

МҰНАЙ ПЛАСТ МИКРООРГАНИЗМДЕРІН 16S rRNA БОЙЫНША ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Карабалаева Д.Э*, Әбітай Ә.Н, Батаева Д.С, Садыкова Д. А.

Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті,
99, Айтеке би, Алматы, 050000, Қазақстан
*dina.20.1996@mail.ru

ТҮЙІН

Осы күнгі болжамдар бойынша мұнайдың әлемдік қорлары жақын 50 жыл ішінде азаюы мүмкін. Қазақстан мұнай ресурстары бойынша әлемде алдыңғы

мұнайдың жартысын ғана өндіруге болады. Осыған байланысты, үшіншілік мұнай өндірісін арттыру жолдары мен құралдарын іздеуге, әсіресе, микробиологиялық әдістерді тұрақты түрде қолдануға қызушылықтың артуы маңызды болып табылады.

Мұнай энергетикалық және химиялық шикізаттардың маңызды көзі болып табылады. Оның қорлары шектеулі және орны толмайды. Қолданыстағы әдістер мұнай кен орындарын игеруде геологиялық мұнай қорларын 40–60%-ға дейін шығаруға мүмкіндік береді. Өңделген кен орындарында мұнай шығаруды жоғарылататын аса тиімді әдістерді құру өзекті міндеттердің бірі болып табылады.

Мұнай шығаруды арттыруда қолданылатын микробиологиялық әдістер жоғары тиімділігімен және қоршаған ортаға қауіпсіздігімен, өзінің кіші капитал сыйымдылығымен назар аудартады. Биотехнологияда қосымша мұнайдың ығыстырылуы белгілі бір дәрежеде жүреді, осы механизмдер, физикалық және химиялық әдістерді де қамтамасыз етеді, бірақ микроорганизмдер метаболиттері тікелей пласт саңылауларында түзілетіндіктен, олардың әсер ету тиімділігі жоғары болып келеді. Осы әдістерді мұнай пластарындағы микробиологиялық және физико-химиялық жағдайды ескерместен игеру мүмкін емес.

Түйінді сөздер: мұнай пласт, жасуша, дақыл, аборигенді микроорганизмдер, аэробты және анаэробты микроорганизмдер.

КІРІСПЕ

Соңғы жылдары жер асты мекендерінің микробиологиясына көп көңіл бөлінуде. Тереңде орналасқан сулы және мұнайлы алқаптардың беттік ерітінділерін бұрғылау немесе өндірістік мақсаттағы ерітінділерді айдау кезінде түсетін микроорганизмдермен қатар, аборигенді микрофлораның бар екендігі дәлелденді [1].

Өндіруші ұңғымаларға мұнайдың қысымның өзгеруімен пласт — коллектор арқылы түсетіні белгілі. Қозғалыс пластағы қысым ұңғыдағы қысымнан жоғары болған жағдайда іске асады. Мұнай кен орындарын алғаш рет зерттеу стадиясында мұнайдың ұңғы аузына келуіне пласттық қысым әдеттегідей жеткілікті болады. Нәтижесінде пласттық қысым уақыт өте келе азаяды, сол себепті қысымды қалыпта ұстап тұру үшін арнайы шаралар жүргізіледі (суды және газды айдау, т.б.) [2].

Пласттық энергияны толтыратын заттың энергиясына байланысты мұнай өндіруші ұңғыға келіп түседі, өндіру тәсілдері 3 классқа жіктеледі:

- Біріншілік әдістер (Primary Recovery)
- Екіншілік әдістер (Secondary Recovery)
- Үшіншілік әдістер (Tertiary Recovery)

Негізінен, кен орының игерілу жүйесі дәйекті түрде өзгереді (егер біз дәстүрлі жеңіл мұнай кен орындары туралы айтатын болсақ): Біріншілік әдістердің I сатысындағы өңдеу Екіншілік әдістердің II және III сатысына және Үшіншілік әдістердің III

және IV сатасының кен орындарының игерілуіне ауысады.

Дәстүрлі емес кен орындары (ауыр, аса ауыр, тұтқырлығы жоғары, қатпарлы) дәстүрлі емес тәсілдерді талап етеді. Осындай кен орындарын игеруде бірден Үшіншілік әдістерден бастап, көбінесе жаңа бірегей әдістерді ойлап табады [3].

Мұнай пластарының микроорганизмдері үлкен биотехнологиялық потенциалға ие. Ол микроорганизмдер газдан басқа да мұнай ығыстырушы метаболиттерді синтездейді, мысалы беттік белсенді заттар (ББЗ), экзо полисахаридтер, еріткіштер, қышқылдар, осы қосылыстардың пласттық жүйеде пайда болуы мұнайдың аэробты-анаэробты деграциясына байланысты болады [4].

Шикі мұнай құрамы бойынша әртүрлі, бірақ сапалы көмірсутектер мен оттегі, күкірт, азот пен микроэлементтерден құралған гетероциклді байланыстардан тұрады. Мұнай газдарының құрамындағы көмірсутектер метан қатарына, CO₂, N₂ басымдылық көрсетеді; H₂ сирек кездеседі; пластта күкірті бар суларда H₂S болады. Молекулалы және аммонийлі азот фосфордың мөлшері төмен болғанда және сол экожүйедегі биогенді процесстер шектеген жағдайда микрофлораның азоттық қажеттілігін қанағаттандыру үшін жеткілікті мөлшерде болады [5].

Әдетте, мұнай пластарының құрамында оттегі болмайды, осыған сәйкес мұнайдың органикалық қосылыстарын деструкциялауының анаэробты процесстеріне көп көңіл бөлінеді [6]. Пластағы электрон

акцепторлары ретінде көмірқышқылы, сульфат және күкірттің басқа да қосылыстары, темірдің гидрооркилы қызмет атқаруы мүмкін. Нитрат және азоттың басқа да оксидтері пластты суларда кездеспейді [7].

Мұнай пласттарын дайындау немесе әзірлеу ба-рысында, суландыруды пайдаланғанда, су алмасу күшейеді, айдалатын сумен бірге еріген оттегі түседі және мұнай деструкциясының микробиологиялық процесстері активтелінеді [8].

Мұнайлы көкжиек температурасы микроорга-низмдер қауымдастығының температурға төзімділік шектерін анықтайды. Айдау ұңғымасының кенжар аймақтарында айдаушы судың өзіне тән температу-ралық режимі орнатылады [9].

Тәжірибені бастамас бұрын пласт суларында жүр-гізілген зерттеу нәтижесі бойынша анықталды:

-Тәжірибе жүргізу аймақтарындағы пласт су-ларының микробиологиялық талдаулар микроор-ганизмдер қауымдастығының құрамына-көмір-сутектотықтырушы, ашытқы, сульфаттүзуші және метантотықтырушы бактериялар кіретіндігін көр-сетті;

-Мелассаның ашу процесі кезінде ашытқы бактериялары мен сульфаттүзуші бактериялар-дың өзара тығыз байланыстары анықталды; Тәжір-бие-сынақ аймақтарындағы пласт суларына кезде-сетін *Clostridium* туысының ашытқы бактериялары CO_2 түзу арқылы мелассаны бұзуда жоғары мета-болиттік белсенділік көрсетіп, кластридияның ең күшті дақылдарымен салыстырылып, мұнай шыға-руды жоғарлатуда мелассалық биотехнологияларда қолданылды.

Пласт суларында анаэробты және аэробты ми-кроорганизмдер топтарының жеке саны айдалатын судағы микроорганизмдер санынан айтарлықтай төмен. Бұл жағдайды микрооргаизмдердің көпшілігі пласт жағдайларына төзімді емес болғандықтан — біршама бөлігі барынша қатаң жағдайларда тіршілік-терін жояды. Пласт сұйықтықтарында 200 г/л тұз-дылықта метантүзуші бактериялар тіршіліктерін жалғастыруға қабілетті, бірақ олардың көпшілігі басқа зерттелінген микроорагнизмдер сияқты қатты тұшыланған сұйықтықтарда да кездескен [10].

Мұнай пласттарының анаэробты микроорага-низмдері. Соңғы жылдары мұнай резервуарларының микробиологиясына көп көңіл бөлінуде. Терең сулы және мұнайлы көкжиектерде микроорагнизмдер қа-тырымен бірге су еріткіштерінің жұмысшы агент-терімен және сумен суландыруда немесе беттік еріткіштермен бұрғылауда түсетін абorigенді ми-крофлоралар кездесетіндігі дәлелденді.

Аэробты микроорганизмдер пласттарда 20–70°C температурралық аралықта, рН 6,0–8,4 болғанда тір-шілік еттеді. Олардың субстраттары-ЕПА, глюкоза, сахароза, ашытқы экстракты, сұйық көмірсутектер, мұнай, метан болып келеді. Аэробты микрофлоралар метанды тотықтыруға мамандандырылған метанто-тықтырушы, тағы да маманданбаған сапротрофты, көмірсутек және мұнайтотықтырушы организмдерді

біріктіреді. Аэробтылар мұнай пласттарының құмды коллекторларында аса көп болады. 16S рРНҚ нукле-отидтер тізбегі негізінде талдау бойынша мынадай бактериялар: *Rhodococcus ruber*, *Arthrobacter oxydans*, *Kosuria rosea*, *Dietzia mans*, *Gordoma rubroperincta*, *Cellulomonas cellulans*, *Clavibacter michiganensis*. *Bacillus subtilis*, *B.cereus*, *B. hcheniformis*, *Brevibacdlus parahrevis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetohacter calcoaceticus* иден-тификацияланған [11].

Микрооргаизмдерге тән тұрақтылығы жоғары, эмульгирлеу және қышқыл түзу қабілеті бар *Rhodococcus sp.* және *Bacillus sp.* Дақылдары пласт-тың мұнай беруін жоғарлату мақсатында биопрепа-рат шығарудың негізгі объектілері ретінде пайдала-нылады.

Ашытқы бактериялар. Мұнай пласттарында анаэ-робты жағдай болғанда ең кең таралған микроорга-низм топтары метабиализм типті анаэробты орга-нотрофтылар болды. Олар температурасы 20–80°C дейін және рН мәні 6,0–8,6 көкжиектерде табылған болатын. Субстрат ретінде — глюкоза, сахароза, крах-мал, бензоат пайдаланады. H_2+CO_2 , спирттер, ұшқыш қышқылдардың пайда болуымен ашу процесі жүр-ген. Ашытқы микрофлораларына мезофильді бак-териялар туыстары *Bacteroides* және *Clostridium* (*C.butyrlicum*, *C.acetobutyricum*, *C.pasteurianum*, *C.tyrobutyricum*), қатаң термофильді бактериялар туыстары *Thermoanaerobacter*, *Thermotoga* және *Thermosipho* және гипертермофильді археялар туы-стары *Thermococcus* ұсынылды [12].

Күкірт пептидтерде гипертермофильді архе-ялардың *Thermococcus sihiricus nov.sp* өсуін сти-мульдейді. Бұл организм және *Thermotoga* және *Thermoanaerobacter* туыстарының бактериялары моле-кулярлы көмірсутек пен пептонға электрон доноры ретінде темірді (Fe^{3+} -) диссимиляциянды қалпына келтірген. Осылайша, ашуды тежейтін молекулалық көмірсутекті жою үшін қолжетімді биорганикалық қолдана отырып, ашытқы бактериялары литоавто-трофты және органогетеротрофты өсуге қабілетті болған [13].

Сульфаттотықтырушы бактериялар. Бұл бакте-риялар рН мәні 6,0–8,6, 18–70°C температурада кар-бонатты және құмды мұнай коллекторларында та-былған болатын. Олардың пайдаланушы субстраттар қатарын — $H_2 + CO_2$, C_2 — C_{16} май қышқылдары, этанол, метанол, лактат, глюкоза, пептон, бензоат, фе-нол, гексадекан, мелааса құраған. Бөліп алынған бак-териялар белгілі *Desulfovibno desulfuricans*, *Dv. vulgaris*, *Desulfubacler postgatei*, *Daultotomaculum nigrificans*, *Thermodesulfo bacterium mobile түрлермен, жаңа орга-низмдермен de: Desulfomicrobium apsheronum gen. nov., sp. nov, Dmb. baculatum comb, nov, Desulfotomaculum kuznetsovii sp. nov., Dtm. Nigrificans suhsp salinus* көр-сетілді [14].

Ашытқы саңырауқұлақтар. Мұнай пласттарының аса маңызды микроорганизмдерінің қатарына тер-мофильді ашытқы саңырауқұлақтар жатады.

Мұнай пласт кен орындарындағы осы ашытқы

саңырауқұлақтарынан бөлініп алынған штаммдар тіршіліктерін жалғастыруға бейім болып келеді. Көп жылдық зерттеу қорытындылары бойынша, ғалымдардың зерттеулерімен мұнай кен орындарынан термофильді бактериялар *Thermotoga* тобына жатаын, *T. Subterranean*, *T.elfii*, *T.hypogea* түрлері бөлініп алынған [14].

Көмірсутек тотықтырушы бактерияларды табиғаттағы рөліне және олардың арнайы зерттеу объектісі болуына байланысты маңызды төрт топқа бөлуге болады. Сондықтан әрбір топтың жекелей сипаттамаларын толығымен қарастыру өте маңызды.

Pseudomonas туысы. *Pseudomonas* туысы кең көлемді, оның түрлері барлық жерлерде ауада, топырақта, тұщы және тұзды суларда орналасқан. 200 жуық түрлері белгілі, жіпшелері арқылы қозғалады. Олардың кейбір түрлері жасылдау, суда еритін пигмент бөліп шығарады. Бұлардың қатарына белгілі көмірсутек тотықтырушы микроорганизмдердің төрт түрі жатады. Пигменттің түзілуі негізінен теңіздің бактерияларына тән емес. *Pseudomonas* түрлерінің көпшілігі лактозаның емес, глюкозаның ашуын жүзеге асырады. Олар негізінен нитратты нитритке дейін, аммиакты немесе азотты тотықтыруға қабілетті. Жоғарыда аталып кеткен бактериялардың төрт түрінің арасында айырмашылық, тотықтырушы көмірсутектер, соның ішінде тек *Pseudomonas aeruginosa* 37° C температурада дамуға қабілетті болған жағдайда, сонда оптималды температура басқа түрлер үшін 20–30° C аралығында болғанда дамуға қабілетті болып келеді. Барлық төрт түрдің ішінде тек *Pseudomonas oleovorans* *Pseudomonas fluorescens* желатинді сұйылтпайды. *Pseudomonas fluorescens* қарағанда *Ps.boreopolis* шамалы ірі, және де бірден беске дейін қарапайым жіпшелері, ал негізі ең соңғыларында біреуден болады. Бактериялар таяқша тәрізді, бірден немесе жұптасып, немесе кейде қысқа тізбекшелі, орташа мөлшері 0,5мн ден 2мм дейін болады. Колониялар морфологиясы әртүрлі болуы мүмкін[15].

ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

Зерттеу материалдары ретінде «Құлсары» мұнай пласт суы алынды. Осы жұмыста ет-пептонды агар, *Pseudomonas Isolation Agar*, *Endo Agar* қоректік орталары қолданылды.

Кох әдісі. Қатты қоректік ортаға егумен микроорганизмдердің клетка санын анықтау. Осы әдіспен микроорганизмдердің санының анықталуы төрт этаптан тұрады: бастапқы сұйылту, сұйылтуды дайындау, Петри табақшаларындағы қатты қоректік орталарға егу жүргізу және өскен коллонияларды санау.

Микроорганизмдердің таза дақылдарын бөліп алу әдістері. Таза микроорганизм дақылдарының табиғи жағдайларда тіршілік етуі өте сирек кездеседі. Көпшілік бактериялардың таза дақылдарын бөліп алу үшін 2–3 тәулік жұмсалынады. Таза дақылдарды бөліп алу үш кезеңнен тұрады: жинақтаушы дақылдың алынуы, таза дақыл бөліп алу, бөлініп алынған

дақылдың тазалығын тексеру.

Бактериялардың морфология-физиологиялық қасиеттерін зерттеу әдістері. Зерттеудің нысаны болып табылатын «Құлсары» мұнай кен орнының мұнай пласт суының гетеротрофты бактерияларын идентификациялау зертханалық жағдайда жиі қолданылатын негізгі микробиологиялық әдістер көмегімен дақылдық-морфологиялық, физиологиялық-биохимиялық қасиеттері негізінде жүзеге асады.

Микроорганизмдердің протеолитикалық (протеазалық) белсенділігін зерттеу. Протеолитикалық ферменттер белоктарды поли- және олигопептидтерге дейін ыдырауын катализдейді. Протеазаны бациллалардың, актиномицеттер, мицелиалды саңырауқұлақтар және т.б. микроорганизмдердің әр түрлі өкілдері бөледі. Клетка сыртылық протеазалардың белсенділігін субстрат ретінде желатин, казеин және т.б. белоктар қолдана отырып анықтайды.

Желатиннің ыдырауы. Микроорганизмдерді ет-пептонды желатин (ЕПЖ) ортасына егеді. Ол үшін алдымен ортаны дайындап алады. 100 мл ет-пептонды сорпағы (ЕПС) 10–15 г желатин қосып, 20–30 минутқа ісінгенше қалдырады. Содан кейін су моншасында желатин толығымен ерігенше қайнатады және дайын болған ЕПЖ ортасын 8–10 мл пробиркаларға құяды. 0,5 атм. 15–20 мин залалсыздандырады. Сосын микроорганизмдерді микробиологиялық инемен егеді. Өсіру уақыты 7–10 тәулік.

16S rRNA бойынша идентификация. Идентификациясы геннің 16S rRNA фрагментінің тікелей нуклеотидтер тізбегін анықтау әдісімен жүзеге асырылды.

Нуклеотидтер қатарын анықтау. ПТР өнімдерін байланыспайтын праймерлерден тазалау, ферментативті әдіспен, Exonuclease I (Fermentas) және сілтілі фосфатазаны (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) қолдана отырып жүргізілді.

Секвенирлену реакциясы BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) қолдану арқылы, өндірушінің нұсқауына сай, фрагменттердің кезекті бөлінуі автоматты генетикалық анализаторда 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) жүргізілген.

ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

Түрлі микробиологиялық анализ қорытындылары көрсеткендей, Батыс мұнай кен орнының мұнай пласт суларында аэробты микроорганизмдер, анаэробты микроорганизмдерге қарағанда біршама көп кездеседі.

Зерттеу жұмысының келесі кезеңінде «Құлсары» мұнай кен орнының мұнай пласт су үлгілеріне микробиологиялық сандық сипаттама қарастырылды.

«Құлсары» мұнай кен орнының мұнай пласт су үлгілерінің аэробты және анаэробты микроорганизмдердің сандық көрсеткіштері 1-ші кестеде көрсетілген.

1 кесте. «Құлсары» мұнай пласт суының жалпы микроорганизмдер саны

№	Үлгі	Жалпы микроорганизм санының көрсеткіші, КТБ/мл		Пласт тереңдігі, м
		Аэробты	Анаэробты	
1	Құлсары	24,0x10 ⁶ ±1,4x10 ⁶	0,7x10 ² ± 0,03x10 ²	280

Зерттеу барысында «Құлсары» мұнай пласт суының аэробты микроорганизмдерінің жалпы микроорганизм саны (ЖМС) — 24,0x10⁶ КТБ/мл екендігі анықталды.

1 кестеде көрсетілгендей, «Құлсары» мұнай пласт суында анаэробты микроорганизмдер сәйкесінше — 0,7x10² КТБ/мл тең сандық көрсеткіш көрсетті.

Мұнай пласт суының микроорганизмдерінің морфологиялық қасиеттері. Жұмыс барысында

2 кесте. «Құлсары» мұнай пласт суларының микрофлорасының макроморфологиялық сипаттамасы

№	Қоректік орталар	Дақылдардың атауы	Колония сипаттамасы
1	ЕПА	ТМ-4	Дөңгелек, сары түсті, беті тегіс, шеті тегіс, жылтыр, диаметр 3-4мм
2	ЕПА анаэробты	TF-2	Дөңгелек, сарғыш түсті, беті тегіс, шеті иректелген, жылтыр
3	Эндо	JAS-2	Дөңгелек, қызғыш түсті, беті тегіс, шеті тегіс, жылтыр
4	Bacillus cereus agar base	GDS-1	Дөңгелек, қара – жасыл түсті, шеті иректелген, беті тегіс, жылтыр, диаметр 3-4мм
5	Bacillus cereus agar base	GFC-1	Дөңгелек, жасыл түсті, беті дөңес, тығыз, шеті иректелген, құрғақ

Жұмыстың келесі сатысында 5 аборигенді микроорганизмдер дақылдарының физиологиялық-дақылдық қасиеттері зерттелінді: қозғалғыштығы, споратүзушілігі, грам бояуы (дәстүрлі), капсула түзу қабілеттілігі, протеолитикалық белсенділік және

«Құлсары» мұнай пласт суынан бөлініп алынған 5 таза микроорганизм дақылдары қолданылды.

«Құлсары» мұнай кенорнының бөлініп алынған 5 микроорганизм дақылдарына мынадай атаулар берілді: TF-2, ТМ-4, GDS-1, JAS-2, GFC-1. «Құлсары» мұнай пласт суынан бөлініп алынған 5 микроорганизм дақылдарының макроморфологиялық сипаттамасы 2 кестеде көрсетілді.

жоғары температурада (46⁰С) өсу қабілетті.

«Құлсары» мұнай пласт суларының аборигенді микроорганизмдердің физиологиялық-дақылдық қасиеттерінің зерттелуі 3 кестеде көрсетілген.

3 кесте. Аборигенді микроорганизмдердің физиология–биохимиялық қасиеттері

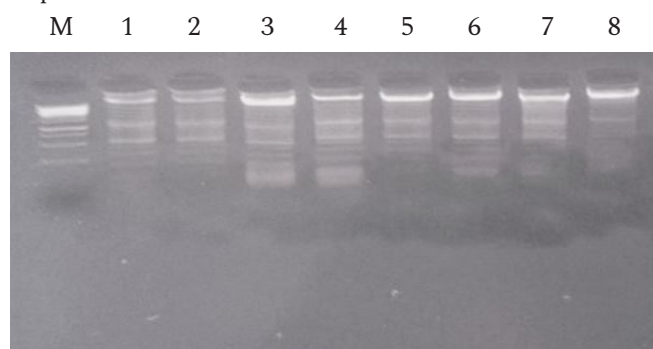
№	Дақыл атаулары	Қозғалғыштығы	Споратүзу қабілеттілігі	Капсула түзу қабілеттілігі	Грамм бояу	Протеолитикалық белсенділік	Температурада 46 ⁰ С өсуі
1	ТМ-4	+	-	-	+	+	++
2	TF-2	+	+	+	+	+	+
3	JAS-2	+	-	+	-	-	++
4	GDS-1	+	+	+	+	++	++
5	GFC-1	+	+	+	+	+++	++

Ескерту: «+» - қасиет анықталған; «-» - қасиет анықталмаған.

Өсу қабілеті: +++ - қарқынды, ++ - орташа, + - әлсіз, - - өспеген

Кестеде көрініп тұрғандай, 2 дақыл — протеолитикалық белсенді, 4 дақыл — капсула түзгіш, 3 дақыл — грам+, 5 дақыл — қозғалғыш, 3 дақыл — споратүзгіш болып келеді.

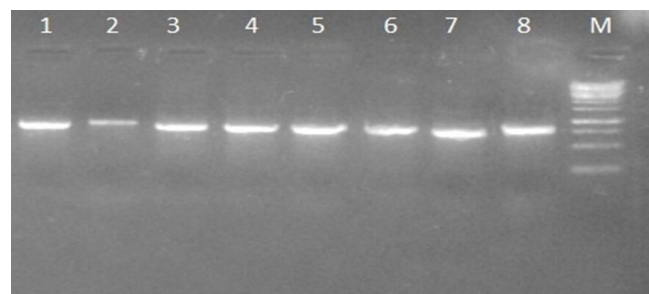
Мұнай пласт суының эмульгирлеуші және қышқыл түзуші микроорганизмдерінің 16S rRNA бойынша идентификациясы. Пласт суынан іріктеп алынған 5 микроорганизм штамдарының идентификациясы геннің 16S rRNA фрагментінің тікелей нуклеотидтер тізбегін анықтау әдісімен жүзеге асырылды. Барлық үлгілерде ДНК бөліп алуда концентрациясы жоғары, мәні 260/280 ал түрленуі 1.34–3.15 аралықта жүрді. Одан ары TE (1x) буффер қолдана отырып, үлгілер 100ng/ul дейін сұйылтылуы 1 суретте көрсетілген.



1 сурет. Микроорганизмдердің ДНК геномының 1% агарлы геледегі электрофорез препараты

Геннің 16S rDNA фрагментінің амплификациясы. ПТР реакциясы универсалды праймерлермен 8f 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3 және 806R-5' GGACTACCAGGGTATCTAAT жалпы 30 мкл көлемде орындалды. ПТР қоспасы 150 нг. ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM әрбір дНТФ, 1-х ПТР буффер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, әрбір праймер 10 пмоль құрады. ПТР амплификациялау программасы ұзақ денатурацияны 95°C 5 минут көлемінде, 34 циклда: 95°C — 15 секунд, 52°C- 30 се-

кунд, 72°C — 30 секунд қосқан; қорытынды элонгация 7 минутта 72°C та, ПТР программасы GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) амплификаторларын қолданумен орындалды. ПЦР амплификация нәтижелері 2 суретте келтірілген. Үлгілер ДНК 1-ден 8-ге дейін.



2 сурет. ПТР Электрофорерограммасы — өнімдер генінің 16S rRNA фрагментінің амплификациясы

Нуклеотидтер қатарының анализі. 5 идентификацияланған штаммдардың генінің 16S rRNA нуклеотидтік тізбектеріне талдау жасалған және SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems) программа көмегімен жалпы қатары анықталды.

Содан соң шеткі фрагменттері алып тасталынып (төмен сапалық көрсеткішке ие нуклеотидтер қатарының праймері, фрагменттері) бізге нуклеотидтер тізбегін 650 н.ж. аса ұзындықта алуға мүмкіндік берді, және GeneBank те BLAST алгоритмі бойынша идентификацияланды.

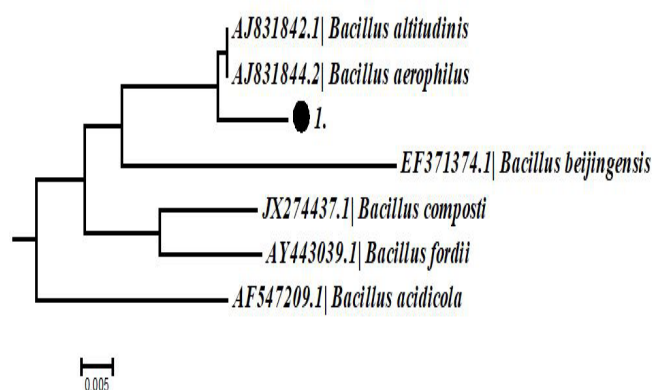
Нуклеотидтік анализ және идентификация нәтижелері 5 кестеде көрсетілген. Бактериялар үшін филогенетикалық ағаш тұрғызуда программалық жүйе — Mega 6, сондай-ақ bacterio.net (List of prokaryotic names with standing in nomenclature) сайты пайдаланылды. Нуклеотидтер қатарын теңестіру үшін Muscle алгоритмі қолданылған, ағаштың тұрғызылуы жақын көршілердің қосылуы әдісін қолдану арқылы жүргізілді (Neighbor-Joining NJ).

4 кесте. Микроорганизм штамдарының генетикалық идентификациясының нәтижелері

Геннің 16S rRNA нуклеотидтік анализі бойынша идентификациясы				
Штамм атауы	Геннің 16S rRNA фрагментінің тізбегі	Халықаралық деректер базасындағы нуклеотидті тізбектердің идентификациясы (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) BLAST алгоритмі		
		Инвентарлы номер GeneBank (Accession number)	Штамм атауы	Сәйкестігі %
TF-2	TACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTTCCSTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGTGGGGTAAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCSAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAACCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACCTGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCCGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGT	KC414717.1	<i>Bacillus altitudinis</i>	99

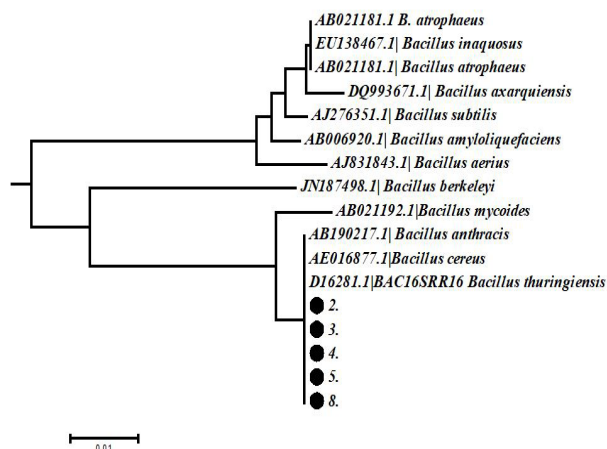
TM-4	ATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTTATGAAGT- TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATA- AGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATA- ACATTTGAACTGCATGGTTTCAAATTGAAAGCGGGCTTCG- GCTGCTACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG- GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT- GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC- CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT- GGASGAAAGTCTGMCAGGACACCGCCGCTGAGTGATGAAG- GCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT- GCTAGTTGAATAAG	KY908472.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
GDS-1	AGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGG- GCTTTCACATCAGACTTAAGAAACACCTGCGCGCGCTTAC- GCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCG- CGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTTGGCTTCTGGTTAGG- TACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTC- CCTAACACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCACTAC- GCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTC- CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTC- CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTG- CCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCG- GGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTCAATTTTC- GAACCATGCRGTTCA	KY249126.1	<i>Bacillus cereus</i>	99
JAS-2	AGGCTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCG- CCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCATATCTCACGCATTTACCCG- TACACATGGAATTCCACTTTCCTCTCTGCACTCAAGTCTC- CCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTCA- CATCAGACTTAAGAAACACCTGCGCGCGCTTACGCCAATA- ATTCCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT- GGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAG- GTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAA- CAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCACTACGCGGC- GTTGCTCCGTCAGA	KP236247.1	<i>Bacillus anthracis</i>	99
GFC-1	AGTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCG- CCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCATATCTCACGCATTTAC- CGTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACT- CAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTG- GGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACACCTGCGCGCGCTTAC- GCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCG- CGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGG- TACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTC- CCTAACACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCACTAC- GCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTC- CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTC- CCAGTGTGGCCGATCAC	KR708902.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99

3 суретте көрініп тұрғандай TF-2 штамының нуклеотидтік қатары *Bacillus altitudinis* түріне аса жақын орналасқан. Осылайша, TF-2 штамы 16S rRNA аймағы нуклеотидтік қатарының талдауына сүйене отырып *Bacillus altitudinis* түріне жатқызылды.



3 сурет. Филогенетикалық ағаш, 16S rRNA ген фрагментінің талдауы негізінде құрылған

Bacillus anthracis түріне аса жақын орналасқан. Сол себепті, бұл штамдар 16S rRNA нуклеотидтік қатарының талдауына сүйене отырып *Bacillus atropheus* түрі ретінде идентификацияланды.



4 сурет. Филогенетикалық ағаш, 16S rRNA ген фрагментінің талдауы негізінде құрылған

4 суретте берілгендей, 2, 3, 4, 5 үлгілердің нуклеотидтік қатары *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*

Геннің 16S rRNA бойынша 5 штамның идентификациясының нәтижесі 5 кестеде берілген.

5 кесте. 16S rRNA бойынша 5 штамның идентификациясы нәтижесі

Штам атауы	Идентификация нәтижесі
TF-2	<i>Bacillus altitudinis</i>
TM-4	<i>Bacillus thuringiensis</i>
GDS-1	<i>Bacillus cereus</i>
JAS-2	<i>Bacillus anthracis</i>
GFC-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>

16S rRNA бойынша идентификация нәтижелері көрсеткендей, барлық 5 дақыл *Bacillus* туысына жатады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Жасалған жұмыстар бойынша келесідей қорытындылар жасалынды. Зерттелген «Құлсары» мұнай пласт су үлгілеріндегі аэробты ЖМС — $24,0 \times 10^6$ КТБ/мл, ал анаэробты ЖМС — $0,7 \times 10^2$ КТБ/мл көрсетті. Микроорганизмдердің физиология-дақылдық қасиеттері бойынша «Құлсары» аборигенді микроорганизмдердің физиологиялық-дақылдық қасиеттері – 5 аборигенді дақылдан тұрады. Олардың 2 дақылы — протеолитикалық белсенді, 4 дақылы — капсула түзеді, 3 дақылы — грам+, 5 дақылы — қозғалғыш, 3 дақылы — споратүзгіш болып келеді. 16S rRNA бойынша идентификация нәтижелері көрсеткендей, барлық 5 дақыл *Bacillus* туысына жатады.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР

1. Zhang Yan Shan., Yu Shan. Микробиологиялық тәсілмен мұнай игеру технологиясы // Химия өнеркәсіп баспасы. — 2009. — 14–57б.

2. Р. Р. Ибатуллин. Увеличение нефтеотдачи на поздней стадии разработки месторождений. Теория. Методика. Практика. М: Недра. –2004. — 292 с.

3. Ю. М. Симаев. Использование биореагента КШАС–М для увеличения нефтеотдачи пластов // Интервал. — 2000. — Т. 4–5, № 15–16. –4 с.

4. Сериков Ф. Т., Оразбаев В. В. Проблемы профилактики разливов нефти и методы регирования // Нефть и газ. — 2002. — № 2. — 81–89с.

5. Исмаилов А. А., Смаилова Г. Ж., Исмаилова Д. А. «Состав и физико — химические свойства пластовой воды» // ВЕСТНИК Казахстанско — Британского Технического Университета № 1 (20), Алматы — 2012, С. 20–23.

6. Шостак А. В., Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский Государственный Технологический Университет» Конспект лекции по дисциплине нефти и газа, Краснодар — 2012, 36–45 с.

7. Хавкин А. Я. Нанотехнологии в добыче нефти и газа. М: 2008 г.13 с.

8. Практикум по микробиологии /Под. ред. А. Н. Нетрусова. — М.: Academia. 2005. 597 с.

9. Булавин В. Д. Технологический комплекс для интенсификации добычи нефти и увеличения нефтеотдачи на основе отечественного биополимера. Новости науки и техники. — 2006. — № 4. — 116–117 с.

10. Сургучев М. Л. Вторичные и третичные методы увеличения нефтеотдачи пластов. М: Недра, 2005 г., 17, 107 с.

11. Ron E. Z. Natural role of biosurfactants / E. Z. Ron, E. Rozenberg // Environ. Microbiol. — 2001, vol.3, pp. 229–236.

12. Апендина Г. С., Туякбаева А. У., Кулжанова К. А., Бокаева Н. Х., Жамантара А. К., Абжалелов А. Б. Выбор активных микроорганизмов деструкторов углеводородов нефти и нефтепродуктов // Материалы междуна. конф., посвященной 100 — летию со дня рождения В. М. Бородского. — Алматы. 2009 178–179 с.

13. Технология повышения нефтеотдачи пластов, снижения обводненности и интенсификации добычи с использованием биополимеров и композиций на их основе / В. В. Балакин [и др.] // Тр. Всероссийского совещания по разработке нефтяных месторождений, Альметьевск, 5–9 июня 2000 г: в 2 ч. // «ТатА-СУнефть», ОАО «Татнефть» — Альметьевск, 2000. — № 2 — С. 50–54.

14. Молчанов, А. Г. Машины и оборудование для добычи нефти и газа учеб. для вузов: учеб. для студентов вузов по спец. «Машины и оборудование нефтяных и газовых промыслов» / А. Г. Молчанов. — Изд. 2-е, испр. и доп. — Москва: Изд. дом Альянс, 2010. 586 с.

15. Сургучев Л. М. Увеличение нефтеотдачи пластов: статус и перспективы. Материалы II Международного научного симпозиума. М: 2009. С. 62–69.

REFERENCES

1 Shan, Zh.Y., Shan, Yu. Technology of oil development by microbiological method // Chemical Industry Publishing house. - 2009. - №?. - P. 14-57.

2 Ibatullin, R.R. Increased oil recovery at the late stage of field development. Theory. Methodology. Praktika. Moscow, Nedra. - 2004, P. 292.

3 Simaev, Yu.M. The use of the KSHAS-M bioreagent to increase oil recovery. Interval, 2000, T.4-5, № 15-16, pp. 4

4 Serikov F.T., Orazbayev V.V. Problems of oil spill prevention and response methods. Oil and gas, 2002.- №2.- P.81-89.

5 Ismailov, A.A., Smailova, G.Zh., Ismailova, D.A. "Composition and physico - chemical properties of reservoir water". BULLETIN of the Kazakh - British Technical University vol.1(20), Almaty - 2012.- P. 20-23.

6 Shostak, A.V. Federal Budgetary State Educational Institution of Higher professional Education "Kuban State Technological University" Lecture notes on the discipline of oil and gas, Krasnodar. - 2012. - P. 36-45.

7 Khavkin, A.Y. Nanotechnology in oil and gas production. Moscow.- 2008. - P.13

- 8 Netrusova, A.N. Workshop on microbiology. Moscow. - 2005. - P. 597.
- 9 Bulavin, V.D. Technological complex for oil production intensification and oil recovery increase based on domestic biopolymer. News of science and Technology, 2006. - N° 4. - P. 116-117.
- 10 Surguchev, M.L. Secondary and tertiary methods of increasing oil recovery. Moscow, Nedra. - 2005. - N°17. - P.107
- 11 Ron, E.Z. Natural role of biosurfactants / E.Z. Ron, E. Rozenberg // Environ. Microbiol. - 2001. - vol.3. - P. 229 - 236.
- 12 Apendina, G.S., Tuyakbaeva, A.U., Kulzhanova, K.A., Bokaeva, N.H., Zhamantara, A.K., Abzhalelov, A.B. The choice of active microorganisms destructors of hydrocarbons of oil and petroleum products. [Materials of the international conference dedicated to the 100th anniversary of the birth of V.M. Borodsky], Almaty. - 2009. - P.178-179
- 13 Balakin, V.V. Technology for increasing oil recovery, reducing waterlogging and intensification of production using biopolymers and compositions based on them. Tr. of the All-Russian Meeting on the Development of oil fields, Almet'yevsk, June 5 - 9, 2000, // Tatasunef't, OAO Tatneft - Almet'yevsk. - 2000. - vol.2. - P. 50-54.
- 14 Molchanov, A. G. Machinery and equipment for oil and gas production studies. for universities: studies for university students on spec. "Machines and equipment of oil and gas fields" / A. G. Molchanov. 2nd edition, Moscow, Publishing house Alliance. - 2010. - P. 586.
- 15 Surguchev, L.M. Increase in oil recovery: status and prospects. Materials of the II International Scientific Symposium. Moscow. - 2009. - P. 62-69.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ ПО 16S rRNA

Карабалаева Д.Э*, Әбітай Ә.Н, Батаева Д.С, Садыкова Д. А.

Казахский национальный женский педагогический университет, ул. Айтеке би, 99, Алматы, 050000, Казахстан

*dina.20.1996@mail.ru

АБСТРАКТ

На сегодняшний день мировые запасы нефти могут сократиться в течение ближайших 50 лет. Казахстан входит в число ведущих стран мира по ресурсам нефти. Только половина нефти на месторождениях может быть добыта современными методами. В связи с этим, актуальность обусловлена возрастающим интересом к поиску путей и средств повышения нефтеотдачи, особенно к постоянному применению микробиологических методов.

Нефть является важным источником энергетического и химического сырья. Его запасы ограничены и невосполнимы. Существующие методы позволяют извлекать до 40–60% геологических запасов нефти при разработке нефтяных месторождений. Одной из актуальных задач является создание наиболее эффективных методов повышения нефтеотдачи на отработанных месторождениях.

Микробиологические методы, используемые для повышения нефтеотдачи, привлекают внимание своей малой капиталоемкостью, высокой эффективностью и безопасностью для окружающей среды. В биотехнологии вытеснение дополнительной нефти происходит в определенной степени, эти механизмы, как физические, так и химические, но поскольку метаболиты микроорганизмов образуются непосредственно в пластовых отверстиях, эффективность их действия остается высокой. Освоение этих методов невозможно без учета микробиологической и физико-химической обстановки в нефтяных пластах.

Ключевые слова: нефтяной пласт, клетки, культуры, аборигенные микроорганизмы, аэробные и анаэробные микроорганизмы.

IDENTIFICATION OF OIL RESERVOIR MICROORGANISMS BY 16S rRNA

Karabalayeva.D.Y*, Abitay A.N, Batayeva D.S, Sadykova D. A.

Kazakh National Women's Teacher Training University, st. Aiteke bi 99, Almaty, 050000, Kazakhstan

**dina.20.1996@mail.ru*

ABSTRACT

According to today's forecasts, global oil reserves may decrease over the next 50 years. Kazakhstan is one of the leading countries in the world in terms of oil resources. With modern methods, only half of the oil in the fields can be extracted. In this regard, the relevance is due to the growing interest in finding ways and means to increase oil recovery, especially to the constant use of microbiological methods.

Oil is an important source of energy and chemical raw materials. Its reserves are limited and irreplaceable. The existing methods allow us to extract up to 40–60% of geological oil reserves in the development of oil fields. One of the most urgent tasks is to create the most effective methods to increase oil production in the developed fields.

Microbiological methods used to increase oil production attract attention with their high efficiency and environmental safety, low capital intensity. In biotechnology, additional oil displacement occurs to a certain extent, these mechanisms provide both physical and chemical methods, but since the metabolites of microorganisms are formed directly in the plate openings, their impact efficiency is higher. It is impossible to master these methods without taking into account the microbiological and physico-chemical conditions in oil plates.

Key words: oil reservoir, cells, cultures, native microorganisms, aerobic and anaerobic microorganisms.