

文章编号: 0253-2697(2010)06-0975-05

## 高温油藏内源微生物的堵调及种群分布

宋智勇<sup>1</sup> 郭辽原<sup>1</sup> 袁书文<sup>2</sup> 郝 滨<sup>1</sup> 吴晓玲<sup>1</sup>

(1. 中国石化胜利油田分公司采油工艺研究院 山东东营 257000; 2. 中国海洋大学 山东青岛 266100)

**摘要:** 针对高温高压油藏(65℃、11 MPa),以其中内源微生物群落为主要对象,利用物理模拟及分子生物学手段研究了内源微生物被激活后与多孔介质间的相互作用及其群落分布特征。研究发现,内源微生物激活后使岩心渗透率由 1.64  $\mu\text{m}^2$  降至 1.01  $\mu\text{m}^2$ 。多孔介质和油水两相界面均表现出显著的细胞截留能力,水驱 2PV 后产出液细菌浓度由  $10^8$  个/mL 降至  $10^6$  个/mL 以下,而每毫升岩心中细菌总量约为  $7 \times 10^8$  个。利用分子方法研究群落结构发现,以糖类、烃类和脂肪酸为底物的代谢活动已被激活并在产出液或岩心不同位置形成优势,并且产出液和岩心中产甲烷古菌一致,而岩心内细菌种类丰富(>20 种嗜热菌),且多样性高于产出液。

**关键词:** 高温油藏;微生物提高采收率;内源微生物;物理模拟实验;微生物堵调;群落结构

中图分类号: TE357 文献标识码: A

## Microbial plugging and community distribution of indigenous thermophilic microbes in high-temperature oil reservoirs

SONG Zhiyong<sup>1</sup> GUO Liaoyuan<sup>1</sup> YUAN Shuwen<sup>2</sup> HAO Bin<sup>1</sup> WU Xiaoling<sup>1</sup>

(1. Oil Production Technology Research Institute, Sinopec Shengli Oilfield Company, Dongying 257000, China;  
2. Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

**Abstract:** The present paper studied the community distribution of indigenous microbes and interactions between activated indigenous microbes and porous media by means of physical simulations and molecular microbiology under simulated reservoir conditions (65℃, 11MPa), and aimed at providing a basis for the field application of the microbial enhanced oil recovery in high-temperature reservoirs. The study showed that the permeability of porous media declined from 1.64  $\mu\text{m}^2$  to 1.01  $\mu\text{m}^2$  as indigenous microbes were activated, both porous media and the oil-water interface showed an obvious interception of cells, and the cell concentration in the produced liquid by 2PV flooding decreased from  $10^8$  cells/mL to  $10^6$  cells/mL, while the total concentration of microbes in porous media was  $7 \times 10^8$  cells/mL. The result of molecular microbiology analysis showed that activated indigenous microbes could metabolize carbohydrates, hydrocarbons and fat acids and accumulate in different parts of produced liquids and porous media. Moreover, genera of methanogenic archaea were the same both in produced liquids and porous media, while types of bacterial communities in porous media were abundant (more than 20 thermophilic genera) and their diversity was higher than that in produced liquids. These differences could help the field identification of microbial communities within reservoirs through produced liquids and provide a basis for enhancing the pertinence of microbial plugging in reservoirs.

**Key words:** high-temperature reservoir; microbial enhanced oil recovery; indigenous microbe; physical simulation; microbial plugging; community structure

作为微生物提高采收率技术(MEOR)重要手段之一的微生物堵调受到广泛关注<sup>[1-2]</sup>。目前,针对微生物堵调的研究主要围绕筛选的外源微生物及其代谢产生的聚合物或生物膜的封堵作用,实验收到良好效果,但大多堵调实验仍处于中低温条件( $\leq 50^\circ\text{C}$ )<sup>[2-6]</sup>。对分布广泛的高温油藏( $>60^\circ\text{C}$ )仍缺乏微生物堵调方面的实验数据支持,应用范围受限。而油藏内源微生物,特

别是高温、高盐油藏环境下,经过极端环境长期驯化和筛选,具有单独外源菌种难以比拟的适应能力<sup>[7]</sup>,并且减少了外源菌的生产、运输环节<sup>[8-9]</sup>。本实验室在前期研究了高温油藏内源微生物在模拟条件下的种群结构、代谢演变特征及其驱油效果<sup>[10]</sup>,并在此基础上利用物理模拟实验及分子生物学手段,研究了高温油藏驱油过程中内源微生物群落在多孔介质中的运移、分

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划(863)项目(2009AA063505)部分成果。

**作者简介:** 宋智勇,男,1979年10月生,2006年获大连理工大学环境工程专业博士学位,现为中石化胜利油田采油工艺研究院高级工程师,主要从事微生物提高采收率领域的研究工作。E-mail: songzhy232@yahoo.com.cn

布及其堵调等功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用原油、地层水和注入水样品均来自胜利油田某区块的油井及注水站,地下原油黏度为 46.3 mPa·s,地下原油密度为(0.880~0.925)g/cm<sup>3</sup>,产出水平均总矿化度为 5 923 mg/L, Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 离子含量为 71 mg/L。激活剂配方为<sup>[10]</sup>:尿素为 1 g/L,磷酸氢二铵为 1 g/L,淀粉水解液体积分数为 5%,硝酸铵为 0.1 g/L。

### 1.2 物理模拟实验

利用填砂岩心模拟该区块油藏条件,岩心长为 600 mm,直径为 38 mm,渗透率为 1.6±0.2 μm<sup>2</sup>,孔隙度为 0.31~0.33,孔隙体积为 208~221 mL,温度为 65℃,压力为 11 MPa,驱替速度为 1.0 mL/min。

实验步骤:①装填岩心,抽真空 2 h 后饱和地层水;②测定岩心孔隙度、渗透率;③饱和原油,出口设背压阀,加压至 11 MPa 并全程保持,计算含油饱和度;④一次水驱,注地层水至待产出液含水率达 99%;⑤注入 0.5 PV 激活剂,65℃恒温下放置一定时间;⑥二次水驱,注地层水至待产出液含水率达 99%,计算驱油效率,并对产出液进行取样分析。

利用最大可能计数法(MPN)及显微镜检法检测微生物浓度。岩心中滞留微生物提取方法:拆解岩心,量取 40 mL 岩心固体,加入 0.8% 无菌盐水,剧烈震荡后静置,沉降沙粒,取上层液体,如此反复清洗沙粒后,将全部上层液体在 8 133 r/min 下离心收集其中细胞,重新置于 40 mL 无菌水中,镜检计数并做群落分析。

在 4℃ 温度下,样品在转速为 9 092 r/min 离心 20 min,弃上清液,多次反复离心,富集沉淀。利用 DNA 提取试剂盒,提取基因组 DNA,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后置于 -20℃ 保存。

### 1.3 16SrDNA 扩增及变性梯度凝胶电泳分析

水驱产出液 DNA 样品的细菌 16SrDNA 扩增,引物:341f(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和 907r(5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3')。DGGE 样品扩增需要在前端引物 5' 端加 40 bp 的 GC 夹子,即 GC341f。25 μL 反应体系:2.5 mmol/L dNTP 2 μL,10×PCR-Buffer 2.5 μL,20 μmol/L 引物各 0.4 μL,5 U/μL Taq 0.2 μL,模板 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 16.5 μL。反应(温度、时长)程序依次设置为(各阶段用分号隔开):94℃、5 min;94℃、1 min,65~56℃、1 min,72℃、1 min,每 2 个循环降 1℃(该程序重复 20

个循环);94℃、1 min,55℃、1 min,72℃、1 min(该程序重复 10 个循环);72℃、6 min;完成反应。

古菌采用引物 A3F(5'-TTC Cgg TTg ATC CTg CCg gA-3')和 A9R(5'-CCC gCC AAT TCC TTT AAg TTT C-3')扩增,产物用于克隆测序,反应(温度、时长)程序依次设置为(各阶段用分号隔开):95℃、5 min;94℃、30 s,53.5℃、30 s,72℃、1 min(该程序重复 5 个循环);92℃、30 s,53.5℃、30 s,72℃、1 min(该程序重复 30 个循环);72℃、10 min;完成反应。

带 GC 夹的 PCR 产物用 DCode 通用突变检测系统进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。随即在凝胶成像分析系统照相,并进行必要的 DNA 条带切割、抽提,用无发夹结构的引物扩增,测序分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 内源微生物激活后对岩心渗透率的影响

首先考察模拟岩心中原位激活的内源微生物对岩心所起到的封堵作用,利用填砂岩心管(φ38 mm×L600 mm)装填水相渗透率 1.6 μm<sup>2</sup> 的多根岩心,同时注入实验区块油藏的地层水,并注激活剂 0.5 PV,分别培养不同时间测定水相渗透率的变化。

从图 1 数据可见,在高温、高压(65℃、11 MPa)条件下,多孔介质中原位激活的内源微生物对渗透率有显著的影响,在 3 d 时就使渗透率降低约 20%,培养 14 d 时进一步降低了 38%。这种渗透率随时间逐渐降低的过程体现出微生物的繁殖、代谢等生命活动区别于化学试剂的特点。

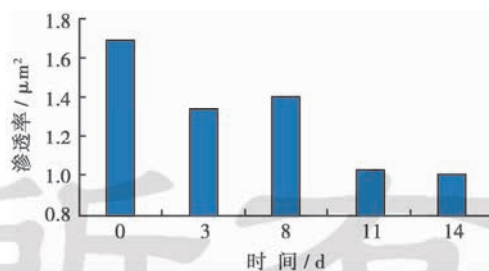


图 1 岩心中微生物激活后水相渗透率的变化

Fig. 1 Effect of activated indigenous microbe on water permeability in core samples

### 2.2 多孔介质对微生物总量及分布的影响

岩心产出液中菌体数量的变化情况如图 2 所示。从图 2 可见,注水会携带部分原位激活的内源微生物向前运移,水驱初期产出液中菌体浓度较高,达 10<sup>8</sup> 个/mL。但菌体浓度在后续水驱 0.6 PV 左右开始迅速衰减,到 2 PV 时产出液菌体浓度大幅降低至初使值的 1% 左右。



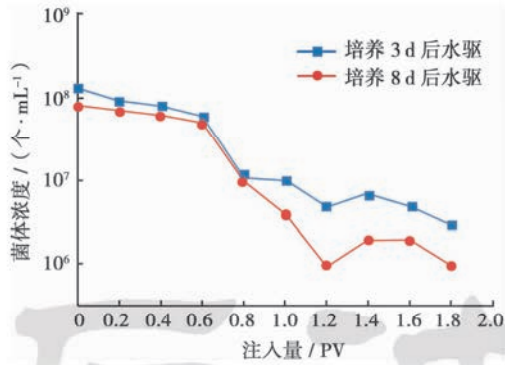


图2 原位激活后产出液微生物数量

Fig. 2 Cell concentration of produced water after activation in situ

对水驱后的岩心进行拆解,并在洁净操作台中进行取样,测定单位体积岩心中的菌体数量如图3所示。图3横坐标表示取样点在整个岩心中的相对位置,0为入口,1为出口。

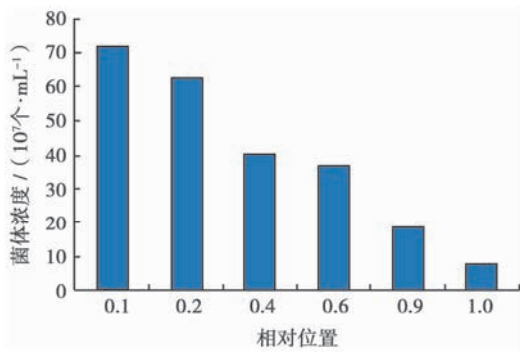


图3 岩心中单位体积砂粒上附着的微生物数量

Fig. 3 Cell concentration in porous medium of cores

从图3可见,水驱后岩心中的菌体数量仍然大大高于产出液,并且在岩心中的菌体数量沿注水方向逐渐降低。因此,产出液菌体数量的衰减并非菌体被完全冲洗,而是由于大多微生物倾向于留在原位,被注水带出的只是其中的少部分。内源微生物这种细胞滞留的特性与已报道的外源微生物在多孔介质中运移特性大致相同<sup>[6]</sup>。

尽管多数细胞滞留在原位,注水初期仍有 $10^6$ 个/mL以上的菌体随注水向下游运移,有必要研究其对下游岩心所造成的影响。利用填砂岩心管( $\phi 21\text{ mm} \times L170\text{ mm}$ )装填多根水相渗透率为 $1.6\ \mu\text{m}^2$ 的岩心,同时开展岩心中单纯水相与岩心中含剩余油的两组对照实验,以分别反映多孔介质和油水两相界面的截留作用,其中含剩余油的岩心含油饱和度为31%,其水相渗透率为 $0.82\ \mu\text{m}^2$ 。

水驱用菌液是在 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 下利用该区块地层水加激活剂培养而获得,当细菌浓度达 $3 \times 10^7$ 个/mL时连

续注入10 PV,监测产出液菌体浓度以及最终的水相渗透率变化。注入菌液后,无原油的对照岩心水相渗透率从 $1.6\ \mu\text{m}^2$ 降至 $0.74\ \mu\text{m}^2$ ,而含有剩余油的岩心,水相渗透率则从 $0.82\ \mu\text{m}^2$ 降至 $0.34\ \mu\text{m}^2$ 。两种情况下水相渗透率均下降了50%以上。

从图4可见,菌液经过该多孔介质后,菌体浓度比入口浓度降低了60%~95%,注入3 PV时出现峰值,然后逐步降低。这表明多孔介质对随水相而来的菌体同样有显著的截留作用,并且滞留量持续增大。另外,含油的两相流情况下产出液菌体浓度明显低于无剩余油的岩心,仅为注入时浓度的10%以下。这说明多孔介质中的油水两相界面增加了对菌体截留的贡献,同时,也体现了菌体细胞趋向界面并被吸附的特点<sup>[11]</sup>。

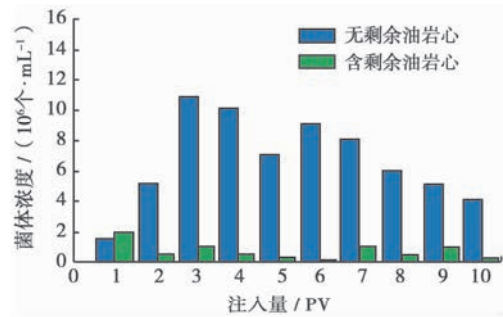


图4 产出液菌体浓度随注入量的变化

Fig. 4 Relation between cell concentration of produced liquid and injected volume

## 2.3 岩心不同位置内源微生物群落结构分布

### 2.3.1 古菌群落结构分析

由于古菌多样性较低<sup>[8]</sup>,直接对样品进行古菌16S rDNA克隆测序。结果表明,岩心中各位置以及产出液中古菌几乎都属于 *Methanothermobacter*,均为嗜热、自养型(以 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2$ 为底物)产甲烷菌。古菌种群的高度一致表明,产出液的群落结构可以很好地反映岩心中的情况。

另外,并未检出乙酸营养型产甲烷古菌,但在细菌分析中发现了利用乙酸并与产甲烷菌互营的细菌,通过这一途径保证了产甲烷活动的营养来源。

### 2.3.2 细菌群落结构分析

由于细菌群落多样性较高,需先利用 DGGE 观察其种群结构差异并做进一步分析,结果如图5所示。图5中泳道数字表示样品取自整个岩心中的相对位置,沿注水方向0为入口,1为出口。结果表明,岩心不同位置及产出液的群落结构并不完全一致,并且产出液的群落多样性明显低于岩心内部。为此,对多样性较高的岩心样品利用16SrDNA克隆测序获得多个



种群的序列,而对优势明显的条带则进行针对性切胶回收操作,获得单独优势菌种的序列。对测序结果进行比对,得到相应同源性最高的菌属(表1)。

表1 岩心样品细菌种群克隆测序比对结果  
Table 1 Sequencing results of bacteria community in core samples

登陆号	名称	覆盖率/%	同源性/%
GU086442.1	<i>Achromobacter sp.</i>	100	99
NR_026397.1	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	100	99
NR_024688.1	<i>Thermacetogenium phaeum</i>	98	96
FJ796691.1	<i>Firmicutes bacterium</i>	99	98
FJ802199.1	<i>Denitrifying bacterium</i>	100	90
GU339261.1	<i>Exiguobacterium</i>	100	99
AY684086.1	<i>Thermoanaerobacteriaceae</i>	100	95
FJ796698.1	<i>Clostridium sp.</i>	100	98
AB450762.1	<i>Caldicoprobacter oshimai</i>	97	99
FJ968635.1	<i>Arcobacter sp.</i>	99	98
EF198252.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	100	99
AB332034.1	<i>Tepidimicrobium sp.</i>	98	99
CP001145.1	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	100	99
EU638374.1	<i>Thermoanaerobacteriales</i>	99	94
AY703479.1	<i>Thermosediminibacter litori peruensis</i>	95	95
NR_028903.1	<i>Anaerobaculum mobile</i>	100	99
AB540984.1	<i>Moorella thermoacetica</i>	100	99
EU563362.1	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	100	99
EU031439.1	<i>Serratia marcescens</i>	99	99
AP009389.1	<i>Pelotomaculum thermo propionicum</i>	75	88

通过对样品的克隆测序分析发现,岩心中多为嗜热厌氧菌,并能在该模拟条件下代谢产生乙酸、表面活性剂等物质,有利于内源微生物群落的生长和驱油效率的提高。

值得关注的是,取自岩心中段的样品部分菌属 *Thermacetogenium phaeum* (克隆数从7个上升至13个)、*Achromobacter sp.* (克隆数从个1上升至6个) 相对入口端的克隆数显著上升。这说明乙酸氧化和烃类氧化菌数量随注水深入而显著提高,即岩心较深部的代谢以乙酸和烃类为主要底物。其中烃类代谢提高的原因是该处比入口端具有更高的含油饱和度,而乙酸则是注入营养和原油代谢的主要产物,随注水运移、累积至此成为主要底物;并且该乙酸氧化微生物能够与产甲烷菌互营生长<sup>[12]</sup>,弥补了本实验中乙酸营养型产甲烷菌的缺乏,保证了产甲烷过程的充足底物来源,对整体代谢完整性有重要意义。

另外,图5中出口端样品有2个条带(条带A和B)优势明显,并与产出液优势条带一致。经切胶回收、测

序比对,它们分别代表了 *Brevibacillus*(GU397391.1)和 *Thermotoga elfii*(EU276416.1)。其中 *Brevibacillus* 在石油领域的报道多用于研究降解原油产脂肪酸而提高采收率<sup>[13]</sup>, *Thermotoga elfii* 则发现于油藏、热泉等极端环境,以糖类为底物的极端嗜热、严格厌氧菌<sup>[14]</sup>。它们在岩心末端和产出液中的优势地位说明,在微生物驱油过程中经人工手段同时激活了糖类和烃类为底物的两大类代谢活动,进一步从内源微生物群落的角度验证了激活剂配方<sup>[10]</sup>达到了促进群落代谢活性提高和代谢途径多样化的目标。

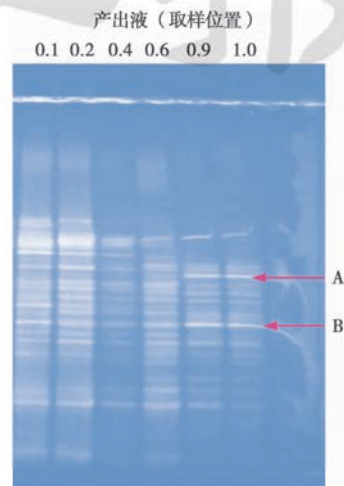


图5 岩心与产出液样品细菌 DGGE 分析

Fig. 5 Denaturing gradient gel electrophoresis of microbe in core and produced water

### 3 结论

(1) 在模拟油藏高温高压条件下(65℃、11 MPa),在岩心中原位激活以及随水相移动的内源微生物细胞均能显著降低岩心渗透率达20%~58%,显示出一定的堵调作用。

(2) 从生物量的角度来看,在模拟条件下,多孔介质及油水两相界面均对微生物细胞有显著的截留、吸附作用,微生物培养液经过岩心后菌体浓度降低了65%~99%,而岩心中菌体浓度则最高可达产出液的20倍以上。

(3) 从微生物种群结构的角度来看,一方面,岩心中的微生物多样性高于产出液;另外,岩心不同位置的群落结构亦有差别并呈现一定规律,其中,岩心中段的烃类和乙酸营养型菌种(*Thermacetogenium phaeum*, *Achromobacter sp.*)形成优势说明,原油及其他代谢物在岩心中的分布差异是影响微生物群落分布的重要因素之一。



## 参 考 文 献

- [1] Murray R G, Anthony Y, Julia M F. Potential microbial enhanced oil recovery processes: A critical analysis[R]. SPE 114676, 2008.
- [2] Gandler G L, Gbosi A, Bryant S L, et al. Mechanistic understanding of microbial plugging for improved sweep efficiency[R]. SPE 100048, 2006.
- [3] Suthar H, Krushi H, Anjana D, et al. Selective plugging strategy based microbial enhanced oil recovery using bacillus licheniformis TT33[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2009, 19(10): 1230-1237.
- [4] 王君, 马挺, 李蔚, 等. 一株高温解烃产黏菌的特性及其调剖驱油效果[J]. 化工学报, 2008, 59(3): 694-699.  
Wang Jun, Ma Ting, Li Wei, et al. Characterization of a mucoidal thermophile hydrocarbon-degrading bacterium and experiments on profile flooding[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering (China), 2008, 59(3): 694-699.
- [5] 郭万奎, 石成方, 万新德, 等. 大庆油田聚合物驱后微生物调剖先导性现场试验研究[J]. 石油学报, 2006, 27(增刊): 86-90.  
Guo Wankui, Shi Chengfang, Wan Xinde, et al. Study on pilot test of microbial profile modification after polymer flooding in Daqing Oilfield [J]. Acta Petrolei Sinica, 2006, 27(Supplement): 86-90.
- [6] 冯庆贤, 窦松江, 杨怀军, 等. 采油微生物在多孔介质中的运移与生长实验研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2003, 36(1): 126-128.  
Feng Qingxian, Dou Songjiang, Yang Huaijun, et al. Migration and growth of microorganism in porous medium[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis: Natural Science Edition, 2003, 36(1): 126-128.
- [7] Takahata Y, Nishijima M. Distribution and physiological characteristics of hyperthermophiles in the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66(1): 73-79.
- [8] 冯庆贤, 向廷生, Nazina T N, 等. 高温油藏内源微生物及其提高采收率潜力研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 496-501.  
Feng Qingxian, Xiang Tingsheng, Nazina T N, et al. Potential investigations of indigenous microbiological properties and its enhanced oil recovery high-temperature horizons[J]. Microbiology, 2008, 35(4): 496-501.
- [9] 程海鹰, 王修林, 徐登霆, 等. 内源微生物提高采收率实验研究[J]. 石油勘探与开发, 2006, 33(1): 91-94.  
Cheng Haiying, Wang Xiulin, Xu Dengting, et al. Experiments on EOR employing indigenous microorganisms[J]. Petroleum Exploration and Development, 2006, 33(1): 91-94.
- [10] 宋智勇, 郭辽原, 高光军, 等. 内源微生物驱油物模实验及其群落演变研究[J]. 石油钻采工艺, 2010, 32(1): 89-93.  
Song Zhiyong, Guo Liaoyuan, Gao Guangjun, et al. Succession of microbial community in physical simulation of indigenous microorganism flooding[J]. Oil Drilling and Production Technology, 2010, 32(1): 89-93.
- [11] 景贵成, 郭尚平, 俞理. 一株以原油为碳源的 *pseudomonas sp.* 菌化学趋向性研究[J]. 中国科学院研究生院学报, 2005, 22(2): 187-191.  
Jing Guicheng, Guo Shangping, Yu Li. Studies on the chemotaxis of a bacterium *pseudomonas sp.* using crude oil as carbon source [J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Science, 2005, 22(2): 187-191.
- [12] Hattori S, Kamagata Y, Hanada S, et al. *Thermacetogenium phaeum gen. nov., sp. nov.*, a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 1601-1609.
- [13] 伍晓林. *Brevibacillus Brevis* 和 *Bacillus Cereus* MEOR 机制的研究及在大庆油田的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2005.  
Wu Xiaolin. The mechanism and practice of MEOR by *brevibacillus brevis* and *bacillus cereus* in Daqing Oilfield[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005.
- [14] Ravot G, Magot M, Fardeau M L, et al. *Thermotoga elfii sp. nov.*, a novel thermophilic bacterium from an African oil-producing well[J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1995, 45(2): 308-314.

(收稿日期 2010-03-24 改回日期 2010-07-01 编辑 黄小娟)

## 《石油学报》2011年第1期部分文章预告(II)

中国储层地质模型 20 年.....	贾爱林
塔河奥陶系碳酸盐岩油藏缝洞系统发育模式与分布规律 .....	李 阳等
考虑变质量流水平井筒稠油携砂能力研究 .....	雷登生等
新型非均相复合驱油方法研究 .....	崔晓红
低渗透储层产量递减模型的渗流机理及应用 .....	陈新彬等
断块油藏中阶梯水平井的渗流特性分析 .....	任 岚等
碳酸盐岩气层岩电参数实验 .....	刘向君等
基于 POD 的埋地热油管道停输再启动模拟高效算法 .....	张劲军等
基于事故树的钻柱失效分析方法 .....	臧艳彬等
深水钻井条件下合成基钻井液流变性研究 .....	岳前升等
高温高压条件下 CO <sub>2</sub> /原油和 N <sub>2</sub> /原油界面张力研究 .....	王海涛等
三维离散元在煤层水平井井壁稳定的应用 .....	屈 平等
大型丛式井组平台位置优化方法 .....	李文飞等
钻机旋转系统的自适应 PID 控制策略 .....	李 琳等
锂盐早强剂改善油井水泥的低温性能及其作用机理 .....	王成文等