

油藏调剖菌 TP-1 的培养条件及岩芯模拟驱油研究

刘 静¹ 王 君¹ 张宏伟² 马 挺¹ 李国强¹ 梁凤来¹ 刘如林^{1*}

(1. 南开大学生命科学学院 天津市微生物功能基因组学重点实验室

分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

(2. 天津出入境检验检疫局 天津 300457)

摘 要: 从油井产出水中分离得到一株兼性厌氧芽孢杆菌 TP-1, 该菌株可在 55℃ 的油藏温度生长, 并代谢产生粘性多糖和气体。经培养条件优化, 发酵液多糖产量可达 5.5 g/L, 产气量为 22 mL/L。低浓度的 CaCl_2 、 MgSO_4 和 AlCl_3 对多糖的生成有促进作用。岩芯模拟试验表明, 该菌的注入可使岩芯压力增加, 提高石油采收率 7.37%。TP-1 是一株性能良好的油藏调剖菌。

关键词: 芽孢杆菌, 多糖, 微生物调剖, 岩芯模拟

Studies on Cultivation and Core Simulated Test of *Bacillus* TP-1 for Microbial Profile Modification

LIU Jing¹ WANG Jun¹ ZHANG Hong-Wei² MA Ting¹ LI Guo-Qiang¹
LIANG Feng-Lai¹ LIU Ru-Lin^{1*}

(1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, The Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Tianjin 300071)

(2. Tianjin Exit-entry Quarantine Bureau, Tianjin 300457)

Abstract: A facultative anaerobic bacterium, *Bacillus* TP-1 isolated from oil field wastewater could produce viscous polysaccharide and gas under oil reservoir condition at 55℃. The polysaccharide can produced 5.5 g/L and the output of gas was 22 mL/L. The viscous polysaccharide production was favorable in the lower concentration of CaCl_2 , MgSO_4 and AlCl_3 . The results of core simulated tests showed that pressure was increased and oil recovery was enhanced by 7.37% after the bacteria injection. TP-1 strain has most of the desirable properties for microbial profile modification.

Keywords: *Bacillus* sp., Polysaccharide, Microbial profile modification, Core simulated test

随着微生物采油技术的不断发展, 微生物调剖技术将成为经济有效的采油方法^[1-3]。把经过筛选的细菌培养液以适当的压力注入油藏高渗区, 加入必要的营养, 通过微生物生长代谢产生的胞外多糖可将地层中游离的大量细菌及其他固形颗粒粘附在孔

隙岩石表面, 形成菌胶团; 随着菌胶团逐渐增长形成了生物膜。即使杀菌剂杀死生物膜中的菌体细胞, 多糖复合物仍可以较长时间存在, 并对孔隙空间起到封堵作用; 同时微生物代谢产生的气体可在多孔介质中形成气锁, 堵塞水流孔隙。由于上述原因, 注

入水的走向将改变, 扩大了注水波及体积, 从而使常规水驱不能涉及的油藏部分可实现注水水驱。微生物由于自身能够在油层内大量繁殖, 并且具有运动的特征, 有助于到达一般化学调剖剂无法涉及的地层进行深部调剖^[4-5]。

本研究室由油井产出水分离到一株可在 55℃ 生长并代谢产生胞外多糖和气体的兼性厌氧菌 TP-1, 经岩芯模拟试验结果表明, 该菌株的注入可封堵高渗透层, 使岩芯压力提高, 能够使注入水由高渗透层转向低渗透层, 增加了注水波及面积, 提高石油采收率, 推测是该菌株代谢产生的多糖和气体所致^[6-7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 飞表盘式旋转粘度计(美国 Brookfield LVT), 高速离心机(德国 Hettich Universal32R), 恒温振荡器(江苏太仓, THZ-22 型); 蔗糖, 葡萄糖, 无水乙醇等生化试剂均为国产分析纯, 购于天津化学试剂厂。

1.1.2 菌种: *Bacillus* sp.TP-1, 为兼性厌氧菌, 在 55℃ 缺氧条件下生长良好, 由本室分离并保藏。

1.1.3 基础发酵培养基: 蔗糖 10.0 g, K_2HPO_4 5.0 g, NaCl 5.0 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g, 酵母粉 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 粘度测定: 采用 LVT 美国 Brookfield 公司博力飞表盘式旋转粘度计, 25℃, 1#转子 6 r/min 测定。

1.2.2 多糖产量的测定^[8]: 取发酵液 50 mL, 8000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇, 得到多糖沉淀, 过滤分离, 60℃ 恒温烘干, 称重。

1.2.3 气体产生量测定: 以 5% 接种量将 TP-1 液体菌种接入装有倒置刻度试管的发酵培养基中, 放置

55℃ 恒温箱培养 14 d, 计产气量。

1.2.4 发酵条件的优化: 根据基础发酵培养基采用单因素试验优化发酵条件, 包括碳源、氮源、磷源、温度、NaCl 以及 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Al^{3+} 等离子体的不同浓度, 以菌体浓度、发酵液的粘度和多糖的产量来确定发酵培养基的组成。摇瓶培养条件: 250 mL 锥形瓶装培养基 100 mL, 8 层纱布封口; 以 5% 接种量将液体菌种接入发酵培养基, 置 120 r/min 油浴摇床 55℃ 培养 5 d。

1.2.5 岩芯调剖模拟试验^[9]: 岩芯采用填砂双渗非均质模型, 将模型抽真空, 饱和地层水, 计算孔隙体积(PV); 然后向模型中饱和原油, 建立束缚水, 测定模型的含油饱和度; 接着用注入水驱替模型中的原油不再出油为止, 计算水驱采油率; 模型中注入 0.5PV 调剖菌 TP-1 及营养物, 在试验温度(55℃)下静置 7 d, 开启模型, 进行后续水驱, 测定采收率。

2 结果与讨论

2.1 碳源对调剖菌生长的影响

在基础发酵培养基中分别添加不同浓度的葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、液体石蜡和原油为碳源, 接种 TP-1 菌, 置 55℃ 油浴培养 5 d; 测定发酵液粘度、多糖量及菌的生长量(表 1)。结果表明, 该菌株以蔗糖为碳源生长量最大, 有利于多糖的生成, 蔗糖浓度以 1.0%~1.5% 为宜。TP-1 菌株对烃类利用率较低, 因此采用该菌株进行油藏调剖需注入相应的碳源营养物。

在基础发酵培养基中, 分别以不同浓度的 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 和 NH_4NO_3 为氮源, 55℃ 发酵培养菌株 TP-1, 实验结果见表 2。通过不同氮源对 TP-1 菌株生长影响的比较, 可以看出 NH_4NO_3 比 $(NH_4)_2SO_4$ 和 NH_4Cl 更适于该菌株的生长及多糖的产生, 使用浓度以 0.4%~0.6% 为宜。

表 1 不同碳源对 TP-1 菌株生长的影响
Table 1 Effects of carbon sources on TP-1 growth

碳 源 Carbon sources	葡萄糖 Glucose (%)			蔗糖 Sucrose (%)			淀粉 Starch (%)			液蜡 Liquid paraffin (%)	原油 Crude oil (%)
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0
菌体量 Biomass ($\times 10^8$ CFU/mL)	1.2	1.6	2.1	1.4	3.7	3.8	0.8	1.3	1.5	0.3	0.07
粘度 Viscosity (mPa·s)	31	42	61	45	91	115	21	45	63	14	5
粘多糖 Polysaccharide (g/L)	2.5	3.1	5.3	3.2	6.4	9.3	1.8	3.0	5.1	1.2	0.2

表 2 不同无机氮源对 TP-1 菌株生长的影响
Table 2 Effects of nitrogen sources on TP-1 growth

氮 源 Nitrogen sources	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)				NH ₄ NO ₃ (%)				NH ₄ Cl (%)			
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.1	0.2	0.4	0.6	0.1	0.2	0.4	0.6
菌体量 Biomass (×10 ⁸ CFU/mL)	0.8	1.8	2.4	3.6	1.6	2.8	4.0	4.3	0.7	1.5	1.7	2.0
粘度 Viscosity(mPa·s)	38	51	69	71	44	57	88	101	39	48	65	66
粘多糖 Polysaccharide(g/L)	3.1	4.0	5.9	6.2	4.1	4.5	6.1	6.7	3.2	3.9	5.7	5.9

2.2 磷酸盐对调剖菌生长的影响

在基础发酵培养基中分别添加 0.5 % 的 KH₂PO₄、K₂HPO₄、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄ 和 (NH₄)₃PO₄，55℃ 发酵培养菌株 TP-1，以不加磷酸盐培养瓶为对照，实验结果见表 3。各种磷酸盐均有促进 TP-1 菌株多糖生成及菌体细胞生长的作用，在营养基质中添加 KH₂PO₄ 或 NaH₂PO₄ 酸式磷酸盐更有利于该菌的生长和多糖产生。

2.3 NaCl 和其它矿物盐对调剖菌生长的影响

在培养液中分别添加不同浓度的 NaCl 及

MgSO₄ 和 CaCl₂，55℃ 发酵培养菌株 TP-1。实验结果表明(表 4)，NaCl 浓度在 0.5%~6.0% 时对 TP-1 菌株的生长及多糖产生没有明显的影响，但 NaCl 浓度达到 10% 以上对菌的生长及多糖的产生均具有明显的抑制作用。同时发现，CaCl₂ 浓度在 0.5 % 以下，MgSO₄ 浓度在 0.1% 以内及低浓度的 AlCl₃(0.02%) 对 TP-1 菌株的生长和多糖的产生具有促进作用(表 5)。

实验表明菌株 TP-1 发酵产多糖的最佳培养基为(g/L)：蔗糖 15，NH₄NO₃ 6，KH₂PO₄ 5，NaCl 5，CaCl₂ 1，MgSO₄ 0.5，AlCl₃ 0.2，pH 7.2~7.4。

表 3 磷酸盐对 TP-1 菌株生长的影响
Table 3 Effects of phosphates on TP-1 growth

磷酸盐 Phosphates	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₃ PO ₄	对照 Control
菌体量 Biomass (×10 ⁸ CFU/mL)	4.7	2.7	4.2	2.5	2.1	1.6
粘度 Viscosity (mPa·s)	98	68	91	66	56	40
粘多糖 Polysaccharide (g/L)	6.5	5.7	6.3	5.5	4.9	3.8

表 4 NaCl 对 TP-1 菌株生长的影响
Table 4 Effects of NaCl on TP-1 growth

NaCl (%)	0.2	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0
菌体量 Biomass (×10 ⁸ CFU/mL)	3.3	3.6	4.0	4.4	4.1	3.6	3.1	0.6	0.04
粘度 Viscosity (mPa·s)	59	63	91	70	73	69	52	26	5
粘多糖 Polysaccharide (g/L)	5.1	6.0	6.4	6.2	6.2	6.0	4.7	3.0	0.2

表 5 Ca²⁺、Mg²⁺和 Al³⁺对 TP-1 菌株生长的影响
Table 5 Effects of Ca²⁺, Mg²⁺ and Al³⁺ on TP-1 growth

矿物质 Minerals	CaCl ₂ (%)			MgSO ₄ (%)			AlCl ₃ (%)		
	0.02	0.10	0.50	0.02	0.10	0.50	0.02	0.10	0.50
菌体量 Biomass (×10 ⁸ CFU/mL)	3.7	4.0	3.9	3.1	4.1	2.8	3.0	2.1	1.8
粘度 Viscosity (mPa·s)	58	65	70	60	82	69	61	45	29
粘多糖 Polysaccharide (g/L)	5.0	5.6	5.7	5.5	6.1	5.8	5.3	3.5	3.2

2.4 温度对调剖菌生长的影响

将 TP-1 菌株接种于优化后的发酵培养基，分别放置 35℃~60℃ 的条件下进行培养，测定发酵液粘度、多糖量及菌的生长量，结果见表 6。TP-1 菌株生

长适宜温度为 37℃~55℃，并能产生大量多糖，温度超过 60℃ 时菌体生长减弱，多糖产生量也相应降低。

2.5 调剖菌 TP-1 发酵动态曲线

菌株 TP-1 在发酵培养过程中，定时取样，以菌

表 6 温度对 TP-1 菌株生长的影响
Table 6 Effects of temperature on TP-1 growth

温度 Temperature(℃)	35	40	45	50	55	60
菌体量 Biomass (×10 ⁸ CFU/mL)	3.7	4.0	3.9	4.3	4.6	0.8
粘度 Viscosity(mPa·s)	96	107	112	120	118	43
粘多糖 Polysaccharide(g/L)	8.9	9.2	9.2	9.4	9.3	2.7

体细胞生长量、多糖产生量、产气量、发酵液粘度及 pH 值的变化,反映不同时期的发酵动态(图 1)。菌体进入对数期后 pH 值持续下降,粘性多糖和气体的产生开始于对数生长末期,达到平衡期后产量迅速增加;直到发酵超过 95 h,发酵液粘度、粘性多糖和气体产生量均达到最高,并维持在这一水平。

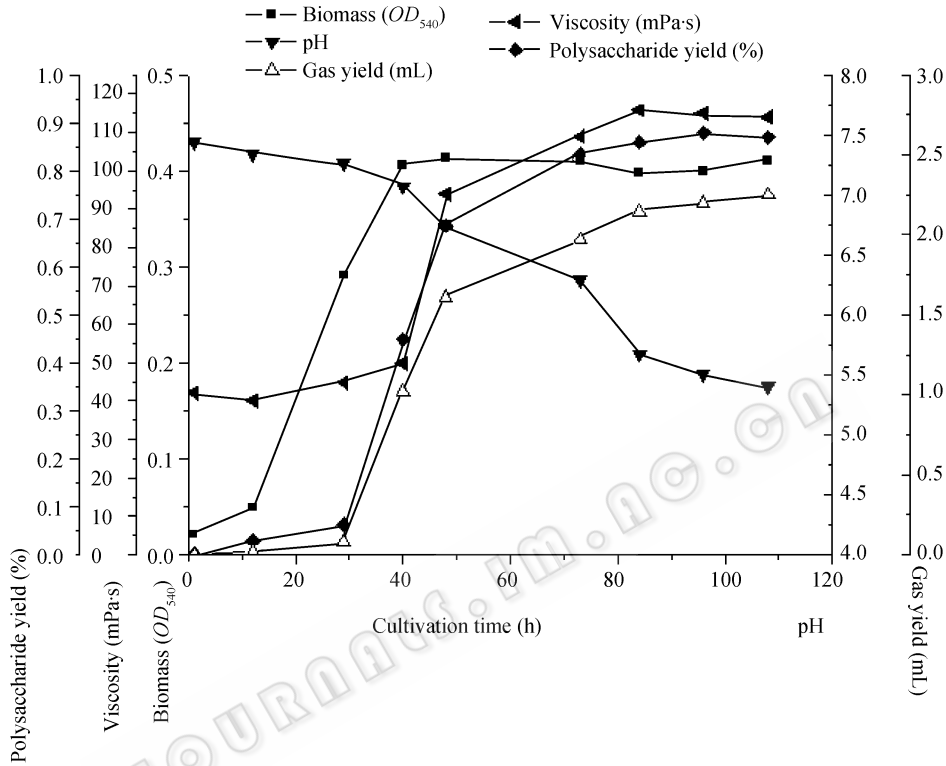


图 1 TP-1 菌株发酵动态曲线
Fig. 1 Fermentation dynamic curve of TP-1

2.6 岩芯模拟实验

岩芯含水率在注入 3.5PV TP-1 调剖菌后由 100%降到 90%,说明菌体细胞堵塞了高渗透岩芯致使注入水改向低渗透层流动,注水驱动低渗透层中的残余油,使采出液中油的含量上升,采收率由原来的 57.98%上升到 65.35%。岩芯压力从注入 3.3 PV 菌液后开始急剧上升,由原来的 0.2 atm 上升到 0.4 atm,之后逐渐下降(图 2)。这一现象是由于菌液堵塞高渗透岩芯,使注入水转向低渗透岩芯,并且代谢产生的气体可在多孔介质中形成气锁,引起注水压力提高,使注水对残余油的驱动能力加大,因此能够采出更多的残余油。实验结果可以看出,岩芯水驱后,利用微生物 TP-1 菌液进行微生物调剖驱油,采收率能够在水驱基础上再提高 7.37%。

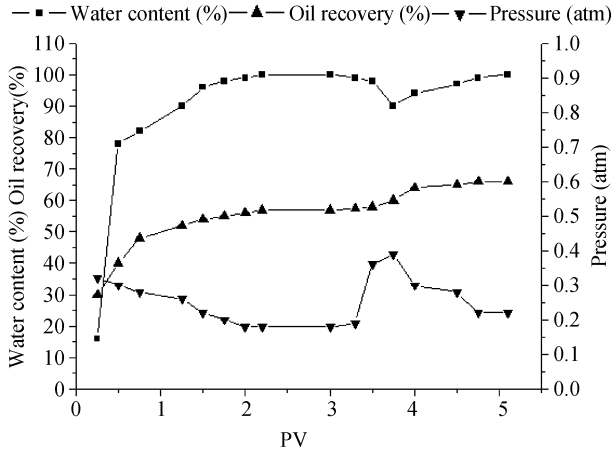


图 2 菌株 TP-1 岩芯模拟实验结果
Fig. 2 Core test of TP-1

3 结论

由本室分离的 *Bacillus* sp.TP-1 菌株为兼性厌氧菌, 该菌株在 55℃ 缺氧环境下可以正常生长繁殖并代谢产生粘性多糖和气体。由该菌株产生的多糖在高温和高矿化度的环境下具有良好的稳定性能, 而易在岩石颗粒表面形成较为牢固的生物膜。对培养条件的研究, 可以有效地指导营养液的注入, 增强调剖性能。岩芯模拟驱油实验表明该菌的注入可以封堵高渗区, 提高注水压力, 达到增采原油的效果。

参 考 文 献

- [1] Lee HO, Bae JH, Hejl K. Laboratory design and field implementation of microbial profile modification process. *SPE*49074, 1998.
- [2] Bae JH, Chambers KT, Lee HO. Microbial profile modi-

fication with spores. *SPE*28611, 1996.

- [3] 王修垣. 微生物提高石油采收率(I). *微生物学通报*, 1999, **26**(5): 384-385.
- [4] 纪海玲. 微生物调剖技术的初步试验研究. *特种油气藏*, 2003, **10**(5): 87-90.
- [5] 罗 强, 蒲万芬, 罗 敏, 等. 微生物调剖机理及应用. *地质科技情报*, 2005, **24**(2): 101-104.
- [6] 宋绍富, 张忠智, 雷光伦, 等. 高效驱油菌 I 的选育与室内岩芯模拟驱油研究. *石油化工高等学校学报*, 2003, **16**(1): 31-35.
- [7] 李希明, 栾传振, 肖贤明. 微生物采油技术物理模拟研究现状. *石油钻采工艺*, 2006, **28**(1): 32-36.
- [8] 李 莎, 徐 虹, 姜 岷. 产碱杆菌 NX-3 胞外多糖的结构与性能. *微生物学通报*, 2005, **32**(6): 37-41.
- [9] 梁凤来, 程守强, 刘如林, 等. 解烃细菌 NX-2 的特性及矿场试验. *微生物学通报*, 2004, **31**(3): 70-73.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。

带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3℃~5℃不可写成 3~5℃; 3%~6%不可写成 3~6%等。文中的数值和单位之间应加一个空格, 除了%和℃。