

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 631.421.2

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.263-278

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПЛАСТОВЫХ ФЛЮИДОВ РОМАШКИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

Л.Р. Бикташева, С.Ю. Селивановская, Р.А. Мухтарова,
Х. Абдалджалил, П.Ю. Галицкая

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Пластовые флюиды нефтяных резервуаров содержат микроорганизмы, перечень и обилие которых может характеризовать их состояние. Однако зачастую их количество бывает низким, что не позволяет провести анализ. В этом случае используют метод обогащения культуры. В настоящей работе с использованием методов молекулярной биологии проведен сравнительный анализ некоторых характеристик сообществ микроорганизмов образца исходного пластового флюида (образец 2313А) и образца после его обогащения (образец 2313Б).

На основе данных метагеномного анализа было установлено, что в образце 2313А доминировали представители аэробных бактерий родов *Pseudomonas* (порядок Pseudomonadales) (47.5%) и *Rhodococcus* (порядок Actinomycetales) (45%). Помимо аэробных микроорганизмов в сообществе обнаружены и представители порядков Halanaerobiales (1.4%) и Desulfovibrionales (0.03%), в состав которых входят анаэробные организмы. В образце 2313Б преобладали бактерии типа Actinobacteria (99.9%) в качестве доминирующей ОТЕ определена бактерия *Rhodococcus fascians* (порядок Actinomycetales). С использованием количественной ПЦР в реальном времени показано, что процесс обогащения приводит к снижению относительного обилия копий генов *rhlB* и *rhlAB*, кодирующих ферменты продукции биосурфактантов в 1063 и 244 раза. Меньший эффект культивирование оказало на обилие копий генов *dsrA*, *apsA*, включенных в процесс сульфатредукции. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что при использовании метода обогащения формируется сообщество, существенно отличающееся от исходных микробных сообществ пластовых флюидов нефтяных резервуаров.

Ключевые слова: пластовый флюид, бактериальное сообщество, сульфатредукция, биосурфактанты

Введение

Пластовые флюиды (смесь углеводов, воды, газов, находящихся в пластовых условиях) содержат микроорганизмы, деятельность которых приводит к различным последствиям, например к коррозии оборудования. Поэтому в настоящее время активно развивается направление, посвященное идентификации микроорганизмов и их дальнейшему мониторингу в условиях коллектора [1].

В сообществах исходных нефтяных резервуаров преобладают анаэробные бактерии – представители типов Thermotogales и Clostridiales, а также родов

Thermovirga, *Anaerolinaceae*, *Syntrophus*, *Syntrophomonas*, *Candidatus Atribacteria*, встречаются археи – представители классов *Methanomicrobia* и *Methanobacteria*, приспособленные к потреблению углеводов и сложных тугоплавких органических соединений [1, 2]. Отмечено также, что в нефтяных пластах повсеместно во всех диапазонах температур распространены бактерии типов *Proteobacteria* и *Euryarchaeota* [3, 4]. При разведке и добыче нефть нефтяного резервуара подвергается антропогенным воздействиям, приводящим к появлению новых акцепторов и доноров электронов, а также экзогенных микроорганизмов [1]. Так, при закачке морской воды и нитратов, используемых для вторичной добычи нефти, в составе микробного сообщества нефтяных резервуаров могут появляться факультативные анаэробы, такие как представители типов *Deferribacteres*, *Delta*-, *Epsilon*- и *Gamma*proteobacteria (в частности, представители родов *Marinobacter* и *Marinobacterium*), а также представители семейства *Pseudomonadaceae* [3, 4]. Эти микроорганизмы имеют более эффективный энергетический метаболизм, такой как восстановление нитратов, окисление сульфидов и серы, что позволяет им вытеснять анаэробные виды из сообщества. При этом следствием изменения сообществ является закисление пластовых флюидов и коррозия оборудования. Отмечено, что состав сообщества микроорганизмов пластовых флюидов определяется соотношением углеводородной и водной фракций, а также качеством закачиваемой воды [5]. Например, в исследовании Э. Коренблум с соавторами показано, что образцы нефти с высоким содержанием воды имеют более высокое альфа-разнообразие микробного сообщества по сравнению с менее обводненными [3].

Наряду с информацией о составе сообщества, оцениваемого методами метагеномного анализа, представляет интерес и информация об отдельных группах микроорганизмов, осуществляющих определенные функции. Последнюю информацию получают методом количественной ПЦР [6–8].

К числу таких микроорганизмов относятся, например, сульфатредуцирующие бактерии, чья активность может привести к процессам коррозии оборудования. Наличие сульфатредуцирующих бактерий фиксируется с помощью оценки наличия в экстрагированной ДНК специфических генов: *dsrAB*, кодирующего диссимиляционную сульфатредуктазу, ключевого фермента диссимиляционной сульфатредукции, *apsA*, кодирующего APS-редуктазу, отвечающую за образование 1:1 альфа-бета-гетеродимера [9–11]. Эти гены присутствуют у всех известных сульфатредуцирующих бактерий, в связи с чем их удобно использовать для мониторинга [12].

Не меньший интерес представляет другая группа – бактерии, способные к синтезу биосурфактантов. Биосурфактанты способствуют разжижению нефти и, в итоге, увеличению нефтедобычи. К числу генов, по которым можно осуществлять мониторинг этих бактерий, относятся следующие: ген *RhlR*, кодирует одноименный фермент, регулирующий транскрипцию оперона *RhlAB*, кодирующего рамнозилтрансферазу 1, участвующую в синтезе биосурфактанта монорамнолипида; ген *RhlA*, кодирующий субъединицу А рамнозилтрансферазы, участвующий в производстве предшественника рамнолипидов – 3-(3-алканоилокси)алканоат (НАА); ген *RhlB*, кодирующий субъединицу В рамнозилтрансферазы, добавляющий рамнозу к предшественнику НАА с образованием монорамнолипида; ген *RhlC*, кодирующий фермент рамнозилтрансферазу 2, катализирующий добавление

второй части рамнозы к монорамнолипидам с образованием дирамнолипидов [13, 14].

Для анализа сообществ микроорганизмов природных объектов существует несколько методов. К числу наиболее часто применяемых относятся два: первый – основанный на посеве образца на набор питательных сред с последующим анализом выросших колоний, второй – основанный на анализе образцов методами молекулярной биологии (метагеномный анализ, количественная ПЦР в реальном времени). Второй метод имеет неоспоримые преимущества, поскольку позволяет более полно проанализировать состав микробных сообществ за счет анализа некультивируемых видов. В то же время использование этого метода затруднено из-за низкого содержания микроорганизмов в пластовом флюиде и зачастую невозможности получения достаточного количества ДНК при применении процедуры прямой экстракции. Для получения экстрагируемой ДНК в количестве, достаточном для дальнейших манипуляций, применяют метод обогащения культуры, заключающийся в культивировании анализируемого образца в условиях, имитирующих параметры естественной среды [15]. Так, в работе [16] показано, что при культивировании образцов нефти были обнаружены представители родов *Petrotoga*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Geobacillus* и *Rahnella*, тогда как прямая экстракция ДНК из исходных нефтей не удалась.

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ структуры и состава сообществ микроорганизмов и наличия бактерий, отвечающих за сульфатредукцию и продуцирование биосурфактантов в исходном нефтяном флюиде и флюиде, подвергнутом процедуре обогащения.

1. Материалы и методы

Отбор пластового флюида и процедура обогащения микробного сообщества. Пробы пластовых флюидов были трижды отобраны в устье скважины № 2313 Альметьевской части Ромашкинского месторождения (Татарстан, Россия). Образцы отбирали в двухлитровые стерильные пластиковые бутылки, доставляли в лабораторию в тот же день и хранили при 4 °С. Образцы пластового флюида содержали более 99% воды. Далее образцы объединяли и из объединенного образца (2313А) экстрагировали ДНК.

Чтобы увеличить количество микроорганизмов в пластовом флюиде, был использован метод обогащения, для чего исходный образец флюида в количестве 2% вносили в питательную среду (г/л бидистиллированной воды): KH_2PO_4 – 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, Na_2HPO_4 – 4.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1. Культивирование проводили в течение 120 ч. В результате был получен образец 2313Б.

Экстракция ДНК. Перед экстракцией ДНК оба образца обрабатывали буфером Виноградского в соответствии с [3, 17], клетки концентрировали на поликарбонатных мембранах (0.22 мкм; Millipore, США), которые разрушали жидким азотом в стерильных условиях.

Общую геномную ДНК образцов экстрагировали с использованием набора FastDNA SPIN for soil (MP Biomedicals, США) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы хранили при –20 °С.

Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ структуры микробного сообщества. Секвенирование бактериального сообщества проводили на базе платформы Illumina MiSeq (Illumina, США). Подготовка геномной библиотеки была осуществлена согласно модифицированному протоколу Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol (Illumina MiSeq). Амплификацию участка V3–V4 региона 16S рРНК гена проводили с помощью термоциклера DNA Engine Tetrad® 2 cyclер (BioRad, Германия) с использованием праймеров

А (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3');

В (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGTATCTAATCC-3').

Амплификация проводилась по следующему режиму: 95 °С в течение 3 мин, 27 циклов – 95 °С (30 с), 55 °С (30 с) и 72 °С (30 с), а также финальная элонгация при 72 °С (3 мин). Ампликоны были очищены с помощью Agencourt AMPure XP purification kit (Beckman Coulter, США). Второй раунд был проведен с использованием тех же параметров амплификации. Концентрация ампликонов была измерена на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher, США). Контроль качества полученных ампликонов был проведен на приборе Labchip GX Touch 24 (PerkinElmer, США). Далее было проведено секвенирование на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно инструкции.

Данные секвенирования 16S рРНК были проанализированы с помощью программного обеспечения Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) platform, version 1.6.0 [18]. Выравнивание репрезентативных последовательностей проводили согласно алгоритму PyNAST [19]. Таксономическая структура была определена сравнением с базой данных Greengenes с использованием программы USEARCH [20]. Операционные таксономические единицы (ОТЕ) были сгруппированы с порогом сходства 97%.

Определение количества копий генов методом количественной ПЦР в реальном времени. Общую численность бактерий в сообществе, а также численность сульфатредуцирующих бактерий и бактерий, продуцирующих биосурфактанты, определяли на основании оценки количества копий генов [21, 22], которое устанавливали с помощью количественной ПЦР с использованием общеклеточных 341F/534R [23] и специфических праймеров (табл. 1). Реакционная смесь включала в себя 0.1 ед./мкл полимеразы SynTaq, 1-кратный буфер с красителем SYBR Green, 2.5 mM MgCl₂, по 200 мкМ каждого dNTP, 0.2 мкМ каждого праймера и 1 мкл ДНК. Амплификацию осуществляли на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Германия) в следующем режиме: 15 мин при 95 °С, и 39 циклов по 30 с при 95 °С, 30 с при 55 °С, и 30 с при 72 °С. Стандартная кривая для оценки общего числа бактерий была построена на основе зависимости порогового цикла (Ct) от известных количеств копий 16S рРНК генов штамма *Pseudomonas fluorescens*. ДНК положительного клона, несущего интересующий ген, разводили до семи различных концентраций ДНК в диапазоне от 1 пг/мкл до 1 нг/мкл и амплифицировали для создания стандартной кривой. Концентрация ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0

Табл. 1

Праймеры, использованные в исследовании

Гены	Последовательность	T_m	Ссылки
<i>dsrA</i> и <i>apsA</i>	ACSCACTGGAAGCACGGGTGGAGCCGTGCA TGTT	60 °C	[24, 25]
<i>rhlB</i>	GCCACGACCAGTTCGACCATCCCCCTCCCT ATGAC	50 °C	[26]
<i>rhlAB</i>	GGGGCTTGTGTGGGTCTTGCCATGCCTTTTC CGCCAACCCCTCGC	54 °C	[27]
<i>rhlA</i>	TTTCACATCGACCAGGTGCTTGCCGTTGATG AAATGCACG	51 °C	[13]
<i>rhlR</i>	GCGCAAGCTTGTGGCGCTTGCTCGAGGACCC GCTCCAGACCACCATTTCC	51 °C	[28]

Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Эффективность количественной ПЦР составила 94% при значениях R^2 больше 0.99.

Количество копий генов относили к 1 мл анализируемого образца [6, 29].

Для генов *dsrA* и *apsA*, *rhlA*, *rhlAB*, *rhlB*, *rhlR* была рассчитана их доля (относительное количество) как отношение количества копий соответствующего гена к количеству копий гена 16S рРНК, выраженное в процентах [21, 22].

Статистическая обработка результатов. Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. Полученные данные были обработаны с использованием программы Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, США). Для оценки достоверности различий был использован критерий Фишера при $\alpha = 0.05$. Альфа-разнообразие было рассчитано с помощью индексов Шеннона – Уивера и Симпсона.

2. Результаты и их обсуждение

В процессе метагеномного анализа в результате секвенирования бактериальных сообществ по V3–V4-региону 16S рРНК всего было получено 88595 пар последовательностей, удалено 568 химер, контроль качества прошло 88027 пар последовательностей. Суммарно в образцах было идентифицировано 137 ОТЕ, из них в исходном образце 2313А – 137 ОТЕ, в культивированном (2313Б) – 29 ОТЕ. Установлено, что в образце исходного пластового флюида (2313А) доминировали бактерии типов Proteobacteria (50%) и Actinobacteria (45%) (рис. 1). Полученные результаты согласуются с известными данными: так, М. Пэннекенс с соавторами [4] и Л.-И. Ван с соавторами [30] отмечают, что бактерии, представляющие типы Proteobacteria и Actinobacteria повсеместно распространены в нефтяных пластах, более того, М. Ван с соавторами [5] отмечают, что заводнение скважин способствует появлению быстрорастущих бактерий, представителей типа Proteobacteria. Принимая во внимание то, что вода в пластовом флюиде составляла более 99%, выявленный результат закономерен. В культивированном образце (2313Б) преобладали бактерии типа Actinobacteria (99.9%) (рис. 1).

Анализ сообществ на уровне порядков и родов выявил, что в образце исходного флюида доминировали аэробные бактерии родов *Pseudomonas* (порядок Pseudomonadales) – 47.5% и *Rhodococcus* (порядок Actinomycetales) – 45% (рис. 2). Известно, что бактерии – представители порядка Pseudomonadales – наиболее

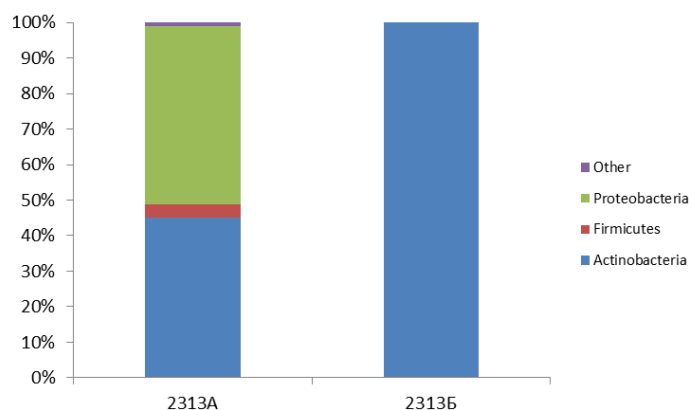


Рис. 1. Структура сообществ образцов 2313А и 2313Б с группировкой ОТЕ на уровне типов (порог сходства 97%)

распространены в заводненных скважинах [3, 30] и, в целом, представители обоих порядков преобладают в нефтяной фазе пластового флюида [4, 30]. Представители этих доминирующих порядков являются типичными углеводородокисляющими организмами; кроме них было обнаружено множество углеводородокисляющих порядков с меньшим обилием, таких как, например, Burkholderiales. Помимо аэробных микроорганизмов в сообществе обнаружены и представители порядков Halanaerobiales (1.4%) и Desulfovibrionales (0.03%), в число которых входят анаэробные организмы.

В сообществе культивированного образца доминировала ОТЕ, отнесенная к виду *Rhodococcus fascians* (порядок Actinomycetales). Здесь необходимо отметить, что ОТЕ, принадлежащая к виду *Rh. Fascians*, в исходном образце пластового флюида имела обилие менее 0.01%. Бактерии вида *Rh. fascians* обычно встречаются и в чистых, и в загрязненных нефтью почвах. Представители этого вида характеризуются как способностью трансформировать углеводороды, так и толерантностью к факторам окружающей среды, таким как колебания температуры, влажности и рН [31–33]. После культивирования обилие представителей других порядков соответственно снизилось, например, обилие Pseudomonadales снизилось до 0.005%, обилие Burkholderiales – до 0.007%, а представители ОТЕ, относящихся к анаэробным организмам, были элиминированы.

Данные о количестве ОТЕ и их обилии, полученные в процессе секвенирования, позволили сравнить два сообщества по индексам альфа-разнообразия, для чего использовали индекс Шеннона – Уивера, учитывающий одновременно выравненность и видовое богатство в сообществе, и индекс Симпсона, учитывающий в основном вклад доминирования отдельных видов.

Оценка альфа-разнообразия сообществ показала, что культивирование образца исходного флюида привело к снижению индекса Шеннона – Уивера с 3.1 до 0.3, а индекса Симпсона с 0.8 до 0.1. Это свидетельствует о том, что образец исходного флюида (2313А) характеризуется большим разнообразием, чем культивированный (2313Б), и этот результат согласуется с известными данными [18]. Скорее всего, изменение разнообразия связано с изменением структуры доминирования и элиминации некоторых членов сообществ, например представителей анаэробных родов *Halanaerobium*, *Desulfovibrionales*.

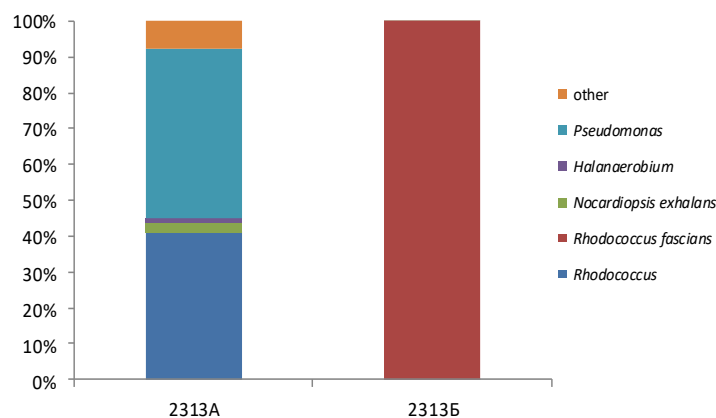


Рис. 2. Структура сообществ образцов 2313А и 2313Б с группировкой ОТЕ на уровне порядков и родов (порог сходства 97%)

Еще одной характеристикой микробных сообществ является численность всех организмов в сообществе или численность бактерий каких-либо функциональных групп. Количество всех бактерий в сообществе определяли на основе анализа количества копий генов, полученных методом количественной ПЦР с использованием праймеров к консервативным участкам 16S рРНК региона. Данный регион рекомендуется для анализа представителей царства бактерий ввиду того, что он содержит консервативные участки вне зависимости от их таксономической принадлежности. Подобный подход представлен в [19, 20] для анализа наличия и числа копий общеклеточных генов на основе ПЦР участка 16S рРНК.

Согласно данным, представленным в литературе, результаты количественной ПЦР используются для оценки обилия бактерий в целом и отдельных функциональных групп в природных объектах, в частности в почве [21]. В ряде случаев авторы осуществляют пересчет количества копий генов на количество клеток в 1 г почвы [22]. Анализ количества копий общеклеточных генов показал, что в образце 2313А их количество составляло $1.6 \cdot 10^5$ копий генов/мл, тогда как в образце 2313Б оно было равно $8.2 \cdot 10^5$ копий генов/мл (рис. 3). Таким образом, культивирование исходного образца увеличило общее число бактерий в 5 раз.

Оценку обилия двух групп бактерий, осуществляющих производство биосурфактантов и сульфатредукцию, осуществляли методом количественной ПЦР с использованием специфических праймеров (см. раздел «Материалы и методы исследования»). Указанные группы бактерий были выбраны в качестве примера. Так, активность сульфатредуцирующих бактерий оказывает негативное влияние на процесс нефтедобычи, поскольку продукты их метаболизма вызывают коррозию оборудования. В то же время функционирование бактерий, продуцирующих биосурфактанты, может быть рассмотрено как положительный факт, поскольку эти соединения разжижают нефть, что способствует повышению эффективности ее добычи.

Анализ количества генов, ответственных за продукцию биосурфактантов, показал, что в образце исходного флюида (2313А) доля генов *rhlB* и *rhlAB* составляла 44 и 29% от количества копий общеклеточных генов. В образце

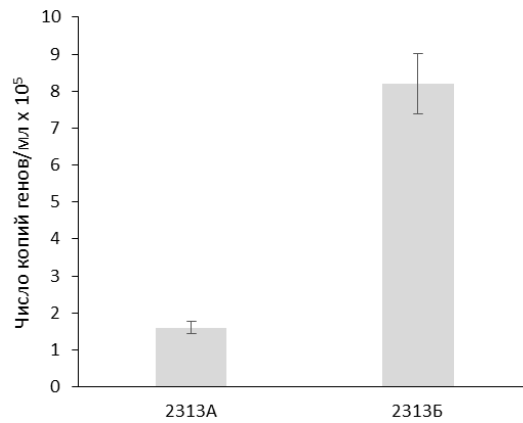


Рис. 3. Количество копий генов 16S рРНК, установленное для образцов 2313А и 2313Б

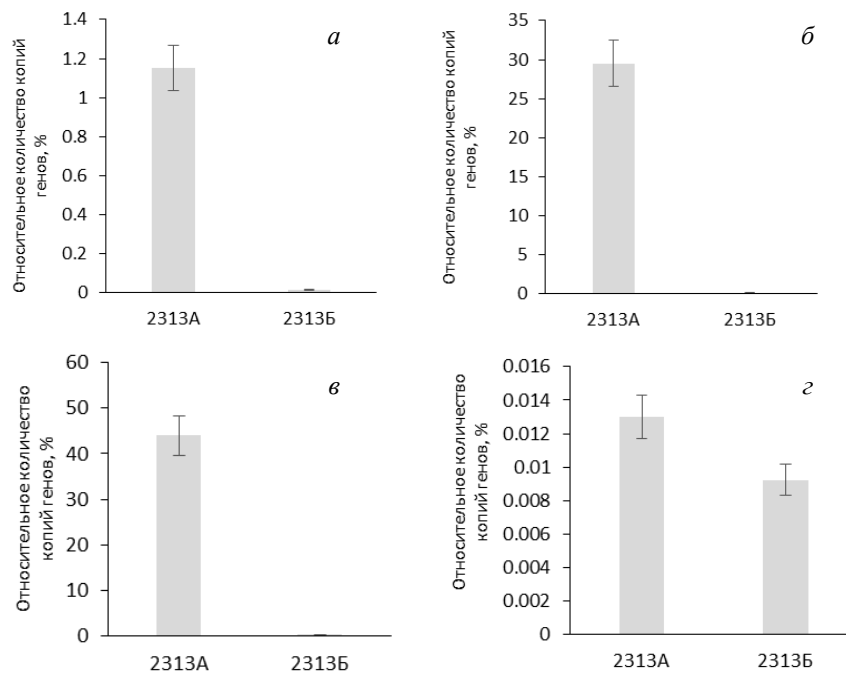


Рис. 4. Относительное количество копий генов, кодирующих синтез биосурфактантов: *a* – *rhlA*, *б* – *rhlAB*, *в* – *rhlB*, *г* – *rhlR*

2313Б их доля оказалась в 1063 и 244 раза ниже по сравнению с исходным образцом (рис. 4, *б*, *в*). В случае генов *rhlA* и *rhlR* снижение оказалось менее выраженным – в 69 и 1.4 раза соответственно (рис. 4, *а*, *г*). Согласно данным [13, 14], ген *rhlA* обнаружен у бактерий родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*. В нашем случае снижение числа копий генов, кодирующих синтез рамнолипидов, соответствует снижению относительного обилия его носителей – представителей родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* – в культивированном образце (рис. 2 и 4).

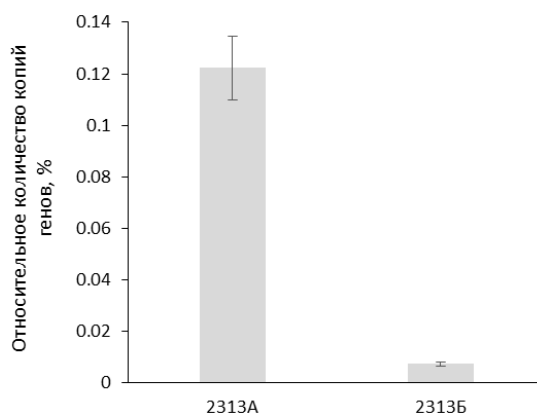


Рис. 5. Относительное количество копий генов, кодирующих ферменты сульфатредукции (*dsrA*, *apsA*)

Для анализа наличия сульфатредуцентов был использован праймер, который сконструирован для консервативных участков последовательностей генов *dsrA* и *apsA* [24]. Анализ генов, кодирующих ферменты сульфатредукции, выявил, что в исходном флюиде (образец 2313А) их доля оказалась выше в 17 раз по сравнению с долей культивированного образца 2313Б (рис. 5). Такое снижение, скорее всего, связано с элиминированием из сообщества носителей этих генов, таких как бактерии семейства *Desulfovibrionales*, в связи с тем что они являются облигатными анаэробами [17].

Заключение

Проведен анализ микробных сообществ исходного пластового флюида и его обогащенного варианта, включающий оценку состава и структуры бактериальных сообществ, относительного количества копий генов бактерий, включенных в процессы сульфатредукции и продукции биосурфактантов. Выявлено: несмотря на то что метод обогащения позволяет существенно увеличить обилие бактерий в сообществе, он приводит к изменению в структуре и составе сообществ. Следовательно, при сравнении сообществ микроорганизмов различных пластовых флюидов метод обогащения может применяться только при невозможности прямого выделения ДНК из образцов. В этом случае сравнение необходимо осуществлять также с обогащенным образцом.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению № 075-15-2020-931 в рамках программы развития НЦМУ «Рациональное освоение запасов жидких углеводородов планеты».

Литература

1. Vigneron A., Alsop E.B., Lomans B.P., Kyrpides N.C., Head I.M., Tsesmetzis N. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle // ISME J. – 2017. – V. 11, No 9. – P. 2141–2154. – doi: 10.1038/ismej.2017.78.

2. *Sierra-Garcia I.N., Belgini D.R.B., Torres-Ballesteros A., Paez-Espino D., Capilla R., Santos Neto E.V., Gray N., de Oliveira V.M.* In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs // *Sci. Total Environ.* – 2020. – V. 715. – Art. 136646, P. 1–14. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136646.
3. *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. – V. 2012. – Art. 156537, P. 1–8. – doi: 10.1155/2012/156537.
4. *Pannekens M., Kroll L., Müller H., Mbow F.T., Meckenstock R.U.* Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms // *New Biotechnol.* – 2019. – V. 49. – P. 1–9. – doi: 10.1016/j.nbt.2018.11.006.
5. *Wang M., Deng B., Fu X., Sun H., Xu Z.* Characterizations of microbial diversity and machine oil degrading microbes in machine oil contaminated soil // *Environ. Pollut.* – 2019. – V. 255, Pt. 1. – Art. 113190, P. 1–10. – doi: 10.1016/j.envpol.2019.113190.
6. *Li J., Feng M., Yu X.* Rapid detection of *mcyG* gene of microcystins producing cyanobacteria in water samples by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips // *J. Water Health.* – 2021. – V. 19, No 6. – P. 907–917. – doi: 10.2166/wh.2021.091.
7. *Blazejak A., Schippers A.* Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea // *Front. Microbiol.* – 2011. – V. 2. – Art. 253, P. 1–11. – doi: 10.3389/fmicb.2011.00253.
8. *Gittel A., Sørensen K.B., Skovhus T.L., Ingvorsen K., Schramm A.* Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75, No 22. – P. 7086–7096. – doi: 10.1128/AEM.01123-09.
9. *Fritz G., Büchert T., Huber H., Stetter K.O., Kroneck P.M.H.* Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1 alphabeta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes – high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 473, No 1. – P. 63–66. – doi: 10.1016/s0014-5793(00)01500-3.
10. *Klein M., Friedrich M., Roger A.J., Hugenholtz P., Fishbain S., Abicht H., Blackall L.L., Stahl D.A., Wagner M.* Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183, No 20. – P. 6028–6035. – doi: 10.1128/JB.183.20.6028-6035.2001.
11. *Wagner M., Roger A.J., Flax J.L., Brusseau G.A., Stahl D.A.* Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180, No 11. – P. 2975–2982. – doi: 10.1128/JB.180.11.2975-2982.1998.
12. *Zverlov V., Klein M., Lücker S., Friedrich M.W., Kellermann J., Stahl D.A., Loy A., Wagner M.* Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187, No 6. – P. 2203–2208. – doi: 10.1128/JB.187.6.2203-2208.2005.
13. *Dulcey C.E., López de los Santos Y., Létourneau M., Déziel E., Doucet N.* Semi-rational evolution of the 3-(3-hydroxyalkanoxyloxy)alkanoate (HAA) synthase Rh1A to improve rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae* // *FEBS J.* – 2019. – V. 286, No 20. – P. 4036–4059. – doi: 10.1111/febs.14954.
14. *Twigg M.S., Tripathi L., Zompra A., Salek K., Irorere V.U., Gutierrez T., Spyroulias G.A., Marchant R., Banat I.M.* Identification and characterisation of short chain rhamnolipid production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – V. 102, No 19. – P. 8537–8549. – doi: 10.1007/s00253-018-9202-3.

15. Ferrari B.C., Binnerup S.J., Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, No 12. – P. 8714–8720. – doi: 10.1128/AEM.71.12.8714-8720.2005.
16. Dellagnezze B.M., Vasconcellos S.P., Angelim A.L., Melo V.M.M., Santisi S., Cappello S., Oliveira V.M. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale // *Mar. Pollut. Bull.* – 2016. – V. 107, No 1. – P. 107–117. – doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.04.011.
17. von der Weid I., Korenblum E., Jurelevicius D., Rosado A.S., Dino R., Sebastian G.V., Seldin L. Molecular diversity of bacterial communities from subseafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 18, No 1. – P. 5–14.
18. Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K.-E., Streit W.R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, No 10. – P. 6235–6242. – doi: 10.1128/AEM.69.10.6235-6242.2003.
19. Muyzer G., de Waal E., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, No 3. – P. 695–700. – doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
20. Shahsavari E., Aburto-Medina A., Taha M., Ball A.S. A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils // *MethodsX.* – 2016. – V. 3. – P. 205–211. – doi: 10.1016/j.mex.2016.02.005.
21. Xu K., Tang Y., Ren C., Zhao K., Sun Y. Diversity and abundance of *n*-alkane-degrading bacteria in the near-surface soils of a Chinese onshore oil and gas field // *Biogeosciences.* – 2013. – V. 10. – P. 2041–2048. – doi:10.5194/bg-10-2041-2013.
22. Fukuhara Y., Horii S., Matsuno T., Matsumiya Y., Mukai M., Kubo M. Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2013. – V. 170, No 2. – P. 329–339. – doi: 10.1007/s12010-013-0170-x.
23. Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, No 3. – P. 695–700. – doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
24. Ben-Dov E., Brenner A., Kushmaro A. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* genes // *Microb. Ecol.* – 2007. – V. 54, No 3. – P. 439–451. – doi: 10.1007/s00248-007-9233-2.
25. Karunakaran E., Vernon D., Biggs C.A., Saul A., Crawford D., Jensen H. Enumeration of sulphate-reducing bacteria for assessing potential for hydrogen sulphide production in urban drainage systems // *Water Sci. Technol.* – 2016. – V. 73, No 12. – P. 3087–3094. – doi: 10.2166/wst.2016.026.
26. Bodour A.A., Drees K.P., Maier R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, No 6. – P. 3280–3287. – doi: 10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003.
27. Medina G., Juárez K., Valderrama B., Soberón-Chávez G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter // *J. Bacteriol.* – 2003. – V. 185, No 20. – P. 5976–5983. – doi: 10.1128/JB.185.20.5976-5983.2003.
28. Medina G., Juárez K., Díaz R., Soberón-Chávez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein // *Microbiology.* – 2003. – V. 149, No 11. – P. 3073–3081. – doi: 10.1099/mic.0.26282-0.

29. Agrawal A., Lal B. Rapid detection and quantification of bisulfite reductase genes in oil field samples using real-time PCR // FEMS Microbiol. Ecol. – 2009. – V. 69, No 2. – P. 301–312. – doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00714.x.
30. Wang L.-Y., Ke W.-J., Sun X.-B., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 98, No 9. – P. 4209–4221. – doi: 10.1007/s00253-013-5472-y.
31. Maes T., Vereecke D., Ritsema T., Cornelis K., Thu H.N.T., Van Montagu M., Holsters M., Goethals K. The *att* locus of *Rhodococcus fascians* strain D188 is essential for full virulence on tobacco through the production of an autoregulatory compound // Mol. Microbiol. – 2001. – V. 42, No 1. – P. 13–28. – doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02615.x.
32. Muscatello G., Anderson G.A., Gilkerson J.R., Browning G.F. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72, No 9. – P. 6152–6160. – doi: 10.1128/AEM.00495-06.
33. Fanget N.V.J., Foley S. Starvation/stationary-phase survival of *Rhodococcus erythropolis* SQ1: A physiological and genetic analysis // Arch. Microbiol. – 2011. – V. 193, No 1. – P. 1–13. – doi: 10.1007/s00203-010-0638-9.

Поступила в редакцию
23.12.2021

Бикташева Лилия Рамилевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Учебно-научной лаборатории «Центр агро- и экобиотехнологий» Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: biktasheval@mail.ru

Селивановская Светлана Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru

Мухтарова Рената Алмазовна, лаборант Учебно-научной лаборатории «Центр агро- и экобиотехнологий» Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: rene.2020@yandex.ru

Абдалджалил Хассан, инженер НИЛ изучения состояния и эволюции подземных резервуаров НЦМУ «Рациональное освоение запасов жидких углеводородов планеты» Института геологии и нефтегазовых технологий

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: hasanabdaljalil23@gmail.com

Галицкая Полина Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: gpolina33@yandex.ru

**Some Characteristics of the Microbial Community
of Reservoir Fluids of the Romashkinskoe Field**

L.R. Biktasheva*, S.Y. Selivanovskaya**, R.A. Mukhtarova***, H. Abdaljalil****,
P.Y. Galitskaya*****

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: *biktasheval@mail.ru, **svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru, ***rene.2020@yandex.ru,
****hasanabdaljalil23@gmail.com, *****gpolina33@yandex.ru

Received December 23, 2021

Abstract

The condition of oil wells is reflected by the abundance and species composition of microorganisms in their reservoir fluids. However, such microorganisms are often present in small numbers, which hampers their analysis. The culture enrichment method is a good strategy to overcome this problem. Here we discuss the results of a molecular biology-based comparative analysis of some characteristics of the microbial communities from the following two samples: the initial reservoir fluid sample (2313A) and the enriched sample (2313B).

The metagenomic analysis showed that sample 2313A was dominated by aerobic bacteria belonging to the genera *Pseudomonas* (order Pseudomonales) (47.5%) and *Rhodococcus* (order Actinomycetales) (45%). The community also comprised representatives of the anaerobic orders Halanaerobiales (1.4%) and Desulfovibrionales (0.03%). In sample 2313B, bacteria from the phylum Actinobacteria prevailed (99.9%) with *Rhodococcus fascians* (order Actinomycetales) identified as the dominant OTU. The quantitative real-time PCR analysis revealed that the enrichment process led to a 1063 and 244 times decrease in the relative abundance of copies of the *rhlB* and *rhlAB* genes encoding enzymes for the production of biosurfactants. The cultivation had a lesser effect on the abundance of copies of the *dsrA* and *apsA* genes, both involved in the sulfate reduction. When summarized, the obtained results indicate that the culture enrichment method enables the formation of a community differing substantially from the initial microbial communities of reservoir fluids of the oil wells.

Keywords: reservoir fluid, bacterial community, sulfate reduction, biosurfactants

Acknowledgments. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement no. 075-15-2020-931) within the framework of the development program of a world-class research center “Efficient development of the global liquid hydrocarbon reserves”.

Figure Captions

Fig. 1. Community structure of samples 2313A and 2313B with OTU grouping at the phylum level (similarity threshold of 97%).

Fig. 2. Community structure of samples 2313A and 2313B with the OTU grouping at the level of orders and genera (similarity threshold of 97%).

Fig. 3. Number of copies of 16S rRNA genes determined for samples 2313A and 2313B.

Fig. 4. Relative number of copies of genes encoding the synthesis of biosurfactants: *a* – *rhlA*, *b* – *rhlAB*, *c* – *rhlB*, *d* – *rhlR*.

Fig. 5. Relative number of copies of genes encoding sulfate reduction enzymes (*dsrA*, *apsA*).

References

1. Vigneron A., Alsop E.B., Lomans B.P., Kyrpides N.C., Head I.M., Tsesmetzis N. Succession in the petroleum reservoir microbiome through an oil field production lifecycle. *ISME J.*, 2017, vol. 11, no. 9, pp. 2141–2154. doi: 10.1038/ismej.2017.78.
2. Sierra-Garcia I.N., Belgini D.R.B., Torres-Ballesteros A., Paez-Espino D., Capilla R., Santos Neto E.V., Gray N., de Oliveira V.M. In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. *Sci. Total Environ.*, 2020, vol. 715, art. 136646, pp. 1–14. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136646.
3. 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, vol. 2012, art. 156537, pp. 1–8. doi: 10.1155/2012/156537.
4. Pannekens M., Kroll L., Müller H., Mbow F.T., Meckenstock R.U. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *New Biotechnol.*, 2019, vol. 49, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.nbt.2018.11.006.
5. Wang M., Deng B., Fu X., Sun H., Xu Z. Characterizations of microbial diversity and machine oil degrading microbes in machine oil contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 2019, vol. 255, pt. 1, art. 113190, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113190.
6. Li J., Feng M., Yu X. Rapid detection of *mcyG* gene of microcystins producing cyanobacteria in water samples by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips. *J. Water Health*, 2021, vol. 19, no. 6, pp. 907–917. doi: 10.2166/wh.2021.091.
7. Blazejak A., Schippers A. Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2, art. 253, pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2011.00253.
8. Gittel A., Sørensen K.B., Skovhus T.L., Ingvorsen K., Schramm A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 22, pp. 7086–7096. doi: 10.1128/AEM.01123-09.
9. Fritz G., Büchert T., Huber H., Stetter K.O., Kroneck P.M.H. Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1 alphabeta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes – high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Lett.*, 2000, vol. 473, no. 1, pp. 63–66. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01500-3.
10. Klein M., Friedrich M., Roger A.J., Hugenholtz P., Fishbain S., Abicht H., Blackall L.L., Stahl D.A., Wagner M. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 20, pp. 6028–6035. doi: 10.1128/JB.183.20.6028-6035.2001.
11. Wagner M., Roger A.J., Flax J.L., Brusseau G.A., Stahl D.A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 11, pp. 2975–2982. doi: 10.1128/JB.180.11.2975-2982.1998.
12. Zverlov V., Klein M., Lücker S., Friedrich M.W., Kellermann J., Stahl D.A., Loy A., Wagner M. Lateral gene transfer of dissimilatory (bi)sulfite reductase revisited. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 6, pp. 2203–2208. doi: 10.1128/JB.187.6.2203-2208.2005.
13. Dulcey C.E., López de los Santos Y., Létourneau M., Déziel E., Doucet N. Semi-rational evolution of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAA) synthase RhlA to improve rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. *FEBS J.*, 2019, vol. 286, no. 20, pp. 4036–4059. doi: 10.1111/febs.14954.
14. Twigg M.S., Tripathi L., Zompra A., Salek K., Irorere V.U., Gutierrez T., Spyroulias G.A., Marchant R., Banat I.M. Identification and characterisation of short chain rhamnolipid production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, vol. 102, no. 19, pp. 8537–8549. doi: 10.1007/s00253-018-9202-3.
15. Ferrari B.C., Binnerup S.J., Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 12, pp. 8714–8720. doi: 10.1128/AEM.71.12.8714-8720.2005.
16. Dellagnezze B.M., Vasconcellos S.P., Angelim A.L., Melo V.M.M., Santisi S., Cappello S., Oliveira V.M. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. *Mar. Pollut. Bull.*, 2016, vol. 107, no. 1, pp. 107–117. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.04.011.

17. von der Weid I., Korenblum E., Jurelevicius D., Rosado A.S., Dino R., Sebastian G.V., Seldin L. Molecular diversity of bacterial communities from seafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 5–14.
18. Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K.-E., Streit W.R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 10, pp. 6235–6242. doi: 10.1128/AEM.69.10.6235-6242.2003.
19. Muyzer G., de Waal E., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 3, pp. 695–700. doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
20. Shahsavari E., Aburto-Medina A., Taha M., Ball A.S. A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. *MethodsX*, 2016, vol. 3, pp. 205–211. doi: 10.1016/j.mex.2016.02.005.
21. Xu K., Tang Y., Ren C., Zhao K., Sun Y. Diversity and abundance of *n*-alkane-degrading bacteria in the near-surface soils of a Chinese onshore oil and gas field. *Biogeosciences*, 2013, vol. 10, pp. 2041–2048. doi: 10.5194/bg-10-2041-2013.
22. Fukuhara Y., Horii S., Matsuno T., Matsumiya Y., Mukai M., Kubo M. Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, vol. 170, no. 2, pp. 329–339. doi: 10.1007/s12010-013-0170-x.
23. Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 3, pp. 695–700. doi: 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
24. Ben-Dov E., Brenner A., Kushmaro A. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* genes. *Microb. Ecol.*, 2007, vol. 54, no. 3, pp. 439–451. doi: 10.1007/s00248-007-9233-2.
25. Karunakaran E., Vernon D., Biggs C.A., Saul A., Crawford D., Jensen H. Enumeration of sulphate-reducing bacteria for assessing potential for hydrogen sulphide production in urban drainage systems. *Water Sci. Technol.*, 2016, vol. 73, no. 12, pp. 3087–3094. doi: 10.2166/wst.2016.026.
26. Bodour A.A., Drees K.P., Maier R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 6, pp. 3280–3287. doi: 10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003.
27. Medina G., Juárez K., Valderrama B., Soberón-Chávez G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 20, pp. 5976–5983. doi: 10.1128/JB.185.20.5976-5983.2003.
28. Medina G., Juárez K., Díaz R., Soberón-Chávez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology*, 2003, vol. 149, no. 11, pp. 3073–3081. doi: 10.1099/mic.0.26282-0.
29. Agrawal A., Lal B. Rapid detection and quantification of bisulfite reductase genes in oil field samples using real-time PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2009, vol. 69, no. 2, pp. 301–312. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00714.x.
30. Wang L.-Y., Ke W.-J., Sun X.-B., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 9, pp. 4209–4221. doi: 10.1007/s00253-013-5472-y.
31. Maes T., Vereecke D., Ritsema T., Cornelis K., Thu H.N.T., Van Montagu M., Holsters M., Goethals K. The *att* locus of *Rhodococcus fascians* strain D188 is essential for full virulence on tobacco through the production of an autoregulatory compound. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 42, no. 1, pp. 13–28. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02615.x.
32. Muscatello G., Anderson G.A., Gilkerson J.R., Browning G.F. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 9, pp. 6152–6160. doi: 10.1128/AEM.00495-06.

33. Fanget N.V.J., Foley S. Starvation/stationary-phase survival of *Rhodococcus erythropolis* SQ1: A physiological and genetic analysis. *Arch. Microbiol.*, 2011, vol. 193, no. 1, pp. 1–13. doi: 10.1007/s00203-010-0638-9.

Для цитирования: Бикташева Л.Р., Селивановская С.Ю., Мухтарова Р.А., Абдалджалил Х., Галицкая П.Ю. Некоторые характеристики микробного сообщества пластовых флюидов Ромашкинского месторождения // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 2. – С. 263–278. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.263-278.

For citation: Biktasheva L.R., Selivanovskaya S.Y., Mukhtarova R.A., Abdaljalil H., Galit-skaya P.Y. Some characteristics of the microbial community of reservoir fluids of the Romashkinskoe field. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 2, pp. 263–278. doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.263-278. (In Russian)