

孤岛油田中一区馆3单元油藏微生物多样性分析*

汪卫东**

(胜利油田采油工艺研究院 东营 257000)

摘要 应用分子生态学方法,分析了孤岛油田中一区馆3单元油藏样品的微生物多样性,包括两个注入水样和4口油井产出液样,发现注入水样的微生物多样性明显高于油井产出液样,其中 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)和 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)占较高比例;同一单元相同的油藏条件下,不同油井产出液水样中微生物多样性存在明显的差异,油井产出液中的细菌类型较单一,以Gammaproteobacteria为主,但古菌类型相对较多,包含甲烷杆菌纲(Methanobacteria)、甲烷微菌纲(Methanomicrobia)、古丸菌纲(Archaeoglobi)、热球菌纲(Thermococci)等多个不同纲的微生物.相同的油井微生物多样性随时间不同而发生变化.对油藏微生物生态结构的分析可以为微生物采油技术提供基础资料.图5表2参12

关键词 油藏;微生物多样性;古菌;分子生态学分析方法;微生物采油;孤岛油田;胜利油田

CLC Q939.97 : TE357.9

Microbial Diversity of Guantao-3 Member of Zhongyi Block, Gudao Oil Field in China*

WANG Weidong**

(Oil Production Technology Research Institute, Shengli Oil Field Company, Sinopec, Dongying 257000, Shandong, China)

Abstract To develop microbial enhanced oil recovery (MEOR) technology, microbial diversity of Guantao-3 Member of Zhongyi Block, Gudao Oil Field in China after water and chemical flooding was investigated by molecular biology methods. Two samples of injected water and four samples of produced water were analyzed. The results indicated the diverse of microbial communities in the injected water, which was dominated by Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria, was more complicated than that in produced water, and the data also showed that there were notable differences of microbial communities in different oil wells, and the microbial community in a single well also changed with the time courses. Besides, the species diversity of bacteria in produced water, which was dominated by Gammaproteobacteria, was relatively simple; while that of archaea was relatively rich, including Methanobacteria, Methanomicrobia, Archaeoglobi and Thermococci. These results provide the basis information on microbial ecology in specific reservoirs for MEOR technology. Fig 5, Tab 2, Ref 12

Keywords oil reservoir; microbial diversity; archaea; molecular method; microbial enhanced oil recovery; Gudao Oil Field; Shengli Oil Field

CLC Q939.97 : TE357.9

我国经济快速发展对原油的需求量逐年增加,石油消费年平均增长率高达6.8%。2008年国内共消费原油 3.59×10^9 t,而全国原油总产量仅为 1.80×10^9 t,进口 1.79×10^9 t,进口依存度达到49.8%。因此,提高国内油田采收率已成为石油开发的重点任务。近20 a来,以聚合物驱油为主导的化学法提高采收率的技术得到快速发展,取得明显的提高采收率效果,然而,适合化学驱的油藏大部分均已实施过或正在实施化学驱技术,化学驱以后如何进一步提高采收率问题迫在眉睫。微生物采油技术被认为是具有较好发展前景的提高采收率技术,但目前仍存在许多问题尚未解决,其中一个关键性的问题,即对油藏环境中微生物的群落结构及演变规律认识还不清楚。过去依靠培养法进行研究局限性较大,现在国内外部分学者应用基于16S rRNA基因的分子生物学技术分析

油藏环境中的微生物,对油藏这种极端环境中的微生物群落有了新的认识^[1-3]。微生物采油技术发展至今,在国内外已基本形成一个共识,即通过人为干涉,调控油藏微生物生态结构,实现微生物群落结构和功能的变化,使之向有利于提高采收率的方向转变^[4]。因此,微生物采油技术研究首先要详细了解油藏环境中的微生物生态结构及主要种群,分析其中具有提高采收率潜力的种群,并设法激活这些目标微生物,其手段包括向油藏中引入微生物或相关的营养。

针对油藏条件特点,我们采用16S rRNA基因克隆文库技术分析了解孤岛油田中一区馆3单元的注入水样品和油藏产出液样品的微生物多样性,为微生物采油技术现场试验提供了基础资料。

1 孤岛油田中一区馆3单元油藏简述

孤岛油田中一区馆3单元是胜利油田的一个主要油区,埋藏深度1 173~1 230 m,油藏压力12 MPa,温度69 ℃,孔隙度33%,空气渗透率 $1.5 \sim 2.5 \mu\text{m}^2$,地层水总矿化度5 923 mg/L,原油粘度400~2 000 mPa.s。该区于1971年10月投产,1974年

收稿日期: 2009-12-02 接受日期: 2010-01-11

*中国石油化工股份有限公司重点科技攻关项目(No. P05076)资助
Supported by the Key Scientific and Technological Project of Sinopec (No. P05076)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wswzx@slof.com)

9月开始注水开发, 1994年12月开始注聚合物(聚丙烯酰胺)开发, 至2006年12月又恢复注水开发, 目前产出液含水已高达96.6%。为了进一步提高采收率, 计划在该单元开展微生物采油技术现场试验, 2006年5月开始对这个单元注入水和产出液进行了微生物多样性分析。

现场取样: 2个注入水样分别是G1-6、Z1-6, 其余均为油井产出液样, 分别从6-13、7N11、3C15、8X815井采集, 经油水分离后, 对水相进行分析, 代表油藏环境样品。注水井与油井相对地理位置如图1所示。

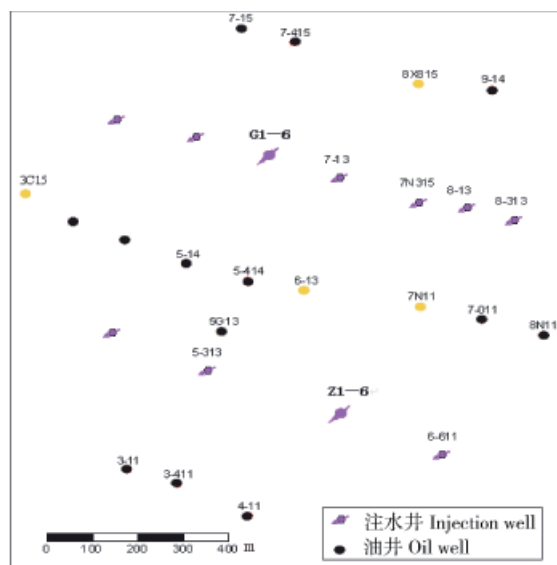


图1 中一区馆3单元取样井位图

Fig. 1 Sampling well map of Guantao-3 member of Zhongyi Block

2 样品处理与分析方法

油田现场取得样品与通常环境中的样品差别很大, 一般含一定量的原油, 样品乳化严重, 菌体量较低, 难于获取; 在油藏这种独特的环境下, 还可能存在比较独特的微生物群落, 所以, 需要选择适当的引物对细菌和古菌的群落进行分析^[5-7]。

为了尽可能获得较多的菌体, 在样品中加入适量的无菌饱和NaCl水溶液, 混合均匀后, 采用孔径为0.22 μm 的微孔滤膜减压抽滤, 所得滤膜连同截留物用异辛烷清洗后加入蛋白酶, 采用击打破壁的方法, 可获得较多的DNA样品。

16S rRNA基因的PCR扩增采用细菌通用引物27f和1492r^[8-11]; 扩增体系采用Promega公司的Taq DNA聚合酶扩增体系, 扩增程序参考Dicello等的方法; 古菌采用Rolling等的方法, 引物为ARCH46f和ARCH 1017r^[8-11]。

3 油藏微生物多样性分析结果

分析结果表明, 注入水的微生物多样性远远高于产出液。在挑取单克隆测序时注入水样挑取的数量多于产出液样, 从文库覆盖率(表1)来看, 尽管注入水样的测序数量大于产出液样, 但其文库覆盖率仍较低。

3.1 注入水样品细菌多样性分析

注入水样G1-6的多样性结果显示, 所有克隆按照99%的相似性共划分36个OTU类型。在注入水G1-6中,

表1 细菌16S rRNA基因文库分析结果

Table 1 Analysis of 16S rRNA genes of bacteria

样品来源 Sample name	OUT数 OTU number	测序数 Clone number	文库覆盖率 Coverage (r/%)
Z1-6	39	104	80.0
G1-6	36	94	81.7
3C15	4	72	98.6
8X815	11	72	83.3
6-13	8	72	95.7

包含了 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、 β -变形菌纲 (Betaproteobacteria)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、脱铁杆菌纲 (Deferribacteres)、 ϵ -变形菌纲 (Epsilonproteobacteria) 和黄杆菌纲 (Flavobacteria) 等, 其中Gammaproteobacteria占61.7%, Betaproteobacteria占21.3%。而在Gammaproteobacteria中, 假单胞菌科 (Pseudomonadaceae) 占主导地位, 在Betaproteobacteria中红环菌科 (Rhodocyclaceae) 占主导地位。科水平的微生物类群包括丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae)、黄杆菌科 (Flavobacteriaceae)、Rhodocyclaceae、脱铁杆菌科 (Deferribacteraceae)、嗜氢菌科 (Hydrogenophilaceae)、Pseudomonadaceae、红杆菌科 (Rhodobacteraceae)、弯曲菌科 (Campylobacteraceae)、优杆菌科 (Eubacteriaceae) 和交替单胞菌科 (Alteromonadaceae) 等 (图2)。

3.2 产出液样品细菌多样性分析

产出液6-13所有克隆按照99%的相似性共划分8个OTU类型。在产出液中, 细菌种类很单一, 主要属于Gammaproteobacteria, 占96%, 其中的优势科是莫拉氏菌科 (Moraxellaceae) 和Pseudomonadaceae。产出液中多样性相对注入水明显降低, 属水平的微生物类群包括冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和食酸菌属 (*Acidovorax*) 等 (图3)。

产出液8X815样品所有克隆按照99%的相似性共划分11个OTU类型。结果与6-13相似, 几乎所有细菌均来自Gammaproteobacteria, 但此文库的序列与已知序列的相似性较低, 科水平的微生物类群主要包括Pseudomonadaceae和Moraxellaceae; 属水平的微生物类群包括Pseudomonas和Acinetobacter。

产出液3C15所有克隆按照99%的相似性共划分4个OTU类型。所有序列均属于Gammaproteobacteria, 其中Pseudomonadaceae占主导地位, Moraxellaceae次之。属水平的微生物类群包括Psychrobacter、Pseudomonas和Acinetobacter。

3.3 古菌多样性分析

因为古菌的种类比细菌少, 而且文献表明在油藏环境中的古菌种类较单一, 所以古菌的测序数量较少, 从各文库的测序结果来看, 每个样品所含的OTU很少, 且文库覆盖率都能达到标准 (表2)。

从序列分析结果来看, 注入水G1-6古菌类群不如细菌那样丰富, 且此样品中的古菌全部属于产甲烷菌中的甲烷微菌纲 (Methanomicrobia)。与嗜热甲烷食甲基菌 (*Methanomethylovorans thermophila*) 相似的微生物占了绝对的优势 (图4)。

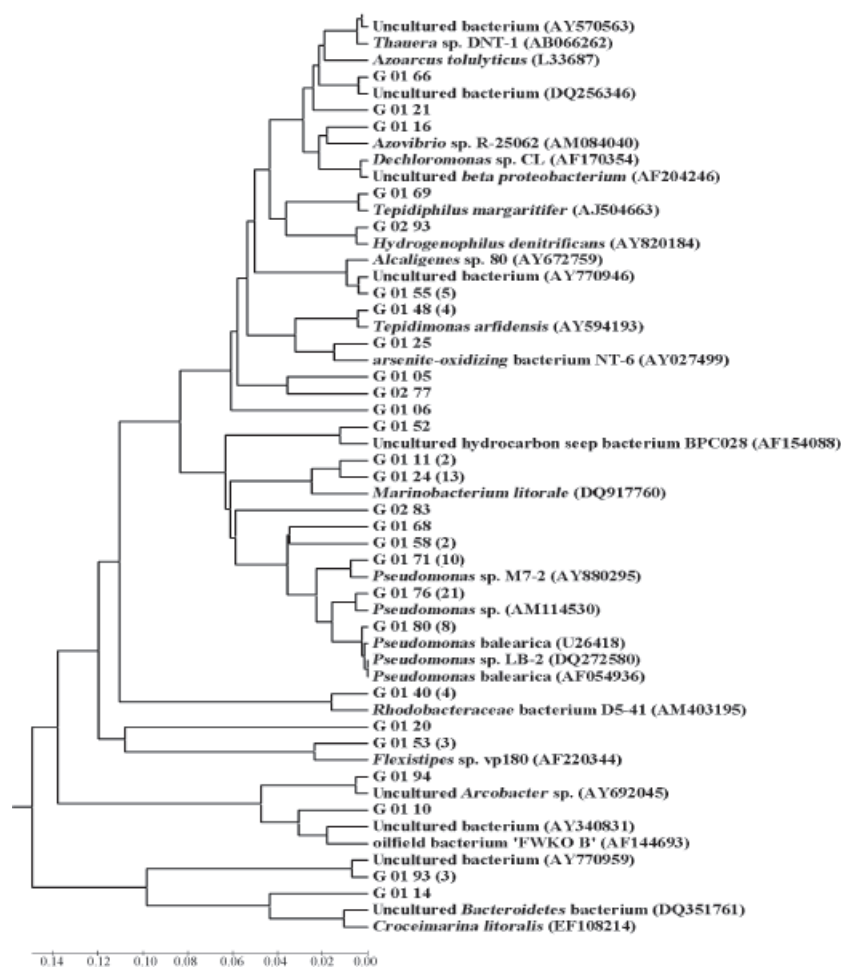


图2 注入水G1-6样品细菌16S rRNA基因文库序列的系统发育树

Fig. 2 Unrooted neighbor-joining tree based on the 16S rRNA genes from the clone libraries (G1-6) and their nearest neighbors retrieved from GenBank

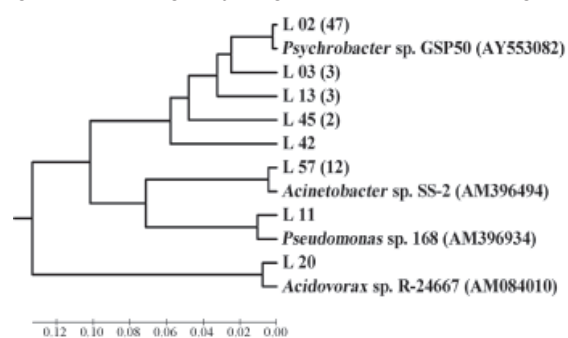


图3 产出液6-13样品细菌16S rRNA基因文库序列的系统发育树

Fig. 3 Unrooted neighbor-joining tree based on the 16S rRNA genes from the clone libraries (6-13) and their nearest neighbors retrieved from GenBank

表2 古菌16S rRNA基因文库分析结果

Table 2 Analysis of 16S rRNA genes of Archaea

样品来源	OUT数	测序数	文库覆盖率
Sample name	OTU number	Clone number	Coverage (%)
Z1-6	8	49	93.9%
G1-6	4	49	95.9%
3C15	5	33	93.9%
6-13	10	35	94.3%

注入水样品Z1-6中的古菌类型以产甲烷菌为主, 其中Methanomicrobia占93%, 甲烷杆菌纲 (Methanobacteria)

占7%. 与G1-6注水样品相似, 与*M. thermophila*相似的微生物占了很大的优势. Methanobacteria中占主要优势的是甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*) 和甲烷热杆菌属 (*Methanothermobacter*).

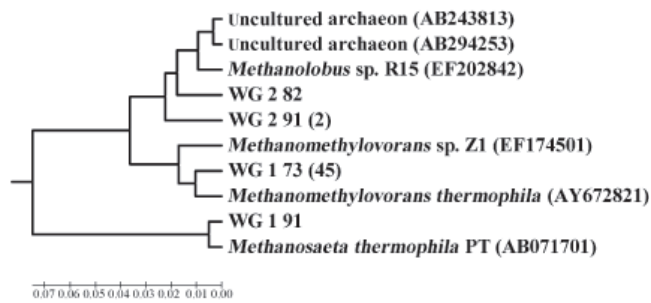


图4 产出液G1-6样品古菌16S rRNA基因文库序列的系统发育树

Fig. 4 Unrooted neighbor-joining tree based on the 16S rRNA genes of Archaea from the clone libraries (G1-6) and their nearest neighbors retrieved from GenBank

产出液6-13的古菌多样性分析结果与细菌结果相反, 产出液古菌的多样性比注入水古菌的多样性高, 6-13样品中Methanobacteria占37.1%, Methanomicrobia占14%, 古球状菌纲 (Archaeoglobi) 占31.4%, 另外还含有热球菌纲 (Thermococci) (图5).

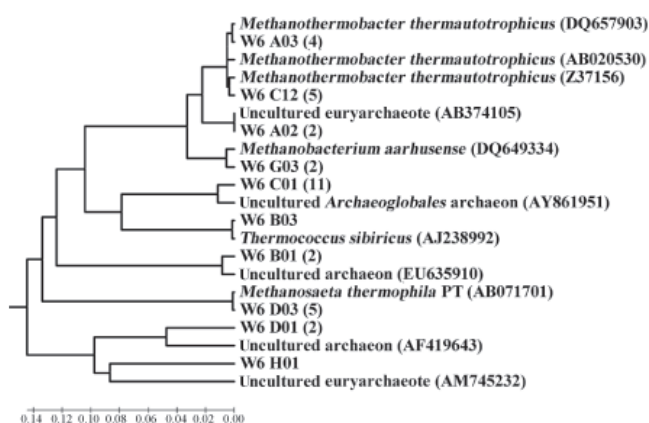


图5 产出液6-13样品古菌16S rRNA基因文库序列的系统发育树
Fig. 5 Unrooted neighbor-joining tree based on the 16S rRNA genes of Archaea from the clone libraries (6-13) and their nearest neighbors retrieved from GenBank

产出液3C15样品分析结果表明, 其中Methanobacteria占94%, 另外还有Methanomicrobia, 但数量不多。

对比文库的分析结果可以看出, 注入水的多样性明显高于产出液, 包括了Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Deltaproteobacteria、Deferribacteres、Epsilonproteobacteria和Thermotogae等; 而产出液的微生物多样性相对单一, 基本只有Gammaproteobacteria存在, 而且在Gammaproteobacteria中也仅有Pseudomonadaceae和Moraxellaceae两个科。但是不论是注入水还是产出液, Pseudomonadaceae是共有的。另外, 在注水中占较高优势(约20%)的Psychrobacter, 成为油井样品6-13中的主要优势微生物(>80%), 在3C15中也有一定优势。注水样品中占主要优势的Gammaproteobacteria, 在油井样品中没有检出, 说明油藏的极端条件不适宜于该类群微生物的生存, 而产出液在水的回注过程中, 在地上条件下Gammaproteobacteria得以增殖, 使注水中的该类菌成为优势菌。

4 微生物多样性随时间变化的分析比较

油田生产是一个动态过程, 各油井产出液的物理化学性质会随时间发生变化。为了进一步了解油藏中的微生物是否组成稳定, 在2007年9月再次取样开展16S rRNA基因文库分析, 并与2006年11月取样结果进行比较, 分析了这两批样品的微生物群落结构变化。

注入水G1-6不同时间点的多样性比较结果显示, 两批样品的细菌种类没有太大变化, 但是在数量上差异较大, 2006年的样品中优势菌较单一, 变形菌门(Proteobacteria)占93.2%, 而2007年的样品中优势菌群较多, 其中脱铁杆菌门(Deferribacteres)占34.6%, Proteobacteria下降至57.7%。

产出液3C15的2007年样品的多样性明显高于2006年的样品, 后者Proteobacteria占有绝对的优势(98.6%), 而前者中厚壁菌门(Firmicutes)和Proteobacteria都具有较高的丰度, 同时2007年样品中还有相当高丰度的蓝藻门(Cyanobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)等。产出液6-13的2007年样品的多样性明显高于2006年的样品, 后者只有Proteobacteria, 而前者中Proteobacteria和Firmicutes都具有较高的丰度, 同时2007

年样品中还有相当高丰度的Deferribacteres和Bacteroidetes等。产出液8X815两个时间的微生物文库的组成差异巨大, 和其它同一时间所采产出液的组成相似, 2006年所采的8X815样品仅含有Proteobacteria, 而2007年样品中Bacteroidetes成为最优势的细菌类型, Firmicutes也占有很高比例。3个产出液样品不同时间点多样性比较结果来看, 同一时间点的几个样品的相似性较高, 2006年样品优势菌均只有Proteobacteria, 而2007年样品的多样性均高于2006年样品。样品8X815的变化最大, Proteobacteria在间隔几个月后的样品中完全消失。

产出液7N11细菌文库比较结果表明, 两次不同时间采样的细菌群落结构的变化相对较小。Proteobacteria、Firmicutes和Unclassified Bacteria是两次样品中的主要优势微生物。

通过对2006年和2007年两次采样的微生物群落的系统分析, 发现同一口井的产出液在不同的时间点微生物群落结构变化较大。地下油层的温度、压力及总的营养物状态在这两个采样时间不会发生变化, 注入水由于在地面环境处理, 会受季节变化的影响较大, 这样注入水引入的细菌进入油藏改变油层中微生物生物因子和非生物因子, 从而使油层的微生物分布特征产生变化, 这可能是产出液中微生物群落发生变化的主要原因。

5 讨论

通过对中一区馆3高含水油藏中的特定注入水和产出液中的微生物多样性进行分析, 结果表明注入水中的细菌种类繁多, 包括Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Deferribacteres、Epsilonproteobacteria和Flavobacteria等, 而产出液中的细菌类型单一, 主要以Gammaproteobacteria为主; 古菌的结果与细菌相反, 注入水中的古菌类型单一, 以Methanomicrobia为主, 而产出液中的古菌类型相对较多, 包含Methanobacteria、Methanomicrobia、Archaeoglobi和Thermococci多个不同纲的微生物。油藏是一个极端环境, 高温高压(69 °C、12 MPa)条件下的产出液中微生物种类较少, 相对而言, 注入水在地面处理系统中处于常压状态, 温度也较低(40~50 °C), 有利于微生物生长繁殖, 因此, 注入水中的细菌种类较多。另外油藏还是一个缺氧环境, 有利于古菌的生长, 古菌的分析结果暗示在微生物采油过程中不可忽视这类菌群。

2006年11月样品和2007年9月建立的16S rRNA基因克隆文库序列分析表明, 注入水和产出液中的微生物多样性随时间发生变化, 显然油藏中微生物的类型不是简单地由注入水中的微生物组成所决定, 油藏的极端环境和特定类型的微生物的增殖使其微生物组成与注入水有较大区别。同一油井不同时间取样的分析结果显示油藏产出液的微生物组成随着时间发生了较大的改变, 说明注水井的微生物的注入对地层产生明显的扰动, 改变了油井产出液的微生物组成, 这些结果为人为干涉油藏微生物生态而进行微生物采油提供了理论依据。

现在的问题是产出液样能否完全代表油藏流体, 也就是分析产出液的微生物生态结构是不是油藏中的真实微生物生态结构^[12], 因为, 产出液要经过1 000多米的油井管柱才流到地面, 油井管柱中也有微生物群落存在, 可能影响最终的

分析结果, 这是油藏微生物分析不可避免的问题。另外, 本研究取样的油井属同一单元, 油井间距只有几百米, 油藏条件基本同样, 但分析结果表明各井微生物群落结构差异较大, 其原因有待于进一步研究。

致谢 感谢上海交通大学生命科学技术学院张晓君老师和任红燕博士在分析过程中给予技术支持。

References

- 1 Yuan SQ (袁三青), Xue YF (薛燕芬), Gao P (高鹏), Wang WD (汪卫东), Ma YH (马延和), Li XM (李希明), Xu GW (许国旺). Microbial diversity in Shengli Petroleum Reservoirs analyzed by T-RFLP. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, **47** (2): 290~294
- 2 Zhang XM (张雪梅), She YH (余跃惠), Huang JF (黄金凤), Zhang F (张凡), Wang J (王靖), Wang WJ (王文军), Wang HZ (王洪志), Wang ZL (王正良). Microbial diversity of the Daqing Oilfield after polymer flooding. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (5): 668~672
- 3 Nazina TN, Sokolova DS, Shestakova NM, Grigoriyan AA, Mikhailova EM, Babich TL, Lysenko AM, Tourova TP, Poltaraus AB, Feng QX, Ni FT, Belyaev SS. The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the Dagang high-temperature oil field. *Microbiology*, 2005, **74** (3): 343~351
- 4 Wang WD (汪卫东), Wei B (魏斌), Tan YX (谭云贤), Wang XL (王修林). Problems confronted in microbial enhanced oil recovery. *Pet Explor & Dev* (石油勘探与开发), 2004, **31** (6): 88~91
- 5 Gu J (谷峻), Shi CF (石成芳), Wu XL (吴晓磊), Zhao JY (赵俊义). Progress in methodological research of microbial community in oil fields. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2008, **27** (1): 324~329
- 6 Nazina TN, Shestakova NM, Grigoriyan AA, Mikhailova EM, Tourova TP, Poltaraus AB, Feng QX, Ni FT, Belyaev SS. Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P. R. China). *Microbiology*, 2006, **75** (1): 55~65
- 7 Cheng HY (程海鹰), Sun SS (孙珊珊), Liang JC (梁建春), Wang JJ (汪娟娟), Luo YJ (罗一菁), Wei L (魏利), Zhang ZZ (张忠智). Molecular analysis of microbial community in oil field. *Chem & Bioeng* (化学与生物工程), 2008, **25** (1): 939~943
- 8 Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 1999, **2**: 317~322
- 9 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 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, **59**: 695~700
- 10 Zhou L (周琳), Zhang XJ (张晓君), Li GX (李国勋), Zhang J (张杰). The application of DGGE/TGGE techniques in molecular microbial ecology of soil. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2006 (5): 67~71
- 11 Bao MT (包木太), Wang B (王兵), Chen QG (陈庆国), Gao GJ (高光军), Li XM (李希明). Denature gradient gel electrophoresis of stratal bacteria activation in oilfield under different pressure conditions. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2009, **49** (4): 536~539
- 12 Li H (李辉), Mu BZ (牟伯中). Recent advances in molecular microbial ecology of petroleum reservoirs. *Microbiology* (微生物学通报), 2008, **35** (5): 803~808