

胜利油田沾3区块油藏中 *Geobacillus* 菌的激活研究

李彩凤^{1,2}, 李 阳³, 吴昕宇⁴, 曹嫣镔², 汪卫东², 包木太¹

(1. 中国海洋大学化学化工学院, 山东青岛 266100; 2. 中国石化股份胜利油田分公司采油工艺研究院, 山东东营 257000;
3. 中国石油化工股份有限公司, 北京 100728; 4. 中国石油大学信息与控制工程学院, 山东青岛 266580)

摘要:利用16S rRNA克隆文库技术分析胜利油田沾3区块油藏样品的微生物群落结构,使用不同激活剂对沾3区块油藏样品进行内源微生物激活,对激活后样品进行乳化能力、产生表面活性物质能力评价及微生物群落结构分析,并开展物理模拟驱油实验。结果表明:沾3区块油藏样品中含有2%的 *Geobacillus*,该菌是沾3区块油藏内源微生物中产生表面活性物质、发挥乳化功能的关键菌群;加入适宜的激活剂体系可以选择性激活该类细菌,使其成为优势菌;利用选择性激活 *Geobacillus* 的配方激活沾3区块油藏内源微生物,可以在水驱基础上提高原油采收率10.8%。

关键词: *Geobacillus*; 乳化能力; 激活; 内源微生物; 微生物种群

中图分类号: TE 357.9 **文献标志码:** A

引用格式: 李彩凤, 李阳, 吴昕宇, 等. 胜利油田沾3区块油藏中 *Geobacillus* 菌的激活研究[J]. 中国石油大学学报(自然科学版), 2016, 40(1): 163-167.

LI Caifeng, LI Yang, WU Xinyu, et al. Study on the activation *Geobacillus* species in Zhan 3 blocks of Shengli Oilfield[J]. Journal of China University of Petroleum (Edition of Natural Science), 2016, 40(1): 163-167.

Study on the activation *Geobacillus* species in Zhan 3 blocks of Shengli Oilfield

LI Caifeng^{1,2}, LI Yang³, WU Xinyu⁴, CAO Yanbin², WANG Weidong², BAO Mutai¹

(1. College of Chemistry & Chemical Engineering in Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

2. Shengli Oil Production Research Institution, SINOPEC, Dongying 257000, China;

3. China Petroleum & Chemical Corporation, Beijing 100728, China;

4. College of information and Control Engineering in China University of Petroleum, Qingdao 266580, China)

Abstract: The microbial community structure in Zhan 3 block reservoir of Shengli Oilfield was analyzed by means of 16S rRNA clone library. The indigenous microorganism in Zhan 3 block reservoir was activated by adding different activators. And the emulsifying ability, the ability of producing surfactant, and the analysis of microbial community structure for the activated samples were studied. The physical simulation flooding experiments were also carried out. The results show that *Geobacillus* accounts for 2% of the total sequences in Zhan 3 reservoir samples, which is the key species for producing surfactant and playing the function of emulsification. It could be selectively activated and becomes the dominant species by adding proper activators. The indigenous microorganism could enhance oil recovery up to 10.8% based on water flooding at the *Geobacillus* activator formula in the reservoir conditions.

Keywords: *Geobacillus*; emulsifying ability; activation; indigenous microorganism; microbial population

Geobacillus 是2001年国际上新命名的一类细菌^[1],由于其具有嗜热、兼性厌氧,降解烃和产生表

面活性剂的特性,在微生物采油、环境治理等领域中有潜在应用价值;同时这类细菌可能具有特殊的功

收稿日期:2015-07-01

基金项目:国家“863”计划项目(2013AA064401)

作者简介:李彩凤(1981-),女,工程师,博士研究生,研究方向为石油微生物。E-mail:fengr66@163.com。

通讯作者:包木太(1971-),男,教授,博士生导师,研究方向为微生物采油和环境生物修复。E-mail:mtbao@ouc.edu.cn。

能基因和特种酶,对构建工程菌亦具有重要的研究价值^[2,4]。在火山口、温泉等高温环境中均可分离到 *Geobacillus* 菌属的菌株。此外, *Geobacillus* 菌株并不是单独存在于环境中,而是与其他细菌共存形成一个生物多样性的群体。在 60 °C 的中高温条件下, *Geobacillus* 一般处于优势地位^[5-6]。夏文杰等^[7] 从大庆油田油藏样品中分离到一株 *Geobacillus sp* WJ-2, 在有氧或厌氧、45 ~ 75 °C 下生长良好,最适温度为 65 °C,能以原油为唯一碳源生长并合成生物表面活性剂。徐爽等^[8] 从甘肃玉门油田油藏样品中分离到 1 株可降解原油并具有很好乳化活性的嗜热菌株 *Geobacillus pallidus*, 最适生长温度为 60 °C, 生长 pH 值为 5.5 ~ 9.5, 该菌还能降解原油中重质组分,提高原油流动性,改善原油品质^[8]。笔者对胜利油田沾 3 区块油藏地层水中的微生物群落结构进行克隆测序分析,研究 *Geobacillus* 菌属在高温油藏的分布和激活规律,进一步模拟沾 3 区块油藏条件,在水驱基础上评价 *Geobacillus* 菌属的驱油潜力。

1 材料与方法

1.1 激活样品

微生物激活样品为胜利油田沾 3 区块 3 口油井产出液的混合样品,该区块油藏温度 63 °C, 地层水总矿化度 7.0 ~ 10.0 g/L。

1.2 激活剂

1[#] 激活剂:蔗糖 30 g/L, NaNO₃ 2 g/L, KH₂PO₄ 1.4 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 1.4 g/L, 酵母粉 0.5 g/L。

2[#] 激活剂:胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L。

3[#] 激活剂: NH₄Cl 1.0 g/L, K₂HPO₄ 0.2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, FeSO₄ 0.001 g/L, NaNO₃ 1.0 g/L, KH₂PO₄ 0.1 g/L, 原油 5 g/L。

1[#] 激活剂体系参考了文献检索到的适宜 *Geobacillus* 生长的培养基^[9], 2[#] 激活剂为 LB 培养基^[10], 适合大多数微生物的生长, 3[#] 激活剂为无机盐配方, 适合烃类降解菌的生长。

1.3 实验方法

1.3.1 内源微生物菌群分析

对样品进行 16S rRNA 克隆文库分析, 由华大基因公司完成。

1.3.2 内源微生物激活培养

在血清瓶中加入沾 3 区块地层水, 然后分别加入上述不同激活剂体系。于 65 °C 下进行高温静止

培养, 2、5、8、12、15 d 后进行菌液取样, 通过不同指标对比激活剂体系的激活效果。

1.3.3 激活后样品中总菌数检测

将培养不同时间的内源微生物激活样品进行不同倍数稀释后, 利用血球计数板在显微镜下进行微生物总菌数的检测。

1.3.4 乳化能力测定

在试管中加入 5 mL 柴油和 5 mL 激活样品, 涡旋振荡器充分振荡 1 min, 60 °C 静置 24 h 后测量乳化层高度, 以乳化指数表示激活样品的乳化能力。乳化指数等于乳化层高度占有机相总高度的分数^[11]。

1.3.5 扩油圈测定

采用扩油圈法测试油藏样品和富集样品中是否存在表面活性物质^[12], 本文中扩油圈法进行了改进。取一培养皿, 加入含 0.1% 苏丹红的液体石蜡, 中心滴加激活后样品, 中心油膜被挤向四周形成一圆圈, 观察圆圈直径, 圆圈直径与表面活性剂含量和活性成正比。

1.3.6 物理模拟驱油实验

装填岩心; 岩心抽真空饱和沾 3 区块地层水; 测孔隙度和渗透率参数; 饱和油并计算原始含油饱和度; 一次水驱至岩心产出液含水率 98%; 65 °C 下连续注入 0.3V_p (V_p 为孔隙体积) 激活剂; 培养 12 d; 二次水驱至含水率 100% 结束。

2 结果分析

2.1 沾 3 区块地层水菌群结构分析

对沾 3 区块地层水的微生物群落结构进行 16S rRNA 基因克隆文库分析, 结果如图 1 所示。文库覆

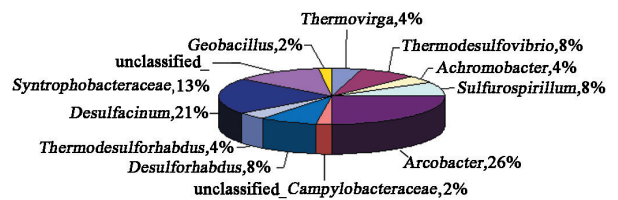


图 1 沾 3 区块地层水菌群结构分析结果

Fig. 1 Microbial diversity of reservoir water of Zhan 3 block

盖率均超过 90%, 可以准确地反映油藏样品的微生物多样性; Shannon 指数为 2.11, 说明该样品中微生物群落的多样性高, 微生物种类丰富; Pielou 均匀度指数为 0.88, 表明样品中微生物呈均匀分布, 不存在明显的优势物种。其中弓形菌 (*Arcobacter*)、热硫还原杆菌 (*Thermodesulfobacterium*) 占文库比例超过

20%,为相对占优势的种群,*Geobacillus* 菌属占文库比例2%,为非优势种群。

2.2 地层水激活后总菌数检测

沾3区块地层水采用3种激活剂激活培养,激活后总菌数随时间变化情况见图2。可以看出,设计的3种激活剂均能激活油藏样品中的内源微生物,1#激活剂和2#激活剂激活培养8d后菌液密度达到最高,分别为 5.0×10^8 个/mL和 3.5×10^8 个/mL,无明显差别,3#激活剂激活培养12d后菌液密度达到最高,为 1.8×10^8 个/mL,低于前两种激活剂激活效果。

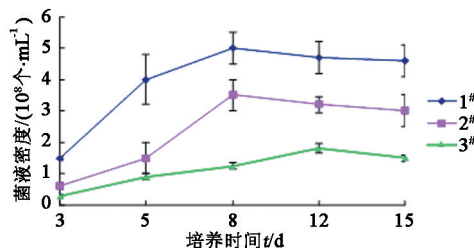


图2 地层水激活后总菌数

Fig.2 Total number of bacteria in activated reservoir water

2.3 地层水激活后乳化能力测试

利用3种不同的激活剂激活样品中的内源微生物,不同时间取样进行乳化指数测定。图3显示1#激活剂激活的样品乳化效果较好,培养3d后,开始出现乳化现象,培养8d后,乳化指数最高可达98%,之后略有降低。2#激活剂激活样品后无明显乳化效果。3#激活剂培养5d后,开始出现乳化现象,培养12d,乳化指数最高达80%。证明1#激活剂和3#激活剂中的营养成分有利于激活样品中代谢产物表面活性剂的油藏微生物,1#激活剂激活效果最佳。

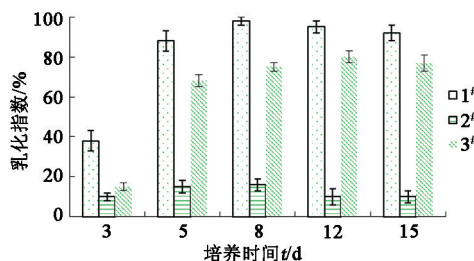


图3 地层水激活后的乳化指数

Fig.3 Index of emulsification of activated reservoir water

2.4 地层水激活后扩油圈测试

扩油圈检测实验显示培养8d后,1#激活剂激活的样品扩油圈直径最大可达6cm,2#激活剂激活

样品扩油圈直径最大为1cm。培养12d后,3#激活剂激活样品扩油圈直径最大为3cm。表明1#激活剂激活样品产生的表面活性剂量相对较高。随着激活时间的延长,扩油圈直径有所降低,与上述乳化指数的变化相似。

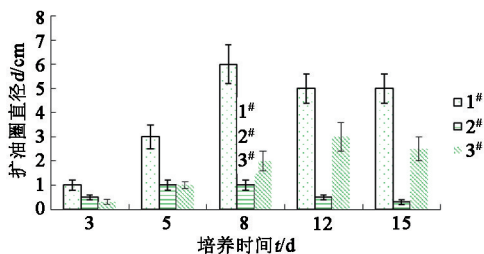


图4 地层水激活后的扩油圈直径

Fig.4 Diameter of exclusive circle by oil spreading method of activated reservoir water

2.5 地层水激活后菌群结构分析

对1#激活剂、2#激活剂激活8d后的样品和3#激活剂激活12d后的样品进行16S rRNA基因克隆文库分析,结果见图5。与激活前沾3区块地层水

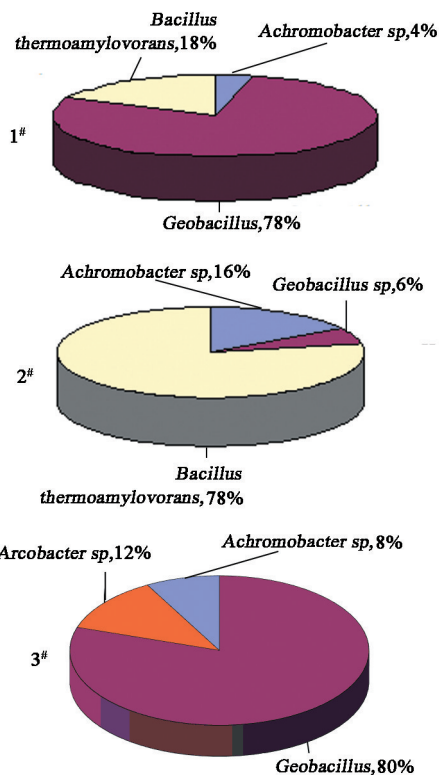


图5 激活剂激活后样品菌群结构

Fig.5 Microbial diversity of activated reservoir water by activators

菌群结构分析结果(图1)相比,3个激活剂激活后样品中微生物种群数明显减少,优势种群突出。1#

激活剂、2[#]激活剂激活后样品中均含有 *Bacillus thermoamylovora*、*Achromobacter*、*Geobacillus*, 推测这3类细菌更适应沾3区块油藏环境, 加入激活剂体系后相比其他菌群生长繁殖能力更强。1[#]激活剂激活后样品中 *Bacillus thermoamylovora*、*Achromobacter* 和 *Geobacillus* 所占比例分别为18%、4%和78%, 2[#]激活剂激活后样品中这3类细菌所占比例分别为78%、16%和6%。3[#]激活剂激活后样品中 *Geobacillus*、*Achromobacter* 和 *Arcobacter* 所占比例分别为80%、8%和12%, 表明这3类细菌均具有烃类降解功能, 在沾3区块油藏环境条件下, *Geobacillus* 降解烃类的能力最强。综合菌群结构、乳化能力和扩油圈分析结果, *Geobacillus* 是沾3油藏内源微生物中产生表面活性物质、发挥乳化功能的关键菌群, 并且1[#]激活剂可以在沾3区块复杂的内源微生物类群中选择性激活 *Geobacillus*, 使其成为优势菌, 激活效果最佳。

2.6 内源微生物驱油

如表1所示, 0为空白岩心, 1、2和3分别为注

表1 内源微生物驱提高采收率结果

Table 1 Results of enhanced oil recovery by endogenous microorganism flooding

序号	一次水驱采收率/%	激活剂注入	培养时间/d	二次水驱提高采收率/%	微生物提高采收率/%
0	43.5	—	12	1.8	—
1	41.8	0.3V _p 1 [#] 激活剂	12	12.6	10.8
2	45.3	0.3V _p 2 [#] 激活剂	12	3.0	1.2
3	43.5	0.3V _p 3 [#] 激活剂	15	8.0	6.2

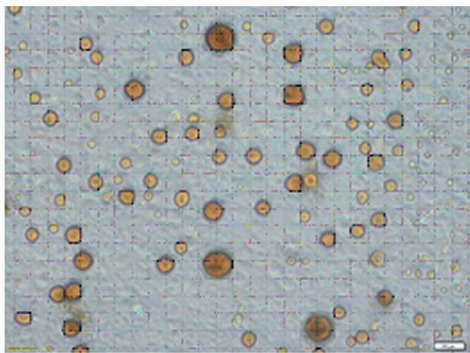


图6 1[#]岩心产出液的显微镜观察

Fig. 6 Microscope observation of produced fluid of core 1[#]

3 结论

(1) 胜利油田沾3区块油藏微生物群落结构复杂, 其中存在 *Geobacillus*, 但其所占比例较低, 仅为2%。加入合适的激活剂体系可以选择性激活该类细菌, 使其成为优势菌。

(2) *Geobacillus* 是沾3区块油藏内源微生物中产生表面活性物质、发挥乳化功能的关键菌群。

入1[#]激活剂、2[#]激活剂和3[#]激活剂激活内源微生物进行驱替的岩心。其中空白岩心二次水驱提高采收率1.8%, 而3组实验岩心二次水驱提高采收率分别为12.6%、3.0%和8.0%, 计算得出3组实验岩心激活内源微生物在一次水驱基础上提高原油采收率分别为10.8%、1.2%和6.2%。同时, 对岩心驱替液进行显微镜观察, 结果见图8。1[#]岩心产出液发现有大量乳化油滴存在, 油滴直径约为10 μm。2[#]岩心产出液无明显乳化油滴存在, 3[#]岩心产出液中发现乳化油滴存在, 但数量明显少于1[#]岩心产出液。对1[#]岩心、2[#]岩心和3[#]岩心产出液分别进行16S rRNA基因克隆文库分析, 结果与3种激活剂激活地层水后菌群结构相似。上述结果表明, 在沾3油藏条件下, 激活 *Geobacillus* 能够产生生物乳化剂等有利于驱油的代谢产物, 充分发挥其原油乳化功能, 大幅度提高原油采收率, 1[#]激活剂对 *Geobacillus* 的激活效果最好。

(3) 模拟油藏条件下, 采用激活 *Geobacillus* 的激活剂体系, 沾3区块内源微生物在水驱基础上提高原油采收率10.8%, 驱替液中原油乳化现象显著。表明 *Geobacillus* 在油藏条件下产生生物乳化剂等代谢产物, 乳化原油, 提高了原油采收率, 该菌是内源微生物采油技术激活的重要功能菌。

参考文献:

- [1] NAZINA T N, TOUROVA T P, POLTARAUS A B, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen nov, sp nov and *Geobacillus uzenensis* sp nov from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G stearothermophilus* *G th*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(2): 433-446.
- [2] OBOJSKA A, TERNAN N G, LEJCZAK B, et al. Organophosphonate utilization by the thermophile *Geobacillus*

- lus caldxylosilyticus* T20 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002,68(4):2081-2084.
- [3] MARCHANT R, BANAT I M, RAHMAN T J, et al. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments[J]. Environmental Microbiology, 2002,4(10):595-602.
- [4] ANNWEILER E, RICHNOW H H, ANTRANIKIAN G, et al. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000,66(2):518-523.
- [5] SCHIANO M V, LAMA L, POLI A, et al. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2003,30(2):95-101.
- [6] KIMURA H, ASADA R, NAGANUMA T. Distribution of microorganisms in the subsurface of the manus basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(1):644-648.
- [7] 夏文杰,董汉平,俞理,等. 一株耐温耐盐烃降解菌 *Geobacillus sp* XDF-4 性能[J]. 化工学报,2010,61(11):2951-2958.
- XIA Wenjie, DONG Hanping, YU Li, et al. Characterization of a thermophilic and halotolerant strain *Geobacillus sp* XDF-4 [J]. CIESC Journal, 2010,61(11):2951-2958.
- [8] 徐爽,黄志勇,路福平,等. 高温产生物乳化剂菌的筛选及其功能分析[J]. 科技导报,2011,29(15):52-57.
- XU Shuang, HUANG Zhiyong, LU Fuping, et al. Screening bioemulsifier-produced microorganisms and its function analysis[J]. Science & Technology Review, 2011,29(15):52-57.
- [9] 孔祥平. 一株地芽孢杆菌 (*Geobacillus sp*) 在模拟油藏条件下的生长与运移实验研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2007.
- KONG Xiangping. Study on the growth and transport of the bacterium *Geobacillus sp* in simulated reservoir conditions [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培棠,译. 3版. 北京:科学出版社,2002.
- [11] 张国印,刘庆梅,李凌云,等. 表面活性剂复配在三次采油中的应用[J]. 中外能源,2010,15(2):56-59.
- ZHANG Guoyin, LIU Qingmei, LI Lingyun, et al. Application of combined surfactant in tertiary oil recovery[J]. Sino-Global Energy, 2010,15(2):56-59.
- [12] 张凡,余跃惠. 排油圈法对生物表面活性剂的定性与定量[J]. 化学工程师,2005,112(1):14-15,38.
- ZHANG Fan, SHE Yuehui. Quantitative and qualitative analysis of biosurfactant by oil spreading method [J]. Chemical Engineer, 2005,112(1):14-15,38.

(编辑 刘为清)