

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.015

驱油生物表面活性剂生产菌的筛选与评价^{*}

吴景春 赵 阳 杨 柳 张晓龙 张振鲁 度维志

(东北石油大学提高油气采收率教育部重点实验室 黑龙江 大庆 163318)

摘要 目的:筛选适合油田的生物表面活性剂生产菌。**方法:**通过发酵培养,研究生物表面活性剂生产菌生长代谢规律;采用正交试验法,优选出其最佳培养条件;通过室内驱油实验评价生物表面活性剂驱油效果。**结果:**2#菌株最佳培养时间为96小时,最优发酵培养条件为:葡萄糖4.0 g、玉米浆1.6 g、 Na_2HPO_4 0.1 g、 KH_2PO_4 0.05 g、 MgSO_4 0.05 g、 CaCl_2 0.005 g、水100 mL、pH 7.2,培养温度35℃,摇床转速120 r/min,生物表面活性剂驱油提高采收率6.16%。**结论:**筛选出最优生物表面活性剂产生菌2#,菌株具备产表面活性剂的能力且产物量较高,其生物表面活性剂驱油效果良好。

关键词:微生物采油;生物表面活性剂;表面张力;采收率

中图分类号:Q93-33, Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2062-03

The Evaluation and Screening of Oil-displacing Biosurfactant-producing Bacteria

WU Jing-chun, ZHAO Yang, YANG Liu, ZHANG Xiao-long, ZHANG Zhen-lu, TUO Wei-zhi

(Key Laboratory of Enhanced Oil Recovery of Education Ministry, Northeast Petroleum University, Daqing, Heilongjiang, 163318, China)

ABSTRACT Objective: To filter out biosurfactant producing strain for oilfield. **Methods:** To study on the growth and metabolism law of biosurfactant-producing bacteria was studied by the fermentation, and the best culture conditions were elected by using orthogonal experimental method. The biological surfactant oil displacement effect was evaluated through laboratory displacement experiment. **Results:** The best culture time for strain 2# was 96 hours. The optimal condition for fermenting were as follows: the fermentation medium was composed of 4.0 g of glucose, 1.6 g of corn steep liquor, 0.1 g of Na_2HPO_4 , 0.05 g of KH_2PO_4 , 0.05 g of MgSO_4 , 0.005 g of CaCl_2 , 100 mL of water and pH 7.0; The culturing temperature was 35℃; The rotation speed of shaking table was 120 r/min. Biosurfactant flooding EOR efficiency was 6.16%. **Conclusions:** The best oil-displacing biosurfactant-producing bacteria is strain 2#. It could produce surfactant and the product quantity is high. The effect of biosurfactant flooding is good.

Key words: Microbial oil recovery; Biosurfactant; Surface tension; EOR

Chinese Library Classification: Q93-33, Q939.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2062-03

前言

生物表面活性剂是由微生物代谢产生的、亲水基与疏水基结构于一体的两亲化合物,可改变两相界面的物理性质,例如降低空气-水、油-水、固体-水的表面张力^[1]。与化学表面活性剂相比,它有着天然、可生物降解、安全及高表面活性和生理活性等优点,受到全世界多行业的广泛关注。在石油行业,生物表面活性剂被用于提高采收率、改善稠油油品、降低原油黏度等方面^[2-3]。

生物表面活性剂产生菌的筛选方法有很多,包括蓝色凝胶平板法、血平板法、原油平板法、界面张力法、表面张力法、傅立叶变化红外光谱法等^[4-6]。其中界面张力法与表面张力法均是通过检测微生物发酵液的表面活性来确定菌株是否为生物表面活性剂产生菌^[7]。本文采用表面张力法,结合菌种生长代谢规律筛选出最优生物表面活性剂产生菌2#;通过正交试验,确定其

最优发酵条件;通过室内驱油实验对其进行驱油效果评价。

1 实验材料与方法

1.1 菌株

从大庆采油一厂油井产出水中分离纯化得到的7株纯菌株,分别命名为:1#、2#、3#、4#、5#、6#、7#。其中,1#、2#、3#、4#为短杆菌,5#为球菌,6#、7#为长杆菌。

1.2 培养基

葡萄糖平板培养基:葡萄糖2.0g、玉米浆0.8g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、 CaCl_2 0.005g、琼脂1.7g、水100 mL、pH 7.0。

种子培养基:葡萄糖2.0g、玉米浆0.8g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、 CaCl_2 0.005g、水100 mL、pH 7.0。

发酵培养基:考虑初始pH、无机盐以及碳氮比可能对实验造成的影响,根据经验,拟定四种配方。

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(51374075);黑龙江省自然科学基金项目(E201120)

作者简介:吴景春(1968-),男,教授,主要研究方向:微生物采油,电话:0459-6503797, E-mail: w6529@163.com

(收稿日期:2013-11-12 接受日期:2013-12-10)

配方一:葡萄糖 4.0g、玉米浆 1.6g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、 CaCl_2 0.005g、水 100 mL、pH 7.0。

配方二:葡萄糖 4.0g、玉米浆 1.6g、 NaCl 0.1g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、水 100 mL、pH 7.0。

配方三:葡萄糖 4.0g、玉米浆 1.6g、 NH_4NO_3 0.1g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、 CaCl_2 0.005g、水 100 mL、pH 7.0。

配方四:葡萄糖 4.0g、玉米浆 1.6g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、 CaCl_2 0.005g、水 100 mL、pH 7.2。

1.3 测定方法

总菌数的测定方法:采用平板菌落计数法^[8-10]。

表面张力的测定方法:采用白钢板测定法^[9-11]。

界面张力的测定方法:采用旋转液滴测定法^[12-13]。将待测样品稀释 10 倍,使用美国引进的界面张力仪,测定其与大庆采油一厂原油的界面张力。

1.4 室内岩心驱油实验

将岩心饱和地层水和原油后水驱至指定值,之后将微生物发酵液注入岩心,放置一天后进行后续水驱^[14]。

2 结果

2.1 菌株的生长曲线及产表面活性剂的能力

分别将各菌株接入种子培养基,置于 30℃、110 r/min 的摇床培养 16h,然后接入发酵培养基(配方一)中,于 35℃、120 r/min 的摇床培养,每 24 h 检测微生物的数量,4 d 后停止培养,测定各菌株发酵液的表面张力。通过培养,发现 1#、2#、3#、6# 菌株在发酵过程中,总菌数较高,2-3 d 内均能维持在 10⁸ 个/mL 以上。而其余三株的生长状况较差(见图 1)。表面张力测定结果(见表 1)反映出,1#、2# 发酵液表面张力明显降低。由于 1#、2# 菌株的生长能力及产表面活性剂能力均优于其它菌株,因此将 1#、2# 作为产表面活性剂菌株保留备用。

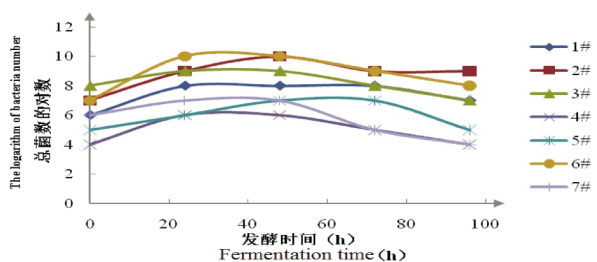


图 1 各菌株的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of each strain

表 1 各菌株发酵液的表面张力

Table 1 The surface tension of fermentation broth of each strain

strain	the blank	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#
surface tension (mN/m)	54.78	29.43	32.38	46.02	62.51	49.81	54.06	50.99

2.2 1#、2# 菌株在发酵过程中的代谢规律

从 1#、2# 菌株的种子瓶中取 5 mL 接入发酵瓶(配方一),在 30℃、110 r/min 的摇床中培养 6 d,得到菌株的发酵曲线,如图 2、图 3 所示。结果表明,生长后期,pH 降至 4.2 以下,菌体开始衰亡,菌数减少。1# 瓶中的表面活性剂被破坏,表面张力与油-水界面张力值升高。2# 瓶中表面活性剂未受破坏,表面张力与油-水界面张力值保持不变。因此将 2# 菌株选为最优生物表面活性剂产生菌,其最佳培养时间为 96 小时。

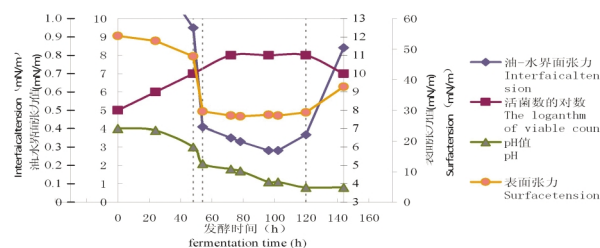


图 2 1# 菌株的发酵曲线

Fig. 2 The fermentation curve of strain 1#

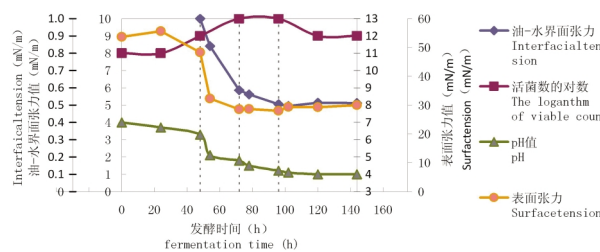


图 3 2# 菌株的发酵曲线

Fig. 3 The fermentation curve of strain 2#

2.3 2# 菌株的最优发酵培养方案

采用正交试验法,考察营养物配方、培养温度及摇床转速对微生物产物的影响^[15-17]。营养物配方有四个水平;培养温度有两个水平,分别为 30℃、35℃;摇床转速有两个水平,分别为 110 r/min、120 r/min。实验结果采用方差分析方法^[18-20]。

通过分析得知,发酵瓶配方和培养温度对 2# 菌株合成表面活性剂的能力有显著影响,而摇床转速的作用不明显,其最佳培养方案为:发酵瓶配方四、培养温度 35℃、摇床转速 120 r/min。

2.4 室内岩心驱油实验效果评价

取渗透率约 300 mD 的小岩心,注入 2# 菌株产生物表面活性剂 0.3 PV,在注入前,水驱含水率应达到 98%,注入速度 0.1 mL/min,实验结果如图 4 所示。结果表明,2# 菌株产生物表

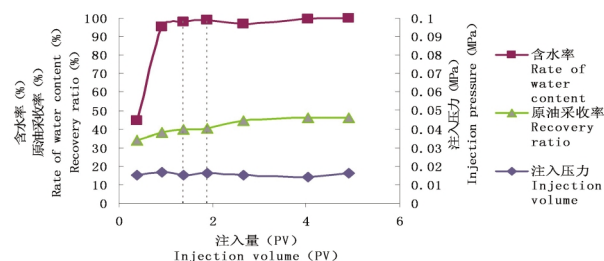


图 4 2# 菌株产生物表面活性剂驱油过程图

Fig. 4 The oil displacement process curve of

biosurfactant-producing strain 2#

面活性剂驱油主要是依靠提高洗油效率来提高原油采收率,在注入压力低的情况下依然可以提高采收率 6.16 %。

3 讨论

现有的能源中,石油是一种重要的能源。利用生物表面活性剂提高石油采收率已成为近年来的研究热点之一。生物表面活性剂是从 20 世纪中期开始快速应用的,美国、英国、加拿大、俄罗斯、罗马尼亚、荷兰及日本等国的科研院所、油田都在进行微生物采油试验研究,其技术正在日益完善^[2]。然而我国对它的研究起步较晚,大多还处于实验研究阶段。生物表面活性剂是微生物代谢过程的产物,生物表面活性剂产生菌有很多种类,包括细菌、霉菌和酵母菌等。其中细菌是生物界中具有生长繁殖全部机能最小的有机体,被广泛应用于微生物采油技术中。

在极其复杂的生物物质群中,生物表面活性剂是微量的存在,本文筛选出了最优生物表面活性剂产生菌和该菌的最优发酵培养方案,同时室内实验评价表明其驱油效果良好。因此实施规模化生产,应用于油田现场试验区块,为油田稳产增产做了一定的贡献。

4 结论

(1)筛选出最优生物表面活性剂产生菌 2#,菌株具备产表面活性剂的能力且产油量较高,最佳培养时间为 96 小时。

(2)2# 菌株最优发酵培养条件为:葡萄糖 4.0g、玉米浆 1.6 g、 Na_2HPO_4 0.1g、 KH_2PO_4 0.05g、 MgSO_4 0.05g、 CaCl_2 0.005g、水 100 mL、pH 7.2;培养温度 35 ℃、摇床转速 120 r/min。

(3)2# 菌株产生物表面活性剂驱油效果良好,提高采收率 6.16%。

参考文献(References)

- [1] Lazar I, Petrisor I G, Yen T E. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) [J]. Petroleum Science and Technology, 2007, 25 (11-12): 1353-1366
- [2] Praveesh B., Soniyamby, Mariappan, et al. Biosurfactant Production by Pseudomonas Sp from Soil Using Whey as Carbon Source[J]. New York Science, 2011, 4 (4):99-103
- [3] Donaldson EC. Microbial Enhanced Oil Recovery-Recent Advances [J]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991:65-84
- [4] Banat IM, Makkar R., Cameotra S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(5):495-508
- [5] Fu HY, Zeng GM, Huan GH, et al. Isolation of Biosurfactant-producing Bacteria from compost and their Prospective application in composting [J].Transaction of Nonferrous Metals Society of China, 2004, 14(1):131-134
- [6] 李清心, 康从宝, 林建强等. 几种简单的分离生物表面活性剂产生菌的方法[J].中国医学生物技术应用杂志, 2002, (02):12-14
- Li Qing-xin, Kang Cong-bao Lin Jan-qiang, et al. submitted to Journal of Chinese Academic Medical Magazine of Organisms [J]. Chinese Journal of medical biological technology application, 2002, (02):12-14
- [7] Hasnain A, Akpobari G, Larry N, et al. Mechanistic Models of Microbe Growth in Heterogeneous Porous Media [R]. SPE 113462, 2008
- [8] Awan A, Teigland R, Kleppe J. EOR Survey in the North Sea [R]. SPE 99546, 2006
- [9] Zahid S, Zahoor M, Khan H. A Review on Microbial EOR With Special Reference to Marginal and/or Mature Assets[R]. SPE 108726, 2007
- [10] Hans K, Statoil A, Alexander W, et al. Wax Control by Biocatalytic Degradation in High-Paraffinic Crude Oils[R]. SPE 106420, 2007
- [11] Irfan Kurawle, Mohit Kaul, Nakul Mahalle, et al. Bio-Genetic Engineering, Future of Multi Microbial Culture EOR-A Detailed Report[R]. SPE 123303, 2009
- [12] Otagaki H, Fujiwara K, Hattori Y, et al. Verification of Microbial Activities for Microbial Restoration of Methane Deposit With Subsurface CO₂ Sequestration into the Depleted Oil Fields [R]. SPE 123596, 2009
- [13] Mohammed M, Amro. Multidisciplinary Challenge for Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR)[R]. SPE 120820, 2008
- [14] Town K, Husky E, Sheehy AJ, et al. MEOR Success in Southern Saskatchewan[R]. SPE 124319, 2009
- [15] Hou Z, Wu X, Wang Z, et al. The Mechanism and Application of MEOR by Brevibacillus Brevis and Bacillus Cereus in Daqing Oilfield[R]. SPE 97469, 2005
- [16] Samir M; Abu El Ela M; and El Marsafy S. New Incubated Pseudomonas Aeruginosa Bacteria for Increasing Oil Recovery under Reservoir Conditions[R]. SPE 126104, 2010
- [17] Manrique E, Izadi M, Kitchen C, et al. Effective EOR Decision Strategies with Limited Data: Field Cases Demonstration [R]. SPE 113269, 2008
- [18] Yusuf A, Kadarwati S, Nurkamdia, et al. Field Test of the Indigenous Microbes for Oil Recovery, Ledok Field, Central Java[R]. SPE 57309, 1999
- [19] Gullapalli I L, Bae J H, Hejl K, et al. Laboratory Design and Field Implementation of Microbial Profile Modification Process [R]. SPE 60910, 2000
- [20] Zhang YJ, Xu ZS, Ji P, et al. Microbial EOR Laboratory Studies and Application Results in Daqing Oil Field[R]. SPE 54332, 1999
- [21] Fu HY, Zeng GM, Huan G H, et al. Isolation of Biosurfactant-producing Bacteria from compost and their Prospective application in composting [J].Transaction of Nonferrous Metals Society of China, 2004,14(1):131-134