

IRSTI: 34.27.21

A.K. YERNAZAROVA, G.K. KAIYRMANOVA*, U.T. SHAIMERDENOVA,
R.B. MAGMIYAYEV, A.R. ISLAMOVA
Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: kaiyrman@kaznu.kz

IDENTIFICATION OF INDIGENOUS CULTURES OF MICROORGANISMS OF THE GENUS *BACILLUS* AND THEIR POTENTIAL APPLICATION FOR ENHANCED OIL RECOVERY

doi:10.53729/MV-AS.2024.01.10

Abstract

The present study was conducted to isolate active *Bacillus* cultures from developed oil reservoirs as potential objects for the development of microbial enhanced oil recovery (MEOR) methods. Oil formation water from two oil fields "Zhetybai" and "Kulsary" located in Western Kazakhstan were used as study materials. 8 cultures of *Bacillus* genus were isolated and identified on the basis of phylogenetic analysis of 16S rRNA gene. The formation of acetic acid and biosurfactants were studied as target properties valuable for MEOR. It was revealed that the investigated microorganisms are able to synthesize acetic acid as well as fatty acids. Emulsifying activity was determined as an indicator of the presence of biosurfactants. The maximum emulsification index was observed in strains of *Bacillus* sp. ZhM-3 and *Bacillus* sp. KM-2 for crude oil - 80% and 65%, for hexane - 69% and 50%, respectively. As a result of this work it was shown that the cultures of *Bacillus* sp. ZhM-3 and *Bacillus* sp. KM-2 are active producers of organic acids (acetic and butyric acids) and biosurfactants capable of emulsifying crude oil, which makes them potentially effective for application in biotechnological processes aimed at enhancing oil recovery from depleted fields.

Keywords: microorganisms, *Bacillus*, MEOR, biosurfactants, emulsification.

Microbial enhanced oil recovery (MEOR) is the method of using microorganisms to improve recovery of oil from the reservoirs after secondary oil recovery [1, 2]. Nowadays, the necessity of improving and/or advancing the current enhanced oil recovery (EOR) processes to make them more efficient has attracted the attention of researchers and oil field operators.

Kazakhstan is among the top 15 countries in the world by essential oil reserves, having 3% of the world's total oil reserves. Fewer of the fields are in operation. Most of those fields are mature ones, and are difficult to recover. Most of the hydrocarbon fields have already been discovered and commercially produced. Oil fields under water flooding have reached a high water cut ranging from 80 to 90%, while a large volume of undeveloped oil reserves (up to 60–70%) are located in deep oil reservoir formations. In addition, high viscosity of oils and complex geological structures characterize most deposits in Kazakhstan [3]. In this regard, the development of tertiary methods to enhance oil recovery like MEOR allows rational use of natural oil resources and to get economic benefits from the production of additional oil.

MEOR is environmentally friendly, low in cost, and easy to operate [4]. The degradation of petroleum and the production of metabolites, like acids, gases and biosurfactants are the main mechanisms by which microbes can enhance oil recovery [5]. Products of metabolism of microorganisms are promising substances when replacing chemical surfactants, which are usually used in EOR. They are also low toxic, compared to synthetic surfactants, due to environmentally attractive alternatives [6]. Therefore, the isolation and screening key metabolite producing microorganisms are important parts of MEOR.

The main mechanisms of metabolites of microorganisms are reviewed in many works [1, 2, 7], including that microbial biosurfactants emulsify oil, reduce oil viscosity and interfacial tension at the oil-water interface; acids could dissolve the rocks and increase the porosity and permeability of the reservoir; polymers and gases, lead to a decrease in the viscosity of oil and

dissolving carbonate rocks, increasing the permeability [8].

In the present study, we examined eight strains of *Bacillus* isolated from oil reservoir waters. Thus, the aim of the present study includes: the isolation and screening biosurfactant and acid producing Bacilli from oil reservoirs.

Materials and methods of research

Samples collection

Two types of oil-reservoir water from two wells of West Kazakhstan's deposits were used:

1) the oilfield "Zhetybay", well № 4726, depth of 1900 m, pressure 15.5 MPA and temperature of 45°C, water content– 93%. Salinity - 95 g/l, viscosity at temperature of 20°C was 8.45 cP, and at 50°C was 4.25 cP, further will be marked as Sample 1.

2) the oilfield "Kulsary", well № 216, depth of 250 m, pressure 13 MPA and temperature of 17-20°C, salinity - 187 g/l, water content – 98%, viscosity at 20°C - 6.02 cP, and at 50°C - 2.48 cP, further will be marked as Sample 2.

The reservoir oil water samples were taken from the production pipeline. The location of oilfields is shown in Fig. 1.



Figure 1 – Map of location of the oilfields

Cultures of the genus *Bacillus* were isolated according to the method described by Travers et al. (Travers et al., 1987) [9], as well as on differential media (HiMedia, India). *Bacillus* genus cultures were incubated at 30°C for 24 h.

When culturing microorganisms, synthetic medium E8 with the following composition, g/L, was used as a mineral background: KH_2PO_4 , 0.7; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -1.5; MgSO_4 0.8; NaCl , 0.5; pH, 6.6-6.7, where crude oil 2% was added as carbon source. The crude oil used was crude viscous oil from the Akingen field with the following characteristics: density - 902.9 kg/m³, tar content 26%, sulfur content 0.22%. Horizon oil is heavy, tarry, low-sulfur.

Genomic identification of specific bacteria was based on sequencing of the gene coding for 16S rRNA [10], the PCR program was performed using the GeneAmp PCR system 9700 amplifier (Applied Biosystems). Genomic DNA was isolated using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PromegaCorp., Madison, WI, USA). DNA fragments were separated via 1% agarose gel electrophoresis. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the DNA segment that can provide bacterial identification. The primers used for amplifying the conserved regions within 16S rRNA genes were: forward primer. - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 and reverse primer GGAATACCAGGGTATCTAAT in a total volume of 30 µl. Purification of PCR products was performed using an enzymatic method using Exonuclease I (Fermentas) and alkaline phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Sequencing results were processed using the SeqScape 2.6.0 program (Applied

Biosystems). Homologous nucleotide sequences of 16S rRNA genes were searched using the BLAST program (BasicLocalAlignmentSearchTool) in the International GeneBank database of the US National Center for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The Mega X program [11] was used to construct the phylogenetic tree of bacteria, also the website bacterio.net (List of names of prokaryotes with position in the nomenclature). The Muscle algorithm built by the Neighbor-Joining NJ method was used to align nucleotide sequences.

Microbial emulsification index was determined according to Cooper's method [12]. The culture supernatant was used with crude oil in a 3:2 ratio and mixed on a laboratory shaker at 250 rpm for 20 min to obtain a stable emulsion. The tubes were then kept in an upright position at room temperature. Hexane with a density of 655 kg/m³, which is a clear colorless liquid with an odor of oil, was used in the experiment. And crude oil from the Akingen field.

The emulsification index was expressed as a percentage, calculated by the formula:

$$E_{24} = \left(\frac{V_e}{V_n} \right) \times 100 \quad (1)$$

Where, V_e – Is the volume of the emulsion

V_n – is full volume of liquid, including total volume of water phase (culture or supernatant) + volume of hydrocarbon phase (crude oil) + volume of generated emulsion.

Analytical methods

Liquid samples collected after 8 days of fermentation were analyzed for acid content using a gas chromatograph (model Agilent 7890A, Agilent Ltd., USA). Specific acids such as acetic acid, propionic acid and butyric acid were measured. The pH of the fermentation medium was measured using a C931P pH meter. Statistical calculations were performed using the Excel 7 tabular processor.

Results and discussion

The microbial diversity of crude oil, oil-contaminated sites, produced water, and various oil reservoirs has been considered in many studies, and a wide variety of microorganisms has been shown [13-16]. Most of the species found in the studied samples belonged to different families of bacteria, with predominance of representatives of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*, which was also mentioned in other studies [14, 15]. Representatives of the genus *Bacillus* are known to be producers of major metabolites valuable for MEOR, in particular, as producers of biosurfactants, mainly such biosurfactants as surfactin, lichenisin, polypeptide and rhamnolipid, and are one of the well-known and thoroughly studied microorganisms due to their ability to reduce interfacial surface activity and other properties [17, 18, 19].

In the studied samples from the deposits "Zhetybai" and "Kulsary" were isolated 8 cultures of microorganisms, of which 5 strains (KE-1, KB-4, KM-2, KB-2, KMA-2) originated from the deposit "Kulsary", and 3 strains (ZhS-1, ZhB-1, ZhM-3) were found in the deposit "Zhetybai". The cells of 8 strains KE-1, KB-4, KM-2, KB-2, KMA-2, ZhS-1, ZhB-1, ZhM-3 were Gram-positive, bacilliform (about 0.5-0.9 µm wide and 1.1-2.4 µm long), endospore-forming bacteria. Colonies were spreading and irregularly shaped.

16S rRNA gene sequence analysis.

The results of the 16S rRNA sequence analysis suggest that strains KE-1, KB-4, KM-2, KB-2, KMA-2, ZhS-1, ZhB-1, ZhM-3 possess 99% sequence similarity with the *Bacillus* genus. A phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of isolated strains and the closest related strains was constructed by neighbor-joining (Fig. 2).

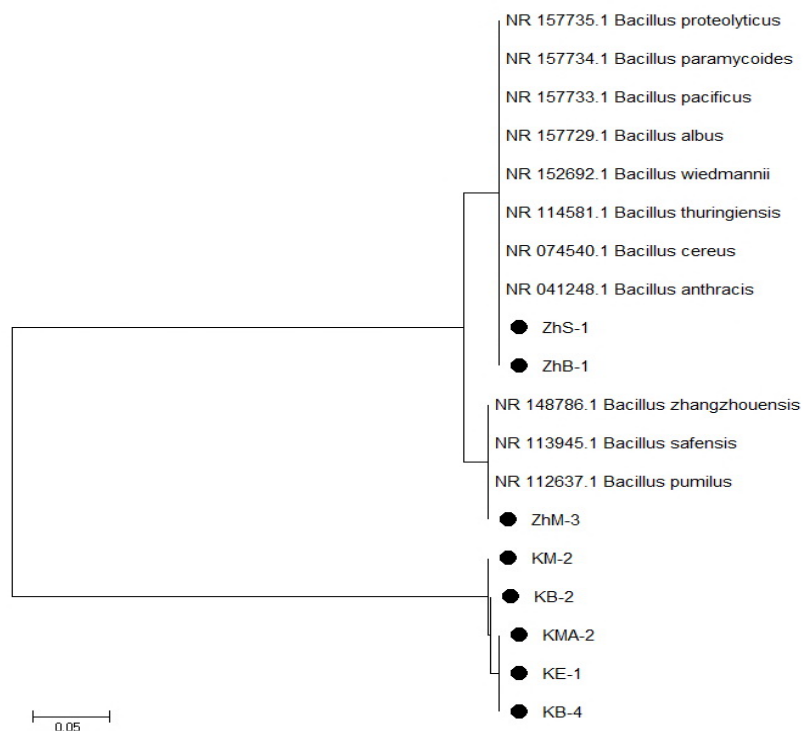


Figure 2 – Phylogenetic tree of the strains through neighbor-joining methods using MEGA version X

Genetic identification of bacterial isolates using full-length sequencing of 16S rRNA gene confirmed that 8 bacterial cultures isolated from oil patch water belong to the genus *Bacillus*.

The next step of the work was to study the production, valuable for MEOR, of metabolites such as organic acids, gas and biosurfactants.

To study the production of various organic acids and carbon dioxide by microorganisms, synthetic medium E8 was used, where 2% crude oil was used as the only carbon source in the medium. The experiment was carried out for 8 days.

Figure 3 shows the results of determining the amount of organic acids produced by microorganisms on the medium with the addition of oil for 8 days.

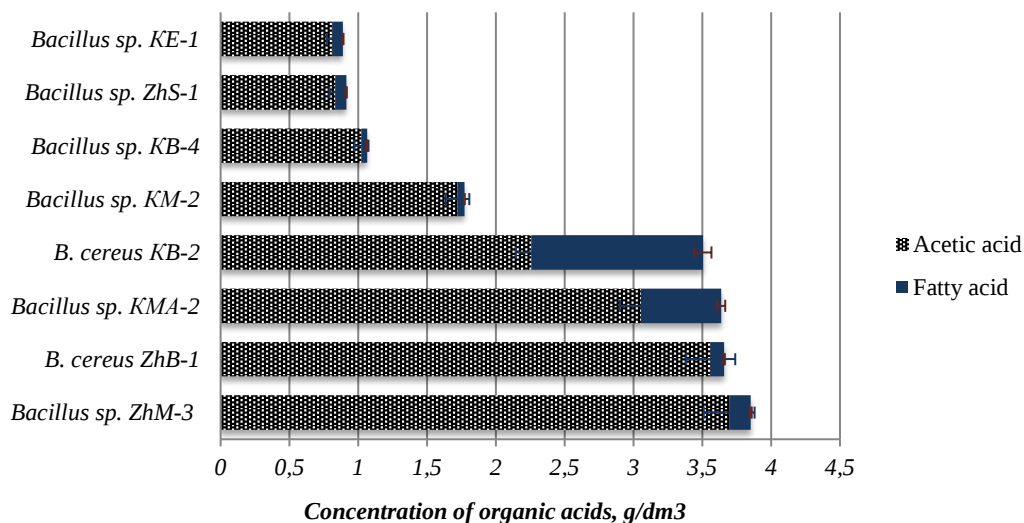


Figure 3 – Production of organic acids by *Bacillus*

The study of the qualitative and quantitative composition of organic acids showed that *Bacillus* cells produce acetic acid in greater amounts and, downwardly, butyric acid, then, in trace amounts, propionic acid. The most active acetic acid producers are *Bacillus sp.* ZhM-3 and *Bacillus sp.* ZhB-1, so, by the end of 8 days this index amounted to 3.695 g/dm³ and 3.561 g/dm³, respectively. The maximum production of butyric acid was observed for *Bacillus spp.* KB-2 and *Bacillus spp.* KMA-2 and by the end of the experiment the acid content was 1.2 g/dm³ and 0.6 g/dm³, respectively, other cultures produced significantly less butyric acid. The content of propionic acid in the fermented medium was negligible or in trace amounts (0.028-0.061 g/dm³) by the end of the experiment.

When studying the production of organic acids by *Bacillus* cultures, it was shown that the quantitative composition of the production of different acids depends on the composition of the media, however, acetic acid was the main acidic component, it should also be noted that in addition to acetic acid, *Bacillus* cultures produced other acids such as formic acid, propionic acid, isobutyric acid, succinic acid and isovaleric acid, but their amounts were much less than acetic acid [20]. Some works mention that representatives of p. *Bacillus* change the proportion of unsaturated fatty acids to adapt to a wide range of environmental changes [21, 22]. In such quantities, they are unlikely to have a significant effect on enhanced oil recovery, but this product may play an important role in adaptation to the extreme conditions of the oil reservoir and in creating an association for use in MEOR, since fatty acids may have antimicrobial activity against other microorganisms, as well as serve as a source of nutrients for other microorganisms [23, 24].

Figure 4 shows the results of pH change (initial and by the end of the experiment) when culturing bacilli on synthetic medium with oil; the variant without microorganisms was used as a control.

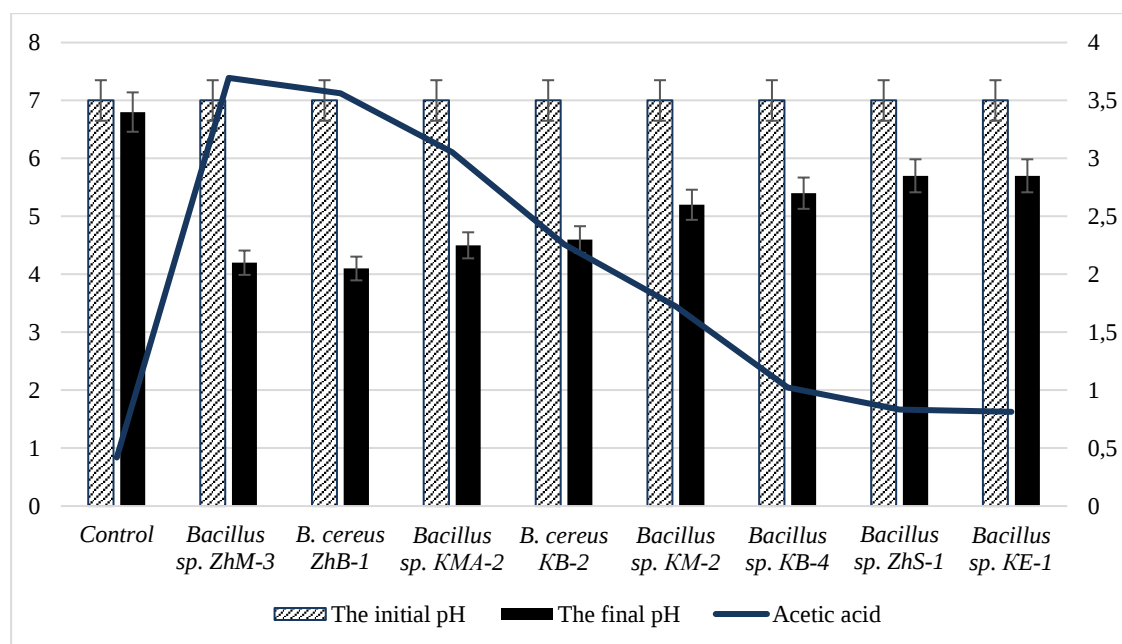


Figure 4 – Correlative change in the acidity of the medium during binding to the product acetic acid

As can be seen, all cultures ferment the substrate with acidification of the medium, i.e. the cells produce organic acids, thus, of the 8 cultures of bacilli *B. sp.* ZhM-3, *B. cereus* ZhB-1, *B.sp.* KMA-2 and *B. cereus* KB-2 showed the highest acid-producing ability, with a maximum decrease in the pH of the medium by the end of the experiment of 5-4.1 units at an initial pH of 7 units. These results correlate with the amount of acetic acid produced by these cultures. The decrease of pH value indicated the formation of acidic catabolic metabolites [20]. In addition, the

final pH value and acetic acid concentration were correlated. At the maximum acetic acid content in the medium - 3.695 g/dm³, the pH value of the medium by the end of the experiment reached 4.1 units.

The emulsifying activity index estimates the ability of biosurfactants produced by bacteria to emulsify two immiscible liquids. Many researchers have noted that oil emulsification is one of the significant mechanisms of MEOR [5, 25, 26]. Oil emulsifying activity is the ability of surfactant-producing microorganisms to form tiny oil emulsions, which increases the efficiency of contact between bacteria and hydrocarbons. There are two types of emulsifying activity: exogenous emulsifying activity - the ability of microorganisms to form extracellular biosurfactants and endogenous emulsifying activity - the ability of microorganisms to form cell-associated biosurfactants [27]. The ability of microorganisms to produce oil-dispersing bioemulsifiers was investigated by endogenous emulsifying activity (E_{24}) in 24 hours.

Figure 5 shows the results of the study of the emulsification index of oil and hexane by *Bacillus* cells. Hexane was used as a comparative product obtained from oil.

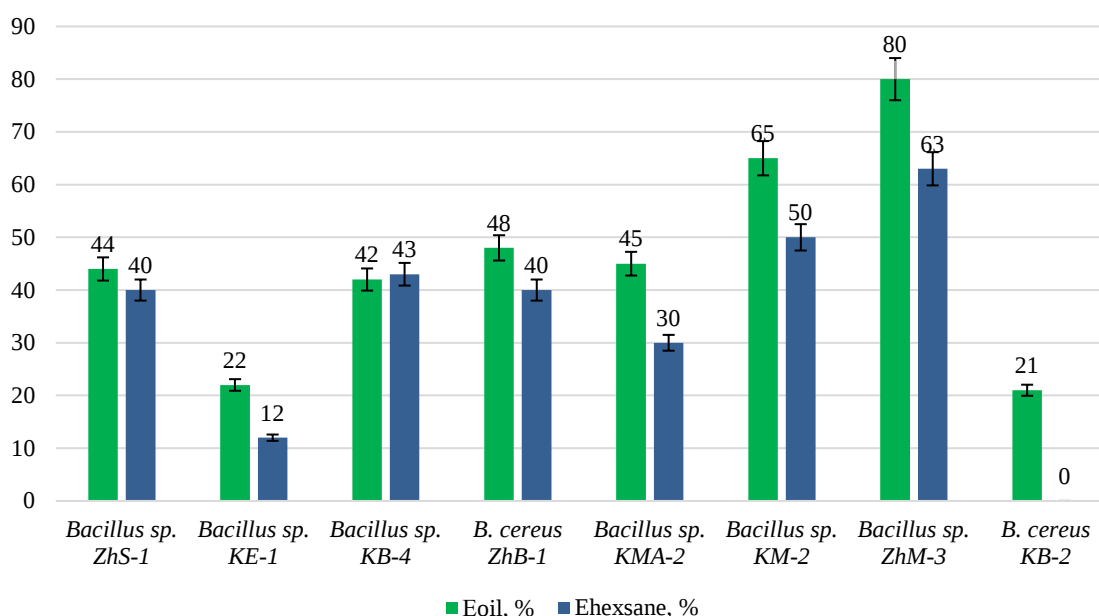


Figure 5 – Determination of oil and hexane emulsification index (E) by *Bacillus* cells

As can be seen in Figure 5, the emulsification index of crude oil by *Bacillus* is higher (21-80 %) than that of E_{hexane} (12-63 %). The maximum ability to emulsify crude oil is possessed by cells of *Bacillus* sp. ZhM-3 - 80% and *Bacillus* sp. KM-2 - 65%. It should be noted that for the same cultures the same correlation with hexane emulsification index (E) is observed, although the numerical values are lower, so the maximum E_{hexane} was observed in *Bacillus* sp. ZhM-3 and amounted to 63%. The effectiveness of some bacteria, including the genera *Bacillus*, capable of producing biosurfactants, has been described in a number of works, so the greater the proportion of stable emulsions formed, the greater the amount of biosurfactant produced by microorganisms, also the emulsification index of crude oil above 50% is an indicator of promising bacteria used in the oil industry [27, 28, 29, 30]. Lipopeptide surfactins and lichenisin produced by *Bacillus* strains are among the most studied biosurfactants. These biosurfactants are known to reduce surface and interfacial tension among other properties and are able to mobilize trapped oil, so bacteria capable of producing these biosurfactants are good agents for MEOR applications.

Thus, cultures of *Bacillus* sp. ZhM-3 and *Bacillus* sp. KM-2 isolated from oil formation water have high crude oil emulsification index of 80% and 65%, respectively, and are promising targets for the oil industry.

Conclusion

As a result of this study, 8 *Bacillus* cultures were isolated from oil patch waters and identified as members of the genus *Bacillus*.

In order to develop MEOR, the isolated indigenous cultures of oil reservoirs were studied for their liquefying and emulsifying properties against crude oil (organic acid production, emulsification index). All strains of bacilli on medium with crude oil showed the ability to produce more acetic acid, then butyric acid, whereas propionic acid synthesis is insignificant for all bacilli. The maximum acetic acid producers on medium with crude oil were shown by cultures of *Bacillus* sp. ZhM-3 and *Bacillus* sp. ZhB-1 (3.7 g/dm³ and 3.6 g/dm³ respectively). Out of the 8 cultures, two cultures, *Bacillus* sp. ZhM-3 and *Bacillus* sp. KM-2 (80 and 65%, respectively) showed high results in emulsifying crude oil. Based on the work carried out, 3 cultures of *Bacillus* sp. ZhM-3, *Bacillus cereus* ZhB-1 and *Bacillus* sp. KM-2, which are active acetic acid producers and capable of emulsifying crude oil, making them potentially effective for application in biotechnological processes aimed at enhancing oil recovery from mature fields.

Funding

This research has been/was/is funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. BR18574066).

References:

- 1 Lazar I., Petrisor I.G., Yen T.F.: Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), *Pet. Sci. Technol*, 25, 2007: 1353–1366 (doi:10.1080/10916460701287714)
- 2 Yernazarova A., Kayirmanova G., Baubekova A., Zhubanova A.: Microbial enhanced oil recovery, Ed. by Laura Romero-Zeron University of New Brunswick, Canada, *IntechOpen*, Rijeka, 2016, (doi: 10.5772/64805)
- 3 Kurbanbayev M.I., Miroshnikov V.Y., Tolokonsky S.I.: Enhancement of oil recovery in Kazakhstan deposits. In *Proceedings of the III International Scientific Symposium "Theory and Practice of Application of Enhanced Oil Recovery Techniques"* (in Russian), Moscow, 2011: 243, September 20–21.
- 4 She H., Kong D., Li Y., Hu Z., Guo H.: Recent Advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China, *Geofluids*, 2019 (doi.org/10.1155/2019/1871392)
- 5 Geeth S.J., Banat I.M., Joshi S.J.: Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR), *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 14, 2018: 23–32 (doi:10.1016/j.bcab.2018.01.010)
- 6 Câmara J.M.D.A., Sousa M.A.S.B., Barros Neto E.L., Oliveira M.C.A.: Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR), *J. Pet. Explor. Prod. Technol.*, 9, 2019: 2333–2341 (doi:10.1007/s13202-019-0633-x)
- 7 Vishnyakov V., Suleimanov B., Salmanov A., Zeynalov E.: *Primer on Enhanced oil recovery*, Imprint Gulf Professional Publishing, 2020: 161–169.
- 8 Shibulal B., Al-Bahry S.N., Al-Wahaibi Y.M., Elshafie A.E., Al-Bemani A.S., Joshi S.J.: Microbial-Enhanced Heavy Oil Recovery under Laboratory Conditions by *Bacillus firmus* BG4 and *Bacillus halodurans* BG5 Isolated from Heavy Oil Fields, *Colloids Interfaces*, 2018, 2(1):1 (doi: 10.3390/colloids2010001)
- 9 Travers R.S., Martin P.A., Reichelderfer C.F.: Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(6), 1987: 1263–1266 (doi: 10.1128/AEM.53.6.1263-1266.1987)
- 10 Clarridge 3rd J.E.: Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, 17: 840–862, (doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004)
- 11 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Mol. Biol. Evol.*, 35, 2018: 1547–1549 (doi: 10.1093/molbev/msy096)
- 12 Cooper D.G., Goldenberg B.G.: Surface-active agents from two bacillus species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1987: 224–229 (doi: 10.1128/aem.53.2.224-229.1987)
- 13 Yernazarova A., Kaiyirmanova G., Zhubanova A.: Microorganisms in Oil Reservoirs of West

Kazakhstan, *Int. J. resent Technol. Eng.*, 7, 70–72: 2018 (ISSN: 2277-3878)

14 Korenblum E., Souza D.B., Penna M., Seldin L.: Molecular analysis of the bacterial communities in crude oil samples from two brazilian offshore petroleum platforms, *Int. J. Microbiol.*, 2012: 156537 (doi:10.1155/2012/156537)

15 Ridley C.M., Voordouw G.: Aerobic microbial taxa dominate deep subsurface cores from the Alberta oil sands, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 94, 2018 (doi: 10.1093/femsec/fiy073)

16 Vinothini C., Sudhakar S., Ravikumar R.: Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 4, 2015: 318–329 (ISSN: 2319-7706)

17 Fritze D.: Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria, *Phytopathology*®, 94, 2004: 1245–1248 (doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245)

18 Phetcharat T., Dawkrajai P., Chitov T., Mhuantong W., Champreda V., Bovonsombut S.: Biosurfactant-Producing Capability and Prediction of Functional Genes Potentially Beneficial to Microbial Enhanced Oil Recovery in Indigenous Bacterial Communities of an Onshore Oil Reservoir, *Curr. Microbiol.*, 76, 2019: 382–391 (doi: 10.1007/s00284-019-01641-8)

19 Purwasena I.A., Astuti D.I., Syukron M., Amaniyah M., Sugai Y. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. *J. Pet. Sci. Eng.* 2019, 183: 106383 (doi: 10.1016/j.petrol.2019.106383)

20 Paavilainen S., Helistö P., Korpela T.: Conversion of carbohydrates to organic acids by alkaliphilic bacilli, *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 1994: 217–222 (doi: 10.1016/0922-338X(94)90293-3)

21 Ginies C., Brillard J., Nguyen-The C.: Identification of Fatty Acids in *Bacillus cereus*, *JoVE*, e54960, 2016 (doi: 10.3791/54960)

22 Diomande S., Nguyen-The C., Guinebretière M.H., Broussolle V., Brillard J.: Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation, *Front. Microbiol.*, 6, 2015: 813 (doi: 10.3389/fmicb.2015.00813)

23 Çelik A., Sperandio D., Speight R.E., Turner N.J.: Enantioselective epoxidation of linolenic acid catalysed by cytochrome P450BM3 from *Bacillus megaterium*, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 2005: 2688–2690 (doi: 10.1039/B506155E)

24 Hou C.T.: New bioactive fatty acids, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17 Suppl 1, 2008, 192–195, PMID: 18296335.

25 Ke C.Y., Lu G.M., Li Y.B., Sun W.J., Zhang Q.Z., Zhang X.L.: A pilot study on large-scale microbial enhanced oil recovery (MEOR) in Baolige Oilfield, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 127, 2018: 247–253 (doi: 10.1016/j.ibiod.2017.12.009)

26 Safdel M., Anbaz M.A., Daryasafar A., Jamialahmadi M.: Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 74, 2017: 159–172 (doi: 10.1016/j.rser.2017.02.045)

27 Rossiana N., Miranti M., Maspudin K.: Prospective Study of *Bacillus sphaericus* and *Pseudomonas aeruginosa* as The Microbial Enhanced Oil Recovery Agents, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 166, 2018: 12018 (doi:10.1088/1755-1315/166/1/012018)

28 Joshi S.J., Desai A.J.: Bench-Scale Production of Biosurfactants and their Potential in Ex-Situ MEOR Application, *Soil Sediment Contam. An Int. J.*, 22, 2013: 701–715 (doi: 10.1080/15320383.2013.756450)

29 Pereira J.F.B., Gudiña E.J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J.A., Coutinho J.A.P., Rodrigues L.R.: Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications, *Fuel*, 111, 2013: 259–268 (doi: 10.1016/j.fuel.2013.04.040)

30 Szulc A., Ambrozewicz D., Sydow M., Ławniczak Ł., Piotrowska Cyplik A., et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J. Environ. Manage.* 2014.132: 121– 128. (doi: 10.1016/j.jenvman.2013.11.006)

А.К. ЕРНАЗАРОВА, Г.Қ. ҚАЙЫРМАНОВА*, Ұ.Т. ШАЙМЕРДЕНОВА,
Р.Б. МАГМИЯЕВ, А.Р. ИСЛАМОВА
әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан
*e-mail: kaiyrman@kaznu.kz

АБОРИГЕНДІ *BACILLUS* ТУЫСЫ МИКРОБ ДАҚЫЛДАРЫНЫҢ АНЫҚТАЛУЫ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ МҰНАЙ ШЫҒАРУДЫ ЖОҒАРЫЛАТУЫНДА ҚОЛДАНЫЛУ МҮМКІНШІЛІГІ

Түйін

Бұл зерттеу мұнай шығаруды жоғарылатудың микробиологиялық әдістерін (Microbial enhanced oil recovery – MEOR) әзірлеу үшін әлеуетті нысандар ретінде дамыған мұнайпласттарынан белсенді *Bacillus* дақылдарын оқшаулау мақсатында жүргізілді. Зерттеу материалдары ретінде Батыс Қазақстанда орналасқан "Жетібай" және "Құлсары" екі мұнай кен орнының мұнайпласт сулары пайдаланылды. *Bacillus* тұқымының сегіз дақылы 16S рРНҚ генінің филогенетикалық талдауы негізінде бөлініп алынды және анықталды. MEOR үшін құнды мақсатты қасиеттер ретінде сірке қышқылы мен биосурфактанттардың түзілуі зерттелді. Зерттелетін микроорганизмдердің май қышқылдарымен қатар сірке қышқылын да синтездеуге қабілетті екендігі анықталды. Биосурфактанттардың түзілуінің көрсеткіші ретінде эмульгирлеуші белсенділігі анықталды. Ең жоғары эмульсия индексі *Bacillus sp. ZhM-3* және *Bacillus sp. KM-2* штаммдарында байқалды – шикі мұнай үшін 80% және 65%, сәйкесінше гексан үшін 69% және 50%. Жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде *Bacillus sp. ZhM-3* және *Bacillus sp. KM-2* дақылдары органикалық қышқылдардың (сірке және май қышқылдары) және шикі мұнайды эмульгирлеуге қабілетті биосурфактанттардың белсенді өндірушілері болып табылады, бұл оларды сарқылған кен орындарынан мұнай шығаруды жоғарылатуға бағытталған биотехнологиялық процестерде қолдану үшін әлеуетті тиімді етеді.

Кілтті сөздер: микроорганизмдер, *Bacillus*, MEOR, биосурфактанттар, эмульсия.

МРНТИ: 34.27.21

А.К. ЕРНАЗАРОВА, Г.К. КАЙЫРМАНОВА*, У.Т. ШАЙМЕРДЕНОВА,
Р.Б. МАГМИЯЕВ, А.Р. ИСЛАМОВА
Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби г.Алматы, Республика
Казахстан
*e-mail: kaiyrman@kaznu.kz

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АБОРИГЕННЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *BACILLUS* И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕОТДАЧИ ПЛАСТОВ

doi:10.53729/MV-AS.2024.01.10

Аннотация

Настоящее исследование проведено с целью выделения из разработанных нефтепластов активных культур рода *Bacillus*, как потенциальных объектов для разработки микробиологических методов увеличения нефтеотдачи (Microbial enhanced oil recovery – MEOR). В качестве материалов исследования использована нефтепластовая вода двух нефтяных месторождений "Жетыбай" и "Кульсары", расположенных в Западном Казахстане. Выделены и идентифицированы на основе филогенетического анализа гена 16S рРНҚ 8 культур рода *Bacillus*. В качестве целевых ценных свойств для MEOR проводили изучение продукции органических кислот и биосурфактантов. Выявлено, что исследуемые микроорганизмы способны синтезировать уксусную и масляную кислоты. В качестве показателя наличия биосурфактантов определяли индекс эмульгирования сырой нефти и гексана. Максимальный индекс эмульгирования отмечен у культур *Bacillus sp.*

ZhM-3 и *Bacillus* sp. KM-2 для сырой нефти – 80% и 65%, для гексана – 69% и 50%, соответственно. В результате проведенной работы показано, что культуры *Bacillus* sp. ZhM-3 и *Bacillus* sp. KM-2 являются активными продуцентами органических кислот (уксусной и масляной) и биосурфактантов, способных к эмульгированию сырой нефти, что делает их потенциально эффективными для применения в биотехнологических процессах, направленных на повышение нефтеотдачи выработанных месторождений.

Ключевые слова: микроорганизмы, *Bacillus*, MEOR, биосурфактанты, эмульгирование.

Микробиологический метод увеличения нефтеотдачи (Microbial enhanced oil recovery – MEOR) – это метод использования микроорганизмов для увеличения нефтеотдачи пластов после выработки средних и лёгких нефтей традиционными методами добычи [1, 2]. В настоящее время, в связи с истощением легкоизвлекаемых запасов нефти, нефтедобывающей отрасли придётся уделять большее внимание освоению и вводу в промышленную разработку трудноизвлекаемых нефтей, в том числе, выработанным месторождениям с тяжёлой остаточной нефтью. В связи с этим, необходимость улучшения и усовершенствования существующих методов увеличения нефтеотдачи (MEOR) с целью повышения их эффективности привлекает внимание исследователей и операторов нефтяных месторождений.

Казахстан входит в число 15 ведущих стран мира по основным запасам нефти, имея 3 % от мировых запасов нефти. Большинство месторождений находится в эксплуатации, однако обводненность нефтепластов достигает 80–90 %, что относит их к выработанным месторождениям с большим количеством тяжелой остаточной нефти до 60 %. Кроме того, для большинства месторождений Казахстана характерны высокая вязкость нефтей и сложное геологическое строение пластов, что относит продукт к трудноизвлекаемым нефтям [3]. В связи с вышеперечисленным, развитие третичных методов увеличения нефтеотдачи для разработки тяжёлых высоковязких нефтей, позволяет рационально использовать природные нефтяные ресурсы и получать экономический эффект от добычи дополнительной нефти [4].

В биотехнологиях увеличение нефтеотдачи и дополнительное вытеснение нефти обуславливают те же механизмы, что и при физико-химических методах, но микробные метаболиты (кислоты, газы, биосурфактанты) образуются непосредственно в порах пласта, что увеличивает эффективность их воздействия [5]. Продукты метаболизма микроорганизмов являются перспективными веществами при замене химических поверхностно-активных веществ, которые обычно используются при MEOR. Метаболиты являются малотоксичными в сравнении с синтетическими ПАВ, что делает их экологически привлекательными альтернативами [6]. Выделение и скрининг ключевых метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, являются важными составляющими MEOR.

Основные механизмы действия микробных метаболитов для MEOR рассмотрены во многих работах, в частности, микробные биосурфактанты эмульгируют нефть, снижают вязкость нефти и межфазное натяжение на границе раздела нефть-вода; кислоты также обуславливают снижение вязкости нефти и растворение карбонатных пород, увеличивая пористость и проницаемость нефтепласта; газы образуют дополнительное давление в пласте, что в итоге приводит к подвижности нефти и продвижению на поверхность [1, 2, 7, 8].

Цель настоящего исследования – выделение, идентификация и изучение ценных свойств культур р. *Bacillus*, выделенных из разработанных нефтепластов, для разработки методов повышения нефтеотдачи.

Материалы и методы исследования

В работе использованы пробы нефтепластовых вод следующих месторождений Западного Казахстана:

1) месторождение "Жетыбай", скважина № 4726, глубина 1900 м, давление 15,5 МПА, температура 45°C, обводненность - 93%, соленость - 95 г/л, вязкость при температуре 20°C составляла 8,45 сП, а при 50°C - 4,25 сП, далее обозначается как Образец 1.

2) месторождение "Кульсары", скважина № 216, глубина 250 м, давление 13 МПА и температура 17-20°C, минерализация - 187 г/л, обводненность - 98%, вязкость при температуре 20°C - 6,02 сП, а при 50°C - 2,48 сП, далее обозначается как Образец 2.

Пробы пластовой воды отбирались из эксплуатационного трубопровода и транспортировались в течение 10-18 часов при 0-(+2)°C. Расположение месторождений представлено на рисунке 1.



Рисунок 1 – Карта расположения нефтяных месторождений

Бациллярные культуры выделены по методу Траверса (Travers et al., 1987) [9], а также на дифференциальных питательных средах (HiMedia, Индия) при инкубации при 30°C в течение 24 ч.

При культивировании микроорганизмов в качестве минерального фона использовалась синтетическая питательная среда E8 следующего состава, г/л: K_2HPO_4 - 0,7; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 1,5; MgSO_4 0,8; NaCl - 0,5; pH - 6,6–6,7, где в качестве источника углерода добавляли сырую нефть (2 %). В качестве сырой нефти использовалась сырая вязкая нефть с месторождения Акинген со следующими характеристиками: плотность - 902,9 кг/м³, содержание смолы - 26%, серы - 0,22%. Нефть горизонта тяжелая, смолистая, малосернистая.

Геномная идентификация конкретных бактерий основывалась на секвенировании гена, кодирующего 16S rRNA [10], ПЦР-программу проводили с использованием амплификатора GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Геномную ДНК выделяли с помощью набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PromegaCorp., Madison, WI, USA). Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) использовалась для амплификации сегмента ДНК, обеспечивающая идентификацию бактерий. Для амплификации консервативных участков генов 16S рРНК использовали следующие праймеры: прямой праймер - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 и обратный праймер GGACTACCAGGGTATCTAAT в общем объеме 30 мкл. Очистку продуктов ПЦР проводили ферментативным методом с использованием экзонуклеазы I (Fermentas) и щелочной фосфатазы (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Результаты секвенирования обрабатывались с помощью программы SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводился с использованием программы BLAST (BasicLocalAlignmentSearchTool)

в международной базе данных GeneBank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Для построения филогенетического древа бактерий использовалась программа Mega X [11], также сайт bacterio.net (Список названий прокариот с положением в номенклатуре). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали алгоритм Muscle, построенный методом Neighbor-Joining NJ.

Микробный индекс эмульгирования определяли по методу Купера [12]. Для оценки эндогенной эмульгирующей активности культуральную среду не центрифугировали. Далее культуральную среду с бактериальными клетками смешивали с углеводородным субстратом (сырая нефть, гексан) в соотношении 3:2 и перемешивали на лабораторном шейкере при 250 об/мин в течение 20 мин для получения стабильной эмульсии. После этого пробирки выдерживались в вертикальном положении в течение 24 ч при комнатной температуре. В качестве гидрофобных субстратов использовали сырую нефть (Акинген) и гексан – нефтяной продукт, представляющий собой прозрачную бесцветную жидкость.

Индекс эмульгирования выражался в процентах, рассчитывался по формуле:

$$E_{24} = \left(\frac{V_e}{V_n} \right) \times 100 \quad (1)$$

где, V_e – объем эмульсии,

V_n – полный объем жидкости, включающий общий объем водной фазы (культура или супернатант) + объем углеводородной фазы (сырая нефть) + объем образовавшейся эмульсии.

Образцы жидкости, отобранные после 8 суток ферментации, были проанализированы на содержание кислот с помощью газового хроматографа (модель Agilent 7890A, Agilent Ltd., США). Измерялись такие специфические кислоты, как уксусная, пропионовая и масляная кислоты. Измерение pH ферментационной среды проводилось на приборе pH-метр С931Р. При проведении статистических расчетов использовали табличный процессор Excel 7.

Результаты и обсуждение

Микробное разнообразие сырой нефти, нефтезагрязненных участков, пластовых вод, а также различных нефтяных резервуаров рассматривалось во многих исследованиях и было показано широкое разнообразие микроорганизмов [13-16]. Большинство видов, обнаруженных в исследованных образцах, относились к разным семействам бактерий, с преобладанием представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, что также упоминалось в других исследованиях [14, 15]. Микроорганизмы, обитающие в нефтяных пластах, обладают большим биотехнологическим потенциалом и продуцируют из нефти биомассу и ряд метаболитов с нефтевытесняющими свойствами. Это различные газы, кислоты, ПАВ, растворители, полимеры и сами бактериальные клетки [13, 14]. Известно, что представители рода *Bacillus* являются продуцентами основных метаболитов, ценных для MEOR, в частности, таких биосурфактантов как: сурфактин, лихенизин, полипептид и рамнолипид, и являются одними из хорошо известных и тщательно изученных микроорганизмов из-за их способности к снижению межфазной поверхностной активности и других свойств [17, 18, 19].

В исследованных образцах месторождений "Жетыбай" и "Кульсары" было выделено 8 культур, из которых: 5 культур обозначены как КЕ-1, КВ-4, КМ-2, КВ-2, КМА-2, так как происходили из месторождения "Кульсары", 3 культуры - как ZhS-1, ZhB-1, ZhM-3, так как обнаружены из нефтепластов месторождения "Жетыбай". Все выделенные культуры – спорообразующие, подвижные, грамположительные палочки (около 0,5-0,9 мкм в ширину и 1,1-2,4 мкм в длину). Колонии мелкобугристые, матовые с волнистым краем, неправильной формы.

Результаты анализа последовательности 16S рРНК свидетельствуют о том, что штаммы KE-1, KB-4, KM-2, KB-2, KMA-2, ZhS-1, ZhB-1, ZhM-3 имеют 99% сходства с родом *Bacillus*. Филогенетическое древо на основе последовательностей 16S рДНК, выделенных штаммов и ближайших родственных штаммов, построено методом соседних связей (рисунок 2).

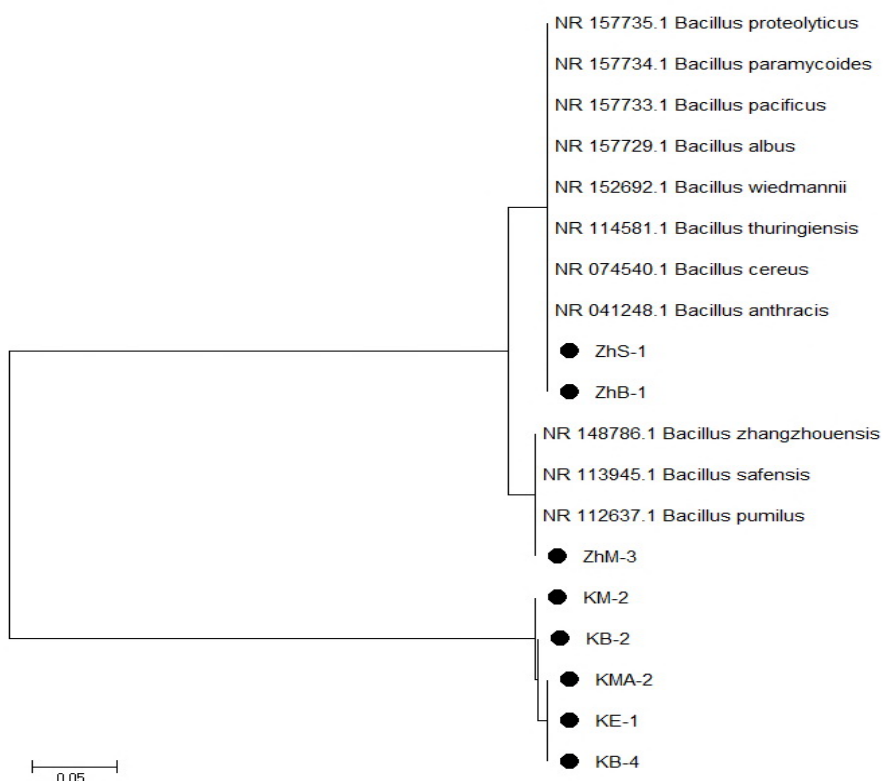


Рисунок 2 – Филогенетическое древо штаммов, построенное методом neighbor-joining с использованием программы MEGA версии X

Генетическая идентификация бактериальных изолятов с помощью полноразмерного секвенирования гена 16S рРНК подтвердила, что 8 культур бактерий, выделенные из нефтепластовых вод, относятся к представителям рода *Bacillus*.

Следующим этапом работы явилось изучение продукции метаболитов, ценных для MEOR - органических кислот и биосурфактантов.

Для выделения различных органических кислот и углекислого газа микроорганизмами использовали синтетическую среду Е8, где в качестве единственного источника углерода в питательной среде использовали сырую нефть в количестве 2 % объемных. Эксперимент проводился в течение 8 суток.

На рисунке 3 представлены результаты определения количества органических кислот, продуцируемых микроорганизмами на питательной среде с добавлением нефти в течение 8-и суток.

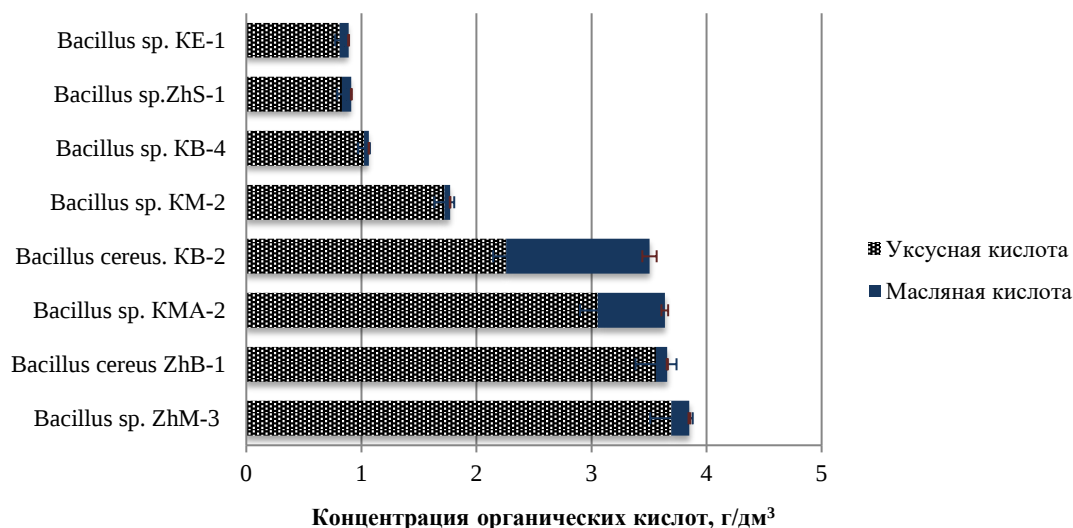


Рисунок 3 – Продукция органических кислот представителями р. *Bacillus* при культивировании на питательной среде с нефтью в течение 8 суток

Изучение качественного и количественного состава органических кислот показало, что клетки бацилл в большом количестве продуцируют уксусную и, по нисходящей, масляную, затем, в следовых количествах, пропионовую кислоты. Наиболее активными продуцентами уксусной кислоты являются *Bacillus sp. ZhM-3* и *Bacillus sp. ZhB-1*, так, к концу 8-х суток этот показатель составил 3,695 г/дм³ и 3,561 г/дм³, соответственно. Максимальная продукция масляной кислоты наблюдалась для культур *Bacillus sp. KB-2* и *Bacillus sp. KMA-2* и к концу эксперимента содержание кислоты составило 1,2 г/дм³ и 0,6 г/дм³, соответственно, другие культуры продуцировали значительно меньше масляной кислоты. Содержание пропионовой кислоты в ферментируемой среде к концу эксперимента было незначительно или в следовых количествах (0.028-0.061 г/дм³).

В литературе при изучении продукции органических кислот культурами *Bacillus* показано, что количественный состав продукции различных кислот зависит от состава питательных сред, однако, уксусная кислота является основным кислотным компонентом; также следует отметить, что помимо уксусной, культуры *Bacillus* продуцируют и другие кислоты, такие как муравьиная, пропионовая, изомасляная, янтарная и изовалериановая, но их количество было значительно меньше, чем уксусной кислоты [20]. В некоторых работах упоминается, что представители р. *Bacillus* изменяют долю ненасыщенных жирных кислот, чтобы адаптироваться к широкому спектру изменений окружающей среды [21, 22]. В таких количествах они, вероятно, не окажут существенного влияния на повышение нефтеотдачи, но эти метаболиты могут иметь важную роль в адаптации к экстремальным условиям нефтяного пласта и в создании ассоциации для использования в MEOR, так как жирные кислоты могут обладать антимикробной активностью, а также служить источником питательных веществ для других микроорганизмов [23, 24].

На рисунке 4 представлены результаты изменения pH (исходное и к концу эксперимента) при культивировании бацилл на синтетической среде с нефтью, в качестве контроля использовался вариант без внесения микроорганизмов.

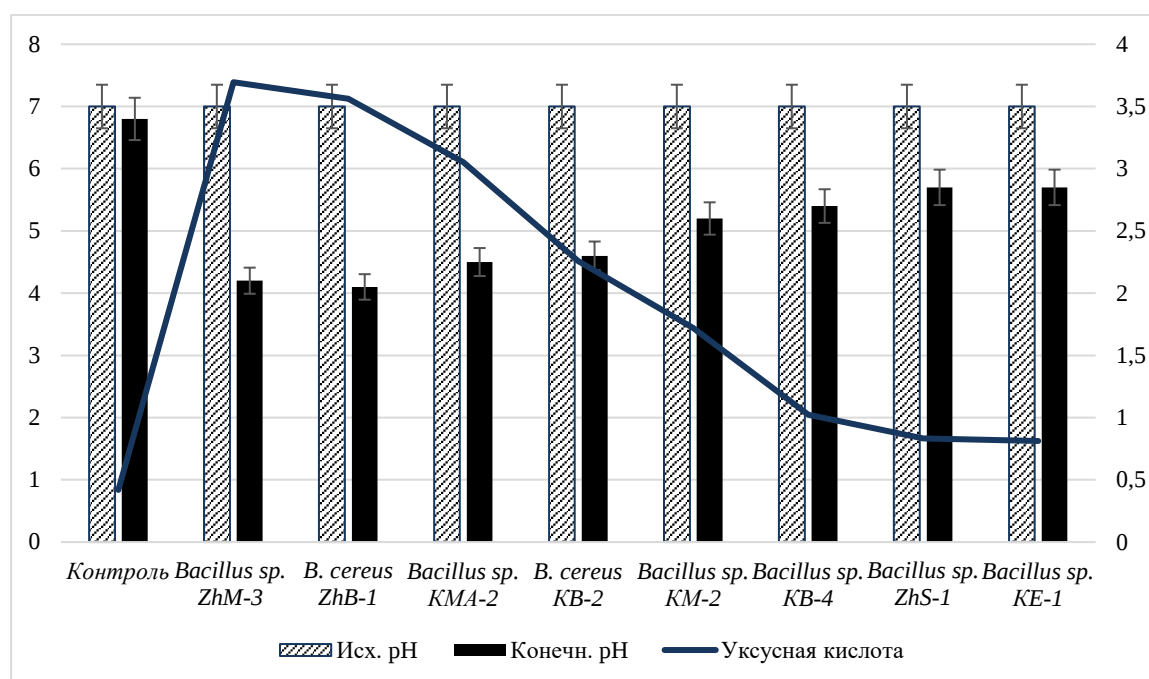


Рисунок 4 – Корреляционное изменение кислотности среды при связывании с продуктом уксусной кислоты

Как видно, все культуры ферментируют субстрат с подкислением питательной среды, т.е. клетки продуцируют органические кислоты. Так, из 8 культур бацилл *B. sp.* ZhM-3, *B. cereus* ZhB-1, *B.sp.* KMA-2 и *B.cereus* KB-2 показали самую высокую способность продуцировать кислоты, при этом максимальное снижение pH среды к концу эксперимента составило 5-4,1 ед., при исходном pH равном 7 ед. Результаты коррелируют с количеством продуцируемой уксусной кислоты этими культурами. Снижение значения pH указывало на образование кислых метаболитов катаболизма [20]. Кроме того, значение конечного pH и концентрация уксусной кислоты коррелировали. При максимальном содержании уксусной кислоты в среде, 3,695 г/дм³, показатель pH среды к концу эксперимента составил 4,1 ед.

Индекс эмульгирующей активности позволяет оценить способность продуцируемых бактериями биосурфактантов эмульгировать две несмешивающиеся жидкости. Многие исследователи отмечают, что нефтеэмульгирование является одним из значимых механизмов MEOR [5, 25, 26]. Нефтеэмульгирующая активность - способность микроорганизмов-продуцентов ПАВ к образованию мельчайших нефтеэмульсий, что повышает эффективность контакта бактерий с углеводородами. Различают два вида эмульгирующей активности: экзогенная - способность микроорганизмов к образованию экстрацеллюлярных биосурфактантов и эндогенная - способность микроорганизмов к образованию клеточно-связанных биосурфактантов [27]. Способность микроорганизмов производить биоэмульгаторы, диспергирующие нефть, исследовали по эндогенной эмульгирующей активности (E_{24}) за 24 часа.

На рисунке 5 приведены результаты исследования индекса эмульгирования нефти и гексана клетками бацилл. Гексан использовали как сравнительный продукт, полученный из нефти.

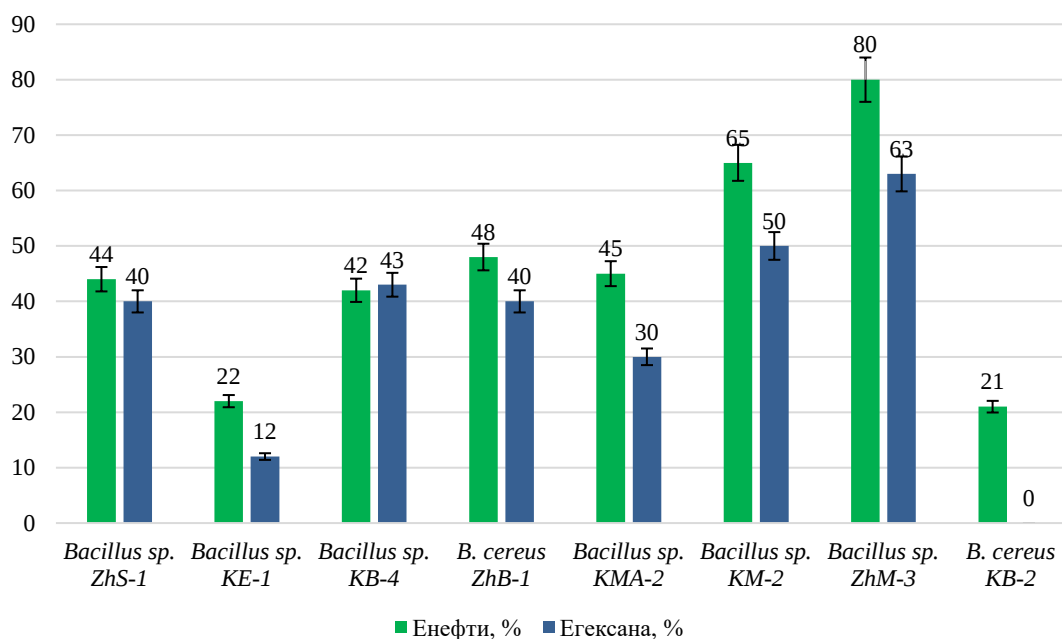


Рисунок 5 – Определение индекса эмульгирования (Е) нефти и гексана клетками бацилл

Как видно на рисунке 5, индекс эмульгирования бациллами сырой нефти выше (21-80 %), чем Е_{гексана} (12-63 %). Максимальной способностью к эмульгированию сырой нефти обладают клетки *Bacillus sp.* ZhM-3 - 80% и *Bacillus sp.* KM-2 - 65%. Следует отметить, что для этих же культур наблюдается такая же корреляция с индексом эмульгирования гексана (Е), хотя числовые показатели ниже, так максимальный Е_{гексана} наблюдался у *Bacillus sp.* ZhM-3 и составил 63%. Эффективность некоторых бактерий, в том числе р. *Bacillus*, способных продуцировать биосурфактанты, описана в ряде работ. Так, чем больше доля образовавшихся стабильных эмульсий, тем большее количество биосурфактанта продуцируют микроорганизмы, индекс эмульгирования сырой нефти выше 50% является показателем перспективности бактерий, используемых в нефтяной промышленности [27-30]. Липопептидные сурфактины и лихенизин, продуцируемые штаммами р.*Bacillus*, являются одними из наиболее изученных биосурфактантов, известные тем, что наряду с другими свойствами снижают поверхностное и межфазное натяжение и мобилизуют захваченную нефть. Бактерии, способные продуцировать эти биосурфактанты, являются хорошими агентами для применения в MEOR.

Таким образом, культуры *Bacillus sp.* ZhM-3 и *Bacillus sp.* KM-2, выделенные из нефтепластовых вод, обладают высоким индексом эмульгирования сырой нефти - 80% и 65%, соответственно, и являются перспективными объектами для нефтяной отрасли.

Заключение

В результате проведенного исследования из нефтепластовых вод выделены и идентифицированы 8 культур бацилл, как представители рода *Bacillus*.

Для разработки микробных MEOR у аборигенных культур микроорганизмов изучены разжижающие и эмульгирующие свойства в отношении сырой нефти (продукция органических кислот, индекс эмульгирования). Все штаммы бацилл на питательной среде с сырой нефтью продемонстрировали способность к большому продуцированию уксусной, кислоты, меньшему - масляной кислоты, незначительному - пропионовой кислоты. Максимальными продуцентами уксусной кислоты на среде с нефтью показаны культуры *Bacillus sp.* ZhM-3 и *Bacillus sp.* ZhB-1 (3,7 г/дм³ и 3,6 г/дм³, соответственно). Из 8-и культур две культуры - *Bacillus sp.* ZhM-3 и *Bacillus sp.* KM-2 продемонстрировали высокие результаты в эмульгировании сырой нефти (80% и 65%, соответственно). На основании проведенных исследований отобраны 3 культуры *Bacillus sp.* ZhM-3, *Bacillus*

cereus ZhB-1 и *Bacillus* sp. KM-2, которые являются активными продуцентами уксусной кислоты и способны к эмульгированию сырой нефти, что делает их потенциально эффективными для применения в биотехнологических процессах, направленных на повышение нефтеотдачи зрелых месторождений нефти.

Финансирование

Данное исследование финансировалось/финансируется Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант №BR18574066).

Литература:

- 1 Lazar I., Petrisor I.G., Yen T.F.: Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), *Pet. Sci. Technol.*, 25, 2007: 1353–1366 (doi:10.1080/10916460701287714)
- 2 Yernazarova A., Kayirmanova G., Baubekova A., Zhubanova A.: Microbial enhanced oil recovery, Ed. by Laura Romero-Zeron University of New Brunswick, Canada, *IntechOpen*, Rijeka, 2016, (doi: 10.5772/64805)
- 3 Kurbanbayev M.I., Miroshnikov V.Y., Tolokonsky S.I.: Enhancement of oil recovery in Kazakhstan deposits. In *Proceedings of the III International Scientific Symposium “Theory and Practice of Application of Enhanced Oil Recovery Techniques”* (in Russian), Moscow, 2011: 243, September 20–21.
- 4 She H., Kong D., Li Y., Hu Z., Guo H.: Recent Advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China, *Geofluids*, 2019 (doi.org/10.1155/2019/1871392)
- 5 Geetha S.J., Banat I.M., Joshi S.J.: Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR), *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 14, 2018: 23–32 (doi:10.1016/j.bcab.2018.01.010)
- 6 Câmara J.M.D.A., Sousa M.A.S.B., Barros Neto E.L., Oliveira M.C.A.: Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR), *J. Pet. Explor. Prod. Technol.*, 9, 2019: 2333–2341 (doi:10.1007/s13202-019-0633-x)
- 7 Vishnyakov V., Suleimanov B., Salmanov A., Zeynalov E.: *Primer on Enhanced oil recovery*, Imprint Gulf Professional Publishing, 2020: 161–169.
- 8 Shibulal B., Al-Bahry S.N., Al-Wahaibi Y.M., Elshafie A.E., Al-Bemani A.S., Joshi S.J.: Microbial-Enhanced Heavy Oil Recovery under Laboratory Conditions by *Bacillus firmus* BG4 and *Bacillus halodurans* BG5 Isolated from Heavy Oil Fields, *Colloids Interfaces*, 2018, 2(1):1 (doi: 10.3390/colloids2010001)
- 9 Travers R.S., Martin P.A., Reichelderfer C.F.: Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(6), 1987: 1263–1266 (doi: 10.1128/AEM.53.6.1263-1266.1987)
- 10 Clarridge 3rd J.E.: Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases, *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 840–862, 2004, (doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004)
- 11 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura, K.: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Mol. Biol. Evol.*, 35, 2018: 1547–1549 (doi: 10.1093/molbev/msy096)
- 12 Cooper D.G., Goldenberg B.G.: Surface-active agents from two bacillus species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1987: 224–229 (doi: 10.1128/aem.53.2.224-229.1987)
- 13 Yernazarova A., Kaiyirmanova G., Zhubanova A.: Microorganisms in Oil Reservoirs of West Kazakhstan, *Int. J. resent Technol. Eng.*, 2018, 7: 70–72, (ISSN: 2277-3878)
- 14 Korenblum E., Souza D.B., Penna M., Seldin L.: Molecular analysis of the bacterial communities in crude oil samples from two brazilian offshore petroleum platforms, *Int. J. Microbiol.*, 2012:156537 (doi:10.1155/2012/156537)
- 15 Ridley C.M., Voordouw G.: Aerobic microbial taxa dominate deep subsurface cores from the Alberta oil sands, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 94, 2018 (doi: 10.1093/femsec/fiy073)
- 16 Vinothini C., Sudhakar S., Ravikumar R.: Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 4, 2015: 318–329 (ISSN: 2319-7706)
- 17 Fritze D.: Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-

Forming Bacteria, *Phytopathology*®, 94, 2004: 1245–1248 (doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245)

18 Phetcharat T., Dawkrajai P., Chitov T., Mhuantong W., Champreda V., Bovonsombut S.: Biosurfactant-Producing Capability and Prediction of Functional Genes Potentially Beneficial to Microbial Enhanced Oil Recovery in Indigenous Bacterial Communities of an Onshore Oil Reservoir, *Curr. Microbiol.*, 76, 2019: 382–391 (doi: 10.1007/s00284-019-01641-8)

19 Purwasena I.A., Astuti D.I., Syukron M., Amaniyah M., Sugai Y. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. *J. Pet. Sci. Eng.* 2019, 183:106383 (doi: 10.1016/j.petrol.2019.106383)

20 Paavilainen S., Helistö P., Korpela T.: Conversion of carbohydrates to organic acids by alkaliphilic bacilli, *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 1994, 217–222 (doi: 10.1016/0922-338X(94)90293-3)

21 Ginies C., Brillard J., Nguyen-The C.: Identification of Fatty Acids in *Bacillus cereus*, *JoVE*, e54960, 2016 (doi: 10.3791/54960)

22 Diomande S., Nguyen-The C., Guinebretière M.H., Broussolle V., Brillard J.: Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation, *Front. Microbiol.*, 6, 2015: 813 (doi: 10.3389/fmicb.2015.00813)

23 Çelik A., Sperandio D., Speight R.E., Turner N.J.: Enantioselective epoxidation of linolenic acid catalysed by cytochrome P450BM3 from *Bacillus megaterium*, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 2005: 2688–2690 (doi: 10.1039/B506155E)

24 Hou C.T.: New bioactive fatty acids, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17 Suppl 1, 2008: 192–195, PMID: 18296335.

25 Ke C.Y., Lu G.M., Li Y.B., Sun W.J., Zhang Q.Z., Zhang X.L.: A pilot study on large-scale microbial enhanced oil recovery (MEOR) in Baolige Oilfield, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 127, 2018: 247–253 (doi: 10.1016/j.ibiod.2017.12.009)

26 Safdel M., Anbaz M.A., Daryasafar A., Jamialahmadi M.: Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 74, 2017: 159–172 (doi: 10.1016/j.rser.2017.02.045)

27 Rossiana N., Miranti M., Maspudin K.: Prospective Study of *Bacillus sphaericus* and *Pseudomonas aeruginosa* as The Microbial Enhanced Oil Recovery Agents, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 166, 2018: 12018 (doi:10.1088/1755-1315/166/1/012018)

28 Joshi S.J., Desai A.J.: Bench-Scale Production of Biosurfactants and their Potential in Ex-Situ MEOR Application, *Soil Sediment Contam. An Int. J.*, 22, 2013: 701–715 (doi: 10.1080/15320383.2013.756450)

29 Pereira J.F.B., Gudiña E.J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J.A., Coutinho J.A.P., Rodrigues L.R.: Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications, *Fuel*, 111, 2013: 259–268 (doi: 10.1016/j.fuel.2013.04.040)

30 Szulc A., Ambrozewicz D., Sydow M., Ławniczak Ł., Piotrowska Cyplik A., et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J. Environ. Manage.* 2014.132: 121– 128. (doi: 10.1016/j.jenvman.2013.11.006)