

## РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ СТЕПЕНИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ НЕФТИ ИЗ КАРБОНАТНЫХ НЕФТЯНЫХ КОЛЛЕКТОРОВ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Т.Н. Назина\*, Н.К. Павлова\*, Ю.В. Татаркин\*, Н.М. Шестакова\*, Т.Л. Бабич\*,  
Д.Ш. Соколова\*, В.С. Ивойлов\*, Т.П. Турова\*, М.Р. Хисаметдинов\*\*, Р.Р. Ибатуллин\*\*,  
С.С. Беляев\*, М.В. Иванов\*

\* ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук,  
Москва

\*\* Татарский научно-исследовательский и проектный институт нефти  
(ТатНИПИнефть), Бугульма

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с интенсивной разработкой нефтяных месторождений с песчаными коллекторами и легкой кондиционной нефтью в составе остаточных запасов возрастает доля нефти, залегающей в карбонатных коллекторах. Существующие методы позволяют извлекать около половины геологических запасов нефти из терригенных нефтяных пластов, тогда как из карбонатных коллекторов извлекается не более 20% нефти [1].

Микроорганизмы, обитающие в нефтяных пластах, способны образовывать нефтевытесняющие метаболиты, такие как полимеры, поверхностно-активные вещества, газы, кислоты и растворители. Активность микрофлоры может быть основана на биодegradации введенных питательных веществ (типа мелассы) или на биодegradации части остаточной нефти в пласте.

Микробные технологии повышения нефтеотдачи применялись в основном на нефтяных месторождениях с песчаными коллекторами и легкой нефтью [1–3]. Актуальна разработка биотехнологий повышения нефтеизвлечения из карбонатных нефтяных пластов, характеризующихся сложными геологическими, петрофизическими и гидродинамическими условиями и высоковязкой сернистой нефтью [4].

Выбор биотехнологии повышения нефтеизвлечения основывается на оценке масштабов современных биогеохимических процессов и условий конкретного нефтяного пласта. Микроорганизмы карбонатных нефтяных пластов относительно мало изучены [5–8]. Наряду с этим выполнен ряд экспериментов по повышению нефтеизвлечения из карбонатных коллекторов, основанных на нагнетании мелассы и сбраживающих ее бактерий родов *Clostridium* или *Bacillus* в пласт [1, 3]. В период 1991–1995 гг.

сотрудниками ИНМИ РАН, немецкими исследователями и специалистами ОАО «Татнефть» были проведены испытания биотехнологии повышения нефтеизвлечения на залежи 302 с карбонатными коллекторами Ромашкинского нефтяного месторождения. В ходе испытаний были детально охарактеризованы физико-химические условия, численность микроорганизмов основных метаболических групп и скорости биогенных процессов в залежи 302 [8–10, 12, 13]. Из залежи 302 выделены высокоактивные штаммы *Clostridium tyrobutyricum*, сбраживающие мелассу с образованием большого количества летучих кислот, низших спиртов, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub> [12–14]. В результате интродукции в нефтяной пласт суспензии *C. tyrobutyricum* и мелассы было получено 4806 т дополнительной нефти, или 4.58 т дополнительно добытой нефти на 1 т закачанной мелассы [12, 10, 3].

Внесение мелассы в карбонатный коллектор способствовало росту бродильных бактерий, образующих нефтевытесняющие метаболиты, которые в свою очередь нередко использовались сульфатредуцирующими бактериями. Образующий сульфидогенами сероводород вызывает коррозию металлического нефтепромыслового оборудования и приводит к ухудшению качества нефти.

Целью настоящей работы была разработка метода воздействия на пластовую микрофлору, сочетающего стимуляцию роста бродильных бактерий и подавление роста сульфидогенов, на основе изучения разнообразия и активности микроорганизмов в карбонатных нефтяных пластах Татарстана.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования была залежь 302 с карбонатными коллекторами Ромашкинского нефтяного месторождения (Татарстан). Залежь характеризуется сложными геологическими, петрофизическими и гидродинамическими условиями [12, 14]. Залежь располагается на глубине 493–515 м ниже уровня моря, имеет температуру 17–23 °С. Нефть залежи – вязкая, смолистая, парафинистая и высокосернистая; состоит в основном из парафиновых, нафтеновых и ароматических углеводородов. Плотность нефти около 0.95 г/см<sup>3</sup>, а вязкость 83–85 мПа·с. Попутный газ содержит метан (9.5%), этан (31.8%), пропан (14.5%), бутаны (7.5%), пентаны (3%), гексан и высшие гомологи (0.9%), азот (29.8%), углекислоту (2.7%), сероводород (0.3%). Пластовая вода залежи 302 относится к хлоркальциевому и хлормagneиевому типу, содержит высокие концентрации сульфатов, рН варьирует от 6.8 до 7.9. Залежь эксплуатируется с 1975 г. С 1981 г. для

поддержания пластового давления осуществляется нагнетание в залежь пресной речной воды, обычно выполняемое в период с мая по сентябрь.

Пробы пластовой воды и нефти отбирали на устье добывающих скважин. Пластовую жидкость помещали в стерильные герметично закрывающиеся бутылки. Посевы производили в день отбора проб. Пробу пластовой воды (1 л) на молекулярно-биологический анализ фиксировали этиловым спиртом (1:1, об.) непосредственно у скважины в момент отбора. Пробы для определения химического состава пластовой воды и молекулярно-биологических исследований хранили при 6 °С. Всего было отобрано 10 проб пластовой воды из залежи 302.

**Состав сред и условия культивирования микроорганизмов.** Для изучения микроорганизмов карбонатных нефтяных пластов использовали микробиологические [14], молекулярно-биологические [15] и радиоизотопные методы [16, 17]. Численность микроорганизмов основных физиологических групп (аэробные органотрофы и углеводородокисляющие, сульфатредуцирующие, бродильные и метанобразующие) определяли путем посева пластовой воды в жидкие среды методом десятикратных разведений в двух-четырёх повторностях. Посевы инкубировали при 20–22 °С в течение 15 суток и затем анализировали специфические микробные метаболиты. Метан, водород, углекислоту, сероводород и летучие жирные кислоты определяли методами, приведенными ранее [16]. Скорости сульфатредукции и метаногенеза в изолированных пробах пластовой воды определяли радиоизотопными методами, используя меченые  $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{O}_4$ ,  $^{14}\text{CH}_3\text{-COONa}$  и  $\text{NaN}^{14}\text{CO}_3$  с удельной активностью 7.1, 0.49 и 1.4 МБк/мл соответственно. Опыты ставили в двух-трех повторностях. Радиоизотопные измерения выполняли на сцинтилляционном счетчике RackBeta (ЛКВ, Финляндия). Количество метана, образовавшегося из бикарбоната и ацетата, и скорость сульфатредукции определяли, как указано в статье [17].

**Эксперименты по выявлению влияния перекиси водорода и нитратов на рост микроорганизмов нефтяного пласта** проводили по единой схеме. В пенициллиновые флаконы объемом 20 мл, содержащие 8.5 мл соответствующей питательной среды, вносили 1 мл раствора перекиси водорода (из расчета 0, 50, 100, 150, 200 и 300 мкг  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мл среды) или 1 мл раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (из расчета 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 г/л среды) и 0.5 мл посевного материала (накопительную культуру аэробных органотрофных, углеводородокисляющих, бродильных, сульфатредуцирующих или метанобразующих

микроорганизмов из карбонатного нефтяного пласта). Газовая фаза для аэробных бактерий была представлена воздухом, для анаэробных бактерий – аргонном или  $H_2 + CO_2$  (4:1, об./об.). Опыты проводили в двух повторностях. Для каждой концентрации перекиси водорода использовали 3 контроля: среда с посевным материалом, инкубируемая при 4 °С; среда без посевного материала, инкубируемая при 20–22 и 4 °С. Посевы инкубировали при 20–22 °С в течение 5 суток, затем оценивали жизнеспособность микроорганизмов путем высева на среду того же состава методом предельных разведений (до  $10^{-3}$  разведения). Рост контролировали микрофотографированием и посредством анализа микробных метаболитов ( $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $CH_4$ ), как описано ранее [16].

**Влияние различных концентраций  $NO_3^-$  на рост анаэробных бродильных бактерий** изучали путем посева в среду с пептоном и глюкозой [14] первичных накопительных культур, полученных на той же среде из пластовой воды добывающей скважины 26480 залежи 302. Рост бродильных бактерий в присутствии нитратов оценивали микрофотографированием и по образованию  $H_2$  в газовой фазе.

**Влияние  $NO_3^-$  на рост сульфатредуцирующих прокариот** оценивали путем засева среды [18] с лактатом натрия первичной накопительной культурой сульфидогенов, полученной из добывающей скважины 36275 залежи 302. Рост бактерий в присутствии нитратов оценивали по образованию сероводорода в водной фазе и микрофотографированием.

**Влияние  $NO_3^-$  на рост метаногенов** исследовали путем засева среды [19], содержащей ацетат (2.2 г/л) и/или  $H_2+CO_2$ , накопительной культурой метаногенов, полученной из добывающей скважины 36275. Рост метаногенов оценивали по образованию метана в газовой фазе газохроматографическим методом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Экологические условия и микробные процессы в нефтяных пластах с карбонатными коллекторами**

По химическому составу исследованные пластовые воды залежи 302 Ромашкинского нефтяного месторождения относятся к хлоркальциевому и хлормagneиевому типу, имеют минерализацию от 18.2 до 28.8 г/л, рН варьирует от 6.8 до 7.9 (табл. 1). Залежь 302 представляет собой восстановленную экосистему, пластовые воды которой содержат высокие концентрации сероводорода.

Вследствие высоко восстановленной обстановки в залежи 302 микробное сообщество было лишено аэробных микроорганизмов (рис. 1). В залежи преобладали

сульфатредуцирующие бактерии ( $10^3$ – $10^6$  кл/мл) и бактерии с броодильным типом метаболизма ( $10^2$ – $10^4$  кл/мл). Численность метаногенов, определяемая в среде с  $H_2+CO_2$ , достигала  $10^4$  кл/мл, в среде с ацетатом – сотен клеток в 1 мл. Денитрифицирующие бактерии выявлены при посеве пластовой воды в среды с фенолом и нитратом (скважина 36275) и бензоатом и нитратом (скважины 26426, 26480).

Высокое содержание сульфатов и сульфатредуцирующих бактерий в пластовой воде и другие благоприятные экологические условия (рН, Eh, умеренная соленость вод) обусловили доминирование процесса сульфатредукции в залежи 302 (табл. 1). Скорость сульфатредукции варьировала от 2.28 до 25.80  $мкг S^{2-} л^{-1} сут^{-1}$ . Образование метана из бикарбоната не было зарегистрировано, скорость метаногенеза из ацетата варьировала от 0.006 до 0.395  $мкг CH_4 л^{-1} сут^{-1}$ .

#### **Биоразнообразие микроорганизмов в пластовых водах карбонатной нефтяной залежи 302 на основе анализа библиотеки клонов генов 16S рНК**

Впервые исследовано биоразнообразие микроорганизмов в пластовой воде низкотемпературного карбонатного нефтяного пласта. На основе ДНК, выделенной из пластовой воды, были созданы библиотеки клонов генов 16S рНК представителей доменов *Bacteria* (107 клонов) и *Archaea* (67 клонов). Впервые при исследовании карбонатных нефтяных пластов в библиотеке бактериальных клонов обнаружены гены 16S рНК сульфатредуцирующей бактерии *Desulfoglaeba alkanexedens* (50 из 107 бактериальных клонов), способной расти на н-алканах, а также флотипы бактерий родов *Desulfomicrobium*, *Desulfovibrio* и *Desulfosarcina* (суммарно 10 клонов). Полученные результаты свидетельствует о возможности как одностадийной, так и многостадийной анаэробной биodeградации нефти с участием сульфатредуцирующих бактерий в карбонатном нефтяном пласте. Часть выявленных последовательностей (23 клон) была близка генам 16S рНК аэробных бактерий родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brachymonas* и *Thiofaba*.

Нуклеотидные последовательности архей, выявленные в библиотеке клонов пластовой воды (67 клонов), принадлежали неизвестным группам архей. Гены 16S рНК, выявленные в накопительной культуре, растущей на нефти с образованием метана, принадлежали метаногенам родов *Methanolobus* и *Methanoplanus*.

Молекулярные исследования микробного сообщества карбонатного нефтяного пласта подтвердили присутствие микроорганизмов, осуществляющих тесную связь биогеохимических циклов углерода и серы в этом подземном местообитании.

### **Биотехнологический потенциал микроорганизмов из карбонатных нефтяных пластов**

Из нефтяных пластов с карбонатными коллекторами (Татарстан) были выделены накопительные культуры микроорганизмов разных физиологических групп. Исследованные микроорганизмы практически не росли аэробно и анаэробно на тяжелой сернистой нефти из залежи. Основные группы микроорганизмов, представляющие интерес для разработки технологии повышения нефтеизвлечения из карбонатной нефтяной залежи, включают бактерии с бродильным типом метаболизма, денитрифицирующие и метанобразующие микроорганизмы.

Известные биотехнологии, применявшиеся ранее на карбонатных нефтяных коллекторах, заключаются в основном в нагнетании мелассы и сбраживающих ее микроорганизмов [3, 10, 12–14]. Используется также нагнетание нитрата для борьбы с сульфатредуцирующими бактериями [3, 20–22]. Сотрудники ИНМИ РАН и ОАО «Татнефть» предложили новый способ повышения нефтеизвлечения пластов, который заключается в нагнетании раствора перекиси водорода в качестве возможного акцептора электронов для окисления углеводородов нефти [23].

Суть метода сводится к использованию иных, чем кислород воздуха, источников кислорода для окисления нефти. Вместо водно-воздушной смеси в нефтяной пласт предлагается вносить раствор перекиси водорода, который под воздействием микроорганизмов и химически будет разлагаться в пласте с образованием молекулярного кислорода. С нагнетаемой водой перекись водорода будет проникать глубоко внутрь пласта и способствовать развитию микробных процессов не только в призабойной зоне нагнетательных скважин, как это происходит в случае нагнетания воздуха. Замена воздуха на  $H_2O_2$  позволит отказаться от использования компрессоров для подачи воздуха. Применение раствора перекиси водорода позволит использовать уже имеющееся оборудование нагнетательных станций (насосы). Экспериментальное подтверждение положительного воздействия раствора перекиси водорода на вытеснение нефти получено на терригенной нефтяной залежи Ганси с песчаными коллекторами (КНР) [24]. Раствор

перекиси водорода может быть использован также для подавления роста прокариот на отдельных участках нефтяного пласта.

Для выбора биотехнологии повышения извлечения нефти из карбонатных нефтяных коллекторов было необходимо выяснить влияние перекиси водорода, нитратов и мелассы на функционирование разных компонентов микробной пищевой цепи.

**Влияние мелассы на рост микроорганизмов залежи 302.** Ранее было показано, что нагнетание 4%-ного раствора мелассы способствует активации жизнедеятельности микроорганизмов залежи 302 [12–14]. Обогащение пластового микробного сообщества суспензией штамма *Clostridium tyrobutyricum* давало селективное преимущество бродильным бактериям, которые сбраживали мелассу с образованием большого количества летучих кислот, низших спиртов, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>. В результате биотехнологического воздействия было получено 4806 т дополнительной нефти из залежи, или 4.58 т дополнительно добытой нефти на 1 т закачанной мелассы [12, 10, 3]. При этом нередко продукты брожения мелассы использовались не только метаногенами, но и сульфидогенами, что приводило к накоплению сероводорода в пластовой воде [10].

В лабораторных условиях при посеве пластовой воды из залежи на среды для бродильных бактерий с мелассой или сахарозой (основным компонентом мелассы) мы наблюдали образование спиртов (этанол, метанол), органических кислот (ацетат, пропионат) и газов (H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>), являющихся нефтевытесняющими агентами, рН среды снижался до 4.55 (табл. 2). В культурах бродильных бактерий на продуктах брожения мелассы наблюдали микробную сукцессию. На 15–20 сутки инкубации пластовой воды в среде с мелассой было зарегистрировано небольшое количество метана в газовой фазе, но присутствие сульфатов в среде обусловило доминирование процесса сульфатредукции, энергетически более выгодного, чем метаногенез. Таким образом, стимулирование роста аметаногенов в пластовой воде залежи 302, содержащей от 1 до 6 г сульфатов в 1 л, маловероятно. Популяция денитрифицирующих бактерий, способных конкурировать за субстрат с сульфидогенами, в пластовых водах также была малочисленна вследствие высокой концентрации сероводорода залежи. Представлялось необходимым не только стимулировать рост бродильных бактерий посредством внесения мелассы, но и подавлять жизнедеятельность сульфидогенных прокариот нефтяного пласта.

**Влияние перекиси водорода на рост микроорганизмов залежи 302.** Как показано ниже, раствор перекиси водорода не может использоваться для подавления роста

сульфидогенов, поскольку в первую очередь подавляет жизнедеятельность бродильных бактерий. Раствор  $H_2O_2$  в концентрации от 0 до 75 мг/л не влиял на рост аэробных органотрофов, численность которых после инкубации с перекисью превышала  $10^3$  кл/мл. Повышение содержания  $H_2O_2$  в среде сопровождалось снижением численности аэробов до десятков-сотен кл/мл (рис. 2). Численность углеводородокисляющих бактерий оставалась высокой (более  $10^3$  кл/мл) в интервале концентрации  $H_2O_2$  от 0 до 25 мг/л.

Жизнеспособные клетки бродильных бактерий обнаруживались в контрольном варианте без перекиси и в присутствии 10 мкг  $H_2O_2$ /мл среды, где их численность превышала  $10^3$  кл/мл (рис. 2). В пробах с начальной концентрацией более 25 мкг  $H_2O_2$ /мл жизнеспособные клетки бродильных микроорганизмов не были выявлены, и образование молекулярного водорода не было зарегистрировано.

Сульфатвосстанавливающие бактерии проявляли высокую устойчивость к наличию перекиси водорода в среде. Они росли и продуцировали сероводород при начальной концентрации 100 мкг  $H_2O_2$  /мл среды. В присутствии 150 мкг  $H_2O_2$ /мл среды сероводород не образовывался, хотя сульфатвосстанавливающие бактерии при этом сохраняли жизнеспособность. Накопительные культуры метаногенов проявляли высокую чувствительность к наличию перекиси водорода в среде. Накопительная культура из залежи 302 продуцировала метан в среде, содержащей не более 100 мкг  $H_2O_2$ /мл среды. Устойчивость сульфидогенов и метаногенов к перекиси объясняется тем, что значительная часть внесенной  $H_2O_2$  использовалась на окисление восстановителя  $Na_2S \cdot 9H_2O$ , концентрация которого в средах составляла 0.2 и 0.5 г/л соответственно.

Проведенные исследования выявили различное отношение пластовых микроорганизмов к наличию перекиси водорода в среде. Раствор  $H_2O_2$  стимулировал рост аэробных органотрофных, и в том числе углеводородокисляющих бактерий. Сульфатредуцирующие прокариоты и метаногены росли в среде, содержащей не более 100 мкг  $H_2O_2$ /мл среды. Учитывая гидродинамические условия в заводняемом нефтяном пласте, можно ожидать, что в призабойной зоне нагнетательных скважин в момент внесения раствора перекиси водорода основные микробные процессы будут подавлены, хотя большинство микроорганизмов сохраняют жизнеспособность. В пласте концентрация  $H_2O_2$  будет снижаться в результате ее разбавления и использования на химическое окисление сероводорода пластовой воды и рост аэробной микробиоты. Необходимы дальнейшие исследования для определения целесообразности нагнетания  $H_2O_2$  в

карбонатные нефтяные пласты, содержащие высокие концентрации сероводорода в пластовой воде.

**Влияние нитратов на рост микроорганизмов залежи 302.** Для борьбы с сульфатредуцирующими прокариотами широко используются нитраты [3, 20–22]. Нагнетание нитратов стимулирует рост автотрофных нитратредуцирующих сульфидокисляющих бактерий и гетеротрофных нитратредуцирующих бактерий в пласте. Нитратредуцирующие бактерии являются основными конкурентами сульфатредуцирующих бактерий за доступный субстрат. Такое «конкурентное исключение» обеспечивает основной механизм ингибирования сульфатредукции. Однако показано, что некоторые штаммы сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio desulfuricans* способны расти также за счет нитратредукции. В полевых экспериментах по подавлению сульфатредуцирующих прокариот в песчаных нефтяных коллекторах в пласт нагнетали воду, содержащую 100–150 мг нитратов в 1 л, что приводило к снижению содержания сероводорода в пластовой воде [20, 22].

В проведенных нами исследованиях внесение 1–4 г  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на 1 л среды не влияло на рост накопительных культур бродильных бактерий и метаногенов (рис. 3). Сульфатредуцирующие бактерии из залежи 302 (скважина 36275) образовывали сероводород в среде, содержащей не более 1 г  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ /л. Нитраты в концентрации 1.5 г/л оказывали бактерицидное действие на рост сульфатредуцирующих бактерий из залежи.

Таким образом, в условиях карбонатного нефтяного пласта для подавления жизнедеятельности сульфидогенов необходимо вносить в 10 раз больше нитратов, чем в терригенные нефтяные пласты с низкосульфатными пластовыми водами.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности применения на карбонатной нефтяной залежи 302 Ромашкинского нефтяного месторождения биотехнологии повышения нефтеизвлечения, основанной на активации бродильных и метанобразующих микроорганизмов нефтяного пласта, путем нагнетания мелассы (4–6 об. %) и минеральных солей азота и фосфора. Применение биотехнологии позволит получать нефтевытесняющие метаболиты (растворители, органические кислоты, газы и биополимеры) непосредственно в порах нефтяного пласта. Для подавления жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий рекомендовано предварительное периодическое нагнетание в пласт нитратов в концентрации 1.5 г/л нагнетаемой воды.

Биотехнология является экологически чистой, технологически простой и безопасной для окружающей среды.

Работа выполнена по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН № 24, тема: “Научное обоснование и разработка биотехнологии повышения извлечения яжелой и остаточной нефти из карбонатных нефтяных коллекторов”.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н., Розанова Е.П., Глумов И.Ф., Ибатуллин Р.Р., Иванов М.В.* Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения // Микробиология. 2004. Т. 73, № 5. С. 687–697.
2. *Ivanov M.V., Belyaev S.S.* Microbial activity in waterflooded oil fields and its possible regulation // Proc. 1982 Int. Conf. on Microbial enhancement of oil recovery. Oklahoma. Shangri La, Alton. 1982. P. 48–57.
3. *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.
4. *Ибатуллин Р.Р., Хисамов Р.С., Кандаурова Г.Ф., Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н.* Применение современных микробиологических технологий увеличения нефтеотдачи на объектах НГДУ «Лениногорскнефть» // Нефт. хоз-во. 2005. Т. 7. С. 42–45.
5. *Розанова Е.П., Быков В.Н., Балдина А.Л., Косогорова Т.А.* Биогенные элементы и сульфатредукция в заводняемом нефтяном карбонатном пласте // Микробиология. 1976. Т. 45, вып. 2. С. 365–368.
6. *Tanner R.S., Udegbumam E.O., McInerney M.J., Knapp R.M.* Microbially enhanced oil recovery from carbonate reservoirs // Geomicrobiol. J. 1991. V. 9. P. 169–195.
7. *Adkins J.P., Cornell L.A., Tanner R.S.* Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids // Geomicrobiol. J. 1992. V. 10. P. 87–97.
8. *Назина Т.Н., Иванова А.Е., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В.* Микробиологические исследования карбонатного коллектора Ромашкинского нефтяного месторождения в связи с испытанием биотехнологии повышения нефтеотдачи. Предварительные исследования // Микробиология. 1998. Т. 67, № 5. С. 701–709.
9. *Назина Т.Н., Иванова А.Е., Ивойлов В.С., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В.* Микробиологические исследования пластовой воды Ромашкинского нефтяного месторождения в процессе испытания биотехнологии повышения нефтеотдачи // Микробиология. 1999. Т. 68, № 2. С. 252–260.

10. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Ивойлов В.С., Миллер Ю.М., Кандаурова Г.Ф., Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Иванов М.В. Результаты испытания микробиологического метода повышения нефтеотдачи в условиях карбонатного коллектора Ромашкинского нефтяного месторождения. Биогеохимические и продукционные характеристики // Микробиология. 1999. Т. 68. № 2. С. 261–266.
11. Kaster K.M., Bonaunet K., Berland H., Kjeilen-Eilertsen G., Brakstad O.G. Characterisation of culture-independent- and dependent microbial communities in a high-temperature offshore chalk petroleum reservoir // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009. V. 96. P. 423–439.
12. Wagner M., Lungershausen D., Murtada H., Rosenthal G. Development and application of a new biotechnology of the molasses in-situ method; detailed evaluation for selected wells in the Romashkino carbonate reservoir // *Proc. Fifth int. conf. on microbial enhanced oil recovery and related biotechnology for solving environmental problems*. 1995. P. 153–173.
13. Wagner M., Ziran B., Iwanow M.W., Beljajew S.S., Nazina T.N. Verfahren zur Unterdrückung sulfatreduzierender Bakterien bei MIOR. Deutsches Patentamt DE 41 27 744 A1. 25.2.1993.
14. Назина Т.Н., Иванова А.Е., Вагнер М., Циран Б., Ибатуллин Р.Р., Кандаурова Г.Ф., Миллер Ю.М., Беляев С.С., Иванов М.В. Интродукция *Clostridium tyrobutyricum* и мелассы в нефтяной пласт Ромашкинского месторождения и влияние ее на развитие микробиологических процессов в пласте // Микробиология. 1996. Т. 65, № 3. С. 403–408.
15. Назина Т.Н., Шестакова Н.М., Григорьян А.А., Михайлова Е.М., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Циньсян Фен, Фангтиан Ни, Беляев С.С. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология. 2006. Т. 75, № 1. С. 70–81.
16. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernykh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu.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, N. 10. P. 6143–6151.
17. Belyaev S.S., Borzenkov I.A. Microbial transformation of low-molecular-weight carbon compounds in the deep subsurface // *Biogeochemistry of global change*. New York; London, 1993. P. 825–838.
18. Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria (cultivation

techniques and media) // The prokaryotes. 2nd edn. New York; Berlin, 1992. V. 4. P. 3358–3361.

19. *Zeikus J.G., Weimer P.J., Nelson D.R., Daniels L.* Bacterial methanogenesis: acetate as a methane precursor in pure culture // *Arch. Microbiol.* 1975. V. 104. P. 129–134.

20. *Larsen J., Rod M. H., Zwolle S.* Prevention of reservoir souring in the Halfdan field by nitrite injection. Corrosion 04761 // *Proc. of corrosion. Houston, Texas, 2004.*

21. *Voordouw G.* Impact of nitrate on the sulfur cycle in oil fields // *Microbial sulfur metabolism.* Springer. 2008. P. 296–301.

22. *Grigoryan A., Lambo A., Lin S., Cornish S.L., Jack T.R., Voordouw G.* Souring remediation by field-wide nitrate injection in an Alberta oil field // *J. Can. Petrol. Technol.* 2009. V. 48, N. 5. P. 58–61.

23. *Ибатуллин Р.Р., Беляев С.С., Борзенков И.А., Иванов М.В., Хисамов Р.С., Уваров С.Г., Береговой А.Н., Рахимова Ш.Г.* Способ разработки неоднородного нефтяного пласта. Заявка на патент № 2006115514, приоритет от 05.05.2006.

24. *Назина Т.Н., Павлова Н.К., Фангтиан Ни, Шестакова Н.М., Ивойлов В.С., Циньсян Фенг, Джао Донюн, Прусакова Т.С., Беляев С.С., Иванов М.В.* Регуляция геохимической активности микроорганизмов в нефтяном пласте путем нагнетания водно-воздушной смеси или  $H_2O_2$  // *Микробиология.* 2008. Т. 77, № 3. С. 370–379.

Таблица 1.

**Химический состав пластовой воды и скорости сульфатредукции и метаногенеза в залежи 302 Ромашкинского нефтяного месторождения**

Параметры	Добывающие скважины				
	26426	26480	26480*	35851	36275
Общая минерализация, г/л	18.263	18.246	23.381	28.876	17.004
pH	7.44	7.93	7.90	7.20	6.83
Содержание в пластовой воде, г/л					
Na <sup>+</sup> + K <sup>+</sup>	5.620	5.679	7.458	8.394	5.306
Ca <sup>2+</sup>	0.726	0.675	0.675	1.905	0.805
Mg <sup>2+</sup>	0.317	0.324	0.317	0.661	0.309
Cl <sup>-</sup>	6.753	6.753	7.042	15.821	8.412
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0	0	0	0	0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.927	0.671	1.049	0.927	0.988
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3.920	4.144	6.840	1.168	1.184
Ацетат, мг/л	4.5	0.8	20.4	1.5	2.0
Скорость сульфатредукции, мкг S <sup>2-</sup> л <sup>-1</sup> сут <sup>-1</sup>	25.80	19.60	26.60	2.28	2.90
Скорость метаногенеза, мкг CH <sub>4</sub> л <sup>-1</sup> сут <sup>-1</sup>					
Из NaHCO <sub>3</sub>	0	0	8.15	0	0
Из ацетата	0.395	0.006	0.040	0.012	0.015

\* проба пластовой жидкости отобрана в июле 2010 года, остальные пробы были отобраны в июле 2009 года.

Таблица 2.

**Продукты, образуемые накопительными культурами бродильных микроорганизмов из залежи 302 при росте на мелассе и сахарозе за 14 суток инкубации**

Продукты брожения, рН среды	Накопительные культуры из скважины		
	35851	26426	26426
Субстрат	Меласса	Меласса	Сахароза
рН	4.55	4.55	6.9
Этанол, мг/л	438	0	0
Метанол, мг/л	0	0	40
Ацетат, мг/л	600	1140	54
Пропионат, мг/л	480	0	0
H <sub>2</sub> , мкл/мл газовой фазы	30	17.8	3161
СО <sub>2</sub> , мкл/мл газовой фазы	22.5	0	20.2

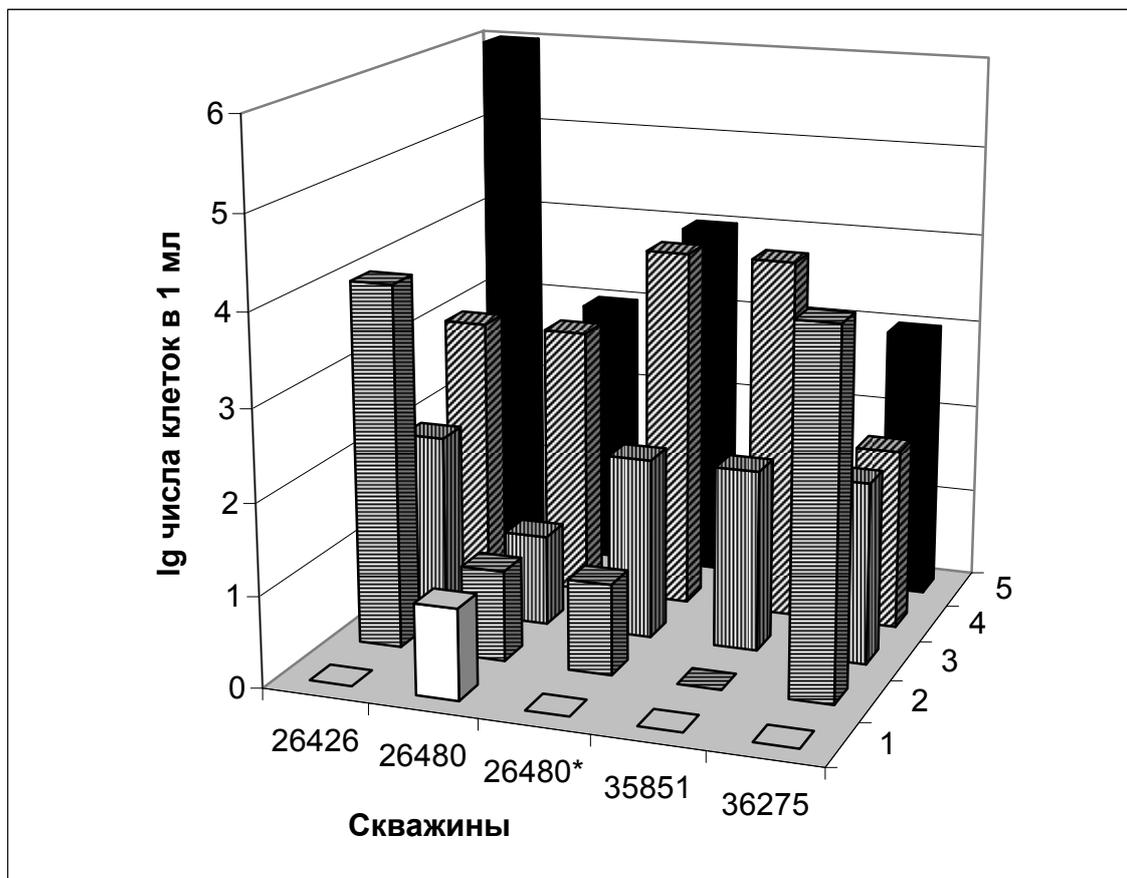


Рис. 1. Численность аэробных органотрофов (1), метаногенов, растущих в среде с водородом (2) или ацетатом (3), бродильных (4) и сульфатредуцирующих (5) прокариот в пластовых водах залежи 302

\* Пробу из скважины 26480 отбирали в июле 2010 г., другие пробы отбирали в июле 2009 г.

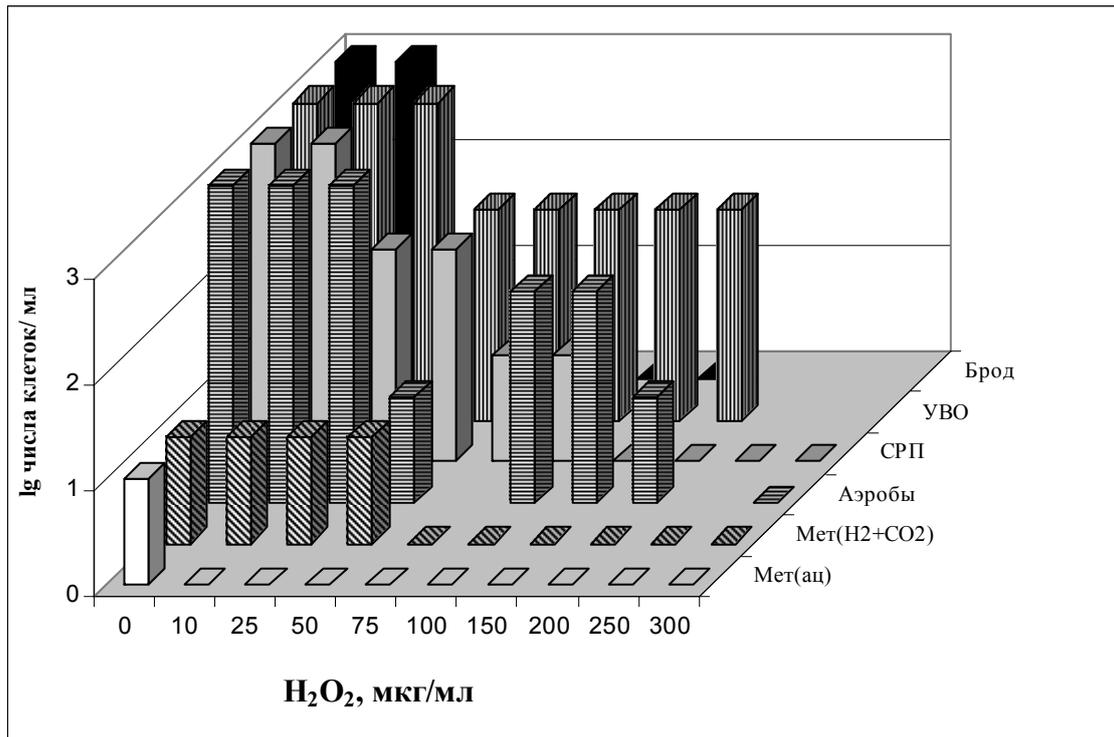


Рис. 2. Влияние различных концентраций  $H_2O_2$  на рост аэробных органотрофов [Аэробы], углеводородокисляющих бактерий [УОБ], бродильных [Брод], сульфатредуцирующих прокариот [СРП], метаногенов, растущих на ацетате [Мет(ац)], и метаногенов, растущих на  $H_2+CO_2$  [Мет ( $H_2+CO_2$ )], из залежи 302

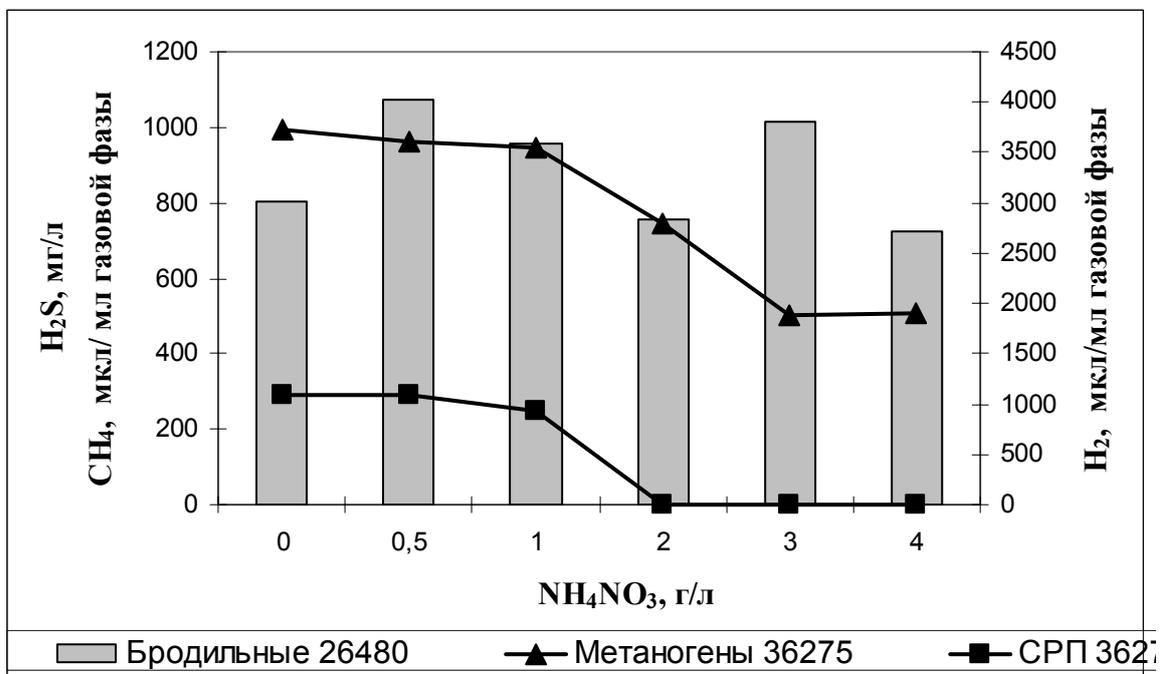


Рис. 3. Образование  $H_2$ ,  $CH_4$  и  $H_2S$  накопительными культурами бродильных, метанобразующих и сульфидогенных прокариот соответственно в присутствии различных концентраций  $NH_4NO_3$  в среде