

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К.И. Сатпаева

УДК
665.3:66.095 (043)

На правах
рукописи

ӘКІМБЕК АРАЙЛЫМ ӨТЕГЕНҚЫЗЫ
Биодесульфуризация высокосернистой нефти глубокими
эвтектическими растворителями

8D07108 - Основные процессы синтеза и производства новых органических и
полимерных материалов

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные руководители:
PhD, профессор, Рафикова Х.С.

к.с.-х.н., доцент,
ассоц. профессор Джамалова Г.А.

Зарубежный руководитель:
PhD, Ассистент профессора
М. Пагано (Бразилия)

Республика Казахстан
Алматы, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	14
1.1 Нефтяные ресурсы и нефтегазовый комплекс Казахстана	14
1.2 Состав нефти и серосодержащие соединения	21
1.3 Технологии десульфуризации нефти и нефтяных компонентов	25
1.4 Глубокие эвтектические растворители	33
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	45
2.1 Материалы исследования	45
2.2 Методы исследования	49
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ	66
3.1 Сравнительный анализ содержания серосодержащих соединений в образцах нефти различных месторождений методом газовой хроматографии	66
3.2 Выделение сульфатоокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий из сырой нефти	79
3.3 Генетическая идентификация бактерий на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA	91
3.4 Влияние тяжелых металлов на активность выделенных микроорганизмов	113
3.5 Микробная активность в отношении серы в составе сырой высокосернистой нефти	126
3.6 Биодесульфуризация высокосернистой нефти месторождения «Каражанбас» Казахстана	136
3.7 Разработка технологии биодесульфуризации высокосернистой нефти с применением синтезированных глубоких эвтектических растворителей	162
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	169
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	172

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ISO 9120:1997. Petroleum and related products – Determination of air-release properties of steam turbine and other oils – Impinger method;

ISO 8754:2003. Petroleum products Determination of sulfur content Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry;

ГОСТ ISO 3170-2022. Нефтепродукты жидкие. Ручные методы отбора проб.

ГОСТ Р 51858-2002. Нефть. Общие технические условия.

ГОСТ 32513-2013. Топлива моторные. Бензин неэтилированный. Технические условия. 2019.

ГОСТ 32511-2013. Топливо дизельное ЕВРО. Технические условия. 2019.

ГОСТ 10227-2013. Топливо для реактивных двигателей. Технические условия. 2014.

ГОСТ 20448-90. Газы углеводородные сжиженные топливные для коммунально-бытового потребления. Технические условия. 2005.

СТ РК АСТМ Д 4294. Стандартный метод определения серы в нефти и нефтепродуктах методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии на основе энергии дисперсионного взаимодействия.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ГЭР – Глубокие эвтектические растворители
БДС – Биодесульфуризация
Мпа – Мега паскаль
ppm – parts per million
ГХ-МС с ПИД – Газовая хроматография масс-спектрометр с пламенно-ионизационным детектором
16S rRNA – Рибосомная рибонуклеиновая кислота с седиментационным коэффициентом (16S)
нм – Нанометр
ppm – parts per million
м – метр
г – грамм
га – гектар
т – тонна
% мас. – массовая доля
кг/м³ – килограмм на кубический метр
мм²/с – квадратный миллиметр на секунду
мкм – микрометры
г/см³ – грамм на кубический метр
мг/л – миллиграммы на литр
мм рт. ст. – миллиметра ртутного столба
кДж – Килоджоуль
АВС – акцептор водородной связи
ДВС – донор водородной связи
МПА – Мясопептонный агар
МСС – минеральная синтетическая среда
МПБ – Мясопептонный бульон
КОЕ/мл – колониеобразующие единицы/миллилитр
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
п.н. – пары нуклеотидов
БРЦ ВКПМ - Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
СРБ – сульфатредуцирующие бактерий
СОБ – сероокисляющие бактерий
СОМ – сероокисляющие микроорганизмы
ОМЧ – Общее количество микроорганизмов
БТ – бензотиофен
ДБТ – дибензотиофен
4,6-ДМДБТ - 4,6-диметилдибензотиофен

ВВЕДЕНИЕ

Оценка современного состояния решаемой научной или научно-технологической проблемы. Одним из главных направлений современной нефтехимии является совершенствование процессов переработки нефтяного сырья с целью снижения содержания серных соединений. Высокосернистые нефти Казахстана характеризуются содержанием устойчивых органосернистых структур, в основном, тиофенового и бензотиофенового рядов, включая их алкил замещённые производные [1]. Присутствие таких соединений отрицательно влияет на технологические характеристики нефтепродуктов, усложняет процессы переработки и требует применения технологий, обеспечивающих селективное разрушение связей C-S при сохранении углеводородного каркаса [2]. Кроме того, соединения серы оказывают выраженное негативное воздействие на окружающую среду и здоровье человека. По данным Всемирной организации здравоохранения, загрязнение воздуха соединениями серы является причиной 6,7 млн преждевременных смертей во всем мире [3]. Даже низкие концентрации диоксида серы порядка 0,1 ppm способны вызывать бронхоконстрикцию у лиц, страдающих бронхиальной астмой, а хроническое воздействие на уровне 0,4-3,0 ppm в течение нескольких десятилетий ассоциируется с нарушением функции дыхательной системы у работников промышленных предприятий [4]. В экологическом отношении оксиды серы играют ключевую роль в формировании кислотных осадков, что приводит к закислению почв, вымыванию кальция и магния, повреждению корневых систем растений и снижению их продуктивности [5]. Эти данные свидетельствуют о необходимости внедрения более экологичных и селективных методов обессеривания нефти и нефтяных продуктов.

Следует отметить, что с экономической точки зрения, традиционные методы требуют значительных капитальных и операционных затрат: потребление водорода, высокие температуры и давления, стоимость катализаторов, постоянная замена оборудования. В качестве примера можно привести метод гидродесульфурзации, который является наиболее затратным методом обессеривания. Так, технико-экономический анализ для тяжелого топлива с содержанием серы 3,5 % показал, что при объемном расходе 250 м³/ч капитальные вложения достигают 308,9 млн долларов США, а ежегодные эксплуатационные расходы около 114,5 долларов США [6]. В исследовании по применению химически импрегнированных отходов кокосовой койры для адсорбционной десульфурзации дизельного топлива показало, что адсорбент обладает хорошей регенерационной способностью (до трех циклов «адсорбция-десорбция»), а капитальные вложения для его приготовления достигают примерно 11 тыс. долларов США за килограмм [7].

На сегодня для снижения содержания сернистых соединений в нефти применяются методы, которые были перечислены выше. Каждый из этих методов имеет свои ограничения. Среди традиционных методов,

гидродесульфуризация остается наиболее распространенной технологией при том, что реализуется при высоких капитальных и эксплуатационных затратах [6]. Также активно применяются методы окислительной десульфуризации. Метод позволяет эффективно окислять устойчивые тиофеновые соединения, но часто требует избытка окислителей, что повышает себестоимость процесса, а также сталкивается с проблемами активации молекулярного кислорода при мягких условиях. Ввиду этого данный метод лимитирован в применении [8]. Адсорбционная десульфуризация характеризуется простотой и низкой стоимостью адсорбентов, но метод ограничивается малой емкостью и необходимостью регенерации сорбентов [9]. На фоне этих технологий в последнее время всё больше внимания уделяется инженерной биотехнологии, основанной на использовании микроорганизмов для удаления сернистых соединений из сырой нефти, поскольку микробная десульфуризация является экономически эффективным и экологически чистым процессом. Одним из перспективных результатов в данной области является применение глубоких эвтектических растворителей (ГЭР). Такой подход позволяет увеличить количество активных клеток, участвующих в биодесульфуризации (БДС) и способствует повышению общей эффективности процесса переработки высокосернистых нефтей.

Основание и исходные данные для разработки темы. Выбор направления исследования обусловлен взаимным действием двух факторов: высокой сернистости нефтей казахстанских месторождений и необходимостью разработки технологий селективного удаления органосернистых соединений с минимальными энергетическими и ресурсными затратами. Нефти Каражанбас и Бузачи относятся к категории высокосернистых, Кумколь – к низкосернистым, но при этом в их составе присутствует широкий спектр устойчивых ароматических и алифатических сернистых соединений, которые сохраняются в топливных фракциях после традиционной переработки. Современные достижения в области органической химии, инженерной биотехнологии и зелёной химии открывают перспективы применения технологии биодесульфуризации в качестве экологически приемлемой альтернативы традиционным методам. Однако эффективность биодесульфуризации во многом определяется активностью и численностью микроорганизмов, способных окислять C-S связи в условиях сложной нефтяной матрицы. В связи с этим, в качестве эффективных подходов рассматривается использование глубоких эвтектических растворителей (ГЭР) в составе питательных сред для интенсификации роста и метаболической активности целевых микроорганизмов. Такой подход направлен не на модификацию нефти, а на оптимизацию процесса микробиологического звена, что позволяет увеличить общее количество активных клеток и повысить скорость протекания реакций десульфуризации. Исходными данными для разработки темы послужили научные литературные сведения о составе и свойствах высокосернистых и сернистых нефтей Казахстана, опубликованные исследования по применению БДС к различным типам нефтяного сырья, а

также результаты предварительных экспериментов автора по оценке влияния ГЭР на рост сероокисляющих культур.

Обоснование необходимости проведения научно-исследовательской работы. Разработка эффективных и экологически безопасных технологий удаления сернистых соединений из нефти и нефтепродуктов является приоритетной задачей современной нефтехимии. Высокий уровень сернистости казахстанских нефтей не только снижает их рыночную стоимость, но и ограничивает возможности переработки, поскольку продукты с повышенным содержанием серы не соответствуют действующим экологическим нормам.

Традиционные процессы гидродесульфуризации, несмотря на их широкое промышленное применение энергозатратны и не обеспечивают полной конверсии алкилзамещенных дибензотиофенов и других устойчивых структур [6]. Тогда как экстракционная десульфуризация, в том числе с использованием глубоких эвтектических растворителей, позволяют селективно извлекать сернистые соединения и могут обеспечить уменьшение энергопотребления и объема используемых растворителей на 50-70 %. Однако данные методы часто сталкиваются с потерями растворителя, требующими затрат на регенерацию, характеризуются сложностью разделения фаз [10], не обеспечивают полной конверсии трудноудаляемых органосернистых соединений, особенно в тяжёлых нефтях с высоким содержанием смолисто-асфальтеновых компонентов.

Биодесульфуризация представляет собой перспективную альтернативу, обладающую высокой селективностью, мягкими условиями проведения процесса и потенциалом снижения углеродного следа производства, в отличие от процессов гидродесульфуризации, которые проводятся при высоких показателях температуры (300-400 °С) и давления водорода (2-8 МПа), значительных затратах на дорогостоящие катализаторы и водород [6].

По сравнению с окислительной десульфуризацией, где необходим избыток окислителей и последующая стадия разделения продуктов [11], биодесульфуризация обладает высокой селективностью к устойчивым органосернистым соединениям и потенциалом снижения углеродного следа.

Однако успешная интеграция биодесульфуризации в блок-схему требует решения ряда задач, связанных с повышением биокаталитической активности микроорганизмов, оптимизацией условий протекания процессов и сокращением продолжительности процесса. В связи с этим, актуальным является поиск методик, позволяющих интенсифицировать рост и метаболическую активность целевых микроорганизмов. Использование ГЭР в составе питательных сред представляет собой новый и малоизученный подход, способный повысить эффективность биодесульфуризации. Данное направление исследований сочетает достижения нефтехимии, микробиологии, инженерной биотехнологии и зелёной химии, что определяет его междисциплинарную значимость и практическую ценность.

Сведения о планируемом научно-техническом уровне разработке, патентных исследованиях и выводы из них.

В ходе исследования были проведены аналитический обзор научной литературы и патентных источников, посвященных технологиям десульфуризации нефти и нефтепродуктов. Результаты анализа показали, что на сегодняшний день в мировой практике отсутствуют универсальные и одновременно экономически и экологически эффективные методы удаления трудноудаляемых органосернистых соединений, особенно в тяжёлых и высокосернистых нефтях Казахстана. Существующие промышленные технологии, включая гидроочистку, обеспечивают лишь частичное удаление серы и требуют значительных энергетических и материальных затрат. Проведённый литературный поиск показал, что основная масса источников в области десульфуризации ориентирована на каталитические и термохимические методы. Разработки, связанные с применением биодесульфуризации, носят ограниченный характер и, как правило, не затрагивают использование ГЭР в составе питательных сред для стимулирования роста сероокисляющих микроорганизмов.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что предложенный в данной работе подход, основанный на использовании ГЭР в системе биодесульфуризации высокосернистых нефтей открывает возможности для повышения селективности и эффективности удаления органосернистых соединений, а также способствует формированию экологически ориентированных технологий переработки. Полученные в ходе работы результаты могут стать основой для масштабирования и промышленного внедрения разработанного подхода.

Сведения о метрологическом обеспечении диссертации. При проведении научно-исследовательских работ использовались комплексные методы анализа и испытаний с применением современных аналитических приборов и сертифицированных методик, утвержденных в аккредитованных лабораториях. Исследования проводились на базе нижеперечисленных лабораторий:

- Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И. Сатпаева, кафедра Химической и биохимической инженерии;
- РГП на ПХВ «Институт проблем горения»;
- Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Научно-исследовательский центр «Биотехнология»;
- ТОО «Национальный центр биотехнологии» (НЦБ).

Все измерения проводились в соответствии с требованиями государственных и международных стандартов и методической документации, что обеспечивало необходимую точность и воспроизводимость полученных результатов.

Актуальность. Актуальность разработки новых технологий удаления серы из топлива связана с ужесточением экологических требований. В ЕС и

Японии содержание серы в бензине и дизельном топливе не должно превышать 10 ppm, в США 15 ppm. В то же время в некоторых видах нефти, добываемых в Казахстане, содержание серы достигает 1,6-2,2 % по массе, что на несколько порядков больше установленных норм. Это снижает конкурентоспособность казахстанской нефти на международном рынке и экспортный потенциал страны [12, 13, 14, 15]. Высокое содержание сернистых соединений в тяжелых нефтях Казахстана ухудшает качество топлива, вызывает коррозию оборудования и приводит к выбросам SO₂, что негативно отражается на экологии. Существующие промышленные технологии, обеспечивающие эффективное удаление легких форм серы, однако требуют высоких затрат, такие как: высокие температуры (300 до 400 °С) и давление (2-8 МПа), использования водорода и дорогостоящих катализаторов [16], избытка окислителей и стадии разделения продуктов [17], регенерации и контроль потерь растворителя [10], что снижает их экономическую целесообразность при переработке тяжелых нефтей.

В связи с этим актуальным направлением является разработка альтернативных, более экологичных и экономически оправданных методов десульфуризации, способных обеспечивать селективное удаление серы при минимальном разрушении углеводородной матрицы. Одним из перспективных подходов является биодесульфуризация, основанная на способности микроорганизмов при оптимальных условиях селективно окислять серу в составе органических соединений. В данной работе предложено использовать технологию биодесульфуризации нефти и нефтяных продуктов в сочетании с глубокими эвтектическими растворителями в составе питательных сред и оптимальным режимом для стимулирования роста серо окисляющих микроорганизмов и повышения биодоступности органосернистых соединений. Такой подход сочетает в себе экологическую безопасность, технологическую эффективность и возможность интеграции разработанной технологии в существующие схемы нефтепереработки, что определяет его высокую актуальность для решения проблемы глубокой десульфуризации высокосернистых нефтей Казахстана и соответствует цели устойчивого развития 7 – «Доступная и чистая энергия».

Объекты исследования. Казахские месторождения тяжелых нефтей Каражанбас и Бузачи, характеризующиеся высоким содержанием органосернистых соединений, затрудняющие их эффективную десульфуризацию традиционными методами, а также низкосернистая нефть Кумколь.

Предмет исследования. Процессы биодесульфуризации тяжелых нефтей с использованием нефте- и серо окисляющих микроорганизмов, культивируемых в питательных средах с добавлением глубоких эвтектических растворителей.

Цель исследования. Разработка и обоснование химико-технологической биодесульфуризации тяжелых высокосернистых нефтей Казахстана на основе синтезированных глубоких эвтектических

растворителей и включения их в состав десульфуризационных систем для интенсификации и оптимизации биодесульфуризационного процесса.

Задачи исследования:

1. Синтез и характеристика глубоких эвтектических растворителей, оценка их влияния на рост, метаболическую активность изолированных и коллекционных микроорганизмов при биодесульфуризации тяжелой высокосернистой нефти.

2. Выделение и изучение штаммов микроорганизмов из образцов сырой высокосернистой нефти Казахстана. Выявление культурально-технологических свойств изолированных штаммов путем аэробных процессов.

3. Исследование десульфуризационной активности микроорганизмов при обработке высокосернистой нефти и установление их роли в процессах окисления и восстановления серосодержащих соединений.

4. Исследование эффективности десульфуризации нефти при совместном применении глубоких эвтектических растворителей и микроорганизмов.

В рамках исследования глубокие эвтектические растворители рассматриваются не только как вспомогательные реагенты, но и как ключевые элементы методологии, обеспечивающие двойной эффект:

- стимуляцию роста и метаболической активности изолированных и коллекционных микроорганизмов за счет модификации условий в десульфуризационной среде;

- повышение доступности органосернистых соединений в нефтяной матрице для биокаталитического разложения.

Такое совместное применение ГЭР позволяет объединить преимущества химических и биотехнологических подходов, позволяя создавать более эффективные и экологически безопасные технологии десульфуризации тяжёлых высокосернистых нефтей.

Методы исследований. Исследования были основаны на применении следующих методов:

- газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-МС с ПИД Agilent 7890В) для качественного и количественного анализа сернистых соединений в нефтяных образцах;

- микробиологические методы выделения и культивирования для изоляции штаммов сероокисляющих микроорганизмов из нефтяных проб и их идентификации с использованием морфологических, культуральных и биохимических признаков;

- спектрофотометрический метод (Jenway 7315) на основе измерения оптической плотности (D_{opt}) при длине волны 600 нм для оценки влияния тяжёлых металлов на рост изолированных бактериальных культур;

- генетическая идентификация микроорганизмов на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA;

- синтез глубоких эвтектических растворителей для получения целевых композиций в заданных молярных соотношениях;
- ЯМР ^1H и ^{13}C (спектрометр JNM-ECA JEOL) для структурной характеристики и подтверждения состава синтезированных глубоких эвтектических растворителей;
- Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-Фурье) (ИК-Фурье-спектрометр ФТ-801 (Россия)) для идентификации функциональных групп и анализа межмолекулярных взаимодействий в составе ГЭР;
- Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК) (на приборе NETZSCH DSC 300 Supreme) для исследования термических переходов и оценки термодинамической стабильности полученных систем;
- Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК) для исследования термических переходов и оценки термодинамической стабильности полученных систем;
- экспериментальные испытания по биодесульфуризации для оценки эффективности удаления сернистых соединений в лабораторных условиях, а также для оптимизации технологических параметров процесса.
- энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ для определения массовой доли серы в биодесульфуриционной системе на основе ГЭР с использованием рентгенофлуоресцентного энергодисперсионного анализатора «Спектроскан S».

На защиту выносятся следующие положения:

1. Состав полученных глубоких эвтектических растворителей на основе бетаина:глицерина (Bet+Gly) (1:2), лимонной кислоты:глицерина (CA+Gly) (1:4), тетрабутиламмония хлорида:молочной кислоты (TBAC+La) (1:2), Холин хлорида:этиленгликоля (ChCl+EG) (1:2), тетрабутиламмоний бромида:изопропанола (TBAB+isopropanol) (1:2);
2. Результаты изучения колонизации нефтей нефте- и серо окисляющими микроорганизмами, определения их культуральных и технологических свойств, генетическая идентификация активных штаммов микроорганизмов на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA, спектрофотометрического анализа ($\lambda=600$ нм) влияния тяжелых металлов на рост изолированных микроорганизмов;
3. Использование глубоких эвтектических растворителей на основе бетаина:глицерина (Bet+Gly) (1:2), лимонной кислоты:глицерина (CA+Gly) (1:4) в сочетании с штаммами аборигенных микроорганизмов *B. cereus* (SFN-2), *B. thuringiensis* (SFN-3) для десульфуризации нефти (до 82,35 %), тогда как использование штаммов SFN-1, H-1, H-4, F-1, F-2, E-1 и H-2 показали серо восстанавливающие способности;
4. Результаты применения композиции глубоких эвтектических растворителей на основе бетаина:глицерина (Bet+Gly) (1:2), лимонной кислоты:глицерина (CA+Gly) (1:4) в сочетании с аборигенными сероокисляющими микроорганизмами *B. cereus* (SFN-2), *B. thuringiensis* (SFN-

3) и коллекционными микроорганизмами *P. aeruginosa* В-5807, *Rh. erythropolis* АС-1039, *P. putida* В-1827 в процессе биодесульфуризации нефти (удаление серы до 96,3 %).

Научная новизна полученных результатов.

1. Впервые:

- установлена возможность применения глубоких эвтектических растворителей в составе десульфуризационных питательных систем для изолированных и коллекционных микроорганизмов;
- интенсификация процессов биодесульфуризации тяжелых высокосернистых нефтей осуществлена на основе применения глубоких эвтектических растворителей в составе десульфуризационных систем.

2. Впервые показано, что введение глубоких эвтектических растворителей в питательную среду обеспечивает:

- формирование десульфуризационной среды;
- существенное повышение скорости роста и метаболической активности нефте- и сероокисляющих микроорганизмов за счет оптимизации физико-химических условий их культивирования.

3. На основании комплексных исследований нефтей месторождения Каражанбас впервые выявлено, что использование глубоких эвтектических растворителей способствует увеличению биомассы, повышению активности ферментных систем, участвующих в десульфуризации, а также расширяет спектр сернистых соединений, подвергающихся биокаталитическому разложению. Полученные результаты подтверждают, что разработанный подход обладает высокой потенциальной способностью для создания экологически безопасных и энергоэффективных технологий глубокой очистки нефти от серы, что соответствует цели устойчивого развития 7 – «Доступная и чистая энергия».

Практическая значимость работы. Предложенный в работе метод биодесульфуризации с использованием глубоких эвтектических растворителей открывает новые возможности для повышения эффективности процессов очистки высокосернистых нефтей. Добавления ГЭР не изменяет саму нефтяную матрицу, а создает оптимальные условия для роста и активности сероокисляющих микроорганизмов, что в итоге облегчает им доступ к серосодержащим соединениям и ускоряет их разложение.

Такой подход позволяет:

- снижать энергозатраты;
- обходиться без агрессивных реагентов, минимизируя воздействие негативных факторов на окружающую среду;
- сохранять высокую степень очистки нефтей от сераорганических соединений.

Полученные результаты могут быть применены на макроуровне для удаления серы на основе разработанной химико-биотехнологической десульфуризации высокосернистых тяжелых нефтей.

Публикации и апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных

журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus. В журнале Heliyon, квартиль Q1, процентиль 83 %:

Akimbek A.O., Jamalova G.A., Yernazarova A.K., Kaiyrmanova G.K., Yelikbayev B.K., Pagano M.C., Zazybin A.G., Rafikova K.S. Biodesulfurization of high-sulfur oil from the Karazhanbas field of Kazakhstan with deep eutectic solvents. Heliyon, 2025, Volume 11, Issue 2, 30 January 2025, e41877. DOI: 10.1016/j.heliyon.2025.e41877. (**Scopus, WoS**).

А также результаты исследования были апробированы на международных и национальных научных форумах: **Frontier Symposium of Engineered Science**, 23-29 июня 2024 г., Астана, Казахстан. *Biodesulfurization of high-sulfur oil from the Karazhanbas field by Deep Eutectic Solvents*. Авторы: Akimbek A.O., Jamalova G.A., Rafikova Kh.S., Yernazarova A.K., Yelikbayev B.K., Kaiyrmanova G.K., Pagano M.C., Islam S., Nauryzova S., Kerimkulova A., Selenova B. (устный доклад).

Кроме того, были опубликованы работы в качестве соавторов двух статей, опубликованных в международных рецензируемых журналах Environmental Monitoring and Assessment (Q3, Scopus, Web of Science) и ChemistrySelect (Q3, Scopus, Web of Science). Данные статьи выполнены в рамках других научных проектов, близких по тематике, и отражают научную активность автора в смежных областях:

1. В журнале CiteScore (Scopus, 2023) квартиль журнала Q2, процентиль 73 %. Uzcan F., Joldybayeva S., **Akimbek A.**, et al. A very simple and sensitive pelargonic acid based liquid phase microextraction of erythrosine from food and water samples. Environmental Monitoring and Assessment, 197, 569 (2025). DOI: 10.1007/s10661-025-13954-2. (**Scopus, WoS**).

2. В журнале ChemistrySelect, квартиль журнала Q3, процентиль 45 %. Uğur Işık, Khadichakhan Rafikova, Nermin Meriç, Remziye Güzel, Aygul Kerimkulova, **Arailym Akimbek**, Veysi Okumuş, Feyyaz Durap, Cezmi Kayan, Murat Aydemir. Half-sandwich ruthenium (II) and iridium (III) complexes of imidazole based phosphinite ligands: antioxidant and antibacterial activities as well as electrochemical properties. ChemistrySelect, Volume 9, Issue 6, February 12, 2024, e202304785. DOI: 10.1002/slct.202304785. (**Scopus, WoS**).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает введение (9 стр.), 3 главы (154 стр.), заключение (2 стр.) и библиографический указатель литературы, включающий 507 наименований (37 стр.). Общий объем составляет 206 стр. компьютерного текста, в которых приведены 38 таблиц, 70 рисунков.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Нефтяные ресурсы и нефтегазовый комплекс Казахстана

1.1.1 Мировые ресурсы нефти

Сырая нефть, как ключевой источник энергии, занимает почти половину всех мировых энергетических поставок [18]. В частности, более 70 % добываемой нефти потребляется транспортным сектором [19].

Согласно прогнозам, ожидается, что:

– к 2040 г глобальный спрос на энергию может возрасти примерно на 50 % по сравнению с текущими потребностями, достигнув порядка 400 млн баррелей нефтяного эквивалента в сутки (мбнэ/сут) [19];

– к 2070 г может возникнуть глобальный дефицит этого ресурса [20].

Поэтому стабильный рост в потреблении данного ресурса сопровождается увеличением ее добычи. Так, в 2023 г глобальный уровень производства нефти достиг 96,4 миллиона баррелей в сутки, что стало историческим рекордом [21].

Для определения крупнейших нефтяных запасов на 2024 г (Рисунок 1.1) в основу рейтинга легли данные последнего отчёта ОПЕК [22].

Как видно из графика рисунка 1.1, в тройку лидеров по объёму запасов нефти входят Венесуэла (303 млрд баррелей), Саудовская Аравия (267 млрд баррелей) и Иран (208 млрд баррелей). Казахстан в этом рейтинге входит в ТОП-15, занимая 12 позицию (30 млрд баррелей) [22].

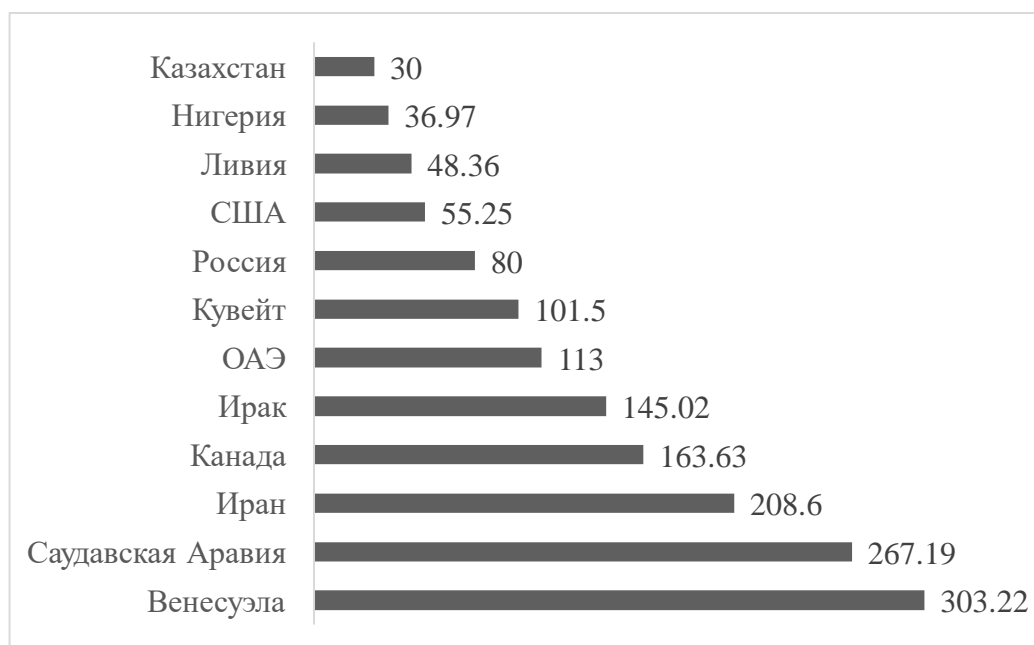


Рисунок 1.1 – Крупнейшие запасы нефти в мире по странам в 2024 году

Масштабное применение нефти сопровождается негативными экологическими последствиями, такими как выбросы парниковых и токсичных газов (оксид углерода, диоксид углерода, метан и хлор-фтор-углероды), что способствует глобальному потеплению и ухудшению состояния природной среды и здоровья населения. Но не смотря на это, нефть служит важным стратегическим ресурсом, являясь «кровью» промышленности [20].

1.1.2 Нефтегазовый сектор экономики Казахстана

Нефтегазовый сектор экономики Казахстана играет существенную роль в развитии страны, обеспечивает значительную часть налоговых поступлений в бюджет страны и формирует около четверти ВВП [23]. Анализ статистических данных за период 2020-2024 гг. (в пересчете на миллиарды тенге) свидетельствует о сохранении устойчивой концентрации добычи в нескольких ведущих нефтедобывающих регионах (Рисунки 1.2-1.4) [24].

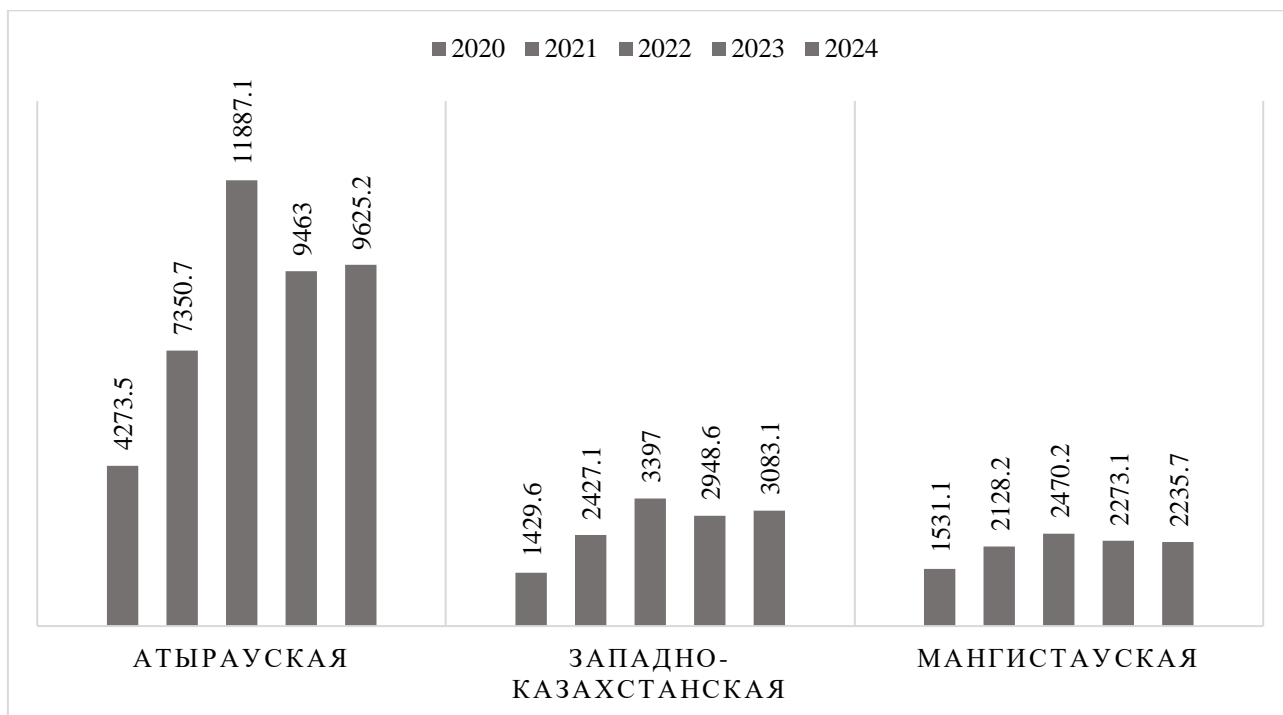


Рисунок 1.2 – Регионы с высокой добычей сырой нефти Казахстана за 2020-2024 годы, в млрд тг

Наиболее значимыми центрами, как это представлено на рисунке 1.2, выступают Атырауская, Мангистауская и Западно-Казахстанская области, которые формируют большую часть добычи сырья. Так, в Атырауской области годовой объём достигает 9 400-11 800 млрд тг, в Мангистауской более 1 500-2 400 млрд тг, а в Западно-Казахстанской возрастает от 1 430 млрд тг в 2020 году до более чем 3 080 млрд тг в 2024 году. Эти регионы не только обладают крупнейшими запасами нефтяного сырья, но и характеризуются развитой

инфраструктурой добычи и транспортировки, что обеспечивает стабильную долгосрочную перспективу в этом направлении для страны.

Также определенное значение в структуре нефтедобычи сохраняют Актюбинская и Кызылординская области. Для Актюбинской области это от 396 до 682 млрд тг, для Кызылординской области от 371 до 550 млрд тг (рисунок 1.3). Несмотря на сравнительно меньшие масштабы по сравнению с западными регионами, данные показатели имеют существенное значение для экономического развития указанных территорий.

Наименее значимые объёмы добычи фиксируются в Жамбылской области (менее 2 млрд тг в год) и в Восточно-Казахстанской области, где нефтедобыча практически отсутствует (Рисунок 1.4). Несмотря на минимальный вклад в национальную отрасль, данные регионы могут рассматриваться как перспективные направления для проведения геологоразведочных работ [24].

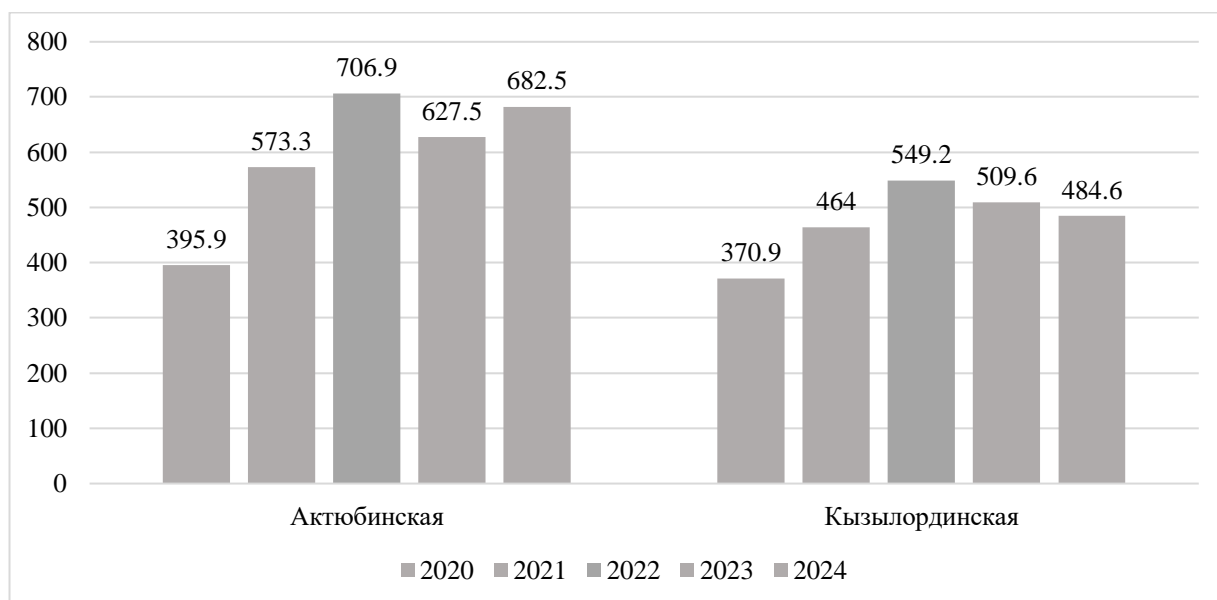


Рисунок 1.3 – Добыча сырой нефти в двух областях Казахстана за 2020-2024 годы, в млрд тг

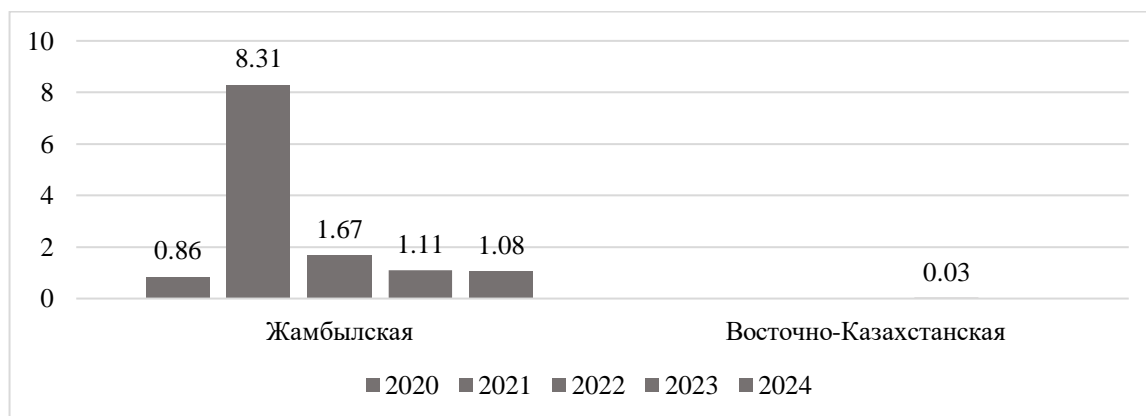


Рисунок 1.4 – Добыча сырой нефти Казахстана за 2020-2024 годы, в млрд тг

В Казахстане находится примерно 200 месторождений нефти и газа. Почти 70 % этих ресурсов сосредоточено в западных регионах страны. На рисунке 1.5 приведены данные запасов по пяти крупным месторождениям [25].

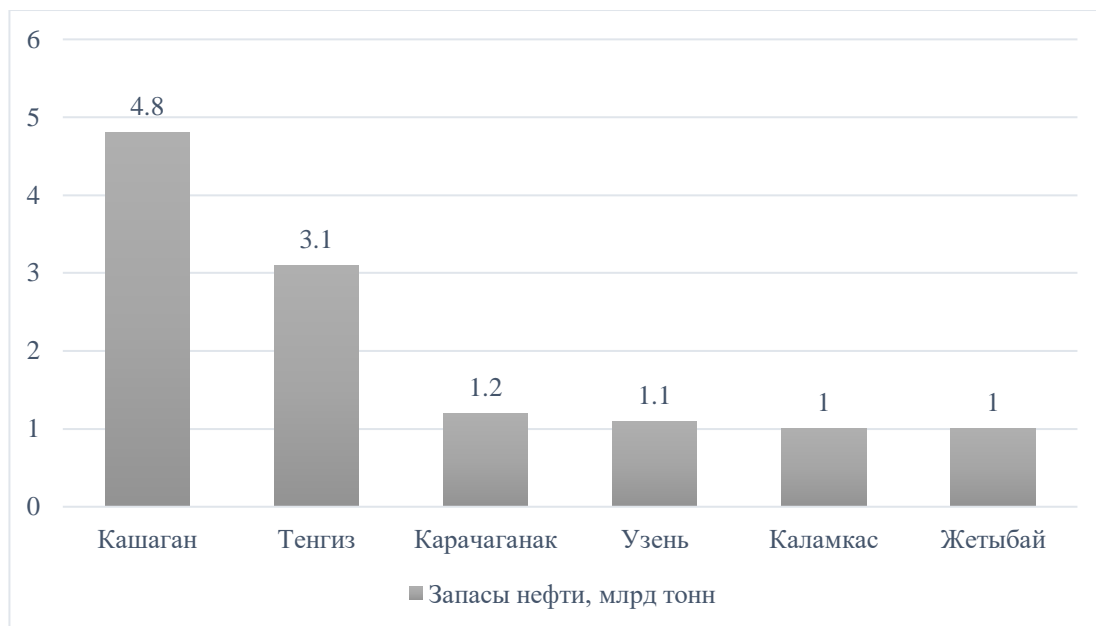


Рисунок 1.5 – Запасы нефти, млрд тонн

Согласно графику, из рисунка 1.5, наибольший объем запасов сосредоточен на месторождении Кашаган, который оценивается в 4,8 млрд тонн. Это делает его крупнейшим нефтяным объектом страны, обладающим стратегическим значением для энергетической отрасли. Второе место занимает месторождение Тенгиз с объемом запасов около 3,1 млрд тонн, что также характеризует его значимым для мира месторождением. Третьим является Карачаганак, его запасы оцениваются в 1,2 млрд тонн. Сравнительно меньшие объемы зафиксированы на месторождениях Узень (1,1 млрд тонн), Каламкас (1,0 млрд тонн) и Жетибай (1,0 млрд тонн) [25].

Проблемной особенностью для некоторых месторождений является добыча высокосернистой нефти. С данной проблемой сталкивается не только Казахстан, но и другие нефтедобывающие страны, т.к. трудно хранить «горы серы», которые продолжают накапливаться с ростом добычи нефти [26].

В качестве примера можно привести такие месторождения Казахстана, как Карачаганакский газ и нефтяной конденсат, Тенгиз, которые отличаются высоким содержанием сероводорода и других соединений серы [27]. Это означает, что количество загрязняющих веществ растет с каждым днем. Вместе с основным сырьем казахстанские нефтегазовые компании извлекают примерно от 2000 до 3000 тонн элементарной серы в день из потоков продуктов [28]. Сера легко воспламеняется, вызывает дезактивацию катализаторов, применяемых при переработке сырой нефти, а также проблемы с коррозией в трубопроводах, насосном и нефтеперерабатывающем оборудовании [29].

1.1.3 Нефтяные месторождения Казахстана, послужившие базой для исследования

Месторождение «Каражанбас» – это самое крупное в Содружестве Независимых Государств (СНГ) неглубокозалегающее (228,466 м.) месторождение высоковязкой тяжелой нефти, расположенный на полуострове Бузачи в Мангистауской области западного Казахстана и эксплуатируемый с 1974 г [30]. Средняя глубина залегания месторождений – 366 м, нефтяная площадь – 2677 га [13]. В месторождении «Каражанбас» геологические запасы нефти оценены в 300 799 000 т. Дебиты нефти – 2154 т/сутки [30].

Нефть месторождения «Каражанбас»:

- 1) имеет:
 - элементарный состав: углерод – 82,51 %, водород – 11,79 %, азот – 0,85 %, сера – 2,55 %, кислород – 2,30 % [31];
 - значительное содержание парафина (0,7-1,4 %) [13, 32];
 - очень высокую молекулярную массу [33] (чем выше молекулярная масса нефти, тем выше содержание в ней смол, асфальтенов и различных гетероорганических соединений [34]; содержание нефтяных смол и асфальтенов может достигать 24,18 % масс. и 4,85 % масс. соответственно [31]);
- 2) характеризуется низким выходом плавающих фракций: выход легких фракций, выкипающих при температуре до 350 °С составляет 27 % [35];
- 3) уникальна по составу, т.к. содержит ванадий и никель [30];
- 4) трудноизвлекаемая из-за высоких показателей плотности 938,5-944,6 кг/м³ [30] и смолистости (до 24 %) [36];
- 5) транспортируемый и перерабатываемый сорт [36]
- 6) относят к высокосернистым (1,6-2,2 % [30]), т.к. количество серы превышает 0,42 % [37] – 1 % [38] и 2 % [39];

Месторождение высоковязкой нефти «Бозащы» (Бузачи) [40] расположено в Мангистауской области Республики Казахстан на полуостров Бузачи [41] и административно входит в состав Тупкараганского района [42]. Месторождение занимает наиболее геологически молодую территорию, недавно освободившуюся из-под вод Каспийского моря. Почвенный покров месторождения представлен солончаками, в которых аккумулярованы наносы соляного ила, насыщенного хлоридами и сульфатами [43]. Глубина залегания нефтяных пластов колеблется в пределах 339-455 м [14].

По основным физико-химическим свойствам нефть Северо-Бузачинского месторождения [14, 44]:

- 1) относится к группе тяжелой нефти (плотность ее при 20 °С варьирует от 921,2-921,7 до 929,5 кг/м³) с большим содержанием асфальтосмолистых компонентов и малым выходом бензиновых фракций:
 - выход кокса составляет 6,4 %, а фракций, выкипающих до 200 °С – 3,75 %, до 300 °С – 20 %;

2) высоковязкая, кинематическая вязкость ее при 20 °С составляет 290 мм²/с;

3) содержит:

- больше ароматических углеводородов и смол;
- смол силикагелевых 20 %, асфальтенов - 2,85 % (имеют размеры частиц от 60 до 90 мкм);

- серы 1,78 % (высокосернистая);

- парафинов (температура плавления 40 °С) - 1,6 %;

4) в углеводородном составе нефти отмечается преобладание нафтеновых фракций (40-65 %) над метановыми (10-30 %) и ароматическими (около 20 %):

- групповой углеводородный состав: парафинонафтеновый состав – 34,4 % масс., ароматические – 48,0 % масс., моноциклические - 16,3 % масс., бициклические - 9,3 % масс., полициклические - 22,4 % масс.

Месторождение «Кумколь», введенное в промышленную разработку в 1995 г [45, 46]:

1) находится:

- в Улытауской области Ресбулики Казахстан,

- на поздней стадии эксплуатации;

2) относится к месторождению легкой нефти (плотность нефти 0.83 г/см³);

Нефтепровод Кумколь составляет важную часть нефтепровода Казахстан-Китай [47].

Данный нефтегазоносный бассейн с точки зрения географического расположения и геолого-промысловых характеристик является нефтегазоносным районом [48]. Отличительной особенностью эксплуатации месторождения является ежегодный рост обводненности добываемой продукции, которая в настоящее время превышает в среднем 90%, что в свою очередь значительно осложняет условия эксплуатации объектов сбора и подготовки нефти, газа и воды [46].

В разрезе месторождения «Кумколь» выявлено 6 продуктивных горизонтов: в меловых отложениях выделяется арыкумский горизонт, содержащий два продуктивных горизонта: М1 и М2. В верхнеюрских отложениях (кумкольская свита) содержится три продуктивных горизонта: Ю1, Ю2, и Ю3, в средней юре (дошанская свита) – один продуктивный горизонт – Ю4. Средние физические показатели пластовой нефти: плотность – 692 кг/м³ (плотность при 20 °С – 829,1 кг/м³), вязкость 0,76 мПа·с; температура застывания – 13,1 °С. Среднее содержание асфальто-смолистых вещества 6,8 % масс, серы – 0,10-0,14 % масс., парафина – 12,0-17,2 % масс. [49, 50, 51, 52, 53].

1.1.4 Нормативно-правовое регулирование содержания серы в нефтепродуктах в Казахстане

Из-за такого разрушительного воздействия соединений серы Европейский союз и другие развитые страны, такие как Япония и США, установили максимально допустимый предел содержания серы в нефтепродуктах, например, для бензина на уровне 10 ppm, а для дизельного топлива на уровне 15 ppm [54], в Казахстане по экологическим стандартам Евро-4 допускается не более 50 ppm (Таблица 1.1) [55]. С 1 июля 2021 года в Республике Казахстан вступил в силу обновленный Экологический кодекс, разработанный с учётом рекомендаций ОЭСР. Он ввёл обязательное применение наилучших доступных технологий (Best Available Techniques, BAT), переход на систему интегрированных экологических разрешений для предприятий I категории, а также закрепил принцип «загрязнитель платит», предусматривающий полную компенсацию затрат на охрану окружающей среды за счёт экологических платежей [56, 57]. Согласно кодексу, с 2025 года предприятия, не внедрившие BAT, будут облагаться повышенными ставками платы за выбросы, что создает экономические стимулы для модернизации. Показательным примером применения новых норм стало дело против оператора Северо-Каспийского проекта компании NCOС, которой в 2022 году был предъявлен иск на сумму около 4,4 млрд долларов США. Поводом послужило значительное превышение лимита по накоплению элементарной серы (1,7 млн тонн при разрешенных 730 тыс.), а также нарушения в системе очистки сточных вод и управлении отходами [58-63].

Таблица 1.1 – Регуляторные параметры содержания серы в нефтепродуктах, реализуемых на территории Республики Казахстан

Категория нефтепродуктов	Допустимое содержание серы	Нормативно-правовая и метрологическая база контроля
Автомобильный бензин (классы К2, К3, К4, К5), не более мг/кг	500, 150, 50, 10	Технический регламент ТР ТС 013/2011; ГОСТ 32513-2013.
Дизельное топливо (классы К2, К3, К4, К5), не более мг/кг	500, 150, 50, 10	ТР ТС 013/2011; ГОСТ 32511-2013
Мазут, %	Для флотского мазута – 2,0; Для топочного мазута – 3,5.	Технический регламент ТР ТС 013/2011;
Авиационный керосин (ТС-1, РТ и др.), %	Не более 0,2 % масс. серы	ГОСТ 10227-2013
Авиационный бензин, %	Не более 0,03 % масс. серы	Технический регламент ТР ТС 013/2011;
Судовое топливо, %	3,5 (по 31 декабря 2011 г.) 2 (по 31 декабря 2012 г.) 1,5 (с 1 января 2013 г.) 0,5 (с 1 января 2020 г.)	Технический регламент ТР ТС 013/2011;

Сжиженный углеводородный газ (СУГ)	До 0,013 % масс. общей серы	ГОСТ 20448-90
------------------------------------	-----------------------------	---------------

Таким образом, для соблюдения вышеуказанных нормативных требований необходимо разработать методы удаления нежелательных компонентов серы и серных соединений для очистки и модернизации нефти и нефтяных продуктов [64]. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка экологически чистых и эффективных методов ее удаления [65], включающих как традиционные, так и инновационные подходы. К числу таких методов относятся: адсорбционная десульфуризация, микробиологическая или бактериальная десульфуризация, экстракционная десульфуризация, окислительная десульфуризация, а также сверхкритическая водная десульфуризация. В ряде случаев применяются комбинированные схемы, сочетающие два или более методов с целью повышения эффективности удаления сераорганических соединений и оптимизации технологических параметров [66].

1.2 Состав нефти и серосодержащие соединения

1.2.1 Общая характеристика нефти

Растущий спрос на энергию привел к исчерпанию легких и сладких (с низким содержанием серы) залежей нефти. Для удовлетворения потребностей населения используется более тяжелые и кислые нефти (с высоким содержанием серы), что экономически невыгодно, так как она требует специальной переработки и технологических улучшений [2]. Переработка и технологическое улучшение тяжелых и кислых нефти приводят к выбросам, негативно влияющие на организм человека и окружающую среду [67]. Нефть, не возобновляемый энергетический ресурс, природная, маслянистая, легковоспламеняющаяся жидкость [68, 69]. Состав нефти варьируется в зависимости от географического положения, геологического возраста месторождения и глубины залегания скважины [70]. И состоит из некоторых основных элементов таких как смеси углеводородов, составляющих циклоалканы, алкены, ароматические углеводороды – 85 % [71], 14 % водорода, 1-3 % серы, кислорода, солей [72] и металлов (например, V, Ni, Fe), которые ухудшает процесс переработки и хранения [73], и менее 1 % азота. Азотсодержащие соединения в сырой нефти обычно присутствуют в виде циклических соединений, таких как полициклические ароматические азотсодержащие гетероциклы (ПАНГ), и обычно подразделяются на две категории: основные (с пиридиновым ядром) и неосновные (с пиррольным ядром). Независимо от происхождения нефти, соотношение между ними обычно составляет 0,25-0,35 %. Неосновные соединения включают пиррол,

индол, карбазол (Рисунок 1.6, а-с) и их производные, а к основным относятся пиридин, хинолины и бензохинолины (Рисунок 1.6, d-f) [72, 74].

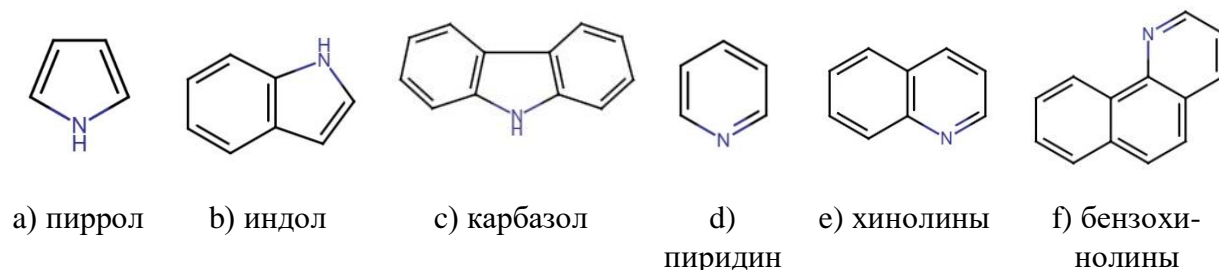


Рисунок 1.6 – Неосновные (а-с) и основные (d-f) азотосодержащие соединения

1.2.2 Серосодержащие соединения в нефти

В сырой нефти содержание серы по массе находится в диапазоне от 0,03 % до 7,89 % [75], поэтому различают мало- (до 0,42 %) и высокосернистую (от 0,42 % и выше) нефть [37]. При этом соединения серы в сырой нефти могут находиться в двух формах – неорганической (элементарная сера S, сероводород H_2S , карбонилсульфид COS, растворенный пирит FeS_2) и органической (соединения, в которых сера существует в виде гетероатома, связанного с молекулой углеводорода: тиолы RSH , сульфиды $R'-S-R$ и тиофеновые соединения C_4H_4S) [76, 77], которые в комплексе достигают 50-70 % от их общего содержания в нефти [78].

Сера являясь как наиболее характерным гетероатомом, присутствующих в сырой нефти может достигать до 14 мас. %. Их концентрация, возрастает с увеличением температуры кипения фракции, что отражает их более высокую термическую стабильность и молекулярную массу [75].

В составе нефти серу и ее компоненты можно разделить на четыре основные группы, а именно дисульфиды, меркаптаны, сульфиды и тиофены (Рисунок 1.7). При горении этих соединений в воздух выделяются ядовитые газы [79-80].

Дисульфиды – прозрачная, бесцветная или слегка желтая, подвижная жидкость при комнатной температуре, имеющая запах «эфира» [81]. Он легко воспламеняется и летуч, имеет растворимость 2160 мг/л^{-1} в воде при $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Мало растворим в воде, в спирте, бензоле, эфире, хлороформе, четыреххлористом углеводе и маслах. При выбросе в воздух расчетное давление паров в 359 мм рт. ст. при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ указывает, что сероуглерод будет существовать исключительно в виде пара в окружающей атмосфере и может потенциально улетучиваться с сухих поверхностей почвы, учитывая его давление паров [82]. К основным механизмам образования дисульфидных связей относятся:

- свободно радикальное окисление тиольной группы с последующим образованием дисульфидной связи при взаимодействии с близлежащим тиолом, через стадию промежуточного дисульфидного анион-радикала [83];
- нуклеофильная замещающая реакция, инициируемая гидропероксидами, приводящая к формированию сульфеновой кислоты, которая далее может преобразовываться в дисульфид;
- реакция обмена между тиолом и уже существующей дисульфидной связью (тиол-дисульфидный обмен) [81].

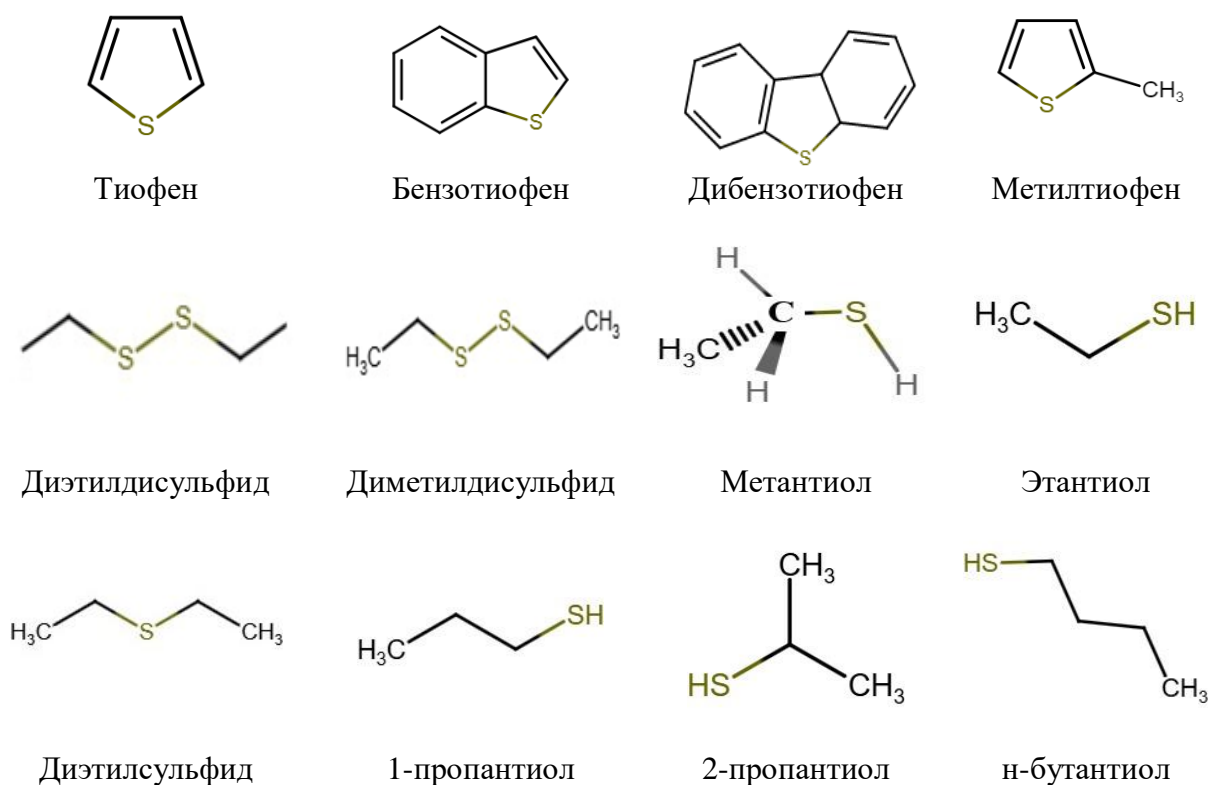


Рисунок 1.7 – Распространенные серосодержащие соединения в составе нефти

Меркаптаны (тиолы) – это серосодержащие аналоги спиртов, в которых кислород замещен атомом серы [84] с общей формулой $R-S-H$ [85], преобладающие сернистые соединения в продуктах нефтепереработки, обычно имеющие неприятный запах. Вызывают коррозию и нарушают стабильность топлива из-за образования смол [86]. Меркаптаны часто встречаются в природном газе, но обычно лишь в небольших концентрациях – до 200-300 ppm, а чаще – значительно меньше [84]. Наиболее распространенными являются:

- этилмеркаптан C_2H_5SH ,
- пропилмеркаптан C_3H_7SH ,
- бутилмеркаптан C_4H_9SH ,
- амилмеркаптан $C_5H_{11}SH$.

Сульфиды – это соединение, содержащих анион серы в степени окисления -2 (S^{2-}), связанный с одним или несколькими металлическими, или полуметаллическими катионами [87]. Сульфиды образуются преимущественно в процессе диагенеза органического вещества осадков, протекающего в восстановительной среде. А также при термолизе и гидрокрекинге тяжёлых фракций (например, при термокаталитическом распаде тиофенов и сульфидов) образуется H_2S , особенно при температуре выше $240-250\text{ }^\circ\text{C}$ [88]. Их суммарное содержание в составе нефти и нефтяных остатков может достигать $0,03-7,9\%$ по массе, причём они образуют значительную долю лёгких и средних фракций нефти [75]. Присутствие сульфидов в нефти оказывает ряд негативных воздействий такие как повышение коррозионной активности нефтяных продуктов, образование H_2S при термической обработке токсичного и агрессивного газа; экологические риски при сжигании топлива с высоким содержанием серы образование SO_2 и вторичных загрязнителей (кислотные дожди) [2].

Тиофены – это бесцветная жидкость с температурой кипения $84,4\text{ }^\circ\text{C}$ и температурой плавления $-38,3\text{ }^\circ\text{C}$, имеет запах, похожий на запах бензола, легко воспламеняется, умеренно токсичен, не смешивается с водой и растворяется в органических растворителях [89]. Тиофены рассматриваются как богатая электронами ароматическая циклическая система, подобная бензолу. Поэтому его основная реакционная способность, то есть электрофильное замещение, весьма близка ко всем сопоставимым (гетеро)ароматическим циклам [90]. Высокая стабильность тиофенов связана с различными реакциями, содержащими источники серы и углеводороды, особенно ненасыщенные. Первоначальный синтез тиофена, проведённый Мейером, включал ацетилен и элементарную серу. Кроме того, тиофены обычно синтезируются путем обработки диэфиров, 1,4-дикетонов или дикарбоксилатов в присутствии сульфидирующих реагентов [91]

Среди вышеперечисленных серо органических групп наибольшую технологическую и эксплуатационную проблему представляют сульфиды, а также некоторые конденсированные производные тиофена. Установлено, что свободная сера, дисульфиды и тиофенол участвуют в процессах, способствующих образованию осадков в нефтяных системах [2]. В большинстве нефтяных и газовых месторождений наличие серы в сырой нефти снижает эффективность сжигания и способствует увеличению выбросов загрязняющих веществ в процессе добычи нефти и газа [92]. Приводит к коррозии труб, образованию гудрона в процессе переработки нефти, снижают стабильность топлива, придают нефтепродуктам специфический запах [93], а также дезактивацию катализаторов в процессе промышленного удаления, к деградации лесов и изменению климата. Поэтому удаление S-соединений привлекло огромное внимание как стран-экспортеров, так и стран-импортеров нефти [12].

Кроме вышеперечисленных недостатков у серы и их соединений есть и преимущества. Она необходима для производства фосфорных удобрений и

производства легких электродвигателей и высокопроизводительных литий-ионных аккумуляторов. Ежегодно используется более 246 миллионов тонн серной кислоты. Сегодня более 80 % мировых поставок серы поступает за счет десульфурации ископаемого топлива для сокращения выбросов диоксида серы (SO₂) [94]. Поэтому для десульфурации серы исследователи разработали технологии, такие как [95] адсорбционная десульфуризация, окислительная десульфуризация, гидродесульфуризация, биодесульфуризация [54].

1.3 Технологии десульфуризации нефти и нефтяных компонентов

В технологии десульфуризации нефти практикуются различные подходы, включая гидродесульфуризацию (ГДС), адсорбционную десульфуризацию, биодесульфуризацию, окислительное обессеривание, экстрактивную десульфуризацию [96], а также методы с применением комбинированных технологий [97]. Однако наиболее часто используемыми являются такие виды десульфуризации, как адсорбционная, гидродесульфуризация и биодесульфуризация [98].

1.3.1 Адсорбционная десульфуризация

Адсорбционная десульфуризация – это каталитический процесс для удаления соединений серы, таких как сульфиды, дисульфиды из нефтяных фракций [9], но технология не подходит для удаления неактивных соединений серы, таких как БТ, ДБТ, 4,6-ДМДБТ и т. д., из-за необходимости более жестких условий реакции [99]. Метод является недорогой альтернативой гидродесульфуризации, при которой адсорбент добавляется к сырью, а сульфид иммобилизуется на его поверхности или внутри, таким образом удаляя сульфид из сырья [100]. Адсорбционная десульфуризация выделяется на фоне других методов благодаря своей простоте в использовании, низким эксплуатационным затратам, экологичности и мягким условиям реакции [101], низким рабочим температурам (от комнатной до 100 °С), отсутствием необходимости в водороде, возможности глубокого удаления тяжёлых серосодержащих соединений при умерённых условиях [102].

На рисунке 1.8 приведена схематическая модель процесса адсорбционной десульфуризации [103]. Система состоит из загрузочного резервуара с топливом, воздушного компрессора, адсорбционного реактора, резервуара для воды и испарителем. Серосодержащее топливо поступает в адсорбционный реактор, канал которого заполнен адсорбционным слоем пористого цеолитового адсорбента, где происходит удаление сернистых соединений. Увеличенная часть рисунка показывает микроструктуру цеолита, где отчетливо видна его пористая структура и высокая поверхностная активность, которые являются главными причинами эффективности процесса адсорбции.

В основе механизма метода лежит селективное взаимодействие серо органических соединений, таких как тиофен, бензотиофен и дибензотиофен, с активными центрами твердого адсорбента. Наиболее распространенными механизмами фиксации молекул серосодержащих компонентов являются:

- образование π -комплексов между π -электронной системой ароматических колец серо органических соединений и переходными металлами;
- координационное связывание атома серы с катионами металлов, локализованных в пористой структуре адсорбента;
- физическая адсорбция за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий [104].

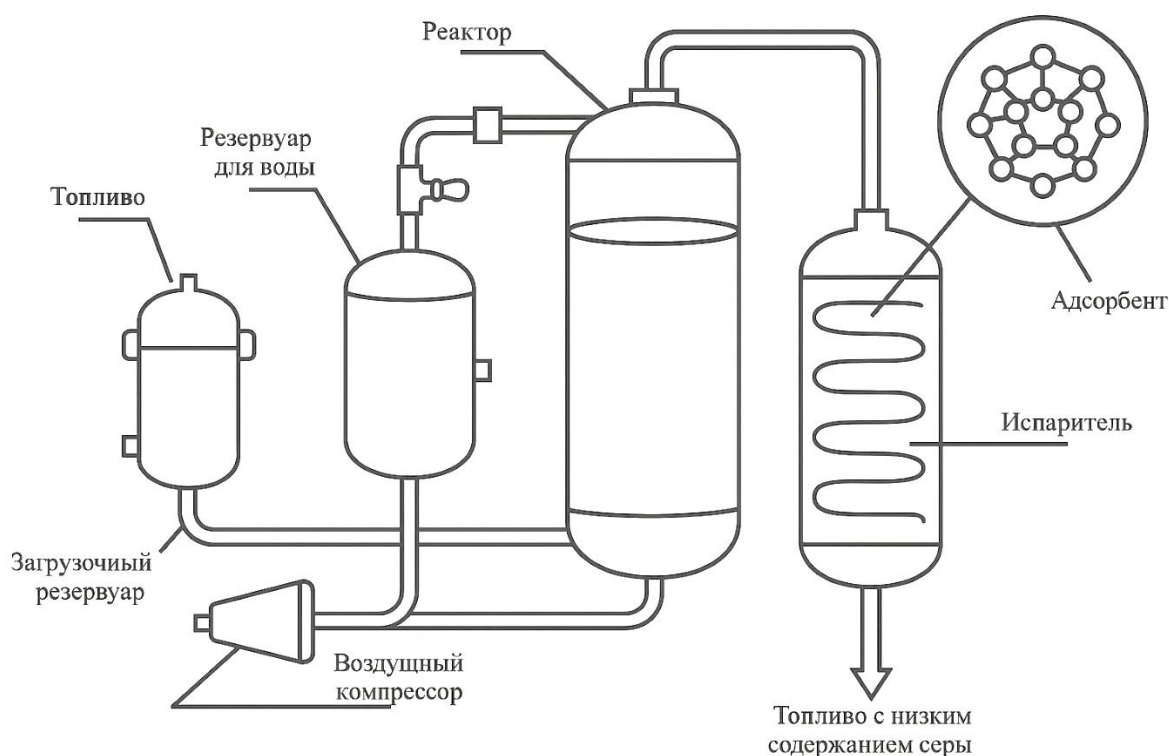


Рисунок 1.8 – Технологическая схема адсорбционной десульфуризации

Количество адсорбированной серы на единицу массы адсорбента (мг/г) и процент адсорбции рассчитывается с использованием уравнений:

$$q_e = \frac{C_i - C_e}{W} \times V \quad (1.1)$$

где:

q_e – адсорбционная емкость в мг/г,

C_i (мг/л) – начальная концентрация серы в модельной нефти,

C_e – равновесная концентрация серы в модельной нефти,

V – объем модельной нефти в литрах,

W – масса адсорбента в граммах.

Среди наиболее эффективных адсорбентов, применяемых для адсорбционной десульфуризации, можно выделить:

– цеолиты, особенно модифицированные переходными металлами (Cu, Ni, La, Ce и др.), обладающие высокой удельной поверхностью, развитой пористой структурой и устойчивостью к регенерации (такие системы демонстрируют селективное связывание серосодержащих молекул даже в присутствии других углеводородов) [105];

– активированные угли, в том числе модифицированные, благодаря высокой сорбционной способности и доступности пор различного размера (их эффективность обусловлена развитой микропористой структурой и возможностью физической и химической регенерации) [106];

– оксиды металлов, включая γ -Al₂O₃, ZnO и другие, которые проявляют активность в адсорбции за счет кислотных и основных центров на поверхности [107].

Но несмотря на вышеперечисленные преимущества метода есть недостатки метода, которые замедляют процесс удаления серы:

– первоначальная скорость адсорбции высокая, но при заполнении макро- и мезопор процесс постепенно замедляется, тогда как микропоры насыщаются медленно, повышая сопротивление и время обработки [108];

– большинство адсорбентов сложно регенерировать, потому что термальная, химическая обработка и промывание со временем могут изменять пористость и активность [109];

– много циклов регенерации могут приводить к снижению производительности и сокращению срока службы [109];

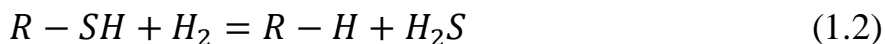
– часто, в целях повышения эффективности, требуется интеграция с другими методами, такими как окислительная десульфуризация или гибридными системами [101].

1.3.2 Гидродесульфуризация

Гидродесульфуризация (ГДС) является широко используемой технологией для удаления серы и преобразования ресурсов тяжелой нефти [110], азота и металлов, а также асфальтенов и приводит к более чистому сгоранию путем гидрогенолиза C-S-связей в присутствии водорода и дисульфидных катализаторов таких как CoMo или NiMo на γ -Al₂O₃ [111]. А также реакции тяжелой нефти с водородом при высоких температурах около 300-400 °С и давлении в реакторе 30-130 атм. на селективных слоях катализатора. Гетерогенные катализаторы играют решающую роль в процессах гидроочистки тяжелой нефти благодаря своей исключительной термической и физико-химической стабильности, что позволяет им выдерживать высокие температуры и давления, обычно встречающиеся в этих процессах [112]. Выбор катализатора зависит от задачи процесса: NiMo более гидрогенизирующий, предпочтителен для потоков, требующих интенсивного насыщения, и для «рефрактерных» сероароматиков (например, 4,6-ДМДБТ), особенно в проточных режимах при ограниченном времени контакта. CoMo сильнее выражает гидрогенолиз, чаще применяют для олефинсодержащих

потоков (бензины, флюид-каталитический крекинг) и нередко в периодических реакторах [75]. А также используются носители катализаторов: Al_2O_3 , $Al_2O_3-TiO_2$, $Al_2O_3-ZrO_2$, $SiO_2-Al_2O_3$, TiO_2 , ZrO_2 , мезопористые SBA-15/MCM-41, цеолиты (USY, ZSM-5) для бифункциональности, углеродные носители (активированный уголь, графен) [113].

Простая реакция ГДС может быть описана следующим уравнением:



Здесь, R представляет собой алкил ассоциированной степени. Реакционная способность R-SH (меркаптановых или тиоловых) соединений выше, чем у дисульфидов (R-S-S-R). H_2S легко удаляется из обессеренной нефти путем абсорбции в установке для подготовки газа и впоследствии преобразуется в элементарную серу по методу Клауса [114].

На рисунке 1.9 показана упрощённая схема ГДС. Сырьё смешивают с подпиточным и рециркулируемым водородом, нагнетают до нужного давления, подогревают в теплообменнике (за счет тепла выхода реактора) и догревают в печи. Далее смесь гидрообработывают в одном или нескольких реакторах с неподвижным слоем; внутри размещают несколько каталитических слоев с разными функциями. Подача идёт сверху, между слоями вводят квенч-водород для контроля температуры экзотермичной реакции. Выходной поток охлаждают, затем газ и жидкость разделяют в горячем и холодном аппаратах высокого давления. Жидкость фракционируют в колонне по температурам кипения, газ направляют в аминовый абсорбер для удаления H_2S ; очищенный водород компрессором возвращают в циркуляцию [115].



Рисунок 1.9 – Технологическая схема для процесса ГДС

Гидродесульфуризация обладает рядом преимуществ: промышленная зрелость и широкое внедрение (стандартные блоки НПЗ, непрерывный

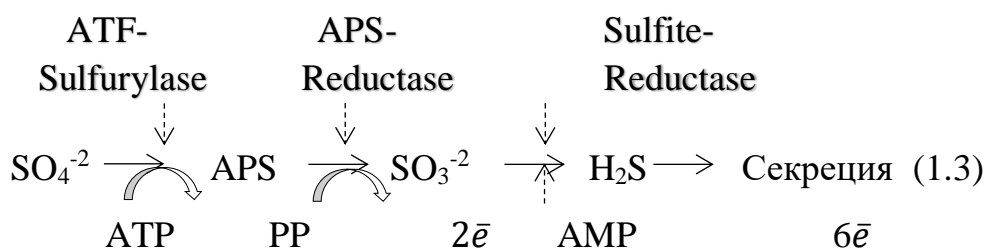
режим); одновременное удаление нескольких примесей и стабилизация топлива (S, N, O, насыщение олефинов) [116]; гибкая конфигурация процесса (теплосетевые решения, один/несколько реакторов, адаптация под различные фракции); высокая адаптивность к разным видам сырья, длительный ресурс катализаторов и технологическая простота [117]; возможность регенерации/ресайклинга отработанных катализаторов, что поддерживает ресурсосбережение [118].

Несмотря на хорошо изученности и широко внедренный коммерческий процесс, требуется дальнейшая оптимизация и обновление катализаторов для удовлетворения современных требований. Важно отметить, что технология затратна из-за необходимости строгого соблюдения требований безопасности, работы при высоких температурах (300-400 °С) и давлениях (30-130 бар), а также из-за высокого расхода водорода. [119].

1.3.3 Биодесульфуризация

В условиях усиливающихся экологических требований глобальное внимание смещается в сторону устойчивых и экологически чистых видов топлива, что стимулирует развитие технологий глубокой переработки низкосортной нефти в более ценные продукты. Сераорганические соединения в составе нефти не только затрудняют переработку, но и способствуют загрязнению окружающей среды при сгорании топлива. Согласно экономическим оценкам, каждый дополнительный процент содержания серы в нефти снижает ее рыночную стоимость в среднем на 0,056 доллара США [120]. Биодесульфуризация представляет собой инновационный подход к удалению серы из углеводородного сырья, основанный на использовании микроорганизмов, способных селективно извлекать атомы серы из сероорганических соединений при этом оставляя углеродную цепь органических соединений серы неповрежденной [121]. В отличие от традиционных методов биодесульфуризация осуществляется при мягких условиях обеспечивая более глубокую степень очистки. Процесс основан на ферментативном окислении, при котором специфические бактериальные ферменты разрывают связи углерод-сера, способствуя эффективному удалению серы без разрушения углеродного скелета молекулы [122].

Нефтяные резервуары относятся к экстремальным экосистемам, характеризующиеся высокой температурой, соленостью и давлением [123], где микробный компонент представлен сероокисляющими [124, 125], нитратредуцирующими, сульфат- [124], нитрат- и железоредуцирующими [126] микроорганизмами, которые в процессе жизнедеятельности используют углеводородные, серо- и азотсодержащие соединения [127]. Из них, сульфатредуцирующие микроорганизмы считаются нежелательными, т.к. являются проводниками биокоррозии труб и конструкций нефтяных сооружений, так, в анаэробных условиях они восстанавливают, используя сульфат в качестве терминального акцептора электронов [128, 129]:



Как видно из схемы, сульфат многоступенчато восстанавливается до сероводорода:

1) из-за стабильности сульфат-аниона, сульфат под действием ATF-сульфуриказы активируется (ATF-зависимо) до аденозин-5'-фосфосульфата (AFS) [130];

2) AFS с помощью APS-редуктазы (*aprAB*) восстанавливается до сульфита [127];

3) при действии диссимиляционной сульфитредуктазы (*dsrAB*) и белка DsrC (*dsrC*), идёт восстановление до сульфида [127].

Ключевым белком в микробном восстановлении сульфита является диссимиляционная сульфитредуктаза (*dsrAB*) [131], которая катализирует заключительную энергосберегающую стадию диссимиляционного пути восстановления сульфатов [132].

Серо окисляющие бактерии анаэробно окисляют соединения серы в качестве доноров электронов для сохранения энергии [133] и производят побочные продукты ионов сульфата и водорода [134]:



С помощью гена *apr AB* были определены разнообразия бактериальных групп сульфатредуцирующих и сероокисляющих. К первым отнесены фотолитотрофные окислители серы и строгие анаэробы, хемолитотрофы классов α -, β -, γ -протеобактерии [135], ко вторым – нейтрофильные, хемолитоавтотрофные сероокисляющие микроорганизмы [136]. Для бактерий, ассимилирующие и утилизирующие серу, такие факторы, как температура, концентрация серы [135] и вода [137] являются ключевыми для формирования микробных сообществ [135]. При низком содержании воды рост сероокисляющих микроорганизмов прекращается [137].

Биодесульфуризация с помощью сероокисляющих микроорганизмов [138] является экологичным (ферментативное расщепляющие углерод-серных связей в составе нефти и их продуктов предотвращает образование нежелательных побочных продуктов и сокращает выбросы парниковых газов) [139, 140] и экономически эффективным (процесс протекает при температуре и давлении окружающей среды [141, 142]) методом удаления серы и серных соединений из нефти и нефтепродуктов.

В заключении приводится таблица, где все методы дисульфуризации интерпретируются в сравнительном аспекте (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Методы десульфуризации интерпретируются в сравнительном аспекте

Метод	Особенность процесса	Применяют для удаления	Не подходит для удаления	Ключевое преимущество	Ключевой недостаток	Ссылка
Адсорбционная	Селективное взаимодействие сероорганических соединений (тиофен, бензотиофен и дибензотиофен) с активными центрами твёрдого адсорбента	Тиофеновые соединения (ДБТ и аналоги) в лёгких/средних фракциях	Неактивных соединений серы, таких как БТ, ДБТ, 4,6-ДМДБТ и т. д.	Мягкие условия (низкая температура и давление, отсутствие водорода), высокая селективность	Ограниченная сорбционная ёмкость, необходимость регенерации и адсорбента и потеря активности при многократных циклах	[143, 144]
Гидродесульфуризация	Каталитическое удаление серы путём гидрогенолиза и гидрогенирования сероорганических соединений в присутствии водорода и катализаторов	Тиофены, тиофаны, меркаптаны и др. в средних дистиллятах	Стерические и затруднённые тиофены (4,6-ДМДБТ)	Масштабируемость, зрелая промышленная инфраструктура и высокая эффективность при обработке большинства нефтяных фракций.	Высокие капитальные и операционные расходы. (Н ₂ , давление, температура).	[145, 146]
Биодесульфуризация	Микроорганизмы окислительно удаляют S-атом из тиофенов до 2-НВР без разрушения углеводоро	Рефрактерных сероорганических соединений	Высокодебитных потоков и тяжёлых нефтяных остатков	Низкие энергозатраты, работа при мягких условиях	Низкая скорость процесса и длительное время обработки	[147-149]

Метод	Особенность процесса	Применяют для удаления	Не подходит для удаления	Ключевое преимущество	Ключевой недостаток	Ссылка
	дногоскелета					
Окислительная	Каталитическое окисление сероорганических соединений до сульфонов/сульфоксидов, которые затем удаляются экстракцией или адсорбцией.	Рефрактерных сероорганических соединений (например, 4,6-диметилдибензотиофена и других алкилзамещённых дибензотиофенов)	Прямых тяжёлых нефтяных остатков и сильно загрязнённых матриц	Мягкие условия (атмосферное давление, низкая T), отсутствие потребности в H ₂ и дорогих катализаторах	Значительный расход окислителя и реагентов, необходимость отдельной стадии отделения и утилизации сульфонов/сульфоксидов	[150, 151]
Экстракционная	сероорганические соединения из топлива переходят в несмешивающийся экстрагент	Тиофеновых и бензотиофеновых соединений из дизельных / керосиновых фракций при мягких условиях	Серных соединений из тяжёлых нефтяных остатков и загрязнённых сред	Сохранение структуры и качества исходного топлива, метод не разрушает углеводородный скелет	Требуется отбор и регенерация подходящего экстрагента, что сложно и дорого	[152-154]
Комбинирование окислительной и экстракционной десульфуризации	Селективное окисление и эффективное удаление продуктов в мягких условиях	Алкилзамещённых, рефрактерных сероорганических соединений (например, ДБТ и более сложных структур)	Тяжёлых нефтяных остатков с высокой загрязнённостью и сложной матрицей	Минимизация фазовых разделений, сокращение времени и энергетических затрат, экологично (ГЭР)	Сложность формулировки и стабилизации многокомпонентных экстрагентов/каталитических систем	[154-156]

1.4 Глубокие эвтектические растворители

1.4.1 Общие характеристики глубоких эвтектических растворителей

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) были разработаны в XXI веке как экологически безопасные растворители и стали использоваться в различных областях [157]. ГЭР по структуре представляют собой эвтектические смеси, образующиеся при сочетании донора водородной связи (ДВС) и соли металла с акцептором водородной связи (АВС) [158]. Взаимодействие акцепторов водородной связи с четвертичными аммониевыми солями происходит через делокализацию заряда между акцептором водородной связи и ионами галогенидов, что ведет к снижению температуры плавления и образованию ГЭР [159]. Температура плавления эвтектической смеси оказывается ниже, чем у ее чистых компонентов (АВС и ДВС) [160], а также ниже, чем у идеальной жидкой смеси. Очень низкая температура плавления ГЭР объясняется различными типами взаимодействий между его компонентами (АВС и ДВС) [161]. Ионные жидкости с высокой стоимостью, токсичностью, сложностью при синтезе и очистке вызвали проблемы в промышленности [162]. ГЭР обладающей схожими уникальными физико-химическими свойствами решил эти ограничения, предложив ряд преимуществ, таких как универсальности, простоты, низкая стоимость синтеза без необходимости очистки, легкая биodeградация, нетоксичность и доступное сырье [163, 164]. Благодаря исследованиям Abbott A.P. и соавторов, в котором было обнаружено понижение температуры плавления смеси хлорида холина (ChCl) в соотношении 1:2 (с температурой плавления около 302 °C) с мочевиной (температура плавления около 133 °C), при которой эвтектическая смесь плавилась при 12 °C [165], ГЭР стали привлекать все большее внимание как в научных кругах, так и в промышленности [166].

Для синтеза ГЭР высокой чистоты при минимальных затратах используются различные методы получения. В научной литературе выделяют три основных подхода к синтезу ГЭР: термический, лиофильная сушка и механохимическое смешивание [167].

Самый простой и распространённый способ получения ГЭР это термический метод. Этот способ основан на нагревании смеси компонентов с известным количеством воды или без него на водяной бане или на горячей плите [168] при температуре от 50 до 100 °C, в зависимости от температуры плавления и устойчивости веществ, до получения однородного прозрачного раствора [169]. Однако данный способ синтеза требует больше времени для приготовления, от 8 до 12 часов и более высокие температуры могут привести к деградации конечных продуктов из-за реакции этерификации [170].

Метод лиофильной (сублимационной) сушки включает два этапа: (1) растворение компонентов ГЭР в воде с применением нагрева при 50 °C,

ультразвука при (37 кГц, 30 Вт) или вихревого перемешивания и (2) последующее удаление воды путем лиофилизации [171]. Вместо лиофильной сушки воду также можно удалить с помощью ротационного испарителя или вакуумной центрифуги [168].

Механохимический способ предполагает ручное растирание компонентов в ступке при комнатной температуре до образования однородной жидкой смеси [172]. Затем для удаления влаги ABC [Ch⁺] [Cl⁻] сначала высушивают в вакуумной печи в течение двух дней при температуре 40 °С, а затем выдерживают в условиях высокого вакуума в Шленке в течение примерно 4 дней из-за его гигроскопичных характеристик [173].

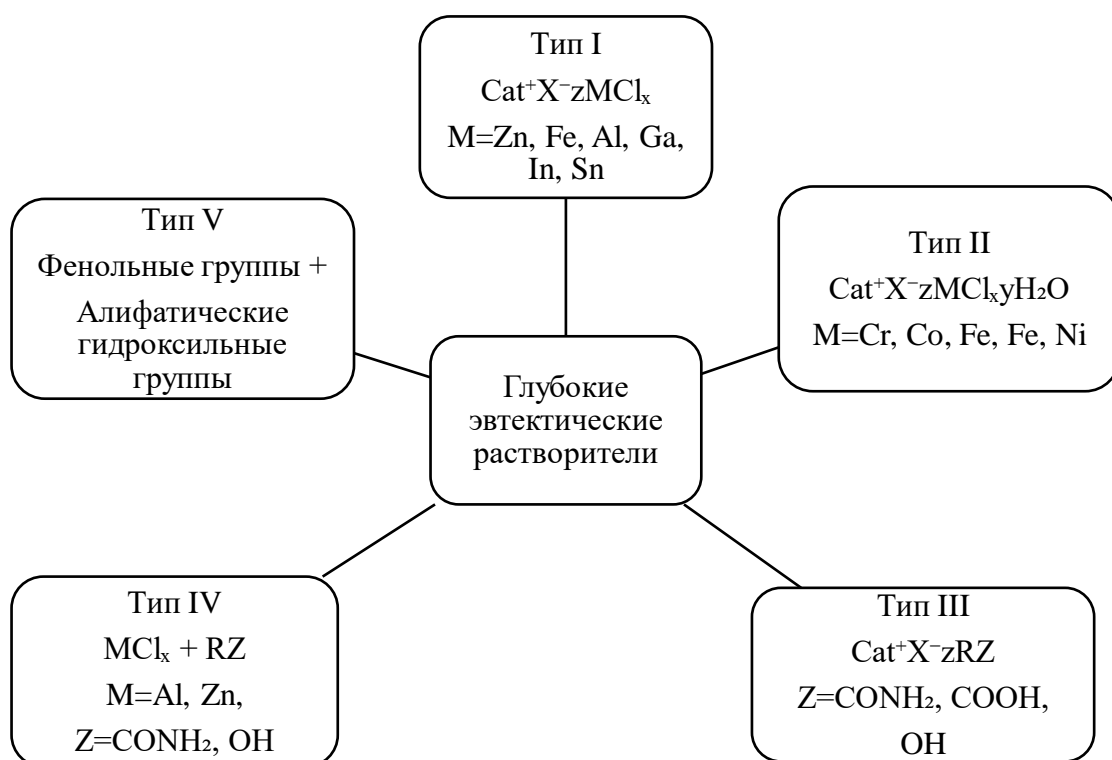


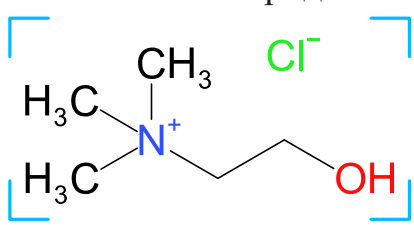
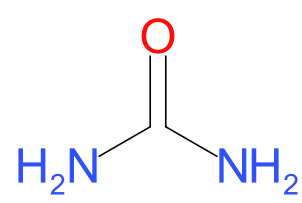
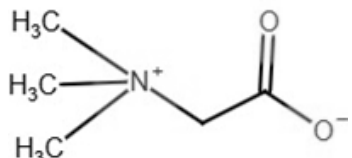
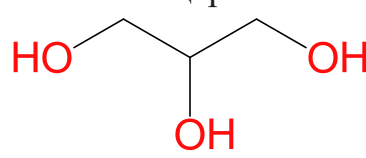
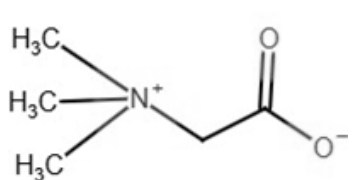
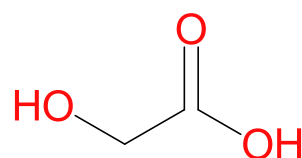
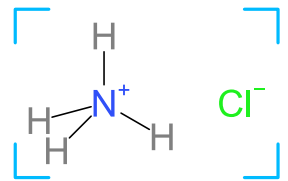
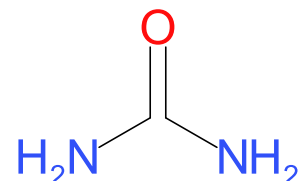
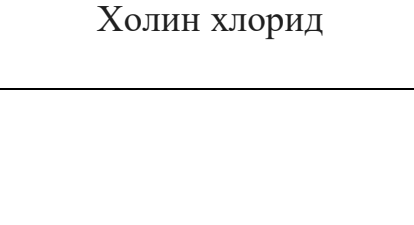
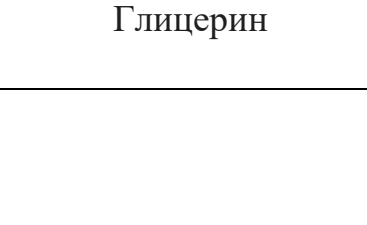
Рисунок 1.10 – Пять категорий ГЭР

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) классифицируются на пять категории (Рисунок 1.10) [182] в зависимости от их природы. ГЭР типа I состоят из четвертичной аммонийной соли и галогенида металла [174]. Тип I включает смеси MCl_x с четвертичными аммониевыми солями, аналогичные системам галогенидов металлов с имидазолиевыми солями. Примеры, эвтектики с FeCl₂, соединения ЭМИХ (1-Этил-3-метилимидазолий хлорид) с AgCl, CuCl, LiCl, CdCl₂, CuCl₂, SnCl₂, ZnCl₂, LaCl₃, YCl₃ и SnCl₄ [159]. Тогда как ГЭР типа II включают четвертичную аммонийную соль и гидратированный галогенид металла [174]. Тип II включает смеси MCl_x*yH₂O с четвертичными аммониевыми солями. Например, ChCl⁺, CoCl₂·6H₂O (M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe) [175]. ГЭР типа III формируются на основе четвертичной аммонийной соли и донора водородной связи (ДВС), например, спиртов или карбоновых кислот [176]. К типу III относятся Cat⁺ X⁻+zRZ

(Z=CONH₂, COOH, OH) [177]. ГЭР типа IV представляют собой эвтектические смеси ZnCl₂ и ДВС, такие как мочевины или ацетамид [176]. К типу IV относятся MCl_x+RZ (M=Al, Zn; Z=CONH₂, OH) [177]. Наконец, ГЭР типа V были получены Коутиньом и его коллег. К этой группе относятся эвтектические растворители на основе гидроксильной группы, связанная с ароматическим кольцом, то есть фенольным соединением. Это позволяет создавать новые типы молекулярных неионных ГЭР, классифицируемые как тип V [178]. В качестве известных соединений можно назвать фенола с триоктилфосфиноксидом [179], соединение ментола:тимолола в соотношениях 1:1 [180]. Данный тип ГЭР только недавно был добавлен в классическую классификацию. Их особенностью является способность к восстановлению и регенерации за счёт испарения, что даёт им значительное преимущество по сравнению с ионными ГЭР [181].

Интерес к ГЭР растёт с каждым годом. В таблице 1.3 приведены часто используемые ГЭР.

Таблица 1.3 – Часто используемые глубокие эвтектические растворители

№	Акцепторы водородных связей	Доноры водородных связей
1 [183]	Холин хлорид 	Мочевина 
2 [184]	Бетаин 	Глицерин 
3 [184]	Бетаин 	Гликолевая кислота 
4 [185]	Хлористый аммоний 	Мочевина 
5 [186]	Холин хлорид 	Глицерин 

№	Акцепторы водородных связей	Доноры водородных связей
6 [187]	<p>Хлорид тетраметиламмония</p>	<p>Глицерин</p>
7 [188]	<p>Лимонная кислота</p>	<p>Пропиленгликоль</p>
8 [188]	<p>Лимонная кислота</p>	<p>Глицерин</p>
9 [174]	<p>Холин хлорид</p>	<p>Этиленгликоль</p>
10 [174]	<p>Холин хлорид</p>	<p>Молочная кислота</p>

1.4.2 Физическая и химическая характеристика глубоких эвтектических растворителей

Различные свойства глубоких эвтектических растворителей позволяют рассматривать их как потенциально универсальные растворители, способные извлекать как полярные, так и неполярные соединения. Благодаря этому они представляют собой перспективную замену множеству традиционных токсичных органических растворителей. К важным физико-химическим характеристикам ГЭР, относятся температура плавления, плотность и вязкость [189].

1.4.2.1 Плотность

Плотность глубокой эвтектической смеси представляет собой одно из основных физико-химических свойств, поскольку она задаёт исходные параметры для построения уравнений состояния. Эти уравнения позволяют рассчитывать другие важные термодинамические характеристики, необходимые для оценки растворителя с точки зрения его промышленной применимости. Точные данные о плотности также способствуют оптимизации процессов, где ГЭР используется в качестве экологически безопасной и функционально гибкой альтернативы традиционным органическим растворителям [190]. Литература показывает, что большинство плотностей ГЭР выше плотности воды, между 1,0 и 1,35 г/см³ при 298,15 К [191]. Плотность ГЭР зависит от множества факторов, включая молекулярную структуру компонентов, их соотношение, температуру и применение относительно более крупных молекулярных компонентов. Данные свойства в составе ГЭР может приводить к увеличению ее плотности [192]. Кроме того, на это физико-химическое свойство существенное влияние оказывают такие характеристики компонентов АВС и ДВС, как длина алкильной цепи, количество функциональных групп, а также их молярное соотношение в смеси. Совокупное воздействие этих факторов определяет плотность конечной системы и, соответственно, влияет на её термодинамическое поведение и растворяющие свойства [193]. ГЭР обычно имеют плотность от 1,0 до 1,35 г/см³ при 25 °С. Однако системы, содержащие металлические соли, такие как ZnCl₂, могут иметь плотность от 1,3 до 1,6 г/см³. Гидрофобные ГЭР, как правило, имеют плотность ниже воды, что обусловлено их молекулярной структурой [194, 195]. Аналогично, плотность ГЭР, состоящих из ChCl и различных кислот в качестве ДВС, составляла от 1,0 до 1,6 г см⁻³ [196]. Температура также влияет на плотность растворителя. С повышением температуры плотность ГЭР обычно уменьшается [197]. Однако, ГЭР на основе хлорида холина и глицерина в молярном соотношении 1:2, известный как глицелин, а также его водные смеси в температурном диапазоне 283,15-363,15 К были исследованы на предмет изменения плотности. Установлено, что с повышением температуры плотность снижается, при этом данная

зависимость описывается квадратичной функцией, то есть, плотность уменьшается с увеличением температуры, но не с постоянной скоростью

$$\rho(T) = aT^2 + bT + c \quad (1.5)$$

где, $\rho(T)$ – плотность при температуре T ;

a, b, c – эмпирические коэффициенты, определённые экспериментально;
 T – абсолютная температура (обычно в Кельвинах) [198].

Еще одним важным фактором, определяющим плотность глубоких эвтектических растворителей (ГЭР), является природа используемой соли. В частности, как показано в работе Shahbaz и соавт., ГЭР, содержащие аммониевые соли, демонстрируют более низкие значения плотности по сравнению с фосфониевыми аналогами. Это различие обусловлено вариациями в молекулярной массе, объеме и степени упаковки ионных пар в структуре раствора [199]. Кроме того, установлено, что соли с бромид-анионами образуют более плотные ГЭР по сравнению с хлоридсодержащими, что связано с большей массой и поляризуемостью иона Br^- , способствующей более плотной молекулярной организации в жидкости [200]. Точные данные о плотности ГЭР необходимы для разработки уравнений состояния, оценки растворяющих свойств и оптимизации процессов. Понимание факторов, влияющих на плотность, позволяет настраивать свойства ГЭР для конкретных промышленных применений [201].

1.4.2.2 Вязкость

Для промышленного внедрения ГЭР важно глубокое понимание их теплофизических свойств, в частности вязкости, которая определяет пригодность этих растворителей в химических процессах, влияя на поток, массоперенос и теплопередачу. Однако большинство ГЭР обладают высокой вязкостью при комнатной температуре из-за обширной сети водородных связей, что ограничивает их применение. Этот параметр зависит от таких факторов, как температура, давление и химический состав жидкости [202]. Вязкость при этом зависит от таких факторов, как температура, давление, химический состав, тип и соотношение донора (ДВС) и акцептора (АВС) водородной связи, а также от характера межмолекулярных взаимодействий между ними. [203]. Сильные водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса повышают вязкость ГЭР. Хотя ГЭР имеют многообещающие применения, их вязкость оказывает значительное влияние на эксплуатационные характеристики и потенциальные области применения, их ограничения включают низкие коэффициенты диффузии, медленную скорость поглощения газа и низкую электропроводность [204]. Например, в улавливания и преобразования углекислого газа (CO_2) вязкость ГЭР напрямую влияет на его растворимость: чем выше вязкость, тем ниже растворимость CO_2 . Это особенно важно для процессов фотокаталитического преобразования CO_2 в ценные химические продукты, такие как углеводороды. Таким образом, подбор подходящего состава и пропорции компонентов АВС и ДВС имеет

решающее значение для оптимизации вязкости и растворимости CO₂ в ГЭР, что, в свою очередь, влияет на эффективность их применения [205].

Кроме того, вязкость ГЭР может изменяться под влиянием температуры и наличия ионных видов в составе электролита. Эти параметры критичны при использовании ГЭР в качестве жидких электролитов, поскольку вязкость напрямую отражает текучесть и ионную подвижность в таких системах [206]. Например, смесей на основе бетаина, хлорида холина и пролина наблюдаются заметные различия в вязкости, что объясняется различиями в вязкости используемых компонентов. В частности, глицерин обладает высокой вязкостью (более 1 Па·с), тогда как вязкость этиленгликоля значительно ниже около 0,019 Па·с [207]. Вязкость смесей, в которых используется глицерин, колеблется в пределах от 1 до 2 Па·с. Эти значения сопоставимы с вязкостью смеси бетаин-глицерин в мольном соотношении 1:3, составляющей около 1,2 Па·с. При этом вязкость таких смесей несколько выше по сравнению с ранее зарегистрированными значениями для других систем, например, хлорид холина-глицерин (1:2), где вязкость находилась в диапазоне 0,2-0,5 Па·с, и хлорид холина-мочевина (1:2) с вязкостью около 0,9 Па·с [208]. Для описания температурной зависимости вязкости ГЭР часто используют эмпирические модели, такие как уравнение Аррениуса. Эти модели позволяют предсказать поведение системы в широком температурном диапазоне, что критично при масштабировании технологических процессов:

$$\eta = \eta_0 \cdot \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1.6)$$

где, η

η – вязкость при температуре T,

η_0 – предэкспоненциальный множитель,

E_a – энергия активации вязкого потока,

R – универсальная газовая постоянная,

T – абсолютная температура (в К).

Это уравнение показывает, что вязкость убывает экспоненциально с ростом температуры, что связано с разрушением водородных связей и ослаблением межмолекулярного взаимодействия. [209]. А также добавление воды в ГЭР может снизить их вязкость, разрушая часть водородных связей и увеличивая подвижность молекул. Однако избыточное количество воды (>50 %) может нарушить структуру ГЭР и снизить их растворяющую способность [168]. Оптимизация вязкости также может быть достигнута путём молекулярного дизайна: например, выбор менее вязких ДВС (этиленгликоль, мочевины) или использование разветвлённых структур АВС, которые препятствуют плотной упаковке и уменьшают межмолекулярные взаимодействия. Это особенно важно для создания жидких электролитов и растворителей для процессов массообмена [208].

1.4.2.3 Температура плавления

Понятие эвтектической смеси происходит от греческого слова eutēktos, что означает «легко плавящийся» и отражает снижение температуры

плавления при смешивании компонентов [210]. Температура плавления ГЭР является важным фактором в дифференциации глубокой эвтектической смеси от других типов жидких смесей [211]. Снижение температуры плавления в ГЭР в основном связано с водородными связями между донором (ДВС) и акцептором (АВС) водорода, которые препятствуют образованию твёрдой фазы [165]. Эбботт и коллеги показали, что при смешивании хлорида холина и мочевины в соотношении 1:2 образуется эвтектическая смесь с температурой плавления 12 °С - значительно ниже, чем у каждого компонента (302 °С для хлорида холина и 133 °С для мочевины). К изменению температуры влияют различные факторы [212], включая изменение энтропии при переходе в жидкую фазу, решётчатую энергию системы и силу взаимодействий между АВС и ДВС [213]. И для определения температуры плавления ГЭР применяются методы термического анализа, такие как прибор для измерения точки плавления, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), а также методы рассеяния рентгеновского излучения. Построение фазовой диаграммы в зависимости от состава компонентов АВС и ДВС позволяет визуализировать снижение температуры плавления, определить точную температуру плавления ГЭР и предсказать поведение их эвтектической фазы [214].

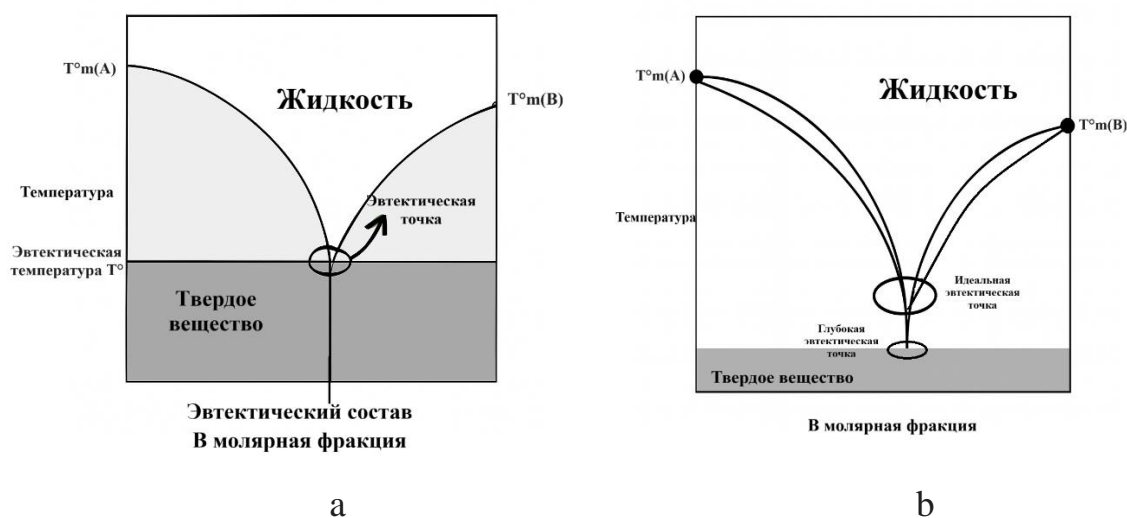


Рисунок 1.11 – (а) Диаграмма состояния твердого тела и жидкости бинарной смеси соединений А и В. (б) Фазовая диаграмма типичной идеальной эвтектической смеси (красный) и глубокого эвтектического растворителя (зеленый)

Это можно наглядно представить с помощью фазовой диаграммы, где при смешивании веществ А и В их температуры плавления ($T^{\circ m}(A)$ и $T^{\circ m}(B)$) снижаются до минимального значения – эвтектической точки, которая определяет состав и минимальную температуру плавления смеси (1.11 а). Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) представляют собой неидеальные эвтектические смеси, в которых наблюдается особенно сильное снижение температуры плавления, что и делает их «глубокими» [215]. Для определения, насколько смесь отклоняется от идеального поведения, сначала

рассчитывают теоретическую (идеальную) эвтектическую точку (показана красной кривой на рисунке 1.11 b). Если на практике смесь плавится при более низкой температуре, чем предсказывает теория, её относят к глубоким эвтектическим растворителям (зелёная кривая на рисунке 1.11 b) [216].

Некоторые из изученных ГЭР могут быть стабильными до 170 °С, в зависимости от их состава [217]. Кроме того, влияние воды на температурные свойства ГЭР требует тщательного изучения, особенно с учетом их гигроскопичности. Так, например, при воздействии атмосферной влаги в течение всего 48 часов система хлорид холина/мочевина поглотила около 5,5 % воды по массе, что привело к снижению температуры плавления на 15 °С [218]. Это неудивительно, поскольку водородные связи составляют основу наноструктуры ГЭР, а даже небольшое количество воды может нарушать её, интегрируясь в водородную сеть. Влияние воды зависит от состава конкретной эвтектической смеси, поэтому ее добавление в систему не может считаться нейтральным или безвредным по умолчанию [219].

1.2.4.3 Область применения

С развитием зеленой химии возрос интерес к экологически безопасным растворителям. Традиционные растворители, такие как CH_2Cl_2 и $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, обладают высокой летучестью, токсичностью и сложно утилизируются, что противоречит принципам зелёной химии. Альтернативой стали ионные жидкости, отличающиеся низким давлением паров, высокой термической стабильностью и электропроводностью. Однако их высокая вязкость, сложность и стоимость синтеза ограничивают применение. В 2003 году был предложен новый класс зелёных растворителей – глубокие эвтектические растворители [220]. Благодаря своим доступным свойствам в последние годы ГЭР нашли широкое применение в таких областях, как катализ, экстракция, сепарация, синтез, электрохимия и десульфурация а так же исследователи активно изучают использование различных типов ГЭР в процессах каталитической окислительной десульфурации [221], в зеленой химии для решения экологических и энергетических задач, таких как снижение энергозатрат, уменьшение образования отходов, использование безопасных и многоразовых растворителей, проведение реакций в одном реакторе и оптимизация расхода растворителей для сокращения их объема [222]. А также эвтектические растворители находят применения в области нанотехнологий. Впервые были исследованы в производстве пентаклей золотых нанокристаллов в работах [223], кроме этого используется для электроосаждения, в качестве диспергаторов и для управления морфологией или химическим составом [166].

Yue Liu и соавторы использовали ГЭР в композиции с углеродными нанотрубками для удаления сульфидов из мазута. ГЭР на основе холина хлорида с толуолсульфоновой кислотой (1 : 2) был загружен на многослойные углеродные нанотрубки (OD=30-60 нм), скорость десульфурации композитного материала составила 95,8 % [224].

В работах Тадей Менегатти и соавторов для настройки механических свойств и химической стойкости альгинатных гидрогелей в среде с высоким pK_a (отрицательный логарифм константы кислотной диссоциации) были улучшены путем сополимеризации альгината с поливиниловым спиртом (ПВС). Добавление ПВС привело к трёхкратному увеличению модуля сдвига и повышению стойкости к (S)- α -метилбензиламину – модельной молекуле с высоким pK_a . Для решения проблемы проницаемости в сополимер ПВС-альгинат был введён глубокий эвтектический растворитель бетаин-пропиленгликоль (ГЭР), что повысило проницаемость для этил-3-оксобутаноата, используемого для биовосстановления в хиральные спирты. Кроме того, ГЭР заметно улучшил модуль сдвига. Этот двойной эффект подчеркивает роль ГЭР в улучшении гидрогеля как носителя для иммобилизации [225].

1.2.4.4 Использование ГЭР при десульфуризация нефти

В последнее время возрастающий интерес вызывает применение ГЭР в качестве как катализаторов, так и экстрагентов в процессах десульфурации. В системах на основе ГЭР окислители (H_2O_2 или O_2) способствуют превращению входящих в состав ГЭР органических кислот в пероксикислоты, которые эффективно окисляют серосодержащие соединения топлива до сульфонов. Последние легко удаляются самим ГЭР, выполняющим одновременно функции катализатора и экстрагента. ГЭР являются экологически безопасными, способны работать в синергии с дополнительными катализаторами, такими как полиоксометаллаты (ПОМ) или металлонеитральные катализаторы, легко регенерируются с применением деионизированной воды и могут многократно использоваться с незначительной потерей активности [226].

Olga Thoda и соавторы, используя метод окислительной десульфурации тяжелых нефтей с глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР), снизили содержание серы до уровня ниже 0,5 масс. %. Процесс включает предварительное окисление серосодержащих соединений смесью пероксида водорода и карбоновой кислоты (уксусной или муравьиной), с последующей экстракцией продуктов окисления с использованием ГЭР на основе хлорид холина: этиленгликоля в соотношении 1:2. Степень десульфурации достиг до 75,7 % и содержание серы в топливе снизилась до 0,33 масс. % [174]. Li и соавторы исследовали эффективность экстракции дибензотиофена (ДБТ) из н-октана с использованием глубоких эвтектических растворителей (ГЭР), состоящих из донора и акцептора водородных связей (ДВС и АВС), а также солей переходных металлов. В ходе работы были протестированы различные соли на основе переходных металлов. Наилучшие результаты показал ГЭР, сформированный из тетрабутиламмоний хлорида (ТБАХ), полиэтиленгликоля (ПЭГ) и хлорида железа ($FeCl_3$) в составе ТБАХ/ПЭГ/ $FeCl_3$, обеспечив эффективность удаления ДБТ на уровне 81,2 %, что значительно превышало показатели других ГЭР на основе ионов металлов. Оптимизация мольного

соотношения компонентов (4:1:0,05) позволила повысить эффективность десульфурации до 89,5 % [227].

Fatemeh Armandsefat и соавторы синтезировали фентоноподобные глубокие эвтектические растворители, выполняющие функции как катализатора, так и реакционной среды, и применили их в процессе окислительной десульфурации (ОД). Исследование включало оптимизацию состава ГЭР, условий реакции и изучение влияния различных параметров на эффективность десульфурации. Эксперименты показали высокую каталитическую активность ГЭР в ОД. Оптимальные условия включали комнатную температуру, продолжительность реакции 2,5 часа и использование 200 мг ГЭР (HNFM-FeCl₄) в качестве катализатора и экстрагента. Отношение окислителя к сере составляло ~3:1 при применении 30 % раствора H₂O₂. Выход дибензотиофенсульфона достиг до 98 % [228].

Zaharaddeen S. Gano и соавторы провели десульфурацию жидкого топлива с использованием ГЭР, содержащих имидазол, методом жидкостно-жидкостной экстракции. Исследовано влияние таких параметров, как время, температура, массовая доля растворителя и начальная концентрация серы в топливе, на эффективность удаления серы. Результаты показали, что при однократной экстракции из модельного топлива удалось достичь 70 % удаления дибензотиофена (ДБТ) и 47 % – тиофена, а из коммерческого дизельного топлива – 47 % общего удаления серы [229].

Несмотря на свои преимущества, ГЭР имеет ряда недостатков таких как: высокая вязкость, проблемы с извлечением продукта и все еще неизученные методы восстановления и переработки [230]. Прекурсоры для синтеза ГЭР, как правило, являются недорогими и легко подготавливаемыми, однако их применение сопровождается определёнными ограничениями, связанными с температурным режимом и энергозатратами. Во многих случаях ГЭР могут быть регенерированы с использованием воды или традиционных растворителей, сохраняя при этом свою структуру и способность к десульфурации. Тем не менее, уже после одного этапа экстракции эффективность ГЭР существенно снижается, что требует проведения этапов регенерации, малоприменяемых для масштабного промышленного применения. В большинстве научных публикаций используется модельное топливо, представляющее собой раствор серосодержащих соединений в n-гептане или n-октане, что ограничивает достоверность результатов. Для подтверждения пригодности экологически чистых растворителей (таких как ГЭР) необходимы исследования на реальных нефтепродуктах, поскольку их сложный состав может существенно повлиять на эффективность экстракции. Этот аспект становится особенно важным при переходе от лабораторного уровня к пилотным установкам [231]. А также их крайне низкая летучесть и давление насыщенного пара, делает их испарения или перегонку невозможными. В отличие от традиционных органических растворителей, ГЭР практически не испаряются даже при нагревании, что затрудняет их удаление из экстрактов и снижает эффективность стадий очистки. В

промышленной практике это приводит к необходимости применения дополнительных этапов для отделения целевых веществ, таких как осаждение антисольвентами, экстракция с помощью нерастворимых смол или использование мембранных технологий. Эти методы увеличивают энергозатраты, себестоимость и сложность процесса, а также могут привести к частичной потере растворителя или продукта [215]. Хотя ГЭР часто позиционируются как «зелёная» альтернатива традиционным растворителям, их токсичность является непредсказуемой и сильно зависит от конкретного состава. Ряд исследований показал, что некоторые ГЭР оказываются более токсичными, чем отдельные исходные компоненты, особенно если они основаны на хлоридах, мочеvine, карбоновых кислотах или фенолах. Эксперименты на клеточных культурах и микроорганизмах выявили повышенную цитотоксичность и нарушение работы антиоксидантных систем. Также наблюдалось угнетающее воздействие на рост бактерий и водных организмов, включая микроводоросли и дафний. Таким образом, экологическая безопасность ГЭР не является универсальной и должна подтверждаться для каждой конкретной смеси в зависимости от области применения [232].

Нефтяной сектор экономики Казахстана, рассредоточенный в Атырауской, Мангистауской, Западно-Казахстанской (формирует большую часть добычи сырья), Актюбинской, Улытауской (формирует определенную часть добычи сырья), Восточно-Казахстанской и Жамбылской (формирует наименьшую часть добычи сырья) областях Казахстана, и, поэтому, выполняет существенную роль в развитии страны. Базой для исследования послужили:

- самое крупное в СНГ неглубокозалегающее (228,466 м.) месторождение «Каражанбас» высоковязкой тяжелой нефти, расположенный в Мангистауской области западного Казахстана и эксплуатируемый с 1974 г;
- месторождение высоковязкой тяжелой нефти «Бозащы», расположенного в Мангистауской области на полуострове Бузачи
- месторождение лёгкой нефти «Кумколь», расположенный в Улытауской области и введенное в промышленную разработку в 1995 г.

Содержание серы в нефтях месторождениях «Каражанбас», «Бозащы» и «Кумколь» составляет 1,6-2,2 %, 1,78 % (высокосернистые) и 0,10-0,14 % (низкосернистая) соответственно. Т.к. в Казахстане по экологическим стандартам предел содержания серы в нефтепродуктах допускается не более 50 ppm, поэтому исследования по синтезу экологически чистых ГЭР, применению их для активирования процессов микробиологической десульфуризации и разработка химико-технологической схемы биодесульфуризации тяжелых нефтей для Казахстана имеет первостепенное значение.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы исследования

Материалом для исследования послужили:

1 Нефть из трёх месторождений Республики Казахстан – «Каражанбас», «Бозащы» и «Кумколь» (таблица 2.1) [30, 233-237].

Таблица 2.1 – Краткая характеристика нефти из месторождений Республики Казахстан

Название месторождения	Географическое расположение	Краткая характеристика нефти	
		Общая	По содержанию серы
Каражанбас	Северная часть полуострова Бузачи Мангистауской области	Тяжелая, высоковязкая	Высокосернистая
Бозащы (Северные Бузачи)	Полуостров Бузачи Мангистауской области	Тяжелая, высоковязкая	Высокосернистая
Кумколь	Улытауская область	Высокопарафинистая, маловязкая	Низкосернистая

Как видно из таблицы 2.1, нефть, отобранная из месторождений «Каражанбас» (проба 1) и «Бозащы» (проба 2) относят по содержанию серы к высокосернистым (1,6-2,2 % [13] и 1,78 % [14] соответственно), а из месторождения «Кумколь» (проба 3) – к низкосернистой (0,10-0,14 % масс. [15]).

2 Питательные среды

Название питательных сред, их состав и рН представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Питательные среды

Мясо-пептонный агар (МПА)		Минерально-синтетическая среда (МСС)		Мясопептонный бульон (МПБ)	
Состав, г/л	рН	Состав, г/л	рН	Состав, г/л	рН
Пептон 10,0; Эквивалент мясного экстракта 3,0; NaCl 5,0; Агар (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n 15,0	7,6 ± 0,2	NaCl 10,0; NH ₄ NO ₃ 2,0; Na ₂ HPO ₄ 5,0; KH ₂ PO ₄ 2,0; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,2; Глицерин (C ₃ H ₈ O ₃) 10,0	6,6-6,7	Пептон 10,0; Эквивалент мясного экстракта 3,0; NaCl 5,0	7,6 ± 0,2
Saburo		Pseudomonas Isolation agar		Actinomyces Isolation agar	
Состав, г/л	рН	Состав, г/л	рН	Состав, г/л	рН

Микологический пептон 10,0; Декстроза (C ₆ H ₁₂ O ₆) 40,0; Агар (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n 15,0	5,6± 0,2	Пептон 20,0; MgCl ₂ 1,400; K ₂ SO ₄ 10,0; Триклозан (C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂) 0,025; Агар (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n 13,600	7,0± 0,2	Натрия казеинат 2,0; L-аспарагин 0,100; Натрия пропионат (C ₃ H ₅ NaO ₂) 4,000; Фосфат калия двузамещённый (K ₂ HPO ₄) 0,500; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,100; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,001; Агар (C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n 15,000	8,1± 0,2
Sulphate reducing medium					
Состав, г/л					pH
Часть А		Часть В		Часть С	
Дигидрофосфат калия 0,500; Пептон 2,000; Мясной экстракт В# 1,000; Na ₂ SO ₄ 1,500; MgSO ₄ ·7H ₂ O 2,000; CaCl ₂ 0,100	Железо-аммонийный сульфат (NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O) 0,392; Аскорбат натрия (C ₆ H ₇ NaO ₆) 0,100		Лактат натрия (C ₃ H ₅ NaO ₃) 3,500		7,5± 0,3
Sulphur Medium					
Состав, г/л					pH
Часть А			Часть В		
Калия дигидрофосфат (K ₂ HPO ₄) 3,0; Магния сульфат·7H ₂ O (MgSO ₄ ·7H ₂ O) 0,5	Аммония сульфат ((NH ₄) ₂ SO ₄) 0,3; Кальция хлорид·2H ₂ O (CaCl ₂ ·2H ₂ O) 0,25; Железа (III) хлорид·6H ₂ O (FeCl ₃ ·6H ₂ O) 0,02		Сера элементная (S ⁰) 10,0		4,8± 0,2

Как видно из таблицы 2.2, в исследованиях использовано восемь видов питательных сред компании HIMEDIA [238] – это МПА (мясопептонный агар), МПБ (мясопептонный бульон), минеральная синтетическая среда MSS, Sulphur Medium, Sulphate reducing medium, Pseudomonas Isolation agar, Actinomyces Isolation agar, Saburo.

3 Реактивы по Граму

Для окрашивания бактериальных препаратов были использованы, как это представлено в таблице 2.3, реактивы HiMedia [238]: Gram's Crystal Violet S012 (первичный краситель), Gram's Iodine S013 (мордант), Gram's Decolourizer S032 (обесцвечиватель), Safranin 0.5% w/v S027 (контрастный краситель).

Таблица 2.3 – Реактивы для окрашивания по Граму [238]

Название	Gram's Crystal Violet S012	Gram's Iodine S013	Gram's Decolourizer S032	Safranin 0.5 % w/v S027
----------	----------------------------	--------------------	--------------------------	-------------------------

Функция	Первичный краситель	Мордант	Обесцвечиватель	Контрастный краситель
Состав, г/л	Раствор А Кристаллический фиолетовый – 2; Этиловый спирт – 20; Раствор В Оксалат аммония, моногидрат – 0.80; Дистиллированная вода – 80	Йод – 1; Иодид калия – 2; Дистиллированная вода – 300	Этиловый спирт, 95 % – 50; Ацетон – 50	Сафранин О – 0,50; Этиловый спирт, 95 % – 100

4 Штаммы бактерий

Бактериальные штаммы, использованные в исследованиях, охарактеризованы в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Бактериальные штаммы, использованные в исследованиях

Вид	Краткая характеристика			Источник
	Оптимальные параметры для роста		Геном	
	pH	t, °C		
Идентифицированные в опытах бактерии				
<i>Bacillus paramycoides</i> (SFN-1)	7	30	Небольшой, порядка 5,3–5,6 Мб и GC ≈ 35 %	[239, 240]
<i>Bacillus cereus</i> (SFN-2)	5-6	28-35	Включает одну кольцевую хромосому и несколько плазмид. Содержит оперон dszABC (монооксигеназы DszC и DszA, десульфиназа DszB), который обеспечивает 90 % активности десульфуризации	[241-243]
<i>Bacillus thuringiensis</i> (SFN-3)	7,5	28-30	Состоит из хромосомы и нескольких крупных плазмид. Содержит оперон dszABC (монооксигеназы DszC и DszA, десульфиназа DszB), который обеспечивает 90 % активности десульфуризации	[244]
<i>Bacillus subtilis</i> (H-1)	5-6,5	25-35	Имеет одну хромосому и многочисленные регуляторы. Геном реализует пути ассимиляции органосерных субстратов	[245, 246]
<i>Bacillus siamensis</i> (H-4)	7	37	Геном включает 4 357 генов, содержание GC 45,92 %. В качестве	[246, 247]

			вспомогательных путей использует ферменты окислительного метаболизма серы (как у близких bacilli)	
<i>Bacillus haynesii</i> (F-1)	6	29-42	Размер ~ 4 Мб, GC 43-44 % (по родственным видам). Используется эксплуатация оперонов для органосерных соединений	[248, 249]
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> (F-2)	6-9	30-37	Размер хромосомы ~ 4-4,2 Мб. Эксплуатируются опероны для органосерных соединений	[249, 250]
<i>Peribacillus simplex</i> (E-1)	7	25-30	Размер генома 5,8 Мб. Эксплуатирует опероны для органосерных соединений	[251]
<i>Microbacterium sp.</i> (H-2)	7	30	Имеет одну хромосому длиной 3,38 Мб и одну плазмиду размером 59,2 kb. Способен полностью деградировать 4,6-диметил-ДБТ, тиофен, бензотиофен и 70% дифенилсульфида.	[252, 253]
Бактерии Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БЦ ВКПМ)				
<i>Pseudomonas putida</i> (B-1827)	7	28-30	Геном ~6.18-6.20 Мб, GC ~61.5-61.6 %. Хорошо развиты ассимилятивные пути серы	[254-256]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (AC 1039)	6,5-7,5	28-30	Геном состоит из хромосомы длиной 6 455 263 п.н., одной линейной плазмиды (pR09L01) размеров 227 989 п.н. и трёх кольцевых плазмид. Кодировать dszA-dszB-dszC (+ dszD), гены локализованы на плазмиде pSOX (~150 kb); В процессе биодесульфурзации активно регулируется серным метаболизмом	[257, 258]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B-5807)	7	37	Имеет крупный геном ~6.3 Мб, высокий GC ~66 %. Присутствуют пути органосерной ассимиляции алкансульфонаты и таурин в геноме (напр., PA3935 = tauD в PAO1) и транскриптомно реагируют на серное голодание	[259, 260]

Как видно из таблицы 2.4, в исследованиях были использованы 12 штаммов, из них 9 аборигенные (*Bacillus paramycoides* (SFN-1), *Bacillus cereus* (SFN-2), *Bacillus thuringiensis* (SFN-3), *Bacillus subtilis* (H-1), *Bacillus siamensis* (H-4), *Bacillus haynesii* (F-1), *Bacillus zhangzhouensis* (F-2), *Peribacillus simplex* (E-1), *Microbacterium sp.* (H-2)) и 3 культурные (*Pseudomonas putida* (B-1827), *Rhodococcus erythropolis* (AC 1039), *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807)).

Аборигенные штаммы выделены из нефтей трёх месторождений Казахстана (Каражанбас, Бозащы, Кумколь), культурные штаммы получены из оригинальных культур Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) [261].

5 Тяжелые металлы

В качестве модельного тяжёлого металла использовали шестивалентный хром (Cr (VI)) в виде $K_2Cr_2O_7$. Выбор Cr (VI) обусловлен его высокой токсичностью и регулярным присутствием в составе нефти, в пластовых и технологических водах, а также сточных водах нефтеперерабатывающих предприятий [262].

6 Глубокие эвтектические растворители (ГЭР)

ГЭР представляют собой эвтектические смеси, образующиеся при сочетании донора водородной связи и соли металла с акцептором водородной связи [258]. Для исследований синтезированы два вида ГЭР: ГЭР-1, состав: 2 компонента в соотношении: Vet+Gly - бетаин+глицерин (1:2); ГЭР-2, состав: 2 компонента в соотношении: CA+Gly - лимонная кислота+глицерин (1:4).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Отбор нефти

Сырая нефть, использованная в исследованиях, была отобрана вручную согласно ГОСТ ISO 3170-2022 с использованием закрытого метода, минимизирующего потери лёгких фракций. Представительную объединённую пробу формировали из локальных проб верхней, средней и нижней зон резервуара, после чего пробу гомогенизировали в соответствии со стандартом.

Пробу помещали в сухие металлические емкости с инертным уплотнением (ПТФЭ) в соответствии с пунктом 5.5, оставляя минимальный газовый зазор. Маркировку и прослеживаемость оформляли согласно требованиям к обращению с пробами. Для выполнения всех видов исследований отобрали 5 л сырой нефти, из них для комплекса химических анализов отобрали 3 л сырой нефти, это выше рекомендованного минимума 0,5 л на конечную пробу и соответствует положению ГОСТ ISO 3170-2022 о выборе объёма приёмника по потребности анализа, а для микробиологических исследований 2 л [264].

В целях проведения микробиологических и биотехнологических исследований сырая нефть подвергалась стерилизации. Стерилизацию нефти проводили 48 ч на водяной бане 15 мин. при 70 °C [265].

2.2.2 Определение серосодержащих компонентов в светлой фракции нефти методом газовой хроматографии

Газохроматографический анализ серосодержащих соединений проводили с использованием газового хроматографа-масс-спектрометра Agilent 7890В (Agilent Technologies, США), оснащенного пламенно-ионизационным детектором (ПВД) и автоматическим пробоотборником (автосэмплер) [266]. Применение автосэмплера обеспечивало высокую воспроизводимость ввода проб и исключало влияние человеческого фактора на точность дозирования.

В качестве газоносителя использовали высокочистый гелий (99,999 %) со скоростью потока 1,0 мл/мин. Разделение компонентов осуществляли на капиллярной колонке Agilent (30 м×0,25 мм×0,25 мкм, неполярная неподвижная фаза). Температурная программа: начальная температура колонки 50 °С (выдержка 2 мин), затем подъём температуры со скоростью 10 °С/мин до 230 °С с последующей изотермической выдержкой 5 мин. Температура инжектора составляла 250 °С, температура детектора 280 °С.

Ввод пробы выполнялся в режиме split с коэффициентом деления 1:50, объём вводимой пробы 1,0 мкл. Светлые фракции нефти выделяли методом атмосферной перегонки с отбором фракций до 250 °С. Перед анализом пробы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Регистрацию и обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Agilent OpenLAB CDS. Идентификацию соединений проводили путём сравнения времён удерживания с литературными данными и стандартными образцами [267]. Количественное содержание выражали в относительных единицах по площади пика (Area %). Из общего числа идентифицированных серосодержащих соединений для сравнительного анализа отбирали компоненты с устойчивыми хроматографическими характеристиками и наибольшим вкладом в суммарное содержание сернистых фракций.

Формирование трехповторного эксперимента на данном этапе представлено в таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Эксперимент по определению серосодержащих компонентов в светлой фракции нефти методом газовой хроматографии [267]

Оборудование	Формирование группы	
	Контроль	Опыт
Газовая хроматография ГХ-МС Agilent 7890В с ПВД	Отобрать 2 мл дистиллированной воды, профильтровать через мембранный фильтр (0,45 мкм)	Отобрать 2 мл предварительно выделенные светлые фракции нефти (до 250 °С)
	Температурная программа: 50°С (2 мин), +10°С/мин до 230°С (5 мин)	
	Ввод пробы в режиме split с коэффициентом деления 1:50, объём вводимой пробы 1,0 мкл	
	Обработка данных в OpenLAB CDS	

2.2.3 Определение общего количества микроорганизмов в нефти

В стеклянную колбу с дистиллированной водой вносили порошкообразную питательную смесь в нужных пропорциях. Для полноценного растворения питательной смеси дистиллированную воду при постоянном перемешивании доводили до кипения. Приготовленные питательные среды стерилизовали автоклавированием.

Методика работы с питательными средами, рекомендованная производителем [238], кратко описана в таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Методика работы с питательными средами [238]

Название	Приготовление	Стерилизация	Применение
МПА / МПБ (мясопептонный агар / мясопептонный бульон)	28 г/1000 мл дистиллированной воды	Автоклавирование при 121 °С 15 мин	Поддержание жизнедеятельности, хранение, активация, тестирование, получение биомассы культур микроорганизмов
Pseudomonas Isolation agar	45,03 г добавляют в 1000 мл дистиллированной воды, содержащей 20 мл глицерина	Автоклавирование при 121 °С 15 мин	Селективная среда для выделения и первичной идентификации псевдомонад
Actinomyces Isolation agar	21,70 г / 1000 мл дистиллированной воды, содержащей 5 мл глицерина	Автоклавирование при 121 °С 15 мин	Агаризованная среда для выделения актиномицетов
Saburo	30 г/1000 мл дистиллированной воды	Автоклавирование при 121 °С 15 мин	Селективная среда для выделения и подсчёта дрожжей и плесневых грибов из различных образцов
Синтетическая среда МСС	Готовят три вида: Среда МСС + нефть стерильная (2 %) Среда МСС + нефть (2 %) + ГЭР- 1 (2 %) Среда МСС + нефть (2 %)+ ГЭР-2 (2 %)	Автоклавирование при 0,75 атм 20 мин	Проведение бидесульфуризации нефти с применением ГЭР и без
Sulphur Medium	Суспендирование 3,74 г Part А в 1000 мл дистиллированной	Автоклавирование при ~100 °С по 30 мин в течение 3	Сложная среда для получения биомассы культур тиобактерий

	воды, растворение и разлив по 100 мл в колбы 250 мл	последовательных дней	(цианобактерий, протеобактерий)
	Затем в каждую колбу добавляют в асептических условиях по 1 г Part B (элементарная сера)	Из-за наличия элементарной серы автоклавирование не проводят	
Sulphate reducing medium	Часть А: Суспендируют 6,08 г в 900 мл дистиллированной воды	Автоклавирование при 121 °С 15мин	Селективная среда для определения сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в пробах воды.
	Часть В Суспендируют 0,384 г в 100 мл. Фильтрование (0,45 мкм)/ К 900 мл Части А добавляют в асептических условиях Часть В	Автоклавирование не проводят	
	3,50 г Части С добавляют в Часть А	Автоклавирование при 121 °С 15мин	

Все питательные среды, как это видно из таблицы 2.6, использовались в агаризованном виде (2 % агара) в чашках Петри, кроме Sulfate reducing medium, которая была использована как в жидком (накопительные культуры), так и в плотном (для получения чистой культуры) виде.

После остывания стерилизованной питательной среды до 45-50 °С, среда разливалась в подготовленные стерильные чашки Петри. По истечении 15-20 мин при 18-25 °С среда застывала и была готова для посева.

Определение общего количества микроорганизмов проводили методом Коха путем подсчета числа колоний, выросших после посева на твердой питательной среде МПА [268].

Определение общего количества микроорганизмов проводилось методом Коха, посевом на плотную питательную среду [265], кроме Sulfate reducing medium, которая была использована как в жидком (накопительные культуры), так и в плотном (для получения чистой культуры) виде. Определение проводилось на основании числа колоний, выросших после посева на плотной питательной среде определенного объема исследуемой суспензии. Результаты количественного учета микроорганизмов выражают в колониеобразующих единицах (КОЕ), т.к. учитывается количество выросших на среде колоний. Определение числа микроорганизмов этим методом

включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Подсчет количества клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \times 10^n}{V} \quad (2.1)$$

где, X – количество клеток в 1 мл; а – среднее число колоний на чашке Петри; V – объем суспензии, взятый для посева, мл; 10^n – коэффициент разведения [265].

Культивирование проводили в термостате при температуре 30 °С в течение 24-72 ч [268].

Таким образом, в работе использовались готовые питательные среды: Nutrient Broth и Nutrient Agar для поддержания жизнедеятельности и получения биомассы культур микроорганизмов; Sulphur Medium для культивирования цианобактерий, протеобактерий; Sulphate reducing medium для определения сульфатредуцирующих бактерий [269]; Среда Сабуро – селективная среда для микромицетов; Pseudomonas Isolation agar для выделения и первичной идентификации псевдомонад [270]; минеральная синтетическая среда (МСС) для десульфуризации [271].

В заключении приводится таблица 2.7, где кратко изложена информация по формированию трехповторного эксперимента на данном этапе.

Таблица 2.7 – Эксперимент по определению общего количества микроорганизмов в нефти

Основное обустройство	Формирование группы	
	Контроль	Опыт
Термостат для культивирования	Питательные среды (см. табл. 2.5) без посева	Посев нефтяной пробы на плотные питательные среды (см. табл. 2.5); для СРБ применялась жидкая и плотная среда
	Отсутствие колоний после 24-72 ч. инкубации при 30 °С	Подсчёт колоний после 24-72 ч. инкубации при 30 °С

2.2.4 Окрашивание по Граму

Этапы окрашивания по Граму: подготовка препарата (на чистом сухом предметном стекле готовится тонкий бактериальный препарат, который высушивается на воздухе и фиксируется лёгким нагреванием), основное окрашивание (полностью покрывают препарат Gram's Crystal Violet (S012) на 1 мин, затем смывают водой), мордант (наносится Gram's Iodine (S013) на 1 мин, затем смывают водой), обесцвечивание (проводится обработка с Gram's Decolourizer (S032) до прекращения схода синего красителя с препарата, после чего немедленно промывают водой), контрастное окрашивание (проводят с применением Safranin 0.5 % (S027) в течение 20 с, затем смывают водой) [238].

2.2.5 Методы микроскопии

Микробиологические препараты готовили по общепринятой методике светлопольной микроскопии. Для исследований использовали бинокулярные микроскопы «Микмедво-1» и «Motic VA 300», оснащённые ахроматическими объективами с увеличением $\times 10$, $\times 40$ и иммерсионным объективом $\times 100$, а также окулярами $\times 10$ (общее увеличение – $100\times$, $400\times$ и $1000\times$).

Подготовка препаратов:

Для оценки морфологии клеток готовили нативные препараты: каплю клеточной суспензии наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и микроскопировали в светлом поле при увеличениях $\times 400$ и $\times 1000$.

Для детального изучения клеточной морфологии и грам-реакции готовили окрашенные мазки: мазок фиксировали на пламени, затем окрашивали по методу Грама (кристаллический фиолетовый, раствор Люголя, обесцвечивание этанолом, докрасивание сафранином).

Для проверки чистоты культур проводили микроскопию нативных и окрашенных препаратов из колоний, выращенных на мясопептонном агаре (МПА).

Цели микроскопии:

- Морфологическая идентификация культур (форма клеток, наличие спор, расположение, подвижность).
- Контроль чистоты культур на всех этапах работы (от активации до окончания эксперимента).
- Визуальная оценка физиологического состояния клеток (наличие включений, форма, равномерность окрашивания).

Микроскопию проводили в асептических условиях на всех этапах экспериментального цикла [272].

2.2.6 Получение чистой культуры микроорганизмов

Чистые культуры получали методом истощающего штриха путем высева на питательную среду бактериологической петлей определенного объема исследуемой суспензии из накопительной культуры (Рисунок 2.1) [273].

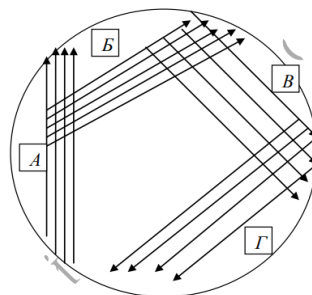


Рисунок 2.1 – Схема рассева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

После получения чистой культуры были проведены опыты с использованием элективно-селективных сред: Pseudomonas Isolation agar, Sulfur medium, Sulphate reducing medium для выделения тионовых и сульфатредуцирующих бактерий. Все питательные среды использовались в агаризованном виде (2 % агара) в чашках Петри, кроме Sulfate reducing medium, которая была использована как в жидком (для получения накопительной культуры), так и в плотном (для получения чистой культуры) виде. На плотные среды в чашки Петри материал-инокулят вносили в количестве 0,1 мл; в жидкие – 8-10 % объемных, культивировали при температуре 30 °С в течении 24-360 ч. Для сульфатредуцирующих бактерий были созданы аэро- и анаэробные условия [274, 275].

2.2.7 Тест на чувствительность выделенных культур к тяжелому металлу

Для оценки влияния шестивалентного хрома Cr(VI) на рост бактериальных культур (таблица 2.8) использовали универсальную жидкую питательную среду мясопептонного бульона (МПБ). В среду вносили стерильный раствор Cr(VI) до конечной концентрации 150 мкг/мл, рН среды после внесения соли доводили до $7,0 \pm 0,05$. В экспериментах применяли 24-часовые культуры бактерий, выращенные на МПБ в условиях аэрации при 30 °С. В связи с различным размером клеток и плотностью бактериальной суспензии, оптическая плотность исходных культур (D_{600}) составляла 0,0160-0,145 ед [276].

Таблица 2.8 – Тест на чувствительность выделенных культур к тяжелому металлу [276]

Параметры	Условие / значение
Питательная среда	Мясопептонный бульон (МПБ) следующего состава: Пептон 10,0; Эквивалент мясного экстракта 3,0; NaCl 5,0;
Внесение Cr (VI)	В среду вносили стерильный раствор Cr(VI) до конечной концентрации 150 мкг/мл
Условия культивирования	рН среды после внесения соли доводили до $7,0 \pm 0,05$. В экспериментах применяли 24-часовые культуры бактерий, выращенные на МПБ в условиях аэрации при 30 °С.
Метод	Изменение оптической плотности при $\lambda = 600$ нм с применением спектрофотометра Jenway 7315

Культивирование проводили в объеме 50 мл при температуре 30 ± 1 °С в аэробных условиях в течение 120 часов. Для обеспечения постоянного насыщения кислородом использовали орбитальную шейкерную установку со скоростью 160 об/мин. Рост культур определяли спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности среды при длине волны 600 нм ($\lambda=600$ нм) с использованием спектрофотометра Jenway 7315.

В заключении приводится таблица 2.9, где кратко изложена информация по формированию трехповторного эксперимента на данном этапе.

Таблица 2.9 – Эксперимент по определению чувствительности выделенных культур к тяжелому металлу

Основное оборудование	Формирование группы	
	Контроль	Опыт
Термостат для культивирования	МПБ без добавления хрома Cr (VI).	В МПБ вносили раствор Cr(VI) до концентрации 150 мкг/мл, рН корректировали до 7,0±0,05
	В опытах использовали 24-часовые культуры. Культивирование проводили при 30±1 °С в течение 120 ч в аэробных условиях на орбитальном шейкере (160 об/мин). Рост оценивали по изменению оптической плотности при λ=600 нм.	

2.2.8 Определение роста микроорганизмов на среде с нефтью

Способность микроорганизмов использовать углеводороды высокосернистой нефти определяли на плотной среде. В чашке Петри со стерильной агаризованной минеральной средой вырезается лунка, в которую вносится единственный источник углерода – нефть, чашку с наружной стороны делят на сектора чернилами по стеклу. Затем каждую из исследуемых культур микроорганизмов высевают петлей, проводя радиальный штрих по отношению к лунке с источником углерода. В качестве инокулята используют густые суспензии клеток, которые готовят смывом культур с поверхности скошенного агара. Продолжительность культивирования 48 ч [277].

В заключении приводится таблица 2.10, где кратко изложена информация по формированию трехповторного эксперимента на данном этапе.

Таблица 2.10 – Эксперимент по определению роста микроорганизмов на среде с нефтью

Основное оборудование	Формирование группы	
	Контроль	Опыт
Термостат для культивирования	Минеральная среда с лункой нефти без внесения культур	Минеральная среда с нефтью и посевом способом радиального штриха исследуемых культур микроорганизмов
	Продолжительность культивирования 48 ч	

2.2.9 Генетическая идентификация бактерий на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA

Выделение ДНК из бактериальных культур проводили набором «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» в соответствии с протоколом производителя [278]. Оценка концентрации и чистоты ДНК проводили с измерением оптической плотности микрообъемов образцов с использованием спектрофотометра NanoDrop [279] 1000 при 260/280 нм [280]. Фрагменты генов *16S rRNA* были амплифицированы с применением ПЦР с универсальными праймерами 8f (5'-AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3') и 806R (5'-ggACTACCAgggTATСТААТ-3') в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 25 нг ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas) 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию при 95 °С (активация фермента и денатурация матрицы) в течение 11 минут [281] 32 циклов: 95 °С – 30 секунд, 55 °С – 40 секунд, 72 °С – 60 секунд; заключительная элонгация 10 минут при 72 °С [282]. Образцы ДНК амплифицировали с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), расчетное время работы протокола составляет 3,5 часа [281].

С целью дальнейшей визуализации ДНК был проведен электрофорез в камере горизонтального электрофореза PowerPac, используя источник тока BioRad Electrophoretic Bath в качестве электродного буфера используя 1x TAE - буфер. Очистка продуктов PCR от несоединенных праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов путем магнитной чистки с помощью магнитного силикагеля [283]. Реакцию секвенирование ПЦР-продукта проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.10 Спектрофотометрическое определение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием прибора NanoDrop 1000. Основными длинами волн, которые используются для измерения поглощения ДНК, являются 260 нм (УФ-область) и 280 нм (белковая компонента ДНК). Концентрация ДНК приведена в таблице 2.11.

Таблица 2.11 – Концентрация выделенной ДНК

№	Наименование образца	Концентрация ДНК, нг/мкл
1	SFN-1	75,93
2	SFN-2	219,29
3	SFN-3	456,42
4	H-1	115,46

5	H-2	110,4
6	H-4	147,61
7	E-1	177,74
8	F-1	87,27
9	F-2	227,26

2.2.11 Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК, проводили методом разделения фрагментов ДНК в 1.5% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента - бромистого этидия, который был использован с целью дальнейшей визуализации ДНК. Электрофорез проводили в камере горизонтального электрофореза PowerPac, используя источник тока BioRad Electrophoretic Bath. В качестве электродного буфера использовали 1x TAE - буфер. Во всех пробах был амплифицировать специфический фрагмент размером около 800 п.н. В отрицательном контрольном образце ПЦР продуктов не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии контаминации в проведенной реакции (рисунок 2.2).

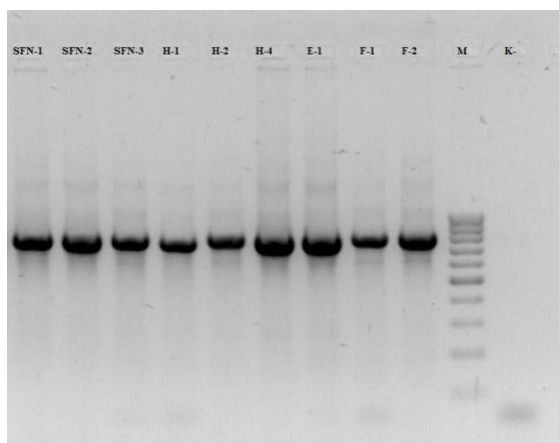


Рисунок 2.2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента гена *16S rRNA*.

Обозначения: 1-9 – исследуемые образцы в соответствии с таблицей 1 1-SFN1; 2-SFN2; 3-SFN3; 4-H1; 5-H2; 6-H4; 7-E1; 8-F1; 9-F2; (M) маркер молекулярного веса (Fermentas) (100-1000 п.н., с шагом 100 п.н.), (K-) отрицательный контрольный образец;

2.2.12 Микробная активность в серосодержащей сырой нефти

Для оценки микробной активности в условиях серосодержащей среды использовали модифицированную минеральную среду МСС. В качестве инокулята применяли 24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на мясопептонном бульоне (МПБ) при 30 ± 1 °C в условиях аэрации. Концентрацию инокулята довели до 8 % от рабочего объема среды. В

качестве единственного источника углерода и серы использовали высокосернистую нефть месторождения «Каражанбас» в концентрации 10 %. Перед внесением нефти проводили ее стерилизацию фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и гомогенизацию ультразвуковым диспергатором (40 кГц, 5 мин).

Условия культивирования:

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера с рабочим объемом 50 мл при температуре 30 ± 1 °С, в аэробных условиях, на орбитальном шейкере со скоростью 160 об/мин, в течение 120 ч.

Динамика роста микроорганизмов определялась методом Коха с последовательными серийными разведениями суспензии и высевом на агаризованную питательную среду с последующим подсчётом колониеобразующих единиц (КОЕ/мл).

Содержание серы в среде определяли по СТ РК АСТМ Д 4294 в начале (0 ч) и в конце (120 ч) эксперимента с применением рентгенофлуоресцентным энергодисперсионным анализатором «Спектроскан S».

Все опыты проводились в трёхкратной повторности [284].

2.2.13 Определение содержания общей серы в нефти

Содержание серы в среде определяли по СТ РК АСТМ Д 4294 с применением рентгенофлуоресцентного энергодисперсионного анализатора «Спектроскан S». Метод основан на возбуждении образца рентгеновским излучением и измерении интенсивности характеристической линии S K α .

Образец помещали в рентгеновский пучок анализатора и регистрировали интенсивность характеристической линии серы (S K α). Концентрацию серы рассчитывали сравнением сигнала пробы с аттестованными эталонами. Для охвата рабочих концентраций использовали не менее трёх диапазонов калибровки: 0-0,10 %, 0,10-1,00 % и 1,00-5,00 % (в низком диапазоне эквивалентно 0-1000 мг/кг). Продолжительность анализа одной пробы составляло 1-5 мин [285].

2.3 Биодесульфуризация нефти

2.3.1 Подготовка инокулята

Опыты по биодесульфуризации проводились с использованием как аборигенных, так и коллекционных штаммов микроорганизмов. В качестве аборигенных использовали идентифицированные штаммы *Bacillus cereus* (SFN2) и *Bacillus thuringiensis* (SFN3), выделенные ранее из образцов высокосернистых нефтей месторождений Казахстана. Эти штаммы проявляют устойчивость к нефтяным углеводородам и повышенную активность в отношении соединений серы. В качестве коллекционных культур применяли *Pseudomonas putida* (B-1827), *Rhodococcus erythropolis* (AC 1039) и *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807), полученные из оригинальных культур

Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ). Выбор данных культур обусловлен их способностью к окислительной и оксидативно-редукционной трансформации органосернистых соединений, в том числе дибензотиофена и его производных.

Для активации штаммов использовали жидкую питательную среду МПБ (мясопептонный бульон), содержащую (% масс.): пептон 1,0; мясной экстракт 1,0; NaCl 0,5; pH 7,0-7,2. Среду готовили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с рабочим объёмом 50 мл, стерилизовали при 121 °С в течение 20 минут.

Лиофилизированные культуры ресуспендировали в 10 мл стерильного МПБ и инкубировали при 28-30 °С на орбитальной шейкерной установке при 150-200 об/мин в течение 48-72 ч до достижения логарифмической фазы роста (оптическая плотность при $\lambda=600$ нм составляла 0,8-1,0 ед.). Для аборигенных штаммов использовали аналогичные условия с предварительным хранением маточных культур на агаризованной среде МПА (мясопептонный агар) при 4 °С и ежемесячным пересевом.

После активации клеточные суспензии использовали в качестве инокулята для опытов по биодесульфурзации, внося 5-10 % (об. /об.) от общего объёма реакционной среды. Перед внесением инокулята проводили контроль чистоты культур методом микроскопии и посевов на питательные агаризованные среды. [268, 274].

2.3.2 Синтез глубоких эвтектических растворителей

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) представляют собой бинарные или многокомпонентные системы, образованные за счёт взаимодействия донора и акцептора водородной связи (ДВС/АВС). Их образование основано на смещении температуры плавления смеси в сторону, значительно меньшую по сравнению с индивидуальными компонентами. Благодаря наличию обширной сети водородных связей между молекулами компонентов формируется стабильная жидкая фаза при сравнительно низких температурах. Выбор компонентов обусловлен их доступностью, низкой токсичностью, биосовместимостью и возможностью модификации свойств в зависимости от задачи.

В рамках настоящей исследовательской работы для синтеза были использованы следующие ГЭР:

ГЭР-1 – смесь бетаина ($C_5H_{11}NO_2$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) в молярном соотношении 1:2 (рисунок 2.3).

Методика синтеза: требуемое количество бетаина (11,715 г) и глицерина (18,418 г) (0,1 моль:0,02 моль) взвешивали с точностью $\pm 0,001$ г, помещали в круглодонную колбу и устанавливали на магнитную мешалку с подогревом. Смесь нагревали до 50 ± 1 °С и перемешивали при 300 об/мин в течение 60 минут до получения однородного прозрачного раствора без видимых кристаллических включений. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры, герметично укупоривали и хранили в тёмном месте при 20-25 °С до проведения исследований [286]:

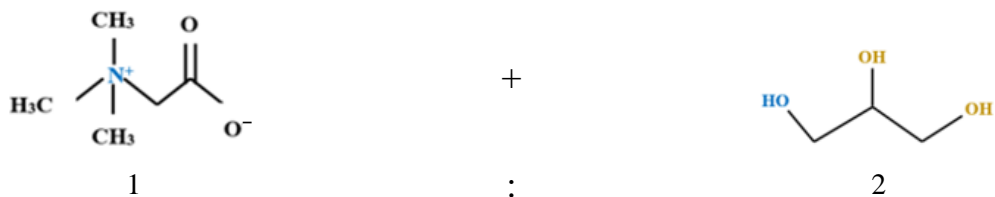


Рисунок 2.3 – Синтез глубокого эвтектического растворителя-1 на основе бетаина ($C_5H_{11}NO_2$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) в молярном соотношении 1:2

ГЭР-2 – смесь лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) в молярном соотношении 1:4 (рисунок 2.4).

Методика синтеза: исходные вещества, лимонную кислоту ($C_6H_8O_7$) (19,212 г) и глицерина ($C_3H_8O_3$) (36,836 г) в молярном соотношении взвешивали, помещали в круглодонную колбу, добавляли 10 % дистиллированной воды для снижения вязкости и облегчения смешивания. Смесь нагревали до 60 ± 1 °С и перемешивали при 300 об/мин до полного растворения лимонной кислоты и образования прозрачного гомогенного раствора. Процесс занимал 50 минут. По окончании синтеза раствор охлаждали до комнатной температуры и хранили в плотно закрытой таре [287]:

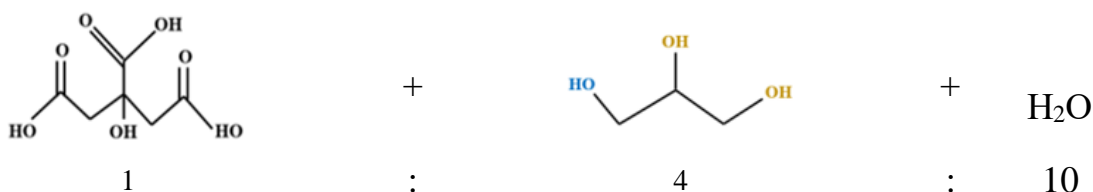


Рисунок 2.4 – Синтез глубокого эвтектического растворителя-2 на основе лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) в молярном соотношении 1:4

ГЭР-3 – смесь холина хлорида (акцептор водородных связей) и этиленгликоля (донор), которые смешивали в молярном соотношении 1:2. Смесь нагревали до 80 °С и перемешивали со скоростью 300 об/мин в течение 12 ч. В результате получали прозрачный гомогенный раствор ГЭР на основе холина хлорида и этиленгликоля (ChCl:EG) (рисунок 2.5). Для завершения формирования системы перемешивание продолжали до 24 ч. [505].

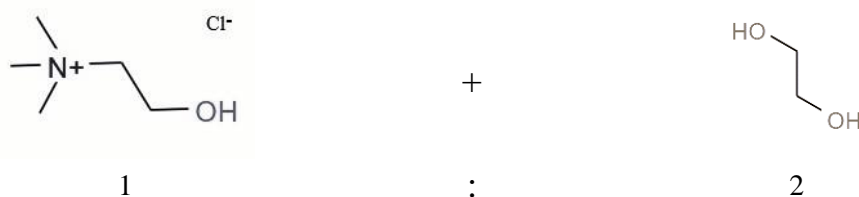


Рисунок 2.5 – Синтез глубокого эвтектического растворителя-3 на основе холина хлорида $[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]^+\text{Cl}^-$ и этиленгликоля ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) в молярном соотношении 1:2

ГЭР-4 – смесь тетрабутиламмония хлорид (ТВАС) $[(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]\text{Cl}$ (акцептор водородных связей) и молочная кислота (LA) ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) (донор), которые смешивали в молярном соотношении 1:2. Смесь нагревали до $60\text{ }^\circ\text{C}$ и перемешивали со скоростью 300 об/мин в течение 1 часа. В результате получали прозрачный гомогенный раствор ГЭР на основе тетрабутиламмония хлорида (ТВАС) $[(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]\text{Cl}$ и молочной кислоты (LA) ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) (рисунок 2.6). [506].

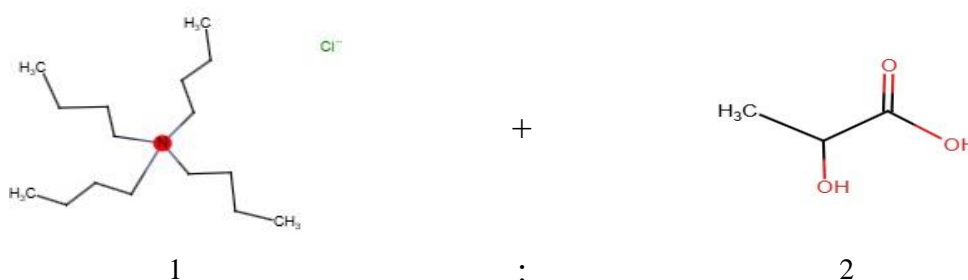


Рисунок 2.6 – Синтез глубокого эвтектического растворителя-4 на основе тетрабутиламмония хлорида $[(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]\text{Cl}$ и молочной кислоты ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) в молярном соотношении 1:2

ГЭР-5 – смесь тетрабутиламмоний бромид (ТВАВ) ($\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{BrN}$) (акцептор водородных связей) и изопропанола ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) (донор), которые смешивали в молярном соотношении 1:2. Смесь нагревали до $80\text{ }^\circ\text{C}$ и перемешивали со скоростью 300 об/мин в течение 1 часа. В результате получали прозрачного раствора без видимых кристаллических включений. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры, герметично укупоривали и хранили в темном месте при $20\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$ до проведения исследований (рисунок 2.7). [507].

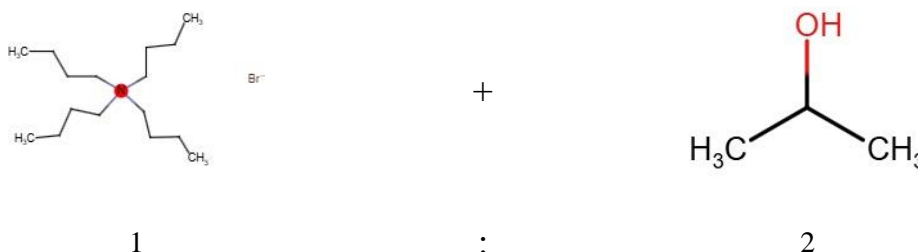


Рисунок 2.7 – Синтез глубокого эвтектического растворителя-5 на основе тетрабутиламмоний бромид ($\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{BrN}$) и изопропанола ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) в молярном соотношении 1:2

Контроль качества синтезированных ГЭР осуществлялся с применением методов: ЯМР ^1H и ^{13}C , дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), ИК-Фурье-спектроскопию с анализом смещения полос, соответствующих группам $-\text{OH}$ и $-\text{C}=\text{O}$, что свидетельствует о формировании водородных связей между компонентами [288].

2.3.3 Исследование физико-химических характеристик глубоких эвтектических растворителей

2.3.3.1 Метод ЯМР ^1H и ^{13}C

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре JNM-ECA JEOL 400 (399,78 и 100,53 МГц соответственно) в растворителе CDCl_3 . Химические сдвиги определяли относительно сигналов остаточных протонов и атомов углерода дейтерированного растворителя. ЯМР-спектроскопия является информативным методом исследования структуры органических соединений, позволяющим установить химическое окружение и взаимное расположение атомов водорода и углерода в молекуле, а также оценить чистоту и идентифицировать продукты реакций.

2.3.3.2 ИК-Фурье-спектрометрический анализ

ИК-Фурье-спектроскопия является качественным методом анализа, применяемым для изучения поглощения инфракрасного излучения веществами в твердом, жидком и газообразном состоянии и позволяет идентифицировать функциональные группы в составе молекул. Исследования проводили в диапазоне $500\text{-}4000\text{ см}^{-1}$ на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 (Россия). Для регистрации спектров образцы смешивали с предварительно высушенным KBr в соотношении 4 мг:220 мг, после чего прессовали в таблетки диаметром 12 мм.

2.3.3.3 Метод дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК)

Термическое поведение двух систем ГЭР: $\text{ChCl}:\text{Ethylene Glycol}$ (1:2) и $\text{Tetrabutylammonium Chloride}:\text{Lactic Acid}$ (1:2) исследовали методом дифференциально-сканирующей калориметрии на приборе NETZSCH DSC 300 Supreme. Измерения проводили в атмосфере азота при расходе 50 мл/мин.

Были выполнены два температурных цикла:

– от -50 до $150\text{ }^\circ\text{C}$ (низкотемпературный диапазон, регистрация сигнала в $\mu\text{V}/\text{mg}$);

– от 30 до $550\text{ }^\circ\text{C}$ (высокотемпературный диапазон, калиброванный режим теплового потока, mW/mg).

2.3.3.4 Термогравиметрический анализ

Термическую устойчивость глубоких эвтектических растворителей исследовали методом термогравиметрического анализа (ТГА). Измерения проводили в атмосфере азота в температурном интервале $35\text{-}360\text{ }^\circ\text{C}$ при

скорости нагрева 10 °С/мин. Использование инертной атмосферы позволило исключить влияние окислительных процессов и оценить собственную термостабильность систем. Метод ТГА применяли для определения температурных интервалов начала разложения, а также для анализа характера и стадийности термической деструкции исследуемых ГЭР.

2.3.4 Постановка эксперимента

Для проведения экспериментов использовали модифицированную минерально-синтетическую среду (МСС) следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 4,0; Na_2HPO_4 – 7,12; KH_2PO_4 – 4,08; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; pH 6,6-6,7. Среду стерилизовали автоклавированием при 0,75 атм в течение 20 минут.

В каждую колбу (рабочий объём 50 мл) вносили: 10 % (по объёму) предварительно активированного инокулята, находящегося в логарифмической фазе роста; 2 % (по объёму) нефти, использовавшейся в качестве единственного источника серы. Компоненты смешивали в асептических условиях на ламинарном боксе для равномерного распределения нефти в среде.

Условия культивирования:

Культивирование проводили при температуре 30 ± 1 °С на ротационном шейкере с частотой 160 об/мин, обеспечивая непрерывную аэрацию и предотвращение осаждения нефти. Продолжительность эксперимента составляла 10 суток.

Дополнительно, в качестве контроля использовались следующие контрольные образцы без микроорганизмов:

- МСС + нефть (2 %, стерильная);
- МСС + нефть (2 %) + ГЭР-1 (2 %);
- МСС + нефть (2 %) + ГЭР-2 (2 %).

Все варианты, включая контрольные, готовили в трёхкратной повторности для повышения статистической достоверности.

Для определения эффективности микробной десульфуризации были отобраны образцы для энергодисперсионного рентгенфлуоресцентного анализа методом [285, 289], при условиях: температура 22 °С, влажность 73 %, давление 695 мм рт.ст., в количестве образца 0,1 л. Пробоотбор осуществляли на 0, 2, 5, 7 и 10-е сутки культивирования. Пробы отбирали стерильными шприцами, тщательно перемешивая среду перед отбором для получения репрезентативного образца. Объём пробы составлял 5 мл. [271].

В заключении приводится таблица 2.12, где кратко изложена информация по формированию трехповторного эксперимента на данном этапе.

Таблица 2.12 – Эксперимент биодесульфуризации нефти

	Формирование (особенность кратко опишите)
--	---

Основное оборудование	Контроль	Опыт
Шейкер ротационный	МСС + нефть (2 %, стерильная) без посева	МСС + нефть (2 %, стерильная) + 10 % активированного инокулята
	МСС + нефть (2 %) + ГЭР-1 (2 %) без посева	МСС + нефть (2 %) + ГЭР-1 (2 %) + 10 % активированного инокулята
	МСС + нефть (2 %) + ГЭР-2 (2 %) без посева	МСС + нефть (2 %) + ГЭР-2 (2 %) + 10 % активированного инокулята
	Культивирование проводили при 30 ± 1 °С на ротационном шейкере (160 об/мин) в течение 10 суток	

2.4 Статистические исследования

Результаты исследования обрабатывались вариационно-статистическими методами (средние значения со стандартными отклонениями при трёх повторных независимых исследованиях). Значимость предполагалась при $p < 0,05$ [290, 291]. Изучение влияния факторов на различные стратегии культивирования проводили методом дисперсионного анализа с использованием программы STATISTICA 13.3 [292].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Сравнительный анализ содержания серосодержащих соединений в образцах нефти различных месторождений методом газовой хроматографии

В результате газохроматографического анализа образцов нефти, отобранных с месторождения «Каражанбас», «Бузачи» и «Кумколь» было идентифицировано порядка тридцати серосодержащих соединений. Определение компонентного состава проводилось с использованием сравнительного анализа спектров масс-детектора с библиотечными базами данных, что позволило отнести значительную часть соединений к известным химическим структурам, тогда как ряд пиков остался неопознанным.

3.1.1 Газохроматографическая характеристика серосодержащих соединений месторождений Каражанбас

В результате газохроматографического анализа нефти месторождения «Каражанбас» были идентифицированы серосодержащие соединения с высокой интенсивностью сигналов по площади пиков (Area %). Для целей настоящего исследования из общего перечня были отобраны пять соединений, характеризующихся наибольшей относительной концентрацией в пробах, стабильностью хроматографических параметров между прогонами:

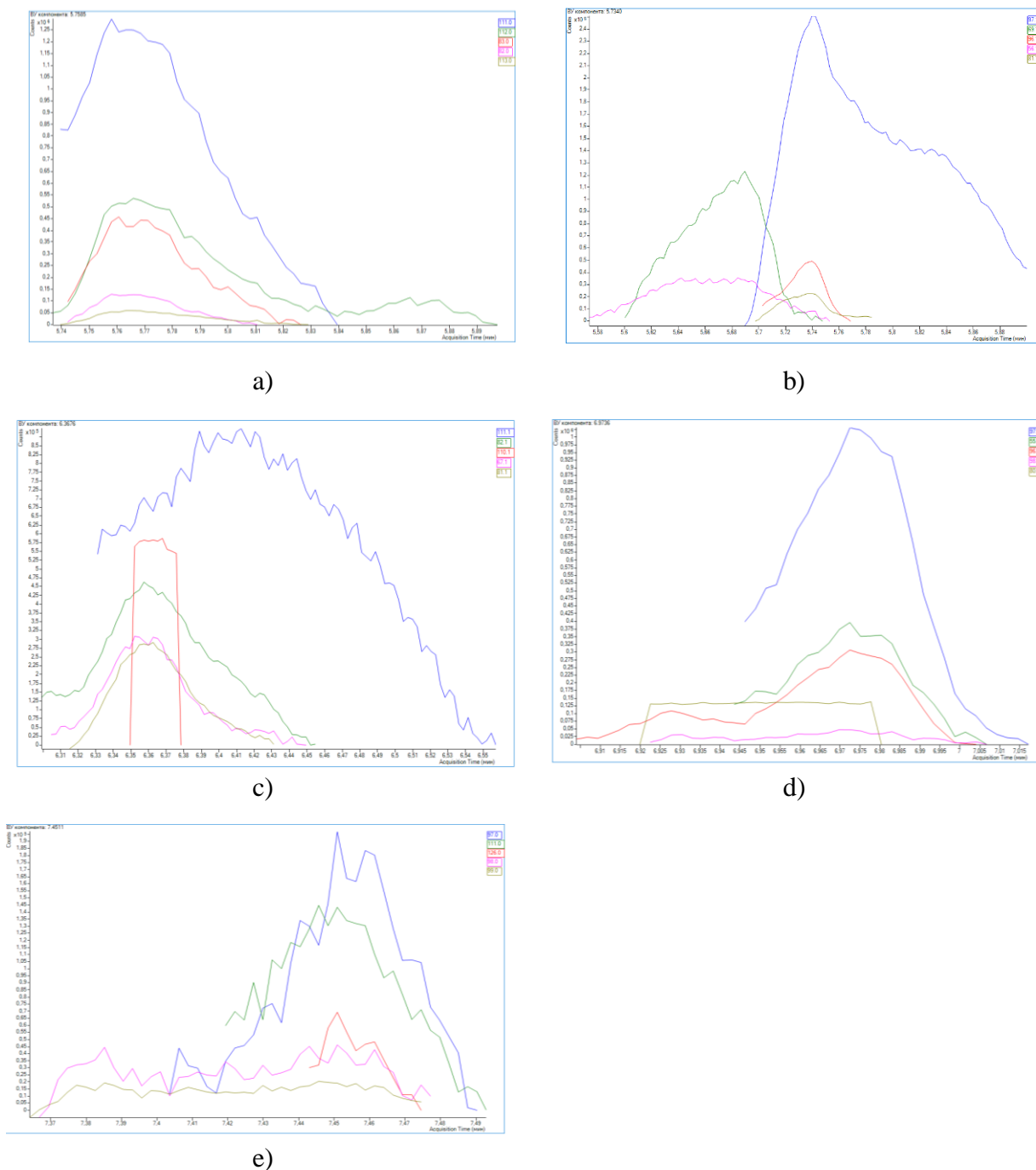
- а) 2-тиофенкарбоновая кислота, 4-нитрофениловый эфир;
- б) 4-(пирролидин-1-ил) изотиазолидин 1,1-диоксид;
- в) 2-тиофенкарбоновая кислота, 2-этилциклогексильный эфир;
- г) сернистая кислота, ди(циклогексилметильный) эфир;
- д) тиофен, 2-пропил-.

Дальнейшее изложение посвящено детальному рассмотрению хроматографических характеристик указанных соединений, включая оценку их количественного содержания, воспроизводимости времён удерживания и особенностей формы пиков (Рисунок 3.1). Для этого полученные результаты по каждому исследованному соединению оформлены в таблицах 3.1-3.5.

Как видно из рисунка 3.1 (а) и таблицы 3.1, среди выполненных прогонов: наибольшее содержание данного серосодержащего соединения наблюдается в №111,0, относительно него уровни №112,0 и №83,0 составляют ~40-45 % и ~33-35 %, тогда как №82,0 и №113,0 менее 10 % и <5 %. Временное положение пика стабильно, различия между прогонами носят количественный характер.

Как видно из рисунка 3.1 (б) и таблицы 3.2, смещение пиков между прогонами не превышает $\pm 0,01$ мин. Среди выполненных прогонов максимальное содержание вещества зафиксировано в №97,0, относительно него уровни №111,0, №126,0, №98,0 составляют $\approx 60-62$ %, $\approx 36-38$ % и $\approx 14-15$ %. Минимальное содержание вещества зафиксировано в №99,0 с <5 %.

Различия между прогонами связаны с концентрационными изменениями, а хроматографическое разделение стабильно.



а) 2-тиофенкарбоновая кислота, 4-нитрофениловый эфир; б) 4-(пирролидин-1-ил) изотиазолидин 1,1-диоксид; с) 2-тиофенкарбоновая кислота, 2-этилциклогексильный эфир; д) сернистая кислота, ди(циклогексилметильный) эфир; е) тиофен, 2-пропил-

Рисунок 3.1 – Газохроматографические профили серосодержащего соединения в образцах нефти месторождения «Каражанбас»

Таблица 3.1 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Каражанбас»: 2-Тиофенкарбоновая кислота, 4-нитрофениловый эфир ($R_t=5,7585$ мин, шкала $\times 10^6$)

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№111,0	~5,76-5,77	$\times 10^6$	Синий	$1,30 \times 10^6$
№112,0	~5,76-5,77	$\times 10^6$	Зеленый	$0,50-0,55 \times 10^6$
№83,0	~5,76-5,77	$\times 10^6$	Красный	$0,42-0,45 \times 10^6$
№82,0	~5,76-5,77	$\times 10^6$	Пурпурный	$0,12-0,14 \times 10^6$
№113,0	~5,76-5,77	$\times 10^6$	Оливковый	$0,04-0,05 \times 10^6$

Таблица 3.2 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Каражанбас»: 4-(пирролидин-1-ил) изотиазолидин 1,1-диоксид ($R_t = 5,7340$ мин, шкала $\times 10^6$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№97,0	~5,73-5,74	$\times 10^6$	Синий	$1,10 \times 10^6$
№111,0	~5,73-5,74	$\times 10^6$	Зеленый	$0,66-0,68 \times 10^6$
№126,0	~5,73-5,74	$\times 10^6$	Красный	$0,40-0,42 \times 10^6$
№98,0	~5,73-5,74	$\times 10^6$	Пурпурный	$0,15-0,17 \times 10^6$
№99,0	~5,73-5,74	$\times 10^6$	Оливковый	$0,045 \times 10^6$

Таблица 3.3 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Каражанбас»: 2-Тиофенкарбоновая кислота, 2-этилциклогексильный эфир ($R_t = 6,3676$ мин, шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№112,0	~6,36-6,37	$\times 10^5$	Синий	$9,4-9,6 \times 10^5$
№111,0	~6,36-6,37	$\times 10^5$	Зеленый	$7,7-7,9 \times 10^5$
№83,0	~6,36-6,37	$\times 10^5$	Красный	$5,8-6,0 \times 10^5$
№82,0	~6,36-6,37	$\times 10^5$	Пурпурный	$2,3-2,5 \times 10^5$
№113,0	~6,36-6,37	$\times 10^5$	Оливковый	$0,9 \times 10^5$

Таблица 3.4 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Каражанбас»: Сернистая кислота, ди(циклогексилметил) эфир ($R_t = 6,9736$ мин, шкала $\times 10^6$ counts).

№ прогона	Время удерживания компонента, Rt, мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№97,0	~6,97-6,98	×10 ⁶	Синий	1,44-1,46×10 ⁶
№111,0	~6,97-6,98	×10 ⁶	Зеленый	0,95-0,97×10 ⁶
№126,0	~6,97-6,98	×10 ⁶	Красный	0,62-0,64×10 ⁶
№98,0	~6,97-6,98	×10 ⁶	Пурпурный	0,25-0,27×10 ⁶
№99,0	~6,97-6,98	×10 ⁶	Оливковый	0,085-0,095×10 ⁶

Как видно из рисунка 3.1 (с) и таблицы 3.3, положение пиков стабильно в пределах ±0,01 мин. Максимальное содержание вещества зафиксировано в прогоне №112,0, относительно него уровни №111,0, №83,0, №82,0 составляют ≈81-83 %, ≈61-63 %, ≈24-26 %. Минимальное содержание составляет менее ≈9 % от максимального. Различия между прогонами значительны.

Как видно из рисунка 3.1 (d) и таблицы 3.4, положение пиков не превышает ±0,01 мин. Максимальное содержание вещества зафиксировано в прогоне №97,0, относительно него уровни №111,0, №126,0, №98,0 составляют ≈65-67 %, ≈42-44 %, ≈17-18 %. Минимальное содержание вещества зафиксировано в №99,0 с ≈6 %. Различия между прогонами значительны.

Таблица 3.5 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Каражанбас»: Тиофен, 2-пропил- (Rt = 7,4511 мин, шкала ×10⁵)

№ прогона	Время удерживания компонента, Rt, мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№112,0	~7,45-7,46	×10 ⁵	Синий	8.6-8.8×10 ⁵
№111,0	~7,45-7,46	×10 ⁵	Зеленый	6.4-6.6×10 ⁵
№83,0	~7,45-7,46	×10 ⁵	Красный	4.0-4.2×10 ⁵
№82,0	~7,45-7,46	×10 ⁵	Пурпурный	1.45-1.55×10 ⁵
№113,0	~7,45-7,46	×10 ⁵	Оливковый	0.55-0.65×10 ⁵

Как видно из рисунка 3.1 (e) и таблицы 3.5, смещение пиков стабильны, не превышает ±0,01 мин. Максимальное содержание вещества зафиксировано в прогоне №112,0, относительно него уровни №111,0, №83,0, №82,0 составляют ≈74-76 %, ≈46-48 %, ≈16-18 %. Минимальное содержание вещества зафиксировано в №113,0 с ≈6-8 %. Различия между прогонами значительны.

Таким образом, исследуемые соединения характеризуются повышенной площадью пиков, что свидетельствует о их значительном содержании в составе изученных нефтей. Помимо них, были зафиксированы также ряд сложных эфиров и гетероциклических соединений, представленных менее

интенсивными, но воспроизводимыми сигналами. Среди них можно отметить такие соединения, как 2-тиофенкарбоновая кислота, 4-нитрофенильный эфир, фенилтиоуксусной кислоты эфир, 5-Аллил-2-т-бутил-5-этил-3-метил-4-оксоимидазолидин-1-карбоновая кислота, т-бутиловый эфир, тиофен, 2-(1-метилэтил)-.

Дополнительно были обнаружены неопознанные пики, которые по характеру удерживания (Rt) и особенностям хроматографического профиля предположительно относятся к тиофеновым и бензотиофеновым производным. Наличие данных соединений подтверждает сложный сероорганический состав нефти Каражанбасского месторождения и подчёркивает актуальность разработки селективных методов десульфуризации.

3.1.2 Газохроматографическая характеристика серосодержащих соединений месторождений Бозащы

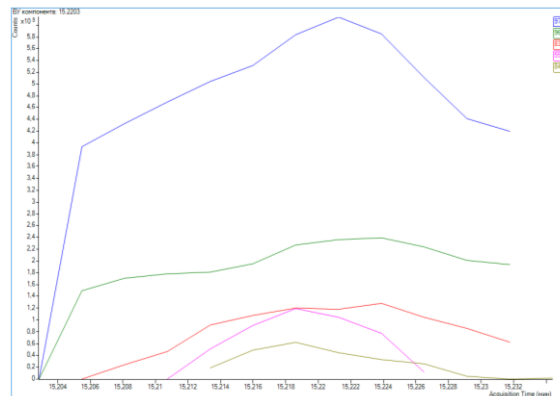
В результате газохроматографического анализа нефти, отобранной с месторождения Бозащы, было идентифицировано более двадцати серосодержащих соединений различного строения, включая тиофены, сульфиды и сложные эфиры сернистой кислоты. Для дальнейшего детального рассмотрения и количественной оценки были выбраны пять компонентов, характеризующихся устойчивыми временами удерживания (Rt) и высокой воспроизводимостью сигналов, что позволяет отнести их к числу маркерных соединений сероорганической фракции нефти (Рисунок 3.2):

- a) тиофен, 3-этил-;
- b) сернистая кислота, ди (циклогексилметил) эфир;
- c) бензилметилсульфид;
- d) тиофен, 2-этил-5-октил-;
- e) этанол, 1-[4-(метилсульфонил)фенил] -.

Ниже приведены развёрнутые описания хроматографических профилей для данных соединений. Для этого полученные результаты по каждому исследованному соединению оформлены в таблицах 3.6 – 3.10.



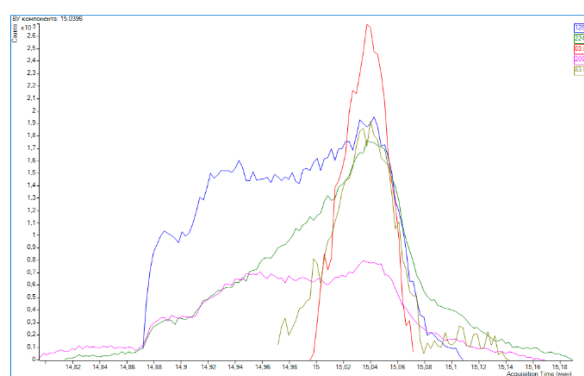
a)



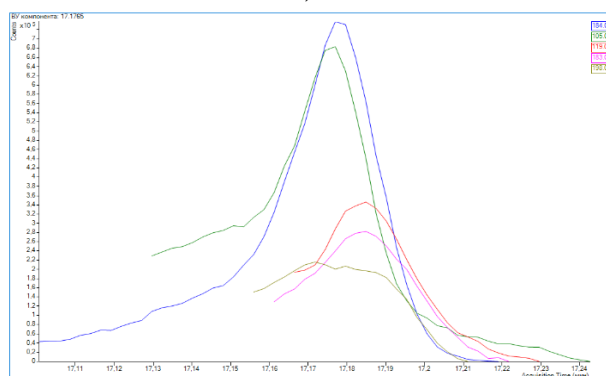
b)



c)



d)



e)

а) тиофен, 3-этил-; б) сернистая кислота, ди (циклогексилметил) эфир;
 с) бензилметилсульфид; д) тиофен, 2-этил-5-октил-; е) этанон, 1-[4-(метилсульфонил)фенил] -

Рисунок 3.2 – Газохроматографические профили серосодержащего соединения в образцах нефти месторождения Бузачи

Таблица 3.6 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Бузачи»: Тиофен, 3-этил-; ($R_t = 5,9741$ мин; шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№97,0	~5,975	$\times 10^5$	Синий	$3,05 \times 10^5$
№83,0	~5,975	$\times 10^5$	Зеленый	$0,82 \times 10^5$
№112,0	~5,975	$\times 10^5$	Красный	$0,70 \times 10^5$
№82,0	~5,975	$\times 10^5$	Пурпурный	$0,28 \times 10^5$
№146,0	~5,975	$\times 10^5$	Оливковый	Ниже $0,05 \times 10^5$

Как видно из рисунка 3.2 (а) и таблицы 3.6, пики симметричные, смещение пиков между прогонами в пределах $\pm 0,005$ мин. Максимальное содержание вещества зафиксировано в прогоне №97.0, относительно него уровни №83,0, №112,0, №82,0 составляют $\approx 27\%$, $\approx 23\%$ и $\approx 9\%$. Минимальное

содержание составляет в №146.0 с <2 % от максимума. Разброс концентраций между прогонами превышает порядок величины, что указывает на значительную вариабельность распределения данного анализа в пробах.

Таблица 3.7 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Бузачи»: Сернистая кислота, ди (циклогексилметил) эфир ($R_t = 15,2203$ мин; шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№97,1	~15,2203	$\times 10^5$	Синий	$5,80 \times 10^5$
№96,1	~15,2203	$\times 10^5$	Зеленый	$2,10 \times 10^5$
№83,1	~15,2203	$\times 10^5$	Красный	$1,00 \times 10^5$
№55,1	~15,2203	$\times 10^5$	Пурпурный	$1,00 \times 10^5$
№84,1	~15,2203	$\times 10^5$	Оливковый	$0,50 \times 10^5$

Как видно из рисунка 3.2 (b) и таблицы 3.7, пики полусимметричные, смещение удерживания не превышает $\pm 0,004$ мин. Максимальное содержание соединения наблюдается в прогоне №97,1, относительно него уровни №96,1, №83,1, №55,1 составляют $\approx 36\%$, $\approx 17\%$ и $\approx 17\%$ соответственно. Минимальное значение зафиксировано в №84,1 с $\approx 9\%$. Разброс концентраций указывает на выраженную вариабельность распределения анализа в пробах.

Таблица 3.8 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Бузачи»: Бензилметилсульфид ($R_t = 14,4934$ мин; шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№91,0	~14,4934	$\times 10^5$	Синий	$2,85 \times 10^5$
№83,1	~14,4934	$\times 10^5$	Зеленый	$1,80 \times 10^5$
№138,1	~14,4934	$\times 10^5$	Красный	$0,80 \times 10^5$
№123,1	~14,4934	$\times 10^5$	Пурпурный	$0,72 \times 10^5$
№67,1	~14,4934	$\times 10^5$	Оливковый	$0,65 \times 10^5$

Как видно из рисунка 3.2 (c) и таблицы 3.8, пики хорошо разделены, смещение пиков не превышает $\pm 0,005$ мин. Наибольшее содержание вещества зафиксировано в прогоне №91,0, относительно него уровни №83,1, №138,1, №123,1 составляют $\approx 63\%$, $\approx 28\%$ и $\approx 25\%$. Минимальное содержание составляет в №67,1 с <23 % от максимума. Сигнал устойчивый, форма пика симметричная, признаков коэлюции не выявлено.

Таблица 3.9 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Бузачи»: Тиофен, 2-этил-5-октил- ($R_t = 15,0396$ мин; шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№69,0	~15,0396	$\times 10^5$	Синий	$2,65 \times 10^5$
№125,0	~15,0396	$\times 10^5$	Зеленый	$2,05 \times 10^5$
№224,0	~15,0396	$\times 10^5$	Красный	$2,00 \times 10^5$
№209,0	~15,0396	$\times 10^5$	Пурпурный	$0,95 \times 10^5$
№83,0	~15,0396	$\times 10^5$	Оливковый	$0,90 \times 10^5$

Как видно из рисунка 3.2 (d) и таблицы 3.9, пики стабильны, смещение не превышает $\pm 0,005$ мин. Максимальное содержание соединения зафиксировано в прогоне №69.0, при этом два прогона №125.0 и №224.0 показывают близкие значения $\sim 75-77$ %. Содержание в прогонах №209.0 и №83.0 заметно ниже $\approx 34-36$ %. Различия между прогонами отражают вариабельность концентрации, но при этом удерживание стабильно, что подтверждает корректность идентификации анализа.

Таблица 3.10 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Бузачи»: Этанон, 1-[4-(метилсульфонил) фенил] - ($R_t = 17,1765$ мин; шкала $\times 10^5$).

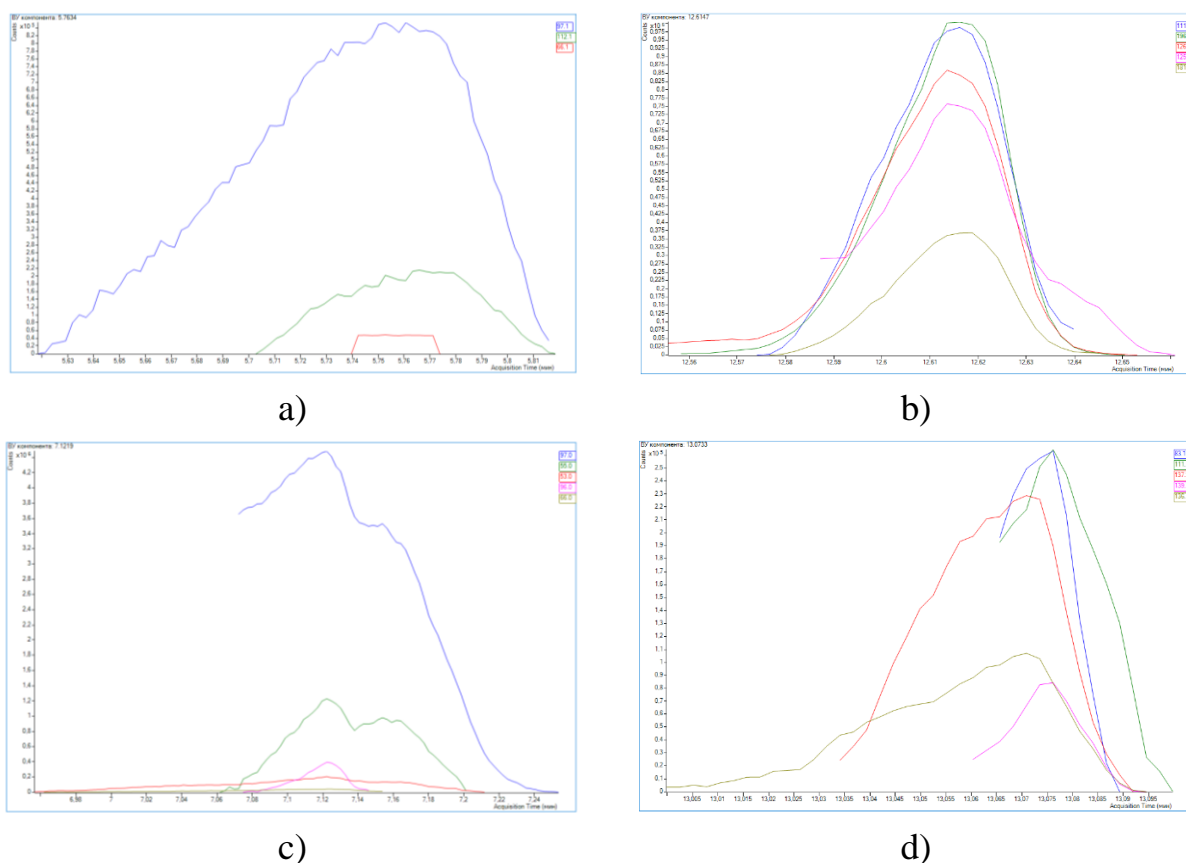
№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№184,0	~17,1765	$\times 10^5$	Синий	$7,10 \times 10^5$
№105,0	~17,1765	$\times 10^5$	Зеленый	$6,80 \times 10^5$
№113,0	~17,1765	$\times 10^5$	Красный	$3,50 \times 10^5$
№183,0	~17,1765	$\times 10^5$	Пурпурный	$2,80 \times 10^5$
№198,0	~17,1765	$\times 10^5$	Оливковый	$2,00 \times 10^5$

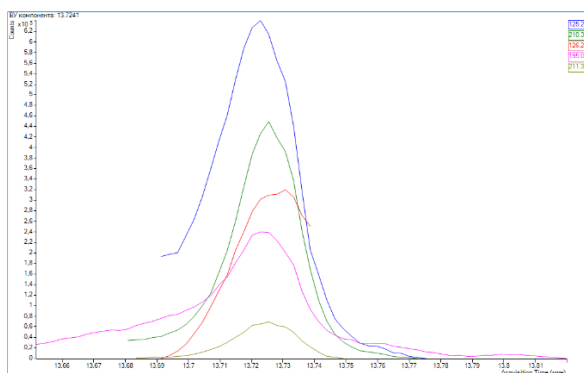
Как видно из рисунка 3.2 (e) и таблицы 3.10, пики острые, стабильные, во всех прогонах смещение удерживание составляет $\leq 0,005$ мин. Максимальное содержание соединения зафиксировано в прогоне №184,0, при этом значение в №105,0 практически идентично с ≈ 96 %, что указывает на равномерное распределение вещества в части проб. Остальные прогоны, №113,0, №183,0 и 198,0 содержат соединение в 2-3 раза меньше, ≈ 49 %, ≈ 39 % и ≈ 28 % от максимума. Это подтверждает, как стабильность метода, так и вариабельность концентраций между отдельными образцами.

Таким образом, для всех исследованных соединений было получено стабильное время удерживания компонента (R_t), что подтверждает правильность их идентификации. При этом интенсивность пиков сильно менялась: содержание соединений варьировало от 5-10 % до 100 % от максимума в зависимости от прогона. Наибольшие концентрации отмечались в отдельных двух-трех прогонах, тогда как в других их количество было значительно ниже. Помимо них, были зафиксированы также ряд сложных эфиров и гетероциклических соединений, такие как 2-Тиофенкарбоновая кислота, 2-этилциклогексильный эфир, 1-Пентанон, 1-(2-тиенил)-, 4-(Пирролидин-1-ил)изотиазолидин-1,1-диоксид, 6-Этилтио-1,2,4-триазоло(4,3-*b*)пиридазин. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сероорганический состав нефти Бузачи отличается высокой сложностью и неоднородностью распределения соединений.

3.1.3 Газохроматографическая характеристика серосодержащих соединений месторождений Кумколь

В результате газохроматографического анализа нефти, отобранной с месторождения Кумколь, идентифицировано более двадцати серосодержащих соединений различного строения. Из общего перечня для детального рассмотрения были выделены пять компонентов, характеризующихся устойчивыми временами удерживания и высокой воспроизводимостью сигналов. К их числу относятся (Рисунок 3.3):





е)

а) тиофен, 3-этил-; б) тиофен, 2-пропил-; в) сернистая кислота, ди(циклогексилметилловый) эфир; д) этанон, 1-(3-тиенил)-; е) тиофен, 2-этил-5-гептил-

Рисунок 3.3 – Газохроматографические профили серосодержащего соединения в образцах нефти месторождения Кумколь

- а) тиофен, 3-этил-;
- б) тиофен, 2-пропил-;
- в) сернистая кислота, ди(циклогексилметилловый) эфир;
- д) этанон, 1-(3-тиенил)-;
- е) тиофен, 2-этил-5-гептил-.

Ниже приведены развёрнутые описания хроматографических профилей для данных соединений. Для этого полученные результаты по каждому исследованному соединению оформлены в таблицах 3.11 – 3.15.

Как видно из рисунка 3.3 (а) и таблицы 3.11, пики не стабильны, смещение не превышает $\pm 0,005$ мин, что указывает на высокую воспроизводимость метода. Максимальное содержание соединения зафиксировано в прогоне №97,1. В остальных прогонах интенсивность снижена: до $\approx 38\%$ в №112,1 и $\approx 8\%$ в №66,1. Различия имеют количественный характер при сохранении стабильного временного положения пика.

Таблица 3.11 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Кумколь»: Тиофен, 3-этил- ($R_t = 5,7634$ мин; шкала $\times 10^5$)

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№97,1	$\sim 5,7634$	$\times 10^5$	Синий	$8,25 \times 10^5$
№112,1	$\sim 5,7634$	$\times 10^5$	Зеленый	$3,15 \times 10^5$
№66,1	$\sim 5,7634$	$\times 10^5$	Красный	$0,65 \times 10^5$

Таблица 3.12 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Кумколь»: Тиофен, 2-пропил- ($R_t \approx 12,6147$ мин; шкала $\times 10^6$)

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№196,0	$\sim 12,6147$	$\times 10^5$	Синий	$0,98 \times 10^6$
№111,0	$\sim 12,6147$	$\times 10^5$	Зеленый	$0,96 \times 10^6$
№126,0	$\sim 12,6147$	$\times 10^5$	Красный	$0,78 \times 10^6$
№125,0	$\sim 12,6147$	$\times 10^5$	Пурпурный	$0,71 \times 10^6$
№181,0	$\sim 12,6147$	$\times 10^5$	Оливковый	$0,42 \times 10^6$

Таблица 3.13 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Кумколь»: Сернистая кислота, ди(циклогексилметиловый) эфир ($R_t \approx 7,1219$ мин; шкала $\times 10^6$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№97,0	$\sim 7,1219$	$\times 10^6$	Синий	$4,35 \times 10^6$
№55,0	$\sim 7,1219$	$\times 10^6$	Зеленый	$1,65 \times 10^6$
№53,0	$\sim 7,1219$	$\times 10^6$	Красный	$0,72 \times 10^6$
№96,0	$\sim 7,1219$	$\times 10^6$	Пурпурный	$0,58 \times 10^6$
№66,0	$\sim 7,1219$	$\times 10^6$	Оливковый	$0,32 \times 10^6$

Как видно из рисунка 3.3 (b) и таблицы 3.12, пики стабильны, смещение не превышает $\pm 0,002$ мин, форма сигналов одинакова во всех прогонах. Максимальные значения отмечены в прогоне №196,0 и одинаково с ним №111,0 с 98 %. Уровни в №126,0 и №125,0 несколько ниже и составляют 72 и 80 % от максимума. Минимальное содержание соединения зафиксировано в №181,0 с ≈ 43 %. Таким образом, соединение характеризуется высокой стабильностью временного удерживания и воспроизводимой формой пиков, при этом вариации интенсивности отражают различия в концентрации между пробами.

Как видно из рисунка 3.3 (c) и таблицы 3.13, пики стабильны, смещение не превышает $\pm 0,003$ мин, что подтверждает высокую точность метода. Максимальное содержание соединения зафиксировано в прогоне №97,0, где интенсивность более чем в два раза превышает значения остальных проб. Относительно него уровни №55,0, №53,0 и №96,0 составляют ≈ 38 %, ≈ 17 %, ≈ 13 %. Минимальное содержание соединения зафиксировано в №66,0 с ≈ 7 %. Таким образом, соединение демонстрирует выраженную вариабельность концентраций при сохранении стабильного времени удерживания компонента и формы пика.

Таблица 3.14 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Кумколь»: Этанон, 1-(3-тиенил)-; ($R_t \approx 13,0733$ мин; шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№83,1	~13,0733	$\times 10^5$	Синий	$2,52 \times 10^5$
№111,1	~13,0733	$\times 10^5$	Зеленый	$2,48 \times 10^5$
№137,2	~13,0733	$\times 10^5$	Красный	$2,15 \times 10^5$
№139,2	~13,0733	$\times 10^5$	Пурпурный	$1,05 \times 10^5$
№136,1	~13,0733	$\times 10^5$	Оливковый	$0,82 \times 10^5$

Таблица 3.15 – Газохроматографические профили в образцах нефти месторождения «Кумколь»: Тиофен, 2-этил-5-гептил- ($R_t \approx 13,7241$ мин; шкала $\times 10^5$).

№ прогона	Время удерживания компонента, R_t , мин	Количества ионов, зарегистрированных детектором, число	Цвет	Амплитуда пика
№125,2	~13,7241	$\times 10^5$	Синий	$6,25 \times 10^5$
№210,3	~13,7241	$\times 10^5$	Зеленый	$4,35 \times 10^5$
№126,2	~13,7241	$\times 10^5$	Красный	$3,05 \times 10^5$
№195,0	~13,7241	$\times 10^5$	Пурпурный	$2,35 \times 10^5$
№211,3	~13,7241	$\times 10^5$	Оливковый	$1,15 \times 10^5$

Как видно из рисунка 3.3 (d) и таблицы 3.14, пики стабильны, смещение в разброс $\leq \pm 0,002$ мин, форма пиков преимущественно симметричная. Наибольшее содержание соединения зафиксировано в прогоне №83.1, близкое значение наблюдается в №111.1 с 98 %, что подтверждает высокую воспроизводимость метода. Относительно них уровни в прогонах №137,2 и №139,2 составляют ≈ 85 % и ≈ 42 %. Минимальное содержание компонентов зафиксировано в №136,1 с ≈ 33 % от максимального, что отражает заметную вариабельность концентрации, но при стабильном R_t .

Как видно из рисунка 3.3 (d) и таблицы 3.15, Временное положение пиков стабильны, смещение в разброс $\leq \pm 0,003$ мин, форма сигналов преимущественно симметричная. Максимальная концентрация соединения зафиксирована в прогоне №125,2, относительно него уровни в №210,3, №126,2 и №195,0 составляют ≈ 70 %, ≈ 49 % и ≈ 38 %. Минимальное содержание отмечается в №211,3 с ≈ 18 %. Таким образом, соединение демонстрирует выраженные количественные различия между прогонами при устойчивых хроматографических параметрах.

Таким образом, интенсивности сигналов (пики) варьировали в широких пределах: от минимальных значений на уровне 7-10 % до максимума, принятого за 100 %. При этом для отдельных соединений отмечалось близкое совпадение интенсивностей в двух прогонах, что свидетельствует о воспроизводимости метода. В то же время другие соединения показывали выраженные различия между прогонами, указывая на вариабельность концентрации компонентов в исследованных пробах. Помимо них, были зафиксированы также ряд сложных эфиров и гетероциклических соединений, такие как бензилмеркаптан, S-(трет-бутилдиметилсилил)-, 4-(Пирролидин-1-ил)изотиазолидин-1,1-диоксид, -Тиофенкарбоновая кислота, 2-этилциклогексильный эфир. Таким образом, нефть Кумкольского месторождения характеризуется сложным и неоднородным сероорганическим составом.

Заключение. По данным Газовой хроматографии-масс-спектрометр с ПИД анализов для всех месторождений зафиксированы стабильные времена удерживания (между $\leq \pm 0,002-0,01$ мин), что подтверждает правильность идентификации методики. Различия между прогонами носят преимущественно количественный характер (амплитуды от ~5-10 % до 100 % от максимума), при сохранении формы пиков и времени удерживания компонентов. Во всех трех месторождениях преобладают производные тиофена и его замещённых форм (алкил-, ацил- и сложные эфиры тиофенкарбоновых кислот), а также обнаружены сульфоновые кислоты и их эфиры, тиоэфиры, алкилтиопроизводные гетероциклов, фосфорсодержащие сернистые соединения и различные бензотиофеновые структуры. Повторяющимся компонентами в наборах для Каражанбаса, Бузачи и Кумколя выступает сернистая кислота, ди(циклогексилметил) эфир (Сернистая кислота, ди(циклогексилметил) эфир), демонстрирующая воспроизводимые времена удержания. Алкилированные тиофены (например, 3-этил-, 2-пропил-, 2-этил-5-алкил-) присутствуют во всех трех нефтях, что указывает на доминирование тиофенового типа серы в органической фракции.

В месторождении Каражанбас помимо алкилтиофенов выделяются гетероциклические соединения. В месторождении Бузачи помимо алкилтиофенов выделяются бензилметилсульфид и этанон, 1-[4-(метилсульфонил)фенил]-, что соответствует к составу более «тяжелых» сероорганических структур. В месторождении Кумколь кроме вышечисленных соединений в других месторождениях, здесь выделяется один из анализов, сернистая кислота, ди(циклогексилметил) эфир, отличающийся по составу от остальных. В исследованных казахстанских нефтях часто встречалось соединение сернистая кислота, ди(циклогексилметил) эфир. При этом в зарубежных исследованиях, например, по нефтям Судана [293], такие эфиры не отмечались среди характерных сероорганических соединений – там обычно доминируют тиофены, бензотиофены и дибензотиофены. Это подчёркивает специфику именно казахстанских нефтей и указывает на отличия их сероорганического

профиля от нефти других регионов. Кроме этого, часто встречался ди(циклогексилметил) эфир сернистой кислоты. Подобные эфиры почти не описаны в других исследованиях, например, по нефти из Нигер-дельты там чаще отмечают тиофены, бензотиофены и их производные [294]. В нефти Brent и других сортах Северного моря свидетельствуют о разнообразии серных соединений, но эфиры, подобные обнаруженным в наших исследованиях, не отмечаются как доминирующие [295].

Таким образом, проведённые исследования показали, что нефти месторождений Каражанбас, Бузачи и Кумколь имеют схожую основу сероорганического состава, доминирование алкилтиофенов и родственных соединений при устойчивых временах удерживания. При этом для каждой нефти характерны свои особенности в распределении и относительном содержании отдельных компонентов. Эти результаты подчёркивают сложность и разнообразие сероорганики казахстанских нефтей и подтверждают необходимость разработки более селективных методов обессеривания.

3.2 Выделение сульфатоокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий из сырой нефти

Нефтяные пласты представляют собой чрезвычайно замкнутую среду с высокими температурами, высоким давлением, недостатком кислорода и сосуществованием нефти, газа, воды и горных пород [296]. Несмотря на экстремальные условия (аноксия, высокая температура/солёность, низкая активность воды) нефтяные месторождения стабильно заселены микробными сообществами [126], включая углеводородокисляющих, ферментативных, сероокисляющих, сульфатредуцирующих и метаногенных бактерий [297], т.к. резервуары обеспечивают их всеми питательными элементами (углерод, азот, фосфор, водород, сера, магний, калий, натрий, железо, марганец, кальций и цинк и др.), которые необходимы для их роста и метаболизма, способствуя формированию богатой микробиоты [298]. Благодаря такому богатому составу в пластовых и особенно попутных водах часто формируются сложные микробные консорциумы с ярко выраженной трофической структурой: тяжёлые углеводороды нефти ферментируются и гидролизуются, образуя ацетат, пропионат, водород и другие лёгкие субстраты, которые затем служат кормом для специализированных микроорганизмов [299].

Совместное функционирование этих метаболических групп ферментаторов углеводов, метаногенов и сульфатредуцирующих бактерий обеспечивает замыкание локальных биогеохимических циклов углерода и серы как в глубоких пластах, так и в поверхностных добычных системах [300]. Нефтяные пласты представляют собой многофазную систему, включающую сырую нефть, пластовые воды, а также твердые поверхности горных пород и органических материалов, которые служат нишами для

обитания микроорганизмов [125]. Зона перехода нефть-вода считается «горячей точкой» роста микробов, поскольку микроорганизмы в водной фазе находятся в прямом контакте с доступными донорами электронов вышележащей нефтяной фазы [126]. В нефтяной фазе наблюдается гораздо более высокое бактериальное разнообразие и видовое богатство по сравнению с водной. При этом часть микроорганизмов способна адгезироваться непосредственно к поверхности углеводородной фазы, тогда как другие сохраняют активность преимущественно в водной среде [301]. Микробные процессы, протекающие в нефтяных пластах, существенно изменяют химический состав и физико-химические характеристики сырой нефти. В результате их активность отражается как на её экономической ценности, так и на условиях эксплуатации месторождений [302]. Это влияние может быть двойственным: с одной стороны, снижение вязкости тяжёлой нефти способствует повышению эффективности её извлечения, а с другой стороны микробная активность может вызывать нежелательные последствия, такие как коррозия оборудования или закисление пласта [303]. Так, главными возбудителями бактериально индуцированной коррозии (БИК) стального оборудования считаются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), которые используют сульфат пластовой воды в качестве акцептора электронов, восстанавливая его до сульфида [304] и которые отличаются высоким разнообразием в резервуарных средах [305]. СРБ также способны засорять трубопроводы и ухудшать качество нефти [306].

СРБ, обитающие в нефтяных резервуарах, питаются растворенными в пластовых водах донорами электронов, образующимися как из нефти в результате анаэробной ферментации, так и за счёт привнесённых органических субстратов: типично используются лактат, пируват, формат, сукцинат/фумарат, малат, короткоцепочечные спирты (метанол, этанол, глицерин), а также H_2/CO_2 в качестве источников углерода и энергии для восстановления сульфата [307]. По температуре спектр обитания СРБ охватывает от мезофильных условий до термофильных резервуаров (45-70 °С и выше), где подтверждена активность и разнообразие сульфатредуцирующих сообществ [308]. По кислотности чаще демонстрируют нейтрофильные оптимума (около рН 6-7), однако в реальных системах зафиксированы значения рН 5,8-6,2, а для разных резервуаров интервал примерно рН 3-7 [309]. На уровне образа жизни СРБ часто формируют биоплёнки на металлах и в зоне нефть-вода, где обеспечивается одновременно доступ к органическим донорам и к сульфату из водной фазы; активность и морфология таких биоплёнок выражено зависят от температуры, что важно для оценки коррозионных рисков [310].

В контексте исследуемой темы следует отметить, что ключевые звенья локального цикла серы образуют две функциональные группы – это СРБ, диссимиляторно восстанавливающие SO_4^{2-} до H_2S и СОБ, окисляющие $H_2S/S^0/S_2O_3^{2-}$ до SO_4^{2-} с использованием O_2 или NO_3^- . Их совместная

активность замыкает цикл серы в пластовых и промысловых системах [311]. СРБ используют сульфат (SO_4^{2-}), тиосульфат или другие окисленные формы серы как акцепторы электронов, восстанавливая их до сульфида (H_2S). Тем самым они обеспечивают ключевое звено биогеохимического цикла серы в нефтяных пластах [312]. Через восстановление сульфата до токсичного сероводорода (H_2S) они завершают процесс расщепления углеводов, инициированных другими нарушителями, ферментаторами и метаногенами, и тем самым поддерживают устойчивость микробного консорциума в условиях анаэробии [313].

В нефтяных месторождениях встречаются СРБ, такие как: *Curtobacterium*, *Brevundimonas*, *Brachymonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* [124]. А также сообщества СРБ в нефтяных средах включают представителей таких родов, как *Desulfovibrio*, *Desulfotignum*, *Desulfoplanes* и других из семейств *Desulfovibrionaceae* и *Desulfobacteraceae*, чьи геномы выделены и реконструированы в метагеномных исследованиях [307]. В нефтяных месторождениях Казахстана также выявлены разнообразные сульфатредуцирующие сообщества, адаптированные к специфическим условиям пластов. В Каражанбас были выделены штаммы *Pseudodesulfovibrio*, *Oleidesulfovibrio* и *Acetobacterium*, действующие как источники H_2S и факторы микробиологически индуцированной коррозии [314]. В Узене (выше 57°C , до 120 г/л солёности) после закачки морской воды резко возросли доли термофильных СРБ, *Desulfonauticus*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, биоплёнки *Desulfovibrio alaskensis Kaz19* показали повышенную устойчивость к биоцидным воздействиям [315].

Сероокисляющие микроорганизмы (СОМ) в нефтяных системах это преимущественно хемо(лито)автотрофные и литогетеротрофные бактерии, которые используют восстановленные соединения серы, такие как H_2S , элементную S^0 , тиосульфат, тетратионат и политионаты, как доноры электронов, а в качестве акцепторов используют O_2 или NO_3^- , конечными продуктами выступают SO_4^{2-} и/или S^0 ; набор путей включает Sox, rDSR и S₄I и меняется с условиями среды [316, 136]. В реальных условиях добычи особенно активны нитрат-зависимые сероокислители (НЗ-СОМ), которые подавляют деятельность сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) за счёт окисления H_2S и конкуренции за ресурсы, что служит эффективным стратегическим методом контроля «подкисление нефти» – накопление H_2S . Этот эффект подтверждён в недавней работе Huimei Tian и соавторов: структурные изменения микробного сообщества (включая ген *dsrB/soxB*), рост доли СОМ и эффективное подавление СРБ наблюдались в условиях высокого содержания нитрата и кислорода [306]. рН среды и структурные особенности СОМ существенно влияют на метаболизм. При слабокислой среде (рН \approx 5-6.5) активны автотрофные *Halothiobacillus* и *Thiomonas*, которые полностью окисляют сульфид до сульфата, повышая кислотность. При нейтральных или

слегка щелочных условиях ($\text{pH} \approx 6.5-8.5$) доминируют *Thiobacillus* и *Sulfuriferula*, которые используют неполный Sox или путь rDSR, что ведёт к накоплению промежуточных соединений [317]. На практике СОМ выполняют двойную функцию: с одной стороны, это «санитары серы», которые детоксицируют H_2S , уменьшая осернение и связанные риски, особенно при грамотно дозируемых нитрате/кислороде [136] это является преимуществам данных бактерий. А с другой стороны, недостаткам данных бактерий, при кислородном режиме и доминировании СОМ они способны ускорять закисление среды (рост $\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$) и тем самым усиливать коррозионные процессы, что требует осторожной настройки режимов аэрации/нитратирования в системах подготовки/закачки воды [318]. СОБ концентрируются в интерфейсе нефть-вода и формируют биоплёнки на стенках оборудования, где условия позволяют одновременное потребление H_2S и O_2/NO_3^- . Активность бактерий варьируется с окислительными градиентами: в окислительных зонах преобладают виды с полным Sox-путём, а в гипоксических неполный Sox и rDSR [306].

Как видим, СРБ связывают не только с биогенным «осернением» и микробиологически обусловленной коррозией, но и с важнейшим звеном глобального серного цикла, т.к. они замыкают круговорот серы, восстанавливая сульфат до H_2S , который затем может быть повторно окислен сероокисляющими бактериями или химическими процессами. Таким образом, СРБ обеспечивают стабильность биогеохимических сетей в нефтяных пластах и других анаэробных экосистемах [296]. Кроме того, СРБ играют ключевую роль в трофических взаимодействиях микробных консорциумов. Они утилизируют продукты ферментации, летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат) и молекулярный водород, которые накапливаются при деградации углеводов. Без СРБ эти субстраты тормозили бы рост других микроорганизмов, а с ними они становятся частью устойчивой энергетической цепи: ферментаторы-СРБ-метаногены/СОМ». Такой обмен подтверждён в метагеномных исследованиях пластовых вод, где СРБ занимают центральное место в сети обмена электронов [319].

Сероокисляющие микроорганизмы в нефтяных и околонефтяных экосистемах представлены прежде всего родами *Thiobacillus* (в т.ч. *T. denitrificans* как классический нитрат-зависимый окислитель сульфида/тиосульфата), *Halothiobacillus*, *Sulfuriferula* (переклассифицированные «тиобациллы» с rDSR/sox-маршрутами), *Thiomicrothabodus*, а также *Sulfurimonas*, *Sulfurovum* и *Sulfuricurvum* из *Campylobacterota* [320]. Таксономически и функционально существенен кластер *Sulfuriferula* (семейство *Sulfuricellaceae*): современные изоляции и геномные исследования подтверждают широкую экологическую амплитуду этого рода и способность к окислению различных форм серы, включая сценарии с неполным Sox и rDSR, что важно для нейтральных/слабощелочных

вод промыслов [321]. Некоторые представители родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, хотя и не являются классическими сероокисляющими бактериями (СОМ), демонстрируют важную активность в контексте сероокисления и биодесульфуризации углеводородных сред [322]. Кроме того, в метаболических исследованиях было показано, что *Rhodococcus qingshengii* и близкие родственники используют ассимиляционный путь метаболизма серы, превращая органические серосодержащие соединения (например, дибензотиофен) в метаболиты (например, 2-гидроксибифенил), что способствует их дальнейшему использованию как источников углерода [323]. В нефтяных и водонапорных системах Казахстана сероокисляющие бактерии играют важную роль в контроле «осернения» (souring), вызванного активностью СРБ. Кроме классических *Thiobacillus*, в резервуарах Казахстана встречаются *Rhodococcus sp.*, *Gordonia sp.*, *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas sp.* Их активность особенно проявляется в зоне интерфейса нефть-вода и в системах подготовки воды для заводнения [324].

Как видим, в нефтяных пластах и связанных системах добычи сукцессионная динамика между сульфатредуцирующими бактериями и сероокисляющими микроорганизмами играет ключевую роль в контроле серного цикла и технологических процессов. СРБ восстанавливают сульфат до H_2S , вызывая прокисания нефти, коррозию оборудования и ухудшение качества нефти. СОМ, в свою очередь, окисляют сероводород назад до элементов серы или сульфатов, включая нитрат-зависимые формы (НЗ-СОМ), что существенно влияет на динамику системы и предотвращение накопления H_2S [296]. Метагеномные анализы, проведенные на примере резервуара Halfdan в Северном море, показали, что при вторичном введении кислорода и нитратов, происходит последовательный сдвиг доминирующих процессов: от ферментативных и СРБ к активным СОМ, изменения в метаболической активности и преобладание быстрорегулируемых групп. Такой переход указывает на устойчивую сукцессивную структуру, устойчивую к технологическим воздействиям [325].

Сероокисляющие микроорганизмы (СОМ) являются важнейшим звеном в контроле сероводородообразования и поддержании баланса серного цикла в нефтяных системах. В условиях закачки нитрата или при дозированном введении кислорода в систему активируются нитрат-зависимые и аэробные СОМ, которые окисляют сероводород до элементной серы (S^0) или сульфата (SO_4^{2-}) [306]. Таким образом, внедрение СОМ рассматривается как экологическая и энергоэффективная действия для подкисления нефти, позволяющая уменьшить токсичность и коррозионные риски без чрезмерного использования химических ингибиторов. Помимо процессов в пласте, СОМ находят широкое применение в инженерных технологиях очистки газов и вод. В частности, системы для очистки воздуха на основе сероокисляющих бактерий показали высокую эффективность в удалении H_2S из попутного газа

и сточных вод. Эти системы обеспечивают биологическую рециклизацию H_2S в элементную серу или сульфат, при этом достигается высокая нагрузочная способность и стабильность процесса при корректной настройке pH и концентрации нитрата [326]. Однако применение сероокисляющих микроорганизмов имеет и свои риски. При избытке кислорода и высокой метаболической активности СОМ возможна локальная генерация серной кислоты (H_2SO_4), что приводит к закислению среды и ускоренной коррозии металлов и цементных материалов обсадных колонн. Инженерные обзоры отмечают необходимость строгого контроля геохимических параметров при использовании СОМ-технологий, включая поддержание оптимального pH и буферных условий в системе [327].

Углевородоксиляющие микроорганизмы (далее УМ), ключевая функциональная группа нефтяного микробиома. Эти бактерии используют нефть и её фракции, n-алканы, ароматические и полициклические углеводороды, как источники углерода и энергии. В аэробных условиях важную роль играют роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia* и *Cycloclasticus*, которые продуцируют биосурфактанты, облегчающие доступ ферментов к гидрофобным субстратам [328]. Частично разлагают углеводороды до ацетата, пропионата и водорода, которые затем потребляются метаногенами и сульфатредуцирующими бактериями (СРБ). Такой метаболический обмен обеспечивает замыкание локальных циклов углерода и серы и позволяет системе существовать даже в экстремальных условиях давления и температуры [329, 330]. При доступности кислорода и питательных элементов доминируют аэробные УМ. При переходе к анаэробии или ограниченному снабжению акцепторами электронов сообщество перестраивается в пользу ферментаторов, нитратредуцирующих и метаногенных микроорганизмов. Такая сукцессионная динамика отражает принцип: одни микроорганизмы производят субстраты (летучие жирные кислоты, H_2), которые становятся источником питания для других [325, 319], т.е. конечные продукты включаются в цикл трикарбоновых кислот и служат источником энергии и биомассы [331].

В пластовых и глубоководных системах состав и активность УМ задаются температурой (от психрофильных морских (4 °C) до термофильных анаэробных деструкторов (50-70 °C)) [300, 332], оптимальным давлением (от атмосферного до 40-80 МПа, при этом высокое давление способствует перестраиванию сукцессии, препятствуя росту УМ) [333] и pH (7-8, хотя диапазон активности сообществ широк (4-9)) [334].

В исследованиях показано, что из представителей УМ, *Rhodococcus indonesiensis* и *Pseudomonas argentinensis* способны разрушать тяжёлые нефтяные фракции, продуцировать биосурфактанты, усиливать биоэмульгирование и биодоступность субстратов [335]. За счет частичной биоразборки длинноцепочечных алканов и ко-продукции ПАВ, в ко-культурах

Bacillus subtilis+*P. aeruginosa* фиксировали рост деградации сырой нефти до ~63 % за 7 суток (лабораторные условия), что иллюстрирует синергию ПАВ и гидрофобизации клеток. Это способствует снижению вязкости нефти и мобилизацию тяжёлых фракций [328]. Использование поверхностно-активных веществ и биосурфактантов может снизить МНП и повысить нефтеотдачу за счет его снижения. Асфальтены в сырой нефти обладают структурной способностью действовать как поверхностно-активное вещество. При микробиологическом повышении нефтеотдачи пласта (МНП) выработка биосурфактантов, даже в небольших количествах, является значимым механизмом, снижающим МНП [336].

Еще одним микробным сообществом в составе нефти – это метаногенные бактерии (МБ). МБ в нефтяных пластах используют несколько путей: водородотрофный (H_2/CO_2), ацетокластический (ацетат) и метилотрофный (метанол/метиламины), причём в высокосолёных пластовых водах часто доминируют метилотрофы рода *Methanohalophilus*. Показано, что в низкосульфатных и высокосолёных резервуарах именно *methanohalophilus* выходит на первый план, тогда как при большем содержании сульфата усиливается конкуренция со сульфатредукторами за H_2 /ацетат [337, 319]. За последние годы установлен случай алкилотрофного метаногенеза, когда МБ из группы *Candidatus Methanoliparum* напрямую «вскрывают» алканы и доводят их до метана (ключевая ферментная система алкил-коэнзим-М-редуктазы), что существенно расширило представления о роли метаногенов в глубокой биodeградации нефти [330]. Экологически метаногены завязаны на синтрофию: ферментаторы расщепляют тяжёлые фракции до легких жирных кислот (ЛЖК) (ацетат (CH_3COOH), пропионат (CH_3CH_2COOH), бутират ($CH_3CH_2CH_2COOH$)) и H_2 , а метаногены «подбирают» эти доноры. Именно так поддерживается поток электронов и замыкаются локальные циклы C/S в анаэробных пластах [319]. Условия обитания: по температуре метаногенез описан от умеренных до термофильных режимов ($\approx 15-45$ °C в системах с водозаводнением, до 60 °C под высокими давлениями в глубинных резервуарах), при pH обычно близком к нейтральному (оптимум $\sim 7-7,5$) [338]. В глубоких нефтяных резервуарах прямо продемонстрирована анаэробная деградация углеводов с участием алкилотрофных метаногенов, что объясняет устойчивое метанообразование без участия внешних акцепторов электронов и подчёркивает роль метаногенеза как «финального стока» углерода в системе [330]. К ключевым представителям метаногенных бактерий относятся *Methanomassiliicoccales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* и *Methanobacteriales* [339].

Метаногенные археи замыкают углеродный цикл нефтяного микробиома в условиях дефицита сульфата, используя H_2/CO_2 , ацетат и метилсодержащие соединения. Продукты ферментации (ЛЖК, H_2) от углеводородокисляющих и ферментирующих бактерий служат для них

субстратами, формируя синтрофные сети. Недавно было выявлено, что *Candidatus Methanoliparum* напрямую активировать и разлагает алканы с образованием метана, что существенно изменило представления о глубокой биодеградация нефти и механизмах естественного формирования газа в нефтяных резервуарах [330]. Метаногенные бактерии являются ключевыми бактериями в глубокой биодеградация нефти, образовании природного газа и поддержании давления, с чёткими ограничениями по условиям (анаэробия, узкий диапазон pH, чувствительность к O₂). Их активность одновременно создаёт риск накопления метана (газоопасность) [340].

Таблица 3.16 – Общее количество микроорганизмов (ОМЧ) сырой нефти, КОЕ/мл

Показатель	Пробы нефти, отобранные из месторождения		
	«Каражанбас»	«Бозащы»	«Кумколь»
ОМЧ, КОЕ/мл	$(1,7 \pm 0,1) * 10^3$	$(2,1 \pm 0,1) * 10^2$	$(6,5 \pm 0,3) * 10^3$
Анаэробные сульфатредуцирующие бактерии	+	+	-
Аэробные сульфатредуцирующие бактерии	+	+	-
Тиобактерии, протеобактерии Sulphur Medium	-	-	-
Псевдомонады	-	-	-
Микромицеты	-	-	-
Актиномицеты	-	-	-
<i>Примечание:</i> - нет роста; + - имеется рост			

Как видим, биохимическая гибкость консорциума микроорганизмов, обитающих в нефтяных резервуарах, порождает множество вопросов для изучения особенностей их активности в контексте исследуемых тем.

Поэтому на данном этапе пробы нефти, отобранные из месторождений «Каражанбас», «Бозащы» и «Кумколь» исследовались на общую обсемененность (таблица 3.16).

В результате проведённого микробиологического анализа (таблица 3.16) установлено, что во всех исследованных образцах сырой нефти из месторождений «Каражанбас», «Бозащы» и «Кумколь» присутствуют микроорганизмы, способные к росту на средах с сырой нефтью. Наибольшая численность клеток были выделены в пробах нефти месторождения «Кумколь», что может быть связано с более благоприятными физико-химическими условиями для развития серных микроорганизмов, несколько ниже этот показатель в нефти месторождения «Каражанбас», и на порядок меньше в образцах нефти месторождения «Бозащы». Все выделенные культуры характеризовались замедленным развитием: первые признаки роста

отмечены лишь на третьи сутки культивирования, что указывает на низкую скорость метаболической активности микроорганизмов в условиях высокого содержания углеводов и сернистых соединений в среде.

В исследуемых пробах не выявлены тиобактерии, протеобактерии, псевдомонады. На селективной среде для сульфатредуцирующих бактерий зафиксирован рост как аэробных, так и анаэробных бактерий.

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) используют сульфат в качестве терминального акцептора электронов для анаэробного дыхания [127, 130, 132]. А их способность восстанавливать сульфат до сульфида обуславливает их ключевую роль в микробной трансформации серы [341]. На селективной среде Sulphate reducing medium наблюдается характерный рост сульфатредукторов, так как на 7-е сутки анаэробного культивирования в пробирке наблюдалось почернение сред разной интенсивности. Известно, что строгие анаэробные сульфатредуцирующие бактерии, превращают сульфат в сульфид [342], поэтому при культивировании на селективной среде они вступают в реакцию с ионами двухвалентного железа с образованием черного цвета в течение 4-21 суток при температуре 20-30 °С.

Выделенные из исследуемых месторождений СРБ, свидетельствуют о том, что они участвуют в процессах локальной биогенной десульфурзации нефтяных систем. При этом не следует забывать, что активность СРБ имеет двойственный эффект, т.к. они участвуют не только в биодесульфурзации, вовлекая серу в биогеохимический цикл, но и при одновременном образовании H_2S , создают проблемы, связанные, как показано в работе Tran T. (2021) [341], с подкислением нефти, отложением сульфидов металлов и развитием микробиологически индуцированной коррозии (МИК).

Биогеохимический цикл серы в нефтяных пластах можно описать нижеперечисленным многоступенчатым путем:

- сульфат активируется (АТФ-зависимо) до аденозин-5'-фосфосульфата (АПС) ATP sulfurylase (sat) из-за стабильности сульфатного аниона;
- АПС восстанавливается до сульфита APS reductase (aprAB);
- APS reductase (aprAB) восстанавливается до сульфита диссимиляционной сульфитредуктазой (dsrAB) и белком DsrC [130].

Даже при отсутствии СРБ, как в нефти «Кумколь», микробиом сохраняет активность за счёт углеводородокисляющих бактерий и ферментативных звеньев, которые в составе ОМЧ. Так и в нефти остальных месторождений, «Каражанбас», «Бозащы» образовывались СРБ. Первая ступень в любом сценарии, открытие и частичная деструкция углеводов (n-алканов, ароматических и ПАУ) за счёт УМ, после чего подключаются ферментативные микроорганизмы, переводя тяжёлые фракции в летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират) и H_2/CO_2 [331]. Эти промежуточные метаболиты это «валюта» электронов для последующих консументов (СРБ, СОБ косвенно через конкуренцию за доноры, метаногенов). Поэтому преобразованные тяжёлые фракции в летучие жирные

кислоты (ацетат, пропионат, бутират) и H_2 , дальше становятся субстратами для СРБ. Подобная «подготовка субстратов» является первой стадией микробной десульфуризации и обеспечивает поддержание метаболических потоков углерода и серы [343].

Таким образом, выявленные различия между нефтяными месторождениями «Каражанбас», «Бозащы» и «Кумколь» согласуются с общей закономерностью сукцессионных преобразований микробных сообществ в нефтяных системах. Согласно современным представлениям, динамика сообщества определяется доступностью акцепторов электронов, уровнем минерализации и температурным режимом. На ранних стадиях ключевую роль играют углеводородокисляющие микроорганизмы и ферментаторы, продуцирующие низкомолекулярные субстраты (ацетат, пропионат, H_2), которые формируют основу для дальнейшего метаболизма. При наличии сульфата в системе доминируют сульфатредуцирующие прокариоты (СРБ/СОБ), обеспечивающие восстановление SO_4^{2-} до H_2S , что приводит к явлениям souring, выпадению сульфидов металлов (например, FeS) и усилению процессов микробиологически индуцированной коррозии [325, 319]. Однако в условиях подачи нитрата и/или кислорода равновесие смещается в сторону сероокисляющих микроорганизмов, которые окисляют сероводород до элементарной серы или сульфата, тем самым ограничивая активность СРБ и снижая риск накопления H_2S . В низкосульфатных и высокосолёных системах ведущая роль переходит к метаногенным археям, использующим H_2/CO_2 , ацетат и метилсодержащие соединения для образования метана, что формирует альтернативный «безсерный» путь трансформации органического вещества. Такая последовательность: УМ – ферментативные – СРБ (подкисление, FeS) / СОБ (десульфуризация S^0/SO_4^{2-}) – метаногены (CH_4). И это отражает универсальную закономерность микробной сукцессии в нефтяных резервуарах [306].

На следующем этапе работы проводили выделение чистых культур бактерий. Из проб нефти на универсальной среде МПА, с помощью метода истощающего штриха выделено 12 аэробных культур бактерий (таблица 3.17). Бактериальная чистота выделенных культур определялась визуальным и микроскопическим контролем.

Таблица 3.17 – Выделенные культуры микроорганизмов

№	Образцы проб нефти месторождений	Условное название выделенных культур
1	«Каражанбас»	H1, H2, H3, H4, H5, H6, SFN1
2	«Бозащы»	E1, SFN2, SFN3
3	«Кумколь»	F1, F2

У выделенных культур были изучены морфолого-культуральные признаки (макроморфология колоний, микроморфология клеток, окраска по Граму, спорообразование) (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Морфологические и культуральные свойства микроорганизмов

№	Штамм	Микроморфология клеток	Окраска по Граму	Спорообразование	Морфология колонии
1	<i>H1</i>	Моно-, диплобактерии (палочки)	Г+	+	Форма колоний круглая, профиль плоский, край колоний гладкий, цвет белый, структура однородная, диаметр 8 мм
2	<i>H2</i>	Палочки	Г+	-	Форма круглая, блестящая, непрозрачная, поверхность бугристая, края колоний волнистый, цвет серовато-желтый, диаметр 2 мм
3	<i>H3</i>	Стрептобактерии	Г+	+	Форма колоний круглая, поверхность и края бугристые, цвет белый матовый, диаметр 2 мм
4	<i>H4</i>	Монобактерии	Г+	+	Форма не правильная ризоидная, края не правильная, цвет белый, поверхность бугристая, края блестящая, центр матовый, диаметр 10 мм
5	<i>H5</i>	Стрептобактерии	Г-	-	Форма круглая, поверхность гладкая блестящая, края ровный, цвет белый, диаметр 1мм
6	<i>H6</i>	Стрептококки	Г+	-	Форма круглая, поверхность гладкая блестящая, края ровный, цвет желтый, диаметр 1мм
7	<i>E1</i>	Моно-, дипло-стрептобактерии, тетрабактерии	Г+	+	Форма круглая, поверхность гладкая блестящая, края ровный, цвет белый, диаметр 3мм
8	<i>SFN1</i>	Стрептобактерии	Г+	+	Форма круглая с валиком по краю, цвет белый матовый, поверхность гладкая, диаметр 3мм
9	<i>SFN2</i>	Стрептобактерий	Г+	+	Форма круглая с валиком по краю, цвет белый матовый, поверхность гладкая, диаметр 4 мм
10	<i>SFN3</i>	Моно-, дипло-, тетрабактерии	Г+	+	Форма круглая с ризоидным краем, поверхность волнистый, волокнистая, цвет белый, диаметр 5мм

№	Штамм	Микроморфология клеток	Окраска по Граму	Спорообразование	Морфология колонии
11	F1	Длинные и тонкие монобактерии	Г+	+	Форма неправильная, края бугристая, поверхность волнистый, центр матовый, диаметр 8мм
12	F2	Короткие палочки, моно, диплобактерии	Г+	+	Форма круглая, блестящая, края ровный, поверхность гладкая, цвет белый, диаметр 2мм

В результате микроскопических исследований было обнаружено, что 11 культур представлены палочками (моно-, дипло-, стрептобактериями) и одна культура (Н6) – кокками; 11 культур – грамположительны и одна (Н5) – грамотрицательная, 10 культур – спорообразующие, три (Н2, Н5, Н6) – спор не образуют.

На рисунке 3.4 представлены фрагменты изучения макроморфологии колоний; микрофотографии клеток бактерий SFN1, Н2, Н5, Н1.

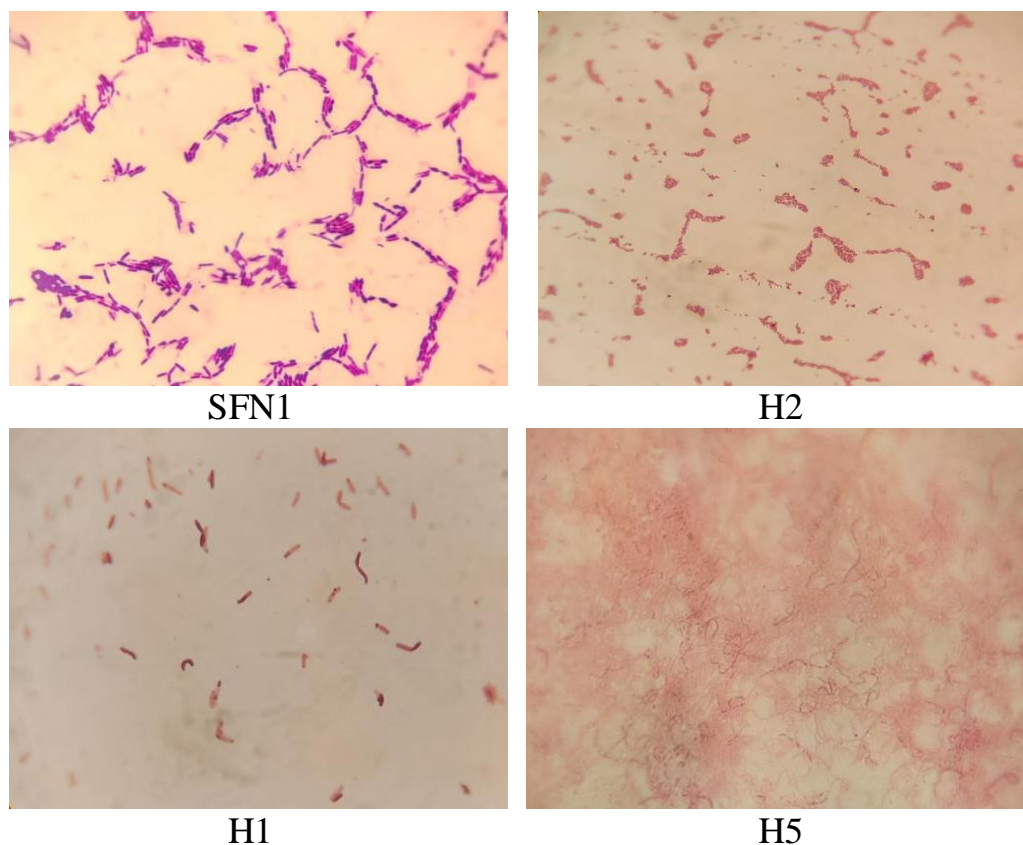


Рисунок 3.4 – Микроморфология выделенных бактериальных культур. Фотографии были сделаны при увеличении в 1000 раз

Фрагмент опыта по определению бактерий, способных к активному росту на среде с высокосернистой нефтью представлен на рисунке 3.5.

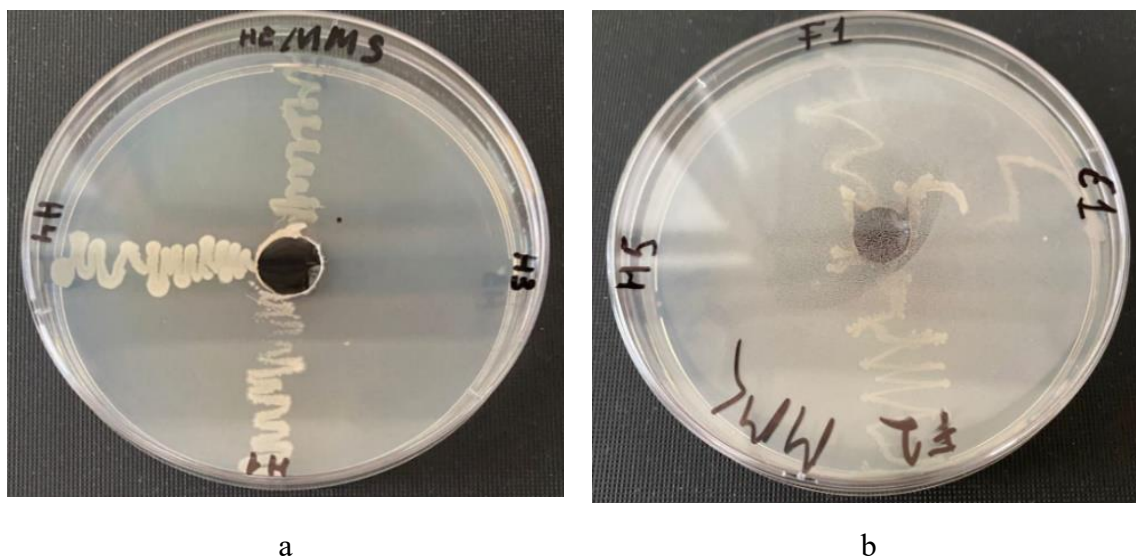


Рисунок 3.5 – Определение бактерий, способных к активному росту на среде с высокосернистой нефтью. а) штаммы (Н1, Н2, Н3, Н4); б) штаммы (Н5, F1, F2, E1)

На минеральной среде с высокосернистой нефтью был проведен первичный скрининг исследуемых 12-и микроорганизмов, где единственным источником углерода являлась сырая нефть (радиально-чашечный метод). На рисунке 3.5 представлены фотографии определения бактерий, способных к активному росту на среде с нефтью. В чашке Петри с агаризованной минеральной средой в центре находится лунка с единственным источником углерода – нефтью, далее радиально от лунок посеяны штрихом исследуемые бактерии (по четыре культуры в чашке).

Как видно на рисунке 3.5, через 48 часов культивирования на чашках наблюдается рост бактерий, которые могут потреблять углерод высокосернистой нефти: обильный рост бактерий Н1, Н2, Н3, Н4 (Рис. 3.5а), умеренный рост F1, E1, F2 (Рис. 3.5б), нет роста у культур – Н3, Н5.

В результате проведенных исследований отобраны 9 следующих культур, обладающих активным и умеренным ростом на среде с высокосернистой нефтью: *SFN1*, *SFN2*, *SFN3*, *F1*, *F2*, *E1*, *H1*, *H2*, *H4*.

3.3 Генетическая идентификация бактерий на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rRNA

Для идентификации микроорганизмов, обладающих активным и умеренным ростом на среде с высокосернистой нефтью, нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую

последовательность в программном обеспечении SeqMan (DNA Star). В результате секвенирования 16S rRNA (таблица 3.19) все исследуемые образцы (SFN1, SFN2, SFN3, F1, F2, E1, H1, H2, H4) принадлежали к родам *Bacillus* и *Microbacterium* (рисунок 3.6).

Таблица 3.19 - Результаты генетической идентификации бактериальных культур методом анализа нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA

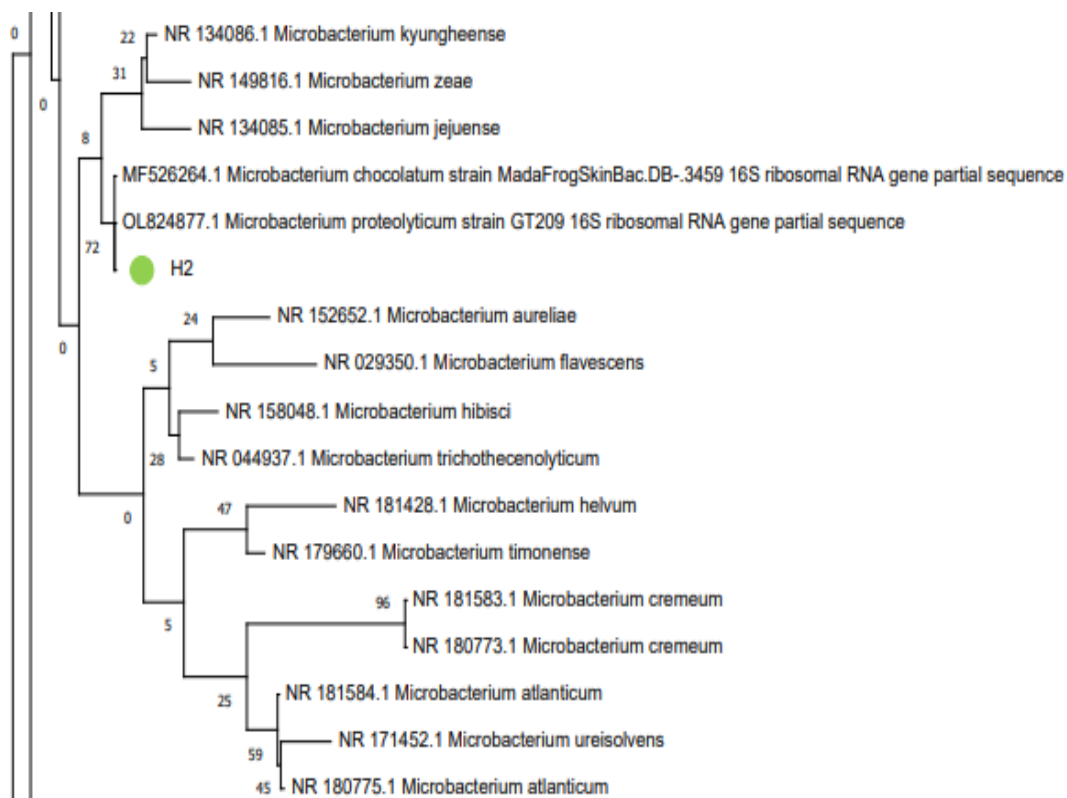
Штамм	Последовательность фрагмента 16S rRNA гена	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), алгоритм BLAST		
		Инвентарный номер GenBank (Accession number)	Название штамма	% совпадения
SFN-1	CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGA AAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGT CAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTAC TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCT CAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGG TCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTT ACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTC	OR115613.1	<i>Bacillus cereus</i>	99.85 %
		OR114675.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.85 %
		OR105049.1	<i>Bacillus paramycoides</i>	100.00 %
SFN-2	CTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACYGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGA TGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAG GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA AGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAG GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGC ACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGG TGGCGAAGG	OR115613.1	<i>Bacillus cereus</i>	99.85 %
		OR428655.1	<i>Bacillus wiedmannii</i>	99.85 %
		OR114675.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.85 %
SFN 3	CTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT AACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGA	OR115613.1	<i>Bacillus cereus</i>	100.00 %

	AAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGA CCCgcgTcgcATTAGCTAGTTGGTgAGGTAA CGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG CTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGA AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACC TTGACGGTACCTAACCGAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT AAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGA TGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT ATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC GAAGGCGAC	OR114675. 1	Bacillus thuringien sis	100. 00 %
		OR098477. 1	Bacillus paramyco ides	100. 00 %
H-1	TGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAG TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGG GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG ATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATA AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTgAGGT ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA AGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACC TTGACGGTACCTAACCGAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT AAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG	OR098486. 1	Bacillus tequilensi s	100. 00 %
		CP121266.1	Bacillus subtilis	100. 00 %
		OR058807. 1	Bacillus mojavensi s	100. 00 %
H-2	ACaCATGCaAGTcGAACGGTGAAGCCAAGCTT GCTTGGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTA ACACGTGAGCAACCTGCCCTGGACTCTGGGA TAAGCGCTGGAAACGGTGTCTAATACTGGAT ATGAGCTCTCATCGCATGGTGGGGGTTGGAA AGATTTTTTCGGTCTGGGATGGGCTCGCGGCC TATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACC AAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA ATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAG CAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG TTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGA GAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTC TGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGC CTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGG TAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGT GGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGA TG	MK854868. 1	Microbact erium sp.	100. 00 %
		MF526264. 1	Microbact erium chocolatu m	100. 00 %
		OL824877. 1	Microbact erium proteolyti cum	100. 00 %

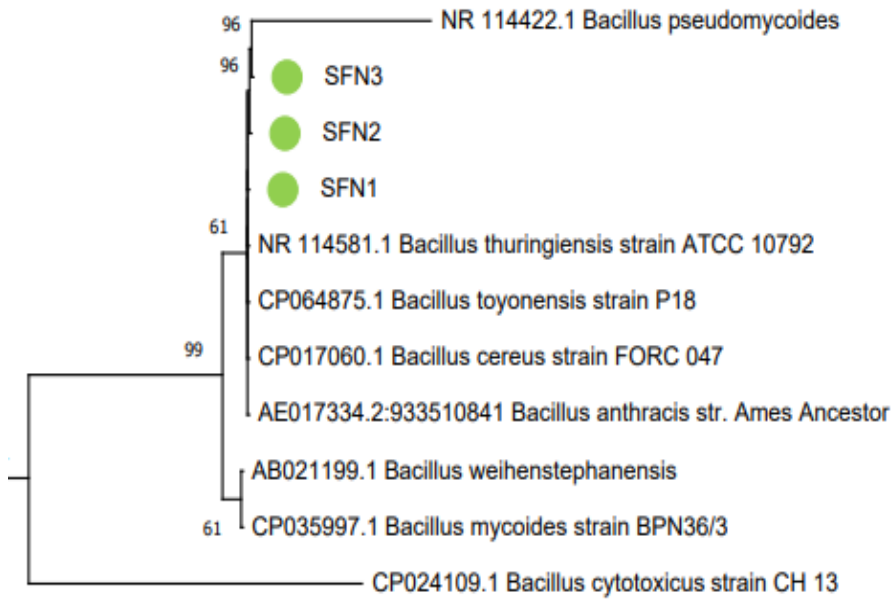
H-4	CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG AGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACT GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC GGATGGTTGTYTGAACCGCATGGTTCAGACA TAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGAT GGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG TAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCC GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA GGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCAC CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG TAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG GCG	CP127164.1	Bacillus velezensis	99.8 5 %
		OR098487. 1	Bacillus siamensis	99.8 5 %
		OR084135. 1	Bacillus amyloliqu efaciens	99.8 5 %
E-1	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCC TATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGA GCTAATACCGGATACGTTCTTTTCTCGCATGA GAGAAGATGGAAGACGGTTTACGCTGTCAC TTATAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG AACGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAGTTCT GTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAAC TGCTGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCC TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGA ACACCAGTGGC	OQ932819. 1	Peribacill us simplex	100. 00 %
		OR079438. 1	Peribacill us frigoritol erans	100. 00 %
F-1	AAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG TGGGTAACCTGCCTGTAAGTACTGGGATAAC TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTT GATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGT GGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCG CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT GGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC AAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGAC GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGGA A	MN918403. 1	Bacillus haynesii	99.8 4 %
		MT367712. 1	Bacillus paraliche niformis	99.8 4 %

F-2	CTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTA ACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGA TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT AGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAA AGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGAC CCGCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAT GGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG AACAAAGTGCAGAGAGTAACTGCTCGCACCTTG ACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA GGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATGTGGAGGAAC	OR269107. 1	Bacillus zhangzhoue nsis	100. 00 %
		OR077336. 1	Bacillus safensis	100. 00 %
		OR083425. 1	Bacillus pumilis	100. 00 %

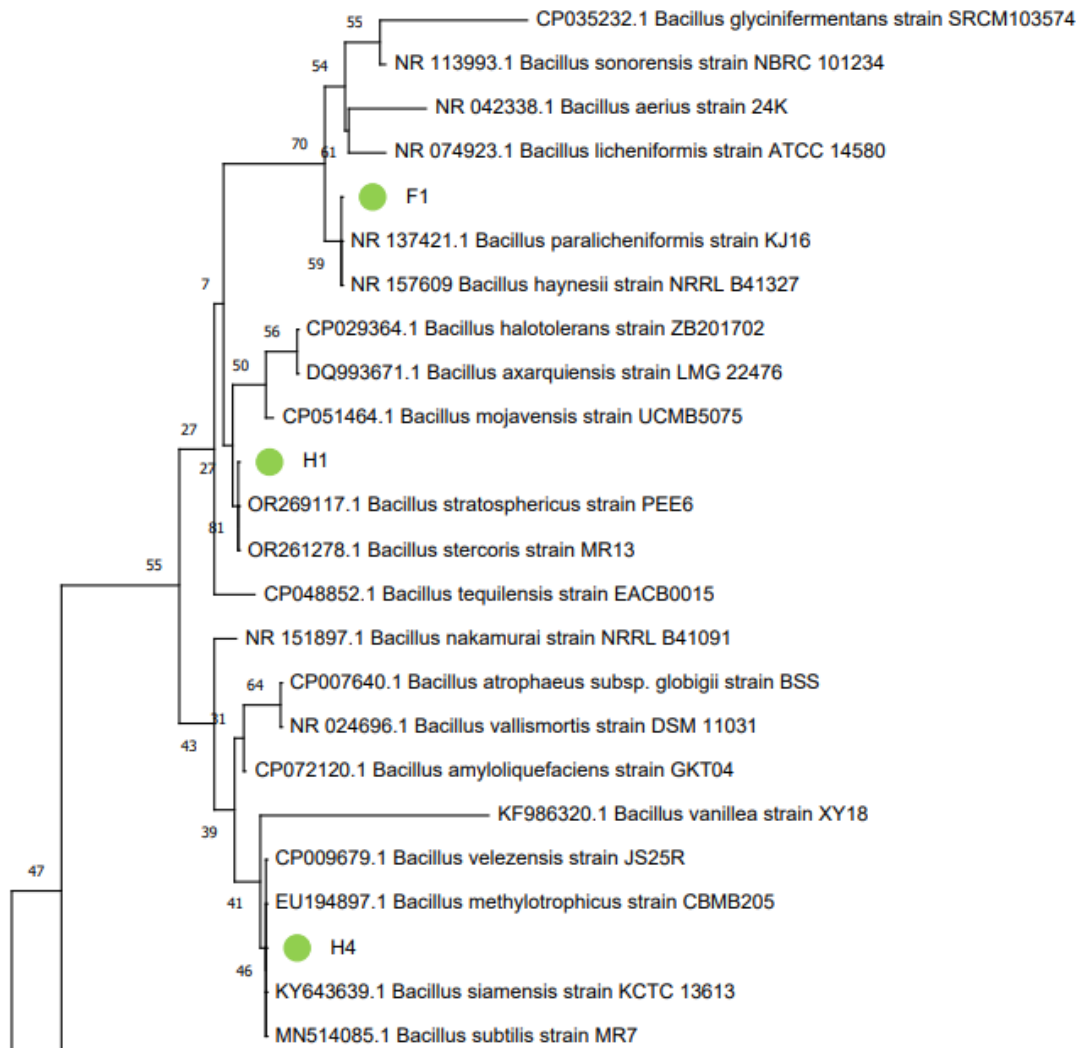
Дополнительно было построено филогенетическое дерево с нуклеотидными последовательностями *16S rRNA* гена референтных штаммов данных видов. Филогенетическое дерево было построено с использованием программного обеспечения – Mega X с применением алгоритма Muscle для выравнивания нуклеотидных последовательностей, с использованием метода присоединения ближайших соседей (Neighbor-Joining NJ). Референтные последовательности данных штаммов были использованы для последующего построения филогенетического дерева (рисунок 3.6).



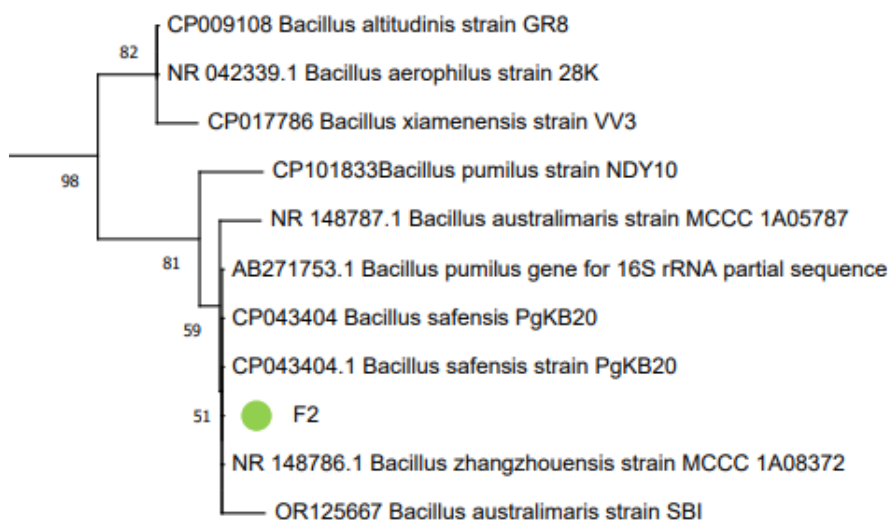
a



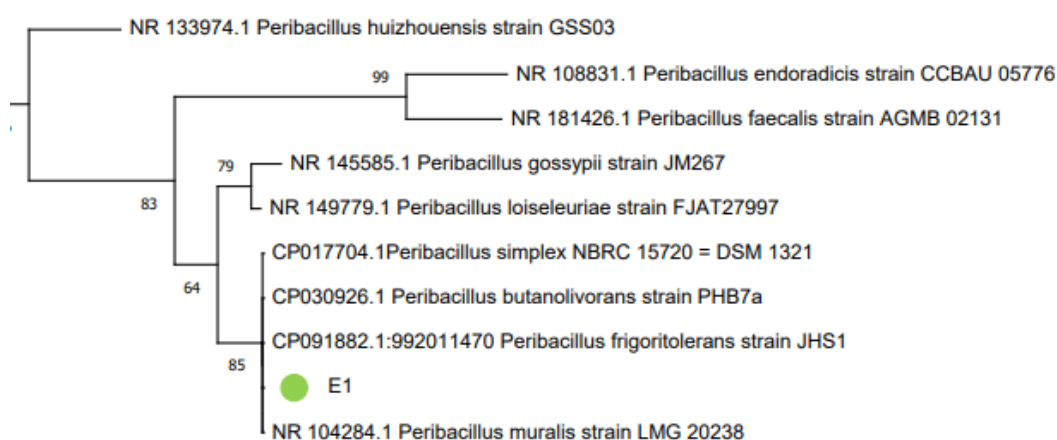
b



c



d



e

а) Штамм Н2; б) штаммы SFN-1, SFN-2, SFN-3 расположенные в одной ветви; с) штаммы Н-1, Н-4, F-1; д) штамм F2; е) штамм E-1

Рисунок 3.6 – Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа фрагмента гена 16S rRNA

В результате секвенирования 16S rRNA и на основе филогенетического дерева, построенного алгоритмом Neighbor-Joining (N-J) оказалось, что выделенные изоляты обладают идентичностью на 100 % с *Bacillus paramycoides* (SFN-1), *Bacillus thuringiensis* (SFN3), *Bacillus subtilis* (H1), *Bacillus zhangzhouensis* (F2), *Peribacillus simplex* (E-1), *Microbacterium sp.* (H2) и на 99,85 % с *Bacillus cereus* (SFN2), *Bacillus siamensis* (H4) и *Bacillus haynesii* (F1). Полученные последовательности были идентифицированы в GenBank по алгоритму BLAST и каждому присвоен Инвентарный номер GenBank (Accession number).

Таким образом, 9 культур микроорганизмов, обладающих активным и умеренным ростом на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода высокосернистую нефть, на основе микробиологических и

генетических методов идентифицированы как представители родов *Bacillus*, *Peribacillus* и *Microbacterium*, в частности 7 культур бацилл: *Bacillus paramycooides* SFN-1, *Bacillus cereus* SFN-2, *Bacillus thuringiensis* SFN-3, *Bacillus subtilis* H-1, *Bacillus siamensis* H-4, *Bacillus haynesii* F-1, *Bacillus zhangzhouensis* F-2, а также по одной культуре *Peribacillus simplex* E-1 и *Microbacterium* sp. H-2.

Для осуществления процесса нефтедобычи требуются два основных компонента: микроорганизмы, которые могут быть как экзогенными, так и аборигенными и могут повышать нефтеотдачу посредством различных механизмов, и питательная среда, содержащая азот и фосфор, которая служит источником питания для этих микроорганизмов. Микроорганизмы нефтяных пластов широко распространены и обладают значительным потенциалом как микроорганизмы, которые могут процветать в сложных условиях, преобладающих в нефтяных пластах [344, 345]. Исследования последних лет показывают, что микробные сообщества нефтяных пластов Казахстана представляют собой устойчивые консорциумы анаэробных и факультативно-анаэробных прокариот такие, как сульфатвосстанавливающие бактерии (СРБ), нитратвосстанавливающие и сероокисляющие микроорганизмы, метаногенные археи, ферментативные и синтрофы. Их баланс определяется пластовой температурой, минерализацией, наличием сульфата/нитрата вследствие заводнения, а также историей применения биоцидов. Именно эта совокупность факторов определяет, будет ли доминировать сульфатредукция с образованием H_2S , или же метаногенез и ферментация, и, как следствие, как именно будет меняться химия нефти и коррозионная обстановка [315, 346]. Для месторождения Узень, эксплуатируемого с закачкой каспийской морской воды, показано, что в исходной сульфат-свободной пластовой воде преобладают термофильные водородоокисляющие метаногены [347] рода *Methanothermococcus*, сопровождаемые термофильными ферментёрами (*Thermovirga*, *Defliviitoga*, *Thermosipho*). В зонах, куда проникают сульфатсодержащие воды, происходит смещение сообщества в пользу сульфидогенов: возрастают доли *Desulfonauticus*, а также фиксируются *Thermodesulforhabdus*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*. В приствольной зоне нагнетательных скважин отмечены денитрификаторы (*Marinobacter*, *Halomonas*, *Pelobacter*). Важная инженерная деталь: нитрат в мезофильных обогащениях узенской системы не подавлял сульфидогенез (денитрификаторы быстро восстанавливали его до N_2), тогда как в термофильных условиях нитрит (продукт денитрификации) ингибировал СРБ. Всё это подчёркивает, что эффективность нитратной стратегии контроля souring температурозависима [315].

Для Каражанбаса (мелкие глубины, 25-45 °С, высоковязкая сернистая нефть) в последние годы получены чистые культуры сульфидогенов из пластовых вод, включая *Pseudodesulfovibrio* и *Oleidesulfovibrio*. Более того, описан новый вид, *Pseudodesulfovibrio karagichevae* sp. nov., что указывает на

длительную адаптацию местных СРБ к низко-среднетемпературным и умеренно солёным условиям и подтверждает эндемичность ряда линий СРБ для Бузачинского региона [307]. В пластовых водах, вовлечённых в цикл ППД, присутствуют одновременно и сульфат, и сульфид, что создаёт условия для стабильной сульфидогенезной активности. Эти находки согласуются с более ранними метабаркодинговыми данными по Каражанбас, где в низкотемпературных горизонтах выявлялись мезофильные метаногены (*Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanotherix*), и спектр СРБ/ТРБ-бактерий, термофильные и мезофильные сульфатредуцирующие бактерии (роды *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina*, *Desulfoglaeba*, *Desulfotignum*, *Desulfocurvus*), синтрофные бактерии (род *Smithella*), а также представителей родов *Marinobacter*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Arcobacter*, *Halomonas* [314]. Кроме того, были выделены, сероокисляющие, нефтеокисляющие, углеводородокисляющие микроорганизмы [346]. Например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus erithropolis*, *Rhodococcus rubber*, *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus luteu*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus methanicus* [348]. Кроме вышеперечисленных нефтяных микроорганизмов в месторождениях Атырауской области есть и представители следующих бактериальных групп: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. В меньшем количестве встречаются представители групп *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, семейства *Micrococcaceae*, *Flexibacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Planococcaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Alteromonadaceae*, *Dietziaceae*, *Bacillaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Anaerolinaceae*, *Mycobacteriaceae* и *Peptococcaceae* [349].

И выделенные микроорганизмы, с точки зрения влияния на состав и качество нефти микробные процессы действуют разнонаправленно:

1 Анаэробная деградация углеводов (включая альтернативные пути к «классическому» фумаратному присоединению) приводит к последовательному потреблению фракций (обычно быстрее уходят n-алканы), с образованием органических кислот и газа. Это может менять распределение фракций, кислотное число и реологию, а также подготавливать субстраты для метаногенеза. Глобальный мета-анализ по нефтяным резервуарам показал существование «функционального ядра» микробиоты и одновременную чувствительность метаболизма к вмешательствам (водозащитные, химия), что объясняет вариативность нефте-биотрансформаций между участками одного месторождения [327].

2 Сульфатредукция ведёт к образованию H_2S , который растворяется в воде и нефти, придаёт сырью «кислый» характер, увеличивает коррозионную агрессивность и ухудшает товарные свойства; термофильные и умеренно-термофильные СРБ активны вплоть до ~ 85 °С.

3 СОМ участвуют в окислении восстановленных соединений серы (H_2S , тиосульфаты, элементарная сера), что снижает souring и концентрацию токсичных продуктов. Они способны конкурировать с

сульфатредуцирующими бактериями за субстраты и таким образом уравновешивать биогеохимический цикл серы [350].

Таким образом, для нефтяных месторождений Казахстана вышеперечисленные данные убедительно демонстрируют ключевую роль микробных сообществ в формировании химической и технологической специфики добываемого сырья. Наибольшее значение имеют процессы сульфатредукции, приводящие к образованию сероводорода и обострению коррозионной ситуации; параллельно в условиях дефицита сульфата возрастает вклад метаногенеза и термофильной ферментации, что изменяет газовый баланс и общее качество пластовых флюидов, сероокисляющих микроорганизмов, которые способны частично уравновешивать действие сульфатредуцирующих форм, окисляя восстановленные соединения серы и снижая степень подкисления нефти. Важно отметить, что структура и активность сообществ оказываются крайне чувствительными к инженерным воздействиям: состав и минерализация закачиваемой воды, присутствие нитратов или даже незначительных количеств кислорода способны заметно смещать метаболические траектории и, соответственно, определять уровень биогенного воздействия на нефть. В этих условиях становится очевидным, что микробные процессы могут не только осложнять разработку за счёт souring и коррозии, но и быть целенаправленно использованы для управления реологическими и фазовыми свойствами нефти в рамках технологий микробного увеличения нефтеотдачи (MEOR). Совокупность выявленных закономерностей, опирающаяся на результаты как международных исследований, так и отечественных работ последних лет (2020-2025 гг.), формирует надежную основу для планирования программ мониторинга и внедрения биоинженерных стратегий на Каражанбасе, Узене и ряде других месторождений Западного Казахстана [307, 344, 348].

Однако, следует отметить, что данные культуры были выделены с нефтезагрязненных почв месторождений, тогда как в нашем случае, культуры выделены из подземных экстремальных нефтепластов.

На следующем этапе были изучены, на основе анализа научной литературы, эколого-биологические характеристики выделенных и идентифицированных родов и видов микроорганизмов.

3.3.1 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий рода *Bacillus*

Бактерии рода *Bacillus* являются членами семейства *Bacillaceae* и характеризуется разнообразием видов, для которых типичны аэробный тип роста, формирование покоящихся эндоспор и образование спор [351]. Род *Bacillus* – это крупное таксономическое объединение, включающий 435 видов и 12 подвидов (с подтвержденной публикацией и правильной номенклатурой), которые сгруппированы на основе анализа 16S рРНК, а также других генов и белковых последовательностей в две отдельные клады, организованные в

филогенетические деревья, которые филогенетически не связаны друг с другом [352]. Большинство из которых относятся к сапрофитам, широко распространённым в природных экосистемах – от почвы и воды до растений и животных. Для рода характерно значительное разнообразие штаммов и видов [353]. Представители *Bacillus* представляют собой грамположительные либо грамвариабельные палочковидные бактерии, способные к спорообразованию. В основном они каталазоположительные и нередко обладают подвижностью благодаря перитрихальным жгутикам [354]. Большинство видов – мезофильные микроорганизмы, однако встречаются также психротрофные и термофильные формы. Род включает как облигатно аэробные, так и факультативно-анаэробные бактерии. Вегетативные клетки имеют размеры от 0,5×1,2 мкм до 2,5×10 мкм [353]. Эндоспоры могут формироваться в центральной, парацентральной, субтерминальной либо терминальной позиции. Высокая устойчивость спор к неблагоприятным воздействиям обеспечивает выживание и широкое распространение представителей рода *Bacillus* [355]. Спора обладает сложной структурой, которая отличается от вегетативной клетки. Синтез различных слоев, составляющих спору, является постепенным процессом, который начинается вскоре после стадии септы. Он состоит из тонкого внешнего слоя гликопротеиновой природы, называемого экзоспорием, присутствующим только у некоторых видов [356]. Еще одной характеристикой спор является то, что их рН на единицу ниже, чем у вегетативной клетки, и что они содержат специфические белки, называемые малыми кислоторастворимыми споровыми белками (МКСБ). МКСБ связываются с ДНК, защищая ее от радиации, тепла и высыхания, и служат источником углерода и энергии для клетки во время прорастания [352, 356].

С точки зрения экологии обитания, представители рода *Bacillus* встречаются повсеместно и могут быть выделены из самых разнообразных субстратов, при этом наибольшая частота обнаружения связана с почвой и растениями. Эти микроорганизмы отличаются относительной неприхотливостью к источникам питания: рост наблюдается как на питательном агаре, так и на пептонных средах. Оптимальные условия развития соответствуют нейтральным значениям рН, однако некоторые виды способны размножаться при рН около 9, тогда как другие демонстрируют устойчивость к кислой среде до рН 2 [357]. Температурный диапазон роста составляет от 10 до 45 °С, при этом наибольшая активность наблюдается при 30-40 °С [358]. Отдельные представители рода способны расти при концентрациях NaCl свыше 7 % (мас. /об.). Колонии отличаются морфологической вариабельностью, а при определённых условиях культивирования отдельные виды продуцируют пигменты. *Bacillus* spp. относятся к хемоорганотрофным микроорганизмам, использующим в качестве субстратов аминокислоты, органические кислоты и сахара. Метаболизм осуществляется путём аэробного либо анаэробного дыхания, а также посредством ферментации, что определяется как видовой принадлежностью, так и параметрами окружающей среды [357, 352].

Представители рода демонстрируют широкий диапазон составов оснований ДНК, а также основных аминокислотных составов клеточной стенки. Проведенные исследования, основанные на сравнительном анализе гена *16S rРНК*, фенотипических характеристиках, мультилокусном типировании и изучении полиморфизма амплифицированных фрагментов, позволили выделить пять-шесть филогенетически обособленных кластеров внутри группы. Известны своим низким содержанием G (гуанин) + C (цитозин) [359]. Несмотря на высокую степень генетической гомологии между представителями рода *Bacillus*, оптимальным методом их таксономической идентификации остается полное геномное секвенирование [360]. Однако данный подход не всегда является практически реализуемым. В случаях, когда используется секвенирование гена *rrs*, кодирующего 16S рРНК, последующий анализ не всегда обеспечивает достаточную точность и надёжность в определении вида. Показано, что у 93,93 % представителей рода *Bacillus* присутствует несколько копий гена 16S рРНК, причём 55,32 % аллелей оказываются идентичными аналогам у других видов, что существенно ограничивает возможности данного маркера для точной идентификации [361, 360].

В результате исследований из нефти были выделены следующие виды бактерий рода *Bacillus*: *Bacillus paramycoides* (SFN-1), *Bacillus cereus* (SFN-2), *Bacillus thuringiensis* (SFN-3), *Bacillus subtilis* (H-1), *Bacillus siamensis* (H-4), *Bacillus haynesii* (F-1), *Bacillus zhangzhouensis* (F-2).

3.3.2 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus paramycoides* (SFN-1)

Bacillus paramycoides относится к группе *Bacillus cereus*, является ценным микробом, способным эффективно разлагать органические вещества и устранять загрязняющие вещества, а также обладает превосходными восстановительными способностями [362]. Клетки грамположительные, палочковидные, длиной 1,8-2,2 мкм и шириной 0,8-1,2 мкм, типично образуют круглые колонии диаметром 2-3 мм; характерна каталаза- и оксидаза-активность [363]. Представители вида относятся к факультативно-анаэробным хемоорганотрофам. Их рост возможен в температурном диапазоне от 15 до 39 °С, при оптимуме около 30 °С. Диапазон переносимых значений рН составляет 5-9, наиболее благоприятным является нейтральный уровень (около 7). Микроорганизмы способны развиваться в присутствии до 5 % NaCl (w/v), при этом оптимальные условия наблюдаются при концентрации соли около 0,5 %. Клетки характеризуются каталазоположительной реакцией, гидролизуют казеин и продуцируют ацетоин, однако не проявляют активности аргинин-дигидролазы, а также декарбоксилаз лизина, орнитина и ряда других ферментов [363]. У штамма размер генома составляет приблизительно 5,34 Мб при среднем содержании GC 35,2 %. В геноме идентифицировано 5173 кодирующих последовательности, 8 генов рРНК и 83 гена тРНК. Анализ

показателей средней идентичности нуклеотидов подтвердил его принадлежность к виду, показав сходство на уровне 97,8-98,2 %. Хотя конкретные данные о наличии плазмид или фаговых островков у этого штамма ограничены. В геноме выявлен кластер (*phaA*, *phaP*, *phaQ*, *phaR*, *phaV*, *phaC*), ответственный за синтез поли(3НВ) и сополимера Р(3НВ-со-3НV). Синтаза *PhaC/PhaR* относится к ферментам класса IV и проявляет специфичность к 3-гидроксиацил-КоА, формируя полиэфиры короткой цепи. Также обнаружены ацетаткиназа и фосфатацетилтрансфераза, обеспечивающие образование пропионил-КоА из пропионата, что делает возможной полимеризацию 3-(R)-гидроксивалерил-КоА в состав Р(3НВ-со-3НV) [364, 365].

В природных и техногенных экосистемах *B. paramycoides* может играть роль в биогеохимических трансформациях, особенно в цикле углерода, поскольку способен метаболизировать биомассу и продуцировать водород, что свидетельствует об участии в энергетических потоках [366]. Высокая продукция биосурфактантов штаммами *B. paramycoides* указывает на их потенциал в эмульгировании гидрофобных субстратов, таких как нефтяные углеводороды, что согласуется с ролью подобных бактерий в биоремедиации [367]. В условиях нефтяной среды штаммы демонстрируют выраженные метаболические преимущества: синтезируемые ими биосурфактанты способствуют эффективному эмульгированию гидрофобных углеводородов, что облегчает их адсорбцию клетками и дальнейшую биодеградацию [368].

3.3.3 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus cereus* (SFN-2)

Bacillus cereus факультативно анаэробная, токсинообразующая [369]. Относится к типу *Bacillota* (*Firmicutes*), классу *Bacilli*, порядку *Bacillales* и семейству *Bacillaceae*, представляя собой грамположительный, спорообразующий, подвижный микроорганизм, входящий в состав так называемой *B. cereus group*, объединяющей филогенетически близкие виды, включая *B. anthracis* и *B. thuringiensis* [370, 371]. Подвижные палочки с перитрихальными жгутиками, образующие овальные эндоспоры, на питательных средах нередко дают β-гемолиз и лецитиназную активность (фосфолипаза С), что используется в диагностике [372]. Факультативный анаэроб-хемоорганотроф с широким температурным диапазоном роста примерно от 8 до 50 °С (оптимум у многих штаммов около 30-42 °С). В составе комплекса есть психротолерантные линии, способные расти при холодильных температурах, что критично для безопасности пищевых продуктов [373, 374].

Бактерия существует как спорообразующая и вегетативная клетка в природе и как вегетативная клетка при колонизации организма человека. Трансмиссионная электронная микроскопия вегетативной клетки выявляет цитоплазматическую мембрану, окружающую клеточное содержимое. Кроме того, некоторые штаммы содержат внешний кристаллический поверхностный белок (слой S) [375]. Сердцевина споры окружена внутренней мембраной,

кортексом и внутренней и внешней оболочками. Хотя спора *B. cereus* лишена метаболической активности, она устойчива к экстремальным условиям окружающей среды, включая нагревание, замораживание, высушивание и радиацию, и может рассматриваться как инфекционный агент для этой бактерии [376]. *B. cereus* широко распространена в окружающей среде, а именно в почве, где споры сохраняются в неблагоприятных условиях. Может расти в широком диапазоне температур (8-55 °С), но плохо переносит низкие значения рН (минимум 5-6) или содержание воды (минимальная активность воды 0,95). Эндоспоры устойчивы к нагреванию, радиации, дезинфицирующим средствам и высушиванию, а их адгезивные свойства облегчают их прикрепление к технологическому оборудованию и устойчивость к процедурам очистки [241].

Геномы видов группы *B. cereus* высококонсервативны, с размерами от 5,2 до 5,9 Мб. Генетически *B. cereus* имеет мезогеном с хромосомой порядка ~5,4 Мб и GC-содержанием ~35 %. Выявлено 13 *trn*-оперонов, многочисленные профаги и обширный регулон плейотропного регулятора *PtcR*, контролирующего десятки генов вирулентности и адаптации [370, 377]. Вариабельность признаков во многом связана с крупными плазмидами: у «эметических» линий циркулирует мегаплазида *pCER270*, несущая кластер *ses* не-рибосомальной пептидсинтетазы для биосинтеза церулида, *pCER270* относится к семейству *pXO1-like* плазмид, близкородственных токсин-плазмиде *B. anthracis*, и может влиять на споруляцию и устойчивость спор [378].

В углеводородсодержащих средах *B. cereus* демонстрирует прикладно важные функции: отдельные штаммы эффективно окисляют нефть и её фракции [379]. В десульфуризации необработанного керосина с общим содержанием серы 2333 ppmw, произведенного иранской нефтеперерабатывающей компанией (Исфаханский НПЗ), для изучения возможностей этого нового микроорганизма. Было установлено, что около 33 % общего содержания серы в необработанном керосине может быть удалено за 72 часа [380].

3.3.4 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus thuringiensis* (SFN-3)

Bacillus thuringiensis (Bt) относится к типу *Bacillota* (*Firmicutes*), классу *Bacilli*, порядку *Bacillales* и семейству *Bacillaceae*, входя в комплекс *B. cereus sensu lato*, который также включает *B. cereus* и *B. anthracis*, различия между ними определяются прежде всего плазмидным набором и регуляторными системами [381]. Палочковидные, грамположительные спорообразующие бактерии с содержанием G+C в диапазоне от 32 до 69 % [382]. Клетки имеют размеры от 0,5×1,2 мкм до 2,5×10 мкм [353]. Оптимальные условия развития соответствуют нейтральным значениям рН, однако некоторые виды способны размножаться при рН около 9, тогда как другие демонстрируют устойчивость

к кислой среде до pH 2 [357]. Температурный диапазон роста составляет от 10 до 45 °С, при этом наибольшая активность наблюдается при 30-40 °С [358].

Геном *Bacillus thuringiensis* у разных штаммов демонстрирует значительное разнообразие. У референсного изолята размер хромосомы составляет около 5,66 Мб при среднем GC-содержании ~36,2 %, в составе которого выявлено порядка 5714 кодирующих последовательностей, а также гены rRNA и tRNA. Кроме того, для генома характерно наличие большого числа мобильных элементов, интегрированных профагов, транспозонов и островков патогенности, которые вносят вклад в генетическую вариабельность и способность к быстрой адаптации [383, 384, 385].

Кроме того, эти микроорганизмы известны своим способностью продуцировать кристаллические белки (Cry). Считается, что белок Cry токсичен для многих насекомых, и именно поэтому Bt используется в качестве микробного инсектицида для повышения устойчивости растений путем генетической модификации. Когда личинки насекомого проглатывают белковый кристалл, пищеварительные ферменты, присутствующие в кишечнике, активируют токсин и приводят к образованию пор в клеточной мембране кишечника, за чем следует паралич кишечника и в конечном итоге гибель личинок [386, 387]. Он активно участвует в минерализации органического вещества (белков, углеводов) благодаря внеклеточным ферментам и играет роль в круговороте углерода и азота. Особенно заметна его роль как природного энтомопатогена: при споруляции Bt синтезирует δ-эндотоксины (Cry и Cyt), формирующие характерные параспоровые кристаллы, которые разрушают эпителий кишечника насекомых [387]. А также бактерий *Bacillus thuringiensis* в процессе биодеградациии лёгкой сырой нефти показало высокую способность. Эти бактерии способны разлагать сырую нефть через прозрачный слой эмульсии. Они обладают высокой эффективностью в разложении углеводородных соединений на 80 % [388].

3.3.5 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus subtilis* (Н-1)

Bacillus subtilis представляет собой грамположительный аэроб с палочковидной морфологией клеток, обычно имеющих длину 2-6 мкм и диаметр менее 1 мкм. Оптимум роста находится при 30-35 °С, что позволяет клеткам удваиваться примерно за 20 минут. При определённых условиях роста они способны формировать удлинённые цепочки, соединённые остатками нерасщеплённых перегородок [389]. В условиях дефицита питательных веществ клетки вступают в программу сложной дифференцировки, завершающейся образованием устойчивых эндоспор, которые освобождаются после лизиса материнской клетки. Вегетативные формы подвижны за счёт жгутиков и обладают способностью к формированию биоплёнок и многоклеточных структур типа «плодовых тел», содержащих споры [390]. Аэроб/факультативный анаэроб-хемоорганотроф: в отсутствие O₂ способен к

нитратному дыханию/ферментации, что подтверждено классическими и современными работами [391]. Оптимальная температура роста для многих лабораторных штаммов составляет ~30-35 °С, клетки обычно 2-6 мкм длиной и < 1 мкм в диаметре [389]. Имеет толерантность к солёности и рН варьирует по штаммам: описаны как умеренные, так и выраженно гало-толерантные линии (в т.ч. из ризосферы), что подтверждено как контролируруемыми «growth/no-growth» картами по температуре-рН- a_w [392].

Штамм *Bacillus subtilis*, полученный ещё в 1950-е годы и характеризующийся триптофановой ауксотрофией, является одним из наиболее изученных бактериальных организмов. Он вошёл в число первых прокариот, для которых была получена полная геномная последовательность: размер хромосомы составляет около 4,2 Мб и включает приблизительно 4100 белок-кодирующих генов [389]. В результате глобальных проектов по определению жизненно необходимых генов было показано, что для роста в стандартных условиях LB при 37 °С требуется 257 генов. Сравнительный анализ 36 полных геномов различных изолятов *B. subtilis* позволил реконструировать «пангеном», насчитывающий примерно 6250 генов, из которых около 2500 составляют «основной геном» консервативный набор, разделяемый всеми штаммами [393]. Важной особенностью генома являются многочисленные кластеры, связанные с образованием эндоспор (около 300 генов), а также наличие профагов и их реликтов. Широкий набор регуляторных генов обеспечивают ему высокую выживаемость и конкурентоспособность [394].

Для повышения нефтеотдачи одним из распространённых подходов является закачка экзогенных микроорганизмов в пласт. Штамм *Bacillus subtilis*, продуцирующий циклические липопептидные биосурфактанты используется для снижения поверхностное натяжение культуральной жидкости с 68 до 25 мН/м и межфазное натяжение вода/нефть с 25,6 до 4,6 мН/м. В опытах по вытеснению нефти закачка ферментационного бульона при температуре 40 °С увеличила нефтеотдачу на 32,4 % [395]. Кроме того, микроорганизмы были протестированы на конститутивную продукцию ферментов и другие маркеры биоремедиации на синтетических и промышленных сточных водах пищевой отрасли. Установлено, что микроорганизм проявил высокий потенциал для разложения жиров, масел, смазочных материалов и снижения запахов [396]. Что касается десульфуризации, у умеренно термофильного штамма *B. subtilis* продемонстрирована биодесульфуризация дибензотиофена (ДБТ) при 50 °С через селективное расщепление C-S-связей [397].

3.3.6 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus siamensis* (Н-4)

Bacillus siamensis – грамположительная спорообразующая палочковидная бактерия, входящая в *Bacillus amyloliquefaciens* комплекс и

проявляющая заметную эндофитную и ризосферную активность [398]. Этот вид обнаружен в различных экологических нишах, включая ризосферу, растениз, и морские отложения, что подчёркивает его экологическую универсальность и адаптивность. Колонии бывают скользкими, полупрозрачными, выпуклыми, гладкими и бледно-желтыми на агаре LB через 12 часов при 37 °С. Под световым микроскопом выглядит палочковидным и грамположительным. Под СЭМ палочковидные клетки имеют средний размер 3,22×0,72 мкм и окружены внеклеточным матриксом [399]. Физиологически *Bacillus siamensis* представляет собой аэробный либо факультативно-анаэробный хемоорганотроф, способный переносить стрессовые условия, включая водные и экстремальные среды. Он продуцирует широкий спектр биоактивных ферментов, таких как протеазы и антимикробные пептиды, а отдельные штаммы синтезируют серратиопептидазу, обладающую антибактериальными и противовоспалительными эффектами [400]. Оптимальные условия развития соответствуют нейтральным значениям pH, однако некоторые виды способны размножаться при pH около 9, тогда как другие демонстрируют устойчивость к кислой среде до pH 2 [357]. Температурный диапазон роста составляет от 10 до 45 °С, при этом наибольшая активность наблюдается при 30-40 °С [358].

Геном штамма составляет около 3,868 Мб и содержит 3 594 белок-кодирующих гена. В нём идентифицировано семь кластеров вторичных метаболитов с подтверждённой антимикробной активностью, а также три кластера, потенциально кодирующие новые соединения [401]. Особый интерес представляют гены, связанные с биосинтезом липопептидов (fengycin, surfactin, bacillomycin D), сидерофора bacillibactin, а также поликетидных и гибридных PKS/NRPS кластеров и гена, регулирующего формирование биоплёнки. Совокупность этих элементов объясняет антагонистические, фитостимулирующие и биоконтрольные свойства штамма [402].

В естественных экосистемах *B. siamensis* способствует росту растений, биоконтролю патогенов и улучшению структуры почвы. Он продуцирует внеклеточные ферменты (протеазы, целлюлазы), растительные фитогормоны (IAA) и способен к колонизации корней и образованию биоплёнок, что усиливает его роль в круговороте веществ и устойчивых агроэкосистемах [401]. В нефтяной промышленности штамм показал способность к синтезу биосурфактанта, который снижал поверхностное натяжение ферментационного бульона на 38,6 % по сравнению с контролем. Биосурфактант формировал стабильные эмульсии с n-гексаном, нефтью и легкой нефтью и сохранял активность при широком диапазоне температур (20-100 °С), pH (3,0-13,0) и солёности (0-30 % NaCl). При обработке тяжёлой нефти происходило перераспределение фракций: уменьшалось содержание насыщенных углеводородов и асфальтенов при одновременном увеличении ароматических компонентов и смол; кроме того, возрастала концентрация отдельных n-алканов [403].

3.3.7 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus haynesii* (F-1)

Микроорганизм представляет собой грамположительные, факультативно-анаэробные, подвижные палочки с эндоспорами, размерами 0,6-0,9×1,8-2,5 мкм. Эндоспоры эллипсоидальные, располагаются центрально или парацентрально, спорангии не увеличены. Формируют кремово-белые, слизистые, полупрозрачные колонии диаметром 3-4 мм при 37 °С. От близких видов отличается утилизацией стахиозы, раффинозы, мелибиозы и D-галактуроновой кислоты. Допустимый диапазон условий: рН 5,5-10, температура 15-60 °С, до 12 % NaCl. Оптимум роста при 37 °С и рН 7,0. Клетки каталазоположительные, но оксидазоотрицательные [404, 405]. Кроме типовых сухопутных источников, штаммы *B. haynesii* успешно выделены из экстремальных условий, включая термальные источники Анд, где они продуцируют экзополисахариды, высокоаморфные биополимеры с антиоксидантной и эмульгирующей активностью [406]. Геномные данные по *B. haynesii* скудны: большая часть информации сосредоточена на описании метаболитов, поэтому геномные особенности пока не раскрыты. Преобладающими клеточными жирными кислотами это антеизо-С15:0 и изо-С15:0, а пептидогликан из клеточных стенок содержал мезо-диаминопимелиновую кислоту. Содержание G+C ДНК составляет 45,7 и 44,3 моль %. Кроме того, имеет уникальный паттерн использования углерода, который отличал его от ближайших филогенетических соседей [404].

В природных экосистемах вид проявляет адаптивность к экстремальным факторам активность защищает от термического и рН-стресса, что способствует выживанию в полевых и промышленных средах. В агро- и технических экосистемах *B. haynesii* демонстрирует антагонистическую активность: штаммы способны продуцировать биосурфактанты и проявляют антибактериальную активность против, например, *Staphylococcus aureus*, при этом не имея устойчивости к стандартным антибиотикам [407].

3.3.8 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Bacillus zhangzhouensis* (F-2)

Клетки *Bacillus zhangzhouensis* представляют собой грамположительные, облигатно аэробные палочки размером 0,5-0,6×1,8-2,0 мкм, подвижные благодаря субполярным жгутикам. На среде LB после 48 часов инкубации при 32 °С формируются круглые кремово-белые непрозрачные колонии диаметром 2-3 мм. В клетках выявляются центрально расположенные эллипсоидные эндоспоры. Реакции на каталазу и оксидазу положительные. Рост возможен в интервале температур 8-45 °С (оптимальная 30-37 °С), рН 5-11 (оптимальный 6-9) и при концентрации NaCl 0-12 % (оптимум 1-3 %) [250]. На основании последовательностей генома

содержание ДНК G+C штамма составило 41,4 мол. %, что близко к значениям для четырех референтных штаммов (41,3-41,7 мол. %).

B. zhangzhouensis был впервые выделен из нефтесодержащей среды, как побочный продукт нефтедобычи, где показал способность к окислению марганца. В этом контексте наблюдался триазильный рост и интенсивное образование MnOx при концентрациях Mn 0,5-1,0 г/л, тогда как концентрации >2 г/л тормозили рост. Это первый случай фиксации *B. zhangzhouensis* как бактерии, способной окислять Mn в условиях нефтяного конгломерата [408].

3.3.9 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Peribacillus simplex* (E-1)

Род *Peribacillus*, относящийся к семейству *Bacillaceae*, включает грамположительные палочковидные бактерии, способные к образованию эндоспор. Ранее эти микроорганизмы классифицировались в составе рода *Bacillus* как аэробные или факультативно-анаэробные формы, однако в 2020 году на основе филогеномных данных и сравнительного геномного анализа была проведена их таксономическая перегруппировка. В результате, с опорой на специфические молекулярные маркеры, они были выделены в отдельный монофилогенетический род *Peribacillus*, который в настоящее время объединяет 21 вид. Типовым видом рода считается *Peribacillus simplex* [409, 410, 411]. Диапазон роста варьирует от 4 до 45 °C (оптимум 25-30 °C) и pH 5,5-9,0. Толерантен к солёности до 5-6 % NaCl. Каталазо- и оксидазоположителен. Может использовать широкий спектр органических субстратов (сахара, аминокислоты, органические кислоты), что отражает его экологическую универсальность [412]. Штаммы *P. simplex* синтезируют ферменты и антимикотические вещества, поддерживающие их биоконтрольные свойства. Одновременно они были обнаружены среди клинических изолятов, где показали устойчивость к пенициллину и вирулентные признаки – биоплёнообразование и протеазную активность, что указывает на возможное клиническое значение [413].

Геном штамма *Peribacillus simplex* имеет 659 201 прочтение общей длиной ~768 млн нуклеотидов и средним размером CDS 845 п.н., что обеспечивает покрытие 582,6× и N50 = 8866 п.н. А также имеет плазмидную последовательность длиной 5963 п.н. (GC 31,9 %), 5341 ген, кодирующий белки, 83 гена тРНК и 39 генов рРНК. Функциональный анализ показал наличие генов, связанных с транспортом и метаболизмом аминокислот, неорганических ионов, а также с процессами получения и преобразования энергии [414].

При внесении в почву или на растения такие микроорганизмы способны оказывать ряд положительных эффектов, включая:

- функционирование в качестве биопестицидов;
- стимуляцию роста растений;

– улучшение свойств почвы за счёт процессов биоремедиации и биоадсорбции.

Использование бактериальных инокулянтов повышает агрономическую эффективность, снижает производственные затраты и нагрузку на окружающую среду, а также позволяет частично заменить химические удобрения и пестициды [411]. В сфере биоремедиации *Peribacillus* способен эффективно снижать концентрации загрязнителей, включая различные тяжёлые металлы [415], а также низкомолекулярные полициклические ароматические углеводороды. Кроме того, у представителей этого рода описана способность к биоадсорбции и биотрансформации органических токсикантов, включая нефтяные углеводороды, пестициды и фенольные соединения. Эти механизмы реализуются за счёт продукции экзополисахаридов, биосурфактантов и ферментов окислительно-восстановительного метаболизма, что делает бактерию перспективным агентом для очистки как почвенных, так и водных экосистем [416].

3.3.10 Эколого-биологическая характеристика изолированных бактерий *Microbacterium sp.* (Н-2)

Род *Microbacterium* принадлежит семейству *Microbacteriaceae* (тип *Actinobacteria*), включает более 90 признанных видов, выделенных из разнообразных экосистем: почв, вод, осадков, а также человеческих микроэкспрессий и промышленных сред. Эти бактерии характеризуются высоким содержанием Г-Ц [417]. Грамположительные, имеют неподвижных палочек (*Actinobacteria, Microbacteriaceae*), обитающий в разнообразных средах: от пустынь и болот до загрязнённых почв [418]. Термоустойчивые, неспорообразующие палочки [419], устойчивы к кислоте, аэробные и слабо анаэробные, в основном подвергаются респираторному метаболизму с эпизодической слабой ферментацией. Их потребности в питании сложны [420]. Подходящая температура для роста составляет от 25 до 37 °С, а оптимальная температура 30 °С. Активный рост показывает при pH 6,0-8,0, а оптимальный pH составляет 7,0. Как в кислой, так и в щелочной среде рост была ниже, чем в нейтральной среде [418]. Пангеном *Microbacterium* включает небольшой «ядро» (~331 семейство генов), однако отличается высокой генетической и функциональной вариативностью. Выявлен целый набор кластеров вторичных метаболитов: терпенов, поликетидных синтаз (PKS), синтаз не-рибосомных пептидов (NRPS), включая пути синтеза сидерофоров. Изолятам, обнаруженным в местах с тяжёлыми металлами, присуща повышенная устойчивость благодаря наличию генов регуляции металлов [417].

Некоторые штаммы *Microbacterium* способны выживать в средах, загрязнённых тяжёлыми металлами, восстанавливать определенные металлы, такие как шестивалентный хром, и изменять подвижность тяжёлых металлов в загрязнённых почвах [421]. Выделенные из загрязнённого ПАУ участка штаммы *Microbacterium* используются для биодеградациии нефти. Бактерий

метаболизируют ароматические углеводороды с помощью модифицированных путей орто -расщепления, а структура их клеточной стенки также способствует деградации высокомолекулярных ПАУ [422].

Дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния тяжелого металла на активность выделенных микроорганизмов и определение микробного обессеривания сырой высокосернистой нефти.

3.4 Влияние тяжелых металлов на активность выделенных микроорганизмов

Коррозии подвергаются не только трубы из сплавов железа, но и иные конструкции из других сплавов, а также бетонные конструкции. Показано, что к коррозии в присутствии сульфатредукторов устойчивы олово, цинк, свинец (возможно, ввиду их токсичности). Также решение ряда экологических проблем зависит не только от способности ряда микроорганизмов осажать или аккумулировать тяжелые металлы, но и от исследования токсического действия последних на микроорганизмы.

В составе нефти и нефтяных остатков содержатся токсичные тяжелые металлы такие, как Cr(VI), Zn(II) и Fe(III) [423].

Тяжелые металлы (ТМ) – это группа химических элементов, плотность которых превышает 5 г/см³. Из 90 природных элементов 53 относятся именно к этой категории. Интересно, что их свойства неоднозначны: одни из них при определённых физиологических условиях необходимы живым организмам (например, как микроэлементы), тогда как другие проявляют токсическое действие и представляют серьёзную угрозу для экологии [424]. Сам термин «тяжелые металлы» характеризуются тем, что имеют высокий явный вес, на первый взгляд кажется исключительно простым, тяжелый металл с высоким удельным весом [425]. Присутствие тяжёлых металлов (ТМ) в составе сырой нефти является одним из наиболее значимых факторов её экологической опасности. При попадании в окружающую среду эти элементы аккумулируются в почве, базовом компоненте экосистем. Из-за высокой способности к адсорбции тяжёлые металлы прочно фиксируются в почвенных структурах и могут сохраняться в них десятилетиями, что делает почву основным депо данных загрязнителей [426, 427]. В нефтегазовой промышленности тяжелые металлы можно обнаружить в составе нефти, нефтешламов, в различных отходах, включая буровые растворы, эксплуатационные жидкости и пластовые воды [428]. Особую токсикологическую значимость представляют ТМ в составе сырой нефти такие как никель (Ni), медь (Cu), кадмий (Cd), хром (Cr), ртуть (Hg), свинец (Pb), мышьяк (As) и цинк (Zn). Эти элементы способны вступать во взаимодействие с ферментативными системами почвы, нарушая её биохимический баланс и оказывая долговременное негативное воздействие на экосистемы [429, 430, 431]. Тяжелые металлы являются второстепенными

элементами и являются значительными загрязнителями из-за их высокой токсичности и растворимости в воде. Эти металлы, которые имеют тенденцию образовывать стабильные растворенные комплексы с неорганическими и органическими лигандами, часто препятствует их сорбции и осаждению [432].

Тяжёлые металлы поступают в нефтяные системы из минеральной матрицы пласта и органического вещества материнских пород. На ранних стадиях катагенеза металлы частично комплексируются с органическими лигандами нефти и смолисто-асфальтовыми компонентами, а также переходят в пластовую воду в виде растворённых ионных форм. В дальнейшем геохимическая эволюция (рН, Eh, ионная сила, сероводород) определяет их перераспределение между нефтью, водной и твёрдой фазами [433, 434].

Железо в потоках добычи и переработки нефти имеет два источника:

1 Природное содержание в сырье, обычно 0,04-120 ppm, в тяжёлых нефтях и битумах до 120-500 ppm (в растворённой и твёрдофазной формах).

2 Техногенное поступление из-за коррозии трубопроводов и аппаратов, которое усиливают кислые компоненты сырья при несовпадении их с применённой металлургией [435].

В реальной многофазной системе «нефть-вода-твёрдая фаза» железо присутствует в нескольких ключевых формах:

1 Твёрдые частицы: в восстановительных сернистых нишах быстро образуются сульфиды железа (аморфные сульфиды железа, грейгит, пирротин; далее пирит/марказит), которые попадают в поток нефти/эмульсий и вносят вклад в стабилизацию эмульсий и масштабирование [436].

2 Маслорастворимые комплексы: высокотемпературная нафтенатная коррозия генерирует железонафтенаты (iron naphthenate) в органической фазе. Параллельно образуются твёрдые оксиды железа как продукты коррозии. Это подтверждено коррозионными исследованиями на НПЗ (АМРР 2024) и рядом каталитических работ, где железонафтенат выступает активным компонентом [437].

3 Металлы преимущественно обогащают тяжелые фракции нефти, формируя ассоциации и комплексы с асфальтенами и смолами [438].

В целом по современной практике контроля сырой нефти железо (Fe) в «чистых» товарных потоках обычно находится на уровне единиц ppm, а операционный ориентир спецификаций держат около ≤ 10 ppm (по результатам определения суммарного Fe по ASTM D5708), поскольку превышения ухудшают разделение фаз, усиливают коррозию и дезактивацию катализаторов [439, 440]. Для тяжёлых и высокосмолистых нефтей значения часто смещены в диапазон десятков-сотен ppm, с документированными случаями 340 частей на миллион, а в сырой нефти менее 65 частей на миллион, но его высокая концентрация в отложениях составляет от 20 до 49%. На величину Fe заметно влияют форма присутствия растворимых комплексов, твёрдые частицы оксидов/сульфидов, вклад коррозионного выноса по цепочке «добыча–транспорт–хранение», а также эффективность обессоливания/обезвоживания и условия пробоотбора [441].

В присутствии сульфатредуцирующих бактерий биогенный сульфид быстро переводит $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ в FeS , что одновременно снижает растворенный H_2S и меняет доступность железа и серы для бактерий. На лабораторных биореакторах показано, что дозирование Fe^{3+} эффективно подавляет H_2S , изменяя кинетику образования сульфида и структуру консорциумов [442]. Кроме того биогенный сульфид способен восстанавливать Fe(III) при низком рН, то есть СРБ косвенно участвуют в круговороте железа, усиливая восстановление Fe(III) до Fe(II) . Это важный этап между серным и железным циклами [443]. В анаэробных системах добавки ZVI/Fe (0) и (или) Fe^{3+} часто усиливают метаногенез и разложение длинноцепочечных углеводов за счёт: донорства/переноса электронов, каталитического восстановления промежуточных акцепторов, стимулирования синтрофных связей между ЖВБ (железовосстанавливающих бактерий) и метаногенами. На сложных субстратах Fe^{3+} усиливал синтрофию (ЖВБ *Trichococcus/Bacillus* ↔ *Methanobacterium/Methanomethylovorans*) и биодеградацию C19-C20 алканов. На моделях анаэробного сбраживания ZVI ускорял выход метана и сокращал лаг-фазу. Эти результаты важны для нефтешламов/попутных вод с органикой [444, 445]. А также трёхвалентное железо Fe(III) в анаэробных условиях может выступать терминальным акцептором электронов: на модели с *Shewanella putrefaciens* восстановление Fe(III) достигало ~60 % к 7-му дню и ~82,8 % к 30-му дню, параллельно фиксировалась деградация сырой нефти (по ГХ-масс быстрее убывали двухядерные ароматические соединения, тогда как насыщенные фракции уменьшались медленнее). Этот эффект зависит от специации и доступности Fe(III) (аморфные гидроксиды восстанавливаются быстрее, чем кристаллические оксиды), состава доноров электронов, температуры и наличия «электронных шаттлов» (гумусовые вещества, AQDS), что в сумме смещает сообщество в сторону железоредуцирующих путей и ускоряет анаэробный распад ароматиков [446].

Zn(II) в нефтяных системах – обычно следовый элемент, чаще всего фиксируемый в низких ppm и ниже, со склонностью уходить в ZnS при сероводородных условиях. В нефтепромышленной системе Zn(II) встречается преимущественно в водной фазе в виде Zn^{2+} и его хлоридно-/карбонатных комплексов. При наличии сероводорода он быстро переводится в малорастворимый ZnS , выпадая в осадок [447]. Или формируя сульфидные отложения, нередко совместно с FeS/PbS , что влияет на межфазную плёнку и устойчивость эмульсий; рост и подавление таких ZnS -масштабов экспериментально показаны и зависят от рН, концентрации HS^- и присутствия дисперсантов (например, карбоксиметилцеллюлозы). В органической (нефтяной) фазе цинк фиксируется в следовых количествах и частично ассоциируется с тяжёлыми фракциями (смолы/асфальтены), однако при типичных промысловых условиях он склонен мигрировать в водную и твёрдую фазы [448]. В сырой нефти содержание цинка обычно колеблется от следовых величин до десятков, а в редких случаях, сотен ppm: геохимические работы упоминают максимумы порядка ~160 ppm (как верхние экстремальные

значения из исторических наборов), тогда как для ряда современных проб по специальным методикам извлечения Zn из нефти стабильно фиксируют уровни >1 ppm [449]. А в попутных водах, сопровождающих процессы нефте- и газодобычи, содержание цинка обычно составляет около 1 ppm и выше, что имеет практическое значение как для технологических процессов, так и для экологии. Накопление Zn^{2+} в воде способствует образованию нерастворимых сульфидов (ZnS) при взаимодействии с H_2S , что ведёт к образованию твёрдых отложений и ускоряет процессы масштабирования в трубопроводах и оборудовании [450].

В составе нефтяных систем цинк в форме Zn^{2+} проявляет двойную природу: он может выступать как микроэлемент, но при повышенных концентрациях становится токсичным для микробов. Так, исследования показали, что сульфатредуцирующие бактерии эффективно удаляют Zn(II) при концентрациях до 40 мг/л, тогда как значения 60-100 мг/л начинают угнетать их рост и метаболическую активность. Например, при 40 мг/л Zn(II) после 8 суток биообработки СРБ достигали удаления около 76-77 % Zn(II) и сульфата, тогда как при 100 мг/л эффективность падала ниже 35 % [451]. Кроме того, цинк в форме ZnO-хитозановых наночастиц (ZnO-CS) показал антисептический эффект: при 250 $\mu\text{g/ml}$ эти наноконпозиты эффективно подавляли рост СРБ и снижают восстановление сульфатов, оказывая потенциал для подавления биофильмов сульфатредуцирующих бактерий [452]. Таким образом, Zn(II) ведёт себя как потенциальный ингибитор микробных процессов при концентрациях вокруг 40-100 мг/л, с особенно выраженным антимикробным действием в форме наночастиц ZnO.

Хром относится к элементам, обладающим выраженной токсичностью и способным осложнять процессы переработки углеводородного сырья. В сырой нефти он встречается либо как природная составляющая, связанная с условиями её формирования, либо поступает вторично, вследствие коррозии стальных трубопроводов и оборудования при добыче [453]. Для тяжёлых, смолистых систем нефтяных песков показаны 1,686-5,733 ppm Cr в углеводородной фазе по ААС, что согласуется с известной тенденцией накопления металлов в тяжёлых фракциях при деградации нефти [454]. В попутных и добычных водах Cr обычно присутствует на уровнях 1,52-2,31 мкг/л [455]. Источниками Cr в промышленных контурах, помимо природного, могут быть коррозия хромсодержащих сталей/сплавов и историческое применение хроматов как антикоррозионных добавок в отдельных технологических водных системах (сейчас повсеместно выводятся из обращения из-за канцерогенности Cr(VI)) [456]. Шестивалентный хром – более токсичная и растворимая форма, проникающая в клетки как сульфат-аналог (через сульфат-транспортеры), вызывающая окислительный стресс и ДНК-повреждения микроорганизмов, снижение валентности до Cr(III) резко уменьшает токсичность и мобильность [457]. В отношении «нефтяных» анаэробных консорциумов имеет следующие ключевых эффекта:

Для *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Cr(VI) вызывал транзиторное подавление сульфатредукции и роста; толерантность зависела от доступных субстратов/ресурсного соотношения. При оптимизации условий клетки способны восстанавливать Cr(VI) до Cr(III), частично снимая токсический эффект (данные физиологии, транскриптомики и кинетики восстановления). Это важно для нефтяных биоплёнок: СРБ – центральные игроки в сероводородообразовании и коррозии, и Cr(VI) способен «глушить» их активность на входе, пока не будет восстановлен до Cr(III) [458, 459]. Таким образом, в реальных нефтяных средах Cr(VI) проявляет ярко выраженную острую токсичность к ключевым членам нафторазрушающих/анаэробных сообществ, но при наличии доноров электронов, Fe(II)/сульфида и железоксидных фаз микробные сообщества способны быстро переводить Cr(VI) в менее токсичный Cr(III), что смягчает подавление биотрансформации углеводородов. Именно эта комбинация «высокая начальная токсичность + быстрая восстановимость» объясняет, почему Cr(VI) считают наиболее опасным в триаде Fe(III)-Zn(II)-Cr(VI): Fe(III) чаще выступает акцептором электронов/минеральной матрицей. А Zn(II) – эссенциальный катион с токсичностью в более высоких дозах. Cr(VI) же – канцероген/мутаген и сильный окислитель, активный уже при μM -уровнях в воде [457, 458].

Поэтому определение влияния тяжелых металлов проводили с применением Cr (VI) для 9 отобранных культур микроорганизмов: *Bacillus paramycoides* (SFN-1), *Bacillus cereus* (SFN-2), *Bacillus thuringiensis* (SFN-3), *Bacillus subtilis* (H-1), *Bacillus siamensis* (H-4), *Bacillus haynesii* (F-1), *Bacillus zhangzhouensis* (F-2), *Peribacillus simplex* (E-1), *Microbacterium sp.* (H-2). В качестве контроля использовали варианты культивирования культур в МПБ без добавления хрома Cr (VI) (Таблица 3.20).

Таблица 3.20 - Динамика изменения оптической плотности при культивировании бактерий на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{ctrl} (контроль)

Вид	Оптическая плотность, ед.	Продолжительность культивирования, час					
		0	24	48	72	96	120
<i>Bacillus paramycoides</i> SFN-1	Опыт Cr (VI)	0,019	0,287	0,264	0,213	0,019	0,012
	Контроль	0,016	0,161	0,115	0,037	0,019	0,017
<i>Bacillus cereus</i> SFN-2	Опыт Cr (VI)	0,123	0,266	0,191	0,161	0,018	0,022
	Контроль	0,145	0,268	0,33	0,341	0,085	0,074
<i>Bacillus thuringiensis</i> SFN-3	Опыт Cr (VI)	0,057	0,188	0,083	0,075	0,01	0,022
	Контроль	0,042	0,776	0,763	0,642	0,117	0,049
<i>Bacillus subtilis</i> H-1	Опыт Cr (VI)	0,023	0,102	0,046	0,02	0,016	0,014
	Контроль	0,029	0,122	0,155	0,075	0,025	0,022
<i>Bacillus siamensis</i> H-4	Опыт Cr (VI)	0,097	0,174	0,097	0,067	0,007	0,01
	Контроль	0,007	0,064	0,011	0,015	0,013	0,04
<i>Bacillus haynesii</i> F-1	Опыт Cr (VI)	0,015	0,093	0,002	0,009	0,02	0,015

	Контроль	0,016	0,142	0,15	0,039	0,026	0,096
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> F-2	Опыт Cr (VI)	0,027	0,292	0,089	0,025	0,02	0,024
	Контроль	0,021	0,125	0,048	0,075	0,015	0,021
<i>Peribacillus simplex</i> E-1	Опыт Cr (VI)	0,030	0,155	0,066	0,057	0,007	0,013
	Контроль	0,036	0,07	0,116	0,107	0,037	0,034
<i>Microbacterium sp.</i> H-2	Опыт Cr (VI)	0,051	0,15	0,14	0,017	0,008	0,007
	Контроль	0,054	0,097	0,157	0,087	0,016	0,023

На рисунке 3.7 представлены результаты микробного культивирования на среде с хромом в концентрации 150 мкг/мл.

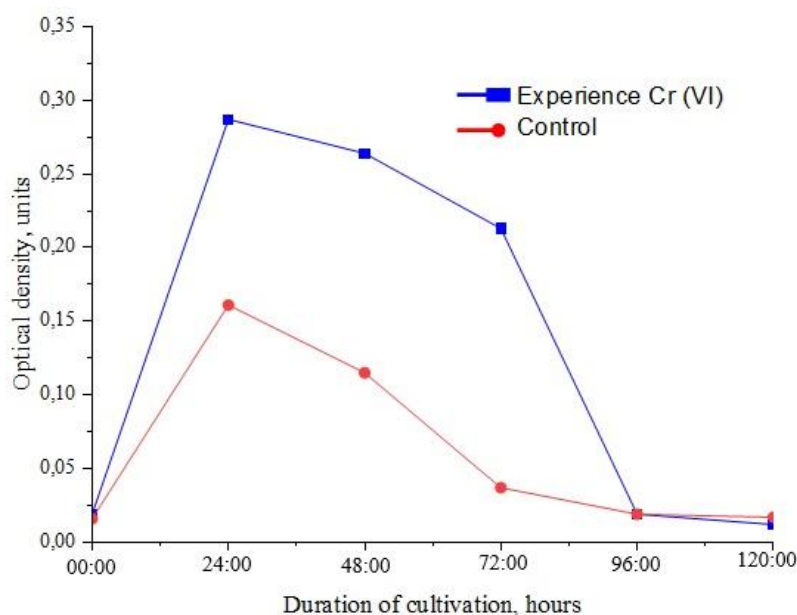


Рисунок 3.7 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus paramycooides* SFN-1 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Рост культуры *Bacillus paramycooides* SFN-1 в присутствии и отсутствии ионов Cr(VI) оценивался по изменению оптической плотности при 600 нм в течение 24-120 часов культивирования. В контрольном опыте без добавления металла наблюдался умеренный рост, максимальное значение D_{opt} составило 0,161 на 24-м часу после происходило постепенное снижение биомассы: до 0,115 (48 ч), 0,037 (72 ч), и почти полное подавление к 96-120 часам (0,019-0,017). При внесении Cr(VI) культура демонстрировала более выраженный рост на ранней стадии: уже к 24-му часу достигал 0,287, что почти в два раза выше контрольного уровня. В течение последующих 48-72 часов сохранялся сравнительно высокий уровень оптической плотности (0,264-0,213), однако к 96-му часу наблюдалось резкое падение до 0,019, и на 120-м часу показатели оставались минимальными (0,012). Таким образом, Cr(VI) вызывал стимулирующий эффект на начальных этапах, обеспечивая более интенсивное накопление

биомассы по сравнению с контролем. Однако длительное воздействие приводило к выраженному ингибированию роста и почти полному подавлению культуры. Это указывает на возможное наличие у *Bacillus paramycooides* SFN-1 адапционных механизмов к Cr(VI) на ранних стадиях культивирования, но с накоплением токсического эффекта металл становился летальным для клеток. Однако в исследованиях Kalsoom, К. И соавторов использовали *Bacillus paramycooides* для восстановления токсичного шестивалентного хрома до менее вредного хрома. В результате штамм продемонстрировал 65 %-ное снижение Cr(VI) в течение 96 ч при 30 °С [460]. И в исследованиях Gu Y и соавторов показывал устойчивость к воздействию Cr(VI) в концентрации до 2500 мг/л, а скорость удаления 2000 мг/л Cr(VI) достигала 67,3 % при оптимальных условиях культивирования: 220 об/мин, pH 8 и 31 °С [461].

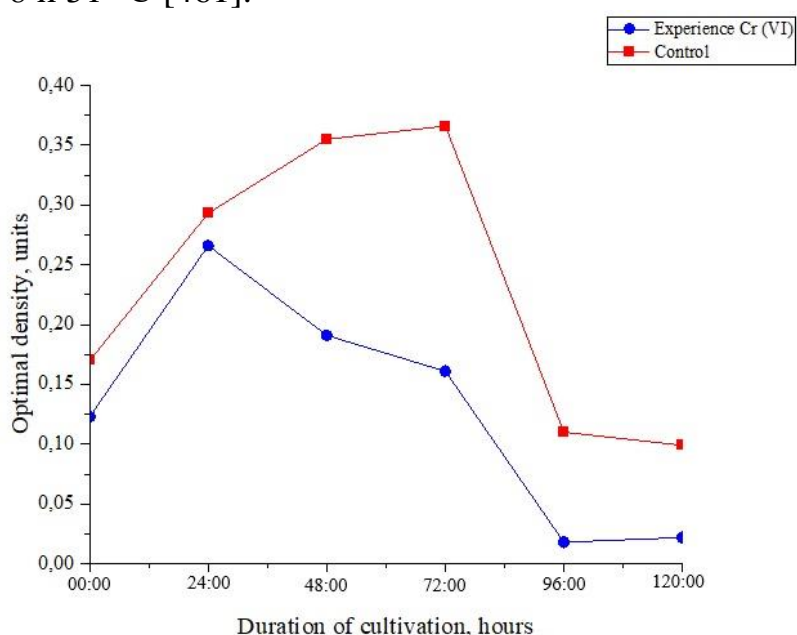


Рисунок 3.8 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus cereus* SFN-2 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Рост культуры *Bacillus cereus* SFN-2 (Рисунок 3.8) в контроле наблюдалась устойчивая динамика увеличения биомассы: D_{opt} вырос с 0,145 (0 ч) до 0,268 (24 ч), далее продолжал расти до 0,330 (48 ч) и достиг максимума 0,341 на 72-м часу. После этого наступал спад: 0,085 к 96 ч и 0,074 к 120 ч. В условиях опыта с Cr(VI) наблюдалось заметное ингибирование роста. На начальном этапе D_{opt} составил 0,123, к 24-му часу показатель увеличился до 0,266, но в дальнейшем рост резко замедлился: 0,191 (48 ч), 0,161 (72 ч). После 96-го часа происходило почти полное подавление роста (0,018-0,022). Таким образом, по сравнению с контролем Cr(VI) оказывал выраженный ингибирующий эффект на *Bacillus cereus* SFN-2: рост биомассы был ниже на всех стадиях, кроме 24-го часа, а к концу эксперимента культура фактически полностью подавлялась. Это указывает на чувствительность данного штамма

к ионам Cr(VI), с невозможностью поддерживать длительное развитие в условиях присутствия металла. Тогда как, в исследованиях Youquan Chen и соавторов *Bacillus cereus* показывал ярко выраженные результаты при преобразовании Cr(VI) в Cr(III) в горшке на 94,22 % [462].

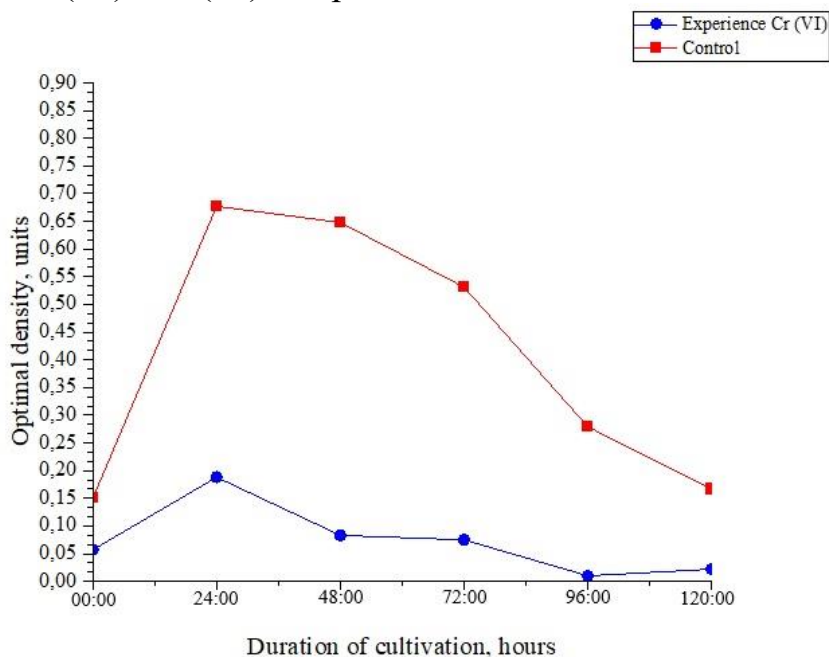


Рисунок 3.9 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus thuringiensis* SFN-3 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Рост культуры *Bacillus thuringiensis* SFN-3 (Рисунок 3.9) в контроле клетки демонстрировали интенсивное развитие: D_{opt} быстро увеличивался с 0,042 (0 ч) до 0,776 (24 ч) и сохранялся на высоком уровне до 48 ч (0,763). Далее происходило постепенное снижение биомассы, 0,642 (72 ч), 0,117 (96 ч), и к 120 ч D_{opt} составил 0,049, что указывает на естественное истощение питательной среды. В условиях опыта с Cr(VI) наблюдалось резкое угнетение роста. На начальном этапе D_{opt} составил 0,057, а максимальное значение было достигнуто на 24-м часу (0,188), что в 4 раза ниже контрольного уровня. Уже к 48 ч показатель снижался до 0,083, далее сохранялся на минимальном уровне (0,075-0,010) и к 120 ч составлял лишь 0,022. Суммируя, Cr(VI) оказывает выраженное токсическое воздействие на *Bacillus thuringiensis* SFN-3, полностью подавляя активный рост культуры. Данный вид проявил наименьшую устойчивость: разница с контролем сохранялась на всех стадиях эксперимента, а биомасса в условиях металла оставалась крайне низкой. Использование штамма *Bacillus thuringiensis* показывал хорошие результаты в исследованиях Yasemin Şahin, продемонстрировав поглощение ионов хрома(VI) смесью спор и кристаллов *B. thuringiensis* 24,1 % [463].

Изменение роста культуры *Bacillus subtilis* H-1 (Рисунок 3.10) в контроле наблюдалась нормальная динамика роста: OD увеличивался с 0,029

(0 ч) до 0,122 (24 ч), затем достиг максимума 0,155 на 48-м часу. После этого происходило постепенное снижение: 0,075 (72 ч), 0,025 (96 ч), и 0,022 (120 ч). В присутствии Cr(VI) рост культуры был существенно замедлен. На старте D_{opt} составлял 0,023, к 24 ч показатель достигал 0,102, но далее рост резко снижался: 0,046 (48 ч), 0,020 (72 ч). К концу эксперимента показатели оставались минимальными (0,016-0,014). Таким образом, воздействие Cr(VI) оказывало выраженный ингибирующий эффект на *Bacillus subtilis* Н-1. Несмотря на сходную с контролем динамику начального роста, биомасса в опыте была почти в 3-4 раза ниже контрольных значений на 48-72 ч, а к финальным срокам показатели культуры стремились к нулю.

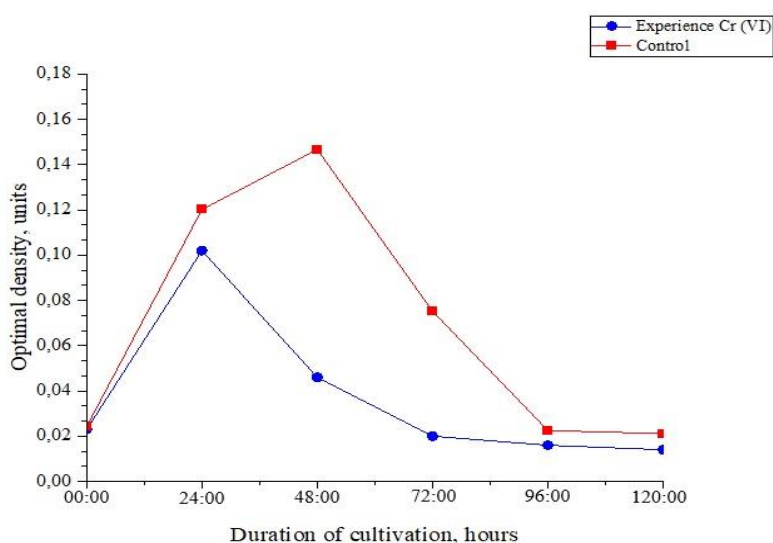


Рисунок 3.10 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus subtilis* Н-1 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Это указывает на низкую устойчивость штамма к воздействию ионов шестивалентного хрома. Но эффективность *Bacillus subtilis* в биоредукции Cr(VI) подтверждена многочисленными экспериментами. Например, штамм в работе Neha Upadhyay способен за 72 ч восстанавливать до 75 % из 50 мг/л Cr(VI) [464]. Недавние работы демонстрируют, что включение гуминовых веществ и аналогичных электронных доноров значительно усиливает данный процесс, восстанавливая Cr(VI) до 39,8 % [465].

Рост культуры *Bacillus siamensis* Н-4 (Рисунок 3.11) в контроле наблюдался очень слабый рост: D_{opt} увеличивался с 0,007 (0 ч) до 0,064 на 24 ч, но затем снижался почти до нуля (0,011-0,015 на 48-72 ч). К 120 ч D_{opt} немного увеличился до 0,040, что указывает на затяжной и нерегулярный рост в отсутствие металла. В условиях опыта с Cr(VI) отмечался иной характер динамики. На старте D_{opt} составлял 0,097, а максимальное значение зафиксировано на 24-м часу (0,174), что почти втрое превышало контроль. Однако далее происходило снижение: 0,097 (48 ч), 0,067 (72 ч), и резкое падение до 0,007 на 96 ч. К концу эксперимента D_{opt} оставался на крайне

низком уровне (0,010). Следовательно, воздействие Cr(VI) вызвало стимулирующий эффект на начальном этапе, когда рост штамма в опыте значительно превышал контрольные значения. Однако в дальнейшем культура оказалась неспособной поддерживать развитие в условиях присутствия токсичного металла, и уже после 72 ч рост был почти полностью подавлен.

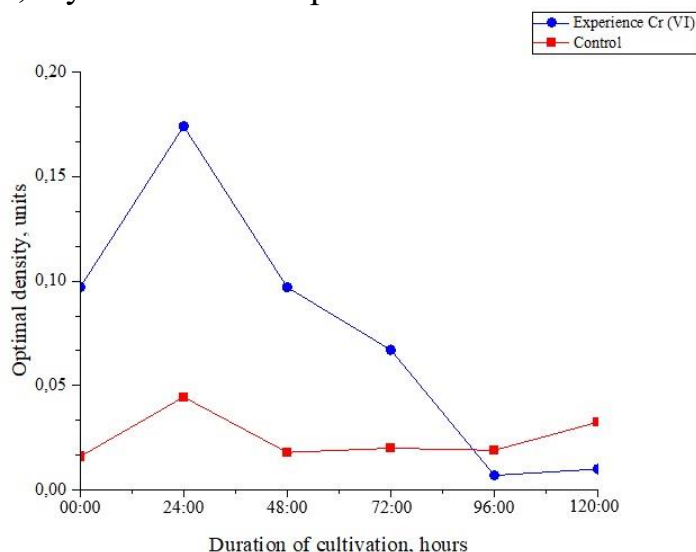


Рисунок 3.11 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus siamensis* H-4 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

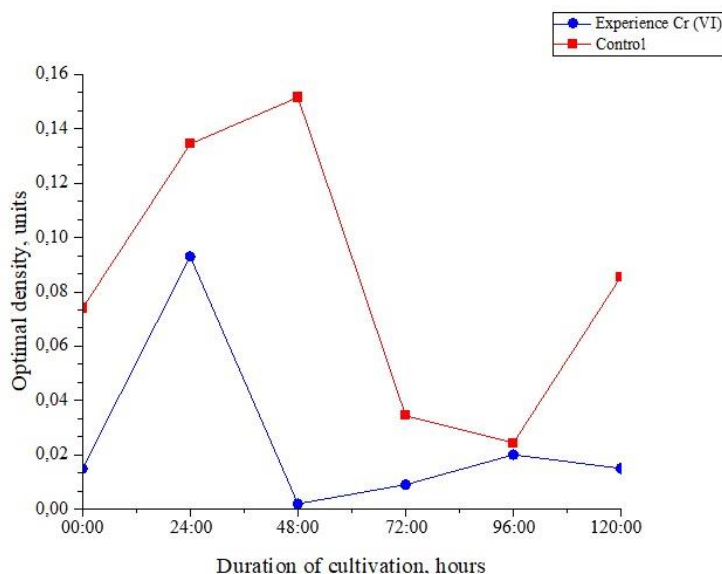


Рисунок 3.12 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus haynesii* F-1 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Изменение роста культуры *Bacillus haynesii* F-1 (Рисунок 3.12) в контроле наблюдался умеренный рост: D_{opt} увеличивался с 0,016 (0 ч) до 0,142

на 24 ч и достигал максимального значения 0,150 на 48 ч. После этого показатели постепенно снижались: 0,039 (72 ч), 0,026 (96 ч) и 0,096 на 120 ч, что указывает на сохранение части метаболически активных клеток. В условиях опыта с Cr(VI) отмечалось сильное ингибирование роста. Стартовое значение D_{opt} составляло 0,015, а максимум был зафиксирован на 24 ч (0,093), что в полтора раза ниже контрольного. Уже к 48 ч OD резко падал до 0,002, а к 72 ч оставался минимальным (0,009). В дальнейшем наблюдалось лишь незначительное повышение: 0,020 (96 ч) и 0,015 (120 ч). Таким образом, Cr(VI) оказывает выраженный токсический эффект на *Bacillus haynesii* F-1. Несмотря на небольшой рост на начальной стадии, уже к 48 ч культура практически полностью подавлялась. Отличительной особенностью является отсутствие способности поддерживать биомассу в течение длительного времени, что указывает на высокую чувствительность данного штамма к шестивалентному хромю. *Bacillus haynesii* продемонстрировал способность формировать биопленки и синтезировать внеклеточные полимерные вещества, способствующие сокращению Cr(VI) до 20-24 % [466].

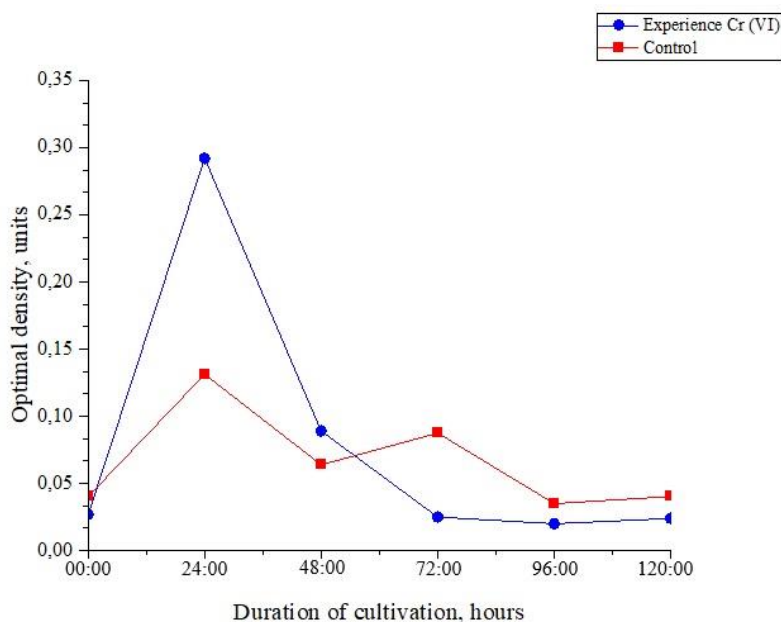


Рисунок 3.13 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Bacillus zhangzhouensis* F-2 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Динамика роста культуры *Bacillus zhangzhouensis* F-2 (Рисунок 3.13) в контрольных условиях наблюдался постепенный рост: оптическая плотность увеличилась с 0,021 (0 ч) до 0,125 (24 ч), после чего снизилась до 0,048 (48 ч). На 72 ч фиксировался небольшой подъём до 0,075, однако к концу эксперимента значения оставались низкими (0,015-0,021). При добавлении Cr(VI) рост культуры имел иные данные. Уже на 24 ч D_{opt} достигал 0,292, что более чем в два раза превышало контроль. Однако в дальнейшем биомасса стремительно снижалась: до 0,089 (48 ч), 0,025 (72 ч), и оставалась на низком

уровне к 96-120 ч (0,020-0,024). Исходя из этого, Cr(VI) вызывает сильный стимулирующий эффект на ранней стадии, значительно усиливая накопление биомассы, но в последующие сроки проявляет выраженное ингибирующее действие. Это свидетельствует о кратковременной адаптации штамма к воздействию тяжёлого металла, сменяющейся токсическим эффектом при длительном культивировании.

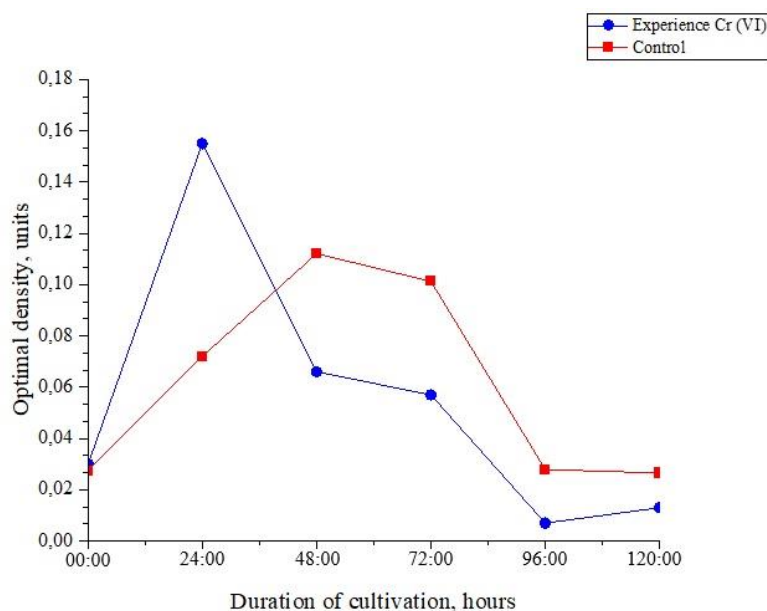


Рисунок 3.14 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Peribacillus simplex* E-1 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

Рост культуры *Peribacillus simplex* E-1 (Рисунок 3.14) в контроле развивался умеренно: D_{opt} увеличивался с 0,036 (0 ч) до 0,070 на 24 ч, затем достигал пика на 48 ч (0,116) и сохранялся на относительно высоком уровне до 72 ч (0,107). После этого биомасса постепенно снижалась: 0,037 (96 ч) и 0,034 (120 ч). В условиях опыта с Cr(VI) динамика роста отличалась. На старте D_{opt} составлял 0,030, к 24 ч наблюдалось резкое повышение до 0,155, что более чем в два раза превышало контроль. Однако после этого биомасса быстро снижалась: 0,066 (48 ч), 0,057 (72 ч), и достигала минимальных значений к концу эксперимента (0,007-0,013). Таким образом, Cr(VI) вызывал стимуляцию роста на ранней стадии, обеспечив кратковременное превышение контрольных значений, но оказывал выраженное ингибирующее действие на более поздних сроках культивирования. Данный результат указывает на способность штамма кратковременно адаптироваться к присутствию токсичного металла, однако длительное воздействие приводило к резкому снижению жизнеспособности клеток.

Динамика роста культуры *Microbacterium sp.* H-2 (Рисунок 3.15) в контроле отмечался умеренный рост: D_{opt} увеличился с 0,054 (0 ч) до 0,097 (24 ч), а максимальное значение зафиксировано на 48 ч (0,157). Далее

происходило постепенное снижение: 0,087 (72 ч), 0,016 (96 ч), и 0,023 (120 ч). В условиях опыта с Cr(VI) динамика отличалась.

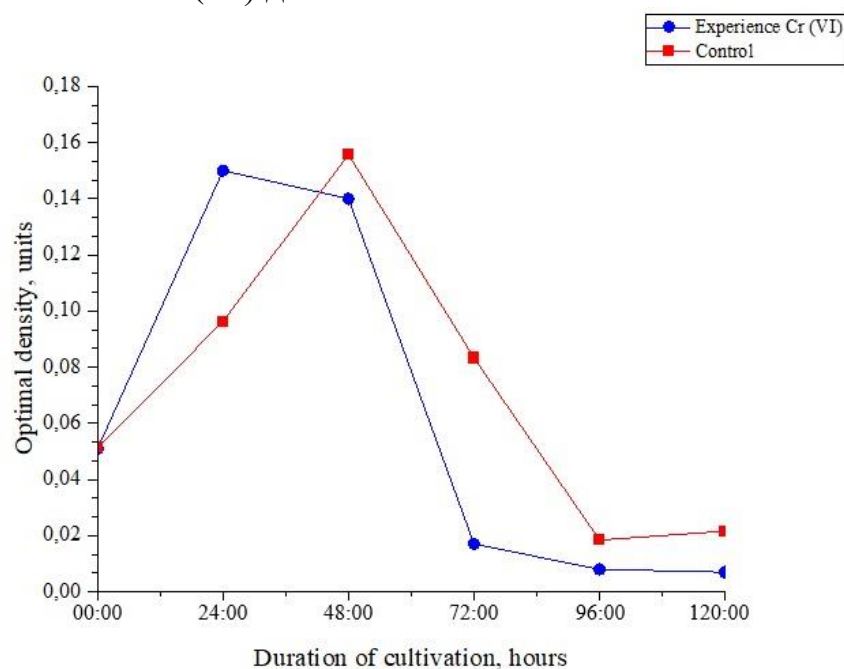


Рисунок 3.15 – Динамика изменения оптической плотности (ед.) при культивировании бактерий *Microbacterium sp.* Н-2 на МПБ с добавлением Cr (VI), D_{opt} (опыт) и без Cr (VI), D_{opt} (контроль)

На старте D_{opt} составлял 0,051, к 24 ч показатель резко возрастал до 0,150, а к 48 ч сохранялся на высоком уровне (0,140). Однако в дальнейшем происходило резкое падение: 0,017 (72 ч), 0,008 (96 ч), и 0,007 на 120 ч, что указывает на почти полное подавление роста. Таким образом, Cr(VI) проявлял стимулирующий эффект на раннем этапе культивирования, обеспечивая показатели, сопоставимые и даже превышающие контроль, но оказывал выраженное ингибирующее действие при длительном воздействии. Это указывает на кратковременную адаптацию *Microbacterium sp.* Н-2 к присутствию тяжёлого металла, сменяющуюся токсическим эффектом. В исследованиях Tingting Li штамм *Microbacterium sp.* может эффективно разлагать Cr(VI) в условиях pH 7-10, 15-35 °C и совместного присутствия металлических загрязнителей, таких как Pb и Ni [467]. Кроме этого, в работе Kumar M так же демонстрировал хорошие результаты при восстановлении Cr (VI) [468].

Сравнительный анализ результатов, полученных в опыте и контроле свидетельствуют о том, что максимальное увеличение клеток наблюдали:

1) через 24 ч культивирования у следующих культур *Bacillus paramycoides* SFN-1 (0,287 ед. в опытной группе и 0,161 ед. в контрольной группе), *Bacillus thuringiensis* SFN-3 (0,188 и 0,776 ед. соответственно), *Bacillus siamensis* Н-4 (0,174 и 0,064 ед. соответственно), *Bacillus haynesii* F-1 (0,093 и

0,142 соответственно) и *Bacillus zhangzhouensis* F-2 (0,292 и 0,125 ед. соответственно);

2) в разное время культивирования у следующих культур:

- *Bacillus cereus* SFN-2: в опыте (0,266 ед.) через 24 ч, контроле (0,341 ед.) через 72 ч культивирования;

- *Bacillus subtilis* H-1, *Peribacillus simplex* E-1 и *Microbacterium sp.* H-2: в опыте (0,102; 0,155 и 0,15 ед. соответственно) через 24 ч, контроле (0,155; 0,116 и 0,157 ед. соответственно) через 48 ч культивирования.

Изучая особенность поведения культур в данном эксперименте можно отметить, что наиболее устойчивыми штаммами, у которых зафиксировано относительно высокие показатели количества клеток в среде с Cr (VI) наблюдали в течение 24, 48 и 72 ч культивирования, в частности, это *Bacillus paramycoides* SFN-1 (0,284; 0,264 и 0,213 ед. клеток в среде с Cr (VI)) и *Bacillus cereus* SFN-2 (0,266; 0,191 и 0,161 ед. клеток в среде с Cr (VI)).

По другим исследованным штаммам видно, что в контроле, в среде без Cr, наблюдается постепенное увеличение клеток с максимальным содержанием клеток на 2-3-и сутки культивирования, тогда как в среде с Cr (VI) наблюдается угнетение клеток: в первый день культивирования фиксируется максимальное количество, но затем популяция не развивается. Литературные данные свидетельствуют о том, что хром может оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на организмы. Бактерии родов *Bacillus* и *Microbacterium* могут не только редуцировать Cr (VI), но и восстанавливать, как это было отмечено Campos J. (1995) [469]. С биологической точки зрения ионы хрома являются важными питательными веществами, поскольку они участвуют в реакциях переноса электронов в биологических системах [470].

Дисперсионный анализ показал, что эффективность действия фактора А (Cr (VI)) на результирующий признак X (рост культуры) статистически достоверно ($F_f \geq F_{st}$) в определенные периоды культивирования для штаммов SFN-1 (24-72 ч), SFN-2 (48-96 ч), SFN-3 (24-96 ч), H-1 (48 ч), H-2 (24, 72 ч), H-4 (0, 24, 72 ч), F-1 (48, 120 ч), F-2 (24 ч) и E-1 (24 ч) и может быть с уверенностью ($p < 0,05$) перенесено на генеральную совокупность. Для всех объектов данной категории влияние изучаемого фактора может составлять не более 5 % от общего влияния всей суммы факторов для SFN-1 (24 ч), SFN-3 (96 ч), H-4 (72 ч), F-2 (24 ч), не более 10 % для H-1 (48 ч), F-1 (120 ч) и E-1 (24 ч), не более 15 % SFN-2 (96 ч) и H-2 (24 ч), тогда как для других исследуемых промежутков времени культивирования влияние исследуемого фактора не превышает 2 %. Это свидетельствует о том, что в процессе обитания в нефтях исследуемые культуры при определенной концентрации приобрели относительную стойкость к Cr (VI). Следовательно, чем выше будет концентрация Cr (VI) в нефти, тем больше будет влиять исследуемый фактор на рост культур.

3.5 Микробная активность в отношении серы в составе сырой высокосернистой нефти

Сера относится к числу основных загрязнителей сырой нефти, и её анализ имеет принципиальное значение по целому ряду причин [471]. В составе сырой нефти содержание сернистых соединений обычно варьирует в пределах 0,1-3 % по массе, при этом их распределение зависит от геологического происхождения сырья [472]. Присутствие серы в сырой нефти приводит к снижению эффективности сгорания и высокому уровню выбросов загрязняющих веществ в нефтегазовой отрасли [473]. Цена на лёгкую малосернистую нефть, как правило, превышает стоимость тяжёлой и высокосернистой. Это объясняется тем, что нефть данного типа имеет более высокую API-плотность и сниженное содержание серы, что облегчает её переработку. Для получения бензина и дизельного топлива, пользующихся высоким спросом, требуется меньше затрат и менее энергоёмкие технологии, чем при обработке тяжёлых сортов. По этой причине лёгкая нефть считается более привлекательной для переработки на НПЗ [471, 474].

Сера поступает в нефть в ходе ранних геохимических процессов, когда органическое вещество взаимодействует с H_2S или элементной серой, полученной бактериями-сульфатредукторами, восстанавливающими сульфаты в анаэробных условиях [64]. Таким образом формируются органические и неорганические формы серы [76]. Следует подчеркнуть, что сернистые соединения представлены различными классами химических структур, включая тиофены, сульфиды, бензотиофены и дибензотиофены. Их количественное содержание в образцах нефти зависит как от геологического происхождения сырья, так и от особенностей технологий переработки на нефтеперерабатывающих предприятиях [475]. Среди различных классов соединений особую сложность представляют дибензотиофены и их производные, которые отличаются высокой стабильностью и низкой реакционной способностью, что затрудняет их удаление в процессе переработки [476]. При переработке нефти органическая сера удаляется преимущественно с помощью традиционных методов, в ходе которой образуется H_2S , а позднее по процессу Клауса превращается в элементарную серу. Таким образом формируя промышленный серному цикл [477]. Кроме того, образование H_2S , сульфатов, сернистых газов могут образовываться при сжигании остаточных топлив. При сжигании топлива, содержащего серу, образуются оксиды серы – SO_2 и SO_3 , которые превалируют в атмосферу и служат основным источником кислотных дождей. Таким образом идет возврат серы в экосистему, через атмосферу и осадки дальше в воду и почву [478]. Этот цикл демонстрирует, что сера не исчезает в ходе использования нефти, а лишь переходит из одной формы в другую, что требует комплексного контроля как на технологическом, так и на экологическом уровнях.

Таким образом, сера в нефтяной отрасли проходит сложный путь преобразований, формируя техногенный круговорот. На геологическом этапе

она включается в состав нефти в виде органических и неорганических соединений. Однако традиционные методы плохо справляются с удалением устойчивых форм, таких как алкилдабензотиофены, что требует либо более жёстких условий, либо альтернативных технологий [479]. Несмотря на экстремальные условия в нефтяных пластах, именно микроорганизмы способны поддерживать циркуляцию серы: сульфатредуцирующие бактерии преобразуют сульфат в H_2S , а сульфид-окисляющие бактерии способны окислять H_2S обратно до сульфата или элементарной серы, образуя таким образом микробное звено в техногенном цикле [480].

Использование СОБ для удаления серы основана на способности микроорганизмов избирательно разрушать сероорганические соединения, такие как дибензотиофены, без повреждения углеводородного каркаса топлива, что позволяет сохранить его энергетическую ценность [481]. В отличие от традиционных методов биодесульфуризация осуществляется при мягких условиях обеспечивая более глубокую степень очистки. Процесс основан на ферментативном окислении, при котором специфические бактериальные ферменты разрывают связи углерод-серы, способствуя эффективному удалению серы без разрушения углеродного скелета молекулы [122]. Преимущество использования сероокисляющих штаммов для десульфурации цельной сырой нефти заключается в том, что он может снизить стоимость десульфурационной обработки на нефтеперерабатывающих заводах [482]. Используются такие микроорганизмы, как *Mycobacterium goodii*, *Pseudomonas Spp.*, *Gordonia Spp.*, *Rhodococcus Spp.*, *Mycobacterium phlei*, *Paenibacillus Spp.*, *Rhodococcus globerulus* и *Nocardia Spp.* также использовались для обработки БДС газойля, бензина, нефтешликового топлива, нефтяных отходов, мазута и крекированных остатков [483]. Но в последние годы в этой области используются микроорганизмы рода *Bacillus*.

Следует отметить, что микроорганизмы *Bacillus cereus* ранее были выделены и использованы в работах R. A. Omar и соавторов для эффективной деструкции S-соединений из нефти и нефтяных продуктов. В их исследованиях разработанная ими технология привело к 99 % десульфуризации нефтей, содержащих ДБТ и тиофен [484], а F. Boshagh в исследованиях со штаммом *Bacillus cereus* достиг 71 % в десульфуризации нефти [485].

В исследованиях M.S. Tabatabaee и M. M. Assadi испытание SARA ASTM D4124-01 выявило снижение содержания асфальтенов на 65,5 %, алифатических соединений на 22,1 % и содержания ароматических соединений на 30,3 % в среде MSM. Дальнейшие результаты с 0,9 % соевым раствором показали снижение содержания асфальтенов на 55 % и ароматических соединений на 2,1 % соответственно [486]. D. Arabian и соавторы через 72 часа обессеривания выявили, что общее содержание серы в керосине снизилось до 1557 частей на миллион [380]. В исследованиях Muhammad Kashif и соавторов, культуры *Bacillus Cereus*, выращенные на ДБТ,

демонстрировали утилизацию ДБТ, мимолетное появление сульфона ДБТ и образование 2-гидроксибифенила. Молекулярный анализ оперона *dsz* продуктов ПЦР выявил наличие генов *dszA*, *dszB* и *dszC*, которые кодируют 90 % активность десульфуризации ДБТ [243]. Микроорганизмы рода *Bacillus* активно применяется для удаления серы из состава нефти и нефтяных продуктов. Asghar Molaee Dehkordi и соавторы в своих исследованиях удалось удалить около 33 % общего содержания серы в неочищенном керосине в течение 72 часа с применением *Bacillus cereus* [487]. *B. thuringiensis* разлагали 80 % веса сырой нефти в работах Marwah Thamer [388]. В исследованиях В. Wu и соавторов деградацию сырой нефти проводили совместным культивированием *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa* и около 75 % насыщенных фракций сырой нефти были эффективно удалены. Данные микроорганизмы могут метаболизировать и размножаться в среде с сырой нефтью в качестве единственного источника углерода [488]. Биосурфактант штамма усилил разложение компонентов отработанного моторного масла полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) до 82 % за 18 дней инкубации, что более чем в два раза по сравнению с разложением без добавления биосурфактантов, восстановил 85 % отработанного моторного масла из загрязненного песка за 24 часа [489]. А также бактерии *Bacillus zhangzhouensis* эффективно удаляли тиоловые соединения из жидкостей. Впервые было достигнуто примерно 99 %-е обессеривание нефти, содержащих дибензотиофена и тиофена и эффективно разлагали оставшиеся S-соединений до ~ 3-15 мг/л в исследованиях R. A. Omar [484]. *Microbacterium* способна обеспечить синхронное удаление тяжелых металлов такие, как аммония, нитритов, нитратов и фосфора [490], цинка, марганца и меди, марганца, кадмия и свинца [417], которые могут встречаться в составе нефти [491]. Штамм *Microbacterium* проявляет широкий спектр десульфуризационной активности. Он способен не только полностью разлагать такие устойчивые соединения, как 4,6-диметил-дибензотиофен, тиофен и бензотиофен, но и эффективно разрушает до 70 % дифенилсульфида. Эти результаты особенно важны, поскольку именно алкилзамещённые дибензотиофены и конденсированные сероорганические структуры считаются «рефрактерными» соединениями, крайне устойчивыми к традиционной гидродесульфуризации. В исследованиях Wei Li продемонстрирована активность штамма *Microbacterium* и, следовательно, показывает о его высоком биотехнологическом потенциале в процессах биодесульфуризации, направленных на глубокое удаление серы из нефтяных фракций [253].

Как видим, изолированные из исследуемых нами нефтей культуры, обладают, как это показано в вышеперечисленных исследованиях, высокой биодесульфуризационной активностью. Поэтому на следующем этапе исследований изолированные культуры тестировались на активность в отношении серы в составе сырой высокосернистой нефти.

Для определения потенциала исследуемых аборигенных культур к микробной десульфуризации отобранных микроорганизмов использовали

минеральную среду МСС и в качестве источника углерода и серы - высокосернистую нефть месторождения «Каражанбас». Поскольку его нефть представляет собой такие качества как: высокая вязкость, плотность составляет порядка 939-945 кг/м³, отличается высоким содержанием смол и асфальтенов (суммарно ~36 %: смолы ≈24 %, асфальтены ≈12 %), а также повышенной сернистостью (≈1,6-2,2 % масс.), что формирует значительную долю рефрактерной органосеры и обуславливает высокую коррозионную и экологическую значимость серы для данного сырья [13, 30, 32]. Эти характеристики многократно отмечены в публикациях по геологии и переработке каражанбасской нефти.

Все это показывает, что нефть месторождений Каражанбас является наглядным примером тяжелого и высокосернистого сырья Казахстана и удобным объектом для проверки методов микробной десульфуризации. Высокое содержание серы в смолах и асфальтенах, а также наличие трудноудаляемых сероорганических соединений делают её особенно сложной для традиционной очистки. Поэтому именно Каражанбас лучше всего подходит для оценки эффективности биодесульфуризации, и выбор этого месторождения для экспериментов полностью обоснован.

В ходе наблюдений за динамикой роста микроорганизмов на высокосернистой нефти выявлено, что максимальное увеличение количества клеток наблюдается для культуры *F1* (на 3 порядка – с 10⁴ до 10⁷ КОЕ/мл), умеренный рост клеток (увеличение на 2 порядка) – для 4-х культур (*H1*, *F2*, *H4*, *E1*), слабый рост (увеличение на порядок) – 3 культуры (*SFN1*, *SFN2*, *SFN3*), культура *H2* не показала роста на данной среде. На рисунках 30-38 представлены результаты изучения роста бактерий на среде с высокосернистой нефтью.

Как показано на рисунке 3.16, динамика роста *Bacillus subtilis* (H-1) характеризуется высокой активностью и быстрым переходом от фазы адаптации к экспоненциальному размножению. Стартовое количество клеток составляло 1,8x10⁵ КОЕ/мл, к 2-м суткам популяция увеличилась до 1,1x10⁶ КОЕ/мл, а к 4-м суткам достигла 1,4x10⁷ КОЕ/мл. Максимальное значение зафиксировано на 5-е сутки 3,7x10⁷ КОЕ/мл, что соответствует приросту на три порядка. Такая динамика показывает не только высокую метаболическую активность штамма, но и его способность к длительному нахождению в экспоненциальной фазе роста, что свидетельствует о хорошей адаптационной способности. В отличие от культур, продемонстрировавших слабый или умеренный прирост, *Bacillus subtilis* (H-1) демонстрирует максимальную скорость наращивания биомассы и уверенную устойчивость к условиям среды.

Идентифицированная культура *Microbacterium sp.* (H-2) в условиях эксперимента не проявила способности к росту (Рисунок 3.17). Исходная численность клеток составляла примерно 2,1x10³ КОЕ/мл, однако уже к 2-м суткам клеточные формы не определялись, и на протяжении всего периода наблюдений динамика роста отсутствовала. Такой результат указывает на то, что штамм оказался неспособен адаптироваться к условиям среды и

использовать их для собственного метаболизма и размножения. В отличие от других штаммов, продемонстрировавших даже минимальный рост, данный штамм полностью утратил жизнеспособность на ранних этапах культивирования. Это свидетельствует о его ограниченном биотехнологическом потенциале на среде с нефтью.

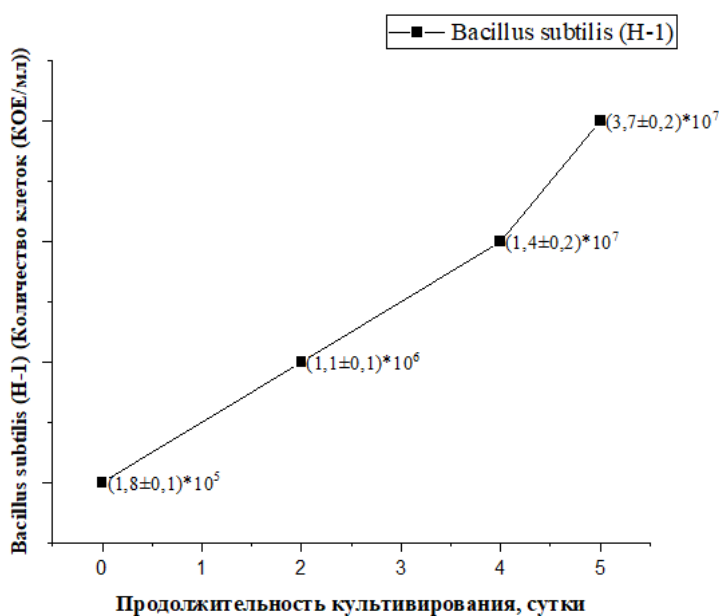


Рисунок 3.16 – Рост штамма *Bacillus subtilis* (H1) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Как видно с рисунка 3.18, рост *Bacillus siamensis* (H-4) оказался незначительным и характеризовался слабым ростом на протяжении всего эксперимента. Начальное количество клеток составляло $1,7 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, к 2-м суткам показатель увеличился лишь до $2,1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, что отражает минимальное проявление адаптации. На 4-е сутки численность достигла $3,4 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, однако к пятому дню популяция снизилась до $1,1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, то есть рост не только прекратился, но и наметилась к сокращению роста. Следовательно, общий прирост показал низкий рост, что свидетельствует о низкой метаболической активности штамма и его ограниченных возможностях к длительному использованию условий среды.

Кратковременный рост с последующим снижением численности клеток указывает на то, что культура не выдерживает длительного культивирования и не может конкурировать с другими, более устойчивыми и активно растущими штаммами.

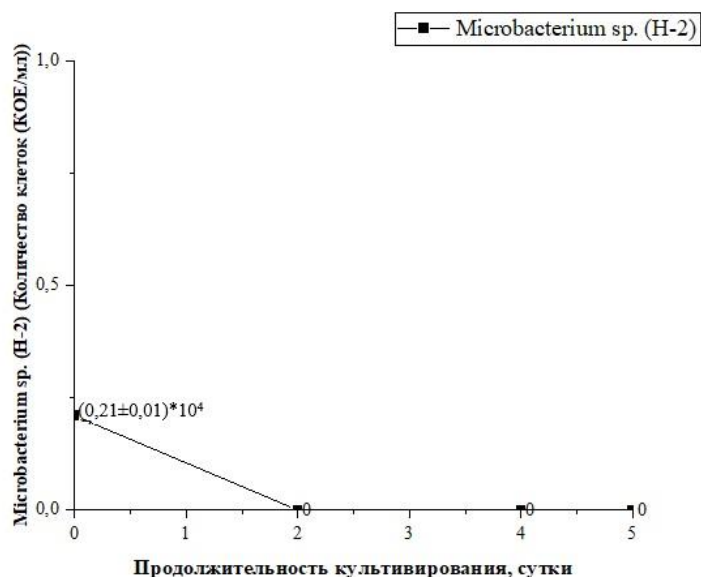


Рисунок 3.17 – Рост штамма *Microbacterium sp.* (H-2) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Идентифицированная культура *Bacillus haynesii* (F-1) демонстрирует динамичный рост в течение всего периода наблюдений (Рисунок 3.19). Уже на второй день численность клеток увеличилась на порядок (до $2,0 \times 10^4$ КОЕ/мл). В дальнейшем фиксируется значительное наращивание биомассы: к четвёртым суткам рост достиг $5,2 \times 10^6$ КОЕ/мл, а к пятым продемонстрировал максимальные показатели в размере $4,1 \times 10^7$ КОЕ/мл. Полученные данные указывают на высокую метаболическую активность культуры, её способность эффективно использовать нефтяные компоненты для поддержания роста и размножения, а также на перспективность данного штамма для дальнейших исследований, связанных с биотрансформацией сероорганических соединений.

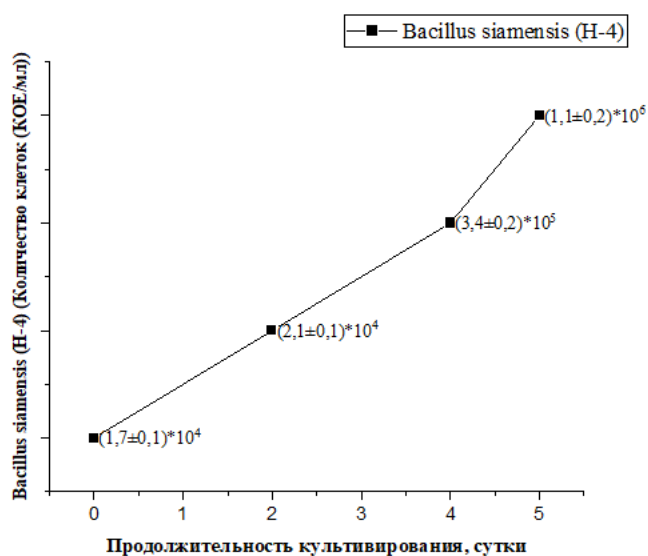


Рисунок 3.18 – Рост штамма *Bacillus siamensis* (H-4) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

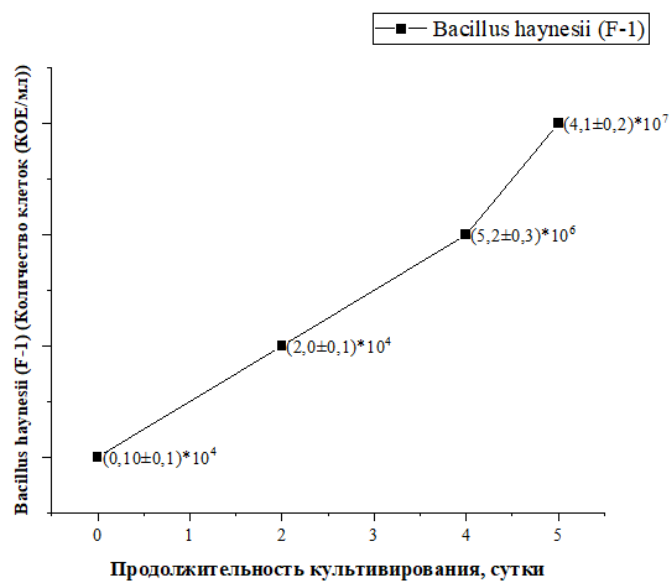


Рисунок 3.19 – Рост штамма *Bacillus haynesii* (F-1) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

На рисунке 3.20 динамика роста *Bacillus zhangzhouensis* (F-2) показывает последовательное увеличение численности клеток. На начальном этапе численность составляла $5,6 \times 10^5$ КОЕ/мл. К 2-м суткам она возросла до $7,3 \times 10^6$ КОЕ/мл, а к 4-м суткам достигла $1,9 \times 10^7$ КОЕ/мл. На 5-е сутки рост стабилизировался, сохранившись на уровне $1,8 \times 10^7$ КОЕ/мл. Таким образом, полученные данные подтверждают, что штамм проявляет достаточно высокий уровень биологической активности и способен эффективно адаптироваться к условиям эксперимента.

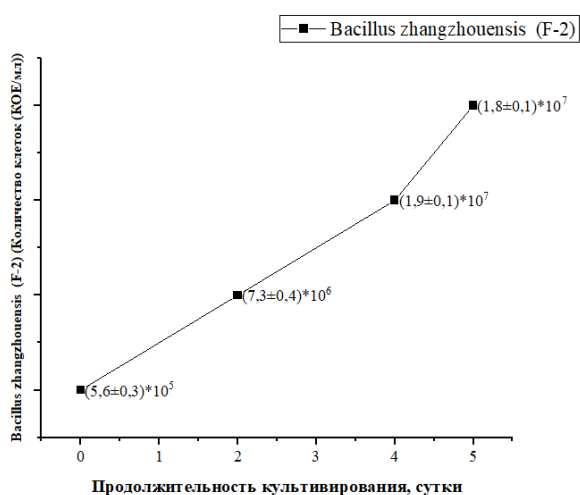


Рисунок 3.20 – Рост штамма *Bacillus zhangzhouensis* (F2) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Как показано на рисунке 3.21, поведение *Peribacillus simplex* (E-1) показывает, что данный штамм способен успешно приспосабливаться к условиям эксперимента. Уже к 2-м суткам численность клеток увеличилась более чем в 30 раз, а к пятому дню достигла значения $7,1 \times 10^6$ КОЕ/мл. Такой прирост подтверждает выраженную биологическую активность культуры, хотя интенсивность роста оказалась ниже, чем у наиболее активно развивающихся штаммов. В то же время стабильная динамика и равномерное наращивание биомассы позволяют рассматривать *Peribacillus simplex* как перспективный объект для дальнейшего изучения и возможного применения в нефтяной промышленности.

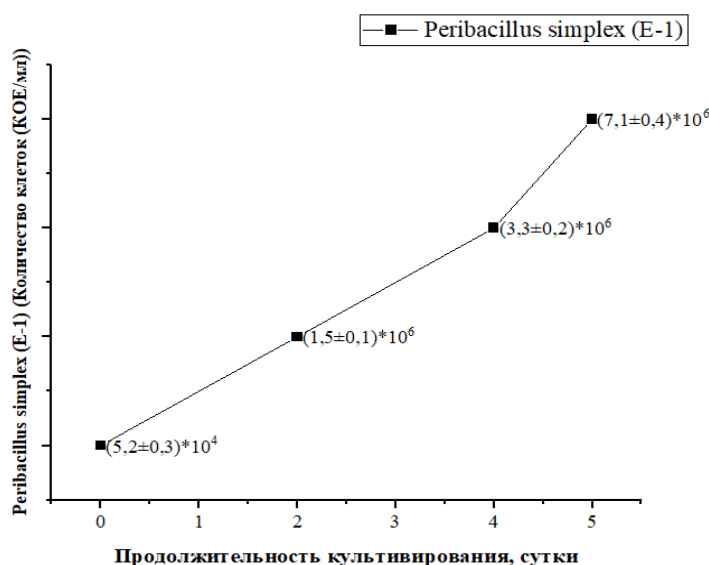


Рисунок 3.21 – Рост штамма *Peribacillus simplex* (E-1) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

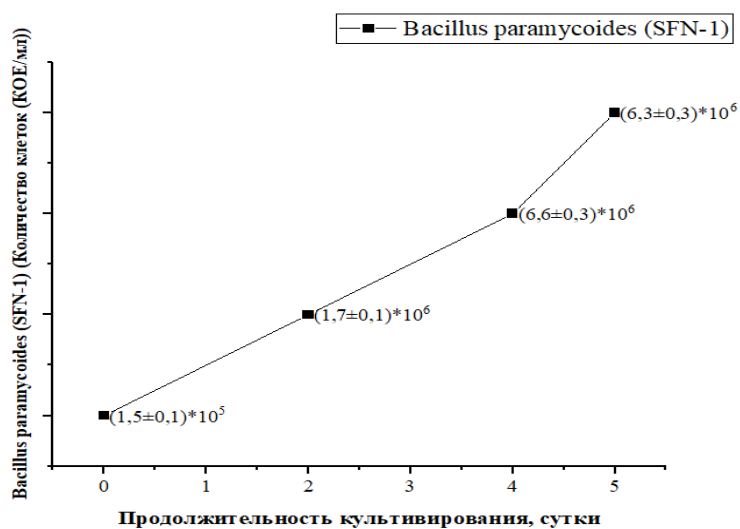


Рисунок 3.22 – Рост штамма *Bacillus paramycoides* (SFN-1) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Аборигенный штамм *Bacillus paramycoides* (SFN-1) демонстрирует незначительный рост популяции (Рисунок 3.22). Исходная численность клеток составляла $1,5 \times 10^5$ КОЕ/мл, к 2-м суткам она увеличилась до $1,7 \times 10^6$ КОЕ/мл. На 4-е сутки численность достигла $6,6 \times 10^6$ КОЕ/мл, а к 5-м суткам составила $6,3 \times 10^6$ КОЕ/мл, что указывает на замедление роста и стабилизацию процесса. Данный штамм продемонстрировал слабую способность к росту: численность клеток увеличилась лишь в несколько десятков раз и стабилизировалась к концу наблюдений. Данный результат показывает, что штамм менее эффективно использует условия среды и не может конкурировать по активности с другими культурами.

Штамм *Bacillus cereus* (SFN-2) проявила умеренную активность (Рисунок 3.23). Изначально численность составляла $1,1 \times 10^5$ КОЕ/мл, к 2-м суткам она возросла до $6,9 \times 10^5$ КОЕ/мл. Наибольший рост наблюдается к 4-м суткам $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл, после чего фиксируется снижение до $8,6 \times 10^6$ КОЕ/мл на 5-е сутки. Таким образом, полученные результаты демонстрирует, что штамм эффективно использует доступные ресурсы и способен к активному размножению на определенном этапе, однако быстро исчерпывает питательный потенциал среды. Это отражается в снижении численности клеток и может ограничивать длительное применение *Bacillus cereus* (SFN-2) в биотехнологических процессах.

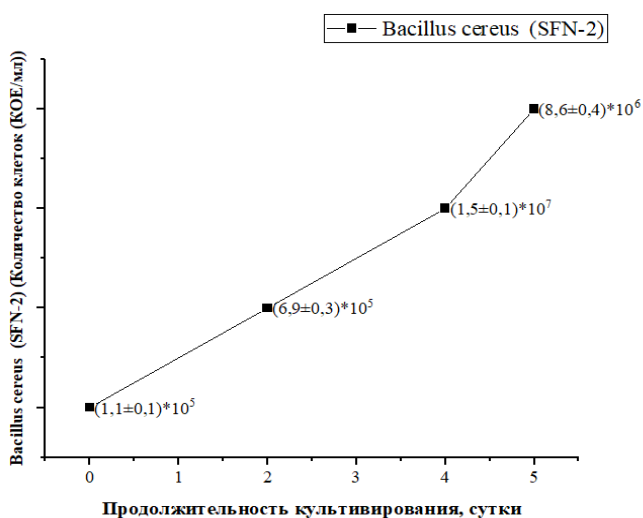


Рисунок 3.23 – Рост штамма *Bacillus cereus* (SFN2) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Динамика роста культуры *Bacillus thuringiensis* (SFN-3) (Рисунок 3.24) характеризуется умеренной активностью по сравнению с другими исследованными штаммами. На начальном этапе численность клеток составляла $1,9 \times 10^5$ КОЕ/мл. Уже к 2-м суткам фиксируется незначительное увеличение до $8,8 \times 10^5$ КОЕ/мл, что соответствует росту менее чем на один порядок. В дальнейшем, к 4-м суткам наблюдается дальнейшее наращивание

биомассы до $4,4 \times 10^6$ КОЕ/мл, однако на 5-е сутки численность клеток стабилизируется на уровне $3,1 \times 10^6$ КОЕ/мл, что свидетельствует о замедлении роста. Общий прирост популяции за весь период эксперимента составил лишь один порядок. Это указывает на то, что штамм эффективно использует доступные ресурсы, но быстро исчерпывает их, что приводит к снижению клеточной численности.

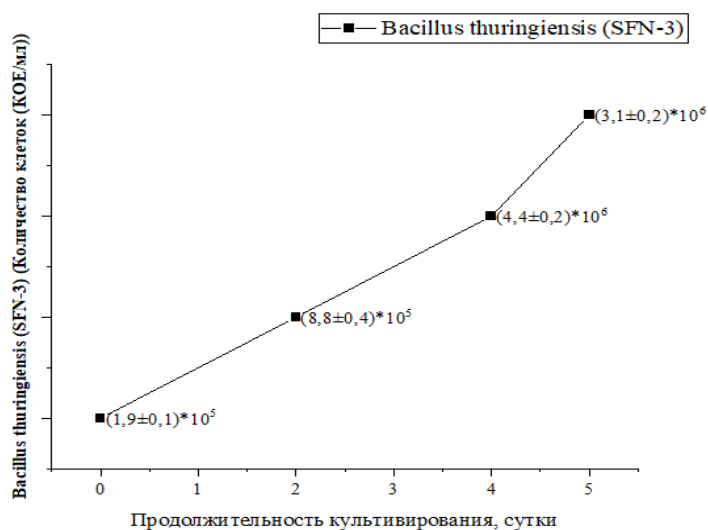


Рисунок 3.24 – Рост штамма *Bacillus thuringiensis* (SFN3) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Общую массовую долю серы до и после микробного обессеривания в составе нефти определяли методом энергодисперсионного рентген флуоресцентного анализатора серы Спектроскан S, в соответствии с нормативными документами [289], при условиях: температура 22 °С, влажность 73 %, давление 695 мм рт.ст., в количестве образца 0,1 л.

В результате химического определения массовой доли серы (%) в контрольных вариантах исходный показатель серы составил 1,955 %.

По результатам экспериментов на пятые сутки было установлено, что штаммы *Bacillus cereus* (SFN-2) и *Bacillus thuringiensis* (SFN-3) проявили выраженные сероокисляющие свойства. Массовая доля серы в нефти при их действии снизилась на 0,008 % и 0,364 % соответственно по сравнению с контрольными образцами (Рисунки 37, 38). Для остальных штаммов характерными оказались процессы сульфатовосстановления различной интенсивности: *Bacillus paramycoides* (SFN-1) восстановил серу до 0,182 %, *Bacillus subtilis* (H1) – до 0,13 %, *Bacillus siamensis* (H-4) - до 0,182 %, *Bacillus haynesii* (F-1) - до 0,164 %, *Bacillus zhangzhouensis* (F2) - до 0,063 %, *Peribacillus simplex* (E-1) - до 0,083 % и *Microbacterium sp.* (H-2) - до 0,113 % (Рисунки 30-36).

Таким образом, в рамках проведённого исследования было подтверждено, что именно штаммы *Bacillus cereus* (SFN-2) и *Bacillus*

thuringiensis (SFN-3) обладают наибольшим потенциалом в удалении сернистых соединений из сырой нефти. Для дальнейшего повышения эффективности процесса с данными культурами были проведены испытания условия совместного применения с глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР), что позволило оценить возможность комбинированного воздействия биотехнологического и физико-химического факторов. В качестве дополнительного этапа исследования, для сравнения эффективности биодесульфуризации аборигенных штаммов, были использованы коллекционные культуры *Pseudomonas putida* (B-1827), *Rhodococcus erythropolis* (AC-1039) и *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807). Это дало возможность сопоставить активность выделенных микроорганизмов с эталонными моделями, традиционно применяемыми в биодесульфуризационных экспериментах, и подтвердить перспективность локальных изолятов для разработки технологий микробного снижения сернистости высокосернистых нефтей.

3.6 Физико-химические характеристики глубоких эвтектических растворителей

3.6.1 Результаты ИК-Фурье спектра глубоких эвтектических растворителей

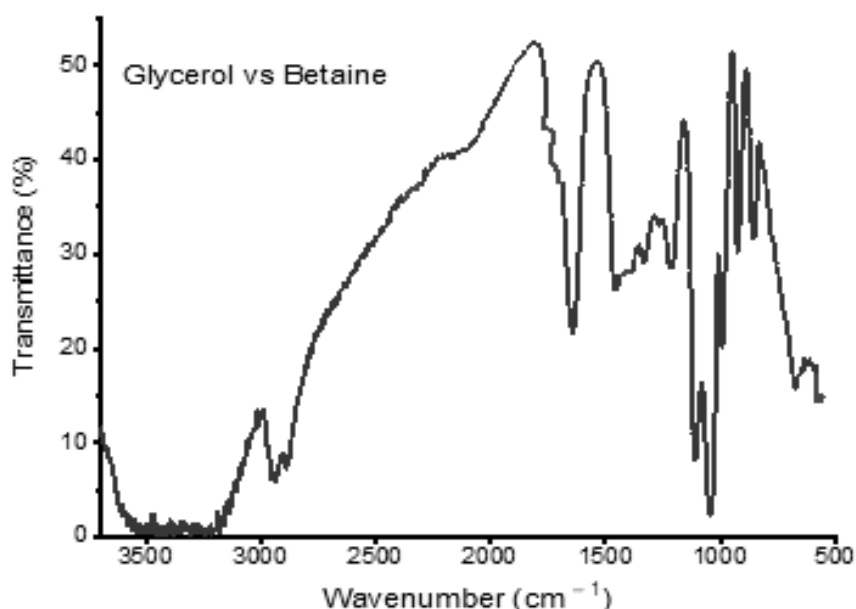


Рисунок 3.25 - Результаты ИК-Фурье спектра глубокого эвтектического растворителя (ГЭР-1) на основе бетаина и глицерина

ИК-Фурье-спектр глубокого эвтектического растворителя на основе бетаина и глицерина характеризуется набором интенсивных полос поглощения, соответствующих функциональным группам, присутствующим в

обоих исходных компонентах (рисунок 3.25). Формирование эвтектической системы сопровождается возникновением развитой сети водородных связей между молекулами глицерина и ионными центрами бетаина, что приводит к изменению формы, положения и интенсивности отдельных полос по сравнению с индивидуальными веществами и подтверждает образование единой надмолекулярной структуры. В спектре наблюдается широкая интенсивная полоса в области $3200-3600\text{ см}^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям гидроксильных групп (О-Н) глицерина, что свидетельствует о наличии сильных межмолекулярных водородных связей. Полосы в диапазоне $1600-1400\text{ см}^{-1}$ обусловлены колебаниями карбоксилатной группы (COO^-) и деформационными колебаниями аммонийных фрагментов бетаина. Пики в области $3000-2800\text{ см}^{-1}$ соответствуют валентным колебаниям С-Н связей алкильных фрагментов обоих компонентов. Интенсивные полосы в области $1100-1000\text{ см}^{-1}$ связаны с валентными колебаниями связей С-О в спиртовых группах глицерина, тогда как полосы в диапазоне $1400-1300\text{ см}^{-1}$ и $1000-900\text{ см}^{-1}$ соответствуют деформационным колебаниям О-Н и С-О-Н групп соответственно. Следует отметить, что положение и интенсивность указанных полос могут изменяться в зависимости от молярного соотношения бетаина и глицерина, а также условий получения ГЭР, что отражает вариации в характере и степени развития водородных связей в системе.

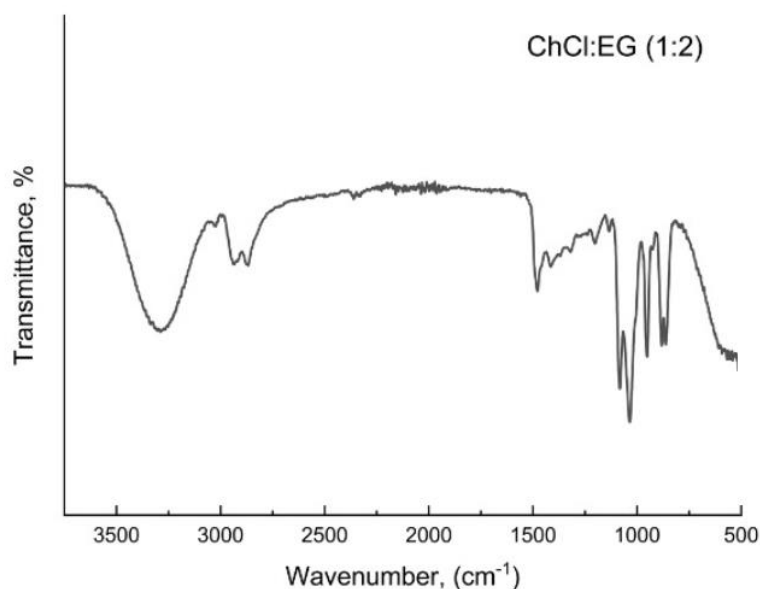


Рисунок 3.26 - Результаты ИК-Фурье спектра глубокого эвтектического растворителя (ГЭР-3) на основе холина хлорида и этиленгликоля

На рисунке 3.26 приведены ИК-спектры ГЭР холина хлорида:этиленгликоля, полученные в диапазоне $4000-500\text{ см}^{-1}$ при разрешении 4 см^{-1} и усреднении 32 сканов. В спектре холина хлорида:этиленгликоля наблюдается широкая интенсивная полоса в области $3300-3400\text{ см}^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям О-Н и

свидетельствующая о развитой сети водородных связей. Ее уширение по сравнению с чистым этиленгликолем указывает на формирование сильных межмолекулярных взаимодействий между гидроксильными группами этиленгликоля и хлорид-ионом. Полосы в области $2950-2850\text{ см}^{-1}$ относятся к колебаниям С-Н метильных и метиленовых групп холина, а появление полосы около 950 см^{-1} , соответствующей колебаниям связи С-N⁺, подтверждает присутствие хлорида холина в системе. В диапазоне $1050-1100\text{ см}^{-1}$ фиксируются интенсивные полосы валентных колебаний С-О этиленгликоля, которые в составе ГЭР смещены и уширены, что указывает на перераспределение электронной плотности вследствие взаимодействия с хлорид-ионом. Таким образом, ИК-спектр подтверждает, что формирование ГЭР-3 холина хлорида:этиленгликоля (1:2) обусловлено образованием развитой сети водородных связей без возникновения новых ковалентных связей, что согласуется с литературными данными для аналогичных систем.

Измерения проводили в диапазоне $4000-500\text{ см}^{-1}$ при спектральном разрешении 4 см^{-1} с усреднением 32 сканов; образцы анализировали без предварительной пробоподготовки (Рисунок 3.27). В ИК-спектре системы тетрабутил аммония хлорид (ТВАС):молочной кислоты (LA) наблюдаются характерные признаки формирования эвтектической структуры, включая широкую полосу валентных колебаний О-Н, а также смещение полос, соответствующих карбонильным (С=О) и С-О группам молочной кислоты. Указанные изменения свидетельствуют о наличии специфических межмолекулярных взаимодействий между молекулами кислоты и катионом тетрабутиламмония. Таким образом, структура системы стабилизируется за счет совместного действия водородных связей и электростатических взаимодействий между компонентами.

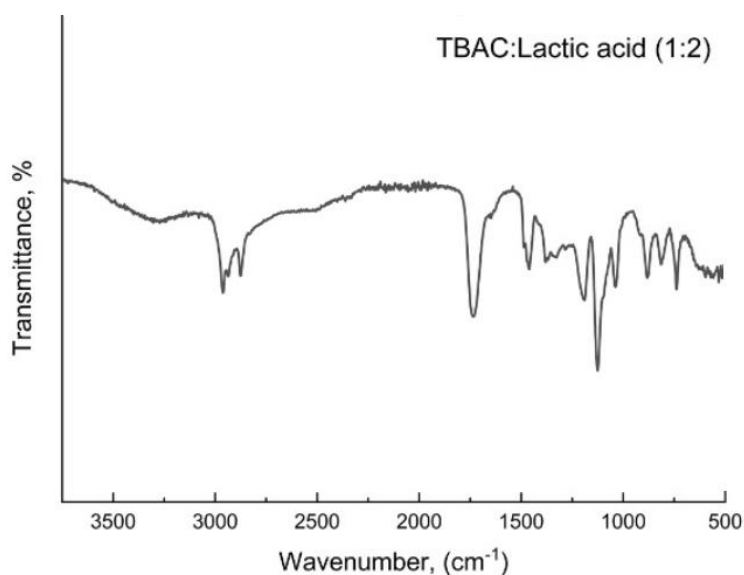


Рисунок 3.27 – Результаты ИК-Фурье спектра глубокого эвтектического растворителя (ГЭР-4) на основе тетрабутил аммония хлорид (ТВАС) и молочной кислоты (LA)

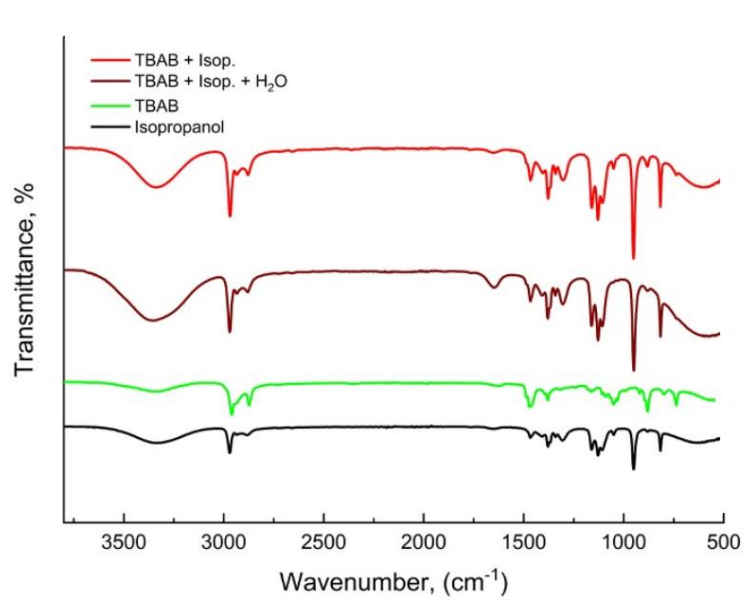


Рисунок 3.28 – Результаты ИК-Фурье спектра глубокого эвтектического растворителя (ГЭР-5) на основе тетрабутиламмония бромида (ТВАВ) и изопранола

Как видно из рисунка 3.28, широкая интенсивная полоса в области 3340-3360 cm^{-1} соответствует валентным колебаниям О-Н и указывает на наличие развитой системы водородных связей, что свидетельствует об образовании устойчивой сети межмолекулярных взаимодействий и успешном формировании эвтектической системы, что согласуется с литературными данными. Кроме того, полоса в области около 1650 cm^{-1} связана с деформационными колебаниями молекул воды, что указывает на присутствие следовых количеств влаги в системе.

3.6.2 Результаты ЯМР ^1H и ^{13}C глубоких эвтектических растворителей

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре JNM-ECA JEOL 400 с использованием CDCl_3 в качестве растворителя при рабочих частотах 399,78 и 100,53 МГц соответственно. Химические сдвиги определяли относительно сигналов остаточных протонов и атомов углерода дейтерированного растворителя. Метод ЯМР-спектроскопии является одним из наиболее информативных инструментов структурного анализа органических соединений, позволяя установить химическое окружение, тип и взаимное расположение атомов в молекуле, а также подтвердить чистоту и индивидуальность исследуемых веществ.

В рамках исследования ЯМР-спектроскопия использовалась для подтверждения структуры исходных компонентов и последующей идентификации их участия в формировании эвтектической системы. На рисунках 3.29 и 3.30 приведены ^1H ЯМР-спектры бетаина и глицерина, на

которых отчетливо наблюдаются сигналы, соответствующие характерным протонам функциональных групп данных соединений. Анализ положения, формы и интегральной интенсивности сигналов позволяет однозначно подтвердить химическую природу исследуемых соединений и служит основой для дальнейшего сопоставления со спектрами соответствующих глубоких эвтектических растворителей.

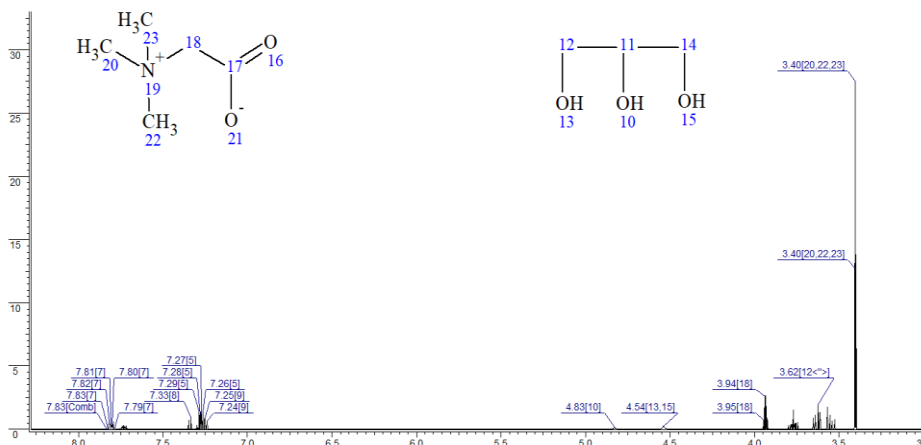


Рисунок 3.29 – Модель ^1H ЯМР-спектров бетаина и глицерина

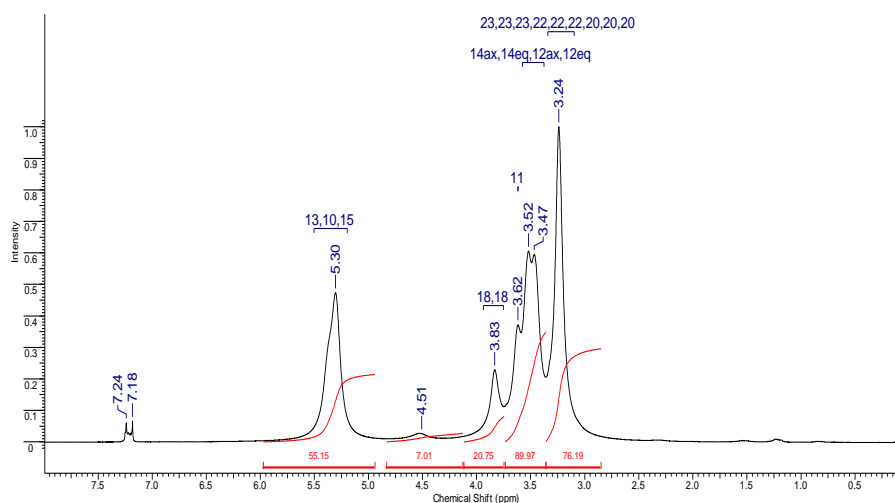


Рисунок 3.30 – ^1H ЯМР-спектры бетаина и глицерина (ГЭР 1) в растворе CDCl_3

В ^1H ЯМР-спектре бетаина сигналы метиленовых протонов Н-18,18 наблюдаются в виде синглета при 3,83 ppm с интегральной интенсивностью 20,08 Н. Метиленовые протоны глицерина Н-12ax, Н-14ax и Н-12eq, Н-14eq регистрируются в виде мультиплета в области 3,47-3,52 ppm с интегральной интенсивностью 86,66 Н, тогда как метиновый протон молекулы глицерина проявляется в виде синглета при 3,62 ppm. Протоны гидроксильных групп глицерина (Н-13, Н-10, Н-15) наблюдаются в виде интенсивного синглета при 5,31 ppm с интегральной интенсивностью 53,13 Н.

В ^{13}C ЯМР-спектре бетаина сигналы атомов углерода фиксируются при 53,24 (C-20, C-22, C-23), 66,18 (C-18) и 168,07 (C-17) ppm. Для глицерина характерные резонансы атомов углерода наблюдаются при 63,33 (C-12, C-14) и 72,87 (C-11) ppm (рисунки 3.31 и 3.32).

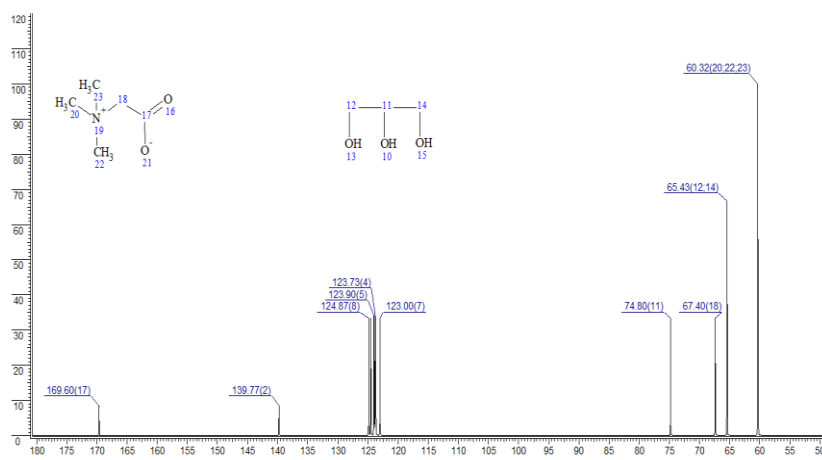


Рисунок 3.31 – Модель ^{13}C ЯМР бетаина и глицерина

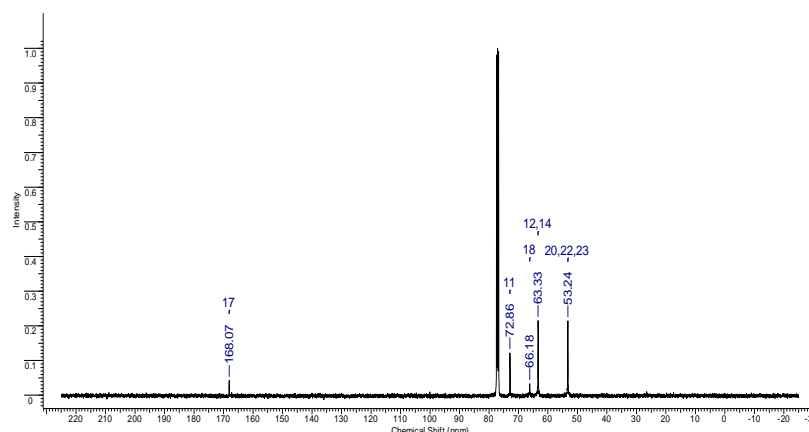


Рисунок 3.32 – ^{13}C ЯМР спектры бетаина и глицерина в растворе CDCl_3

3.6.3 Результаты дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК)

Холина хлорид:этиленгликоль (1:2):

– Низкотемпературный диапазон (-50...150 °С). Кривая ДСК (рис. 3.33а) характеризуется плавным изменением базовой линии без выраженных эндо- и экзотермических эффектов, что указывает на отсутствие фазового перехода плавления и свидетельствует об аморфном (переохлажденном) состоянии системы, типичном для эвтектических жидкостей с развитой сетью водородных связей. Аналогичное поведение описано в работе Nauler.

– Высокотемпературный диапазон (30...550 °С). На кривой ДСК (рис. 3.33b) наблюдается выраженный эндотермический эффект в области 200-280 °С, соответствующий процессам термического разложения, а не плавлению. Согласно данным Peeters et al., ГЭР на основе холинхлорида начинают

разлагаться при температурах выше ~ 180 °С. Таким образом, термостабильность системы холина хлорида:этиленгликоля ограничена температурой около 180 °С; отсутствие экзотермических эффектов кристаллизации дополнительно подтверждает ее кинетическую устойчивость до начала деструкции.

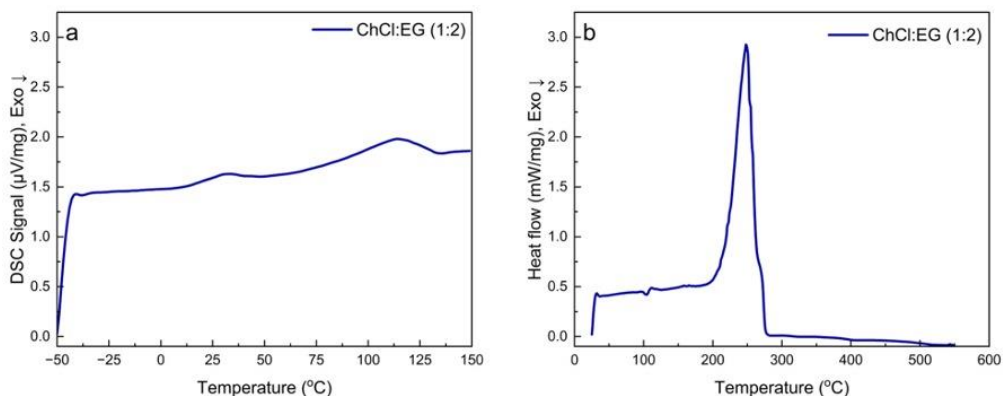


Рисунок 3.33 – ДСК-кривые глубокого эвтектического растворителя (ГЭР-3) холин хлорид:этиленгликоль (1:2): а) в диапазоне температур от -50 до 150 °С; б) в диапазоне температур от 30 до 550 °С

Тетрабутил аммония хлорид (ТВАС):молочной кислоты (LA) (1:2):

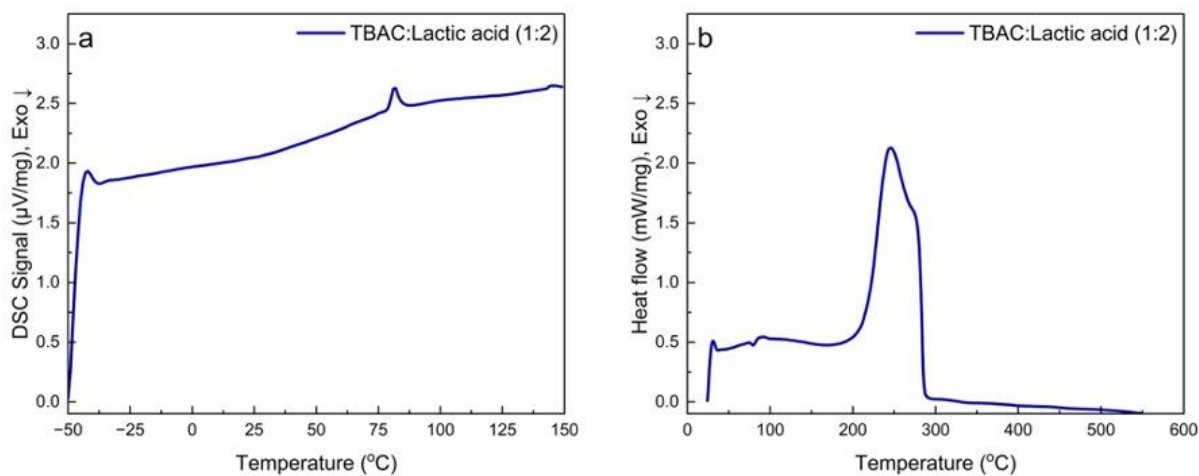


Рисунок 3.34 – ДСК-кривые глубокого эвтектического растворителя Тетрабутил аммония хлорид:молочная кислота (1:2): а) в диапазоне температур от -50 до 150 °С; б) в диапазоне температур от 30 до 550 °С

– Низкотемпературный диапазон (-50...150 °С). Кривая ДСК (рис. 3.34а) характеризуется относительно стабильной базовой линией в относительных единицах ($\mu\text{V}/\text{mg}$) с плавным эндотермическим дрейфом. При этом фиксируются незначительные ступенчатые отклонения в области около -45 °С, а также слабовыраженный эндотермический эффект в интервале 75-100 °С. Наблюдаемые особенности могут быть связаны с процессами стеклования или структурной релаксации, возможным фазовым переходом (плавлением) и/или

влиянием примесей, в частности следовых количеств влаги либо свободного компонента.

– Высокотемпературный диапазон (30...550 °С). В высокотемпературной области на кривой ДСК (рис. 3.34b) регистрируется выраженный эндотермический пик в интервале 230-300 °С, соответствующий термическому разложению молочной кислоты и разрушению водородной сети в системе Тетрабутил аммония хлорид (ТВАС):молочной кислоты (LA) (1:2). Известно, что молочная кислота подвергается дегидратации и деструкции при температурах порядка 300 °С, что хорошо согласуется с полученными результатами. Отсутствие дополнительных тепловых эффектов при температурах выше 350 °С свидетельствует о практически полном разложении и испарении компонентов эвтектической системы.

3.6.4 Результаты термогравиметрического анализа (ТГА) ГЭР Холин хлорид:этиленгликоль (1:2):

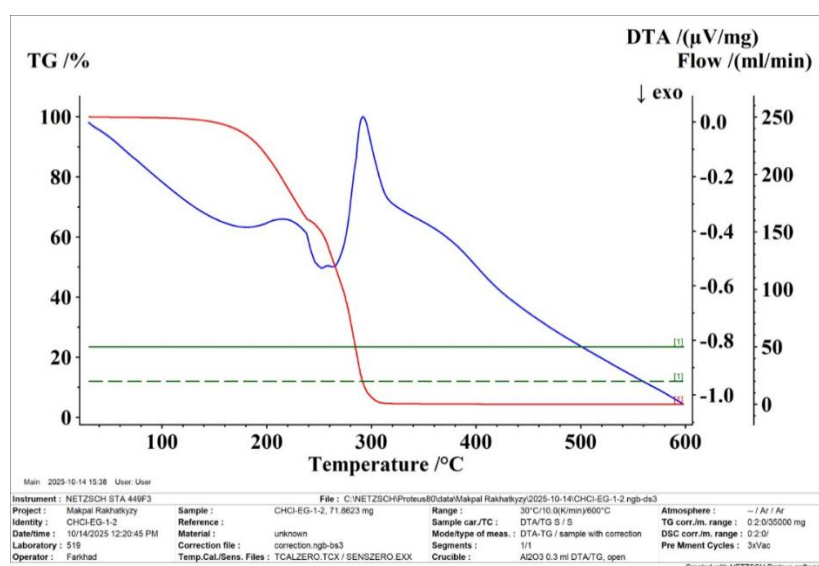


Рисунок 3.35 - термогравиметрический анализ ГЭР-3 Холина хлорида:этиленгликоля (1:2)

ГЭР-3 на основе Холина хлорида:этиленгликоля характеризуется умеренной термической стабильностью, при этом начало термического разложения наблюдается при температуре порядка ~180 °С. Полученное значение хорошо согласуется с литературными данными для глубоких эвтектических растворителей на основе хлорида холина. В связи с этим практическое применение данной системы целесообразно ограничивать температурным диапазоном ниже 150-170 °С, что позволяет избежать развития деструктивных процессов и сохранить структурную устойчивость растворителя.

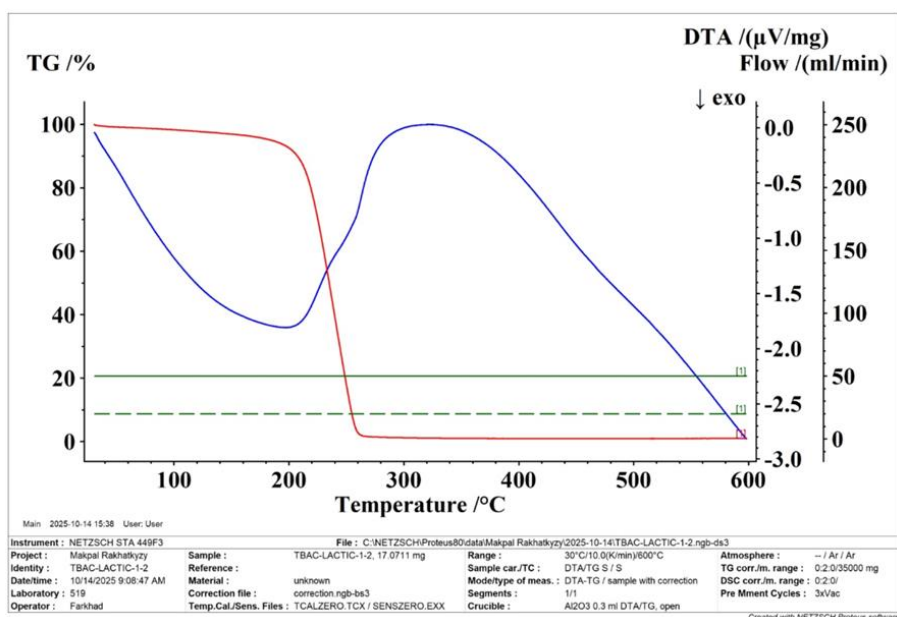


Рисунок 3.36 - термогравиметрический анализ ГЭР-4 Тетрабутил аммония хлорид:молочная кислота (1:2)

ГЭР-5 на основе тетрабутиламмония бромид (ТВАВ) и изопропанола характеризуется более высокой термической устойчивостью по сравнению с ChCl:EG, при этом начало термического разложения наблюдается при температуре порядка ~ 220 °C. Полученные результаты подтверждают, что глубокие эвтектические растворители на основе тетраалкиламмониевых солей обладают повышенной термостабильностью по отношению к аналогичным системам на основе хлорида холина, что расширяет область их потенциального применения в условиях повышенных температур.

3.6 Биодесульфуризация высокосернистой нефти месторождения «Каражанбас» Казахстана

Ранее в рамках выполнения других этапов и проектов, посвященных разработке глубоких эвтектических растворителей для десульфуризации топлив и нефтяных систем, были проведены предварительные эксперименты по удалению серосодержащих соединений с использованием только экстрактивного подхода на основе ГЭР. В ходе этих исследований были синтезированы и апробированы различные составы глубоких эвтектических растворителей, обладающие сродством к ароматическим соединениям серы, таким как тиофен и его производные.

В частности, были исследованы следующие системы ГЭР:

ГЭР-1: бетаин:глицерин (1:2), обеспечивающий удаление серы на уровне ~ 53 %;

ГЭР-3: холинхлорид:этиленгликоль (1:2), эффективность удаления ~ 49 %;

ГЭР-4: тетрабутиламмоний хлорид (ТВАС):молочная кислота (1:2), удаление серы ~51 %;

ГЭР-5: тетрабутиламмоний бромид (ТВАВ):изопропанол (1:2), эффективность ~50 %.

Полученные результаты показали, что глубокие эвтектические растворители способны обеспечивать умеренную степень экстрактивного извлечения серосодержащих соединений в мягких условиях, однако их самостоятельное применение не позволяет достичь глубокой очистки нефти и нефтяных продуктов от устойчивых гетероциклических соединений серы.

В связи с этим в настоящей работе предлагается дальнейшее развитие подхода путем объединения экстрактивных свойств ГЭР с биокаталитической активностью сероокисляющих микроорганизмов. Планируется проведение экспериментов по десульфуризации высокосернистой нефти в композиционных системах «ГЭР + микроорганизмы», что позволит повысить степень удаления серы за счет синергетического сочетания экстракции и биотрансформации серосодержащих соединений.

Для определения потенциала к микробной десульфуризации сырой нефти использовали минерально-синтетическую среду (МСС), в качестве источника углерода и серы - высокосернистую нефть месторождений «Каражанбас», в качестве экстрагентов и катализаторов биохимических процессов добавляли ГЭР-1 – смесь бетаина ($C_5H_{11}NO_2$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) [1:2], ГЭР-2 – смесь лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) [1:4].

Глубокие эвтектические растворители на основе глицерина, бетаина и лимонной кислоты обеспечивают защиту от осмотического стресса, температурного стресса, окислительного стресса и играют роль в поддержании внутриклеточного pH, обеспечивают легко усваивание источника азота [492], улучшает рост клеток, стимулируя выработку экзополисахаридов [493, 494]. Бетаин, входящий в состав ГЭР, рассматривается как метаболит, поддерживающий клеточный гомеостаз и ускоряющий адаптацию микроорганизмов, предотвращает денатурацию белков, поддерживает целостность мембран и одновременно стимулирует синтез экзополисахаридов, повышающих устойчивость клеток к высоким концентрациям NaCl и другим ионным нагрузкам [493].

Основным активным компонентом данной системы выступает бетаин, который функционирует как совместимый осмолит, предотвращая повреждение клеток при стрессах, стабилизирует макромолекулы и одновременно может служить ценным питательным субстратом. В исследованиях Wargo MJ для *Pseudomonas aeruginosa* установлено, что глицин-бетаин, образующийся из холина, выполняет двойную роль: с одной стороны, он действует как осмопротектор, защищающий клетки от неблагоприятных факторов, а с другой, может использоваться как источник углерода и азота. Такой выбор функции определяется регуляцией метаболических путей и условиями среды, что подчёркивает универсальность и гибкость бетаина в клеточном метаболизме [492]. У *Bacillus subtilis* роль

глицин-бетаина также хорошо подтверждена: при воздействии холодового стресса данный осмолит активно аккумулируется клетками, выполняя функцию «совместимой соли». Это накопление предотвращает повреждение клеточных структур, поддерживает целостность мембран и обеспечивает стабильность метаболических процессов в условиях пониженных температур [495]. ГЭР-1 на основе Vet:Gly (1:2) бетаин обеспечивает осмо- и стрессопротекцию/гомеостаз, а глицерин дает мягкую, биосовместимую среду и субстратный вклад [496]. Растворитель на основе лимонной кислоты и глицерина в молярном соотношении 1:4 образует натуральный глубокий эвтектический растворитель, способный эффективно растворять как полярные, так и слабополярные вещества. Его формирование и стабильность подтверждены экспериментально: компоненты связываются водородными связями при нагревании, образуя однородный прозрачный раствор [497]. В исследованиях показали, что глицерин-лимонная кислота ГЭР успешно используются как экологически чистый экстрагент, которые обладают низкой токсичности и кислотности [498].

В таблице 3.21 представлены результаты биодесульфуризации без ГЭР.

Таблица 3.21 – Биодесульфуризации высокосернистой нефти без добавления ГЭР

Наименование микроорганизмов	Начальная концентрация серы, %	Концентрация серы после биодесульфуризации, %	Процентный показатель удаленной серы, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B5807	2,129 %	1,383 %	32,8 %
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AC1039	2,129 %	0,102 %	95,2 %
<i>Pseudomonas putida</i> B1827	2,129 %	1,554 %	27,0 %
<i>Bacillus cereus</i> SFN2	2,129 %	0,518 %	75,6 %
<i>Bacillus thuringiensis</i> SFN3	2,129 %	0,081 %	96,1 %

На рисунках 3.37-3.41 представлены результаты роста микроорганизмов на среде с высокосернистой нефтью. На рисунках 3.42-3.46 показаны графики роста микроорганизмов на среде с высокосернистой нефтью с добавлением в качестве экстрагентов и катализаторов биохимических процессов ГЭР- 1, ГЭР-2. Контролем послужили варианты опытов без микроорганизмов.

Культивирование штамма *Bacillus cereus* (SFN-2) (Рисунок 3.37) на среде с добавлением сырой нефти показало устойчивую положительную динамику роста в течение эксперимента. Численность популяции на первые сутки составляла $(2,41 \pm 0,12) \times 10^6$ КОЕ/мл. Уже к 2-м суткам количество клеток увеличилось более чем на два порядка и достигло $(1,26 \pm 0,06) \times 10^8$ КОЕ/мл, что свидетельствует о быстрой адаптации штамма к углеводородной среде и активации метаболических путей, обеспечивающих утилизацию сероорганических соединений. Наиболее интенсивный рост отмечался в

промежутке 2-5 суток, когда численность микроорганизмов достигла максимального значения $(1,96 \pm 0,11) \times 10^9$ КОЕ/мл. На 7-е сутки показатели оставались на сопоставимом уровне $(1,94 \pm 0,11) \times 10^9$ КОЕ/мл, что указывает на переход к стационарной фазе, при которой сохраняется высокая плотность популяции. К 10-м суткам зафиксировано снижение численности клеток до $(1,24 \pm 0,04) \times 10^8$ КОЕ/мл.

Таким образом, *Bacillus cereus* (SFN-2) проявил способность к быстрому росту и эффективному использованию нефти в качестве источника углерода и серы. Динамика изменений численности клеток подтверждает его потенциал для дальнейшего изучения в процессах микробной десульфуризации.

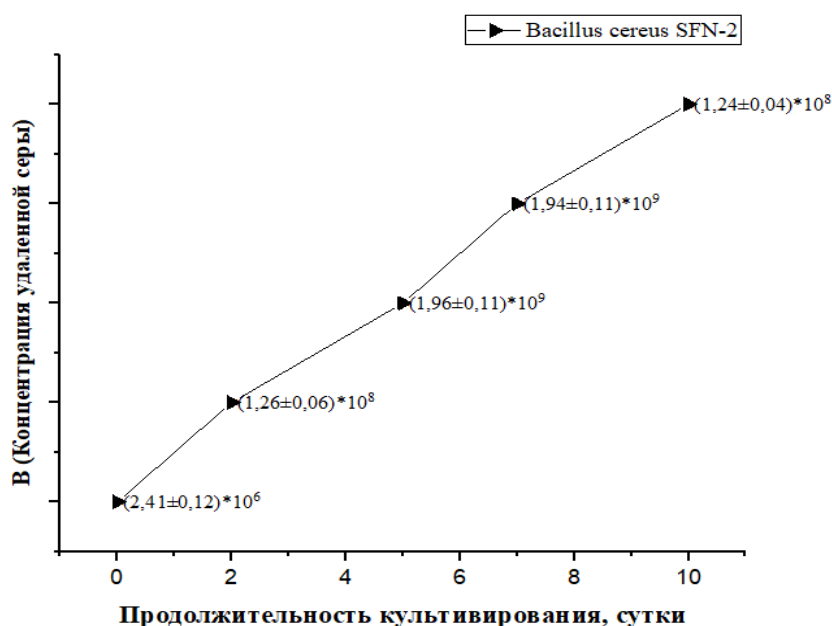


Рисунок 3.37 – Рост штамма *Bacillus cereus* (SFN2) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Культивирование штамма *Bacillus thuringiensis* (SFN-3) (Рисунок 3.38) на среде с добавлением сырой нефти сопровождалось последовательным ростом численности клеточной популяции в течение 10 суток. Численность популяции на первые сутки составляла $(4,96 \pm 0,19) \times 10^6$ КОЕ/мл. Уже к 2-м суткам наблюдалось увеличение более чем на два порядка, до $(1,29 \pm 0,06) \times 10^8$ КОЕ/мл, что свидетельствует о быстрой адаптации штамма к углеводородной среде и активации метаболических процессов. В период 2-5 суток рост оставался интенсивным: численность клеток возросла до $(1,42 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл. На 7-е сутки популяция достигла значения $(1,52 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл, что отражает устойчивое развитие и сохранение высокой биомассы. К 10-м суткам наблюдалось снижение численности клеток до $(1,55 \pm 0,09) \times 10^8$ КОЕ/мл, что свидетельствует о выходе культуры из активной фазы размножения и снижении интенсивности роста. Таким образом, штамм

Bacillus thuringiensis (SFN-3) продемонстрировал выраженную способность к адаптации и эффективному использованию нефти как источника углерода и серы. В отличие от штамма SFN-2, динамика роста *B. cereus* (SFN-3) характеризуется более стабильным поддержанием высокой численности клеток до конца эксперимента, что подчёркивает его перспективность для применения в процессах микробной десульфуризации.

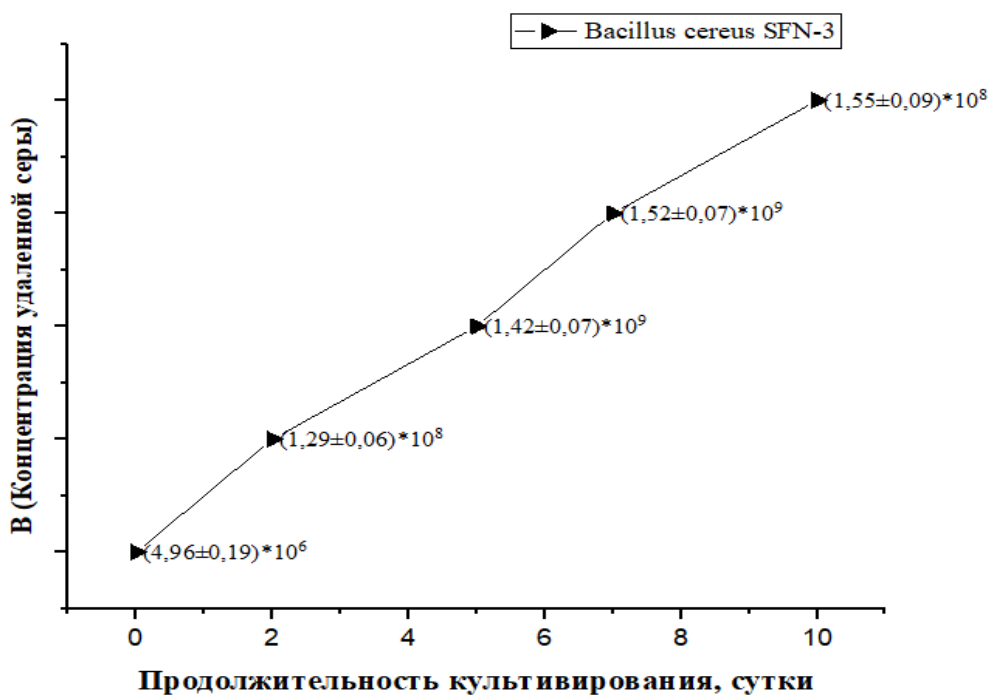


Рисунок 3.38 – Рост штамма *Bacillus thuringiensis* (SFN3) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Динамика роста штамма *Rhodococcus erythropolis* (AC-1039) (Рисунок 3.39) при культивировании на среде с высокосернистой нефтью продемонстрировала выраженное увеличение численности клеточной популяции в первые 7 суток эксперимента. Численность популяции на первые сутки составляла $(3,62 \pm 0,17) \times 10^6$ КОЕ/мл. На вторые сутки численность увеличилась более чем на два порядка, достигнув $(2,42 \pm 0,12) \times 10^8$ КОЕ/мл, что указывает на быструю адаптацию микроорганизма к углеводородному субстрату. Первые пять суток продолжался интенсивный рост, и концентрация клеток составила $(8,05 \pm 0,22) \times 10^8$ КОЕ/мл. Максимальные показатели зафиксированы на 7-е сутки $(1,09 \pm 0,04) \times 10^9$ КОЕ/мл, что свидетельствует об активном использовании нефти в качестве источника углерода и серы. К 10-м суткам наблюдалось снижение численности клеток до $(3,44 \pm 0,14) \times 10^8$ КОЕ/мл, что отражает замедление метаболической активности. Таким образом, штамм *Rhodococcus erythropolis* (AC-1039) показал высокую способность к росту в условиях высокосернистой нефти, достигнув пика

численности порядка 10^9 КОЕ/мл, что подтверждает его перспективность для применения в процессах микробной десульфуризации.

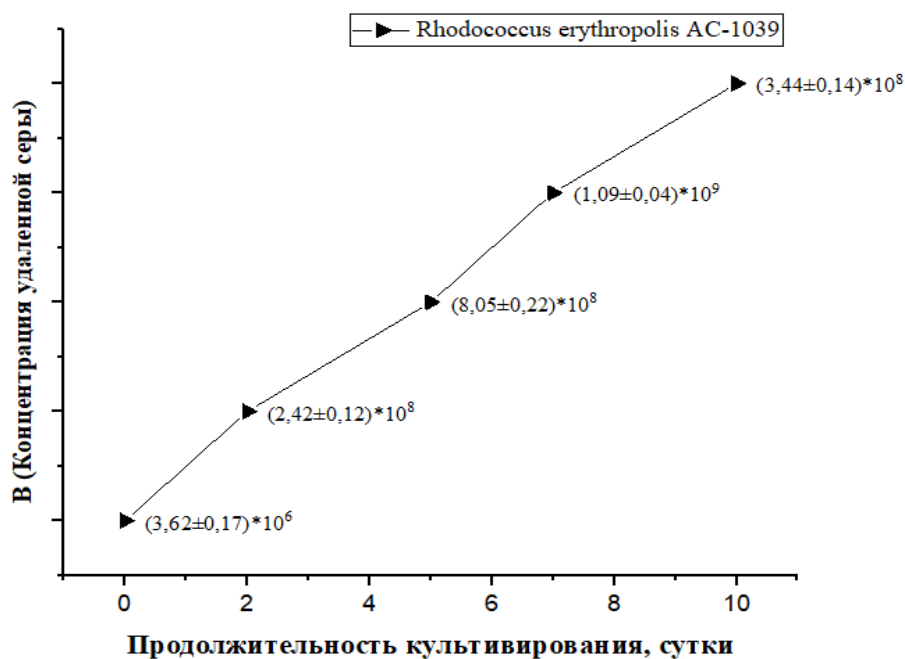


Рисунок 3.39 – Рост штамма *Rhodococcus erythropolis* (AC-1039) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

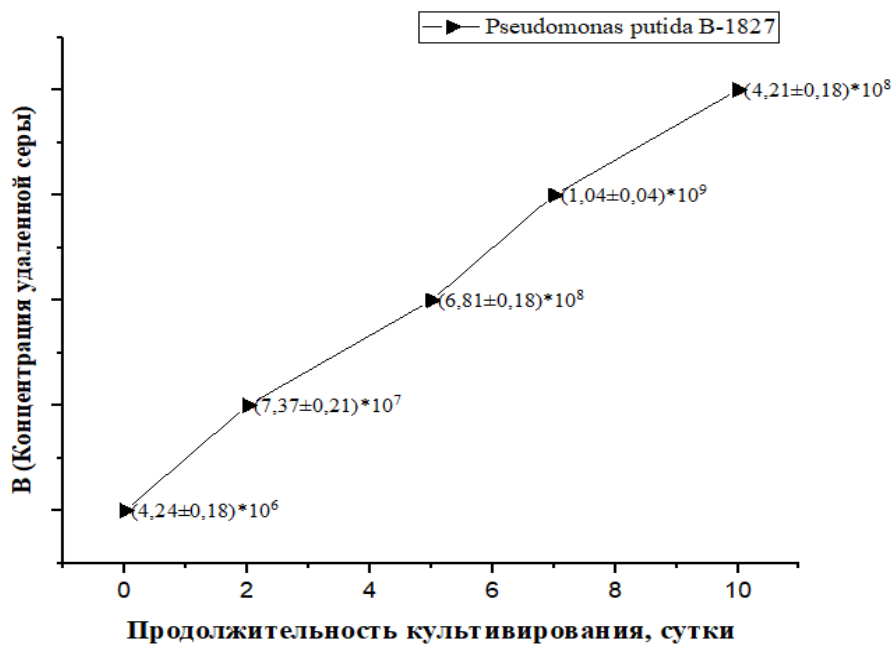


Рисунок 3.40 – Рост штамма *Pseudomonas putida* (B-1827) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Штамм *Pseudomonas putida* (B-1827) (Рисунок 3.40) продемонстрировал характерный ростовой профиль, включающий фазу интенсивного увеличения численности клеток и последующее снижение к концу эксперимента. Стартовое за первые двое суток возросло почти на два порядка ($4,24 \pm 0,18 \times 10^6$ КОЕ/мл), что указывает на высокую скорость адаптации к углеводородному субстрату. В дальнейшем наблюдалось стабильное увеличение популяции, и к 5-7 суткам численность достигала пиковых значений порядка 10^9 КОЕ/мл. Особенностью штамма является выраженный спад численности на 10-е сутки, до $4,21 \pm 0,18 \times 10^8$ КОЕ/мл, что может быть связано как с истощением доступных субстратов, так и с накоплением ингибирующих метаболитов. Такой результат отличает *Pseudomonas putida* от штаммов *Bacillus* (SFN-2, SFN-3), у которых либо наблюдалось более раннее снижение (SFN-2), либо удержание высокой численности дольше (SFN-3). Таким образом, *Pseudomonas putida* (B-1827) сочетает быстрый стартовый рост с выраженным последующим снижением популяции, что указывает на её высокую активность на начальных стадиях биотрансформации нефти, но ограниченную устойчивость в длительном культивировании.

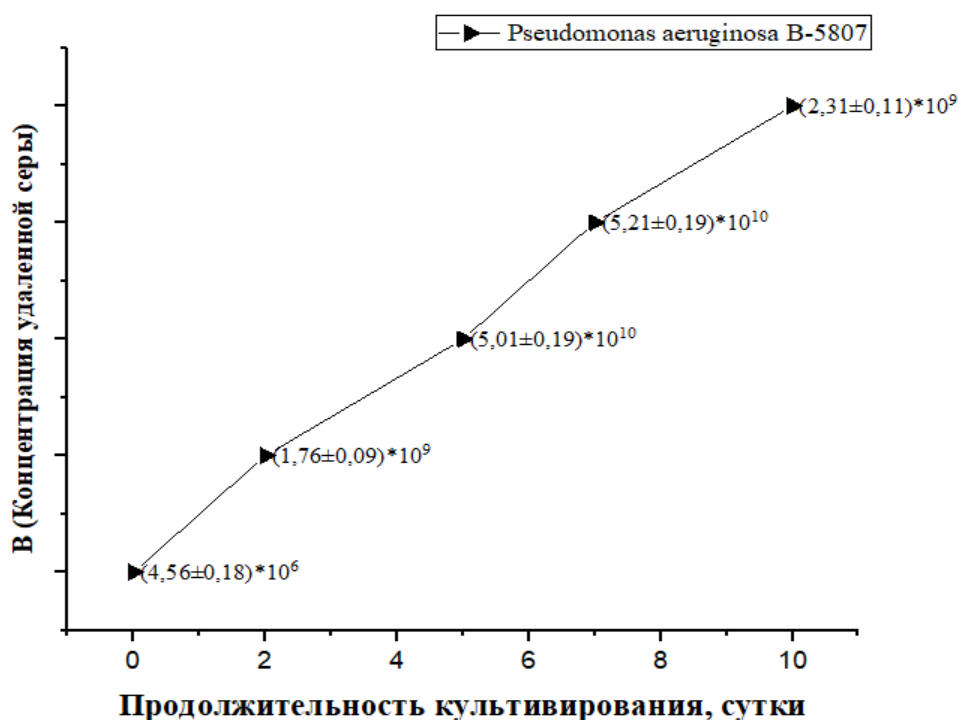


Рисунок 3.41 – Рост штамма *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) на среде с высокосернистой нефтью, КОЕ/мл

Динамика роста *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) (Рисунок 3.41) характеризовалась быстрым нарастанием численности клеток и выраженными колебаниями к концу эксперимента. Стартовая популяция $(4,56 \pm 0,18) \times 10^6$ КОЕ/мл уже к 2-м суткам увеличилась более чем на три порядка, достигнув

$(1,76 \pm 0,09) \times 10^9$ КОЕ/мл, что свидетельствует о крайне быстрой адаптации и высокой метаболической активности штамма. На 5-е и 7-е сутки численность микроорганизмов превысила 10^{10} КОЕ/мл ($5,01 \pm 0,19$ и $5,21 \pm 0,19$ соответственно), что является наибольшим значением среди исследованных культур. Такой результат указывает на уникальную способность *P. aeruginosa* эффективно использовать углеводородный субстрат и быстро формировать биомассу в условиях высокой сернистости. Однако к 10-м суткам зафиксировано резкое снижение клеточной численности до $(2,31 \pm 0,11) \times 10^9$ КОЕ/мл. Это может быть связано с исчерпанием питательных компонентов нефти, накоплением ингибирующих метаболитов. В целом, штамм *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) продемонстрировал наибольшую интенсивность роста и выход биомассы по сравнению с другими микроорганизмами, однако его активность оказалась нестабильной на поздних сроках культивирования.

Таким образом, в ходе наблюдений за динамикой роста микроорганизмов на высокосернистой нефти выявлено, что все культуры активно размножаются, что означает активное деструктирование единственного источника углерода – высокосернистой нефти. Так, максимальное увеличение количества клеток наблюдается для культуры *Pseudomonas aeruginosa* B-5807 на 4 порядка – с 10^6 до 10^{10} КОЕ/мл, далее для остальных 4-х культур (*Rhodococcus erythropolis* AC 1039, *Pseudomonas putida* B-1827, *Bacillus cereus* SFN-2, *Bacillus thuringiensis* SFN-3) наблюдается увеличение содержания клеток на 3 порядка.

В таблице 3.22 представлены результаты биодесульфурзации с добавлением ГЭР-1.

Таблица 3.22 – Биодесульфурзации высокосернистой нефти с добавлением ГЭР-1

Наименование микроорганизмов	Начальная концентрация серы, %	Концентрация серы после биодесульфурзации, %	Процентный показатель удаленной серы, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B5807	2,129 %	0,211 %	90,0 %
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AC1039	2,129 %	0,361 %	83,0 %
<i>Pseudomonas putida</i> B1827	2,129 %	1,758 %	17,4 %
<i>Bacillus cereus</i> SFN2	2,129 %	0,396 %	81,3 %
<i>Bacillus thuringiensis</i> SFN3	2,129 %	1,082 %	49,1 %

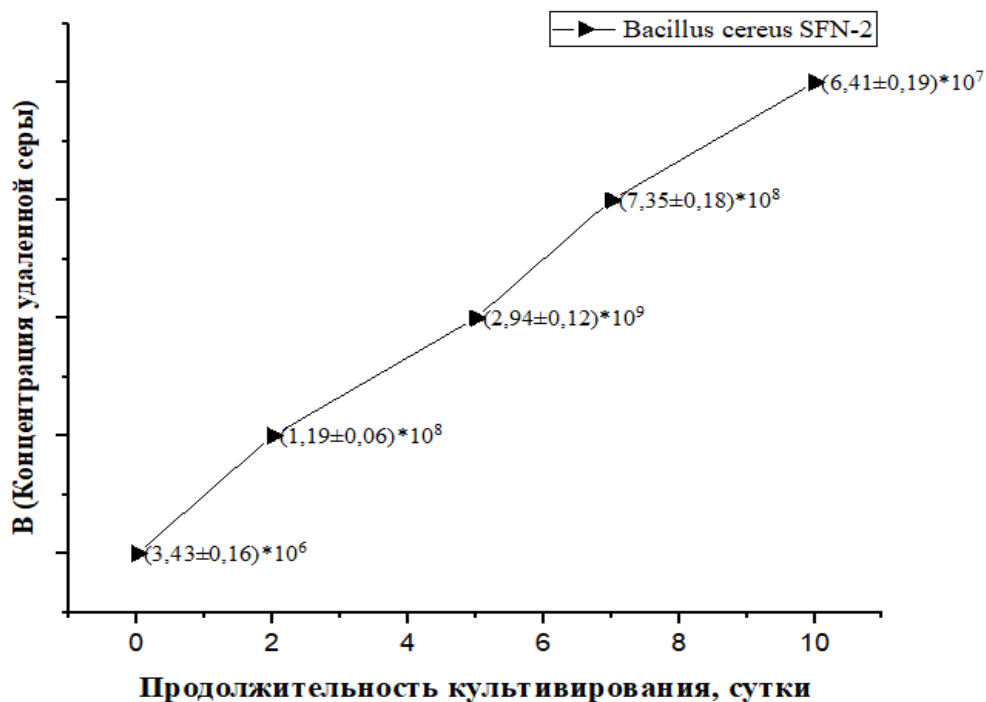


Рисунок 3.42 – Рост штамма *Bacillus cereus* (SFN-2) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-1 (2 %), КОЕ/мл

Графики рисунков 3.42-3.46 показали, что все исследуемые культуры бактерий с первых суток интенсивно размножаются на среде с ГЭР, при этом наблюдается незначительное стимулирование роста клеток в сравнении с ростом без ГЭР. Максимальное увеличение количества клеток выявлено также для культуры *Pseudomonas aeruginosa* B-5807 на 4 порядка – с 10^6 до 10^{10} КОЕ/мл. Для остальных 4-х культур микроорганизмов (*Rhodococcus erythropolis* AC 1039, *Pseudomonas putida* B-1827, *Bacillus cereus* SFN-2, *Bacillus thuringiensis* SFN-3) также наблюдается увеличение содержания клеток на 3 порядка.

По сравнению с исследованиями без добавления ГЭР, где численность клеток снижалась только к концу эксперимента, в присутствии экстрагента наблюдалась более выраженная динамика с резким подъемом и последующим падением. Исходная концентрация популяции составляла $(3,43 \pm 0,16) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Уже к 2-м суткам количество клеток увеличилось почти на два порядка и достигло $(1,19 \pm 0,06) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Максимальные показатели зафиксированы на пятые сутки $(2,94 \pm 0,12) \cdot 10^9$ КОЕ/мл, что отражает интенсивное использование нефти и катализирующее влияние ГЭР-1.

Однако в последующие сроки численность начала снижаться: на 7-е сутки до $(7,35 \pm 0,18) \cdot 10^8$, а к 10-м суткам $(6,41 \pm 0,19) \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Подобное уменьшение может быть связано не только с переходом культуры в стационарную фазу, но и с ослаблением действия ГЭР-1.

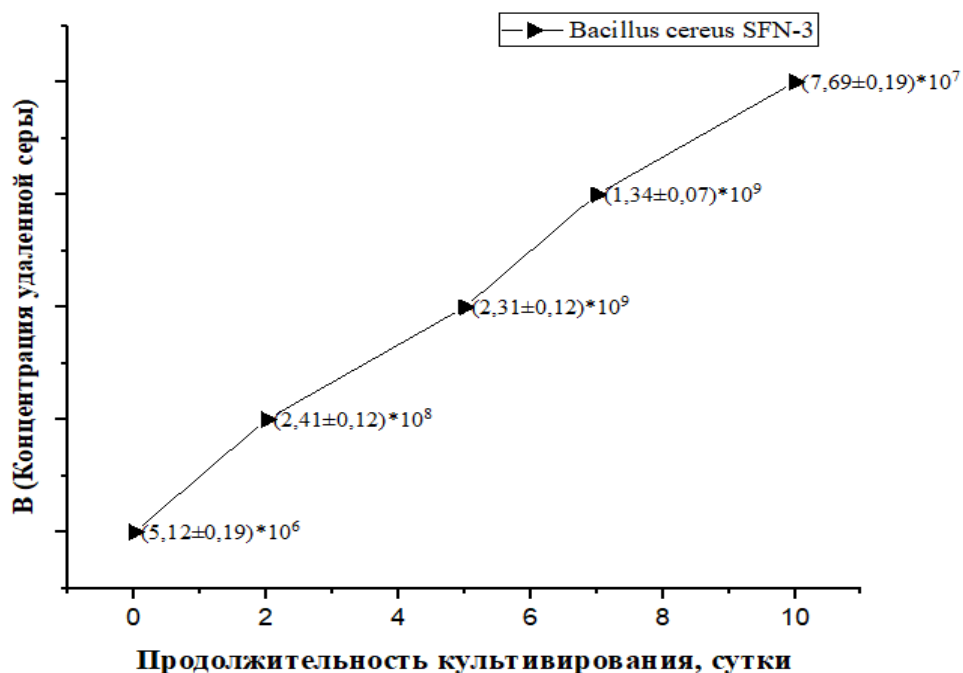


Рисунок 3.43 – Рост штамма *Bacillus thuringiensis* (SFN-3) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-1 (2 %), КОЕ/мл

Вероятно, компоненты экстрагента (бетаин и глицерин) подверглись частичному разложению или метаболизму, в результате чего их катализирующее влияние снизилось, а в среде накопились ингибирующие продукты. Таким образом, добавление ГЭР-1 способствовало ускорению начальной фазы роста *Bacillus cereus* (SFN-2) (Рисунок 3.42), но не обеспечило устойчивого поддержания высокой численности клеток на протяжении всего эксперимента. Это указывает на необходимость его непрерывное добавления в питательную среду при использовании в десульфуризационных процессах.

При добавлении экстрагента ГЭР-1 рост штамма *Bacillus thuringiensis* (SFN-3) (Рисунок 3.43) приобрёл иной характер по сравнению с контролем. Уже в первые двое суток клеточная численность увеличилась почти на два порядка $(2,41 \pm 0,12) \times 10^8$ КОЕ/мл, что свидетельствует о быстрой активации метаболических процессов и эффективном использовании компонентов среды. На промежуточных этапах (5-7 сутки) популяция достигала высоких значений порядка 10^9 КОЕ/мл, отражая стимулирующее влияние ГЭР-1 на интенсивность роста бактерий.

Однако к 10-м суткам численность микроорганизмов резко снизилась до $(7,69 \pm 0,19) \times 10^7$ КОЕ/мл из-за снижения активности добавленного глубокого эвтектического растворителя вследствие его частичного разложения или метаболической переработки.

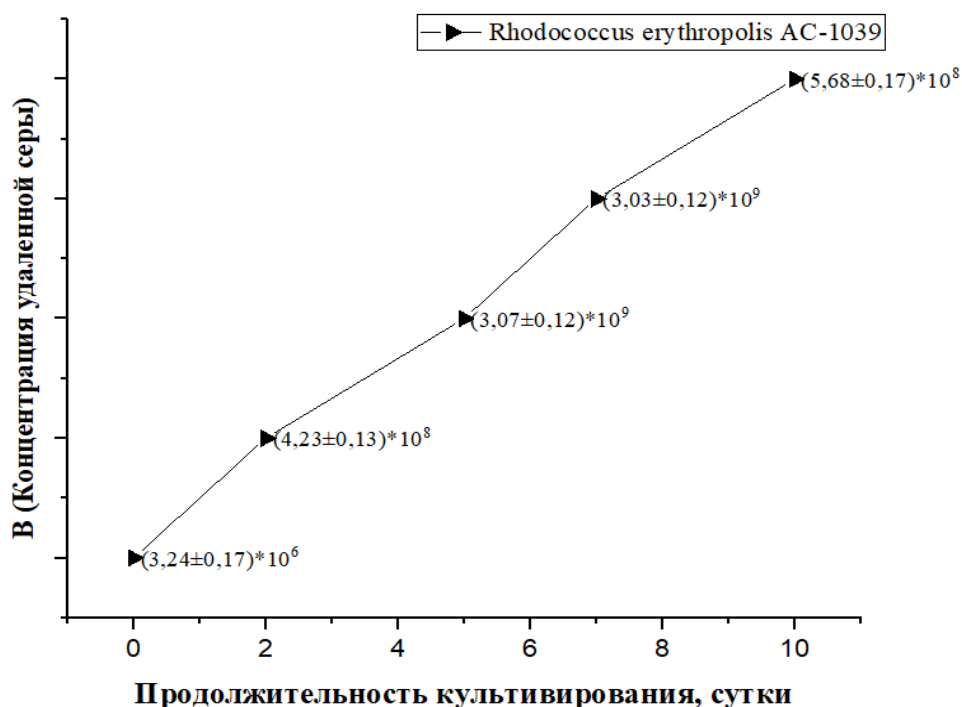


Рисунок 3.44 – Рост штамма *Rhodococcus erythropolis* (АС-1039) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-1 (2 %), КОЕ/мл

Таким образом, введение ГЭР-1 стимулировало быстрый рост и достижение высоких значений биомассы на ранних этапах культивирования, но не обеспечило стабильности популяции к концу эксперимента. Это подчёркивает необходимость подбора оптимального режима применения ГЭР-1, в том числе его возможного повторного дозирование в среду при биодесульфуризации с применением катализаторов.

Внесение ГЭР-1 заметно изменило динамику развития штамма *Rhodococcus erythropolis* (АС-1039) (Рисунок 3.44) по сравнению с контролем. Уже к 2-м суткам численность клеток увеличилась почти на два порядка, достигнув $(4,23 \pm 0,13) \times 10^8$ КОЕ/мл, что указывает на ускоренную адаптацию микроорганизма к углеводородной среде. В дальнейшем, в течение 5-7 суток, сохранялись высокие значения порядка 10^9 КОЕ/мл ($(3,07 \pm 0,12) \times 10^9$ и $(3,03 \pm 0,12) \times 10^9$), что отражает устойчивость популяции и способность штамма эффективно использовать сероорганические соединения. К концу эксперимента численность клеток снизилась до $(5,68 \pm 0,17) \times 10^8$ КОЕ/мл. Таким образом, *Rhodococcus erythropolis* (АС-1039) в присутствии ГЭР-1 демонстрирует выраженный рост и длительное удержание высокой численности клеток на промежуточных стадиях, однако к завершению эксперимента его популяция снижается. Это указывает на стимулирующий, но ограниченный во времени эффект катализатора.

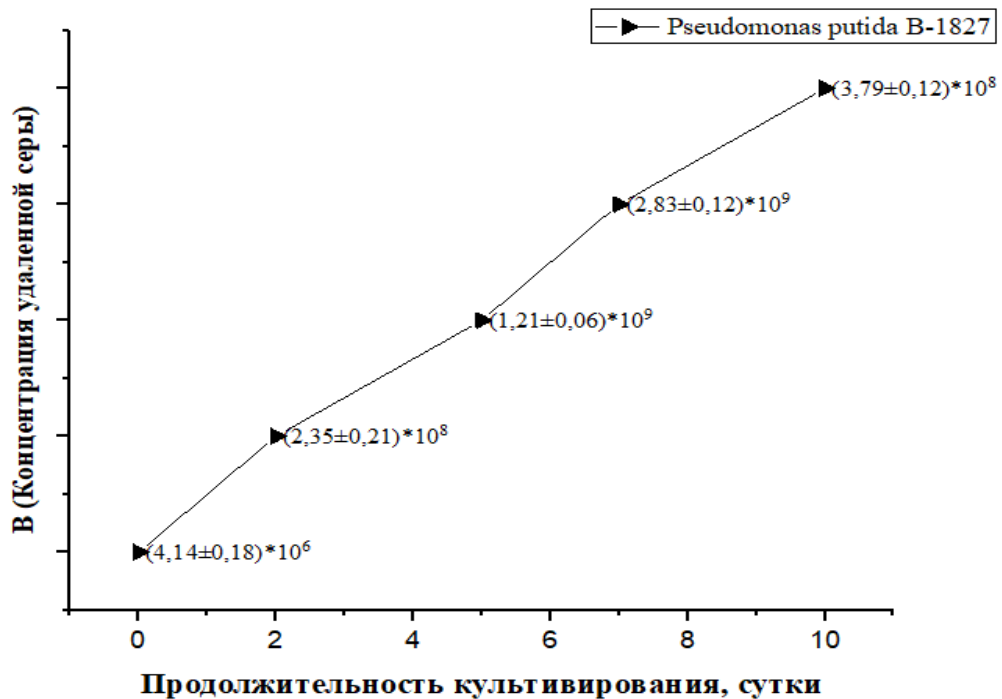


Рисунок 3.45 – Рост штамма *Pseudomonas putida* (B-1827) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-1 (2 %), КОЕ/мл

Добавление ГЭР-1 придало динамике роста *Pseudomonas putida* (B-1827) (Рисунок 3.45) более выраженный характер по сравнению с без добавления катализатора. Уже в первые двое суток численность клеток возросла с $(4,14 \pm 0,18) \cdot 10^6$ до $(2,35 \pm 0,21) \cdot 10^8$ КОЕ/мл, что отражает быструю адаптацию микроорганизма. Наибольшая активность приходилась на 5-7 сутки: численность достигала $(1,21 \pm 0,06) \cdot 10^9$ и $(2,83 \pm 0,12) \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно, что указывает на катализирующую роль экстрагента в интенсификации метаболизма. Однако для этого микроорганизма такие же были показатели, к 10-м суткам численность популяции снизилась почти на порядок до $(3,79 \pm 0,12) \cdot 10^8$ КОЕ/мл из-за снижения объема ГЭР в питательной среде. Это свидетельствует о том, что стимулирующий эффект ГЭР-1 был ограничен по времени: после достижения пика рост замедлился. Таким образом, *Pseudomonas putida* (B-1827) в присутствии ГЭР-1 проявила высокую скорость роста и способность к достижению значительной численности в середине эксперимента, однако длительную стабильность популяции не смогли обеспечить из-за снижения питательных веществ. Это подчёркивает необходимость оптимизации дозировки и режима введения экстрагента для сохранения высокой активности штамма на более поздних сроках культивирования.

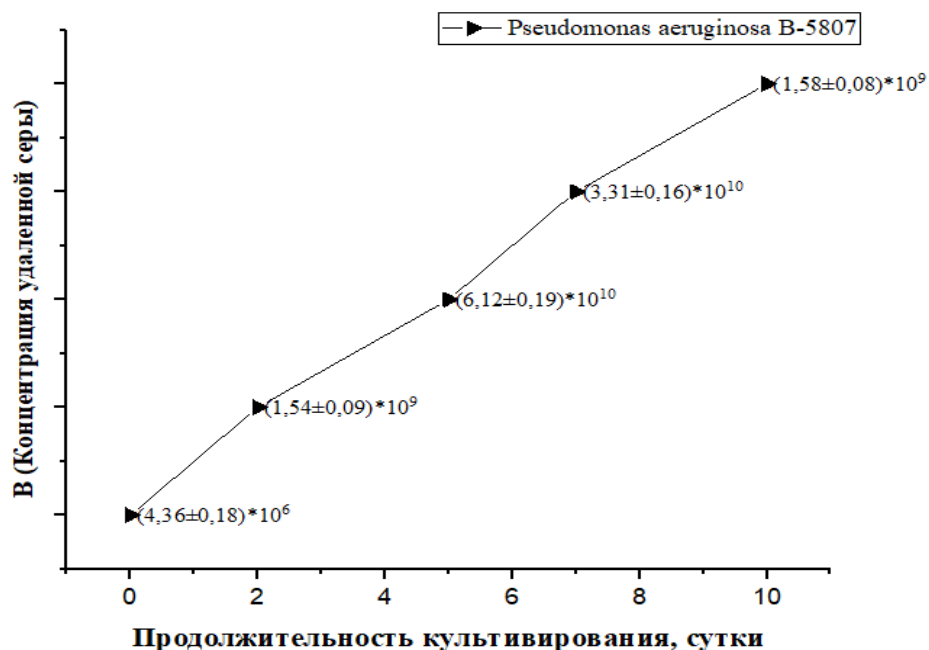


Рисунок 3.46 – Рост штамма *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-1 (2 %), КОЕ/мл

В присутствии ГЭР-1 рост штамма *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) (Рисунок 3.46) отличался наиболее высокой интенсивностью среди вышеперечисленных культур. Уже к 2-м суткам численность клеток возросла до $(1,54 \pm 0,09) \times 10^9$ КОЕ/мл, что на три порядка выше исходного уровня $(4,36 \pm 0,18) \times 10^6$. Кульминация наблюдалась на 5-е сутки, когда популяция достигла рекордных значений $(6,12 \pm 0,19) \times 10^{10}$ КОЕ/мл это максимальный показатель среди всех штаммов в условиях добавления ГЭР-1. В дальнейшем численность снижалась: на 7-е сутки она составила $(3,31 \pm 0,16) \times 10^{10}$, а к 10-м суткам $(1,58 \pm 0,08) \times 10^9$ КОЕ/мл. Подобное падение также указывает на краткосрочный характер стимулирующего эффекта экстрагента и возможное его разложение микроорганизмами. Таким образом, *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) проявила наибольшую продуктивность при использовании ГЭР-1, достигая значений порядка 10^{10} КОЕ/мл. Однако высокая скорость роста сопровождалась нестабильностью популяции на поздних этапах, что подчёркивает необходимость контроля режима применения экстрагента для сохранения длительного эффекта.

Таким образом, добавление в ферментируемую микробами среду с высокосернистой нефтью ГЭР-1, ГЭР-2 даёт незначительное стимулирование клеток всех пяти исследуемых микробных культур, однако для бактерий *Rhodococcus erythropolis* AC 1039 и *Pseudomonas putida* B-1827 показано увеличение скорости роста клеток при добавлении обоих экстрагентов: наблюдается увеличение содержания в среде клеток на 3 порядка на 5 сутки, тогда как без ГЭР такой показатель наблюдается только на 7-е сутки.

После микробной десульфуризации были проведены работы для химического определения массовой доли серы (%) в составе нефти. В таблице 3.23 представлены результаты биодесульфуризации с добавлением ГЭР-2.

Таблица 3.23 – Биодесульфуризации высокосернистой нефти с добавлением ГЭР-2

Наименование микроорганизмов	Начальная концентрация серы, %	Концентрация серы после биодесульфуризации, %	Процентный показатель удаленной серы, %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B5807	2,129 %	0,0782 %	96,3 %
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AC1039	2,129 %	0,084 %	96,0 %
<i>Pseudomonas putida</i> B1827	2,129 %	1,520 %	28,6 %
<i>Bacillus cereus</i> SFN2	2,129 %	0,290 %	29 %
<i>Bacillus thuringiensis</i> SFN3	2,129 %	0,907 %	57,3 %

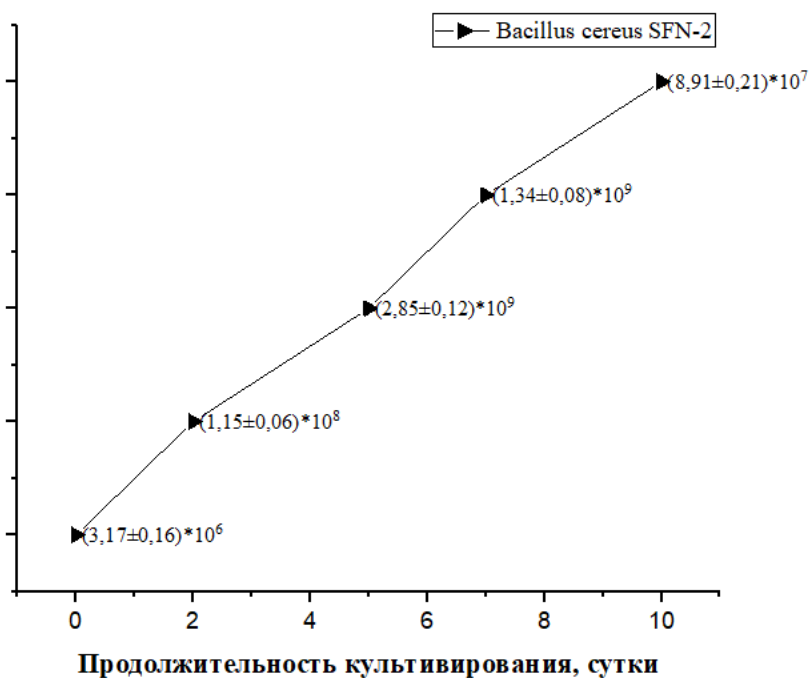


Рисунок 3.47 – Рост штамма *Bacillus cereus* (SFN-2) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-2 (2 %), КОЕ/мл

По сравнению с культивированием без экстрагентов, где численность клеток снижалась лишь к концу эксперимента, использование ГЭР-2 точно так же как с добавлением ГЭР-1, придало ростовой динамике более выраженный характер с быстрым подъемом численности и последующим снижением на поздних сроках. Начальная концентрация клеток составляла $(3,17 \pm 0,16) \times 10^6$ КОЕ/мл. Уже к 2-м суткам популяция увеличилась почти на два порядка, до $(1,15 \pm 0,06) \times 10^8$. Максимальные значения наблюдались на 5-е сутки, $(2,85 \pm 0,12) \times 10^9$ КОЕ/мл, после чего численность снизилась на два раза и на 7-

е сутки составила $(1,34 \pm 0,08) \times 10^9$. К концу эксперимента (10-е сутки) популяция упала до $(8,91 \pm 0,21) \times 10^7$, что может быть так же связано с ослаблением активности ГЭР-2 в результате его метаболической переработки или деградациии в среде. Таким образом, добавление ГЭР-2 стимулировало ранние этапы роста *Bacillus cereus* (SFN-2) (Рисунок 3.47) и позволило достичь высоких значений численности клеток к середине эксперимента.

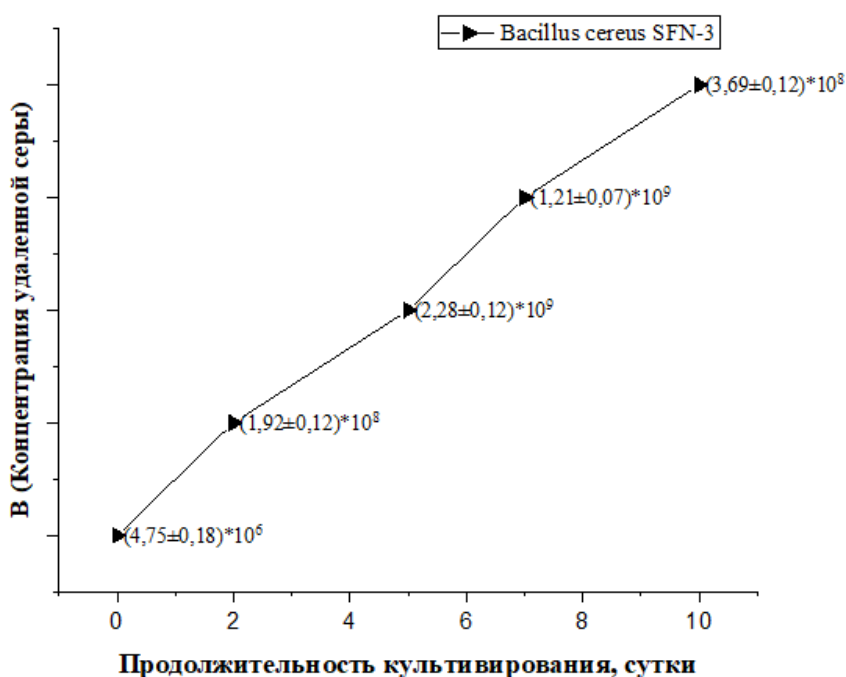


Рисунок 3.48 – Рост штамма *Bacillus cereus* (SFN-3) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-2 (2 %), КОЕ/мл

В присутствии ГЭР-2 активность роста штамма *Bacillus cereus* (SFN-3) (Рисунок 3.48) показала более стабильный характер по сравнению с вариантом без экстрагента. Стартовое значение $(4,75 \pm 0,18) \times 10^6$ КОЕ/мл за первые двое суток увеличилось до $(1,92 \pm 0,12) \times 10^8$, что указывает на ускоренную адаптацию культуры к углеводородной среде. Максимальный рост фиксировался на 5-е сутки $(2,28 \pm 0,12) \times 10^9$ КОЕ/мл, после чего численность клеток постепенно снижалась: $(1,21 \pm 0,07) \times 10^9$ на 7-е сутки и $(3,69 \pm 0,12) \times 10^8$ на 10-е сутки. В отличие от экспериментов с добавлением ГЭР-1, где наблюдалось более резкое падение численности, при использовании ГЭР-2 снижение происходило плавнее, что свидетельствует о более мягком и продолжительном действии данного экстрагента. Таким образом, *Bacillus cereus* (SFN-3) в условиях добавления ГЭР-2 продемонстрировал высокую активность в первые 5 суток и относительную устойчивость популяции на протяжении эксперимента. Это подтверждает, что ГЭР-2 способствует более сбалансированному росту и может рассматриваться как более перспективный катализатор по сравнению с ГЭР-1.

Использование ГЭР-2 заметно усилило ростовую активность *Rhodococcus erythropolis* (АС-1039) (Рисунок 3.49) на начальных этапах по сравнению с контролем. Уже к 2-м суткам численность клеток увеличилась почти на три порядка и достигла $(5,14 \pm 0,15) \times 10^8$ КОЕ/мл, что свидетельствует о быстрой адаптации культуры к углеводородной среде. В последующие сроки рост сохранял устойчивый характер: на 5-е и 7-е сутки показатели составляли $(1,17 \pm 0,07) \times 10^9$ и $(1,24 \pm 0,07) \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно, что отражает способность штамма поддерживать высокую численность в течение длительного времени. Однако, к 10-м суткам численность популяции снизилась до $(3,21 \pm 0,17) \times 10^8$, что, вероятно, связано с исчерпанием питательных ресурсов и частичной утратой активности катализатора.

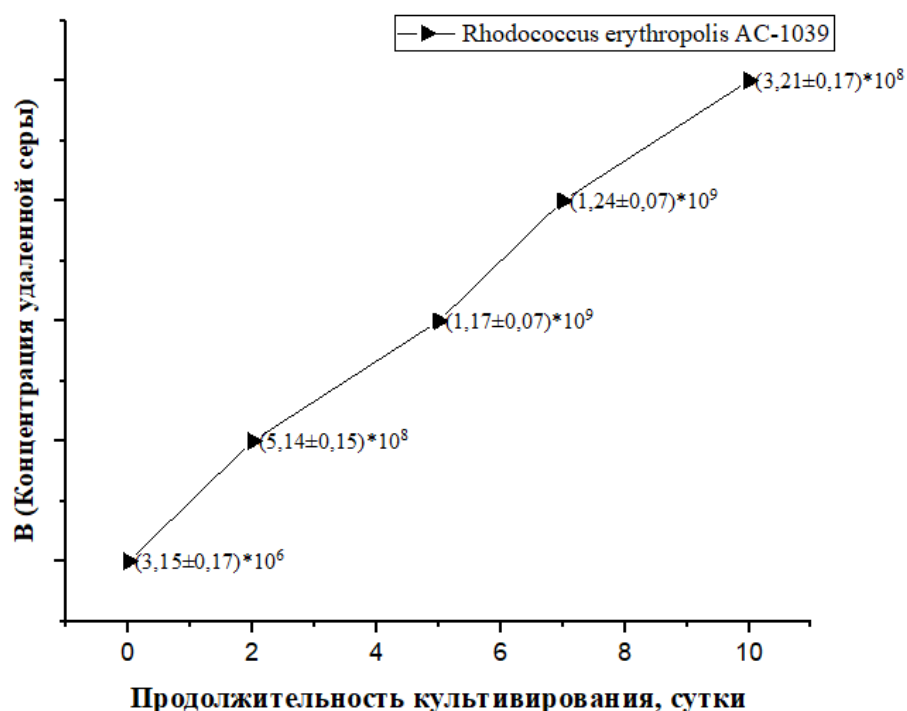


Рисунок 3.49 – Рост штамма *Rhodococcus erythropolis* (АС-1039) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-2 (2 %), КОЕ/мл

Таким образом, добавление ГЭР-2 стимулировало не только быстрый рост *Rhodococcus erythropolis* (АС-1039) на ранних стадиях, но и способствовало сохранению высокой плотности популяции до 7-х суток. Это подтверждает его эффективность как катализатора и отличает от ГЭР-1, при котором снижение численности происходило более резко.

При использовании ГЭР-2 ростовая динамика *Pseudomonas putida* (В-1827) (Рисунок 3.50) характеризовалась выраженным подъемом численности на средних сроках культивирования с последующим снижением к концу эксперимента. Начальная концентрация составляла $(3,15 \pm 0,18) \times 10^6$ КОЕ/мл. Уже к 2-м суткам наблюдалось увеличение почти на порядок, до $(5,41 \pm 0,21) \times 10^7$. Максимальные значения численности были зафиксированы

на 5-7 сутки: $(1,37 \pm 0,06) \times 10^9$ и $(3,69 \pm 0,12) \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно, что отражает катализирующее влияние ГЭР-2 и активное использование углеводородного субстрата микроорганизмами. К 10-м суткам численность клеток снизилась до $(2,21 \pm 0,11) \times 10^8$, что связано с исчерпанием питательных компонентов. Таким образом, добавление ГЭР-2 способствовало достижению высоких показателей численности популяции *Pseudomonas putida* (B-1827) в середине эксперимента, однако не обеспечило ее стабильного удержания до конца наблюдений. В сравнении с ГЭР-1, использование ГЭР-2 сопровождалось более плавной динамикой и меньшей резкостью падения, что делает его перспективным для оптимизации биодесульфуризации.

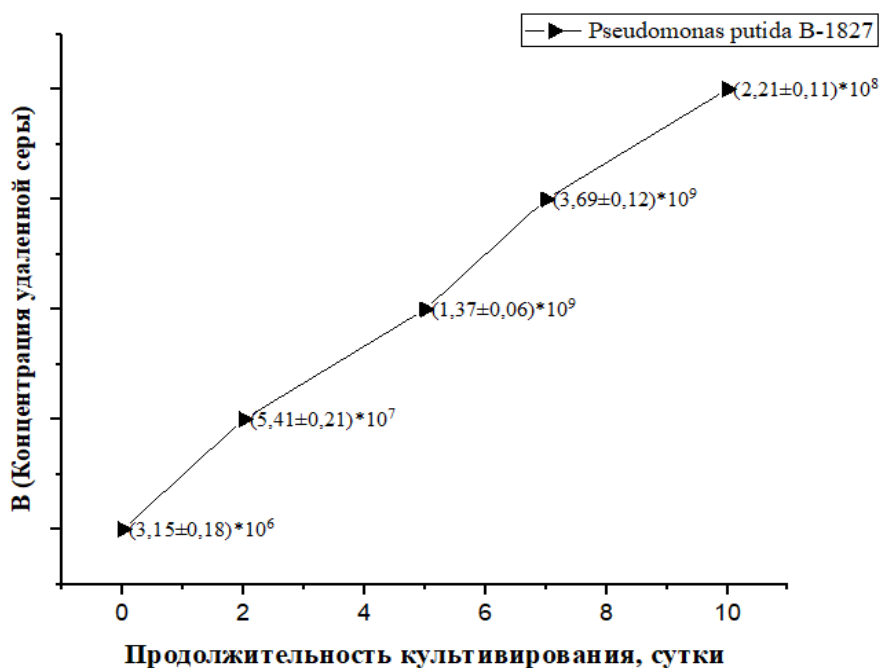


Рисунок 3.50 – Рост штамма *Pseudomonas putida* (B-1827) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-2 (2 %), КОЕ/мл

Введение ГЭР-2 усилило ростовую активность *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) (Рисунок 3.51), обеспечив достижение наиболее высоких значений среди исследованных штаммов. Уже на 2-е сутки численность клеток увеличилась на три порядка по сравнению с исходным уровнем, достигнув $(1,82 \pm 0,09) \times 10^9$ КОЕ/мл. Пик роста зафиксирован на 5-е сутки, $(7,73 \pm 0,17) \times 10^{10}$ КОЕ/мл, что отражает чрезвычайно высокую скорость размножения и интенсивное использование углеводородного субстрата в присутствии глубоких эвтектических растворителей. На более поздних сроках наблюдалось постепенное снижение численности: $(4,61 \pm 0,17) \times 10^{10}$ на 7-е сутки и $(2,12 \pm 0,11) \times 10^9$ на 10-е сутки. Такое падение указывает на кратковременность стимулирующего действия ГЭР-2. Однако, данный штамм показал наиболее высокие результаты среди всех исследованных микроорганизмов: и по скорости адаптации, и по пиковым значениям численности. Таким образом, *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) в условиях

добавления ГЭР-2 достигла наибольших показателей численности среди исследованных культур, что подчёркивает ее потенциал для процессов биодесульфурзации.

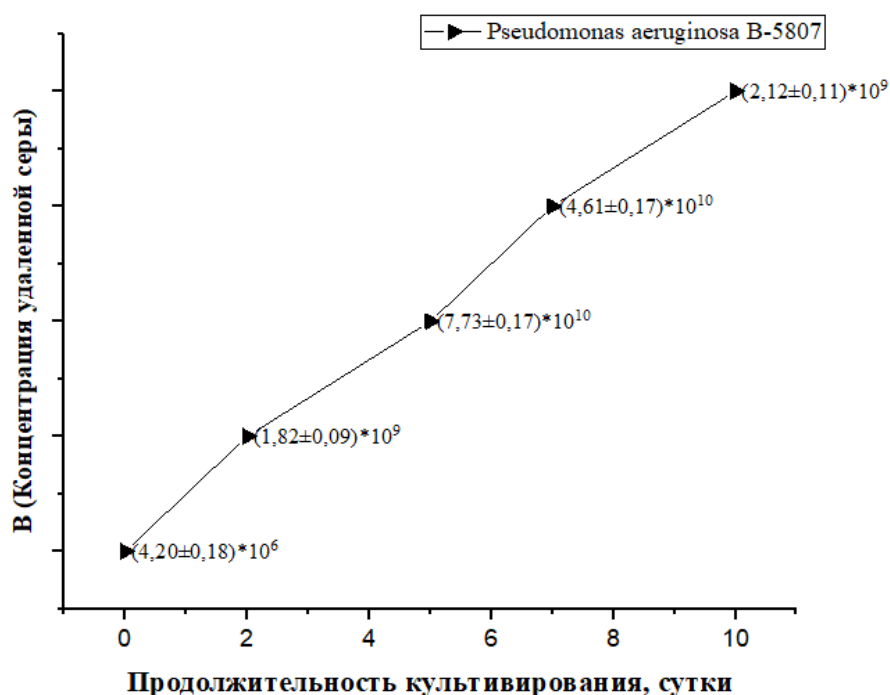


Рисунок 3.51 – Рост штамма *Pseudomonas aeruginosa* (B-5807) на среде с высокосернистой нефтью с добавлением ГЭР-2 (2 %), КОЕ/мл

Таким образом, в проведенных исследованиях наибольший процент десульфурзации (90 % и более) отмечен для штаммов *Bacillus thuringiensis* SFN3 (96,1 %) и *Rhodococcus erythropolis* AC1039 (95,2 %) из контрольной группы опытов. Штаммы *Pseudomonas aeruginosa* B5807 (90 %) из опыта с добавлением ГЭР-1, *Pseudomonas aeruginosa* B5807 (96,3 %) демонстрируют идеальные показатели как в исследованиях Olawumi O. Sadare и Michael O. Daramola [499]. *Rhodococcus erythropolis* AC1039 (96 %) из опыта с добавлением ГЭР-2. Сопоставимое снижение содержания серы было ранее описано для десульфурации нефтяных продуктов с помощью *R. erythropolis* в исследованиях Во Yu и соавторов, который достигли удалению серы до 94,5 % [293].

Результаты по химическому содержанию массовой доли серы коррелируют с результатами определения роста микроорганизмов на высокосернистой нефти (Рисунки 3.16-3.24 и 3.37-3.51). Изучение графиков показало, что в целом происходит активная микробная десульфурзация высокосернистой нефти. Так в исходной питательной среде содержание нефти составляет 2,129 %, добавление экстрагентов ГЭР №1 и ГЭР №2 интенсифицирует активный процесс микробной десульфурзации. Исходя из представленных данных, можно сделать вывод о том, что низкий процент содержания серы в конце эксперимента наблюдается для культур *Pseudomonas*

aeruginosa B-5807 при добавлении ГЭР-2 - 0,0782%, *Bacillus thuringiensis* SFN-3 - 0,081 %, *Rhodococcus erythropolis* AC 1039 при добавлении ГЭР-2 - 0,084 %. Максимальные показатели микробной десульфуризации нефти достигнуты: при добавлении ГЭР-2 - 0,0782-1,520 %; при добавлении ГЭР-1 - 0,211-1,758 %; а без добавления ГЭР показатель микробной десульфуризации составил 0,081-1,554 %.

Дисперсионный анализ показал, что эффективность действия фактора А (ГЭР-1, ГЭР-2) на результативный признак Х (микробная десульфуризация) статистически достоверно ($F_f \geq F_{st}$) для штаммов SFN-1 (*Bacillus paramycoides*), SFN-3 (*Bacillus thuringiensis*), Н-1 (*Bacillus subtilis*), Н-4 (*Bacillus siamensis*), F-1 (*Bacillus haynesii*) и может быть с уверенностью ($p < 0,05$) перенесено на генеральную совокупность. Для всех объектов данной категории влияние изучаемого фактора может составлять не более 5 % от общего влияния всей суммы факторов для Н-4 (*Bacillus siamensis*), не более 12 % для Н-1 (*Bacillus subtilis*) и F-1 (*Bacillus haynesii*), тогда как для других исследуемых культур (SFN-1, SFN-3) влияние исследуемого фактора не превышает 1 %. Это свидетельствует о том, что в процессе в процессе биодесульфуризации аборигенные штаммы бактерий достоверно обладают высокой дисульфуризационной активностью без добавления глубоких эфетктических растворителей (*Bacillus thuringiensis* SFN3), при добавлении ГЭР-1 (*Bacillus cereus* SFN2) и при добавлении ГЭР-2 (*Bacillus thuringiensis* SFN3).

3.7 Разработка технологии биодесульфуризации высокосернистой нефти с применением синтезированного ГЭР

Современные исследования в области десульфуризации нефти и нефтяных продуктов направлены на поиск эффективных методов использования микроорганизмов и катализаторов и оптимизацию условий, обеспечивающих максимальное удаление серосодержащих соединений без разрушения нефтяной матрицы. Для оценки существующих решений и определения перспективных направлений были проанализированы патентные источники, в которых представлены различные схожие технологические подходы от классических микробных систем до электрохимических и микроэмульсионных процессов. И данные исследования дают удалению серы до 90 %. В патенте Вуянг-Хонг Ким и соавторв – EP0323748B1 «Bioelectrochemical desulphurisation of petroleum», были проведены исследования для разработки биодесульфуризации с использованием сероокисляющих бактерий. В работе дибензотиофен (ДБТ) использовался в качестве модельного органосернистого соединения для отбора бактериальных штаммов, потенциально способных к биодеградациии серосодержащих компонентов нефти. Микроорганизмы, выращенные в течение двух суток, были центрифугированы анаэробно. Полученные клеточные суспензии помещали во флаконы типа «сывороточных», в реакционную систему

добавляли 2 мМ метилвиологена (в качестве искусственного переносчика электронов) и 0,1 % (м/об.) ДБТ, после чего инкубировали при 30 °С в течение 6 суток на вращающемся шейкере. В результате удаление ДБТ в течение 6 дней варьировалось от 58 % до 94 % [500].

В патенте автора Курашова В.М. – RU2137839C1 «Микробиологический способ снижения содержания серы в углеводородах», были проведены исследования, направленные на разработку биотехнологического метода очистки углеводородного сырья от серосодержащих соединений. В изобретении описан процесс биодесульфуризации, основанный на использовании адаптированных сероокисляющих бактерий рода *Thiobacillus* – в частности, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus aquaesulis* и *Thiobacillus pantotropha*, а также их смешанных культур. Микроорганизмы применяли в виде водной суспензии, вводимой в углеводородную фазу, где происходило биохимическое окисление органосернистых соединений до растворимых форм серы (сульфатов и сульфитов). Процесс осуществляли при температуре 25-35 °С и рН 6,5-7,5 в анаэробных условиях, что способствовало оптимальной активности ферментативных систем и сохранению углеводородной структуры нефти. Перед использованием бактерии проходили адаптацию к нефтяной среде, что позволяло проводить процесс *in situ*, непосредственно в нефтеносных пластах. Согласно приведённым данным, применение данного способа обеспечивало снижение содержания серы до 50 % от исходного уровня без изменения основных физико-химических свойств нефти, что подчёркивает его высокую эффективность и экологическую безопасность при переработке высокосернистого сырья [501].

Также в патенте Daniel J. Monticello II и соавторов – US5358870A «Microemulsion process for direct biocatalytic desulfurization of organosulfur molecules» представлены экспериментальные исследования, направленные на использование микробиологического метода биодесульфуризации с применением микроэмульсионной технологии. В работе использовали раствор с концентрацией серы 0,52-3 % органической серы. В культуральные колбы добавляли по 10 мл модельного раствора и по 30 мл минеральной среды, не содержащей серы, либо суспензию клеток *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968, обладающих способностью селективно разрушать связи С-S в органосернистых соединениях. Для улучшения контакта между углеводородной и водной фазами в систему вводили катализатора Triton N-101 в концентрации 0,05-0,50 %. Реакцию проводили при 30 °С и интенсивном перемешивании (250 об/мин) в течение 40 часов, после чего нефтяную фазу анализировали на содержание серы. Согласно данным таблицы патента, степень биокаталитической десульфуризации увеличивалась с 5,07 % до 7,89 % при добавлении 0,5 % Triton N-101, что указывает на положительный эффект катализатора, обеспечивающего более эффективный массоперенос субстрата и повышенную доступность серы для ферментативной системы *Rhodococcus rhodochrous*. Полученные результаты подтвердили возможность проведения биодесульфуризации в микроэмульсионной среде без разрушения

углеводородной матрицы нефти и показали перспективность подхода для последующего масштабирования [502].

Вышеперечисленные патентные исследования обладают рядом технологических и научных преимуществ, однако характеризуются и определенными ограничениями, требующими совершенствования:

1 EP0323748B1:

1.1 Реакция проводится в строго анаэробных условиях с подачей водорода, что усложняет контроль и масштабирование процесса.

1.2 Вероятность подавления роста и активности бактерий тяжелыми металлами, смолами и асфальтенами в составе нефти.

2 RU2137839C1:

2.1 Процесс основан на естественной адаптации культур и требует длительной подготовки микроорганизмов к нефтяной среде.

2.2 Проведение реакции *in situ* в пласте затруднено технологически и не позволяет контролировать биохимические параметры.

2.3 Вероятность подавления роста и активности бактерий тяжелыми металлами, смолами и асфальтенами в составе нефти.

3 US5358870A:

3.1 Низкая степень биодесульфуризации (5-8 %) даже при оптимальной концентрации эмульгатора и модельных условиях.

3.2 Вероятность подавления роста и активности бактерий тяжелыми металлами, смолами и асфальтенами в составе нефти.

Преимуществами предлагаемой технологии с использованием ГЭР:

1) Представляет собой экологически безопасный, биосовместимый и нетоксичный растворитель, не требующий дополнительной очистки нефти после десульфуризации.

2) Формирует стабильную структуру, значительно повышающую контакт и обмен веществ между фазами, обеспечивая интенсивный массоперенос.

3) Применение ГЭР повышает скорость и степень биодесульфуризации нефти и нефтяных продуктов.

4) ГЭР создает благоприятную среду для функционирования клеток, стабилизирует ферментативные системы и снижает стрессовое воздействие нефти на организм культуры.

5) Процесс с ГЭР и культуральными изолятами, адаптированных для десульфуризации нефтей проводится при мягких условиях (25-35 °С, нейтральный pH), без использования дополнительных реагентов или энергозатратных стадий.

На основе результатов, полученных от многоступенчатого исследования, разработана блок-схема биодесульфуризации высокосернистой нефти месторождения «Каражанбас» с применением синтезированного ГЭР.

Биодесульфуризации высокосернистой нефти месторождения «Каражанбас» с применением синтезированного ГЭР включает следующие этапы:

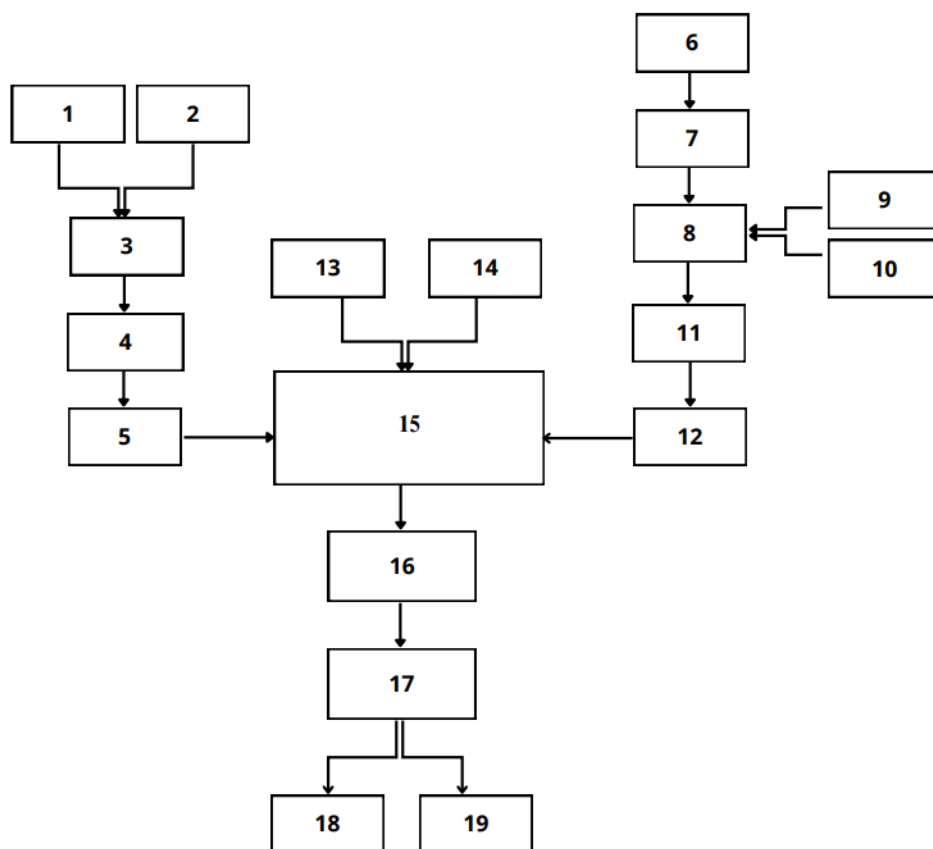


Рисунок 3.52 – Блок-схема биодесульфуризации нефти «Каражанбас»
 1 – акцептор водородных связей; 2 – донор водородных связей; 3 – сушка; 4 – орбитальный шейкер с подогревом; 5 – готовый ГЭР; 6 – питательная среда МПБ; 7 – автоклав; 8 – стерильная питательная среда; 9 – аборигенные микроорганизмы; 10 – коллекционные микроорганизмы; 11 – культивирование; 12 – активированные микроорганизмы; 13 – стерильный нефть; 14 - минерально-синтетическая среда; 15 – биодесульфуризация; 16 – очищенная от серы нефть; 17 – центрифугирование+фильтрация для отделения эмульсий от биомассы; 18 – биомасса микроорганизмов; 19 – очищенная нефть от биомасса микроорганизмов.

На рисунке 3.40 приведена блок-схема биодесульфуризации. Сначала проводится приемка и проверка исходных компонентов. Выполняется элементарный контроль качества, определение влажности и визуальная оценка на отсутствие осадков или признаков кристаллизации. Необходимо минимальное содержание воды, поскольку избыточная влага существенно влияет на физико-химические свойства глубоких эвтектических растворителей. 1 – акцептор водородных связей бетаин ($\geq 99\%$, ан. ч.) предварительно сушат при $60-70\text{ }^\circ\text{C}$ в вакуумном шкафу (3) (200-300 мбар) в течение 3-4 ч до постоянной массы для удаления остаточной влаги. 2 – донор водородных связей глицерин ($\geq 99\%$, техн. ч.) при содержании воды ≤ 1 мас. % может использоваться без дополнительной сушки; при необходимости его

подвергают мягкому прогреву при 40-60 °С [286, 503]. Аналогично, при работе с лимонной кислотой (1) рекомендуется вакуумная или термосушка при 60-80 °С в течение 2-6 часов, это стандартная практика, обеспечивающая воспроизводимость термомеханических свойств ГЭР [188, 497].

На следующем этапе проводили дозирование и загрузку компонентов, акцептора и донора водородных связей в реакционную емкость и отправили в орбитальный шейкер с подогревом (4). ГЭР-1 состоит из смеси бетаина ($C_5H_{11}NO_2$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) в мольном соотношении 1:2. Для синтеза навешивали 11,715 г бетаина и 18,418 г глицерина с точностью $\pm 0,001$ г, помещали в круглодонную колбу и устанавливали на магнитную мешалку с подогревом. Смесь нагревали при 50 ± 1 °С и перемешивали со скоростью 300 об/мин в течение 1 ч до получения прозрачного однородного раствора без кристаллических форм. ГЭР-2 состоял из лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$) и глицерина ($C_3H_8O_3$) в мольном соотношении 1:4. Для синтеза взвешивали 19,212 г лимонной кислоты и 36,836 г глицерина, добавляли 10 % дистиллированной воды для уменьшения вязкости и облегчения смешивания. Смесь нагревали при 60 ± 1 °С и перемешивали 300 об/мин до полного растворения кислоты и образования гомогенного прозрачного раствора (5) в течение часа. И последним этапом является охлаждение до комнатной температуры, герметично закрыть и хранить при 20-25 °С в темном месте до следующего применения [286, 188]. Для активации аборигенных (9) и коллекционных микроорганизмов (10), адаптированных для десульфуризации нефти, применяли жидкую питательную среду МПБ (мясопептонный бульон) (6), содержащую (% масс.): пептон 1,0, мясной экстракт 1,0, NaCl 0,5, pH 7,0-7,2. Компоненты растворяли в дистиллированной воде при нагревании до полного растворения и доводили pH раствора до заданного диапазона с использованием NaOH. Приготовленную среду разливали по колбам Эрленмейера объемом 250 мл с рабочим объемом 50 мл и стерилизовали в автоклаве (7) при 121 °С в течение 20 минут. После стерилизации среду охлаждали до комнатной температуры и проверяли прозрачность, отсутствие осадка и стабильность pH.

Лиофилизированные культурные штаммы ресуспендировали (8) в 10 мл стерильного МПБ, переносили в колбы и инкубировали при 28-30 °С на орбитальном шейкере (11) со скоростью 150-200 об/мин в течение 48-72 ч до достижения логарифмической фазы роста, при которой оптическая плотность при $\lambda=600$ нм составляла 0,8-1,0 ед. Для аборигенных изолятов использовали аналогичные условия культивирования, при 28-30 °С на орбитальном шейкере со скоростью 150-200 об/мин в течение 48-72 ч до логарифмической фазы и оптическая плотность при $\lambda=600$ нм. Маточные культуры предварительно поддерживали на агаризованной среде МПА при 4 °С с ежемесячным пересевом для сохранения жизнеспособности и морфологических признаков. Культивирование проводили на шейкер-инкубаторе с амплитудой 10-20 мм и заполнением колб на 40-50 % объема среды, что обеспечивало оптимальную аэрацию и предотвращало вспенивание. В процессе роста контролировали

оптическую плотность, внешний вид культуры и наличие возможной контаминации. Культуры считали готовыми и активированными к дальнейшему использованию после достижения стабильной фазы активного роста (12) (оптическая плотность при $\lambda=600$ нм 0,8-1,0), устойчивого значения рН 7,0-7,2 и отсутствия посторонней микрофлоры. Выбор состава питательной среды, температурно-временных режимов и скорости перемешивания обусловлен их эффективностью для микроорганизмов родов *Rhodococcus*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, широко применяемых в биотехнологических процессах биодесульфуризации нефти и нефтепродуктов [268, 274].

Биодесульфуризация нефти месторождения «Каражанбас» проводили по блок схеме, включающей этапы подготовки минерально-синтетической среды (МСС) (14), внесения субстрата и катализатора, а также последующее разделение фаз и отбор очищенной нефти. Стерилизацию питательной среды осуществляли в автоклаве при 0,75 атм. в течение 20 минут, после чего готовый раствор охлаждали до комнатной температуры и использовали для постановки опыта. В подготовленную и стерилизованную среду вносили стерилизованную нефть (13), служившую единственным источником серы, а также добавляли соответствующий глубокий эвтектический растворитель (5): ГЭР-1 (бетаин:глицерин, 1:2) или ГЭР-2 (лимонная кислота:глицерин, 1:4) в качестве со-растворителя и фазомодификатора, повышающего биодоступность органосернистых соединений и для повышения активности роста для микроорганизмов. В емкость для десульфуризации (15) вносили 10 % (об.) активного инокулята (12), находящегося в логарифмической фазе роста, и 2 % (об.) нефти (13), после чего смесь тщательно перемешивали для равномерного распределения фаз. Процесс проводится при температуре 30 ± 1 °С с постоянным перемешиванием со скоростью 160 об/мин, что обеспечивает оптимальную аэрацию и предотвращает слиянию нефти. Продолжительность инкубации составляет 10 суток. В качестве контрольных систем используется стерильные варианты без микроорганизмов: МСС + нефть (2 %), МСС + нефть (2 %) + ГЭР-1 (2 %), МСС + нефть (2 %) + ГЭР-2 (2 %). Все варианты эксперимента ставятся в трехкратной повторности для обеспечения статистической надежности результатов.

По завершении очищенная нефть (16) подвергается центрифугированию при 5000 об/мин в течение 20 минут для отделения эмульсионной фазы от биомассы и фильтрация через мембрану с размером пор 0,45 мкм (17) с целью удаления остаточных клеток микроорганизмов (18). Полученную очищенную от биомассы и микроорганизмов нефть (19) отбирали для последующего определения остаточного содержания серы.

Описанная методика позволяет оценить влияние различных типов ГЭР на эффективность микробной десульфуризации нефти и степень удаления серосодержащих соединений, а также обеспечивает получение стабильных воспроизводимых данных при контролируемых гидродинамических и температурных параметрах процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Краткие выводы по результатам исследований:

1. Синтезированы пять ГЭР на основе ГЭР-1 (Bet+Gly (1:2)), ГЭР-2 (CA+Gly (1:4)), ГЭР-2-3 (ТВАС+LA (1:2)), ГЭР-4 (ChCl+EG (1:2)), ГЭР-5 (ТВАВ+isopropanol (1:2)). Оценено влияние синтезированных ГЭР на рост, метаболическую активность изолированных и коллекционных микроорганизмов. И выбраны 2 эвтектического растворителя: ГЭР-1 (Bet+Gly (1:2)), ГЭР-2 (CA+Gly (1:4));

2. Выделены, идентифицированы и изучены штаммы микроорганизмов, обладающих способностью к удалению серы из нефти. Изучены культурально-технологические свойства изолированных штаммов, способных удалять серу посредством селективного окислительного пути. Были отобраны штаммы, обладающих активным и умеренным ростом на среде с высокосернистой нефтью, *Bacillus cereus* SFN-2, *Bacillus thuringiensis* SFN-3. И проявили устойчивость к Cr (VI) в течение 24, 48 и 72 ч культивирования;

3. По результатам экспериментов на пятые сутки установлено, что штаммы *Bacillus cereus* (SFN-2) и *Bacillus thuringiensis* (SFN-3) проявляют выраженную сероокисляющую активность, обеспечивая снижение массовой доли серы в нефти на 0,008 % и 0,364 % соответственно по сравнению с контролем, что соответствует степени десульфуризации до 82,35 %. Для остальных штаммов отмечены процессы сульфатовосстановления различной интенсивности, сопровождающиеся увеличением содержания серы на 0,063-0,182 %. Таким образом, подтверждено, что именно штаммы *B. cereus* (SFN-2) и *B. thuringiensis* (SFN-3) обладают наибольшим потенциалом для удаления сернистых соединений из сырой нефти.

4. Показано, что использование композиций глубоких эвтектических растворителей на основе Бетаина:Глицерина (Bet+Gly) (1:2) и Лимонной кислоты:Глицерина (CA+Gly) (1:4) в сочетании с сероокисляющими микроорганизмами *Bacillus cereus* SFN-2, *Bacillus thuringiensis* SFN-3, *Pseudomonas aeruginosa* В-5807, *Rhodococcus erythropolis* АС-1039 и *Pseudomonas putida* В-1827 приводит к повышению эффективности десульфуризационных процессов. Содержание массовой доли серы (%) к концу эксперимента, на 10-е сутки, максимально снизилось: в образцах без добавления ГЭР с 2,129 % до 0,081 %, с добавлением ГЭР-1 – до 0,211 и с добавлением ГЭР-2 – до 0,0782 %.

Оценка полноты решений поставленных задач. Поставленные в диссертационной работе задачи выполнены в полном объеме. Проведен синтез и отбор эффективных глубоких эвтектических растворителей, выделены и идентифицированы активные штаммы микроорганизмов из высокосернистой нефти Казахстана, исследованы их культурально-технологические свойства и десульфуризационная активность, а также установлена высокая эффективность совместного применения микроорганизмов и ГЭР в процессе биодесульфуризации нефти. Полученные результаты подтверждают

достижение цели диссертационной работы и обоснованность выбранного научного подхода.

Разработка рекомендаций и исходных данных по конкретному использованию результатов. Результаты диссертационного исследования могут быть рекомендованы для использования в нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленности при разработке экологически безопасных технологий очистки высокосернистых нефтей и нефтяных фракций. Наиболее перспективным является применение композиций глубоких эвтектических растворителей Bet+Gly (1:2) и CA+Gly (1:4) в сочетании с активными штаммами микроорганизмов *Bacillus cereus* SFN-2, *Bacillus thuringiensis* SFN-3, *Pseudomonas aeruginosa* B-5807, *Rhodococcus erythropolis* AC-1039 и *Pseudomonas putida* B-1827. К исходным данным для практического использования относятся: применение высокосернистой нефти с исходным содержанием серы около 2,1 %, продолжительность процесса биодесульфуризации до 10 суток, использование отобранных штаммов микроорганизмов в сочетании с глубокими эвтектическими растворителями, обеспечивающее снижение массовой доли серы до 0,0782 %.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения. Технико-экономическая эффективность предлагаемого подхода обусловлена возможностью проведения процесса в мягких условиях, без применения высоких температур и давления, характерных для традиционных методов гидроочистки. Использование глубоких эвтектических растворителей и микроорганизмов позволяет снизить энергозатраты, уменьшить потребность в дорогостоящих катализаторах, водороде и жестких окислительных реагентах, а также сократить экологическую нагрузку на окружающую среду. Высокая степень удаления серы при сравнительно мягких условиях обработки подтверждает перспективность разработанного подхода с точки зрения промышленного применения.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. По научному уровню полученные результаты соответствуют современному уровню развития технологий биодесульфуризации нефти и применения глубоких эвтектических растворителей. В отличие от традиционных подходов, ориентированных преимущественно на жесткие физико-химические методы очистки, в работе предложен комбинированный химико-биотехнологический подход, основанный на совместном использовании ГЭР на основе Бетаина:Глицерина (Bet+Gly) (1:2) и Лимонной кислоты:Глицерина (CA+Gly) (1:4) и сероокисляющих микроорганизмов. Достигнутая степень удаления серы до 96,3 % подтверждает высокую эффективность предложенного решения и его конкурентоспособность по сравнению с известными методами десульфуризации высокосернистых нефтей. Диссертационная работа вносит вклад в развитие экологически безопасных и научно обоснованных технологий глубокой десульфуризации нефтяного сырья.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бишимбаева Г.К., Соломин В.А., Джусипбеков У.Ж., Джахметов Е.А., Ляпунов В.В., Жумабекова С.О. Особенности состава продукта сероочистки тенгизской нефти // Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2003. – том 46, выпуск 1. – С. 163-165.
2. Aikaterini Kondyli, Wolfgang Schrader. Study of Crude Oil Fouling from Sulfur-Containing Compounds Using High-Resolution Mass Spectrometry // Energy Fuels. – 2021. – 35, 16. – P. 13022-13029.
3. Air quality, energy and health. URL: https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/air-quality-and-health/health-impacts/types-of-pollutants?utm_source (Дата обращения: 19-09-2025).
4. Toxicological Profile for Sulfur Dioxide. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK596176/?utm_source (Дата обращения: 19-09-2025).
5. Justyna Likus-Cieślik, Marcin Pietrzykowski. Sulfur Contamination and Environmental Effects: A Case Study of Current SO₂ Industrial Emission by Biomonitoring and Regional Post-mining hot-spots // The Open Biotechnology Journal. – 2021. – 15, (Suppl-1, M3). – P. 82-96.
6. Mostafa Jafari, Amirhossein Khalili Garakani. Techno-Economic Analysis of Heavy Fuel Oil Hydrodesulfurization Process for Application in Power Plants // Iranian Journal of Oil & Gas Science and Technology. – 2021. – Vol. 10, No. 1. – P. 40-65.
7. Ahmed M.J.K., Ahmaruzzaman M. Adsorptive desulfurization of feed diesel using chemically impregnated coconut coir waste // Int. J. Environ. Sci. Technol. – 2015. – 12. – P. 2847-2856.
8. Yuan B., Li X., Sun Y. A Short Review of Aerobic Oxidative Desulfurization of Liquid Fuels over Porous Materials // Catalysts. – 2022. – 12(2), 129.
9. Biswajit Saha, Sundaramurthy Vedachalam, Ajay K. Dalai. Review on recent advances in adsorptive desulfurization // Fuel Processing Technology. – 2021. – Volume 214.
10. Daili Peng, Anne-Jan Kleiweg, Jozef G. M. Winkelman, Zhen Song, Francesco Picchioni. A Hierarchical Hybrid Method for Screening Ionic Liquid Solvents for Extractions Exemplified by the Extractive Desulfurization Process // ACS Sustainable Chem. Eng. – 2021. – 9, 7. – P. 2705-2716.
11. Mohamed A. Betiha, Abdelrahman M. Rabie, Hoda S. Ahmed, Asmaa A. Abdelrahman, Mohamed F. El-Shahat. Oxidative desulfurization using graphene and its composites for fuel containing thiophene and its derivatives: An update review // Egyptian Journal of Petroleum. – 2018. – Volume 27, Issue 4. – P. 715-730.

12. Abdurrashid Haruna, Zulkifli Merican Aljunid Merican, Suleiman Gani Musa, Sulaiman Abubakar. Sulfur removal technologies from fuel oil for safe and sustainable environment // *Fuel*. – 2022. – Volume 329. – 125370.
13. Жамашева А.Е., Идрисова Д.Г., Сагалов Д.Т., Байжунусов К.М., Кәрім І.М. Повышение нефтеотдачи месторождения Каражанбас по технологии CHOPS // *Norwegian Journal of development of the International Science*. – 2022. – № 84. – P. 15-19
14. Надиров Н.К., Котова А.В., Камьянов В.Ф. Новые нефти Казахстана и их использование: Металлы в нефтях // *Алма-Ата: Наука*. – 1984. – С. 448
15. Оразова Г. А. Схема переработки нефтей Кумколь и Кенкияк по топливно-масляному варианту // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2008. – С. 64-68.
16. Yunusov M.P., Gulomov S., Nasullayev K.A. et al. Hydrodesulfurization Catalysts from Aluminium-Containing Waste // *Catal Lett*. – 2024. – 154. – P. 4409-4421.
17. Metawea R., Farag H.A., El-Ashtoukhy ES. et al. Ultrasounds assisted one-pot oxidative desulfurization of model fuel using green synthesized aluminum terephthalate [MIL-53(Al)] // *Sci Rep*. – 2023. – 13, 13728.
18. Faezeh Mirshafiee, Salman Movahedirad, Mohammad Amin Sobati, Reyhaneh Alaei, Sasan Zarei, Hamed Sargazi. Current status and future prospects of oxidative desulfurization of naphtha: a review // *Process Safety and Environmental Protection*. – 2023 – Volume 170. – P. 54-75.
19. Malek M., Samipourgiri M., Rashidi A. et al. Reduction of sulfur in fuel oil using Fe₂O₃ hybrid nanoadsorbent by solvent deasphalting and optimization of operational parameters with CCD // *Sci Rep*. – 2024. – 14, 1560.
20. Tang L., Wang T., Xu Y., He X., Yan A., Zhang Z., Li Y., Chen G. Research and Application Progress of Crude Oil Demulsification Technology // *Processes*. – 2024. – 12, 2292.
21. Statista Research Department. Oil production worldwide from 1998 to 2023. URL: <https://www.statista.com/statistics/265203/global-oil-production-in-barrels-per-day/#statisticContainer> (Дата обращения: 25.09.2024 г.).
22. The World's Largest Oil Reserves by Country in 2024. Ranked by OPEC. URL: <https://www.worldatlas.com/industries/the-world-s-largest-oil-reserves-by-country.html> (Дата обращения; 30.08.2025).
23. Министерство энергетики Республики Казахстан. Нефтяная промышленность. URL: <https://www.gov.kz/memleket/entities/energo/activities/179?lang=ru> (Дата обращения: 28.08.2025).
24. Бюро национальной статистики. Агентства по стратегическому планированию и реформам Республики Казахстан. Статистика промышленного производства. URL: <https://stat.gov.kz/ru/industries/business-statistics/stat-industrial-production/> (Дата обращения: 30.08.2025 г.).

25. Сколько нефти в Казахстане. URL: <https://kioge.kz/ru/glavnaya/11-press-tsentr/novosti/740-skolko-nefti-v-kazakhstan> (дата обращения: 30.08.2025 г.).
26. Khan S., Amani S., Amani M. Alternative and Potential Uses for the Sulfur Byproducts Produced from Oil and Gas Fields // *International Journal of Organic Chemistry*. – 2021. – 11. – P. 14-23.
27. Turgai Alimbaev, Kuralay Yermagambetova, Samal Kabyltayeva, Abilkhan Issayev, Zhadyra Kairat, Zhanna Mazhitova. Environmental problems of the oil and gas industry in Kazakhstan // *E3S Web of Conferences*. – 2020. – 215, 03008.
28. Dennis Denney. Potential Nontraditional Uses for Byproduct Sulfur in Kazakhstan // *J Pet Technol*. – 2005. – 57 (12). – P. 43-45.
29. Tawfik A. Saleh. Characterization, determination and elimination technologies for sulfur from petroleum: Toward cleaner fuel and a safe environment // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. – 2020. – Volume 25.
30. АО «Каражанбасмунай». О месторождении. URL: <https://www.kbm.kz/ru/index.htm> (Дата обращения: 08.10.2023 г.).
31. Karimov O., Shakulikova G., Ishmukhamedova N., Karimov E. Preparation of modified oil road bitumen // *E3S Web Conf*. – 2020. – Volume 175. – P. 1-5.
32. Мурзагалиев Р.С. Особенности геологического строения и разработки нефтяного месторождения Каражанбас // *Геология нефти и газа*. – 2003. – 2. – С. 26-29.
33. Batkayev R.I., Batkayeva A.F., Zobnin N.N., Kovaleva A.Y. Substantiation of Electron-Seeking Catalysis of Vanadocene Dichloride Oxidative Breakdown in the Process of Vanadium Backwash from Heavy Karazhanbas Oil field // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2016. – 32(5). – P. 2665-2672.
34. Каримов Р.М., Мастобаев Б.Н. Влияние содержания парафинов, смол и асфальтенов на товарные качества нефтей // *Башкирский химический журнал*. – 2012. – Т. 19, № 1. – С. 97–102.
35. Mansurov Z.A., Lesbaev B.T., Prikhodko N.G., Kazakov Yu.V., Ualiyev Zh. Burning Oil Layer on the Surface of Water // *Eurasian Chemico-Technological Journal*. – 2013. – 15. – P. 275–281.
36. Zaykina R.F., Zaykin Yu.A., Mamonova T.B., Nadirov N.K. Radiation-thermal processing of high-viscous oil from Karazhanbas field // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2001. – Vol. 60, Issue 3. – P. 211–221.
37. Srivastava V.C. An evaluation of desulfurization technologies for sulfur removal from liquid fuels // *RSC Advances*. – 2012. – Vol. 2. – P. 759–783.
38. Doble M., Kumar A. CHAPTER 25 – Biodesulfurization // *Biotreatment of Industrial Effluents*. – 2005. – P. 255–265.
39. Clews R.J. Chapter 5 – Fundamentals of the Petroleum Industry // *Project Finance for the International Petroleum Industry*. – 2016. – P. 83–99.
40. Альмухаметова Э.М. Расширение опыта применения технологии нестационарного заводнения с применением технологии изменения

направления фильтрационного потока на примере месторождения Северные Бузачи // Георесурсы / Georesources. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 115–121.

41. Акиянова Ф.Ж., Семенов О.Е., Халыков Е.Е. Подвижные пески полуострова Бузачи (Бозашы) // Гидрометеорология и экология. – 2012. – № 1. – С. 58–73.

42. Тыныбаева Т.Г. Некоторые аспекты экологического мониторинга месторождения Северные Бузачи (Казахстан) // Вестник АГТУ. – 2006. – № 3 (32). – С. 166–171.

43. Дергилева Н.Т., Кадырова Н.А., Джуксангалиева А.И. Оценка воздействия на окружающую среду «Групповому техническому проекту на строительство наблюдательных скважин проектной глубиной 1200 метров на участке сброса сточных вод на контрактной территории ТОО «Бузачи-Нефть» // ТОО НПЦ «Бузачи-Нефть». – Актау, 2021. – С. 1-441.

44. Ширяева Р.Н., Кудашева Ф.Х., Шафигуллина Д.И. ИК-спектроскопическое изучение химической структуры асфальтенов из нефти месторождений Оренбургской области и Северные Бузачи // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015.

45. Надиров Н.К., Ширинских А.В., Нуржанова С.Б., Солодова Е.В., Таныбаева А.К., Зайтова С.Т. Технология переработки тяжелого углеводородного сырья механо-волновым способом // Вестник Евразийской науки. – 2019. – № 6. – С. 1-8.

46. Сейден А.Б. Разработка эффективной технологии глубокой очистки воды от взвешенных твердых частиц для поддержания пластового давления на нефтяных месторождениях // Новости науки Казахстана. – 2018. – № 3 (137). – С. 94-106.

47. Сейтенова Г.Ж., Дюсова Р.М., Кибатов Д.С., Абетанов М.Б. Модернизация системы управления коммерческим узлом учета нефти на ГНПС «Кумколь» // Наука и техника Казахстана. – 2018. – № 3. – С. 30-38.

48. Даукеев С.Ж., Воцалевский В.С., Шлыгин Д.А., Пилифосов В.М. Глубинное строение и минеральные ресурсы Казахстана. Том 3. – Алматы, 2002. – С. 1–248.

49. Уточненный проект разработки месторождения Кумколь (по состоянию на 01.07.2008 г.). Договор № 397/0811022 / АО «НИПИнефтегаз». – Актау, 2009. – 997 с.

50. Авторский надзор за реализацией проекта разработки нефтегазового месторождения Кумколь (по состоянию на 01.01.2007 г.) / АО «НИПИнефтегаз». – Актау, 2007. – 330 с.

51. Проект разработки нефтегазового месторождения Кумколь: отчет по договору № СП 2/98 / ЗАО «НИПИмунайгаз». – Актау, 1999. – 442 с.

52. Дополнение к уточненному проекту разработки месторождения Кумколь (по состоянию на 01.07.2011 г.) / АО «НИПИнефтегаз». Договор № 1102023. – Актау, 2011. – 621 с.

53. Оразова Г.А. Схема переработки нефтей Кумколь и Кенкияк по топливно-масляному варианту // Вестник Казанского технологического университета. – 2008. – С. 64–68.

54. Naruna A., Merican Z.M.A.M., Musa S.G. Recent advances in catalytic oxidative desulfurization of fuel oil – A review // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2022. – Vol. 112. – P. 20–36.

55. Постановление Правительства Республики Казахстан от 6 февраля 2013 года № 97 О внесении изменений в постановление Правительства Республики Казахстан от 29 декабря 2007 года № 1372 «Об утверждении Технического регламента о требованиях к выбросам вредных (загрязняющих) веществ автотранспортных средств, выпускаемых в обращение на территории Республики Казахстан»

56. Экологический Кодекс Республики Казахстан. от 2 января 2021 года № 400-VI ЗРК. Статья 5, пункт 5.

57. Новый экологический кодекс: полный текст доклада министра экологии. Сатиева, Камшат (2021-01-05) URL: <https://kaz.zakon.kz/redaktsiia-zakonkz/5053083-ekologiya-ministr-n-zha-a-ekologiyaly.html> (Дата обращения: 01.08.2025 г.).

58. NCOС оштрафован на 3,6 млрд тенге за нарушение экологического законодательства. Дмитрий Мазоренко. URL: <https://vlast.kz/novosti/65827-ncos-ostrofovan-na-36-mlrd-tenge-za-narusenie-ekologiceskogo-zakonodatelstva.html> (Дата обращения: 01.08.2025 г.).

59. Решение Комиссии таможенного союза от 18 октября 2011 года № 826. О принятии технического регламента Таможенного союза «О требованиях к автомобильному и авиационному бензину, дизельному и судовому топливу, топливу для реактивных двигателей и мазуту».

60. ГОСТ 32513-2013. Топлива моторные. Бензин неэтилированный. Технические условия. 2019.

61. ГОСТ 32511-2013. Топливо дизельное ЕВРО. Технические условия. 2019.

62. ГОСТ 10227-2013. Топливо для реактивных двигателей. Технические условия. 2014.

63. ГОСТ 20448-90. Газы углеводородные сжиженные топливные для коммунально-бытового потребления. Технические условия. 2005.

64. Quan Shi, Jianxun Wu. Review on Sulfur Compounds in Petroleum and Its Products: State-of-the-Art and Perspectives // Energy Fuels. – 2021. – 35, 18. – P. 14445-14461.

65. Xiang Li, Yaoyu Wang, Derang Fan, Ahmed Salah Al-Shati. Separation of sulfur compounds from petroleum using hydrodesulfurization method to reduce SO₂ emission: Process optimization and validation // Case Studies in Thermal Engineering. – 2023. – Vol. 49.

66. Wisam Mohammed Kareem Al-khazaali, Seyed Ahmad Ataei. Optimization of Biodesulfurization of sour heavy crude oil // PLOS ONE. – 2023. – 18(4): e0283285.

67. Cozzarelli I.M., Mckelvie J.R., Baehr A.L. Volatile Hydrocarbons and Fuel Oxygenates // Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Treatise on Geochemistry (Second Edition). – 2014. – Vol. 11. – P. 439-480.
68. Fingas M. Water Analysis: Oil Pollution // Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. – 2016.
69. Gad S.C. Petroleum hydrocarbons // Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition). – 2024. – Vol. 7. – P. 447-450.
70. Varjani S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 223. – P. 277-286.
71. Hanif M.A., Nadeem F., Tariq R., Rashid U. Chapter 2 – Nonrenewable energy resources // Renewable and Alternative Energy Resources. – 2022. – P. 31-111.
72. Sari R.M., Kolmetz K. Crude oil properties // Kolmetz Handbook of Process Equipment Design. KLM Technology Group. – 2016. – Rev. 01.
73. Prado G.H.C., Rao Y., de Klerk A. Nitrogen removal from oil: A review // Energy Fuels. – 2017. – 31(1). – P. 14-36.
74. Zhang G., Yang C., Serhan M., Koivu G., Yang Z., Hollebne B., Lambert P., Brown C.E. Characterization of nitrogen-containing polycyclic aromatic heterocycles in crude oils and refined petroleum products // Advances in Marine Biology. – 2018. – Vol. 81. – P. 59-96.
75. Javadli R., de Klerk A. Desulfurization of heavy oil // Applied Petrochemical Research. – 2012. – 1. – P. 3-19.
76. Svinterikos E., Zuburtikudis I., Al-Marzouqi M. Carbon nanomaterials for the adsorptive desulfurization of fuels // Journal of Nanotechnology. – 2019.
77. Agarwal P., Sharma D.K. Comparative studies on the biodesulfurization of crude oil with other desulfurization techniques and deep desulfurization through integrated processes // Energy Fuels. – 2010. – 24. – P. 518-524.
78. Murarka P., Srivastava P. Biodesulfurization of petroleum wastes // Biovalorisation of Wastes to Renewable Chemicals and Biofuels. – 2020. – P. 165-187.
79. Al-Khodor Y.A.A., Albayati T.M. Adsorption desulfurization of actual heavy crude oil using activated carbon // Engineering and Technology Journal. – 2020. – 38. – P. 1441-1453.
80. Crandall B.S., Zhang J.Y., Stavila V., Allendorf M.D., Li Z.L. Desulfurization of liquid hydrocarbon fuels with microporous and mesoporous materials: metal-organic frameworks, zeolites, and mesoporous silicas // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2019. – 58(42). – P. 19322-19352.
81. Mauri P., Toppo S., De Palma A., Benazzi L., Maiorino M., Ursini F. Identification by MS/MS of disulfides produced by a functional redox transition // Methods in Enzymology. – 2010. – Vol. 473. – P. 217-225
82. MAbdollahi M., Hosseini A. Carbon disulfide // Reference Module in Biomedical Sciences. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). – 2014. – P. 678-681.

83. Mottley C., Mason R.P. Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – 276(46). – P. 42677-42683.
84. Carroll J. Chapter 2 – Hydrate types and formers // *Natural Gas Hydrates (Fourth Edition). A Guide for Engineers*. – 2020. – P. 27-67.
85. Sadeghbeigi R. Chapter 1 – Process description // *Fluid Catalytic Cracking Handbook (Third Edition)*. – 2012. – P. 1-42.
86. Fahim M.A., Alsahhaf T.A., Elkilani A. Chapter 15 – Acid gas processing and mercaptans removal // *Fundamentals of Petroleum Refining*. – 2010. – P. 377-402.
87. Mohammed A., Devi P. Chapter 17 – Hydrogen sulfide: Risk assessment, environmental, and health hazard // *Hazardous Gases: Risk Assessment on the Environment and Human Health*. – 2021. – P. 209-223.
88. Basafa M., Hawboldt K. Reservoir souring: sulfur chemistry in offshore oil and gas reservoir fluids // *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. – 2019. – 9. – P. 1105-1118.
89. Molina P., Arques A., Cartagena I. Thiophenes and their benzo derivatives: structure // *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*. – 2008. – Vol. 3. – P. 625-739.
90. Schatz J., Brendgen T., Schühle D. Thiophenes and their benzo derivatives: applications // *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*. – 2008. – Vol. 3. – P. 931-974.
91. Heravi M.M., Zadsirjan V. Paal–Knorr synthesis: an old reaction, new perspectives // *Advances in Heterocyclic Chemistry*. – 2022. – Vol. 138. – P. 1-60.
92. Hernandez Ponce C. Modeling of sulfur removal from heavy fuel oil using ultrasound-assisted oxidative desulfurization // *KAUST Research Repository*. – 2020.
93. Katasonova O.N., Savonina E.Yu., Maryutina T.A. Extraction methods for removing sulfur and its compounds from crude oil and petroleum products // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2021. – 94(4). – P. 411-436.
94. Maslin M., Van Heerde L., Day S. Sulfur: a potential resource crisis that could stifle green technology and threaten food security as the world decarbonises // *The Geographical Journal*. – 2022. – Vol. 188, Issue 4. – P. 498-505.
95. Kadhum A.T., Albayati T.M. Desulfurization techniques process and future challenges for commercial of crude oil products: review // *AIP Conference Proceedings*. – 2022. – P. 1-13.
96. Tahir S., Qazi U.Y., Naseem Z., Tahir N., Zahid M., Javaid R., Shahid I. Deep eutectic solvents as alternative green solvents for the efficient desulfurization of liquid fuel: a comprehensive review // *Fuel*. – 2021. – Vol. 305.
97. Gao S., Li J., Chen X., Abdeltawab A.A., Yakout S.M., Yu G. A combination desulfurization method for diesel fuel: oxidation by ionic liquid with extraction by solvent // *Fuel*. – 2018. – Vol. 224. – P. 545-551.

98. Vedachalam S., Baquerizo N., Dalai A.K. Review on impacts of low sulfur regulations on marine fuels and compliance options // *Fuel*. – 2022. – Vol. 310, Part A.
99. Chen M., Zhang D., Wang Z., Zhang Y., Liu Y. Investigation on the adsorption desulfurization effect of carboxyl and phosphotungstic acid modified UiO-66 // *Inorganica Chimica Acta*. – 2022. – Vol. 542. – 121135.
100. Zhu J., Yu J., Wu P., Liu J., Ji H., Cui P., Chao Y., Zhu W., Liu H., Liu Z. 3D printing of the multifunctional fixed-bed reactor and matched 3D-CeO₂/ATP monolithic adsorbent for adsorption desulfurization // *Chemical Engineering Journal*. – 2023. – Vol. 468. – 143590.
101. Qiu X., Wang B., Kozhevnikov I.V. New adsorption materials for deep desulfurization of fuel oil // *Materials*. – 2024. – 17. – 1803.
102. Hu Y., Li N., Wang M., Qiao Z., Gu D., Zhu L., Yuan D., Wang B. Overview of research status and development trends in diesel desulfurization technology // *Catalysts*. – 2025. – 15(3):251.
103. Mansouri M., Shayanmehr M., Ghaemi A. Exploring the adsorption desulfurization efficiency using RSM and ANN methodologies // *Scientific Reports*. – 2025. – 15. – 20869.
104. Hernández-Maldonado A.J., Yang R.T. Desulfurization of diesel fuels by adsorption via π -complexation with vapor-phase exchanged Cu(I)-Y zeolites // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – 126(4). – P. 992-993.
105. Jafarabadi H., Mansouri M., Shayanmehr M., Ghaemi A. Mechanisms, challenges, and future perspectives of adsorptive desulfurization using zeolite-based adsorbents: a review // *Environmental Science and Pollution Research International*. – 2025. – 32(18). – P. 11350-11402.
106. Jha D., Haider M.B., Kumar R., Byamba-Ochir N., Shim W.G., Sivagnanam B.M., Moon H. Enhanced adsorptive desulfurization using Mongolian anthracite-based activated carbon // *ACS Omega*. – 2019. – 4(24). – P. 20844-20853.
107. Srivastav A., Srivastava V.C. Adsorptive desulfurization by activated alumina // *Journal of Hazardous Materials*. – 2009. – 170(2-3). – P. 1133-1140.
108. Chen K., Li W., Biney B.W., Li Z., Shen J., Wang Z. Evaluation of adsorptive desulfurization performance and economic applicability comparison of activated carbons prepared from various carbon sources // *RSC Advances*. – 2020. – 10(66). – P. 40329-40340.
109. Botana-de la Cruz A., Boahene P.E., Vedachalam S., Dalai A.K., Adjaye J. Mesoporous adsorbents for desulfurization of model diesel fuel: optimization, kinetic, and thermodynamic studies // *Fuels*. – 2020. – 1(1). – P. 47-58.
110. Chen Z., Wang Y., Wu J., Wang B., Jiang T., Yu J., Yang H., Zhao S., Shi Q., Xu C. Composition of sulfur species in deasphalted oils and their molecular-level transformation during the hydrotreating process // *Fuel*. – 2022. – Vol. 328. – 125335.
111. Sun H., Chen C., Zhang R., Li Y., Ge S., Cui P. Advances in gasoline hydrodesulfurization catalysts: the role of structure–activity relationships and machine learning approaches // *ACS Omega*. – 2025. – 10(29). – P. 31262-31273.

112. Pham D.D., Nguyen T.M., Ho T.H., Le Q.V., Nguyen D.L.T. Advancing hydrodesulfurization in heavy oil: recent developments, challenges, and future prospects // *Fuel*. – 2024. – Vol. 372.
113. Zhou W., Yang L., Liu L., Zhou A., Zhang Y., He X., Shi F., Zhao Z. Synthesis of novel NiMo catalysts supported on highly ordered TiO₂-Al₂O₃ composites and their superior catalytic performance for 4,6-dimethyldibenzothiophene hydrodesulfurization // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2020. – Vol. 268.
114. Mohamed Sikkander A., Kavitha K., Ramanachiar R., Anitha V., Sasikala S., Sivaraj C., Niruban Balu T., Mishra S.R., Yasmeen K. Hydrodesulphurization of petroleum // *Petro Chemical Industry International*. – 2022. – 5(3). – P. 150-152.
115. Shafiq I., Shafique S., Akhter P., Yang W., Hussain M. Recent developments in alumina supported hydrodesulfurization catalysts for the production of sulfur-free refinery products: a technical review // *Catalysis Reviews*. – 2020.
116. Castro G., Cruz-Borbolla J., Galván M., Guevara-García A., Ireta J., Matus M.H., Meneses-Viveros A., Perea-Ramírez I.L., Pescador-Rojas M. Hydrodesulfurization of dibenzothiophene: a machine learning approach // *ChemistryOpen*. – 2024. – 13(9):e202400062.
117. Yan T., Jia Y., Hou K., Gui Z., Zhang W., Du K., Pan D., Li H., Shi Y., Qi L., Gao Q., Zhang Y., Tang Y. Highly efficient hydrodesulfurization driven by an in-situ reconstruction of ammonium/amine intercalated MoS₂ catalysts // *iScience*. – 2024. – 27(6).
118. Hong X., Chen J., Wei J., Wu W., Yang Z., Sun S., Xiao F., Tu G. Recovering attached crude oil from hydrodesulfurization spent catalysts // *Recycling*. – 2025. – 10(1):10.
119. Arora S., Singh R., Khan R., Kunzru D., Sivakumar S. Challenges and opportunities to design a highly active hydrodesulfurization catalyst: a comprehensive review // *Molecular Catalysis*. – 2025. – Vol. 583.
120. Tamjidi S., Esmaili H. A review on biodesulfurization of crude oil using different microorganisms: reaction mechanisms, effective factors, and removal efficiency of organic sulfur compounds // *Process Biochemistry*. – 2025. – Vol. 150. – P. 288-305.
121. Sadare O.O., Obazu F., Daramola M.O. Biodesulfurization of petroleum distillates: current status, opportunities and future challenges // *Environments*. – 2017. – 4(4):85.
122. Mamuad R.Y., Choi A.E.S. Biodesulfurization processes for the removal of sulfur from diesel oil: a perspective report // *Energies*. – 2023. – 16(6):2738.
123. Jiao Y., An L., Wang W. Microbial communities and their roles in the Cenozoic sulfurous oil reservoirs in the Southwestern Qaidam Basin, Western China // *Scientific Reports*. – 2023. – 13. – 7988.
124. Tiburcio S.R.G., Macrae A., Peixoto R.S., da Costa Rachid C.T.C., Mansoldo F.R.P., Alviano D.S., Alviano C.S., Ferreira D.F., de Queiroz Venâncio

F., Vermelho A.B. Sulphate-reducing bacterial community structure from produced water of the Periquito and Galo de Campina onshore oilfields in Brazil // *Scientific Reports*. – 2021. – 11(1):20311.

125. Tian H., Gao P., Chen Z., Li Y., Wang Y., Zhou J., Li G., Ma T. Compositions and abundances of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing microorganisms in water-flooded petroleum reservoirs with different temperatures in China // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – 8:143.

126. Pannekens M., Kroll L., Müller H., Tall Mbow F., Meckenstock R.U. Oil reservoirs: an exceptional habitat for microorganisms // *New Biotechnology*. – 2019. – 49. – P. 1-9.

127. Muyzer G., Stams A. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – 6. – P. 441-454.

128. Tripathi A.K., Thakur P., Saxena P., Rauniyar S., Gopalakrishnan V., Singh R.N., Gadhamshetty V., Gnimpieba E.Z., Jasthi B.K., Sani R.K. Gene sets and mechanisms of sulfate-reducing bacteria biofilm formation and quorum sensing with impact on corrosion // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – 12:754140.

129. Kushkevych I., Hýžová B., Vítězová M., Rittmann S.K.R. Microscopic methods for identification of sulfate-reducing bacteria from various habitats // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – 22(8):4007.

130. Marietou A. Sulfate-reducing microorganisms in high temperature oil reservoirs // *Advances in Applied Microbiology*. – 2021. – 116. – P. 99-131.

131. Neukirchen S., Pereira I.A.C., Sousa F.L. Stepwise pathway for early evolutionary assembly of dissimilatory sulfite and sulfate reduction // *ISME Journal*. – 2023. – 17. – P. 1680-1692.

132. Müller A., Kjeldsen K., Rattei T. et al. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases // *ISME Journal*. – 2015. – 9. – P. 1152-1165.

133. Rosendahl C.D., Roebbert Y., Schippers A., Weyer S. U mobilization and associated U isotope fractionation by sulfur-oxidizing bacteria // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – 14:1190962.

134. Eom H. Development of an improved sulfur-oxidizing bacteria-based ecotoxicity test for simple and rapid on-site application // *Toxics*. – 2023. – 11. – 352.

135. Konrad R., Vergara-Barros P., Alcorta J., Alcamán-Arias M.E., Levicán G., Ridley C., Díez B. Distribution and activity of sulfur-metabolizing bacteria along the temperature gradient in phototrophic mats of the Chilean hot spring Porcelana // *Microorganisms*. – 2023. – 11. – 1803.

136. Whaley-Martin K.J., Chen L.X., Nelson T.C. et al. O₂ partitioning of sulfur-oxidizing bacteria drives acidity and thiosulfate distributions in mining waters // *Nature Communications*. – 2023. – 14. – 2006.

137. Zhao C., Wang J., Zang F., Tang W., Dong G., Nan Z. Water content and communities of sulfur-oxidizing bacteria affect elemental sulfur oxidation in silty and sandy loam soils // *European Journal of Soil Biology*. – 2022. – 111.

138. Siddiqui S.U., Ahmed K. Methods for desulfurization of crude oil: a review // *Science International*. – 2016. – 28(2).
139. Chen S., Zhao C., Liu Q., Zhang X., Sun S., Zang M. Biodesulfurization of diesel oil in oil–water two-phase reaction system by *Gordonia* sp. SC-10 // *Biotechnology Letters*. – 2019. – 41. – P. 547-554.
140. Peng C., Huang D., Shi Y., Zhang B., Sun L., Li M., Deng X., Wang W. Comparative transcriptomic analysis revealed the key pathways responsible for organic sulfur removal by thermophilic bacterium *Geobacillus thermoglucosidasius* W-2 // *Science of the Total Environment*. – 2019. – 676. – P. 639-650.
141. Chen S., Zang M., Li L., Chen J., Liu Q., Feng X., Sun S., Zang C., Zhao C. Efficient biodesulfurization of diesel oil by *Gordonia* sp. SC-10 with highly hydrophobic cell surfaces // *Biochemical Engineering Journal*. – 2021. – 174.
142. Soleimani M., Bassi A., Margaritis A. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels // *Biotechnology Advances*. – 2007. – 25. – P. 570-596.
143. Qiu X., Wang B., Kozhevnikov I.V. New adsorption materials for deep desulfurization of fuel oil // *Materials*. – 2024. – 17(8):1803.
144. Rodaina M., El-Sayed E.M. Synthesis and characterization of Al-based metal–organic framework with superior performance for adsorptive desulfurization of model fuel // *Scientific Reports*. – 2025. – 15. – 20104.
145. Prabhu M.K., Louwen J.N., Vogt E.T.C. et al. Hydrodesulfurization of methanethiol over Co-promoted MoS₂ model catalysts // *Nature Communications*. – 2024. – 15. – 7170.
146. Yunusov M.P., Gulomov S., Nasullayev K.A. et al. Hydrodesulfurization catalysts from aluminium-containing waste // *Catalysis Letters*. – 2024. – 154. – P. 4409-4421.
147. Dimos K., Kalantzi S., Prasoulas G., Gklekas P.D., Martzoukou O., Hatzinikolaou D.G., Kekos D., Mamma D. Enhancing biomass production and biodesulfurization efficiency of *Rhodococcus qingshengii* IGTS8: evaluation of batch, repeated batch and fed-batch cultivation techniques // *Applied Sciences*. – 2025. – 15(15):8349.
148. Ahmad A., Zamzami M.A., Ahmad V., Al-Thawadi S., Akhtar M.S., Khan M.J. Bacterial biological factories intended for the desulfurization of petroleum products in refineries // *Fermentation*. – 2023. – 9(3):211.
149. Sadare O.O., Obazu F., Daramola M.O. Biodesulfurization of petroleum distillates: current status, opportunities and future challenges // *Environments*. – 2017. – 4(4):85.
150. Yuan B., Li X., Sun Y. A Short Review of Aerobic Oxidative Desulfurization of Liquid Fuels over Porous Materials // *Catalysts*. – 2022. – 12(2):129.
151. Ahmed B.S., Hamasalih L.O., Hama Aziz K.H., Omer K.M., Shafiq I. Oxidative Desulfurization of Real High-Sulfur Diesel Using Dicarboxylic Acid/H₂O₂ System // *Processes*. – 2022. – 10(11):2327.

152. Faria R.G., Silva D., Mirante F., Gago S., Cunha-Silva L., Balula S.S. Advanced Technologies Conciliating Desulfurization and Denitrogenation to Prepare Clean Fuels // *Catalysts*. – 2024. – 14(2):137.
153. Mamuad R.Y., Choi A.E.S. Biodesulfurization Processes for the Removal of Sulfur from Diesel Oil: A Perspective Report // *Energies*. – 2023. – 16. 2738.
154. Sager A., Rahman S., Syed A. Imtiaz., Zhang Y., et al. Oxidative and Extractive Desulfurization of Fuel Oils Catalyzed by N-Carboxymethyl Pyridinium Acetate and N-Carboxyethyl Pyridinium Acetate Acidic Ionic Liquids: Experimental and Computational DFT Study // *ACS Omega*. – 2024. – 9, 22. – P. 23485-23498.
155. Zhu D., Xu L., Zhang B., Zhu L., He J., Li H., Li H., Jiang W. Designing Inorganic–Organic Dual-Acid Deep Eutectic Solvents for Synergistically Enhanced Extractive and Oxidative Desulfurization // *Molecules*. – 2023. – 28(23):7743.
156. Armandsefat, F., Hamzehzadeh, S. Azizi N. Efficient and promising oxidative desulfurization of fuel using Fenton like deep eutectic solvent // *Sci Rep*. – 2024. – 14, 12614.
157. Oke E.A. Examining the effectiveness of deep eutectic solvents in removal of sulfur from fuel oil: a mini review // *Chemistry Africa*. – 2024. – 7. – P. 3565-3578.
158. Abro R., Kiran N., Ahmed S., Muhammad A., Jatoi A.S., Mazari S.A., Salma U., Plechkova N.V. Extractive desulfurization of fuel oils using deep eutectic solvents: a comprehensive review // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2022. – 10(3).
159. Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications // *Chemical Reviews*. – 2014. – 114(21). – P. 11060-11082.
160. Chandran D., Khalid M., Walvekar R., Mubarak N.M., Dharaskar S., Wong W.Y., Gupta T.C.S.M. Deep eutectic solvents for extraction-desulfurization: a review // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – 275. – P. 312-322.
161. Omar K.A., Sadeghi R. Database of deep eutectic solvents and their physical properties: a review // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – 384.
162. Oke E.A., Ijardar S.P. Advances in the application of deep eutectic solvents based aqueous biphasic systems: an up-to-date review // *Biochemical Engineering Journal*. – 2021. – 176.
163. Makoś P., Boczkaj G. Deep eutectic solvents based highly efficient extractive desulfurization of fuels: eco-friendly approach // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – 296.
164. Tahir S., Qazi U.Y., Naseem Z., Tahir N., Zahid M., Javaid R., Shahid I. Deep eutectic solvents as alternative green solvents for the efficient desulfurization of liquid fuel: a comprehensive review // *Fuel*. – 2021. – 305.
165. Abbott A.P., Capper G., Davies D.L. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures // *Chemical Communications*. – 2003. – P. 70-71.
166. Azzouz A., Hayyan M. Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology: Part II // *Chemical Engineering Journal*. – 2023. – 468.

167. Długosz O., Banach M. Green methods for obtaining deep eutectic solvents (DES) // *Journal of Cleaner Production*. – 2024. – 434.
168. Negi T., Kumar A., Sharma S.K., Rawat N., Saini D., Sirohi R., Prakash O., Dubey A., Dutta A., Shahi N.C. Deep eutectic solvents: preparation, properties, and food applications // *Heliyon*. – 2024. – 10(7).
169. Mgxadeni N., Kabane B., Bahadur I., Varma R.S., Singh S.K. Deep eutectic solvents as sustainable solvents for industrial separation problems: a recent update // *Journal of Ionic Liquids*. – 2023. – 3(2).
170. Wu K., Ren J., Wang Q., Nuerjiang M., Xia X., Bian C. Research progress on the preparation and action mechanism of natural deep eutectic solvents and their application in food // *Foods*. – 2022. – 11(21):3528.
171. Ivanović M., Islamčević Razboršek M., Kolar M. Innovative extraction techniques using deep eutectic solvents and analytical methods for the isolation and characterization of natural bioactive compounds from plant material // *Plants*. – 2020. – 9:1428.
172. Getie F.A., Ayele D.W., Habtu N.G., Yemata T.A., Yihun F.A., Worku A.K., Teshager M.A. Recent advances and various detection strategies of deep eutectic solvents for zinc–air batteries // *Heliyon*. – 2024. – 10(22):e40383.
173. Florindo C., Oliveira F.S., Rebelo L.P.N., Fernandes A.M., Marrucho I.M. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2014. – 2(10). – P. 2416-2425.
174. Thoda O., Svinterikos E., Sakkas K.M., Moschovi A.M., Yakoumis I. High-degree oxidative desulfurization of a commercial marine fuel using deep eutectic solvents and their recycling process // *Separations*. – 2023. – 10:445.
175. Mannu A., Blangetti M., Baldino S., Prandi C. Promising technological and industrial applications of deep eutectic systems // *Materials*. – 2021. – 14:2494.
176. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y.H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – 766. – P. 61-68.
177. Oyoun F., Toncheva A., Castillo Henríquez L., Grougnet R., Laoutid F., Mignet N., Alhareth K., Corvis Y. Deep eutectic solvents: an eco-friendly design for drug engineering // *ChemSusChem*. – 2023. – 16(20).
178. Abranches D.O., Martins M.A.R., Silva L.P., Schaeffer N., Pinho S.P., Coutinho J.A.P. Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: the quest for type V DES // *Chemical Communications*. – 2019. – 55. – 10253.
179. Schaeffer N., Vaz I.C.M., Pinheiro M.S., Olea F., Hanada T., Dourdain S., Coutinho J.A.P. Examining the potential of type V DESs for the solvent extraction of metal ions // *Green Chemistry*. – 2025. – 27. – P. 4438-4463.
180. Benito C., Alcalde R., Atilhan M., Aparicio S. High-pressure properties of type V natural deep eutectic solvents: the case of menthol:thymol // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – 376.

181. Calvo-Flores F.G., Mingorance-Sánchez C. Deep eutectic solvents and multicomponent reactions: two convergent items to green chemistry strategies // *ChemistryOpen*. – 2021. – 10(8). – P. 815-829.
182. Mgxadeni N., Kabane B., Bahadur I., Varma R.S., Singh S.K. Deep eutectic solvents as sustainable solvents for industrial separation problems: a recent update // *Journal of Ionic Liquids*. – 2023. – 3(2).
183. Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures // *Chemical Communications*. – 2003. – P. 70-71.
184. Nowacki K., Wysokowski M., Galiński M. Synthesis and characterization of betaine-based natural deep eutectic solvents for electrochemical application // *Journal of Molecular Liquids*. – 2025. – 424. – 127071.
185. Inayat S., Ahmad R., Awan S.J., Nawshad M. Ammonium chloride and urea based deep eutectic solvent: toxicological and antioxidant profile // *International Journal of Natural Medicine and Health Sciences*. – 2022. – 2(1). – P. 36-42.
186. AlOmar M.K., Hayyan M., Alsaadi M.A., Akib S., Hayyan A., Hashim M.A. Glycerol-based deep eutectic solvents: physical properties // *Journal of Molecular Liquids*. – 2016. – 215. – P. 98-103.
187. Rodriguez N.R., Ferre Guell J., Kroon M.C. Glycerol-based deep eutectic solvents as extractants for the separation of MEK and ethanol via liquid–liquid extraction // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2016. – 61(2). – P. 865-872.
188. Koigerova A., Gosteva A., Samarov A., Tsvetov N. Deep eutectic solvents based on carboxylic acids and glycerol or propylene glycol as green media for extraction of bioactive substances from *Chamaenerion angustifolium* (L.) // *Molecules*. – 2023. – 28:6978.
189. Svigelj R., Dossi N., Grazioli C., Toniolo R. Deep eutectic solvents (DESS) and their application in biosensor development // *Sensors (Basel)*. – 2021. – 21(13):4263.
190. Ullah R., Atilhan M., Anaya B., Khraisheh M., García G., ElKhattat A., Tariq M., Aparicio S. A detailed study of cholinium chloride and levulinic acid deep eutectic solvent system for CO₂ capture via experimental and molecular simulation approaches // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – 17. – P. 20941-20960.
191. Ijardar S.P., Singh V., Gardas R.L. Revisiting the physicochemical properties and applications of deep eutectic solvents // *Molecules*. – 2022. – 27:1368.
192. Ghareh Bagh F.S., Shahbaz K., Mjalli F.S., Hashim M.A., Alnashef I.M. Zinc(II) chloride-based deep eutectic solvents for application as electrolytes: preparation and characterization // *Journal of Molecular Liquids*. – 2015. – 204. – P. 76-83.
193. Imteyaz S., Ingole P.P. Comparison of physicochemical properties of choline chloride-based deep eutectic solvents for CO₂ capture: progress and outlook // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – 376.

194. Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K. Ionic liquid analogues formed from hydrated metal salts // *Chemistry – A European Journal*. – 2004. – 10. – P. 3769.
195. Cichowska-Kopczyńska I., Nowosielski B., Warmińska D. Deep eutectic solvents: properties and applications in CO₂ separation // *Molecules*. – 2023. – 28(14):5293.
196. Cui Y., Li C., Yin J., Li V., Jia Y., Bao M. Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride // *Journal of Molecular Liquids*. – 2017. – 236. – P. 338-343.
197. Hansen B.B., Sangoro J.R. Deep eutectic solvents: a review of fundamentals and applications // *Chemical Reviews*. – 2021. – 121(3). – P. 1232-1285.
198. Yadav A., Trivedi S., Rai R., Pandey S. Densities and dynamic viscosities of (choline chloride + glycerol) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range 283.15–363.15 K // *Fluid Phase Equilibria*. – 2014. – 367. – P. 135-142.
199. Shahbaz K., Baroutian S., Mjalli F.S., Hashim M.A., AlNashef I.M. Densities of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: prediction using artificial intelligence and group contribution techniques // *Thermochimica Acta*. – 2012. – 527. – P. 59-66.
200. Nowosielski B., Jamrógiewicz M., Łuczak J., Śmiechowski M., Warmińska D. Experimental and predicted physicochemical properties of monopropanolamine-based deep eutectic solvents // *Journal of Molecular Liquids*. – 2020. – 309.
201. Zhu Z., Lü H., Zhang M., Yang H. Deep eutectic solvents as non-traditionally multifunctional media for the desulfurization process of fuel oil // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2021. – 23. – P. 785-805.
202. Duarte de Alencar L.V.T., Rodríguez-Reartes S.B., Tavares F.W., Llovel F. Assessing viscosity in sustainable deep eutectic solvents and cosolvent mixtures: an artificial neural network-based molecular approach // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2024. – 12(21). – P. 7987-8000.
203. García G., Aparicio S., Ullah R., Atilhan M. Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications // *Energy & Fuels*. – 2015. – 29(4). – P. 2616-2644.
204. Makarov D.M., Kolker A.M. Viscosity of deep eutectic solvents: predictive modeling with experimental validation // *Fluid Phase Equilibria*. – 2025. – 587.
205. Pishro K.A., Gonzalez M.H. Use of deep eutectic solvents in environmentally friendly dye-sensitized solar cells and their physicochemical properties: a brief review // *RSC Advances*. – 2024. – 14. – P. 14480-14504.
206. Dokoohaki M.H., Mohammadpour F., Zolghadr A.R. Dye-sensitized solar cells based on deep eutectic solvent electrolytes: insights from experiment and simulation // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2021. – 125. – P. 15155-15165.

207. Sun T., Teja A.S. Density, viscosity, and thermal conductivity of aqueous ethylene, diethylene, and triethylene glycol mixtures between 290 K and 450 K // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2003. – 48(1). – P. 198-202.
208. Bryant S.J., Bryant G., Drummond C.J., Greaves T.L. Physico-chemical characterization of amino acid-based deep eutectic solvents // *Molecules*. – 2025. – 30(4):818.
209. Coin Z., Dangwal S., Irwin M.H., Knight T., Bhave R., Rother G., Sacci R., Arifuzzaman M., Bocharova V., Ivanov I., Sholl D.S., Islam S.Z. Effect of viscosity of a deep eutectic solvent on CO₂ capture performance in an energy-efficient membrane contactor-based process // *ACS Omega*. – 2025. – 10(4). – P. 3407-3417.
210. Shaibuna M., Theresa L.V., Sreekumar K. Neoteric deep eutectic solvents: history, recent developments, and catalytic applications // *Soft Matter*. – 2022. – 18(14).
211. van den Bruinhorst A., Costa Gomes M. Is there depth to eutectic solvents? // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. – 2022. – 37.
212. Mu L., Gao J., Zhang Q., Kong F., Zhang Y., Ma Z., Sun C., Lv S. Research progress on deep eutectic solvents and recent applications // *Processes*. – 2023. – 11(7):1986.
213. Qin H., Hu X., Wang J., Cheng H., Chen L., Qi Z. Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications // *Green Energy & Environment*. – 2020. – 5(1). – P. 8-21.
214. Yeow A.T.H., Hayyan A., Hayyan M., Junaidi M.U.M., Saleh J., Basirun W.J., Nor M.R.M., Al Abdulmonem W., Salleh M.Z.M., Zuki F.M., Hamid M.D. A comprehensive review on the physicochemical properties of deep eutectic solvents // *Results in Chemistry*. – 2024. – 7.
215. Ferreira C., Sarraguça M.A. Comprehensive review on deep eutectic solvents and their use to extract bioactive compounds of pharmaceutical interest // *Pharmaceuticals*. – 2024. – 17:124.
216. Martins M.A.R., Pinho S.P., Coutinho J.A.P. Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures // *Journal of Solution Chemistry*. – 2019. – 48. – P. 962-982.
217. Craveiro R., Aroso I., Flammia V., Carvalho T., Viciosa M.T., Dionísio M., Barreiros S., Reis R.L., Duarte A.R.C., Paiva A. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents // *Journal of Molecular Liquids*. – 2016. – 215. – P. 534-540.
218. Meng X., Ballerat-Busserolles K., Husson P., Andanson J.-M. Impact of water on the melting temperature of urea + choline chloride deep eutectic solvent // *New Journal of Chemistry*. – 2016. – 40. – P. 4492-4499.
219. Meredith L., Elbourne A., Greaves T.L., Bryant G., Bryant S.J. Physico-chemical characterisation of glycerol- and ethylene glycol-based deep eutectic solvents // *Journal of Molecular Liquids*. – 2024. – 394. – 123777.
220. Sanjeeta, Singh A., Kavirajwar J. Dynamic properties and diverse applications of deep eutectic solvents // *Journal of Ionic Liquids*. – 2025. – 5(1).

221. Hao L., Wang M., Shan W., Deng C., Ren W., Shi Z., Lü H. L-proline-based deep eutectic solvents (DESs) for deep catalytic oxidative desulfurization (ODS) of diesel // *Journal of Hazardous Materials*. – 2017. – 339. – P. 216-222.
222. Armandsefat F., Hamzehzadeh S., Hosseini S., Azizi N. Deep eutectic solvents as sustainable and extraordinary all-in-one systems for oxidative desulfurization // *Journal of Molecular Liquids*. – 2024. – 410.
223. Liao H.G., Jiang Y.X., Zhou Z.Y., Chen S.P., Sun S.G. Shape-controlled synthesis of gold nanoparticles in deep eutectic solvents for studies of structure-functionality relationships in electrocatalysis // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – 47(47). – P. 9100-9103.
224. Yue L., Jiaojiao X., Xin Z., Yingna C., Jingmei Y. Deep desulfurization performance of thiophene with deep eutectic solvents-loaded carbon nanotube composites // *Royal Society Open Science*. – 2021. – 8:201736.
225. Menegatti T., Kopač T., Žnidaršič-Plazl P. Tuning mechanical characteristics and permeability of alginate hydrogel by polyvinyl alcohol and deep eutectic solvent addition // *Bioengineering*. – 2024. – 11(4):371.
226. Ahmed B., Ahmad Z., Naz S., Ihsan A., Khan B. Oxidative desulfurization of liquid fuels using deep eutectic solvents as a catalyst and extractant: a review // *Chemical Engineering Research and Design*. – 2024. – 211. – P. 253-268.
227. Li C., Zhang J., Li Z., Yin J., Cui Y., Liu Y., Yang G. Extraction desulfurization of fuels with metal-ion-based deep eutectic solvents (MDESs) // *Green Chemistry*. – 2016. – 18(13). – P. 3789-3795.
228. Armandsefat F., Hamzehzadeh S., Azizi N. Efficient and promising oxidative desulfurization of fuel using Fenton-like deep eutectic solvent // *Scientific Reports*. – 2024. – 14. – 12614.
229. Gano Z.S., Mjalli F.S., Al-Wahaibi T., Al-Wahaibi Y., AlNashef I.M. Desulfurization of liquid fuel via extraction with imidazole-containing deep eutectic solvent // *Green Processing and Synthesis*. – 2017. – 6(5). – P. 511-521.
230. Logarušić M., Šubar K., Nikolić M., Jurinjak Tušek A., Damjanović A., Radović M., Radojčić Redovniković I., Žnidaršič-Plazl P., Kroutil W., Cvjetko Bubalo M. Harnessing the potential of deep eutectic solvents in biocatalysis: design strategies using CO₂ to formate reduction as a case study // *Frontiers in Chemistry*. – 2024. – 12:1467810.
231. Oke E.A. Examining the effectiveness of deep eutectic solvents in removal of sulfur from fuel oil: a mini review // *Chemistry Africa*. – 2024. – 7. – P. 3565-3578.
232. Ünlü A.E., Takaç S. Use of deep eutectic solvents in the treatment of agro-industrial lignocellulosic wastes for bioactive compounds // *Agroecosystems – Very Complex Environmental Systems*. – 2020.
233. АО «Каражанбасмунай». URL: <https://www.kbm.kz/ru/>. (Дата обращения: 22.08.2025).
234. Buzachi Operating Ltd. URL: <https://buzachi.com/>. (Дата обращения: 22.08.2025).

235. ТОО «Бузачи Нефть». О месторождении. <http://buzachineft.kz> (Дата обращения: 22.08.2025).
236. Месторождение Кумколь. О месторождении. <https://www.turgai.kz/kumkol.html> (Дата обращения: 22.08.2025).
237. АО «ТУРГАЙ-ПЕТРОЛЕУМ». URL: <https://www.turgai.kz/>. 22.08.2025. (Дата обращения: 22.08.2025).
238. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). https://www.himedia.kz/index_r.htm. 22.08.2025. (Дата обращения: 22.08.2025).
239. Liu, Y., Lai, Q., Du, J., Shao, Z. Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments // *Sci. Rep.* – 2017. – 7:689.
240. Tirkey A., Upadhyay, L.S.B. Introducing the LDPE degrading microbes of sedimentary systems: from dumpsite to laboratory // *Environmental Science Advances.* – May 2025. – Volume 4, Issue 6. – P. 952-963.
241. H.S. Parihar. *Bacillus cereus* // *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition). – 2014. – P. 353-354.
242. Takeno A., Okamoto A., Tori K., Oshima K., Hirakawa H., Toh H., Agata N., Yamada K., Ogasawara N., Hayashi T., Shimizu T., Kuhara S., Hattori M., Ohta M. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* NC7401, which produces high levels of the emetic toxin cereulide // *J Bacteriol.* – 2012. – 194(17). – P. 4767-8.
243. Kashif M., Lu Z., Sang Y., Yan B., Shah S.J., Khan S., Azhar Hussain M., Tang H., Jiang C. Whole-Genome and Transcriptome Sequencing-Based Characterization of *Bacillus Cereus* NR1 From Subtropical Marine Mangrove and Its Potential Role in Sulfur Metabolism // *Front Microbiol.* – 2022 Mar 9. – 13:856092.
244. Saberi, F., Marzban, R., Ardjmand, M., Pajoum Shariati, F., Tavakoli, O. Optimization of culture media to enhance the ability of local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* // *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.* – October 2020. – Volume 19, Issue 7. – P. 468-475.
245. Gurikar C., Nanje Gowda N.A., Hanumantharaju K.N., Netravati B.P. Chapter 4 - Role of *Bacillus* species in soil fertility with reference to rhizosphere engineering // *Rhizosphere Engineering.* – 2022. – P. 65-76.
246. Ma T., Li G., Li J. et al. Desulfurization of dibenzothiophene by *Bacillus subtilis* recombinants carrying *dszABC* and *dszD* genes // *Biotechnol Lett.* – 2006. – 28. – P.1095-1100.
247. Oubaha B., Rathore, R.S., Bagri J., et.al. *Bacillus siamensis* strain BW enhances rice growth and salinity tolerance through redox equilibrium and hormone modulation // *Current Plant Biology.* – 2024. – Volume 37.
248. Makharita R.R., El-Ahmady El-Naggar N., Baghdadi A.M., et al. Sustainable production of bacterial nanocellulose from date fruit waste using *Bacillus haynesii* for waste valorisation and crystal violet dye removal // *Sci Rep.* – 2025. – 15, 25133.

249. Shi C., Zeng S., Gao X., Hussain M., He M., Niu X., Wei C., Yang R., Lan M., Xie Y., Wang Z., Wu G., Tang P. Complete Genome Sequence Analysis of *Bacillus subtilis* MC4-2 Strain That against Tobacco Black Shank Disease // *Int J Genomics*. – 2024. – 8846747.
250. Yang Liu, Qiliang Lai, Juan Du, Zongze Shao. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – 66. – P. 1193-1199.
251. Lee S., Kim Y., Han J.A., Lee H-S., Kim E.Y. Complete genome sequence of bacterium *Peribacillus simplex* strain IMG11 from soil // *Microbiol Resour Announc*. – 2024. – 13 (10):e0064324.
252. Kalsi N., Drautz-Moses D.I., Uchida A., Purbojati R.W., Houghton J.N.I., Chénard C., Wong A., Kolundžija S., Clare M.E., Kushwaha K.K., Putra A., Gaultier N.E., Premkrishnan B.N.V., Heinle C.E., Vettath V.K., Junqueira A.C.M., Schuster S.C. Complete Genome Sequence of *Microbacterium* sp. Strain SGAir0570, Isolated from Tropical Air Collected in Singapore // *Microbiol Resour Announc*. – 2019. – 8(34):e00613-19.
253. Li W., Zhang Y., Wang M.D., Shi Y. Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated *Microbacterium* strain ZD-M2 // *FEMS Microbiol Lett*. – 2005. 247(1). – P. 45-50.
254. Sadare O.O., Daramola M.O. Bio-catalytic degradation of dibenzothiophene (DBT) in petroleum distillate (diesel) by *Pseudomonas* spp. // *Sci Rep*. – 2023. – 13, 6020.
255. Calzada J., Zamarro M.T., Alcón A., Santos V.E., Díaz E., García J.L., Garcia-Ochoa F. Analysis of dibenzothiophene desulfurization in a recombinant *Pseudomonas putida* strain // *Appl Environ Microbiol*. – 2009. – 75 (3):875-7.
256. Филиппова А.С. Идентификация салицилат-1-монооксигеназы *nahG* бактерий *pseudomonas putida* bs3701 и определение ее биохимических характеристик // *УДК*. – 2025. – 577.15; 579.222.
257. Martzoukou O., Amillis S., Glekas P.D., Breyanni D., Avgeris M., Scorilas A., Kekos D., Pachnos M., Mavridis G., Mamma D., Hatzinikolaou D.G. Advancing Desulfurization in the Model Biocatalyst *Rhodococcus qingshengii* IGTS8 via an In Locus Combinatorial Approach // *Appl Environ Microbiol*. – 2023. – 89(2):e0197022.
258. Kitagawa W., Hata M. Complete Genome Sequence of *Rhodococcus erythropolis* JCM 2895, an Antibiotic Protein-Producing Strain // *Microbiol Resour Announc*. – 2022. – 11(12):e0068222.
259. Tralau T., Vuilleumier S., Thibault C., Campbell B.J., Hart C.A., Kertesz M.A. Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol*. – 2007. – 189(19):6743-50.
260. Sathe N., Beech P., Croft L., Suphioglu C., Kapat A., Athan E. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment // *Infectious Medicine*. – 2023. – Volume 2, Issue 3. – P. 178-194.

261. Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ). Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт». г. Москва. 2023 г.

262. Amakiri K.T., Canon A.R., Molinari M., Angelis-Dimakis A. Review of oilfield produced water treatment technologies // *Chemosphere*. – 2022. – Volume 298.

263. Abro R., Kiran N., Ahmed S., Muhammad A., Jatoi A.S., Mazari S.A., Salma U., Plechkova N.V. Extractive desulfurization of fuel oils using deep eutectic solvents – A comprehensive review // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2022. – Volume 10, Issue 3.

264. ГОСТ ISO 3170-2022. Нефтепродукты жидкие. Ручные методы отбора проб.

265. Практикум по микробиологии / Под. ред. А. И. Нетрусов. – М.: Академия, 2005. – 604 с.

266. Agilent Technologies. 7890B GC System. URL: <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/gc-systems/7890b-gc-system> (Дата обращения: 28.08.2025).

267. Chromatography Data Systems. OpenLab CDS. URL: <https://www.agilent.com/en/product/software-informatics/analytical-software-suite/chromatography-data-systems/openlab-cds> (Дата обращения: 29.08.2025)

268. Blevins S.M., Bronze M.S. Robert Koch and the ‘golden age’ of bacteriology // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – 14(9). – P. e744-e751.

269. Kováč J., Vítězová M., Kushkevych I. Metabolic activity of sulfate-reducing bacteria from rodents with colitis // *Open Medicine (Warsaw)*. – 2018. – 13. – P. 344-349.

270. Sandman K., Ecker C. Pseudomonas isolation and identification: an introduction to the challenges of polyphasic taxonomy // *Journal of Microbiology & Biology Education*. – 2014. – 15(2). – P. 287-291.

271. Gudina E.J., Pereira J.F.B., Costa R., Coutinho J.A.P., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-packed columns // *Journal of Hazardous Materials*. – 2013.

272. Petersen J., McLaughlin S. *Laboratory Exercises in Microbiology: Discovering the Unseen World Through Hands-On Investigation*. – 2016. – P. 195.

273. JoVE Science Education Database. Microbiology. Pure cultures and streak plating: isolation of single bacterial colonies from a mixed sample. – JoVE, Cambridge, MA. – 2023.

274. Dolla A., Fournier M., Dermoun Z. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria // *J. Biotechnol.* – 2006. – V.126 (1). – P.87-100.

275. Brioukhanov A.L., Pieulle L., Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Ed. By

Mendez-Vilas A. Microbiology Book Series. Badajoz: Formatex Research Center. – 2010. – V.1. – P.148-159

276. Singh N., Verma T., Gaur R. Detoxification of hexavalent chromium by an indigenous facultative anaerobic *Bacillus cereus* strain isolated from tannery effluent // *African Journal of Biotechnology*. – 2013. – 12(10). – P. 1091-1103.

277. Zhang P., You Z., Chen T., Zhao L., Zhu J., Shi W., Meng Q., Sun Y. Study on the breeding and characterization of high-efficiency oil-degrading bacteria by mutagenesis // *Water*. – 2022. – 14:2544.

278. Инструкция по применению набор реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала. «ДНК/РНК-С-ФАКТОР».

279. Desjardins P., Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids // *Journal of Visualized Experiments*. – 2010. – (45):2565. – DOI: 10.3791/2565.

280. Desjardins P.R., Conklin D.S. Microvolume quantitation of nucleic acid // *Current Protocols in Human Genetics*. – 2011. – 93(1):A.3J.1–A.3J.16.

281. Foster A., Laurin N. Development of a fast PCR protocol enabling rapid generation of AmpF ℓ STR® Identifiler® profiles for genotyping of human DNA // *Investigative Genetics*. – 2012. – 3:6.

282. Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 2006. – 27(4). – P. 397-404.

283. Hoorzook K.B., Barnard T.G. Culture-independent DNA extraction method for bacterial cells concentrated from water // *MethodsX*. – 2022. – 9:101653.

284. Chen S., Sun S., Zhao C., Liu Q., Zang M. Biodesulfurization of model oil using growing cells of *Gordonia* sp. SC-10 // *Petroleum Science and Technology*. – 2019.

285. СТ РК АСТМ Д 4294. Стандартный метод определения серы в нефти и нефтепродуктах методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии на основе энергии дисперсионного взаимодействия.

286. Vasil'eva I., Morozova O., Shumakovich G., Yaropolov A. Betaine-based deep eutectic solvent as a new media for laccase-catalyzed template-guided polymerization/copolymerization of aniline and 3-aminobenzoic acid // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – 23(19):11409.

287. Koigerova A., Gosteva A., Samarov A., Tsvetov N. Deep eutectic solvents based on carboxylic acids and glycerol or propylene glycol as green media for extraction of bioactive substances from *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop. // *Molecules*. – 2023. – 28:6978.

288. Islam S., Rubio C., Rafikova K., Mutelet F. Desulfurization and denitrogenation using betaine-based deep eutectic solvents // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2024. – 69(6). – P. 2244-2254.

289. ISO 8754:2003. Petroleum products Determination of sulfur content Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry.

290. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: ВШ. 1990. – 350 с.

291. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975. – 296 с.
292. STATISTICA 13.3. URL: <https://statistica.software.informer.com/13.3/> (Дата обращения: 29.08.2025).
293. Yu B., Xu P., Shi Q., Ma C. Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – 72(1). – P. 54-58.
294. Ogbesejana A.B., Bello O.M., Akintade O.O. et al. Dibenzothiophenes, phenyldibenzothiophenes, and benzo[b]naphthothiophenes in crude oils and source rock extracts from the Niger Delta Basin, Nigeria, and their applications as source facies, depositional environments, and thermal maturity indicators // *Arab J Geosci*. – 2021. – 14, 592.
295. Fallick A.E., Boyce A.J., McConville P. Sulphur stable isotope systematics in diagenetic pyrite from the North Sea hydrocarbon reservoirs revealed by laser combustion analysis // *Isotopes Environ Health Stud*. – 2012. – 48(1). – P. 144-65.
296. Gao P., Fan K. Sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and sulfate-reducing bacteria (SRB) in oil reservoir and biological control of SRB: a review // *Arch Microbiol*. -2023. – 205, 162.
297. Dong Y., Kumar C. G., Chia N., Kim P. J., Miller P. A., Price N. D., et al. *Halomonas sulfidaeris*-dominated microbial community inhabits a 1.8 km-deep subsurface Cambrian Sandstone reservoir // *Environ. Microbiol*. – 2014. – 16. – P. 1695-1708.
298. Ma T., Chen Y. Metabolism characteristics of microorganisms in oil reservoir and microbial enhanced oil recovery // *J Microbiol*. – 2018. – 38. – P. 1-8.
299. Head I.M., Gray N.D., Larter S.R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management // *Front. Microbiol*. – 2014. – 5:566.
300. Sampaio, I. C. F., de Moura, I. V. L., Matos, J. B. T. L., Jones, C. M., & de Almeida, P. F. Use of Depleted Oil and Gas Reservoirs as Bioreactors to Produce Hydrogen and Capture Carbon Dioxide // *Fermentation*. – 2025. – 11(9), 490.
301. Ridley C.M., Voordouw G. Aerobic microbial taxa dominate deep subsurface cores from the Alberta oil sands // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2018. – 94(6):fiy073.
302. Dong H., Zhang F., Xu T., Liu Y., Du Y., Wang C., Liu T., Gao J., He Y., Wang X., Sun S., She Y. Culture-dependent and culture-independent methods reveal microbe–clay mineral interactions by dissimilatory iron-reducing bacteria in an integral oilfield // *Science of the Total Environment*. – 2022. – 840:156577.
303. Varjani S.J., Gnansounou E. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs // *Bioresource Technology*. – 2017. – Volume 245, Part A. – P. 1258-1265.
304. Knisz J., Eckert R., Gieg L.M., Koerdt A., Lee J.S., et al. Microbiologically influenced corrosion – more than just microorganisms // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2023. – Volume 47, Issue 5.

305. Zhou L., Wu J., Ji J.H., Gao J., Liu Y.F., Wang B. et al. Characteristics of microbiota, core sulfate-reducing taxa and corrosion rates in production water from five petroleum reservoirs in China // *Science of the Total Environment*. – 2023. – 858(Pt 3), 159861.
306. Tian H., Gao P., Qi C., Li G., Ma T. Nitrate and oxygen significantly changed the abundance rather than structure of sulphate-reducing and sulphur-oxidising bacteria in water retrieved from petroleum reservoirs // *Environ Microbiol Rep*. – 2024. – Volume 16, Issue 2.
307. Bidzhieva S. K., Tourova T. P., Grouzdev D. S., Samigullina S. R., Sokolova D. S., et al. Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from an Oil Field in Kazakhstan and a Description of *Pseudodesulfovibrio karagichevae* sp. Nov // *Microorganisms*. – 2024. – 12(12), 2552.
308. Nazina T.N., Tourova T.P., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Poltarau A.B. A Novel View on the Taxonomy of Sulfate-Reducing Bacterium 'Desulfotomaculum salinum' and a Description of a New Species *Desulfofundulus salinus* sp. Nov // *Microorganisms*. – 2024. – 12(6):1115.
309. Ziganshina E.E., Mohammed W.S., Ziganshin A.M. Microbial Diversity of the Produced Waters from the Oilfields in the Republic of Tatarstan (Russian Federation): Participation in Biocorrosion // *Applied Sciences*. – 2023. – 13(24):12984.
310. Peng L., Wen S., Yu L., Li H., Wang F., Deng X. Characterizations of sulfate-reducing bacteria biofilm formed on N80 carbon steel in artificial shale gas field produced water // *Sci Rep*. – 2025. – 15(1):22388.
311. Ke Y., Xiang Y., Yin Y., Wang Y., Liu G., Cai Y., Wang D. Sulfate-reducing bacteria and sulfur-oxidizing bacteria interactions at redox interfaces: Implications for mercury methylation // *Environ Res*. – 2025. – 285(Pt 3):122553.
312. Rajbongshi A., Gogoi S.B. A review on anaerobic microorganisms isolated from oil reservoirs // *World J Microbiol Biotechnol*. – 2021. – 37(7):111.
313. Haithm Salah Hagar, Jalal Foroozesh, Sunil Kumar, Davood Zivar, Negar Banan, Iskandar Dzulkarnain. Microbial H₂S generation in hydrocarbon reservoirs: Analysis of mechanisms and recent remediation technologies // *Journal of Natural Gas Science and Engineering*. – 2022. – Volume 106.
314. Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S. et al. Microbial Diversity and Potential Sulfide Producers in the Karazhanbas Oilfield (Kazakhstan) // *Microbiology*. – 2020. – 89. – P. 459-469.
315. Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Babich T.L., Loiko N.G., Ershov A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zhaparov N.S., Nazina T.N. Sulfidogenic Microbial Communities of the Uzen High-Temperature Oil Field in Kazakhstan // *Microorganisms*. – 2021. – 9(9):1818.
316. Twible L.E., Whaley-Martin K., Chen L.X., Colenbrander Nelson T., Arrey J.L.S., Jarolimek C.V., King J.J., Ramilo L., Sonnenberg H., Banfield J.F., Apte S.C., Warren L.A. pH and thiosulfate dependent microbial sulfur oxidation strategies across diverse environments // *Front Microbiol*. – 2024. – 15:1426584.

317. Kelly J. Whaley-Martin, Lin-Xing Chen, Tara Colenbrander Nelson, Jennifer Gordon, Rose Kantor, Lauren E. Twible. Acidity and sulfur oxidation intermediate concentrations controlled by O₂-driven partitioning of sulfur oxidizing bacteria in a mine tailings impoundment // *Chemistry. Sulfur.* – 2021.

318. Li Q., Gong L., Chen X., Gadd G.M., Liu D. Dual role of microorganisms in metal corrosion: a review of mechanisms of corrosion promotion and inhibition // *Front Microbiol.* – 2025. – 16:1552103.

319. Kadnikov V.V., Ravin N.V., Sokolova D.S., Semenova E.M., Bidzhieva S.K., Beletsky A.V., Ershov A.P., Babich T.L., Khisametdinov M.R., Mardanov A.V., et al. Metagenomic and Culture-Based Analyses of Microbial Communities from Petroleum Reservoirs with High-Salinity Formation Water, and Their Biotechnological Potential // *Biology.* – 2023. – 12(10):1300.

320. Scheffer G., Rattray J., Evans P., Shi W., Bhatnagar S., Hubert C.R.J. Nitrate-reducing microorganisms prevent souring of an oil field produced water storage pond // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2025. – 101(5):fiat041.

321. Hobart K.K., Walker G.M., Feinberg J.M., Bailey J.V., Jones D.S. Diverse *Sulfuriferula* spp. from sulfide mineral weathering environments oxidize ferrous iron and reduced inorganic sulfur compounds // *Appl Environ Microbiol.* – 2025. – 91:e00216-25.

322. Qing C., Nicol A., Li P., Planer-Friedrich B., Yuan C., Kou Z. Different sulfide to arsenic ratios driving arsenic speciation and microbial community interactions in two alkaline hot springs // *Environ Res.* – 2023. – 218:115033.

323. Hirschler A., Carapito C., Maurer L., Zumsteg J., Villette C., Heintz D., Dahl C., Al-Nayal A., Sangal V., Mahmoud H., Van Dorsselaer A., Ismail W. Biotransformation Induces Reprogramming of Sulfur Metabolism in *Rhodococcus qingshengii* IGTS8: Proteomics and Untargeted Metabolomics // *Microbiol Spectr.* – 2021. – 9:e00692-21.

324. Саданов А.Қ., Спанкулова Г.А., Ауэзова О.Н. Ассоциации микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // *Нефть и газ.* – 2020. – 1 (115). – С. 114-122.

325. Vigneron A., Alsop E.B., Lomans B.P., Kyrpides N.C., Head I.M., Tsesmetzis N. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle // *ISME J.* – 2017. – 11(9). – P. 2141-2154.

326. Biaojun Zhang, Yanling Wang, Hongxiang Zhu, Shaobin Huang, et al. Evaluation of H₂S gas removal by a biotrickling filter: Effect of oxygen dose on the performance and microbial communities // *Process Safety and Environmental Protection.* – 2022. – Volume 166. – P. 30-40.

327. Alkan H., Kögler F., Namazova G., Hatscher S., Jelinek W., Amro M. Assessment of the Biogenic Souring in Oil Reservoirs under Secondary and Tertiary Oil Recovery // *Energies.* – 2024. – 17(11):2681.

328. Wu B., Xiu J., Yu L., Huang L., Yi L., Ma Y. Degradation of crude oil in a co-culture system of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Microbiol.* – 2023. – 14:1132831.

329. Beilig S., Pannekens M., Voskuhl L., Meckenstock R.U. Assessing anaerobic microbial degradation rates of crude light oil with reverse stable isotope labelling and community analysis // *Front. Microbiomes.* – 2024. – 3:1324967.
330. Cui-Jing Zhang, Zhuo Zhou, Guihong Cha, Ling Li, Lin Fu, Lai-Yan Liu, Lu Yang, Gunter Wegener, Lei Cheng, Meng Li. Anaerobic hydrocarbon biodegradation by alkylotrophic methanogens in deep oil reservoirs // *The ISME Journal.* – 2024. – Volume 18, Issue 1.
331. Pandolfo E., Barra Caracciolo A., Rolando L. Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons // *Water.* – 2023. – 15, 375.
332. Benito Merino D., Lipp J.S., Borrel G., Boetius A., Wegener G. Anaerobic hexadecane degradation by a thermophilic Hadarchaeon from Guaymas Basin // *ISME J.* – 2024. – 8;18(1).
333. Lin H., Lv Y., Zhang, Y. High hydrostatic pressure stimulates n-C16 mineralization to CO₂ by deep-ocean bacterium *Alcanivorax xenomutans* A28 // *Commun Biol.* – 2025. – 8, 248.
334. Ma Y., Zhu H., Liu H., Xie Y., Zhang D., et al. Degrading characteristics of oil-degrading bacteria and its study of petroleum hydrocarbon metabolites // *CLEAN – Soil, Air, Water.* – 2023. – 52(2).
335. Zaman S.A.U., Bhrdwaj A., Nayarisseri A. et al. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading bacteria from oil polluted soil near Nacharam, Hyderabad, India // *Sci Rep.* – 2025. – 15, 17219.
336. Abdi A., Ranjbar B., Kazemzadeh Y. et al. Investigating the mechanism of interfacial tension reduction through the combination of low-salinity water and bacteria // *Sci Rep.* – 2024. – 14, 11408.
337. Christman G.D., León-Zayas R.I., Summers Z.M., Biddle J.F. Methanogens Within a High Salinity Oil Reservoir From the Gulf of Mexico // *Front Microbiol.* – 2020. – 11:570714.
338. Mbow F.T., Akbari A., Dopffel N., Schneider K., Mukherjee S., Meckenstock R.U. Insights into the effects of anthropogenic activities on oil reservoir microbiome and metabolic potential // *New Biotechnology.* – 2024. – 79. – P. 30-38.
339. Ayob Z., Kusai N.A., Jantan N.M., Murdi A.A., Law M.C., Khairuddin N.S.K., Idris A.S. Methanogenic archaea community in relation to methane production in oil palm planted on tropical peatland // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* – 2023. – 1167. – 012013.
340. Sherry A., Grant R.J., Aitken C.M., et al. Methanogenic crude oil-degrading microbial consortia are not universally abundant in anoxic environments // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2020. – 155. – 105085.
341. Tran T.T.T., Kannoopatti K., Padovan A., Thennadil S. Sulphate-reducing bacteria's response to extreme pH environments and the effect of their activities on microbial corrosion // *Applied Sciences.* – 2021. – 11(5):2201.
342. Cohen R.R.H. Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams // *Journal of Cleaner Production.* – 2006. – 14(12-13). – P. 1146-1157.

343. Liu Y., Chen S., Xie Z., Zhang L., Wang J., Fang J. Influence of extremely high pressure and oxygen on hydrocarbon-enriched microbial communities in sediments from the Challenger Deep, Mariana Trench // *Microorganisms*. – 2023. – 11(3):630.
344. Yernazarova A., Shaimerdenova U., Akimbekov N., Kaiyrmanova G., Shaken M., Izmailova A. Exploring the use of microbial enhanced oil recovery in Kazakhstan: a review // *Front. Microbiol.* – 2024. – 15:1394838.
345. Safdel M., Anbaz M. A., Daryasafar A., Jamialahmadi M. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries // *Renew. Sust. Energ. Rev.* – 2017. – 74. – P. 159-172.
346. Апендина Г.С., Туякбаева А.У. Изучение нефтеструктурной активности углеводородокисляющих микроорганизмов // *Научно-агрономический журнал*. – 2011. – С. 27-31.
347. Абдуллаева Ф.Я., Келдибаева С.С./ Исследование возможности применения микробиологического метода для повышения нефтеотдачи пластов месторождения «Узень» // *Научные труды*. № 4. – 2014. – С. 63-69.
348. Saltybaev A., Asenov A., Muratova A. The degree of biodegradation of petroleum hydrocarbons by microorganisms at positively low temperatures // *Norwegian Journal of Development of the International Science*. – 2018. – № 14. – P. 5-8.
349. Aitkeldiyeva S., Daugaliyeva S., Alimbetova A. Microbial diversity of the contaminated soils in Kazakhstan oilfields // *Periodico Tche Quimica*. – 2020. – 17(35). – P. 908-923.
350. Кильянов М.Ю., Игrevский Л.В., Хафизов С.Ф., Вербицкий В.С., Ламбин Д.Н. Повышение эффективности применения бактерицидов и биостатов при использовании морской воды в системе поддержания пластового давления // *Вестник нефтегазовой отрасли Казахстана*. – 2023. – 5(3). – С. 59-70.
351. Maughan H., Van der Auwera G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2011. – 11(5). – P. 789-797.
352. Blanco Crivelli X., Cundon C., Bonino M.P., Sanin M.S., Bentancor A. The complex and changing genus *Bacillus*: a diverse bacterial powerhouse for many applications // *Bacteria*. – 2024. – 3(3). – P. 256-270.
353. Shelef L.A. *Bacillus*. Detection // *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. – 2003. – P. 358-365.
354. Gillespie S.H. Gram-positive bacilli // *Medical Microbiology Illustrated*. – 1994. – P. 30-43.
355. Pontieri E. Chapter 2 – *Bacillus cereus* group diagnostics: chromogenic media and molecular tools // *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. – 2016. – P. 15-33.
356. McKenney P.T., Driks A., Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – 11. – P. 33.

357. Grutsch A.A., Nimmer P.S., Pittsley R.H., McKillip J.L. *Bacillus* spp. as pathogens in the dairy industry // In: Handbook of Food Bioengineering: Foodborne Diseases. – Geneva, Switzerland: Elsevier. – 2018. – Chapter 7. – P. 193-211.

358. Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – 70. – P. 5753-5798.

359. Das S., Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms // Journal of Microbiological Methods. – 2014. – 103. – P. 80-100.

360. Strube M.L. RibDif: Can individual species be differentiated by 16S sequencing? // Bioinformatics Advances. – 2021. – 1:vbab020.

361. Mohkam M., Nezafat N., Berenjian A., Mobasher M.A., Ghasemi Y. Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, recA, rpoB gene sequencing and RAPD-PCR // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2016. – 8. – P. 8-18.

362. Liu P., Long H., Cheng H., Liang M., Liu Z., Han Z., Guo Z., Shi H., Sun M., He S. Highly efficient synthesis of biogenic selenium nanoparticles by *Bacillus paramycoides* and their antibacterial and antioxidant activities // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – 11:1227619.

363. *Bacillus paramycoides* NH24A2. URL: <https://bacdive.dsmz.de/strain/140968> (Дата обращения: 03-09-2025).

364. de Castro L.M., Foong C.P., Higuchi-Takeuchi M., Lopes E.F., Numata K., Dias da Silva S., da Silva Nonato L., da Mota A.J., Pereira J.O. Draft whole-genome sequence of *Bacillus paramycoides* LB_RP2, a putative polyhydroxyalkanoate-producing bacterium isolated from an Amazonian blackwater river // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – 10(30):e0043821.

365. Tomizawa S., Hyakutake M., Saito Y., Agus J., Mizuno K., Abe H., Tsuge T. Molecular weight change of polyhydroxyalkanoate (PHA) caused by the PhaC subunit of PHA synthase from *Bacillus cereus* YB-4 in recombinant *Escherichia coli* // Biomacromolecules. – 2011. – 12. – P. 2660-2666.

366. Chua E.C.H., Wee S.K., Kandedo J., et al. Growth study and biological hydrogen production by novel strain *Bacillus paramycoides* // MATEC Web of Conferences. – 2023. – 377.

367. Olukunle O.F., Olowoyeye B.R., Fadipe T.O. Biosurfactant Producing Bacteria Associated with Oil Polluted Soils of some Auto Mechanic Workshops in Akure, Ondo State, (Southwest) Nigeria // Adv. Life Sci. – 2023. – 10(3). – P. 356-361.

368. Olukunle O.F., Olowoyeye B.R., Fadipe T.O. Biosurfactant producing bacteria associated with oil-polluted soils of some auto mechanic workshops in

- Akure, Ondo State (Southwest Nigeria) // *Advances in Life Sciences*. – 2023. – 10(3). – P. 356-361.
369. McDowell R.H., Sands E.M., Friedman H. *Bacillus Cereus* // StatPearls Publishing. – 2025.
370. Ivanova N., Sorokin A., Anderson I. et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis* // *Nature*. – 2003. – 423. – P. 87-91.
371. Guinebretière M.H., Velge P., Couvert O., Carlin F., Debuyser M.L., Nguyen-The C. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation // *J Clin Microbiol*. – 2010. – 48(9). – P. 3388-3391.
372. Drobniowski F.A. *Bacillus cereus* and related species // *Clin Microbiol Rev*. – 1993. – 6(4). – P. 324-338.
373. Jessberger N., Dietrich R., Granum P. E., Märtlbauer E. The *Bacillus cereus* Food Infection as Multifactorial Process // *Toxins*. – 2020. – 12(11), 701.
374. Dietrich R., Jessberger N., Ehling-Schulz M., Märtlbauer E., Granum P.E. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus* // *Toxins (Basel)*. – 2021. – 13(2):98.
375. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections // *Microbes Infect*. – 2000. – 2. – P. 189-198.
376. Bottone E.J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen // *Clin Microbiol Rev*. – 2010. – 23(2). – P. 382-98.
377. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential // *Microbiol Spectr*. – 2019. – 7(3):10.
378. Perchat S., Nevers A., Kranzler M., Ehling-Schulz M., Lereclus D., Gohar M. The megaplasmid pCER270 of *Bacillus cereus* emetic strain affects the timing of the sporulation process, spore resistance properties, and germination // *Appl Environ Microbiol*. – 2024. – 90(9):e0102924.
379. Wang X., Gao J., Gao Y., Zhang L., Xu C., Li Q., Li L., Xue J. Analysis of surfactant production by *Bacillus cereus* GX7 and optimization of fermentation conditions // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2024. – 233, 113629.
380. Arabian D., Najafi H., Farhadi F., Dehkordi A.M. Biodesulfurization of simulated light fuel oil by a native isolated bacteria *Bacillus cereus* HN // *Journal of Petroleum Science and Technology*. – 2014. – 4(1). – P. 31-40.
381. Lechuga A., Lood C., Salas M., van Noort V.V., Lavigne R., Redrejo-Rodríguez M. The fully resolved genome of *Bacillus thuringiensis* HER1410 reveals a cry-containing chromosome, two megaplasmids and an integrative plasmidial prophage // *bioRxiv*. – 2020. – 080028.
382. Ibrahim M.A., Griko N., Junker M., Bulla L.A. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective // *Bioengineering Bugs*. – 2010. – 1(1). – P. 31-50.

383. Pacheco S., Gómez I., Chiñas M., Sánchez J., Soberón M., Bravo A. Whole genome sequencing analysis of *Bacillus thuringiensis* GR007 reveals multiple pesticidal protein genes // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – 12:758314.
384. Palma L., Ortiz L., Niz J., Berretta M., Sauka D. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* INTA 103-23 reveals its insecticidal properties: insights from the genomic sequence // *Data*. – 2024. – 9(3), 40.
385. Daas M.S., Rosana A.R.R., Acedo J.Z. et al. Insights into the draft genome sequence of bioactives-producing *Bacillus thuringiensis* DNG9 isolated from Algerian soil-oil slough // *Standards in Genomic Sciences*. – 2018. – 13, 25.
386. Vachon V., Laprade R., Schwartz J.-L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2012. – 111(1). – P. 1-12.
387. Bravo A., Gill S.S., Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control // *Toxicon*. – 2007. – 49(4). – P. 423-435.
388. Thamer M., Al-Kubaisi A.R., Al-Janabi Z.Z. Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq // *Natural Science*. – 2013. – 5(7). – P. 865-873.
389. Errington J., van der Aart L.T. Microbe profile: *Bacillus subtilis* – model organism for cellular development and industrial workhorse // *Microbiology Society*. – 2020. – 166(5).
390. Mandic-Mulec I., Stefanic P., van Elsas J.D. Ecology of Bacillaceae // *Microbiology Spectrum*. – 2015. – 3:10.
391. Sun Y., Kokko M., Vassilev I. Anode-assisted electro-fermentation with *Bacillus subtilis* under oxygen-limited conditions // *Biotechnology for Biofuels*. – 2023. – 16, 6.
392. Gauvry E., Mathot A.G., Couvert O., Leguérinel I., Coroller L. Effects of temperature, pH and water activity on the growth and sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1 // *International Journal of Food Microbiology*. – 2021. – 337:108915.
393. Borriss R., Danchin A., Harwood C.R., Médigue C., Rocha E.P.C. et al. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement // *Microbial Biotechnology*. – 2018. – 11. – P. 3-17.
394. Koo B.-M., Kritikos G., Farelli J.D., Todor H., Tong K. et al. Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis* // *Cell Systems*. – 2017. – 4. – P. 291-305.
395. Xu H., Wang H., Jia W., Ren S., Wang J. Application of *Bacillus subtilis* strain for microbial-enhanced oil recovery // *International Journal of Green Energy*. – 2019. – 16(7). – P. 530-539.
396. Roets-Dlamini Y., Moonsamy G., Laloo R., Ramchuran S. Use of *Bacillus* spp. in the bioremediation of fats, oils and greases (FOGs) and other waste substrates in food processing effluents // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2022. – 42.

397. Kirimura K., Furuya T., Nishii Y., Ishii Y., Kino K., Usami S. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2001. – 91(3). – P. 262-266.
398. Moreira R.F., Pires E.B.E., Sousa O.F., Alves G.B., Viteri Jumbo L.O. et al. A novel neotropical *Bacillus siamensis* strain inhibits soil-borne plant pathogens and promotes soybean growth // *Microorganisms*. – 2025. – 13(6), 1366.
399. Dong Q., Liu Q., Goodwin P.H., Deng X., Xu W., Xia M., Zhang J., Sun R., Wu C., Wang Q., Wu K., Yang L. Isolation and genome-based characterization of biocontrol potential of *Bacillus siamensis* YB-1631 against wheat crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* // *Journal of Fungi (Basel)*. – 2023. – 9(5):547.
400. Viswan A., Anjana H.M., Hermon A.J. et al. Exploring the bioactivity of *Bacillus siamensis* isolated from marine sediments // *Discover Applied Sciences*. – 2025. – 7, 662.
401. Ding S., Li P., Tang Y., He Z., She X. Identification and genomic insights into *Bacillus siamensis* strains with host colonization potential and activity against tomato bacterial wilt // *Pest Manag Sci*. – 2025. – 81(3). – P. 1547-1561.
402. Altimira F., Godoy S., Arias-Aravena M., Araya B., Montes C., Castro J. F., Dardón E., Montenegro E., Pineda W., Viteri I., Tapia E. Genomic and Experimental Analysis of the Biostimulant and Antagonistic Properties of Phytopathogens of *Bacillus safensis* and *Bacillus siamensis* // *Microorganisms*. – 2022. – 10(4), 670.
403. Zhang J., Feng W., Xue Q. Biosurfactant production and oil degradation by *Bacillus siamensis* and its potential applications in enhanced heavy oil recovery // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2022. – 169.
404. Dunlap C.A., Schisler D.A., Perry E.B., Connor N., Cohan F.M., Rooney A.P. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2017. – 67(8). – P. 2720-2725.
405. Rehman S., Jermy B. R., Akhtar S., Borgio J. F., Abdul Azeez S., Ravinayagam V., Gani A. Isolation and characterization of a novel thermophile; *Bacillus haynesii*, applied for the green synthesis of ZnO nanoparticles // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2019. – 47(1). – P. 2072-2082.
406. Banerjee A., Mohammed Breig S. J., Gómez A., Sánchez-Arévalo I., González-Faune P., Sarkar S., Bandopadhyay R., Vuree S., Cornejo J., Tapia J., Bravo G., Cabrera-Barjas G. Optimization and Characterization of a Novel Exopolysaccharide from *Bacillus haynesii* CamB6 for Food Applications // *Biomolecules*. – 2022. – 12(6), 834.
407. K. Rajitha, Y.V. Nancharaiah, V.P. Venugopalan. Acid soluble extracellular matrix confers structural stability to marine *Bacillus haynesii* pellicle biofilms // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2020. – Volume 194.
408. Ou-yahia D., Üstüntürk Onan M., Ilhan Sungur E. Isolation and identification of a manganese-oxidizing bacterium from produced water: growth and

manganese-oxidation ability of *Bacillus zhangzhouensis* in different manganese concentrations // *Arabian Journal for Science and Engineering*. – 2023. – 49(2).

409. Patel S., Gupta R.S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2020. – 70(1). – P. 406-438.

410. Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2020. – 70(11). – P. 5607-5612.

411. Manetsberger J., Caballero Gómez N., Soria-Rodríguez C., Benomar N., Abriouel H. Simply Versatile: The Use of *Peribacillus simplex* in Sustainable Agriculture // *Microorganisms*. – 2023. – 11(10).2540.

412. *Peribacillus simplex* NRS-960. BacDive. URL: https://bacdive.dsmz.de/strain/790?utm_source (Дата обращения: 05-09-2025 г).

413. Celandroni F., Salvetti S., Gueye S.A., Mazzantini D., Lupetti A., Senesi S., et al. Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates // *PLoS ONE*. – 2016. – 11(3): e0152831 *Peribacillus simplex*. URL: <https://www.ezbiocloudpro.app/app/wiki/S;Peribacillus%20simplex> (Дата обращения: 04-09-2025г).

414. Lee S., Kim Y., Han J.A., Lee H., Kim E.Y. Complete genome sequence of bacterium *Peribacillus simplex* strain IMG11 from soil // *Microbiol Resour Announc*. – 2024. – 13:e00643-24.

415. Valentine N.B., Bolton H., Kingsley M.T., Drake G.R., Balkwill D.L., Plymale A.E. Biosorption of cadmium, cobalt, nickel, and strontium by a *Bacillus simplex* strain isolated from the vadose zone // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 1996. – Volume 16, Issue 3. – P. 189-196.

416. Mandree P., Masika W., Naicker J., Moonsamy G., Ramchuran S., Lalloo R. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Industry Contaminated Soil Using Indigenous *Bacillus* spp. // *Processes*. – 2021. – 9(9), 1606.

417. Corretto E., Antonielli L., Sessitsch A., Höfer C., Puschenreiter M., Widhalm S., Swarnalakshmi K., Brader G. Comparative Genomics of Microbacterium Species to Reveal Diversity, Potential for Secondary Metabolites and Heavy Metal Resistance // *Front. Microbiol*. – 2020. – 11:1869.

418. Lu P., Liu Hm., Liu Am. Biodegradation of dicofol by *Microbacterium* sp. D-2 isolated from pesticide-contaminated agricultural soil // *Appl Biol Chem*. – 2019. – 62, 72.

419. Atinuke M. Olajide, Gisèle LaPointe. Microorganisms Associated with Raw Milk // *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third edition)*. – 2022. – P. 319-328.

420. Yu X., Li Z., Yang X., Wang X., Nan D., Lu W., Lv J., Ma Y. *Microbacterium* spp. peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis: a single-center experience and literature review // *Front. Med*. – 2023. – 10:1297296.

421. Henson M.W., Santo Domingo J.W., Kourtev P.S., Jensen R.V., Dunn J.A., Learman D.R. Metabolic and genomic analysis elucidates strain-level variation in *Microbacterium* spp. isolated from chromate contaminated sediment // *PeerJ*. – 2015. – 3:e1395.
422. Behera S., Das S. Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: cellular mechanisms and genetic regulations // *Microbiological Research*. – 2023. – 273.
423. Qomariyah L., P. Ira Kumalasari, S. Suprpto, N. Fajar Puspita, E. Agustiani, S. Altway, H. Hardi. Bioremediation of heavy metals in petroleum sludge through bacterial mixtures // *Materials today proceedings*. – 2022. – Volume 63. – P. S140-S142.
424. Fei X., Lou Z., Xiao R. et al. Contamination and Health Risk Assessment of Heavy Metal Pollution in Soils Developed from Different Soil Parent Materials // *Expo Health*. – 2023. – 15. – P. 395-408.
425. Luo X., Wu C., Lin Y., Li W., Deng M., Tan J., Xue S. Soil heavy metal pollution from Pb/Zn smelting regions in China and the remediation potential of biomineralization // *J Environ Sci (China)*. – 2023. – 125. – P. 662-677.
426. Borah G., Deka H. Crude oil associated heavy metals (HMs) contamination in agricultural land: Understanding risk factors and changes in soil biological properties // *Chemosphere*. – 2023 – 310:136890.
427. Thakare M., Sarma H., Datar S., Roy A. et al. Understanding the holistic approach to plant-microbe remediation technologies for removing heavy metals and radionuclides from soil // *Current Research in Biotechnology*. – 2021. – 3. – P. 84-98.
428. Samaila B., Kalgo Z.M., Maidamma B. Exposure to heavy metals in oil and gas wastes: a systematic review on health hazards assessment and mitigation in Nigeria // *Advanced Research in Medical and Health Sciences*. – 2023. – 1(1). – P. 22-30.
429. Hardi M., Siregar Y., Anita S., Ilza M. Determination of heavy metals concentration in produced water of oil field exploration in siak regency // *Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing*. – 2019. – P. 115-117.
430. Kumar D., Malik S., Rani R. et al. Behavior, risk, and bioremediation potential of heavy metals/metalloids in the soil system // *Rend. Fis. Acc. Lincei*. – 2023. – 34. – P. 809-831.
431. Jaworska H., Lemanowicz J. Heavy metal contents and enzymatic activity in soils exposed to the impact of road traffic // *Sci Rep*. – 2019. – 19981.
432. Akpoji B.S. Heavy metals in crude oil-polluted soil and the remediation potentials of heat-stable bio catalytic remediation cocktail (HBRC) and its residue // *International Journal of Advanced Biochemistry Research*. – 2023. – 7(1). – P. 60-68.
433. Rajbongshi A., Gogoi S.B. A review on oilfield produced water and its treatment technologies // *Petroleum Research*. – 2024. – 9(4). – P. 640-656.

434. Fact Sheet: Produced Water from Oil and Gas Development and Critical Minerals. URL: <https://www.energy.gov/fecm/articles/fact-sheet-produced-water-oil-and-gas-development-and-critical-minerals> (Дата обращения: 04-09-2025 г).
435. Umakant Joshi, Austin Schneider. Mitigating iron foulants in refinery processes // URL: <https://www.digitalrefining.com/article/1001251/mitigating-iron-foulants-in-refinery-processes> (Дата обращения: 04-09-2025 г).
436. Li D., Gao B., Cui X. Investigating the generation of ferrous sulfide nanoparticles in the produced fluid after acidizing oil wells and its influence on emulsifying stability between oil and water // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2022. – 15(11).
437. Patel I., Young D., Bota G. Physicochemical description of refinery high temperature naphthenic acid corrosion // *Proceedings of the Conference AMPP*. – 2024. – P. 1-9.
438. Primerano K., Mirwald J., Hofko B. Asphaltenes and maltenes in crude oil and bitumen: a comprehensive review of properties, separation methods, and insights into structure, reactivity and aging // *Fuel*. – 2024. – 368.
439. Specifications Guide Americas Crude Oil. URL: <https://www.spglobal.com/commodity-insights/en/pricing-benchmarks/our-methodology/methodology-specifications/crude-oil> (Дата обращения: 04-09-2025 г).
440. ASTM D5708-15(2020). Стандартные методы определения никеля, ванадия и железа в сырой нефти и остаточных топливах методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП).
441. Wei Wang, Paul Watkinson. Iron sulphide and coke fouling from sour oils: Review and initial experiments // *Proc. International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning IX*. 2011.
442. Yang Z., Zhu D.Z., Yu T., Shypanski A., Zhang G., Zhou Y. Effect of ferric iron and nitrate on hydrogen sulfide control in lab-scale reactors // *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* – 2021. – 7. – P. 1806-1818.
443. Becerra C.A., Murphy B., Veldman B.V., Nüsslein K. Biogenic sulfide-mediated iron reduction at low pH // *Microorganisms*. – 2024. – 12(10):1939.
444. Zhao Q., Chen C., Chen Z., Shan H., Liang J. Enhanced Oilfield-Produced-Water Treatment Using Fe³⁺-Augmented Composite Bioreactor: Performance and Microbial Community Dynamics // *Bioengineering (Basel)*. – 2025. – 12(7):784.
445. Li D., Gao B., Cui X. Zero-valent iron enhanced methane production of anaerobic digestion by reinforcing microbial electron bifurcation coupled with direct inter-species electron transfer // *Water Research*. – 2024. – 255.
446. Li Y., Liu Y., Guo D., Dong H. Differential degradation of petroleum hydrocarbons by *Shewanella putrefaciens* under aerobic and anaerobic conditions. *Front. Microbiol.* – 2024. – 15:1389954
447. Ko S., Wang X., Kan A.T., Tomson M.B. Growth inhibition and deposition prevention of sulfide scales using dispersants // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. – 2021. – 197.

448. Mady M.F., Kelland M.A. Review of nanotechnology impacts on oilfield scale management // *ACS Appl. Nano Mater.* – 2020. – 3(8). – P. 7343-7364.
449. Sanz-Robinson J., Williams-Jones A.E. Zinc solubility, speciation and deposition: a role for liquid hydrocarbons as ore fluids for Mississippi Valley Type Zn-Pb deposits // *Chemical Geology.* – 2019. – 520. – P. 60-68.
450. Clochard M.C., Oral O., Wade T.L., Cavani O., Castellino M., Ligiero L.M., Elan T. Zinc detection in oil-polluted marine environment by stripping voltammetry with mercury-free nanoporous gold electrode // *Sci Rep.* – 2022. – 12(1):15771.
451. Dong Y., Gao Z., Di J., Wang D., Yang Z., Guo X., Zhu X. Study on the effectiveness of sulfate-reducing bacteria to remove Pb(II) and Zn(II) in tailings and acid mine drainage // *Front Microbiol.* – 2024. – 15:1352430.
452. Jafari M., Moghimi H., Tirandaz H. et al. Corrosion behavior of predominant *Halodesulfovibrio* in a marine SRB consortium and its mitigation using ZnO nanoparticles // *Sci Rep.* – 2024. – 14. 19545.
453. Helen M. Pessoa, Fernanda H. Lyra, Eustáquio Vinicius R. de Castro. Comparison of different pre-treatment procedures for the determination of chromium in crude oil samples by GF AAS // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2012. – 23 (8).
454. Mohammed S., Opuwari M., Titinchi S., Cyster L. Metal-Metal Correlation of Biodegraded Crude Oil and Associated Economic Crops from the Eastern Dahomey Basin, Nigeria // *Minerals.* – 2022. – 12(8), 960.
455. Hu L., Jiang W., Xu X., Wang H., Carroll K.C., Xu P., Zhang Y. Toxicological characterization of produced water from the Permian Basin // *Sci Total Environ.* – 2022. – 815:152943.
456. Hesketh J., Dickinson E.J.F., Martin M.L., Hinds G., Turnbull A. Influence of H₂S on the pitting corrosion of 316L stainless steel in oilfield brine // *Corros Sci.* – 2021. – Apr;182:10.1016/j.corsci.2021.109265.
457. Sharma P., Singh S.P., Parakh S.K., Tong Y.W. Health hazards of hexavalent chromium (Cr (VI)) and its microbial reduction // *Bioengineered.* – 2022. – 13(3). – P. 4923-4938.
458. Franco L.C., Steinbeisser S., Zane G.M., Wall J.D., Fields M.W. Cr(VI) reduction and physiological toxicity are impacted by resource ratio in *Desulfovibrio vulgaris* // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2018 – 102(6). – P. 2839-2850.
459. Klonowska A., Clark M.E., Thieman S.B., Giles B.J., Wall J.D., Fields M.W. Hexavalent chromium reduction in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough causes transitory inhibition of sulfate reduction and cell growth // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2008. – 78(6). – P.1007-16.
460. Kalsoom K., Din S.U., Ceylan E. et al. Cloning and expression of chromate reductase from *Bacillus paramycoides* S48 for chromium remediation // *Sci Rep.* – 2025. – 15, 18796.
461. Gu Y., Chen X., Liu L., Wang S., Yu X., Jia Z., Zhou X. Cr(VI)-bioremediation mechanism of a novel strain *Bacillus paramycoides* Cr6 with the powerful ability to remove Cr(VI) from contaminated water // *J Hazard Mater.* – 2023. – 455:131519.

462. Chen Y., Wu H., Sun P., Liu J., Qiao S., Zhang D., Zhang Z. Remediation of Chromium-Contaminated Soil Based on *Bacillus cereus* WHX-1 Immobilized on Biochar: Cr(VI) Transformation and Functional Microbial Enrichment // *Front. Microbiol.* – 2021. – 12:641913.
463. Şahin Y., Öztürk A. Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis* // *Process Biochemistry.* – 2005. – 40(5). – P. 1895-1901.
464. Upadhyay N., Vishwakarma K., Singh J., Mishra M., Kumar V., Rani R., Mishra R.K., Chauhan D.K., Tripathi D.K., Sharma S. Tolerance and Reduction of Chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 Isolated from Contaminated Coal Mining Soil // *Front. Plant Sci.* – 2017. – 8:778.
465. Li T., He Y., Wang J., Xiang H., Xu X., Li C., Wu Z. Bioreduction of hexavalent chromium via *Bacillus subtilis* SL-44 enhanced by humic acid: An effective strategy for detoxification and immobilization of chromium // *Sci Total Environ.* – 2023. – 888:164246.
466. Maurya A., Kumar R., Yadav P., Singh A., Yadav A., Chowdhary P., Raj A. Biofilm formation and extracellular polymeric substance (EPS) production by *Bacillus haynesii* and influence of hexavalent chromium // *Bioresour Technol.* – 2022. – 352:127109.
467. Li T., Du D., Li C., Zhao J. Investigation on Cr(VI)-bioreduction mechanism and reduction products by a novel *Microbacterium* sp. strain NEAU-W11 // *Chemosphere.* – 2023. – 343.
468. Kumar M., Saini H.S. Reduction of hexavalent chromium (VI) by indigenous alkaliphilic and halotolerant *Microbacterium* sp. M5: comparative studies under growth and nongrowth conditions // *J Appl Microbiol.* – 2019. – 127(4). – P. 1057-1068.
469. Campos J., Martínez-Pacheco M., Cervantes C. Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1995. – 68. – P. 203–208.
470. Mishra S., Bharagava R.N. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies // *Journal of Environmental Science and Health, Part C.* – 2015. – 34(1).
471. Majid Abiodun Adeyemi. Analysis of Sulfur Content in Selected Crude Oils in the World // *Contemporary Developments in Hydraulic Fracturing.* – 2023
472. Abdelrahman H. Hegazi, Jan T. Andersson. 6 - Polycyclic aromatic sulfur heterocycles as source diagnostics of petroleum pollutants in the marine environment // *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics (Second Edition).* – 2016. – P. 313-342
473. Claudia H. Modeling of Sulfur Removal from Heavy Fuel Oil Using Ultrasound-Assisted Oxidative Desulfurization // *Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia: King Abdullah University of Science and Technology.* – 2022.
474. EIA. Crude Oils have Different Quality Characteristics. 2023. URL: <https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=7110> (Дата обращения: 06-09-2025).

475. Mohammadi M., Khanmohammadi Khorrami M., Vatanparast H., Karimi A., Sadrara M. Classification and determination of sulfur content in crude oil samples by infrared spectrometry // *Infrared Physics & Technology*. – 2022. – 127.
476. Prasantongkolmol T., Thongkorn H., Sunipasa A., Do H.A., Saeung C., Jongpatiwut S. Analysis of sulfur compounds for crude oil fingerprinting using gas chromatography with sulfur chemiluminescence detector // *Marine Pollution Bulletin*. – 2023. – 186.
477. Sarkarabad K.M., Ghaemi A. A comprehensive review of performance, innovation, challenges and future directions of desulfurization technologies // *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. – 2025. – 11.
478. Zhong S. The Impact of Acid Rain on Ecosystems and Human Health // *J Marine Sci Res Dev*. – 2024. – 14: 480.
479. Houda S., Lancelot C., Blanchard P., Poinel L., Lamonier C. Oxidative Desulfurization of Heavy Oils with High Sulfur Content: A Review // *Catalysts*. – 2018. – 8(9), 344.
480. Gupta S., Plugge C.M., et al. Harnessing the potential of the microbial sulfur cycle for environmental biotechnology // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2024. – 88.
481. Singh K.J. Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur // *IJARSE*. – 2020. – 9.
482. Al-Jailawi M.H., Al-Faraas A.F., Yahia A.I. Isolation and identification of dibenzothiophene biodesulfurizing bacteria // *American Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2015. – 3(5). – P. 40-46.
483. Al-Khazaali W.M.K., Ataei S.A., Khesareh S. Biodesulfurization of fossil fuels: analysis and prospective // *F1000Res*. – 2023. – 12:1116.
484. Omar R.A., Verma N., Arora P.K. Sequential desulfurization of thiol compounds containing liquid fuels: adsorption over Ni-doped carbon beads followed by biodegradation using environmentally isolated *Bacillus zhangzhouensis* // *Fuel*. – 2020. – 277. – P. 1-10.
485. Boshagh F., Mokhtarani B., Mortaheb H.R. Effect of electrokinetics on biodesulfurization of the model oil by *Rhodococcus erythropolis* PTCC1767 and *Bacillus subtilis* DSMZ 3256 // *Journal of Hazardous Materials*. – 2014. – 280. – P. 781–787.
486. Tabatabaee M.S., Mazaheri Assadi M. Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous *Bacillus cereus* // *J Environ Health Sci Engineer*. – 2013. – 11, 18.
487. Molaee Dehkordi A., Arabian D., Najafi H., Farhadi F. Biodesulfurization of simulated light fuel oil by a native isolated bacteria *Bacillus cereus* HN // *Journal of Petroleum Science and Technology*. – 2014. – 4(1). – P. 31-40.

488. Wu B., Xiu J., Yu L., Huang L., Yi L., Ma Y. Degradation of crude oil in a co-culture system of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Front. Microbiol.* – 2023. – 14:1132831.
489. Bezza F.A., Nkhalambayausi Chirwa E.M. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2 // *Biochemical Engineering Journal.* – 2015. – 101. – P. 168-178.
490. Zhang M., Fan D., Pan L., Su C., Li Z., Liu C., He Q. Characterization and removal mechanism of a novel enrofloxacin-degrading microorganism, *Microbacterium proteolyticum* GJEE142 capable of simultaneous removal of enrofloxacin, nitrogen and phosphorus // *Journal of Hazardous Materials.* – 2023. – 454.
491. Okeola F.O., M.A. Amoloye, G.B. Adebayo, T.O. Abu, O.M. Ameen and B. Obiechina. Comparative study of physicochemical parameters of some crude oil and petroleum products // *Nig. J. Pure & Appl. Sci.* – 2016. – Vol. 29 Issue 2. – P. 2987- 2993.
492. Wargo M.J. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – 79(7). – P. 2112-2120.
493. Hu X., Li D., Qiao Y., Song Q., Guan Z., Qiu K., Cao J., Huang L. Salt tolerance mechanism of a hydrocarbon-degrading strain: salt tolerance mediated by accumulated betaine in cells // *Journal of Hazardous Materials.* – 2020. – 392.
494. Valero M., Leontidis S., Fernandez P.S., Martinez A., Salmeron M.C. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5–30 °C // *Food Microbiology.* – 2000. – 17(6). – P. 605-612.
495. Hoffmann T., Bremer E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition // *J. Bacteriol.* – 2011. – 193(7). – P. 1552-1562.
496. Monteiro H., Paiva A., Duarte A.R.C., Galamba N. Structure and dynamic properties of a glycerol–betaine deep eutectic solvent: when does a DES become an aqueous solution? // *ACS Sustain. Chem. Eng.* – 2022. – 10(11). – P. 3501-3512.
497. Yusoff M.H.M., Gan C.-Y., Shafie M.H. Characterization of citric acid monohydrate–glycerol-based deep eutectic solvents which could be used as an extraction medium for hydrophilic bioactive components // *Journal of Molecular Liquids.* – 2023. – 389.
498. Bozinou E., Palaiogiannis D., Athanasiadis V., Chatzilazarou A., Lalas S.I., Makris D.P. Glycerol-based deep eutectic solvents for simultaneous organosolv treatment/extraction: high-performance recovery of antioxidant polyphenols from onion solid wastes // *Sustainability.* – 2022. – 14(23):15715.
499. Sadare O.O., Daramola M.O. Kinetics of biodesulfurization of South African diesel using *Pseudomonas aeruginosa* // *Materials Today: Proceedings.* – 2023. – P. 1-7.
500. Kim B.-H., Kim T.-S., Kim H.-Y. Bioelectrochemical desulphurisation of petroleum. – 1988.

501. Курашова В.М. Микробиологический способ снижения содержания серы в углеводородах // Патент RU2137839C1. – 1998.
502. Monticello D.J., Kilbane J.J. Microemulsion process for direct biocatalytic desulfurization of organosulfur molecules. – 1992.
503. Chen Q., He N., Fan J., Song F. Thermal conductivity of betaine–glycerol, betaine–1,2-propanediol based deep eutectic solvents // *Thermochimica Acta*. – 2021. – 706. – P. 1-5.
504. Akimbek A.O., Jamalova G.A., Yernazarova A.K., Kaiyrmanova G.K., Yelikbayev B.K., Pagano M.C., Zazybin A.G., Rafikova K.S. Biodesulfurization of high-sulfur oil from the Karazhanbas field of Kazakhstan with deep eutectic solvents // *Heliyon*. – 2025. – 11(2):e41877.
505. R. Bernasconi G. Panzeri G. Firtin B. Kahyaoglu L. Nobili L. Magagnin. Electrodeposition of ZnNi Alloys from Choline Chloride/Ethylene Glycol Deep Eutectic Solvent and Pure Ethylene Glycol for Corrosion Protection // *Phys. Chem. B* – 2020. – 124, 47. – P. 10739-10751
506. Rui Zhang, Mei Hong, Junshuang Wu, Yueting Xiao, Jing Tong. Effect of water on the excess properties of eutectic solvents // *Journal of Molecular Liquids*. – 2024. – Volume 414, Part B
507. Yusof R., Abdulmalek E., Sirat K., Rahman MB. Tetrabutylammonium bromide (TBABr)-based deep eutectic solvents (DESs) and their physical properties // *Molecules*. – 2014. – 19 (6). – P. 8011-26