

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ СЕРОВОДОРОДА В НЕФТЯНОМ МЕСТОРОЖДЕНИИ КАРАЖАНБАС (КАЗАХСТАН)¹

© 2020 г. Д. Ш. Соколова^а, Е. М. Семенова^а, Д. С. Груздев^б, А. П. Ершов^а, С. Х. Биджиева^а,
А. Е. Иванова^а, Т. Л. Бабич^а, М. Р. Сисенбаева^с, М. А. Бисенова^с, Т. Н. Назина^а, *

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^сФилиал ТОО “КМГ Инжиниринг” “КазНИПИМунайгаз”, Актау, 130000 Казахстан

*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 26.02.2020 г.

После доработки 15.03.2020 г.

Принята к публикации 18.03.2020 г.

Биогенное образование сероводорода в нефтяном пласте приводит к ухудшению качества нефти и газа и коррозии нефтепромыслового оборудования. На нефтяном месторождении Каражанбас (Казахстан) бактерициды не применяются, поскольку в нагнетаемой и пластовой воде сульфаты отсутствуют или содержатся в низкой концентрации. Однако в процессе разработки месторождения было зарегистрировано усиление коррозии стального оборудования и появление сероводорода в пластовой воде. Целью настоящей работы было определение потенциальных агентов микробной коррозии и возможности подавления роста сульфидогенов с помощью нитрата. Исследованы экологические условия и состав микробного сообщества нагнетаемой и пластовой воды на участках месторождения с разной температурой. Методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК показано преобладание в высокотемпературном пласте термофильных сульфатредуцирующих бактерий (родов *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfobrevibrio*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfovirgula*, *DeFluviitoga* и *Desulfonauticus*) и архей (рода *Archaeoglobus*), тиосульфатредуцирующих (родов *Thermoanaerobacter*, *Anaerobaculum* и *Coprothermobacter*) и синтрофных бактерий, а также низкая представленность метаногенов (родов *Methanolinea* и *Methanothermobacter*). В сообществах из низкотемпературных пластов присутствовали мезофильные метаногены (родов *Methanococcus*, *Methanobacterium* и *Methanotherix*), приведенные выше термофильные и мезофильные сульфатредуцирующие бактерии (родов *Desulfobrevibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina*, *Desulfoglaeba*, *Desulfotignum* и *Desulfocurvus*), синтрофные бактерии (рода *Smithella*) и бактерии родов *Marinobacter*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Arcobacter*, *Halomonas*. Из пластовой воды были получены накопительные культуры бактерий, образующих сероводород, и культуры, восстанавливающие нитрат до нитрита, подавляющие рост сульфат- и тиосульфатредуцирующих бактерий. Это может указывать на перспективность использования нитрата в качестве конкурентного ингибитора сульфидогенеза в этом месторождении. Обнаружены также коррозионно-активные водород-использующие метаногены и ацетогены, что обуславливает необходимость контроля микробного сообщества в нефтяном пласте.

Ключевые слова: нефтяные пласты, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, сульфатредуцирующие прокариоты, нитрат, нитрит

DOI: 10.31857/S002636562004014X

Сульфатредуцирующие прокариоты (СРП) рассматриваются как основные продуценты сероводорода, ответственные за коррозию нефтепромыслового оборудования, ухудшение качества добываемой нефти, падение проницаемости вмещающих пород и ухудшение экологических

условий при добыче и переработке нефти (Duncan et al., 2009; Gieg et al., 2011; Parthipan et al., 2017). Из нефтяных пластов был выделен ряд сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) (родов *Desulfobrevibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfacinum*, *Desulfonauticus*, *Desulfoglaeba*, *Desulfovermiculus* и др.) и архей (СРА) (рода *Archaeoglobus*) (Magot et al., 2000; Youssef et al., 2009; Aüllo et al., 2013). С использованием радиоизотопных методов зарегистриро-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002636562004014X для авторизованных пользователей.

ваны высокие скорости сульфатредукции в нефтяных пластах с сульфатсодержащей пластовой водой или заводняемых морской водой (Nazina et al., 2017; Duncan et al., 2017). В присутствии сульфатов и других окисленных соединений серы сульфатредуцирующие бактерии используют молекулярный водород, ряд низкомолекулярных органических соединений (жирные кислоты, спирты, лактат, ацетат и пируват). Некоторые штаммы растут на таких органических субстратах как индол, фенол, катехол, толуол, насыщенные неразветвленные *n*-алканы (Widdel et al., 2007; Plugge et al., 2011; Suri et al., 2017; Davidova et al., 2018). Известны штаммы СРБ, восстанавливающие нитрат, Fe^{3+} , U^{6+} , Se^{6+} и Cr^{6+} . Вследствие метаболической гибкости сульфатредуцирующие бактерии встречаются также в пластовой воде, не содержащей сульфата. В отсутствие химических акцепторов электронов эти бактерии способны осуществлять брожение или межвидовой перенос электронов, используя метаногенов в качестве биологических акцепторов электронов. В этом случае сульфатредуцирующие бактерии вовлечены в биогеохимический цикл углерода, осуществляя превращение углеводов нефти совместно с бродильными и метаногенными прокариотами.

Наряду с СРП в нефтяных пластах распространены и другие сульфидогенные прокариоты, которые могут вносить свой вклад в продукцию сероводорода. Коррозионной активностью обладают бродильные бактерии (родов *Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Spirochaeta*, *Fusibacter*, *Dethiosulfovibrio*, *Halanaerobium*) и археи (родов *Pyrococcus* и *Thermococcus*), способные использовать окисленные соединения серы (сульфит, тиосульфат или элементную серу) для удаления электронов в процессе “облегченного брожения” или серного дыхания (Grassia et al., 1996; Magot et al., 2000; Liang et al., 2016).

Сульфатредуцирующие бактерии используют электроны или катодный водород с поверхности стали для восстановления сульфата с образованием сульфида, который, в свою очередь, взаимодействует с ионами железа с образованием сульфида железа (FeS); при избытке бикарбоната в среде дополнительно образуется карбонат железа ($FeCO_3$) (Gieg et al., 2011; Mand et al., 2014).

Помимо сульфидогенов в коррозии стального оборудования могут участвовать также ацетогенные, железо- и марганецредуцирующие и метаногенные прокариоты, не образующие сероводород (Gieg et al., 2011). Ацетогены и метаногены, подобно СРБ, используют водород, образующийся при катодной деполяризации железа, для роста и образования ацетата и метана соответственно (Mand et al., 2014). Показано также окисление углеродистой стали с образованием оксида железа как продукта коррозии на поверхности металла аэробными термофильными бактериями родов

Bacillus и *Geobacillus* в среде с нефтью (Elumalai et al., 2019).

Методы предотвращения и контроля сульфатредукции в нефтяных пластах, включающие удаление сульфатов из нагнетаемой воды, закачку бактерицидов, нитрата или нитрита для подавления активности СРП и окисления сульфида и др., суммированы в обзорах (Gieg et al., 2011; Dolfing, Hubert, 2017). Приведенные материалы свидетельствуют о необходимости мониторинга микробных популяций в нефтяных пластах, в том числе, не содержащих сульфатов.

Нефтяное месторождение Каражанбас (Казахстан) было введено в разработку в 1980 году. Высокотемпературные участки этого месторождения эксплуатируются с применением паротеплового воздействия (Мурзагалиев, 2009). На участках с низкой температурой используется заводнение сточной высокоминерализованной пластовой водой, оставшейся после сепарации нефти. Бактерициды на месторождении не применяются, поскольку в нагнетаемой воде сульфаты практически отсутствуют или содержатся в низкой концентрации. Однако в процессе разработки месторождения было зарегистрировано усиление коррозии нефтепромыслового оборудования и появление сероводорода в добываемой водонефтяной продукции.

Целью настоящей работы является определение физико-химических условий и микробного разнообразия в нагнетаемой и пластовой воде месторождения Каражанбас, поиск возможных продуцентов сероводорода и других агентов коррозии и оценка влияния нитрата на сульфидогенные прокариоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и отбор проб. Пробы нагнетаемой и пластовой воды отбирали в июне 2019 г. на нефтяном месторождении Каражанбас, расположенном на полуострове Бузанчи вблизи Каспийского моря в Мангистауской области Республики Казахстан. Нефтяные пласты залегают на небольшой глубине 228–466 м (табл. S1). Залежи нефти обнаружены в шести пластах нижнего мела (А1, А2, Б, В, Г, Д) и двух горизонтах (Ю-1, Ю-2), приуроченных к верхней части юрского разреза. Тяжелая смолистая нефть месторождения плотностью 939–944 кг/м³ является наиболее вязкой (160–660 мПа с при 50°C) среди нефтей, добываемых на месторождениях Западного Казахстана; она характеризуется высоким содержанием серы (1.6–2.2 мас. %), смол (24 мас. %), асфальтенов (24.9–29.1 мас. %) и парафина (0.7–1.4 мас. %). Содержание газа в среднем составляет 8.9–9.8 м³ на 1 т нефти (Мурзагалиев, 2009).

На месторождении было отобрано 7 проб пластовой воды из добывающих скважин (6609, 7309, 5518, 5019, 4322, 7714 и 6045), 2 пробы нагнетаемой воды, представленных сточной водой, отделенной от нефти, отобранных из цеха первичной переработки нефти (ЦППН) и из доливной насосной станции (ДНС), и проба волжской воды 2.0, используемой для парагазового воздействия. Скважины 7309, 5518, 5019 и 4322 располагаются ближе всего к месту закачки пара в пласт; в пластовых флюидах из этих скважин зарегистрировано появление сероводорода и углекислого газа. Для сравнения анализировали также пластовую воду из добывающих скважин 6609 и 6045 на участке, заводняемом сточной водой. Отметим, что увеличение температуры пласта в результате закачки пара было зарегистрировано в зоне лишь одной добывающей скважины, расположенной в 150 м от зоны обработки. Этот участок не исследовали в настоящей работе.

Пробы отбирали на устье скважин в стерильные бутылки, герметично закрывали, и в течение 4–6 часов в лаборатории проводили посеvy для определения численности микроорганизмов. Отдельно отбирали пробы для химических и молекулярных исследований. Для молекулярно-биологического анализа состава микробного сообщества пробы пластовой и нагнетаемой воды, объемом 1 л каждая, фиксировали этанолом (1 : 1, об.) в момент отбора. В лаборатории пластовую воду отделяли от нефти, добавляя Triton X100 (0.1%), и затем промывали гексаном. Отделенную от нефти воду фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0.22 мкм (“Millipore”, США). Фильтры подсушивали при комнатной температуре и хранили при -20°C .

Состав питательных сред, условия культивирования и учета микроорганизмов. Численность микроорганизмов определяли путем посева проб в жидкие питательные среды методом десятикратных разведений в двух повторностях. Результаты оценивали методом наиболее вероятного числа по таблице Мак Креди. Основу сред для учета всех групп микроорганизмов составляла минеральная морская среда (ММ) следующего состава (г/л): $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 3.0$, $\text{KCl} - 0.3$, $\text{CaCl}_2 - 0.15$, $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.3$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2$, $\text{NaCl} - 20.0$, $\text{NaHCO}_3 - 2.5$ (Widdel, Bak, 1992), 1 мл – микроэлементы, как указано ранее в статье (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003). Для учета аэробных бактерий в среду вносили (г/л): глюкозу – 1.0, бакто-триптон – 5.0, дрожжевой экстракт – 2.5; pH 7.0–7.2, газовая фаза – воздух. Среда для броидильных бактерий включала (г/л): пептон – 4.0, глюкозу – 10.0, соль Мора ($\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 0.5; pH 6.5–7.0, газовая фаза – аргон. Сульфатредуцирующие прокариоты учитывали по образованию сероводорода в конечных разведениях в среде ММ, допол-

ненной (г/л) $\text{Na}_2\text{SO}_4 - 4.0$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.01$, дрожжевым экстрактом – 0.5, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O} - 0.1$ и лактатом натрия – 4.0; pH 7.0–7.2, газовая фаза – аргон. Метаногенов учитывали по образованию метана в среде ММ, дополненной ацетатом натрия – 2.5 г/л, метанолом – 2 мл/л, дрожжевым экстрактом – 1.0 г/л и $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O} - 0.5$ г/л; pH 7.0–7.2, газовая фаза – H_2/CO_2 (4 : 1). Накопительные культуры тиосульфат- и сероредуцирующих бактерий получали в среде для броидильных бактерий с разными акцепторами электронов – тиосульфатом ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 2.0 г/л или элементной серой – 10.0 г/л соответственно; вместо соли Мора вносили $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.01$ г/л. Накопительные культуры денитрифицирующих/нитратредуцирующих бактерий получали в среде ММ, дополненной $\text{NaNO}_3 - 1.0$ г/л и ацетатом натрия – 2.5 г/л; pH 7.0–7.2, газовая фаза – аргон; рост выявляли по образованию нитрита и молекулярного азота.

Посевы инкубировали при 25, 42 или 55°C в зависимости от температуры местообитания, из которого отбирали пробу жидкости, если не указаны иные условия. Посевы выдерживали в термостате в течение 14 сут, отсутствие роста регистрировали через 30 сут инкубации.

Для выяснения влияния нитратов на образование сероводорода сульфат- (СР) и тиосульфатредуцирующими (ТСР) микроорганизмами пластовой и нагнетаемой воды в среду ММ, содержащую дрожжевой экстракт (0.5 г/л), лактат натрия (2 г/л) и сахарозу (5 г/л), вносили нитрат кальция в концентрации 0, 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 г/л, рассчитанной по нитрат-иону. В качестве акцептора электронов для СР бактерий в среду вносили Na_2SO_4 (2.8 г/л), для ТСР – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.6 г/л). Среду восстанавливали внесением $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (50 мг/л). Газовая фаза – аргон.

Аналитические методы. Метан, водород и углекислоту в газовой фазе определяли газохроматографически. Сероводород определяли колориметрическим методом Пахмайра с диметил-*n*-фенилендиамином; химический состав пластовой воды определяли, как описано ранее в статье (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003). Летучие кислоты и низшие спирты анализировали на газовом хроматографе GC-2010 Plus (“Shimadzu Corporation”, Япония) (Семенова и соавт., 2019).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование генов 16S рРНК. Биомассу клеток, собранную на мембранных фильтрах, смывали лизирующим раствором, содержащим 0.15 М NaCl и 0.1 М Na_2EDTA (pH 8.0), и использовали для выделения ДНК. Выделение тотальной ДНК проводили с использованием набора PowerSoil DNA Isolation Kit (“MoBio”, США), согласно рекомендациям производителя. Полученную ДНК хранили в хо-

лодильнике при -20°C . Для получения библиотек генов 16S рРНК микроорганизмов пластовой и нагнетаемой воды был амплифицирован V3–V4 гипервариабельный регион этого гена, и на основе двойного баркодирования были приготовлены библиотеки, как описано ранее (Fadrosh et al., 2014). Смысловые участки праймеров были взяты в соответствии с парой праймеров Pro341F–Pro805R (Takahashi et al., 2014). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) (“Illumina”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Биоинформатический анализ. Полученные в результате секвенирования чтения были подвергнуты процедуре контроля качества с использованием UPARSE (Edgar, 2013). Квалифицированные чтения были сгруппированы для создания операционных таксономических единиц (ОТЕ) с уровнем сходства 97% с использованием USEARCH (Edgar, 2010). Для репрезентативной последовательности каждой ОТЕ было определено таксономическое положение с помощью классификатора RDP (Maidak et al., 2000). Анализ состава микробных сообществ методом тепловой карты был выполнен с использованием ClustVis (Metsalu, Vilo, 2015). Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel, Rstudio (пакет vegan) (Oksanen et al., 2007).

Полученные библиотеки фрагментов генов 16S рРНК микроорганизмов пластовой и нагнетаемой воды депонированы в NCBI, проект PRJNA607806 (SRR11126548–SRR11126560).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические характеристики и культивируемые микроорганизмы нагнетаемой и пластовой воды месторождения Каражанбас. Исследованные пробы жидкостей существенно различались по химическому составу и формировали три группы (табл. 1). В первую группу входили пробы воды из пластов с повышенной температурой (добывающие скважины 7309, 5518, 5019, 4322 и 7714), относящиеся к гидрокарбонатно-натриевому или хлор-кальциевому типу, характеризующиеся низкой общей соленостью (2211.5–8418.2 мг/л), низким содержанием сульфат-иона (0–81.4 мг/л) и присутствием сероводорода (от 21.5 до 62.9 мг/л). Ко второй группе относились пробы нагнетаемой воды из ЦППН и ДНС и пластовой воды из низкотемпературных пластов (скв. 6609 и 6045), которые были более минерализованными (24765.6–53107.4 мг/л) и содержали от 4.6 до 62.0 мг H_2S /л, несмотря на отсутствие или низкое содержание сульфатов в воде. От воды первых двух групп отличается волжская вода, которая используется для парогазового воздействия на пласты, имеет

низкую минерализацию (566.9 мг/л) и содержит 74.1 мг SO_4^{2-} /л.

В пробах из низкотемпературных пластов (скв. 6609, 6045), заводняемых сточной нефтепромысловой водой, численность культивируемых мезофильных аэробных органотрофных и анаэробных бродильных, сульфатредуцирующих и метаногенных прокариот была существенно выше, чем численность термофильных прокариот в пластах с повышенной температурой (скв. 7309, 5518, 4322, 7714 и 5019) (рис. S1). Термофильное микробное сообщество было представлено в основном анаэробными бродильными бактериями, способными восстанавливать тиосульфат и элементную серу с образованием сероводорода (рис. S2). Термофильные сульфатредуцирующие прокариоты были обнаружены только в воде из скв. 5019. В последующих пересевах первичных накопительных культур мезофильных и термофильных сульфатредуцирующих прокариот образование сероводорода было зарегистрировано в интервале температуры от 40 до 70°C , но не при 80°C (рис. S3).

Сульфатредуцирующие прокариоты были наиболее многочисленны в пробах нагнетаемой воды из ДНС (10^5 кл./мл) и ЦППН (10^3 кл./мл), представленных сточной водой из низкотемпературных пластов. Вероятно, повторное использование пластовой воды, сепарированной от нефти, для нагнетания в пласт приводит к его заражению сульфидогенными и другими прокариотами, что может способствовать коррозии стального нефтепромыслового оборудования и биодеградации нефти в пласте. Сульфатредуцирующие прокариоты были обнаружены в пяти пробах воды, тогда как тиосульфат- и сероредуцирующие прокариоты присутствовали в девяти из десяти исследованных проб воды (табл. S2, рис. S1 и S3). Вероятно, при наличии окисленных соединений серы (тиосульфата, сульфита и/или элементной серы) и утилизируемых субстратов эта разнородная группа прокариот может участвовать в образовании сероводорода. Низкая концентрация сульфатов или их отсутствие в пластовой воде, вероятно, ограничивают протекание процесса сульфатредукции в нефтяном пласте, но не препятствуют росту сульфатредуцирующих бактерий посредством участия в цикле углерода, где они могут осуществлять функцию бродильных или синтрофных бактерий.

В посевах волжской воды присутствовали аэробные органотрофные и анаэробные бродильные, денитрифицирующие и сероредуцирующие бактерии; сульфат- и тиосульфатредуцирующие бактерии не были обнаружены (рис. S3).

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества нагнетаемой и пластовой воды нефтяного месторождения Каражанбас. С использованием

Таблица 1. Физико-химическая характеристика пластовой и нагнетаемой воды нефтяного месторождения Каражанбас

Проба, номер скважины	рН	Температура, °С	Суммарная минерализация, мг/л	Содержание, мг/л							Тип воды по Сулину*	Н ₂ S, мг/л
				Na ⁺ + K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻		
ДНС	6.5	25	24765.6	7217.4	1202.4	729.6	15031.0	36.2	0	549.0	Cl–Ca	4.7
6609	6.6	25	32959.2	10221.2	1202.4	851.2	19915.8	0	0	768.6	Cl–Ca	62.0
6045	6.4	25	53107.4	17572	2004.0	729.6	32692	0	0	109.8	Cl–Ca	4.6
ЦППН	6.2	55	29618.6	7987.9	1402.8	1337.6	18412.7	14.0	0	463.6	Cl–Ca	25.5
5019	6.7	45	3353.9	1051.1	80.2	48.6	1503.0	61.0	0	610.0	HCO ₃ –Na	21.5
4322	6.2	45	8418.2	2967.0	200.4	48.6	4885.0	0	0	317.2	Cl–Ca	62.9
5518	6.6	77	5945.2	2037.8	160.3	48.6	3382.0	11.5	0	305.0	Cl–Ca	47.0
7309	6.8	77	2211.5	690.0	40.0	24.3	826.6	70.0	0	561.2	HCO ₃ –Na	34.0
7714	6.3	45	3539.1	1087.9	120.2	48.6	1652.0	81.4	0	549.0	SO ₄ –Na	24.2
Волжская вода	7.6	Н.д.	566.9	167.9	10.0	6.0	150.3	74.1	0	158.6	HCO ₃ –Na	0

* Cl–Ca, хлор-кальциевый; HCO₃–Na, гидрокарбонатно-натриевый; SO₄–Na, сульфатно-натриевый. Н.д. – нет данных.

Таблица 2. Индексы разнообразия фрагментов гена 16S рРНК прокариот в библиотеках* из нагнетаемой и пластовой воды нефтяного месторождения Каражанбас

Параметры	Библиотеки									
	PPN-K	DNS	6609	6045	5019	4322	5518	7309	7714	VW
Количество ОТЕ	276	1024	419	129	152	147	150	52	86	1236
Индекс Шеннона (H ₁₀)	3.94	5.04	3.76	2.90	2.86	2.77	3.72	3.74	1.94	5.62
Индекс Симпсона (1-D)	0.960	0.982	0.946	0.880	0.895	0.866	0.946	0.981	0.715	0.989

* VW – волжская вода; DNS – вода из ДНС; PPN-K – вода из цеха первичной подготовки нефти (ЦППН) месторождения Каражанбас; остальные обозначения соответствуют номерам добывающих скважин.

ДНК из 10 проб воды, отобранных на месторождении Каражанбас, на платформе MiSeq “Illumina” было получено 10 библиотек, содержащих в сумме 734253 фрагмента V3–V4 региона гена 16S рРНК бактерий и архей. Микробное сообщество волжской воды было самым разнообразным и включало 1236 операционных таксономических единиц (ОТЕ) с уровнем сходства ≥97% (табл. 2). По своему составу оно отличалось от исследованных сообществ нагнетаемой и пластовой воды из месторождения Каражанбас, и может служить примером пресноводного сообщества, не имеющего отношения к нефтяному пласту. Количество распределение полученных фрагментов гена 16S рРНК в библиотеках на уровне доменов

Bacteria и *Archaea*, филумов (или классов у *Proteobacteria*) и родов приведено, соответственно, на рис. S4, 1 и 2.

В высокотемпературных пластах месторождения Каражанбас обнаружено разнообразное микробное сообщество, в котором преобладали сульфидогены. В пластовой воде из скв. 5518 выявлены гипертермофильные сульфатредуцирующие археи рода *Archaeoglobus* (3.8% от количества последовательностей в библиотеке) и термофильные водород-использующие метаногены родов *Methanolinea* и *Methanothermobacter*. Представители рода *Archaeoglobus* часто встречаются в высокотемпературных нефтяных пластах, они растут в интервале температуры от 60 до 95°C с оптиму-

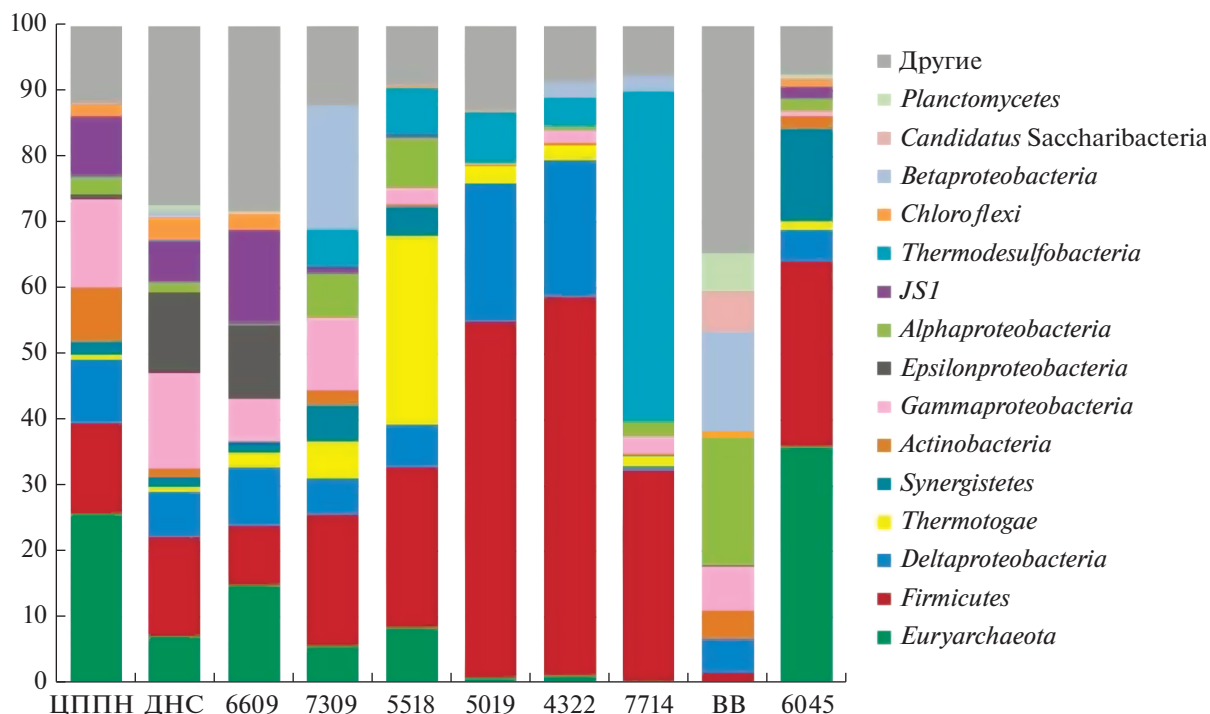


Рис. 1. Таксономическая классификация (на уровне филумов/классов) в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК прокариотных сообществ нагнетаемой и пластовой воды из месторождения Каражанбас. Обозначения библиотек на рис. 1 и 2: ВВ – волжская вода, ДНС – вода из ДНС, ЦППН – вода из цеха первичной подготовки нефти, остальные обозначения соответствуют номерам добывающих скважин.

мом при 83°C, восстанавливают сульфат, тиосульфат и сульфит с образованием сероводорода, используя молекулярный водород и небольшой круг органических субстратов, включая жирные кислоты, алкены и C₁₀–C₂₁ *n*-алканы (Stetter et al., 1993; Beeder et al., 1994; Khelifi et al., 2014).

Несмотря на низкое содержание сульфатов в пробах пластовой воды из скважин 5019, 4322, 7714, 5518 и 7309, в составе сообществ преобладали сульфатредуцирующие бактерии. В сообществе из скв. 7714 обнаружены сульфатредуцирующие бактерии родов *Thermodesulfobacterium* (50.1%) и *Thermodesulfovibrio* (7.2%) и бродильные бактерии рода *Thermoanaerobacter* (18.2%), известные способностью восстанавливать тиосульфат до сероводорода, что позволяет считать это сообщество в основном сульфидогенным. Отметим, что культуральными методами сульфатредуцирующие прокариоты в этой пробе не были обнаружены.

Сульфатредуцирующие бактерии (родов *Desulfotomaculum*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfovirgula*, *Defluviitoga* и *Desulfonauticus*) и тиосульфатредуцирующие бродильные бактерии (родов *Thermoanaerobacter*, *Anaerobaculum* и *Coprothermobacter*) были обнаружены также в пробах воды из скважин 5019, 4322, 5518 и 7309. Примечательно обнаружение бродильных бактерий рода *Soehngenia*, которые обитают также в прикаспийском нефтяном

месторождении, расположенном в Азербайджане (Grouzdev et al., 2019). Функцию синтрофных бактерий в термофильном микробном сообществе, вероятно, выполняют бактерии рода *Pelotomaculum* и широко распространенные в нефтяных пластах бактерии рода *Thermoanaerobacter*, для которых продемонстрирован синтрофный рост на ацетате совместно с метаногенами рода *Methanothermobacter* (Shestakova et al., 2010).

Микробные сообщества из низкотемпературных пластов (скв. 6609 и 6045) и нагнетаемой воды (из ЦППН и ДНС) были более разнообразными, чем термофильные сообщества, и включали преимущественно мезофильные бактерии и археи. В этих сообществах было высоким содержание метаногенов родов *Methanococcus* (5.6–25.3%), *Methanobacterium* (до 7%) и *Methanotherrix* (до 2.6%). Хотя доля сульфатредуцирующих бактерий в этих сообществах была невысока, они отличались большим разнообразием и включали как термофильные (родов *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio*, *Defluviitoga*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfonauticus* и *Desulfovirgula*), так и мезофильные бактерии (родов *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina*, *Desulfoglaeba*, *Desulfotignum* и *Desulfocurvus*). В сообществах присутствовали мезофильные бактерии рода *Smithella* (1.0–4.5%), которые могут расти синтрофно с H₂-использую-

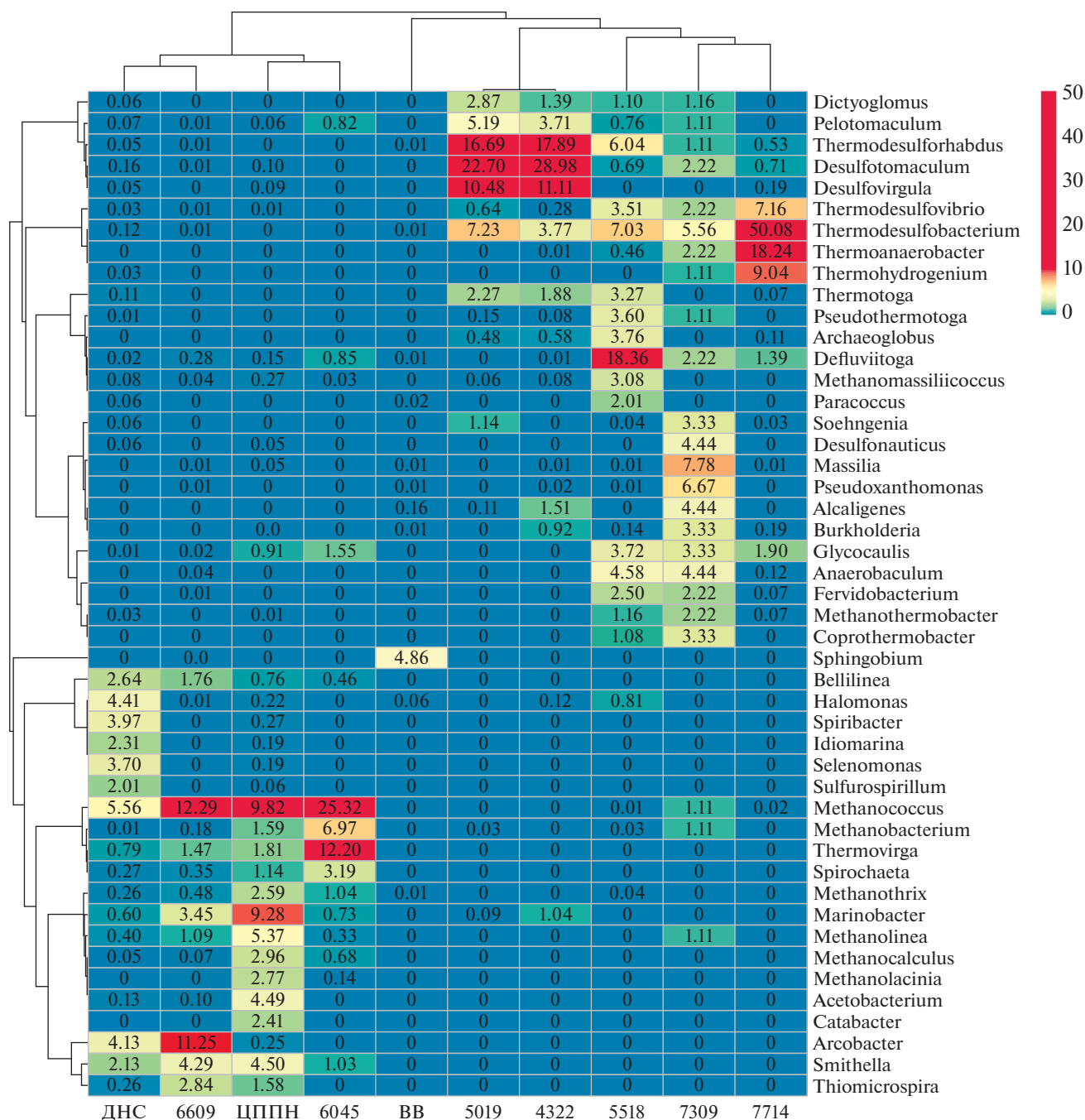


Рис. 2. Тепловая карта (heatmap) распределения доминантных родов в библиотеках фрагментов гена 16S рПНК прокариотных сообществ нагнетаемой и пластиковой воды из месторождения Каражанбас. Двойная иерархическая дендрограмма показывает распределение микроорганизмов в этих пробах. Относительные величины содержания отдельных родов от синего до красного цвета обозначают переход от менее представленного к более представленному роду в библиотеке. Цифры на диаграмме обозначают % от общего количества последовательностей в библиотеке из каждой исследованной пробы жидкости.

щими метаногенами на бутирате, пропионате и других низших жирных кислотах, а также бактерии родов *Marinobacter* (0.6–9.3%), *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Arcobacter*, *Halomonas* и др., способные восстанавливать нитраты до нитрита или N_2 .

Сравнение состава исследованных микробных сообществ методом главных компонент (Principal component analysis (PCA)) показало их разделение на три группы в соответствии с физико-химическими параметрами местообитания (рис. S5).

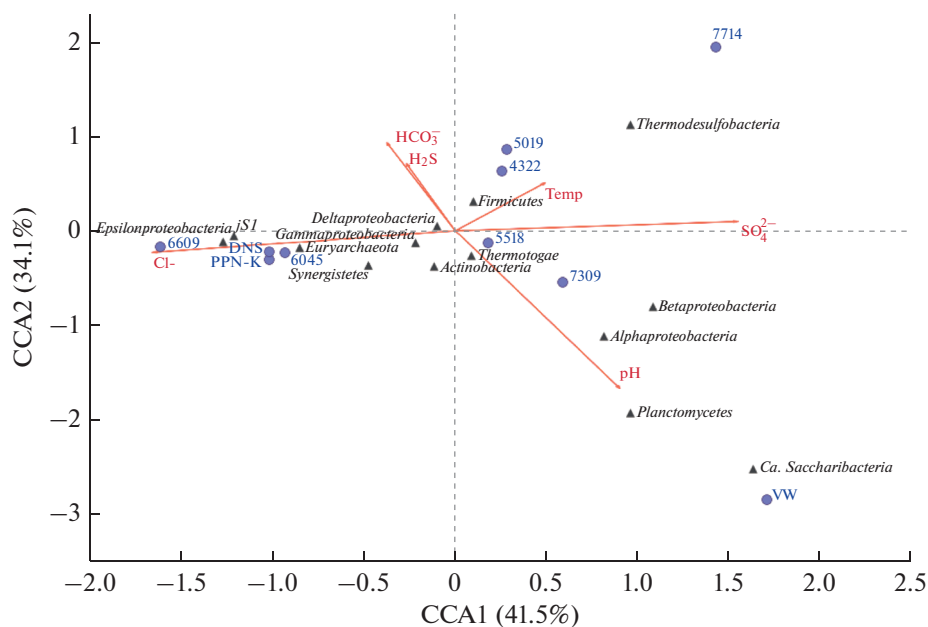


Рис. 3. Канонический корреляционный анализ (ККА), показывающий корреляцию между микробным разнообразием на уровне типа или класса в библиотеках гена 16S рРНК микроорганизмов нагнетаемой и пластовой воды месторождения Каражанбас и физико-химическими параметрами исследуемых проб жидкостей – концентрацией сероводорода, бикарбоната, сульфата и хлора в воде, pH воды и температурой местообитания. Обозначения библиотек: VW – волжская вода, DNS – вода из ДНС, PPN-K – вода из цеха первичной подготовки нефти (ЦППН) месторождения Каражанбас, остальные обозначения соответствуют номерам добывающих скважин.

При сопоставлении состава микроорганизмов и геохимических параметров местообитания методом канонического корреляционного анализа (рис. 3) показано, что векторы содержания сероводорода и бикарбоната являются сонаправленными. Вероятно, образование сероводорода в исследованных пробах пластовой воды протекает наряду с биодеградацией нефти с образованием углекислоты. Показана прямая зависимость присутствия термофильных сульфатредуцирующих бактерий классов *Thermodesulfobacteria* и *Firmicutes* от наличия сульфатов в пластовой воде и температуры местообитания. Присутствие мезофильных метаногенных архей филума *Euryarchaeota*, синтрофных *Deltaproteobacteria* и морских *Gammaproteobacteria* (рода *Marinobacter*) коррелировало с низкой температурой. Микробное сообщество волжской воды занимало обособленное положение и было представлено *Alpha*- и *Betaproteobacteria*, *Planctomycetes* и некультивируемыми бактериями.

Филогенетическое разнообразие накопительных культур сульфат-, тиосульфат- и нитратредуцирующих бактерий. Первичные накопительные культуры сульфатредуцирующих (DNS-SO₄), тиосульфатредуцирующих (DNS-S₂O₃) и денитрифицирующих/нитратредуцирующих (DNS-NO₃) бактерий, полученные посевом воды из ДНС на среды с соответствующими акцепторами электронов, были исследованы методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 гиперварибельного регио-

на гена 16S рРНК. Всего в каждой из библиотек было получено по 40 тысяч ридов, принадлежащих, в основном, представителям домена *Bacteria*. Сравнительный статистический анализ альфа разнообразия в библиотеках накопительных культур (DNS-NO₃, DNS-S₂O₃ и DNS-SO₄) и нагнетаемой воды из ДНС (DNS) показал, что покрытие по Гуд было высоким во всех библиотеках (98.4–99.9%) (табл. S3). В то же время количество операционных таксономических единиц, индексы ACE и CHAO были выше в библиотеке нагнетаемой воды из ДНС, по сравнению с полученными на ее основе накопительными культурами. Использование разных акцепторов и доноров электронов и создание селективных условий привело к резкому снижению общего разнообразия и доминированию небольшого количества филотипов наиболее приспособленных бактерий, что подтверждается значительным увеличением индекса доминирования Симпсона для библиотек из накопительных культур.

В культуре DNS-S₂O₃ присутствовали TCP бактерии родов *Dethiosulfovibrio* (13.2% от общего количества ридов в библиотеке) и *Desulfovibrio* (3.7%), а также бактерии рода *Vibrio* (67.9%), вероятно, растущие за счет брожения сахарозы или лактата (рис. S6). В культуре DNS-SO₄ были представлены CP бактерии родов *Pseudodesulfovibrio* (31.9%) и *Desulfocurvus* (2.4%), а также бактерии рода *Enterobacter* (41.1%), некультивируемые бак-

терии семейств *Enterobacteriaceae* (13.5%) и *Synergistaceae* (8.2%). В культуре DNS-NO₃, полученной в среде с нитратом и ацетатом, преобладали бактерии рода *Pseudomonas* (28.8%), характеризующиеся большим потенциалом в использовании углеводов нефти и денитрификации, а также *Arcobacter* (15.3%), *Vibrio* (12.1%) и *Celeribacter* (6.5%), способные восстанавливать нитрат до нитрита или до N₂. Таким образом, разнообразие бактерий в нагнетаемой воде из ДНС было велико. Использование разных доноров и акцепторов электронов приводило к доминированию разных компонентов сообщества, что может применяться для контроля состава микробных популяций в призабойной зоне нагнетательных скважин и увеличения целевых компонентов сообщества.

Восстановление сульфата и нитрата микроорганизмами пластовой воды при разной температуре. Для подавления коррозии, вызываемой сульфатредуцирующими прокариотами в нефтяных пластах, часто используется нагнетание нитрата, хотя известны примеры усиления коррозии в результате этого воздействия (Bødtker et al., 2009; Grigoryan et al., 2009; Gieg et al., 2011; Dunkun et al., 2017). Возможные механизмы подавления сульфидогенеза нитратом рассмотрены в публикациях (Gieg et al., 2011; Dolfing, Hubert, 2017). Они включают конкурентное подавление сульфатредукции денитрификацией, как энергетически более выгодным процессом окисления нефтяного органического вещества или использования H₂. Показано также, что нитрит, являющийся промежуточным продуктом денитрификации и нитратредукции, химически взаимодействует с сульфидом, окисляя его, а также ингибирует фермент диссимиляционную сульфитредуктазу у СРП, препятствуя образованию сульфида.

Для оценки влияния нитрата на образование сероводорода микроорганизмами месторождения Каражанбас пластовую воду высевали в среды, содержащие одновременно пары акцепторов электронов: SO₄²⁻ + NO₃⁻ и S₂O₃²⁻ + NO₃⁻ (рис. 4а). В отсутствие нитратов зарегистрировано образование сероводорода в посевах на среды для термофильных и мезофильных СР и ТСР микроорганизмов. Внесение нитрат-иона в концентрации от 0.5 до 1.5 г/л привело к снижению образования сероводорода большинством культур. В присутствии 2.0 г NO₃⁻/л, сероводород не накапливался в посевах СР и ТСР бактерий из месторождения Каражанбас. Возможной причиной могло быть ингибирование сульфитредуктазы нитрит-ионом, образуемым нитратредуцирующими бактериями, входящими в сообщество. Отметим, что одновременно с восстановлением тиосульфата или сульфата до сероводорода термофильные популяции из ЦППН и из скв. 5019 восстанавливали

нитрат до нитрита (40 и 70 мг/л соответственно) (рис. 4б). Вероятно, часть образующегося нитрита связывается с сульфидом, и реальная концентрация нитрита, образовавшегося в среде, занижена. Присутствие в пластовой воде мезофильных бактерий родов *Pseudomonas*, *Arcobacter*, *Halomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, способных восстанавливать нитраты до нитрита, позволяет надеяться на возможность подавления роста сульфидогенов при внесении нитрата в низкотемпературные пласты. Термофильные бактерии, ответственные за образование нитрита из нитрата в культурах из ЦППН и скв. 5019, пока находятся в процессе исследования. Отметим, что Ан и соавторы (An et al., 2017) не обнаружили бактерии, образующие нитрит, в составе термофильного сообщества из месторождения сланцевой нефти в Саскачеване (Канада), что препятствует использованию нитрата для подавления сульфатредукции в этом пласте. Вероятно, в ряде случаев для применения этой технологии необходимо внесение в пласт не только нитрата, но и нитратредуцирующих бактерий.

Приведенные результаты демонстрируют большое разнообразие сульфидогенных прокариот в низкосульфатной пластовой воде нефтяного месторождения Каражанбас. Поступление сульфатов в пласт, даже в низкой концентрации, может приводить к образованию сероводорода, вызывающего коррозию стального нефтепромыслового оборудования и ухудшение качества нефти. Из нефтяных пластов, различающихся температурой, получены накопительные культуры мезофильных и термофильных бактерий, способных продуцировать нитрит при восстановлении нитрата. Это свидетельствует о потенциальной возможности подавления роста сульфидогенных прокариот внесением нитрата в пласт. Необходимы дальнейшие исследования по определению оптимальных доз нитрата для термофильных и мезофильных сообществ. Поскольку помимо сульфидогенов в процессе коррозии могут участвовать популяции метаногенных и ацетогенных (например, рода *Acetobacterium*) прокариот, это существенно осложняет контроль микробной коррозии в нефтяном пласте.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Филиала ТОО «КМГ Инжиниринг» «КазНИПИМунайгаз» (договор № 314715/2019/1) и Министерства науки и высшего образования РФ. Биоинформатический анализ выполнен при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16-14-00028).

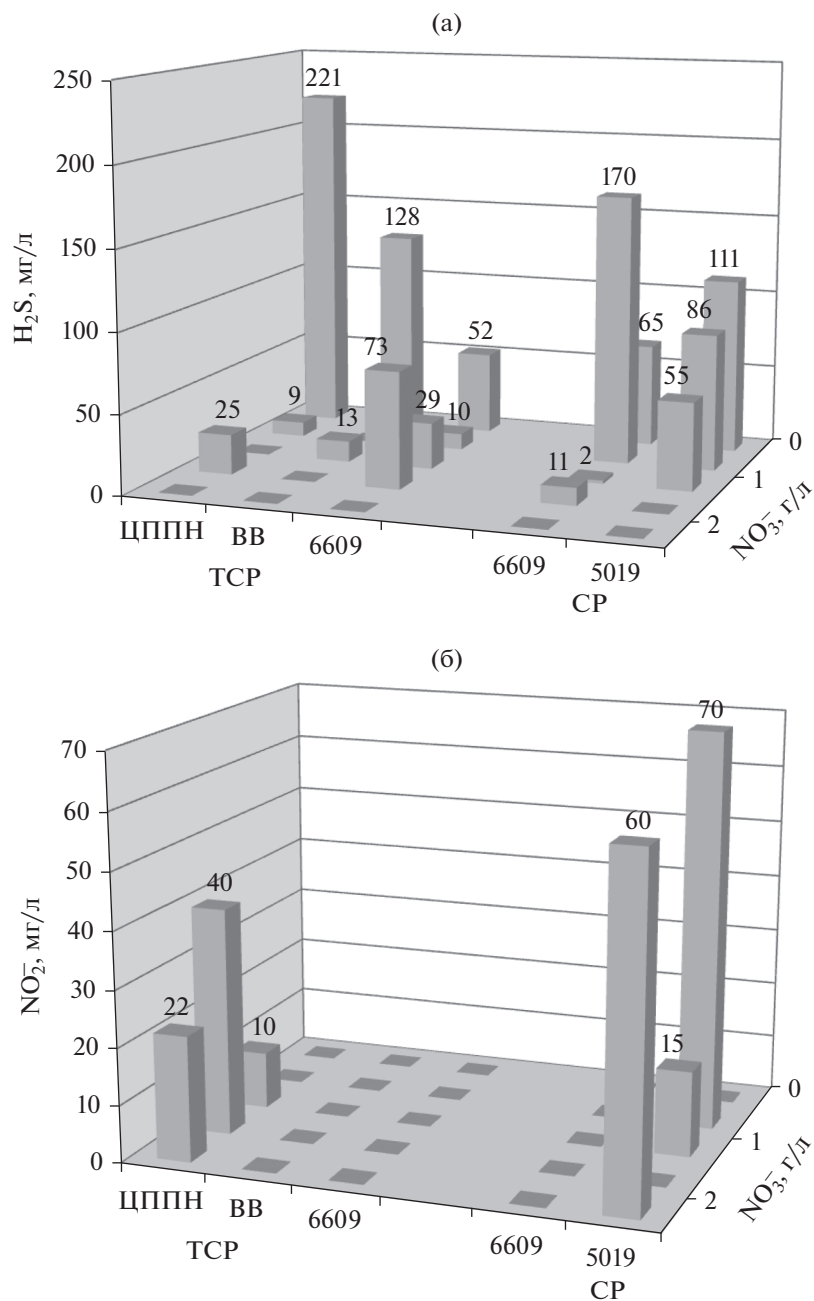


Рис. 4. Образование сероводорода (а) и нитрит-иона (б) тиосульфатредуцирующими (ТСП) и сульфатредуцирующими (СР) популяциями пластовой воды из скважин 6609 и 5019, волжской воды (ВВ) и воды из цеха первичной подготовки нефти (ЦППН) в средах с разным начальным содержанием нитрат-иона (г/л). Посевы воды из ЦППН и из скв. 5019 инкубировали при 55°С, из скв. 6609 и волжской воды – при 25°С. Продолжительность культивирования 14 сут.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мурзагалиев Р.С. Геологическая модель Каражанбасского месторождения высоковязкой нефти и современные геотехнологии ее извлечения. Автореферат дис. ... канд. геол.-мин. наук. М., 2009. 26 с.

Семенова Е.М., Груздев Д.С., Турова Т.П., Назина Т.Н. Физиология и геномные характеристики бактерии *Geotoga petraea*, выделенной из низкотемпературного

- нефтяного месторождения (Россия) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 645–654.
<https://doi.org/10.1134/S002636561906017X>
- Semenova E.M., Grouzdev D.S., Tourova T.P., Nazina T.N.* Physiology and genomic characteristics of *Geotoga petraea*, a bacterium isolated from a low-temperature oil reservoir (Russia) // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 662–670.
<https://doi.org/10.1134/S0026261719060171>
- 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. V. 8. Article 1164.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01164>
- Aüllo T., Ranchou-Peyruse A., Ollivier B., Magot M.* *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. Article 362.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00362>
- Beeder J., Nilsen R.K., Rosnes J.T., Torsvik T., Lien T.* *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60. P. 1227–1231.
- 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. V. 36. P. 439–450.
- 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. V. 69. P. 6143–6151.
- Davidova I.A., Marks C.R., Suflita J.M.* Anaerobic hydrocarbon-degrading *Deltaproteobacteria* // *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / Ed. McGenity T.J. Springer International Publishing AG, 2018. P. 1–38.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-60053-6_12-1
- Dolfing J., Hubert C.R.J.* Using thermodynamics to predict the outcomes of nitrate-based oil reservoir souring control interventions // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 2575.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02575>
- Duncan K.E., Gieg L.M., Parisi V.A., Tanner R.S., Tringe S.G., Bristow J., Suflita J.M.* Biocorrosive thermophilic microbial communities in Alaskan North Slope oil facilities // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43. P. 7977–7984.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Edgar R.C.* UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nature Methods*. 2013. V. 10. P. 996–998.
- Elumalai P., Parthipan P., Narenkumar J., Anandakumar B., Madhavan J., Oh B.-T., Rajasekar A.* Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment // *3 Biotech.* 2019. V. 9. Article 79.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1604-0>
- 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. V. 2. P. 6.
<https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
- Gieg L.M., Jack T.R., Foght J.M.* Biological souring and mitigation in oil reservoirs // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 92. P. 263–282.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>
- Grassia G.C., McLean K.M., Glénat P., Bauld J., Sheehy A.* A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1996. V. 21. P. 47–58.
- Grigoryan A.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. V. 48. P. 58–61.
- Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Sokolova D.S., Tourova T.P., Poltarau A.B., Nazina T.N.* Draft genome sequence of a fermenting bacterium, *Soehngenia* sp. strain 1933P, isolated from a petroleum reservoir in Azerbaijan // *Microbiol. Resour. Announc.* 2019. V. 8. Article e00689-19.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00689-19>
- 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. V. 28. P. 173–174.
- Khelifi N., Amin Ali O., Roche P., Grossi V., Brochier-Armanet C., Valette O., Ollivier B., Dolla A., Hirschler-Réa A.* Anaerobic oxidation of long-chain n-alkanes by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon, *Archaeoglobus fulgidus* // *ISME J.* 2014. V. 8. P. 2153–2166.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.58>
- Liang R., Davidova I.A., Marks C.R., Stamps B.W., Harri-man 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. V. 7. Article 988.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00988>
- Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C.* Microbiology of petroleum reservoirs // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2000. V. 77. P. 103–116.
<https://doi.org/10.1023/A:1002434330514>
- Mand J., Park H.S., Jack T.R., Voordouw G.* The role of acetogens in microbially influenced corrosion of steel // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Article 268.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00268>
- Metsalu T., Vilo J.* ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43 (W1). W566–W570.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>
- 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. Biotech. Micro.* 2017. V. 2. Article 555591.
<https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.02.555591>
- 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 Ecology Package*. 2007. V. 10. P. 631–637.
- Parthipan P., Elumalai P., Karthikeyan O.P., Ting Y.P., Rajasekar A.* A review on biodegradation of hydrocarbon and their influence on corrosion of carbon steel with special ref-

erence to petroleum industry // *J. Environ. Biotechnol. Res.* 2017. V. 6. P. 12–33.

Plugge C.M., Zhang W., Scholten J.C., Stams A.J.M. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. Article 81. doi: 10.3389/fmicb.2011.00081

Shestakova N.M., Ivoilov V.S., Tourova T.P., Belyaev S.S., Poltarau A.B., Nazina T.N. Which microbial communities are present? Application of clone libraries: syntrophic acetate degradation to methane in a high-temperature petroleum reservoir – culture-based and 16S rRNA genes characterization // *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems* / Eds. Whitby C., Skovhus T. Dordrecht: Springer, 2010. Ch. 6. P. 45–53. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9252-6_6

Stetter K.O., Huber R., Blochl E., Kurr M., Eden R.D., Fielder M., Cash H., Vance I. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs // *Nature.* 1993. V. 365. P. 743–745.

Suri N., Voordouw J., Voordouw G. The effectiveness of nitrate-mediated control of the oil field sulfur cycle depends

on the toluene content of the oil // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 956.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00956>

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. V. 9. Article e105592.

Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // *The Prokaryotes*, 2nd edn. / Eds. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. P. 3352–3378.

Widdel F., Musat F., Knittel K., Galushko A. Anaerobic degradation of hydrocarbons with sulphate as electron donor // *Sulphate-Reducing Bacteria. Environmental and Engineered Systems* / Eds. Barton L.L., Hamilton W.A. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. P. 265–303.

Youssef N., Elshahed M.S., McInerney M.J. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities // *Adv. Appl. Microbiol.* 2009. V. 66. P. 141–251.

[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00806-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00806-X)

Microbial Diversity and Potential Sulfide Producers in the Karazhanbas Oilfield (Kazakhstan)

D. Sh. Sokolova¹, E. M. Semenova¹, D. S. Grouzdev², A. P. Ershov¹, S. Kh. Bidzhieva¹, A. E. Ivanova¹,
T. L. Babich¹, M. R. Sissenbayeva³, M. A. Bisenova³, and T. N. Nazina^{1,*}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³KazNIPImunaygas, Branch of the Limited Liability Partnership “KMG Engineering”, Aktau, 130000 Kazakhstan

*e-mail: nazina@inmi.ru

Received February 26, 2020; revised March 15, 2020; accepted March 18, 2020

Abstract—Biogenic sulfide production in oilfields results in lower quality of oil and gas and in corrosion of oil-producing equipment. Bactericidal agents are not used at the Karazhanbas oilfield (Kazakhstan), since sulfate concentrations in both injected and formation water are low or zero. However, increasing corrosion of steel equipment and sulfide release into formation water were observed in the course of the oilfield development. The goal of the present work was to reveal the potential agents of microbial corrosion and to investigate the possibility to suppress development of sulfidogens using nitrate. Environmental conditions and the composition of microbial communities in production and injection water were studied for the sites with different temperatures. High-throughput sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene revealed predominance of thermophilic sulfate-reducing bacteria (genera *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Thermodesulforhabdus*, *Desulfoviregula*, *Defluviitoga*, and *Desulfonauticus*) and archaea (genus *Archaeoglobus*) at the high-temperature horizon, as well as of thiosulfate-reducing (genera *Thermoanaerobacter*, *Anaerobaculum*, and *Coprothermobacter*) and syntrophic bacteria, while abundance of methanogens (genera *Methanolinea* and *Methanothermobacter*) was low. Communities from low-temperature horizons contained mesophilic methanogens (genera *Methanococcus*, *Methanobacterium*, and *Methanotherrix*), thermophilic and mesophilic sulfate-reducing bacteria (genera *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina*, *Desulfoglaeba*, *Desulfotignum*, and *Desulfocurvus*), syntrophic bacteria (genus *Smithella*), and members of the genera *Marinobacter*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Arcobacter*, and *Halomonas*. Enrichment cultures of bacteria producing sulfide were obtained from formation water, as well as the cultures reducing nitrate to nitrite and suppressing growth of sulfate- and thiosulfate-reducing bacteria. These findings may indicate the possibility of using nitrate as a competitive inhibitor of sulfidogenesis in this oilfield. Corrosion-active hydrogen-utilizing methanogens and acetogens were also found, which implies the necessity for monitoring the oilfield microbial communities.

Keywords: oilfields, high-throughput sequencing, the 16S rRNA gene, sulfate-reducing prokaryotes, nitrate, nitrite