科学通报 2019 年 第 64 卷 第 18 期: 1930 ~ 1942
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

山东胜利油田沾3油藏微生物组特征

张蔚[1], 胡小丽[1], 邱轩[1], 刘邓[1], 冯亮[1], 马丽媛[1], 胡婧[2], 王红梅[1*]

1. 中国地质大学, 生物地质与环境地质国家重点实验室, 武汉 430074;
2. 胜利油田采油工程院, 东营 257000
* 联系人, E-mail: wanghmei04@163.com, hmwang@cug.edu.cn

2019-02-20 收稿, 2019-04-28 修回, 2019-04-28 接受, 2019-06-04 网络版发表
中国石油化工股份有限公司项目(P16101)资助

摘要 以山东胜利油田沾3区注入水和采出液为研究对象, 利用16S rRNA高通量测序技术, 分析了油相样本、水相样本以及注入水样本的微生物群落结构. 结果发现沾3油藏微生物多样性较高, 注入水样本中细菌群落多样性最高, 古菌群落多样性最低; 而采出液油相样本的微生物群落多样性较采出液水相样本低. 采出液微生物组的特征与注入水中微生物组的特征存在较大差异, 具有明显的生境特异性. 采出液油相样本与水相样本中主要的细菌类群包括γ-变形菌纲、ε-变形菌纲、α-变形菌纲、放线菌纲和梭状芽孢杆菌纲. 在属水平上, 采出液以假单胞菌占优势, 而注入水中的优势菌属为硫单胞菌. 采出液中古菌主要类群为甲烷微菌纲、甲烷杆菌纲、嗜盐菌纲、热原体纲、热变形菌纲和热球菌纲, 尤其以鬃毛甲烷菌科和甲烷杆菌为主. 对注入水和采出液水相中的油藏微生物与环境理化因子进行冗余分析(RDA)发现, 注入水细菌和古菌群落均主要受SO_4^{2-}浓度影响, 采出液水相样本中的细菌群落主要受Ca^{2+}浓度和pH等影响, 而古菌群落则主要受Cl^-, Mg^{2+}和HCO_3^-浓度影响. 该研究结果揭示了微生物在高温油藏环境中的空间分布特征及受控因素, 为今后定向调控油藏微生物群落、进而提高微生物驱油的采油率奠定了基础.

关键词 油藏, 微生物组, 高通量测序, 微生物多样性, 胜利油田

微生物驱油作为一种新型驱油方式, 具有工艺简单、成本低、污染小等特点, 拥有广阔的应用前景[1]. 微生物驱油技术主要是将微生物与相关营养物质注入地下含油层, 通过微生物繁殖消耗碳源以及微生物产生的代谢物乳化稠油等方式来提高石油的开采率[2]. 微生物驱油起初是利用外源微生物, 即通过向油藏中注入外源微生物产生的表面活性剂或乳化剂来达到乳化石油并降低石油黏度的效果[3]. 然而由于不同油藏环境中原油性质的不同, 外源微生物驱油的效果并不理想. 近年来, 研究人员着重对油藏环境土著微生物开展研究[4], 只有掌握特定油藏原位微生物群落的组成和分布特征及其与环境因子之间的关系, 才能更有效地进行内源微生物的定向调控以提高微生物驱油效率.

需要指出的是, 由于采样技术的限制, 对油藏微生物的研究目前主要集中在对采出液微生物群落的研究上, 而采出液的理化特征温度与油藏本身存在一定的差异. 采出液微生物组特征能够在一定程度上反映不同地区、不同温度油藏的微生物群落组成, 但在特定微生物类群如高温菌的类群上可能会有一定的差异.

油藏采出液中微生物功能群主要分为烃氧化菌、腐生菌、厌氧发酵菌、硫酸盐还原菌和产甲烷菌等[5]. 通过对比我国20余个水驱油藏采出液水相样品微生物群落特征发现, 尽管这些油藏的温度和盐度等环境参数具有较大的差异, 但细菌群落中的弓形杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属等, 古菌群落中的甲烷微菌纲、甲烷杆菌纲、甲烷球菌纲等却普遍存

引用格式: 张蔚, 胡小丽, 邱轩, 等. 山东胜利油田沾3油藏微生物组特征. 科学通报, 2019, 64: 1930–1942
Zhang W, Hu X L, Qiu X, et al. Microbiomes in Zhansan area, Shengli Oilfield, Shandong Province, China (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 1930–1942, doi: 10.1360/N972019-00135

© 2019《中国科学》杂志社

在(≥70%存在的样品)[2,6,7]，这些类群很可能是油藏环境微生物组的核心类群. 此外, 由于注入水与油藏内部理化参数的不同导致其微生物群落的优势菌与采出液水相群落之间具有明显差异[8]. 例如随着氧气浓度的降低, 在注入水中占优势的ε-变形杆菌被热袍菌属取代[9], 显示出微生物群落组成的生境特异性. 近年来, 微生物不仅在采出液水相样本中被检测到大量存在，而且在采出液油相样本中也有发现[10,11]，并且其群落组成和功能与水相中的微生物可能均存在差异. 研究显示, 原油样本中编码多环芳烃分解代谢途径中邻苯二甲酸酶等物质的*phtA*, *hmgA*和*pmdAB*基因比水相样本中高, 而与应激反应相关的*bhlH*, *dnaK*, *obgE*等基因在水相中相对富集[12]. 然而目前有关油相微生物群落的知识仍然匮乏, 阻碍了人们对油藏微生物组的系统认识.

尽管油藏微生物群落中存在核心类群，显示出群落组成上的相似性，但环境条件能显著影响油藏中的优势菌的相对丰度或功能群的组成. 例如在中低温油藏环境中，优势菌主要为绿弯菌门、浮霉菌门、海杆菌属、甲烷球菌属和甲烷绳菌属等，而在高温油藏中厚壁菌门、γ-变形菌门、热袍菌门、拟杆菌纲、芽孢杆菌纲和嗜盐菌目等物种丰度更高[6,13]. 除温度外, pH、矿化度、阴阳离子等也对微生物群落组成产生重要影响, 例如假单胞菌与pH呈负相关, 但脱硫单胞菌属更倾向于偏碱性的环境，甲烷热球菌、古生球菌属则喜欢生存在高矿化度的地区[6,14]. 因此，环境参数作为影响微生物群落动态变化的重要因子对实现微生物群落的定向调控，进而实现微生物驱油效率的提高至关重要.

胜利油田作为我国主要石油产地之一，其油藏已进入了高含水期，原有的化学驱油已无法达到预期效果，亟需新的开采方式. 本文选择该油田沾3区块的高温油藏, 采用16S rRNA高通量测序技术, 系统研究了采出液中水相和油相以及注入水样品中的细菌和古菌微生物群落特征，并分析了微生物群落与环境因子之间的关系，以期为后期采油优势菌的定向调控和快速筛选高效采油菌株以及制定相应的内源微生物激活策略提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集

样本于2016年12月采集自山东胜利油田5个采油井的采出液, 编号分别为沾3-13, 沾3-15, 沾3-23, 沾3-24和沾3-26. 此外, 还采集了该区块采油用的注入水样本. 每个样本设置3个生物学重复. 取样前将所用的10 L塑料桶灭菌, 并用采出液反复多次润洗, 之后将采出液收集在塑料桶中, 旋紧盖子, 密封保存, 并运回实验室. 该取样区块油藏温度大致为60°C，矿化度约为8000~10000 mg/L, pH为7~8, 属于高温稠油油藏.

1.2 样品处理

将样品在实验室静置1 d，待油水分离后，注入水(编号为IW)和采出液水相(编号为W)利用超高速离心机(HITACHI CP100NX, 日本)在4°C, 9500 r/min条件下离心15 min, 沉淀物用于水相微生物总DNA提取. 油相(编号为O)则采用异辛烷: 石油=1:1的比例进行多次萃取，之后利用离心机在4°C，10000 r/min条件下离心10 min, 所得沉淀物用于油相微生物总DNA提取.

采用Fast Soil Power试剂盒(12888-100, MOBIO, 美国)进行DNA的提取, 提取后的DNA进行琼脂糖凝胶电泳检测其质量. 分别采用引物338F(5′-barcode-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′)，806R(5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)[15]和787-F(5′-ATTAGATACCCSBGTAGTCC-3′)，1059-R(5′-GCCATGCACCWCCTCT-3′)[16]对细菌和古菌进行16S rRNA扩增，然后利用Illumina Miseq平台(上海派森诺生物有限公司)对PCR产物进行高通量测序.

1.3 测序数据处理

对获得的有效数据进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)归并划分，每个OTU的代表序列用于分类地位鉴定以及系统发育学分析. 多样性分析方法包括: (1) α多样性分析: 采用Shannon-Wiener指数[2]、Simpson指数[6]、ACE指数[1]和Chao1指数[2]等多样性指数来计算; (2) β多样性分析: 使用R软件(https://www.r-project.org/)[6]对unweighted和weighted的UniFrac距离矩阵分别进行NMDS分析, 通过二维或三维排序图描述群落样本的结构分布; (3) 冗余分析(RDA): 使用Canoco 5软件(http://www.canoco5.com/)[6]对不同样本与环境因子之间的关系进行分析.

1.4 水样理化参数的测定

本研究采用离子色谱法(戴安离子色谱ICS900, GB/T15454，GB/T14642)测定采出液水样及注入水样

本的阳离子浓度及SO_4^{2-}, Cl^-浓度, 利用指示剂法测定HCO_3^-浓度[17], 用pH计(DENVER, UB-7)测定pH.

2 结果

细菌和古菌16S rRNA高通量测序分别得到453794和459463条有效序列, 在97%相似性水平上进行聚类, 共得到11085和7149个OTUs.

2.1 微生物组α多样性

Bio-plot箱线图显示, 5个油井采出液的油相样本、水相样本以及注入水样本的细菌群落均显示出较高的多样性, 以注入水中的多样性最高, 采出液水相样本次之, 采出液油相样本细菌群落多样性最低(图1). 古菌群落的多样性整体较细菌群落低, 其中采出液水相样本与油相样本的多样性差别不大, 注入水中古菌群落的多样性最低(图2).

对油样、水样和注入水微生物群落多样性指数之间进行Turkey检验发现, 3种不同类型的样本之间并无显著性差异(细菌P=0.091, 古菌P=0.311).

2.2 微生物组的结构组成

在纲水平上, 采出液中细菌的主要类群分别为γ-变

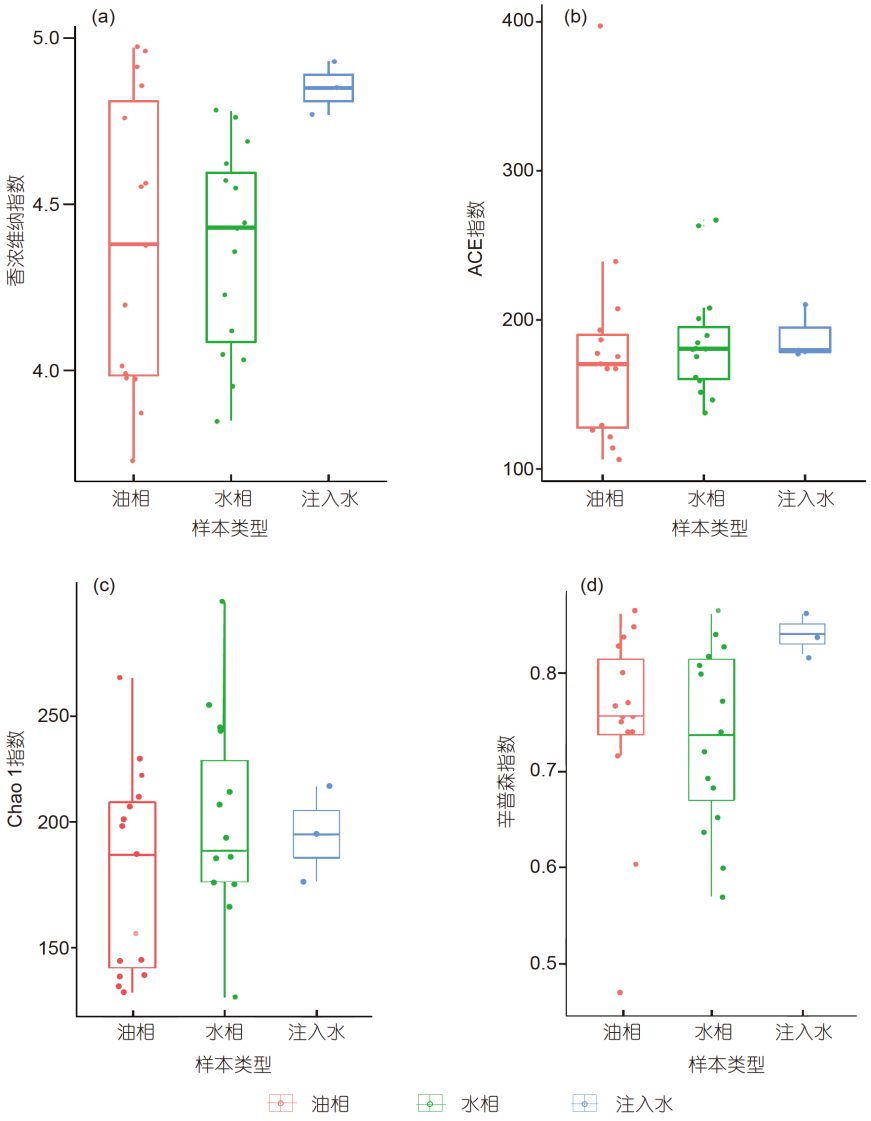


图 1 沾3油藏采出液油相、水相及注入水细菌群落的香浓维纳指数(a)、ACE指数(b)、Chao 1指数(c)及辛普森指数(d)箱线图

Figure 1 Bioplots of Shannon-Wiener (a), ACE index (b), Chao 1 index (c) and Simpson index (d) of bacterial communities in oil, water samples of the production liquid and injection water samples in Zhansan oil reservoir

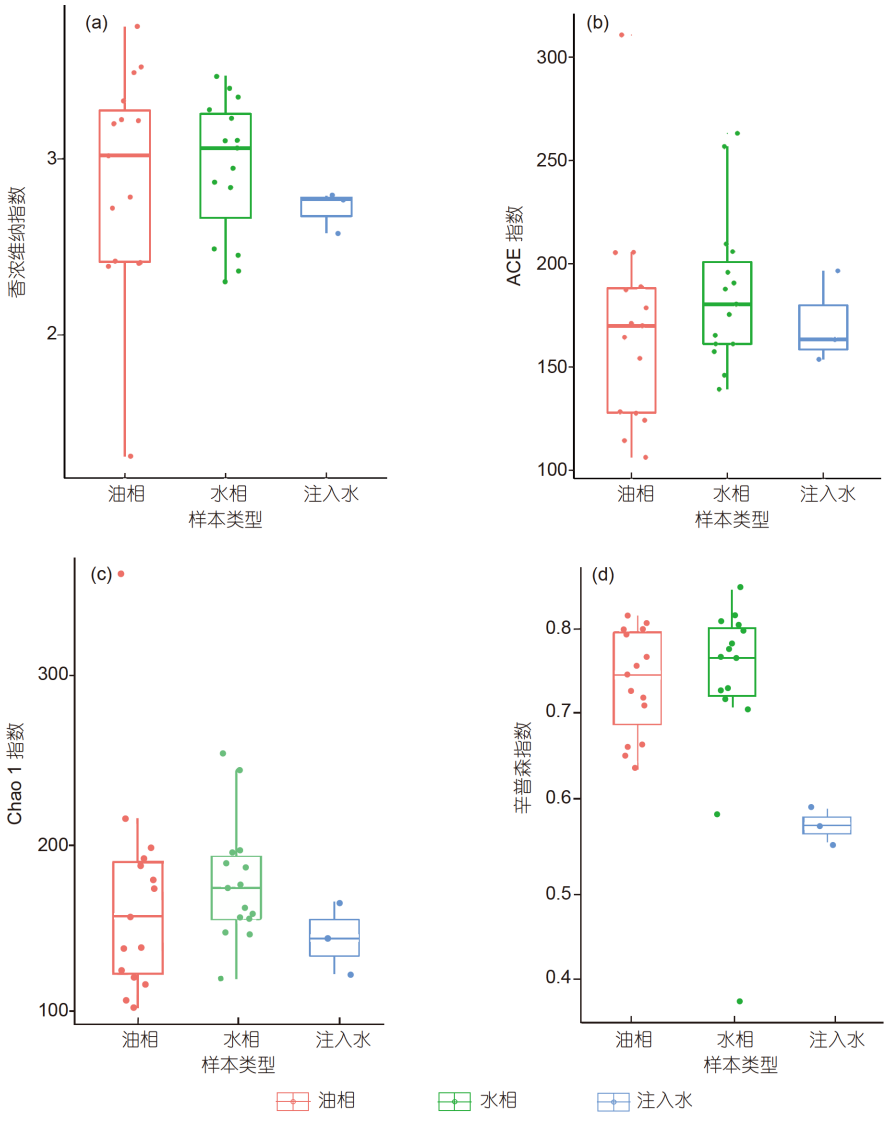


图 2 沾3油藏采出液油相、水相及注入水古菌群落的香浓维纳指数(a)、ACE指数(b)、Chao 1指数(c)及辛普森指数(d)箱线图
Figure 2 Bioplots of Shannon-Wiener (a), ACE index (b), Chao 1 index (c) and Simpson index (d) of archaeal communities in oil, water samples of the production liquid and injection water samples in Zhansan oil reservoir

形菌纲(γ-*Proteobacteria*)、ε-变形菌纲(ε-*Proteobacteria*)、α-变形菌纲(α-*Proteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)和梭状芽孢杆菌纲(*Clostridia*), 占细菌总丰度的90%以上. 在属水平上(图3), 油相样本和水相样本的优势属种均为假单胞菌属*Pseudomonas*, 占油相样本和水相样本总菌属的35%~92%. 而注入水优势属主要为硫单胞菌*Sulfurimonas*, 占注入水总菌属的95%, 在采出液的水相样本中该属丰度大量减少, 只占水相样本细菌群落的0.1%~23.7%(图3).

在纲水平上, 采出液中古菌的六大主要类群总丰度占古菌丰度的98%, 分别为甲烷微菌纲(*Methanomicrobia*)、甲烷杆菌纲(*Methanobacteria*)、嗜盐菌纲(*Halobacteria*)、热原体纲(*Thermoplasmata*)、热变形菌纲(*Thermoprotei*)和热球菌纲(*Thermococci*). 在科水平上(图4), 油相、水相以及注入水样中古菌的优势类群均为鬃毛甲烷菌科*Methanobacteraceae*, 占所有样本古菌丰度的42%~71%. 沾3-23井采出液样本中, 主要优势菌科为盐杆菌科*Halobacteriaceae*, 占沾3-23井古菌丰度的60%. 与注入水古菌群落组成相比, 采出液水相样品中鬃毛甲烷菌有所减少, 由70%降到了42%, 而甲烷杆菌则有所增加, 由1%增加至20%(图4), 而甲烷杆菌在油相样本中含量较高, 占油相样本古菌丰度的

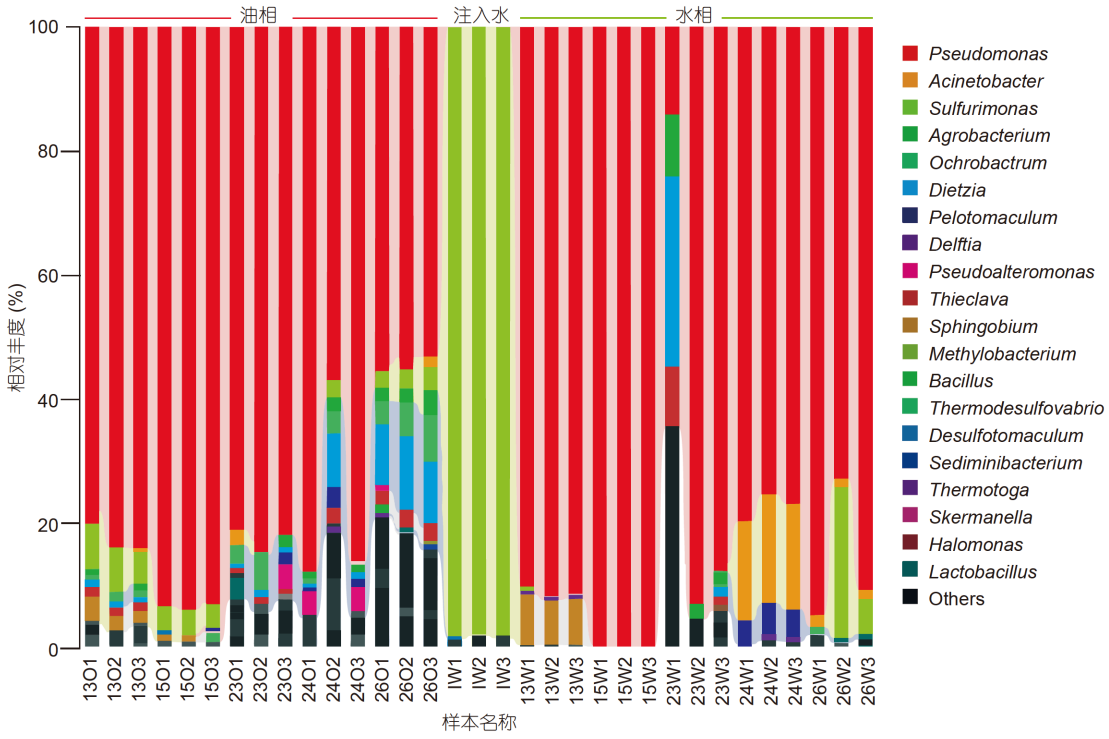


图 3 沾3油藏不同油井采出液油相、水相以及注入水中细菌在属水平上的组成. O, 油相; W, 水相; IW, 注入水

Figure 3 Bacterial compositions of oil, water samples of the production liquid and injection water samples in Zhansan oil reservoir at the genus level. O, oil samples; W, water samples; IW, injection water samples

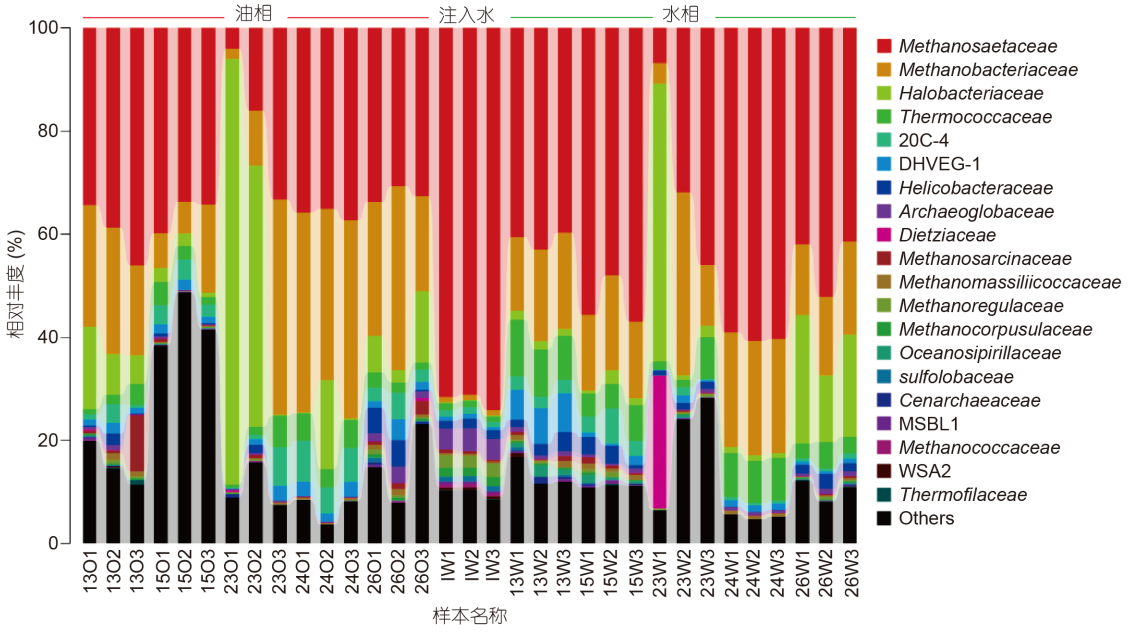


图 4 沾3油藏不同油井采出液油相、水相以及注入水中古菌在科水平上的组成. O, 油相; W, 水相; IW, 注入水

Figure 4 Archaeal compositions samples of oil, water of the production liquid and injection water samples in Zhansan oil reservoir at the family level. O, oil samples; W, water samples; IW, injection water samples

22%~40%.

2.3 微生物组的β多样性

细菌和古菌群落NMDS聚类分析结果显示(图5), 油相样本、水相样本以及注入水3种不同类型样本的微生物组分别聚类. 注入水细菌和古菌群落与采出液的水相样本和油相样本中的细菌和古菌群落距离较远, 而采出液的水相样本与油相样本中的微生物群落聚类较接近. 油相样本细菌群落聚类最紧密, 其次是注入水样本, 水相样本的细菌群落较离散(图5(a)). 而注入水样本的古菌群落聚类最紧密, 油相与水相样本的古菌群落聚类较离散(图5(b)).

2.4 水相及注入水样本微生物群落与环境因子之间的关系

细菌群落与环境因子之间的RDA分析结果表明, 注入水样本细菌群落与SO_4^{2-}浓度相关性显著(P<0.01). 而采出液中水相细菌群落组成则与pH(P<0.01)和Ca^{2+}浓度(P=0.01)以及K^+和Na^+浓度(P<0.05)等显著相关(图6(a)). 将注入水及采出液水相的细菌优势种与环境因

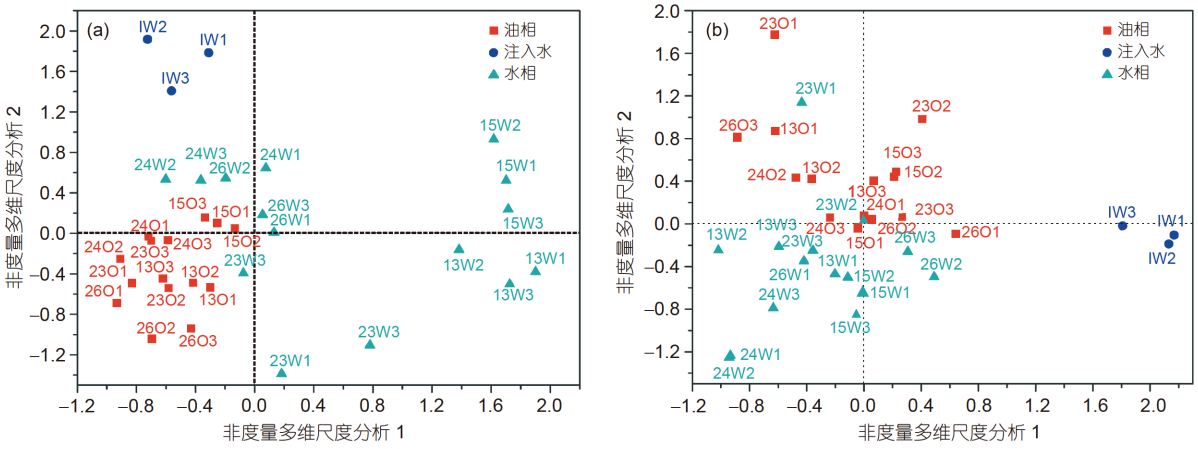


图 5 沾3油藏采出液油相、水相和注入水细菌(a)和古菌(b)群落的NMDS聚类分析. O, 油相; W, 水相; IW, 注入水

Figure 5 NMDS analysis of bacterial (a) and archaeal (b) biomes of oil, water samples of the production liquid and injection water samples in Zhansan oil reservoir. O, oil samples; W, water samples; IW, injection water samples

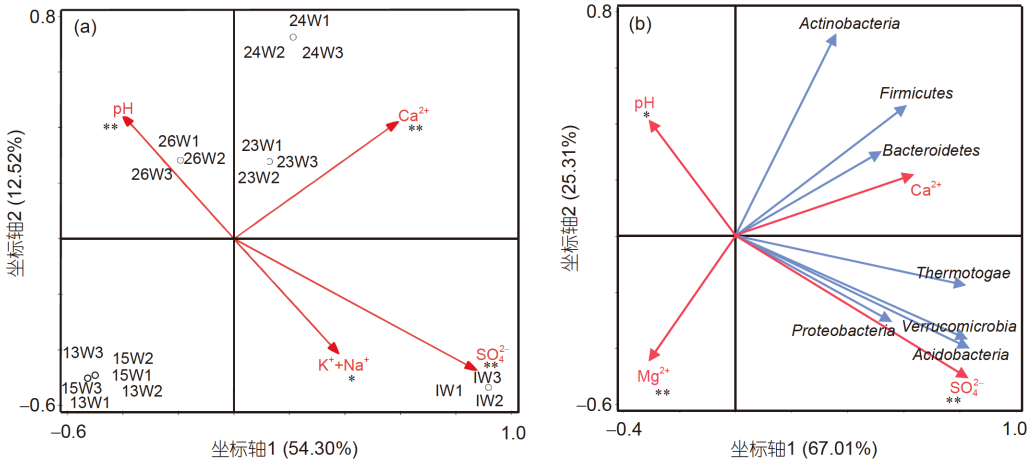


图 6 采出液水相和注入水细菌群落组成与理化因子的RDA分析图. (a) 样本; (b) 优势菌. W, 采出液水相样本; IW, 注入水样本. 图中*和**分别代表P<0.05, P<0.01. *Actinobacteria*, 放线菌门; *Firmicutes*, 厚壁菌门; *Bacteroidetes*, 拟杆菌门; *Thermotogae*, 热袍菌门; *Acidobacteria*, 酸杆菌门; *Verrucomicrobia*, 疣微菌门; *Proteobacteria*, 变形菌门

Figure 6 RDA analysis of correlation between bacterial biomes in water of the production liquid, injection water and their physicochemical factors. (a) Samples; (b) dominant bacterial groups. W, water sample of the production liquid; IW, injection water sample. * P<0.05, ** P<0.01

子进行RDA分析及Pearson显著性检验发现，*Thermotogae*与SO_4^{2-}浓度显著正相关(P<0.01)，与pH显著负相关(P<0.05)；*Proteobacteria*与SO_4^{2-}浓度显著正相关(P<0.01)，与pH显著负相关(P<0.05)；*Acidobacteria*与SO_4^{2-}浓度显著正相关(P<0.01)，与pH显著负相关(P<0.05)；*Verrucomicrobia*与SO_4^{2-}浓度显著正相关(P<0.01)(图6(b))．

古菌群落与环境因子之间的RDA分析结果显示，注入水样本中古菌微生物群落与SO_4^{2-}浓度相关性显著(P<0.01)，但采出液中水相古菌群落组成与SO_4^{2-}浓度相关性并不显著，反而与Mg^{2+}浓度(P<0.01)、HCO_3^-浓度(P<0.01)的相关性更为明显(图7(a))．将采出液水相样本与注入水中的古菌优势种与环境因子进行RDA分析及相关性分析发现，*Thermoprotei*与Mg^{2+}浓度呈正相关(P<0.01)；*Thermococci*与Mg^{2+}和HCO_3^-浓度正相关(P<0.01)，与Cl^-浓度负相关(P<0.01)；*Parvarchaea*与Cl^-和SO_4^{2-}浓度正相关(P<0.01)；DSEG与Cl^-和SO_4^{2-}浓度正相关(P<0.01)，与HCO_3^-浓度负相关(P<0.01)(图7(b))．

3 讨论

沾3区块油藏微生物组既具有油藏环境微生物的普遍性，又具有其独特的类群；环境因子对微生物群落的组成及功能具有显著的影响．因此，在研究微生物驱油的过程及机制时，深入了解油藏不同生境微生物组的分布特征，以及重要环境因子对不同微生物类群的影响，能够为微生物群落的定向调控，提高微生物驱油的采出率提供理论指导．

3.1 沾3高温油藏微生物组特征

在沾3区块油藏采出液的优势菌群中，发现了前人报道的油藏环境核心微生物群，如假单胞菌、甲烷杆菌、鬃毛甲烷菌属等[13,18]，证明核心微生物群这一现象在沾3高温油藏中同样适应．此外，沾3区块采出液微生物显示出较高的多样性，大部分样本微生物群落的Shannon-Wiener指数均大于2，部分样品细菌的Shannon指数甚至超过4(图1)．据报道，油藏微生物群落的Shannon指数值在1.5~3.5之间[19]，很少高于4(表1)，表明胜利油田沾3区块的油藏微生物类群较为丰富，这可能与沾3区块开展微生物驱油、向地下注入营养物质(激活剂)有关．注入水携带了大量外源微生物，其细菌群落Shannon-Wiener指数(4.85)明显高于采出液水相中细菌群落的Shannon-Wiener指数(3.95~4.62)．注入水进入油藏环境后，细菌多样性显著降低，可能是外源细菌群落在营养匮乏的油藏环境中，与本土细菌群落相比在底物竞争中处于劣势从而导致死亡[29]．而注入水古菌群落的Shannon-Wiener指数相比采出液水相及油相中的古菌群落要低，可能是由于古菌群落多为厌氧菌，而注入水携带了大量O_2，不利于厌氧菌的生存．由于采出液油相样本较水相样本处于高疏水、高毒性、且不利于接收外界营养注入的状态，油相样本的Shannon-Wiener指数普遍较水相样本低．

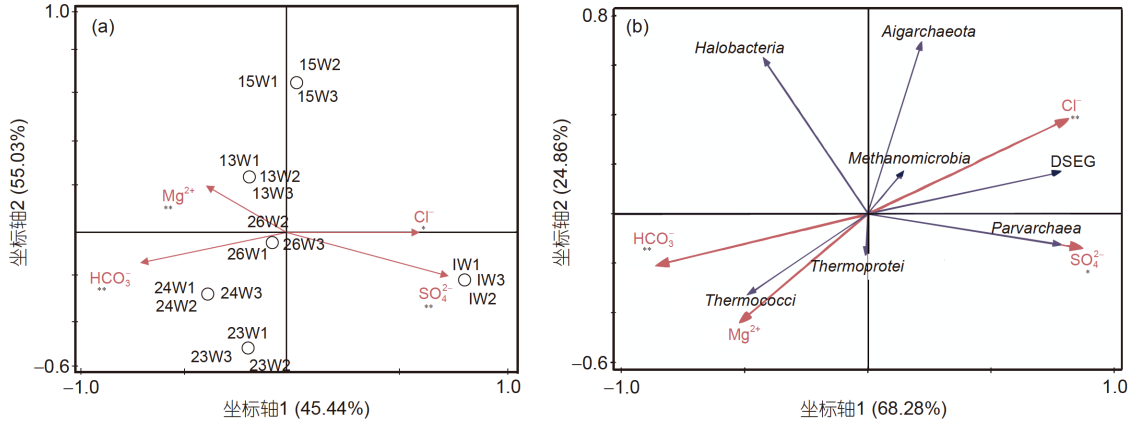


图 7 (网络版彩色)采出液水相和注入水古菌群落与理化因子之间的RDA分析图．(a) 样本；(b) 优势菌．W，水相样本；IW，注入水样本．图中*和**分别代表P<0.05，P<0.01．*Thermoprotei*，热变形菌纲；*Thermococci*，热球菌纲；*Methanomicrobia*，甲烷微菌纲；*Halobacteria*，盐杆菌；*Aigarchaeota*，曙古菌门

Figure 7 (Color online) RDA analysis of the correlation between archaeal biomes in water of the production liquid, injection water and their physicochemical factors. (a) Samples; (b) dominant bacteria. W, water sample; IW, injection water sample. * P<0.05, ** P<0.01

表 1　不同油藏流体中的微生物群落特征[a)]

Table 1　Microbial community characteristics in different oil reservoir fluids[a)]

油藏类型	样本类型	温度(°C)	优势细菌	优势古菌	Shannon	文献
低温低盐油藏	采出水	20	弓形杆菌属	鬃毛甲烷菌科	-	[20]
低温油藏	采出水	27	γ-变形菌纲	鬃毛甲烷菌属	-	[21]
中温油藏	采出水	37	α-变形菌门	鬃毛甲烷菌科	2.82	[18]
高温油藏	油样	42	γ-变形菌门	甲烷微菌科	3.99	[22]
高温高盐油藏	采出水	45	δ-变形菌纲	-	2.10	[23]
非浸没高温油藏	采出水	55	变形菌门	鬃毛甲烷菌科	1.55	[24]
枯竭油藏	油样	55	厚壁菌门	-	1.55	[25]
高温稠油油藏	油样	60	γ-变形菌纲	鬃毛甲烷菌科	3.68	本研究
高温稠油油藏	采出水	60	γ-变形菌纲	鬃毛甲烷菌科	3.63	本研究
高温稠油油藏	注入水	60	ε-变形菌纲	鬃毛甲烷菌科	4.85	本研究
陆相高温渗水油藏	采出水	65	假单胞菌属	-	-	[26]
高温近海油气藏	采出水	130	β-变形菌门	鬃毛甲烷菌科	-	[27]
低渗透油藏	采出水	-	鞘氨醇单胞菌	-	2.02	[28]

a) -代表文中未提及

沾3区块采出液中细菌的优势类群主要为铜绿假单胞菌属, 隶属于γ-变形菌纲. 变形菌门在其他不同温度、不同理化条件下的油藏中也多占优势, 但纲水平的优势类群在不同油藏环境中变化较大(表1). 铜绿假单胞菌属作为嗜中温细菌, 其可能在油田注水开采的过程中被引进. 由于假单胞菌多为好氧中、低温菌, 而沾三油藏为高温油藏, 推测假单胞菌属可能存在于采油井井筒附近的中低温区域, 利用原油进行生长代谢, 并随着采样被带出. 研究发现铜绿假单胞菌可以耐受微氧和高盐环境, 能够降解石油中的柴油、正构烷烃和多环芳烃等[30]. 此外, 该菌还能通过与高岭石和蒙脱石的相互作用, 在高浓度原油环境中形成重油-细胞-黏土矿物复合体, 进而促进细胞的生长[31]. 研究区沾3区块的储层为碎屑岩储层, 含有一定量的黏土矿物, 它们与铜绿假单胞菌进行相互作用, 进而促进微生物对石油烃的降解和利用. 尽管沾3油藏采出液油相与水相环境中优势细菌属均以假单胞菌属为主, 但它们在水相和油相中的基因表达可能存在差异. 如通过泛基因组的分析, 发现从油相中分离出的一株假单胞菌基因组包含I型分泌的全套基因[12]; 同时, 与调节疏水性有关的基因, 与应激反应如抗毒性有关的基因在油相中的表达也与水相中不同[32]. 但目前对相同类群在油相和水相中功能上的差异研究仍十分薄弱, 亟待在后续研究中进一步加强.

在沾3油藏中还发现大量的厚壁菌门, 主要包括芽孢杆菌纲、梭菌纲以及柔膜菌纲. 目前已有大量研究发现了芽孢杆菌纲以及梭菌纲对石油烃具有较强的降解能力[33,34], 并能够被用于油藏开采或土壤、海洋石油污染的修复, 因为它们能够快速适应石油污染环境并利用石油进行自身生长代谢[34]; 其代谢产物不仅能够起到原油乳化剂的作用[33], 还能够为其他在油藏环境中生存但不能利用烷烃的群落提供营养[35]. 因此, 厚壁菌门对油藏微生物群落的构建及稳定起着十分重要的作用.

沾3油藏含有丰富的放线菌, 以迪茨氏菌属和微球菌属为主. 迪茨氏菌属能够有效降解烷烃, 其核心基因组存在完整的烷烃羟化途径, 通过电子传递蛋白和烷烃羟化酶的融合来加速长链烷烃降解的速率[36]. 不仅如此, 迪茨氏菌属还被证实能为油藏其他不能利用原油进行生长的微生物提供代谢产物, 而其他微生物则通过自己的运动性为迪茨氏菌属完成对底物的趋化性, 从而实现对油藏环境的共同适应[37]. 这很好地揭示了油藏微生物之间的互作关系, 对全面认识油藏微生物的生态功能具有重要意义.

油藏环境中古菌微生物群落主要以产甲烷菌为主(表1), 其中, 鬃毛甲烷菌科属丰度较高. 沾3区块采出液中古菌群落的优势属种主要为鬃毛甲烷菌. 该类群是乙酸营养型产甲烷古菌, 可在产甲烷条件下对石油烃进行厌氧生物降解, 具有较高的石油降解率[38,39]. 除此之外, 油相样本、水相样本中还含有大量的甲烷杆菌

Methanobacteriaceae, 该类微生物在其他油藏中也大量存在[38,40,41]. 沾3-23井样本点中, 还检测到大量的盐杆菌科*Halobacteriaceae*, 它们被证实在降解单环芳烃类质中占优势[42].

综上所述, 沾3油藏古菌主要以产甲烷类群为主, 它们一方面通过甲烷的产生促进原油的流动性, 改变原油的物理性质; 另一方面也可以直接对原油进行降解, 改变原油的化学组成, 从而在微生物驱油中发挥重要作用.

3.2 沾3高温油藏微生物组成与环境因子之间的关系

生境对微生物群落及其生态功能均具有强烈的选择作用, 使得微生物群落表现出高度的生境特异性[43~45]. 在沾3油藏的具体表现为采出液中油相样本与水相样本的菌群结构相似, 而与注入水样本差别较大(图5), 这与SO_4^{2-}浓度, pH, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-以及HCO_3^-浓度等重要环境因子密切相关.

SO_4^{2-}浓度是显著影响注入水细菌和古菌群落结构的理化因子, 注入水中SO_4^{2-}浓度比采出液水相样本的高一个数量级(表S1), 这可能是SO_4^{2-}浓度影响注入水微生物群落结构(以硫单胞菌为主)的主要原因. 高含量的SO_4^{2-}随着注入水进入到油藏环境, 为硫酸盐还原菌的大量繁殖提供了物质基础. 在沾3油藏中, SO_4^{2-}浓度与*Proteobacteria*, *Thermotogae*, *Verrucomicrovia*和*Parvarchaea*呈显著正相关, 且*Proteobacteria*中以假单胞菌为主. 研究表明, 不同假单胞菌科均具有硫酸盐还原能力[46]. *Thermotogae*多属于嗜热硫酸盐还原菌, 在富含硫酸盐的环境中能够迅速将甲醇降解, 并且该门内多数类群已被报道含有[Fe-Fe]-氢化酶基因, 具有产氢气的能力, 能够为氢营养型产甲烷菌提供产甲烷的原料[47]. 由于目前报道的能直接利用SO_4^{2-}的微生物多数为细菌, 古菌群落对SO_4^{2-}的响应可能体现在与其他细菌如产氢微生物的协同作用上.

pH是一种极为重要的环境参数, 在多种生境下都能对细菌群落产生显著影响. 在油藏环境中, 无论是低温、中温还是高温油藏, 在中性或偏碱性条件下微生物菌群对烃类都具有较高的降解效率[48]. 在沾3油藏环境中, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*及*Thermotogae*均与pH呈显著负相关, *Proteobacteria*和*Thermotogae*更倾向于生存于偏碱性的环境中[49]. 本研究样本pH在8.30~8.59之间, 呈弱碱性(表S1), 有利于*Proteobacteria*和*Thermotogae*的生存, 进而使它们在原油的降解中发挥作用.

Ca^{2+}和Mg^{2+}在油藏环境中为常见元素, 通常与K^+和Na^+一起作为油藏环境矿化度的指标. Ca^{2+}曾被证明在不同的极端环境中(如沙漠环境、高氮废水)对细菌群落起着重要的调控作用, Ca^{2+}浓度的变化会导致优势类群的改变[50]. 在沾3油藏环境中, Mg^{2+}与*Thermoprotei*及*Thermococci*呈显著正相关, 其中*Thermoprotei*以除琉球菌属*Desulfurococcus*为主, *Thermococci*以高温球菌属*Thermococcus*为主. 然而目前关于Mg^{2+}与古菌之间存在相关性的认识还很薄弱, Mg^{2+}浓度显著影响油藏古菌群落的原因还不得而知.

高氯化学剂能引起周围环境如pH、渗透压和氧化还原电位的改变, 进而影响微生物的生长. 在沾3油藏群落中, Cl^-与*Parvarcheae*呈显著正相关关系, 与*Thermococci*显著负相关. 研究发现, *Thermococci*最适pH为6.8, 不能直接利用碳氢化合物进行生长代谢[51], 推测在油藏环境中它们可能通过与其他菌群协同作用而生存.

HCO_3^-是油藏环境中常见的阴离子, HCO_3^-的存在能加速产甲烷菌将CO_2转化成CH_4[40]. 在沾3油藏群落中, *Thermococci*被发现与HCO_3^-存在显著正相关关系. 据报道, 部分*Thermococci*含有*fdh2-mfh2-mnh2*基因簇, 使其能够利用甲酸盐产生H_2和碳酸氢盐, 并维持自身生长[52]. 这种特点可能促使*Thermococci*与产甲烷菌协同作用并为产甲烷菌提供产甲烷原料.

综上所述, 微生物群落的生长代谢受到多种环境因子, 如SO_4^{2-}, pH, Ca^{2+}, Cl^-等的共同影响. 例如偏中性pH有利于微生物的生长与代谢, 但微生物在降解原油的过程中会产生不同的酸性物质, 引起环境pH的降低. 同时油藏中高浓度的Cl^-也会造成pH的降低, 进而造成硝酸盐含量的降低[53], 最终导致环境中反硝化微生物丰度的降低及硫酸盐还原菌丰度的升高, 这一结果不利于对油藏开采管道的保护. 因此, 在原油开采过程中, 应通过测定采出液的pH来调整注入水的pH及营养物质, 以尽量维持油藏环境中水相体系的中性偏碱性环境. 可适当调整SO_4^{2-}浓度以控制硫酸盐还原菌的繁殖; 同时, 也可通过后期研究来探讨不同离子如SO_4^{2-}, Mg^{2+}, HCO_3^-之间的浓度比对微生物群落的影响, 借此在原位条件下保证多种离子的动态平衡.

4 结论

本研究通过高通量测序方法探讨了山东胜利油田沾3区5口油井采出液水相和油相以及注入水中的油藏

微生物组分布特征，系统揭示了油藏流体系统中微生物的多样性及其与环境因子之间的关系. 发现胜利油田沾3区高温稠油油藏环境中微生物多样性较其他油藏高, 主要以变形杆菌纲及产甲烷菌为主, 其中优势菌群主要包括铜绿假单胞菌、鬃毛甲烷菌科以及甲烷杆菌. 这些微生物在不同的油藏中分布广泛, 并分别在烷烃降解、产甲烷和提供氮源等方面发挥关键作用，表明了其在原油环境中的重要性. 外源注入水与采出液中的微生物群落组成差异较大，微生物群落组成按样品类型聚类明显, 表现出生境的特异性. SO_4^{2-}是影响注入水细菌和古菌群落的主控因子，而采出液水相细菌和古菌的群落结构则受不同环境因子的影响，细菌群落结构主要与pH和Ca^{2+}有关，而古菌组成则主要受Mg^{2+}, Cl^-, HCO_3^-的影响. 因此, 在原油开采过程中, 要同时关注多个环境因子对微生物群落的影响及微生物的环境效应, 以期达到更好的开采效果.

参考文献

1 Tian H, Gao P, Chen Z, et al. Compositions and abundances of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing microorganisms in water-flooded petroleum reservoirs with different temperatures in China. Front Microbiol, 2017, 8: 143

2 Gao P, Tian H, Li G, et al. Microbial diversity and abundance in the Xinjiang luliang long-term water-flooding petroleum reservoir. MicrobiologyOpen, 2015, 4: 332–342

3 Xu H Y. Improving oil recovery in using exogenous microorganisms (in Chinese). Master Dissertation. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2016 [徐海燕. 采用外源微生物提高原油采收率. 硕士学位论文. 北京: 中国科学院大学, 2016]

4 Wang X, Li X, Yu L, et al. Characterizing the microbiome in petroleum reservoir flooded by different water sources. Sci Total Environ, 2019, 653: 872–885

5 Gao P K, Ma T, Liu R L. Metabolic characteristics and ecological structure regulation of reservoir microorganisms (in Chinese). Acta Microbiol Sin, 2011, 51: 711−717 [高配科, 马挺, 刘如林. 油藏微生物的代谢特征和生态结构调控. 微生物学报, 2011, 51: 711−717]

6 Gao P, Tian H, Wang Y, et al. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China. Sci Rep, 2015, 6: 20174

7 Li C Y, Li J Y, Mbadinga S M, et al. Analysis of bacterial and archaeal communities along a high-molecular-weight polyacrylamide transportation pipeline system in an oil field. IJMS, 2015, 16: 7445–7461

8 Gao P K, Li G Q, Tian H M, et al. Differences in microbial community composition between injection and production water samples of water flooding petroleum reservoirs. Biogeosciences, 2015, 12: 3403–3414

9 Yamane K, Hattori Y, Ohtagaki H, et al. Microbial diversity with dominance of 16S rRNA gene sequences with high GC contents at 74 and 98°C subsurface crude oil deposits in Japan. FEMS MicroBiol Ecol, 2011, 76: 220–235

10 Wang X B, Zhang Q, Liu Y, et al. Microorganisms and their oil-degrading activities in dehydrated crude oil (in Chinese). Chin J Apppl Environ Biol, 2013, 19: 515–518 [王兴彪, 张晴, 刘洋, 等. 脱水原油中的微生物及其原油降解活性. 应用与环境生物学报, 2013, 3: 515−518]

11 Song W F, Wang J W, Yan Y C, et al. Shifts of the indigenous microbial communities from reservoir production water in crude oil- and asphaltene-degrading microcosms. Int Biodeterior Biodegrad, 2018, 132: 18–29

12 Cai M, Nie Y, Chi C Q, et al. Crude oil as a microbial seed bank with unexpected functional potentials. Sci Rep, 2015, 5: 16057

13 Li X X, Mbadinga S M, Liu J F, et al. Microbiota and their affiliation with physiochemical characteristics of different subsurface petroleum reservoirs. Int Biodeterior Biodegrad, 2017, 120: 170–185

14 Liang B, Zhang K, Wang L Y, et al. Different diversity and distribution of archaeal community in the aqueous and oil phases of production fluid from high-temperature petroleum reservoirs. Front Microbiol, 2018, 9: 841

15 Wang B, Peng Y, Guo Y, et al. Illumina miseq sequencing reveals the key microorganisms involved in partial nitritation followed by simultaneous sludge fermentation, denitrification and anammox process. Bioresour Tech, 2016, 207: 118–125

16 Xu S, Selvam A, Karthikeyan O P, et al. Responses of microbial community and acidogenic intermediates to different water regimes in a hybrid solid anaerobic digestion system treating food waste. Bioresour Tech, 2014, 168: 49–58

17 Wang J, He S J, Li L, et al. Probe cable method for measuring alkalinity of drilling fluid filtrate on site (in Chinese). Nat Gas Technol, 2010, 4: 33−35 [王娟, 何素娟, 李磊, 等. 现场钻井液滤液碱度测定方法探索. 天然气技术与经济, 2010, 4: 33−35]

18 Zhao L, Ma T, Gao M, et al. Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28: 3039–3052

19 Latham R E. Measuring biological diversity by a. E. Magurran. J Veg Sci, 2004, 6: 854−856

20 Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. FEMS Microbiol Ecol, 2010, 54: 427−443

21 Pham V D, Hnatow L L, Zhang S, et al. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. Environ Microbiol, 2010, 11: 176–187

22 Silva T R, Verde L C L, Santos Neto E V, et al. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields. Int Biodeterior Biodegrad, 2013, 81: 57–70

23 She Y, Zhang X, Fan Z, et al. Microbial diversity research of produced water from Daqing oil reservoir after polymer flooding. In: International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008

24 Kobayashi H, Endo K, Sakata S, et al. Phylogenetic diversity of microbial communities associated with the crude-oil, large-insoluble-particle and formation-water components of the reservoir fluid from a non-flooded high-temperature petroleum reservoir. J Biosci Bioeng, 2012, 113: 204–210

25 Kobayashi H, Kawaguchi H, Endo K, et al. Analysis of methane production by microorganisms indigenous to a depleted oil reservoir for application in microbial enhanced oil recovery. J Biosci Bioeng, 2012, 113: 84–87

26 Li H, Yang S Z, Mu B Z, et al. Molecular analysis of the bacterial community in a continental high-temperature and water-flooded petroleum reservoir. FEMS Microbiol Lett, 2010, 257: 92–98

27 Kaster K M, Bonaunet K, Berland H, et al. Characterisation of culture-independent and -dependent microbial communities in a high-temperature offshore chalk petroleum reservoir. Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 96: 423–439

28 Xiao M, Zhang Z Z, Wang J X, et al. Bacterial community diversity in a low-permeability oil reservoir and its potential for enhancing oil recovery. Bioresour Tech, 2013, 147: 110–116

29 Gao P, Li G, Le J, et al. Succession of microbial communities and changes of incremental oil in a post-polymer flooded reservoir with nutrient stimulation. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102: 2007–2017

30 Zhang Z, Hou Z, Yang C, et al. Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresour Tech, 2011, 102: 4111–4116

31 Chaerun S K, Tazaki K. How kaolinite plays an essential role in remediating oil-polluted seawater. Clay Miner, 2005, 40: 481–491

32 Hu B, Nie Y, Geng S, et al. Complete genome sequence of the petroleum-emulsifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* SLG510A3-8. J Biotech, 2015, 211: 1–2

33 Fooladi T, Moazami N, Abdeshahian P, et al. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. J Pet Sci Eng, 2016, 145: 510–519

34 Varma S S, Lakshmi M B, Rajagopal P, et al. Degradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in contaminated soil using *Bacillus pumilus* MVSV3. Biocontrol Sci, 2017, 22: 17–23

35 El-Sheshtawy H S, Aiad I, Osman M E, et al. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. Egypt J Pet, 2016, 25: 293–298

36 Liang J L, Jiangyang J H, Nie Y, et al. Regulation of the alkane hydroxylase CYP153 gene in a gram-positive alkane-degrading bacterium, *Dietzia* sp. strain DQ12-45-1b. Appl Environ Microbiol, 2015, 82: 608–619

37 Fang H, Qin X Y, Zhang K D, et al. Role of the group 2 Mrp sodium/proton antiporter in rapid response to high alkaline shock in the alkaline- and salt-tolerant *Dietzia* sp. DQ12-45-1b. Appl Microbiol Biot, 2018, 102: 1−13

38 Roy A, Dutta A, Pal S, et al. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. Bioresour Tech, 2018, 253: 22–32

39 Sierra-Garcia I N, Dellagnezze B M, Santos V P, et al. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales. Extremophiles, 2017, 21: 1−19

40 Ma L, Liang B, Wang L Y, et al. Microbial reduction of CO_2 from injected $NaH^{13}CO_3$ with degradation of n-hexadecane in the enrichment culture derived from a petroleum reservoir. Int Biodeterior Biodegrad, 2018, 127: 192–200

41 Zhang H, Zhang H N. Composition and distribution of several anaerobic bacteria in different sedimentary environments (in Chinese). Acta Microbiol Sin, 1992, 28: 182−190 [张辉, 张洪年. 不同沉积环境中几种厌氧细菌的组成与分布. 微生物学报, 1992, 28: 182−190]

42 Mao X W. Preliminary study on the diversity and degradation characteristics of Btex halophilic bacteria. Master Dissertation (in Chinese). Beijing: Tsinghua University, 2008 [毛心慰. Btex嗜盐降解细菌的多样性及降解特性的初步研究. 硕士学位论文. 北京: 清华大学, 2008]

43 Wu P, Lian Z L, Jiang Z C, et al. Microorganism community structure of Weizhou oil and gas development zone was analyzed by high-throughput sequencing (in Chinese). J Tropical Oceanogr, 2016, 35: 48−54 [吴鹏, 连忠廉, 姜重臣, 等. 高通量测序分析涠洲油气田开发区的微生物群落结构. 热带海洋学报, 2016, 35: 48−54]

44 Long H, Wang Y, Chang S, et al. Diversity of crude oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes from the Qinghai-Tibet Plateau. Environ Monit Assess, 2017, 189: 116

45 Zhang X, Tang Y, Shi Y, et al. Responses of soil hydrolytic enzymes, ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen applications in a temperate grassland in inner Mongolia. Sci Rep, 2016, 6: 32791

46 Furmanczyk E M, Kaminski M A, Lipinski L, et al. *Pseudomonas laurylsulfatovorans* sp. Nov., sodium dodecyl sulfate degrading bacteria, isolated

from the peaty soil of a wastewater treatment plant. Syst Appl Microbiol, 2018, 41: 348−354
47 Oliver S, Drake H L, Horn M A. Hitherto unknown [Fe-Fe]-hydrogenase gene diversity in anaerobes and anoxic enrichments from a moderately acidic fen. Appl Environ Microbiol, 2010, 76: 2027−2031
48 Arora P, Ranade D R, Dhakephalkar P K. Development of a microbial process for the recovery of petroleum oil from depleted reservoirs at 91–96°C. Bioresour Tech, 2014, 165: 274–278
49 Liu Y, Rose J, Huang S, et al. A pH-gated conformational switch regulates the phosphatase activity of bifunctional hiSkA-family histidine kinases. Nat Commun, 2017, 8: 2104
50 Liu Y H. Effect of calcium ion concentration on anammox denitrification and microbial community structure (in Chinese). Master Dissertation. Guilin: Guilin University Technology, 2016 [刘语涵. 钙离子浓度对厌氧氨氧化脱氮性能及微生物群落结构的影响. 硕士学位论文. 桂林: 桂林理工大学, 2016]
51 Kobayashi T. *Thermococcus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2015. 1−8
52 Schink B, Montag D, Keller A, et al. Hydrogen or formate: Alternative key players in methanogenic degradation. Environ Microbiol Rep, 2017, 9: 189–202
53 Kemmitt S J, Wright D, Jones D L. Soil acidification used as a management strategy to reduce nitrate losses from agricultural land. Soil Biol Biochem, 2005, 37: 867–875

补充材料

表S1 沾3油藏采出液水样及注入水的理化参数

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “山东胜利油田沾3油藏微生物组特征”

Microbiomes in Zhansan area, Shengli Oilfield, Shandong Province, China

Wei Zhang[1], Xiaoli Hu[1], Xuan Qiu[1], Deng Liu[1], Liang Feng[1], Liyuan Ma[1], Jing Hu[2] & Hongmei Wang[1*]

[1] *State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China;*
[2] *Engineering Institute, Shengli Oilfield, Dongying 257000, China*
* Corresponding author, E-mail: wanghmei04@163.com, hmwang@cug.edu.cn

The purpose of this study was to characterize bacterial and archaeal communities in a high temperature oil reservoir and their relationships with environmental factors. Production liquid (further separated to oil and water samples) and injection water samples were collected in the Zhansan area of the Shengli Oilfield, Shandong Province and subjected to 16S rRNA gene analysis by high-throughput sequencing. The physicochemical properties of the water samples were also analyzed. The bacterial communities in the Zhansan area showed a relatively high diversity compared with those in other oil reservoirs previously reported. High diversity may be due to nutrients introduced in the injection water during microbial enhanced oil recovery in this area. The highest diversity of bacterial communities was observed in the injection water samples and the lowest in oil samples of the production liquid. Bacterial compositions showed a clustering pattern according to the sample types. Specifically, the dominant bacterial groups in the oil and water samples of the production liquid were γ-*Proteobacteria*, ε-*Proteobacteria*, α-*Proteobacteria*, *Actinomycetes* and *Clostridium*. At the genus level, *Pseudomonas* was dominant in both oil and water samples of the production liquid, whereas the bacterial community in injection water was dominated by *Sulfurimonas*. In general, *Pseudomonas* spp. are mesophilic facultative anaerobes and many species of this genus can degrade petroleum fractions. The presence of this genus in the high temperature oil reservoir suggests that they were associated with low-to moderate temperature zones in contact with various hydrocarbons. As for the archaeal biomes, the diversity was low in all samples. The major archaeal groups in the production liquid were *Methanomicrobia*, *Halobacteria*, *Thermoplasmata*, *Thermoprotei*, and *Thermococci*, dominated by *Methanosaeta* and *Methanobacteriaceae* especially. They also showed a clustering pattern according to sample types. Redundancy analysis (RDA) of microbiomes and environmental parameters indicated that the sulfate concentration significantly constructed the bacterial and archaeal communities in the injection water, which was one order of magnitude higher than that in the water samples of the production liquid. In contrast, the bacterial communities in the water samples of the production liquid were impacted by Ca^{2+} and pH. The archaeal communities had significant correlations with Cl^{-}, Mg^{2+} and HCO_3^{-}. These results revealed the ecological distribution of microbiomes in different phases of production liquid, which are useful to our understanding about microbiomes in high temperature oil reservoirs and provide clues on possible manipulation and control of microbiomes in microbial enhanced oil recovery.

oil reservoirs, microbiomes, high-throughput sequencing, microbial diversity, Shengli Oilfield

doi: 10.1360/N972019-00135