

高通量测序分析延长油田油藏微生物多样性

赵 丽 薛 媛 高怡文 梁凯强 金 志 罗婷婷

(陕西延长石油(集团)有限责任公司研究院, 陕西 西安 710065)

摘 要: 基于 16S 核糖体核糖核酸 (16S Ribosomal Ribonucleic Acid, 16S rRNA) 基因, 采用高通量测序技术, 对延长油田代表性油藏微生物多样性进行检测分析。从取得的 33 个样品中均检测到了大量种属的本源微生物, 按照微生物功能划分, 得到 59 种优势菌群, 其中优势菌群中烃氧化菌 14 种、发酵菌 12 种、硝酸盐还原菌 4 种、硫酸盐还原菌 4 种, 产甲烷菌 1 种, 以上都是开展微生物采油技术的有益菌; 同时也存在可有效降解石油以及有机污染物的微生物本源菌。可为延长油田开展微生物采油技术及环境污染治理奠定物质基础。

关键词: 高通量测序技术; 微生物多样性; 延长油田; 内源微生物激活

延长油田属于典型的低渗透油藏, 具有“低渗、低压、低丰度”和裂缝发育的特点, 低渗油田的开发是一个全球难题^[1], 微生物采油技术 (MEOR) 是可以较好解决这一难题的技术之一, 大量的微生物存在于油藏中, 因此油藏中存在开展微生物采油技术的物质基础, 可是至今现场试验规模不大和试验效果不稳, 说明此技术仍有许多问题未得到解决, 其中研究清楚油藏环境中微生物的种类及演化规律是关键性的问题, 油藏中的微生物群落结构复杂, 并且随着时间和外界因素的影响是一个动态变化的过程, 也是一个复杂的过程, 油藏中优势菌的种类变化、丰度改变等各个阶段和过程, 对开展微生物采油技术都蕴含着大量具有指导意义的信息。

研究油藏微生物多样性的方法很多, 传统的培养方法只适用于对环境极少数可培养微生物种群的研究, 常规分子生物学手段, 如 PCR-DGGE、RFLP 和 RAPD 等方法亦因操作复杂、实验周期长、成本高、痕量微生物检测困难等因素, 很难进行深入分析。高通量测序技术操作相对简单, 不需要构建克隆, 且通量高, 可以大量构建基因信息库进行比较分析, 使高效、全面认识油藏微生物成为可能。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从延长油田东部、西部、南部 17 个区块不同油层采集了 33 个生产井产出液油水样品。在无菌操作台中, 使用抽滤装置将 33 个油水样分别通过 0.22 μm 滤膜过滤, 得到的滤膜置于 Eppendorf 管中, -20℃ 保存。

1.2 基因组 DNA 提取及 16S · rRNA 基因扩增

使用 OMEGA 公司 E.Z.N.A Soil DNA 试剂盒抽提基因组 DNA。

引物设计:

对指定区域 16S: V1-V3 区全长, 合成融合引物, 引物 PAGE 纯化。

融合引物:

F: 5'-454adapter-mid-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

R: 5'-454adapter-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'

16S · rRNA 基因扩增实验采用 TransGen AP221-02, 反应体系为 20 μl (见表 1)。

表 1 PCR 扩增反应体系

原液 Stock solution	终浓度或含量 Final amount	用量 (μL) Volume
5×PCR buffer	1×	4
2.5mM dNTPs	0.25mm	2
5μm Forward Primer 引物	0.1μm	0.4
5μm Reverse Primer 引物	0.1μm	0.4
Template DNA	10ng	2.0
FastPfu Polymerase	0.06U/μL	0.4
ddH ₂ O		10.8
总计		20

PCR 扩增程序为: 95℃ 2min, 95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 25 个循环, 72℃ 5min。反应在 ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪上进行。

1.3 高通量测序

根据电泳初步定量数据, 通过对 PCR 产物进行精确检测定量, 然后根据每个样品的测序量要求, 确定混合比例。EmPCR (emulsion-based clonal amplification) 产物由 Roche emPCRAmp-Lib_L Kit 制备, 然后上机测序。

1.4 OTU 聚类分析

应用 mothur 软件 (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page) 进行。

1.5 Alpha 多样性指数分析

Alpha 多样性, 是指一个特定区域或生态系统内的多样性。微生物多样性研究在群落生态学中, 微生物群落的丰度和多样性可以通过单样品的 Alpha 多样性反映出。

1.6 分类学分析

通过分类学分析, 能够得知样品在各分类水平上的分类学对比情况, 获得以下信息: ①样品中微生物的种类; ②样品中各微生物的序列数, 即各微生物的相对丰度。

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 提取及 16S · rRNA 基因扩增

实验提取了 33 个样品的基因组 DNA，并针对每个基因组 DNA 的 16S · rRNA 进行 PCR 扩增。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测（见图 1）。图中条带的亮度反应出 PCR 产物浓度的高低，条带越亮，产物浓度越高。33 个样品中除 20 号、24 号样 DNA 条带较淡，其余样品条带清晰，浓度适宜，可进行测序实验。

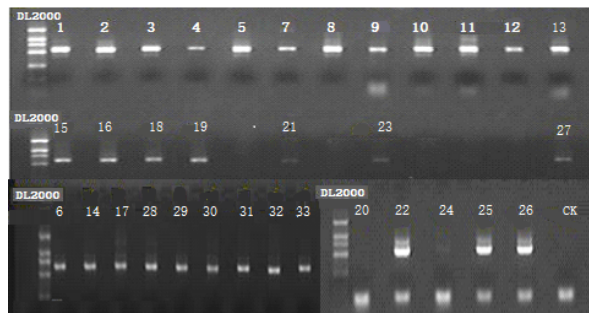


图 1 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图

2.2 原始数据样品区分、统计及优化

通过对 33 个样品有效序列进行去杂优化，去除少量数据，提高信息分析质量。优化后样品平均长度 417bp（见表 2）。

表 2 优化后的序列数据

测序区域	样品数 (个)	有效序列 (个)	碱基数 (bp)	平均长度 (bp)
16s:533R → 27F	33	193679	80898851	417

2.3 多样性指数分析结果

33 个样品中共得到 594 个 OUT，基于 594 个 OUT 进行多样性指数分析（见图 2），5 号、6 号、7 号、12 号、23 号样品的 ace 丰度指数值在 109~228 之间，chao1 丰度指数值在 153~235 之间，ace 丰度指数值和 chao1 丰度指数值均较大，说明上述样品的微生物菌群丰富程度高；shannon 多样性指数值在 2.33~3.62 之间，simpson 多样性指数值在 0.0674~0.1649 之间，较高的 shannon 多样性指数值，较低的 simpson 多样性指数值，说明上述样品的微生物菌群多样性丰富。上述样品优化序列划分得到的 OTU 数目在 133~208 之间，相比其他样品 OTU 数目较高，说明上述该样品不仅有丰富的微生物物种数量，且具有较高的菌群丰度及多样性程度。

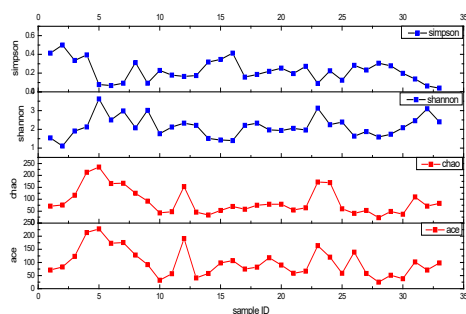


图 2 各样品综合指数曲线图

2.4 分类学分析结果

由分类学分析结果可知（见图 3），33 个样品微生

物多样性丰富，其中 2 号样的菌纲微生物含量最丰富，高达 12314 种；9 号样的纲微生物含量最少，但也包含 3788 种。

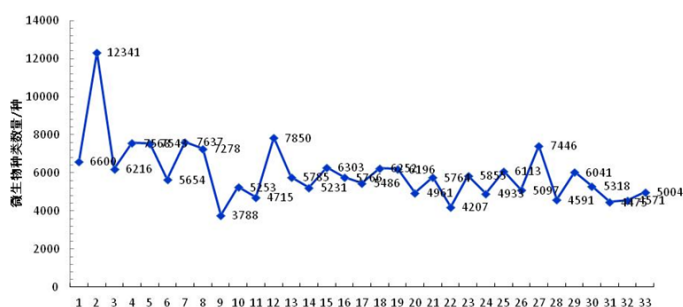


图 3 多样品微生物种类数量折线图

2.5 油藏微生物采油潜力分析

油藏微生物根据功能分类可分为六大类，即：氧化菌（HOB）、厌氧发酵菌（FMB）、硝酸盐还原菌（NRB）、硫酸盐还原菌（SRB）、腐生菌（TGB）和产甲烷菌（PMB）。对得到的 59 个优势菌群进行功能划分，优势菌群中 HOB14 种、FMB 12 种、NRB 4 种、SRB 4 种、PMB1 种，无 TGB。所测样品的优势菌群中，HOB 种类最多，占 39.39%；FMB 次之，占 36.36%。本次所测样品的优势菌群中 HOB、FMB、NRB 和 PMB 四种采油功能菌所占比例为 90.91%，菌群物种多样性丰富，为进行微生物驱油提供了先决条件。

3 结论与认识

通过 454 高通量测序，结合多种生物信息学分析方法，对 33 个检测样品进行微生物多样性进行了分析，得到以下结论与认识：①在 33 个样品中均检测出大量种属本源微生物，其中为 2 号样品中微生物数量最多，含有 9 个菌纲 12341 种微生物；微生物数量最少的为 9 号样，但也拥有 18 个菌纲 3788 种微生物。这说明延长油田油藏中含有丰富的微生物物种，且具有较高的微生物菌群丰度及多样性程度；②延长油田油藏环境中存在以石油为唯一碳源，可有效降解原油中的饱和烃、芳香烃、菲和烷基菲等成分的微生物菌种；还存在可有效降解石油以及有机污染物的微生物本源菌。因此为延长油田开展微生物采油技术及环境污染治理奠定物质基础；③通过油藏微生物功能划分，共计得到 59 中优势菌群，其中优势菌群中 HOB14 种、FMB12 种、NRB4 种、SRB4 种、PMB1 种，其中 HOB 为实施微生物采油技术的关键菌群，FMB、NRB、PMB 等也在微生物采油技术的某一环节起到重要作用，四种采油功能菌占优势菌的 90.91%，因此延长油田油藏具备开展微生物采油技术的条件，即可进行原位激活的内源微生物驱，也可进行本源采油菌种分离筛选，实施本源微生物菌液注入的微生物驱。

参考文献：

- [1] 王成俊, 洪玲, 高瑞民, 等. 低渗透油藏提高采收率技术现状与挑战 [J]. 非常规油气, 2018(3):102-108.