

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт химии нефти

Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Гусева Юлия Зинуровна

**МЕТОД УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕОТДАЧИ ВЫСОКОВЯЗКИХ НЕФТЕЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТАТИВНО ГЕНЕРИРУЕМОЙ
НЕФТЕВЫТЕСНЯЮЩЕЙ КОМПОЗИЦИИ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СОСТАВ
И СВОЙСТВА НЕФТЕЙ**

02.00.13 – нефтехимия

Диссертация на соискание ученой степени
Кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
Алтунина Л.К.

Томск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ЗАПАСЫ ВЫСОКОВЯЗКИХ НЕФТЕЙ И БИТУМОВ В МИРОВОМ МАСШТАБЕ, МЕТОДЫ ДОБЫЧИ И ТРУДНОСТИ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ИЗВЛЕЧЕНИИ НЕФТИ ИЗ ПЛАСТА.....	8
1.1 Тепловые методы увеличения нефтеотдачи.....	9
1.2 Физико-химические методы повышения нефтеотдачи.....	11
1.3 Газовые методы увеличения нефтеотдачи.....	15
1.4 Методы повышения нефтеотдачи с использованием микроорганизмов.....	16
1.5 Уреза и уробактерии – история изучения, роль в природе, распространение и практическая значимость.....	22
1.6 Ферментативное окисление углеводородов нефти.....	25
1.6.1 Аэробное окисление.....	26
1.6.2 Анаэробное окисление.....	32
2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1 Объекты исследования.....	33
2.2 Микробиологические и биохимические методы.....	34
2.3 Постановка экспериментов.....	36
2.4 Моделирование процесса вытеснения нефти комплексным микробиологическим и физико-химическим методом.....	38
2.5 Методы физико-химических анализов пластовых флюидов, культуральных жидкостей, жидкостей после вытеснения.....	39
2.6 Статистическая обработка результатов эксперимента.....	41
3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ ПЛАСТОВЫХ ФЛЮИДОВ ИССЛЕДУЕМЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ ВЯЗКОЙ НЕФТИ.....	42
3.1 Влияние нефтewытесняющих композиций на рост пластовой микрофлоры в лабораторных условиях.....	42

4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИСТОЧНИКОВ УРОБАКТЕРИЙ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	50
4.1 Уреазная активность соевой муки и препарата уреазы.....	51
4.2 Микробиологический анализ корнеплода свеклы с целью выявления и выделения уробактерий, участвующих в гидролизе карбамида.....	53
4.3 Активность уробактерий из отходов жизнедеятельности животных.....	60
4.4 Исследование газовой фракции при гидролизе карбамида уреазой из природных источников.....	67
4.5 Влияние продуктов гидролиза карбамида на изменения реологических свойств нефтей.....	68
5. ФИЗИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЫТЕСНЕНИЯ ВЯЗКИХ НЕФТЕЙ КОМПЛЕКСНЫМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....	70
5.1 Нефтевытеснения композицией ПАВ и ферментом из отходов жизнедеятельности домашних животных, катализирующим в ней гидролиз карбамида.....	71
5.2 Нефтевытеснение композицией ПАВ и уреазой соевой муки, гидролизующей в ней карбамид	78
5.3 Нефтевытеснение композицией ПАВ и уробактериями свекольной кожуры, катализирующими в ней карбамид.....	82
6. ИЗМЕНЕНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НЕФТИ ПРИ ВЫТЕСНЕНИИ КОМПЛЕКСНЫМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....	87
Выводы.....	96
Приложения.....	98
Список использованной литературы.....	115

Введение

Важнейшей долей сырьевой базы нефтяной отрасли России и других нефтедобывающих стран являются запасы тяжелых и битуминозных нефтей. Мировой суммарный объем запасов высоковязких нефтей почти в пять раз превышает объем остаточных извлекаемых запасов нефтей малой и средней вязкости [1,2]. В процессе разработки этих месторождений накоплен большой опыт освоения новых технологических и технических средств в различных геолого-промысловых условиях. В то же время следует констатировать, что потенциал месторождений высоковязких нефтей используется недостаточно [3]. Так, на Усинском месторождении (Россия) нефтеотдача с применением термальных методов не превышает 21-22 % [4,5].

Проблема разработки месторождений высоковязкой нефти заключается в том, что естественные температурные условия не обеспечивают необходимой подвижности нефти во время фильтрации по пласту и притоку в скважины [6,7]. В Институте химии нефти СО РАН была создана технология, сочетающая паротепловой и физико-химический метод воздействия на залежь с применением нефтевытесняющих композиций на основе ПАВ и карбамида. Карбамид в растворе практически устойчив при температуре до 70 °С. Под действием более высокой температуры он гидролизует с выделением CO₂, растворяющегося в основном в нефти, снижая тем самым её вязкость, и NH₃, обеспечивающий высокие нефтевытесняющие свойства ПАВ. Применение данной технологии на Усинском месторождении позволило увеличить нефтеизвлечение на 20 % [7]. Однако паротепловое воздействие весьма энергоемко и требует крупных материальных затрат и сложного оборудования (парогенераторную установку, поверхностные коммуникации – трубопроводы, компенсаторы температурных деформаций, устьевое и внутрискважинное оборудование) [7,8]. Поэтому актуальной представляется разработка метода воздействия на залежи высоковязкой нефти без применения термических методов.

Известно, что реакцию гидролитического расщепления карбамида без воздействия высоких температур катализирует фермент уреазы. Поэтому для

увеличения нефтеотдачи низкотемпературных (20-40°C) залежей вязких нефтей возможно одновременное введение в пласт нефтевытесняющей композиции на основе ПАВ и карбамида и фермента, катализирующего в ней гидролиз карбамида. В литературе отсутствует информация об использовании уреазы в методах вытеснения высоковязких нефти. В связи с этим представляет интерес изучить влияние метода с применением данного фермента, ПАВ и карбамида на эффективность вытеснения высоковязкой нефти из пласта, а также на ее состав и свойства

Цель данной работы: разработка научных основ комплексного микробиологического и физико-химического метода увеличения нефтеотдачи низкотемпературных пластов высоковязких нефтей с применением нефтевытесняющей композиции ПАВ и фермента, катализирующего в ней гидролиз карбамида, а также влияние метода на состав и свойства добываемой нефти.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующую **научную задачу** – установить закономерности процесса вытеснения высоковязких высокосмолистых и высокопарафинистых нефтей без воздействия высоких температур путем лабораторного моделирования нефтевытеснения и анализа физико-химических характеристик и углеводородного состава исходных и вытесненных нефтей.

Этапы исследования:

1. Изучить влияние композиций с регулируемой щелочностью на рост микрофлоры, участвующей в вытеснении нефти.
2. Исследовать природные источники уреазы и/или уробактерий, пригодных для внутрипластового ферментативного гидролиза карбамида в составе композиций как основы комплексного метода повышения нефтеотдачи низкотемпературных пластов высоковязкой нефти.
3. Установить в условиях, моделирующих пластовые, закономерности процесса вытеснения нефти с помощью комплексного микробиологического и физико-химического метода.

4. Исследовать изменения группового состава углеводов нефти в процессе ее вытеснения композицией и ферментом.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

- Вязкость нефти снижается под действием продуктов ферментативного гидролиза карбамида.
- Комплексный физико-химический и микробиологический метод увеличения нефтеотдачи высоковязких нефтей.
- Направленность изменения состава углеводов нефти в процессе ее вытеснения композицией НИНКА® в сочетании с природными источниками фермента.

Научная новизна исследования заключается в получении новых данных о влиянии нефтewытесняющей композиции и фермента, катализирующего в ней гидролиз карбамида, на процесс вытеснения из пласта высоковязких нефтей, их состав и свойства.

Впервые исследованы закономерности вытеснения из пласта высоковязких нефтей физико-химическими композициями в сочетании с природным источником фермента уреазы (соевая мука, кожура и корнеплод свеклы, отходы жизнедеятельности домашних животных) и показано, что под действием уробактерий из указанных источников, обладающих высокой уреазной активностью, уже на 2-5 сутки в растворе композиции ПАВ создается щелочная среда с pH 9.0-9.2, которая требуется для эффективной работы композиции.

Впервые показано, что при использовании комплексного метода на основе композиции ПАВ и фермента из природных источников в условиях, моделирующих пластовые, коэффициент нефтewытеснения увеличивается за счет доотмыва высокомолекулярных соединений, в частности, n-алканов и полициклических ароматических углеводов.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты проведенных исследований являются научной основой экологически безопасного комплексного физико-химического и микробиологического метода увеличения

нефтеотдачи залежей высоковязких нефтей без применения теплового воздействия.

Личный вклад автора состоит в анализе литературных источников, в планировании и проведении экспериментальных работ, обработке полученных данных физико-химических и микробиологических методов исследования, обсуждении результатов и формулировке выводов. Личный вклад автора составляет более 80%.

Апробация работы: основные положения диссертации докладывались на: VIII Международной конференции «Химия нефти и газа» (Томск, 2012); XIV международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике» (Санкт-Петербург, 2012 г); Международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2013); IV Международном научном симпозиуме «Теория и практика применения методов увеличения нефтеотдачи пластов» (Москва, 2013); XVI Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике» (Санкт-Петербург, 2013);

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных перечнем ВАК, материалы(16) и тезисы(2) докладов на Международных и Всероссийских конференциях

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, шести разделов, выводов, списка литературы из 100 наименований. Работа изложена на 125 страницах, содержит 21 таблицу и 37 рисунков.

Автор выражает благодарность и признательность всем сотрудникам, лаборатории коллоидной химии нефти, лаборатории гетероорганических соединений нефти, лаборатории природных превращений нефти, д-ру хим. наук Т.А. Сагаченко и д-ру хим наук, О.В. Серебренниковой и всем сотрудникам ИХН СО РАН.

Глава 1. Запасы высоковязких нефтей в мировом масштабе, методы добычи и трудности, возникающие при извлечении нефти из пласта

По оценкам мировых экспертов, запасы трудно извлекаемых нефтей в мире превышают 1 трлн. тонн и в развитых промышленных странах рассматриваются не только как резерв добычи нефти, но и как стратегическое направление ее развития на ближайшие годы [3].

Мировые запасы высоковязких нефтей (ВВН), к которым принято относить нефти с вязкостью 30 мПа·с или 35 мм²/с и выше, в настоящее время уже значительно превысили запасы легких нефтей. В России запасы ВВН сейчас составляют около 6.2 млрд т, и есть все предпосылки к тому, что к 2020 г. их доля в общем балансе достигнет 75 % [4].

В мире открыто свыше 1680 месторождений высоковязкой нефти, основные из них сконцентрированы на Ближнем Востоке. В России наиболее крупными месторождениями вязких нефтей являются: Ван-Еганское – 1.3 млрд т; Северо-Комсомольское – 700 млн т; Усинское – 600 млн т; Русское – 299 млн т. В Волго-Уральском и Западно-Сибирском нефтегазоносных регионах находится 71.4 % ВВН от общего объема залежей, а доля тяжелых и вязких нефтей в этих бассейнах составляет 60.4 и 70.8 % , соответственно [1].

Отнесение запасов к категории трудно извлекаемых часто связано либо с условиями залегания, то есть со свойствами продуктивных коллекторов – низкой проницаемостью и высокой неоднородностью, либо со свойствами нефти – как правило, ее высокой вязкостью. Из них на долю высоковязких нефтей приходится 13 %, малопроницаемых коллекторов – 36 %, маломощных пластов – 4 %, подгазовых зон – 14 % [8]. Многие месторождения сочетают ряд неблагоприятных факторов, затрудняющих их разработку. Так, 78 % запасов высоковязких нефтей Усинского месторождения сосредоточены в низкопроницаемых низкотемпературных коллекторах (пермо-карбоновая залежь). При добыче высоковязких нефтей понижается и даже полностью прекращается дебит скважин из-за закупорки асфальтосмолопарафиновыми отложениями (АСПО). Для добычи высоковязких нефтей требуется применение дорогостоящих

специальных технологий. На сегодняшний день во многих странах ведется поиск новых технологий и оборудования для добычи парафинистых, тяжелых и высоковязких нефтей [9].

Методы увеличения нефтеотдачи делят на четыре основные группы: химические (заводнение с помощью поверхностно-активных веществ, жидких растворителей, полимеров), газовые (закачка углеводородных газов, углекислого газа, азота), тепловые (вытеснение нефти теплоносителями, воздействие с помощью внутрипластовых экзотермических окислительных реакций) и микробиологические (введение в пласт продуктов жизнедеятельности бактерий или питательных субстратов, стимулирующих активность пластового биоценоза) [10, 11].

1.1 Термические методы увеличения нефтеотдачи

Термические методы добычи нефти делятся на два вида: прогрев пласта с помощью внутрипластового горения и подведение теплоносителя извне. Внутрипластовое горение представляет собой сжигание коксовых остатков в призабойной зоне нагнетательных скважин, затем фронт горения перемещается путём нагнетания воздуха (сухое горение) или воздуха и воды (влажное горение). Нагнетание теплоносителя с поверхности широко применяется как в России, так и за рубежом; осуществляется в виде паротеплового воздействия (ПТВ) или закачки горячей воды (ВГВ)[12].

Суть процесса **внутрипластового горения** сводится к образованию и перемещению по пласту высокотемпературной зоны сравнительно небольших размеров, в которой тепло генерируется в результате экзотермических окислительных реакций между частью содержащейся в пласте нефти и кислородом нагнетаемого в пласт воздуха.

В качестве топлива для горения расходуется часть нефти, остающаяся в пласте после вытеснения ее газами горения, водяным паром, водой, крекинга, испарившимися фракциями нефти впереди фронта горения и претерпевающая изменения вследствие дистилляции, и других сложных физико-химических процессов. Процесс влажного внутрипластового горения отличается тем, что в

пласт вместе с воздухом закачивается в определенном количестве вода, которая, соприкасаясь с нагретой движущимся фронтом горения породой, испаряется. Захватываемый потоком газа пар переносит теплоту в область впереди фронта горения, где вследствие этого развиваются обширные зоны прогрева, выраженные в основном зонами насыщенного пара и сконденсированной горячей воды.

Суть применения влажного внутрипластового горения заключается в том, что добавление к нагнетаемому воздуху агента с более высокой теплоемкостью – воды, улучшает теплоперенос в пласте, что способствует перемещению теплоты из задней области в переднюю относительно фронта горения. Использование основной массы теплоты в области позади фронта горения, т.е. приближение генерированной в пласте теплоты к фронту вытеснения нефти, существенно повышает эффективность процесса теплопереноса и извлечения нефти [11, 13, 14, 15, 16].

Вытеснение нефти паром. На основании лабораторных и промысловых опытов установлено, что наиболее эффективным рабочим агентом, используемым для увеличения нефтеотдачи, является насыщенный водяной пар высоких давлений (8–15 МПа). Количество пара может быть в 25–40 раз больше, чем количества воды. Пар может вытеснить почти до 90 % нефти из пористой среды.

Повышение нефтеотдачи пласта в процессе нагнетания в него пара возможно за счет снижения вязкости нефти под воздействием температуры, что способствует улучшению охвата пласта процессом, а также за счет расширения нефти, перегонки ее с паром и экстрагирования растворителем, что повышает коэффициент вытеснения. Основную долю эффекта вытеснения нефти (40–50 %) обеспечивает снижение вязкости нефти, затем дистилляция нефти и изменение подвижностей (18–20 %) и в меньшей степени – расширение и смачиваемость породы пласта.

Чтобы тепло не рассеивалось в окружающие породы, для применения этого метода выбирают нефтяные пласты с достаточно большой толщиной (15 м и более).

К недостаткам метода вытеснения нефти паром относится, прежде всего, необходимость применения чистой высококачественной воды для парогенераторов, чтобы получить пар с насыщенностью 80 % и теплоемкостью 5000 кДж/кг. В такой воде, должно содержаться менее 0.005 мг/л твердых взвешенных частиц и полностью должны отсутствовать органические вещества (соли, нефть), катионы магния и кальция, растворенный газ (особенно кислород). Обработка воды химическими реагентами (умягчение, удаление газов, обессоливание) требуют больших расходов, иногда достигающих 30–35 % от общих расходов на производство пара.

Отношение подвижностей пара и нефти хуже, чем отношение подвижностей воды и нефти, поэтому охват пласта вытеснением паром ниже, чем при заводнении, особенно в случае вязкостей нефти более 800-1000 мПа·с. Увеличение охвата пластов процессом вытеснения нефти паром является одной из основных проблем, требующих решения. И, наконец, применение метода связано с большими затратами на его реализацию, в частности, на оборудование.

Несмотря на опыт, накопленный в сфере термических методов добычи нефти, актуальным представляется поиск и создание новых, более совершенных технологий разработки залежей высоковязких нефтей и битумов [16, 17, 18, 19, 20, 21].

1.2 Физико-химические методы повышения нефтеотдачи

Использование методов водного воздействия на пласты не обеспечивает полного извлечения геологических запасов нефти, в недрах остается больше половины, а на месторождениях вязких нефтей – до 85 % разведанных запасов. Для повышения нефтеотдачи пластов в последние годы применяют новые методы воздействия на пласт–закачку с водой поверхностно-активных веществ (ПАВ), полимеров, растворителей, эмульсий и др. Использование этих методов позволяет на 10-30 % повысить нефтеотдачу пластов[11].

Метод повышения нефтеотдачи с использованием полимеров. Полимерное заводнение заключается в добавлении полимера в воду для уменьшения ее подвижности. Получаемое увеличение вязкости, а также

уменьшение проницаемости по водной фазе, которое происходит при использовании некоторых полимеров, является причиной более низкого отношения подвижностей. Это уменьшение отношения подвижностей повышает эффективность заводнения за счет более высокого коэффициента охвата по объему и меньшей нефтенасыщенности в отмытой зоне. Минимальная остаточная нефтенасыщенность не уменьшается, хотя остающаяся после процесса вытеснения нефтенасыщенность уменьшается. Более высокий коэффициент нефтеотдачи является экономическим стимулом для осуществления полимерного заводнения. Как правило, полимерное заводнение бывает экономически выгодным только в тех случаях, когда отношение подвижностей при обычном заводнении высоко, неоднородность пласта большая или отмечается сочетание этих двух факторов [22].

Все промышленные полимеры попадают фактически в два класса: класс полиакриламидов (гидролизированный полиакриламид, сополимеры акриламида и 2-акриламид 2-метилпропансульфоната, сополимеры акриловой кислоты и акриламида, сам полиакриламид, полиакриловая кислота) и класс полисахаридов (биополимеры ксантановая смола, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилгидроксипропилцеллюлоза, глюкан, декстран), кроме того, полиоксиэтилен и поливиниловый спирт [23].

За рубежом полимерные растворы для МУН применяются в промышленных масштабах. Метод в основном применяется в пластах с температурой до 60 °С, с хорошей проницаемостью и слабой минерализацией пластовой воды. На объектах полимерного заводнения плотность пластовой нефти изменялась от 820 до 950 кг/м³, вязкость – от 10 до 15 мПа·с. Исходная нефтеотдача изменялась в широких пределах – от 10 до 60 %. Расход полимера на 1 м³ дополнительно добытой нефти составляет 1.5-5.7 кг. В США полимерное заводнение по числу реализованных проектов стоит на первом месте [23, 24].

Однако при полимерном заводнении возникают проблемы с биодеструкцией полимеров пластовой микрофлорой, малой стойкостью

полимеров в пластовых водах с высокой минерализацией, при высоких пластовых температурах или при воздействии теплоносителя.

Композиции ПАВ, генерирующие в пласте CO₂ и щелочную буферную систему, для увеличения нефтеотдачи залежей высоковязких нефтей. В ИХН СО РАН в течение ряда лет развивается концепция воздействия на залежь высоковязкой нефти композиции на основе ПАВ, которые в пласте под действием температуры пара образуют CO₂ и аммиачную буферную систему. В скважину перед нагнетанием пара закачивается оторочка композиции. Она представляет собой водный раствор смеси неионогенного и анионоактивного ПАВ, карбамида и солей аммония (композиция НИНКА[®]). В пласте под действием высокой температуры пара карбамид гидролизует с образованием углекислого газа и аммиака. Углекислый газ, в отличие от аммиака, более растворим в нефти, чем в воде. Поэтому в системе «нефть – вода» нефтяная фаза будет обогащена углекислым газом, водная – аммиаком, который с солью аммония образует щелочную систему с максимальной буферной емкостью в интервале pH 9.0-10.0. Такая среда является оптимальной для мощного действия ПАВ в составе композиции. При этом углекислого газ растворяется в нефти, что приводит к уменьшению ее вязкости, а также углекислый газ и аммиак в паровой фазе способствуют сохранению парогазовой смеси при температуре ниже температуры конденсации пара, что увеличивает эффективность процесса переноса компонентов нефти по механизму дистилляции. Кроме того, аммиак, растворяясь в водном растворе солей аммония, образует щелочную систему с высокой буферной емкостью [21, 22].

Создана технология [21, 22] чередующегося паротеплового и физико-химического воздействия нефтевытесняющей композицией НИНКА[®] на залежи высоковязкой нефти. Промысловые испытания технологии проведены на Усинском месторождении в России и на месторождении Ляохэ в Китае. Применение технологии при стационарной закачке пара приводит к снижению обводненности продукции на 10-20 %, увеличению дебитов по нефти в среднем на 40 %, при увеличении дебитов по жидкости на 5-10 %. При пароциклическом

воздействии добыча нефти возросла в 1.8-2.3 раза, продолжительность периода добычи нефти на 3-5 месяцев, вязкость нефти уменьшилась в 3 раза, температура застывания снизилась на 10-22 °С [3, 23, 25].

Метод повышения нефтеотдачи с применением гелеобразующих композиций. Одна из главных причин неполного извлечения нефти связана с низкой проницаемостью и неоднородностью породы пласта, что способствует неполному охвату залежи заводнением или паротепловым воздействием. Это главным образом неоднородность строения и свойств породы-коллектора на макро- и микроуровнях, которая усиливает в конечном счете дисперсию гидродинамических, энерго- и массообменных процессов в пласте. Многолетняя практика применения всевозможных методов увеличения нефтеотдачи на месторождениях России показала, что наиболее успешными оказались методы, повышающие охват пласта закачиваемой водой или паром. Одним из перспективных способов решения проблемы увеличения охвата пласта является внутрипластовая генерация гелей [1, 6].

Гелеобразующие системы в поверхностных условиях являются маловязкими водными растворами, в пластовых – превращаются в гели под действием тепловой энергии пласта или закачиваемого теплоносителя, а также в результате взаимодействия закачиваемой системы с пластовыми флюидами и породой-коллектором. В ИХН СО РАН в течение ряда лет изучаются физико-химические и гидродинамические аспекты внутрипластовой генерации гелей. Исследованы кинетика гелеобразования, реологические и фильтрационные характеристики гелей различных типов для неоднородных пластов с проницаемостью в интервале от 0.01 до 10 мкм² [26].

Разработаны термотропные гелеобразующие системы: полимерные на основе эфиров целлюлозы и неорганические системы соль алюминия–карбамид–вода. Время гелеобразования – от нескольких минут до нескольких суток – в интервале температур 30-320 °С. С использованием гелей разработаны пять гель-технологий для увеличения нефтеотдачи высоко неоднородных пластов, которые

промышленно используются на месторождениях Западной Сибири и республики Коми [26].

Для увеличения пароциклического воздействия на залежи высоковязких нефтей предложены термообратимые гелеобразующие полимерные системы. Исследование кинетики гелеобразования и реологических характеристик в указанных системах в области температур 20-250 °С, показали воспроизводимость реологических параметров гелей при циклическом реверсировании процессов нагревания и охлаждения [27]. Гелеобразующие системы показали высокую эффективность на моделях неоднородного пласта и были рекомендованы для регулирования фильтрационных потоков пластовых флюидов, ограничения водопритока, увеличения охвата паротепловым и пароциклическим воздействием залежей высоковязкой нефти. На месторождении Ляхэ, КНР, в 2005-2006 гг. на двух пароциклических скважинах успешно проведены опытно-промышленные испытания технологии ограничения водопритока с применением термообратимых полимерных гелей МЕТКА [24, 25].

Все технологии реализуются в рамках существующих систем разработки месторождений, не требуют существенных капитальных затрат и изменений промысловой инфраструктуры, используют продукты многотоннажного производства.

Вопрос о полноте извлечения нефти из коллекторов приобретает все большую актуальность, особенно на поздней стадии разработки месторождений с применением заводнения. При этом особое внимание уделяется экологической безопасности технологий. Указанные проблемы привели к поиску и разработке новых методов повышения нефтеотдачи пластов, в частности, микробиологических.

1.3 Газовые методы увеличения нефтеотдачи

Одним из самых эффективных способов повышения нефтеотдачи считается нагнетание в пласт диоксида углерода (CO₂). Растворяясь в нефти, углекислый газ снижает ее вязкость, объем нефти увеличивается и увеличивается объем пор с

нефтью, создавая тем самым благоприятные условия для движения нефти к поверхности земли.

Закачка диоксида углерода CO_2 в целях увеличения нефтеотдачи пластов проводится с 60-х годов. По данным БашНИПИнефть, метод наиболее экономичен на месторождениях с высокой степенью обводненности. Лабораторные исследования вытеснения нефти различного состава, с диапазоном вязкости от 0.3 до 47 мПа·с, показали, что применение оторочек диоксида углерода величиной 15-30 % объема порового пространства обеспечивает увеличение коэффициента вытеснения на 15-25 % от начальной нефтенасыщенности [28]. За рубежом, главным образом в США, накоплен значительный опыт закачки диоксида углерода в пласт для повышения нефтеотдачи. По данным обзорного доклада Хаммершейба на XI Мировом нефтяном конгрессе, закачка диоксида углерода осуществляется в промышленном масштабе и на пилотных участках (участки менее 8.1 га) в песчаные и карбонатные коллекторы различной проницаемости [29].

Однако при закачке CO_2 возникает целый ряд проблем, связанный с защитой нефтепромыслового оборудования от коррозии, в частности, применение антикоррозионных покрытий или специальных материалов, что значительно удорожает технологию [29].

1.4 Методы повышения нефтеотдачи с использованием микроорганизмов

Экологически безопасные микробиологические методы увеличения нефтеотдачи применяются в основном на месторождениях, разрабатываемых с помощью заводнения. Присутствие водной фазы создает условия для развития богатой и разнообразной пластовой микрофлоры [30, 31].

Микробиологическая технология вписывается в схему вторичной добычи и требует минимального дополнительного оборудования – компрессор для нагнетания воздуха и эжектор для введения минеральных солей [32, 33].

В настоящее время методы увеличения нефтеотдачи с участием микроорганизмов имеют широкие перспективы применения, так как ежегодно

ухудшается структура нефтяных запасов в России и во всем мире растет доля обводненных месторождений и месторождений вязкой нефти. Многие микробиологические методы увеличения нефтеотдачи уже прошли промысловые испытания и показали свою эффективность.

Нефть, добытая с применением биотехнологии, сравнима по себестоимости с нефтью, добытой первичным и вторичным способами из активных запасов [14].

Микробиологические методы повышения нефтеотдачи разрабатываются по двум направлениям: первое – получение в наземных условиях продуктов микробиологического синтеза, увеличивающих подвижность нефти, и нагнетание их в нефтяной пласт, второе – развитие микробиологических процессов непосредственно в условиях нефтяного пласта с целью получения метаболитов, способствующих вытеснению нефти из коллектора. Суть этих методов заключается в улучшении нефтевытесняющих свойств закачиваемой воды с помощью микробных метаболитов: биоПАВ, полисахаридов, растворителей и др. Эти методы применяются в России, Польше, Венгрии, Румынии, Китае, Германии и США [34, 35, 36].

Применение микробиологических методов увеличения нефтеотдачи, механизм воздействия которых основывается на изменении реологических свойств нефтей, коллекторских свойств пород и очистке их от асфальтосмолопарафиновых отложений, обеспечивает комплексное действие на пласт: ограничивает движение воды по пласту блокированием промытых зон микроорганизмами, обеспечивает доотмыв нефти продуктами их жизнедеятельности, что, в конечном итоге, ведет к повышению нефтеотдачи пластов [37].

Наиболее часто применяемые технологии микробиологического воздействия – это циклическая микробиологическая обработка отдельных добывающих скважин и микробиологическое заводнение.

Циклическая микробиологическая обработка добывающих скважин – это нагнетание в пласт питательных субстратов, биокатализаторов и микроорганизмов, которые сочетаются с периодом закрытия скважин от

нескольких дней до нескольких месяцев для роста микроорганизмов и накопления метаболитов. За периодом закрытия скважины следует период эксплуатации, и цикл повторяется, когда добыча нефти в скважине значительно снижается. Микробиологическое заводнение – это введение в пласт микробной взвеси и питательных веществ одновременно. Преимущество этих методов в том, что непосредственно в пласте создаются факторы, способствующие нефтевытеснению, что и увеличивает их эффективность.

В целом, к преимуществам микробиологических методов повышения нефтеотдачи можно отнести:

- повышение производительности нефтяных месторождений;
- увеличение суммарной добычи нефти и срока эффективной эксплуатации скважин и месторождений;
- уменьшение содержания воды в пластовой жидкости;
- повышение вязкости пластовой воды за счет биомассы и растворимых биополимеров, продуктов жизнедеятельности микроорганизмов;
- уменьшение содержания сероводорода в нефтяных и газовых скважинах и месторождениях, что снижает его отрицательное воздействие на оборудование;
- уменьшение времени простоя оборудования [38, 39, 40, 41, 42].

Селективная закупорка высокопроницаемых зон и перераспределение фильтрационных потоков. Селективное закупоривание высокопроницаемых пропластков – это один из эффектов, обеспечиваемый методом, основанным на закачке в пласт избыточного активного ила очистных сооружений.

Опытно-промышленные испытания с использованием активного ила или его смеси со стабилизатором проводились на месторождениях Башкортостана, Пермской области и Татарстана [41, 42, 43].

Группа исследователей во главе с KnappR. изучала селективное закупоривание пор нефтеносной породы и распространение потока флюидов в проточной модели, составленной из 2-х песчаников различной проницаемости, которые имеют капиллярный контакт. Рост количества бактерий изменял поток флюидов в модели таким образом, что более 60 % его шло через слой низкой

проницаемости. Причем скорость фильтрации жидкости, проходящей через слой низкой проницаемости, увеличилась в 3 раза [44, 45].

Методы активизации микроорганизмов в пластовых условиях. Методы активизации микроорганизмов в пластовых условиях с целью получения продуктов, способствующих вытеснению нефти, могут быть разработаны на основе стимуляции естественной микрофлоры пласта, сформировавшейся в процессе эксплуатации месторождения или на основе введения микрофлоры, адаптированной к конкретным пластовым условиям [46].

Специальная группа углеводородокисляющих микроорганизмов способна метаболизировать углеводороды, производя органические растворители, такие как спирты и альдегиды, жирные кислоты, обладающие поверхностной активностью, газообразные продукты и другие метаболиты, увеличивающие подвижность нефти. Газообразные метаболиты, растворяясь в нефти, снижают ее вязкость и также способствуют увеличению нефтеотдачи. Следовательно, если такие живые, подвижные микроорганизмы будут внесены в нефтяной пласт, они смогут передвигаться в места залегания оставшейся нефти и приводить в движение нефть, считавшуюся ранее неподвижной и не извлекаемой [47].

Для стимуляции микрофлоры в пластовых условиях применяются минеральные (соли азота и фосфора) или органические субстраты (меласса – отход сахарного производства, молочная сыворотка и др.).

Один из способов включает последовательную закачку в пласт водного раствора целлюлозосодержащего материала с питательными субстратами и биореагентом.

В другом проекте в качестве питательных субстратов для стимуляции пластовой или вносимой углеводородокисляющей микрофлоры служат соли фосфора и азота, в качестве биореагента – надосадочная жидкость, приготовленная путем смешения в воде целлюлозосодержащего материала и питательных веществ. Дополнительно в качестве питательных веществ используют щелок черный моносультитный, мелассу свекловичную или белково-витаминный концентрат «Белвитамил» [48, 49].

Технология нагнетания мелассы в пласт. Технологии с использованием мелассы (отхода сахарного производства) применяются на месторождениях США, Китая, Румынии, Венгрии, Польши, Германии и других странах, где развито сахарное производство. Примером успешных испытаний метода являются результаты воздействия на карбонатные коллекторы с применением мелассной технологии на месторождении Фуйу (Китай), где в 2001 г. было закачано 236 т мелассы и за первые 6 месяцев дополнительно получено около 2700 т нефти. В основе технологии лежит способность сахаролитических микроорганизмов родов *Clostridium*, *Bacillus* усваивать мелассу, содержащую не менее 40 % сахара, быстро накапливать биомассу и повышать ферментативную углеводородокисляющую активность [50, 51]. При сбраживании мелассы в условиях нефтяного пласта образуется большое количество метаболитов (CO_2 , низших жирных кислот, спиртов и др.), изменяющих свойства пластовой воды, нефти, газа, породы и стимулирующих процесс вытеснения остаточной нефти [52].

В России опытно-промышленные работы по мелассному заводнению проводились при добыче вязкой нефти в 1992-1994 гг. в НГДУ “Ленингорскнефть”. Биотехнология основана на циклической интродукции в пласт мелассы и бактерий *Clostridium tyrobutyricum* [53, 54]. Нефть залежи – вязкая, высокопарафинистая и высокосернистая. Биотехнологическое воздействие на залежь снизило плотность нефти с 0.950 до 0.907 г/см³, вязкость – с 46.2 до 24 мПа·с. Межфазное натяжение, характеризующее образование биоПАВ на границе исследуемой воды и гептана, снизилось в 1.5-3 раза, что позволило получить на опытном участке дополнительно около 30 % нефти [55].

Комплексный микробиологический и физико-химический метод повышения нефтеотдачи. В течение ряда лет в лаборатории коллоидной химии нефти ИХН СО РАН разрабатываются комплексные микробиологические и физико-химические методы увеличения нефтеотдачи пластов, основанные на повышении активности аборигенной пластовой микрофлоры после применения нефтевытесняющих композиций. Влияние нефтявытесняющих композиций на

рост углеводородокисляющей микрофлоры обусловлен двумя эффектами: эмульгирование нефти и увеличение площади ее контакта с микрофлорой, а также стимулирующее действие соединений азота, которые служат микрофлоре пищевыми субстратами. Эффективность комплексного метода заключается в собственном моющем действии композиции и ее стимулирующем действии на углеводородокисляющую микрофлору пласта.

Высоким стимулирующим эффектом, повышающим на 3-5 порядков численность бактериальных клеток, обладает растворы нефтewытесняющей композиции ИХН-КА® и НИНКА® при добавлении в пластовую воду. Питательная ценность композиции определяется содержанием в ней солей азота и карбамида. Бактериальные культуры при стимуляции скорости роста питательными добавками увеличивают степень деградации УВ нефти в 10-30 раз. Окисляющая активность этих же бактериальных культур не проявляется, если их рост и размножение отсутствуют. Полученные данные позволили разработать научные основы микробиологического метода повышения нефтеотдачи и метода депарафинизации топлив и масел [56].

Физическое моделирование нефтewытеснения показало, что прирост коэффициента за счет комплексного микробиологического и физико-химического метода увеличения нефтеотдачи составляет 14-34 % [57].

Кроме того, при проведении опытно-промышленных испытаний комплексной технологии, направленной на перераспределение фильтрационных потоков и интенсификацию добычи нефти, на Лас-Еганском месторождении (Западная Сибирь) показано, что однократная закачка в пласт моющей композиции ИХН-100 вызывает повышение численности углеводородокисляющей и денитрифицирующей микрофлоры, заметное в течение года после обработки [57].

1.5 Уреаза и уробактерии – история изучения, роль в природе, распространение и практическая значимость

Уробактерии широко распространены в природе, встречаются в почве, сточных водах, навозе, подстилках для скота – то есть в средах, богатых карбамидом (мочевинной). Кроме того, уробактерии населяют кожуру свеклы. Уробактерии гидролизуют мочевины до аммиака и двуокиси углерода: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{CO}_2 + \text{NH}_3$. Эта реакция не имеет энергетического значения, но дает преимущество в конкурентной борьбе между видами за счет сильного защелачивания среды [58]. Кроме того, продуцируемый в процессе гидролиза аммиак служит источником азота для бактерий. Для получения энергии уробактерии окисляют органические кислоты и аминокислоты. Большинство уробактерий, разлагающих карбамид, относятся к аэробной группе, способны расти в сильнощелочных средах (рН 9.5) и относятся к родам *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Achromobacter* и *Clostridium*, *Staphylococcus* [59]. Обычные аммонификаторы, обладающие уреазой, при некотором подщелачивании среды аммиаком, образующимся из мочевины, отмирают. Из специфичных уробактерий могут быть названы *Micrococcus urea*, *Sarcina urea*, *Sporosarcina ureae*, *Bac. pasteurii* и *Bac. Freidenreichii* [60].

Будучи широко распространенными в природе, в особенности в почве, уробактерии играют весьма важную роль в круговороте азота в природе, переводя накапливающуюся в почве в громадных количествах мочевины, не усваиваемую растениями, в легко усваиваемый углекислый аммоний, обеспечивая самоочищение природных биоценозов.

На богатых гумусом почвах это превращение происходит за 2-3 дня, на песчаных и болотистых несколько медленнее. Физиологический смысл распада мочевины, по-видимому, сводится к переводу амидной формы азота в более легкоусвояемую аммиачную.

Активность уреазы часто рассматривается как показатель экологического здоровья микробных сообществ. При отсутствии растений активность уреазы в почве, как правило, связано с деятельностью гетеротрофных микроорганизмов,

хотя было показано, что некоторые хемоавтотрофные бактерии способны к росту на мочеvine в качестве единственного источника углерода, азота и энергии.

Кроме бактерий, уреазу вырабатывают некоторые виды растений семейства бобовых – фасоль, горох, соя, конские бобы, канавалия, семена арбузов и кабачков [61].

Уреаза – это тривиальное название ферментов, систематическое название – амидогидролаза мочевины (ЕС 3.5.1.5.). Уреазы окисляют С-N связи (непептидные) в линейных амидах, характеризуется своей специфичностью и входит в состав природных источников растительного или бактериального происхождения. По уровню специфичности уреазы относятся к группе ферментов с абсолютной субстратной специфичностью, т.е. катализируют гидролиз только мочевины [59].

Фермент уреазы – это первый фермент, который был выделен в кристаллической форме в 1926 г. Джеймсом Самнером (американский биохимик). И сам метод выделения фермента, и полученный Самнером препарат были весьма необычны. Метод был чрезвычайно прост. Обезжиренную бобовую муку из бобов рода Канавалия (*Canavalia*) экстрагировали 30 %-ным ацетоном, ацетоновый фильтрат выдерживали в холодильнике, в результате чего из раствора выпадали кристаллы фермента, которые затем сушили и перекристаллизовывали.

Уреаза состоит из двух субъединиц (α и β), соединенных в димеры, которые, в свою очередь, соединяются друг с другом в тримеры $(\alpha\beta)_3$. Тримеры формируют особую сложную структуру $((\alpha\beta)_3)_4$. Необычная уреазы была найдена у *Helicobacter pylori*, у которой 4 из 6 обычных субъединиц фермента объединены в общий комплекс из 24 субъединиц ($\alpha_{12}\beta_{12}$). Считается, что этот надмолекулярный комплекс обеспечивает дополнительную стабильность фермента у этой бактерии, которая производит аммиак для того, чтобы нейтрализовать соляную кислоту желудочного сока. Наличие высокой активности уреазы используется как диагностический признак бактерий *Helicobacter* и *Ureaplasma urealyticum*. Молекулярная масса уреазы 480000 а. е. м., оптимальный водородный показатель (рН) 7,4; оптимальная температура 50-55 °С; Ингибиторы:

тяжёлые металлы (Pb^{2+}), ионы Hg^{2+} , Ag^+ , пероксид водорода, N-этилмалеинимид, ацетогидроксамовая кислота. Реактивация уреазы, ингибированной тяжелыми металлами, возможна при взаимодействии с этилендиаминтетрауксусной кислотой (комплексообразователь трилон Б). Уреаза сохраняет активность в 8М растворе мочевины. В целом, на активность уреазы влияют разные переменные: температура, pH (оптимальная каталитическая активность уреазы проявляется при pH 6,5-7,5), объем реакции, концентрация реагентов, тип буферного раствора.

Уреаза соевых бобов – гомогексамерный фермент, содержащий 6 субъединиц с молекулярной массой 90770 – содержит дополнительно по 2 атома никеля в каждой субъединице. Показано, что в растениях, обеспеченных никелем, активность уреазы выше, и, соответственно, ниже содержание мочевины по сравнению с необеспеченными. В тканях животных и человека фермент уреазы не синтезируется. Наличие уреазы в некоторых биологических жидкостях, например, в слюне, объясняется присутствием в ней соответствующих микроорганизмов, вырабатывающих и выделяющих данный фермент [58, 59, 60, 62].

Практическое использование уреазы и уробактерий. Современный технический уровень препаративной химии и биохимии позволяет получать в кристаллическом высокоочищенном состоянии ферменты с высокой удельной активностью и гомогенностью. Промышленные ферментные препараты уреазы обладают как техническим, так и пищевым и медицинским назначением. Кроме того, ферменты все шире применяют для аналитических целей. Известны лабораторные методы определения содержания мочевины в моче, основанные на её гидролизе в присутствии соевой уреазы с последующим измерением количества аммиака, выделившегося в результате реакции. Уреазу используют для качественного определения мочевины в различных биологических жидкостях, например, в слюне, крови и других. Поскольку уреазы имеет практически абсолютную специфичность в отношении мочевины, то ее используют для аналитического определения именно мочевины. Биосенсоры на основе уреазы для обнаружения тяжёлых металлов использовались для количественной оценки общего загрязнения воды ионами тяжёлых металлов [61, 62, 63].

Уробактерии использовались в экспериментальной системе «Оазис-2» на борту космического корабля «Союз-13» для регенерации воздуха и воды с 18 по 26 декабря 1973 года [63].

Уробактерии *Bacillus pasteurii* и *Sporosarcina ureae* являются обязательным компонентом активного ила очистных сооружений для очистки канализационных стоков и отходов животноводческих комплексов. Кроме того, уробактерия *Bacillus pasteurii* промышленно используется для очистки от мочевины сточных вод производства азотных удобрений из угля. Конечный продукт гидролиза – аммиак – может быть отогнан обычными методами или преобразован в нитрат при помощи хемоавтотрофной бактерии *Nitrosomonas sp.*, а после денитрификации под действием денитрифицирующих бактерий преобразован в газообразный азот [63, 64].

Для промышленного синтеза уреазы используются специально селектированные высокоактивные штаммы, например, *Staphylococcus saprophyticus* 1-1.10 [64].

В биогетехнологиях увеличения нефтеотдачи уреазная активность микрофлоры ранее не использовалась.

В настоящее время в ИХН СО РАН разрабатывается новая технология увеличения нефтеотдачи для месторождений с высоковязкой нефтью в отсутствие теплового воздействия, в рамках которой предполагается применение нефтевытесняющих композиций на основе ПАВ и карбамида и фермента катализирующего гидролиз карбамида уреазой или уробактериями в интервале температур 25-40 °С.

1.6 Ферментативное окисление углеводородов нефти

Микроорганизмы способны использовать УВ разных классов простого и сложного строения. Практически все УВ, входящие в состав нефти, могут являться объектом для микробного воздействия [65].

Микроорганизмы обладают определенной избирательной способностью к окислению субстрата; их ферментативные системы адаптируются к

определенным группам УВ. Так, микроорганизмы наиболее быстро и эффективно развиваются на твердых *n*-парафинах и несколько медленнее на жидких и газообразных *n*-парафинах. Изоалканы более стойки к микроорганизмам, чем алканы нормального строения, наконец, менее уязвимыми оказываются соединения ароматического ряда [66].

Способность утилизировать алканы от C_5 - C_{10} до C_{16} - C_{34} показана для микроорганизмов родов: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*. Целесообразно рассматривать влияние длины цепи УВ на его доступность микробиологическому воздействию [66].

1.6.1 Аэробное окисление углеводов

Микроорганизмы, окисляющие алифатические УВ, относятся главным образом к родам *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, а также к дрожжевым и плесневым грибам. Процесс окисления осуществляется ферментативным путем при наличии газообразного кислорода [67].

Наиболее вероятным местом первичной атаки молекулярного кислорода на углеводородную цепь является углерод в α -положении или один из терминальных метильных атомов углерода. При этом вначале образуется спирт, затем альдегид и кислота. Именно появление первичных спиртов и жирных кислот при окислении *n*-парафинов, наряду со способностью углеводородоокисляющих микроорганизмов легко усваивать первичные спирты и кислоты, приводит к мысли о монотерминальном окислении *n*-парафинов [68].

В процессе химического окисления УВ первый этап тоже характеризуется образованием гидроперекисей, при этом перекись, будучи промежуточным продуктом, распадается далее по связи О-О, и образовавшийся спирт является стойким продуктом. При микробиологическом же окислении УВ (по второму варианту) связь О-О расщепляется под действием гидропероксидазной редуктазы с выделением воды и образованием соответствующего первичного спирта, превращающегося через альдегид в жирную кислоту [69].

На примере различных *n*-парафиновых УВ показано, что после образования кислот и оксикислот может происходить окисление в β -положении, когда

отщепляется не один, а два атома углерода. В зависимости от экологических условий, процесс может включать стадию окисления в β -положении либо миновать ее [70].

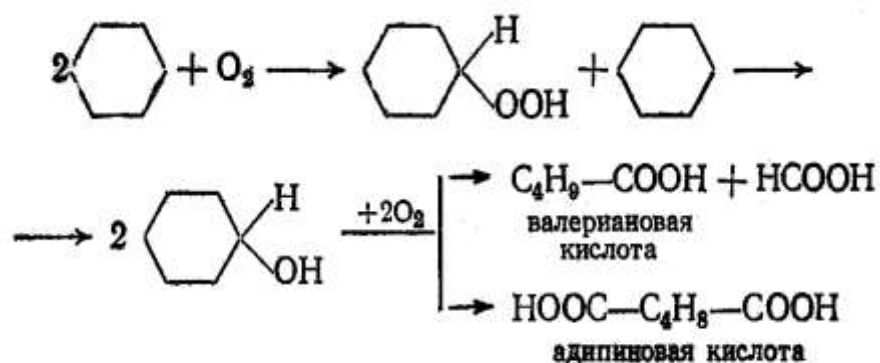
Что касается микробиологического окисления *изопарафинов*, то ранее существовало мнение, якобы они быстрее поражаются микробами, чем *n*-парафины, однако более поздние исследования показали ошибочность такого суждения. При выращивании 4 родов микроорганизмов на изопарафинах обнаружено, что использование ими определенного УВ в качестве единственного источника углерода и энергии зависит от числа ответвлений и степени ветвления. Оказалось, что разветвленные структуры менее пригодны для роста микроорганизмов, чем неразветвленные: увеличение длины ответвлений или смещение ветви к середине цепи парафина или у определенного углерода атома, снижало пригодность этого парафина для роста микробов [68, 69, 70, 71].

Ненасыщенные алифатические углеводороды (олефины) окисляются микробами довольно легко. Описано большое число микроорганизмов, использующих в качестве субстратов олефины [72, 73, 74]. Механизм микробиологического окисления олефинов изучен меньше, чем соответствующий процесс парафинов. Установлено, что ферментные системы микроорганизмов при окислении олефинов образуют насыщенные кислородом продукты, в которых двойная связь оказывается не разрушенной. Поскольку продуктом распада является тетрадеценовая кислота, считают, что имеет место прямая атака на метильную группу олефина [75, 76].

Окисление алициклических углеводородов. На основании факта бактериального разложения нефти с большим числом нафтеновых УВ можно сделать вывод о микробиологическом окислении нафтенов. Позднее, обобщая накопившиеся данные, Э. Бирштехер отнес циклогексан, метилциклогексан, 1,3-диметилциклогексан, 1,3,4-триметилциклогексан и декалин к циклопарафинам, способным поражаться бактериями [77]. Нафтеновые УВ очень легко окисляются бактериями и плесневыми грибами; какой-либо алифатический заместитель в кольце еще более способствует лабильности молекулы. Что касается механизма

микробного окисления нафтенов, то, по предложению Э. Бирштехера, начальной ступенью является образование диолов. Последующие исследования [77] показали, что бактерии способны окислять декалин и тетралин.

Позднее была выделена чистая культура *Pseudomonas aeruginosae*, окисляющая циклогексан. Этот микроорганизм, разлагая субстрат, в качестве первого продукта обмена образует гидроперекись, которая накапливается в таких больших количествах, что будет тормозить развитие микроба. При нормальном ходе процесса окисления продуктами превращения гидроперекиси являются валериановая, муравьиная и адипиновая кислоты, которые, включаясь в обмен веществ микроорганизмами, обеспечивают и поддерживают его рост и развитие, а тем самым дальнейшее окисление субстрата. Здесь налицо биологическая цепная реакция, схема которой выглядит следующим образом [66]:



Механизм окисления, насыщенных циклических УВ, таких, как циклогексан и его алкилзамещенные, декалин, изучен еще недостаточно полно. Опытами обнаружено, что многие циклопарафины и циклоолефины легко окисляются почвенными бактериями, постоянно присутствующими в пылевых частицах воздуха [66]. Авторы утверждают, что при этом происходит окисление продукта, но не прирост микробной массы. Однако непрерывность процесса не нарушается, поскольку нет недостатка постоянном притоке микрофлоры вместе с воздухом [78, 79, 80].

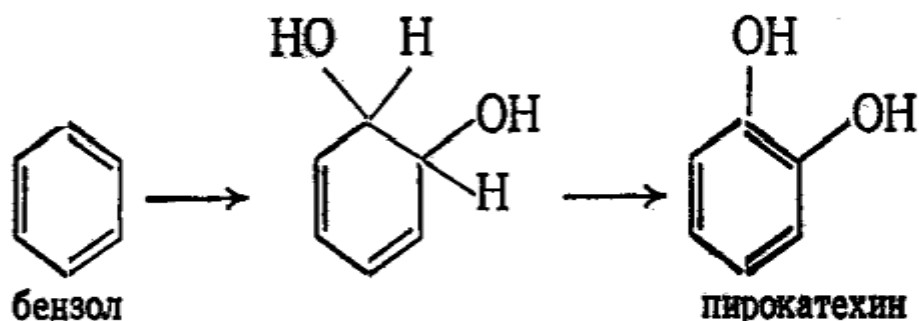
Окисление ароматических углеводородов. Ароматические УВ разлагаются микроорганизмами, но лишь в редких случаях они могут быть для микробов единственными источниками углерода и энергии. Отсюда следует вывод, что

ароматические УВ гораздо устойчивее к микробиологическому окислению, чем парафины и нафтены. Если в условиях эксперимента можно сравнительно легко добиться начальной гидратации молекулы с последующим разрывом кольца, то на практике частичное окисление ароматических УВ происходит лишь за счет боковых цепей [81].

Тем не менее, вопросам микробиологической трансформации ароматических УВ в литературе уделяется большое внимание. При этом многоядерные ароматические УВ, такие, как антрацен и фенантрен, изучались более интенсивно, чем одноядерное, что объясняется сравнительно легкостью биологического окисления первых [82].

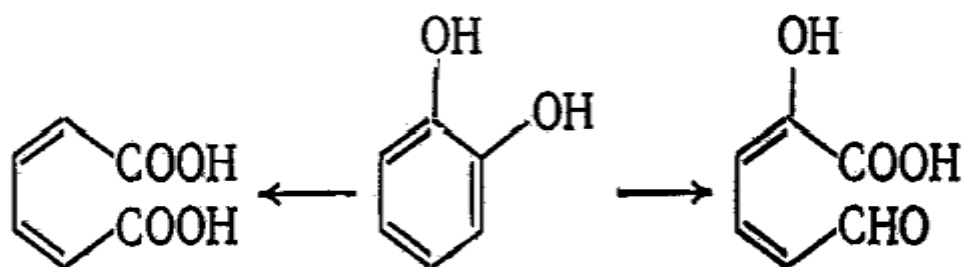
Микроорганизмы осуществляют распад ароматических УВ до конечного продукта – алифатических кислот, включающихся в метаболизм микробной клетки по циклу Кребса (т.е. трикарбоновых кислот) [66]. Способностью окислять бензол обладают лишь немногие микроорганизмы, в том числе виды *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*. При окислении бензола различными микроорганизмами каждый раз в качестве первичного продукта его превращения выделяли пирокатехин [66, 83].

Однако по аналогии с тем, что было установлено для ароматических многоядерных УВ, полагают, что пирокатехин не является в действительности первичным продуктом окисления бензола, а получается после дегидрирования его транс-диоксигидразо производного по схеме [66]:



Пирокатехин затем быстро превращается в цис, цис-муковую кислоту при раскрытии ароматического ядра между углеродными атомами в положении 1 и 2

или в полуальдегид α -оксимуконной кислоты при раскрытии этого ядра между атомами углерода в положении 2 и 3.



цис, цис-муко-
новая кислота

полуальдегид
 α -оксимуконной
кислоты

Эти вещества, в свою очередь, превращаются в более простые соединения, усваиваемые микроорганизмами по циклу Кребса. Такая гипотеза автора основывается на аналогичных данных, полученных им при разложении нафталина, некоторых его производных, а также фенантрена [66].

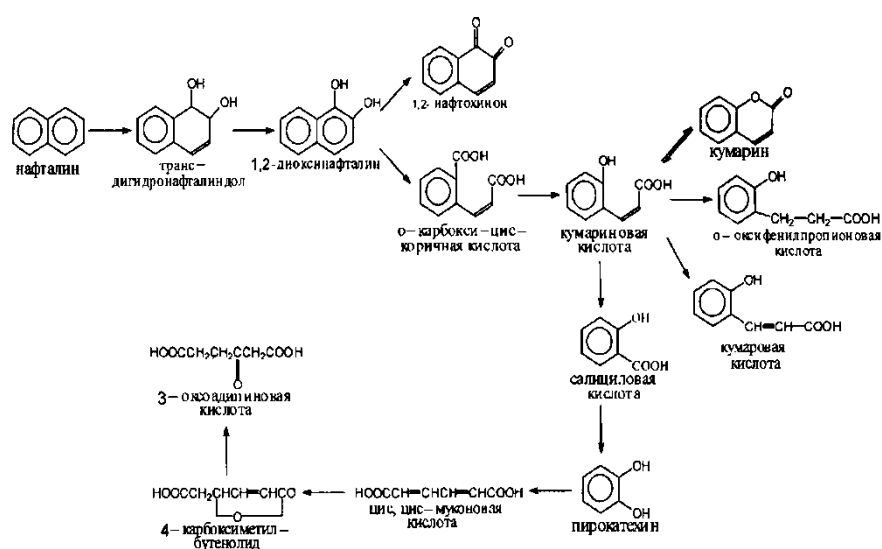
Микробиологическое окисление нафталина. Бактерии, разрушающие нафталин, впервые выделены и описаны в 1927 году. Были найдены аэробные подвижные формы, которые используют очищенный нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии. Такими бактериями являются штаммы *Pseudomonas aeruginosae*, что было впоследствии подтверждено другими авторами [84].

Нафталин вначале окисляется до транс-дигидронафталиндиола, который дегидрируется до 1,2-диоксинафталина, после чего происходит разрыв кольца. В некоторых случаях, в зависимости от вида микроорганизма и условий его культивирования, – до 1,2-нафтохинона, токсичного для микробной клетки; в случае такого метаболического тупика процесс прерывается. Разрыв кольца 1,2-дигидронафталина, вероятно, идет через о-карбокцис-коричную кислоту, окислительное декарбокцилирование которой приводит к образованию о-окси-цис-коричной кислоты [85].

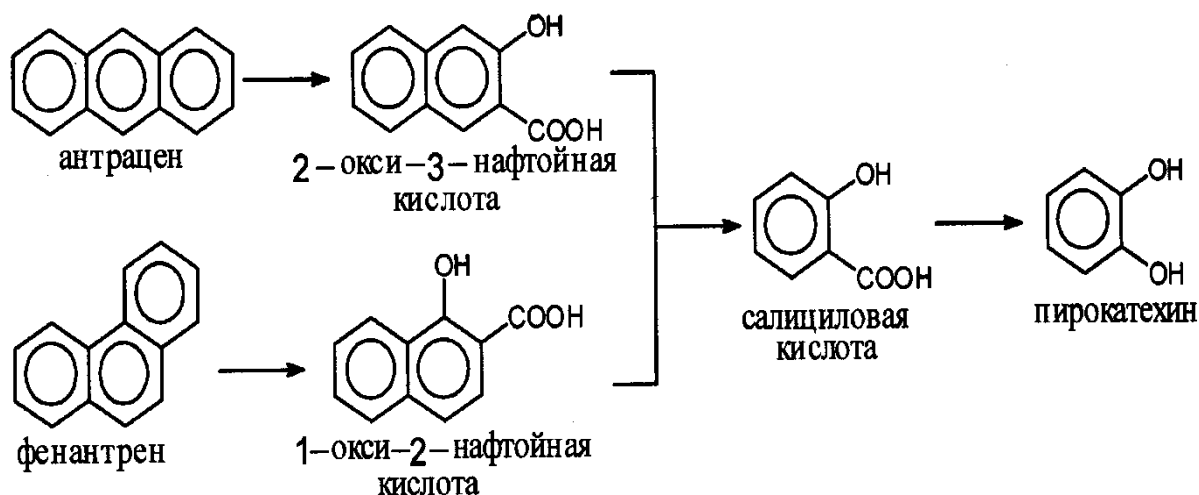
Процесс образования органических кислот из 1,2-диоксинафталина осуществляется в результате хорошо известных биохимических реакций. Так, окисление в β - положении ведет к появлению салициловой кислоты, а

изомеризация и восстановление – к образованию кумаровой и о-оксибензилпропионовой кислот (дальнейший путь их метаболизма в клетке не изучен) [85].

Хлор-, бром- и метилнафталины, а также алкилметилнафталины окисляются бактериями еще интенсивнее, чем нафталин. Окисление алкильной части цепочки метилнафталинов можно рассматривать, как «метильное окисление», т.е. как окисление метана и других алканов [66]. С этой точки зрения естественно, что ряд алкилнасыщенных бензолов и нафталинов окисляется так же легко, как н-парафины.



В 1928 г. были выделены и описаны три штамма бактерий, окисляющих **фенантрен**, а позднее обнаружены штаммы *Pseudomonas* и *Flavobacterium*, окисляющие **антрацен** и **фенантрен** через салициловую кислоту и пирокатехин. При изучении механизма окисления трехъядерных аренов также определено, что антрацен и фенантрен под действием микробов через диолы превращаются в салициловую кислоту и далее в пирокатехин по схеме [66, 85]:



1.6.2. Анаэробное окисление углеводородов

Анаэробное окисление углеводородов возможно в толще нефтепродукта, либо в смеси последнего и воды, либо в глубине нефтеносных пластов, без доступа воздуха. Практически подобные условия встречаются при хранении нефти и нефтепродуктов, особенно в больших резервуарах, а также при бурении нефтяных скважин или при заводнении пластов с целью вторичной добычи нефти, наконец, в системе теплообмена на нефтеперерабатывающих заводах. Возбудителями анаэробного окисления УВ являются чаще всего сульфатвосстанавливающие бактерии (серобактерии), особенно родов *Desulfovibrio*, а также *Pseudomonas*. Редукция сульфатов под действием микроорганизмов представляет собою окислительно-восстановительный процесс. При этом сульфаты восстанавливаются до сероводорода, а углеводороды окисляются [85, 86].

Для бактерий, окисляющих УВ в анаэробных условиях, акцептором водорода является не атмосферный кислород, а сульфаты и нитраты. При этом происходит не только ухудшение качества нефтепродукта, но и коррозия контактирующего с ним металла (резервуаров, трубопроводов)[86].

В присутствии металла сульфатвосстанавливающие бактерии действуют как деполяризаторы, активизируя процесс соединения кислорода сульфатов с водородом. Конечный продукт восстановления сульфатов сероводород является коррозирующим агентом, при взаимодействии которого с железом образуется

сернистое железо, в свою очередь, стимулирующее развитие микроорганизмов [84, 85, 86].

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

В работе использовали пробы высоковязкой нефти, отобранные на месторождениях Цагаан-Элс, Тамсагбулаг (Монголия) и Усинском месторождении (Россия). Основные характеристики изучаемых нефтей приведены в табл. 1.

Таблица 1–Основные характеристики нефтей

Параметры	Месторождения нефтей		
	Цагаан-Элс	Тамсагбулаг	Усинское
Глубина залегания, м	1200–1355	2311–2480	1000-1350
Пластовая температура, °С	30-49	30-50	19-25
Плотность при 25 °С, г/см ³	0.872	845.5	0.955-0.968
Вязкость при 25 °С, мПа·с	1391	2180	12800
Минерализация пластовой воды, г/дм ³	57.5	3.95	59.8
Содержание, % мас.			
парафинонафтеновые УВ	11.0-18.0	83.2	0.3-1.1
ароматические УВ	16.9	11.2	28.3
смолы	13.4	4.0	до 19.5
асфальтены	0.2-2.6	1.6	9.0-38.0
Элементный состав, % мас.			
С	87.7	85.2	85.5
Н	11.08	13.18	10.95
N	0.3	0.2	0.63
S	до 0.19	0.14	2.04
O	1.1	1.2	1.06

Нефти месторождений Цаган-Элс и Тамсагбулаг (Монголия) характеризуются как высоковязкие, высокопарафинистые и малосернистые.

Нефть Усинского месторождения по таким характеристикам, как плотность, вязкость, содержание смолисто-асфальтеновых компонентов и серы относится к тяжелым, высоковязким, высокосмолистым и высокосернистым нефтям.

Объектами для выделения и исследования микроорганизмов, продуцирующих уреазу, послужили образцы:

- почвы, загрязненной отходами жизнедеятельности мелкого рогатого скота (грунт из загона для скота на частном подворье);
- соломы с отходами жизнедеятельности КРС (подстилка на частном подворье).
- отходов жизнедеятельности КРС (навоз из ТОО «Заварзино»);
- отходов жизнедеятельности лошадей (навоз из конюшни конного клуба «Жокей»);
- кожуры и корнеплодов свеклы.

Кроме того, в качестве объектов, содержащих уреазу, послужили соевая мука и реактив «Уреаза из соевых бобов» (Марка Б, Реахим, НПО «Биолар»).

Тест-объектами для исследования гидролиза карбамида, послужили разработанные в ИХН СО РАН нефтewытесняющие композиции ИХН-КА и НИНКА[®]. Основной 50 %-ный раствор композиций ИХН-КА (НИНКА[®]) содержит, % мас.: неионогенное ПАВ – 5.0 (1.5); ионогенное ПАВ – 2.4 (0.5); нитрат аммония – 14.2 (16); карбамид – 28.4 (32.5); минерализованная вода – 50. Начальный рН композиций – 6.5-6.8.

2.2 Микробиологические и биохимические методы

Микробиологический анализ пластовых флюидов заключался в определении численности физиологических групп углеводородокисляющих, аммонифицирующих, денитрифицирующих и сульфатредуцирующих микроорганизмов методом посева на селективные жидкие и плотные питательные среды. Гетеротрофную или аммонифицирующую микрофлору учитывали на мясо-пептонном агаре, денитрифицирующую микрофлору – на среде Гильтая, сульфатредуцирующую микрофлору – на среде Таусона [87, 88].

Для получения накопительной культуры уробактерий применяли жидкую селективную питательную среду Ленисаи растворы нефтewытесняющих композиций ПАВ (поверхностно активных веществ), содержащих карбамид, в разных концентрациях.

Численность уробактерий определяли посевом на селективную агаризованную среду Лениса [87].

Из накопительных культур с максимальными значениями pH среды выделяли чистые культуры бактерий, которые затем определяли до вида [88].

Идентификацию культур, выделенных из свекольной кожуры, проводили на базе Новосибирского ЦКП "Секвенирование". ДНК выделяли при помощи набора "Медиген". Полученные последовательности сравнивали с последовательностями из баз данных nr DatabaseNCBI.

Штаммы, выделенные из помета животных, идентифицировали на кафедре физиологии растений и биотехнологии Томского Государственного Университета с помощью набора ZR Soil Microbe DNA Kit (Zimo Research, USA).

Филогенетическое дерево определяемых штаммов построено на основании нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК методом UPGMA. Шкала соответствует 0.1 нуклеотидных замен на сайт.

При культивировании групп углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и уробактерий на жидких средах в ряде опытов определяли активность основных ферментов.

Активность фермента каталазы углеводородокисляющей пластовой микрофлоры определяли газометрическим методом, который основан на измерении скорости разложения пероксида водорода [90,91,92]. Количество выделившегося молекулярного кислорода учитывают в течение 1 минуты. Активность каталазы выражают в мл кислорода, выделившегося на 1мл раствора [89, 90, 91].

Активность дегидрогеназы углеводородокисляющей пластовой микрофлоры и уреазы уробактерий определяли фотоколориметрическими методами [90]. В качестве акцептора водорода применяли бесцветные соли тетразолия (2,3,5 трифенилтетразолия хлористый–ТТХ), которые восстанавливаются в красные соединения формазанов (трифенилформазан - ТФФ). Окрашенный раствор фотоколориметрируют с синим светофильтром при

длине волны 540 нм. Активность дегидрогеназы выражают в мг ТФФ на 1 мл раствора за сутки.

Уреазу определяли при оптической плотности 400 нм с реактивом Несслера, формирующим окрашенный комплекс с ионами аммония. Активность фермента выражали в мг иона аммония, выделенного за 1 час из 1 г исследуемого образца [90, 91, 92].

2.3 Постановка экспериментов

Влияние нефтewытесняющих композиций и их компонентов на численность и ферментативную активность пластовой микрофлоры исследовали при ее культивировании на модели пластовой воды и на селективной среде Раймонда для углеводородокисляющих микроорганизмов. Микрофлору вносили в виде суспензии клеток в физиологическом растворе из одно- или двухсуточных колоний на мясопептонном агаре.

Уреазную активность соевой муки, реактива уреазы и микрофлоры, населяющей свекольную кожуру и отходы жизнедеятельности домашних животных, исследовали при гидролизе ими карбамида в растворах нефтewытесняющей композиции с разными концентрациями или в его индивидуальных растворах. Об эффективности гидролиза судили по изменению рН раствора, снижению концентрации карбамида, увеличению концентрации ионов аммония и численности бактерий в культуральной жидкости и, в ряде случаев, увеличению концентрации углекислого газа в воздухе над культуральной жидкостью.

Для определения условий максимального накопления уробактерий в водной фазе при их смыве (десорбции) с механических частиц отходов жизнедеятельности домашнего скота варьировали концентрацию отходов, время перемешивания и добавление 0.5 % ПАВ в физиологический раствор для их десорбции. Исследовали 3 варианта концентрации помета – 5, 10 и 15 %. Время перемешивания составляло 30, 60 и 120 минут.

Для исследования комплексного влияния УОБ и уробактерий на состав и свойства нефти культивирование проводили в течение месяца в 10 %-ном

растворе композиции НИНКА® с нефтью Усинского месторождения в концентрации 10 %. После эксперимента остаточную нефть экстрагировали из жидкой фазы хлороформом в делительной воронке, затем освобождали от растворителя на вакуумном роторном испарителе. Хлороформенные экстракты анализировали методом ИК-спектроскопии. На колонке с оксидом алюминия получали гексановую фракцию нефти, которую затем анализировали методом газожидкостной хроматографии [93, 94, 95].

Для исследования газовой фракции в емкости по 200 мл вносили по 100 мл 10%-ного раствора композиции НИНКА® и по 0,1 г каждого источника уробактерий (сухая молотая кожура свеклы, соевая мука и навоз лошади), сеяли на мясо-пептонный агар и среду Лениса для определения исходной численности микроорганизмов. Затем плотно завинчивали крышку и ставили термостат на 20 суток при 30 °С.

Влияние продуктов ферментативного гидролиза карбамида в составе нефтewытесняющей композиции на реологические характеристики высоковязких нефтей пермо-карбоновой залежи Усинского месторождения и месторождения Тамсагбулаг исследовали следующим образом: в герметичные ячейки объемом 150 см³ помещали системы: нефть – композиция в соотношении 2:1 в количестве 120 г. В качестве источников уреазы/уробактерий использовали водную вытяжку из навоза КРС (15 %) или свекольной кожуры (10%), а также молотую свекольную кожуру (0.01 %). Контролем служил 10 %-ный раствор композиции НИНКА® без уробактерий. Системы термостатировали в воздушном термостате: с нефтью Усинского месторождения – при 30 °С в течение 90 суток, с нефтью месторождения Тамсагбулаг – при 40 °С в течение 60 суток. После охлаждения и отделения нефтяной фазы от водной, проводили исследования нефти, сравнивая ее реологические свойства до и после воздействия композиций методом ротационной вискозиметрии на вискозиметре «Реотест-2.1.М».

2.4 Моделирование процесса вытеснения нефти комплексным микробиологическим и физико-химическим методом

Нефтевытеснение проводили на установке из стеклянных, термостатируемых колонок высотой 81-112 см, диаметром 1.9-2.2 см. Для каждой колонки определяли поровый объем, проницаемость по газу, высоту столба силикагеля. Каждая колонка подключалась отдельно к коллектору для создания градиента давления. Для подачи исходных жидкостей и определения количеств авытесняемых из колонок воды и нефти применяли делительные воронки и мерные цилиндры. Заданную температуру поддерживали с помощью термостата VT-12. В качестве модели породы-коллектора применяли силикагель марки АСКГ с удельной поверхностью частиц 160-500 м²/г. Согласно ГОСТ 39-195-86, для исследования процессов вытеснения готовили изовязкостную модель нефти, для чего к исследуемой вязкой нефти добавляли 30 % керосина.

Сначала колонки насыщали водой (модель пластовой воды) для определения порового объема каждой модели по разнице объема введенной и вышедшей воды. Затем модель насыщали нефтью, затем через модель фильтровали несколько поровых объемов пластовой воды до полной обводненности продукции на выходе – для моделирования обводненного пласта. На выходе из модели фиксировали объем вытесненной нефти и воды для последующего расчета нефтенасыщенности, коэффициента нефтевытеснения и его относительного прироста. Расчет вели по формулам:

$$1 \text{ Начальная нефтенасыщенность, \%} = \frac{\text{Начальный объем нефти в модели (см}^3\text{)} \cdot 100 (\%)}{\text{Поровый объем (см}^3\text{)}}$$

$$2 \text{ Абсолютный коэффициент нефтевытеснения, \%} = \frac{\text{Кумулятивный выход нефти (см}^3\text{)} \cdot 100 (\%)}{\text{Начальный объем нефти в модели (см}^3\text{)}}$$

3 Относительный прирост коэффициента нефтевытеснения, % =
 = $\frac{\text{Кумулятивный выход нефти (см}^3\text{)} \cdot 100 (\%)}{\text{Объем нефти в модели до закачки композиции (см}^3\text{)}}$

Объем нефти в модели до закачки композиции (см³)

Модели обводненного пласта обрабатывали нефтевытесняющими составами – одним поровым объемом 10 % раствора композиции НИНКА[®] (контроль), либо композицией с добавлением углеводородокисляющей микрофлоры или агента ферментативного гидролиза карбамида – уробактерий или уреазы. После обработки модели перекрывали и термостатировали при 40°C в течение 14 суток, после чего продолжали вытеснение нефти водой до полной обводненности продукции.

На выходе из моделей в каждой пробе определяли объем вытесненной нефти и воды, рН водной фазы, количество микроорганизмов и концентрацию карбамида – компонента композиции НИНКА[®].

Нефть, вытесненную из модели, из жидкой фазы экстрагировали хлороформом в делительной воронке, затем экстракт освобождали от растворителя на вакуумном роторном испарителе. Хлороформные экстракты анализировали методом ИК-спектроскопии. На колонке с оксидом алюминия получали гексановую фракцию нефти, которую затем анализировали методом ГЖХ [96].

2.5 Методы физико-химических анализов пластовых флюидов, культуральных жидкостей, жидкостей после вытеснения

Водородный показатель воды (рН) измеряли на рН-метре-милливольтметре рН-130 со стеклянным электродом и на милливольтметре рН-673М с хлорсеребряным электродом.

Плотность нефти и воды определяли пикнометрическим методом по ГОСТ 189995.1-73 «Продукты химически жидкие. Методы определения плотности», вязкость – методом вибрационной вискозиметрии на приборе «Реокинетика». Минерализацию пластовой воды определяли по ГОСТ 2874-73, основанном на весовом определении растворенных веществ после высушивания.

Концентрацию карбамида определяли колориметрическим методом по формированию окрашенного комплекса с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида при длине волны 490 нм [61].

Концентрацию ионов аммония определяли фотоколориметрическим методом с реактивом Несслера при длине волны 400 нм [92].

Методом ГЖХ анализировали гексановую фракцию углеводородов, полученную на оксиде алюминия. Анализ проводили на хроматографе марки 3700 с пламенно-ионизационным детектором, на капиллярной колонке 25 м × 0.2 мм с неподвижной фазой SE 54 и программированием температуры от 50 до 290 °С, газ-носитель – гелий. Индивидуальные углеводороды идентифицировали, учитывая известные порядки элюирования и величины индексов удерживания. Обработку результатов вели методом нормировки, для чего сумму высот всех пиков n-алканов и изопреноидных углеводородов пристана и фитана приравнивали к 100 % и вычисляли относительное содержание каждого компонента. По данным хроматографического анализа строили гистограммы молекулярно-массового распределения насыщенных углеводородов нефти. Глубину биодеструкции УВ оценивали по отношению величины суммы пиков изопреноидных углеводородов к сумме n-алканов C₁₇ и C₁₈ [96].

Методом хромато-масс-спектрометрии определяли содержание ароматических углеводородов в гексановой фракции нефтей. Анализ проводили на хроматографе «NERMAGR10-10C» (Франция) с использованием кварцевой капиллярной колонки SPB-5 30 м × 0.32 мм с неподвижной хроматографической фазой DB-5. Газ-носитель – гелий. Метод ионизации – электронный удар с энергией ионизирующего излучения 70 эВ [94].

Методом ИК-спектроскопии определяли изменения структурно-группового состава нефтей. Для этого снимали ИК-спектры (Рисунки 1-10, Приложение 2) в области 500-4000 см⁻¹. Для сравнения состава нефтей использовали относительные величины – так называемые спектральные коэффициенты, рассчитываемые по оптической плотности полос поглощения в определенной области спектра:

$C_1 = D_{1610}/D_{720}$ – коэффициент ароматичности, рассчитывается с помощью отношения оптических плотностей полос поглощения в областях 1610 см^{-1} и 720 см^{-1} , позволяющий судить о доле парафиновых групп по отношению к ароматическим структурам. Полоса поглощения 1610 см^{-1} определяет валентные колебания связей $C=C$ ароматических структур. Метиленовая группа CH_2 обуславливает полосу поглощения 720 см^{-1} .

$C_2 = D_{750}/D_{720}$ – коэффициент интенсивности поглощения полициклических аренов и n-алканов.

$C_3 = D_{720}/D_{1380}$ – коэффициент относительной интенсивности метиленовых (CH_2) и метильных (CH_3) групп.

$A_1 = D_{815}/D_{750}$ – коэффициент относительного содержания три- и полициклических аренов.

$A_2 = D_{875}/D_{720}$ – коэффициент относительного содержания трициклических аренов и алканов.

$A_3 = D_{815}/D_{875}$ – коэффициент относительной интенсивности поглощения три- и бициклических аренов.

$CH_3/CH_2 = D_{1380}/D_{720}$ – коэффициент разветвленности, определяется интенсивностью поглощения метильных и метиленовых структур.

D_{1710}/D_{1610} – коэффициент окисленности определяется отношением интенсивности образования продуктов окисления углеводородов $C=O$ и связей $C=C$ ароматических структур [94, 95].

2.6 Статистическая обработка результатов эксперимента

Все эксперименты выполнялись в 4-5 повторностях. Статистическую обработку данных проводили в статистических пакетах Microsoft Excel (2007) и Statistics for Windows 6.0. Данные, показанные на рисунках и таблицах, представляют собой средние значения.

Глава 3. Микробиологические и физико-химические исследования образцов пластовых флюидов исследуемых месторождений вязкой нефти

В ходе работы из проб воды и нефти выделено более 30 культур. При изучении видового состава установлено, что доминирующими являются представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Flavobacter* и *Flexitrix*, на долю которых приходится до 80 % всего гетеротрофного пластового биоценоза. Определено присутствие грибковой и дрожжевой микрофлоры. Все эти представители являются активными продуцентами биоПАВ и биополимеров, снижающих поверхностное и межфазное натяжения на границе порода – нефть – вода.

Численность общей гетеротрофной микрофлоры, играющей значительную роль в процессах десорбции остаточной нефти, определяется от 220 клеток до 32 тыс. клеток в см^3 пластовой воды. Углеводородокисляющая (УОБ) группа, продукты метаболизма которой изменяют реологические свойства нефти, насчитывает от 100 клет/см³ до 20 тыс.клет/см³. Численность денитрофицирующей группы составила от нескольких единиц до 3000 клет/см³, СВБ – от 60 до 1500 клет/см³.

В целом, пластовая микрофлора довольно разнообразна, но немногочисленна, что может быть вызвано низким водообменном, отсутствием азотистого питания и фосфора. Это является лимитирующим фактором для роста и размножения микроорганизмов в пластовых условиях. Поэтому мы изучили влияние нефтewытесняющих композиций на рост пластовой микрофлоры.

3.1 Влияние нефтewытесняющих композиций на рост пластовой микрофлоры

Для повышения эффективности микробиологического воздействия на вытеснение вязкой нефти, исследовали влияние компонентов нефтewытесняющих композиций на динамику роста и ферментативную активность пластовой микрофлоры высокосмолистой нефти Усинского месторождения и высокопарафинистой нефти месторождения Тамсагбулаг. В состав нефтewытесняющих композиций с регулируемой щелочностью входят нитрат

аммония и карбамид, то есть различные формы минерального азота, представляющие разную питательную ценность для микроорганизмов.

На Рисунке 1 представлены колонии микроорганизмов рода *Bacillus*, выделенные из нефти Усинского месторождения, активно растущие на нефти и продуцирующие биоПАВ, за счет чего вокруг колоний на 3-и сутки культивирования образовалось чистое пространство, свободное от нефти.

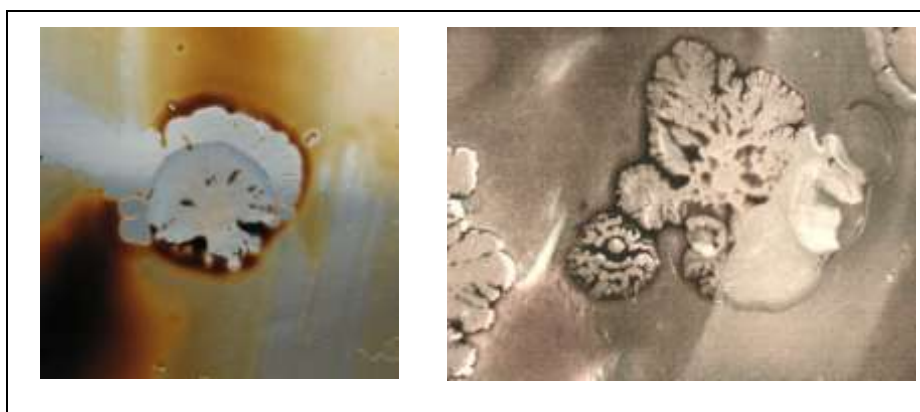


Рисунок 1 – Колонии микроорганизмов рода *Bacillus*, выделенные из нефти месторождения Усинское.

На Рисунке 2 показана утилизация нефти при культивировании микроорганизмов, выделенных из пластовой воды месторождения Монголии, на мясо-пептонном агаре (МПА) с добавлением нефти.



Рисунок 2 – Углеводородоокисляющая микрофлора, выделенная из пластовой воды месторождений Тамсагбулаг.

Введение в пластовую воду раствора нефтewытесняющей композиции в концентрации 0.1-0.2 %, компонентами которого являются минеральные азотистые соединения, стимулирует рост микроорганизмов и активность ряда

ферментов оксигеназной группы. Так введение карбамида в концентрациях 0.1, 0.2 % увеличивает численность микроорганизмов в 3-5 раз (Рисунок 3).

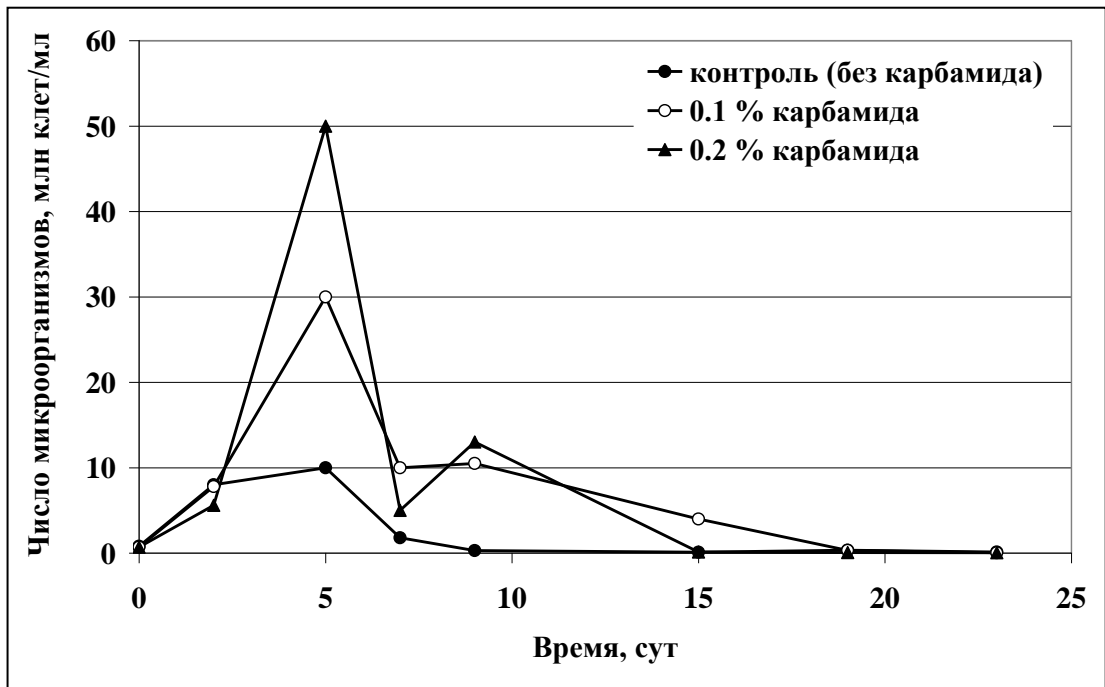


Рисунок 3 – Динамика роста пластовой микрофлоры месторождения Усинское при добавлении карбамида

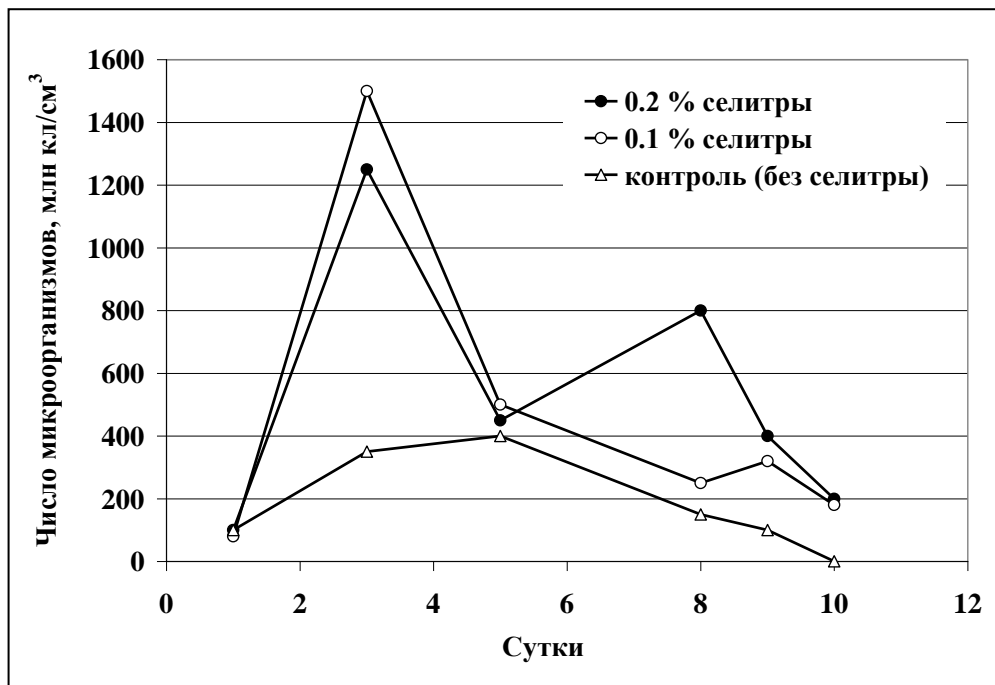


Рисунок 4 – Влияние селитры на динамику роста пластовой микрофлоры в контакте с нефтью

Введение селитры стимулирует численность микроорганизмов в 17-20 раз (Рисунок 4). Добавка раствора KNO_3 в концентрации 0.1 % увеличивает численность микроорганизмов на 3 порядка. Следовательно, селитра, как азотистый субстрат, лучше усваивается микроорганизмами и на более высоком уровне стимулирует рост их численности.

При введении в пластовую воду композиции ИХН-КА, компонентами которой являются и карбамид и селитра, в концентрации от 0.1 до 10 %, численность микрофлоры увеличивается во всех вариантах опыта. Максимальное увеличение численности микрофлоры от 5 до 3100 млн клет/см³ получено при добавлении 0.5 %-ного раствора композиции на 7-е сутки культивирования. Стимулирующим питательным субстратом также служат растворы композиции в концентрации 0.1 и 0.2 %, при добавлении которых численность увеличивается на несколько порядков (Таблица 2.)

Таблица 2 – Влияние нефтewытесняющей композиции ИХН-КА на численность углеводородокисляющей микрофлоры

Концентрация растворов композиции, %	Число микроорганизмов, млн клет/см ³							
	время опыта, сутки							
	исх.	1	3	5	7	10	12	15
контроль								
0	2.5	31	440	150	27	40	10	10
0	2.0	25	440	108	220	40	12	10
опыт								
10	5	50	80	59	25	30	13	0.1
5	5.5	50	180	100	54	44	37	37
1	4	80	180	440	480	400	130	100
0.5	5	140	200	1450	3100	1700	460	220
0.2	5	110	490	900	1800	1100	960	150
0.2	2.3	140	490	900	1700	1100	800	184
0.1	7	150	420	800	1200	1250	430	45
0.1	4	135	400	800	1200	1200	500	40

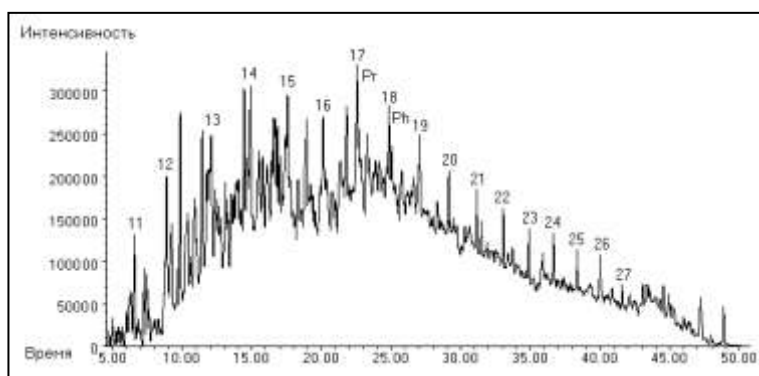
Следовательно, нефтевытесняющая композиция ИХН-КА, закачанная в пласт, выполняет двойную функцию: 1 – увеличивает вытеснение нефти из пласта, 2 – при продвижении по пласту, разбавляясь, служит питательным субстратом, увеличивающим численность и активность пластовой микрофлоры.

Ферментативную активность микрофлоры изучали при их культивировании в нефтезагрязненной минеральной среде Раймонда, близкой по составу к пластовой воде. В процессе культивирования микроорганизмов в контакте с нефтью исследовали их каталазную и дегидрогеназную активность [97].

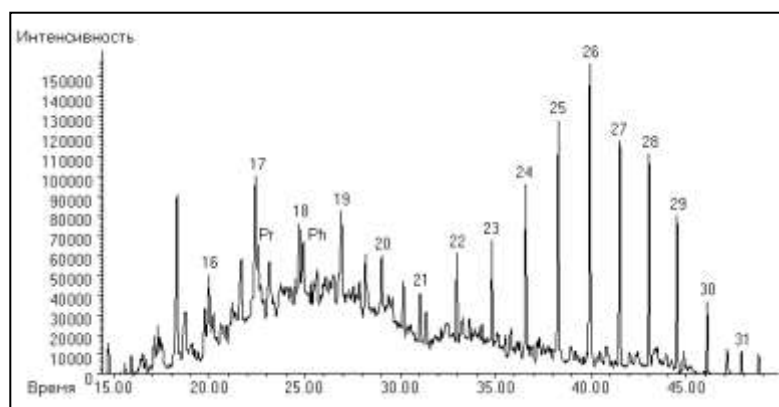
Биоокислительные процессы, лежащие в основе деструкции нефти, прямолинейно зависят от скорости размножения микроорганизмов и накопления биомассы [98]. В качестве стимулирующего субстрата при культивировании микроорганизмов, увеличивающего их численность на 3-4 порядка, применяли 0.5 %-ный раствор композиции ИХН-КА, содержащий селитру, карбамид и ПАВ. Разбавленный раствор композиции играет двойную роль: первое – служит источником азотного питания, стимулирующим рост и ферментативную активность микроорганизмов, второе – за счет ПАВ происходит эмульгирование нефти, что способствует более тесному контакту бактерий с углеводородами нефти.

При деструкции УВ нефти продуктами метаболизма являются биополимеры, карбоновые кислоты, альдегиды, кетоны, спирты и биоПАВ, снижающие поверхностное и межфазное натяжение на границе «порода-нефть-вода» и увеличивающие десорбцию нефти с пористой породы пласта [99]. Образование микробных метаболитов, обладающих нефтевытесняющими свойствами, может осуществляться непосредственно в пласте при введении композиции.

В процессе биодеструкции высоковязкой нефти концентрация насыщенных ациклических УВ C_{11} - C_{21} значительно снизилась (Рисунок 5).



А



Б

Рисунок 5 – Хроматограммы исходной нефти Усинского месторождения (А) и после биодegradации активизированной микрофлорой (Б)

На фоне их снижения относительно увеличилась концентрация н-алканов C_{22} – C_{31} . В целом, потеря массы нефти Усинского месторождения при деструкции активизированной микрофлорой за 15 суток составила 65 %.

Данные ИК-спектроскопии позволили определить коэффициенты (C_1 , C_2 и коэффициент разветвленности), отражающие процессы биоокисления УВ (Таблица 3). Коэффициенты C_1 и C_2 отражают степень ароматичности и, как следует из данных Таблицы 3, более интенсивный процесс биодеструкции отмечен в варианте с композицией ИХН-КА. Коэффициент разветвленности (CH_3/CH_2) растет при уменьшении длины цепи н-алканов за счет их утилизации микроорганизмами. Для исходной нефти показатель разветвленности равен 1.086, в контроле увеличивается до 1.450, а в опыте – до 1.876 (Таблица 3).

Таблица 3 – Спектральные коэффициенты исходной и биодegradированной высоковязкой нефти Усинского месторождения

Объект	Спектральные коэффициенты		
	$C_1=D_{1610}/D_{720}$	$C_2=D_{750}/D_{720}$	CH_3/CH_2
Исходная нефть	0.180	0.532	1.086
Нефть после биодеструкции без подкормки	0.304	0.700	1.450
Нефть после биодеструкции+ подкормка(0.5 %-ный р-р ИХН-КА)	0.602	0.853	1.876

При биодеструкции высоковязкой нефти месторождения Тамсагбулаг в качестве стимулирующего азотистого субстрата также применяли 0.5 %-ный раствор композиции ИХН-КА. Численность микрофлоры при этом увеличивалась на 3 порядка – от 28 тыс клет до 37 млн клет/см³. ИК-спектры нефтей представлены на Рисунке 6.

ИК-спектр биодegradированной нефти по сравнению с исходной характеризуется появлением новых полос поглощения, которые отражают образование продуктов метаболизма в процессе биодеструкции (Рисунок 6). Область поглощения 1721 см⁻¹ указывает на присутствие карбонильной группы, входящей в состав альдегидов, кетонов и карбоновых кислот, 1608 см⁻¹ – на присутствие ароматических соединений, 1377-1380 см⁻¹ – метильных групп, 720 см⁻¹ – метиленовые групп [95]. Промежуточные продукты окисления н-алканов обладают поверхностно-активными свойствами в силу своего строения: кислородсодержащая группа выполняет роль полярной головки, не окисленная цепь н-алкана – липофильного хвоста.

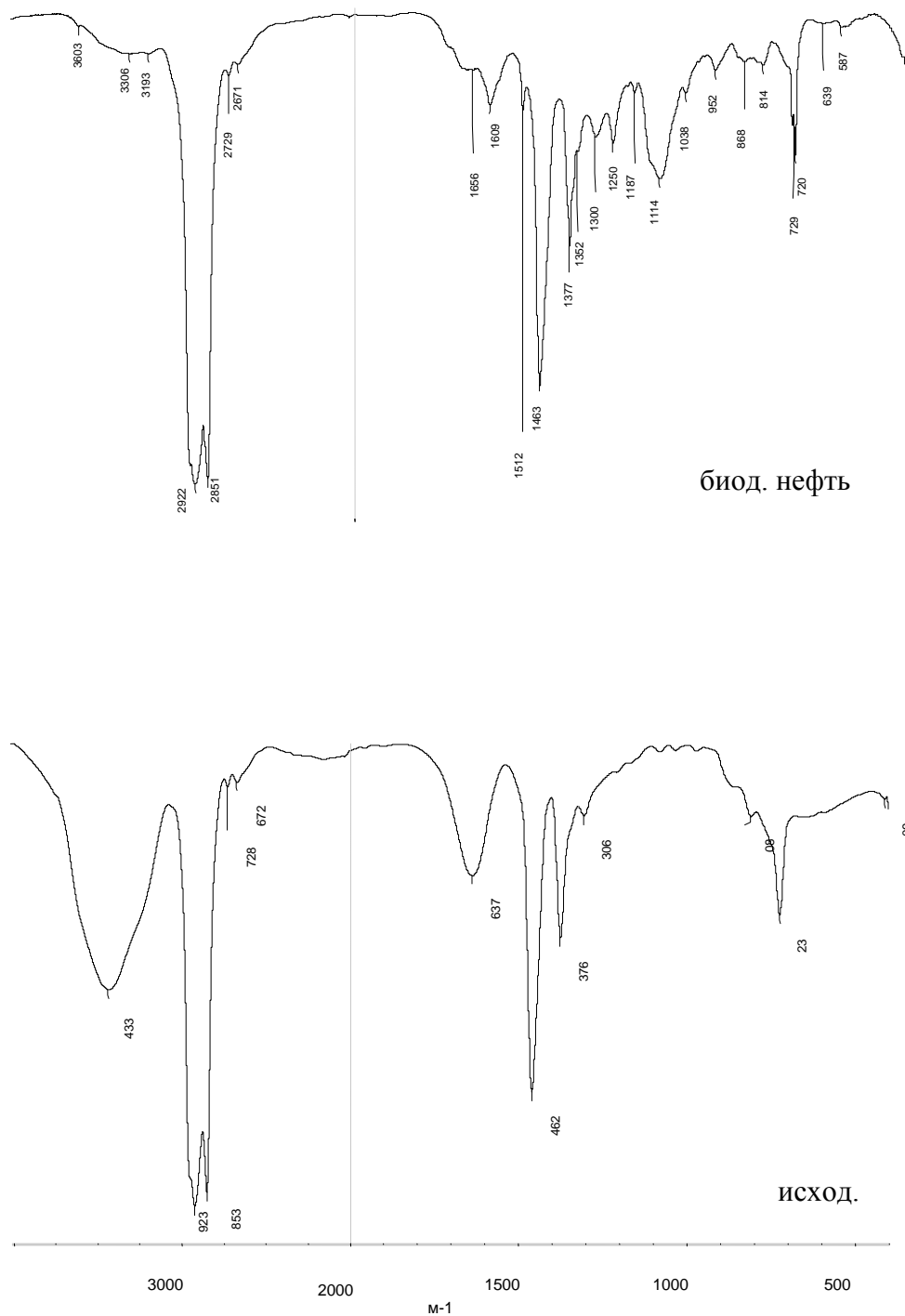


Рисунок 6 – ИК-спектры исходной и биодegradированной нефти
месторождения Тамсагбулаг

При биодеструкции нефти Тамсагбулаг увеличились коэффициенты ароматичности C_1 и C_2 , снизился коэффициент C_3 , что говорит об окислении н-алканов – снижении их доли по отношению к ароматическим УВ и увеличению коэффициента разветвленности (Таблица 4).

Таблица 4 – Спектральные коэффициенты нефти месторождения Тамсагбулаг до и после биодеструкции

Объект	Спектральные коэффициенты			CH ₃ /CH ₂
	$C_1=D_{1610}/D_{720}$	$C_2=D_{750}/D_{720}$	$C_3=D_{720}/D_{1380}$	
Исходная нефть	0.203	0.453	0.1409	1.173
Нефть после биодеструкции без подкормки	0.413	0.503	0.1241	1.422
Нефть после биодеструкции стимулированной микрофлорой	0.602	0.732	0.1015	1.676

Следовательно, нефтевытесняющая композиции ИХН-КА и НИНКА[®], содержащие карбамид и селитру, в концентрации до 10%, оказывают стимулирующее действие на численность и ферментативную активность пластовой микрофлоры, которая в процессах биодеструкции нефти накапливает продукты метаболизма, что способствует вытеснению нефти из пласта.

Глава 4. Микробиологический анализ источников уробактерий животного и растительного происхождения

Одной из задач данной работы был поиск природных источников уреазы и/или уробактерий, пригодных для внутрипластового ферментативного гидролиза карбамида в составе нефтевытесняющих композиций как основы комплексного метода повышения нефтеотдачи низкотемпературных пластов высоковязких нефтей.

Из литературных источников известно, что уреазу в природе вырабатывают микроорганизмы и некоторые виды растений. Соответствующие микроорганизмы (уробактерии) наиболее многочисленны в средах, обогащенных карбамидом (фекалиях, моче животных и человека и загрязненных ими объектах – воде, почве,

подстилке скота). Наиболее известные растительные продуценты уреазы – представители семейства бобовых (соя).

4.1 Уреазная активность соевой муки и препарата уреазы

В данной работе в качестве агентов гидролиза карбамида исследовали соевую муку и коммерческий ферментный препарат уреазу (Марка Б, Реахим, НПО «Биолар»), выделенную из соевых бобов.

Активность соевой муки и препарата уреазы исследовали при гидролизе карбамида в растворах нефтewытесняющей композиции с разными концентрациями (Таблица 5).

Таблица 5– Гидролиз карбамида в составе растворов нефтewытесняющей композиции соевой мукой и кристаллической уреазой

Концентрация растворов композиции, %	Содержание карбамида, г/дм ³	Время гидролиза, ч	Соевая мука		Препарат уреазы	
			концентрация, %	maxpH	концентрация, %	maxpH
50	325.0	6-24	1.0	8.1	0.1	7.7
		48-96	1.0	8.1	-	-
10	65.0	24	1.0	9.0	-	-
		48	0.5	9.0	0.001	7.1
		24	0.1	7.2	0.005	8.4
		24	-	-	0.01	8.8
		24	-	-	0.1	9.3
5.0	32.5	1-2	0.1	7.8	-	-
		24-96	0.1	8.3-8.8	-	-
		2.0	0.5	9.3	0.1	9.3
		2.0	1.0	9.3	0.01	9.2
		2.0	-	-	0.001	8.6
		2.0	-	-	0.005	8.7
0.5	3.25	24	0.01	9.1	-	-
		2.0	0.5	9.3	0.1	9.3
		2.0	1.0	9.3	0.01	9.2
		2.0	-	-	0.001	7.8
		2.0	-	-	0.005	8.8
0.1	0.65	2.0	1.0	9.0	0.1	9.1
		2.0	0.5	9.0	0.01	9.1
		24	1.0	9.0	-	-
		24	0.5	9.0	-	-

В 50 %-ном растворе композиции, содержащем 325.0 г/дм^3 карбамида, активность фермента ингибируется высокой концентрацией минеральных солей, возможно, разрушается структура белковых молекул фермента.

При разбавлении композиции в 5 раз концентрация карбамида снижается до 65 г/дм^3 , активность фермента возрастает, и гидролиз соевой мукой и уреазой в концентрации 1.0 и 0.1 % соответственно протекает с повышением рН до 9.0-9.3 за 24 часа. Снижение концентрации соевой муки до 0.5 % увеличивает время гидролиза до 48 часов с рН 9.0.

При разбавлении композиции в 10-500 раз и концентрации соевой муки – 0.5 %, а уреазы – 0.01 % создаются оптимальные условия для активности фермента: за 2 часа рН увеличивается от 6.5 до 9.0-9.3.

Из полученных данных следует, что большое значение для работы фермента имеет концентрация субстрата. При малых концентрациях субстрата и избытке фермента субстрат быстро расходуется и реакция прекращается. С увеличением концентрации субстрата при прочих равных условиях скорость гидролиза увеличивается и при определенном соотношении субстрата и фермента наступают оптимальные условия для течения реакции с накоплением продуктов разложения. На основании этого оптимальными соотношениями фермент/субстрат следует признать варианты с концентрацией композиции 0.5-10 % при добавлении 1 % соевой муки и 0.1 % препарата уреазы. Однако в промышленных условиях более технологично готовить меньший объем концентрированной композиции, поэтому оптимальной концентрацией композиции будет 10 % по сумме всех реагентов (что соответствует 65 г/дм^3 карбамида).

Видно, что в индивидуальном растворе с низкой концентрацией карбамида гидролиз его соевой мукой в концентрации 0.5 и 0.05 % проходил быстро: за две минуты рН раствора карбамида увеличился от 7.8 до 8.8. Через шесть минут значение рН увеличилось до 9.1-9.2 и оставалось постоянным до конца опыта. Положительные результаты достигнуты при проведении гидролиза в растворах с

соевой мукой с концентрацией 0.5 %, где за 120 минут значение рН увеличилось до 9.3. В остальных вариантах рН не превышал 9.0.

Следовательно, для создания буферной системы гидролиз карбамида в составе нефтewытесняющей композиции НИНКА возможно приводить с применением соевой муки в концентрации 0.5 % при температуре 25-30 °С.

4.2 Микробиологический анализ корнеплода свеклы с целью выявления и выделения уробактерий, участвующих в гидролизе карбамида

В работе были исследованы гидролиз карбамида разными частями корнеплодов свеклы столовой – свекольной кожурой, мякотью и сухим жмыхом после отжима свекольного сока, исследованы и выделены культуры уробактерий, населяющих свекольную кожуру.

В корнеплодах свеклы содержатся: сахароза (14-18 %), растворимые органические вещества (2.2 %), нерастворимые органические вещества (до 5 %) [100], биологически активные вещества и ферменты. Об образовании в свекле фермента уреазы данных в литературе не найдено. Известно лишь, что уреазной активностью обладают некоторые микроорганизмы, населяющие кожуру свеклы.

В одном грамме сырой массы кожуры свеклы содержится до $3 \cdot 10^9$ бактерий, при высушивании их число не снижается (Таблицаб).

Таблицаб – Численность микрофлоры и уреазная активность высушенного растительного сырья из разных частей корнеплода свеклы

Препарат	Уреазная активность, мг NH_4^+ на 1 г за 1 час	Численность микрофлоры, млрд клет/г
Кожура	5.94	4.0
Мякоть	5.12	4.8
Неочищенный корнеплод	8.2	5.5
Сок	3.0	4.23

На Рисунке 7 представлены колонии бактерий, выделенных из разных частей корнеплода свеклы.

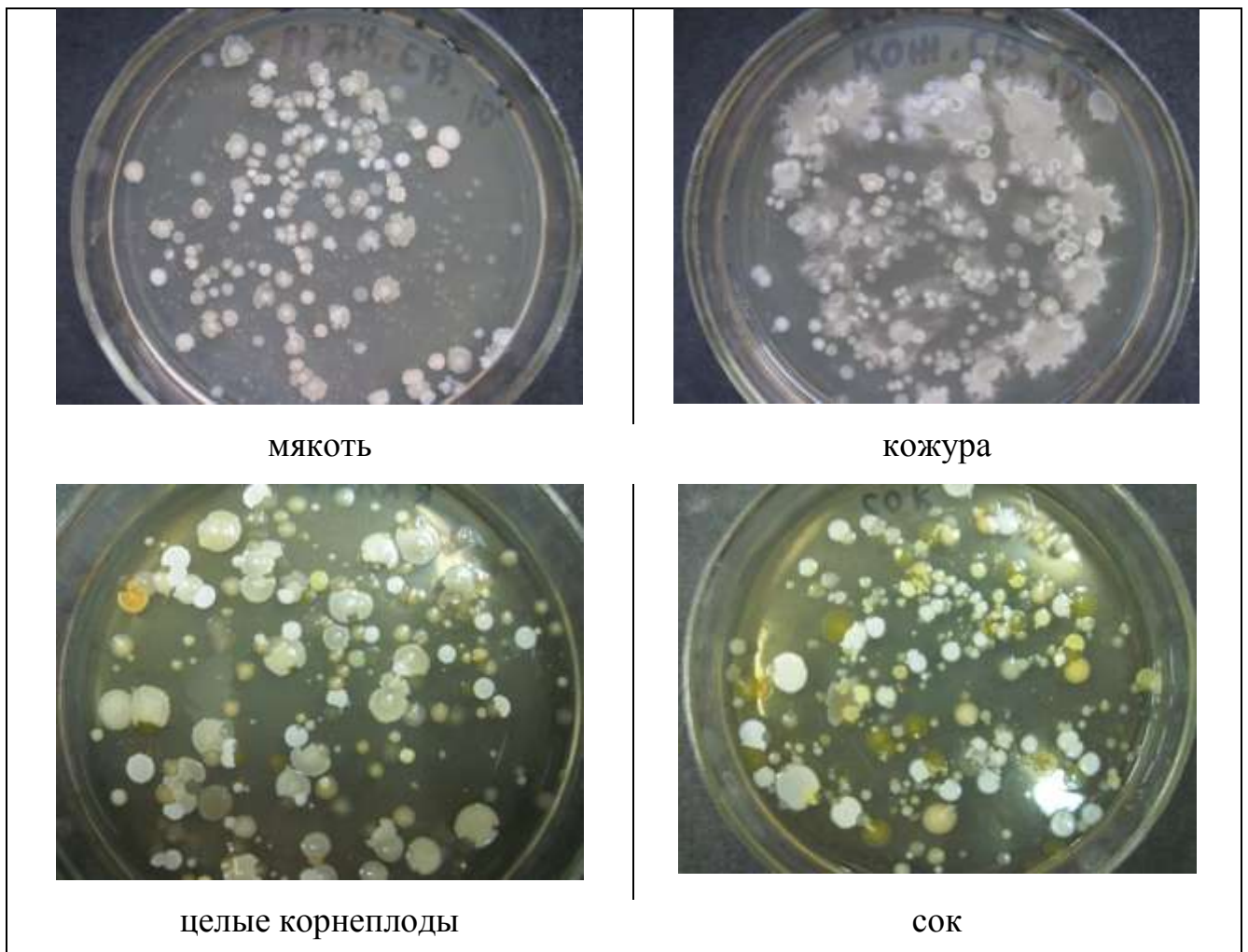


Рисунок 7 – Колонии бактерий из разных частей корнеплода свеклы

Из исследуемых образцов растительного сырья (сырая и сухая свекольная кожура, целые корнеплоды) после их инкубирования в селективных условиях (среда Лениса или растворы нефтевытесняющих композиций) выделяли наиболее активные штаммы уробактерий.

Филогенетическое положение и фенотипическая характеристика штаммов уробактерий, выделенных из свекольной массы

Штаммы уробактерий, выделенные из препаратов тканей свеклы, идентифицированы в Институте цитологии и генетики СО РАН. Выделено 5 штаммов бактерий, из которых 4 были отнесены к роду *Staphylococcus* и 1 – к роду *Klebsiella*.

Klebsiella sp. в нашем случае характеризовался одиночными клетками 1×3 мкм и соответствовал типовому описанию (Рисунок 8). Выделенные штаммы обладают бродильным и дыхательным типом метаболизма, катаболизируют углеводы с образованием кислоты и газа, каталазоположительные. Гидролизуют мочевины, восстанавливают нитраты. Встречаются в почве, воде, на фруктах и овощах, в фекалиях человека, на коже и слизистых дыхательных путей.

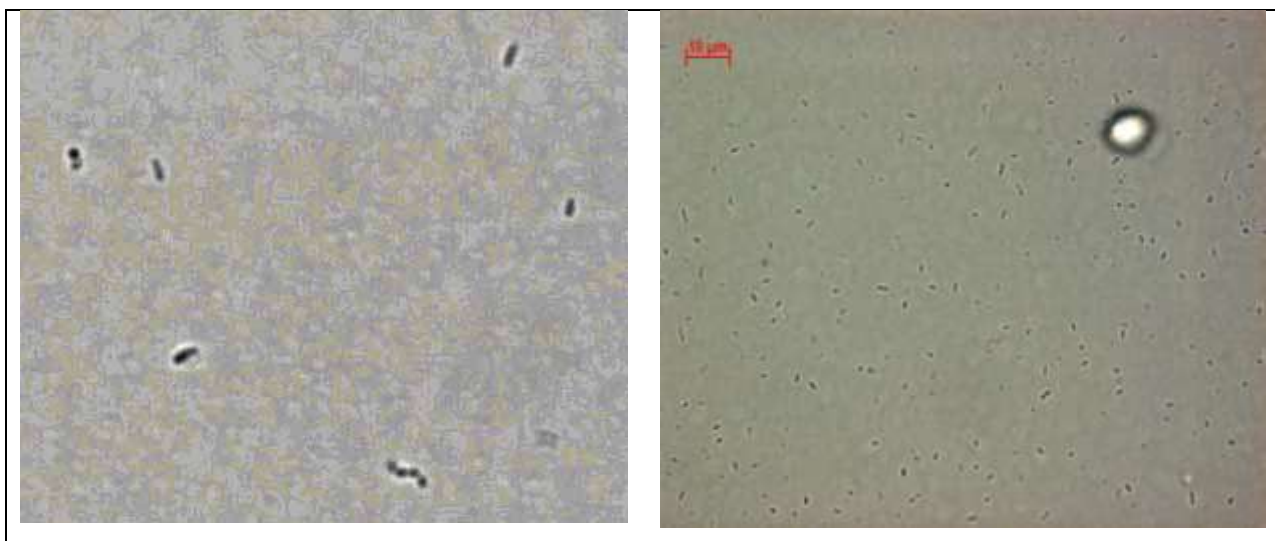


Рисунок 8 – Морфология клеток *Klebsiella sp.*

Штаммы *Staphylococcus sciuri* характеризовались сферическими клетками, диаметром 1.0 мкм, одиночными, по две или в группах неправильной формы (Рисунок 9).

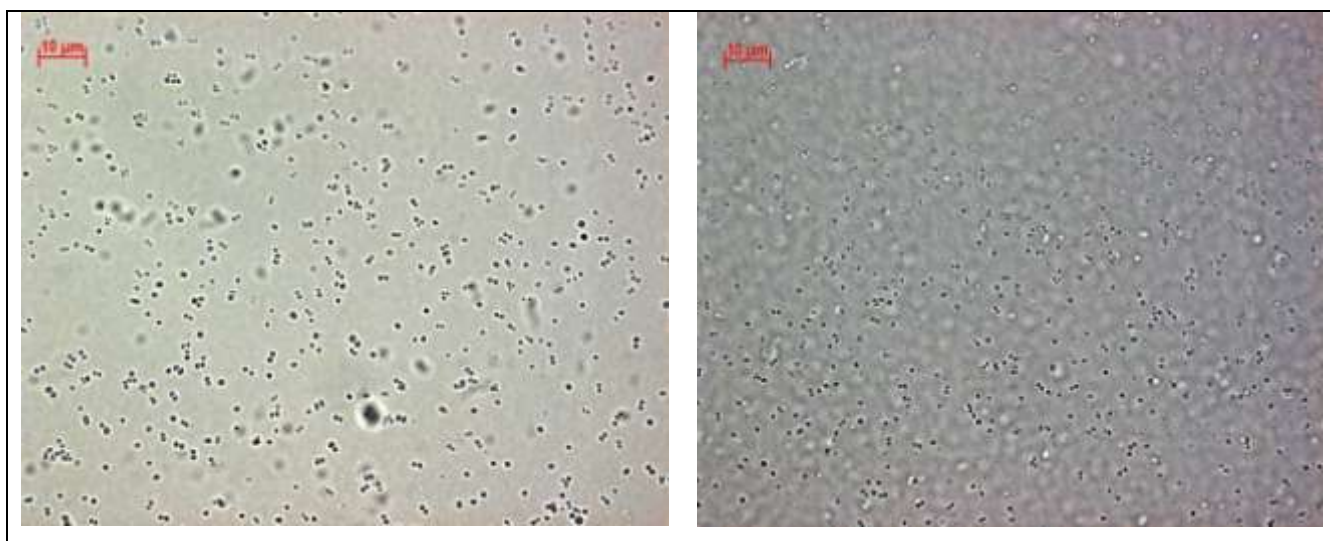


Рисунок 9 – Морфология клеток *Staphylococcus sciuri*

Штаммы *Staphylococcus succinus*, *Staphylococcus saprophyticus* характеризовались несколько более крупными клетками (до 2 мкм), чем

Staphylococcus sciuri (Рисунок 10). Ранее культуры *Staphylococcus succinus* и *Staphylococcus sciuri* выделяли из мочи здоровых людей.

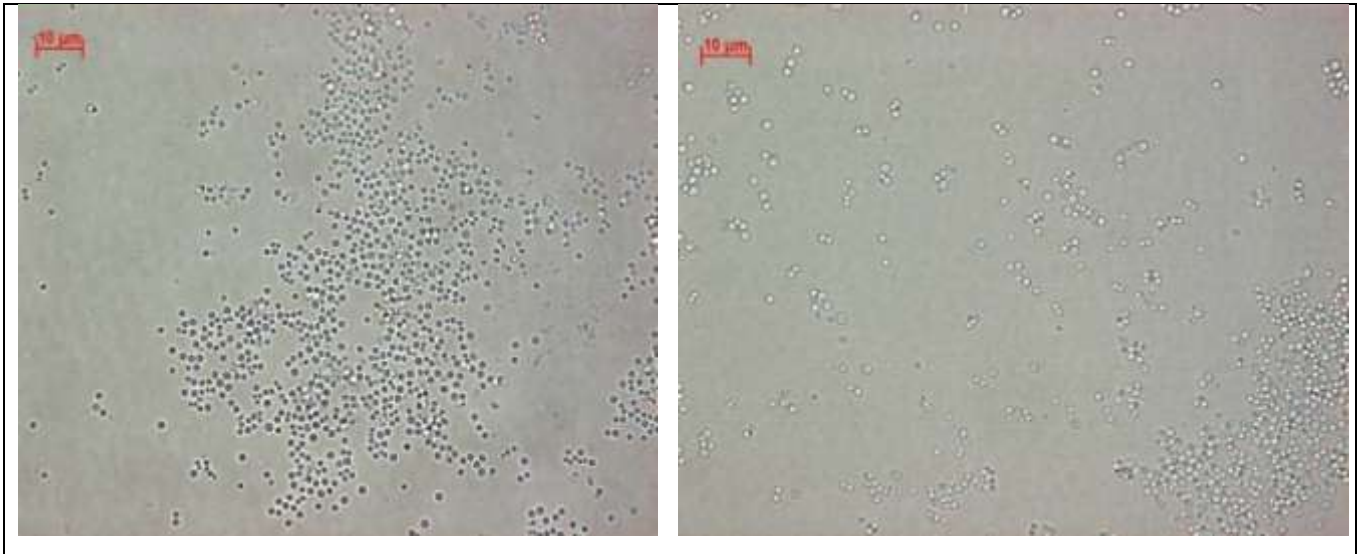


Рисунок 10 – Морфология клеток *Staphylococcus succinus*

На основе фенотипических данных и филогенетического анализа было описано 2 штамма, имеющих 99.7-100 % сходства со *Staphylococcus succinus* (100 %), 2 штамма – со *Staphylococcus sciuri* (100 %) и 1 штамм – с *Klebsiella* sp. (100 %). Полученная дендрограмма позволяет представить отношение исследованных штаммов друг к другу и к известным видам (Рисунок 11).

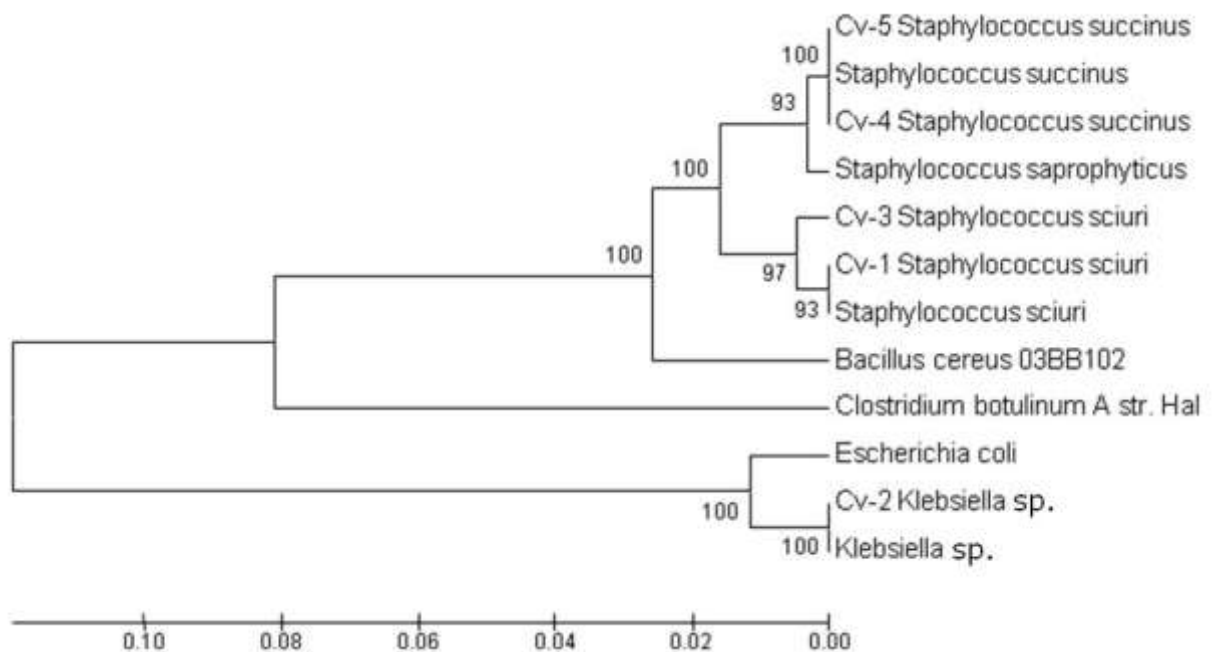


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево штаммов, выделенных из свеклы

Уреазная активность микрофлоры, обитающей в тканях свеклы

Активность уробактерий из тканей свеклы столовой изучена при гидролизе карбамида в его растворах с разными концентрациями и в составе композиции ИХН-КА. В качестве агентов гидролиза использовалась измельченная высушенная масса кожуры свеклы, а также чистая культура уробактерий.

Сухие свекольные препараты вводили в растворы композиции в соотношении 3 г на 100 см³ раствора, так как в больших дозах препараты при набухании затрудняют перемешивание. В 10 % растворе композиции все изучаемые образцы гидролизовали карбамид, повышая рН до 8.2-9.0, в разбавленном до 5 % растворе щелочная среда с рН 8.4 формировалась лишь под действием чистой культуры уробактерий, а препараты свеклы вызывали развитие бродильной микрофлоры с образованием кислых продуктов (Рисунок 12).

В концентрированной композиции (50 %) рН не менялся или менялся слабо, что говорит о подавлении деятельности микрофлоры высокой концентрацией карбамида и нитрата аммония. В растворе с 25 % концентрацией гидролиз начался под влиянием препаратов из свекольной кожуры и мякоти: за 15 суток опыта рН поднялся до 7.3-7.6, но вид кривой изменения рН показывает, что процесс не завершился, и, возможно, при более длительных сроках экспозиции, достигнет щелочных значений (до 8.5-9.5 ед.) (Рисунок 12).

Исследованы закономерности гидролиза карбамида чистой культурой уробактерий, выделенных из свекольной кожуры, в его индивидуальных растворах с концентрациями 28.6, 14.3, 5.72, 2.86 % (Рисунок 13).

В процессе гидролиза карбамида в физиологическом растворе чистыми культурами положительный результат получен при концентрации карбамида 2.86 %. В этом случае гидролиз проходил с одновременным увеличением численности бактерий и рН среды. Во всех остальных вариантах жизнеспособность уробактерий угнеталась (Рисунок 13).

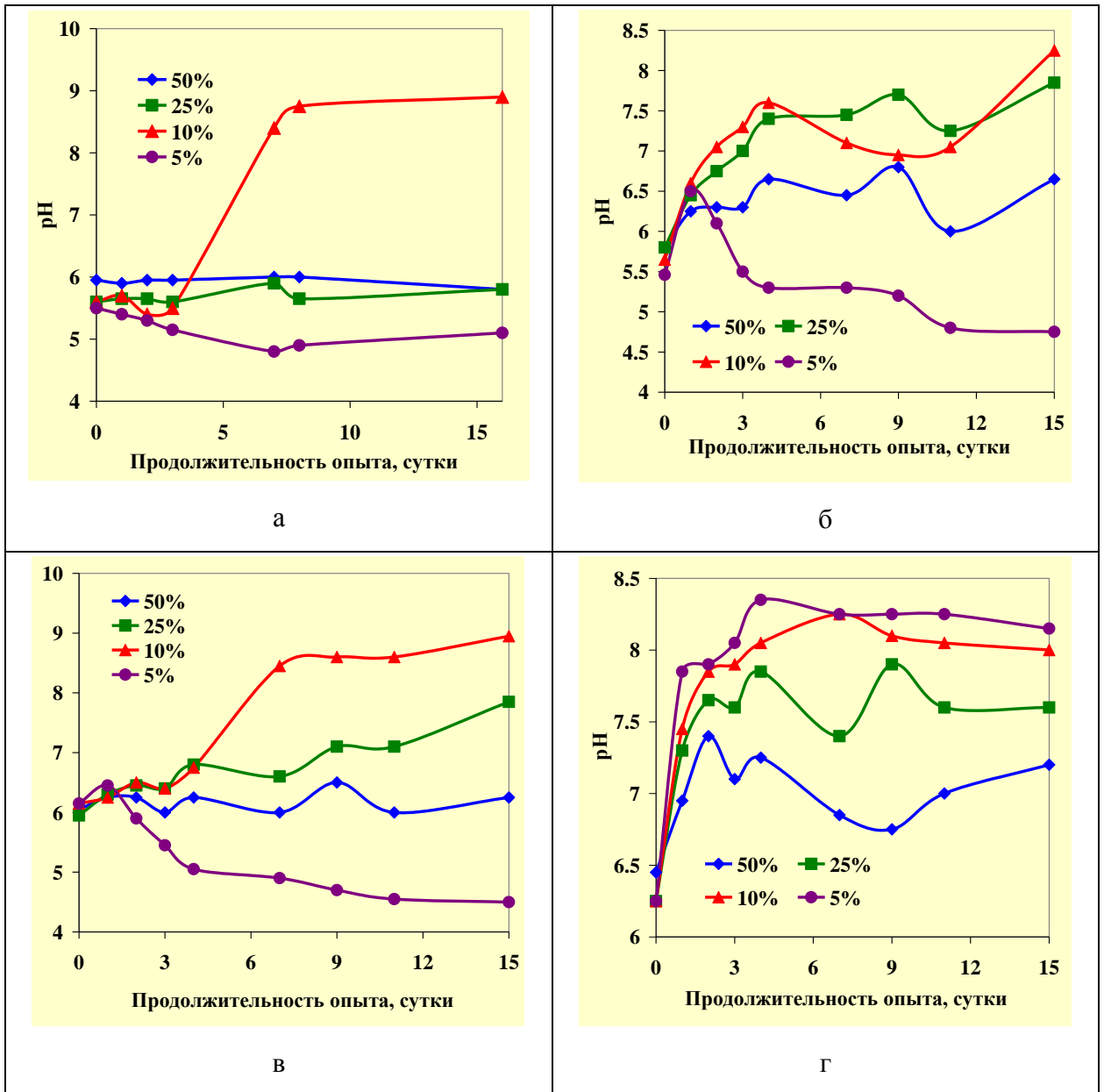


Рисунок 12 – Гидролиз карбамида в составе ИХН-КА уробактериями из:

а) свекольного жмыха; б) свекольной кожуры; в) свекольной мякоти;

г) чистой культуры

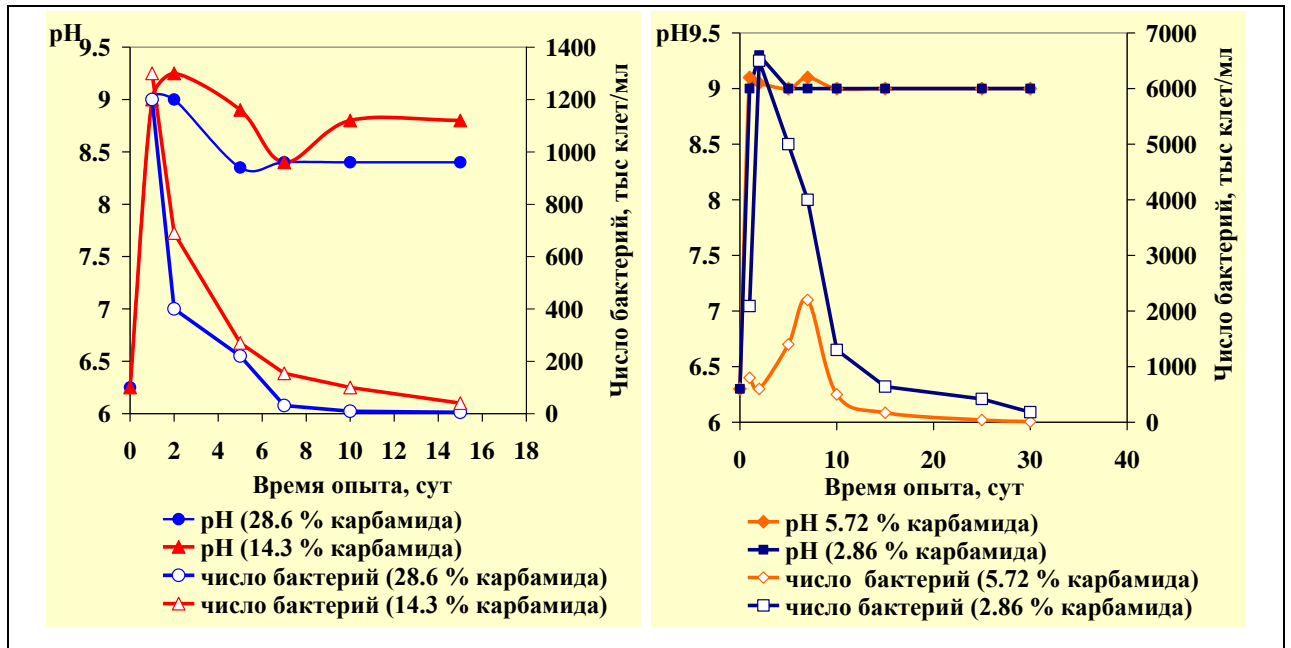


Рисунок 13– Изменение рН и численности чистой культуры уробактерий при гидролизе карбамида в физиологическом растворе

Также исследовали гидролиз карбамида в физиологическом растворе в тех же концентрациях в присутствии 3 % сухой массы кожуры свеклы (Рисунок 14).

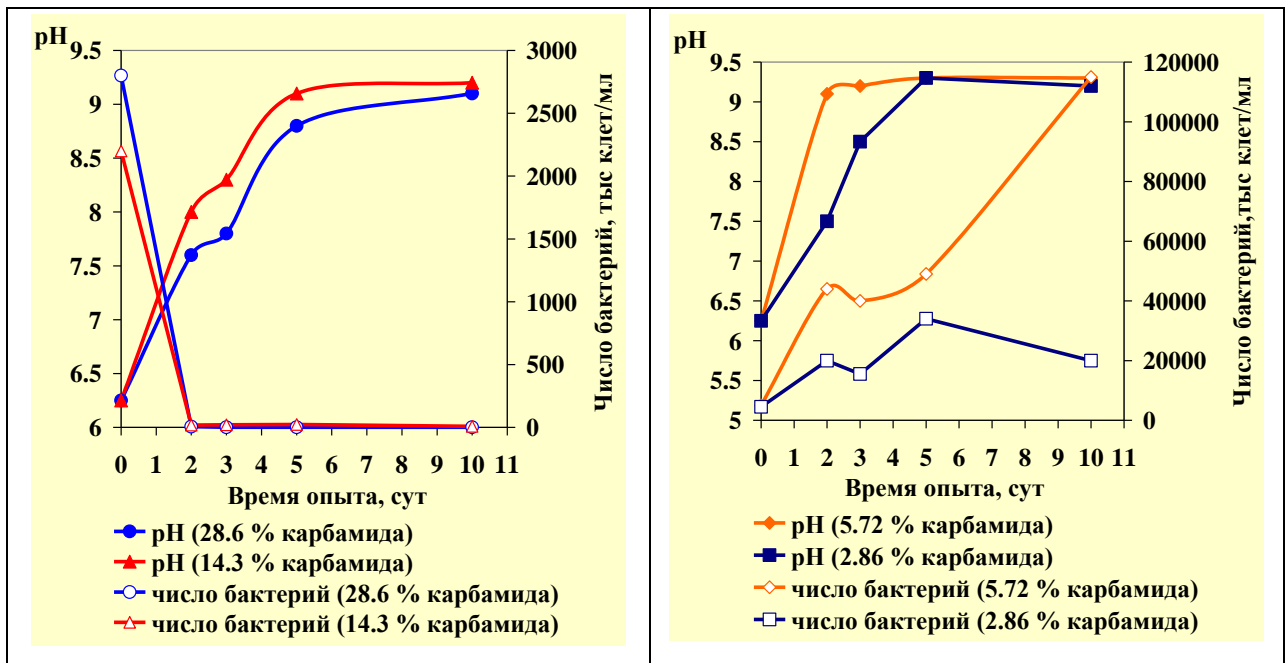


Рисунок 14 – Изменение рН и численности бактерий из сухой массы свекольной кожуры при гидролизе карбамида в физиологическом растворе

Во всех вариантах опыта величина рН на 5-10-е сутки достигала 9.2-9.3, но активный рост уробактерий наблюдался лишь при концентрации карбамида

5.72 % . Следовательно, концентрация карбамида 5.72 % (что соответствует 10 % концентрации композиции) является оптимальной для активного гидролиза с формированием щелочной среды (рН 9.0-9.3) как чистыми культурами уробактерий, так и в составе сухой массы кожуры свеклы.

4.3 Активность уробактерий из отходов жизнедеятельности животных

Наиболее многочисленны уробактерии в таких субстратах, как отходы жизнедеятельности человека и животных, в силу селективных условий.

В данной работе были исследованы численность и активность уробактерий в помете домашних животных (коровы, овцы, лошади). Показано, что обсемененность уробактериями навоза копытных животных варьирует в пределах 1.7-3.2 млрд клет/г сухого образца. Морфология колоний уробактерий представлена на Рисунке 15.

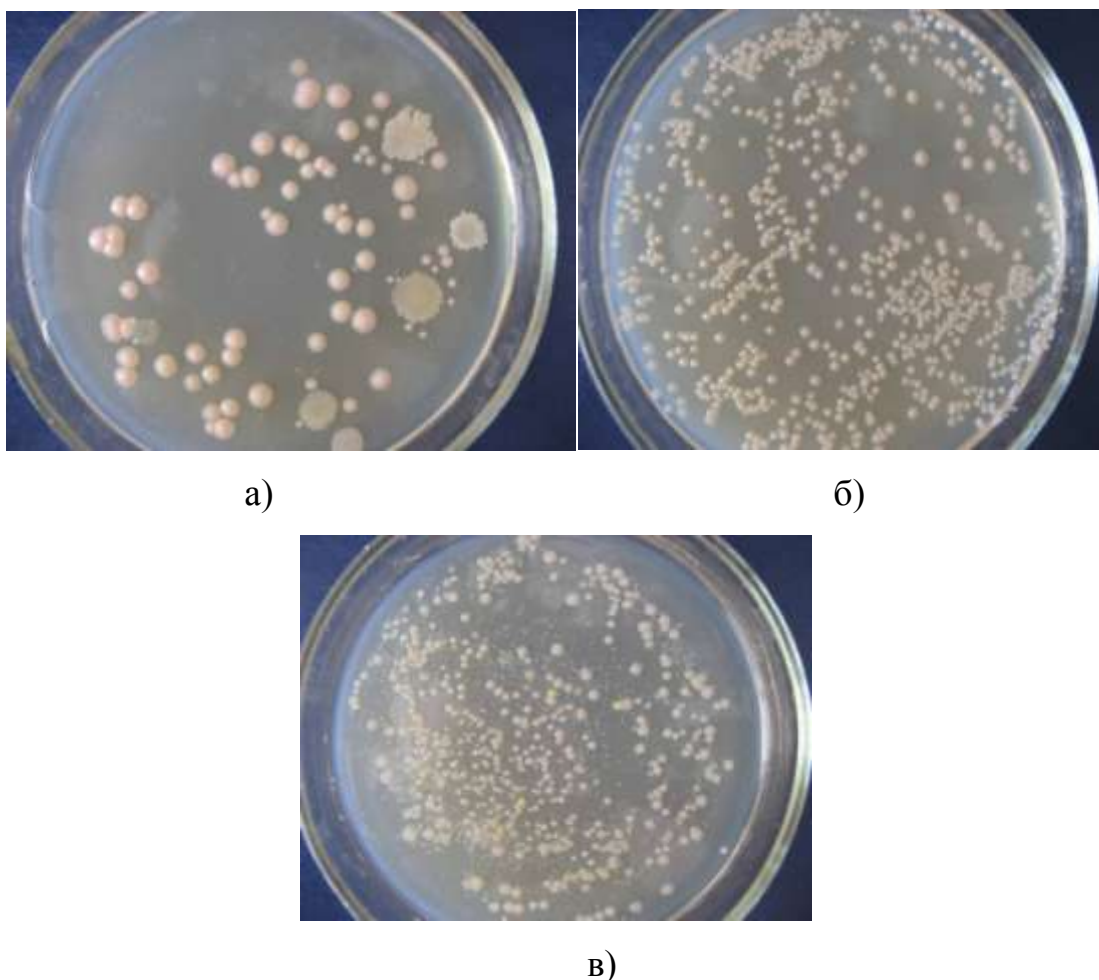


Рисунок 15 – Уробактерии из отходов жизнедеятельности домашнего скота: а) овцы; б) лошади; в) коровы

Филогенетическое положение и фенотипическая характеристика штаммов уробактерий, выделенных из помета домашнего скота

Штаммы уробактерий, выделенные из навоза животных на накопительной среде для уробактерий, идентифицированы в Институте цитологии и генетики СО РАН. Выделено 5 штаммов бактерий, принадлежащих к роду *Bacillus*, имеющих близкое родство к штаммам *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus altitudinis* и *Lysinibacillus sphaericus* (Рисунок 16).

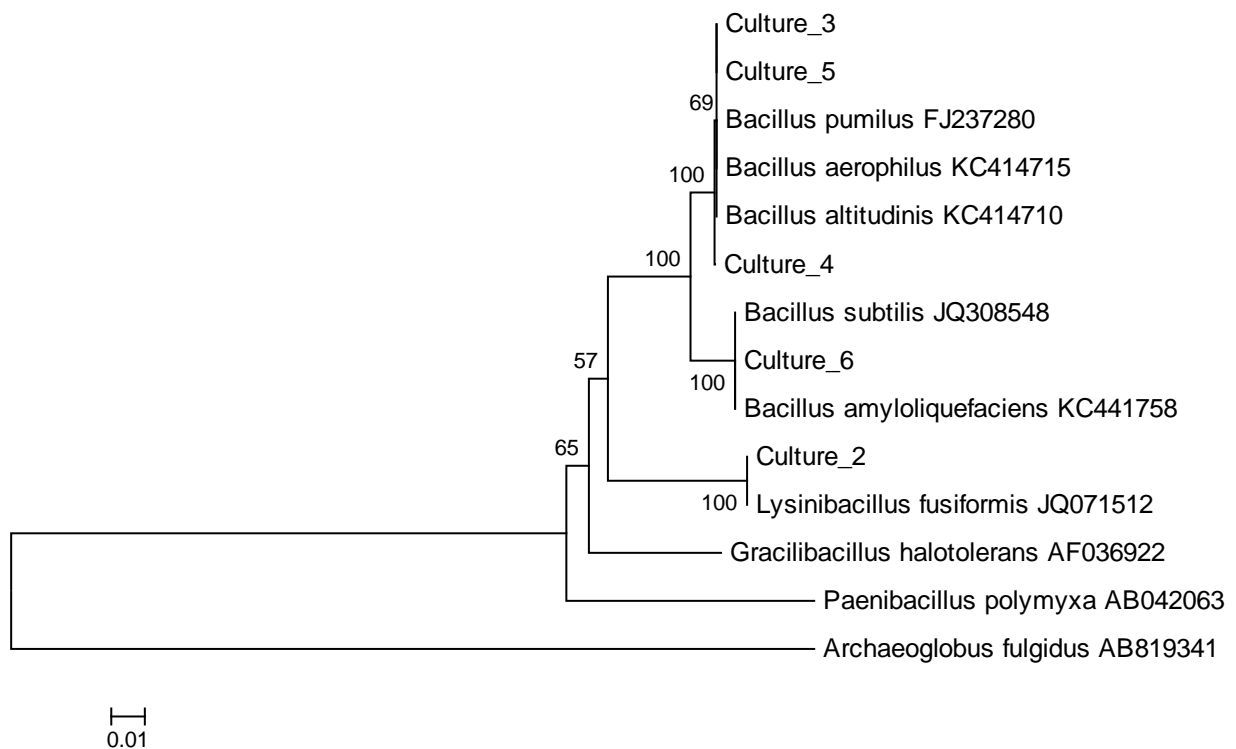


Рисунок 16 – Филогенетическое дерево обладающих уреазной активностью штаммов, выделенных из помета копытных животных

Вид *Bacillus amyloliquefaciens* - грамположительные аэробные почвенные бактерии. Вид тесно связан с *Bacillus subtilis*, не патогенный, стимулирует восстановление микробиоценоза почвы и желудочно-кишечного тракта животных и человека, обладает антибактериальной и фунгицидной активностью и гидролизует мочевины. На мясопептонном агаре культура имеет непрозрачные колонии кремового цвета, с ровным краем. Клетки палочковидные, образуют эндоспores, длина клетки - 2,0-3,8 мкм, ширина - 0,5-1,0 мкм.

Вид *Bacillus pumilus*– грамположительные, аэробные спорообразующие бациллы, обычно встречаются в почве и ризосфере растений, обладают фунгицидной активностью, имеют большое значение для успешного хранения сена. Гидролизует мочевины. На мясопептонном агаре культура имеет непрозрачные зернистые колонии с выступающим плотным центром с неровным краем. Цвет колоний от кремового до розового. Клетки - крупные палочки, иногда соединенные в цепочки, образуют споры эллипсоидной или цилиндрической формы.

Bacillus aerophilus –грамположительные, аэробные спорообразующие бациллы, впервые были выделены из криогенных труб, используемых для сбора проб воздуха с больших высоты. На мясопептонном агаре культура имеет белые, неправильной формы колонии 5-8 мм в диаметре с выпуклым кратером в центре.

Bacillus altitudinis – грамположительные, аэробные спорообразующие бациллы, впервые были также выделены из криогенных труб, используемых для сбора проб воздуха с больших высот, кроме того, позже выделялись из почвы скотобойни, желудочно-кишечного тракта рыбы, ила и ризосферы растений.

Lysinibacillus sphaericus– грамположительные, палочковидные бактерии, образуют эндоспоры. Естественные обитатели почвы, патогены для некоторых насекомых, что используются как основа биологического метода борьбы с личинками кровососущих насекомых. Алкалофилы.

В данной работе использовали микрофлору, обитающую в помете животных, для гидролиза карбамида и генерирования буферной системы нефтевытесняющих композиций. В частности, были исследованы условия максимального накопления численности уробактерий при их культивировании в водной вытяжке из отходов жизнедеятельности лошади. Варьировали дозу, время перемешивания и добавление ПАВ для десорбции микробных клеток с механических частиц помета.

Показано, что число микроорганизмов в водной фазе напрямую зависит от концентрации исходного сырья и времени перемешивания, а добавление ПАВ способствует десорбции клеток с механических частиц субстрата, увеличивая их

численность в жидкой фазе в 1.5-2 раза. Максимальная численность бактериальных клеток определена при концентрации помета – 15 % и времени перемешивания – 120 мин (Таблица 7).

За 10 суток хранения нефильтрованного экстракта число микробных клеток во всех вариантах опыта уменьшилось почти вдвое. К 30-ым суткам численность микроорганизмов не превышала 18 млн клет/мл, величина рН – 8.3. Исходное значение рН раствора помета в воде – 7.4. (Таблица 7)

Таблица 7 – Выделение и рост уробактерий из конского помета

Концентрация помета, %	Значение рН			Число клеток уробактерий, млн /мл		
	1 сут	10 сут	30 сут	1 сут	10 сут	30 сут
<i>Время перемешивания 30 минут</i>						
5	7.7	7.9		200	120	6
10	7.7	8.0	8.2	250	140	8
15	7.8	8.0		360	185	9.5
<i>Время перемешивания 60 минут</i>						
5	8.0	8.2		420	220	11
10	7.9	8.1	8.2	480	240	14
15	8.1	8.2		520	360	15
<i>Время перемешивания 120 минут</i>						
5	8.0	8.2		730	300	15
10	7.7	8.3	8.3	800	420	16
15	8.0	8.3		840	485	18

При экстракции уробактерий 0.5 %-ным раствором ПАВ незначительно увеличивался рН и численность микрофлоры была выше в 1.5-2 раза на протяжении всего опыта (Таблица 8).

Значительное снижение численности уробактерий на 30-ые сутки связано с отсутствием питательных субстратов в растворе. Невысокие значения рН обусловлены ограниченным количеством карбамида в помете.

Таблица 8 – Экстракция уробактерий из конского помета 0.5 %-ным раствором ПАВ

Концентрация помета, %	Значение рН			Число клеток уробактерий, млн /мл		
	1 сут	10 сут	30 сут	1 сут	10 сут	30 сут
<i>Время перемешивания 30 минут</i>						
5	7.8		8.1	400	260	10.0
10	7.9	8.0	8.2	510	280	12.9
15	7.9		8.2	560	380	11.0
<i>Время перемешивания 60 минут</i>						
5	7.9		8.0	520	350	13.7
10	7.9	8.0	8.2	610	400	16.0
15	7.9		8.2	650	435	17.5
<i>Время перемешивания 120 минут</i>						
5	7.9		8.2	700	480	18.6
10	7.9	8.0	8.3	800	550	20.0
15	7.9		8.2	880	620	22.3

Гидролиз карбамида уробактериями из отходов жизнедеятельности домашних животных

Уреазную активность отобранных проб определяли по способности гидролизовать карбамид. Гидролиз карбамида контролировали по увеличению рН среды. В среде с рН 9-10 выживают, в основном, бактерии уреазной группы. Для получения накопительной культуры уробактерий применяли жидкую селективную питательную среду Лениса и растворы нефтewытесняющих композиций НИНКА и ИХН-КА в разных концентрациях. В пробирки с питательной средой вносили навеску проб отходов жизнедеятельности домашних животных, и пробирки помещали в термостат при 30 °С. Численность микроорганизмов определяли методом посева на агаризованную среду Лениса.

В результате за 6 суток рН среды повышается до 10, при котором бактерии уреазной группы сохраняют способность расти. Их численность на 6-ые сутки культивирования определялась в интервале от 50 до 95 млн клеток/см³ (Таблица 9).

Таблица 9 – Гидролиз карбамида уробактериями из отходов жизнедеятельности домашнего скота

Отходы жизнедеятельности	Концентрация раствора карбамида, %	Изменение рН, время опыта, сут						Число уробактерий, млн клеток/см ³
		исх.	2 часа	1	2	5	6	
коровы	6	6.5	8.5	9.2	9.4	9.8	10.0	50
	3	6.5	10.0	9.2	9.7	10.0	10.0	90
овцы	6	6.5	8.1	9.0	9.4	9.8	10.0	78
	3	6.5	9.0	9.5	9.7	10.0	10.0	80
лошади	6	6.5	8.1	9.2	9.6	9.9	10.0	95
	3	6.5	7.9	9.0	9.0	10.0	10.0	93

Рост других бактерий из-за высокого значения рН угнетается. Как следует из Таблицы 9, величина рН увеличивается уже через 2 часа после начала опыта, так как в отходах жизнедеятельности уже имеется фермент уреазы. Изменение рН и динамика роста уреазной культуры, выделенной из отходов жизнедеятельности коровы, лошади и овцы, представлены на Рисунке 17.

Гидролиз проводили сухими отходами жизнедеятельности домашних животных. Наибольшая численность уробактерий отмечена для культуры, выделенной из помета коровы (Рисунок 17). Максимальная величина рН, равная 9.4, была отмечена для уробактерий, выделенных из отходов жизнедеятельности коровы и лошади.

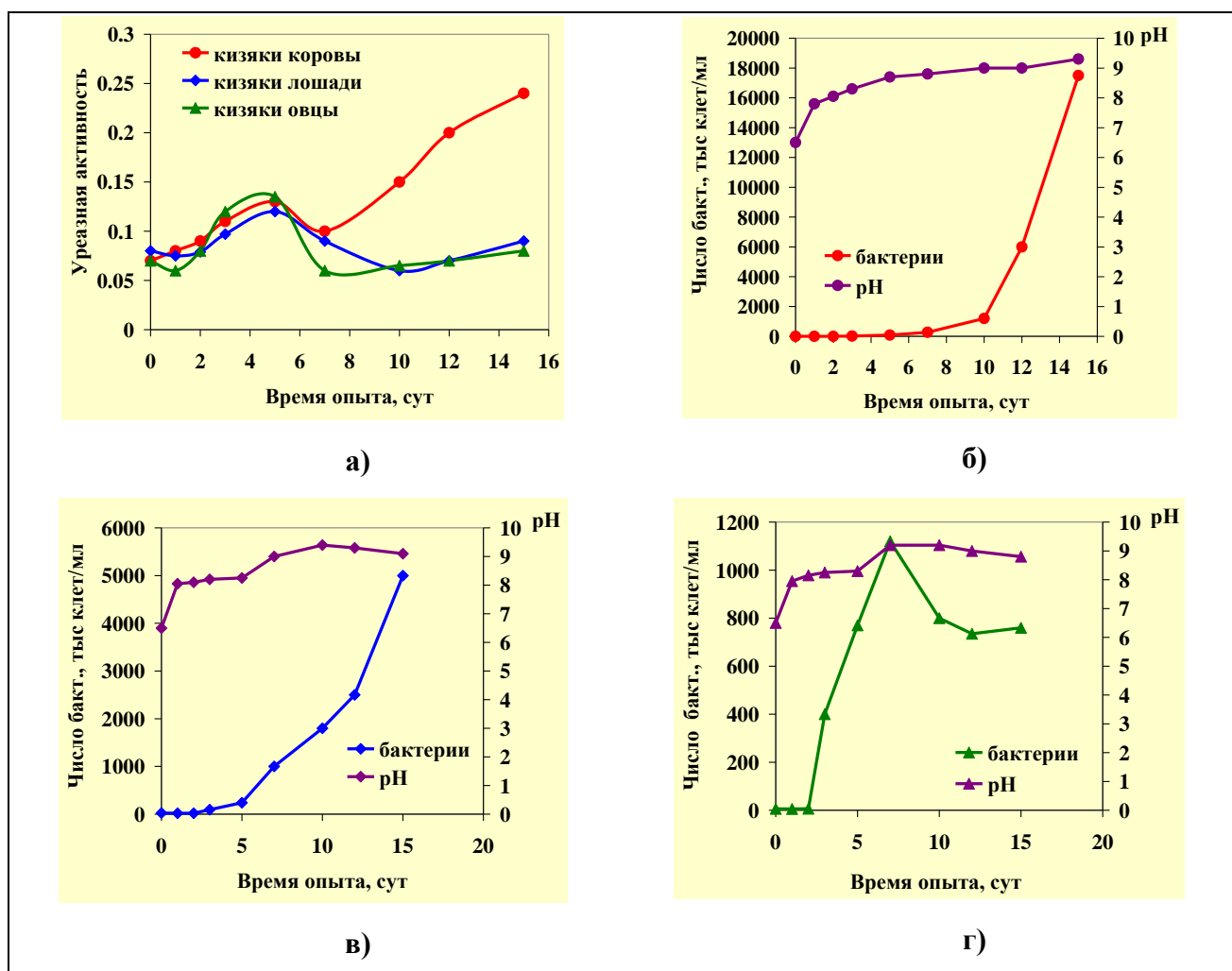


Рисунок 17 – Уреазная активность уробактерий, мг NH₄⁺ на 1 см³ культуральной жидкости за 1 ч (а); изменение рН и динамика роста уробактерий, выделенных из отходов жизнедеятельности: коровы (б), лошади (в) и овцы (г) в процессе в гидролиза 6 % раствора карбамида

Увеличение активности фермента уреазы от 0.07 до 0.24 мг NH₄⁺ на 1 см³ отмечено на 15-ые сутки для культуры, выделенной из отходов жизнедеятельности коровы, что соответствует максимальному накоплению биомассы бактерий до 17.5 млн клет/см³ (Рисунок 17).

Таким образом, высушенные отходы жизнедеятельности домашних животных, в частности, лошади, проявляют высокую уреазную активность в процессах гидролиза карбамида с выделением CO₂, снижающего вязкость нефти, и NH₃, повышающего рН и моющие свойства композиции, что способствует вытеснению вязкой нефти из пласта. Их можно использовать как доступный

источник, позволяющий в дальнейшем проводить наработку опытных партий биопрепарата, имеющего высокую уреазную активность.

4.4 Исследование газовой фракции при гидролизе карбамида уреазой из природных источников

Для подтверждения образования CO_2 в процессах гидролиза карбамида уреазой из природных источников провели исследование газовой фракции при гидролизе уробактериями карбамида в составе 10.0 %-ного раствора композиции. Хроматографический анализ газообразных продуктов гидролиза карбамида показал повышение концентрации углекислого газа и азота, что свидетельствует о процессах гидролиза (Таблица 10).

Таблица 10 – Хроматографический анализ газообразных продуктов ферментативного гидролиза карбамида

Источник уреазы	Параметры на 20 сутки гидролиза			
	pH	число, м/о	CO_2 , % об	O_2 , % об
Соевая мука	8.83	$8.0 \cdot 10^6$	0.78	6.28
ОЖДЖ*	9.3	$13.8 \cdot 10^3$	1.07	10.87
Кожура свеклы	9.0	$10.6 \cdot 10^3$	2.36	7.69
Контроль, р-р 10% НИНКИ	7.1	0	0.77	18.2
Контроль, воздух			0.49	21.51

ОЖДЖ* - отходы жизнедеятельности домашних животных

В случае контроля, соевой муки и отходов жизнедеятельности животных концентрация CO_2 над культуральной жидкостью возрастает в два раза, при использовании кожуры свеклы – в 5 раз, при этом pH увеличивается до 9.0.

Таким образом, отходы жизнедеятельности домашних животных, кожуру свеклы и соевую муку можно использовать как доступный источник, позволяющий в дальнейшем проводить наработку опытных партий биопрепарата, имеющего высокую уреазную активность.

4.5 Влияние продуктов гидролиза карбамида на изменения реологических свойств нефтей

Изменение реологических свойств нефтей под влиянием уреазы/уробактерий и композиции НИНКА[®] после их совместной экспозиции в герметичных ячейках при заданной температуре отражено в Таблице 11.

Таблица 11 – Влияние уреазы/уробактерий и композиции НИНКА[®] на физико-химические свойства высоковязких нефтей после их совместной экспозиции

Исследуемые параметры	Нефть месторождений	Исходные значения	10% р-р комп-ции НИНКА контроль	После экспозиции с уреазой/уробактериями из:	
				кожуры свеклы	отходы жизн-ти КРС
Плотность, кг/м ³ при 20 °С	Тамсагбулаг	0.847	0.847	0.849	0.845
	Усинское	0.965	0.963	0.965	0.955
Вязкость, мПа.с при 20 °С	Тамсагбулаг	2180	1640	2135	1490
	Усинское	12800	7260	7190	6090
рН водной фазы	Тамсагбулаг	6.3	7.5	7.7	9.0
	Усинское	6.3	7.2	7.4	9.2

Анализ приведенных данных свидетельствует, что плотность исследуемых нефтей при разных воздействиях практически не меняется. Независимо от химической природы нефти наблюдается снижение вязкости, определяемое методом вибрационной вискозиметрии. Так, вязкость нефтей месторождений Тамсагбулаг и Усинское в контрольном варианте снизилась на 24.0 и 43.2 %, соответственно (Таблица 11). Это может быть связано с тем, что составляющие раствора композиции НИНКА[®] являются питательными веществами для аборигенной микрофлоры, промежуточные продукты окисления которых проявляют поверхностно-активные свойства, при этом выделяется СО₂. После термостатирования с композицией НИНКА[®] и отходами жизнедеятельности КРС вязкость нефти месторождений Тамсагбулаг снизилась на 31.0 %, а нефти

месторождения Усинское – на 52.4 %. При этом $\rho_{\text{Нув}}$ увеличилось до 9.0- 9.2. Следует отметить, что при добавлении кожуры свеклы реакция гидролиза прошла только для нефти месторождения Усинское, при этом вязкость снизилась на 43.8 %. (Таблица 11)

На Рисунке 18 представлены результаты исследования влияния продуктов ферментативного гидролиза карбамида в составе нефтewытесняющей композиции на реологические характеристики высоковязких нефтей, полученные методом ротационной вискозиметрии при 30 °С.

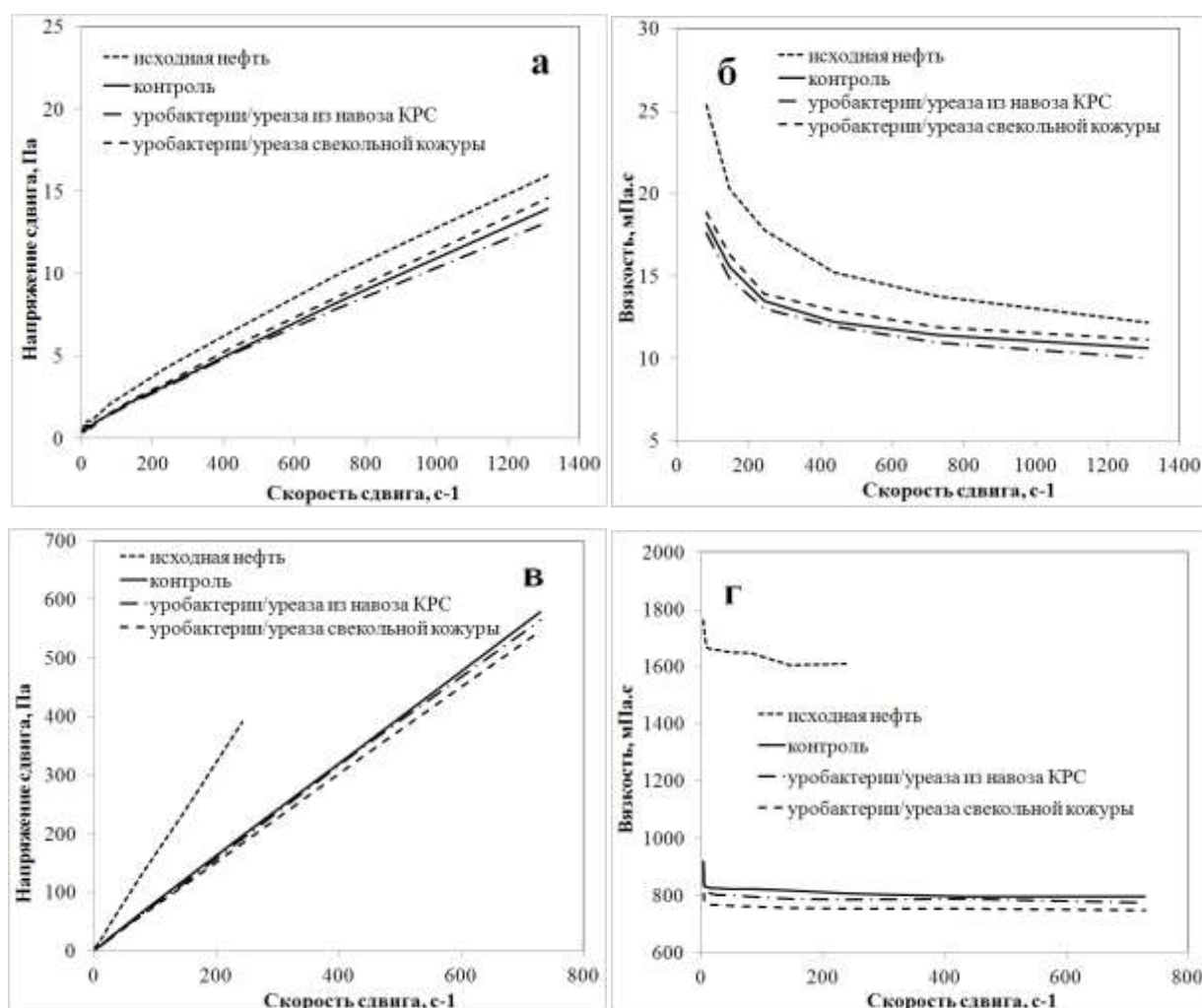


Рисунок 18 – Изменение вязкости и напряжения сдвига нефтей месторождений Тамсагбулаг (а, б) и Усинское (в, г) после их экспозиции с 10 %-ным раствором композиции НИИКА[®] и уробактериями/уреазой из разных источников.

Контроль – 10 % ный раствор НИИКА[®] без уробактерий

При различных скоростях сдвига получены реологические кривые течения нефтей, определены значения вязкостей. Исследуемая высокосмолистая нефть Усинского месторождения представляет собой коллоидно-дисперсную систему со слабо выраженными неньютоновскими свойствами, которые ослабевают после контакта с композицией. При этом характер реологического поведения нефти (псевдопластический) существенно не изменяется. Высокопарафинистая нефть месторождения Тамсагбулаг представляет собой коллоидно-дисперсную систему с заметно выраженными неньютоновскими свойствами, которые ослабевают после контакта с композицией при увеличении температуры выше 30 °С и скорости сдвига выше 100 с⁻¹.

Кроме того, после контакта высокопарафинистой нефти месторождения Тамсагбулаг с уробактериями и композицией НИНКА® в ней снижается температура начала кристаллизации парафинов: с 19.2 °С для исходной нефти до 17.2 °С под влиянием композиции и до 16 °С под влиянием продуктов ферментативного гидролиза карбамида в композиции.

Таким образом, соевая мука, кожура свеклы и отходы жизнедеятельности домашних животных проявляют высокую уреазную активность в процессах гидролиза карбамида с выделением СО₂, снижающего вязкость нефти, и NH₃, повышающего рН и моющие свойства композиции, что способствует дополнительному вытеснению высоковязкой нефти из пласта.

Глава 5. Физическое моделирование вытеснения высоковязких нефтей комплексным микробиологическим и физико-химическим методом

О конечной эффективности разрабатываемого метода можно судить по результатам физического моделирования вытеснения высоковязких нефтей из моделей пласта. Были проведены исследования нефтевытесняющей способности композиции НИНКА® при ферментативном гидролизе карбамида уробактериями и/или ферментом уреазой в составе корнеплодов свеклы, соевой муки, отходов жизнедеятельности домашних животных. Моделировали низкотемпературные условия месторождений Цагаан - Элс (Монголия) и Усинское (Россия), вязкость

нефтей которых обусловлена высоким содержанием парафинов и смолисто-асфальтеновых веществ соответственно (Таблица 1).

5.1 Нефтевытеснение композицией ПАВ и ферментом из отходов жизнедеятельности домашних животных, катализирующим в ней гидролиз карбамида.

Довытеснение остаточной нефти из контрольных моделей проводили 10 %-ным раствором композиции НИНКА[®], из опытных – раствором композиции с добавлением 0.2 % водной вытяжки из отходов жизнедеятельности лошади, содержащих активную группу уробактерий (Таблица12, Таблицы 1, 2 Приложения 1).

Таблица 12 – Параметры вытеснения высоковязких нефтей месторождений Усинское и Цагаан-Элс 10 %-ным раствором композиции НИНКА[®] при гидролизе карбамида уреазой/уробактериями из отходов жизнедеятельности лошади.

Параметры вытеснения	Нефть месторождения Цагаан-Элс (модель 1)		Нефть месторождения Усинское (модель 2)	
	10 % НИНКА [®] (контр.)	10 % НИНКА [®] + 0.2 % экстракт ОЖДЖ*	10 % НИНКА [®] (контр.)	10 % НИНКА [®] + 0.2 % экстракт ОЖДЖ*
Исходная нефтенасыщенность, %	19.0	18.2	19.1	20.6
Проницаемость по газу, D	8.3	8.5	10.2	10.0
Коэффициент нефтевытеснения (K _в), %	42.1	52.9	59.1	50.0
<i>Доотмыв нефти водой после обработки композицией</i>				
Объем довытесненной нефти, см ³	5.63	10.6	7.25	14.0
Абсолютный коэффициент вытеснения нефти, %	48	65.4	72.25	61.6
Абсолютный прирост коэфф. нефтевытеснения, %	5.9	12.5	13.15	11.6
Относительный прирост коэфф. нефтевытеснения, %	10.2	26.5	16.0	23.3

ОЖДЖ*- отходы жизнедеятельности домашних животных

В присутствии уробактерий относительный прирост коэффициента нефтевытеснения был выше контрольного для обеих нефтей: 26.5 % для нефти Цагаан - Элс против 10.2 % в контроле и 23.3 % - для усинской нефти против 16.0 % в контроле.

Абсолютный прирост коэффициента нефтевытеснения (отношение объема вытесненной нефти к первоначальному объему нефти, полученной до отмыва водой и обработки композицией) в присутствии уробактерий также увеличивался по сравнению с контролем на 3.5-6 %.

Закономерности вытеснения нефти месторождения Цагаан-Элс, а также динамика выхода микроорганизмов, карбамида и изменение pH вытесненной жидкости приведены на Рисунках 19-22.

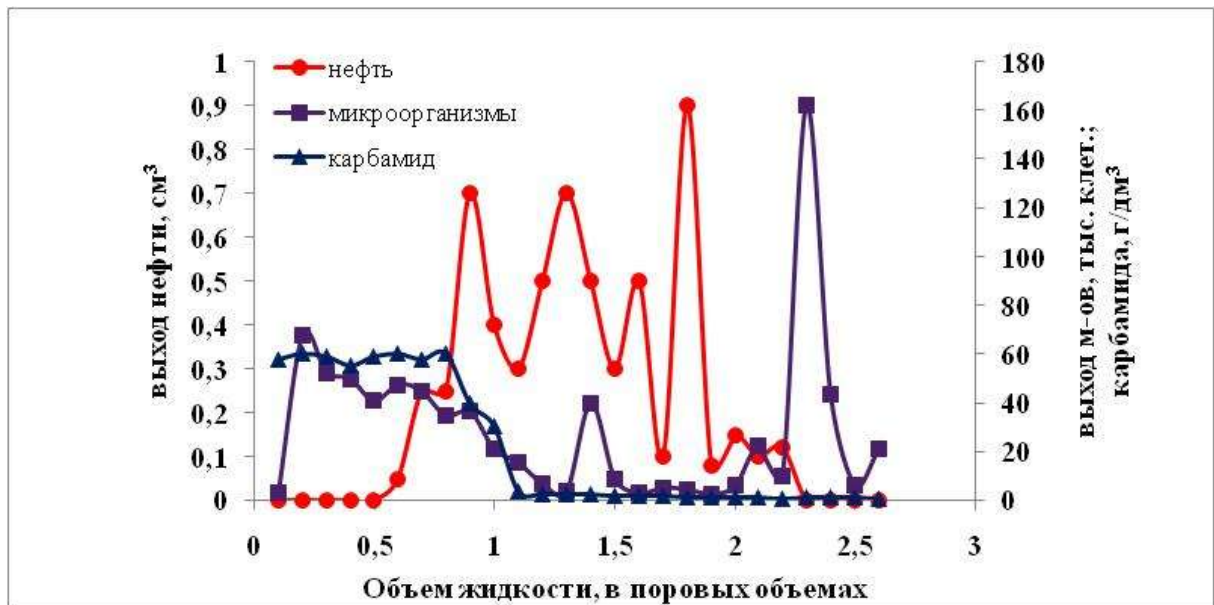


Рисунок 19 – Вытеснение нефти месторождения Цагаан-Элс, выход микроорганизмов и карбамида из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА®(контроль)

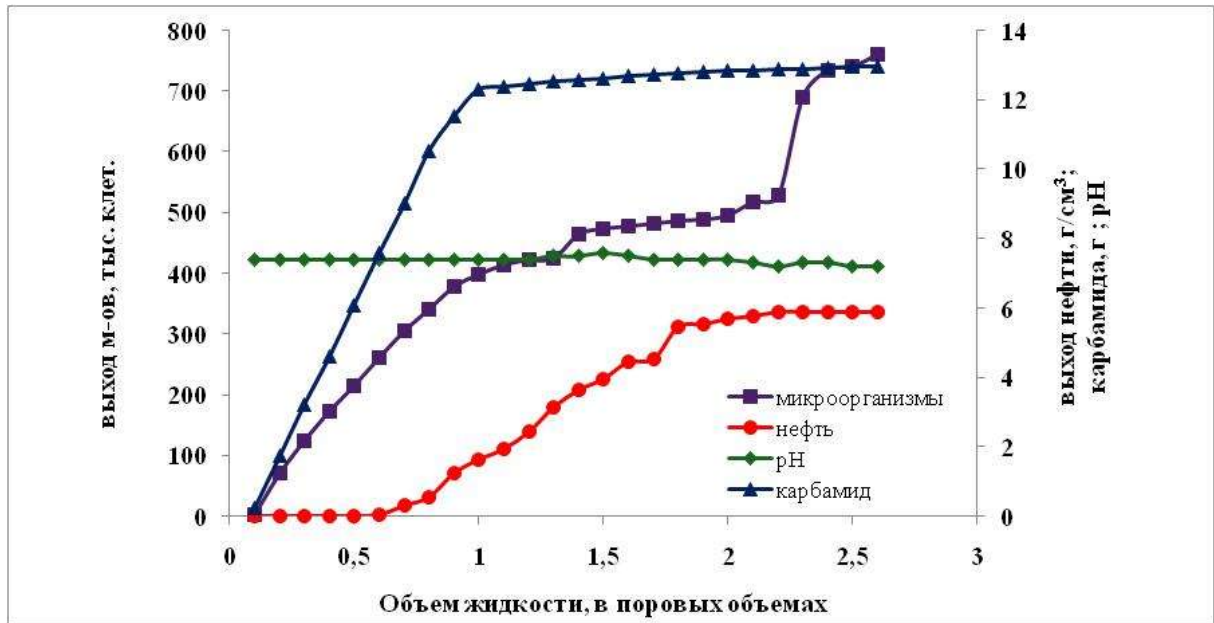


Рисунок 20 – Кумулятивный выход нефти месторождения Цагаан-Элс, микроорганизмов и карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели после обработки 10 %-ным раствором композиции НИНКА® (контроль)

Из графиков видно, что вытеснение нефти продолжалось при фильтрации через модель до двух поровых объемов воды, выход карбамида практически завершился после выхода одного порового объема, а выход микроорганизмов наблюдался на протяжении 2.5-3.1 поровых объемов. Значения pH вытесненной из контрольной модели жидкости варьировали в пределах от 7.2 до 7.6 (Рисунок20), а в опытной модели - в пределах 8.5-9.1.

В жидкости на выходе из контрольной модели определялась немногочисленная гетеротрофная микрофлора, суммарное количество которой составило 230 тыс. клеток. На выходе из опытной модели общая численность уробактерий в жидкости составила 13.8 млн клеток. Учитывая сорбционную активность наполнителя модели по отношению к микроорганизмам, которая составляет до 90 %, их общая численность во время термостатирования увеличилась приблизительно в 3.5 раза, что обусловило их уреазную активность, проявившуюся в стабильном увеличении pH жидкости и повышенном вытеснении нефти.

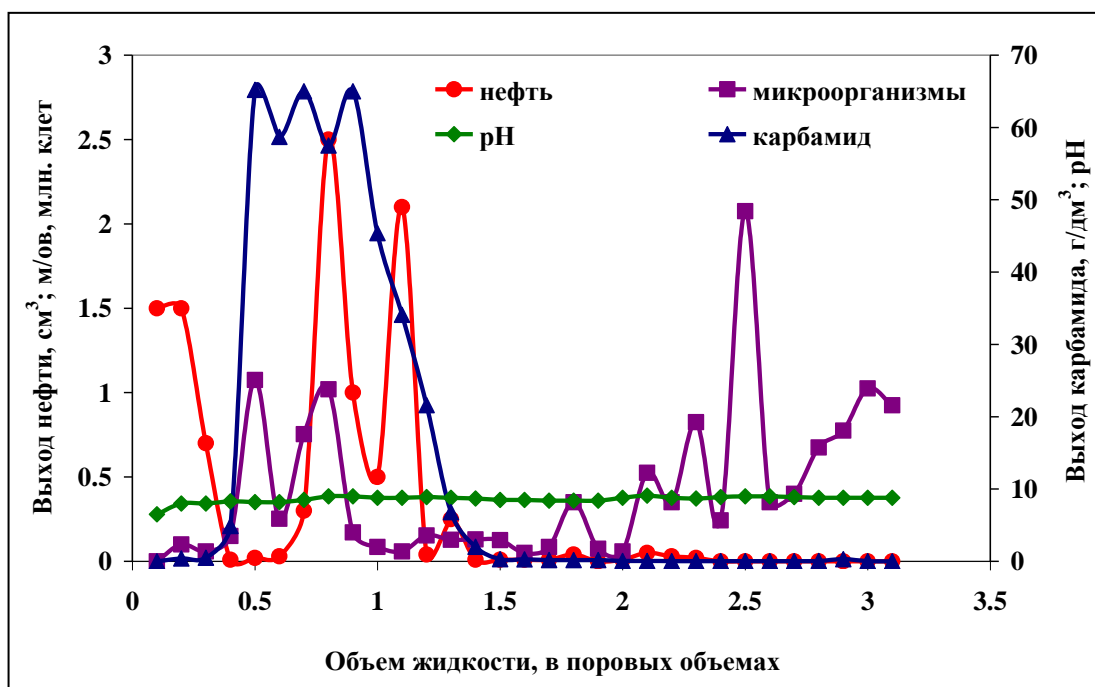


Рисунок 21 – Вытеснение нефти месторождения Цагаан-Элс, выход микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением вытяжки конского навоза (опыт)

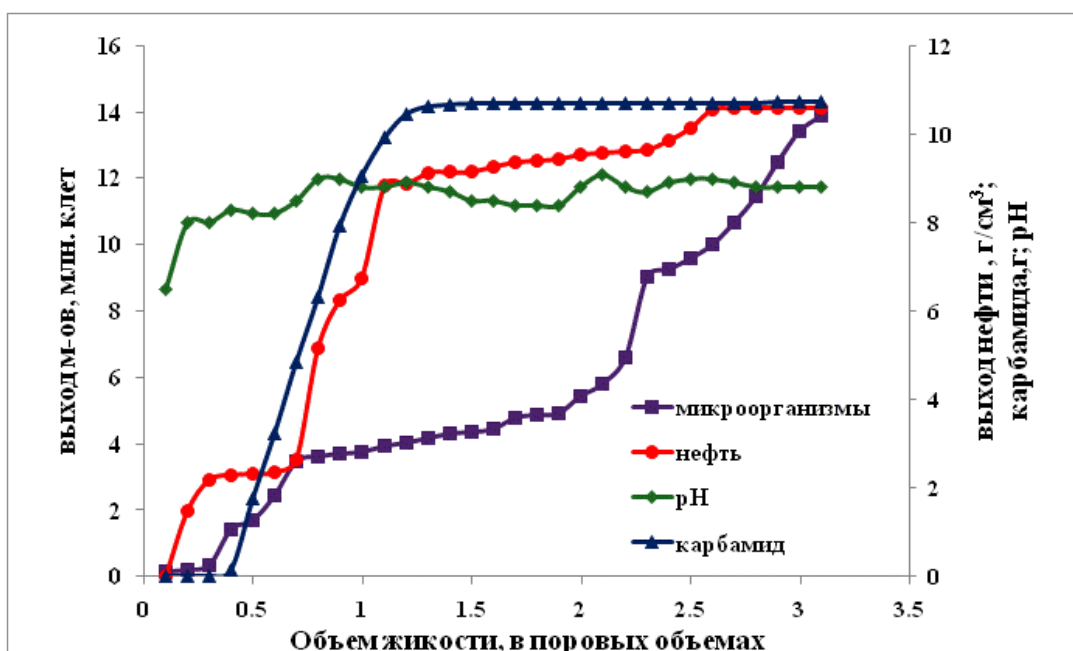


Рисунок 22 – Кумулятивный выход нефти месторождения Цагаан-Элс, микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели,

обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА[®] с добавлением вытяжки из отходов жизнедеятельности лошади (опыт)

Из графиков видно, что вытеснение нефти из контрольной модели практически закончилось после фильтрации одного порового объема воды, а из опытной модели продолжалось до двух поровых объемов; выход карбамида завершился после выхода одного порового объема, а выход микроорганизмов наблюдался на протяжении 2.5-3.1 поровых объемов.

Закономерности вытеснения нефти месторождения Усинское из контрольной и опытной моделей, а также динамика выхода микроорганизмов, карбамида и изменение рН вытесненной жидкости приведены на Рисунках 23-26.

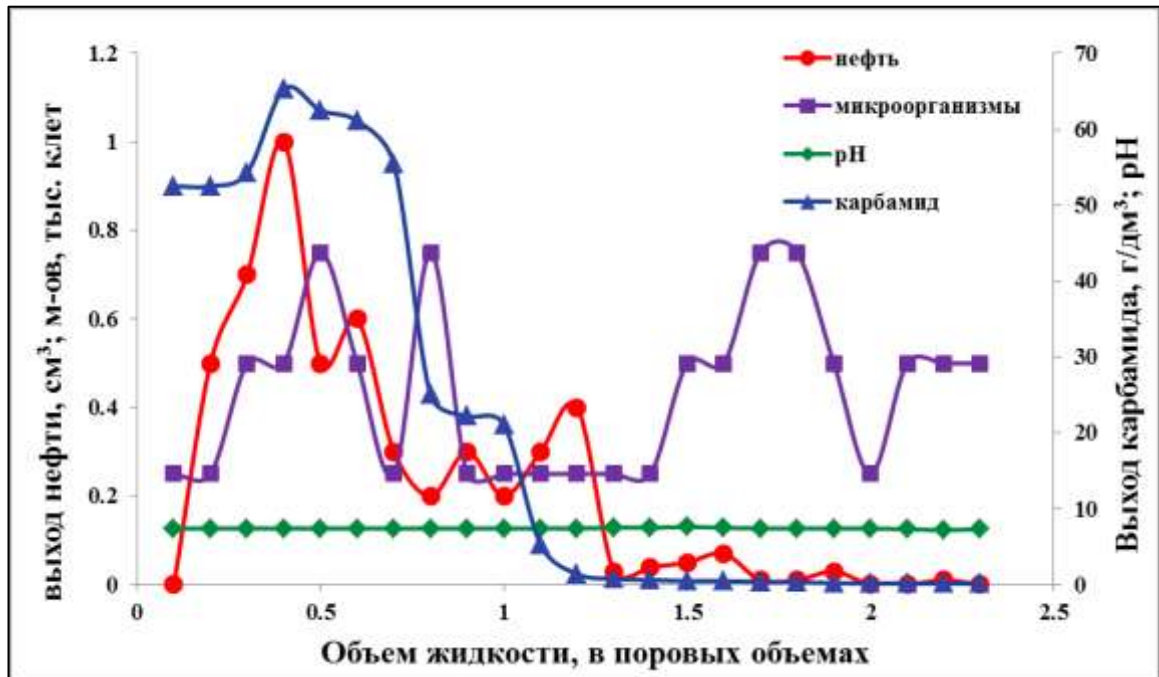


Рисунок 23 –Вытеснение нефти месторождения Усинское, выход микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА[®] (контроль)

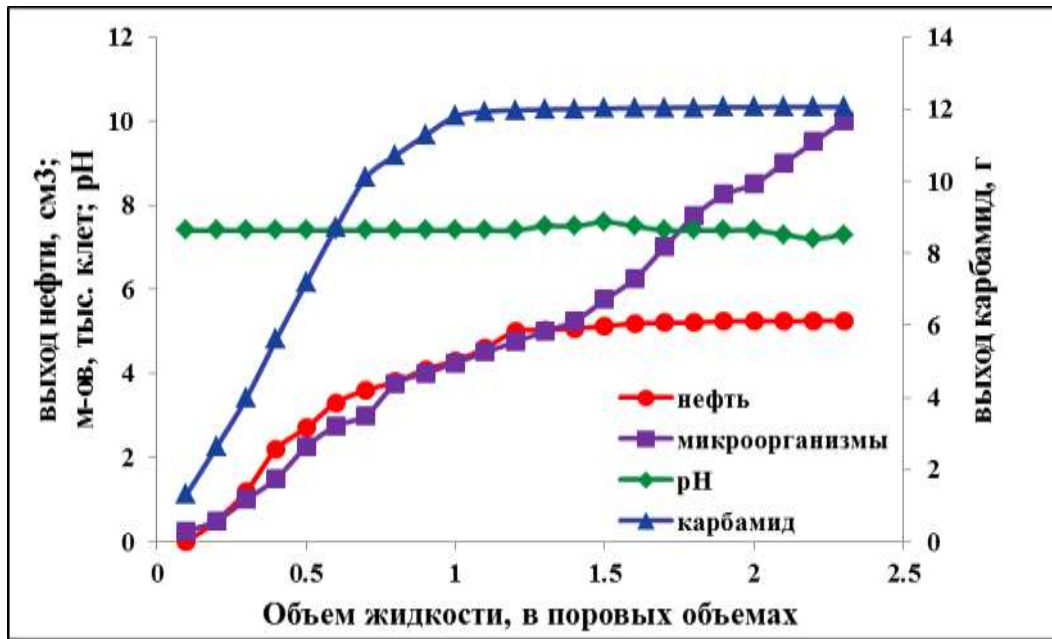


Рисунок 24 – Кумулятивный выход нефти месторождения Усинское, микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели после обработки 10 %- ным раствором композиции НИНКА[®] (контроль)

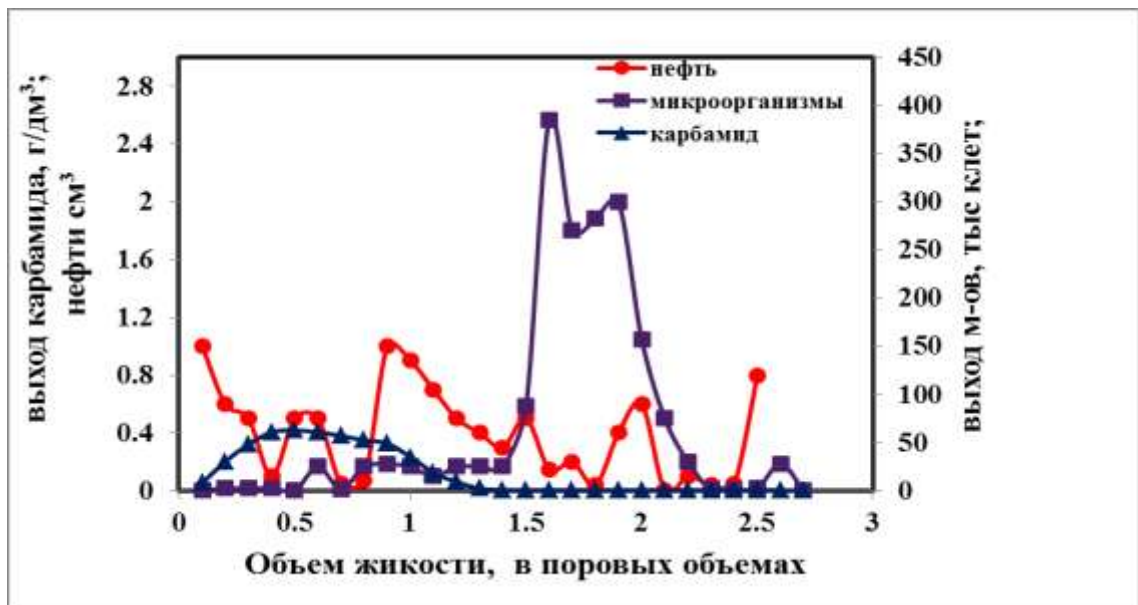


Рисунок 25 – Вытеснение нефти месторождения Усинское, выход микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %- ным раствором композиции НИНКА[®] с добавлением вытяжки конского навоза (опыт)

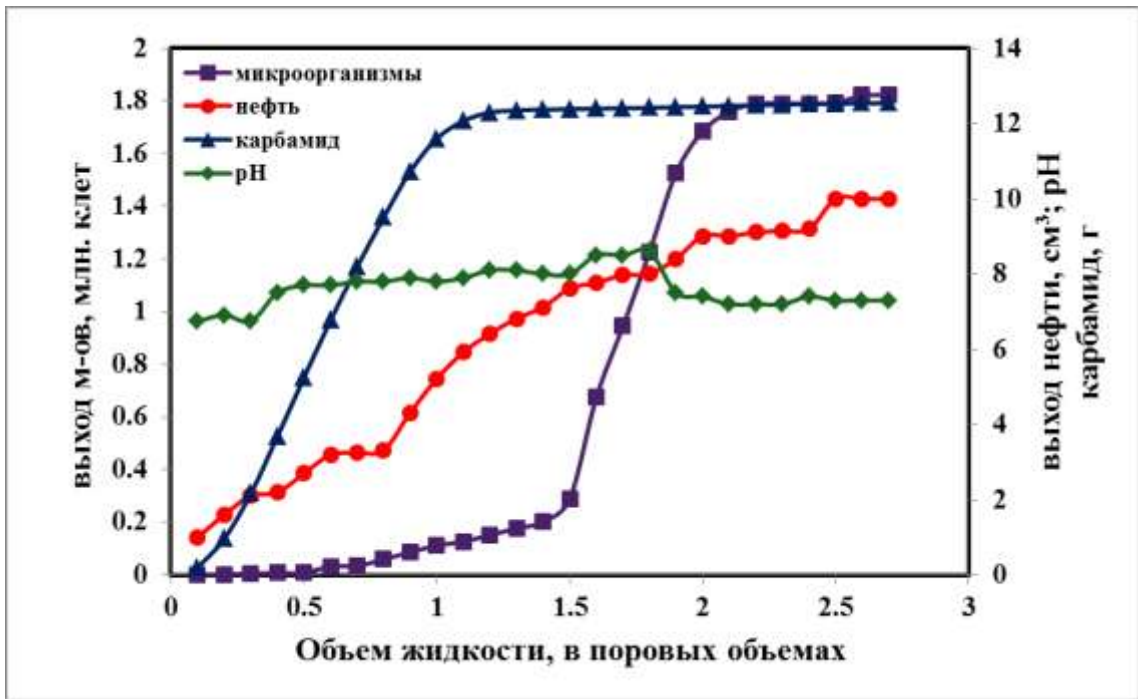


Рисунок 26– Кумулятивный выход нефти месторождения Усинское, микроорганизмов и карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %- ным раствором композиции НИНКА[®] с добавлением вытяжки конского навоза (опыт)

В контрольной модели значения pH вытесненной жидкости варьировали в пределах от 7.2 до 7.6 (Рисунки 23,24), следовательно, довытеснение нефти явилось следствием работы ПАВ композиции в нейтральных условиях. В присутствии уреазы/уробактерий из отходов жизнедеятельности лошади pH вытесненной жидкости повышался до 7.9-8.6. Формирование щелочной буферной системы усилило моющие свойства композиции, и относительный прирост коэффициента нефтевытеснения составил 23.3 %. Суммарный выход уробактерий из опытной модели составил 1.8 млн клеток, в контрольной модели определялась немногочисленная гетеротрофная микрофлора общей численностью 10 тыс. клеток

5.2 Нефтевытеснение композицией ПАВ и уреазой соевой муки, гидролизующей в ней карбамид.

Нефтенасыщенность моделей до обработки исследуемым методом варьировала в пределах 17.1-28.3 %, что соответствует истощенному пласту на поздней стадии разработки.

Довытеснение остаточной нефти из опытных моделей проводили 10 %- ным раствором композиции НИНКА[®] с добавлением 0.2 % соевой муки (Таблица13, Таблицы 1, 2 Приложения 1).

Таблица 13 – Параметры вытеснения высоковязких нефтей месторождений Усинское и Цагаан - Элс 10 % раствором композиции НИНКА[®] при гидролизе карбамида уреазой соевой муки

Параметры вытеснения	Нефть месторождения Цагаан-Элс (модель 1)		Нефть месторождения Усинское (модель 2)	
	10 % НИНКА [®] (контр.)	10 % НИНКА [®] + 02 % соевой муки	10 % НИНКА [®] (контр.)	10 % НИНКА [®] + 0.2 % соевой муки
Исходная нефтенасыщенность, %	19.0	28.3	19.1	17.1
Проницаемость по газу, D	8.3	10.1	10.2	10.9
Коэффициент нефтевытеснения (K _в), %	42.1	32.9	59.1	57.1
<i>Доотмыв нефти водой после обработки композицией</i>				
Объем довытесненной нефти, см ³	5.63	10.2	7.25	12.2
Абсолютный коэфф. вытеснения нефти, %	48.0	46.3	72.25	65.8
Абсолютный прирост коэфф. нефтевытеснения, %	5.9	13.4	13.15	8.7
Относительный прирост коэфф. нефтевытеснения, %	10.2	20.0	16.0	20.3

В присутствии соевой муки относительный прирост коэффициента нефтевытеснения был выше контрольного для обеих нефтей: 20.0 % для нефти Цагаан-Элс (в контроле 10.2 %) и 20.3 % для усинской нефти (в контроле 16.0 %). Закономерности вытеснения нефти месторождения Цагаан-Элс, а также динамика выхода микроорганизмов, карбамида и изменение рН вытесненной жидкости приведены на Рисунках 27-28.

Из графиков видно, что вытеснение нефти месторождения Цагаан-Элс продолжалось при фильтрации через модель до трех поровых объемов воды, а выход карбамида практически завершился после выхода половины порового объема. Значения рН вытесненной из модели жидкости варьировали в пределах 7.7-8.2 (Рисунки 27, 28), что свидетельствует о невысокой уреазной активности и слабом гидролизе карбамида в составе композиции. В жидкости на выходе из модели определялась многочисленная гетеротрофная микрофлора, суммарное количество которой составило 15 млн клеток.

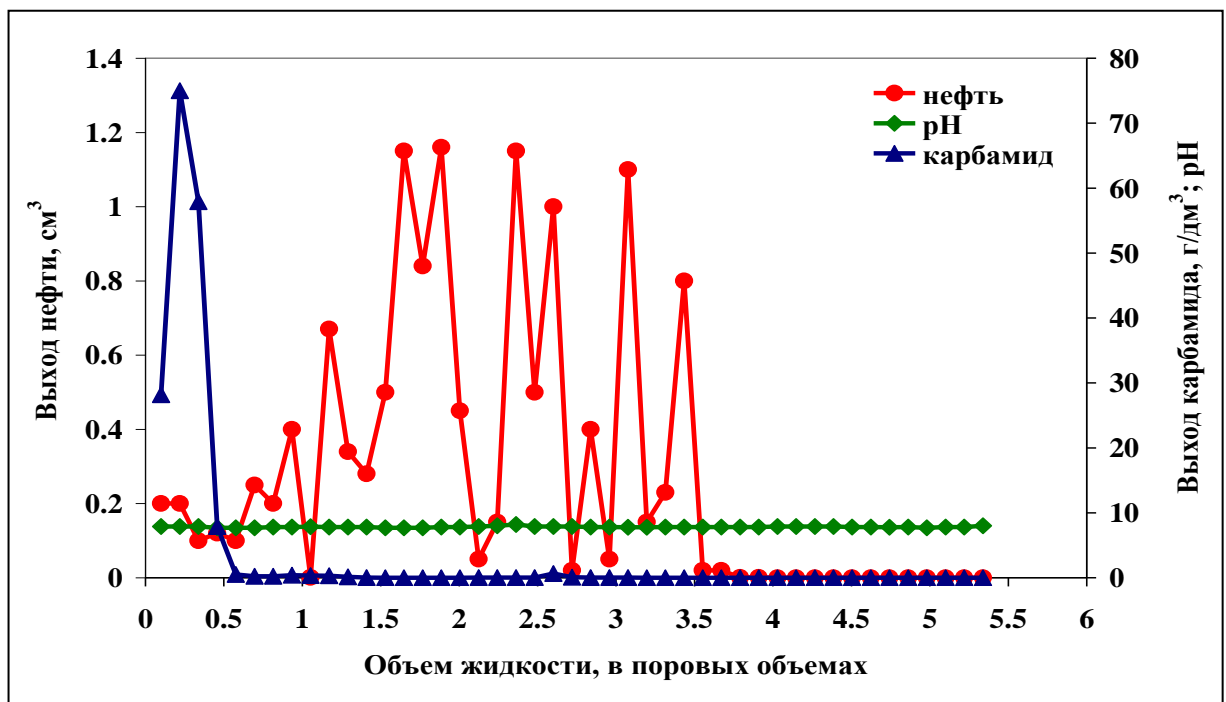


Рисунок 27– Вытеснение нефти месторождения Цагаан-Элс, выход микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %- ным раствором композиции НИНКА[®] с добавлением соевой муки (опыт)

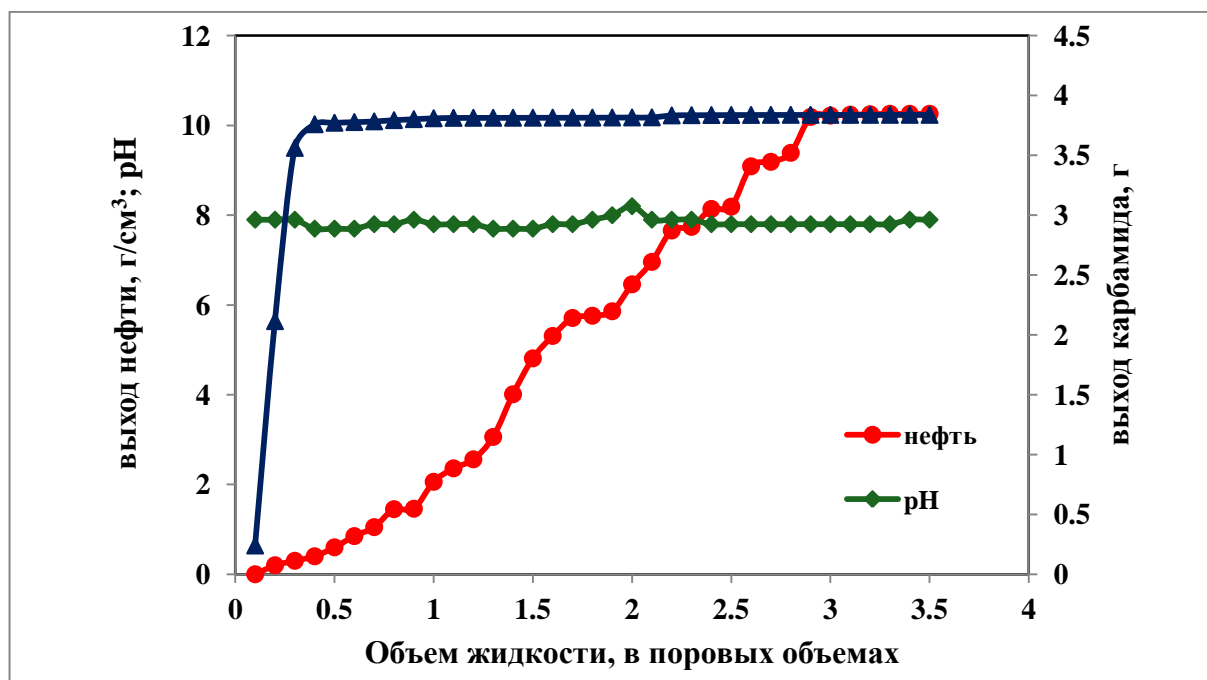


Рисунок 28 –Кумулятивный выход нефти месторождения Цагаан - Элс, карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением соевой муки (опыт)

Закономерности вытеснения нефти месторождения Усинское из опытной модели, а также выход карбамида и изменение pH вытесненной жидкости приведены на Рисунках 29, 30.

Из графиков видно, что вытеснение нефти из модели практически закончилось после фильтрации 1.4 порового объема воды, выход карбамида завершился после выхода 0.8 порового объема.

Значение pH вытесненной жидкости в присутствии соевой муки соответствовало нейтральной среде (7.2-7.4), следовательно, довытеснение нефти должно было являться следствием работы ПАВ композиции в нейтральных условиях.

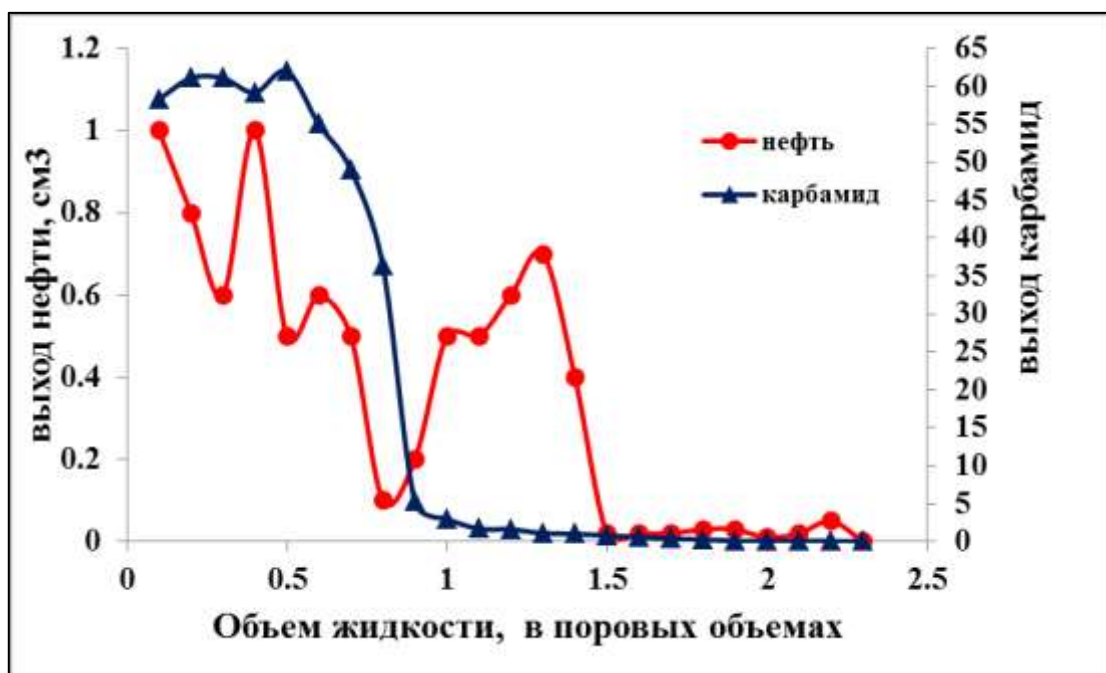


Рисунок 29 – Вытеснение нефти месторождения Усинское, выход микроорганизмов и карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %- ным раствором композиции НИНКА® с добавлением соевой муки(опыт)

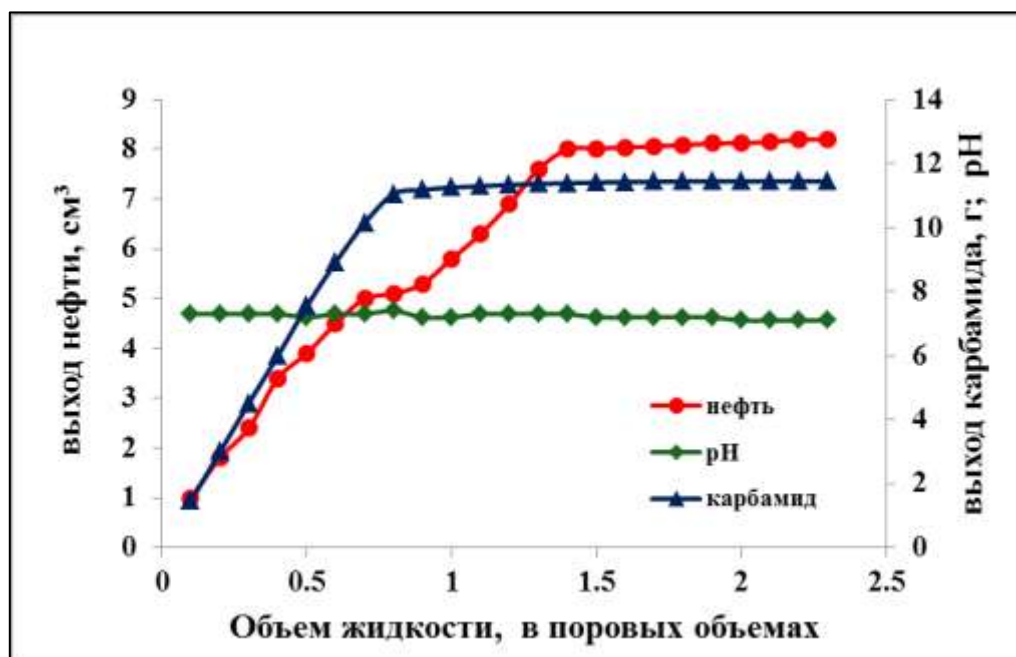


Рисунок 30 – Кумулятивный выход нефти месторождения Усинское, карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %- ным раствором композиции НИНКА® с добавлением соевой муки (опыт)

Таким образом, термостатирование с 0.2 % соевой муки не приводило к формированию буферной системы композиции и заметному повышению pH раствора, однако, прирост коэффициента нефтевытеснения из опытных моделей был значительно выше контрольных значений. На выходе из опытных моделей определялась многочисленная гетеротрофная микрофлора (4.9-15 млн клеток) которая, вероятно, использовала для роста органическое вещество соевой муки. Возможно, увеличению нефтевытеснения способствовали метаболиты выявленной микрофлоры.

5.3 Нефтевытеснение композицией ПАВ и уробактериями свекольной кожуры, катализирующими в ней карбамид.

При проведении эксперимента в качестве природного источника уробактерий применяли измельченную массу свекольной кожуры в растворе композиции.

Нефтенасыщенность моделей до обработки исследуемым методом варьировала в пределах 19.0-25.5 %. Довытеснение проводили 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением 0.2 %-ной водной вытяжки свекольной кожуры в качестве агента гидролиза карбамида (Таблица 14, Таблицы 1, 2 Приложения 1).

В присутствии вытяжки свекольной кожуры относительный прирост коэффициента нефтевытеснения был выше контрольного для обеих нефтей: 16.7 % для нефти Цагаан-Элс (в контроле 10.2 %) и 24.9 % для усинской нефти (в контроле 16.0 %).

Закономерности вытеснения нефти месторождения Цагаан-Элс, а также динамика выхода микроорганизмов, карбамида и изменение pH вытесненной жидкости приведены на Рисунках 31-34.

Таблица 14 –Параметры вытеснения высоковязких нефтей месторождений Усинскоеи Цагаан - Элс 10 % - ным раствором композиции НИНКА[®] при гидролизе карбамида уробактериями свекольной кожуры

Параметры вытеснения	Нефть месторождения Цагаан-Элс		Нефть месторождения Усинское	
	10 % НИНКА [®] (контр.)	10 % НИНКА [®] + 02 % экстракта свеклы	10 % НИНКА [®] (контр.)	10 % НИНКА [®] + 0.2 % экстракта свеклы
Исходная нефтенасыщенность, %	19.0	25.5	19.1	19.6
Проницаемость по газу, D	8.3	9.7	10.2	9.4
Коэффициент нефтевытеснения (K _в), %	42.1	29.4	59.1	65.4
<i>Доотмыв нефти водой после обработки композицией</i>				
Объем довытесненной нефти, см ³	5.63	9.2	7.25	11.2
Абсолютный коэффициент вытеснения нефти, %	48.0	56.4	72.25	74
Абсолютный прирост коэфф. нефтевытеснения, %	5.9	8.8	13.15	8.6
Относительный прирост коэфф. нефтевытеснения, %	10.2	16.7	16.0	24.9

Вытеснение нефти месторождения Цагаан-Элс продолжалось при фильтрации через модель до 2.5 поровых объемов воды, а выход карбамида практически завершался после выхода 0.7 поровых объемов. Значения рН вытесненной из модели жидкости варьировали в пределах 7.2-7.7 (Рисунки31, 32), что свидетельствует о невысокой уреазной активности и слабом гидролизе карбамида в составе композиции.

Вытеснение нефти месторождения Усинское, выход микроорганизмов, карбамида и изменение рН вытесненной жидкости приведены на рисунках 33-34.

Вытеснение нефти продолжалось при фильтрации через модель до 2.5 поровых объемов воды, а выход карбамида практически завершился после выхода одного порового объема. Значения pH вытесненной из модели жидкости были ниже, чем в контроле, и достигали лишь 7.4, что свидетельствовало о низкой уреазной активности и слабом гидролизе карбамида в составе композиции.

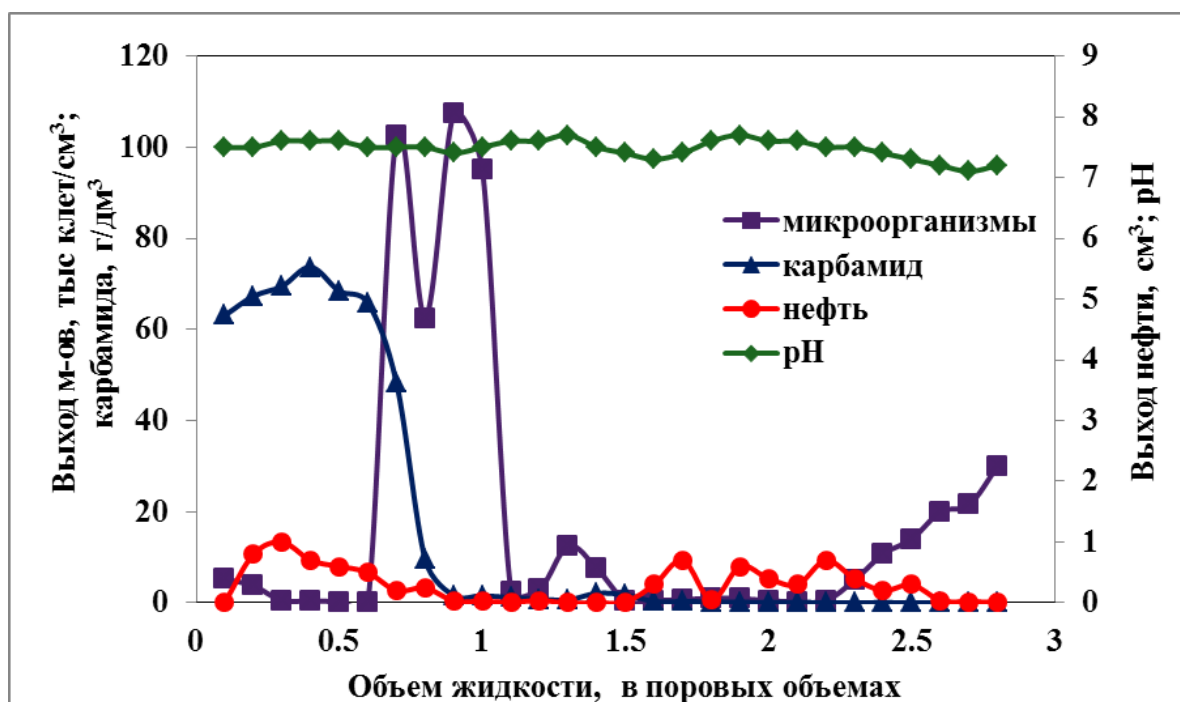


Рисунок 31 – Вытеснение нефти месторождения Цагаан-Элс, выход микроорганизмов и карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением экстракта свекольной кожуры (опыт)

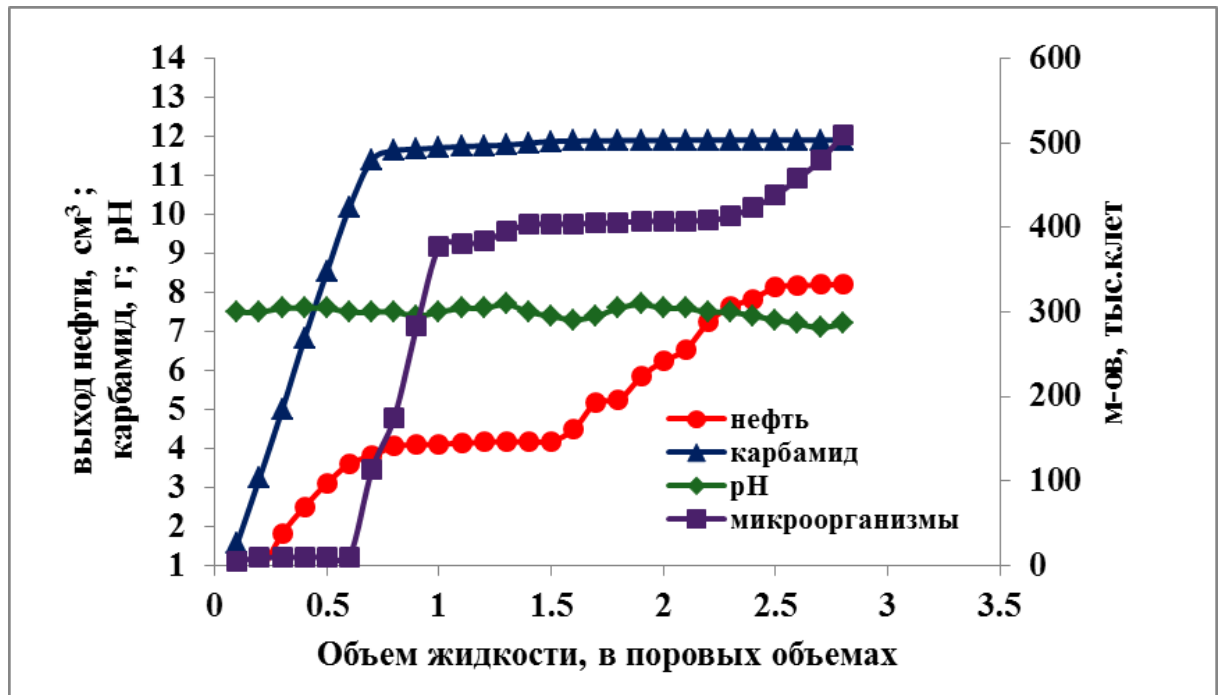


Рисунок 32 – Кумулятивный выход нефти месторождения Цагаан-Элс, карбамида, изменение pH жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением экстракта свекольной кожуры (опыт)

Однако для обеих нефтей в присутствии вытяжки из свекольной кожуры прирост коэффициента вытеснения был значительно выше, чем в контроле, несмотря на нейтральный pH и отсутствие гидролиза карбамида.

Защеление среды могло явиться следствием деятельности бродильной микрофлоры, также населяющей свекольную кожуру и окисляющей сахара в ее составе. Повышение коэффициента нефтевытеснения могло произойти за счет кислых и газообразных продуктов брожения сахаров, по механизмам, описанным в Главе 1.

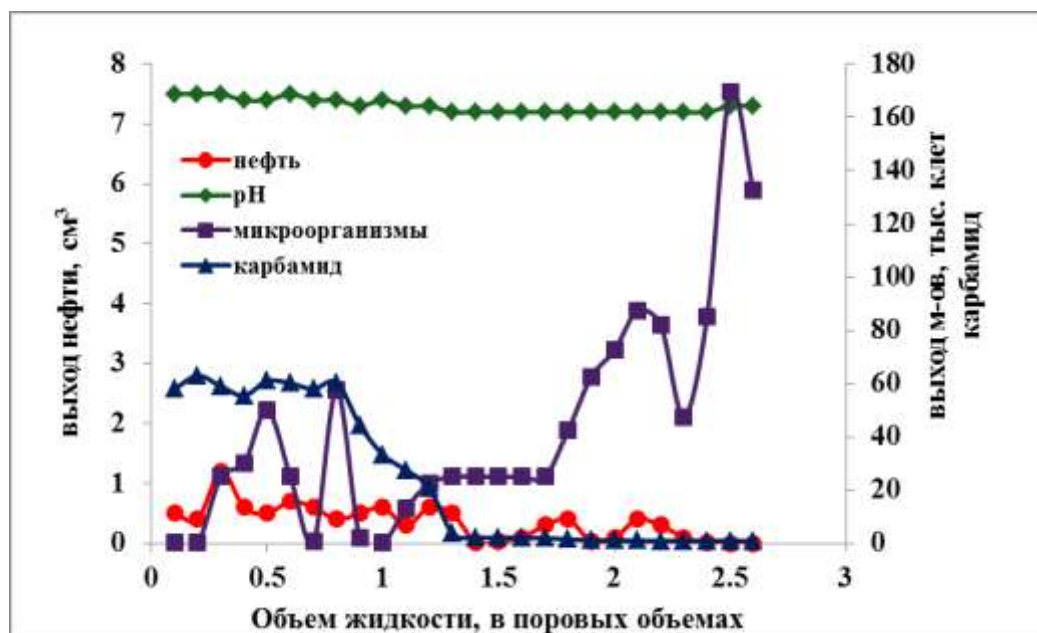


Рисунок 33– Вытеснение нефти месторождения Усинское, выход микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением экстракта свекольной кожуры(опыт)

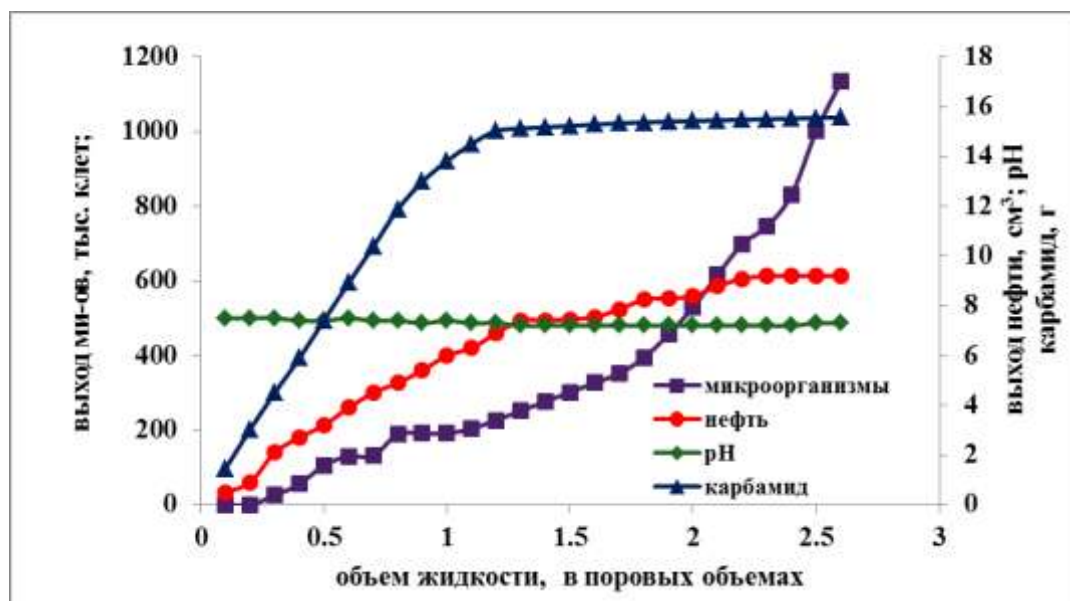


Рисунок 34 – Кумулятивный выход нефти месторождения Усинское, микроорганизмов и карбамида, изменение рН жидкости на выходе из модели, обработанной 10 %-ным раствором композиции НИНКА® с добавлением экстракта свекольной кожуры (опыт)

Таким образом, при физическом моделировании вытеснения высоковязких нефтей разного состава показана перспективность применения в качестве агента гидролиза карбамида для генерирования буферной системы нефтевытесняющих композиций отходов жизнедеятельности домашнего скота, соевой муки и кожуры свеклы, содержащие группу жизнеспособных уробактерий, либо фермент уреазу, способные гидролизовать карбамид с выделением углекислого газа и аммиака.

Глава 6 Изменения химического состава нефти при вытеснении комплексным микробиологическим и физико-химическим методом

Микроорганизмы в пористой среде модели пласта представляют собой иммобилизованные катализаторы, поэтому при моделировании вытеснения нефти с участием микроорганизмов важно знать, какое влияние оказывает микрофлора и метод в целом на состав добываемой нефти, чтобы прогнозировать процессы, происходящие в пластовых условиях при использовании новых методов увеличения нефтеотдачи.

Для этого нефти, вытесненные из моделей разными составами, анализировали методами ИК-спектроскопии, газожидкостной хроматографии и хроматомасс-спектроскопии.

ИК-спектры всех исследованных образцов нефтей (Рисунки 1-10 Приложения 2) имеют одинаковый набор характеристических полос поглощения, указывающих на сходство их качественного состава. В них проявляются характеристические полосы, соответствующие алифатическим ($1470 - 1460 \text{ см}^{-1}$ (C–H-связь в CH_2 -группах), $1380 - 1370 \text{ см}^{-1}$ (C–H-связь в CH_3 -группах)), ароматическим (1605 см^{-1} , $870-750 \text{ см}^{-1}$) и кислородсодержащим структурам (1697 см^{-1}).

Анализ спектральных коэффициентов позволил выявить количественные различия в ИК-спектрах исследованных нефтяных образцов. Так усинские нефти, вытесненные с добавлением уреазы/уробактерий, характеризуются увеличением относительного содержания ароматических структур, в том числе

полициклических, снижением доли парафиновых структур и увеличением степени разветвленности алкильных цепей (Таблица 15).

Таблица 15– Спектральные коэффициенты нефти месторождения Усинское до и после вытеснения комплексным методом

Спектральные коэффициенты	Исх. нефть	10 % НИНКА® (Контроль)	10 % НИНКА® + конский навоз	10 % НИНКА® + соевая мука	10 % НИНКА® + свекольная кожура
$C_1=D_{1610}/D_{720}$	1.41	1.27	1.39	1.49	1.68
$C_2=D_{750}/D_{720}$	1.27	1.15	1.19	1.25	1.29
$C_3=D_{720}/D_{1380}$	0.22	0.26	0.23	0.20	0.20
$A_1=D_{815}/D_{750}$	1.0	0.86	1.0	1.0	0.97
$A_2=D_{875}/D_{720}$	1.0	0.71	0.90	0.92	0.91
$A_3=D_{815}/D_{875}$	1.29	1.38	1.30	1.36	1.37
Коэф. разветвленности (D_{1380}/D_{720})	4.5	4.44	4.22	5.04	4.97

Таблица 16 – Спектральные коэффициенты нефти месторождения Цагаан-Элс до и после вытеснения комплексным методом

Спектральные коэффициенты	Исх. нефть	10 % НИНКА® (контроль)	10 % НИНКА® + конский навоз	10 % НИНКА® + соевая мука	10 % НИНКА® + свекольная кожура
$C_1=D_{1610}/D_{720}$	0.32	0.25	0.44	0.40	0.74
$C_2=D_{750}/D_{720}$	0.57	0.78	0.77	0.83	0.74
$C_3=D_{720}/D_{1380}$	0.41	0.78	0.57	0.60	0.55
$A_1=D_{815}/D_{750}$	0.65	0.30	0.30	0.31	0.29
$A_2=D_{875}/D_{720}$	0.25	0.15	0.18	0.14	0.13
$A_3=D_{815}/D_{875}$	1.49	1.54	1.31	1.8	1.67
Коэф. разветвленности D_{1380}/D_{720}	2.4	1.27	1.73	1.97	1.82

Для нефтей месторождения Цагаан-Элс наблюдаются те же тенденции изменения спектральных коэффициентов C_1 и C_3 , характеризующих ароматичность и насыщенность системы, и коэффициента разветвленности алифатических фрагментов (Таблица 16). В тоже время для этих высокопарафинистых нефтей не столь ярко выражены изменения коэффициентов A_1 - A_3 , отражающих долю полициклических ароматических структур, что вероятно, обусловлено природой данной нефти.

Таким образом, применение композиции ПАВ с добавлением фермента катализирующего гидролиз карбамида, не вызывает значимых изменений в качественном составе нефти, а приводит, главным образом, к перераспределению содержания низко- и более высокомолекулярных структур за счет доотмыва высокомолекулярных соединений нефти. Это связано с действием продуктов гидролиза карбамида – углекислого газа, который растворяясь в нефти, снижает ее вязкость, и аммиака, усиливающего моющие свойства композиции

По данным ГЖХ, в ММР n-алканов изовязкостной модели (согласно ГОСТ 39-195-86) нефти месторождения Усинское четко выделяются две группы пиков, принадлежащие насыщенной части нефти (C_{23} - C_{33}) и низкомолекулярным алканам (C_{11} - C_{20}) (Рисунок 35).

Из литературы известно, что при прохождении через пористую среду (например, насыпную модель пласта), нефть частично разделяется: в вытесненную нефть попадают более легкие неполярные компоненты, а высокомолекулярные и полярные, в основном задерживаются, сорбируясь на поверхности керна.

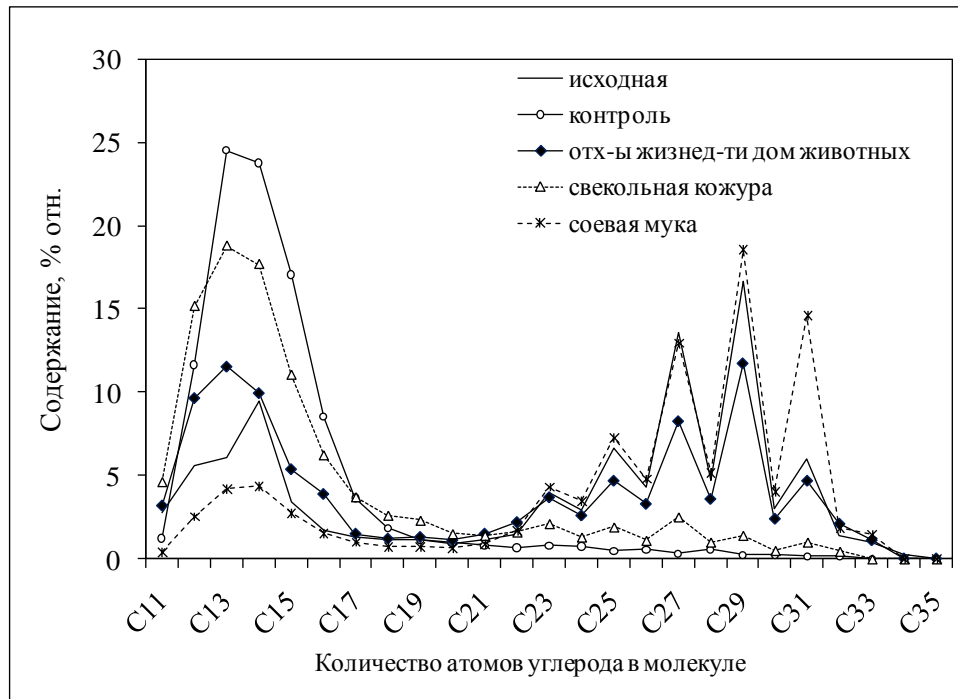


Рисунок 35– ИзменениеММР н-алканов нефти месторождения Усинское после вытеснения комплексным методом

Этот эффект можно наблюдать на примере нефти, вытесненной из контрольной модели, где микрофлора не использовалась: по сравнению с исходной в ней возросла доля н-алканов $C_{11}-C_{16}$ и резко уменьшилось относительное содержание высокомолекулярных УВ $C_{23}-C_{33}$. (Рисунок 35). После вытеснения с участием микрофлоры из отходов жизнедеятельности лошади и свекольной кожуры отмечено снижение доли н-алканов $C_{11}-C_{20}$ и увеличение относительного содержания высокомолекулярных УВ $C_{23}-C_{33}$ по сравнению с контролем. Увеличение доли тяжелых алканов, вероятно, происходило за счет их десорбции с кенового материала под действием микрофлоры и композиции. В опытных вариантах прослеживается доотмыв высокомолекулярных углеводородов, где относительное содержание приближается к исходной нефти, что свидетельствует об активной работе уреазы/уробактерий. В нефти, вытесненной с применением соевой муки, эти изменения усилились: отмечена максимальная доля длинноцепочечных и минимальная доля низкомолекулярных н-алканов.

В случае высокопарафинистой нефти месторождения Цагаан-Элс н - алканы изовязкостной модели характеризуются максимальным содержанием соединений C_{13} - C_{21} (Рисунок 36).

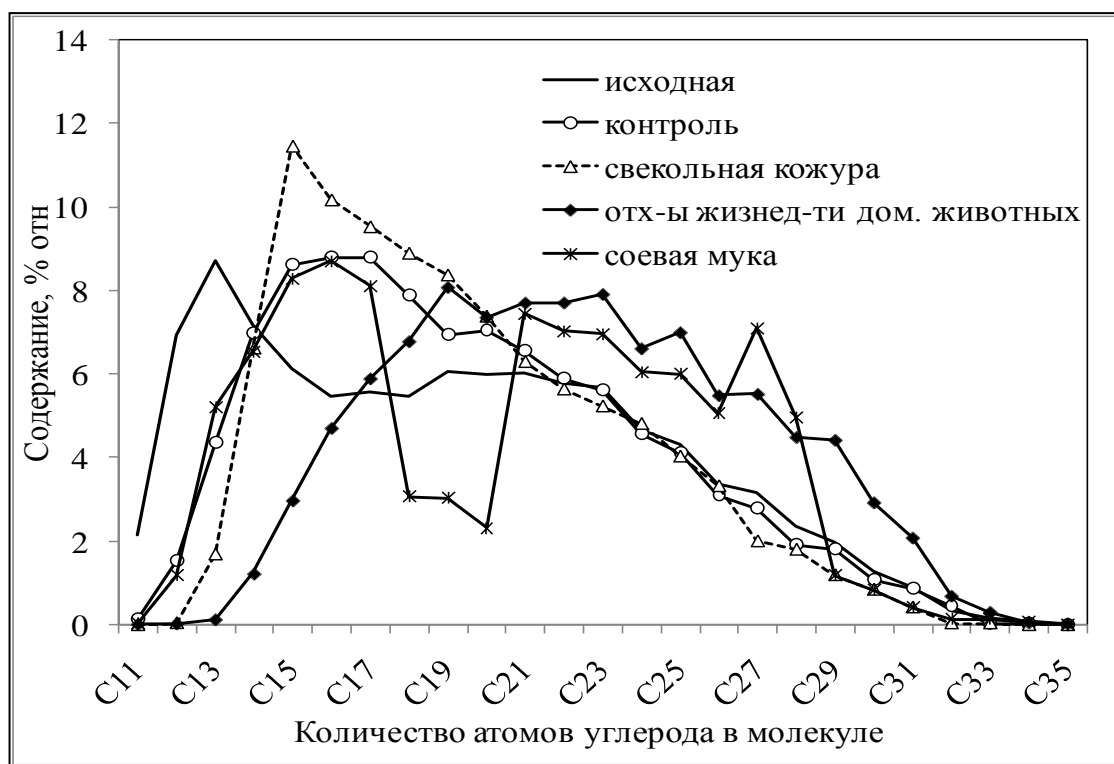


Рисунок 36 – Изменение ММР н-алканов нефти месторождения Цагаан-Элс после вытеснения разными составами

В нефти, вытесненной композицией НИНКА (контроль), относительное содержание этих УВ возрастает. В нефти из опытных моделей изменения связаны с увеличением доли высокомолекулярных н - алканов. Максимальные изменения были отмечены при добавлении к композиции соевой муки и отходов жизнедеятельности лошади. В составе н-алканов этих нефтей существенно возрастает доля соединений состава C_{21} - C_{29} .

Методом хроматомасс-спектрометрии в составе ароматических соединений всех исследуемых образцов идентифицированы алкилбензолы, нафталины, фенантрены и дибензотиофены (Таблицы 17,18).

Таблица 17 Относительное содержание аренов в масляных фракциях нефти месторождения Усинское, вытесненных композицией с добавлением уреазы/уробактерий

	Содержание, % отн.			
	10% композиция, контроль	ОЖДЖ*	Экстракт кожурь свеклы	Соевая мука
Алкилбензолы	78.2	73.5	72.3	68.8
Нафталины	19.1	21.2	21.8	23.9
Фенантрены	2.1	3.9	4.5	5.7
Дибензотиофены	0.6	1.4	1.4	1.5

ОЖДЖ* - отходы жизнедеятельности домашних животных

Таблица 18– Относительное содержание аренов в масляных фракциях нефти месторождения Цагаан-Элс, вытесненных композицией с добавлением уреазы/уробактерий

	Содержание % отн.			
	10% композиция, контроль	ОЖДЖ*	Экстракт кожурь свеклы	Соевая мука
Алкилбензолы	82.9	77.2	76.0	69.6
Нафталины	12.8	18.2	19.3	24.4
Фенантрены	3.4	3.5	3.6	4.8
Дибензотиофены	0.9	1.1	1.1	1.2

Анализ полученных данных показал, что для нефтей, вытесненных различными составами, наблюдаются следующие особенности. Среди установленных типов соединений, относительно контроля, снижается доля алкилбензолов и увеличивается доля нафталинов, фенантронов и дибензотиофенов.

На примере нефти месторождения Усинское выявлены изменения в относительном содержании отдельных представителей моно- и полициклических ароматических УВ до и после вытеснения комплексным методом. В составе алкилбензолов при использовании природных источников фермента уреазы наблюдается увеличение концентрации метилалкилбензолов и снижение доли н-алкилбензолов (Таблица 19)

Таблица 19– Относительное содержание алкилбензолов в масляных фракциях нефти месторождения Усинское, вытесненных композицией и с добавлением уреазы/уробактерий

	Углеводороды, % отн		
	АБ	МАБ	ТМАБ
10 %-ный р-р комп. НИНКА®	62.2	33.6	4.2
ОЖДЖ	25.9	71.1	3.0
Кожура свеклы	23.6	72.5	3.9
Соевая мука	21.8	73.7	4.5
АБ –н-алкилбензолы, МАБ – метилалкилбензолы, ТМАБ- триметилалкилбензолы			

В составе ТМАБ (m/z 133) в присутствии природных источников фермента уреазы также идет перераспределение концентраций компонентов (Рисунок 37) вследствие доотмыва высокомолекулярных соединений.

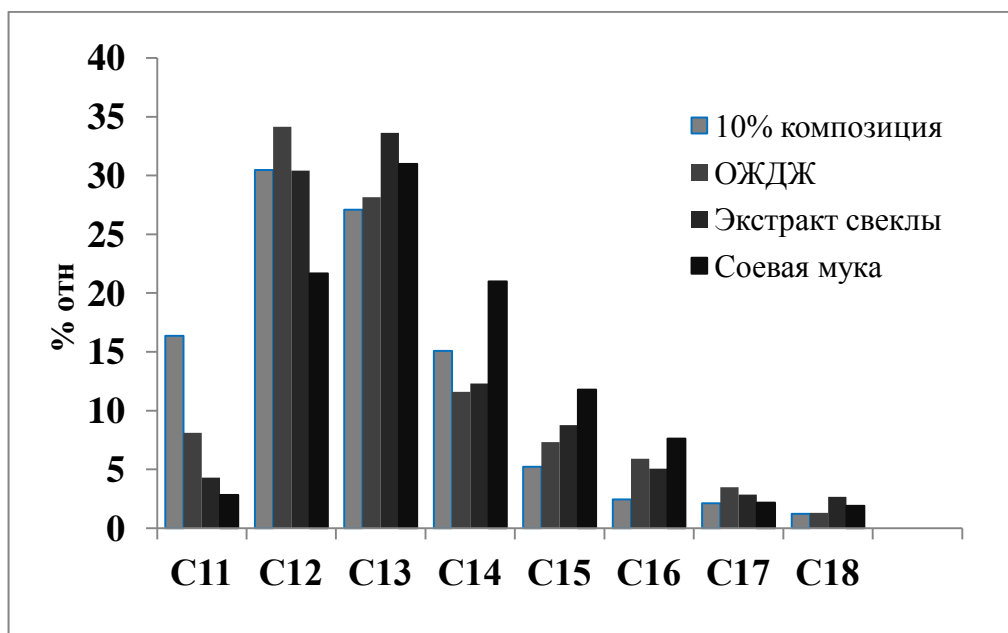


Рисунок 37 – Изменение ММР алкилбензолов (m/z 133) нефти месторождения Усинское после вытеснения комплексным методом

Для полициклических ароматических УВ отмечено увеличение доли низкомолекулярных структур. Среди нафталинов снижается содержание метилнафталинов и диметилнафталинов по сравнению с контролем и возрастает доля триметил- и тетраметилнафталинов (Таблица 20).

Таблица 20– Относительное содержание гомологов нафталина в масляных фракциях нефти месторождения Усинское, вытесненных композицией и с добавлением уреазы/уробактерий

	Углеводороды, % отН				
	Н	МН	ДМН	ТМН	ТеМН
10 %-ный р-р комп. НИНКА®	1.9	29.1	40.3	23.0	5.7
ОЖДЖ	2.0	20.6	36.7	31.5	9.2
Кожура свеклы	3.0	18.9	33.9	32.7	11.5
Соевая мука	1.2	16.6	34.6	35.2	12.4

Н – нафталин, МН – метилнафталин, ДМН – диметилнафталин, ТМН – триметилнафталин, ТеМН – тетраметилнафталин

В составе фенантронов снижается доля метилфенантронов и увеличивается относительное содержание триметилфенантронов и тетраметилфенантронов (Таблица 21).

Таблица 21– Относительное содержание гомологов фенантрена в масляных фракциях нефти месторождения Усинское, вытесненной композицией и с добавлением уреазы/уробактерий

	Углеводороды, % отн				
	Ф	МФ	ДМФ	ТМФ	ТеМФ
10 %-ный р-р комп. НИНКА®	8.4	24.8	37.7	25.8	3.3
ОЖДЖ	7.5	19.9	38.2	29.0	5.4
Кожура свеклы	7.6	21.3	36.4	29.7	5.0
Соевая мука	7.5	20.5	38.2	29.3	4.5
Ф – фенантрен, МФ – метилфенантрен, ДМФ – диметилфенантрен, ТМФ – триметилфенантрен, ТеМФ – тетраметилфенантрен					

Таким образом, использование комплексного метода на основе композиции ПАВ и фермента из природных источников приводит к увеличению в составе углеводородов вытесненной нефти доли высокомолекулярных n-алканов и полициклических ароматических соединений. Среди последних возрастает относительное содержание полизамещенных структур. Наблюдаемые изменения могут быть связаны как с действием продуктов гидролиза карбамида, направленным на усиление моющей способности композиции, так и с доотмывом сорбированной породой части нефти.

Выводы

1. Предложен экологически безопасный комплексный метод увеличения нефтеотдачи низкотемпературных пластов залежей высоковязких нефтей с применением нефтewытесняющей композиции и фермента уреазы из природных источников, катализирующей в ней гидролиз карбамида.

2. В нефтewытесняющих композициях в качестве источников уреазы/уробактерий возможно применение соевой муки, кожуры свеклы и отходов жизнедеятельности домашних животных. Все три источника проявили высокую уреазную активность, при которой создается щелочная среда с pH 8.5-9.3, необходимая для эффективной работы композиции ПАВ.

3. При воздействии на нефть нефтewытесняющей композицией с ферментом гидролиза карбамида из различных источников, плотность исследуемых нефтей практически не менялась. При использовании комплексного метода увеличения нефтеотдачи высоковязких парафинистой и высокосмолистой нефтей вязкость нефти снижается на 31 и 52.4 %, соответственно.

4. Нефтewытесняющая композиция НИНКА[®] с ферментом из природных источников стимулирует десорбцию с породы остаточной нефти, приводящую к обогащению вытесненного флюида более полярными три- и тетрациклическими ароматическими структурами, при этом практически не меняется качественный состав нефти.

5. Композиция на основе ПАВ и фермента, катализирующего гидролиз карбамида, имеет высокую нефтewытесняющую способность:

- при использовании композиции на основе ПАВ без фермента (контроль) относительный прирост коэффициента нефтewытеснения для высоковязких парафинистой и высокосмолистой нефтей составил 10.2 и 16.0%, соответственно

- относительный прирост коэффициента нефтewытеснения при использовании композиции на основе ПАВ с ферментом для обоих типов нефтей выше контрольного и составил: в присутствии отходов жизнедеятельности лошади – 26.5 %, для парафинистой нефти и 23.3 % для высокосмолистой нефти; при использовании соевой муки – 20.3 % и 20.0 % , соответственно; при

использовании в качестве источника уреазы/уробактерий 0,2 %-го экстракта свекольной кожуры – 16.7 % и 24.9%, соответственно.

6. Комплексный метод увеличения нефтеотдачи низкотемпературных пластов залежей высоковязких нефтей с применением ферментативно генерируемой нефтевытесняющей композиции является технологически эффективным и экологически безопасным.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1 – Фильтрационные характеристики моделей и параметры
нефтевытеснения при моделировании доотмыва нефти
месторождения Цагаан-Элс

Параметры вытеснения	10 % НИНКА (контр.)	10 % НИНКА+ навоз лошади	10 % НИНКА+ экстракт свеклы	10 % НИНКА+ соя
Высота заполнения модели силикагелем, см	90	76	90	81
Диаметр колонки, мм	1.9	2.2	1.9	1.9
Проницаемость насыпной модели по газу, мкм ²	8.3	8.5	9.7	10.1
Смачивание породы водой и насыщение нефтью				
Объем воды для смачивания керна, см ³	300	300	200	300
Объем нефти, внесенной в модель, см ³	200	200	200	200
Объем воды, вышедшей из модели, см ³	160	190	80	186
Объем нефти, вышедшей из модели, см ³	90	115	95	124
Объем нефти, оставшейся в модели, см ³	110	85	105	76
Объем воды, оставшейся в модели, см ³	140	110	120	114
Поровый объем по воде+нефти, см ³	250	195	225	190
Исходная нефтенасыщенность керна, %	44	43.6	46.6	40
Первичное вытеснение нефти пластовой водой				
Вытеснение водой, см ³	400	400	400	400
Объем нефти, вытесненной из модели, см ³	35	45	50	25
Объем воды, вышедшей из модели, см ³	370	350	360	385
Объем нефти, оставшейся в модели, см ³	75	40	55	51
Объем воды, оставшейся в модели, см ³	170	160	160	129
Поровый объем по воде+нефти, см ³	290	200	215	220
Нефтенасыщенность после вытеснения водой, %	19.0	18.2	25.5	28.3
Коэффициент нефтевытеснения водой К, %	42.1	47	29.4	32.9
Обработка модели раствором композиции НИНКА или микробной взвесью				
Объем 10 %-ного р-ра композиции, см ³	250			
Объем р-ра композиции+р-р навоза лошади модели, см ³	-	200	-	
Объем р-ра композиции + экстракт свеклы, см ³	-	-	200	
Объем р-ра композиции + соя, см ³	-	-		200
Термостатирование модели при 40°C, сут	14	14	14	14
Вытеснение остаточной нефти водой после термостатирования				
Объем довытесненной нефти, см ³	5.63	10.6	9.2	10.2
Абсолютный коэффициент вытеснения нефти, %	48.0	59.5	54.4	46.3
Абсолютный прирост коэфф. нефтевытеснения	5.9	12.5	8.8	13.4
Относительный прирост коэфф. нефтевытеснения	10.2	23.6	16.7	20.0

Таблица 2 – Параметры вытеснения вязкой нефти Усинского месторождения

Параметры вытеснения	10 % НИНКА (контр.)	10 % НИНКА+ навоз лошади	10 % НИНКА+ экстракт свеклы	10 % НИНКА+ соя
Высота заполнения модели силикагелем, см	111	114	103	111
Диаметр колонки, мм	2.0	2.0	2.0	2.0
Проницаемость насыпной модели по газу, мкм ²	10.2	10.0	9.4	10.9
Смачивание породы водой и насыщение нефтью				
Объем воды для смачивания керна, см ³	300	300	300	300
Объем нефти, внесенной в модель, см ³	300	300	300	300
Объем воды, вышедшей из модели, см ³	140	130	60	130
Объем нефти, вышедшей из модели, см ³	190	180	160	170
Объем нефти, оставшейся в модели, см ³	110	120	140	130
Объем воды, оставшейся в модели, см ³	160	170	240	170
Поровый объем по воде+нефти, см ³	270	290	380	300
Исходная нефтенасыщенность керна, %	40.7	41.3	36.8	43.3
Первичное вытеснение нефти пластовой водой				
Вытеснение водой, см ³	400	400	400	400
Объем нефти, вытесненной из модели, см ³	65	60	80	85
Объем воды, вышедшей из модели, см ³	370	340	350	350
Объем нефти, оставшейся в модели, см ³	45	60	60	45
Объем воды, оставшейся в модели, см ³	190	230	290	220
Поровый объем по воде+нефти, см ³	235	290	350	265
Нефтенасыщенность после вытеснения водой, %	19.1	20.6	17.1	16.9
Коэффициент нефтевытеснения водой К, %	59.1	50.0	57.1	65.3
Обработка модели раствором композиции НИНКА или микробной взвесью				
Объем 10 %-ного р-ра композиции, см ³	300			
Объем р-ра композиции+р-р навоза лошади модели, см ³	-	300	-	
Объем р-ра композиции + экстракт свеклы, см ³	-	-	300	
Объем р-ра композиции + соя, см ³	-	-		300
Термостатирование модели при 40°С, сут	14	14	14	14
Вытеснение остаточной нефти водой после термостатирования				
Объем довытесненной нефти, см ³	7.25	14.0	11.2	12.2
Абсолютный коэффициент вытеснения нефти, %	72.25	61.6	74	65.8
Абсолютный прирост коэфф. нефтевытеснения	13.15	11.6	8.6	8.7
Относительный прирост коэфф. нефтевытеснения	16.0	23.3	24.9	20.3

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ИК-спектры вязких нефтей после вытеснения композицией в присутствии разных агентов гидролиза карбамида

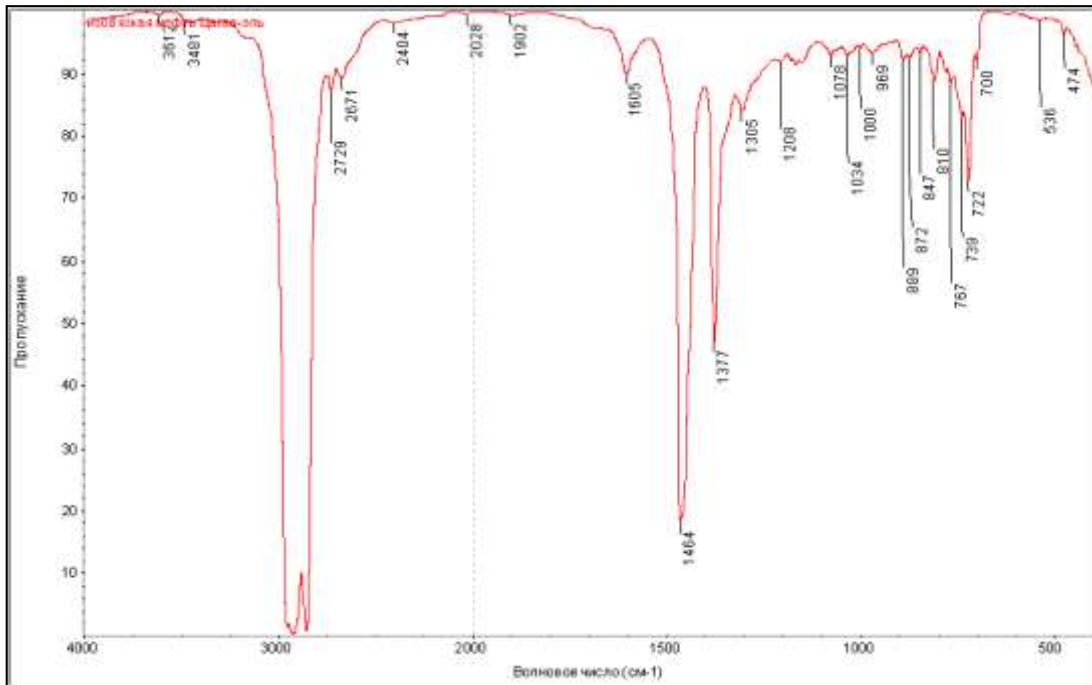


Рисунок 1 – ИК-спектр исходной изовязкостной нефти месторождения Цагаан-Элс

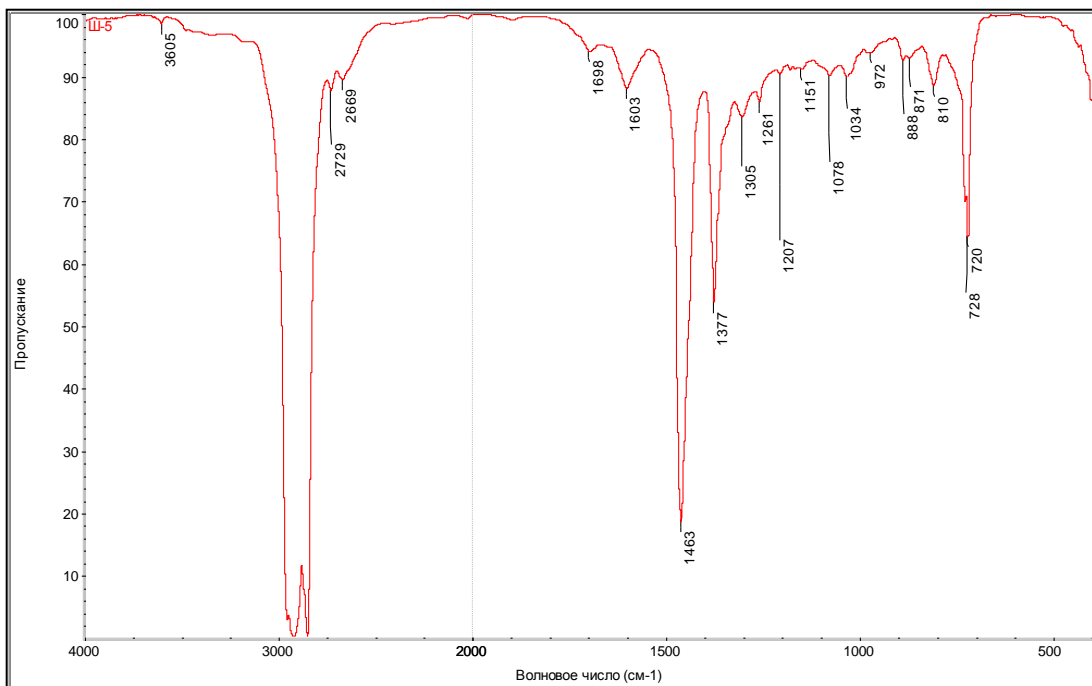


Рисунок 2 – ИК-спектр нефти месторождения Цагаан-Элс после доотмыва 10% композицией НИНКА (контроль)

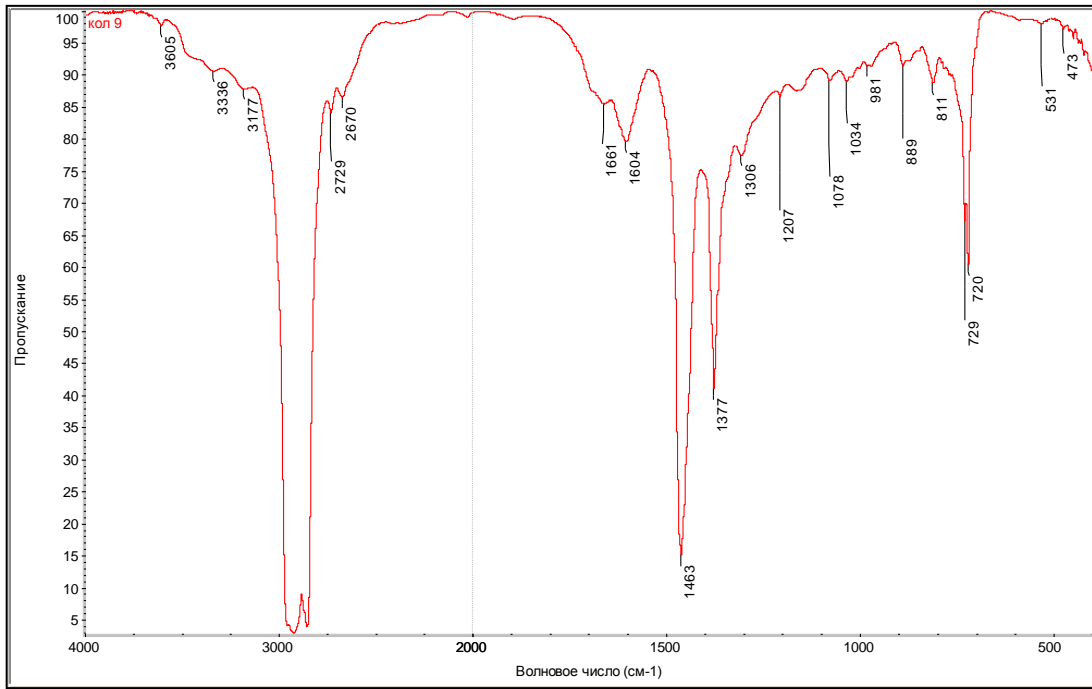


Рисунок 3 – ИК-спектр нефти месторождения Цагаан-Элс после доотмыва 10% композицией НИНКИ® с добавлением 0.2 %-ой водной вытяжки отходов жизнедеятельности животных (опыт)

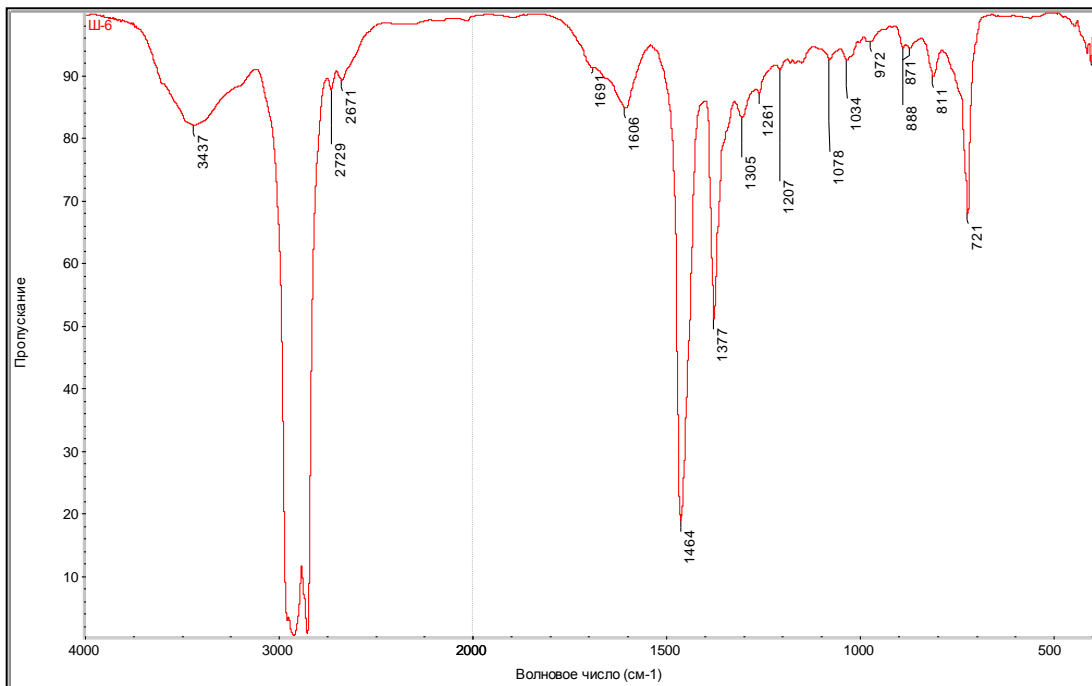


Рисунок 4 – ИК-спектр нефти месторождения Цагаан-Элс после доотмыва 10 % композицией НИНКИ® с добавлением 0.2 % соевой муки (опыт)

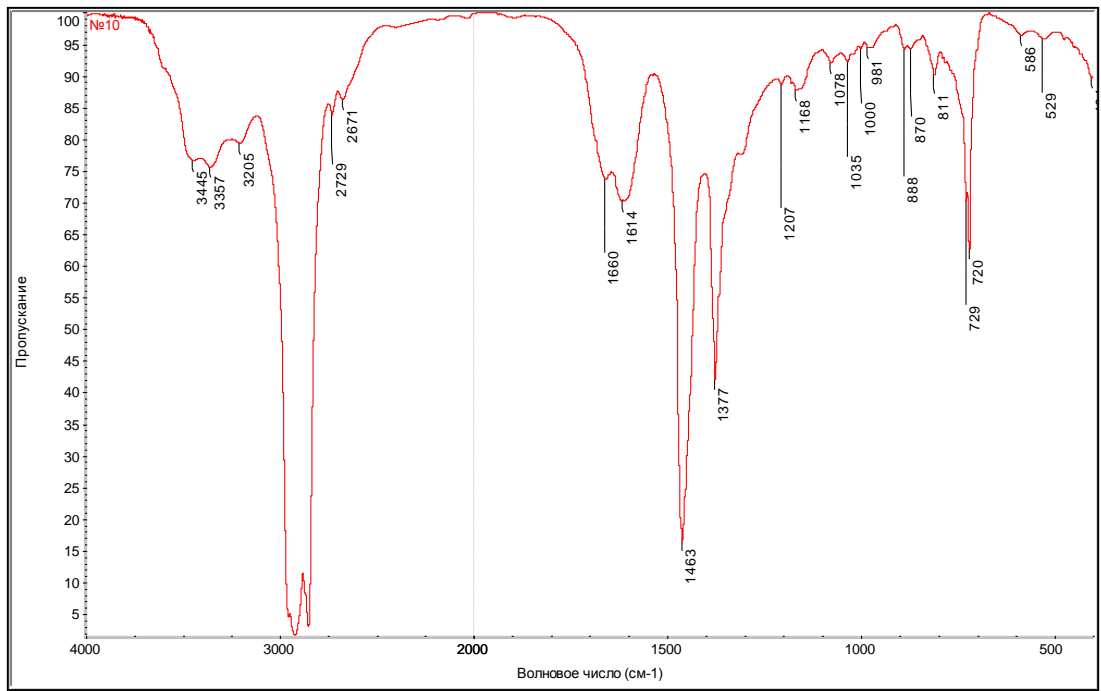


Рисунок 5 – ИК-спектр нефти месторождения Цагаан-Элс после доотмыва 10 % композицией НИНКИ® с добавлением 0.2 % водной вытяжки свекольной кожуры (опыт)

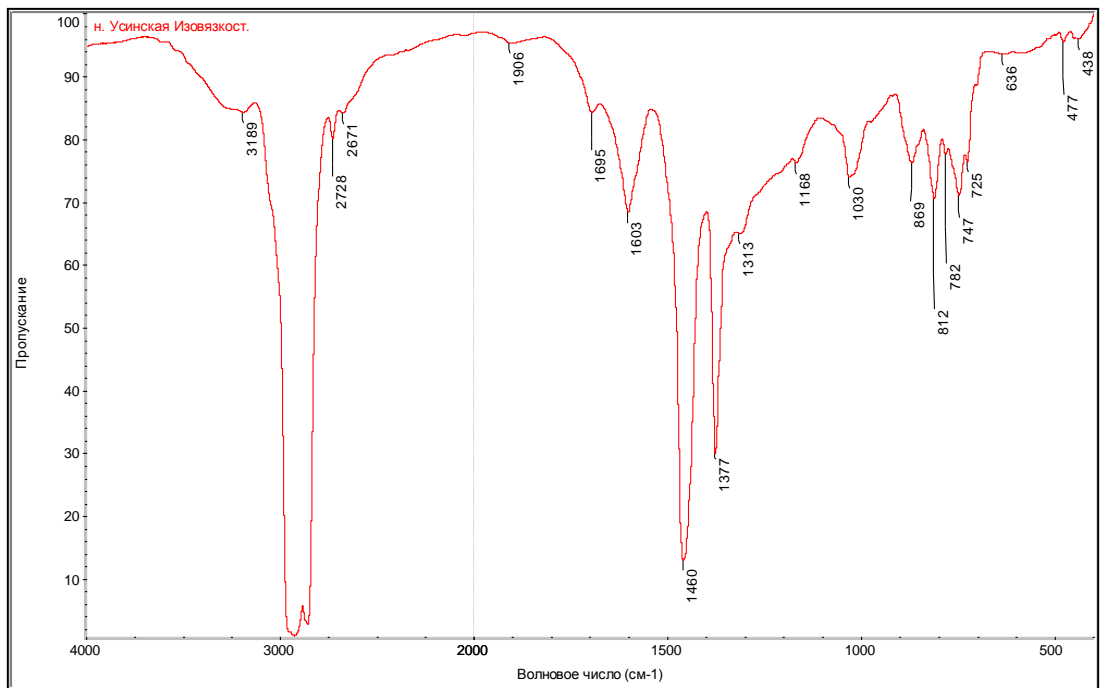


Рисунок 6 – ИК-спектр изовязкостной нефти месторождения Усинское

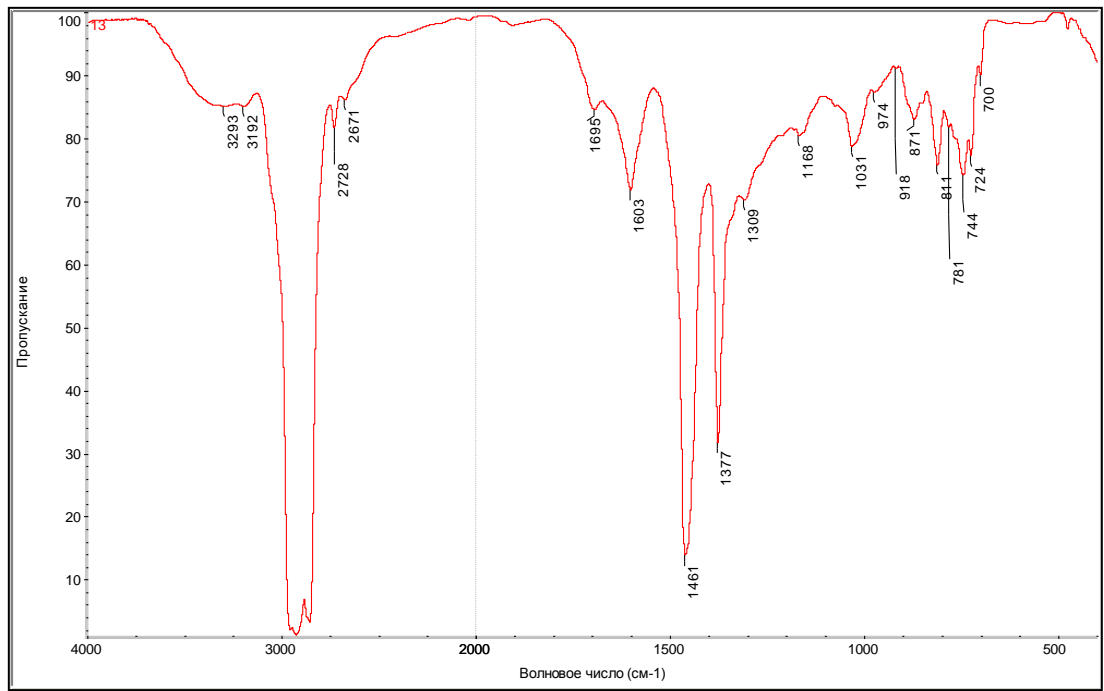


Рисунок 7 – ИК-спектр изовязкостной нефти месторождения Усинское после доотмыва 10% композицией НИНКИ® (контроль)

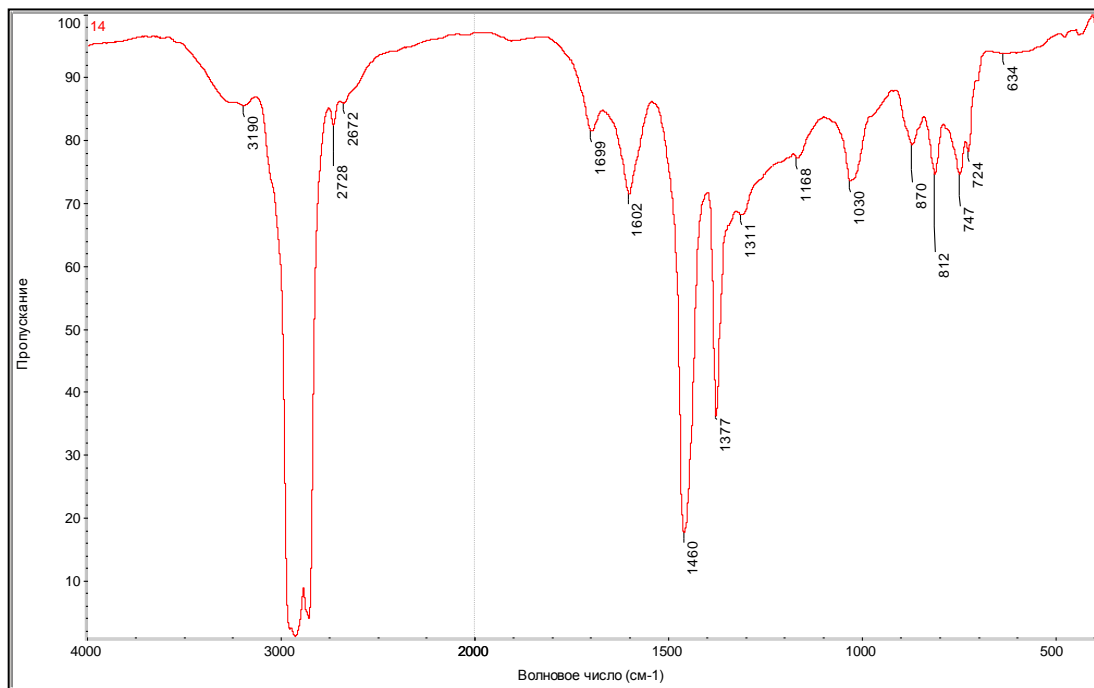


Рисунок 8 – ИК-спектр нефти месторождения Усинское после доотмыва 10% композицией НИНКИ® с добавлением 0.2 %-й водной вытяжки отходов жизнедеятельности животных (опыт)

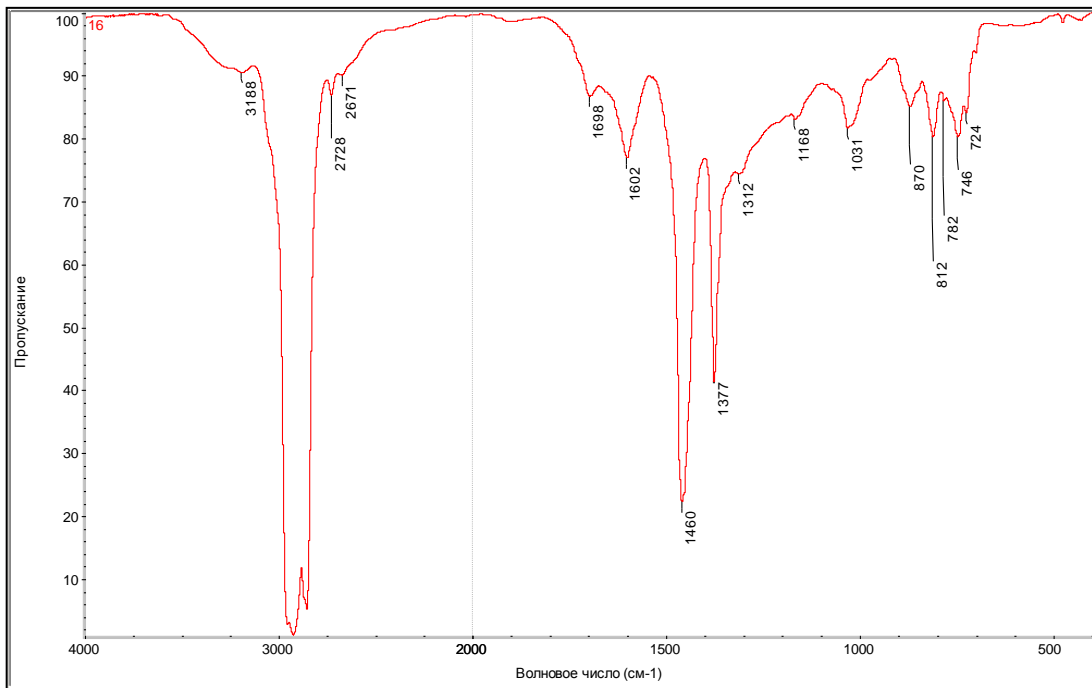


Рисунок 9 – ИК-спектр нефти месторождения Усинское после доотмыва 10 % композицией НИНКИ[®] с добавлением 0.2 % соевой муки (опыт)

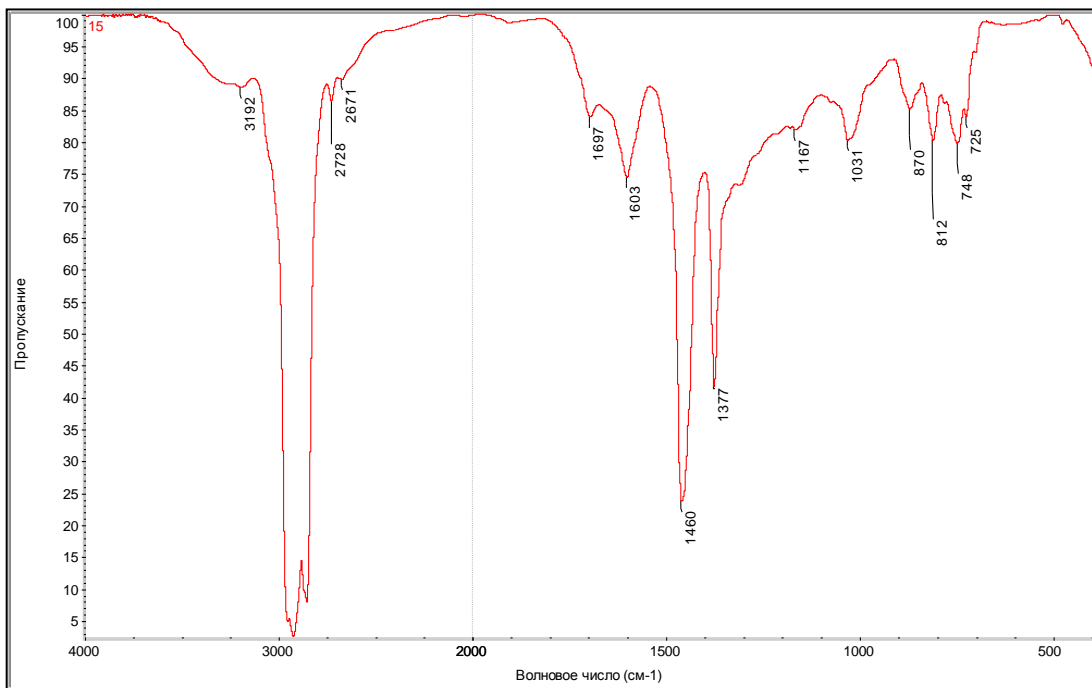
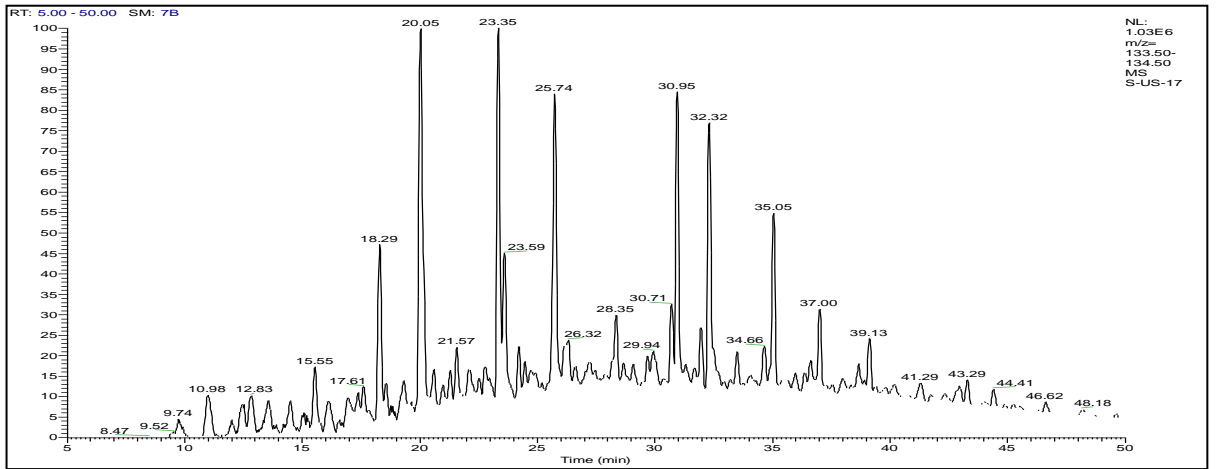
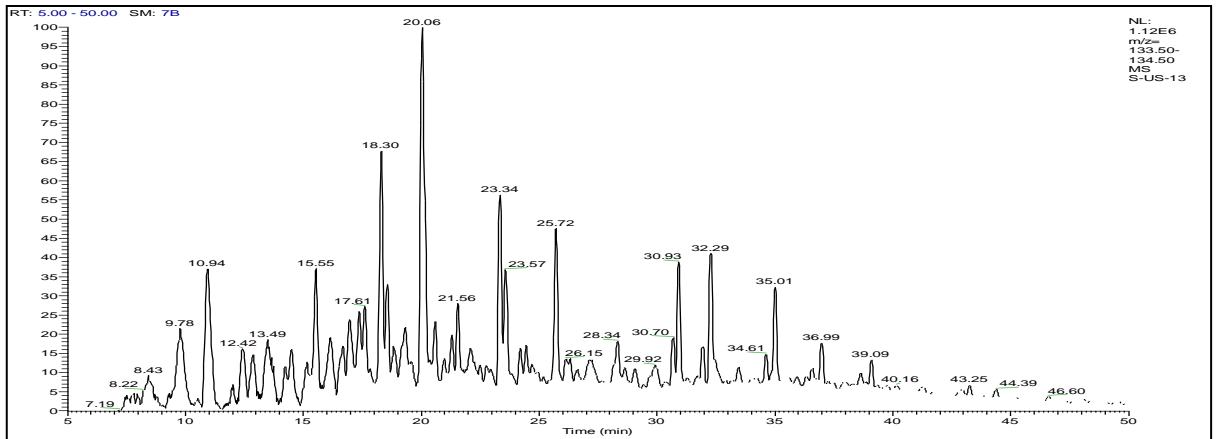


Рисунок 10 – ИК-спектр нефти месторождения Усинское после доотмыва 10 % композицией НИНКИ[®] с добавлением 0.2 % водной вытяжки свекольной кожуры (опыт)

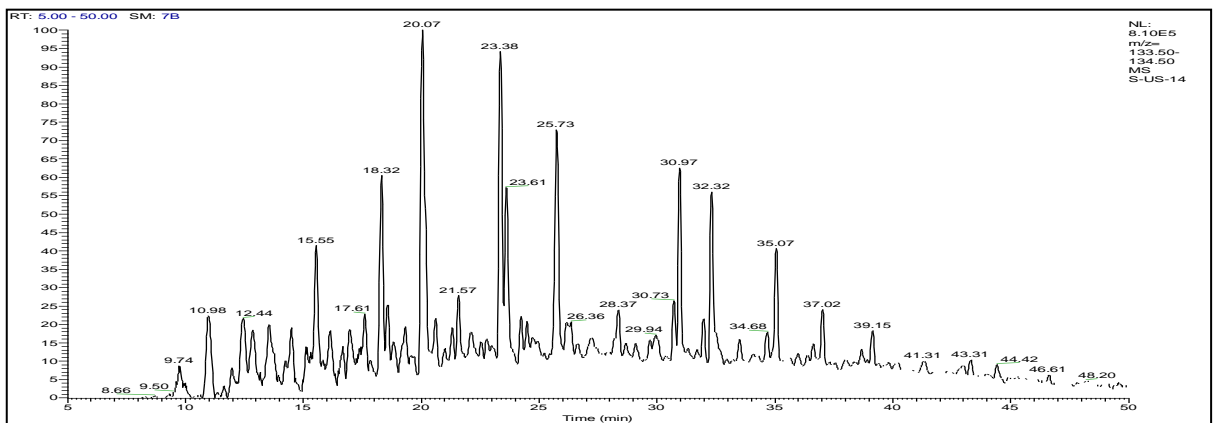
ПРИЛОЖЕНИЕ 3



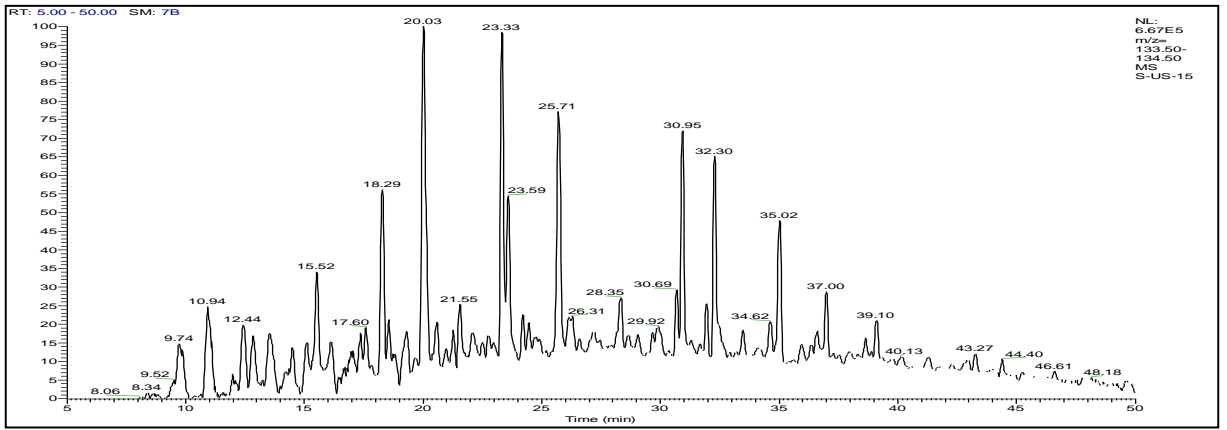
А



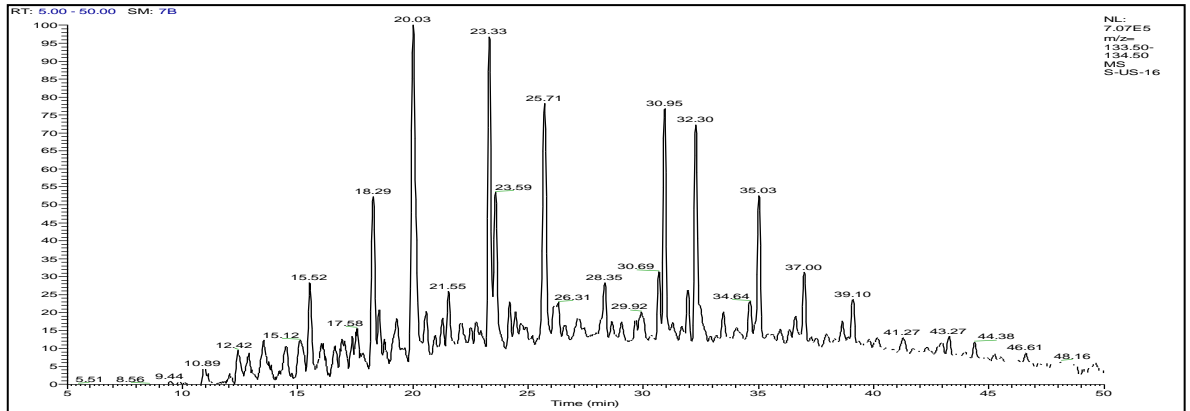
Б



B

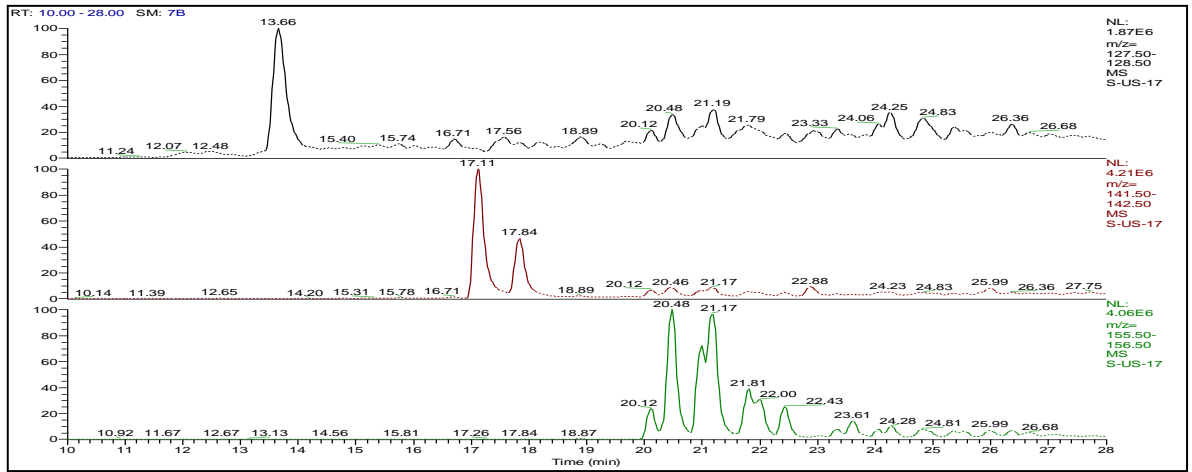


Г

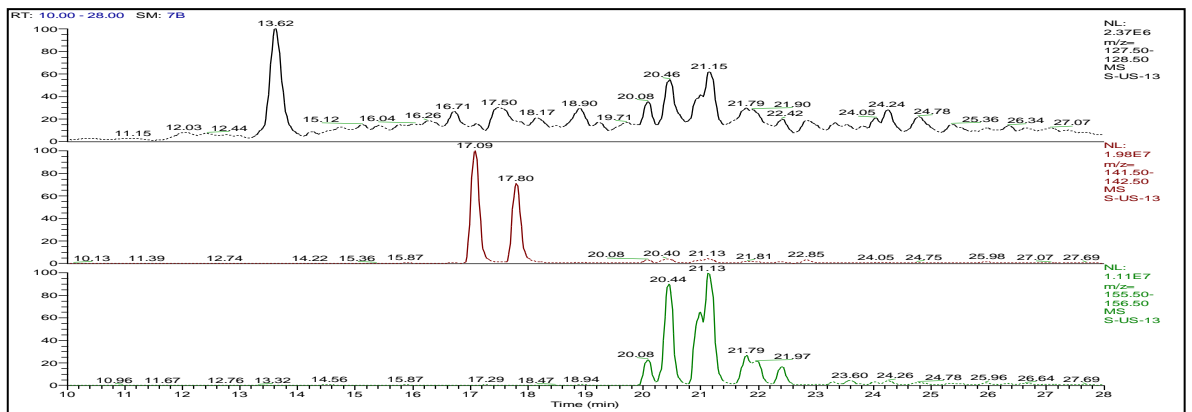


Д

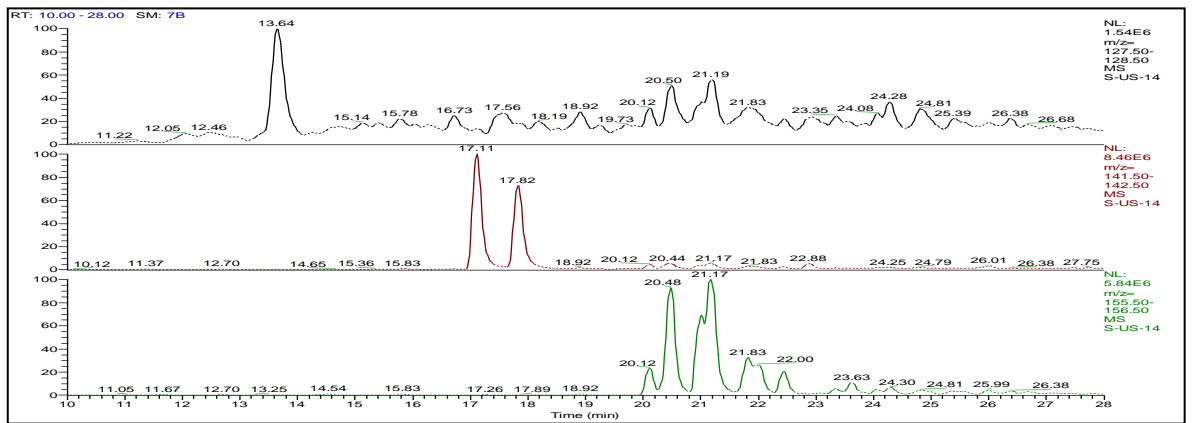
Рисунок 1 – Масс-фрагментограммы распределения тетраметилалкилбензолов (m/z 133) в образцах Усинских нефтей (А- исх. Образец, Б- 10% НИНКА, В- отходы жизнедеятельности лошади, Г- кожура свеклы, Д- соя)



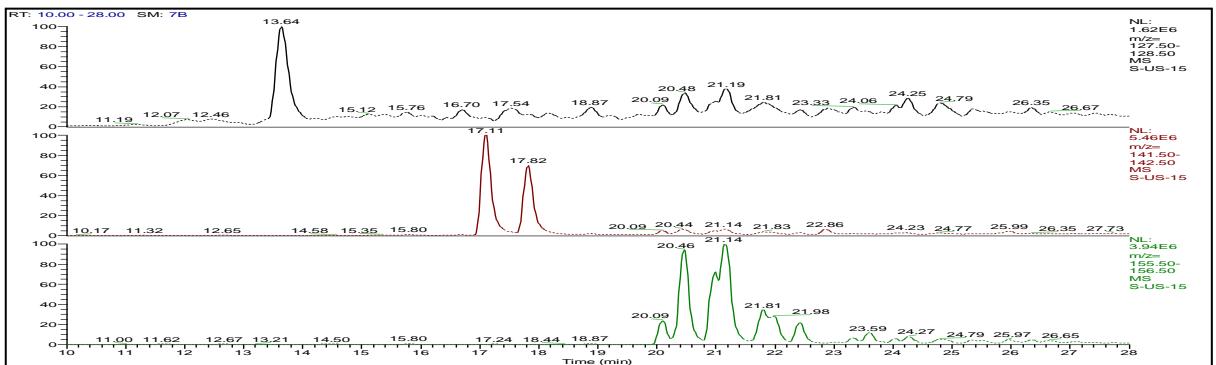
A



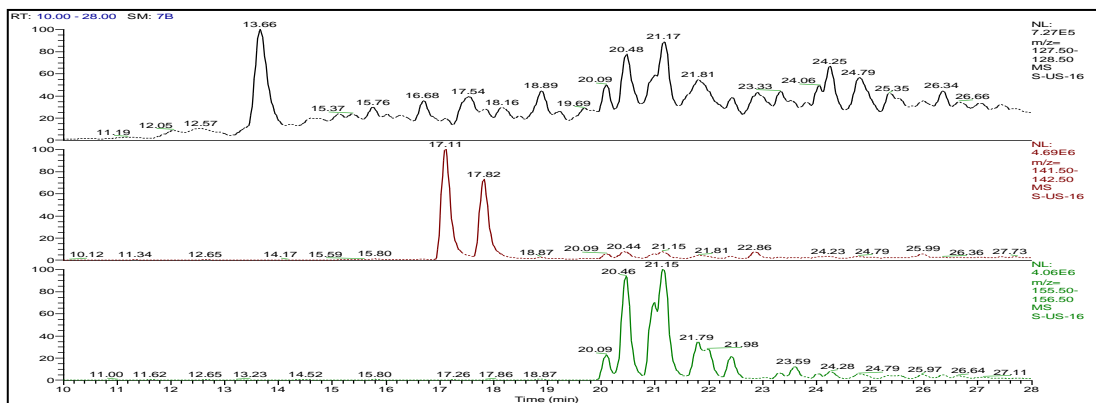
B



B

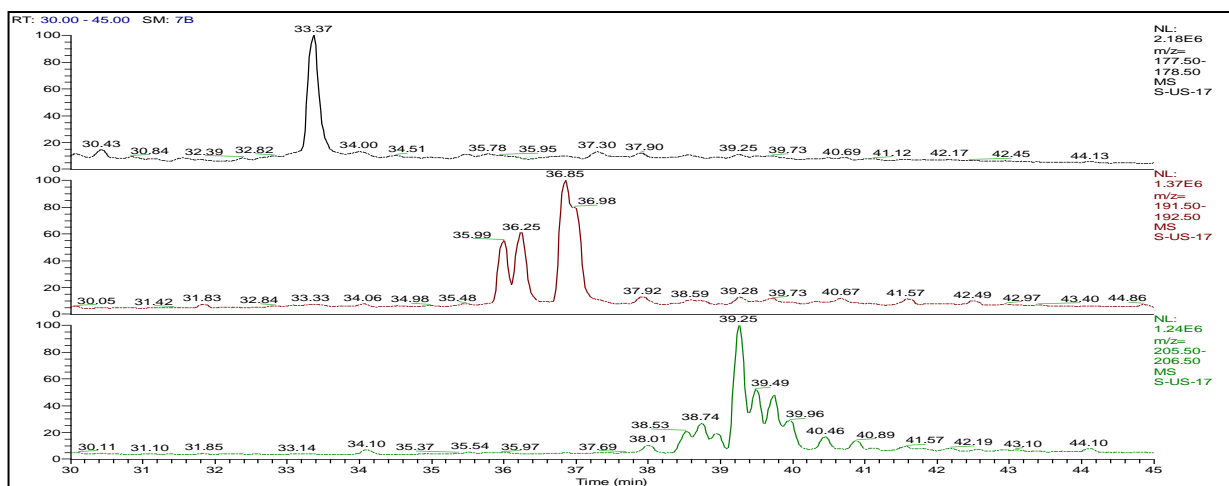


Г

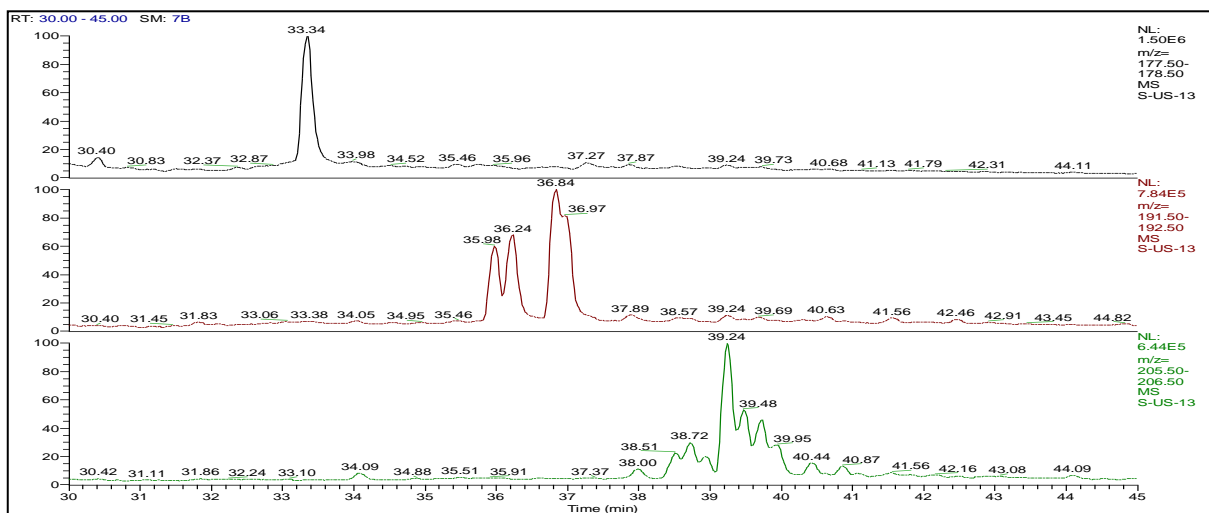


Д

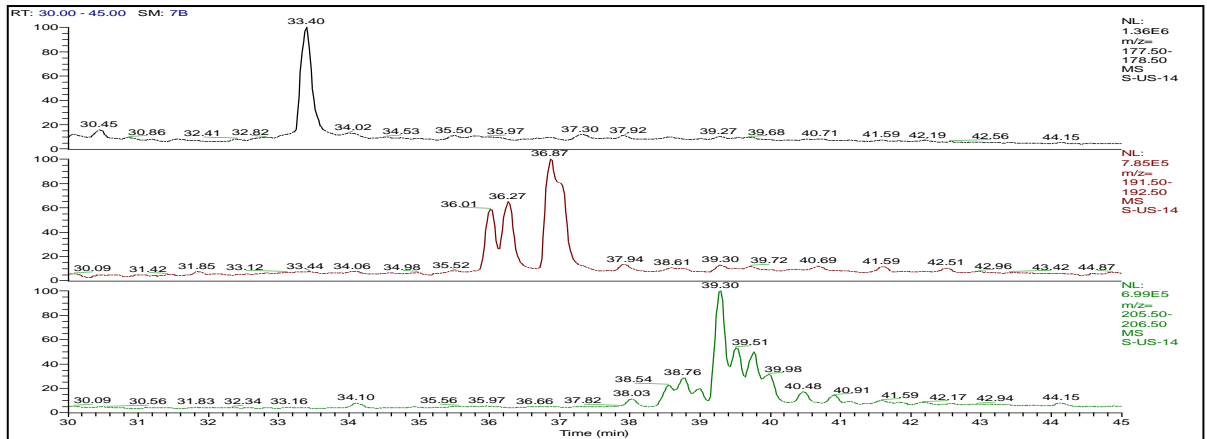
Рисунок 2 – Масс-фрагментограммы распределения нафталина (m/z 128) и его метил- (m/z 142) и диметилзамещенных (m/z 156) гомологов в образцах Усинских нефтей (А- исх. Образец, Б- 10% НИНКА, В- отходы жизнедеятельности лошади, Г- кожура свеклы, Д- соя)



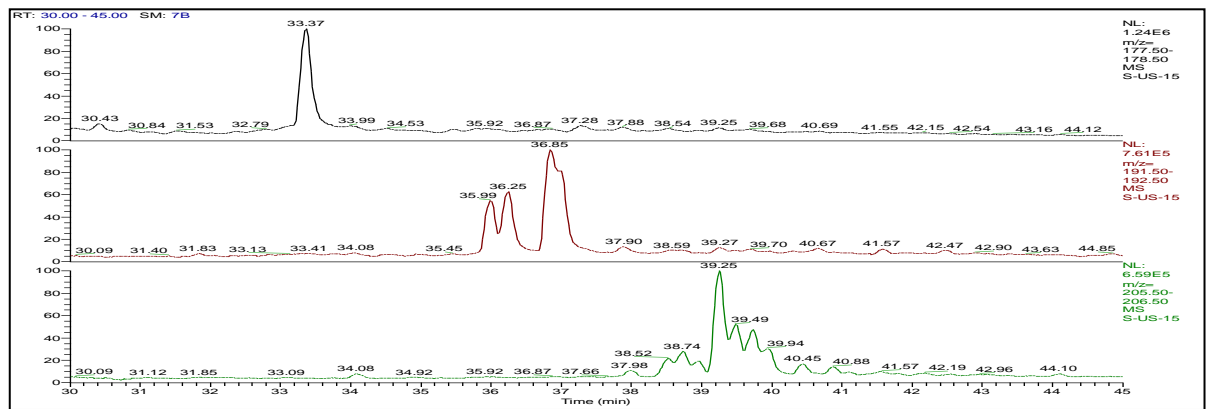
А



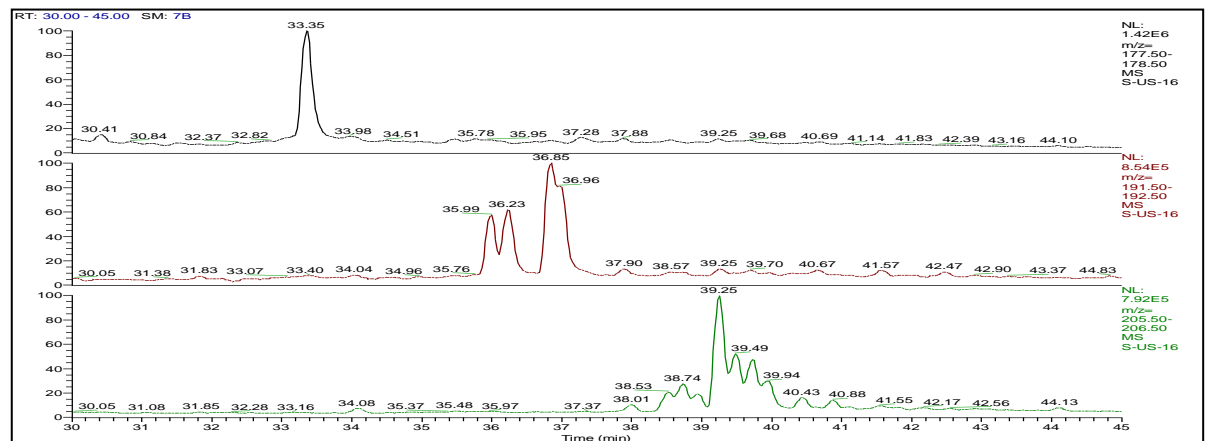
Б



B

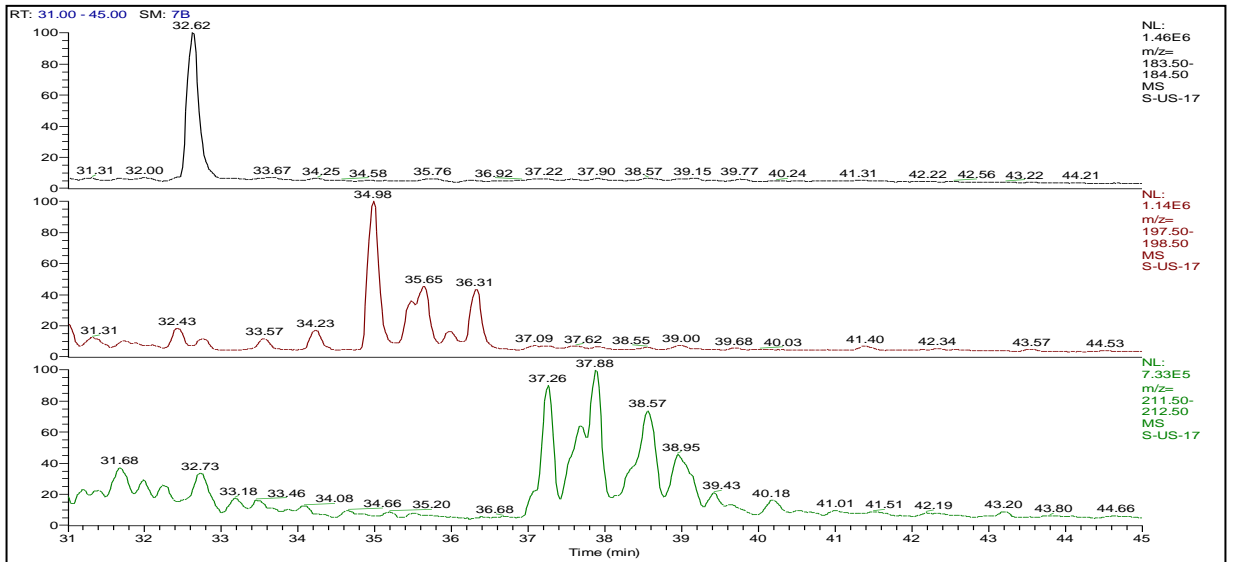


Г

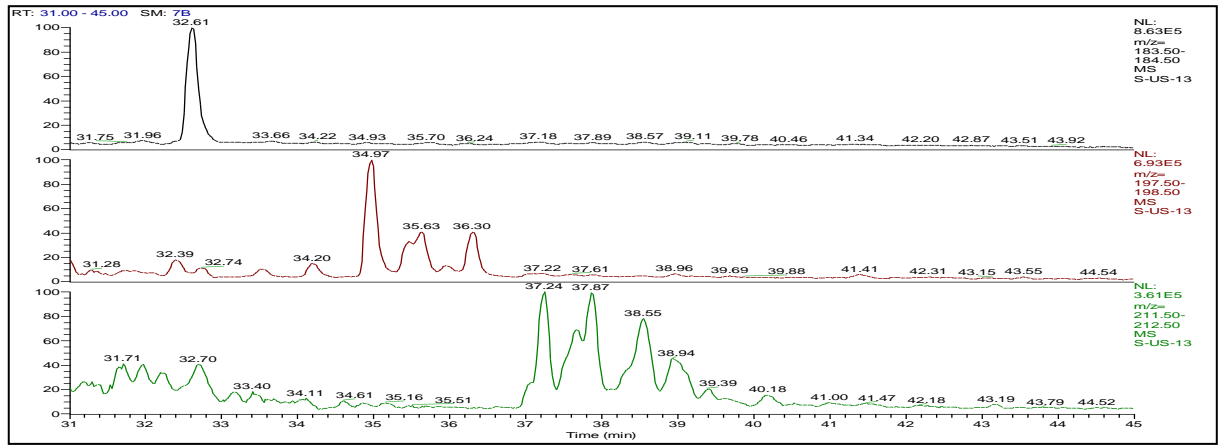


Д

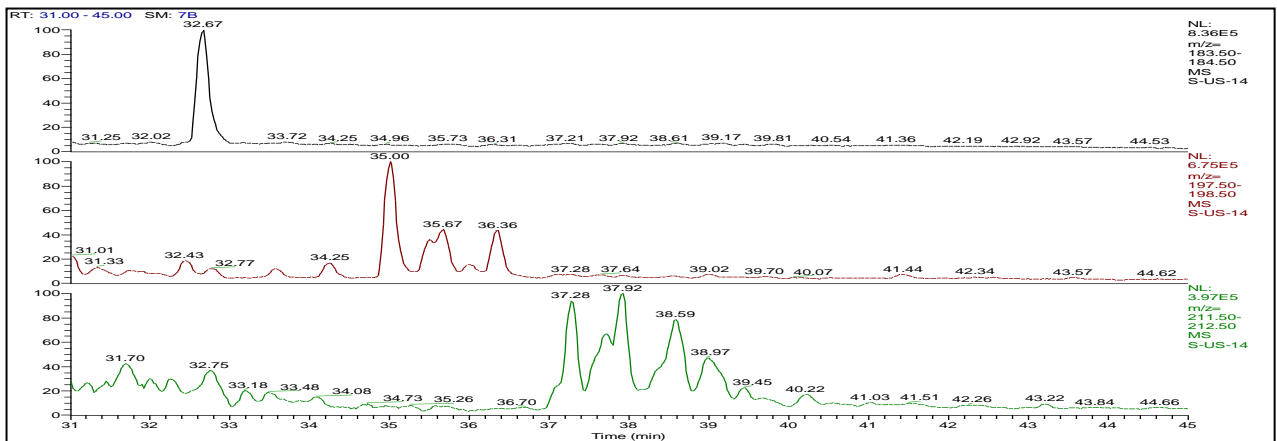
Рисунок 3 – Масс-фрагментограммы распределения фенантрена (m/z 178) и его метил- (m/z 192) и диметилзамещенных (m/z 206) гомологов в образцах Усинских нефтей (А- исх. Образец, Б- 10% НИНКА, В- отходы жизнедеятельности лошади, Г- кожура свеклы, Д- соя)



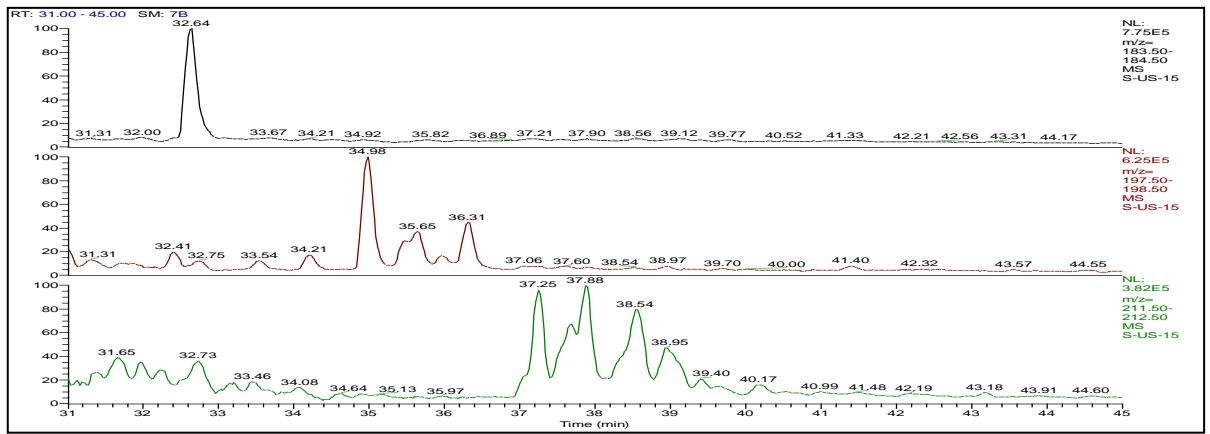
A



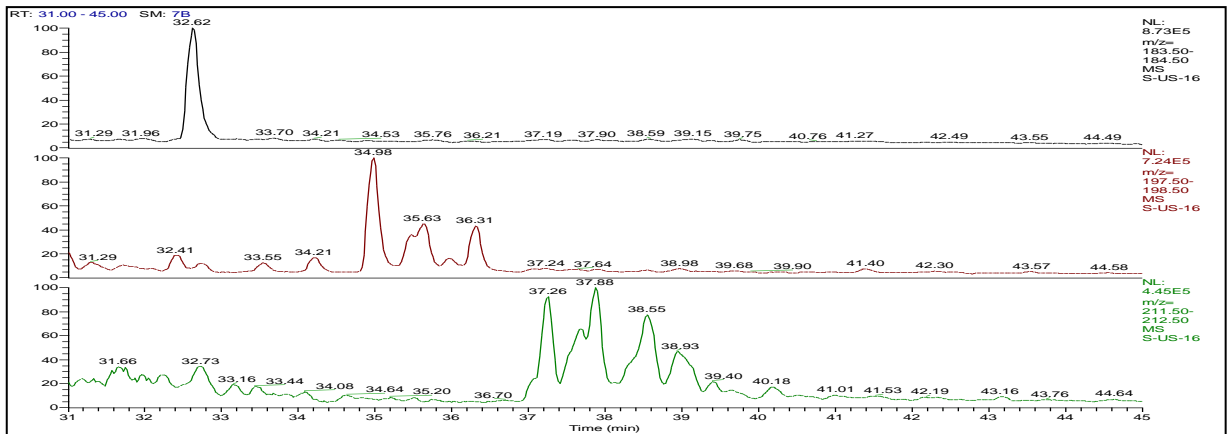
B



B

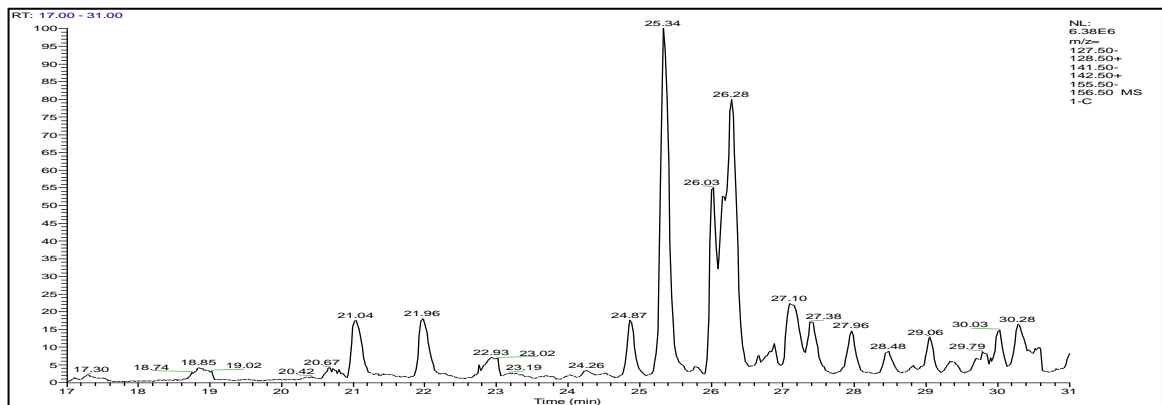


Г

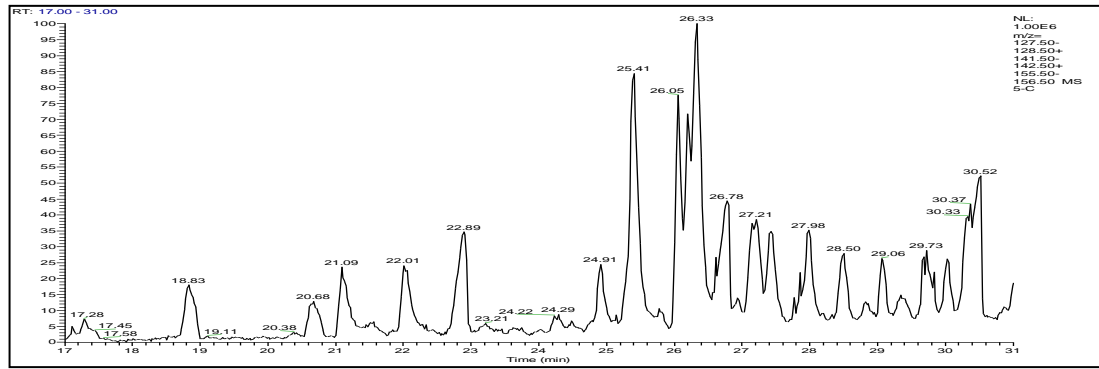


Д

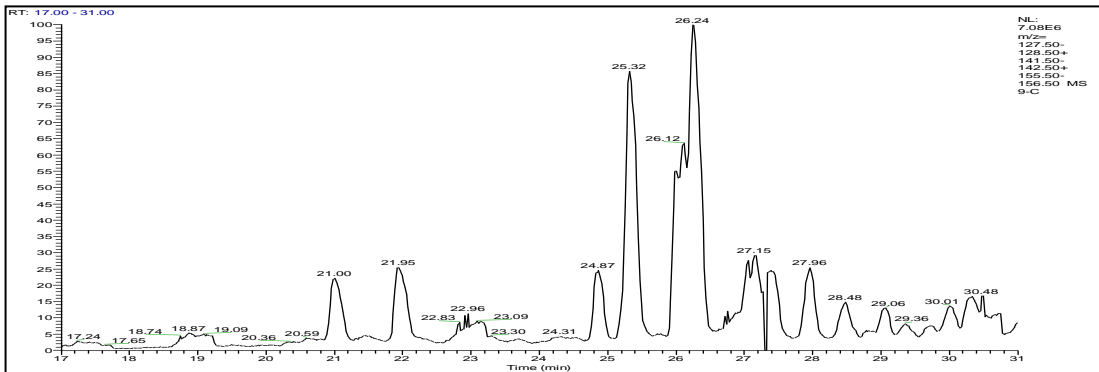
Рисунок 4 – Масс-фрагментогаммы распределения дибензотиофена (m/z 184) и его метил- (m/z 198) и диметилзамещенных (m/z 212) гомологов в образцах Усинских нефтей (А- исх. Образец, Б- 10% НИНКА, В- отходы жизнедеятельности лошади, Г- кожура свеклы, Д- соя)



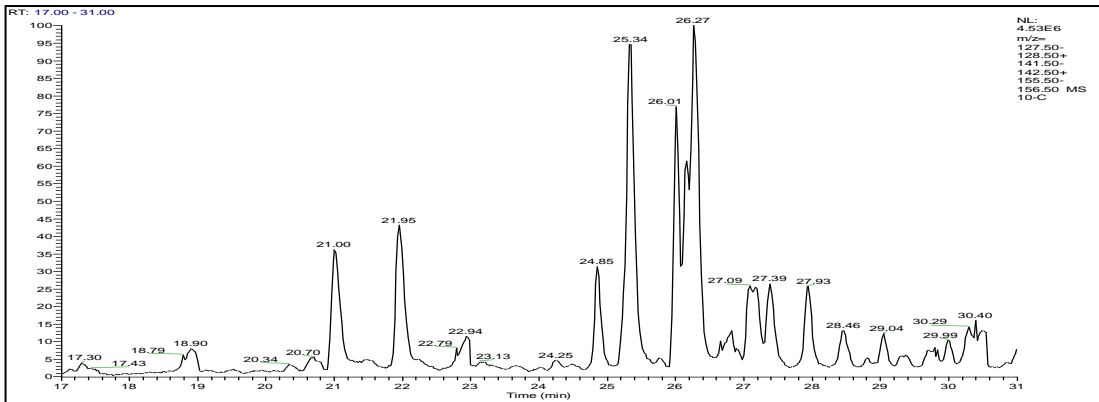
А



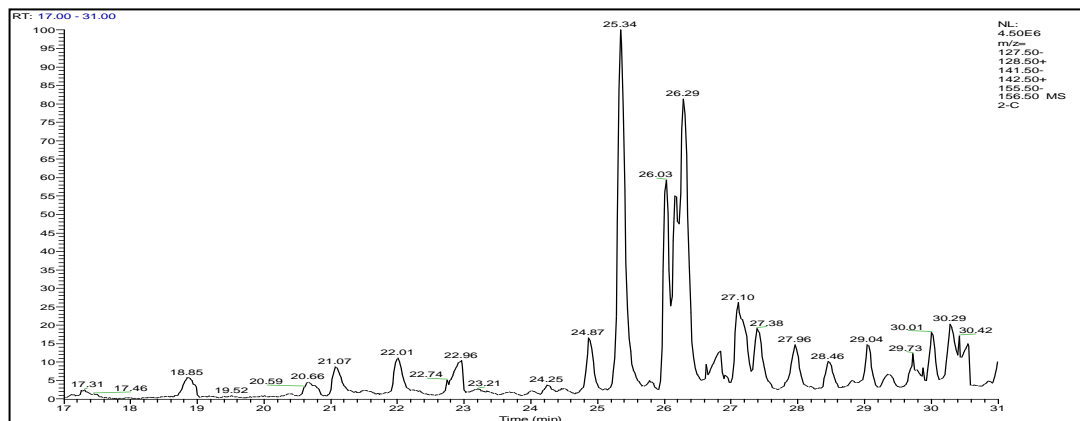
Б



B

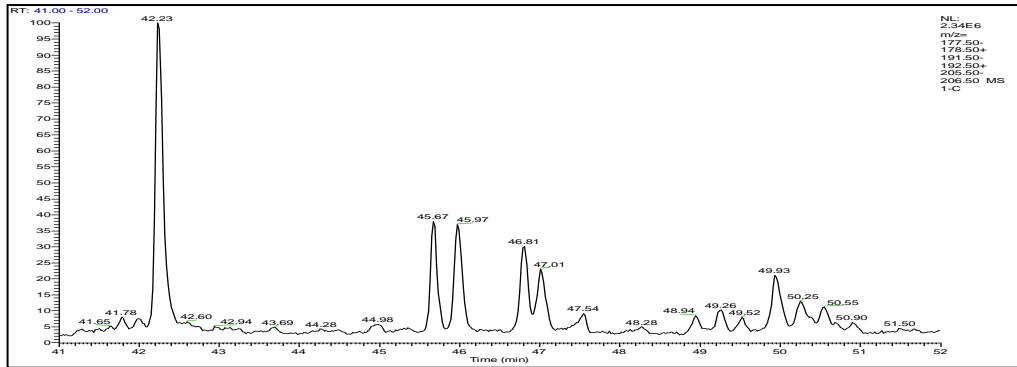


Г

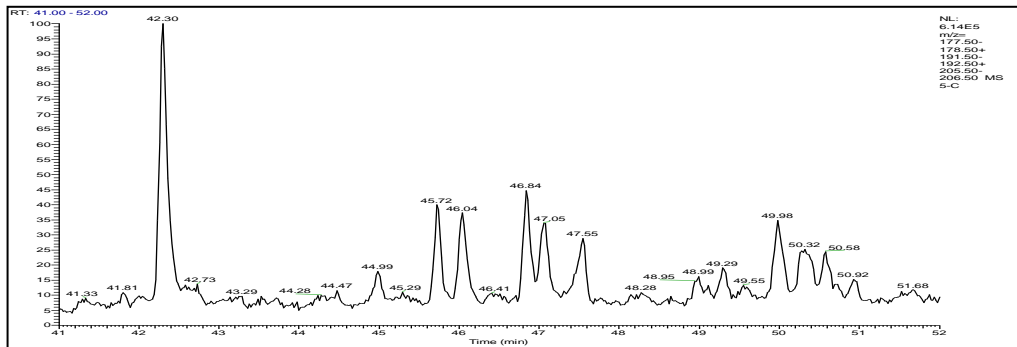


Д

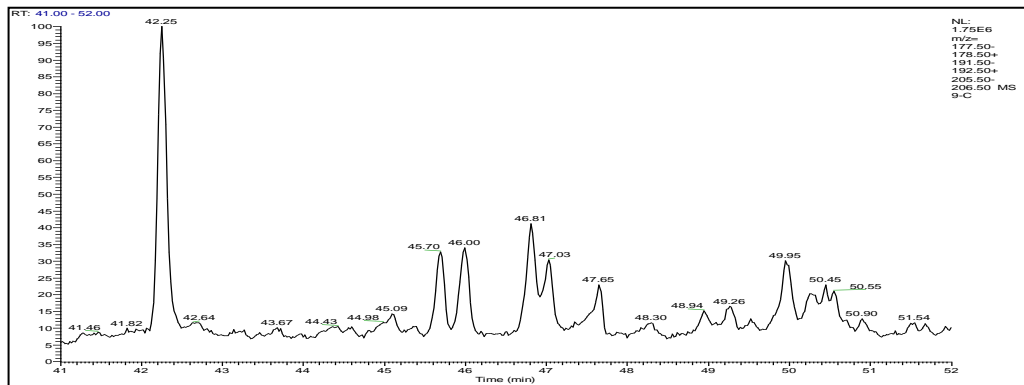
Рисунок 5 – Масс-фрагментограммы распределения нафталина (m/z 128) и его метил- (m/z 142) и диметилзместенных (m/z 156) гомологов в образцах нефти месторождения Цагаан- Элс (А- исх. Образец, Б- 10% НИНКА, В- отходы жизнедеятельности лошади, Г- кожура свеклы, Д- соя)



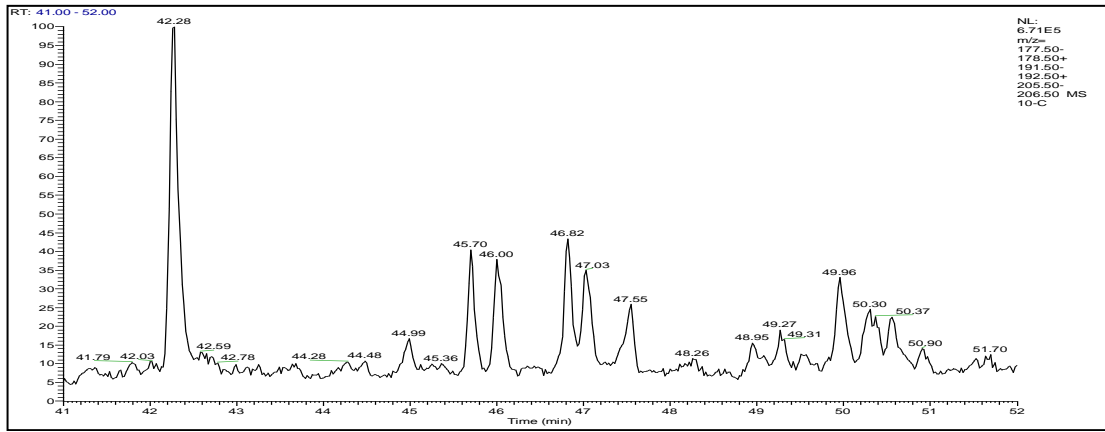
А



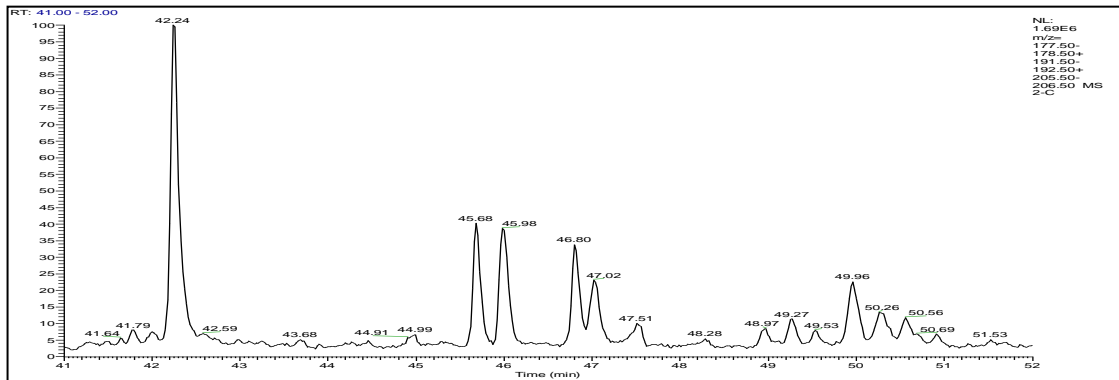
Б



В



Г



Д

Рисунок 6 – Масс-фрагментограммы распределения фенантрена (m/z 178) и его метил- (m/z 192) и диметилзамещенных (m/z 206) гомологов в образцах нефти месторождения Цагаан-Элс (А- исх. Образец, Б- 10% НИНКА, В- отходы жизнедеятельности лошади, Г- кожура свеклы, Д- соя)

Список использованной литературы

1. Антониади Д.Г. Состояние добычи нефти методами повышения нефтеизвлечения в общем объеме мировой добычи / Д.Г. Антониади, А.А. Валуйский, А.Р. Гарушев // Нефтяное хозяйство. 1999. – № 1. – С. 16-23.
2. Артеменко А. Тяжелая нефть и битумы могут стать сырьем XXI века / А. Артеменко, В. Кашавцев // «НЕФТЬ РОССИИ». Ноябрь 2003. – №11. (<http://www.oilru.com/nr/123/2253/>)
3. Антониади Д.Г. Состояние добычи нефти методами повышения нефтеизвлечения в общем объеме мировой добычи / Д.Г. Антониади, А.А. Валуйский, А.Р. Гарушев // Нефтяное хозяйство. 1999. – № 1. – С. 16-23.
4. Боксерман А. А. Разработка нефтяных и газовых месторождений / А. А. Боксерман, Н. Л. Раковский и др. // М.: ВИНТИ. 1975. – Т. 7. – 87 с.
5. Данилова Е. Тяжелые нефти России / Е. Данилова // The Chemical Journal. – декабрь 2008. – С. 34-37.
6. Полищук Ю.М. Высоковязкие нефти: Анализ пространственных и временных изменений физико-химических свойств / Ю.М. Полищук, И.Г. Ященко // Нефтегазовое дело. – 2005. № С.;
7. Алтунина Л. К. Увеличение нефтеотдачи залежей высоковязкой нефти композициями ПАВ, генерирующими в пласте CO₂ при паротепловом воздействии / Л.К. Алтунина, В.А. Кувшинов, И.В. Кувшинов // Материалы II Международного научного симпозиума «Теория и практика применения методов увеличения нефтеотдачи пластов». – Москва, 15-16 сентября 2009. – С. 195-201.
8. Алтунина Л.К. Увеличение нефтеотдачи низкопроницаемых пластов за счет применения систем на основе поверхностно-активных веществ / Л.К. Алтунина, В.А. Кувшинов, И.Ф. Ефремов, В.В. Новгородов // Нетрадиционные источники углеводородного сырья и проблемы его освоения: Тезисы докладов международного симпозиума. Санкт-Петербург.-12-16 октября.-1992.-С.-Пб.-1992.-Т.2.-С.109-110.

9. Аметов И. М. Добыча тяжелых и высоковязких нефтей / И. М. Аметов, Ю. Н. Байдииков, Л. М. Рузин, Ю. А. Спиридонов // – М.: Недра. 1985. – 205 с.
10. Гарушев А.Р., Высоковязкие нефти – сырье для нефтепереработки и металлургии / А.Р. Гарушев, М.Ю. Маликова, Ю.И. Сташок // Нефтяное хозяйство. – 2007. – № 11. – С. 70-71.
11. Максutow Р. Освоение запасов высоковязких нефтей в России / Р. Максutow, Г. Орлов, А. Осипов // «Технологии ТЭК». – 2005. – № 6. – С. 36-40.
12. Рузин Л.М. Совершенствование методов разработки высоковязких нефтей Усинского месторождения с применением физико-химических и микробиологических методов / Л.М. Рузин // Институт ПечорНИПИнефть ООО «Лукойл-Коми».
13. Сургучев М.Л. Методы извлечения остаточной нефти / М.Л. Сургучев, А.Т. Горбунов, Д.П. Забродин, Е.А. Зискин, Г.С. Малютина // - М.: Недра. 1991.
14. Современные методы увеличения нефтеотдачи пластов / Под ред. проф. М.Т. Абасова - М.: Наука.-1992.-136с.- ISBN 5-02-002203-9
15. Кудинов В. И. Совершенствование тепловых методов разработки месторождений высоковязких нефтей/ В. И. Кудинов. – М.: «Нефть и газ». 1996. – 284 с.
16. Раковский Н. Л. Тепловая эффективность нагнетания теплоносителей в слоисто-неоднородные пласты // Нефтяное хозяйство. –1982. – № 11.
17. Назьев В. Остаточные, но не второстепенные/ В. Назьев // Нефтегазовая вертикаль. – 2000. – №3. – С. 21-22.
18. Бурже Ж. Термические методы повышения нефтеотдачи пластов / Ж. Бурже, П. Сурио, М. Комбарну // М.: Недра. 1988. – С. 424.
19. Байбаков Н. К. Тепловые методы разработки нефтяных месторождений / Н.К. Байбаков, А. Р. Гарушев // – М.: Недра. 1988. – 344 с.
20. Мустаев Я. А. Влияние температуры на коэффициент вытеснения нефти водой / Я. А. Мустаев, И. И. Мавлютова, В. В. Чеботарев // Нефть и газ. 1970. – № 11. – С. 65-68.

21. Малофеев Г. Е. К расчету распределения температуры в пласте при закачке горячей воды в скважину / Г. Е. Малофеев // Нефть и газ. – 1960. – № 7. – С. 5.
22. Беляев С.С. Разработка и применение биотехнологии повышения нефтеизвлечения на месторождениях Татарстана – Новые идеи, поиска, разведки и разработки нефтяных меторождений / С.С. Беляев, И.А. Борзенков, И.Ф. Глумов и др. // Казань: Таткнигоиздат. 2000. – С. 370-374.
23. Абрамзон А.А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение: учебное пособие для ВУЗов / А.А. Абрамзон, Л.П.Зайченко, С.И. Файнгольд // Л.:Химия. 1988. – 200с.
24. Алтунина Л.К. Применение термообратимых полимерных гелей для увеличения охвата при паротепловом воздействии на залежи высоковязких нефтей / Л.К. Алтунина, В.А. Кувшинов, Л.А. Стасьева, В.П. Дорохов // Теоретические и прикладные основы физико-химического регулирования свойств нефтяных систем. Часть III. Сборник трудов СО РАН. – Томск: ТГУ. 2001. – С. 3-12.
25. Стахина Л.Д. Состав и свойства высоковязких нефтей Усинского месторождения, полученных при использовании физико-химических методов увеличения нефтеотдачи / Л.Д.Стахина, О.В.Серебренникова, С.Н. Шерстюк // Материалы VII Международнойконференции “Химия нефти и газа”, Томск: Изд. Института оптики атмосферы СО РАН. 2009. – С.353-356.
26. Химические методы в процессах добычи нефти /Под ред. Н. М. Эммануэля, Г. Е. Заикова – М. : Наука, 1987. – 239 с.
27. Fletcher P.D.I., Strey R. Surfactant Science //Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2002. V.7. P. 1-2].
28. Балинт В. Применение углекислого газа в добыче нефти / В. Балинт, А. Бан, Ш. Долешал, П.И. Забродин, Я. Терек. – М.: Недра, 1977. – 240 с.
29. Алтунина Л.К. Физико-химические технологии института химии нефти СО РАН для увеличения нефтеотдачи залежей высоковязких нефтей / Л.К.

- Алтунина, В.А. Кувшинов // Материалы VI международной конференции “Химия нефти и газа”. – Т.1. Томск. Изд. ИОА СО РАН. 2006. – С. 8-14.
- 30.Леонов В.В. О механизме повышения нефтеотдачи при микробиологическом воздействии на пласт. Окислительно-восстановительные процессы в нефтепромысловых водах / В.В. Леонов, Л.Н. Загидуллина, Р.Н. Фахретдинов и др.//Нефтепромысловое дело.- 1998.-№2.-С.20-23.
- 31.Назина Т.Н. Микроорганизмы нефтяных пластов и использование их в биотехнологии повышения нефтеотдачи. Дисс. д-ра биол. наук. М., Институт микробиологии РАН. – 2000. – 67 с.
- 32.Костина Г.Микробы - нефтяным магнатам. / Г. Костина. // «Эксперт».- 2005.- № 18.- С.465.
- 33.Иванов М.В., Беляев С.С., Лауринавичус К.С., Образцова А.Я., Горлатов С.Н. Распространение и геохимическая деятельность микроорганизмов в заводняемом нефтяном месторождении// Микробиология. 1982. Т. 1. № 2. С. 336-341;
34. Изжеурова В.В. Направленная селекция биоценоза активного ила, разрушающего нефтепродукты / В.В. Изжеурова, Н.И. Павленко, З.А. Раилко // Химия и технология воды. – 1991. – Т.13,№1. – С.76-79
- 35.Сафонов Е.Н. Применение новых методов увеличения нефтеотдачи на месторождениях Башкортостана / Е.Н. Сафонов, И.А.Исхаков, К.Х. Гайнуллин и др. // Нефтяное хозяйство.– 2002. – №4. – С. 38-40.
- 36.Сваровская Л. И. Вытеснение остаточной нефти активизированной микрофлорой месторождений Западной Сибири / Л. И. Сваровская, Л. К. Алтунина, З. А. Роженкова, И. В. Назина // Нефтехимия. – 1996. – Т. 36. – № 1. – С. 49-52
- 37.Кузнецов З.И. Роль денитрифицирующих бактерий в образовании биогенного азота в подземных водах./ З.И.Кузнецов // В сб. «Вопросы геохимии подземных вод». Труды ВСЕГИНГЕО. Вып. 20.- С.146.
- 38.Милехина Е.И. Свойства углеводородокисляющей бактерии *Rhodococcus erythropolis*, изолированной из нефтяного месторождения / Е.И. Милехина,

- И.А. Борзенков, И.С. Звягинцева // Микробиология. –1998. –Т.67. – №3. –Р. 328-332.
39. Bryant R.S. Microbial enhanced waterflooding: a pilot study / R.S. Bryant, T.E. Burchfield, D.M. Dennis and others // Division of Petroleum Science. 1991. –V.31. – P. 399-419.
40. Юлбарисов Э.М. Применение биогeотехнологии увеличения нефтеотдачи в высокотемпературных пластах Западно-Сибирской плиты / Э.М. Юлбарисов, Р.Г. Рамазанов, К.Х. Рахмангулов, В.А. Жуков // Интервал.- 2000.- № 4-5. С. 16-18.
41. Юлбарисов Э.М. Геологические основы применения микробиологического метода повышения нефтеотдачи пласта с высоковязкой нефтью (на примере Арланского месторождения) / Э.М. Юлбарисов.- Уфа: УИТиС АНК «Башнефть».- 2002.- 167 с.
42. Юлбарисов Э.М. Микробиологический метод увеличения нефтеизвлечения / Э.М. Юлбарисов // Нефтяное хозяйство.- 1991.- № 1- С. 28-30.
43. Сваровская Л. И. Биодegradация углеводородов нефти пластовой микрофлорой месторождений Западной Сибири / Л. И. Сваровская, Л. К. Алтунина // Нефтехимия. – 1999. – Т. 39. – № 2 – С. 148-152.
44. Котенев Ю. А. Микробиологический метод увеличения нефтеотдачи пластов на основе активного ила биологических очистных сооружений / Ю. А. Котенев, Л. Н. Загидуллина, В. Е. Андреев, П. М. Зобов, О. Ф. Кондрашев, В. М. Хусаинов, Н. Ф. Гумаров, И. М. Назмиев // Нефтяное хозяйство. –2004. – №4. – С. 48-50.
45. Назина Т.Н. Микробиологическая и геохимическая характеристика карбонатных нефтяных коллекторов Татарии / Т.Н. Назина, А.Е. Иванова, Г.Ф. Кандаурова, Р.Р. Ибатуллин, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – № 5. – С. 694-700.
46. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Высш. шк., 2001. – 384 с.

- 47.Беляев С.С. Активизация современной геохимической деятельности пластовой микрофлоры как основа биотехнологии повышения нефтеизвлечения / С.С. Беляев, И.А. Борзенков, И.Ф. Глумов, Р.Р. Ибатуллин, Е.И. Милехина, М.В. Иванов // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – № 6. – С. 851-858.
- 48.Жизнь микробов в экстремальных условиях. Пер с англ. / Под. Ред. Д. Кашнера. – М: Мир, 1981. – 521 с.
- 49.Иванов М.В., Распространение и геохимическая деятельность микроорганизмов в заводняемом нефтяном месторождении/ С.С. Беляев, К.С. Лауринавичус, А.Я. Образцова, С.Н. Горлатов. // Микробиология. 1982. – Т. 1. – № 2. – С. 336-341;
- 50.Лебедева Н.А. Перспективы развития микробиологических технологий в XXI веке/ Н.А. Лебедева, А.З. Гарейшена, Т.А. Кузнецова // Нефтяное хозяйство.- 2000.- № 11.- С.7-11.
- 51.Сургучев М.Л. Вторичные и третичные методы увеличения нефтеотдачи пластов. М: Недра. 1985. – 308 с.
- 52.Назина Т.Н. Микробиологические исследования пластовой воды Ромашкинского месторождения в процессе испытания биотехнологии повышения нефтеотдачи / Т.Н. Назина, А.Е. Иванова, Г.Ф. Кандаурова, Р.Р. Ибатуллин, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Микробиология. – 1999. Т. 68. – № 2. – С. 252-260.
53. Лобанок А.Г. Биотехнология микробных ферментов / А.Г. Лобанок, Н.И. Астапович, Р.В. Михайлова и др. –Минск: Наука и техника, 1989. –205с.
- 54.Назина Т.Н. Результаты испытания микробиологического метода повышения нефтеотдачи в условиях карбонатного коллектора Ромашкинского нефтяного месторождения. Биохимические и продукционные характеристики / Т.Н. Назина, А.Е. Иванова, В.С. Ивойлов // Микробиология. – 1999.. – № 2. – С. 261-266.
- 55.НазинаТ.Н.
Интродукция*Clostridiumtyrobutyricum*имелассывнефтянойпластРомашкинского месторожденияивлияниеенаразвитиемикробиологическихпроцессов

- пласте/ Т.Н. Назина, А.Е. Иванова, М. Вагнер, Б. Циран, Р.Р. Ибатуллин, Г.Ф. Кандаурова, Ю.М. Миллер, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Микробиология. – 1996. –Т. 65. – № 3. – С. 403-408.
- 56.Алтунина Л.К. Комплексный физико-химический и микробиологический метод увеличения нефтеотдачи вязких нефтей низкотемпературных залежей Монголии / Л.К. Алтунина, Л.И. Сваровская, Т. Гэрэлмаа // Нефтехимия. – 2013. – Т. 53. – № 2. – С. 101–106.
- 57.Овсянникова В.С. Влияние микробиологического воздействия на углеводородный состав нефти при увеличении нефтеотдачи пластов нефтеснижающими композициями с регулируемой щелочностью: дисс. канд. хим. наук / В.С. Овсянникова.- Томск, 2008. – 154 с .
- 58.Кучерявый В.И. Синтез и применение карбамида / В.И. Кучерявый, В.В.Лебедев // Химия. Л. 1970.
- 59.Черная А.В. Одновременное фотометрическое определение мочевины и гидрозиона в промстоках / А.В. Черная, И.Г. Перьков, А.В. Дрозд // Заводская лаборатория. –1985. – № 5. – С. 14.
- 60.Юодвальките Д.Ю. Штамм *Staphylococcus saprophyticus* L-1.10-v. – Продуцент уреазы / Д.Ю. Юодвальките, А.А. Глемжа, И.Ю. Гальвидис, Ю.Ф. Василюскас // Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной энзимологии. SU 990813. Опубликовано 23.01.1983. Бюллетень № 3
- 61.Горелова Ю.С. Ускоренный метод определения карбамида в водных, спиртоводных и углеводородных растворах / Ю.С. Горелова, Р.М. Абзалов, П.Л. Ольков, Е.Ю. Горелова, Ф.С. Бактермиров // Заводская лаборатория. – 1992. – № 11. – С. 14-16
- 62.Бабич О.О. Изучение основных фенотипических признаков и биохимических свойств микроорганизмов фруктов и овощей / О.О. Бабич, К.В. Карчин, О.О. Шишко, С.А. Сухих, М.И. Зимица [Электронный ресурс]: http://www.rusnauka.com/9_SNP_2015/Biologia/6_187473.doc.html.
- 63.Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача./А.Ш. Бышевский, О.А. Терсенов // Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. – 384 с.

64. Гриценко А.И. Экология / А.И. Гриценко, Г.С.Акопова, В.М.Максимов // Нефть и газ. М.: Наука. 1997. – 557 с.
65. Розанова Е.П. Использование углеводов микроорганизмами. // Успехи микробиологии. – 1967. – № 4. – С.61-69.
66. Литвиненко С.Н. Защита нефтепродуктов от действия микроорганизмов.- М.: Химия. - 1977. – 144 с.
67. Degley S. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. – Adv. MicrobialPhysiol. 1971. №6. 1-8.
68. Eduardo Diaz. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility // International microbiology. – 2004. – №7. –P. 173–180.
69. Fonken G.S., Johnson R.A. Chemical oxidations with microorganisms / New York, 1972. – 240 p.
70. Hofrichter M., Fritsche W, Aerobic degradation by Microorganisms Biotechnology / H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P. Stadler, J. Klein // Weinheim, Wiley-VCH. Environmental Process II. Soil Decontamination. 2000. 11b(6): - P. 147-167.
71. Perry J. J. Microbial metabolism of cyclic alkanes // Petroleum microbiology. MacMillan Publishing Company, N.Y. 1984. –P. 61-98.
72. Thomas J. Enhanced Oil Recovery – An Overview // Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP. 2008. –Vol. 63. – No. 1. – P. 9-19.
73. New Horizons in Biotechnology. 2003, pp 241-250. Application of Bio-Hydrolyzer for the Treatment of Urea Bearing Wastewater. P. P. Pathe, T. Nandy, S. N. Kaul C. V. Deshpande, L. Szpyrkowicz
74. Microbially enhanced oil recovery from carbonate reservoirs / R.S. Tanne, E.O. Udegbunam, M.I. McInerney, R.M. Knapp // J. Geomicrobiol. J. – 1991. – V.9. – № 4. – P. 169-195.
75. Карбан В. И. О химизме и физико-химических особенностях процессов микробиологического окисления углеводов нефти / В. И. Карбан, Р.В. Кучер, Н.И. Мироненко // Успехи химии.-1969.- Т.38. Вып.3.-С.539- 554.

76. Walker J.D. Microbial petroleum degradation: application of computerized mass-spectrometry / J.D. Walker, R.R. Colwell, L. Petrakis // *Can J Microbiol.* – 1975. – № 21(11). – С. 1760-1767;
77. Бирштехер Э. Нефтяная микробиология. Введение в микробиологию нефтяной промышленности. Пер с англ. Е.А. Пузыревой / Под ред. М.Ф. Двали, Т.Л. Симаковой. – Ленинград: ГНТИ нефтяной и горно-топливной литературы, 1957. – 314 с.
78. Oliver B. *Petroleum Microbiology* / B. Oliver, M. Magot // ASM Press. New York 2005. – 365 с.
79. Jurtahuk P. The mechanism of hydrocarbon oxidation by a *Corynebacterium* species / P. Jurtahuk, G.E. Cardini // *Critical Review Microbiology.* – 1971. – №1. – P.239-289.
80. Герасимова Н.Н. Гетероорганические соединения тяжелых нефтей Усинского месторождения / Н.Н. Герасимова, Е.Ю. Коваленко, Р.С. Мин, Т.А. Сагаченко, В.П. Сергун, С.С. Яновская // “Химия и нефти газа: Материалы VII Международной конференции.” Томск: Изд. Института оптики атмосферы СО РАН. 2009. – С. 97-101.
81. Геннадиев А.Н. Геохимия полициклических ароматических углеводородов в горных породах и почвах / А.Н. Геннадиев, Ю.И. Пиковский, В.Н. Флоровская, Т.А. Алексеева, И.С. Козин, А.И. Оглоблина, М.Е. Раменская, Т.А. Теплицкая, Е.И. Шурубор // М.: Изд-во МГУ. 1996. – С. 196.
82. Миронов О. Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря / О. Г. Миронов // *Морской экологический журнал.* 2002. – № 1. – Т. I. – С. 56-66.
83. Пунтус И.Ф. Выделение и характеристика микроорганизмов-деструкторов полициклических ароматических углеводородов / И.Ф. Пунтус, А.Е. Филонов, И.А. Кошелева, Р.Р. Гаязов, А.В. Карпов, А.М. Боронин // *Микробиология.* – 1997. – Т. 66. – №2. – С. 269-272.
84. Петров Ал. А. Углеводороды нефти. – М.: Наука. 1984. – 264 с.

85. Суворцева Э.Г. Разрушение ароматической фракции нефти ассоциацией грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов / Э.Г. Суворцева, В.С. Ивойлов, С.С. Беляев // Микробиология.- 1997.-Т.66.-№1.-С.78-83.
86. Давыдова М.Н. Анаэробная трансформация нефти под действием экстракта клеток *Desulfovibrio desulfuricans* / М.Н. Давыдова, Ф. К. Мухитова, Р.Р. Ибатулин // Микробиология.-1998.-Т. 67. №2. –С. 202-207.
87. Аристовская Т.В. Большой практикум по микробиологии.- М.: Высшая школа, 1962. – 490 с.
88. Определитель бактерий Берджи.: пер. с англ. // под ред. Дж. Хоулта и др. – М.: Мир.1997. –Т. 1. – 432 с.
89. Большой практикум по микробиологии/ Г. Л. Селибера и др.; под ред. Г. Л. Селибера. – М.: Высшая школа, 1962. – 491с.
90. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв / Ф.Х. Хазиев. – М.: Наука, 1976. – 179
91. Воскресенский П.И. Техника лабораторных работ.– М.: Химия, 1973.- 717 с.
92. Другов Ю.С., Родин А.А. Анализ загрязненной почвы и опасных отходов. Практическое руководство. М.: Бином. Лаборатория знаний. – 2007. – 424 с.
93. Инструментальные методы исследования нефти/ под ред. канд. хим. наук Г.В. Иванов.- НОВОСИБИРСК: Наука.- 1987.-133с.
94. Филатов Д.А. Оценка процессов биодеструкции нефти методами ИК и ЯМР¹Н спектроскопии / Д.А. Филатов, Л.И. Сваровская, Т.Гэрэлмаа, Л.К. Алтунина. // Нефтехимия. –2009.- Т. 49. № 2. -С. 153-158.
95. Большаков Г. Ф. Инфракрасные спектры насыщенных углеводород. Часть 1 Алканы. Новосибирск: Наука.- 1986.-С. 3-32.
96. Соколов В.И., Колбин М.А. Жидкостная хроматография нефтепродуктов: М.: Химия, 1984.
97. Инишева Л.И. Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов / Л.И. Инишева, С.Н. Ивлева, Т.А. Щербакова // Томск. Изд-во Томского университета. 2003. –С. 50-60.

98. Розанова Е.П., Кузнецов С.И. Микрофлора нефтяных месторождений. / Е.П.Розанова, С.И.Кузнецов.- М.: Изд. «Наука», - 1974. – С.200.
99. Квасников Е.И. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах /Е.И. Квасников, Т.М.Клюшникова // – Киев: Наукова думка. 1981. – 131 с.
100. Химический состав и питательная ценность корнеплодов. Часть 3 [Электронный ресурс] Режим доступа <http://www.activestudy.info/ximicheskij-sostav-i-pitatelnaya-cennost-korneplodov-chast-3> свободный.-Загл.сэкрана.