

两株假单胞菌对烃的作用及其协同效应

单金玉¹ 贾莹¹ 刘健¹ 黄英¹ 李玉萍² 陈智宇² 刘如林¹

(南开大学生命科学学院 天津 300071)¹ (大港油田油气勘探开发中心 天津 300282)²

摘要: 研究了两株假单胞菌 K80-A、K80-B 对大港油田官 69 原油的作用效果。实验证明, 能产生乳化因子和假溶因子的 K80-B 菌株对原油粘度的降低率为 51.6%、凝固点降低 2℃; 而只产生表面活性剂的 K80-A 菌株对同一原油的作用效果分别为 43.5% 和 3℃。当两菌株以等比例混合共同作用原油时, 以上指标均有明显提高。说明两菌株具有协同效应。矿场试验证明了混合菌种的优势。

关键词: 假单胞菌, 烃, 假溶活性, 乳化活性, 协同作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2002)04-0055-05

TWO PSEUDOMONAS ACT ON HYDROCARBON AND THEIR SYNERGISTIC EFFECT

SHAN Jin - Yu¹ JIA Ying¹ LIU Jian¹ HUANG Ying¹

LI Yu - Ping² CHEN Zhi - Yu² LIU Ru - Lin¹

(Life College, NanKai University, Tianjin 300071)¹

(Oil - gas exploration & development center of Dagang oil field, Tianjin 300282)²

Abstract: Two *Pseudomonas* strains, K80 - B and K80 - A, can use hydrocarbon as carbon source by two different mechanisms. Different effects can be observed when they are applied to 69-8 oil of Dagan Oil Field. The strain K80-B producing both hydrocarbon pseudosolubilizing factor and hydrocarbon emulsifying factor can decrease the viscosity and solidifying point of the 69-8 oil 51.6% and 2℃ respectively. Whereas the other can only decrease 43.5% and 3℃ respectively. When the two strains are mixed, synergistic effect on crude oil is obvious.

Key word: *Pseudomonas*, Hydrocarbon, Pseudosolubilization, Emulsion, Synergistic effect

微生物提高石油采收率 (Microbial enhanced oil recovery, MEOR) 是石油微生物学中发展最快最活跃的一个分支^[1]。随着研究的深入, 逐步开展了 MEOR 机理的研究。我们针对大港油田官 6 区块的地层条件 (73℃) 和原油性质 (蜡、胶含量均 > 24%) 进行了高温菌种的筛选, 得到分散乳化原油最佳的菌 K80, 经分离鉴定由两种不同的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 组成, 其中 K80-A 菌产糖脂类生物表面活性剂, K80-B 产假溶因子和乳化因子, 它们分别为糖蛋白和脂蛋白, 前者可将烃假溶成直径小于 0.45μm 的液滴, 利于菌体摄取; 后者可保持烃小液滴在水中的稳定性^[2]。本文对两菌株摄取烃的机制及对原油作用的协同效应进行了初步探讨, 并进行了矿场应用实验, 获得明显的增油效果。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株及培养基

菌株 K80-A、K80-B 为本室分离保存, 均为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。

收稿日期: 2001-05-24, 修回日期: 2001-08-25

液体石蜡种子培养基和原油培养基见文献[3]。

1.2 发酵液表面张力的测定^[4]

将菌株 K80-A、K80-B 分别接种到液蜡培养基中，定时取样，离心去细胞，用 JzhYI-180 界面张力仪测定上清的表面张力。

1.3 假溶活性和乳化活性的测定^[5]

假溶活性是以“溶解”在无细胞液中的烃含量 (mg/mL) 来表示的。将两菌株以液蜡为基质的发酵液过滤，离心除菌体，用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，然后按 2% 的量加十六烷到 50mL 滤液中，震荡 5min。再经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，转入分液漏斗，用正己烷抽提 3 次。取其上相 (己烷层)，以气相色谱内标法 (十二烷为内标) 测出十六烷含量，得出假溶活性 (mg/mL)。

乳化活性的测定：取 10mL 液蜡培养基的去细胞培养液，加入 0.1mL 各种不同的试验烃，于漩涡仪混匀 1min，静止 30min 后，立即于 610nm 测定 OD 值；以无机盐培养基加相应烃为各自对照；无机盐培养基为空白。

1.4 原油降解量的测定^[6]

精确称取官 69 油 2.0g，加入含 100mL 无机盐培养基的 250mL 锥形瓶中。灭菌后分别接种两菌株的液蜡种子液 2.0mL，于 37°C 培养 72h，测定微生物对原油的降解量。

1.5 菌株对原油粘度和凝固点的影响

分别将菌株 K80-A、K80-B 及等量混合菌种加入含 40g 原油的无机盐培养基。于 37°C 振荡培养 5d。培养后将油脱水，测定油的粘度和凝固点。

1.6 混合菌株作用后原油的气相色谱分析

取一定量混合菌作用后的油用 CS_2 溶解，取 $1\mu\text{L}$ 做色谱分析 (GC-TA 气相色谱仪)。

1.7 混合菌的矿场试验

以液蜡培养基混合发酵 K80-A、K80-B，从油井注入菌液 1.5t，关井 3d，然后开井生产，计量每天产液量、产油量；与注菌液前的生产纪录比较，计算两菌株的应用效果。

2 结果与讨论

2.1 液体石蜡培养液表面张力的变化

结果如图 1。可以看出，K80-A 无细胞液的表面张力随培养时间的延长明显降低，48h 表面张力降低了 30.2%，说明 K80-A 在液蜡培养基中生长时产生了表面活性剂；而

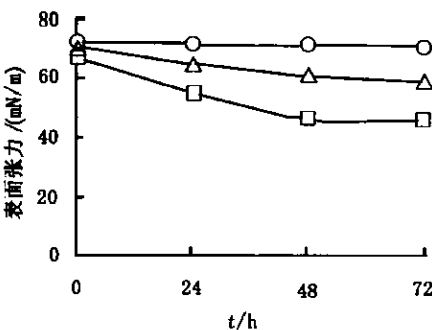


图 1 两菌株去细胞液表面张力

—□— K80-A, —△— K80-B, —○— 对照

K80-B 无细胞液的表面张力 48h 只降低了 13%。

2.2 两菌株去细胞培养液的假溶活性和乳化活性

2.2.1 假溶活性的测定：将 K80-A、K80-B 分别接种于液蜡培养基中，于 37°C 振荡培养至 24、48 和 72h，离心去菌体，测定其发酵液对十六烷假溶作用，假溶作用是“假溶因子”将烃“溶解”成直径小于 $0.45\mu\text{m}$ 的液滴。这对降低原油粘度，增加其流动性是十分有利的。研究结果表明，菌株 K80-B 在液蜡培养基生长过程中可产生大量假溶因子，其活性在 48h 达

1.116mg/mL, 而菌株 K80-A 只有 0.08mg/mL。

2.2.2 乳化活性的测定: 表 1 数据表明, 菌株 K80-B 对烷烃乳化活性远大于 K80-A, 表示 K80-B 发酵液中有乳化因子存在, 其乳化活性随着碳链的增长而增加。K80-A 因有表面活性物质产生, 对烃类亦有一定的乳化作用。

从上述实验结果可以看出, 假单胞菌 K80-A 和 K80-B 在烃中生长时, 其代谢产物不尽相同, K80-A 以产表面活性物质为主, 而 K80-B 则产生假溶因子和乳化因子, 这可能是由于微生物细胞对烃的摄取机制不同所致^[7]。

表 1 菌株 K80-A, K80-B 对烃的乳化作用 (OD_{610})

菌株	己烷	庚烷	辛烷	壬烷	十二烷	十六烷
K80-A	0.130	0.150	0.186	0.200	0.315	0.410
K80-B	0.137	0.224	0.405	0.410	0.840	0.910

2.3 对官 69 油的降解作用

结果见表 2。可以看出, 在 2% 原油培养基的实验条件下, 菌株 K80-B 的降油效果明显优于 K80-A。这是因为 K80-B 所产生的乳化因子和假溶因子使原油分散为小于 0.45 μ m 的小滴, 大大提高了菌体细胞

与油的接触面积, 加快了菌体细胞对油的摄取和利用。而 K80-A 主要产生表面活性剂, 虽可降低油水界面张力, 但菌体细胞与油的接触机率远不如 K80-B 大, 因此对油的摄取和利用率要低。而当两者等量混合接种时, 其效果比单菌株效果均好, 说明它们对烃的摄取具有协同作用。

2.4 对官 69 油粘度和凝固点的影响

实验结果见表 3。可以看出, K80-B 表现出比 K80-A 更好的降粘效果, 而且协同性也同样表现在对原油粘度和凝固点的影响。

2.5 作用后残油的气相色谱分析

两菌株等量混合接种官 69 原

油培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 下作用 3d, 分离作用后残油样, 进行气相色谱分析, 结果见表 4。从生油学角度常把 Pr/C17 和 Ph/C18 两个比值作为生物降解原油因子的重要指标。这两个比值越大, 原油中正构烷烃转变成异构烷烃的量越多, 原油的流动性越好^[8-9]。另外 C_{21+22}/C_{28+29} 的比值也是衡量微生物对原油作用的重要指标。该比值增大, 表明轻质组分增多, 原油中的部分重质组分被微生物降解^[9]。经混合菌种作用后的官 69 原油发生了明显变化; 其 Pr/C17 和 Ph/C18 分别上升了 16.91% 和 30.18%, C_{21+22}/C_{28+29} 则上升了一倍, 说明官 69 油的流动性明显增加, 这和前面的粘度测定结果是一致的。

表 2 不同菌株油降解量实验结果

菌株	原油量 (g)	残油量 (g)	分解率 (%)
K80-A	2.0	1.593	24.9
K80-B	2.0	0.951	52.45
K80-A + K80-B	2.0	0.759	62.5
对照	2.0	1.975	1.2

表 3 不同菌株对原油粘度和凝固点的影响

菌株	粘度 (mPa.s)	降低率 (%)	凝固点 ($^{\circ}$ C)	降低值 ($^{\circ}$ C)
K80-A	35	43.8	40	3
K80-B	30	51.6	41	2
K80-A + K80-B	28	54.84	40	3
对照	62	-	43	-

表4 80混合菌对69-8油作用后的气相色谱分析

菌种	Pr/C ₁₇	Pr/C ₁₇	Pr/C ₁₈	Pr/C ₁₈	C ₂₁₊₂₂ /C ₂₈₊₂₉	C ₂₁₊₂₂ /C ₂₈₊₂₉
		上升率(%)		上升率(%)		上升率(%)
混合菌	0.6071	16.91	0.6677	30.18	6.2421	101
对照	0.5193	-	0.5128	-	3.1020	-

注: 其中 Pr (Pristane, 姥姣烷) 为 2, 6, 10, 14-四甲基十五烷; Ph (Phytant, 植烷) 为 2, 6, 10, 14-四甲基十六烷

2.6 混合菌单井注入矿场试验

正是因为 K80-A、K80-B 用不同的机制摄取烃基质, 分别产生不同的胞外产物使水不溶性的烃变成“水溶性的”, 混合菌种才有如此好的效果。

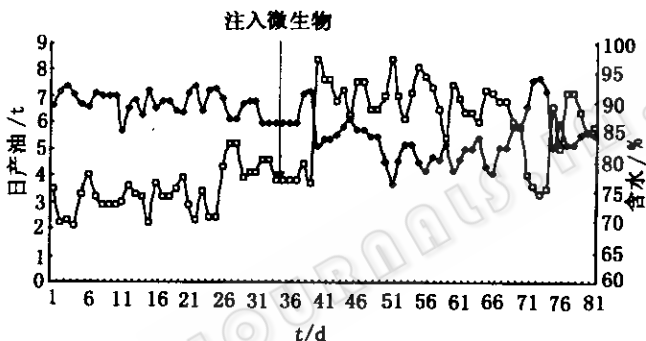


图2 混合菌单井注入生产曲线

—□— 日产油, —◇— 含水(%)

R80 混合菌种在室内实验的基础上于 99 年 9 月进行了单井吞吐试验 (图 2)。注入菌液 1.5t, 关井 3d 后, 油产量由原来的 3.5t/d 增加到 7.2t/d。连续增产 44d, 累计增油 190t 左右, 平均每吨菌液增油 126.6t。矿场试验结果进一步验证了室内实验的可靠性。在微生物提高原油采收率中, 假溶因子、乳化

活性因子和表面活性因子是关键因子, 为今后采油菌种的评价提供了可靠依据。

参考文献

- [1] R M 阿特拉斯 (美). 石油微生物学, 北京: 石油工业出版社, 1991.
- [2] 马 挺, 单金玉, 宋凤来, 等. 南开大学学报 (自然科学), 2002, 35 (1): 23 ~ 27.
- [3] 高 枫, 张心平, 梁凤来, 等. 南开大学学报 (自然科学), 1999, 32 (3): 158 ~ 162.
- [4] Cooper D G., Macdonald C R. Appl Environ Microbiol, 1981, 42 (3): 408 ~ 412.
- [5] Pranab G, Derendra H. Biotechnology and Bioengineering, 1991, 37:, 1 ~ 11.
- [6] 奚旦立, 孙裕生, 刘秀英, 等. 环境监测, 北京: 高等教育出版社, 1995.
- [7] Erickson R T, Nakahara T, Prokop A. Process Biochem, 1975, 10: 9 ~ 14.
- [8] 乐建军, 张春英. 油田化学, 1993, 10 (3): 238 ~ 241.
- [9] 李 牧, 杨 红, 刘宏伟, 等. 油田化学, 1999, 16 (2): 156 ~ 162.