

稠油降解菌的筛选及其对胶质降解作用

王大威^{1,2}, 张健^{1,2}, 齐义彬³, 马挺³

¹海洋石油高效开发国家重点实验室, 北京 100027

²中海油研究总院, 北京 100027

³南开大学生命科学学院分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要:【目的】以胶质为唯一碳源, 从中海油南堡 35-2 油田地层水中经富集培养, 为海上油田稠油降解及提高稠油采收率研究奠定基础。【方法】利用富集培养和胶质平板法分离胶质降解菌株, 对分离菌株通过形态特征、16S rRNA 基因进行鉴定, 对菌株的理化性质进行分析, 并对其降解胶质和稠油的性能进行研究。【结果】分离筛选出细菌菌株 21 株, 并从中筛选出性能较好的 4 株。经鉴定为分别为 Q4-油杆菌 (*Petrobacter* sp.)、QB9-嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、QB26-地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、QB36-白色地芽胞杆菌 (*Geobacillus pallidus*) , 其中 QB26 菌株效果最好, 对该菌株的理化性质进行了分析, 并对其降解胶质和稠油的性能进行了研究。结果显示, 该菌株可在厌氧条件下生长, 并能适应地层环境。分离菌株作用稠油后, 饱和烃相对含量均有不同程度的上升, 芳香烃、胶质、沥青质相对含量降低, 能使胶质相对含量降低 5.1%, 沥青质相对含量降低 2.7%。【结论】分离菌株对 NB35-2 油田稠油中的胶质具有一定的降解作用, 在微生物采油和原油污染处理方面具有应用潜力。

关键词: 稠油, 胶质, 粘度, 地衣芽胞杆菌, 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0353-07

稠油, 即高粘度重质原油, 由于在油层中的渗流阻力大, 甚至不能流动, 因而用常规技术难以经济有效的开发。中国油田的稠油中轻质馏分很少, 含硫量低, 而胶质沥青含量很多, 而且随着胶质沥青含量增大, 原油相对密度及同温度下的粘度随之增高, 因此胶质沥青质的含量是影响稠油开采的主要制约因素^[1]。胶质和沥青质是稠油中的重质部分, 由于其结构复杂, 同时受温度影响小, 因此重质稠油常规方法开发一直是难点^[2-3]。目前我国探明石油储量中, 稠油资源非常丰富, 开发难度较大的重油、稠油

接近 40 亿吨, 主要集中在渤海湾盆地, 其中渤海油田重油、稠油在中海原油中所占的比例达到 80% 以上^[4]。

微生物采油技术 (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR) 发展至今已有 90 多年的历史, 目前 MEOR 技术已经成功地应用于单井吞吐、调剖、降粘等方面, 该技术能够经济有效地延长油田开采周期, 提高近枯竭油藏的采收率^[5]。稠油微生物开采技术是微生物采油技术的延伸, 也是人们对稠油开采的一种有益探索。但目前研究发现微生物对稠

基金项目: 国家科技重大专项 (2011ZX05024-004) “海上稠油化学驱油技术”

* 通信作者。Tel: + 86-10-84526275; Fax: + 86-10-64662989; E-mail: wangdw3@cnooc.com.cn

作者简介: 王大威 (1978 -), 男, 黑龙江人, 采油工艺工程师, 博士学位, 主要从事微生物采油技术研究。E-mail: wangdw3@cnooc.com.cn

收稿日期: 2011-10-14; 修回日期: 2012-02-03

油降解十分困难,影响生物处理效率,而对于胶质和沥青质等重质部分生物降解的研究国内外较少^[6-8]。本文针对稠油的这一特点,开展了渤海油田稠油降解菌分离、筛选及其对胶质和沥青质降解研究,为稠油微生物采油技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 地层水、原油样品: NB35-2 A18 井原油,粘度 523.3 mPa·s,沥青 7.79%,胶质 20.25%; NB35-2 B16 井,地层粘度 1094 mPa·s,沥青 6.92%,胶质 22.01%。均取自中海油渤海油田 NB35-2 油田。

1.1.2 发酵培养基 (g/L): Na₂HPO₄ 0.6, KH₂PO₄ 0.2, NaNO₃ 2, FeSO₄ 0.02, MgSO₄ 0.3, 酵母粉 0.5, 蔗糖 1, pH 7.2。

1.2 稠油中胶质提取方法

采用萃取法从稠油中分离沥青质和胶质。将一定体积的稠油溶解于 15 倍体积的正庚烷中,用离心机以 72 × g 离心 10 min 后,底层沉淀物质即为沥青质。将上层清液取出,加入细孔硅胶,硅胶用量为 2 g/mL 原油,用数显搅拌机搅拌,以 72 g 离心 3 min,用苯冲洗吸附了胶质的硅胶,直到冲洗液为浅黄色。最后用含 7% 甲醇的二氯甲烷溶液冲洗,直到冲洗液接近无色。将苯冲洗液及含甲醇的二氯甲烷冲洗液合并,用旋转蒸发器在 90℃ 下蒸出溶剂,真空干燥,回收。

1.3 胶质降解菌株筛选方法

发酵培养基 100 mL + 2 g 胶质 + 10 mL 地层水,油藏温度 55℃ 摇床培养 2 周富集,将富集的摇瓶用无菌水进行稀释,稀释到 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ 涂布到发酵培养基 + 胶质和 LB 平板上,55℃ 培养。挑选菌落形态和大小不同的菌株。-80℃ 保存,将各单菌活化并接种到发酵培养基 100 mL + 2 g 胶质中,观察乳化效果。

1.4 分离菌株 QB26 的理化性质研究

1.4.1 生理生化试验 参见文献 [9]。

1.4.2 分离菌株 16S rRNA 鉴定: 先将菌株进行活化,然后进行菌落 PCR 扩增 16S rRNA,以细菌基因组 DNA 为模板,27f (5'-AGAGTTTGATCTGGCT CAG-3') 和 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (北京奥科生物技术有限公司)。扩增体系是:

premix 12.5 μL, 1541r 0.2 μL, 27f 0.2 μL, 菌液 1 μL, ddH₂O 加至总体积 25 μL。PCR 程序是: 94℃ 10 min; 94℃ 45 s; 55℃ 45 s; 72℃ 90 s; (×30) 72℃ 10 min; 4℃ 48 h。扩增的 PCR 产物连接到载体 PMD19-T (TAKARA) 上,转化 *E. coli* DH5α。提取有 16S rRNA 插入的质粒并测序,序列测定由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.4.3 分离菌株好氧性、温度、pH 值、矿化度适应范围测定: (1) 好氧性测定: 配制含有 0.5% 的琼脂粉的 LB 培养基 5 mL 于试管中。将降解菌株富集培养,用接种针蘸取菌液,垂直刺入半固体培养基中。55℃ 温箱中培养,观察穿刺线周围降解菌的生长情况,判断其需氧特性。(2) 温度适应范围: 挑取 QB26 单克隆于 LB 固体平板 55℃, 12 h 活化后,调取单菌落于 5 mL LB, 55℃, 120 r/min 震荡培养过夜,1% 接种量接种到 100 mL LB, 培养 4 h, 作为种子液。取种子液 5% 分别接种到无机盐培养基,并加入 0.5% 原油作为唯一碳源,分别在 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 130 r/min 培养。采用水质-石油类和动植物油的测定红外光度法 (中华人民共和国国家标准 GB/T16488-1996) 测定原油降解率。(3) pH 值适应范围: 配制 pH 梯度无机盐培养基: 以 NaOH 或 HCl 调节无机盐培养基的 pH 分别为 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10。菌株培养和原油降解率分析方法同上。(4) 矿化度适应范围: 配制培养基配方,然后按照氯化钠浓度 1% - 6% 6 个梯度额外加入到培养基中,共 6 个实验,每个实验 3 个平行。

1.5 分离菌株性能评价实验

1.5.1 菌株对胶质的降粘作用: 利用 BROOK FIELD CAP 2000 + L VISCOMETER 锥板式粘度计测定 4 号转子, 55℃ 100 r/min 下测定。

1.5.2 菌株对原油的降粘作用: 30 mL 培养液 + 30 g A18 原油, 55℃ 摇床上培养 14 d, 利用 BROOK FIELD VISCOMETER LVDV-II + Pro 提桶式粘度计测定原油和菌种对原油作用后的粘度变化。

1.5.3 乳化系数 (EI24) 的测定: 将 6 mL 发酵液与 4 mL 液体石蜡混合,充分震荡,乳化层高度与液相总高度之比乘以 100% 即为乳化系数 EI24。乳化系数可以在一定程度上反映发酵液的乳化能力。

1.5.4 采用气相色谱法对菌种作用前后原油烃组分变化进行测定: 实验方法见文献^[10]。

1.5.5 采用硅胶-氧化铝双吸附法分析菌株作用前

后原油中胶质含量变化:按照文献^[11]方法对原油进行族组分分析,得出作用前后原油中胶质含量变化。

1.5.6 原油降解前后傅立叶红外光谱测定 (IR) 分析:将降解前后的 A18 原油脱水,用溴化钾压片,采用美国的 Nicolet-560E. S. P 进行红外光谱扫描,扫描波长为 $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ 。

2 结果和讨论

2.1 胶质降解菌的筛选

通过初筛、复筛,从地层油水样中筛选出 21 株单菌, -80°C 保存,将各单菌活化并接种到发酵培养基 $100 \text{ mL} + 2 \text{ g}$ 胶质中,观察乳化效果。分离到效果较好的菌株 4 株,分别为 Q4、QB9、QB26、QB36,其中效果最佳的为 QB26,图 1 为 QB26 的电镜照片。

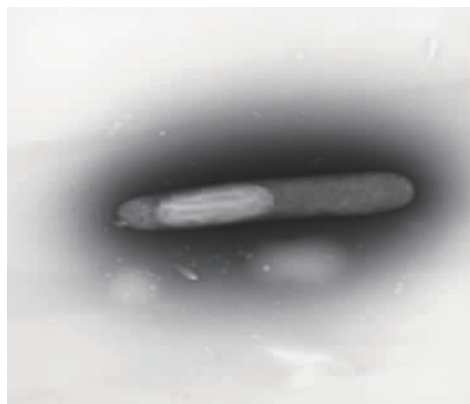


图 1 QB26 菌株透射电镜照片 ($8000 \times$)

Fig. 1 Electron transmitted micrograph of strain QB26. bar = $2 \mu\text{m}$.

2.2 分离菌株 QB26 的形态及生理生化性质研究

2.2.1 生理生化试验:QB26 菌株平板生长菌落呈圆形,菌落粗糙,不透明,无闪光,扩张,污白色,细胞杆状,大小为 $0.34 - 0.45 \times 2 - 4 \mu\text{m}$ 。经鉴定表明,该菌株呈革兰氏阳性,杆状,能形成芽孢,厌氧条件可生长,甲基红试验阳性,硝酸盐还原试验阳性,葡萄糖培养能产酸不产气,可液化明胶,水解淀粉,水解酪素,初步鉴定该菌株为地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

2.2.2 系统发育学分析 (测序结果):将 16S rRNA 测序结果通过与 Genbank 中现有的菌种的 16S rRNA 基因序列比对,利用 Clustal X1.81 软件和 MEGA 4.0 软件构建系统进化树,如图 2 所示,结合生理生化特性进一步确定 QB26 菌株为地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*),同时确定 Q4 为油杆菌 (*Petrobacter* sp.)、QB9 为嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、QB36 为白色地芽胞杆菌 (*Geobacillus pallidus*)。

2.2.3 QB26 菌株的好氧性、温度、pH 值、矿化度适应范围测定:由图 3 可以看出, QB26 菌株在半固体斜面中靠近底部生长较为旺盛,表明其具有兼性厌氧生长的特性,可以在低氧环境中生长,具备微生物采油的潜在应用价值。

QB26 菌株对温度的变化敏感,反映在其降解量的显著差异上。由图 4 可见 QB26 菌株原油降解最适温度为 55°C ,降解量达到 1600 mg/L ,降低或升高培养温度都会导致降解量急剧下降;其次是 50°C ,降解量达到 1000 mg/L ;在低于 50°C 和高于 60°C 时,降解量只有 300 mg/L ,10% 左右。

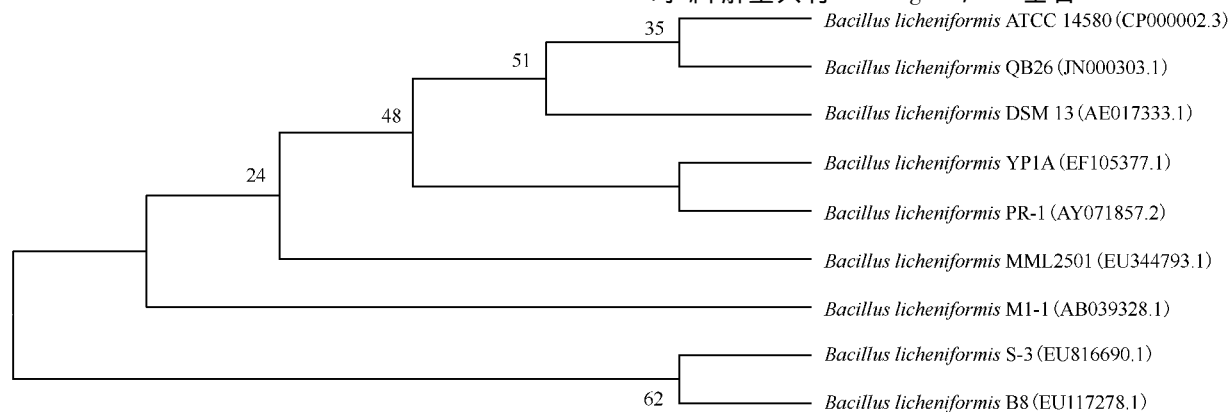


图 2 QB26 菌株 16S rRNA 基因系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain QB26. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each node is the percentage supported by bootstrap and bootstrapping value lower than 50% is not shown. Bar 5% sequence divergence. Bar 0.0005 represent sequence divergence.

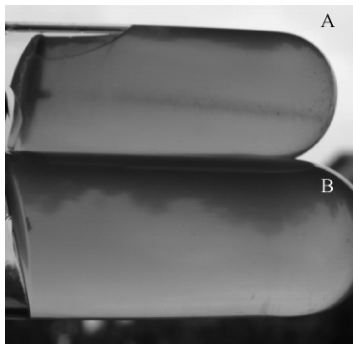


图3 QB26 菌株半固体穿刺照片
Fig.3 Semi-solid puncture photos of strain QB26. A: QB26; B: Control.

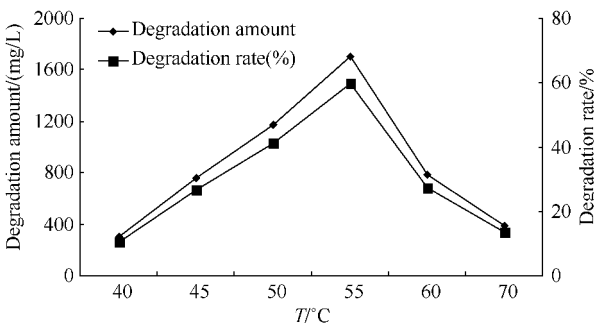


图4 QB26 菌株生长的温度范围
Fig.4 Effect of temperature on the growth and crude oil degradation of strain QB26.

QB26 菌株能在较大 pH 范围内 (5 - 8) 具有良好的石油烃降解性能,降解量都在 1200 mg/L 以上。而且 QB26 菌株的一个特性是对酸环境具有很强的耐受力,在 pH 4 的培养集中 5 d 培养对原油的降解率能达到 40% 左右降解大于 1100 mg/L 的原油,最高降解量发生在 pH 7 的条件下,其降解率超过 64.9%。而当 pH 值在 9 到 10 范围内, QB26 菌株对原油的降解量急剧下降,达不到 500 mg/L,说明其耐碱性能差,如图 5。而 NB35-2 油田地层水的 pH 在中性 7 左右,属于 QB26 菌株作用的最佳 pH,可以发挥菌株 QB26 的最佳降解效果。

由图 6 可看到, QB26 菌株的生长矿化度范围 (以 NaCl 浓度计算) 为 1% - 6%, 最适生长矿化度为 1%。

2.3 分离菌株性能评价实验

2.3.1 菌株对胶质的降粘作用:如图 7 所示, Q4、QB9、QB26、QB36 4 株菌株作用 A18 原油胶质后,乳化测定降粘率,平均降粘 36.6%,其中 QB26 菌株最高可降粘 60.1%;脱水测定降粘率,平均降粘

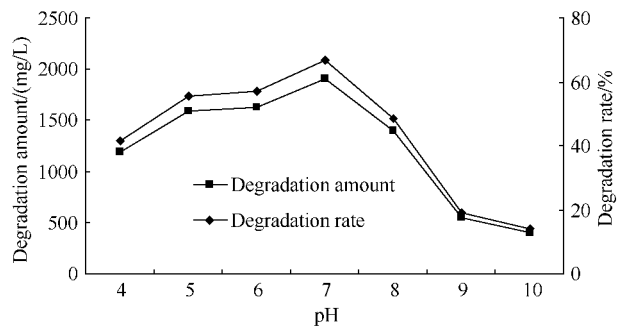


图5 QB26 菌株生长的 pH 范围
Fig.5 Effect of pH on the growth and crude oil degradation of strain QB26.

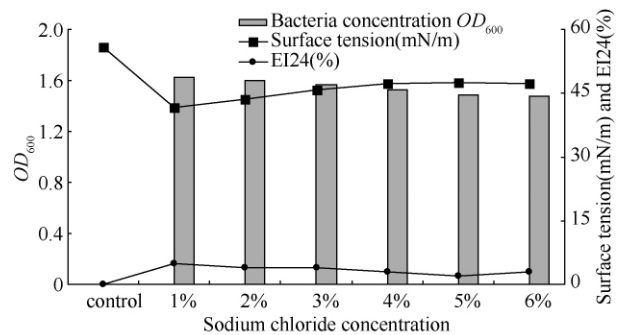


图6 NaCl 浓度梯度对 QB26 菌株的作用
Fig.6 Effect of sodium chloride concentration on the growth of strain QB26.

12.2%,其中 QB26 菌株最高可降粘 17.9%;胶质含量平均降低 15.9%,其中 QB26 作用最为显著,可使胶质含量降低 21.9%。

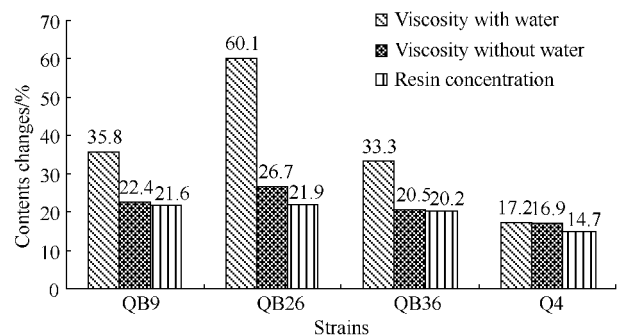


图7 分离菌株作用后胶质的粘度变化和降解率
Fig.7 Viscosity reduction and degradation rate of resin after degradation by isolated strains.

2.3.2 分离菌株对 A18 原油的降粘作用:如图 8 所示,各菌株对 A18 井原油均有一定的乳化降粘作用。菌株作用后,含水粘度平均下降 30% 左右,其中 QB26 降粘率最高达 38.7%。

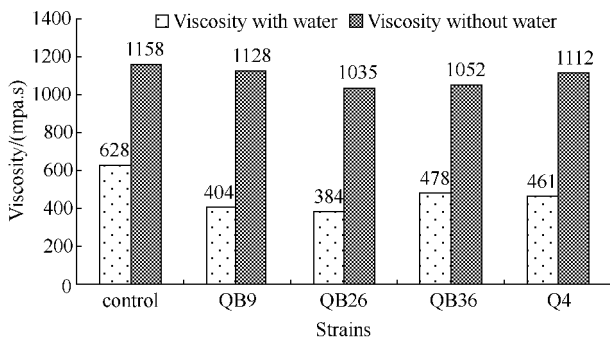


图 8 分离菌株对原油的降粘作用

Fig.8 Viscosity reduction of crude oil after degradation by isolated strains.

2.3.3 分离菌株作用前后原油烃组分变化测定：采用硅胶-氧化铝双吸附法分析分离菌株作用前后原油中各组分含量变化，结果如图 9 所示。分离菌株作用原油后，与空白相比较各组分的相对含量都

发生明显变化，饱和烃相对含量均有不同程度上升，芳香烃、胶质、沥青质相对含量降低，其中 QB26 菌株能使胶质相对含量降低 5.1%，表明原油经菌株作用后，其化学组分发生一定程度的变化。

对 QB26 菌株作用原油后的芳香烃系列组分进行气质联用分析。结果表明，芳甾烷系列占原油各组分总含量的 90% 以上。A18 原油被 QB26 菌株作用前后 (图 10)，萘系列、菲系列、屈系列、噻吩系列、芴系列和芳甾烷系列均有不同程度的降解，降解率在 60% - 85% 左右，而多环芳烃降解后出现联苯系列和呋喃系列化合物；此外，QB26 菌株作用的机制不同，其对于饱和烃重质组分的降解能力大于轻质组分，能同时降解芳香烃的轻质组分和重质组分，对于缺少轻质芳香烃组分的情况下，QB26 菌株还能依靠降解重质组分或胶质等生成新的轻质芳香烃组分。

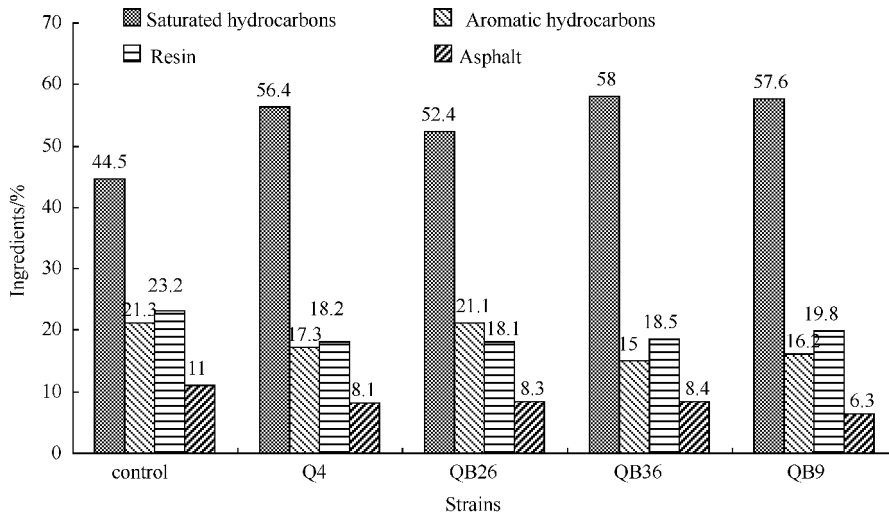


图 9 分离菌株降解原油后四组分相对含量变化

Fig.9 Four fractions contents changes of crude oil after degradation by isolated strains.

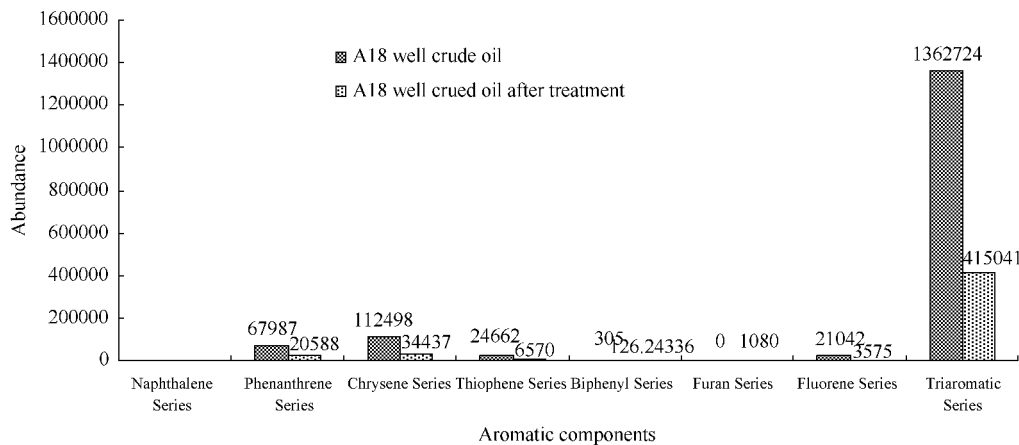


图 10 菌株 QB26 作用原油前后芳香烃各组分变化

Fig.10 Aromatic components changes of crude oil after degradation by strain QB26.

2.3.4 原油降解前后傅立叶红外光谱测定 (IR) 分析:如图 11(A、B)所示。由于原油是混合物,所以尚不能确定是何种官能团的吸收峰,但从图形变化可知原油得到分解,例如:羟基的伸缩震动在 $3670 - 3240 \text{ cm}^{-1}$,作用后的峰值有明显升高,说明长链脂肪酸分解成许多短链脂肪酸,醇类、醛类的峰值在 $1650 - 1450 \text{ cm}^{-1}$,作用后也有明显的提高,说明大分子的胶质被分解为芳香烃后进一步得到降解。分析 $3300 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ 区域 C-H 伸缩振动吸收,以 3000 cm^{-1}

为界:高于 3000 cm^{-1} 的部分经微生物降解后增多,低于 3000 cm^{-1} 的部分减少,表明饱和 C-H 伸缩振动吸收减弱,表明饱和烃化合物减少,不饱和碳 C-H 伸缩振动吸收增强,烯、炔、芳香化合物含量增多,进一步分析不饱和碳碳键的伸缩振动吸收特征峰,其中:炔 $2200 - 2100 \text{ cm}^{-1}$,烯 $1680 - 1640 \text{ cm}^{-1}$,芳环 $1600, 1580, 1500, 1450 \text{ cm}^{-1}$,可以看出,原油经 QB26 菌株作用后,芳香烃的含量增多,取代基的种类也增多。推测胶质降解后形成多种结构的芳香族化合物。

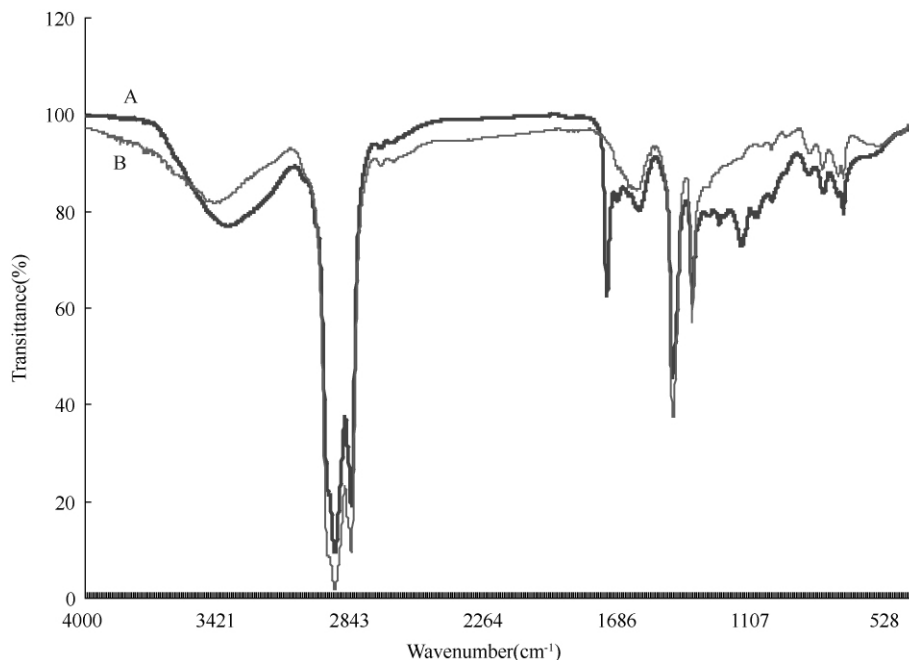


图 11 QB26 作用后原油的红外光谱图

Fig. 11 Infrared spectra of crude oil after degradation by strain QB26. A: Control, A18 well crude oil; B: A18 well crude oil after degradation by strain QB26.

2.4 结论

从中海油 NB35 - 2 油田地层水中筛选出 4 株降解稠油性能较好的菌株,分别为 QB26(地衣芽胞杆菌),QB36(白色地芽胞杆菌),Q4(嗜热脂肪地芽胞杆菌),QB9(油杆菌)。其中 QB26 菌株在油藏温度、矿化度和 pH 条件下,对 A18 井稠油有很好的降解作用,能够改变原油胶质、沥青质的化合物和结构,主要引起胶质、沥青质内含氧基团和甲基、亚甲基的出现或含量增加,原油品质得以改善,能降低原油粘度 38.7%,使原油中胶质相对含量降低 5.1%,沥青质相对含量降低 2.7%,同时生成新的轻质芳香烃组分。

参考文献

[1] Delshad M, Asakawa K, Pope GA, Sepehrnoori K.

Simulation of chemical and microbial enhanced oil recovery methods. *DEO/SPE Improved Oil Recovery Symposium*, Tulsa, Oklahoma, USA., 2002. SPE Paper 75237.

[2] Aitken CM, Jones DM, Larter SR. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature*, 2004, 431:291-294.

[3] Larter SR, Huang H, Adams J, Bennett B, Jokanola O, Oldenburg T, Jones M, Head I, Riediger C, Fowler M. The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface. Part II: Geological controls on subsurface biodegradation fluxes and constraints on reservoir-fluid property prediction. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin*. 2006, 90(6):921-938.

[4] 王春明,李大平,刘世贵. 稠油开采微生物的生理生化特征及其对原油特性的影响. 石油学报(*Acta*

- Petrolei Sinica*) 2007 28(5) : 89-92.
- [5] Banwari LA , Reedy MR , Agnihotri A , Kumar A , Sarbhai MP , Singh M , Khurana RK , Khazanchi SK , Misra TR. A process for enhanced recovery of crude oil from oil wells using novel microbial consortium , World Intellectual Property Organization , Patent No. WO/2005/005773.
- [6] Nagase K , Zhang ST , Asmi H , Yazawa , N , Fujiwara K , Enomoto H , Hong CX , Liang CX. A successful field test of microbial EOR process in Fuyu Oilfield , China. *SPE/DOE Improvement Oil Recovery Symposium* , Tulsa , Oklahoma , USA. 2002 , PE Paper 75238.
- [7] 包木太 , 范晓宁 , 曹秋芳 , 马爱青 , 郭省学. 稠油降粘开采技术研究进展. *油田化学 (Oilfield Chemistry)* , 2006 3(23) : 284-288.
- [8] 张廷山 , 任明忠 , 蓝光志 , 王红娟 , 姜照勇. 微生物降解作用对稠油理化性质的影响. *西南石油学院学报 (Journal of Southwest Petroleum Institute)* , 2003 , 5(25) : 1-4.
- [9] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社 2001.
- [10] 气相色谱质谱法测定沉积物和原油中生物标志物. 中华人民共和国石油天然气行业标准 (GB/T18606-2001).
- [11] 岩石中可溶有机物及原油族组分分析. 中华人民共和国石油天然气行业标准 (SY/T 5119-2008).

Isolation of viscous-oil degrading microorganism and biodegradation to resin

Dawei Wang^{1, 2*} , Jian Zhang^{1, 2} , Yibin Qi³ , Ting Ma³

¹ State Key Laboratory of Offshore Oil Exploitation , Beijing 100027 , China

² China National Offshore Oil Corporation (CNOOC) Research Institute , Beijing 100027 , China

³ Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology , Ministry of Education , College of Life Science , Nankai University , Tianjin 300071 , China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to isolate bacterial strains with high-efficiency to degrade resins. [Methods] We used resin-plate to isolate resin-degrading bacteria from the formation water of Nanbao35-2 oil field , China National Offshore Oil Corporation. The morphological properties and the sequence homology of 16S rRNA were used to identify the strains. The changes of four fractions contents and the infrared spectrometry of the heavy oil were used to analyze the degradation properties. [Results] Four strains , Q4 , QB9 , QB26 and QB36 , were isolated using resin as the sole carbon source. Based on the high sequence similarities (more than 99%) of 16S rDNA sequences analysis. These strains were identified as member of the *Petrobacter* sp. , *Geobacillus stearothermophilus* , *Bacillus licheniformis* , *Geobacillus pallidus* , respectively. QB26 , a *Bacillus licheniformis* , was the most efficient strain , it can grow well under anaerobic conditions , emulsify heavy oil well , and degrade resin and asphaltene in heavy oil. The relative content of saturated hydrocarbons in heavy oil increase after degradation , and the relative content of resin and asphaltene in heavy oil decreased 5.1% and 2.7% , respectively. [Conclusion] The strains isolated from Nanbao 35-2 oil field formation water could degrade resin and heavy oil. They have potential values in microbial enhanced oil recovery and oil pollution treatment.

Keywords: extra-heavy oil , resin , viscosity , *Bacillus licheniformis* , biodegradation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science and Technology Major Project (2011ZX05024-004)

* Corresponding author. Tel: + 86-40-84526275; Fax: + 86-40-64662989; E-mail: wangdw3@cnooc.com.cn

Received: 14 November 2011 / Revised: 3 February 2012