

АҢДАТПА

**6D060700 - Биология мамандығы бойынша философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация**

Тапешова Шаттық Жанібекқызы

**Ақінген кен орны пласт сулары микроорганизмдерінің биологиялық
қасиеттері және мұнайсұйылту потенциалы**

Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы: Диссертациялық жұмыс «Ақінген» кен орны мұнай пласт суларынан бөлініп алынған микроорганизмдердің биологиялық (морфология–дақылдық, физиология–биохимиялық) және молекулярлы–генетикалық қасиеттерін олардың филогенетикалық туыстық белгілерін анықтауға және микробтық мұнай шығаруды жоғарылатудың әдістерін (МШЖ) әзірлеу үшін мұнайсұйылту қасиеттерімен байланысты биосурфактанттардың түзілуіне жауапты *lchAA*, *rhlA*, *srfA* гендерін зерттеуге арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі: Әлемде ауыр және тұтқырлығы жоғары мұнайдың қоры шағын және орташа тұтқырлықтағы мұнайдың алынатын қорларының көлемінен 5 есе артық, сондықтан алынуы қиын мұнай әлемдік мұнай өндірудің негізгі қоры болып табылады.

Қазіргі уақытта Қазақстанның мұнай кен орындарының көпшілігі, ірі жобаларды қоспағанда, өндіру шыңынан өтіп үлгерді, соңғы игеру сатысында тұр және мұнайдың жоғары тұтқырлығы мен суландырылуымен сипатталады, бұл олардың қорларын қиын алынатын санатқа жатқызады, яғни Қазақстан мен барлық мұнай өндіруші елдердің проблемасы қорлардың болмауы емес, оларды жер бетіне шығарудың қиындығы болып табылады. Мұнай өндірудің біріншілік және екіншілік әдістерінен кейін жер қойнауында қалатын өнім кен орны пласттың сулану деңгейінің жоғары болуына байланысты 60-70% - ды құрайды.

Қазіргі уақытта ауыр көмірсутек шикізатын алу жөніндегі ғылыми, тәжірибелік және өнеркәсіптік зерттеулер ерекше өзекті болып табылады. Қиын өндірілетін мұнай қорларын экономикалық тұрғыдан тиімді игеру үшін мұнай өндірудің үшінші әдістері жасалады. Осындай тәсілдердің бірі орасан зор потенциалға ие микроорганизмдерді пайдалану болып табылады. пласттардан мұнай шығаруды арттырудың микробтық әдістері мұнай алуды 10-15% - ға арттыруға мүмкіндік береді, бұл жаңа кен орнының ашылуымен салыстыруға болады және ресурс үнемдейтін, экологиялық қауіпсіз технологияларға жатады.

Мұнай пласт суларында микроорганизмдердің тіршілік етуімен қатар мұнай сұйылтатын қосылыстардың пайда болуымен жүреді, бұл суландырылған пласттардан шикізатты алудың микробтық әдістерінің негізі болып табылады. Микроорганизмдердің жоғары биохимиялық белсенділігі олардың өмірлік маңызды өнімдерінің (газдар, беттік – белсенді заттар, қышқылдар, спирттер және т. б.) өнімділігін арттырады, мұнайсұйылтатын

және мұнайығыстыратын қасиеттері бар, бұл пласттардағы мұнайдың қозғалғыштығын арттыруға және шикізатты қосымша алуға ықпал етеді.

Зерттеу мақсаты: ҚР Атырау облысында орналасқан Ақінген кен орны пласт сулары микроорганизмдерінің морфология-дақылдық, физиология-биохимиялық және мұнайсұйылту қасиеттерін зерттеу.

Зерттеу жұмысының міндеттері:

1. «Ақінген» кен орнының мұнайпласт суларының физика-химиялық құрамын анықтау (жалпы минералдануы, рН, кермектілігі, негізгі тұздардың мөлшері).

2. «Ақінген» кен орнындағы мұнайласт суларының сандық және сапалық микробиологиялық құрамын анықтау.

3. Мұнай пласт суларынан бөлініп алынған микроорганизмдердің морфология–дақылдық және физиология–биохимиялық қасиеттерін анықтау.

4. *16S pPHK* нуклеотидтер тізбегінің негізінде микроорганизмдерге филогенетикалық идентификация жүргізу.

5. Мұнай пласттарынан бөлініп алынған микроорганизмдерден мұнай эмульгирлеуде қатысатын биосурфактанттар өнімін түзуге жауапты *lchAA*, *rhlA*, *srfA* гендерінің болуын анықтау.

6. Жоғары мұнайсұйылту және мұнайығыстыру қасиеттері бар микроорганизмдерді іріктеу.

7. Мұнайсұйылту және мұнайығыстыру қасиеттері жоғары микроорганизмдер ассоциацияларын құрастыру.

Зерттеу объектілері: Атырау облысында орналасқан уақытша тоқтатылған «Ақінген» кен орны пласт сулары және олардан бөлініп алынған 31 микроорганизм дақылдары пайдаланылды.

Зерттеу әдістері. Жұмыс барысында дәстүрлі микробиологиялық (Кох әдісі, микроскопия әдістері, перпендикулярлы штрихтау әдісі және т.б.), генетикалық (*16S pPHK* генінің фрагментін секвендеу) және физика-химиялық әдістер (Купер әдісі, потенциометриялық әдіс, спектрофотометриялық әдіс, электрометриялық әдіс, титриметриялық әдіс, комплексонометриялық әдіс, сұйық хроматография) қолданылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы: Алғаш рет «Ақінген» кен орнындағы мұнайпласт суларына сандық және сапалық микробиологиялық сипаттама берілді. Мұнай пласт суларының аэробты микрофлорасы $96,1 \times 10^7$ КТБ/мл құрайды, ал анаэробтардың мөлшері әлдеқайда аз – 14×10^4 КТБ/мл, сапалық құрамы псевдомонадтар мен бациллалармен көрсетілген, сонымен қатар *Bacillus* туысының өкілдері сандық жағынан басым (13×10^3 КТБ/мл). Бактериялардың 31 дақылы бөлініп алынды және идентификацияланды, оның ішінде 17 бацилдер дақылы: *B. subtilis subsp. spizizenii* S1; *Bacillus paramycoides* M1; *B. subtilis* A5; *B. haynesii* S3; *B. safensis* D7X; *Brevibacillus borstelensis* SR3, 9 штамм - *B. licheniformis* (A1, A2 A3, A4, S2, SR1, SR2, CL1, CL2); 2 штамм - *B. pumilus* (M2, D1X).

14 штамм псевдомонадтар - *P. aeruginosa* (D5; D6; D7; D1; D2; D3; D8; T1; T2; T3; T4; T5; T6; D4).

Алғаш рет *GenBank* халықаралық дерекқор базасында «Ақінген» кен орны мұнай пласт суларынан бөлінген бактериялардың 31 дақылының нуклеотидтік геномдарының тізбегі анықталып, жарияланды. Мұнайды эмульгирлеуге қатысатын биосурфактанттар өніміне жауапты гендердің (*lchAA*, *rhlA*, *srfA*) болуы көрсетілген:

srfA гені – 10 штаммдарында *P. aeruginosa* (D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1, T2, T4, T6);

rhlA гені – 12 штаммдарында *P. aeruginosa* (T2, T3, T4, T5, T6, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1);

lchAA гені – 10 бациллярлы дақылдарында: соның ішінде *B. haynesii* S3, *B. pumilus* M2 және 8 штамм *B. licheniformis* (A1, A3, A4, S2, CL-1, CL-2, SR-1, SR-2).

Алғаш рет «Ақінген» кен орны мұнай пласт сулары микроорганизмдерінің мұнайсұйылту потенциалы анықталды, соның ішінде, жоғары мұнай эмульгирлейтін қасиеттері бар микроорганизмдер (эмульгирлеу индексі 51% - дан жоғары) іріктеліп алынды және олардың негізінде мұнай шығаруды жоғарылатудың микробтық әдістерін әзірлеу үшін перспективті микробтық ассоциациялар құрастырылды.

Жұмыстың ғылыми – практикалық маңыздылығы:

Мұнай шығаруды жоғарылату әдістерін даярлау үшін «Ақінген» кен орны пласт суларының микроорганизмдері негізінде мұнайсұйылтатын және мұнайығыстыратын қасиеттері жоғары микроорганизмдердің перспективті ассоциациялары құрастырылды.

Бөлініп алынған микроорганизмдердің 31 дақылдары әл - Фараби атындағы ҚазҰУ көмірсутектотықтырғыш микроорганизмдер коллекциясына одан әрі биотехнологияда пайдалану үшін енгізілген.

«Ақінген» кен орны мұнай пласт суларан бөлініп алынған 31 бактерия дақылдары 16S rRNA нуклеотидтік тізбегі *GenBank*-те тіркелген және жарияланған, дақылдарға кіруіне арналған тіркеу нөмірі: *B. subtilis subsp. spizizenii* S1 - MW386842; *B. paramycooides* M1 - MW386841; *B. pumilus* M2 - MW386840; *B. licheniformis* A1 - MW386831; *B. licheniformis* A2 - MW386832; *B. licheniformis* A3 - MW386833; *B. licheniformis* A4 - MW386834; *B. subtilis* A5 - MW386835; *B. licheniformis* S2 - MW386843; *B. haynesii* S3 - MW386844; *B.pumilus* D1X - MW386836; *P. aeruginosa* D5 - MW386837; *B. licheniformis* CL1 - MW600501; *B. licheniformis* CL2 - MW600502; *B. safensis* D7X - MW600506; *B. licheniformis* SR1 - MW600508; *B. licheniformis* SR2 - MW600509; *Brevibacillus borstelensis* SR3 - MW600510; *P. aeruginosa* D8 - MW600507; *P. aeruginosa* D6 - MW386838; *P. aeruginosa* D7 - MW386839; *P. aeruginosa* D1- MW600503; *P. aeruginosa* D2 - MW600504; *P. aeruginosa* D3 - MW600505; *P. aeruginosa* T1 - MW617329; *P. aeruginosa* T2 - MW617330; *P. aeruginosa* T3 - MW617331; *P. aeruginosa* T4 - MW617332; *P. aeruginosa* T5 - MW617334; *P. aeruginosa* T6 - MW617335; *P. aeruginosa* D4 - MW617336.

Ғылыми зерттеу барысында алынған нәтижелер әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің «6M070100-Биотехнология» мамандығының «Экосистеманы қалпына келтірудің микробтық өнімдері және препараттар /

Микробные препараты и продукты восстановления экосистем» пәнінің оқу мазмұнына енгізілді (Қосымша А).

Қорғауға шығарылған негізгі қағидалар:

1. Ақінген кен орны мұнайпласт сулары бактерияларының 31 дақылы бөлініп алынды және фенотиптік, генетикалық қасиеттері негізінде идентификацияланды.

2. Ақінген кен орны мұнай-эмульгирлеуші микроорганизмдердің қасиеттері мұнайды эмульгирлеуге қатысатын биосурфактанттар өніміне жауапты *lchAA*, *rhlA*, *srfA* гендерінің болуымен байланысты.

3. Мұнай пласт суларынан бөлінген 16 микроорганизм дақылдарының, соның ішінде: *B. safensis* D7X, *B. subtilis* A5, *B. subtilis subsp. spizizenii* S1, 2 штамм - *B. pumilus* (D1X, M2), 5 штамм - *Bacillus licheniformis* (S2, SR1, SR2, CL1, CL2) және 6 штамм - *P. aeruginosa* (D5, D6, D7, D8, T2, T3) жоғары мұнайсұйылту және мұнайығыстыру қасиеттерге ие: эмульгирлеу индексі 51% - дан жоғары және меласса қосылған ортада белсенді газ түзуге және қышқылдандыруға қабілетті.

4. Суландырылған пласттардан қалдық мұнайды шығаруында микробтық әдістерін құрастыру үшін перспективті жоғары мұнайсұйылту және мұнайығыстыру қасиеттерге ие микроорганизмдер ассоциациялары алынды.

Зерттеудің негізгі нәтижелері мен тұжырымдары:

Жұмыста алынған нәтижелер келесі қорытынды жасауға мүмкіндік береді:

1. Ақінген кен орны мұнайласт сулары жоғары минералданған, натрий және хлор иондары басым, пласт суларының рН 6,34 және натрий-хлорлы түріне жатады.

2. Ақінген кен орны мұнайпласт суларының аэробты микрофлорасы $96,1 \times 10^7$ КТБ/мл құрайды, ал анаэробтардың құрамы едәуір аз – 14×10^4 КТБ/мл, сапалық құрамы псевдомонадтар мен бациллалармен көрсетілген, сонымен қатар *Bacillus* туысының өкілдері сандық жағынан басым (13×10^3 КТБ/мл).

3. Ақінген кен орны мұнайпласт суларының 31 микроб дақылы бөлініп алынды және морфология–дақылдық, физиология–биохимиялық қасиеттері және *16S rRNA* ген нуклеотидтік тізбегі негізінде идентификацияланды, соның ішінде 14 штамм *P. aeruginosa* (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, T1, T2, T3, T4, T5, T6); 17 бацилдер дақылдары – *B. subtilis subsp. spizizenii* S1; *B. paramycoides* M1; *B. subtilis* A5; *B. haynesii* S3; *B. safensis* D7X; *Brevibacillus borstelensis* SR3, *B. pumilus* (M2, D1X); 9 штамм *B. licheniformis* (A1, A2, A3, A4, S2, SR1, CL1, CL2, SR2).

Мұнай пласт суларынан бөлініп алынған 31 бактерия дақылдары 16S rRNA нуклеотидтік тізбегі *GenBank*-те тіркелген және жарияланған, дақылдарға кіруіне арналған тіркеу нөмірі: *B. subtilis subsp. spizizenii* S1 - MW386842; *B. paramycoides* M1 - MW386841; *B. pumilus* M2 - MW386840; *B. licheniformis* A1 - MW386831; *B. licheniformis* A2 - MW386832; *B. licheniformis* A3 - MW386833; *B. licheniformis* A4 - MW386834; *B. subtilis* A5 - MW386835; *B. licheniformis* S2 - MW386843; *B. haynesii* S3 - MW386844; *B. pumilus* D1X - MW386836; *P. aeruginosa* D5 - MW386837; *B. licheniformis* CL1 - MW600501; *B. licheniformis* CL2 - MW600502; *B. safensis* D7X - MW600506; *B. licheniformis* SR1 -

MW600508; *B. licheniformis* SR2 - MW600509; *Brevibacillus borstelensis* SR3 - MW600510; *P. aeruginosa* D8 - MW600507; *P. aeruginosa* D6 - MW386838; *P. aeruginosa* D7 - MW386839; *P. aeruginosa* D1- MW600503; *P. aeruginosa* D2 - MW600504; *P. aeruginosa* D3 - MW600505; *P. aeruginosa* T1 - MW617329; *P. aeruginosa* T2 - MW617330; *P. aeruginosa* T3 - MW617331; *P. aeruginosa* T4 - MW617332; *P. aeruginosa* T5 - MW617334; *P. aeruginosa* T6 - MW617335; *P. aeruginosa* D4 - MW617336.

4. Бактериялардың мұнай эмульгирлеу қасиеттеріне жауапты гендердің бар екені анықталды: *srfA* гені – *Pseudomonas aeruginosa* (D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1, T2, T4, T6) 10 штамдарында; *rhlA* гені – *Pseudomonas aeruginosa* (T2, T3, T4, T5, T6, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D1) 12 штамдарында; *lchAA* гені 10 бациллярды бактерия дақылдарында: *B. haynesii* S3 *B. pumilus* M2 және 8 штамм *B. licheniformis* (A1, A3, A4, S2, SR1, SR2, CL1, CL2).

5. Меласса қосылған E8 ортасында жоғары мақсатты белсенділікке ие микроорганизмдердің 16 дақылы іріктелді: эмульгирлеу индексі 51 % - дан жоғары, белсенді газ түзілуіне және ортаны қышқылдандыруға қабілетті.

6. Белсенділігі жоғары микроорганизмдер ассоциацияларын құрастыру үшін 16 дақылдың антагонистік қарым-қатынастарын зерттеу негізінде микроорганизмдердің 5 дақылы іріктелді: *P. aeruginosa* D5 – мұнайэмульгирлеуші, қышқыл түзгіш, газ түзгіш, *P. aeruginosa* D6 - мұнайэмульгирлеуші, қышқыл түзгіш, газ түзгіш, *Bacillus sp.* D1X - мұнайэмульгирлеуші, газ түзгіш, *B. licheniformis* SR1 –қышқыл түзгіш, газ түзгіш және *B. licheniformis* CL1 –қышқыл түзгіш, газ түзгіш.

7. Зерттелген 12 микроорганизм ассоциацияларынан 6 мақсатты қасиеттердің 4 көрсеткіші сәйкес болуы – мұнайэмульгирлеу, қышқыл- және газ түзілуі аэробты және анаэробты жағдайда микроорганизмдердің келесі 5 ассоциациясы іріктелінді, соның ішінде: 2 монодақылдан тұратын 2 ассоциация - D6: SR1; D6:CL1; 3 монодақылдан тұратын 2 ассоциациясы – D6:SR1:CL1; D6:CL1:D1X және 4 монодақылдан тұратын 1 ассоциация – D6:SR1:CL1:D1X.

Диссертацияда алға қойылған міндеттердің барлығы орындалды.

Автордың жеке үлесі. Зерттелетін мәселеге қатысты әдеби деректерге талдау, жұмыстың мақсат міндеттерін анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді статистикалық өңдеу және талдау, диссертацияны жазу мен қол жазбаны рәсімдеу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың мемлекеттік ғылыми зерттеу бағдарламаларымен байланыстылығы. Диссертациялық жұмыс АР 05134797 «Микробиологиялық әдіспен пласттардан мұнайдың шығуын жоғарылатудың технологиялық сызбасын құру» № 188РК00166 (2018-2020 жж) жоба аясында орындалды.

Жұмыстың сыннан өтуі. Диссертациялық жұмыстың нәтижелері төмендегідей халықаралық ғылыми конференциялар мен симпозиумдарда баяндалды және талқыланды:

- «XXI ғ. Ғылымның дамуы» XXXV Халықаралық ғылыми конференциясы, 16 мамыр 2018 ж, Харьков, Украина;

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» VI Халықаралық ғылыми конференциясы, 2-10 сәуір 2019 ж, Алматы, Қазақстан;

- Қазақстан Республикасының жастар жылына арналған «Биоәртүрлілік және биотехнологиядағы өзекті мәселелер» Халықаралық ғылыми-тәжірибиелік конференциясы, 1 қазан 2019 ж, Нұр-Сұлтан, Қазақстан;

Басылымдар. Диссертацияның негізгі нәтижелері баспадан шыққан 9 ғылыми еңбекте жарияланды, оның ішінде 3 мақала Қазақстан Республикасы Білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті ұсынған отандық мерзімді журналдарда; 1 мақала *Scopus* дерекқор қорына енетін жоғары деңгейдегі ғылыми журналда; 4 тезис отандық халықаралық конференция материалдарында; 1 мақала шетелдік халықаралық конференция материалдарында жарияланды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Диссертациялық жұмыс 110 мәтіндік бетте жазылды. Оның құрамына нормативтік сілтемелер, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 200 пайдаланылған әдебиеттер тізімі кіреді. Диссертация құрамында 21 – сурет, 22 – кесте, 2 – қосымша бар.