

文章编号: 1000-0747(2002)06-0091-03

降解原油微生物的筛选及其部分特性的研究

李清心^{1,2}, 康从宝^{1,2}, 王浩¹, 张长铠¹

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室; 2. 大庆石油学院)

基金项目: 山东大学微生物技术国家重点实验室资助项目(审 2000-068)

摘要: 筛选得到 4 株可利用原油为碳源生长的菌株, 初步鉴定为假单胞菌。这 4 株菌对原油有很好的降黏作用, 它们能利用长链烷烃生长, 并且能耐受一定的温度、压力和矿化度。其中的 M-3 菌除降黏外还能产生酸和生物表面活性剂, 在以原油为碳源的培养基中进行培养时, 可以使培养液的表面张力从 72mN/m 降至 36mN/m, pH 值从 7.0 降至约 5.5。实验证明 M-3 菌液在室内条件下能提高原油采收率 8.8% 左右, 在微生物采油中有很好的应用潜力。图 1 表 4 参 19(李清心摘)

关键词: 微生物采油; 降黏; 假单胞菌

中图分类号: TE357.9 文献标识码: A

微生物提高原油采收率(MEOR)技术在许多油田试验效果很好^[1-14]。筛选能以原油为碳源生长并能生成有益产物的微生物, 既节约成本, 又延长作用时间^[15], 本文介绍对这类菌种的筛选结果及其作用效果。

1 实验材料和筛选结果

1.1 菌种来源及培养基

菌种来自油田产出液、含油废水及长期被原油污染的土壤。3 类培养基组成见表 1。

表 1 微生物菌种培养基组成

培养基	培养基组成(g/L)
富集培养基	原油 2, NaCl 0.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.025, NaNO ₃ 0.2, NaH ₂ PO ₄ 0.5, K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 1.0
斜面培养基	蛋白胨 0.6, NaCl 0.5, 酵母膏 0.2; pH 值 7.2~7.4
发酵培养基	酵母膏 0.1, 葡萄糖 2.0, NaCl 0.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.025, KH ₂ PO ₄ 0.2, K ₂ HPO ₄ 1.0; pH 值 7.2

1.2 筛选方法

将适量含油污水或土样接种于富集培养基中, 置于 45℃、100~120r/min 的摇床培养 7~10d, 然后每天取样涂原油平板, 分离菌种, 按《简明第八版伯杰氏细菌鉴定手册》进行菌种鉴定。

将筛选到的菌种接种于斜面培养基上培养 1~2d, 用无菌水制成菌悬液, 接种于富集培养基中, 置于 45℃、100~150r/min 的摇床培养 2d, 离心收集油相, 用 Brookfield 数字黏度计测量原油的黏度。

用瑞典 Thermo Metric AB 公司制造的新型热导式微量量热计(热活性检测系统)检测以烃类为唯一碳源生长的菌种活性^[16]。用 JzhY1-180 型表面张力测定仪测定表面张力, 测量温度为 25℃。

菌种活化后接入种子瓶。将 45℃培养 1d 得到的种子液接入装有不同盐浓度溶液的摇瓶中进行耐盐实验, 培养数天后用平板计数法检查活菌数。将种子液加入高压容器内, 排净空气, 密封后放入恒温水浴中, 根据需要调节温度和压力, 进行耐温、耐压实验比较高温、高压培养前后菌数的变化。

M-3 菌提高原油采收率室内实验按文献[12]进行。

1.3 菌种筛选结果

筛选得到 4 株以原油为碳源生长较快的假单胞菌属菌株(编号为 M-1、M-2、M-3、M-4), 特征见表 2。

表 2 菌体的表面形态特征及生理生化特征

项目	M-1 菌	M-2 菌	M-3 菌	M-4 菌
革兰氏染色	G-	G-	G-	G-
菌落大小(mm)	1.4~1.7	1.0~1.2	1.4~1.9	1.2~1.7
是否产生色素	否	绿色	否	否
菌落颜色	透明	淡黄	黄色	黄色
菌体形态	杆状	不规则	短杆	短杆
淀粉水解酶	+	-	+	+
明胶水解	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+
细胞色素氧化酶	+	+	+	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	+
生理生化特征				
甲基红反应	-	-	-	-
乙酰甲基甲酸	+	+	+	+
吡啉反应	+	+	+	+
脲酶反应	+	+	+	+
H ₂ S 气体产生	-	-	-	-
反硝化反应	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	-

注: “+”表示有作用; “-”表示无作用

2 实验结果及讨论

2.1 对不同黏度原油的降黏率

从图 1a 明显可见, 筛选得到的 4 株菌对 6 种黏度的原油 (标号为 1~6 的原油黏度分别为 1876.0、1724.0、1470.5、787.0、77.5、67.5 mPa·s) 都有降黏效果, 而且对高黏度原油的降黏效果好于对低黏度原油的降黏效果, 与笔者曾报道的菌株^[17]有所不同。这几株菌能有效地利用长链烃类, 在高黏度原油的降黏中有很大的应用潜力。

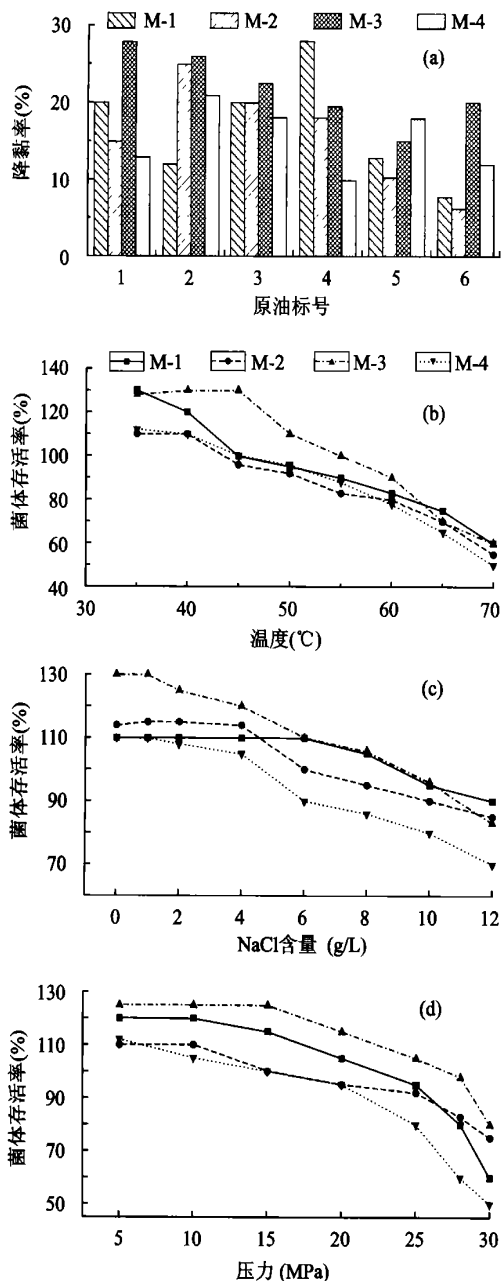


图 1 菌体对不同原油的降黏率(a)、温度对菌体存活的影响(b)、NaCl 浓度对菌体生长的影响(c)、压力对菌体生长的影响(d)

2.2 对不同烷烃的利用情况

通过热量变化检测菌体是否以烷烃类为碳源^[18]的实验结果见表 3。这 4 株菌在 7 种烷烃的培养基中都可生长, 在长链烷烃中生长效果更好。

表 3 菌体对不同烷烃的利用情况实验结果

菌种标号	庚烷	辛烷	十一烷	十二烷	十四烷	十六烷	十八烷
M-1	-	+	+	++	++	++	++
M-2	+	+	+	+	++	++	++
M-3	+	+	+	++	+++	+++	+++
M-4	-	+	+	++	++	++	++

注: “-”表示不利用; “+”个数的多少代表利用率的高低

2.3 耐温、耐压、耐盐实验

从 4 株菌在 35~75 °C 条件下培养 48h 后的存活率 (见图 1b) 可见, 当环境温度达到 70 °C 时, 它们的存活率在 50% 以上。这 4 株菌在不同盐浓度下培养 36h 后的存活率 (见图 1c) 表明, 它们能耐受 10g/L 的矿化度, 而且当矿化度小于 8g/L 时能发生增殖作用。较低压力 (小于 20MPa) 对菌体的影响不明显 (见图 1d), 这主要是因为其细胞壁结构可以耐受一定压力, 到实验压力超过 28MPa 时菌体才不能正常生长。

2.4 M-3 菌生长过程中发酵液表面张力及 pH 值的变化

4 株菌在原油培养基中发酵培养时的生长趋势相似。其中, M-3 菌培养 70h 后, 发酵液的 pH 值从 7.0 降至 5.5, 表面张力从 72mN/m 降至 36mN/m, 说明 M-3 菌能利用原油产生酸性物质和生物表面活性物质。

2.5 室内条件下利用 M-3 菌进行提高原油采收率实验

用在原油中生长较好的 M-3 菌进行提高原油采收率室内实验, 结果表明, 关井周期越长, 菌体对原油作用的效果就越好, 采收率提高得越多, 同时注入菌体浓度越大也越利于原油的开采 (见表 4)。

表 4 M-3 菌提高原油采收率室内实验

岩心编号	孔隙度 (%)	关井周期 (h)	菌体浓度 (cell/mL)	采收率提高 (%)
No. 1(对照)	20.0	24	0	0
No. 2(对照)	21.1	48	0	0
I (实验)	22.2	24	1.2×10^8	7.6
II (实验)	20.3	48	1.2×10^8	8.3
III(实验)	20.5	24	5.0×10^8	8.4
IV(实验)	23.5	48	5.0×10^8	8.8

3 结论

从油田产出液、含油废水及长期被原油污染的土壤中筛选到的4株菌初步鉴定为假单胞菌属厌氧菌,在长链烷烃中生长效果好于在短链烷烃中,对原油均有一定降黏效果(降黏率最高达28%),对盐、温度和压力都有一定的耐受能力。其中,M-3菌在以原油为碳源培养时产生酸类物质和表面活性物质,在室内条件下封闭48h后,其发酵液能使原油采收率提高8.8%左右,表明M-3菌在MEOR应用中潜力很大。另外的3株菌也具有一定的降黏、耐温、耐盐性能,在MEOR和微生物处理石油污染物方面也将有很好的应用前景,但更细致的研究工作有待进行。

参考文献:

- [1] Miller N J, Mudge S M. The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns[J]. *Spill Science & Technology Bulletin*, 1997, 4(1): 17-33.
- [2] 杨承志, 楼诸红. 微生物采油的地质基础及筛选标准[J]. *石油勘探与开发*, 1997, 24(2): 69-72.
- [3] 雷光伦, 陈月明. 微生物提高采收率理论模型[J]. *石油勘探与开发*, 2000, 27(3): 47-49.
- [4] 庞林绪, 莫冰. 微生物采油中原油组分的变化[J]. *石油勘探与开发*, 1998, 25(1): 50-51.
- [5] 向廷生, 何正国, 余跃惠, 等. 微生物提高原油采收率的机理研究[J]. *石油勘探与开发*, 1998, 25(4): 53-55.
- [6] 雷光伦, 李希明, 陈月明, 等. 微生物在油层中的运移能力及规律[J]. *石油勘探与开发*, 2001, 28(5): 75-78.
- [7] 雷光伦. 微生物采油技术的研究与应用[J]. *石油学报*, 2001, 22(2): 56-61.

- [8] 冯庆贤, 陈智宇. 港东二区七断块微生物驱油试验研究[J]. *石油勘探与开发*, 1999, 26(6): 68-71.
- [9] 王修垣. 微生物提高原油采收率[J]. *微生物学报*, 1999, 26(5): 384-385.
- [10] Banat I M, Makkar R S, Camestra S S. Potential commercial applications of microbial biosurfactants[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(5): 495-508.
- [11] Trebhau G L, Nuñez G L, Caira R L, Molina N Y, et al. Microbial stimulation of lake Maracaibo oil wells[C]. *SPE 56503*.
- [12] Behlulgi K, Mehmetoglu T, Donmez S. Application of microbial enhanced oil recovery technology to a Trukish heavy oil[J]. *Applied Microbiology Technology*, 1992, 36: 833-835.
- [13] Macleod F A, Lappin-scott H M, Costerton J W. Plugging of a model rock system by using starved bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6): 1365-1372.
- [14] 冯庆贤, 陈志宇. 耐高温采油微生物的研究与应用[J]. *石油勘探与开发*, 2000, 27(3): 50-52.
- [15] 高学忠, 魏明, 宁萃, 等. 利用微生物调剖技术提高原油采收率[J]. *石油学报*, 1999, 20(5): 54-57.
- [16] 相艳, 南照东, 曾宪成, 等. 微量热法对嗜热菌、嗜冷菌的动力学性质的研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2000, 37(6): 890-896.
- [17] 李清心, 康从宝, 王浩, 等. 利用假单胞菌进行三次采油的研究[J]. *生物技术*, 2001, 3: 封2, 3.
- [18] 于丽, 林瑞森, 刘绪良, 等. 微量热法研究浊度对两种石油菌生长的影响[J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2000, 27(6): 628-632.

第一作者简介: 李清心(1974-), 女, 黑龙江大庆人, 山东大学博士研究生, 自1997年开始从事微生物采油工作, 现主要从事分子生物学及微生物采油基因工程菌的构建研究。地址: 山东大学微生物技术国家重点实验室, 邮政编码: 250100; 电话: (0531)8364216。

收稿日期: 2002-04-26

(编辑、绘图 邓春萍)

Screening of four degrading oil bacteria and their some characteristics

LI Qing-xin^{1,2}, KANG Cong-bao^{1,2}, WANG Hao¹, ZHANG Chang-kai¹

(1. Shandong University, Shandong 250100 P. R. China; 2. Daqing Petroleum Institute, Heilongjiang 151400, P. R. China)

Abstract Four bacteria that could use crude oil as the carbon source were screened and identified as *Pseudomonas* sp. It was demonstrated that these bacteria could decrease the oil viscosity of the crude oil. The four bacteria could use the hydrocarbon with long chain as carbon source and could resist high temperature, pressure and high concentration of NaCl. M-3 could produce acid and biosurfactant when it used oil as carbon source, which could reduce the water surfacial tension (SFT) from 72mN/m to 36mN/m, pH from about 7.0 to 5.5. It was also demonstrated that M-3 could enhance the oil recovery in the model reservoir by 8.8% after 48h shut-in periods. So the M-3 has great potential in microbial enhanced oil recovery.

Key words microbial oil recovery; viscosity decreasing; *Pseudomonas*