

# 石油微生物学在中国科学院微生物研究所的发展

王修垣

(中国科学院微生物研究所 北京 100101)

**摘 要:** 本文较详尽地综述了中国科学院微生物研究所 50 多年在涉及石油微生物学的科学研究成果, 包括微生物勘探法和气态烃氧化菌、微生物与油气形成、有机酸的生产、油田微生物与提高采油量、微生物提高采油的现场应用。共引用了 105 篇文献。

**关键词:** 石油微生物学, 微生物勘探法, 气态烃氧化菌, 有机酸, 油田微生物, 采油

## The Development of Petroleum Microbiology in Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences

WANG Xiu-Yuan

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

**Abstract:** A full and accurate review involved microbial prospecting of petroleum and gaseous hydrocarbon-oxidating bacteria, microorganisms and formation of petroleum and gas, production of organic acids, oil field microorganisms and enhancement of oil recovery. Hundred and five papers are quoted.

**Keywords:** Petroleum microbiology, Microbiological prospecting, Gaseous hydrocarbon-oxidating bacteria, Organic acids, Oil field microorganisms, Oil recovery

石油微生物学作为普通微生物学和地质学之间的分支学科——地质微生物的重要组成部分, 研究微生物在石油系烃类形成、转化和开发等过程中的作用, 探索其在石油工业中应用的途径。因此, 它和一些与石油有关的学科有着密切的关系, 并互相渗透和推动。

早在 1895 年, Miyoshi<sup>[1]</sup>首先记载了微生物利用烃类的现象。Щейко<sup>[2]</sup>于 1901 年发现油层中有微生物。Гинзбург-Карагичева<sup>[3]</sup>和Bastin<sup>[4]</sup>在 1926 年又证实了苏、美的油层水中存在着硫酸盐还原菌等生理菌群。同年, Beckmann<sup>[5]</sup>提出了利用微生物活动提高采油的设想。直到 1946 年, ZoBell 才申请了微生物采油法的第一个专利<sup>[6]</sup>。Söhngen<sup>[7]</sup>和 Kaserer<sup>[8]</sup>在 1906 年分离到甲烷氧化菌。Могилевский(1937)和Blau(1939)先后在前苏联和美国<sup>[9-11]</sup>拟定了利用气态烃氧化菌勘探油气藏的方法。而石油微生物学的发展却始于上世纪 30 年代, 苏、美学者做了大量的工作。到 50 年代, 许多国家开展了微生物利用烃类为碳源生产用途广泛的各种产物。遗传工程技术在 70 年代引入到石油微生物的研究中<sup>[12]</sup>。一些研究成果已应用于石油工业, 或正在

进行中间试验或现场试验。从上世纪 80 年代后期到 1995 年, 美国大约两年召开一次微生物提高采油的国际会议。在有关生物工程的国际会议上, 也组织专题组讨论与石油微生物学有关的问题。

石油微生物学在我国、我所均始于 1955 年。同年 9 月我从武汉大学生物系毕业, 分配到中国科学院菌种保藏委员会(后改名为北京微生物研究室, 为我所前身之一)。时任该会业务秘书的方心芳教授(后为中国科学院生物学部委员、院士)让我到刚设立的油气田微生物勘探组, 同淡家麟助理研究员(至 1956 年年底)等人一道工作, 从而与石油结下了不解之缘, 直到今天。兹将我所有石油微生物学的研究概况作一综述。

### 1 微生物勘探法和气态烃氧化菌

石油一词, 在我国最早见于北宋。时任陕西经略副使兼知延州的沈括(约 1033~1097)撰写的《梦溪笔谈》写道:“鹿延(今富县、延安一带)境内有石油生于地中无穷。”他预期, 此物日后必大行于天下。那时就有石油加工厂, 从中炼出了

炭黑、石蜡和沥青。此前,班固(32~92)在《汉书》中记载:“高奴有洧(Wēi)水,肥可燃,用于点灯、做饭。”明朝,曾学佺在《蜀中广记》中记载:“国朝(即明朝)正德末年(1521),嘉州(四川乐山一带)开盐井,隅得油水,但出于井耳”。清朝的慈禧太后,让人挖出了我国的第一口油井。她把德国政府送她的两台发电机中的一台送去抽油。美国于1859年8月钻了第一口油井,远晚于我国明朝开盐井出油,与清朝挖出油井的时间大体相当。此后,由于民生凋敝、技术落后等因素的影响,“中国贫油论”甚嚣尘上,1939年孙建初先生才在玉门市南一条深沟里挖了老君庙油田第一口井——老君庙第一号油井;至1952年我国的石油年产量只有43.5万吨。

随着国民经济的发展,对石油的需求量日益增加,需要发展新的油气勘探法。1954年,时任燃料化学工业部西安地质调查处处长的翁文波教授(地球化学专家,我院院士),通过该部提出委托我院研究油气藏的微生物勘探法,方心芳先生欣然接受。他在1955年5月,原苏联科学家代表团访华代表 Мишустин ЕН 通讯院士来菌保会座谈后,向中科院院部的报告中,提出的8条建议的第六条,即是“应该扩大石油微生物的研究……”。微生物勘探组的组建为石油微生物学在我所和我国的发展揭开了序幕。

### 1.1 微生物勘探

油气藏深埋于地下,其中富集的天然气的地下压沿着地层裂隙向地表扩散。分析底土中烃含量的异常区作为油气藏可能存在的标志是地球化学直接找油法(气测法)之一。在底土中存在着以气态烃为唯一碳源和能源的细菌,其发育强度与烃含量有相关性。这一方面会引起气测指标的周期性改动,降低了气测法的效果;另一方面提出了利用这类细菌作为油气藏指示菌的可能性。因此,研究气态烃氧化菌的分布规律及其生理、生化特性就成为油气藏微生物勘探法的基础。

微生物勘探法按其分析样品或检测手段的不同可分为土壤细菌勘测、水样细菌勘测、岩心细菌勘测、放射自显影勘测和种菌法等。土壤和水样细菌勘测具有经济、简便易行的优点,在上世纪60年代于前苏联、美国、捷克斯洛伐克、波兰、匈牙利、民主德国等国广为研究和采用。在前苏联,用水样细菌勘测法调查了60多个地区和构造,分析了6000多个水样,普查总面积50万平方公里;发现了150个异常。其中43个进行了钻井,有22个与钻井结果完全一致,15个部分一致,准确率为50%~65%。

此后,对油气藏中天然气向地表扩散的方式和气态烃氧化菌的专一性问题发生了争论,影响了该法的发展;而德国和美国仍在应用和改进这种方法<sup>[13,14]</sup>。

在1956~1971年,我所主要采用土壤细菌勘测法勘探了甘肃、四川、广西、山东、黑龙江、宁夏、陕西、青海、北京和天津等省市约20多个已知油区和未知油区,证实了方法的可用性。微生物勘探法的结果与钻井资料的吻合性在

65%左右。观察到,气态烃氧化菌的分布主要受季节、土壤pH和上覆岩层断裂的存在等因子的影响;在气态烃氧化菌中,以乙烷氧化菌分布较广<sup>[15]</sup>。玉门石油管理局后来在无意中于鸭儿峡钻了一口井,出了石油。该井正好位于微生物勘探划出的烃氧化菌分布的异常带。鸭儿峡油藏的开发对于细菌勘探无疑起了推动作用。淡家麟等<sup>[16]</sup>报道了甲烷、乙烷和丙烷氧化菌的分离方法。张恺民<sup>[17]</sup>鉴定了一株乙烷氧化菌:*Mycobacterium lacticolum* var. *ethanicum*。

我所1958年成立,10月方心芳先生访问前苏联,了解到他们开展地质微生物研究的内涵、成就和意义。回国后,将北京微生物研究室原有的相关课题组合成国内第一个地质微生物研究室,亲任室主任指导工作。当时国内对于微生物和石油的关系知之者寥寥,我所邀请前苏联的 Кузнецова BA 来所讲学,还召开了油气微生物勘探学习班,编写了讲义,组织大专院校、石油部和地质部的有关人员学习和推广,并印发了《微生物勘探石油和天然气方法讲义》<sup>[18,19]</sup>。

### 1.2 气蛋白和降低石油制品凝固点

大庆等油田的发现和开发结束了“中国贫油”的历史,并从1962年开始出口石油。周恩来总理在1963年12月4日宣布“中国需要的石油现在已经可以基本自给”。1978年12月18日,中国原油产量1亿吨/年,位居世界第八。

上世纪六十年代中后期,国内文化大革命如火如荼,国际上前苏联和东欧的社会主义国家和英法等均在积极开展着用油气生产饲料、降低石油制品凝固点的研究和生产。我所的革命委员会决定从细菌勘探组调出3人,加上其他人员13人,组成天然气制造单细胞蛋白课题组。方心芳先生对此有自己的看法。由于头戴“历史反革命”和“反动学术权威”的帽子,不能直言陈谏,只好婉言提醒。

在“气蛋白”组成立之前,法国的 Senez JC 来所作了石油蛋白的报告,由我和另一位同事作记录。会后还整理成文,交给方先生。大约在1968年,我所还组织过有关单位用微生物降低石油凝固点、生产单细胞蛋白的经验交流会,编成交流资料。遗憾的是在我所档案室竟查不到上述气蛋白的只言片语。十几个人七八年的辛劳和青春也伴随着那场辛酸的浩劫化为历史烟尘而不堪回首。

在此顺便提到,牟川静等报道<sup>[20]</sup>, *Pichia petroleum* Mu sp. nov. D, 在发酵轻重混合馏分油品时,60 h能使油品凝固点从17°C下降到约-50°C。另一株酵母菌 *Torulopsis deparaffina* n. sp. C<sub>7</sub> 发酵 300°C~400°C 馏分油(正链烷含量5.6%)70 h,可将凝固点从4.5°C下降到-60°C,并得到干酵母5.4 g/kg油<sup>[21]</sup>。凌代文等鉴定了两株嗜热的烃氧化菌:*Corynebacterium thermophilum* nov. sp. F76 和 *Coryneb. deparaffinicum* nov. sp. F761。它们在30 h发酵中可把中质润滑油(正链烷含量20%)凝固点从26°C下降到-37°C<sup>[22]</sup>。1971年我所谭秀峰、张震元也在杭州炼油厂做过石油脱蜡产单细

胞蛋白的研究。前者 1972 年还在牛栏山用石油发酵聚乙烯醇结枝共聚成新型化学纤维。

1998 年我受江汉石油学院(长江大学前身)之聘, 任兼职教授。我国已成了原油的进口国, 而大多数油气盆地的勘探程度已相当高, 剩余的油气资源分布分散, 非构造油气藏居多, 常规勘探难度增大, 有必要跟上国际细菌勘探的发展态势, 继续开展该技术的开发和应用。建议该校邀请德国 MicroPro GmbH 的总管 Wagner M 博士来讲学, 并商谈合作<sup>[24]</sup>。Wagner 博士是我在前民主德国留学时的同事, 在我的协助下双方签订了协议。该项目列入中德国际合作项目 No. 200203-10。双方在西柳地区和二连盆地马尼特坳陷进行细菌勘探。袁志华等发表的结果表明, 细菌异常带与现有的资料对比, 符合率为 75%~100%<sup>[23-25]</sup>, 效果是理想的。国内还有其他单位也在利用该法勘探油气。

## 2 微生物与油气形成

1) 第四纪沉积岩中物质和能量的微生物转化。在油气成因假说中, 微生物的作用具有重要意义。我国石油地质学家李四光提出了陆相生油理论与中国贫油论相对立。中国科学院于 1961 年组织地质所、微生物所等四个单位到青海湖进行综合研究, 以完善这一理论。1962 年时任地微室业务秘书的王大珍先生担任该项目中微生物研究课题的负责人。根据青海湖第四纪沉积岩四个剖面(最深 141 m)九类生理菌群和生化、地化的分析结果指出, 原始有机质的数量、类型和沉积环境是决定有机质保存及转化的重要因素, 也是决定微生物活动强度的重要因素。微生物在有机质转化早期(埋藏深度 10 m~20 m), 起着产氢、转氢、脱氧、创造还原环境、促进成岩等作用。微生物分解有机物质时释放的能量, 一部分储存于环境中, 创造了还原条件, 有利于剩余有机质的保存; 另一部分转给剩余的有机质使之还原并向石油方向转化。脂肪酸是有机质转化早期的主要中间产物, 在三个还原性剖面中约为有机质总量的一半。在接种岩心样及湖底沉积物样的脂肪酸发酵产物中, 鉴定出有甲烷、乙烷、丙烷、丙烯、正丁烷、丁烯、异丁烷等。作者从而推断, 沉积中的重烃可能是由微生物发酵有机质产生的。撰写的报告编入“青海湖综合考察报告”一书<sup>[26]</sup>出版, 受到地质部、石油部的重视, 并获得 1978 年全国科技大会自然科学奖。

2) 甲烷氧化菌和产甲烷菌, 这是一对在生境、生态、生理和系统发育等方面差异很大, 而广布于自然界的细菌, 对环境发挥着威力巨大的影响。前者可把后者产生的  $\text{CH}_4$  氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2$  参与温室气体中, 亦可作为油气勘探的指示菌和消除煤矿瓦斯爆炸等发挥有益作用。后者既是温室气体  $\text{CH}_4$  和生物形成气体的主要参与者, 也在微生物提高采油工艺(略写为 microbial enhancement of oil recovery, MEOR)中发挥重要的作用。

a) 甲烷氧化菌我所细菌勘探组解体后, 有几位同事开始进行气态烃氧化菌的分离和鉴定。陈子英等报道了甲烷氧化菌混合培养物中非甲烷氧化菌的种类与特性<sup>[27]</sup>。在混合培养物中产生一种酸性多糖, 其单糖组分为: 半乳糖、葡萄糖和岩藻糖。推测这种胞外多糖是由伴生菌形成的<sup>[28]</sup>。他们发现并描述了两个以甲烷为唯一碳源和能源的细菌新属: *Polysporobacterium* gen. nov.<sup>[29]</sup> 和 *Echinosporobacterium* gen. nov.<sup>[30]</sup>。*Polysporobacterium* 的主要特征是, 能从无菌丝的营养细胞直接转变为孢囊, 产生大量孢子进行繁殖, 有四个新种: *Polysporob. arenarium*<sup>[30]</sup>, *Polysporob. chromoflavum*<sup>[31]</sup>, *Polysporob. rhizomorphum*<sup>[26]</sup> 和 *Polysporob. globosum*<sup>[32,33]</sup>。观察了该菌的超显微结构<sup>[34]</sup>。*Echinosporobacterium* 的主要特征是每个孢囊产生两个孢子, 孢子从孢囊一端放出成为新的营养细胞, 而菌体本身具有刺状突出物, 模式种为 *Echinosporob. album*。梁家驊等鉴定了一株分离自沼气池中的甲烷氧化菌, 定名为 *Methylobacter luteolocroceus* sp. nov.<sup>[35,36]</sup>。

b) 据估计, 产甲烷细菌每年为全球产甲烷 4 亿吨, 使之成为第二大温室气体。它也是气田、油藏油气、气顶气和煤层气的主要组分。该菌群在 MEOR 技术中发挥着重大作用。以前由于技术条件的限制, 这方面的研究较少。Hungata 厌气技术的出现(1969 年), 为有机质、残余原油、煤层的生物厌氧降解提供了技术支持。我所研究这类菌最初是 1958 年张树政等的沼气发酵研究, 1982 年方心芳院士建议在我所开展厌氧菌研究, 以产甲烷菌为对象。在中国科学院的支持下, 又重新建立沼气发酵微生物研究组, 由王大耑任组长。其中有凌代文、刘聿太等从事产甲烷菌的分离和分类鉴定研究。由于沼气发酵是多种细菌混合发酵的结果, 因此又由乐华爱、谭培英等从事有关细菌的研究。我国国内有文章认为, 产甲烷细菌在酿酒酒窖窖泥中可提高己酸的产量。梁家驊等将分离自河南一酒厂窖泥中的产己酸的 *Clostridium kluyverimi* 与只利用  $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$  的 *Methanobrevibacter arbohilicum* DSM1125 进行共培养, 并用溴代磺酸乙烷抑制产甲烷为对照, 并未看到产己酸量增加<sup>[37]</sup>。程光胜、屠雄海等从处理啤酒厂废水的厌氧消化器颗粒污泥中得到一个能厌氧降解丁酸的产甲烷共培养物 BF2, 它也可降解包括异丁酸在内的 4~18 个 C 原子的脂肪酸。降解丁酸产生的气体含 95% 以上的甲烷。从它培养在巴豆酸为底物的培养物中分离到专性还原产乙酸的菌株 CF2 和 *Methano-bacterium formicum* MF2 的纯培养, 称 GF2 为 *Syntrophomonas wolgei* subsp. *saponavide* GF2。将它们重新组合可降解丁酸产甲烷; 将 CF2 与 *Methanospirillum hungatei* JF1、*Methanobacterium bryantii* 1125、*Methanob. gormicum* 1535 和 *Desulfovibrio* sp. G11 分别组成人工共培养物, 均可厌氧降解丁酸。由于布氏甲烷短杆菌不利用甲酸, 当 CF2 和 MF2 组成共培养物时, 其种间电子传递方式与以往报道的不同, 可能为甲酸转移, 尚

需测定CF2菌株的甲酸裂解酶的活性<sup>[38]</sup>。东秀珠和程光胜等报道*Symthrophospora bryantii*(用巴豆酸作为唯一碳源和能源分离自*Methano* sp. *hungatei* DSM3014B的二合培养物)在利用H<sub>2</sub>和延胡索酸二者生长的产甲烷菌的共培养物中能降解丁酸,而在与只代谢H<sub>2</sub>的产甲烷菌的共培养物中则不能。这表明,延胡索酸可能是共营降解中比H<sub>2</sub>更重要的电子载体。加入20 mmol/L延胡索酸或130 kPa H<sub>2</sub>抑制合营的丁酸氧化。在无产甲烷菌时,*S. bryantii*能氧化丁酸为乙酸,还原戊烯酸(pentenoate)为戊酸。此时,在气相中可测出300 Pa H<sub>2</sub>;在液相中测出0.3 mmol/L延胡索酸。*S. bryantii*不能与分解乙酸的产甲烷菌*Methanotrix sohngei*共营地生长,在与*Methanosp. hungatei* DSM864和*Methanotrix sohngei*的三合培养物(triculture)中,*S. bryantii*降解丁酸比在只与*M. hungatei*的二合培养物(biculture)更快。在无细胞的*S. bryantii*提取液中证明有产氢酶和延胡索酸降解酶的活性<sup>[39]</sup>。

孙征等从处理北京啤酒厂污水的厌氧消化器中分离到一株只利用H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>的菌株P<sub>X</sub>1,鉴定为一新种,命名为*Methanobacter curvum* sp. nov.<sup>[40]</sup>。我们也完成了在厌氧箱内用斜面培养基分离厌氧菌的研究,效果良好。今后应进一步加强残余油层和煤层的厌氧降解和产甲烷菌的研究和应用。

Кузнецов СИ和Иванов МВ等以油层中存在有厌氧化菌与产甲烷菌的代谢偶联为基础,拟定了提高石油采收率的生物地球化学工艺;而厌氧发酵糖蜜的菌群则是其中的重要成员。若能将非油藏内的这两类菌群人工配伍,形成代谢偶联,将可为不存在这两群细菌的油藏提供可用的菌种。为此,龚革等从处理生活废水的厌氧污泥床的4个样品中分离、纯化了9株嗜热的、利用H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>或甲酸盐产甲烷的细菌。鉴定为嗜热产甲烷杆菌的不同菌株(*Methanobacterium thermoformicicum* 602B)。将该菌株与分离自豆腐污泥的*Bacteroides* sp. 5G-102菌株配伍成人工混合培养物,进行多项生长条件的测定,结果表明了它们配伍的可行性,从而为进一步研究其在提高石油采收率工艺现场应用的可行性提供了前提<sup>[41,42]</sup>。

c) 藻类产烃。群生的丛粒藻(*Botryococcus braunii* Kütz., 又译葡萄藻,1819年)是广布于世界内陆水域的浮游单细胞微藻(microalgae)。在国外,从晚远古代(约10<sup>9</sup>年前)到近代的沉积岩中,在我国北部湾沿岸、茂名油页岩等地的石油沉积层中均发现了它的化石,也从云南抚仙湖水中得到了该藻株。不同来源的该藻的含烃量为0.3%~76%细胞干重,大大高于其它微生物。在有石油沉积的地方,几乎所有的有机质都是由它造成的,因而又名曰油藻。根据对澳大利亚达尔文水库丛粒藻产量的研究结果估算,每年可产石油烃类35万吨,在成本上也是可行的。它不仅可能提供可再生性能源和蛋白,也是陆相生油的佐证。

1940年以来,对藻类产烃研究日益增多,上世纪80年代固定化藻类细胞的研究国内尚未见报道<sup>[43,44]</sup>。我所于1987

年开始研究固定化丛粒藻细胞产烃。该藻固定在纱布上的O<sub>2</sub>释放量、生物量和产烃量分别为1.84 μmol/min/L、1.44 g/L和0.82 g/L,与游离细胞的相当,产生的烃类也相同,主要是C<sub>23</sub>-C<sub>31</sub>的奇数二烯同系物,但产烃量比当时报道的高1-4倍,达到国际先进水平;并且具有设备简单、无毒、廉价、透光性好、表面积大等优点<sup>[45]</sup>。1992年,在国家自然科学基金(No. 39270082)的资助下,用购自武汉水生生物研究所的两个该藻藻株,A(USA-357)、C(760,我国抚仙湖),连同由德国Götting大学惠赠的B(807-1)进行试验。结果指出,A株的最适生长温度为25°C,超过30°C生长迅速下降;加入NaF 0.1 mg/L,A株的生物量由0.71 mg/L提高到0.89 mg/L,浓度提高到0.25 mg/L,即受到抑制。将不产烃的芽孢杆菌109或棒状杆菌22-1与该株协同培养。*Bacillus* 109有抑制作用;*Coryneb.* 22-1有促进作用。烃产量由对照的0.09 g/L提高到0.39 g/L,烃量占生物量的百分数由5.6%提高到24.2%,生物量无明显增加<sup>[46]</sup>。气相色谱质谱分析指出,该藻藻株A和B产生以C<sub>n</sub>H<sub>2n-2</sub>和C<sub>n</sub>H<sub>2n-4</sub>为主的烯基烃,C为丛粒藻烯和异丛粒藻烯主的多分支烃<sup>[47]</sup>。

据西班牙《世界报》2007年5月28日报道,生物燃料系统公司已能在2 m<sup>3</sup>的海水中生产6 kg生态石油,比大豆等作物的效率高出数千倍,并准备在阿利坎特市建立第一个海底生态石油为燃料的电厂,每1 kg有机物质质含有5700千卡热量,像煤炭一样。这无疑是个值得关注的课题。

### 3 有机酸的生产

有机酸是很有用的工业产品,我所作了许多工作。田静等报道,经硝基胍处理的*Candida rugosa*突变株S<sub>B-1</sub>利用重液体石蜡(6%, V/V)产生琥珀酸,最高产量为4.45%,对底物的转化率为74%<sup>[48,49]</sup>。另一株*C. rugosa* C<sub>90</sub>在重液体石蜡6%和碳酸钙5%时发酵74 h~85 h可产反丁烯二酸3.8%~4.2%,转化率为63%~70%<sup>[50]</sup>;流加碳酸钙、发酵162 h,产该酸5.15%,转化率达85%<sup>[51]</sup>。经亚硝基胍和钴60处理得到突变株CNO<sub>20</sub>,发酵6%重液体石蜡可得反丁烯二酸6%,转化率116%<sup>[52]</sup>。杨廉婉等将石油发酵生产延胡索酸的*C. rugosa* C<sub>90</sub>废菌体包埋于聚丙烯酰胺凝胶中,在pH 8.0~8.5条件下将延胡索酸只转化为苹果酸。固定化细胞柱中包埋6 g湿菌体,30°C稳定工作2个月,将12.24 L/mol/L延胡索酸铵转化为L-苹果酸,转化率82%~85%。延胡索酸酶活力的半衰期为95 d。小批量生产得到的结晶成品的含量在99%以上<sup>[53]</sup>。石油蛋白组分离、筛选到几株能高产α-酮戊二酸的石油酵母菌,其中*Candida lipolytica* AS2.1207(716)在含重液体石蜡10%(V/V)的培养基中发酵生产α-酮戊二酸,产量3%,转化率40%<sup>[54]</sup>。

法幼华等<sup>[55]</sup>进行了微生物氧化萘制取水杨酸的研究,得到了两株产酸较稳定的菌株,鉴定为*Pseudomonas ovalis* AS1.593和*Ps. aeruginosa* AS1.860。在适宜的条件下AS1.860

的产酸量可达 19 g/L, 转化率为耗萘量的 85%。但在 5001 罐发酵中常有杆状噬菌体 SA 侵染。用此噬菌体处理敏感菌, 获得抗噬菌体的产水杨酸的菌株, 其中 B6 菌株在摇瓶和罐发酵中产酸量都不低于原敏感菌株的水平<sup>[50]</sup>。

王大珍等<sup>[56]</sup>研究了 *Candida lipolytica* AS 2.1207 产长链脂肪酸的发酵条件。在含重液体石蜡 15%(V/V) 的培养基中发酵 4 d, 长链脂肪酸产量为 13 g/L~14 g/L。其组分主要为同碳数的 C<sub>13-18</sub> 酸, 其中 C<sub>16-18</sub> 酸占总酸量的 80% 以上, 不饱和酸占总酸的 80%, 以 C<sub>17=1</sub> 含量最高。该菌经 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线照射诱变, 得到 As2.1399<sup>[57]</sup>, 产酸稳定。长链脂肪酸组分与亲株基本相同, 而产量为 21 g/L, 平均提高 51%。对培养在烃基质上的 *C. lipolytica* AS 2.1207 的超薄切片观察表明, 细胞壁表面和细胞质膜部位有电子致密层, 特别是质膜部位形成指状突起式增厚及胞饮小囊(pinocytotic vesicles)。在胞内有丰富的电子透明内含物<sup>[58]</sup>。这些都是烃基质培养的微生物所特有的。他们还用 *C. lipolytica* AS2.1207 利用烷烃生成菌体和发酵液, 再用生成物作为碳氮源发酵产生多氧菌素的二步发酵法<sup>[59]</sup>。发酵液中多氧菌素效价达 6500  $\gamma$ /mL~6800  $\gamma$ /mL, 最高达 8600  $\gamma$ /mL。

上世纪六十年代初, 方心芳先生亲自倡导并参加具体工作的烃代谢组, 在烷烃代谢途径和长链二元酸的生产方面作了大量工作, 取得了突出成就和经济、社会效益, 其他同事将详述及此; 微生物防治原油及其制品污染环境的工作也会有人述及, 本文从略。

## 4 油田微生物与提高采油量

1955 年, 根据我国电工部与前苏联和东欧六国签订的科技合作协议, 时任 Greifswald 大学微生物研究所所长的 Schwartz W 教授来华。他提出愿意为我们培养两位从事地质微生物和霉菌微生物的人员。组织上决定由我和吕人豪前往进修, 于 1958 年元月初到该所。Schwartz W 教授让我研究石油微生物, 先作细菌勘探三个月, 接着进行油层微生物活动的基础研究。

布加勒斯特会议, 中苏关系紧张, 我们于 1960 年底奉调回国。回所后仍作细菌勘探, 并于 1961 年底建成油田微生物研究课题组, 开展调查和研究。

### 4.1 油层微生物区系和杀菌、解堵、增注

油层微生物活动规律的研究是油田微生物学的基础。阐明其活动规律就有可能想办法加速其有益活动、或预测油田开发时对其活动的意义估计不足而可能引起的有害后果, 拟订出控制措施, 从而兴利除害、为国民经济建设服务。

在 50 年代, Knösel 和 Schwartz<sup>[60]</sup>报道, 分离自某一钻井中的纯菌株对该井原油具有专一的适应性, 不能在任一其它钻井中生存。大部分加入原油内的由异井油或其它油田中分出的菌株在短期内即行死亡。把各种营养物加入原油内能促进微生物的活动。此时, 加入水、氮化物或无机培养液

能引起原油内菌含量增加; 在个别情况下, 通气也有作用。这些现象是值得注意的, 因为许多研究工作者正在探讨利用微生物提高采油的途径, 例如把有效的细菌注入油层内。如果上述现象是普遍存在的, 就会对此工作增加很大的困难。另一方面, 如果油藏内存在着适宜的菌类, 也可以通过加入营养物活化油层内菌类的活动, 从而提高采油。因此, 我们对此问题继续进行了探讨。

工作分两个部分。一部分是将分离自西德 Höhenassel 油田不同油井样品中的细菌和酵母菌株返接到该油田的不同井油中, 在附加各种营养物的试验室条件下测定其发育强度的变化<sup>[61]</sup>。另一部分是将我所保藏的和从土壤或海水中分离的菌株接入到分别加有水或蛋白胨的玉门老君庙油田的井油中, 定期测定其菌量变化, 以探索在石油工业中利用非油田菌株的可能性。无论在油田菌株, 还是在非油田菌株均未发现它们对井油具有专一性, 而它们的存活情况却是多样的。例如, 从 H31 井油中分离出的 *Mycobacterium* sp. H58、31、Plb, 无论在本源井油和异井油中, 还是在异油田原油中, 当加有蛋白胨或 KNO<sub>3</sub> 时, 至 110 d 均仍处在增殖状态。分离自井油 H31 的 *Mycobact.* sp. H58、31、Pla, 在分离出 5 d 后接入本源井油中至 110 d 生长良好; 在分离出 150 d 后却失去了在本源井油中存活的能力。在加入营养物中, 以蛋白胨、酵母膏(对酵母菌, 2%)或 KNO<sub>3</sub> 的效果较好。同一菌株在不同井油中的发育状况不同, 可能是井油成分的异质性造成的。不同菌株在同一井油中的存活有差异, 可能反映着它们的生理、生化特性有异; 能在原油中存活的菌株至少能抵抗原油中的有毒物质, 不具备这种能力的菌株, 无论是油田的, 还是非油田的, 接入原油中短期即死亡。在原油中发育良好的菌株多半都具有利用原油中某些组分的能力。向原油中加入一些营养物可以活化其中存在的细菌活动。一些非油田菌株可以长期在原油中存在为扩大提高采油用的菌株来源提供了依据。

同时, 我们选择了一株能在原油中生存的 *Serratia marcescens* AS 1.203 作为指示剂测定了钻井泥浆渗入岩心的深度, 以保证油层岩心微生物学分析结果的可靠性。比较用两种方法加入指示菌的效果, 表明钻井过程中加入带指示菌的泥浆法比把它套入取心筒中的方法更有效。通过对取自深度 418 m~856 m 的 46 块岩心的检查结果发现, 有裂隙、松散和破碎的岩心不适合于微生物学分析和某些地质项目上的分析。细菌渗入岩心的深度决定于岩心的岩性、胶结度、裂隙度以及机械破坏的程度, 而与取心深度无关。对于完整的岩心, 指示菌侵入岩心的深度波动在 0.2 cm~2.5 cm 的范围内, 除去岩心外层 2.5 cm~3.0 cm 即可得到合乎要求的岩样<sup>[62]</sup>。用这种方法处理后, 在老君庙油田 46 块岩心(第三系, 深度 435 m~812 m)中检查出有腐生菌、反硝化细菌和液体石蜡分解菌。在少数岩心中发现脂肪分解菌和硫酸盐还原菌。讨论了细菌的分布与岩心含油饱和度、孔隙度和渗透率

的关系<sup>[63]</sup>。

玉门油区三个油田油-水样品(47个:鸭儿峡油田17个,石油沟油田15个,白杨河油田13个)的微生物分析结果指出,从深度253 m~2880 m的油层中广泛地存在着硫酸盐还原菌、液体石蜡分解菌、反硝化细菌和腐生菌。非油区(青草湾)和水样(3个)中菌量极少,未发现硫酸盐还原菌。讨论了细菌的分布与原油含水量和矿藏水交替程度的关系。根据微生物的分析结果和水化资料的对比,对该区一些水文地质问题作了推论,并且指出,应该对注水采油后微生物活动强化造成的问题给予足够的注意<sup>[64]</sup>。迄今,玉门油区仍然是我国各油田中微生物资料最完整的地区。通过这些工作,结束了我国油田缺乏微生物资料的历史,逐渐奠定了我国油田微生物学发展的基础。

在油田开发中,注水是普遍应用的采油方法(二次采抽)。注水会导致油层微生物活动的强化。在注水早的老君庙油田,油层水原属氯化钙型,矿化度高, $\text{SO}_4^{2-}$ 含量0.01~4.96当量%。L层温度20°C~36°C。含油岩心中存在有腐生菌、反硝化细菌、液体石蜡分解菌、硫酸盐还原菌和脂肪分解菌<sup>[65]</sup>。注水井排出液的pH为6.0~8.0。注入的淡水(豆腐台泉水)带进一些细菌和 $\text{SO}_4^{2-}$ 到油层中,并把地层水冲淡,导致微生物活动强度提高,引起地层堵塞和设备腐蚀。我们对水源、输水管线和注水井的排出液进行了微生物学分析。结果表明,菌量随输水管线的延长有所增加,在注水井近井底带形成了活泼发育的微生物群落,由烃氧化菌和硫酸盐还原菌所组成。排出液中硫酸盐还原菌菌数高达几十万到几千万/mL。 $\text{H}_2\text{S}$ 含量最高达到91.3 mg/L~136.4 mg/L。根据14口注水井次的分析结果,计算出细菌活泼发育带位于井底周围6.8 m~9.4 m范围内<sup>[66]</sup>。

在注水晚的胜利油田,地层水原来不含 $\text{SO}_4^{2-}$ ,温度高达70°C~80°C,显然是限制细菌在其中发育的重要因子。用含 $\text{SO}_4^{2-}$ 的黄河水作注水水源。注水时,井底温度52°C~66°C。在取样时,排出水的温度为26.5°C~42.0°C,依注水时间的长短和注水量的大小而定。微生物学和水化学分析指出<sup>[67,68]</sup>,注水井排出水中硫酸盐还原菌最高达到 $10^3\sim10^6$ /mL, $\text{H}_2\text{S}$ 含量为0.62 mg/L~10.12 mg/L。细菌活泼发育带位于2.4 m~2.7 m范围内。得到的硫酸盐还原菌混合培养物在30°C、45°C、55°C和65°C下生长的百分比依次为100、97.4、26.3和10.5,未发现严格嗜热菌。

拟定了杀菌、增注并防腐的综合处理工艺<sup>[69,70]</sup>。用该工艺处理了35口注水井,证明了它的适用性和有效性:处理后,注水井井口压力降低、注水量增加、稳定注水期延长。该工艺成功率高(>90%),施工费低,经济效益显著,工艺简便易行,药剂货源充足。1964~1985年在老君庙油田应用,共增加注水量39604吨,按7吨水增1吨油计,共增油5658吨。

1996年,我所提出申请,报中科院外事局、经国家科委

欧亚处批准,将油层微生物区系研究与应用列为中俄科技合作No.960491030。在辽河油田取两口注水井样及其对应的四口采油井油——水样。在注水井109和482水样中发现有腐生菌、烃氧化菌、发酵葡萄糖+蛋白胨的细菌和硫酸还原菌以及利用乙酸或 $\text{H}_2\text{CO}_3$ 的产甲烷菌;在采油井的大部分油水样中,亦存在着上述菌群。测定了地层水中微生物过程的速度。综合微生物学和地化的分析结果,认为高温、稠油油层适于进行单井吞吐和清洗井筒的微生物提高采油技术<sup>[71]</sup>。在大庆油田6区也作了同样的调研。分离出20多株好氧菌。根据16S rRNA序列分析,它们分别鉴别为:*Kocuria rosea*、*Dietzia maris*、*Brevibacillus parabrevis*、*Cellulomonas cellulans*、*Bacillus licheniformis*、*Rhodococcus ruber*、*Gordonia rubropenninctus*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Clavibacter michiganensis*、*Pseudomonas* sp.和*Acinetobacter calcoeceticus*。微生物群的高活性和多样性表明,大庆油田六区适于应用原地层微生物提高采油技术<sup>[72]</sup>。三方签订了合作协议,因大庆油田六区支付资金不足,未能投入现场应用。

此处也要提到,燃料油贮存过程中微生物的存在和繁殖,不仅影响油品的性质和贮油设备,而且可能是引起飞行事故的原因之一。1979年,我所受解放军总后勤部委托,在我国首先从八个大型燃料贮罐中取得航空煤油样20个、灯用煤油样6个、柴油样9个、汽油样14个。在22个纯油样中只有4个发现了个别细菌和真菌。在25个罐底油、油-水、水或微含水和淤渣的样品中,有16个样品微生物数量较多,细菌最高达 $2.7\times10^7$ /mL,真菌最高达 $8.0\times10^4$ /mL。在少数样品中有液体石蜡氧化菌、硫酸盐还原菌和铁细菌。煤油和柴油比汽油更容易受到微生物的污染。发现了两株典型的航空煤油污染菌:*Cladosporium resinae* 973-26-1和922-23-2-1。还有*Fusarium solani*、*Penicillium waksmanii*、*Aspergillus versicolor*和*Asp. nidulans*。细菌分别属于*Corynebacterium*、*Arthrobacter*、*Alcaligenes*和*Pseudomonas*。证明了可给态氮的缺乏是限制微生物发育的因子,而避免水和其它杂质的污染对于防止微生物的破坏作用是很重要的<sup>[73]</sup>。后来还为首都机场等培训了微生物分析人员。

#### 4.2 生物聚合物和生物表面活性剂

在油田开发中需应用各种制剂。由于生物制剂可被分解,无污染环境之虞,在其它工业中也有广泛应用。微生物胞外多糖在上世纪六十年代即成为新的发酵产品投入市场,微生物表面活性剂也有品种投产,并正在发展。

##### a) 生物聚合物

已投产的几种多糖是以碳水化合物为底物生产的。在上世纪60年代中期,我们与玉门油田协作,用*Leuconostoc mesenteroides*发酵糖蜜生产右旋糖酐作为注入水的稠化剂提高采油。研究了发酵条件、采油模拟试验,并在5吨水泥池敞口发酵成功,现场注入了两个井组。在滴油不产的油井

中只见到油花。因文化大革命, 现场试验被迫中止。

石油工业对产品的需求量很大, 为了避免与民争食, 我们从 70 年代初即开展了以原油及其制品生产多糖的研究。当时, 国外文献中虽有一些用正烷烃为碳源生产多糖的报道, 但至今未见到生产和应用。

我们从 120 多个油污土壤和水样中分离出 740 多株菌, 从中筛选出几株以原油或其馏份产生多糖的细菌菌株。已鉴定出一个新种 *Brevibacterium viscogenes* n. sp. 74-230<sup>[70]</sup>、一株 *Corynebacterium flavoaurantiacum* D 9004<sup>[71]</sup> 和一株石油正反应细菌 437<sup>[74]</sup>。我所和南开大学生物系也报道了一个新种 *C. gummiferum* n. sp. S114<sup>[75]</sup>。研究了产粘短杆菌 74-230 和菌株 437 生产多糖的适宜条件。菌株 437 在适宜条件下, 正十六碳烷加量 2.5%~3.0%, 发酵 10 d, 用乙醇沉淀可得到多糖 11 g/L~13 g/L。产粘短杆菌 74-230 在适宜条件下发酵 4 d, 由原油(12%, W/V)产生多 8.0 g/L<sup>[76-78]</sup>; 由重液体石蜡(4%, V/V)产生多糖 12 g/L 以上, 对重液体石蜡的转化率在 40% 以上<sup>[79]</sup>。

D9004 多糖和 74-230 多糖的理化性质与文献中已记载的多糖不同, 是两种新多糖<sup>[80,81]</sup>。菌株 74-230 可以利用 C<sub>11</sub>-C<sub>22</sub> 的正-链烷合成多糖, 而以 C<sub>12</sub>-C<sub>19</sub> 较好, C<sub>16</sub> 和 C<sub>18</sub> 最好, 含奇数 C 的链烷均比其相邻的偶数 C 链烷差些。大庆 区的原油适于作为形成胞外多糖的底物是由于它的 C<sub>12</sub>-C<sub>19</sub> 的正-链烷含量高于其它原油所致<sup>[75,76]</sup>。该多糖也可以用作钻井泥浆的添加剂<sup>[82]</sup>。我们对微生物胞外多糖的研究证实了使用原油或烃类为底物行工业生产的可行性。产粘短杆菌 74-230 多糖至今仍是国内外第一个用烃类生产的具有潜在应用价值的新多糖, 并具有取之于油、用之于油的优点。

随着我国农业的发展, 以碳水化合物为底物发酵生产黄单胞菌胶(xanthan gum 亦译黄原胶)的研究开发在我所也开展起来, 并列入七五国家科技攻关项目。我们从有黑色病斑的萝卜中, 分离出几十株菌, 从中选出一株 L4, 鉴定为 *Xanthomonas campestris* L4<sup>[83]</sup>。研究了该菌的发酵条件<sup>[84]</sup>, 进行了 2 t 和 20 t 发酵罐的中试<sup>[85,86]</sup>。在 20 t 罐中以蔗糖为底物, 发酵 72 h, 发酵液粘度达到 7000 cp~9500 cp, 产物对底物的转化率平均达到 61.6%。对该多糖也作了物理和化学分析<sup>[87,88]</sup>, 进行了渗流力学及其交联凝胶置换原油的模型试验, 得到了良好的结果<sup>[89]</sup>。准备建厂投产, 受资金难落实等的影响未能实现。

在此基础上发展出一种人工混合产粘短杆菌 L5(利用烃类或原油)和野油菜黄单胞菌(利用淀粉)利用混合底物(淀粉: 液体石蜡(1:1, W/W)生产多糖的新工艺。在 2 t 发酵罐中发酵 72 h, 发酵液粘度达到 10000 mPa.s 以上, 从 40 g/L 底物中得多糖 22 g/L, 产物对底物的转化率超过 55%。发酵液的流变性与其单菌分别生产的多糖溶液的相当<sup>[90]</sup>。那淑敏等报道了出芽短梗霉产生无色胞外多糖的菌株产生的多糖分子量  $2 \times 10^4$ , 仍为普鲁兰型多糖<sup>[91]</sup>。

我们在和胜利油田、华东石油学院协作时发现, *Pseudomonas aeruginosa* YA144 以原油或液体石蜡为碳源的发酵液具有加热稠化的特性。发酵液用乙二醇或尿素法提取, 得到的产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测出糖蛋白。该产物水解后检测, 含有氨基糖、葡萄糖、甘露糖、蛋白质和 DNA 等。用此发酵液作为堵水剂, 在室内非均质平面模型中进行试验。先注水驱油至含水 95% 以上, 改注 YA144 发酵液至 5% 孔隙体积。模型放置于 60°C 下 1 h~4 h, 使 YA 144 发酵液稠化, 继之以水驱。资料表明, 注入的发酵液稠化后, 使注水压力升高, 采出液的含水量下降、含油量增加。当含水量达到 95% 以上时, 再用 YA 144 发酵液作第二次封堵, 又可使采油量提高 20% 左右。

#### b) 生物表面活性剂

氧化烃类的微生物通常都多少具有形成表面活性物质的能力。我们在 70 年代初与胜利油田协作研究微生物对原油的利用时, 分离、筛选到一些发酵原油形成“活性油沫”的菌株。其中有两株诺卡氏菌: 4B105G 和 4-13。它们形成的“活性油沫”具有使稠油降粘的能力。营 12-21 井的稠油粘度在 50°C 时为 2344 cst。加入表面活性剂 44111% 和 0.1%, 该油的粘度分别降低到 10.6 cst 和 53.6 cst。菌株 4-13 的“活性油沫”与稠油之比为 1:2 和 1:5 时, 稠油粘度分别降到 25.9 cst 和 34.6 cst。菌株 4B105G 的“活性油沫”与稠油之比为 1:1 和 1:2 时, 稠油粘度分别降到 12.0 cst 和 40.6 cst。当以 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 为氮源时, 这两株菌不形成“活性油沫”或形成的质量差。只有在以 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 为氮源时, 它们才形成质量好的“活性油沫”。介质的 pH 对“活性油沫”的降粘性能发生显著的影响。菌株 4-13 在 501 罐发酵过程中形成“活性油沫”的降粘能力随发酵时间而增加。

与此同时, 我们用华东 122 阳离子交换树脂从 *Corynebacterium glycinophilum* H255 发酵原油的乳化液中提取出一种水溶性的棕褐色物质 0.15 g/L~0.24 g/L。其红外图谱与联邦德国 Grunau 化工厂的一种蛋白浓缩物乳化剂和已知的几种肽脂乳化剂相似, 但不含脂肪酸和糖类。其氨基酸组份为: 亮氨酸、丝氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、赖氨酸和缬氨酸<sup>[92]</sup>。陈远童曾报道了热带假丝酵母 U<sub>3-21</sub> 产生乳化剂的条件<sup>[93,94]</sup>。他们指出, 该菌利用 C<sub>14-16</sub> 的正链烷产乳化剂多, 但不能利用 C<sub>9-11</sub> 的正链烷。其最适 pH 为 4, 最适温度 28°C。加入 0.15% 蔗糖促进乳化剂的产生和菌体生长。加入葡萄糖和果糖则有抑制作用。

我们从 52 株(7 种)青霉中选出 6 株(*P. spiculisporum* 4 株, *P. purpurogenum* 2 株)能产生刺孢青霉酸的菌株, 其中以 *P. spiculisporum* 44 产酸量最高。确定了该菌产酸的适宜条件。在摇床培养中, 该酸的产量在 40 g/L 以上, 它对煤油的表面张力( $8.765 \times 10^{-3}$  mol/L)和界面张力分别为 38.1 mNm 和 6.68 mNm<sup>[95]</sup>。还分离筛选到一株利用 n-十六碳烷产糖脂的菌株 B126, 鉴定为一新种: *Caseobacter paraffinicum* n. sp. B126,



确定了该菌产糖脂的适宜条件。在 200 r/min、30°C 的摇床上发酵 50 h~60 h, 培养液对 n-十六碳烷的表面张力和界面张力分别为 33 mN/m 和 1 mN/m~3 mN/m。糖脂的得率为 3.7 g/L, n-十六碳烷的转化率为 48%<sup>[96]</sup>还对该菌产生的糖脂进行了理化分析<sup>[97,98]</sup>。

## 5 微生物提高采油的现场应用

微生物提高采油的原理是把油层作为像发酵罐那样的巨大反应器, 直接利用微生物在油层中的生命活动及其代谢产物提高采油; 或是在地面用微生物生产特定的对采油有用的产物(微生物聚合物或表面活性剂), 像用化学驱油剂那样注入到油层中达到提高采油的目的。前者称为地下法, 后者称为地表法。微生物地下采油法与一些物理或化学采油法相比较, 具有工艺简单、成本低廉、有效期长、效果良好等优点。当用常规方法无法采出石油时, 将是微生物地下采油法大显身手的时机。

玉门油田是我国石油工业的摇篮, 也是油田微生物的开拓地之一。微生物提高采油的首次地下试验即是在老君庙油藏进行的。

我所与玉门油田、大庆油田等单位合作, 完成了六五、七五和八五国家科技攻关项目确定的任务。其中之一是微生物地下发酵提高采油。因此, 我国第二次微生物采油的油田应用是在大庆油田东区进行的。我们从 86 个环境样品中选出三个高集培养物(5GA、26A 和 6A), 它们在原油存在下 45°C 能厌氧生长并发酵糖密产生气体和有机酸。在室内模拟试验中评价了它们的产气量依次分别为 8 PV, 15 PV 和 6 PV; 提高采油约为饱和油量的 7%, 注水后残余油量的 34.6%、20.1% 和 21.6%, 将 5GA(*Bacterioides*) 与大庆的菌株配伍, 于 1990 年 6 月~7 月采用单井吞吐刺激工艺, 在大庆中区注了两口井 E5-J18 油井和 E6-J22 油井, 关井 40 d 后恢复采油。观察到排水量界面张力的降低, 有机酸含量产气量和采油量的提高; E6-J22 和 E5J-18 的持续期依次为 8 个月和 18 个月。这两口井共增原油 1800 t, 增产 CO<sub>2</sub> 50000 m<sup>3</sup>。

在此工艺中需要检测注入的外源菌确实在油层中存活并发挥作用。我们提出了从注入井中分离细菌的形态和生理特性对比的方法进行检测给予了相吻合的结果。而这种方法在以往的文献中几乎是找不到的<sup>[99]</sup>。

我们还受胜利油田地质科学研究所的委托, 调查分析了该油区 9 个区块 34 个油水和土壤样品中 4 个生理菌群的分布及其对原油的氧化利用。腐生菌在其中普遍存在, 液体石蜡氧化菌和硫酸盐还原菌只在 8 个样品中发现, 但菌量都在  $\chi \times 10^0$ /mL 左右。液体石蜡氧化菌分属于 12 个属。将从中分纯的菌株以单菌或混合培养的形式接种到以原油为碳源的培养基中 30°C 摇床培养, 最长达 90 d。用色质计算机联用仪对原油的烃组分进行检测, 结果表明, 5 d~10 d

即消耗了原油中绝大部分正构烷烃, 稍后是类异戊二烯烃, 残余烃为甾烷和萜烷, 与文献中的报道相同。

在“九五”期间, 我所于 1991 年与吉林油田扶余采油三场签订合同, 在该采油厂应用生物单井吞吐提高采油。从该油采集了 80 个土样和水样进行高集培养, 从中选出了能在 30°C 和加原油的条件厌氧发酵糖产生气体和有机酸的高富集培养物 48, 它至少包括属于 *Eubacterium*, *Fusobacterium* 和 *Bacterioides* 的 4 种的细菌, 在室内模拟试验中可提高采油达水驱残余油量的 53.7%<sup>[100]</sup>。从 1992 年 6 月至 1995 年 5 月底, 共施工了 86 口井(后来又加了 11 口井)。菌液注入后关井 20 d~30 d 恢复生产。排出液在处理前未检出产酸产气菌, 若检出也只有  $x \times 10^0$ /mL。处理后, 对从中分离出的细菌形态和重要生理生化特性的测定, 表明它们与注入的外源菌是同一的。从而证明富集培养物 48 可适应油层环境, 在该生态系统中自我复制, 为 MEOR 扩大了菌种来源。油井注入后恢复生产, 观察到井的套压上升, 气体中 CO<sub>2</sub> 含量提高, 排出水的 pH 下降; 日产量增加, 含水量下降产油量提高。据 44 口井的统计, 处理前, 单井日产油 0.1 t~1.5 t, 平均 0.64 t; 处理后日增产油 0.2 t~4.4 t, 平均 1.23 t, 增产幅度为 33.3%~733.3%, 平均提高了 204%。在原油地面粘度超过 30 Mpa.s 的 5 口较稠油井和 7 口有结垢井史的油井中也得到了明显的增产效果。在这 86 口井(至 1995 年 5 月底)中有 18 口无效, 见效井数为 68 口, 微生物处理的有效率为 79%, 已增产油 15375.4 t, 平均单井增产油 178.8 t。达到当时国际先进水平<sup>[101]</sup>。

我所的 MEOR 研究和应用受到国际同行的关注。从 1982~1995 年, 由美国主办的 MEOR 国际会议均邀请我所参加, 并作大会报告共 6 次。我国成为国际上第五个将 MEOR 成功应用于油田的国家。

我退休后, 我所薛燕芬等参加了“十五”国家科技攻关“极端微生物 MEOR 课题”和 2006 年以后的中科院知识创新项目和中石化项目有关 MEOR 的研究课题, 发表了两篇论文。应用 T-RFLP(末端限制性片段长度多态性)技术分析和比较了胜利油田 12 区的一口注水井(S12-zhu)和三口采油井(S12-4, S12-5 和 S12-19)的油藏微生物多样性<sup>[102]</sup>。T-RFLP 图谱的多样性指数表明, 注入水样品具有更丰富的细菌和古菌多样性。相似性指数表明, 样品间细菌群落结构的相似性介于 22.4%~30.8% 之间; 古菌群落结构的相似性介于 20.8%~34.5% 之间。查询 RDP 数据库推测, 这 4 个油藏样品所共有的优势微生物可能属于 *Pseudomonas* 和 *Marinobacter* 属及产甲烷菌。从而表明, 该技术可以为 MEOR 提供有用的信息。另一篇论文<sup>[103]</sup>报道了应用多相分类法鉴定了一株分离大庆油田产油井的放线菌 HD321, 命名为 *Gordonia parafinivorans* nov. sp.

前已述及, 我所与俄罗斯科学院微生物研究所及大庆



油田六区合作开展MEOR现场应用的协议因资金问题而搁浅。江汉石油学院约我邀请俄方商谈合作, 双方达成了协议。中石油将此项目批给大港油田主导执行。该油田共在港东二区七断块、孔二北断块和大港三区断块共 17 口注水井和 35 口采油井进行了MEOR区块注入的矿场应用<sup>[104,105]</sup>。据悉, 共计增产原油达四万吨之多。

综上所述, 我所是我国石油微生物学的开拓者。文革前参加这项工作的同事, 当时背着行李, 带着仪器、设备奔赴石油部、地质部的协作单位进行传播和工作, 得到各级领导和同事们的理解和支持, 与协作的同事同吃、同住、同劳动。他们爬山涉水、风餐露宿、忍饥挨饿。搞勘探还得每天用锹挖三公尺的坑 3~4 个取样; 搞采油的, 则与修井队的同事一起, 每逢井喷, 从头到脚满身油污, 爬到沙地上一滚, 爬起来再干; 有的在运动中受到冲击和批判。在我所也流传过“勘探, 勘探, 一辈子白干”“采油, 采油, 一辈子发愁”的口头禅, 大部分同事仍无怨无悔, 坚持完成任务。

在此, 对我尊敬的导师, Schwartz W 教授的感激之情油然而生。在我 1996 年访问德国时, Braunschweig 工业大学微生物研究所的科技负责人陪同我去看望他, 他身体已极度虚弱, 卧床不起, 听到我们进房即微微睁眼, 用很弱颤动的声音说: “王, 您来了。还作油田微生物学的工作吗? 要坚持下去。”一个外国人毫无自私自利之心地关怀着石油微生物学在中国的发展, 深深地打动了, 眼泪不由自主地往下淌。陪我的那位教授说: 你们师生友谊之情竟然这么深厚! 我虽已退休, 步入耄耋之年, 且正与病魔作斗争, 仍然在这条路上矢志不移, 以尽微薄之力为乐。还要感谢石油和地质系统的各位领导和同事们在我们工作中给予的支持和关爱。殷切希望在科研生产密切结合的大潮中, 一些同事进一步发扬一盘棋的优良作风, 诚信、踏实、和谐地为了一个共同的目标而奋斗不息。

致谢: 我已患癌症十三年, 近日又入住北京肿瘤医院。喜逢所庆, 遵所所嘱, 欣然命笔, 激情满怀, 撰写此文。拙文所涉事件和人员较多, 且犬牙交错, 难以理清。我尽其所能, 不妥之处, 请知之者不吝赐教。在此过程中, 所史办公室大力支持, 程光胜教授在成文过程中提供一些资料与宝贵意见, 并做修改, 孙滔进行打印, 谨致诚挚的谢意。

## 参 考 文 献

- [1] Miyoshi M. Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrb Wiss Botan*, 1895, **28**: 269–289.
- [2] Шейко В. Опыт бактериологического исследования нефти. *Нефтяное Дело*, 1901, **7**: 401.
- [3] Гинзбург-Карагичева Т. Л. Микробиологическое исследование серносоленых вод Апшерона. *Азерб Нефть Хоз-во*, 1926, **6**: 30–39.
- [4] Bastin E. The presence of sulfate-reducing bacteria in oil field waters. *Science*, 1926, **63**: 21–24.
- [5] Beckmann JW. Action of bacteria on mineral oil. *Ind Eng Chem News*, 1926, Ed. **4**(Nov. 10): 3.
- [6] ZoBell CE. Bacteriological: process for treatment of fluid-bearing earth formations. US Patent 2, 413, 278. 1946.
- [7] Söhngen NL. Über Bakterien welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Ztbl Bakt*, Abt. II, 1906, **15**: 513–517.
- [8] Kaserer H. Über die Oxydation des Wasserstoffes und des Mathan durch Mikroorganismen. *Ztbl Bakt*, Abt. II, 1906, **15**: 573.
- [9] 莫吉列夫斯基等著. 王修垣译, 张树政校. 微生物学在油气藏勘探中的应用. 北京: 科学出版社, 1958.
- [10] 库兹涅佐夫等著. 王修垣译. 地质微生物学导论. 北京: 科学出版社, 1966.
- [11] Blan LW. Process for locating valuable subterranean deposits. US Patent No2, 269, 1942.
- [12] Chakrabarty AM. Which way genetic engineering? “Recent trends in genetic engineering and its potential applications”. *Industrial Pesearch*, 1976, **18**(1): 45–50.
- [13] Hitzman DC, Tucker JD, Heppard PD. Offshore Trinidad survey identifies hydrocarbon microseepage: 26th Annual Offshore Technology Conference, OTC 7378, Houston, Texas, 1994.
- [14] Wagner M, Priske J, Smit R. Case Histories of Microbial Prospection for Oil a. Gas, Onshore a. Offshore in Northwest Europe. In D. Schumacher a L.A. Leschack, eds, AAPG Studies in Geology No.48 a. SPG Gaophysical References Series 2002, **11**: 453–479.
- [15] Wang Xiu-yuan. Oil field microbiology in China. China-Japan Joint Symposium on Applied Microbiology. Jun. 29-31, 1986, pp.29-30.
- [16] 淡家麟, 曾若恍, 张厚恩. 石油微生物的分离. *科学通报*, 1957, **3**: 90–91.
- [17] 张恺民, 赵志荣. 乙烷氧化菌的研究. *微生物学报*, 1964, **10**(2): 149–156.
- [18] 中国科学院微生物研究所地质微生物研究室. 微生物勘探石油和天然气操作法. *微生物*, 1960, **2**(3): 97–103.
- [19] 中国科学院微生物研究所地质微生物研究室. 石油微生物区系调查法. *微生物*, 1960, **2**(2): 83–93.
- [20] 牟川静, 高鸿图, 李月英, 等. 毕赤氏酵母新种——嗜石油毕赤氏酵母D<sub>3</sub>. *微生物学报*, 1979, **19**(3): 259–264.
- [21] 高鸿图, 牟川静, 李仁和, 等. 一株新的石油脱蜡酵母——脱蜡球拟酵母及其发酵性能. *微生物学报*, 1979, **19**(4): 370–374.
- [22] 凌代文, 王大耜, 高鸿图, 等. 棒杆菌属的两个新种. *微生物学报*, 1982, **22**(3): 197–206.
- [23] 梅博文, 袁志华, 王修垣. 油气微生物勘探法. *中国石油勘探*, 2002, **7**(3): 42–53.
- [24] 袁志华, 梅博文, 余跃惠. 二连盆地马尼特坳陷油气微生物勘探. *石油勘探与开发*, 2002, **29**(3): 64–65.
- [25] 袁志华, 梅博文, 余跃惠, 等. 石油微生物勘探技术在西柳地区的应用. *石油学报*, 2002, **23**(6): 29–31.
- [26] 王大珍. 微生物在有机质转化中的地质作用. *青海湖综合*

- 考察报告. 北京: 科学出版社, 1979, pp.223-264.
- [27] 陈子英, 曹家骥, 尹光琳, 等. 甲烷氧化菌混合菌株的研究, 混合菌株中非甲烷氧化菌的种类与特征. 微生物学通报, 1981, 8(1): 7-9.
- [28] 陈子英, 曹家骥, 尹光琳, 等. 甲烷氧化菌混合菌株的研究, 甲烷氧化菌混合菌株的胞外多糖. 微生物学通报, 1984, 11(1): 15-17.
- [29] 陈子英, 梁家骥, 张凤英. 一属罕见的细菌——多孢子菌属. 微生物学报, 1980, 20(4): 339-344.
- [30] 梁家骥, 陈子英. 一个以孢子繁殖的细菌新属. 微生物学报, 1983, 23(3): 193-196.
- [31] 陈子英, 梁家骥, 张凤英. 多孢子菌的一个新种. 微生物学报, 1983, 23(1): 1-5.
- [32] Chen Ziyang, Liang Jiayuan, Zhang Fengying. Two new species of Polysporobacterium isolated from China. International Congress of Microbiology. Boston, USA, Aug.1982.
- [33] 梁家骥. 多孢子菌属的一新种. 微生物学论文集. 北京: 科学出版社, 1985, pp.21-25.
- [34] 梁家骥, 张凤英, 陈子英. 多孢子菌的超微结构观察. 微生物学通报, 1983, 10(1): 22-23.
- [35] 梁家骥, 程光胜, 陈子英. 自沼气池中分离的一株甲烷利用菌. 微生物学报, 1987, 27(1): 6-9.
- [36] 梁家骥, 程光胜, 陈子英. 厌氧消化器中的甲烷氧化菌. 微生物学通报, 1989, 16(4): 211-214.
- [37] 梁家骥, 苏红军, 程光胜. 产己酸细菌研究, 产己酸细菌与产甲烷菌的混合培养. 微生物学通报, 1996, 23(5): 262-263.
- [38] 程光胜, 屠雄海, 东秀珠, 等. 厌氧降解丁酸共培养物中产氢产己酸细菌与产甲烷细菌的分离与再组合. 微生物学报, 1995, 35(6): 442-449.
- [39] X Dong, G Cheng, Stams AJM. Butyrate Oxidation by *Syntrophospora bryantii* in co-culture with different methanogens in pure culture with pentenoate as electron Acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42: 647-652.
- [40] 孙征, 周宇光, 东秀珠. 一个甲烷杆菌新种的描述和系统分类学研究. 微生物学报, 2001, 41(3): 265-269.
- [41] 龚革, 王修垣. 九株嗜热产甲烷菌的特性. 微生物学报, 1997, 37(5): 378-384.
- [42] 王修垣, 龚革. 嗜热甲烷杆菌 602B3 与拟杆菌 5G-102 的混合培养. 微生物学报, 1997, 37(4): 286-291.
- [43] 王修垣. 高产烃的丛粒藻研究概况. 微生物学报, 1997, 37(5): 405-409.
- [44] 杨廉婉. 固定化藻类细胞的制备和应用. 微生物学通报, 1989, 16(2): 101-107, 83.
- [45] 杨廉婉, 王修垣. 纱布固定化细胞产烃的研究. 微生物学报, 1989, 29(6): 427-431; Adem appear in *Revue Roumaine: de Chinese*, 1989, 34(1): 397-401.
- [46] 王修垣, 谢树华. 几种因子对丛粒藻株 A 的效应. 微生物学通报, 1996, 23(5): 275-277.
- [47] 王修垣, 赵零, 宋一涛. 几种丛粒藻烃类的气相色谱——质谱分析. 微生物学报, 1996, 36(4): 284-291.
- [48] 田静, 傅妙福, 徐纯锡, 等. 液体石蜡发酵生产琥珀酸的研究, 菌种的筛选和诱变. 微生物学报, 1981, 21(2): 229-233.
- [49] 王世卓, 林应锐, 徐纯锡, 等. 液体石蜡发酵生产琥珀酸的研究, 摇瓶发酵条件的研究. 微生物学报, 1981, 21(4): 494-500.
- [50] 无锡市溶剂厂, 中国科学院微生物研究所反丁烯二酸组. 液体石蜡发酵产生反丁烯二酸, 菌种的筛选和鉴定. 微生物学报, 1975, 15(3): 197-240.
- [51] 无锡市溶剂厂, 中国科学院微生物研究所反丁烯二酸组. 提高液体石蜡发酵产生反丁烯二酸产率的试验. 微生物学通报, 1976, 3(3): 21-22.
- [52] 陈丽琼, 田静, 傅妙福, 等. 液体石蜡发酵产生反丁烯二酸, 发酵条件的研究. 微生物学报, 1975, 15(3): 197-204.
- [53] 杨廉婉, 钟丽婵. 产延胡索酸酶的皱褶假丝酵母固定化细胞. 微生物学报, 1980, 20(3): 296-302.
- [54] 中国科学院微生物所工厂发酵车间. 利用液体石蜡发酵生产  $\alpha$ -酮戊二酸. 微生物学通报, 1976, 3(4): 16-18.
- [55] 法幼华, 徐诗伟, 梁家骥, 等. 微生物氧化萘制取水杨酸. 微生物学报, 1974, 14(1): 113-111.
- [56] 法幼华, 黄淑惠, 梁家骥, 等. 水杨酸生产菌抗噬菌体菌株的选育. 微生物学报, 1981, 21(3): 367-370.
- [57] 王大珍, 谭蓓英, 苏起恒, 等. 石油油脂酵母及其应用研究, 利用油脂酵母发酵正烷烃生产脂肪酸的研究. 微生物学报, 1981, 21(4): 482-488.
- [58] 谭蓓英, 郑文尧, 毛维颖, 等. 石油油脂酵母及其应用研究, 同化正烷烃的高脂酵母的选育, 发酵及其脂类物在矿石浮选上的应用. 微生物学通报, 1981, 8(4): 159-163.
- [59] 王大珍, 苏起恒, 陈延钟, 等. 用石油酵母发酵产生多菌素. 微生物学通报, 1983, 10(5): 208-210.
- [60] D Knösel und W Schwartz. Untersuchungen zur Erdölbakteriologie. Über das Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen im Erdöl. *Arch Mikrobiologie*, 1954, 20: 362-390.
- [61] Wang Hsiu-yü an und W Schwartz. Untersuchungen zur Mikrobiologie des Erdöls und Erdölprodukte. Mikrobiologische Untersuchung eines Ölfeldes. *Zeitschrit. Allg Mikrobiologie*, 1961, 1(3): 223-224.
- [62] 王修垣, 毛桂震. 应用指示菌株测定钻井时泥浆渗入岩心的深度. 微生物学报, 1964, 10(2): 168-174.
- [63] 王修垣, 毕炬新. 老君庙油田油层的微生物区系. 微生物学报, 1964, 10(2): 175-181.
- [64] 王修垣, 毛桂震. 玉门油区油水中微生物区系的分布. 微生物学报, 1965, 11(4): 554-563.
- [65] 王修垣, 毛桂震, 宋沛然, 等. 老君庙油田 L 油层注水时细菌发育的规律. 生态学报, 1981, 1(1): 22-29.
- [66] 王修垣, 周培谨. 胜利油田三区注水层微生物的活动. 生态学报, 1984, 4(2): 128-133.
- [67] Wang Xiu-yuan. Development of bacterial activities in oil reservoirs during waterflooding processes. Preprints of the ACS, Division of Petroleum Chemistry, 1983.
- [68] 王修垣, 毛桂震, 宋沛然. 油田注水层杀菌解堵的综合处理. 微生物学通报, 1982, 9(6): 59-61.
- [69] 周培谨, 王先极. 岩心注水时的杀菌和解堵的研究. 微生

- 物学报, 1983, 10(1): 18-21.
- [70] Nazine TN, Xue Y-F, Wang X-Y, *et al.* Microorganisms of the High-Temperature Liaohe Oil Field of China and their Potential for MEOR. *Resource and Environmental Biotechnology*, 2000, 3(2/3): 149-160.
- [71] Nazine TN, Xue YF, Wang XY, *et al.* Diversity and activity of microorganisms in Hu Daging Oil Field of China and their potential for biotechnological applications. *Resource and Environmental Biotechnology*, 2000, 3(2/3): 161-172.
- [72] Nazine TN, Grygorian AA, Xue YF, *et al.* Physiological and phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria from the Daging Oil Field. *Microbiology* (English translation of *Microbiologia*), 2000, vol. 69.
- [73] 王修垣, 田新玉, 王先极. 燃料油储存过程中的微生物学研究. *生态学报*, 1981, 1(4): 307-314.
- [74] 王修垣, 刘秀芳, 王先极, 等. 由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究, 菌株 74-230 的鉴定. *微生物学报*, 1980, 20(4): 345-350.
- [75] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 南开大学生物系. 产胶棒状杆菌 S114 石油发酵粘多糖的研究, 菌种的鉴定. *微生物学报*, 1979, 19(4): 341-346.
- [76] 王修垣, 俞南雄, 刘秀芳, 等. 由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究, 黄橙色棒状杆菌由原油产生的胞外多糖. *微生物学报*, 1982, 22(1): 71-78.
- [77] Wang Xiuyuan, Schwartz W. Conditions for the exopolysaccharide synthesis from n-he-xadecane by an oil-positive bacterium 437. *J Basic Microbiology*, 1985, 25(3): 213-219.
- [78] 王修垣, 刘秀芳, 史志敬, 等. 由原油及其制品生产细菌胞外多糖的研究, 产粘短杆菌 74-230 合成胞外多糖的适宜培养基. *微生物学报*, 1982, 22(4): 367-372.
- [79] 王修垣, 王传柱. 微生物由原油生产多糖及其在二次采油中可用性的探讨. *石油学报*, 1980, 1(4): 77-85.
- [80] Wang Xiuyuan. A microbial polysaccharide produced from crude oil or liquid paraffin and its application in the petroleum industry. "Proceedings of 1982 International Conference on Microbial Enhancement of Oil Recovery", May 16-21, 1982, Shangri-La, Afton, Oklahoma, U.S. Department of Energy, 1983, pp.29-37.
- [81] 王修垣, 崔文华, 俞南雄. 一种新的微生物胞外多糖. *中国科学(B 辑)*, 1984, 27(9): 799-804; *Scientia Sinica(Series B)*, 1985, 28(2): 139-145.
- [82] 王修垣, 张克勤, 崔文华, 等. 产粘短杆菌多糖作为钻井泥浆添加剂的研究. *石油学报*, 1982, 3(4): 59-69.
- [83] 刘秀芳, 王修垣, 崔文华, 等. 两株黄单胞菌胶产生菌 L4 和 L5 的鉴定. *微生物学报*, 1991, 31(1): 75-81.
- [84] 刘秀芳, 王修垣. 野油菜黄单胞菌 L4 生产黄单胞菌多糖的适宜条件. *微生物学报*, 1993, 33(1): 40-47.
- [85] 王修垣, 崔文华, 刘秀芳. 黄单胞菌多糖发酵中试. *微生物学通报*, 1996, 23(6): 327-328.
- [86] 王修垣, 崔文华, 赵 零. 黄单胞菌多糖 20 吨罐发酵. *微生物学通报*, 1997, 24(1): 7-8.
- [87] 崔文华, 王修垣, 刘秀芳. 黄单胞菌胶 XA5 的气相色谱分析. *分析微生物学(特辑)*. 北京: 科学出版社, 1988, pp.128-131.
- [88] 崔文华, 王修垣. 野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* L4 胞外多糖的理化分析. *微生物学报*, 1990, 30(6): 428-432.
- [89] Wang XY. Advances in research, production and application of biopolymers used for EOR in China. In *Microbial Enhancement of Oil Recovery-Recent Advances*. Ed. By E C Donaldson, 1991, pp.467-481.
- [90] 王修垣, 崔文华, 马延和. 混合菌种用混合底物生产多糖. 专利申请号: 90 1 02115.6.
- [91] 那淑敏, 贾盘兴, 余茂勋. 产无色胞外多糖菌株的筛选及其产物的鉴定. *微生物学通报*, 1990, 17(1): 7-9, 64.
- [92] 王修垣, 田新玉, 宋沛然, 等. 菌株 H255 原油发酵液乳化物质的分析. *微生物学报*, 1982, 22(3): 269-275.
- [93] 陈远童, 庞月川, 方心芳. 酵母细胞转运正烷烃的研究. 热带假丝酵母 U3-21 产乳化剂的条件试验. *微生物学通报*, 1984, 11(2): 61-84.
- [94] 陈远童, 郝秀珍. 酵母细胞转运正烷烃的研究. 糖类对突变菌株 U3-21 的生长、乳化剂和二羧酸产生的影响. *微生物学通报*, 1985, 12(2): 65-67.
- [95] Wang Xiu-yuan, Liu Rui-qin. Spiculisporic acid produced by *Penicillium spiculisporum* 44. *Proceedings of The First International MEOR Workshop*, Apr. 1-3, 1986. Abilene, Texas. U. S. Department of Energy, 1987, pp.188-213.
- [96] 薛燕芬, 王修垣. 石蜡酪杆菌 B126 产生糖脂的适宜条件. *微生物学报*, 1995, 35(6): 465-469.
- [97] 薛燕芬, 王修垣. 石蜡酪杆菌 B126 产生的糖脂的理化性质. *微生物学报*, 1996, 36(2): 121-125.
- [98] 薛燕芬, 王修垣. 用两步展开薄层分析法定性鉴定糖脂. *微生物学报*, 1989, 29(1): 75-77.
- [99] Wang X-Y, Xue Y-F, Xie S-H. Characteristics of Enriched Cultures and Their Application to MEOR Field Tests. In: *MEOR-Recent Advances*. Ed. By E. Premuzic and A. Woodhead, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp.335-348.
- [100] Wang X-Y, Xue Y-F, Dai G, *et al.* Application of Bio-Huff-and-Puff Technology at Jilin Oilfield in the Fifth Intern. Conf. on MEOR and Related Biotechnology for Solving Environ Problems. Eds. By Bryant R and Sublette KL, 1995, pp.115-128.
- [101] Wang X-Y, Dai G, Xue Y-F, *et al.* Characteristics of Enriched Cultures for "Bio-Huff-and Puff" Tests at Jinling Oilfield. In *The Fifth Intern. Conf. on MEOR AND Related Biotechnology for Solving Environ Problems*, eds. By Bryant R and Sublette KL, 1995, pp.407-420.
- [102] 袁三青, 薛燕芬, 高 鹏, 等. T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性. *微生物学报*, 2007, 47(2): 290-294.
- [103] Xue Y-F, Sun X-S, Zhou P-J, *et al.* *Gordonia* isolated from an oil-producing well. *Intern J of Syst And Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 1643-1646.
- [104] 冯庆贤, 杨怀军, Naina TN, 等. 孔店油田本源微生物驱先导试验研究. *石油勘探与开发*, 2005, 32(5): 125-128.
- [105] 冯庆贤, 陈智宇. 耐高温采油微生物的研究与应用. *石油勘探与开发*, 2000, 27(3): 50-52.