

花土沟高矿化度油藏内源微生物提高采收率实验研究

王俊¹, 黄立信², 俞理²

1. 中国科学院渗流流体力学研究所, 河北廊坊 065007
2. 中国石油勘探开发研究院廊坊分院, 河北廊坊 065007

摘要 为了探讨青海花土沟高矿化度油藏利用内源微生物生长代谢提高原油采收率的可行性, 用最大可能数法 (MPN 法) 对油藏内源微生物群落组成进行分析, 筛选激活体系, 考查乳化、产酸性能, 同时对微生物作用前后的原油进行气相色谱分析, 通过 16S rDNA 序列分析, 进一步了解油藏内源微生物群落。结果表明, 腐生菌、烃氧化菌、发酵菌、硝酸盐还原菌是该油藏的主要微生物群落; 激活体系能有效地激活内源微生物乳化液蜡, 并产酸, 内源菌浓度达 10^7 /mL, 发酵液表面张力由 57.44mN/m 降至 38.5mN/m, pH 值由 7.19 降至 6.56; 选择细菌通用引物对菌株 16S rDNA 序列进行基因扩增、测序, 测序结果用 Blast 进行同源性比较得分菌株分别为 *Bacillus* sp. 和 *Halomonas* sp., 激活后的内源菌选择性降解饱和烷烃 (C_{11} ~ C_{20} , C_{28} , C_{33})。在花土沟高矿化度油藏实施内源微生物采油具有可行性。

关键词 内源微生物; 提高采收率; 16S rDNA 序列; 饱和烷烃

中图分类号 TE357.9

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.03.02

Laboratory Study of Enhancing Oil Recovery Rate by Indigenous Microorganism in Hyper-salinity Reservoir

WANG Jun¹, HUANG Lixin², YU Li²

1. Institute of Porous Flow and Fluid Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Langfang 065007, Hebei Province, China
2. Langfang Branch, Research Institute of Petroleum Exploitation and Development, Langfang 065007, Hebei Province, China

Abstract In order to study the feasibility of enhancing oil recovery rate in Qinghai oil field with hypersalinity, the composition of indigenous microorganism community was analyzed by MPN counts, the nutrient packages for emulsification were evaluated, the acid production was studied and the sequence of 16S rDNA and the saturated hydrocarbon of oil samples were analyzed. Results show that the main microbial populations in the reservoir are saprophytic bacteria, hydrocarbon-oxidizing bacteria, fermentative bacteria and nitrate reducing bacteria. The indigenous microorganisms can use nutrition added for emulsification through acid production; its cell concentration can reach 10^7 cells/mL, and the surface tension is reduced from 57.44mN/m to 38.5mN/m. The pH value of the fermentation liquor with nitrogen source is decreased from 7.19 to 6.56, and the pH value of the fermentation liquor added with carbon and phosphorous source remains unchanged, so the optimal nutrient was the nitrogen source (0.1% yeast and 0.1% peptone), which was used for all subsequent experiments. The total DNA was extracted, 16S rDNA universal primers were applied for gene amplification, and the results were sequenced and analyzed. The species isolated were confirmed to be *Bacillus* sp. and *Halomonas* sp.; the saturated hydrocarbon was catalyzed selectively (C_{11} ~ C_{20} , C_{28} , C_{33}), which exhibited a great potential to enhance oil recovery rate.

Keywords indigenous microorganism; enhancing oil recovery; sequence of 16S rDNA; saturated hydrocarbon

收稿日期: 2010-07-27; 修回日期: 2010-12-07

基金项目: 国家高科技研究发展计划 (863 计划) 项目 (2009AA063504); 中国石油天然气股份有限公司国际合作项目 (2008A-1402-01)

作者简介: 王俊, 博士研究生, 研究方向为微生物采油, 电子信箱: junwenxu@163.com; 黄立信 (通信作者), 高级工程师, 研究方向为微生物采油, 电子信箱: huanglixin69@petrochina.com.cn

0 引言

花土沟油田位于青海省柴达木盆地西部南区,其地层水为 CaCl_2 型,总矿化度为 $20 \times 10^4 \text{mg/L}$,高矿化度使聚合物等化学驱的应用受到了限制^[1]。为了稳定生产,进一步提高采收率,需要考虑实施微生物采油技术的可行性。微生物采油技术是通过选择性激活油藏内部的有益微生物,利用微生物在油层中生长代谢产生的生物表面活性物质、气体、有机酸来提高原油采收率^[2-3]。青海油田自 1997 年起开展了单井微生物吞吐采油试验,其后又陆续开展了微生物清防蜡试验,均起到了一定效果^[4]。微生物采油技术不但包括微生物在油层中的生长、繁殖和代谢等生物化学过程,而且包括微生物菌体、微生物营养液、微生物代谢产物在油层中的运移,因此微生物群落组成分析十分重要,会影响微生物采油技术的效果,需要在进行矿场试验之前,对特定油藏地层中的微生物群落以及激活后的功能菌群进行系统分析,对油藏群落进行定向调控,促进功能菌群最大程度地代谢有益产物,从而提高微生物采油效率。

1 材料与方法

1.1 原油和水样

实验所用原油和水样取自青海花土沟油区生产井井口。地面原油具有含蜡高、含盐高特点,密度 0.884g/cm^3 ,含蜡量 17.2%~22%,含盐量 1238.8mg/L 。地层水为 CaCl_2 型,钙镁离子含量高,总矿化度为 $20 \times 10^4 \text{mg/L}$ 。

1.2 内源微生物群落结构分析

取 4 个地层水样分析油藏内源微生物的群落组成,采用 3 管 MPN 法^[5]分析水样中腐生菌(TGB)、烃氧化菌(HOB)、硝酸盐还原菌(NRB)、发酵细菌(FMB)、硫酸盐还原菌(SRB)和产甲烷菌(PMB)菌群的浓度。所有试剂瓶培养温度为 37°C ,培养时间为 14~21d。所有试剂瓶均为实验室自配^[6-7]。

1.3 内源菌激活性能研究

由于本实验的目的在于考查内源微生物在油藏中生长代谢产物表面活性物质、有机酸对原油采收率影响,故检测内源微生物激活后的乳化性能、产酸性能。

筛选激活体系,激活体系用地层水配制, 37°C 培养 10~14d,观察不同激活体系对原油的乳化性能,分析发酵液的菌体浓度、pH 值和表面张力。菌体浓度通过稀释涂布测得;通过吊环法测定发酵液表面张力。

1.4 16S rDNA 序列测定

将发酵液稀释涂布于高矿化度琼脂平板上 (NaCl 5%), 37°C 培养,挑取单菌。采用基因组提取试剂盒(天根)提取各菌落的 DNA,采用细菌 16S rDNA 基因通用引物:27F(5'-GAG AGT TTT ATG ATC CTG GCT CAG-3'),引物 21541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3')对菌株 16S rDNA 序列进行基因扩增。聚合酶链式反应(PCR)反应条件: 94°C 预变性 5min, 94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 1.5min,30 个循环; 72°C 9min, 4°C 停止。纯化的 PCR 产物与 pGEM T 连接并转入大肠

杆菌 DH-5 α 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆,测序。测序结果用 Blast 进行同源性比较。

1.5 原油降解性能分析

加入选定的激活体系,以原油为唯一碳源, 37°C ,120 r/min,培养 10~14d。将发酵液以 4000r/min 的速度离心 30min,收集上层油相,氯仿萃取后进行原油全烃气相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 内源微生物群落分析

确定油藏环境中的微生物群落是内源微生物驱油研究的首要工作。图 1 为利用 MPN 法分析 4 个地层水样中 6 种内源菌群的最大可能数结果,从图中可看出,花土沟油藏微生物群落主要由腐生菌、烃类氧化菌、发酵菌、硝酸盐还原菌组成,其构成了花土沟油藏基本的微生物生态系统,显示青海花土沟油藏具备内源微生物激活的潜力,可以予以内源微生物驱油方式。

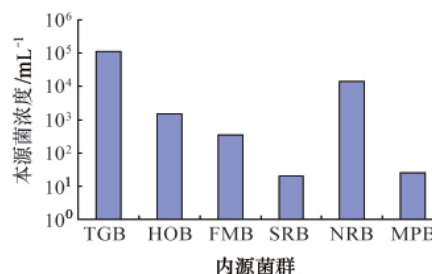


图 1 内源微生物群落分析

Fig. 1 Analysis of indigenous microorganism

2.2 内源菌乳化性能研究

微生物采油的机制之一是利用微生物的代谢产物,降低原油黏度,促进原油流动,从而提高采收率,所以有必要考查微生物对原油的乳化作用。由于青海地层水矿化度很高,其地层水中富含钠、钾、钙、镁离子,所以只需向其中添加微生物所必须的碳、氮、磷源和复合维生素^[8]。选择激活体系 1 为 0.6%糖蜜;激活体系 2 为 0.1%酵母粉,0.1%蛋白胨;激活体系 3 为 0.02%磷酸氢二钾、0.025%硝酸铵与复合维生素浓缩液(0.5mL/100mL)。以液蜡为唯一碳源,分别在地层水中加入 5%的液蜡,180r/min, 37°C 振荡培养,考查内源菌激活后对液蜡的乳化能力。结果表明,青海花土沟油藏的内源微生物能够很好的乳化液蜡,内源菌浓度达 $10^7/\text{mL}$,发酵液表面张力由 57.44mN/m 降至 38.5mN/m (表 1)。

微生物作用原油后会产生一些低分子的有机酸,这些有机酸可对地层岩石产生部分酸化作用,增大地层渗透率,从而提高石油采收率,所以在激活内源微生物过程中,观察发酵液的 pH 值。结果显示,发酵液 pH 值由 7.19 降至 6.56。

2.3 原油性质分析

为了进一步了解内源微生物降解原油的规律,将微生物作用前后的原油进行色谱分析,发现烷烃组分发生了不同程度的变化(图 2)。其中,姥鲛烷(Pr)和植烷(Ph)是原油中的生

表 1 内源菌激活体系筛选

Table 1 Nutrient selection of indigenous microorganisms

样品	参数	激活前	激活后	降低率/%
体系 1	pH 值	7.20	7.4	-2.78
	表面张力/(mN·m ⁻¹)	58.63	54.6	6.87
体系 2	pH 值	7.19	6.56	8.76
	表面张力/(mN·m ⁻¹)	57.44	38.5	33.00
体系 3	pH 值	7.12	7.25	1.80
	表面张力/(mN·m ⁻¹)	56.28	55.43	1.50

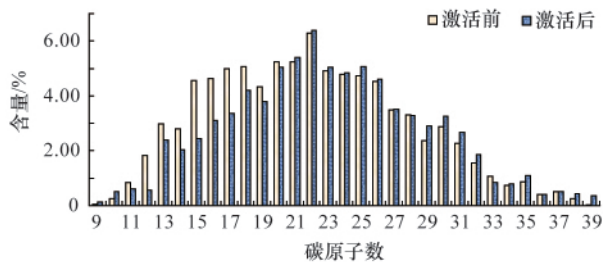


图 2 饱和烃气相色谱分析

Fig. 2 Saturated hydrocarbon analysis by gas chromatography

物标志化合物, 结构比较稳定, 微生物作用对它的影响很小^[9]。从分析结果可以看出, 内源菌激活后作用于花土沟原油, 都不同程度地引起 Pr/nC₁₇ 与 Ph/nC₁₈ 值的变化, Pr/nC₁₇ 与 Ph/nC₁₈ 值分别由原来的 0.64%、1.75% 增加至 1.38%、3.24%, 表明激活后的内源菌对原油中低碳链饱和烷烃具有生物降解作用。从分析结果还可以看出(表 2), 内源微生物选择性地降解了低碳链的饱和烷烃(C₁₁~C₂₀)以及高碳链饱和烷烃(C₂₈, C₃₃), 有助于增强原油的流动性、提高采油率。

表 2 微生物作用前、后原油中饱和烃气相色谱分析

Table 2 Saturated hydrocarbon analysis of oil samples before and after the introduction of microorganism by gas chromatography

正构烷烃	含量/%		正构烷烃	含量/%	
	作用前	作用后		作用前	作用后
C ₁₁	0.85	0.60	C ₁₈	5.06	4.20
C ₁₂	1.84	0.56	C ₁₉	4.32	3.80
C ₁₃	2.97	2.39	C ₂₀	5.24	5.05
C ₁₄	2.81	2.03	C ₂₈	3.31	3.28
C ₁₅	4.55	2.44	C ₃₃	1.06	0.84
C ₁₆	4.63	3.11	Pr/nC ₁₇	0.64	1.38
C ₁₇	5.00	3.36	Ph/nC ₁₈	1.75	3.24

2.4 功能菌群分析

将激活后的发酵液稀释涂布于高矿化度琼脂平板上(5% NaCl), 进一步了解花土沟油区油藏内源微生物群落。37°C 培养后得到两个单菌落 W31、W32。分别提取 W31、W32

菌株的 DNA, 选择细菌通用引物对菌株 16S rDNA 序列进行基因扩增、测序, 测序结果用 Blast 进行同源性比较。W31 与 4 个菌株 *Bacillus* sp. W-SL-2, *Bacillus* sp. BSi20511, *Bacillus firmus*, *Bacillus* sp. G2DM-32 的同源性达 99%, 确定 W31 菌株为 *Bacillus* sp.。W32 与 *Halomonas* sp. FIB162, *Halomonas* sp. FIB163_2, *Halomonas* sp. FIB163_1, *Halomonas* sp. Ap-5 同源性为 98%, 其中与 *Halomonas* sp. FIB162 同源性最大, 确定 W32 菌株为 *Halomonas* sp.。

3 结论

(1) 激活体系能有效地激活内源微生物乳化液蜡, 激活后的内源微生物选择性地降解饱和烷烃(C₁₁~C₂₀, C₂₈, C₃₃)。

(2) 腐生菌、烃氧化菌、发酵菌、硝酸盐还原菌是该油藏中的主要微生物群落, 通过分子手段分析激活后的功能微生物, 分离菌株分别为 *Bacillus* sp. 和 *Halomonas* sp.。实验结果为了了解青海高矿化度油藏微生物群落结构和进一步应用功能菌群进行微生物采油提供依据。

参考文献 (References)

- [1] Zhang Q, Zhou J S, Zhai Y A, et al. Effect of salt solutions on chain structure of partially hydrolyzed polyacrylamide[J]. *Journal Central South University Technology*, 2008, 15(s1): 80-83.
- [2] 汪卫东. 我国微生物采油技术现状及发展前景 [J]. 石油勘探与开发, 2002, 29(6): 87-90.
Wang Weidong. *Petroleum Exploration and Development*, 2002, 29(6): 87-90.
- [3] 窦启龙, 陈践发, 王杰, 等. 微生物采油技术的研究进展及展望 [J]. 天然气地球科学, 2004, 15(5): 559-563.
Dou Qilong, Chen Jianfa, Wang Jie, et al. *Natural Gas Geoscience*, 2004, 15(5): 559-563.
- [4] 曹书瑜, 涂书培, 李志伟, 等. 青海七个泉油田复合微生物驱油试验[J]. 石油天然气学报, 2007, 29(6): 124-127.
Cao Shuyu, Tu Shupe, Li Zhiwei, et al. *Journal of Oil and Gas Technology*, 2007, 29(6): 124-127.
- [5] Bartscht K, Cypionka H, Overmann J. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 28(3): 249-259.
- [6] Widdel F, Boetius A, Rabus R. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane[J]. *Prokaryotes*, 2006(2): 1028-1049.
- [7] Nazina T N, Sokolova D Sh, Shestakova N M, et al. The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the Dagang high-temperature oil field[J]. *Microbiology*, 2005, 74(3): 343-351.
- [8] 张红丽, 黄立信, 俞理, 等. 高温高盐油藏微生物驱油技术研究 [J]. 古生物学报, 2008, 47(4): 493-497.
Zhang Hongli, Huang Lixin, Yu Li, et al. *Acta Palaeontologica Sinica*, 2008, 47(4): 493-497.
- [9] 周金葵, 王大威, 廖明清, 等. 一株石油烃降解菌的筛选及性能评价[J]. 大庆石油地质与开发, 2007, 26(6): 119-123.
Zhou Jinkui, Wang Dawei, Liao Mingqing, et al. *Petroleum Geology and Oilfield Development*, 2007, 26(6): 119-123.

(责任编辑 刘志远)