V3–V4 фрагментов генов 16S рРНК, фрагментов генов *dsrA* и гель-электрофорез генов сульфитредуктазы) 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 и других одноуглеродных соединений в пробах из зон пласта, не подверженных влиянию заводнения, тогда как СВБ рода *Desulfonauticus* вносили наибольший вклад в зоне поступления морской воды. В метаболизме серы ведущую роль также играли СВБ рода *Desulfonauticus* и тиосульфатвосстанавливающие бактерии рода *Thermovirga*. В бессульфатной пластовой воде, не затронутой заводнением, основной вклад в метаболизм серы вносили метаногены рода *Methanothermococcus*, вероятно, за счёт ассимиляционных процессов. Аналогичные результаты были получены и для цикла азота: бактерии родов *Desulfonauticus* и *Thermovirga* и археи *Methanothermococcus* spp. вносили наибольший вклад в метаболизм этого элемента за счёт ассимиляции различных соединений азота. Результаты KEGG-анализа потенциального вклада этих сообществ в метаболизм метана, серы и азота представлены в Таблицах 4–6.

Приведенные 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 тиосульфатвосстанавливающих (*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.



Таблица 4 – Потенциальный вклад микроорганизмов (%) проб пластовой воды из нефтяного месторождения Узень в метаболизм метана и одноуглеродных соединений согласно программе iVikodak

Название рода	ЦППН	7062	6038	3239	9677	7574	8533	4256	8001	9064	2755*
<i>Methanothermococcus</i>	1.7	<b>90.2</b>	<b>97.3</b>	<b>62.1</b>	<b>66.3</b>	<b>76.2</b>	4.8	<b>36.8</b>	<b>19.6</b>	<b>14.4</b>	<b>10.3</b>
<i>Desulfonauticus</i>	<b>14.2</b>	7.1	0.3	0.1	6.3	0.5	<b>33.1</b>	<b>36.1</b>	<b>63.6</b>	<b>77.5</b>	4.6
<i>Thermovirga</i>	<b>12.7</b>	2.3	1.1	<b>33.8</b>	9.1	<b>16.8</b>	1.3	0.7	2.1	0.6	4.5
<i>Deferribacter</i>	53.1	0.0	0.0	0.0	1.3	4.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2
<i>Pelobacter</i>	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.5	2.6	0.0	0.0	20.3
<i>Methanobolus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.2	2.1	0.0	0.0	32.2
<i>Desulfotomaculum</i>	4.0	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.4	3.9	0.0	1.4	12.2
<i>Thermodesulfobacterium</i>	0.8	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	6.9	0.0	10.3	2.3	0.0
<i>Sulfurospirillum</i>	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4	1.1	0.1	0.0	2.5
<i>Thermodesulforhabdus</i>	4.1	0.0	0.0	0.9	1.5	0.0	0.2	0.0	3.3	1.9	0.4
<i>Defluviitoga</i>	0.0	0.0	0.1	0.4	2.9	0.1	0.1	5.6	0.0	0.0	0.0
<i>Desulfoglaeba</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.6	6.3
<i>Geoalkalibacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	1.0	0.0	0.0	5.3
<i>Desulfomicrobium</i>	0.4	0.0	0.1	0.3	0.0	0.2	4.0	0.2	0.0	0.5	0.7
<i>Petrotoga</i>	0.2	0.0	0.0	0.3	0.0	1.4	0.1	3.2	0.2	0.4	0.2
<i>Arcobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0
<i>Marinobacter</i>	0.0	0.0	0.7	0.0	2.1	0.0	0.0	0.9	0.0	0.1	0.0
<i>Anaerococcus</i>	0.0	0.0	0.3	0.2	1.0	0.0	0.0	1.5	0.4	0.0	0.0
<i>Anaerobaculum</i>	0.3	0.0	0.0	0.1	2.2	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Chromohalobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
<i>Finegoldia</i>	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0
<i>Desulfovibrio</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.3	0.3
<i>Peptoniphilus</i>	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0
<i>Pelagibacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Другие	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Таблица 5 – Потенциальный вклад микроорганизмов (%) проб пластовой воды из нефтяного месторождения Узень в метаболизм серы согласно программе iVikodak

Название рода	ЦППН	7062	6038	3239	9677	7574	8533	4256	8001	9064	2755*
<i>Desulfonauticus</i>	11.6	30.8	1.7	0.2	11.3	1.2	36.3	47.5	79.7	90.3	6.1
<i>Thermovirga</i>	15.2	14.7	8.9	79.6	23.9	55.9	2.0	1.4	3.8	1.0	8.7
<i>Methanothermococcus</i>	0.2	53.5	75.4	13.6	16.2	23.6	0.7	6.6	3.3	2.3	1.9
<i>Pelobacter</i>	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	36.4	4.4	0.0	0.0	35.0
<i>Deferribacter</i>	57.7	0.0	0.0	0.0	3.1	13.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3
<i>Desulfotomaculum</i>	2.7	0.0	0.0	1.8	2.0	0.0	0.3	4.1	0.0	1.3	13.1
<i>Methanolobus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.6	1.0	0.0	0.0	15.0
<i>Defluviitoga</i>	0.0	0.0	1.1	1.0	8.2	0.2	0.2	11.4	0.0	0.0	0.0
<i>Sulfurospirillum</i>	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.1	1.9	0.2	0.0	4.5
<i>Marinobacter</i>	0.0	0.0	7.8	0.0	7.6	0.0	0.0	2.2	0.0	0.3	0.0
<i>Thermodesulfobacterium</i>	0.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	0.0	7.8	1.6	0.0
<i>Arcobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	10.8	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0
<i>Petrotoga</i>	0.3	0.0	0.3	0.6	0.0	4.4	0.2	5.7	0.3	0.6	0.4
<i>Geoalkalibacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.6	0.2	1.5	0.0	0.0	7.7
<i>Anaerococcus</i>	0.0	0.0	2.7	0.4	3.0	0.0	0.0	3.2	0.8	0.0	0.0
<i>Thermodesulforhabdus</i>	2.3	0.0	0.0	1.0	1.9	0.0	0.2	0.0	2.9	1.5	0.3
<i>Chromohalobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0
<i>Desulfoglaeba</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.5	6.1
<i>Desulfomicrobium</i>	0.3	0.0	0.3	0.4	0.0	0.4	3.8	0.2	0.0	0.5	0.8
<i>Anaerobaculum</i>	0.2	0.0	0.0	0.1	3.2	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Finegoldia</i>	0.0	0.0	0.2	0.5	1.7	0.0	0.0	1.1	0.2	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.4	0.0	0.0
<i>Peptoniphilus</i>	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	1.1	0.3	0.0	0.0
<i>Pelagibacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
<i>Campylobacter</i>	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Другие	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1

Таблица 6 – Потенциальный вклад микроорганизмов (%) проб пластовой воды из нефтяного месторождения Узень в метаболизм азота согласно программе iVikodak

Название рода	ЦППН	7062	6038	3239	9677	7574	8533	4256	8001	9064	2755*
<i>Methanothermococcus</i>	0.3	<b>75.9</b>	<b>86.9</b>	<b>31.0</b>	<b>31.4</b>	<b>42.8</b>	1.4	<b>13.9</b>	8.0	5.6	3.1
<i>Desulfonauticus</i>	7.4	<b>16.5</b>	0.7	0.1	8.3	0.8	<b>25.7</b>	<b>37.7</b>	<b>71.3</b>	<b>83.7</b>	3.8
<i>Thermovirga</i>	8.5	6.9	3.4	<b>60.3</b>	<b>15.4</b>	<b>33.7</b>	1.3	1.0	3.0	0.8	4.8
<i>Deferribacter</i>	67.0	0.0	0.0	0.0	4.1	16.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3
<i>Pelobacter</i>	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	41.8	5.6	0.0	0.0	35.6
<i>Desulfotomaculum</i>	2.6	0.0	0.0	2.4	2.2	0.0	0.4	5.1	0.0	1.9	12.7
<i>Sulfurospirillum</i>	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.9	2.8	0.3	0.0	5.5
<i>Methanolobus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	1.1	0.0	0.0	13.5
<i>Thermodesulfobacterium</i>	0.4	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	9.4	2.0	0.0
<i>Marinobacter</i>	0.0	0.0	4.7	0.0	7.8	0.0	0.0	2.5	0.0	0.4	0.0
<i>Thermodesulforhabdus</i>	2.7	0.0	0.0	1.7	2.5	0.0	0.2	0.0	4.8	2.6	0.4
<i>Geoalkalibacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.8	0.2	2.5	0.0	0.0	10.1
<i>Petrotoga</i>	0.2	0.0	0.2	0.7	0.0	4.3	0.2	6.4	0.4	0.8	0.3
<i>Anaerococcus</i>	0.0	0.0	2.2	0.7	4.2	0.0	0.0	4.9	1.4	0.0	0.0
<i>Defluviitoga</i>	0.0	0.0	0.3	0.6	4.3	0.1	0.1	6.4	0.0	0.0	0.0
<i>Desulfogleaba</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	1.0	8.5
<i>Arcobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0
<i>Desulfomicrobium</i>	0.4	0.0	0.3	0.8	0.0	0.6	6.2	0.3	0.0	1.0	1.2
<i>Chromohalobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0
<i>Finegoldia</i>	0.0	0.0	0.2	0.7	2.2	0.0	0.0	1.6	0.4	0.0	0.0
<i>Anaerobaculum</i>	0.2	0.0	0.0	0.2	2.9	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Peptoniphilus</i>	0.0	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	1.4	0.4	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.4	0.0	0.0
<i>Pelagibacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
<i>Desulfovibrio</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1
Другие	0.1	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1

## ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ БИОЦИДОВ И НИТРАТА НА ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ

Для оценки рисков коррозии нефтепромыслового оборудования на месторождении Узень пробы пластовой воды были посеяны на селективные среды для сульфат- и тиосульфатвосстанавливающих бактерий. В результате (Рисунок 6) были получены накопительные культуры, образующие сульфид, которые были использованы для дальнейших исследований по подавлению процессов сульфатредукции.

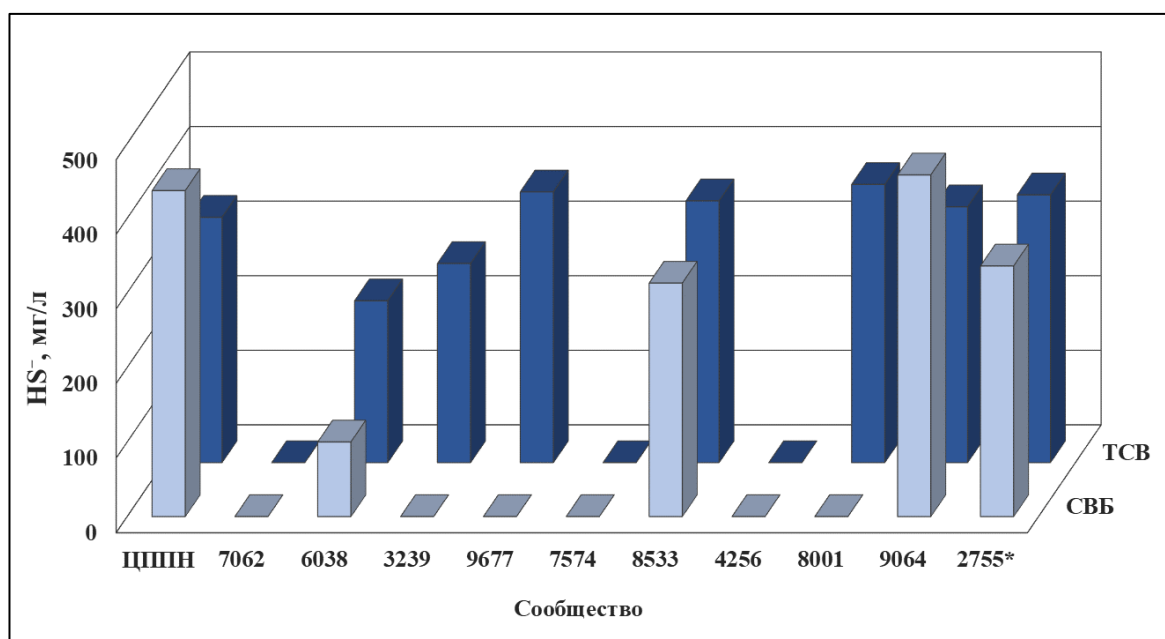


Рисунок 6 – Накопление сульфида накопительными культурами сульфат- (СВБ) и тиосульфатвосстанавливающих (ТСВ) бактерий из нефтяного месторождения Узень.

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 этого сообщества к.б.н. С.Х. Биджиевой, сотрудницей лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, была выделена чистая культура сульфатвосстанавливающей бактерии *Desulfovibrio alaskensis* Kaz19, с которой проводились аналогичные эксперименты для сравнения полученных результатов. Методом сканирующей электронной микроскопии была получена микрофотография сульфатвосстанавливающего микробного сообщества из пробы 2755\* (Рисунок 7а), на которой видно морфологическое разнообразие клеток, включенных в экзополимеры выросшей биоплёнки, и микрофотография чистой культуры Kaz19 (Рисунок 7б) с пилеподобными нанотрубками, соединяющими клетки этого штамма.

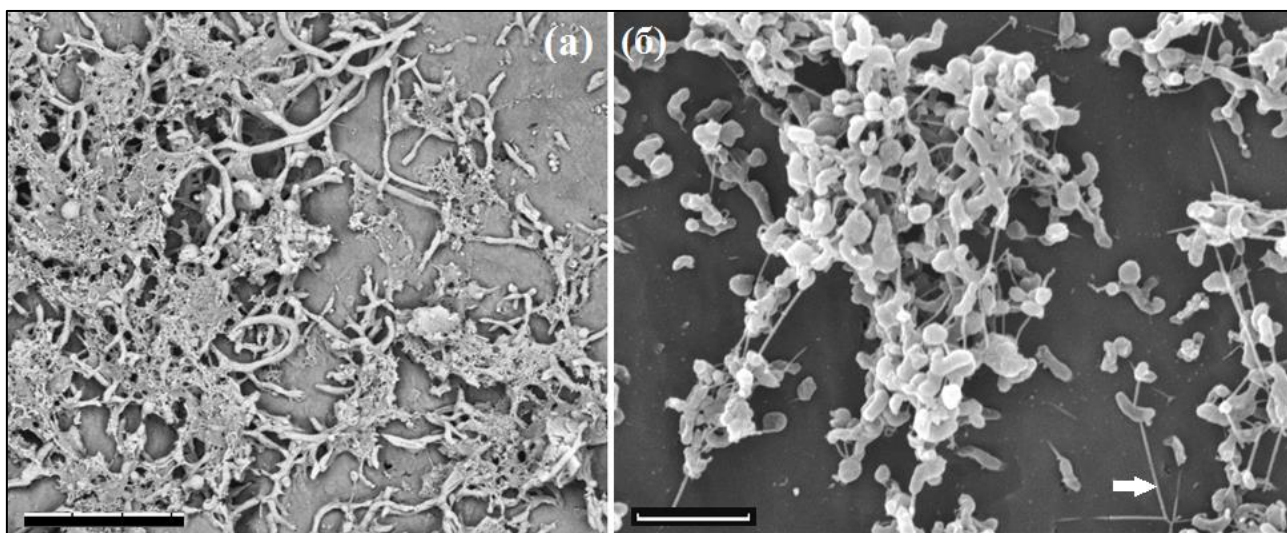


Рисунок 7 – Сканирующие электронные микрофотографии биоплёнок в накопительной сульфатовосстанавливающей культуре, полученной из призабойной зоны нагнетательной скважины (а), и морфология штамма *Desulfovibrio alaskensis* Kaz19 (б), выращенного в среде с лактатом и сульфатом в течение 14 суток (Sokolova et al., 2021). Микрофотография (а) получена на сканирующем электронном микроскопе TM3000 (Hitachi, Токио, Япония) (15 кВ); микрофотография (б) получена на сканирующем электронном микроскопе Camscan-S2 (Cambridge Instrument Co., Лондон, Великобритания) (20 кВ, режим SEI). Стрелка указывает на нанотрубки, напоминающие пилы. Линейки, 10 мкм (а) и 3 мкм (б).

### 6.1. Устойчивость планктонных и биоплёночных форм сульфидогенных прокариот к воздействию биоцидов

Устойчивость микробных сообществ пластовой воды из нефтяного месторождения Узень к влиянию биоцидов тестировали с использованием глутарового альдегида, 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 сульфидогенной накопительной культуры из пробы 2755\* (Рисунок 8а) и сульфатовосстанавливающего штамма *D. alaskensis* Kaz19, выделенного из этой пробы (Рисунок 8б), чтобы оценить ингибирующий эффект используемых биоцидов.

Ранцид-7005 оказался малоэффективным против накопления сульфида как накопительной, так и чистой культурой: концентрации 40–80 мг/л не оказывали значительного ингибирующего воздействия на рост сульфидогенов, а концентрация 120 мг/л, превышающая рекомендуемые значения втрое, оказывала непродолжительный и слабо выраженный подавляющий эффект. Добавление же глутарового альдегида полностью

препятствовало накоплению в средах сульфида в обоих вариантах эксперимента, то есть позволяло подавить рост сульфатвосстанавливающих прокариот.

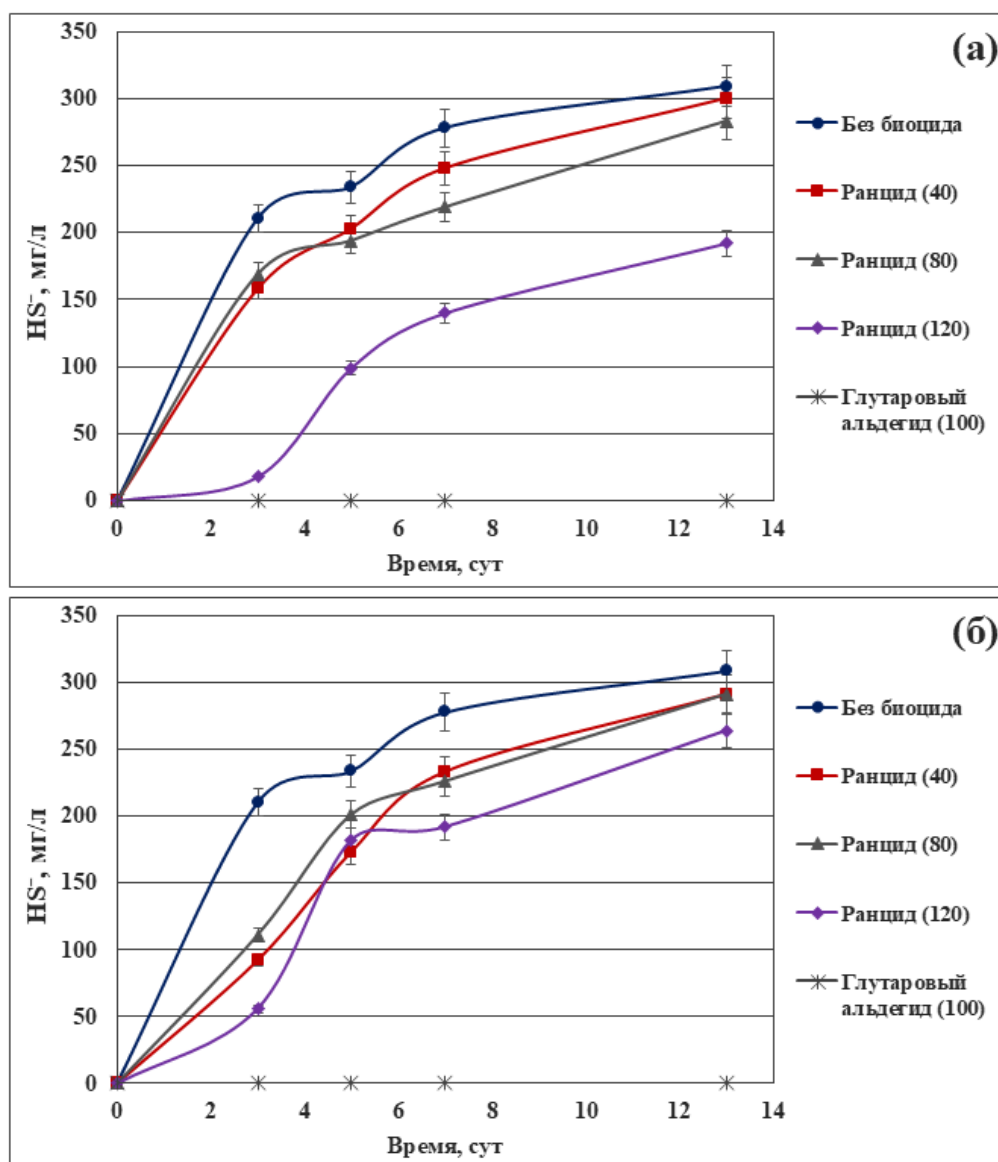


Рисунок 8 – Накопление сульфида накопительной культурой из пробы 2755\* из нефтяного месторождения Узень (а) и сульфатвосстанавливающим штаммом *D. alaskensis* Kaz19 из этой пробы (б) в присутствии глутарового альдегида (100 мг/л), биоцида Ранцид-7005 (40, 80 и 120 мг/л) и в отсутствие биоцидов в среде (Sokolova et al., 2021).

Сравнение устойчивости к Ранциду-7005 планктонных форм и биоплёнок, сформированных на стальном купоне, для накопительной и чистой культуры оценивали с помощью МГТ-теста по доле сохранивших жизнеспособность клеток. Вносили двойную и тройную концентрацию этого биоцида (80 и 120 мг/л соответственно). Результаты этого анализа представлены в виде диаграммы на Рисунке 9.

Накопительная культура 2755\* из призабойной зоны нагнетательной скважины месторождения Узень была чувствительна к воздействию Ранцида-7005, 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-7005/л соответственно, что согласуется с литературными данными о большей резистентности биоплёнок к воздействию биоцидов. В то же время биоплёнки, образованные штаммом *D. alaskensis* Kaz19, были практически нечувствительны к такому воздействию, и присутствие бактерий этого рода в исследуемой пробе 2755\* объясняет относительно высокую долю выживших клеток в накопительной культуре при воздействии на неё Ранцида-7005.

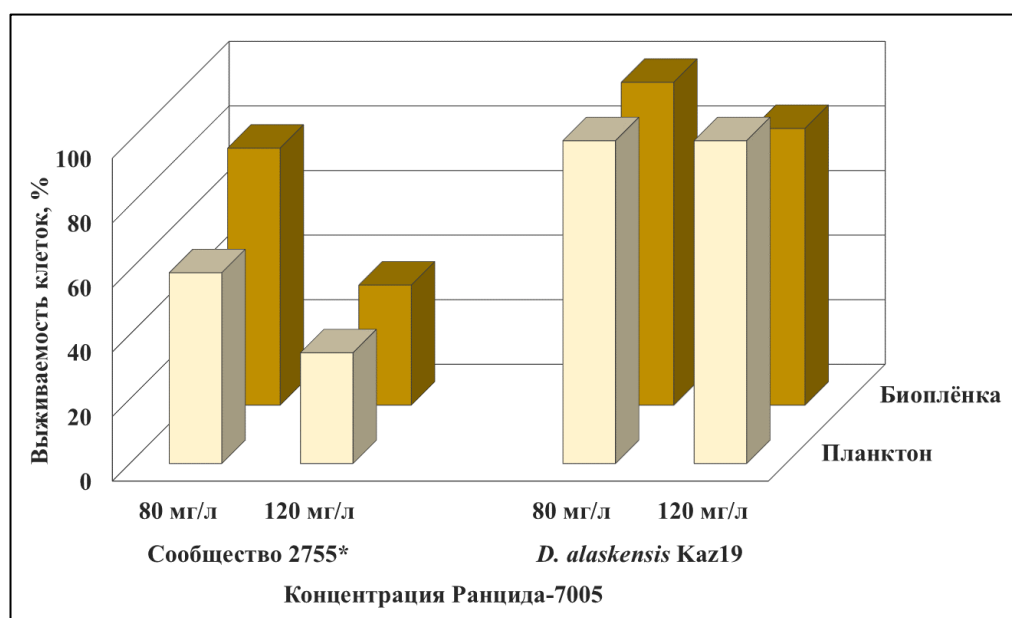


Рисунок 9 – Выживаемость планктонных клеток и биоплёнок накопительной культуры из пробы 2755\* из месторождения Узень и сульфатвосстанавливающего штамма *D. alaskensis* Kaz19 из этой пробы в присутствии биоцида Ранцид-7005 (Sokolova et al., 2021).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что перед масштабным применением биоцидов на месторождении необходимо оценивать их влияние как на планктонные клетки, так и на биоплёнки как минимум нескольких сульфидогенных сообществ этих нефтяных пластов. Присутствие в библиотеке V3–V4 фрагментов генов 16S рРНК исследованного сообщества 2755\* известных электрогенных бактерий родов *Desulfovibrio* и *Pelobacter* указывает также на необходимость уточнения влияния экзоэлектрогенной активности на сульфидогенез в нефтяных коллекторах с дефицитом доступных акцепторов электронов и низким водо- и массообменом.

## 6.2. Влияние нитрата на филогенетическое разнообразие микробных сообществ из 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 инкубирования измеряли содержание растворённого сульфида (Рисунок 10а) и нитрит-иона (Рисунок 10б) в средах культивирования.

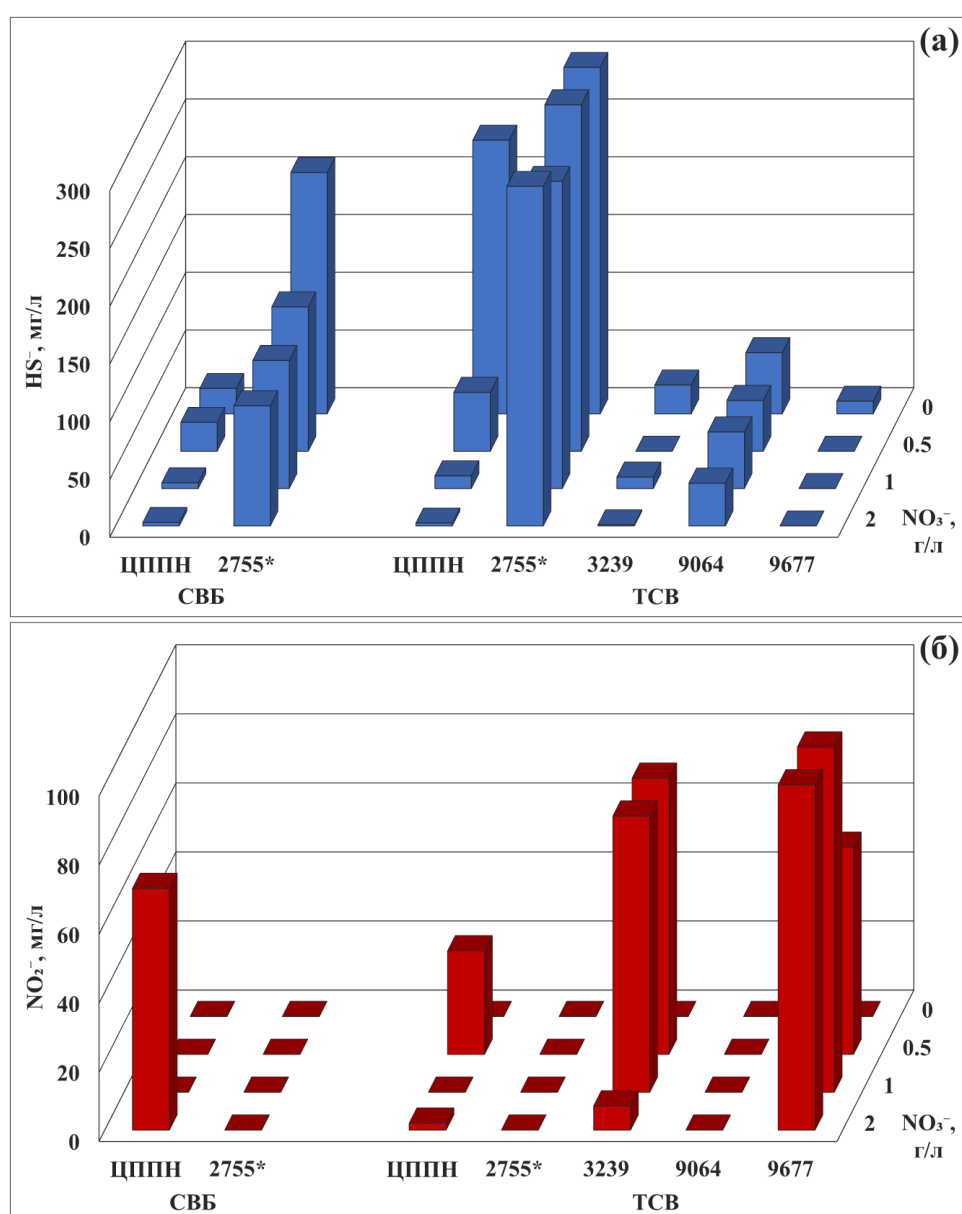


Рисунок 10 – Накопление сульфида (а) и нитрита (б) сульфат- (СВБ) и тиосульфатовосстанавливающими (ТСВ) бактериями пластовой воды месторождения Узень в присутствии разных концентраций нитрата кальция (Sokolova et al., 2021). Обозначения сообществ соответствуют номерам проб, из которых они были получены.



Культуры мезофильных сульфат- и тиосульфатовосстанавливающих бактерий из призабойной зоны нагнетательной скважины (проба 2755\*) обладали высокой устойчивостью к проверенным концентрациям нитрат-иона: при внесении 2 г  $\text{NO}_3^-/\text{л}$  в обеих средах культивирования накапливалось не менее 100 г сульфид-иона/л. Было отмечено также образование значительного количества молекулярного азота в газовой фазе, что свидетельствует о полном восстановлении нитрата денитрифицирующими бактериями рода *Pseudomonas* и/или другими представителями этой функциональной группы. Таким образом, высокое 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 уже в присутствии 0.5–1.0 г внесённого  $\text{NO}_3^-/\text{л}$ . Вместе с этим в культуральной жидкости исследуемых образцов накапливалось до 100 мг  $\text{NO}_2^-/\text{л}$ , что и являлось, вероятно, основным механизмом подавления образования сульфида в этих накопительных культурах. В рамках проведённых экспериментов нитрит образовывался термофильными бактериями, тогда как в мезофильных условиях присутствовали микроорганизмы, которые восстанавливали 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 методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона генов 16S рРНК. Доминирующие флотипы прокариот в полученных библиотеках представлены в виде диаграмм на Рисунке 11.

Накопительные культуры на сульфате и тиосульфате из проб 2755\* и ЦППН ожидаемо были обогащены сульфидогенными бактериями родов *Desulfovibrio*, *Thermosipho*, *Thermovirga*, *Anaerovirgula*, *Geotoga* и *Petrotoga*. Однако в библиотеках из накопительных культур на нитрате значительную (>50%) долю флотипов составляли денитрифицирующие бактерии *Marinobacter* spp., несмотря на то что эти бактерии являлись минорным компонентом исходных микробных сообществ (<0,1% от общего количества флотипов). Эти результаты ярко подтверждают литературные данные о ведущей роли бактерий рода *Marinobacter* в подавлении сульфидогенной микробиоты нефтяных пластов при нитратном заводнении.

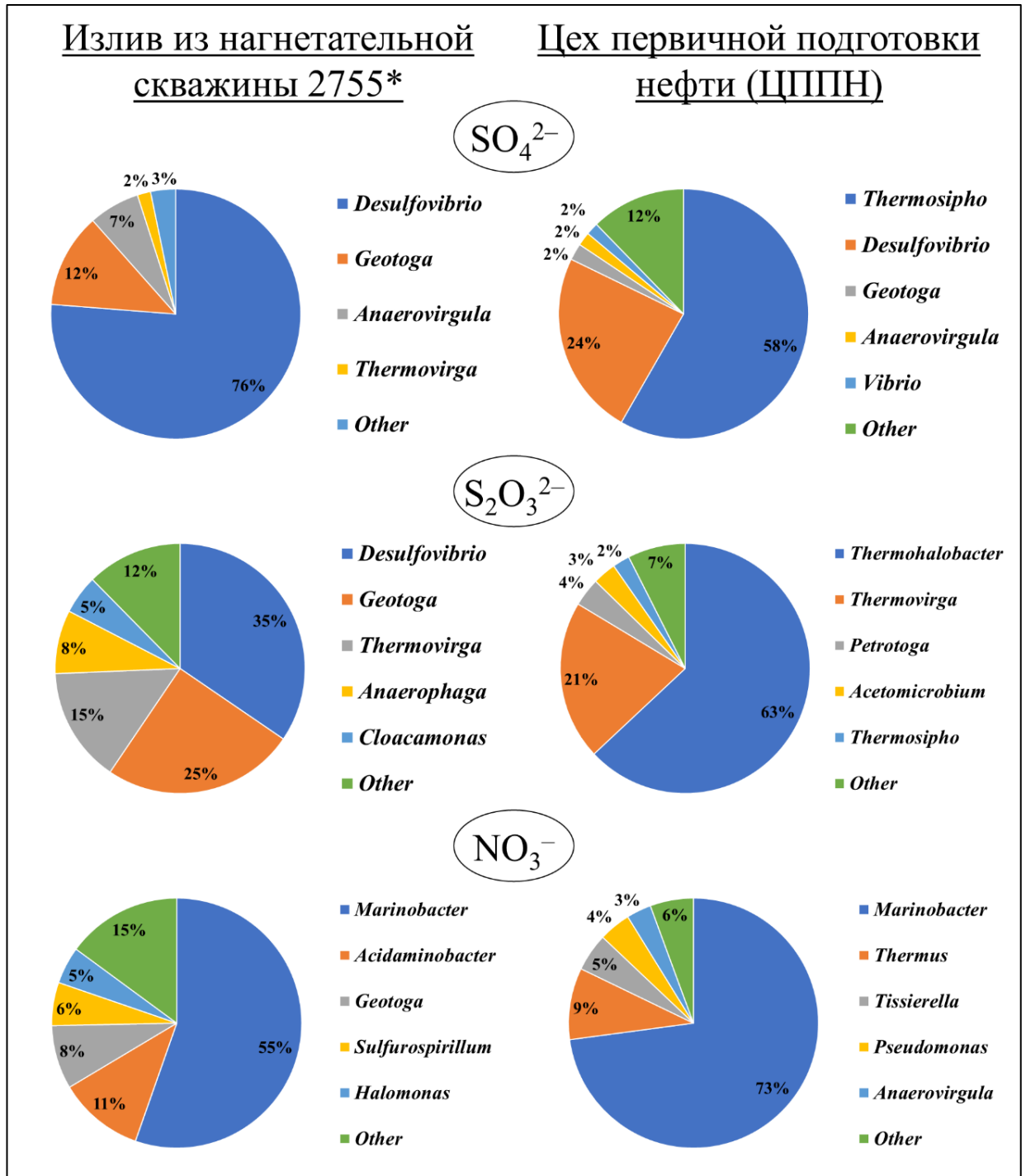


Рисунок 11 – Филогенетическое разнообразие прокариот на уровне рода в сообществах сульфатвосстанавливающих (СВБ), тиосульфатвосстанавливающих (ТСВБ) и денитрифицирующих (ДНБ) бактерий, полученных из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755\* и из цеха первичной подготовки нефти (ЦППН). Общее количество последовательностей в библиотеках СВБ, ТСВБ и ДНБ из пробы 2755\* составляет 88743, 83263 и 82409, а из ЦППН – 59710, 73376 и 90139 соответственно.

Для накопительных культур ДНБ из проб 2755\* и ЦППН, а также для двух исходных микробных сообществ из Республики Татарстан (15500 и 7511) был проанализирован вклад различных родов микроорганизмов в реакции азотного метаболизма (Таблицы 7–8). Результаты представлены также в виде KEGG-анализа реакций цикла азота (Рисунки 12–13).

Таблица 7 – Вклад микроорганизмов в культурах денитрифицирующих бактерий из проб 2755\* и ЦППН месторождения Узень в реакции метаболизма азота

<b>Род бактерий</b>	<b>Денитрифицирующее сообщество 2755*</b>	<b>Денитрифицирующее сообщество ЦППН</b>
<i>Marinobacter</i>	68,3	94,4
<i>Acidaminobacter</i>	10,7	0,1
<i>Geotoga</i>	4,4	1,5
<i>Halomonas</i>	5,6	0
<i>Sulfurospirillum</i>	5,6	0
<i>Tissierella</i>	0,2	2,4
<i>Rhodospirillaceae</i>	1,7	0
<i>Anaerophaga</i>	0,1	1,6
<i>Caenispirillum</i>	1,3	0
<i>Mesotoga</i>	1,1	0
<i>Marinobacterium</i>	0,7	0
<i>Spirochaetaceae</i>	0,3	0

Таблица 8 – Вклад микроорганизмов пластовой воды из нефтяных пластов Татарстана (15500 и 7511) в реакции метаболизма азота

<b>Род бактерий</b>	<b>Пластовая вода 15500</b>	<b>Пластовая вода 7511</b>
<i>Caldalkalibacillus</i>	0	40,8
<i>Desulfotignum</i>	33,3	0
<i>Halanaerobium</i>	1,2	29,1
<i>Pseudomonas</i>	12,4	12,7
<i>Rhodoferax</i>	22,0	0
<i>Halomonas</i>	2,2	7,1
<i>Bradyrhizobium</i>	7,7	0,2
<i>Hydrogenophaga</i>	0,2	4,4
<i>Nocardioides</i>	4,2	0,1
<i>Sporolactobacillus</i>	3,8	0,2
<i>Desulfovermiculus</i>	0,2	2,9
<i>Synergistaceae</i>	0,9	1,8
<i>Anaerolineaceae</i>	2,2	0
<i>Magnetospirillum</i>	2,0	0
<i>Acetobacterium</i>	1,8	0
<i>Acinetobacter</i>	1,6	0
<i>Erysipelothrix</i>	1,3	0
<i>Geobacter</i>	0,8	0
Другие	2,2	0,7



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.

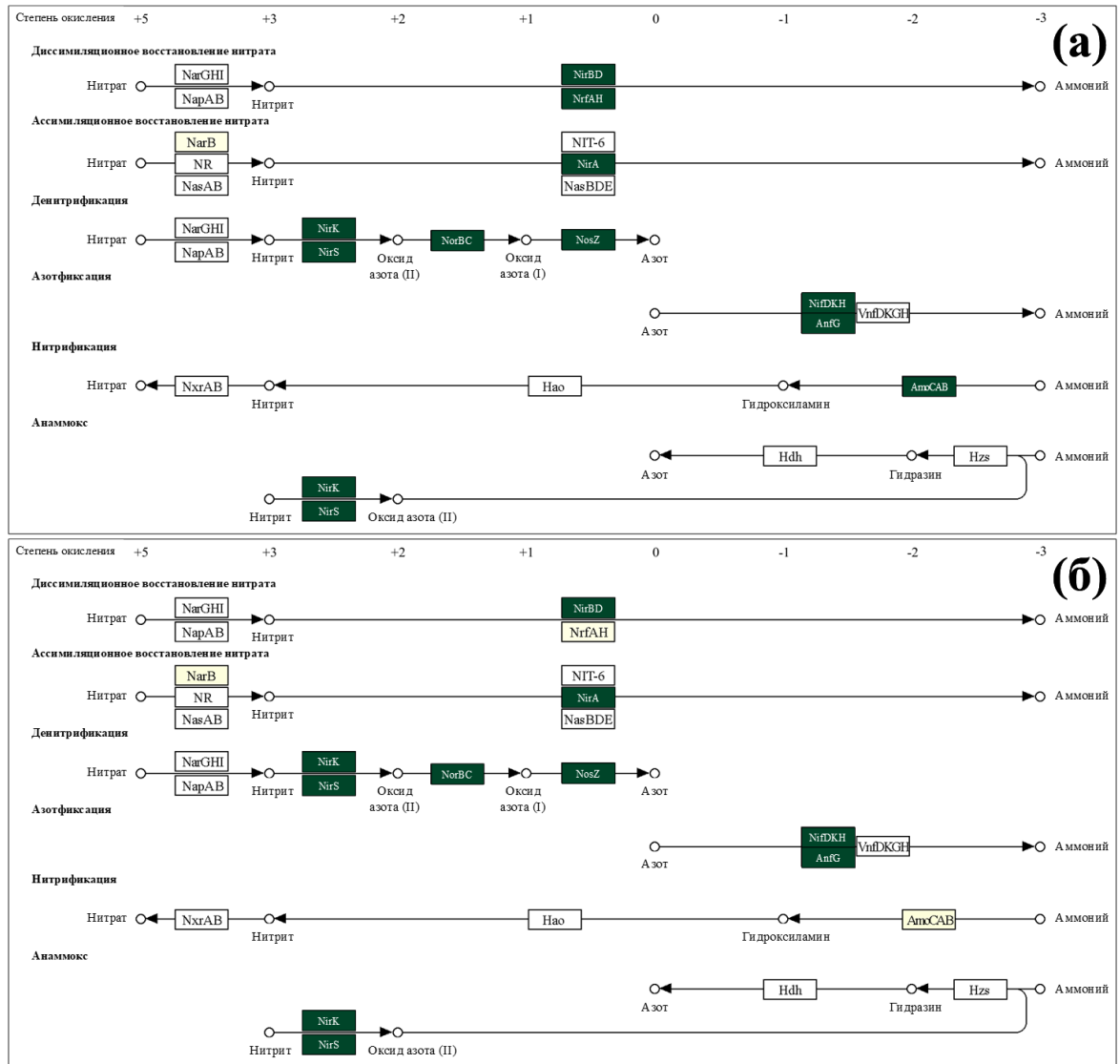


Рисунок 13 – Метаболические карты предполагаемых путей цикла азота в пробах пластовой воды 15500 (а) и 7511 (б) из нефтяных пластов Татарстана.

Таким образом, показана резистентность биоплёнок сульфидогенных прокариот к широко применяемому коммерческому биоциду Ранцид-7005, а также устойчивость мезофильных накопительных культур с высоким филогенетическим разнообразием к нитратному заводнению. Наиболее эффективным способом предотвращения образования сульфида и, как следствие, коррозии нефтепромыслового оборудования в исследованных нефтяных пластах представляется одновременное нагнетание растворов биоцидов и нитратов в эффективных концентрациях.

## ГЛАВА 7. УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ И ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ, И ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНОМНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 7.1. Углеводородокисляющие и денитрифицирующие бактерии, выделенные из нефтяных пластов, и их фенотипические признаки

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, были определены интервалы температуры роста и солёности среды, а также способность к восстановлению нитрата в анаэробных условиях (Таблица 9).

Штамм *Rhodococcus erythropolis* HO-KS22, выделенный из нагнетаемой воды Восточно-Анзирского нефтяного месторождения в Татарстане, защищён патентом РФ на изобретение. Этот штамм образует биоПАВ, снижающий поверхностное и межфазное натяжение на границе нефти и пластовой воды, а также использует мочевины в качестве источника азота, высвобождая тем самым карбонаты нефтеносной породы, что может способствовать перенаправлению гидродинамических потоков нагнетаемой воды и увеличению охвата нефтяной залежи заводнением. Воздействие биоПАВ и увеличение рН пластовой воды до 9,4 приводит к увеличению подвижности нефти и степени её извлечения из пласта (Борзенков и соавт., 2020).

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 как единственном источнике углерода и энергии, снижал межфазное натяжение на границе культуральной жидкости и гексадекана, что могло свидетельствовать о синтезе нефтевытесняющих метаболитов, а также имел низкий уровень сходства гена 16S рРНК с геном филогенетически близкого вида *Ensifer morelensis* (99,0%).

Штамм *Marinobacter lutaoensis* 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, способную к окислению алканов нефти.

Таблица 9 – 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	ПП
НО-А4	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	99,9	0–150	22–55	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
НО-А6	<i>Bacillus altitudinis</i>	99,6	0–100	10–45	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
НО-А7	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9	0–140	24–45	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
НО-А12	<i>Nocardia asteroides</i>	99,6	0–80	10–35	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
НО-А13	<i>Gordonia amicalis</i>	99,1	0–80	15–35	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
НО-А22 <sup>Т</sup>	<i>Ensifer</i> sp.	99,0	0–30	15–33	N <sub>2</sub> O
НО-А23	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	100,0	0–20	4–37	N <sub>2</sub>
НО-А24	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99,7	0–8	4–35	N <sub>2</sub>
НО-А25	<i>Halomonas alimentaria</i>	99,0	0–150	22–55	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
НО-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	5–140	22–55	–
TAT1	<i>Halomonas titanicae</i>	99,7	0–200	4–42	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>

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

Кроме того, был исследован штамм *Halomonas titanicae* TAT1, выделенный сотрудницей лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН к.б.н. Д.Ш. Соколовой из Архангельского месторождения в Татарстане. Штамм TAT1 обладал широким температурным диапазоном роста и был способен расти при высокой солёности среды, достигающей 200 г NaCl/л. В 2023 году таксономия рода *Halomonas* была пересмотрена (de la Haba et al., 2023), что привело к изменению родовой принадлежности штамма TAT1. В настоящее время он относится к виду *Vreelandella titanicae* comb. nov. (Oren, Göker, 2024a). В настоящей работе штамм TAT1 приводится под своим прежним видовым названием, как он был обозначен в опубликованной статье с результатами исследований (Турова и соавт, 2022).

Интервалы солёности и температуры исследованных штаммов приведены на Рисунке 14. Штамм *M. lutaoensis* KAZ22 рос при солёности среды от 0 до 140 г NaCl/л с оптимумом при 20–120 г/л; его температурный интервал роста составлял 22–55°C (оптимум 37°C). Штамм *H. titanicae* TAT1 был способен расти в диапазоне от 0 до 200 г NaCl/л (оптимум 50–100 г/л) и при температурах 5–42°C с оптимумом 37°C, то есть являлся психро- и галотолерантной бактерией. Мезофильный штамм *Ensifer* sp. НО-А22<sup>Т</sup> рос при солёности от 0 до 35 г NaCl/л (оптимум 0–12 г/л) и в диапазоне температуры 15–33°C с оптимумом 22°C.

Все три штамма использовали для роста узкий спектр *n*-алканов нефти (Рисунок 15). Штаммы *M. luteoensis* KAZ22 и *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> потребляли наиболее лёгкие фракции с длиной цепи до 20 атомов углерода. Штамм *H. titanicae* TAT1 использовал алканы с длиной углеродной цепи больше 20. 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.

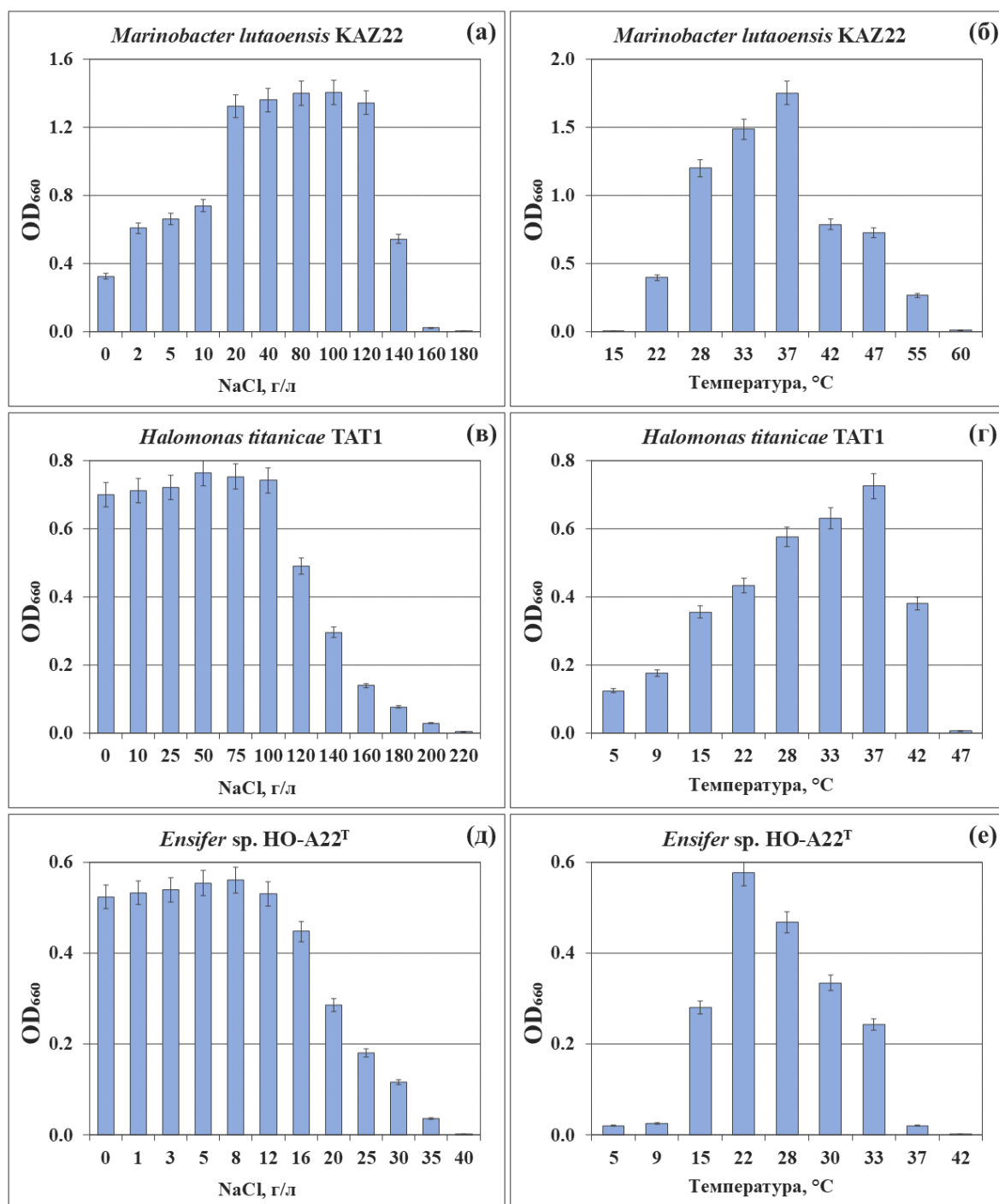


Рисунок 14 – Рост углеводородокисляющих бактерий *M. luteoensis* KAZ22 (а, б), *H. titanicae* TAT1 (в, г) и *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> (д, е) при разных значениях солёности среды (а, в, д) и температуры культивирования (б, г, е).



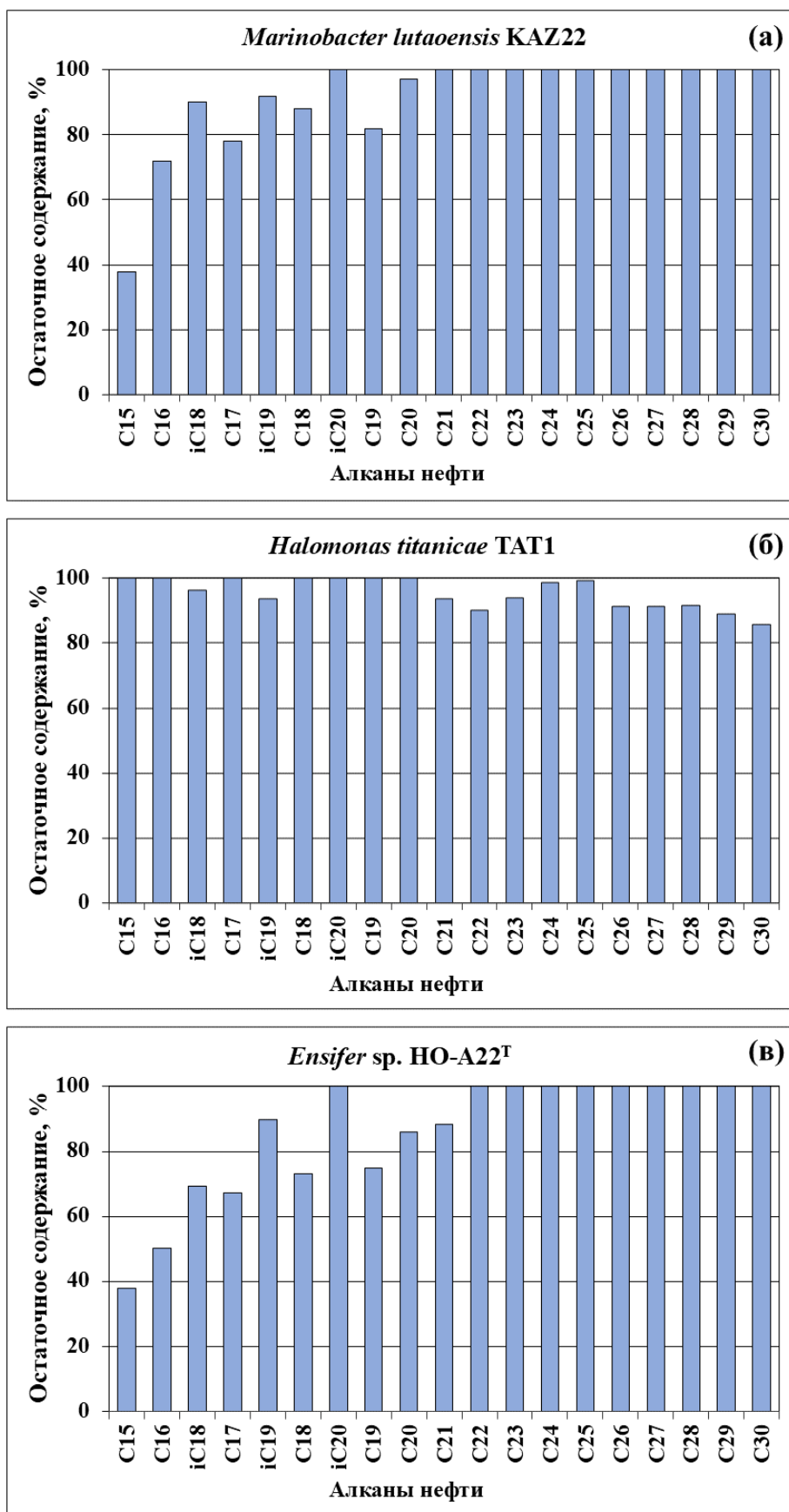


Рисунок 15 – Остаточное содержание алканов в нефти, деградированной углеводородокисляющими бактериями *M. luteoensis* KAZ22 (а), *H. titanicae* TAT1 (б) и *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> (в) при 30°C за 30 суток культивирования.

На платформе Illumina HiSeq были секвенированы полные геномы этих трёх штаммов и проанализированы 120 коровых белков для уточнения их филогенетического положения. Характеристика геномов исследуемых штаммов приведена в Таблице 10. Значения ANI и dDDH для штамма HO-A22<sup>T</sup> свидетельствовали о его принадлежности к новому виду рода *Ensifer*, описание которого приведено в Главе 8.

Таблица 10 – Характеристика геномов бактерий *M. lutaoensis* KAZ22, *H. titanicae* TAT1 и *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>

Характеристика	<i>M. lutaoensis</i> KAZ22	<i>H. titanicae</i> TAT1	<i>Ensifer</i> sp. HO-A22 <sup>T</sup>
Биопроект	PRJNA638879	PRJNA637646	PRJNA637586
Номер в Генбанке	JABWTC000000000	JABWTB010000000	JABWDU000000000
Размер генома (п.н.)	3460169	5303463	6762417
Г+Ц генома, %	63,4	54,6	61,7
Полнота сборки / контаминация, %	99,6 / 0,3	100,0 / 0,9	94,1 / 4,0
N <sub>50</sub> (п.о.)	111938	381158	1120613
Покрытие (×)	460	285	225
Общее количество генов	3231	4908	6312
Количество белок-кодирующих генов	3066	4743	6174
Количество генов (РНК)	60	67	56
Ближайший вид (номер геномной сборки)	<i>M. lutaoensis</i> T5054 <sup>T</sup> (GCF_001981305)	<i>H. titanicae</i> BH1 <sup>T</sup> (GCF_000336575)	<i>E. morelensis</i> Lc04 <sup>T</sup> (GCF_013283195)
ANI / dDDH	99,3% / 94,7%	99,8% / 99,2%	92,4% / 45,9%

## 7.2. Галотолерантные углеводородокисляющие бактерии из нефтяных пластов и анализ их геномов

Секвенирование геномов и определение общих индексов геномного родства штаммов KAZ22 и TAT1 подтвердило их принадлежность к видам *M. lutaoensis* и *H. titanicae* соответственно. Описаны основные фенотипические характеристики этих штаммов (Таблица 11), включая морфологию, размер и подвижность их клеток, образование кислоты из субстратов и их потребление, а также активность ферментов (API® ZYM). Бактериальные хромосомы штаммов KAZ22 и TAT1 и аннотированные в них гены окисления алканов и осмопротекции визуализированы в онлайн-сервисе Proksee и представлены на Рисунке 16.

Таблица 11 – Фенотипические признаки галофильных/галотолерантных бактерий *M. lutoensis* KAZ22 и *H. titanicae* TAT1 из нефтяных пластов (Турова и соавт., 2022)

Признак / штамм	<i>M. lutoensis</i> KAZ22	<i>H. titanicae</i> TAT1
Морфология клеток	Палочки	Палочки
Размер клеток (мкм)	2,0–3,5 × 0,6–1,0	0,6 × 2,0
Подвижность	+	+
Уреаза, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	+
Образование H <sub>2</sub> S, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub>	-	-
<i>Образуют кислоту из:</i>		
Мальтоза	+	+
Манноза	+	-
Маннит, сахароза	-	+
<i>Используют:</i>		
Пируват, фумарат, сукцинат, глутамат	+	+
Ацетат	+	-
Цитрат, DL-фенилаланин	-	+
Формиат, бутират, валерат, бензоат	-	-
<i>Активность ферментов (API®ZYM):</i>		
Щелочная фосфатаза, эстераза (C4), лейцин ариламидаза, валин ариламидаза, цистин ариламидаза, нафтол-AS-BI-фосфогидролаза, β-глюкозидаза	+	+
Эстераза липаза (C8), липаза (C14), N-ацетил-β-глюкозаминидаза, α-маннозидаза	+	-
Трипсин, кислая фосфатаза, α-глюкозидаза	-	+
α-химитрипсин, β-галактозидаза, β-глюкуронидаза, α-фукозидаза	-	-

Обозначения: +, положительный; -, отрицательный.

У обоих штаммов были аннотированы гены окисления алканов (Рисунок 17). В геноме штамма *H. titanicae* TAT1 присутствовал ген *alkB*, кодирующий фермент алкан-1-монооксигеназу AlkB, ответственную за деградацию короткоцепочечных алканов. В геноме штамма *M. lutoensis* KAZ22 были обнаружены две копии гена *alkB*, имеющие отличную друг от друга структуру, фланкированные различными генами и не являющиеся

родственными друг другу. Кроме того, в геноме штамма *M. lutaensis* KAZ22 присутствовал ген флавин-зависимой монооксигеназы *almA*, позволяющей ему использовать длинноцепочечные алканы с длиной углеродной цепи более 30 атомов.

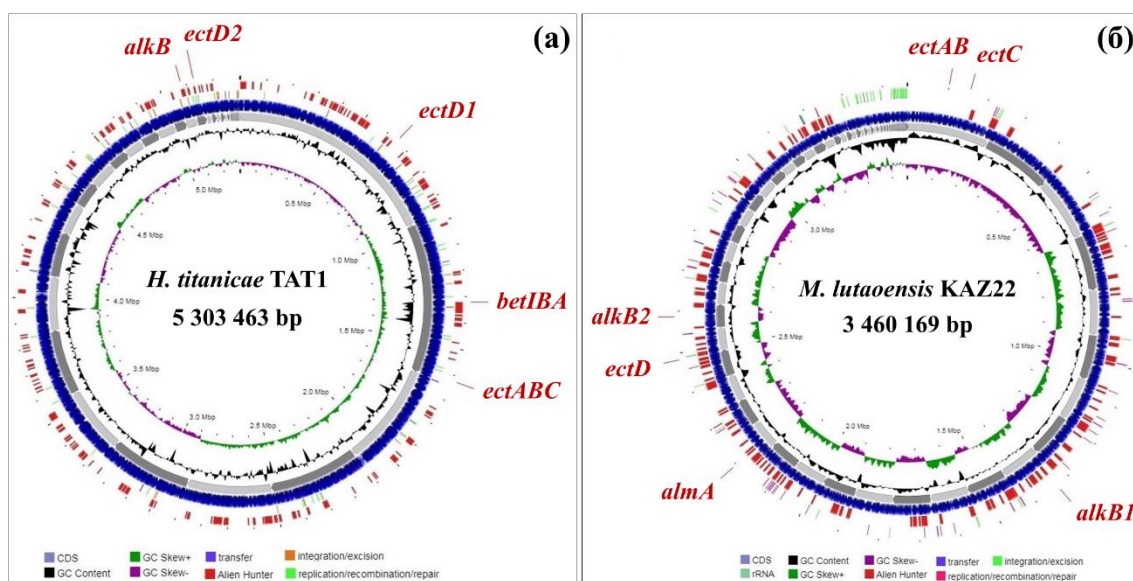


Рисунок 16 – Структура бактериальных хромосом штаммов *H. titanicae* TAT1 (а) и *M. lutaensis* KAZ22 (б) и локусы аннотированных генов окисления алканов и осмопротекции.

Кроме того, у обоих штаммов были аннотированы гены, ответственные за выделение осмопротекторов (Рисунок 18). Штамм *H. titanicae* TAT1 обладал генами синтеза бетаина, эктоина и гидроксiekтоина, в то время как штамм *M. lutaensis* KAZ22 имел отличный от него кластер генов *ectAB*, ассоциированный с геном аспартаткиназы, и отдельно расположенные гены *ectC* и *ectD*, что подтверждает способность обоих штаммов расти в условиях высокой солёности пластовой воды.

Таким образом, из нефтяных пластов России и Казахстана были выделены два штамма углеводородокисляющих бактерий *M. lutaensis* KAZ22 и *H. titanicae* TAT1, исследованы их фенотипические характеристики и проанализированы их геномы. Галотолерантный и термофильный штамм KAZ22 представляет интерес для ММУН 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 в борьбе с коррозией нефтепромыслового оборудования путём подавления активности сульфидогенных микроорганизмов нитрит-ионом.

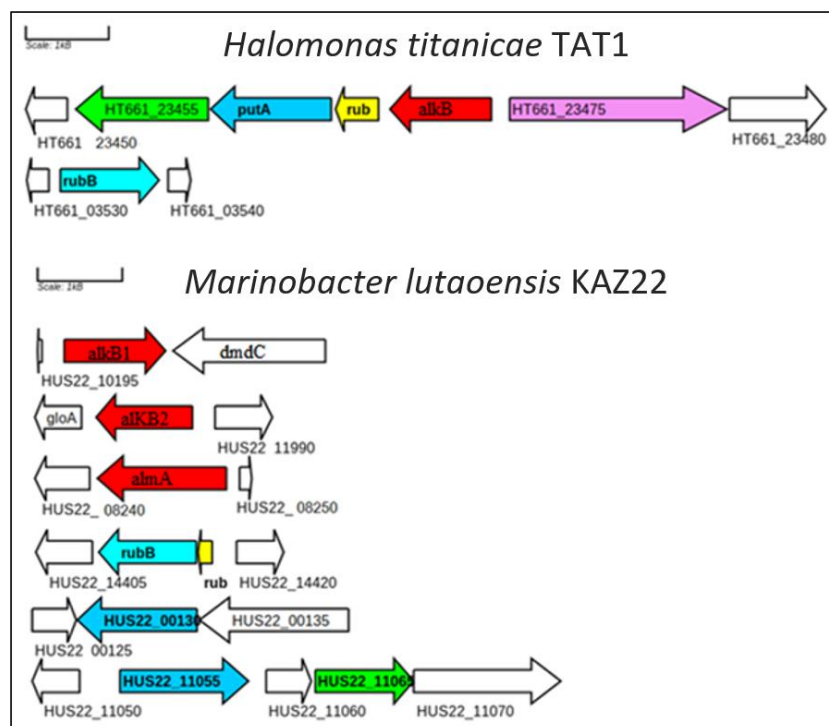


Рисунок 17 – Гены окисления алканов (*alkB* и *almA*) у штаммов бактерий *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaensis* KAZ22 (Турова и соавт., 2022).

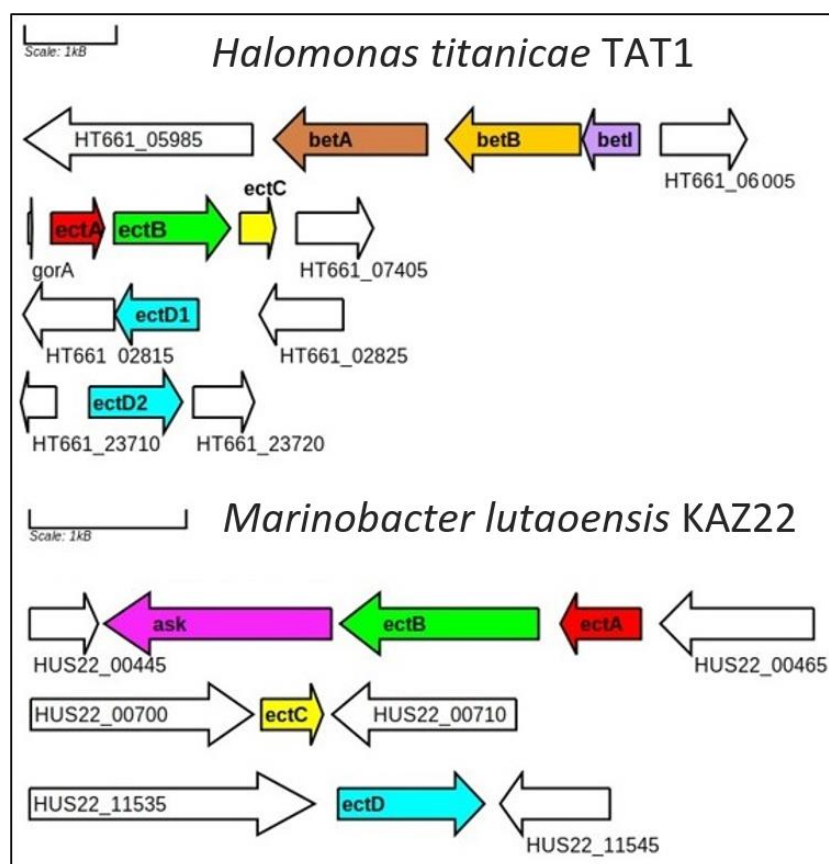


Рисунок 18 – Гены метаболизма осмопротекторов (*bet* и *ect*) у штаммов бактерий *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaensis* KAZ22 (Турова и соавт., 2022).

## ГЛАВА 8. ОПИСАНИЕ НОВОЙ УГЛЕВОДОДОКИСЛЯЮЩЕЙ 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). Проба воды была отобрана в 2016 году в ходе полевых испытаний ММУН. Нагнетаемая вода была слабощелочной, pH 7,86, плотностью – 997,4 кг·м<sup>-3</sup>. Вода содержала следующие ионы (мг·л<sup>-1</sup>): гидрокарбонат (244), хлорид (114), калий и натрий (114), сульфат (74), кальций (60) и магний (15). Общая минерализация пробы составляла 620 мг/л. Пласт располагался на глубине 850–1300 м ниже уровня моря, а его температура составляла 22–25°C. Другие физико-химические характеристики местообитания приведены в статье (Назина и соавт., 2017).

Клетки штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> были представлены неспорообразующими, подвижными, грамотрицательными палочками размером 1,0–1,5 × 0,3–0,5 мкм (Рисунок 19). Через 5 суток культивирования при 22°C штамм образовывал на плотной среде кремовые, гладкие, блестящие и круглые колонии диаметром до 8 мм. Чистоту выделенных культур подтверждали световой микроскопией и анализом гена 16S рРНК.

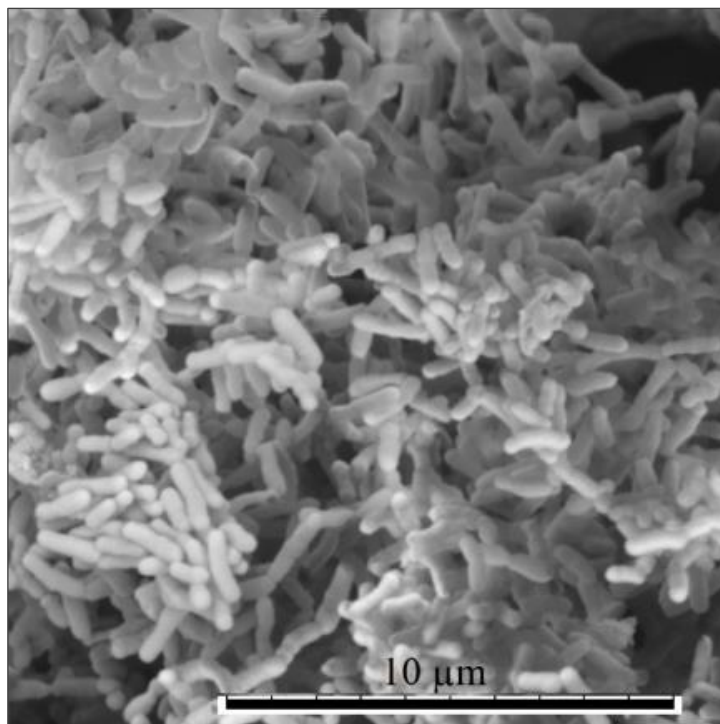


Рисунок 19 – Морфология клеток штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>. Штамм культивировали 72 ч в среде TEG при 22°C. Микрофотография получена на сканирующем электронном микроскопе Thermo Fisher Scientific Quattro S в режиме HV (Ershov et al., 2023).

Ген 16S рРНК штамма HO-A22<sup>T</sup> показал наибольшее сходство с генами бактерий родов *Ensifer* (99,0–99,9%) и *Sinorhizobium* (97,4–98,8%) семейства *Rhizobiaceae*. На филогенетическом дереве последовательность гена 16S рРНК (Рисунок 20) штамма HO-A22<sup>T</sup> кластеризовалась с таковой штамма *Ensifer morelensis* Lc04<sup>T</sup> (Wang et al., 2013). Результаты филогенетического анализа генов 16S рРНК продемонстрировали принадлежность нового изолята к роду *Ensifer*, однако дерево имело низкие значения бутстреп-поддержки, что указывало на необходимость проведения филогеномного анализа. Для уточнения таксономического положения штамма HO-A22<sup>T</sup> были исследованы его морфологические, физиологические и хемотаксономические свойства, а также проанализирован его геном.

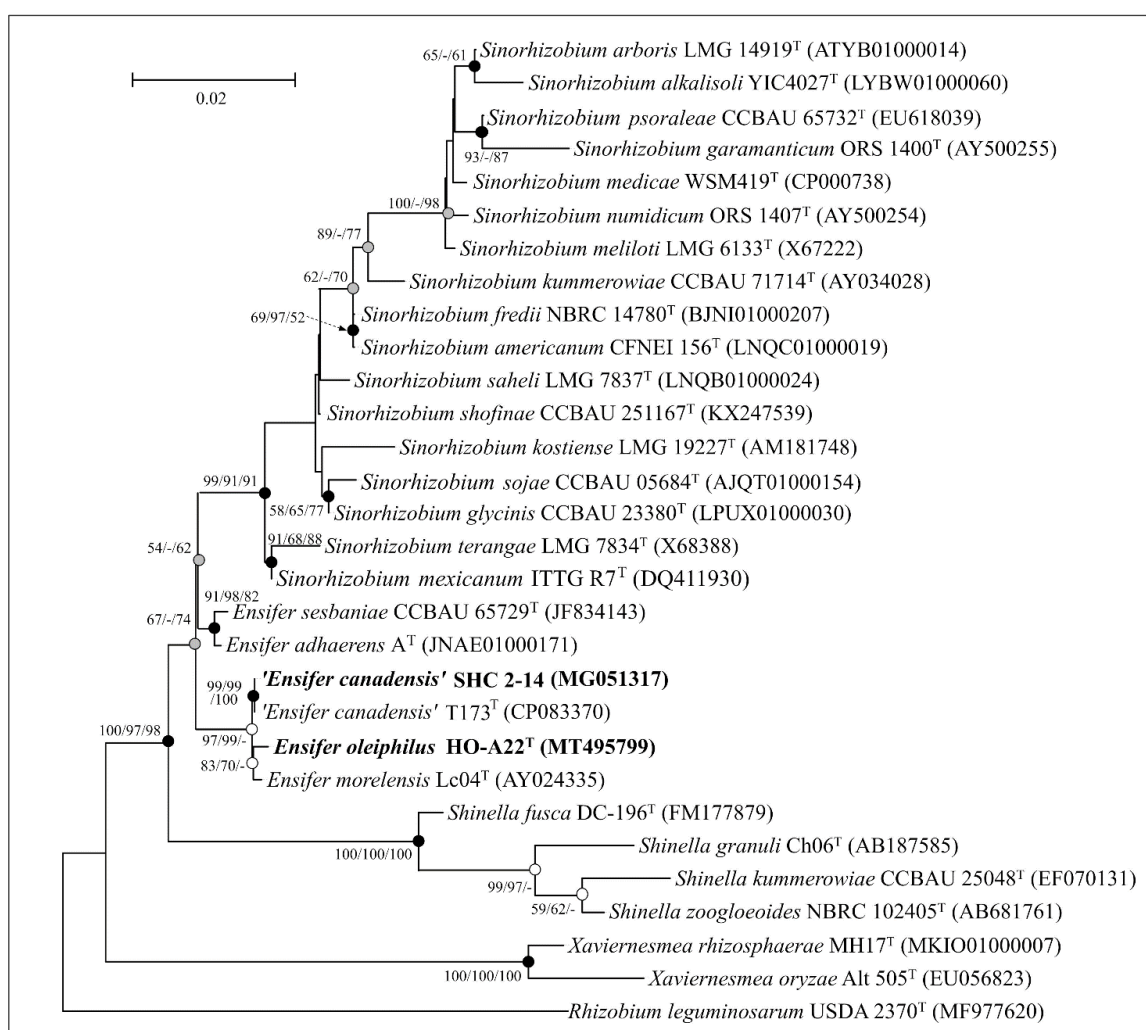


Рисунок 20 – Филогенетическое дерево последовательностей генов 16S рРНК (1365 нуклеотидов), показывающее положение штамма HO-A22<sup>T</sup> относительно близкородственных членов семейства *Rhizobiaceae*. Закрашенные серым узлы были восстановлены на основе алгоритма максимальной экономии; закрашенные белым – с использованием алгоритма присоединения соседей; закрашенные чёрным – на основе алгоритмов присоединения соседей и максимальной экономии. Бутстреп (> 50%) указан в процентах в точках ветвления. Бар, 0,02 замены на нуклеотид. Дерево было укоренено с использованием гена 16S рРНК типового штамма *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> в качестве внешней группы. Номера генов в GenBank указаны в скобках (Ershov et al., 2023).

### 8.1. Фенотипические признаки штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>

Физиологию штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> исследовали с использованием среды TEG при 24°C, соответствующей температуре нефтяного пласта, из которого он был выделен. Штамм рос в интервале 0–3% (вес/об.) NaCl в среде (оптимум 0–1,2% NaCl), температуре 15–33°C (оптимум 22–28°C) и pH 6,0–9,8 (оптимум pH 6,6–8,0). Штамм HO-A22<sup>T</sup> мог расти анаэробно, восстанавливая нитрит до закиси азота (N<sub>2</sub>O), не образуя в качестве конечного продукта процесса молекулярный азот (N<sub>2</sub>). Диапазоны роста штамма HO-A22<sup>T</sup> при разной температуре и концентрации NaCl приведены на Рисунке 14 (раздел 7.1).

При исследовании роста штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> на сырой нефти через 30 суток культивирования было отмечено снижение поверхностного и межфазного натяжения в среде культивирования на 5–10 мН/м, что свидетельствует об образовании ПАВ клетками штамма. Было продемонстрировано также снижение доли короткоцепочечных *n*-алканов в структуре насыщенных углеводородов нефти, деградированной штаммом HO-A22<sup>T</sup> (Рисунок 16), что свидетельствует о потреблении этих соединений. Способность использовать компоненты нефти с образованием биоПАВ обуславливает возможность его применения в биотехнологиях повышения нефтеизвлечения.

Для дальнейшего сравнительного анализа фенотипических признаков были получены типовые штаммы *E. adhaerens* A<sup>T</sup> (= NBRC 100388<sup>T</sup> = LMG 20216<sup>T</sup> = ATCC 33212<sup>T</sup>) и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (= NBRC 100387<sup>T</sup> = LMG 21331<sup>T</sup> = CFN E1007<sup>T</sup>) из Центра биологических ресурсов, NITE (NBRC) в Японии. Виды *Ensifer adhaerens* (Casida, 1982) и *Sinorhizobium morelense* (Wang et al., 2002) были описаны сравнительно давно, и было необходимо привести их фенотипическое описание в соответствие с современными требованиями. В связи с этим оба типовых штамма были так же детально исследованы, как и новый штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>.

Активность ферментов и потребление субстратов штаммами HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup> и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> определяли с помощью тестов API® ZYM, API® 20E и API® 50CH.

В тестах API® ZYM штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> показал положительные результаты на лейцинариламидазу, слабоположительный результат на валин-ариламидазу и отрицательный – на цистинариламидазу и трипсин. Все исследованные штаммы показали положительную или слабоположительную активность щелочной фосфатазы, эстеразы (C4), эстеразы липазы (C8), α-химотрипсина, кислой фосфатазы, нафтол-AS-VI-фосфогидролазы, β-галактозидазы, α-глюкозидазы, β-глюкозидазы и N-ацетил-β-глюкозаминидазы, однако у штаммов отсутствовала липаза (C14), α-галактозидаза, β-глюкуронидаза, α-маннозидаза и α-фукозидаза, что продемонстрировало сходство ферментативной активности этих штаммов (Таблица 12).



Согласно результатам API 20E, штамм *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> был положительным в отношении ферментации/окисления глюкозы и показал слабopоложительный результат на ферментацию/окисление мелибиозы. Все три штамма были положительными или слабopоложительными в отношении β-галактозидазы, триптофандезаминазы, рамнозы, ферментации/окисления арабинозы, образования NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, но отрицательными в отношении аргининдигидролазы, орнитиндекарбоксилазы, использования цитрата, образования H<sub>2</sub>S, продукции индола и ацетоина (реакция Вогес-Проскауэра), ферментации/окисления желатина, маннита, инозита, сорбита, сахарозы и амигдалина. Из исследованных штаммов только *E. adhaerens* A<sup>T</sup> обладал лизиндекарбоксилазой и уреазой (Таблица 13).

Таблица 12 – Сравнение ферментативной активности штаммов *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup> и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (Ershov et al., 2023)

Фермент	HO-A22 <sup>T</sup>	<i>E. adhaerens</i> A <sup>T</sup>	<i>E. morelensis</i> Lc04 <sup>T</sup>
Щелочная фосфатаза	+	+	w
Эстераза (C4)	w	+	w
Эстераза липазы (C8)	w	w	w
Липаза (C14)	–	–	–
Лейцинариламидаза	+	+	+
Валин ариламидаза	w	+	w
Цистин ариламидаза	–	+	w
Трипсин	–	+	+
α-химотрипсин	w	+	+
Кислая фосфатаза	+	+	+
Нафтол-AS-VI-фосфогидролаза	+	+	+
α-Галактозидаза	–	–	–
β-Галактозидаза	+	w	+
β-Глюкуронидаза	–	–	–
α-Глюкозидаза, β-Глюкозидаза	+	+	+
N-ацетил-β-глюкозаминидаза	+	+	–
α-Маннозидаза, α-Фукозидаза	–	–	–

Активность определялась с помощью теста API®ZYM (bioMérieux). Обозначения: +, положительная реакция; – отсутствует реакция; w, слабopоложительная реакция.

Таблица 13 – Сравнение ферментативной активности штаммов *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup> и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (Ershov et al., 2023)

Реакции	HO-A22 <sup>T</sup>	<i>E. adhaerens</i> A <sup>T</sup>	<i>E. morelensis</i> Lc04 <sup>T</sup>
β-Галактозидаза	w	w	w
Аргининдигидролаза	–	–	–
Лизиндекарбоксилаза	–	+	–
Орнитиндекарбоксилаза	–	–	–
Использование цитрата	–	–	–
Образование сероводорода	–	–	–
Уреаза	–	+	–
Триптофандезаминаза	w	w	+
Образование индола	–	–	–
Образование ацетона (Voges Proskauer)	–	–	–
Брожение/окисление желатина	–	–	–
Брожение/окисление глюкозы	+	–	w
Брожение/окисление маннита	–	–	–
Брожение/окисление инозита	–	–	–
Брожение/окисление сорбита	–	–	–
Брожение/окисление рамнозы	+	+	w
Брожение/окисление сахарозы	–	–	–
Брожение/окисление мелибиозы	w	w	–
Брожение/окисление амигдалина	–	–	–
Брожение/окисление арабинозы	+	+	+
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	w	+

Активность определялась с помощью теста API 20E (bioMérieux). Обозначения: +, положительная реакция; – отсутствует реакция; w, слабopоложительная реакция.

Согласно результатам тестов API 50CH, только штамм HO-A22<sup>T</sup> был положительным по L-сорбозе, дульциту, метил-αD-глюкопиранозиду, N-ацетилглюкозамину, амигдалину, арбутину, салицину, D-лактозе, ксилиту, гентиобиозе и 2-кетоглюконату К, слабopоложительным по D-мелибиозе и D-раффинозе, но отрицательным по метил-αD-маннопиранозиду и D-мелицитозе. При этом все исследованные штаммы были

положительными или слабopоложительными по глицерину, эритриту, D-арабинозе, L-арабинозе, D-рибозе, D-ксилозе, L-ксилозе, D-адониту, D-галактозе, D-глюкозе, D-фруктозе, D-маннозе, L-рамнозе, инозитолу, D-манниту, D-сорбиту, эскулину (цитрату железа), D-целлобиозе, D-мальтозе, D-сахарозе, D-трегалозе, D-туранозе, D-ликсозе, D-тагатозе, D-фукозе, L-фукозе, D-арабиту, L-арабиту, но отрицательными по метил-βD-ксилопиранозиду, инулину, крахмалу, гликогену, глюконату К и 5-кетоглюконату К, что может являться одним из общих признаков членов клады *Ensifer/Sinorhizobium* (Таблица 14).

Таблица 14 – Сбраживание углеводов штаммами *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup> и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (Ershov et al., 2023)

Субстрат	HO-A22 <sup>T</sup>	<i>E. adhaerens</i> A <sup>T</sup>	<i>E. morelensis</i> Lc04 <sup>T</sup>
Глицерин	+	+	+
Эритрит	+	w	+
D-Арабиноза	+	+	+
L-Арабиноза	+	+	+
D-Рибоза	+	+	+
D-Ксилоза	+	+	+
L-Ксилоза	+	+	+
D-Адонитол	+	+	+
Метил-βD-ксилопиранозид	–	–	–
D-Галактоза	+	+	+
D-Глюкоза	+	+	+
D-Фруктоза	+	+	+
D-Манноза	+	+	+
L-Сорбоза	+	–	w
L-Рамноза	+	+	+
Дульцит	+	–	w
Инозит	+	+	+
D-Маннит	+	+	+
D-Сорбит	+	+	+
Метил-αD-маннопиранозид	–	–	w
Метил-αD-глюкопиранозид	+	w	+

Таблица 14 (продолжение)

Н-ацетилглюкозамин	+	–	+
Амигдалин	+	–	w
Арбутин	+	–	w
Эскулин (цитрат железа)	+	+	+
Салицин	+	–	+
D-Целлобиоза	+	+	+
D-Мальтоза	+	+	+
D-Лактоза	+	+	+
D-Мелибиоза	w	+	+
D-Сахароза	+	+	+
D-Трегалоза	+	+	+
Инулин	–	–	–
D-Мелицетоза	–	w	–
D-Раффиноза	w	w	w
Крахмал	–	–	–
Гликоген	–	–	–
Ксилит	+	+	+
Гентиобиоза	+	w	+
D-Тураноза	+	+	+
D-Ликсоза	+	+	+
D-Тагатоza	+	+	+
D-Фукоза	+	+	+
L-Фукоза	+	+	+
D-Арабит	+	+	+
L-Арабит	+	w	+
Глюконат К	–	–	–
2-Кетоглюконат К	+	+	+
5-Кетоглюконат К	–	–	–

Сбраживание определяли с помощью теста API 50CH (bioMérieux). Обозначения:

+, положительная реакция; – отсутствует реакция; w, слабоположительная реакция.

В составе клеточных стенок штамма HO-A22<sup>T</sup> были обнаружены жирные кислоты C<sub>18:1</sub> (66,8%), C<sub>16:0</sub> (11,1%), C<sub>14:0</sub> 3-ОН (7,5%), C<sub>16:1</sub> (4,8%), C<sub>17:1</sub> (4,6%), C<sub>18:0</sub> (3,3%), C<sub>18:0</sub> 3-ОН (1,1%), C<sub>17:0</sub> (0,4%) и другие (0,4%). Этот профиль сравнивали с таковыми у штаммов *E. adhaerens* A<sup>T</sup> и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (Таблица 15). У всех трёх штаммов доминирующими жирными кислотами были C<sub>18:1</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:0</sub> и C<sub>14:0</sub> 3-ОН, за исключением штамма *E. adhaerens* A<sup>T</sup>, содержащего C<sub>16:0</sub> 3-ОН вместо C<sub>14:0</sub> 3-ОН. Профиль жирных кислот штамма HO-A22<sup>T</sup> не отличался значительно от такового штамма *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup>.

Таблица 15 – Состав жирных кислот клеточных стенок штаммов *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup> и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (Ershov et al., 2023)

Жирные кислоты	HO-A22 <sup>T</sup>	<i>E. adhaerens</i> A <sup>T</sup>	<i>E. morelensis</i> Lc04 <sup>T</sup>
C <sub>14:0</sub> 3-ОН	7,5	–	4,8
C <sub>16:0</sub> 3-ОН	–	8,5	–
C <sub>16:1</sub>	4,8	2,6	8,2
C <sub>16:0</sub>	11,1	6,9	8,7
C <sub>17:1</sub>	4,6	0,3	0,7
C <sub>17:0</sub>	0,4	–	0,4
C <sub>18:0</sub> 3-ОН	1,1	1,9	0,6
C <sub>18:1</sub>	66,8	75,9	73,7
C <sub>18:0</sub>	3,3	3,5	2,7
Остальные	0,4	0,4	0,2

Значения представляют собой проценты от общего количества жирных кислот. C<sub>16:1</sub>, C<sub>17:1</sub>, C<sub>18:1</sub> – суммы изомеров.

Все известные типовые штаммы рода *Ensifer*, а также штамм HO-A22<sup>T</sup> содержали фосфатидилхолины, фосфатидилэтанолламины и фосфатидилглицеролы в качестве основных полярных липидов (Рисунки 21–24). Они также содержали значительные количества дифосфатидилглицеролов, за исключением *E. sesbaniae* ССВАУ 65729<sup>T</sup> (Wang et al., 2013). Единственным респираторным хиноном для штамма HO-A22<sup>T</sup> был Q10 (Рисунок 25).

Исследованные штаммы рода *Ensifer* имели сходные хемотаксономические характеристики, значимых биохимических различий между штаммом HO-A22<sup>T</sup> и валидно описанными типовыми штаммами рода *Ensifer* не наблюдалось. Эти результаты подтвердили мнение о том, что эти свойства микроорганизмов малоинформативны для классификации (Semenova et al., 2019).

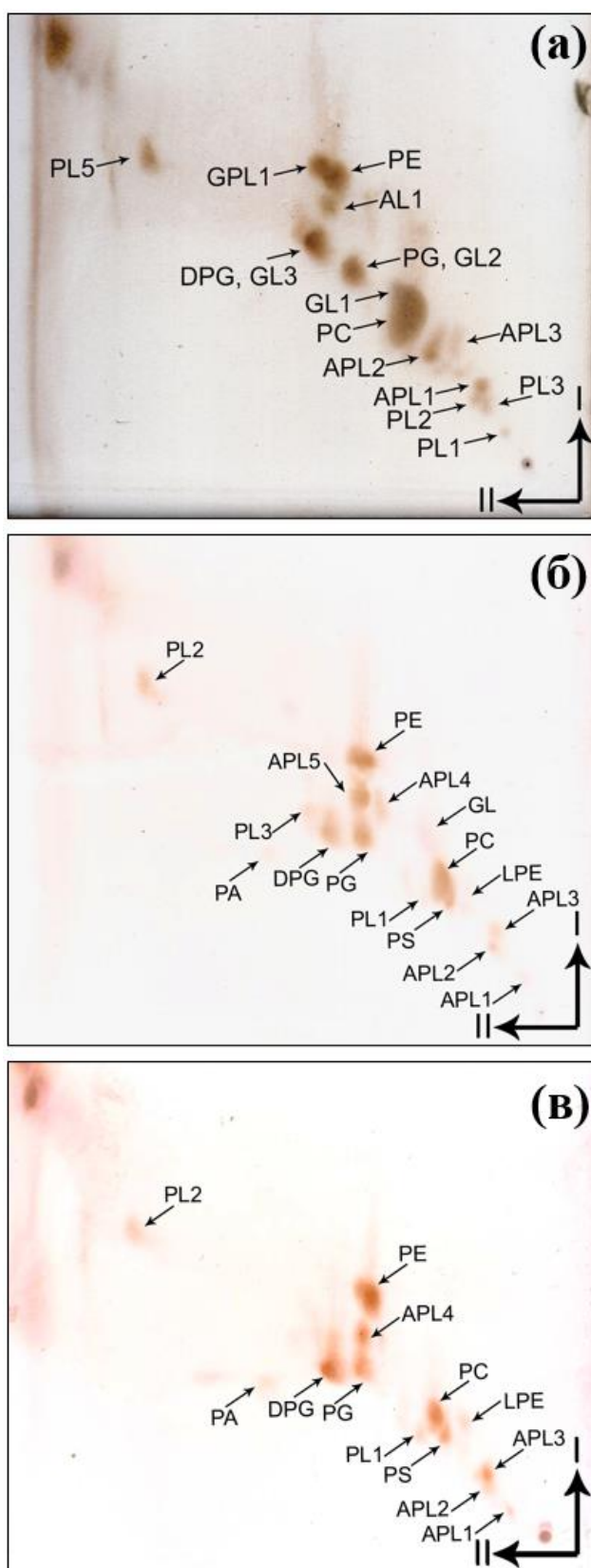


Рисунок 21 – Хроматограмма полярных липидов штаммов *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> (а), *E. adhaerens* A<sup>T</sup> (б) и *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> (в). Компоненты визуализировали окрашиванием 5% серной кислотой в этаноле и нагреванием при 180°C в течение 15 мин. Обозначения: AL, аминолипиды; APL, аминифосфолипиды; DPG, дифосфатидилглицеролы; GL, гликолипиды; LPE, лизофосфатидилэтанолламины; PA, фосфатидные кислоты; PC, фосфатидилхолины; PE, фосфатидилэтанолламины; PG, фосфатидилглицеролы; PL, фосфолипиды; PS, фосфатидилсерины (Ershov et al., 2023).

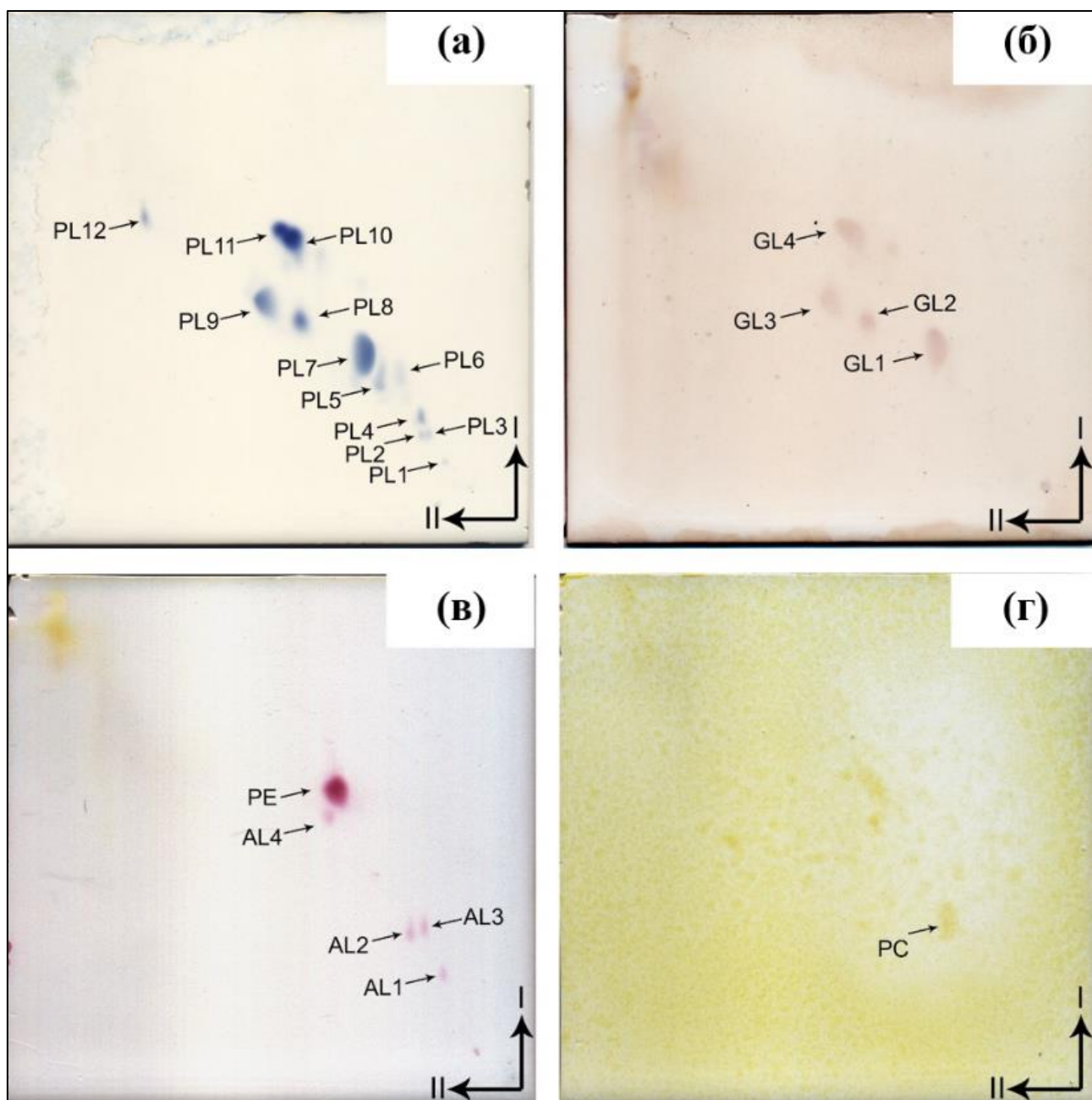


Рисунок 22 – Идентификация полярных липидов штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>. Компоненты визуализировали молибденовым синим (а);  $\alpha$ -нафтолом (б); ninгидрином (в); реактивом Драгендорф (г). Обозначения: AL, аминоклипиды; GL, гликолипиды; PC, фосфатидилхолины; PE, фосфатидилэтаноламины; PL, фосфолипиды (Ershov et al., 2023).

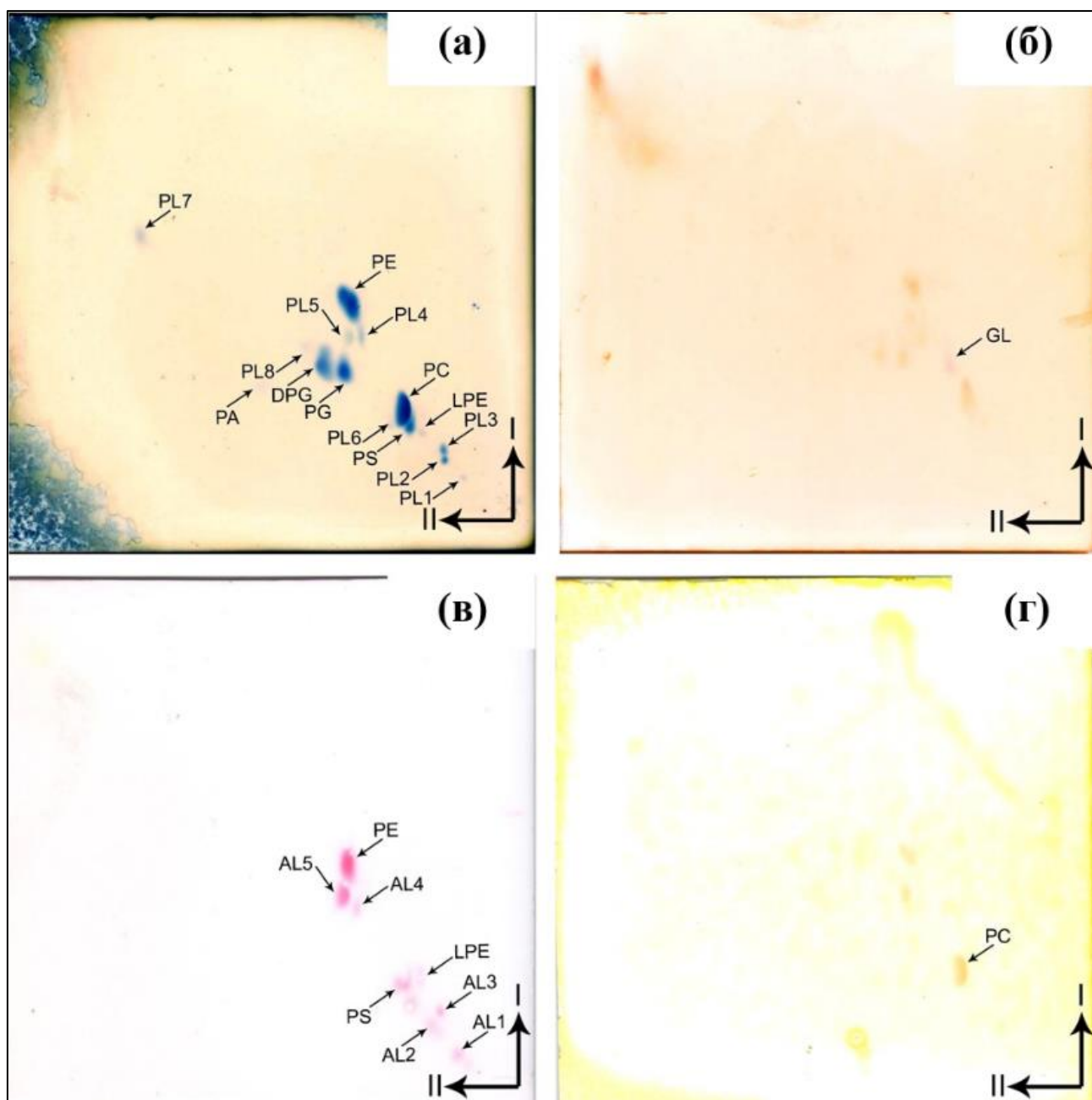


Рисунок 23 – Идентификация полярных липидов штамма *E. adhaerens* А<sup>Т</sup>. Компоненты визуализировали молибденовым синим (а);  $\alpha$ -нафтолом (б); ninгидрином (в); реактивом Драгендорф (г). Обозначения: AL, аминолипиды; DPG, дифосфатидилглицеролы; GL, гликолипиды; LPE, лизофосфатидилэтанолламины; PA, фосфатидные кислоты; PC, фосфатидилхолины; PE, фосфатидилэтанолламины; PG, фосфатидилглицеролы; PL, фосфолипиды; PS, фосфатидилсерины (Ershov et al., 2023).



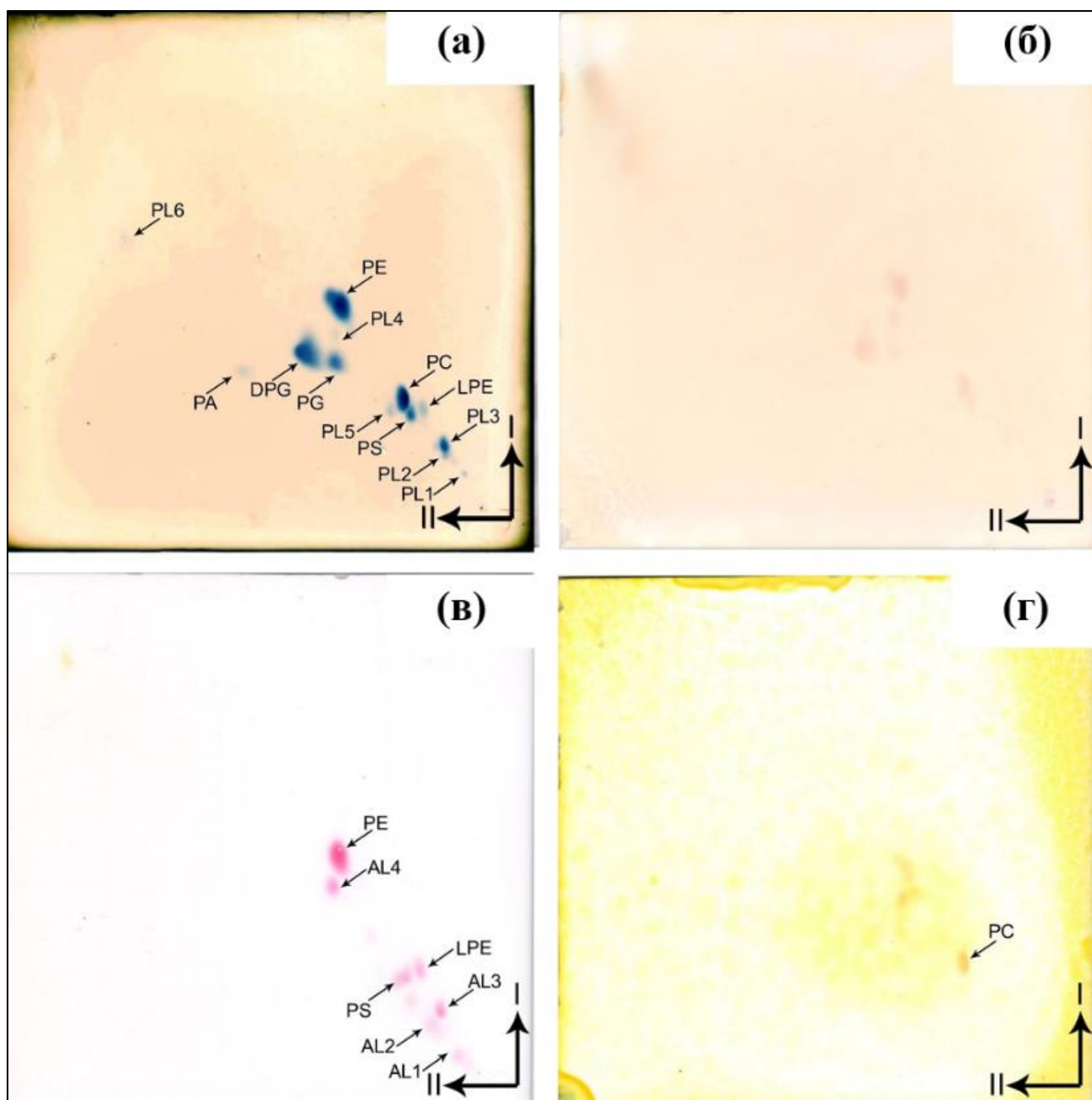


Рисунок 24 – Идентификация полярных липидов штамма *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup>. Компоненты визуализировали молибденовым синим (а); α-нафтолом (б); ninгидрином (в); реактивом Драгендорф (г). Обозначения: AL, аминлипиды; DPG, дифосфатидилглицеролы; LPE, лизофосфатидилэтанолламины; PA, фосфатидные кислоты; PC, фосфатидилхолины; PE, фосфатидилэтанолламины; PG, фосфатидилглицеролы; PL, фосфолипиды; PS, фосфатидилсерины (Ershov et al., 2023).

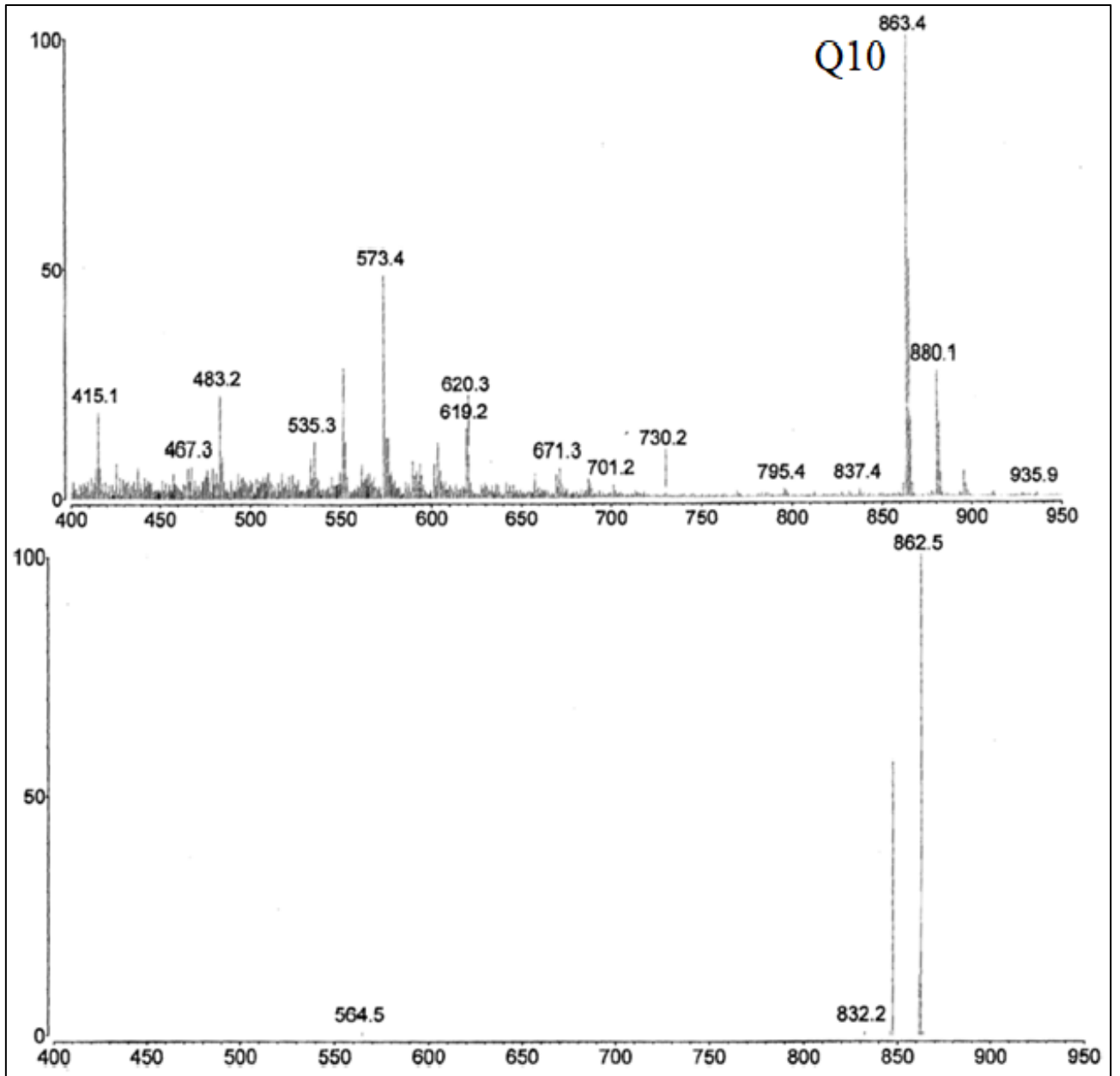


Рисунок 25 – Масс-спектры менахинонов штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>, показывающие наличие менахинона Q10 (Ershov et al., 2023).

## 8.2. Характеристика генома штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>

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 последовательности, 174 псевдогена и 55 генов РНК. На филогеномном дереве (Рисунок 26) 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 значительном удалении от типовых видов рода *Sinorhizobium*.

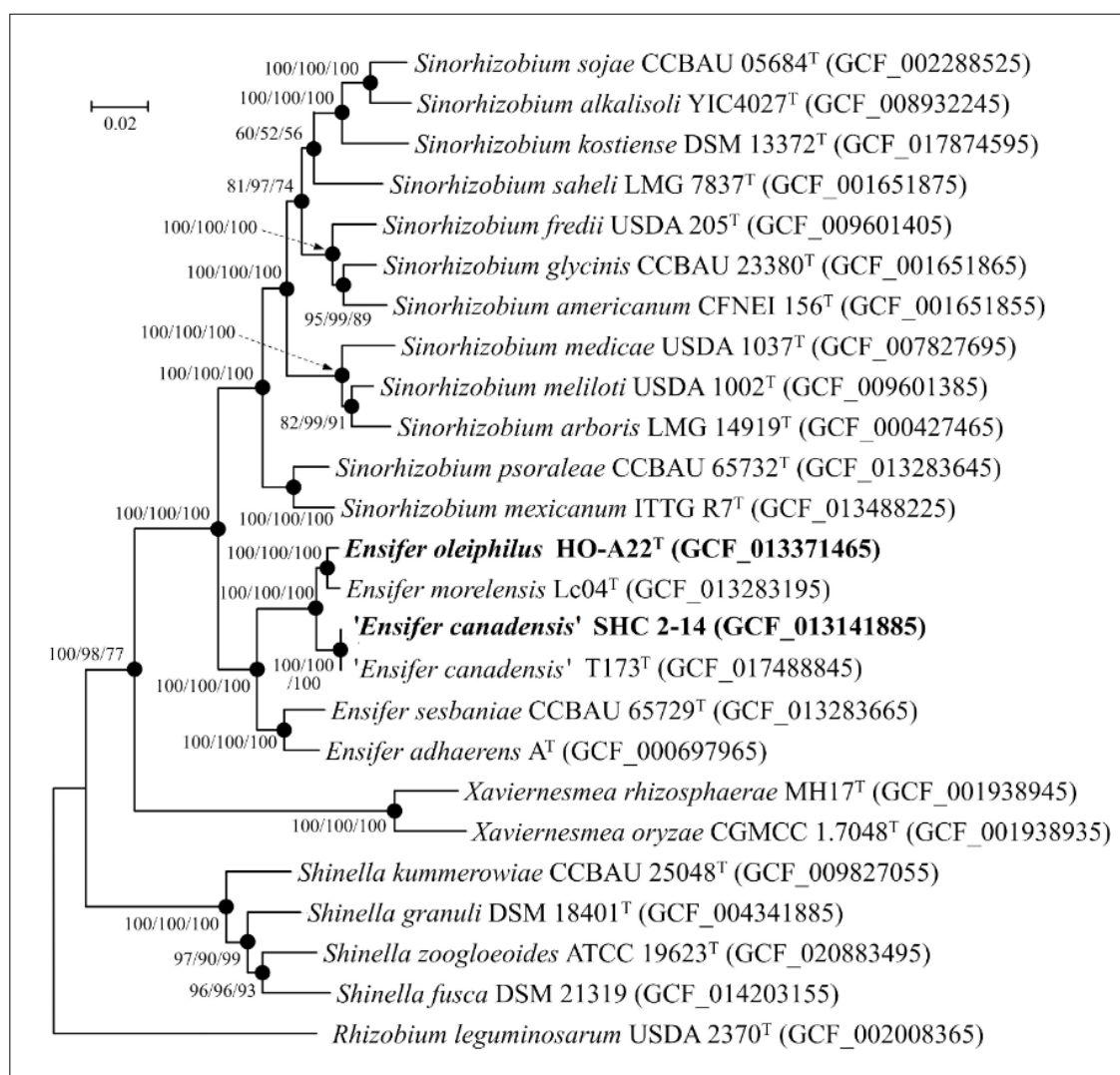


Рисунок 26 – Филогенетическое дерево 120 объединённых однокопийных белков, показывающее положение штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> относительно близкородственных представителей семейства *Rhizobiaceae*. Филогенетический анализ проводился с использованием модели LG+F+I+G4 по 37730 аминокислотным позициям. Чёрные кружки показывают, что соответствующие узлы также были восстановлены на основе алгоритмов присоединения соседей и максимальной экономии. Бар, 0,02 аминокислотных замены на позицию. Бутстреп (>50%) указан в процентах в точках ветвления. Дерево было укоренено с использованием генома *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> в качестве внешней группы. Номера собранных геномов указаны в скобках (Ershov et al., 2023).

Расчётные значения AAI и РОСР между новыми штаммами 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% (Kuzmanović et al., 2022) и РОСР <50–60% (Qin et al., 2014; Li et al., 2017; Orata et al., 2018; Koziyeva et al., 2019). Эти результаты подтверждают таковые, полученные на основе филогеномного и филогенетического анализа гена 16S рРНК, которые 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, предложенной на уровне 95% (Chun et al., 2018; Jain et al., 2018). Значения цифровой ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) по отношению к референтным геномам типовых штаммов рода *Ensifer* находились в диапазоне 25,4–45,9% и были ниже порога в 70% для разделения видов бактерий (Meier-Kolthoff et al., 2013; Chun et al., 2018). 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 гена, сгруппированных в 22072 генных кластера (ГК). Среди этих кластеров 2504 были идентифицированы как основные кластеры, присутствующие во всех проанализированных геномах, что указывает на их значимость для клады (Рисунок 27).

Основные кластеры включали гены, участвующие в транспорте и метаболизме аминокислот (291 ГК), а также в трансляции, структуре рибосом и их биогенезе (211 ГК). Анализ выявил 207 ГК, ответственных за полные пути углеводного обмена, включая гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа), путь Энтнера-Дудорова, окисление пирувата, цитратный цикл (ЦТК), пентозофосфатный цикл и кластер *exo* для биосинтеза и продукции экзополисахарида сукциногликанового типа. Кроме того, был идентифицирован 101 ГК, детерминирующий энергетический метаболизм, включая гены NADH:хиноноксидоредуктазы, сукцинатдегидрогеназы, комплекса цитохрома *bc<sub>1</sub>*, цитохром-*c*-оксидазы и АТФазы F-типа. Геномы также содержали гены ассимиляционной нитрат- и сульфатредукции.

При сравнении геномов бактерий родов *Ensifer* и *Sinorhizobium* было обнаружено, что 300 ГК являются общими для всех геномов бактерий рода *Ensifer*, но не для геномов *Sinorhizobium*. К этим ГК относятся *curA* (НАДФН-зависимая куркуминредуктаза), *cysP* (субстрат-связывающий белок транспортной системы сульфата/тиосульфата), *gli* (D-галактаролактонизомераза), *ixaB* (тагатуронатредуктаза), *uphE* и *uphF* (гены систем транспорта сахаров), *adeS* (сенсорная гистидинкиназа), *lplA*, *lplB* и *lplC* (предполагаемые гены транспортной системы альдуроната), а также *ceuA*, *ceuC* и *ceuD* (гены железозависимой транспортной системы альдуроната).

сидерофорной транспортной системы). Геном штамма HO-A22<sup>T</sup> содержал 339 ГК, 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 демонстрируют генетическое разнообразие внутри клады *Ensifer/Sinorhizobium* и дают представление об адаптации штамма к среде обитания.

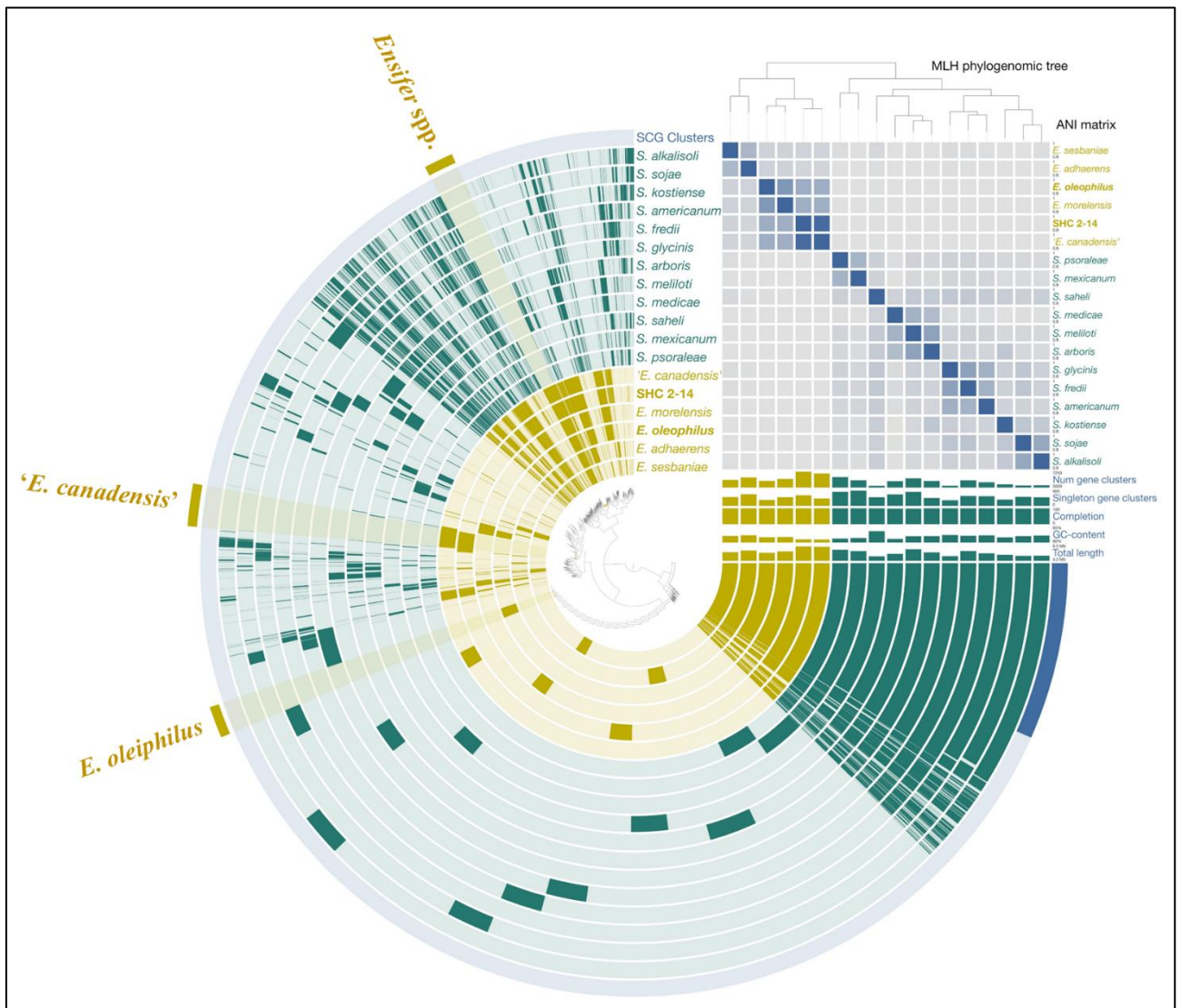


Рисунок 27 – Анализ пангенома штаммов клады *Ensifer/Sinorhizobium*, рассчитанный с помощью Anvi'o v. 7.0. Центральная дендрограмма представляет собой отношения между 22072 кластерами генов (117350 ген) во всех проанализированных геномах. Тёмные круглые области представляют собой гены, обнаруженные в этих областях для каждого генома. Филогенетическое дерево реконструировано с использованием однокопийных генов. Тепловая карта ANI варьирует от 70 до 100% (Ershov et al., 2023).

### 8.3. Анализ генома штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup>

Геном штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> кодировал 6114 ферментов. Штамм имел ряд генов углеродного метаболизма, в том числе гены гликолиза (путь Эмбдена-Мейергофа) и глюконеогенеза, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного пути и пути Энтнера-Дудорова, которые типичны для представителей клады *Ensifer/Sinorhizobium* (Geddes, Oresnik 2014; diCenzo et al., 2017; Draghi et al., 2017; Hawkins et al., 2018; Yurgel et al., 2021). Штамм не обладал генами 6-фосфо-бета-глюкозидазы (EC: 3.2.1.86), фруктозо-1,6-бисфосфат-1-фосфатазы (EC: 3.1.3.11), бета-цепи цитратной (про-3S)-лиазы (EC: 4.1.3.6), глюконолактоназы (EC: 3.1.1.17) и глюконатдегидратазы (EC: 4.2.1.39) в отличие от многих других представителей рода *Ensifer*.

Механизмы восстановления соединений азота бактериями группы *Ensifer/Sinorhizobium* наиболее полно были изучены Torges et al. (2011, 2014) на примере штамма *E. (S.) meliloti*. Штамм HO-A22<sup>T</sup> обладал генами *narADEF*, *nirKV* и *norDEQ*, т.е. был способен восстанавливать нитраты до закиси азота. Штамм содержал периплазматическую нитратредуктазу ферредоксинового типа (EC: 1.7.99.4), медьсодержащую нитритредуктазу (образующую NO) (EC: 1.7.2.1) и редуктазу оксида азота (EC: 1.7.99.7). В то же время геном штамма содержал ген *nirD*, кодирующий нитритредуктазу [NAD(P)H] (EC: 1.7.1.4), за счёт которой он потенциально мог осуществлять диссимиляционное восстановление нитритов до аммония (путь DNRA). Ряд представителей рода *Ensifer* содержит гены *nosDFRZ*, кодирующие редуктазу закиси азота (EC: 1.7.99.6), благодаря которым они в процессе своего роста выделяют молекулярный азот (Safonov et al., 2018). Однако штамм HO-A22<sup>T</sup> не обладал этими генами, поэтому конечным газообразным продуктом денитрификации была закись азота (Семенова и соавт., 2020). Штамм потенциально может быть использован в биотехнологии для подавления коррозии нефтепромышленного оборудования за счет нитрит-иона, который образовывался в качестве промежуточного продукта денитрификации.

Члены клады *Ensifer/Sinorhizobium* известны своей способностью образовывать внеклеточные полисахариды. Установлено, что генные кластеры *eps* и *exo* детерминируют образование экзополисахаридов, что жизненно важно для симбиотических ризобийных бактерий, поскольку полисахариды непосредственно участвуют в заселении клубеньков (Zivkovic et al., 2015; Rivers et al., 2022). Бактерии рода *Ensifer*, как правило, представлены несимбиотическими видами, но они также способны выделять внеклеточные полисахариды. В геноме штамма HO-A22<sup>T</sup> обнаружены гены *epsF* и *exoFQZ*, кодирующие гликозилтрансферазу биосинтеза экзополисахарида и белок-продукт экзополисахарида, что позволяет штамму образовывать эти соединения и повышать вязкость среды культивирования. Кроме того, бактерии рода *Ensifer* обладали генами *rhaIMS* и *rfbCD*,

ответственными за изомеризацию L-рамнозы (EC: 5.3.1.14) и её мутаротацию (EC: 5.1.3.32) (Rivers et al., 2022) и за восстановление dTDP-4-дегидрорамнозы (EC: 1.1.1.133) и её эпимеризацию (EC: 5.1.3.13) (Gao et al., 2011; Zivkovic et al., 2015) соответственно. Известно, что эти процессы являются ключевыми стадиями синтеза экзополисахаридов сукциногликанового типа (Zhan, Leigh, 1990; Jofré et al., 2004; Schmid et al., 2015), из чего можно предположить, что штамм HO-A22<sup>T</sup> образовывал этот тип внеклеточных полисахаридов. Выделение таких соединений штаммом *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> в пластовую воду нефтяного месторождения может представлять практический интерес для увеличения нефтеизвлечения.

Представители класса *Alphaproteobacteria* часто встречаются в нефтезагрязненных почвах, поскольку они обладают устойчивостью к высоким концентрациям неполярных загрязнителей и способностью использовать для роста различные компоненты нефти (Pourbabaee et al., 2021). Геном штамма HO-A22<sup>T</sup> содержал ряд генов, кодирующих ферменты аэробной деградации длинноцепочечных жирных кислот, алифатических углеводов, бензола, бензоата (BenB – бензоат-1,2-диоксигеназа (EC: 1.14.12.10), фенола, катехола (CatA – катехол-1,2-диоксигеназа (EC: 1.13.11.1), толуола, стирола и фенантрена. Для клады *Ensifer/Sinorhizobium* описаны различные пути деградации фенантрена и других полиароматических углеводов (Keum et al., 2006; Muratova et al., 2014; Turkovskaya, Muratova, 2019). Широкий спектр углеводородных соединений, которые потенциально мог использовать штамм HO-A22<sup>T</sup>, свидетельствует о его адаптации к условиям местообитания и возможности его применения в ММУН путем интродукции в нефтяной пласт.

Бактериальные штаммы устойчивы к высоким концентрациям тяжёлых металлов благодаря наличию в их геномах HMRGs (heavy metal resistance genes) – генов устойчивости к тяжёлым металлам (Nazina et al., 2020a; Sherpa et al., 2020; Yang et al., 2020). Геном штамма HO-A22<sup>T</sup> содержал ряд генов, связанных с детоксикацией меди, кадмия, цинка, свинца, кобальта, ртути и хрома. В геноме штамма также присутствовал ген *petE*, кодирующий пластоцианин, который регулирует концентрацию меди и, следовательно, обеспечивает устойчивость к этому иону (García-Cañas et al., 2021). Штамм также обладал генами *cutCE*, ответственными за гомеостаз меди, что является предполагаемым альтернативным механизмом его устойчивости к меди с использованием цитоплазматического медь-связывающего белка CutE (Nyre et al., 2021; Ge et al., 2022). Штамм HO-A22<sup>T</sup> содержал гены, кодирующие фермент CadA – медь-транслоцирующей АТФазы Р-типа (EC: 3.6.3.4), которая также известна детоксикацией кадмия, цинка и свинца (Salam, 2022). Ген *copG* в геноме HO-A22<sup>T</sup> кодирует аминоксидазу меди, которая также ответственна за устойчивость к меди (Toulouse et al., 2018). Штамм был потенциально толерантен к ионам ртути благодаря двум

различным ферментам: MerA представляет собой редуктазу ионов ртути (EC: 1.16.1.1), экспрессия которой индуцируется при ртутном стрессе у ряда прокариотических организмов (Binish et al., 2021; Al-Ansari, 2022; Babich et al., 2023), а белок ZntA представляет собой АТФазу, транспортирующую свинец, кадмий, цинк и ртуть, которая также обнаружена у филогенетически близких бактерий клады *Ensifer/Sinorhizobium* (DiCenzo et al., 2018). Наконец, толерантность штамма к хрому была возможна благодаря наличию в его геноме генов *chrAF*, ответственных за транспорт хромата (ChrA — эффлюкс-переносчик хромата) (Almeida et al., 2020; Princy et al., 2021). Обилие HMRG в геноме штамма HO-A22<sup>T</sup> может позволить ему обитать в средах, загрязненных тяжелыми металлами, в том числе в таких подземных экосистемах, как загрязненные радионуклидами подземные воды.

Таким образом, геном штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> содержал ряд кластеров генов, подтверждающих его физиологические особенности, которые были показаны экспериментально. Штамм обладал генами различных путей метаболизма углерода, денитрификации и диссимиляционного восстановления нитратов до аммония, синтеза экзополисахаридов, предположительно внеклеточных полисахаридов сукциногликанового типа, деградации алифатических и ароматических углеводородных компонентов нефти и детоксикации различных тяжелых металлов и/или радионуклидов, что позволяло штамму расти в нетипичных для представителей клады *Ensifer/Sinorhizobium* условиях среды и подтверждало его приспособленность к обитанию в нефтяном пласте, из которого он был выделен.

#### 8.4. Описание нового вида *Ensifer oleiphilus* sp. nov.

Сравнительная характеристика штамма *Ensifer* sp. HO-A22<sup>T</sup> и валидно описанных представителей рода *Ensifer* приведена в Таблице 16. Все валидно описанные бактерии рода *Ensifer* являются грамотрицательными, подвижными, аэробными, неспорообразующими палочками. Они могут восстанавливать нитраты до нитритов, расти в присутствии 1% 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. Ни один из этих видов не растёт при 4% NaCl, не образует кислоту из инулина или крахмала и не образует H<sub>2</sub>S. 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>. Основными полярными липидами являются фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины и фосфатидилглицеролы.

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 (Oren, Göker, 2024b).



Таблица 16 – Дифференцирующие признаки штаммов HO-A22<sup>T</sup>, *E. adhaerens* A<sup>T</sup>, *E. morelensis* Lc04<sup>T</sup> и *E. sesbaniae* CCBAU 65729<sup>T</sup> (Ershov et al., 2023)

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> CCBAU 65729 <sup>T</sup>
Каталаза	+	w	+	–
Уреаза	–	+	–	+
Использование цитрата	–	–	–	+
Рост при:				
2% NaCl	+	+	+	–
15°C	+	+	+	–
37°C	–	w	w	+
Выделение кислоты (API® 50CH) из:				
Дульцитол	+	–	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-OH	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-OH, C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:1</sub> , C <sub>12:0</sub> aldehyde, C <sub>16:0</sub>
Полярные липиды	PC, PE, DPG, PG	PE, PC, PG, DPG	PE, DPG, PC, PG	PC, PE, PG
Содержание G + C в геноме, %	61.7	62.8 <sup>a</sup>	61.7 <sup>b</sup>	60.4
Источник выделения	Нагнетаемая в нефтяной пласт вода	Почва <sup>a</sup>	Корневые клубеньки <i>Leucaena leucocephala</i> <sup>b</sup>	Корневые клубеньки <i>Sesbania cannabina</i>

Данные для *E. sesbaniae* CCBAU 65729<sup>T</sup> взяты из Wang et al. (2013). Результаты для остальных штаммов получены в настоящей работе кроме: <sup>a</sup>, Tóth et al. (2017); <sup>b</sup>, Wang et al. (2002). Обозначения: +, положительный; –, отрицательный; w, слабый рост; DPG, дифосфатидилглицеролы; PC, фосфатидилхолины; PE, фосфатидилэтаноламины; PG, фосфатидилглицеролы.

Штамм HO-A22<sup>T</sup> может быть использован в биотехнологиях увеличения нефтеотдачи, благодаря использованию алканов нефти и образованию внеклеточных биоПАВ и полисахаридов, а также в технологиях биоремедиации загрязненных радионуклидами и нитратами отходов, вследствие способности восстанавливать нитраты и тяжелые металлы. Описание нового вида в формате протокола приведено в Таблице 17.

Таблица 17. Описание-протокол нового вида бактерий *Ensifer oleiphilus* sp. nov.

Характеристика	<i>Ensifer oleiphilus</i> sp. nov.
Название рода	<i>Ensifer</i>
Название вида	<i>Ensifer oleiphilus</i>
Статус вида	sp. nov.
Этимология вида	o.le.i.phi'lus. L. сущ. ср. <i>oleum</i> нефть; N.L. прилаг. муж. <i>philus</i> (от греч. прилаг. муж. <i>philos</i> ) любящий; N.L. прилаг. муж. <i>oleiphilus</i> любящий нефть, ссылаясь на способность типового штамма потреблять углеводороды нефти
Описание нового таксона и его диагностические признаки	Клетки являются грамотрицательными, подвижными, аэробными, неспорообразующими палочками. Колонии кремовые, гладкие, блестящие, округлые, до 8 мм в диаметре после 5 суток культивирования на среде TEG при 22°C. Рост наблюдается на средах TEG, PCA и LB в присутствии 0–3.0% (в./об.) NaCl (оптимум 0–1.2%), при pH 6.0–9.8 (оптимум 6.6–8.0) и при 15–33°C (оптимум 22–28°C). Каталазоположительные, не имеют уреазы, не потребляют цитрат. Хемоорганогетеротрофы, факультативные анаэробы. Восстанавливают нитрат до закиси азота. Образуют кислоту из D-галактозы, гентиобиозы, дульцитолы, D-лактозы, L-рамнозы, салицина, L-сорбозы, D-туранозы и D-фукозы, но не из D-мелицитозы. Доминирующими жирные кислоты являются C <sub>18:1</sub> , C <sub>16:0</sub> , C <sub>14:0</sub> 3-ОН, C <sub>16:1</sub> , C <sub>17:1</sub> и C <sub>18:0</sub> . Основной менахинон – Q10. Преобладающими полярными липидами являются фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, дифосфатидилглицеролы и фосфатидилглицеролы. Устойчивы к карбенициллину (100 мкг), эритромицину (15 мкг) и канамицину (30 мкг), чувствительны к гентамицину (10 мкг). Размер генома типового штамма составляет 6.76 млн п.о. с содержанием 61.7% G + C в геноме. Типовой штамм HO-A22 <sup>T</sup> (= VKM В-3646 <sup>T</sup> = KCTC 92427 <sup>T</sup> ) выделен из денитрифицирующей накопительной культуры, полученной из нагнетаемой воды в Черёмуховское нефтяное месторождение (Татарстан, Россия). Номер доступа в GenBank/EMBL/DDBJ для последовательности гена 16S рРНК – MT495799, для сборки генома – GCF_013371465.1.
Страна происхождения	Российская Федерация
Регион происхождения	Нурлатский район, Республика Татарстан
Год выделения	2018
Источник выделения	Нагнетаемая в нефтяной пласт вода
Год отбора проб	2016
Долгота	55°0' с. ш.
Широта	51°1' в. д.
Глубина (м ниже уровня моря)	850–1300
Количество штаммов в исследовании	1

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование микробного сообщества нефтяного пласта является необходимым этапом при выборе биотехнологий увеличения нефтеизвлечения на этом месторождении. 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 Восточно-Анзирского, Ново-Елховского, Ромашкинского и Черёмуховского месторождения 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 *Desulfoplanes*, *Desulfovermiculus* и *Desulfotignum*, а в высокотемпературных ( $\geq 55^\circ\text{C}$ ) пробах из месторождения Узень (4256, 7309, 8001, 8533 и 9064) преобладали бактерии родов *Desulfonauticus*, *Desulfoglaeba* и *Thermodesulfobacterium*.

Микробные сообщества из месторождения Узень были исследованы более детально. Примечательно, что микроорганизмы, доминирующие в этих пробах, практически не встречались в морской воде, что напрямую свидетельствует об активации заводнением аборигенной микробиоты этого месторождения. 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, причём во всех таких исследованных библиотеках V3–V4 региона

генов 16S рРНК доминирующими были флотипы 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 извлекаемой 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, двойной и тройной рекомендованной к применению концентрации (40 мг/л) в отличие от глутарового альдегида в концентрации 100 мг/л, который приводил к снижению содержания образуемого 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 плактонной 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, полученным из семи проб воды 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 комплементарного 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 углеводородокисляющих 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 филогенов рода *Marinobacter* в библиотеках V3–V4 фрагментов генов 16S рРНК из накопительных культур месторождения Узень при их стимулировании нитратом, выделенные штаммы этого рода не были способны к нитратредукции, в связи с чем их потенциальное биотехнологическое применение ограничивалось ММУН. Штамм *Halomonas titanicae* TAT1, напротив, накапливал до 100 мг нитрит-иона/л при росте на нитрате в анаэробных условиях, чем и представляет интерес для биотехнологий подавления сульфидогенеза путём нитратного заводнения пласта. Как и штамм *Marinobacter lutaoensis* KAZ22, штамм имел геномные детерминанты окисления алканов и устойчивости к высокой солености, то есть оба эти штамма 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. Поэтому штамм не может использоваться для подавления сульфидогенеза. Однако 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 этого 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 нефтewытесняющих метаболитов, что свидетельствует о возможности их применения в биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения. В геномах бактерий *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter lutaensis* KAZ22 выявлены гены деградации *n*-алканов и синтеза осмопротекторов, подтверждающие приспособленность к условиям местообитания. Штамм *Halomonas titanicae* TAT1 восстанавливает нитрат с накоплением нитрита и может быть использован для подавления роста сульфидогенов.

5. На основании изучения фенотипических признаков и геномного анализа штамма HO-A22<sup>T</sup> и бактерий рода *Ensifer* описан новый вид углеводородокисляющих бактерий *Ensifer oleiphilus* sp. nov. В геноме штамма HO-A22<sup>T</sup> выявлены гены деградации углеводов, восстановления нитрата, синтеза внеклеточных полисахаридов и детоксикации тяжёлых металлов, что подтверждает потенциал его биотехнологического применения.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<b>АОБ</b>	аэробные органотрофные бактерии
<b>АТФ</b>	аденозинтрифосфат
<b>биоПАВ</b>	биологические поверхностно-активные вещества
<b>ВКМ</b>	Всероссийская коллекция микроорганизмов
<b>ГК</b>	генный кластер
<b>ДГГЭ</b>	денатурирующий градиентный гель-электрофорез
<b>ДМСО</b>	диметилсульфоксид
<b>ДНБ</b>	денитрифицирующие бактерии
<b>ДНК</b>	дезоксирибонуклеиновая кислота
<b>МВ</b>	морская вода
<b>ММУН</b>	микробиологические методы увеличения нефтеизвлечения
<b>МТТ</b>	3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид
<b>НАДФ</b>	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
<b>ОТЕ</b>	операционная таксономическая единица
<b>ПАВ</b>	поверхностно-активные вещества
<b>ПЦР</b>	полимеразная цепная реакция
<b>РНК</b>	рибонуклеиновая кислота
<b>рРНК</b>	рибосомная рибонуклеиновая кислота
<b>СВ</b>	сульфатвосстанавливающие
<b>СВБ</b>	сульфатвосстанавливающие бактерии
<b>СЭМ</b>	сканирующая электронная микроскопия
<b>ТСВ</b>	тиосульфатвосстанавливающие
<b>ТСВБ</b>	тиосульфатвосстанавливающие бактерии
<b>ЦППН</b>	цех первичной подготовки нефти
<b>AAI</b>	average amino acid identity (средняя аминокислотная идентичность)
<b>AL</b>	aminolipid (аминолипиды)
<b>ANI</b>	average nucleotide identity (средняя нуклеотидная идентичность)
<b>ANOSIM</b>	analysis of similarity (анализ сходства)
<b>APL</b>	aminophospholipids (аминофосфолипиды)
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур)
<b>ВАС</b>	benzalkonium chloride (хлорид бензалкония)
<b>BLAST</b>	basic local alignment search tool (базовый инструмент поиска локального

	выравнивания)
<b>BV-BRC</b>	Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (Бактериальный и вирусный биоинформатический ресурсный центр)
<b>DDBJ</b>	DNA Data Bank of Japan (Японская база данных ДНК)
<b>dDDH</b>	digital DNA–DNA hybridization (цифровая ДНК–ДНК гибридизация)
<b>DNRA</b>	dissimilatory nitrate reduction to ammonium (диссимиляционное восстановление нитрата до аммония)
<b>DPG</b>	diphosphatidylglycerols (дифосфатидилглицеролы)
<b>dTDP</b>	deoxythymidine diphosphate (дезокситимидиндифосфат)
<b>EC</b>	Enzyme Commission (комиссия по ферментам)
<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory (Европейская молекулярно-биологическая лаборатория)
<b>GA</b>	glutaric aldehyde (глутаровый альдегид)
<b>GL</b>	glycolipids (гликолипиды)
<b>HMRG</b>	heavy metal resistance genes (гены устойчивости к тяжёлым металлам)
<b>KCTC</b>	Korean Collection for Type Cultures (Корейская коллекция типовых культур)
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (энциклопедия генов и геномов Киото)
<b>LB</b>	lysogeny broth (лизогенная среда)
<b>LMG</b>	Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (лаборатория микробиологии Гентского университета)
<b>LPE</b>	lysophosphatidylethanolamines (лизофосфатидилэтанолламины)
<b>NAD</b>	nicotinamide adenine dinucleotide (никотинамидадениндинуклеотид)
<b>NADP</b>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (никотинамидадениндинуклеотидфосфат)
<b>NBRC</b>	National Biological Resource Center (Национальный биологический ресурсный центр)
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации)
<b>NITE</b>	National Institute of Technology and Evaluation (Национальный институт технологии и оценки)
<b>PA</b>	phosphatidic acids (фосфатидные кислоты)
<b>PAST</b>	paleontological statistics (палеонтологическая статистика)
<b>PATRIC</b>	PathoSystems Resource Integration Center (центр интеграции ресурсов PathoSystems)



<b>PC</b>	phosphatidylcholines (фосфатидилхолины)
<b>PCA</b>	plate count agar (агар для подсчёта колоний на чашках)
<b>PE</b>	phosphatidylethanolamines (фосфатидилэтаноламины)
<b>PG</b>	phosphatidylglycerols (фосфатидилглицеролы)
<b>PL</b>	phospholipids (фосфолипиды)
<b>POCP</b>	percentage of conserved proteins (доля консервативных белков)
<b>PS</b>	phosphatidylserines (фосфатидилсерины)
<b>TEG</b>	tryptone, yeast extract, glucose (триптон, дрожжевой экстракт, глюкоза)
<b>THPS</b>	tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (сульфат тетракис (гидроксиметил) фосфония)
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture (департамент сельского хозяйства Соединённых Штатов)

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н., Розанова Е.П., Глумов И.Ф., Ибатуллин Р.Р., Иванов М.В. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения // Микробиология. – 2004. – Т. 73 (5). – С. 687–697.
2. Беляев С.С., Лауринавичус К.С., Образцова А.Я., Горлатов С.Н., Иванов М.В. Микробиологические процессы в призабойной зоне нагнетательных скважин нефтяных месторождений // Микробиология. – 1982. – Т. 51 (6). – С. 997–1001.
3. Богомолов А.И., Абрютина Н.Н. Современные методы исследования нефтей. – Л.: Недра, 1984. – 431 с.
4. Борзенков И.А., Милехина Е.И., Гогоева М.Т., Розанова Е.П., Беляев С.С. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири, Вьетнама // Микробиология. – 2006. – Т. 75 (1). – С. 82–89.
5. 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). Патент RU № 2717025 С1. Заявка № 2019114124 от 08.05.2019. Опубликовано: 17.03.2020.
6. Гинзбург-Карагичева Т.Л. Микробиологическое исследование серно-соленых вод Апшерона // Азербайджанское нефтяное хозяйство. – 1926. – № 3. – С. 30–55.
7. Ибатуллин Р.Р. Технологические процессы разработки нефтяных месторождений. – М.: ВНИИОЭНГ, 2011. – 332 с.
8. Ибатуллин Р.Р., Хисамов Р.С., Кандаурова Г.Ф., Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н. Применение современных микробиологических технологий увеличения нефтеотдачи на объектах НГДУ «Лениногорскнефть» // Нефтяное хозяйство. – 2005. – № 7. – С. 42–45.
9. Иманбаев Б.А., Жапаров Н.С., Максут Д.М., Утепов М.С. Методы применения бактерицидов для борьбы с биогенным сероводородом на месторождении Узень и Карамандыбас // Вестник нефтегазовой отрасли Казахстана. – 2021. – Т. 4 (9). – С. 79–92.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: методы генетической инженерии. Пер. с англ. – М.: Мир, 1984.
11. Назина Т.Н., Беляев С.С. Биологическое и метаболическое разнообразие микроорганизмов нефтяных месторождений // Тр. Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. №. 12. – М.: Наука, 2004. – С. 289–316.

12. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Вагнер М., Циран Б., Ибатуллин Р.Р., Кандаурова Г.Ф., Миллер Ю.М., Беляев С.С., Иванов М.В. Интродукция *Clostridium tyrobutyricum* и мелассы в нефтяной пласт Ромашкинского месторождения и влияние ее на развитие микробиологических процессов в пласте // Микробиология. – 1996. – Т. 65 (3). – С. 403–408.
13. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В. Микробиологические исследования карбонатного коллектора Ромашкинского нефтяного месторождения в связи с испытанием биотехнологии повышения нефтеотдачи. Предварительные исследования // Микробиология. – 1998. – Т. 67 (5). – С. 701–709.
14. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Ивойлов В.С., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В. Микробиологические исследования пластовой воды Ромашкинского нефтяного месторождения в процессе испытания биотехнологии повышения нефтеотдачи // Микробиология. – 1999а. – Т. 68 (2). – С. 252–260.
15. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Ивойлов В.С., Миллер Ю.М., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В. Результаты испытания микробиологического метода повышения нефтеотдачи в условиях карбонатного коллектора Ромашкинского нефтяного месторождения. Биогеохимические и продукционные характеристики // Микробиология. – 1999б. – Т. 68 (2). – С. 261–266.
16. 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.
17. Ножевникова А.Н., Русскова Ю.И., Литти Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А. Синтрофия и межвидовой перенос электронов в метаногенных микробных сообществах // Микробиология. – 2020. – Т. 89 (2). – С. 131–151.
18. Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. – 2016. – Т. 85 (4). – С. 484–489.
19. Розанова Е.П., Быков В.Н., Балдина А.Л., Косогорова Т.А. Биогенные элементы и сульфатредукция в заводняемом нефтяном карбонатном пласте // Микробиология. – 1976. – Т. 45 (2). – С. 365–369.
20. 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.
21. Соболева Е.В., Гусева А.Н. Химия горючих ископаемых. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 204 с.

22. 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.
23. 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.
24. Adams M.M., Hoarfrost A.L., Bose A., Joye S.B., Girguis P.R. Anaerobic oxidation of short-chain alkanes in hydrothermal sediments: potential influences on sulfur cycling and microbial diversity // Front. Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – 110.
25. Adkins J.P., Cornell L.A., Tanner R.S. Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids // Geomicrobiol. J. – 1992. – Vol. 10. – P. 87–97.
26. Aeckersberg F., Bak F., Widdel F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium // Arch. Microbiol. – 1991. – Vol. 156. – P. 5–14.
27. Aeckersberg F., Rainey F. A., Widdel F. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions // Arch. Microbiol. – 1998. – Vol. 170. – P. 361–369.
28. Agrawal A., An D., Cavallaro A., Voordouw G. Souring in low-temperature surface facilities of two high-temperature Argentinian oil fields // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 98. – P. 8017–8029.
29. Al-Ansari M.M. Biodetoxification mercury by using a marine bacterium *Marinomonas* sp. RS3 and its *merA* gene expression under mercury stress // Environ. Res. – 2022. – Vol. 205. – 112452.
30. Almeida M.C., Branco R., Morais P.V. Response to vanadate exposure in *Ochrobactrum tritici* strains // PLoS One. – 2020. – Vol. 15. – e0229359.
31. An D., Brown D., Chatterjee I., Dong X., Ramos-Padron E., Wilson S., Bordenave S., Caffrey S.M., Gieg L.M., Sensen C.W., Voordouw G. Microbial community and potential functional gene diversity involved in anaerobic hydrocarbon degradation and methanogenesis in an oil sands tailings pond // Genome. – 2013. – Vol. 56. – P. 612–618.
32. An B.A., Shen Y., Voordouw G. Control of sulfide production in high salinity Bakken shale oil reservoirs by halophilic bacteria reducing nitrate to nitrite // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – 1164.
33. Antoniou E., Fodelianakis S., Korkakaki E., Kalogerakis N. Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 274–287.

34. Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia* // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 3195–3204.
35. Atlas R.M. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation // Appl. Microbiol. – 1975. – Vol. 30. – P. 396–403.
36. Atlas R.M., Boehm P.D., Calder J.A. Chemical and biological weathering of oil, from the Amoco Cadiz spillage, within the littoral zone // Estuar. Coast. Shelf Sci. – 1981. – Vol. 12. – P. 589–608.
37. Bachmann R.T., Johnson A.C., Edyvean R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: an overview // Int. Biodeterior. Biodegradation. – 2014. – Vol. 86. – P. 225–237.
38. Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R., Nyayanit N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 697–721.
39. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Comput. Biol. – 2012. – Vol. 19. – P. 455–477.
40. Bastin E.S. The presence of sulfate-reducing bacteria in oilfield waters // Science. – 1926. – Vol. 63. – P. 21–24.
41. Bedoya K., Niño J., Acero J., Cabarcas F., Alzate J.F. Assessment of the microbial community and biocide resistance profile in production and injection waters from an Andean oil reservoir in Colombia // Int. Biodeterior. Biodegradation. – 2021. – Vol. 157. – 105137.
42. Bharali P. Gogoi B., Sorhie V., Acharjee S.A., Walling B., Alemtoshi, Vishwakarma V., Shah M.P. Autochthonous psychrophilic hydrocarbonoclastic bacteria and its ecological function in contaminated cold environments // Biodegradation. – 2024. – Vol. 35. – P. 1–46.
43. Bidzhieva S.K., Sokolova D.S., Grouzdev D.S., Kostrikina N.A., Poltarauš A.B., Tourova T.P., Shcherbakova V.A., Troshina O.Y., Nazina T.N. *Sphaerochaeta halotolerans* sp. nov., a novel spherical halotolerant spirochete from a Russian heavy oil reservoir, emended description of the genus *Sphaerochaeta*, reclassification of *Sphaerochaeta coccooides* to a new genus *Parasphaerochaeta* gen. nov. as *Parasphaerochaeta coccooides* comb. nov. and proposal of *Sphaerochaetaceae* fam. nov // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2020. – Vol. 70. – P. 4748–4759.
44. Binish M.B., Shini S., Sinha R.K., Krishnan K.P., Mohan M. Mercuric reductase gene (*merA*) activity in a mercury tolerant sulphate reducing bacterium isolated from the Kongsfjorden, Arctic // Polar Sci. – 2021. – Vol. 30. – 100745.

45. Bødtker G., Lysnes K., Torsvik T., Bjørnstad E.Ø., Sunde E. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 36. – P. 439–450.
46. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 30. – P. 2114–2120.
47. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Y.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69. – P. 6143–6151.
48. Brown L.R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR) // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 13. – P. 316–320.
49. Brown L.R., Vadie A.A., Stephens J.O. Slowing production decline and extending the economic life of an oil field: New MEOR technology // *SPE Reserv. Eval. Eng.* – 2002. – Vol. 5. – P. 33–41.
50. Brunk C.F., Avaniss-Aghajani E., Brunk C.A. A computer analysis of primer and probe hybridization potential with bacterial small-subunit rRNA sequences // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – Vol. 62. – P. 872–879.
51. Cai M., Yu C., Wang R., Si Y., Masakorala K., Yuan H., Yao J., Zhang J. Potential for aerobic and methanogenic oil biodegradation in a water flooded oil field (Dagang oil field) // *Fuel.* – 2015. – Vol. 141. – P. 143–153.
52. Callaghan A.V. Enzymes involved in the anaerobic oxidation of *n*-alkanes: from methane to long-chain paraffins // *Front. Microbiol.* – 2013. – Vol. 4. – 89.
53. Callaghan A.V., Gieg L.M., Kropp K.G., Suflita J.M., Young L.Y. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – P. 4274–4282.
54. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* – 2010. – Vol. 7. – P. 335–336.
55. Chaumeil P., Mussig A.J., Parks D.H., Hugenholtz P. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // *Bioinformatics.* – 2020. – Vol. 36. – P. 1925–1927.

56. Chen C., Shen Y., An D., Voordouw G. Use of acetate, propionate, and butyrate for reduction of nitrate and sulfate and methanogenesis in microcosms and bioreactors simulating an oil reservoir // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – Vol. 83. – e02983-16.
57. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2018. – Vol. 68. – P. 461–466.
58. Clarke K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure // *Aust. J. Ecol.* – 1993. – Vol. 18. – P. 117–143.
59. Collins M.D., Jones D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication // *Microbiol. Rev.* – 1981. – Vol. 45. – P. 316–354.
60. Cravo-Laureau C., Labat C., Jouliau C., Matheron R., Hirschler-Réa A. *Desulfatiferula olefinivorans* gen. nov., sp. nov., a long-chain *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 2699–2702.
61. Cravo-Laureau C., Matheron R., Cayol J.L., Jouliau C., Hirschler-Réa A. *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an *n*-alkane- and *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 54. – P. 77–83.
62. Cravo-Laureau C., Matheron R., Jouliau C., Cayol J.L., Hirschler-Réa A. *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel *n*-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 54. – P. 1639–1642.
63. Da Silva M.L.B., Soares H.M., Furigo A., Schmidell W., Corseuil H.X. Effects of nitrate injection on microbial enhanced oil recovery and oilfield reservoir souring // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 174. – P. 1810–1821.
64. Davey M.E., Wood W.A., Key R., Nakamura K., Stahl D.A. Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: two new genera, representing a new lineage in the bacterial line of descent distantly related to the “*Thermotogales*” // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1993. – Vol. 16. – P. 191–200.
65. Davidova I., Hicks M.S., Fedorak P.M., Suflita J.M. The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 27. – P. 80–86.
66. Davidova I.A., Duncan K.E., Choi O.K., Suflita J.M. *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov., an *n*-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 56. – P. 2737–2742.

67. Davidova I.A., Marks C.R., Suflita J.M. Anaerobic hydrocarbon-degrading *Deltaproteobacteria* // In: Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes (Ed. T.J. McGenity). Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. – Cham, Switzerland: Springer, 2019. – P. 207–243.
68. De Almeida D.G., Rita de Cássia F., Silva J.M.L., Rufino R.D., Santos V.A., Banat I.M., Sarubbo L.A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1718–1731.
69. de Jesus E.B., de Andrade Lima L.R.P. Souring control in oil fields using molybdate injection: A simulation study // J. Pet. Sci. Eng. – 2021. – Vol. 202. – 108539.
70. de la Haba R.R., Arahall D.R., Sánchez-Porro C., Chuvochina M., Wittouck S., Hugenholtz P., Ventosa A. A long-awaited taxogenomic investigation of the family *Halomonadaceae* // Front. Microbiol. – 2023. – Vol. 14. – 1293707.
71. Delmont T.O., Eren E.M. Linking pangenomes and metagenomes: The *Prochlorococcus* metapangenome // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. – e4320.
72. DiCenzo G.C., Debiec K., Krzysztoforski J., Uhrynowski W., Mengoni A., Fagorzi C., Gorecki A., Dziejewicz L., Bajda T., Rzepa G., Drewniak L. Genomic and biotechnological characterization of the heavy-metal resistant, arsenic-oxidizing bacterium *Ensifer* sp. M14 // Genes. – 2018. – Vol. 9. – 379.
73. diCenzo G.C., Muhammed Z., Østerås M., O'Brien S.A., Finan T.M. A key regulator of the glycolytic and gluconeogenic central metabolic pathways in *Sinorhizobium meliloti* // Genetics. – 2017. – Vol. 207. – P. 961–974.
74. Draghi W.O., Del Papa M.F., Barsch A., Albicoro F.J., Lozano M.J., Pühler A., Niehaus K., Lagares A. A metabolomic approach to characterize the acid-tolerance response in *Sinorhizobium meliloti* // Metabolomics. – 2017. – Vol. 13. – 71.
75. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Res. – 2004. – Vol. 32. – P. 1792–1797.
76. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – P. 2460–2461.
77. Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nat. Methods. – 2013. – Vol. 10. – P. 996–998.
78. Ehrenreich P., Behrends A., Harder J., Widdel F., 2000. Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria // Arch. Microbiol. – 2000. – Vol. 173. – P. 58–64.
79. Elumalai P., AlSalhi M.S., Mehariya S., Karthikeyan O.P., Devanesan S., Parthipan P., Rajasekar A. Bacterial community analysis of biofilm on API 5LX carbon steel in an oil reservoir environment // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2021. – Vol. 44. – P. 355–368.



80. Eren A.M., Esen O.C., Quince C., Vineis J.H., Morrison H.G., Sogin M.L., Delmont T.O. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data // PeerJ. – 2015. – Vol. 3. – e1319.
81. Ershov A.P., Babich T.L., Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Semenova E.M., Avtukh A.N., Poltarauš 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. – 2314.
82. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. – 2014. – Vol. 2. – 6.
83. Fardeau M.-L., Magot M., Patel B.K.C., Thomas P., Garcia J.-L., Ollivier B. *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from an oil field water // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. – P. 2141–2149.
84. Fathepure B.Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – 173.
85. Galushko A.S., Kiesele-Lang U., Kappler A. Degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture of mesophilic freshwater bacteria // Polycycl. Aromat. Comp. – 2003. – Vol. 23. – P. 207–218.
86. Galushko A., Minz D., Schink B., Widdel F. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium // Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 1. – P. 415–420.
87. Gao P.K., Li G.Q., Tian H.M., Wang Y.S., Sun H.W., Ma T. Differences in microbial community composition between injection and production water samples of water flooding petroleum reservoirs // Biogeosciences. – 2015. – Vol. 12. – P. 3403–3414.
88. Gao M., D'Haese W., De Rycke R., Wolucka B., Holsters M. Knockout of an azorhizobial dTDP-L-rhamnose synthase affects lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide production and disables symbiosis with *Sesbania rostrata* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – Vol. 14. – P. 857–866.
89. García-Cañas R., Giner-Lamia J., Florencio F.J., López-Maury L. A protease-mediated mechanism regulates the cytochrome *c6*/plastocyanin switch in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // PNAS USA. – 2021. – Vol. 118. – e2017898118.
90. Gardner L.R., Stewart P.S. Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 29. – P. 354–360.

91. Ge Q., Zhu X., Cobine P.A., De La Fuente L. The copper-binding protein CutC is involved in copper homeostasis and affects virulence in the xylem-limited pathogen *Xylella fastidiosa* // *Phytopathology*. – 2022. – Vol. 112. – P. 1620–1629.
92. Geddes B.A., Oresnik I.J. Physiology, genetics, and biochemistry of carbon metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti* // *Can. J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 60. – P. 491–507.
93. Geets J., De Cooman M., Wittebolle L., Heylen K., Vanparys B., De Vos P., Verstraete W., Boon N. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 75. – P. 211–221.
94. Gieg L.M., Jack T.R., Foght J.M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 92. – P. 263–282.
95. Gittel A., Sørensen K.B., Skovhus T.L., Ingvorsen K., Schramm A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 7086–7096.
96. Göker M., Oren A. Valid publication of four additional phylum names // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2023. – Vol. 73. – 006024.
97. Grigoryan A., Lambo A., Lin S., Cornish S.L., Jack T.R., Voordouw G. Souring remediation by field-wide nitrate injection in an Alberta oil field // *J. Can. Pet. Technol.* – 2009. – Vol. 48. – P. 58–61.
98. Grossi V., Cravo-Laureau C., Guyoneaud R., Ranchou-Peyruse A., Hirschler-Rea A. Metabolism of *n*-alkanes and *n*-alkenes by anaerobic bacteria: a summary // *Org. Geochem.* – 2008. – Vol. 39. – P. 1197–1203.
99. Grossi V., Cravo-Laureau C., Méou A., Raphel D., Garzino F., Hirschler-Réa A. Anaerobic 1-alkene metabolism by the alkane- and alkene-degrading sulfate reducer *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803<sup>T</sup> // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 7882–7890.
100. Grouzdev D.S., Rysina M.S., Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Gaisin V.A. Draft genome sequences of ‘*Candidatus Chloroploca asiatica*’ and ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’, candidate representatives of the *Chloroflexales* order: phylogenetic and taxonomic implications // *Stand. Genomic. Sci.* – 2018. – Vol. 13. – 24.
101. Gudiña E.J., Fernandes E.C., Rodrigues A.I., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 59–65.
102. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 29. – P. 1072–1075.

103. Hadia N.J., Hansen T., Tweheyo M.T., Torsæter O. Influence of crude oil components on recovery by high and low salinity waterflooding // *Energy Fuels*. – 2012. – Vol. 26. – P. 4328–4335.
104. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontol. Electron.* – 2001. – Vol. 4. – P. 1–9.
105. Harms G., Zengler K., Rabus R., Aeckersberg F., Minz D., Rosselló-Mora R., Widdel F. Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – P. 999–1004.
106. Hawkins J.P., Ordonez P.A., Oresnik I.J. Characterization of mutations that affect the nonoxidative pentose phosphate pathway in *Sinorhizobium meliloti* // *J. Bacteriol.* – 2018. – Vol. 200. – e00436-17.
107. Head I.M., Gray N.D., Larter S.R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 566–588.
108. Hidaka K., Miyanaga K., Tanji Y. The presence of nitrate- and sulfate-reducing bacteria contributes to ineffectiveness souring control by nitrate injection // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. – 2018. – Vol. 129. – P. 81–88.
109. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation // *Mol. Biol. Evol.* – 2018a. – Vol. 35. – P. 518–522.
110. Hoang D.T., Vinh L.S., Flouri T., Stamatakis A., von Haeseler A., Minh B.Q. MPBoot: fast phylogenetic maximum parsimony tree inference and bootstrap approximation // *BMC Evol. Biol.* – 2018b. – Vol. 18. – 11.
111. Höök M., Bardi U., Feng L., Pang X. Development of oil formation theories and their importance for peak oil // *Mar. Pet. Geol.* – 2010. – Vol. 27. – P. 1995–2004.
112. Hubert C., Voordouw G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 2644–2652.
113. Hungate R.E. A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes // In: *Methods in Microbiology* (Eds. J.L. Norris and D.W. Ribbons). – New York, USA: Academic Press, 1969. – Vol. 3b. – P. 117–132.
114. Hyre A., Casanova-Hampton K., Subashchandrabose S. Copper homeostatic mechanisms and their role in the virulence of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* // *EcoSal Plus*. – 2021. – Vol. 9. – eESP-0014-2020.

115. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Extremotolerant *Rhodococcus* as an important resource for environmental biotechnology // In: Actinomycetes in marine and extreme environments. Unexhausted sources for microbial biotechnology (Ed. I. Kurtböke). – Boca Raton, USA: CRC Press, 2024. – P. 209–246.
116. Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries // Nat. Commun. – 2018. – Vol. 9. – 5114.
117. Jeanthon C., Reysenbach A.-L., L'Haridon S., Gambacorta A., Pace N.R., Glenat P., Prieur D. *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir // Arch. Microbiol. – 1995. – Vol. 164. – P. 91–97.
118. Ji Y., Mao G., Wang Y., Bartlam M. Structural insights into diversity and *n*-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases // Front. Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – 58.
119. Jimenez N., Morris B.E.L., Cai M., Gründger F., Yao J., Richnow H.H., Krüger M. Evidence for *in situ* methanogenic oil degradation in the Dagang oil field // Org. Geochem. – 2012. – Vol. 52. – P. 44–54.
120. Jobelius C., Ruth B., Griebler C., Meckenstock R.U., Hollender J., Reineke A., Frimmel F.H., Zwiener C. Metabolites indicate hot spots of biodegradation and biogeochemical gradients in a high-resolution monitoring well // Environ. Sci. Technol. – 2011. – Vol. 45. – P. 474–481.
121. Jofré E., Lagares A., Mori G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 231. – P. 267–275.
122. Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F.J., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs // Nature. – 2008. – Vol. 451. – P. 176–180.
123. Jurelevicius D., Ramos L., Abreu F., Lins U., de Sousa M.P., dos Santos V.V., dos Santos V.V.C.M., Penna M., Seldin L. Long-term souring treatment using nitrate and biocides in high-temperature oil reservoirs // Fuel. – 2021. – Vol. 288. – 119731.
124. 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. – 1300.
125. Kahrilas G.A., Blotevogel J., Stewart P.S., Borch T. Biocides in hydraulic fracturing fluids: a critical review of their usage, mobility, degradation, and toxicity // Environ. Sci. Technol. – 2015. – Vol. 49. – P. 16–32.

126. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods.* – 2017. – Vol. 14. – P. 587–589.
127. Kates M. Techniques of Lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids // In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Eds. T.S. Work and E. Work). – Amsterdam, Netherlands: North Holland Publishing Co., 1969. – Vol. 3. – 267.
128. Kato T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil-reservoir water and oil sands // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 794–800.
129. Keum Y.S., Seo J.S., Hu Y., Li Q.X. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 71. – P. 935–941.
130. Kniemeyer O., Musat F., Sievert S.M., Knittel K., Wilkes H., Blumenberg M., Michaelis W., Classen A., Bolm C., Joye S.B., Widdel F. Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria // *Nature.* – 2007. – Vol. 449. – P. 898–901.
131. Knisz J., Eckert R., Gieg L.M., Koerdt A., Lee J.S., Silva E.R., Skovhus T.L., An-Stepec B.A., Wade S.A. Microbiologically influenced corrosion – more than just microorganisms // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2023. – Vol. 47. – fuad041.
132. Kögler F., Hartmann F.S., Schulze-Makuch D., Herold A., Alkan H., Dopffel N. Inhibition of microbial souring with molybdate and its application under reservoir conditions // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* – 2021. – Vol. 157. – 105158.
133. Koziava V., Dziuba M., Leão P., Uzun M., Krutkina M., Grouzdev D. Genome-based metabolic reconstruction of a novel uncultivated freshwater magnetotactic coccus “*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*” UR-1, and proposal of a candidate family “*Ca. Magnetaquicoccaceae*” // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – 2290.
134. Kraft B., Strous M., Tegetmeyer H.E. Microbial nitrate respiration – genes, enzymes and environmental distribution // *J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 155. – P. 104–117.
135. Kügler J.H., Roes-Hill M.L., Sylatk C., Hausmann R. Surfactants tailored by the class *Actinobacteria* // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 212–234.
136. Kučera I., Dadák V., Dobrý R. The distribution of redox equivalents in the anaerobic respiratory chain of *Paracoccus denitrificans* // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – Vol. 130. – P. 359–364.
137. Kuzmanović N., Fagorzi C., Mengoni A., Lassalle F., diCenzo G.C. Taxonomy of *Rhizobiaceae* revisited: proposal of a new framework for genus delimitation // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2022. – Vol. 72. – 005243.
138. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods.* – 2012. – Vol. 9. – P. 357–359.

139. Lavania M., Cheema S., Sarma P.M., Mandal A.K., Lal B. Biodegradation of asphalt by *Garciaella petrolearia* TERIG02 for viscosity reduction of heavy oil // Biodegradation. – 2012. – Vol. 23. – P. 15–24.
140. Lazar I., Petrisor I.G., Yen T.F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR) // Pet. Sci. Technol. – 2007. – Vol. 25. – P. 1353–1366.
141. Li W., Wang L.-Y., Duan R.-Y., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z. Microbial community characteristics of petroleum reservoir production water amended with *n*-alkanes and incubated under nitrate-, sulfate-reducing and methanogenic conditions // Int. Biodeterior. Biodegradation. – 2012. – Vol. 69. – P. 87–96.
142. Li Y., Xue H., Sang S., Lin C., Wang X. Phylogenetic analysis of family *Neisseriaceae* based on genome sequences and description of *Populibacter corticis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Neisseriaceae*, isolated from symptomatic bark of *Populus × euramericana* canker // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12. – e0174506.
143. Liang R., Davidova I.A., Marks C.R., Stamps B.W., Harriman B.H., Stevenson B.S., Duncan K.E., Suflita J.M. Metabolic capability of a predominant *Halanaerobium* sp. in hydraulically fractured gas wells and its implication in pipeline corrosion // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – 988.
144. Luo Y.J., Xie B.S., Lv X.L., Cai M., Wang Y.N., Cui H.L., Cai H., Wu X.L. *Marinobacter shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from oil-contaminated saline soil // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2015. – Vol. 107. – P. 1085–1094.
145. Ma Y., Wang L., Shao Z. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – P. 455–465.
146. Magot M. Indigenous microbial communities in oil fields // In: Petroleum microbiology (Eds. B. Ollivier and M. Magot). – Washington, D.C., USA: ASM, 2005. – P. 21–33.
147. Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C. Microbiology of petroleum reservoirs // Antonie van Leeuwenhoek. – 2000. – Vol. 77. – P. 103–116.
148. Maidak B.L., Cole J.R., Lilburn T.G., Parker C.T., Saxman P.R., Stredwick J.M., Garrity G.M., Li B., Olsen G.J., Pramanik S., Schmidt T.M., Tiedje J.M. The RDP (ribosomal database project) continues // Nucleic Acids Res. – 2000. – Vol. 28. – P. 173–174.
149. Mbadinga S.M., Wang L.-Y., Zhou L., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes // Int. Biodeterior. Biodegradation. – 2011. – Vol. 65. – P. 1–13.

150. McInerney M.J., Nagle D.P., Knapp R.M. Microbially enhanced oil recovery: Past, present, and future // In: Petroleum Microbiology (Eds. B. Ollivier and M. Magot). – Washington, D.C., USA: ASM, 2005. – P. 215–238.

151. Mechichi T., Stackebrandt E., Gad'on N., Fuchs G. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov // Arch. Microbiol. – 2002. – Vol. 178. – P. 26–35.

152. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. – 2013. – Vol. 14. – 60.

153. Meier-Kolthoff J.P., Carbasse J.S., Peinado-Olarte R.L., Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes // Nucleic Acids Res. – 2022. – Vol. 50. – P. D801–D807.

154. Metsalu T., Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // Nucleic Acids Res. – 2015. – Vol. 43. – P. W566–W570.

155. Minnikin D.E., O'Donnell A.G., Goodfellow M., Alderson G., Athalye M., Schaal A., Parlett J.H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids // J. Microbiol. Methods. – 1984. – Vol. 2. – P. 233–241.

156. Miroshnichenko M.L., Hippe H., Stackebrandt E., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Jeanthon C., Nazina T.N., Belyaev S.S., Bonch-Osmolovskaya E.A. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high temperature oil reservoir // Extremophiles. – 2001. – Vol. 5. – P. 85–91.

157. Morrow N., Buckley J. Improved oil recovery by low-salinity waterflooding // J. Pet. Technol. – 2011. – Vol. 63. – P. 106–112.

158. Muratova A., Pozdnyakova N., Makarov O., Baboshin M., Baskunov B., Myasoedova N., Golovleva L., Turkovskaya O. Degradation of phenanthrene by the rhizobacterium *Ensifer meliloti* // Biodegradation. – 2014. – Vol. 25. – P. 787–795.

159. Nazina T., Babich T., Kostryukova N., Sokolova D., Abdullin R., Tourova T., Kadnikov V., Mardanov A., Ravin N., Grouzdev D., Poltaraus A., Kalmykov S., Safonov A., Zakharova E., Novikov A., Kato K. Ultramicrobacteria from nitrate- and radionuclide-contaminated groundwater // Sustainability. – 2020a. – Vol. 12. – 1239.

160. Nazina T.N., Bidzhieva S.K., Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Tourova T.P., Parshina S.N., Avtukh A.N., Poltaraus A.B., Talybly A.K. *Soehngenia longivita* sp. nov., a fermenting

bacterium isolated from a petroleum reservoir in Azerbaijan, and emended description of the genus *Soehngenia* // *Microorganisms*. – 2020b. – Vol. 8. – 1967.

161. Nazina T.N., Shestakova N.M., Ivoilov V.S., Kostrukova N.K., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Radiotracer assay of microbial processes in petroleum reservoirs // *Adv. Biotechnol. Microbiol.* – 2017a. – Vol. 2. – 555591.

162. Nazina T.N., Shestakova N.M., Pavlova N.K., Tatarkin Y.V., Ivoilov V.S., Khisametdinov M.R., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Tourova T.P., Poltarau A.B., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Functional and phylogenetic microbial diversity in formation waters of a low-temperature carbonate petroleum reservoir // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. – 2013. – Vol. 81. – P. 71–81.

163. Nazina T.N., Shestakova N.M., Semenova E.M., Korshunova A.V., Kostrukova N.K., Tourova T.P., Min L., Feng Q., Poltarau A.B. Diversity of metabolically active *Bacteria* in water-flooded high-temperature heavy oil reservoir // *Front. Microbiol.* – 2017b. – Vol. 8. – 707.

164. 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*. – 2020c. – Vol. 12. – 15.

165. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoriyan A.A., Ivanova A.E., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 51. – P. 433–446.

166. Nemati M., Jenneman G.E., Voordouw G. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion // *Biotechnol. Prog.* – 2001. – Vol. 17. – P. 852–859.

167. Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* – 2015. – Vol. 32. – P. 268–274.

168. Niu J., Liu Q., Lv J., Peng B. Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials // *J. Pet. Sci. Eng.* – 2020. – Vol. 192. – P. 107350.



169. Okonechnikov K., Conesa A., García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32. – P. 292–294.
170. Oksanen J., Kindt R., Legendre P., O'Hara B., Stevens M.H.H., Oksanen M.J., Suggests M.A.S.S. The vegan package // *Community Ecol. Package*. – 2007. – Vol. 10. – P. 631–637.
171. Ommedal H., Torsvik T. *Desulfotignum toluenicum* sp. nov., a novel toluene-degrading, sulphate-reducing bacterium isolated from an oil-reservoir model column // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57. – P. 2865–2869.
172. Orata F.D., Meier-Kolthoff J.P., Sauvageau D., Stein L.Y. Phylogenomic analysis of the Gammaproteobacterial methanotrophs (Order *Methylococcales*) calls for the reclassification of members at the genus and species levels // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – 3162.
173. Oren A., Garrity G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2021. – Vol. 71. – 005056.
174. Oren A., Göker M. Validation List no. 216. Valid publication of new names and new combinations effectively published outside the IJSEM // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2024a. – Vol. 74. – 006229.
175. Oren A., Göker M. Validation List no. 218. Valid publication of new names and new combinations effectively published outside the IJSEM // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2024b. – Vol. 74. – 006398.
176. Orphan V.J., Goffredi S.K., Delong E.F., Boles J.R. Geochemical influence on diversity and microbial processes in high-temperature oil reservoirs // *Geomicrobiol. J.* – 2003. – Vol. 20. – P. 295–311.
177. Orphan V.J., Taylor L.T., Hafenbradl D., Delong E.F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 700–711.
178. Pereira G. F., Pilz-Junior H. L., Corção G. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – 23027.
179. Pfennig N., Lippert K.D. Über das vitamin B12 – Bedürfnis phototropher Schwefereibakterien // *Arch. Microbiol.* – 1966. – Vol. 55. – P. 245–256.
180. Postgate, J.R. *The Sulfate-Reducing Bacteria* (2nd Edition). – Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984; 208 pp.
181. Pourbabae A.A., Khazaei M., Alikhani H.A., Emami S. Root nodulation of alfalfa by *Ensifer meliloti* in petroleum contaminated soil // *Rhizosphere*. – 2021. – Vol. 17. – 100305.

182. Prajapat G., Jain S., Lal B., Lavania M., Agrawal A. Control of reservoir souring by incomplete nitrate reduction in Indian oil fields // *Bioresour. Technol. Rep.* – 2023. – Vol. 21. – 101302.
183. Prajapat G., Jain S., Rellegadla S., Tailor P., Agrawal A. Synergistic approach to control reservoir souring in the moderately thermophilic oil fields of western India // *Bioresour. Technol. Rep.* – 2021. – Vol. 14. – 100649.
184. Prajapat G., Rellegadla S., Jain S., Agrawal A. Reservoir souring control using benzalkonium chloride and nitrate in bioreactors simulating oil fields of western India // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* – 2018. – Vol. 132. – P. 30–39.
185. Pratama R.A., Babadagli T. A review of the mechanics of heavy-oil recovery by steam injection with chemical additives // *J. Pet. Sci. Eng.* – 2022. – Vol. 208. – 109717.
186. Princy S., Subramanian D., Natarajan J., Prabakaran S.R. Analysis of chromate transporters in bacterial species for Cr(VI) reduction isolated from tannery effluent contaminated site of Dindigul district, Tamil Nadu, India // *Geomicrobiol. J.* – 2021. – Vol. 38. – P. 598–606.
187. Qin Q.-L., Xie B.-B., Zhang X.-Y., Chen X.-L., Zhou B.-C., Zhou J., Oren A., Zhang Y.-Z. A proposed genus boundary for the Prokaryotes based on genomic insights // *J. Bacteriol.* – 2014. – Vol. 196. – P. 2210–2215.
188. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glockner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – P. D590–D596.
189. Quillet L., Besaury L., Popova M., Paissé S., Deloffre J., Ouddane B. Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the Medway Estuary (UK) // *Mar. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 14. – P. 363–381.
190. Rabus R., Nordhaus R., Ludwig W., Widdel F. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59. – P. 1444–1451.
191. Rabus R., Widdel F., 1996. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – Vol. 62. – P. 1238–1241.
192. Ravot G., Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C., Ageron E., Grimont P.A.D., Thomas P., Garcia J.-L. *Haloanaerobium congolense* sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium from an African oil field // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – Vol. 147. – P. 81–88.

193. Rees G.N., Patel B.K., Grassia G.S., Sheehy A.J. *Anaerobaculum thermoterrenum* gen. nov., sp. nov., a novel, thermophilic bacterium which ferments citrate // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 47. – P. 150–154.
194. Rellegadla S., Prajapat G., Agrawal A. Polymers for enhanced oil recovery: fundamentals and selection criteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 101. – P. 4387–4402.
195. Ren H.-Y., Zhang X.-J., Song Z.-Y., Rupert W., Gao G.-J., Guo S.-X., Zhao L.-P. Comparison of microbial community compositions of injection and production well samples in a long-term water-flooded petroleum reservoir // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – e23258.
196. Rivers D.M., Kim D.D., Oresnik I.J. Inability to catabolize rhamnose by *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 affects competition for nodule occupancy // *Microorganisms.* – 2022. – Vol. 10. – 732.
197. Romero-Hernández L., Velez P., Betanzo-Gutiérrez I., Camacho-López M.D., Vázquez-Duhalt R., Riquelme M. Extra-heavy crude oil degradation by *Alternaria* sp. isolated from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico // *Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – 6090.
198. Rueter P., Rabus R., Wilkest H., Aeckersberg F., Rainey F.A., Jannasch H.W., Widdel F. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria // *Nature.* – 1994. – Vol. 372. – P. 455–458.
199. Safonov A.V., Babich T.L., Sokolova D.S., Grouzdev D.S., Tourova T.P., Poltarau A.B., Zakharova E.V., Merkel A.Y., Novikov A.P., Nazina T.N. Microbial community and *in situ* bioremediation of groundwater by nitrate removal in the zone of a radioactive waste surface repository // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – 1985.
200. Salam L.B. Metagenomic insights into the microbial community structure and resistomes of a tropical agricultural soil persistently inundated with pesticide and animal manure use // *Folia Microbiol.* – 2022. – Vol. 67. – P. 707–719.
201. Saravanan A., Kumar P.S., Vardhan K.H., Jeevanantham S., Karishma S.B., Yaashikaa P.R., Vellaichamy P. A review on systematic approach for microbial enhanced oil recovery technologies: Opportunities and challenges // *J. Clean. Prod.* – 2020. – Vol. 258. – 120777.
202. Schmid J., Sieber V., Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – 496.
203. Semenova E.M., Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Tourova T.P., Poltarau A.B., Potekhina N.V., Shishina P.N., Bolshakova M.A., Avtukh A.N., Ianutsevich E.A., Tereshina V.M., Nazina T.N. Physiological and genomic characterization of *Actinotalea subterranea* sp. nov. from oil-degrading methanogenic enrichment and reclassification of the family *Actinotaleaceae* // *Microorganisms.* – 2022. – Vol. 10. – 378.

204. Semenova E.M., Sokolova D.S., Grouzdev D.S., Poltaraus A.B., Vinokurova N.G., Tourova T.P., Nazina T.N. *Geobacillus proteiniphilus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a high-temperature heavy oil reservoir in China // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69. – P. 3001–3008.
205. Senthilmurugan B., Radhakrishnan J.S., Poulsen M., Arana V.H., Al-Qahtani M., Jamsheer A.F. Microbially induced corrosion in oilfield: microbial quantification and optimization of biocide application // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 94. – P. 2640–2650.
206. Shavandi M., Mohebbali G., Haddadi A., Shakarami H., Nuhi A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6 // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 2011. – Vol. 82. – P. 477–482.
207. Sherpa M.T., Najjar I.N., Das S., Thakur N. Distribution of antibiotic and metal resistance genes in two glaciers of North Sikkim, India // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2020. – Vol. 203. – 111037.
208. Shi X., Oliveira D.A., Holsten L., Steinhauer K., de Rezende J.R. Long-term biocide efficacy and its effect on a souring microbial community // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2021. – Vol. 87. – e00842-21.
209. Siddique T., Penner T., Semple K., Foght J.M. Anaerobic biodegradation of longer-chain *n*-alkanes coupled to methane production in oil sands tailings // *Environ. Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 45. – P. 5892–5899.
210. Silva R.D.C.F., Almeida D.G., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 12523–12542.
211. 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. – 1818.
212. Sun S., Zhang Z., Luo Y., Zhong W., Xiao M., Yi W., Yub L., Fu P. Exopolysaccharide production by a genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – P. 6153–6158.
213. Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – e105592.
214. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // *Mol. Biol. Evol.* – 2021. – Vol. 38. – P. 3022–3027.

215. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – P. 6614–6624.
216. Torres M.J., Rubia M.I., Bedmar E.J., Delgado M.J. Denitrification in *Sinorhizobium meliloti* // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – Vol. 39. – P. 1886–1889.
217. Torres M.J., Rubia M.I., Coba de la Peña T., Pueyo J.J., Bedmar E.J., Delgado M.J. Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti* // *BMC Microbiol.* – 2014. – Vol. 14. – 142.
218. Toulouse C., Metesch K., Pfannstiel J., Steuber J. Metabolic reprogramming of *Vibrio cholerae* impaired in respiratory NADH oxidation is accompanied by increased copper sensitivity // *J. Bacteriol.* – 2018. – Vol. 200. – e00761-17.
219. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae*, I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1964. – Vol. 30. – P. 225–238.
220. Turkovskaya O., Muratova A. Plant–bacterial degradation of polyaromatic hydrocarbons in the rhizosphere // *Trends Biotechnol.* – 2019. – Vol. 37. – P. 926–930.
221. van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 74. – P. 13–21.
222. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr. A.* – 1975. – Vol. 114. – 129–141.
223. Vigneron A., Alsop E.B., Lomans B.P., Kyrpidis N.C., Head I.M., Tsesmetzis N. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle // *ISME J.* – 2017. – Vol. 11. – P. 2141–2154.
224. Voordouw G., Grigoryan A.A., Lambo A., Lin S., Park H.S., Jack T.R., Coombe D., Clay B., Zhang F., Ertmoed R., Miner K., Arensdorf J.J. Sulfide remediation by pulsed injection of nitrate into a low temperature Canadian heavy oil reservoir // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 43. – P. 9512–9518.
225. Voordouw G., Voordouw J.K., Jack T.R., Foght J., Fedorak P.M., Westlake D.W. Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol. 58. – P. 3542–3552.
226. Wang B., Deng S., Su S., Sun S., Chen C., Xu H., Ma H., Banat I.M., She Y., Zhang F. Microbial characteristics and potential mechanisms of souring control for a hypersaline oil reservoir // *Pet. Sci. Technol.* – 2023. – 2241508.
227. Wang H., Cheng H., Wang F., Wei D., Wang X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells // *J. Microbiol. Methods.* – 2010. – Vol. 82. – P. 330–333.

228. Wang Y.C., Wang F., Hou B.C., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X., Li Y., Zhang Y.B. Proposal of *Ensifer psoraleae* sp. nov., *Ensifer sesbaniae* sp. nov., *Ensifer morelense* comb. nov. and *Ensifer americanum* comb. nov. // Syst. Appl. Microbiol. – 2013. – Vol. 36. – P. 467–473.
229. Wang Y.N., Cai H., Chi C.Q., Lu A.H., Lin X.G., Jiang Z.F., Wu X. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57. – P. 1222–1226.
230. Wang Y.N. Chi C.Q., Cai M., Lou Z.Y., Tang Y.Q., Zhi X.Y., Li W.-J., Wu X.-L., Du X. *Amycolobicoccus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – Vol. 60. – P. 638–643.
231. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173. – P. 697–703.
232. Widdel F., Musat F., Knittel K., Galushko A. Anaerobic degradation of hydrocarbons with sulfate as electron acceptor // In: Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems (Eds. L.L. Barton and W.A. Hamilton). Chapter 9. – Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007. – P. 265–304.
233. Widdel F., Pfennig N. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids // Arch. Microbiol. – 1981. – Vol. 129. – P. 395–400.
234. Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. Formation of methane by bacterial extracts // J. Biol. Chem. – 1963. – Vol. 238. – P. 2882–2888.
235. Wu B., Xiu J., Yu L., Huang L., Yi L., Ma Y. Research advances of microbial enhanced oil recovery // Heliyon. – 2022. – Vol. 8. – e11424.
236. Yang N., Ding R., Liu J. Synthesizing glycine betaine via choline oxidation pathway as an osmoprotectant strategy in *Haloferacales* // Gene. – 2022. – Vol. 847. – 146886.
237. Yang S., Deng W., Liu S., Yu X., Mustafa G.R., Chen S., He L., Ao X., Yang Y., Zhou K., Li B., Han X., Xu X., Zou L. Presence of heavy metal resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates and analysis of resistance gene structure in *E. coli* E308 // J. Glob. Antimicrob. Resist. – 2020. – Vol. 21. – P. 420–426.
238. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H. Chun J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2017. – Vol. 67. – P. 1613–1617.
239. Youssef N., Elshahed M.S., McInerney M.J. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities // Adv. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 66. – P. 141–251.
240. Yurgel S.N., Qu Y., Rice J.T., Ajeethan N., Zink E.M., Brown J.M., Purvine S., Lipton M.S., Kahn M.L. Specialization in a nitrogen-fixing symbiosis: proteome differences between

*Sinorhizobium medicae* bacteria and bacteroids // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2021. – Vol. 34. – P. 1409–1422.

241. Zedelius J., Rabus R., Grundmann O., Werner I., Brodkorb D., Schreiber F., Ehrenreich P., Behrends A., Wilkes H., Kube M., Reinhardt R., Widdel F. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation // Environ. Microbiol. Rep. – 2011. – Vol. 3. – P. 125–135.

242. Zhan H.J., Leigh J.A. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti* // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172. – P. 5254–5259.

243. Zivkovic M., Miljkovic M., Ruas-Madiedo P., Strahinic I., Tolinacki M., Golic N., Kojic M. Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. – Vol. 81. – P. 1387–1396.