

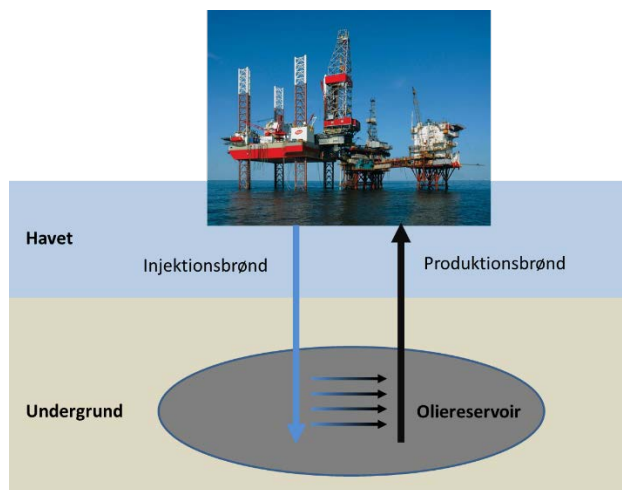
Slutrapport om projekt: Forstudie til undersøgelser af bakterier i vand i olieindustrien

Aaron M. Saunders

1. december 2015

Literature review

Olie og gas er en vigtig kilde til energi og råmaterialer for det moderne verden. I Danmark er Mærsk Olie og Gas, en partner i nærværende projekt, er en del af Danish Underground Consortium (DUC) som har licens til at indvinde olie fra den danske sektor af oliefelterne i Nordsøen. I 2013 udgjorde Nordsøs-olie og gas 56% of den samlede dansk energi forbrug (Energistyrelsen, 2013). Olieindvinding i Nordsøen er såkaldt ”moderne” oliefelter, dvs. olien der er nemt at få op er taget og der skal bruges en række tekniske løsninger til at få fat i det resterende olie. En metode at gøre det er havvandinjektion (Figur 1), hvor en injektionsbrønd bores i nærheden af en producerende brønd og havvand pumpes ned i reservoiret for at øge trykket og i princippet presse olien ud.



Figur 1: Diagram over olieproduktion til havs. Havvand pumpes ned som injektionsvand, der presser olie ud af formationen hen mod produktionsbrønden.

Havvandsinjektion kan dog øge mikrobielle vækst og skabe en række problemer:

1) Sulfat som pumpes ned med havvandet omsættes til svovlbrinte af sulfatereducerende bakterier og archaea, i en proces der hedder *forsuring* (Larsen, 2009). Dette skal fjernes fra råolien før den raffineres og dette medfører en betydelig udgift

2) Bakterievækst på indersiden af olierør fremmer nedbrydning af rørene, såkaldt *biokorrosion* (Larsen, 2010). Dette pålægger også en stor udgift ikke mindst pga. tabt produktion mens rørene skiftes. Biokorrosion forårsages af bestemte mikroorganismer, fx sulfat-reducerende bakterier og archaea og methanogener.

Ingeniørfirmaer rådgiver olieindustrien, men de mangler værktøjer der kan infomere løsninger til disse problemstillinger, da nuværende analysemetoder kan ikke linke problemerne til bestemte bakteriearter i systemet. Det er analogt til en læge der gerne vil diagnosticere om en patients sygdom skyldes fx *Salmonella* eller *E. coli*, da behandling skal målrettes den underliggende årsag, selv om symptomerne er de samme.

Bakterier i miljøet måles oftest ved at måle antal af deres gener i en given prøve. Der findes kvantitativ PCR (qPCR) metoder, som bruges i andre miljøer (Callbeck et al. 2013), men deres brug i olieindvindingsystemer skal udvikles. Derudover findes der nye metoder der hurtigt kan identificere mange tusinde bakteriearter i en enkelt analyse med amplicon sekvensering (Caporaso et al. 2012; Saunders et al. 2015). Dette skal også testes og anvendes i olieindvindingsystemer. Sammen vil disse to analysemetoder give et detaljeret billede af hvilke bakterier findes i systemerne. Viden om, hvilke bakterier er hyppige i systemet vil kunne bidrage til processtyring og evt. indikere om der skal ændres på nuværende praksis med dosering af nitrat og biocider.

Metoder

Prøvetagning

Prøver blev udtaget af Mærsk i samarbejde med Rambøll og fragtet til laboratoriet. Prøver af rust (Figur 2A) blev homogeniserede i en morter og pistil. Prøver af vand (Figur 2B) blev filtreret ned på 0,2 µm filtre. Vandet i prøver som indeholdte en oliefase blev adskilt i et skilletragt.



Figur 2: Prøverne fra rørlægninger (A) blev taget af det porøse rust på indersiden af røret. Prøver af vand blev udtaget i 250 mL flasker (B). Producerede vand havde en oliefase (øverst) og vandfase (nederst). Kun vandfasen blev analyseret.

Kvantitativ PCR (qPCR)

DNA blev oprenset fra prøverne med Fast DNA spin kit (MPBio) med 0,5 g af faststof eller et halvt filter. Koncentrationer af 1) total Bacteria, 2) total Archaea, og 3) sulfat-reducerende Bacteria og 4) sulfat-reducerende Archaea blev målt med en Startagene MxPro qPCR maskine og Brilliant SYBR Mastermix kit.

Næste-generationers sekvensanalyse (NGS)

Det relative antal af de forskellige bakteriearter i hver prøver blev målt med en MiSeq sekvensmaskine (Illumina). Mindste 10 000 datapunkter blev målt for hver prøver.

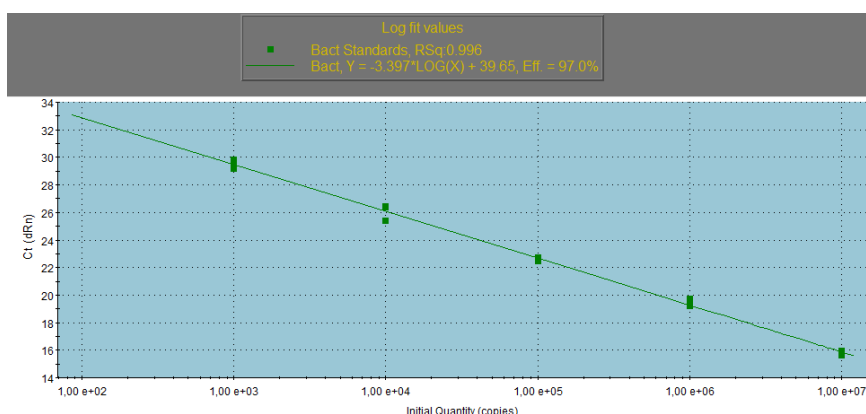
Resultater

Metoder Udvikling

En række primere blev testet for specificitet og effektivitet med standarder og med prøverne fra olieindvindingsystemer. Der blev anvendt fire qPCR analyser:

1. Total Bacteria
2. Total Archaea
3. Sulfat-reducerende Bacteria
4. Sulfat-reducerende Archaea

Alle metoder blev testet i forhold til standard protokoller (Bustin, 2009). Standarderne gav lineær respons igennem mindst 5 størrelsesordener med en reproducerbart effektivitet som var >80% (Figur 3).



Figur 3: En typisk standardkurv for total Bacteria qPCR.

Inhibering var et problem i prøverne fra rørlægningerne, formentlig på grund af at der kommer mange jern-ioner med i DNA oprensningen (Kreader, 1996). Vi indkøbt en metoder til at kontrollere for inhibering ved at køre kontrol prøver med interne standarder. Fjernelse af de inhiberende stoffer ved at skylde tre ekstra gang under oprensningen på spin-søjlen var ikke effektivt, så der blev nødvendigt at fortynde prøven indtil inhiberingen var væk (typisk 10 eller 100 gange), men det medfører en tilsvarende reduktion i følsomhed af analysen.

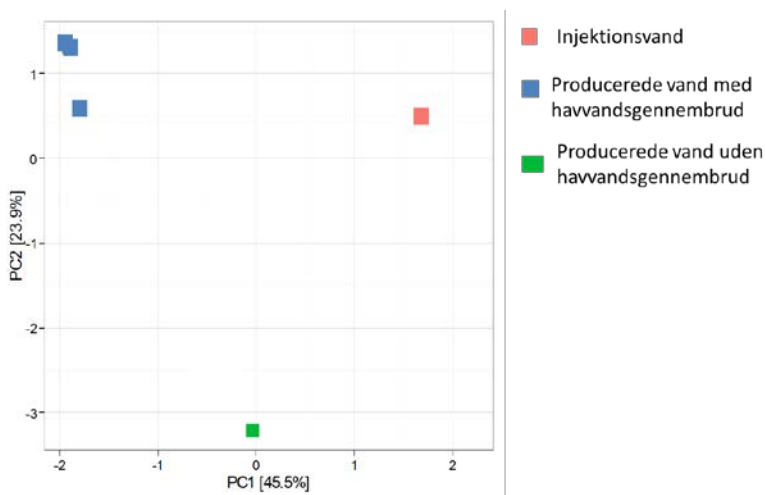
Undersøgelse af biofilm fra korroderede rør

Der blev undersøgt 10 prøver af biofilm/rust fra 3 forskellige rørlægninger fra havbunden i Nordsøen. Rørene hvor det er gået hul i bliver taget ud af produktion og sendt til lands. Så bliver de undersøgt blandt andet med at udtage prøve fra indersiden af rørene som sendtes til EAAA for analyse.

qPCR analyser og amplicon sekvensering gav gode resultater men antallet af disse organismer var i de tre tilfælde så lavt at det konkluderes at biokorrosion ikke var en væsentlig faktor i at rørene blev utæt.

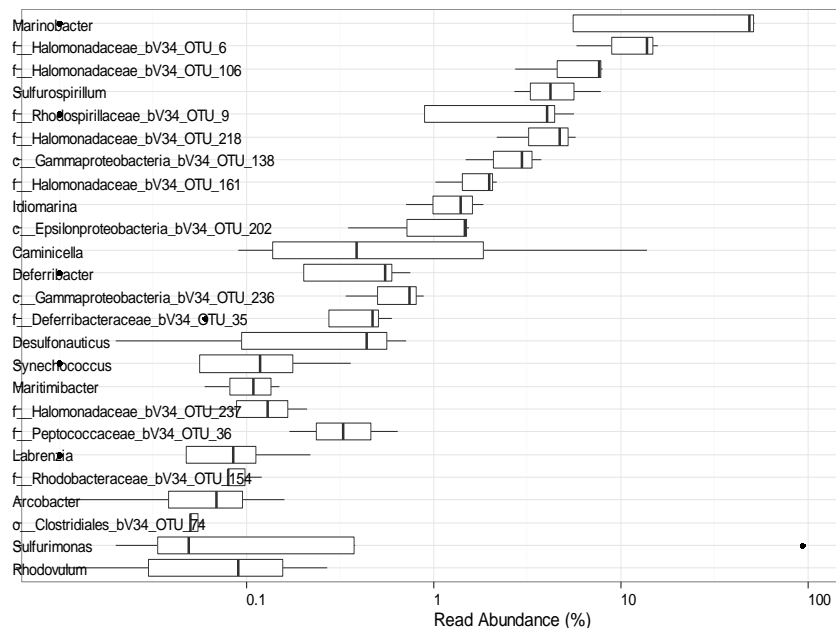
Undersøgelse af producerede vand

Der blev udtaget en prøve af injektionsvand, 3 prøver af producerede vand og 3 prøver fra multifase rørlægninger. Alle prøver kunne analyseres med de udviklede metoder. Det var et tydeligt forskel i hvilke bakteriearter der var til stede i hhv. injektionsvand og producerede vand med og uden havvandsgennembrud (Figur 4). I dette system er nitrat tilsat havvandet og i tilfælde af gennembrud vil man kunne se hvilke bakterier vokse på nitrat.



Figur 4: Statistisk analyse der sammenligner hvilke bakterier er tilstede i vandprøver. Hvert prøve tegner et punkt på diagrammet. Jo mere bakteriesammensætningen i prøven ligner hinanden jo tættere på de er i diagrammet.

Når bakterierne klassificeres kan det ses at slægten *Marinobacter* er den mest hyppig organisme i det producerede vand med havvandsgennembrud. *Marinobacter* kan nedbryder kulbrinte molekyler i olien med samtidig reducere nitrat (Gauthier et al. 1992) og de er også blevet impliceret i korrosion i andre systemer (Carvalho et al. 2014; Pillay and Lin 2013). Det skal undersøges for om *Marinobacter* er hyppig i biofilm i rørlægninger i oliesystemer og om den måske spille en rolle i biokorrosion, da dens høje hyppighed kunne betyder at den var vigtigere end, sulfat-reducerende bakterier og metanogener som indtil videre antages for at være de betydelige slægter.



Figur 5: Boxplot over de 25 mest hyppige slægter i vandprøverne.

I forhold til tidligere målinger var antallet af Archaea lavere end forventede. Yderligere undersøgelse skal foretages for at kontrollere om Archaea tallene er for lave.

Konklusioner og perspektiver

En kombination af qPCR og amplicon sekvensering kunne bruges til at undersøge antallet af bakterier i olieindvindingsystemer. Fremtidig projekter kunne kontrollere om total Archaea tallene er for lave med den udviklede qPCR. *Marinobacter* var en hyppig bakterieart I vandprøverne og den skal undersøges for at finde ud af om den bidrage til biokorrosion i systemet.

Videndeling

De typer metoder som projektet har anvendt er generelt anvendeligt for molekylær identificering af bakterier. De bliver anvendt næste år speciale projekter på laborantuddannelsen. Cases fra projektet er indgået i undervisningen om qPCR i bioteknologi modulet.

Resultaterne af projektet blev præsenteret under Reservoir Microbiology Forum 2015 (Saunders et al. 2015), en international forum om mikrobiologi i olieindvindingsystemer.

Mini Business case

Det har fra starten været hensigten at de udviklede analysere kan efter projektet, tilbydes som kommercielle analysemetoder til industripartnerne og andre interessenter i olieindustrien. Det er også tilfældet nu. I 2015 fik vi yderligere projekter på ca. 50.000 kr. i olieindustrien samt 25.000 kr. fra et projekt som anvendte de samme metoder til at undersøge bakterierne i forurenede jord. Der budgetteres for en øget omsætning i 2016, i alt ca. 250.000 kr.

Kommunikation til web

En hjemmeside om det kommercielle ydelser projektet munder ud i er blevet lavet på <http://labmil.com>. Vi har været i kontakt med Henrik Varmark om at få disse informationer integreret i <http://eaaa.dk> og det er under arbejde.

Videntilbageløb

Cases og industrikendskabet indgår i undervisningen om i bioteknologi modulet (om metoden) og under miljøteknolog-uddannelsen (om industrielle problemstillinger). De typer metoder som projektet har anvendt er generelt anvendeligt for molekylær identificering af bakterier og har derfor også anvendelse i andre brancher. Metoderne indgår fra næste år i speciale projekter på laborantuddannelsen.

For at få viden om muligheden for at få lavet analyserne hos os kommer ud til industrien arbejdes ved at Aaron deltog i Reservoir Microbiology Forum 2015 (Saunders et al. 2015), en international forum om mikrobiologi i olieindvindingsystemer. Der tages nu også personlig kontakt til branchen for at tilbyde analyserne og vi udvider hjemmesiden med informationer så vi kan henviser dertil. For at øge kendskabet i Danmark generelt om vores udviklingsarbejde planlægges også at skrive en populær artikel om projekt (fx i Jord og Vand).

CRM

Projektpartnerne er blevet registreret i EAAAs CRM.

Eksterne bevillinger

Der er ikke nogle eksterne bevillinger i forbindelse med dette projekt.

Referencer

- Bustin S A., V Benes, J A Garson, J Hellemans, J Huggett, M Kubista, R Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Callbeck C M, A Sherry, C Hubert, N D Gray, G Voordouw, and I M Head. 2013. "Improving PCR Efficiency for Accurate Quantification of 16S rRNA Genes." *Journal of Microbiological Methods* 93 (2): 148–52. doi:10.1016/j.mimet.2013.03.010.
- Caporaso J G, C L Lauber, W A Walters, D Berg-Lyons, J Huntley, N Fierer, S M Owens, et al. 2012. "Ultra-High-Throughput Microbial Community Analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms." *The ISME Journal* 6 (8): 1621–24. doi:10.1038/ismej.2012.8.
- Carvalho M L, J Doma, M Szttyler, I Beech, and P Cristiani. 2014. "The Study of Marine Corrosion of Copper Alloys in Chlorinated Condenser Cooling Circuits: The Role of Microbiological Components." *Bioelectrochemistry, BIOCORROSION*, 97 (June): 2–6. doi:10.1016/j.bioelechem.2013.12.005.
- "Danmarks Olie og Gasproduktion 2013." 2013. København, Danmark: Energistyrelsen. <http://www.ens.dk/en/oil-gas/reports-oil-gas-activities>.
- Gauthier M J, B Lafay, R Christen, L Fernandez, M Acquaviva, P Bonin, and J C Bertrand. 1992. "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gen. Nov., Sp. Nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium." *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (4): 568–76. doi:10.1099/00207713-42-4-568.
- Kreider C A. 1996. "Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 1102–6.
- Larsen J, K Rasmussen, H Pedersen, K Sørensen, T Lundgaard, and T L Skovhus. 2010. "Consortia Of MIC Bacteria And Archaea Causing Pitting Corrosion In Top Side Oil Production Facilities." In . NACE International. <https://www.onepetro.org/conference-paper/NACE-10252>.
- Larsen J, K Sørensen, B Højris, and T L Skovhus. 2009. "Significance Of Troublesome Sulfate-Reducing Prokaryotes (Srp) In Oil Field Systems." In . NACE International. <https://www.onepetro.org/conference-paper/NACE-09389>.
- Pillay C, and L Johnson. 2013. "Metal Corrosion by Aerobic Bacteria Isolated from Stimulated Corrosion Systems: Effects of Additional Nitrate Sources." *International Biodeterioration & Biodegradation* 83 (September): 158–65. doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.013.
- Saunders A M, M Albertsen, J Vollertsen, and P H Nielsen. 2015 (a). "The Activated Sludge Ecosystem Contains a Core Community of Abundant Organisms." *The ISME Journal*, August. doi:10.1038/ismej.2015.117.
- Saunders, A M, K B Sørensen, A Allegrucci, J Larsen, and P J Raahauge. 2015 (b). "Next-Generation Sequencing Is a Cost-Effective Tool for Monitoring Microbes in Oil and Gas Production." In . London, UK. <https://www.energyinst.org/technical/environment/microbiology/reservoir-microbiology-forum>.

Procesfigur med forløb