



# 贝莱斯芽孢杆菌 B6 强化驱油机制分析及在高矿化度油藏中的应用

陈显轲<sup>1,2,7</sup>, 孙培耀<sup>3\*</sup>, 蔡勇<sup>4</sup>, 张淼峰<sup>5</sup>, 张伟<sup>5</sup>, 杨博<sup>6</sup>, 马安周<sup>1,7</sup>

- 1 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085
- 2 中国科学院大学中丹学院, 北京 101400
- 3 青海油田分公司钻采工艺研究院, 甘肃 敦煌 736202
- 4 青海油田分公司采油五厂, 青海 茫崖 816400
- 5 青海油田分公司采油三厂, 青海 茫崖 816400
- 6 青海油田分公司采油一厂, 青海 茫崖 816400
- 7 中国科学院大学, 北京 100049

陈显轲, 孙培耀, 蔡勇, 张淼峰, 张伟, 杨博, 马安周. 贝莱斯芽孢杆菌 B6 强化驱油机制分析及在高矿化度油藏中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1948-1959.

CHEN Xianke, SUN Peiyao, CAI Yong, ZHANG Miaofeng, ZHANG Wei, YANG Bo, MA Anzhou. *Bacillus velezensis* B6: mechanism of enhanced oil recovery and application in highly mineralized oil reservoirs[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1948-1959.

**摘要:** 【目的】筛选油藏内源功能微生物并探究其驱油机理, 现场试验以确定油藏内源微生物提高原油采收技术应用的工艺和技术可行性。【方法】采集英东油田样品, 利用原油平板筛选驱油功能菌, 评价其环境适应性并优化培养条件, 通过乳化性能、降黏防蜡和烃转化能力等评估其驱油性能并探索其潜在机制, 并在油田现场进行微生物强化驱油试验。【结果】从油水样品中分离到的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) B6, 其乳化活性指数(emulsifying activity index, EI24)值为 100.00%, 降黏率为 97.20%, 防蜡率为 86.90%, 表明菌株 B6 具有良好的乳化降黏性能, 具有提高原油采收的潜力, 并且能够减少原油中的重质组分而增加轻质烃类, 改善原油物性, 提升原油品质。进一步在英东油田、跃进油田和花土沟油田进行微生物单井吞吐和清防蜡作业, 共进行

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200); 青海油田微生物采油技术推广应用(2022T01); 青海省科技计划(2022-QY-202)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200), the Extension and Application of Microbial Oil Recovery Technology in Qinghai Oilfield (2022T01), and the Qinghai Science and Technology Plan (2022-QY-202).

\*Corresponding author. Tel: +86-937-8920426, E-mail: sunpyqh@petrochina.com.cn

Received: 2023-09-01; Accepted: 2023-11-10; Published online: 2023-11-21

62 井次现场试验, 累计增油 1 460.36 t, 平均延长洗井周期 47 d, 经济效益为 342.50 万元, 投入产出比为 1:4。【结论】通过室内研究和现场试验, 证实内源微生物 *Bacillus velezensis* B6 具有显著提高原油采收和油井清防蜡的效果, 应用潜力巨大。

关键词: 微生物吞吐采油; 乳化降黏; 规模化发酵; 微生物清防蜡

## ***Bacillus velezensis* B6: mechanism of enhanced oil recovery and application in highly mineralized oil reservoirs**

CHEN Xianke<sup>1,2,7</sup>, SUN Peiyao<sup>3\*</sup>, CAI Yong<sup>4</sup>, ZHANG Miaofeng<sup>5</sup>, ZHANG Wei<sup>5</sup>, YANG Bo<sup>6</sup>, MA Anzhou<sup>1,7</sup>

1 Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2 Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101400, China

3 Drilling and Production Technology Research Institute of Qinghai Oilfield Company, Dunhuang 736202, Gansu, China

4 The Fifth Oil Production Plant of Qinghai Oilfield Company, Mangya 816400, Qinghai, China

5 The Third Oil Production Plant of Qinghai Oilfield Company, Mangya 816400, Qinghai, China

6 The First Oil Production Plant of Qinghai Oilfield Company, Mangya 816400, Qinghai, China

7 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract: [Objective]** To screen the indigenous functional microorganisms in reservoirs and explore their oil recovery mechanisms, we conducted field tests to determine the process and technical feasibility of enhancing crude oil recovery by indigenous microorganisms. **[Methods]** We collected samples from the Yingdong Oilfield and used oil plates to screen for the target bacteria. Next, we evaluated the environmental adaptability and optimized the culture conditions of the strain. Further, we measured the emulsifying, viscosity-reducing, paraffin-resistant, and hydrocarbon conversion abilities of the isolate to evaluate the oil recovery competence of the strain and explored its oil recovery mechanism. Finally, we carried out the microbial enhanced oil recovery tests in the oilfields. **[Results]** We isolated *Bacillus velezensis* B6 from the oil-water sample with an emulsifying activity index (EI24) of 100.00%, a viscosity reduction rate of 97.20%, and a paraffin resistance rate of 86.90%, which indicated that strain B6 had good emulsifying and viscosity-reducing abilities and improved oil recovery potential. Strain B6 could reduce heavy components in crude oil and increase light hydrocarbons to improve crude oil properties and quality. Moreover, we carried out single-well huff and puff and paraffin removal operations in Yingdong Oilfield, Yuejin Oilfield, and Huatugou Oilfield with a total of 62 well-times in the field test, which resulted in a cumulative oil increase of 1 460.36 tons and an average delay of 47 days in the well flushing cycle. The economic benefit was CNY 3.425 million, and the input-output ratio was 1:4. **[Conclusion]** The laboratory studies and field tests proved that indigenous *B. velezensis* B6 can significantly improve the oil recovery and well paraffin removal, with great application potential.

**Keywords:** microbial huff and puff; emulsification and viscosity reduction; large-scale fermentation; microbial paraffin removal

石油作为当今社会的重要能源之一, 在世界经济和人类社会的发展中起着至关重要的作用。自工业革命以来, 随着石油化工行业的深入发展, 全球石油需求量不断增加, 且原油价格持续上涨<sup>[1-2]</sup>。但是, 随着油田开采年限的增加, 常规易采石油资源储量越来越少, 原油采收率越来越低。目前地下油藏环境中仍有大量原油亟待有效开采, 其残留的剩余原油占60%–70%<sup>[3-5]</sup>。因此, 如何绿色、高效、经济地开采出地下剩余原油不仅是能源领域的研究热点, 而且事关国家经济发展和社会稳定。

微生物强化采油(microbial enhanced oil recovery, MEOR)是随着3次采油而发展的新兴技术, 具有工艺简单、成本低廉和环境友好等特点, 在国内外被广泛推广使用<sup>[6-11]</sup>, 是最具有发展前景的采油技术之一。微生物强化采油技术工艺主要包括微生物单井吞吐、微生物清防蜡、微生物驱替和微生物选择性封堵, 同时也开发了基于微生物强化采油的多种工艺的整合, 如多轮吞吐、清防蜡耦合单井吞吐等驱油技术。近20余年来, 筛选了大量高产生物表面活性剂或石油烃降解等的微生物, 绝大多数菌株已在室内研究中证实了其具有驱油的性能, 为提高剩余原油的采收奠定了坚实的基础, 但目前现场试验验证和应用仍严重不足<sup>[12]</sup>。目前, 胜利油田和大庆油田等是我国微生物强化驱油技术现场应用较为成熟且取得成果的油田<sup>[13-16]</sup>。然而, 油藏地层环境具有明显的地质特异性、非均质性强, 油藏模式复杂多样, 这导致微生物强化采油技术的具体应用表现出一定的特异性, 因而需要依据油藏环境和原油物性施用合适的驱油微生物。

针对青海油田地层油藏环境矿化度较高和原油采收率较低等现实问题, 本文通过对筛选获得的内源微生物贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) B6生长及其功能特征的研究, 从而评

估该菌株对原油的作用效果。该菌株经规模化培养后在英东油田、跃进油田和花土沟油田开展微生物单井吞吐和清防蜡试验, 实现原位乳化降黏和井筒清防蜡, 提高原油流动性并增加油井洗井周期, 验证其实际应用价值。本研究为开发适用于较高矿化度油藏中稠油冷采的绿色生物采油体系提供了科学依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和设备

葡萄糖、石蜡油、琼脂粉、氯化钠、磷酸氢二钾和七水合硫酸亚铁等分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司; 正己烷等色谱纯有机试剂购自Thermo Fisher Scientific公司。气相色谱-质谱联用仪(岛津公司), 多功能酶标仪(SpectraMax i3x, Molecular Devices公司), 表面张力仪(Lauda Scientific公司), 流变仪(HAAKE™ Viscotester™ iQ, Thermo Fisher Scientific公司), 光学显微镜(Olympus公司)。现场作业使用泵车( $2.5 \times 10^4$  Pa)、罐车( $30 \text{ m}^3$ )等专业设备。

### 1.2 样品采集

使用10 L无菌塑料桶, 在英东油田油井工作过程中采集油水样, 在4 °C条件下送至实验室进行下一步分析。

### 1.3 驱油微生物的筛选及鉴定

#### 1.3.1 培养基及培养条件

原油培养基(g/L): 原油 20,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5,  $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, SDS 0.01, pH 6.5–7.5。固体原油培养基中加入琼脂粉 8 g/L。115 °C灭菌 45 min。

改良LB培养基(Medium A) (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 20,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, pH 6.8–7.2。115 °C灭菌 30 min。

发酵培养基(Medium B) (g/L): 葡萄糖 30, 酵母粉 4, 胰蛋白胨 8,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2, NaCl 20,

pH 6.8–7.2。115 °C灭菌 30 min。

培养条件：37 °C，150–200 r/min。

### 1.3.2 菌株 B6 的分离纯化及鉴定

将油水样接种到原油培养基中培养 10 d 后采用稀释平板法进行驱油功能微生物的分离纯化。取 100  $\mu$ L 稀释度为  $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-9}$  的菌液涂布于固体原油培养基上，挑选平板上具有不同菌落形态和较大透明圈的菌株作为实验菌株，再次进行稀释涂布培养。随后，挑取单菌落转接到改良 LB 培养基中培养 24 h，使用通用引物 27F/1492R 扩增 16S rRNA 基因全长序列<sup>[17]</sup>，由金唯智生物科技(北京)有限公司测序后基于基因信息确定菌株的分类地位。

## 1.4 菌株环境适应性评价

### 1.4.1 pH

配制发酵培养基，使用 HCl 或 NaOH 调节培养基的 pH 分别为 6.0、7.0、8.0 和 9.0， $OD_{600}$  为 1 的菌液接种量为 1%，37 °C、200 r/min 振荡培养，定期取样测量菌液在 600 nm 处的光密度值。

### 1.4.2 温度

配制发酵培养基，在 30、37、40 °C 和 50 °C 条件下培养， $OD_{600}$  为 1 的菌液接种量为 1%，37 °C、200 r/min 振荡培养，定期取样测量菌液在 600 nm 处的光密度值。

### 1.4.3 矿化度

配制 NaCl 浓度分别为 20、100 和 150 g/L 的发酵培养基， $OD_{600}$  为 1 的菌液接种量为 1%，37 °C、200 r/min 振荡培养，定期取样测量菌液在 600 nm 处的光密度值。

## 1.5 菌液性能评价

### 1.5.1 乳化性能

通过乳化活性指数(emulsifying activity index, EI24)对菌液进行乳化性能评价<sup>[18]</sup>。以石蜡油作为原油替代物，分别各取 2 mL 石蜡油与菌株上清发酵液加入到 10 mL 试管中，并记录上层有机相总高度。使用漩涡振荡器振荡约

3 min，混匀后室温静置 24 h，记录白色乳化层高度，并计算 EI24 值。以培养基作空白对照，设置 3 组平行。其中， $EI24 = \text{乳化层高度} / \text{有机层总高度} \times 100\%$ 。

### 1.5.2 原油黏度和防蜡率测定

使用流变仪测定菌株 B6 处理前后 37 °C 条件下的原油黏度，采用倒扣瓶法评估菌株 B6 对原油的防蜡率，原油黏度和防蜡率的具体操作方法参考文献[18]。其中，原油黏度为 2 630.42 mPas，含蜡量为 25.00%。

### 1.5.3 表面张力测定

采用悬滴法测定菌株 B6 发酵上清液的表面张力<sup>[19]</sup>。取 40 mL 发酵菌液，10 000 $\times$ g 室温离心 10 min，取发酵上清液，利用表面张力仪测定菌株发酵液的表面张力，测定 3 次，取平均值。

### 1.5.4 石油烃 C10–C40 分析

处理后的原油样品使用超声萃取法提取，正己烷稀释后使用气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)进行分析，详细的处理和操作方法参考文献[20]。

### 1.5.5 四组分测定

采用薄层色谱-火焰离子化检测(thin-layer chromatography with flame ionization detection, TLC-FID)技术对残余油样品中的烷烃、芳香烃、树脂和沥青质 4 种组分含量进行分析<sup>[21]</sup>。

## 1.6 菌株 B6 的现场应用

### 1.6.1 油井概况

现场微生物单井吞吐和清防蜡试验油井井深 1 121–1 767 m，油藏温度 34–53 °C，平均油井热洗周期 45 d。单井储层孔隙度 15%–24%，渗透率 30–89 md。原油黏度 2 000–4 000 mPas，地层水矿化度为 100 000–140 000 mg/L，平均 pH 为 8.5。

### 1.6.2 现场施工

规模化发酵：配制发酵培养基，规模化发酵参数如下：转速 80–150 r/min，37 °C，压力 0.3–0.5 MPa，通气比 0.3–0.5 VVM。

单井吞吐作业：单井吞吐施工液中菌液浓度为15%，营养液浓度为6%，pH约为8.0。根据试验油井油层厚度、孔隙度和处理半径最终确定注入施工液量为6–10 m<sup>3</sup>。使用套管环空注入法，从油套环空间注入单井吞吐施工液，注入排量控制在0.2–0.3 m<sup>3</sup>/min，注入压力控制在1.5×10<sup>4</sup> Pa内，在注入过程中根据注入泵压等动态参数的变化情况调整注入速度和注入量。待全部注入后，关井7 d后开井作业，定期监测油井产量。

清防蜡作业：清防蜡作业液中菌液浓度为30%，营养液浓度为8%，pH约为8.5。采用套管注入方式，注入量为1 m<sup>3</sup>，注入完成后油井正常生产，定期监测油井示功图，评估洗井周期。

### 1.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析和图示化，误差棒表示标准差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 B6 的鉴定及其生长性能

基于在线工具 NCBI BLAST ([\[ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi\]\(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi\)\)和 EZBioCloud \(\[www.ezbiocloud.net/identify\]\(http://www.ezbiocloud.net/identify\)\)对筛选获得的驱油功能菌株 B6 的 16S rRNA 基因全长序列进行比对分析，结果表明菌株 B6 属于 \*Bacillus\* 属，\*Bacillus velezensis\* 种。使用 MEGA 11.0<sup>\[22\]</sup>构建进化树后使用 iTOL \(<https://itol.embl.de/>\)对进化树进行美化调整。菌株 B6 与 \*B. velezensis\* CR-502、\*B. velezensis\* JK19 和 \*B. velezensis\* JS25R 等亲缘关系更近\(图 1\)，命名为 \*B. velezensis\* B6，NCBI 序列号为 OR277460。国内外关于 \*B. velezensis\* 的研究主要集中在拮抗动植物病原菌，促进动植物生长等方面<sup>\[23-26\]</sup>。最近的一篇报道表明 \*B. velezensis\* 由于其高产生物表面活性剂而在微生物强化驱油中取得了良好的应用效果，但是其环境适应性和驱油功能特性与菌株 B6 存在不同<sup>\[27\]</sup>。此外，与菌株 B6 亲缘关系更近的 \*B. velezensis\* SRCM102755 等菌株基因组中均含有生物表面活性剂合成基因 \*srfAA\*、\*srfAB\* 和 \*srfAC\*<sup>\[28\]</sup>。因此，该菌在微生物强化采油中可能具有重要作用。](https://blast.</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

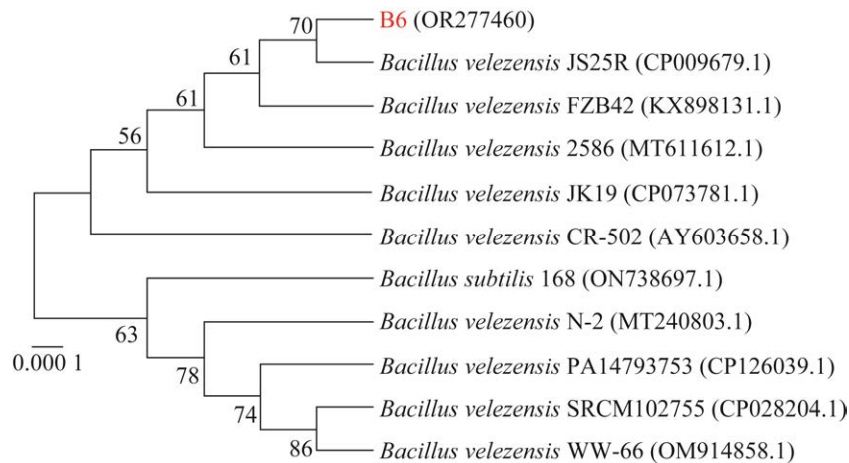


图 1 菌株 B6 的系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic tree analysis of strain B6. The phylogenetic tree (bootstrap consensus tree) of 16S rRNA gene of strain B6 was constructed by neighbor-joining method. Numbers at nodes are bootstrap values (>50%) based on 1 000 replications. Bar, 0.000 1 substitutions per nucleotide position.

根据生长曲线(图 2), *B. velezensis* B6 在培养过程中表现出较短的生长周期, 培养 5 h 即可达到对数期, 12 h 后逐渐到达生长稳定期。在 pH 6.0–8.0 时菌株 B6 表现出良好的生长趋势, 而在 pH 9.0 时, B6 则几乎不生长(图 2A), 且与 *B. velezensis* BSA1 相比在 pH 8.0 时能更快地到达生长稳定期<sup>[27]</sup>; 菌株 B6 的生长能力随着培养温度的升高表现出先增强后降低的趋势, 30 °C 延缓了其的对数期(图 2B); 在 100 g/L 以上的矿化环境中, 菌株 B6 的生长受到了一定的限制(图 2C); 菌株 B6 在发酵培养基中比在改良 LB 培养基中表现出较高的生长优势(图 2D)。综上所述, *B. velezensis* B6 在 pH 6.0–8.0、30–40 °C 的环境中能够良好生长, 在 100 g/L 的矿化度以上

生长受到一定抑制, 说明本研究分离得到的菌株 B6 能够较好地适应油田油藏环境, 具有实际应用的潜在价值。

## 2.2 菌株驱油功能特性评价

菌液具有较低的表面张力和较高的乳化能力能在提高原油采收率方面起着重要作用<sup>[29]</sup>。如表 1 所示, 菌株 B6 发酵上清液的表面张力(27.33 mN/m)显著低于纯水的表面张力(72.80 mN/m), 良好的表面活性剂能够显著降低表面张力, 可以有效改变油、岩、水的界面状态, 有助于提高地层中油相的流动性, 从而提高驱油效率<sup>[30]</sup>。将发酵上清液与液体石蜡混合后, EI24 值为 100.00%, 具有优良的乳化性能, 并高于先前单菌或混合菌系的研究结果。如, Liu 等<sup>[31]</sup>测

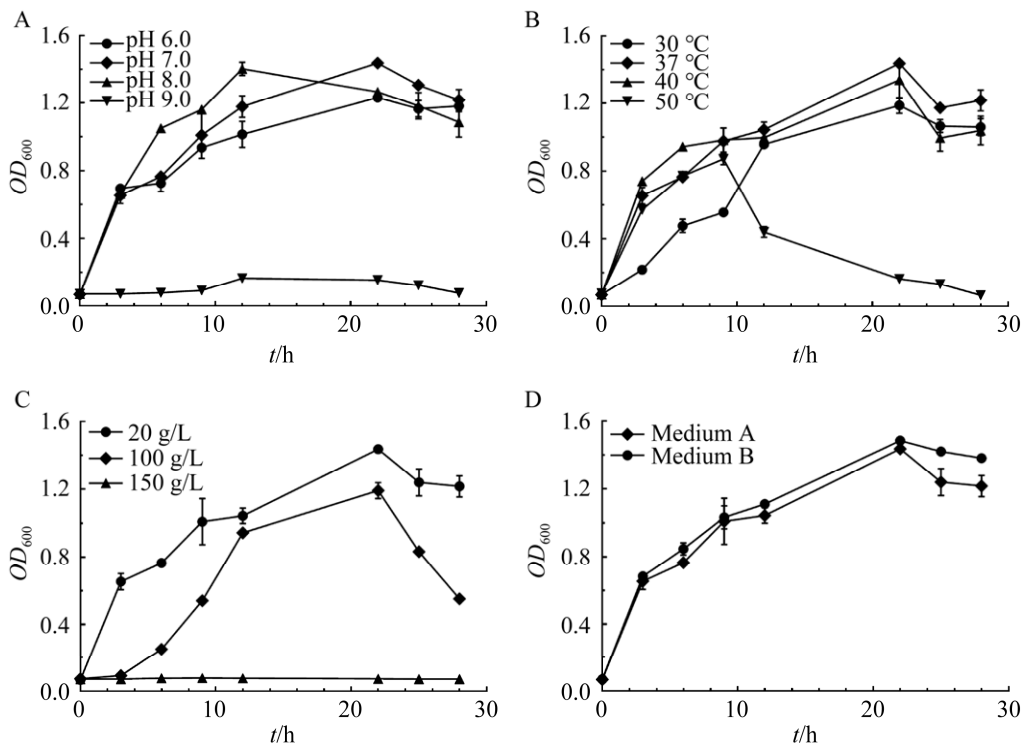


图 2 菌株 B6 在不同环境下的生长曲线分析 A: pH. B: 温度. C: 矿化度. D: 培养基对菌株 B6 生长的影响

Figure 2 Analysis of growth curves of strain B6 in different environments. Effects of pH (A), temperature (B), salinity (C), and media (D) on the growth of strain B6. Medium A and Medium B represent improved LB medium and fermentation medium, respectively. Error bar represents the standard deviation (SD).

表 1 不同培养基中菌株 B6 的驱油性能评价

Table 1 Evaluation of oil recovery performance of strain B6 in different media

Media	Surface tension (mN/m)	EI24 (%)	Paraffin control rate (%)	Viscosity reduction rate (%)
Improved LB medium	27.95	96.54	86.90	95.08
Fermentation medium	27.33	100.00	74.00	97.20

定的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) L20 发酵上清液的 EI24 值为 62.00%，魏晓霞等<sup>[18]</sup>测定了来源于青海油田的混合菌系 QZ-10 的 EI24 值为 91.11%。因此，以上结果表明菌株 B6 产生的生物表面活性剂其性能更为突出，具有较高的应用于微生物强化驱油的潜力。

此外，经菌株 B6 处理后，倒扣瓶法测得的其防蜡率均高于 70.00%，在 37 °C 条件下降黏率最高可达到 97.20% (表 1)。王卫强等<sup>[32]</sup>从石油污染土壤中分离筛选获得的一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) W12#，其防蜡率为 34.66%，降黏率为 63.75%，表明菌株 B6 在防蜡和降黏等方面一定程度上优于先前的研究。此外，菌株 B6 使用发酵培养基进行发酵培养时，其乳化和降黏性能优于改良 LB 培养基(表 1)，表明大规模培养菌株 B6 时使用发酵培养基可能具有较好的驱油效果。综上所述，*B. velezensis* B6 的驱油性能不仅强于单菌而且优于混合菌系，具有强化驱油的潜力，环境适应性良好，可用于微生物单井吞吐和油井清防蜡作业。

### 2.3 原油组分变化特征

原油通常是一种化学成分复杂的黑色易燃液体，根据其在有机溶剂中的溶解度不同，可分为饱和烃、芳香烃、树脂和沥青质<sup>[33]</sup>。使用发酵培养基对菌株 B6 处理前后的原油进行四组分测试，各组分含量如图 3 所示。经菌株 B6 处理后，原油中的饱和烃含量显著增加了 4.38% ( $P < 0.0001$ )，芳香烃、树脂和沥青质含量减少，其中沥青质在处理前后含量差异不大(图 3)。这可能是该菌较强的乳化性能提高了细菌

对疏水性烃类的可利用性，从而提高了长链或大分子多环烃的降解<sup>[34-35]</sup>。此外，沥青质等大分子是原油高黏性和油井堵塞的主要原因<sup>[36]</sup>，该菌在一定程度上能够降解该类大分子物质。因此，表明菌株 B6 能够将原油中的大分子重质物质，如树脂和沥青质，降解成小分子轻质石油基组分，增加了原油流动性，提高了原油的品质。

对菌株 B6 处理前后原油中的饱和烃 (C10–C40) 进行检测，分析处理前后不同饱和烃组分的含量变化，以探讨对原油物性的影响。与空白组相比，使用改良 LB 培养基培养时，C10–C20 的含量增加了 5.60%，C21–C30 和 C31–C40 的含量分别减少了 4.18% 和 1.42%；使用发酵培养基培养时，C10–C20 的含量增加了 6.28%，C21–C30 和 C31–C40 的含量分别减少了 4.60% 和 1.68%。随着碳数的增加，菌株 B6 处理后原油中的饱和烃降解率呈现下降趋势，特别是 C30–C40 范围内的烃类物质(图 4)。结果

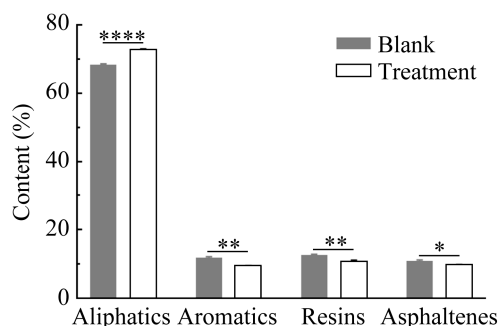


图 3 原油四组分组成分析

Figure 3 Analysis of four components of crude oil. Unpaired *t* test, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

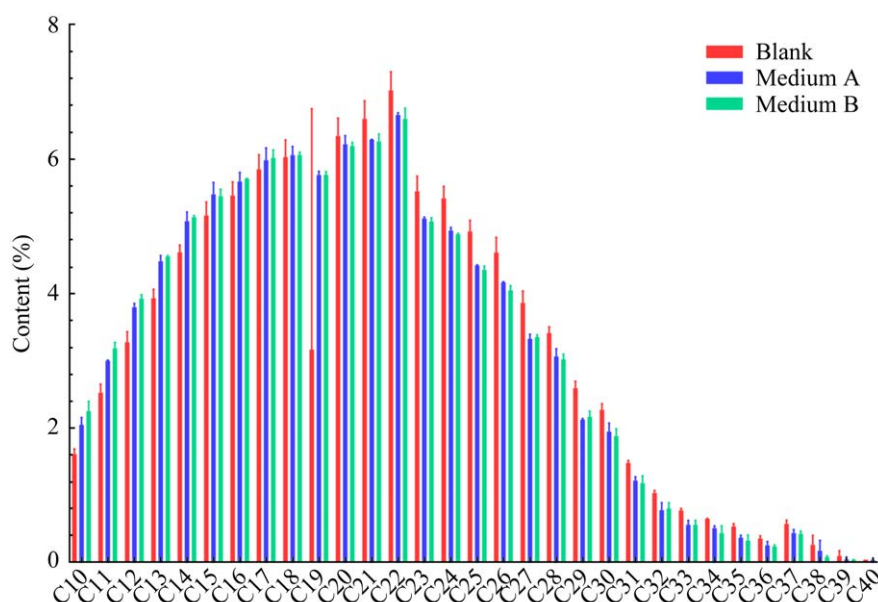


图 4 原油中饱和烃 C10–C40 组成分析

Figure 4 Analysis of C10–C40 composition in crude oil. Medium A and Medium B represent improved LB medium and fermentation medium, respectively.

表明, 菌株 B6 能够对长链饱和烃进行分解, 因此原油中大分子组分的减少和短链烃的增加有效地降低了原油的黏度, 改变了原油物性。此外, 当碳数高于 20 时, 易出现结蜡现象, 经处理后碳数高于 20 的长链饱和烃明显减少, 这有助于减缓油井结蜡现象, 延长洗井周期<sup>[37]</sup>。综上所述, *B. velezensis* B6 能够降解原油中的大分子重质组分和长链烃等物质, 表明该菌在油田微生物驱油和油井清防蜡中具有良好的应用前景。

#### 2.4 单井吞吐与清防蜡效果评价

微生物单井吞吐具有见效快、操作简单等优点, 是常用的一种微生物驱油工艺, 且一般会使用多轮吞吐操作以提高其有效期和原油采出率。微生物单井吞吐和清防蜡作业选用的是以产生生物表面活性剂为主的 *B. velezensis* B6 及其发酵产物的混合物, 其混合液 pH 值为 6.6–7.5, 每毫升菌数 $\geq 10^8$  个。在现场作业前, 对菌液进行乳化性能测试, EI24 值均为 100.00%。结合

室内研究结果和油藏环境以及先前操作经验<sup>[27]</sup>, 在英东油田、跃进油田和花土沟油田进行微生物单井吞吐和清防蜡试验。其中, 微生物单井吞吐主要评价指标为油井的日产液量、日产油量和含水率, 而微生物油井清防蜡则以洗井周期和油井载荷为主要评价指标(图 5)。

如图 5A–5C 所示, 微生物单井吞吐作业前油井的平均日产液量为 4.12 t, 日产油量为 1.05 t, 含水率 65.61%; 作业后油井的平均日产液量为 5.02 t, 日产油量为 1.56 t, 含水率 60.05%, 微生物单井吞吐有效率 100%。与作业前相比, 平均日产液增加 0.9 t, 平均日增油 0.51 t, 平均含水率降低了 5.56%, 作业后驱油效果显著, 且采油率高于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) XT-1 和螯合球菌(*Chelatococcus daeguensis*) HB-4 岩芯驱油的结果<sup>[38-39]</sup>, 表明使用油藏内源微生物 *B. velezensis* B6 的强化驱油效果更为显著。先前的研究表明, 注入菌液制剂可以激活油藏中的其他功能微生物, 如产表面活性剂、石油烃降



解和产气体的微生物，不同功能微生物的综合作用有助于提高石油采收率<sup>[27]</sup>。此外，吞吐油井能够有效延长洗井周期，这可能归功于微生物对大分子重质原油组分的降解转化，原油物性得到了改善。在油井清防蜡现场试验中，处理前平均洗井周期为 45 d，处理后平均洗井周期为 92 d，平均延长洗井周期 47 d (图 5D)，清防蜡有效率 96.55%，优于 QZ-10 混合菌液的作业效果<sup>[18]</sup>。作业前油井最大载荷与最小载荷差值的平均值为 19.68 kN，作业后油井最大载荷与最小载荷差值的平均值为 17.38 kN，作业后油井载荷显著降低(图 5E)。上述相关数据表明该菌能够有效地改善油井载荷，降低采油负荷。综上所述，*B. velezensis* B6 具有良好的现场应用效果，在提高原油采收率方面具有很大的实

际应用价值。

## 2.5 经济效益

在英东油田、跃进油田和花土沟油田进行微生物单井吞吐和清防蜡作业，共进行 62 井次现场试验。微生物单井吞吐作业后平均日增液量最大值 4.32 t，平均日增油最大值 1.97 t，最大有效期 138 d；作业后平均日增液量最小值 1.29 t，平均日增油最小值 0.32 t，最小有效期 35 d。吞吐前后对比，产液量累计增加了 1 613.22 t，产油量累计增加了 1 124.85 t，平均有效期 128 d。原油结算价格按 3 000 元/t 计算，经济效益为 249.00 万元，投入产出比为 1:3.8。清防蜡作业后累计增油 335.51 t，平均延长洗井周期 47 d，经济效益为 93.50 万元，投入产出比为 1:4.8。

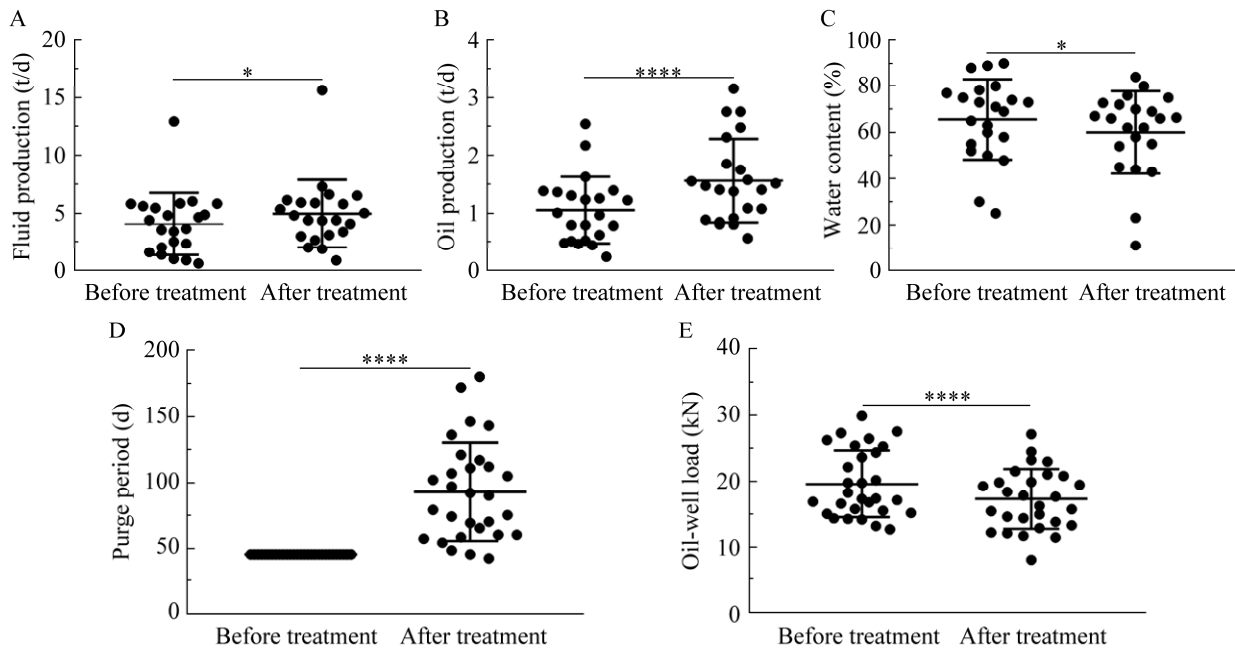


图 5 微生物单井吞吐和油井清防蜡效果评价 产液量(A)、产油量(B)和含水率(C)用于评估微生物单井吞吐效果，洗井周期(D)和油井载荷(E)用于评估清防蜡效果

Figure 5 Evaluation of microbial single well huff and puff and oil-well paraffin removal. Fluid production (A), oil production (B), and water content (C) are used to evaluate the effectiveness of microbial single well huff and puff. Purge period (D) and oil-well load (E) are used to evaluate the effectiveness of paraffin removal. Paired *t* test, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

### 3 结论

在地下油藏环境中, 微生物生长代谢过程中所产生的生物活性物质具有改善油藏环境、乳化原油、降低原油黏度和改变原油物性等功, 从而提高残余原油的采收率<sup>[40]</sup>。本研究从英东油田油水样中筛选到一株能够产生生物表面活性剂的 *B. velezensis* B6, 该菌具有适应较高矿化度油藏环境的能力, 表现出优良的乳化降黏性能。此外, 通过对处理前后原油组分的分析, 表明菌株 B6 能够降低大分子重质石油组分, 如树脂和沥青质, 增加了小分子短链饱和和烃等轻质烃组分, 改善原油物性, 提高了原油的流动性和原油的品质。规模化发酵的菌液在英东油田、跃进油田和花土沟油田进行微生物单井吞吐和清防蜡试验, 现场试验效果好, 累计增油 1 456.36 t, 平均延长洗井周期 47 d, 经济效益为 342.50 万元, 投入产出比为 1:4。综上所述, *B. velezensis* B6 能够较好地应用于微生物单井吞吐和清防蜡等微生物强化采油。但是, 针对清防蜡作业仍需要优化工艺参数, 包括培养基的选择、菌液的注入量和注入方式, 以提高现场作业效率。此外, 鉴于油井层间较强的非均质性, 下一步可通过组学技术、原油指纹图谱和驱油模型等多角度的交叉分析, 了解并确定改善原油物性的关键机制和因素, 并完善长期原油采收监测技术, 建立适合多层间的油井组微生物强化驱油工艺体系。

### 参考文献

- [1] SONG YG, ZHANG XY, HU GH. Relationships among geopolitical risk, trade policy uncertainty, and crude oil import prices: evidence from China[J]. Resources Policy, 2023, 82: 103555.
- [2] CHAI J, WANG YR, WANG SY, WANG YY. A decomposition-integration model with dynamic fuzzy reconstruction for crude oil price prediction and the implications for sustainable development[J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 229: 775-786.
- [3] BROWN LR. Microbial enhanced oil recovery (MEOR)[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(3): 316-320.
- [4] GUO K, LI HL, YU ZX. *In-situ* heavy and extra-heavy oil recovery: a review[J]. Fuel, 2016, 185: 886-902.
- [5] KANG WL, ZHOU BB, ISSAKHOV M, GABDULLIN M. Advances in enhanced oil recovery technologies for low permeability reservoirs[J]. Petroleum Science, 2022, 19(4): 1622-1640.
- [6] LAZAR I, PETRISOR IG, YEN TF. Microbial enhanced oil recovery (MEOR)[J]. Petroleum Science and Technology, 2007, 25(11): 1353-1366.
- [7] 汪卫东. 微生物采油技术研究及试验[J]. 石油钻采工艺, 2012, 34(1): 107-113.  
WANG WD. Laboratory research and field trials of microbial oil recovery technique[J]. Oil Drilling & Production Technology, 2012, 34(1): 107-113 (in Chinese).
- [8] 侯研博, 宋欣, 孙刚正, 谭晓明. 新型激活剂提高内源微生物驱油效果研究及应用[J]. 石油与天然气化工, 2018, 47(5): 85-89.  
HOU YB, SONG X, SUN GZ, TAN XM. Research and application of the new activator to improve the effect of MEOR[J]. Chemical Engineering of Oil and Gas, 2018, 47(5): 85-89 (in Chinese).
- [9] 宋永亭, 李彩凤, 曹嫣媛, 孙刚正, 吴晓玲. 内外源微生物复合吞吐技术在常规稠油低效井中的研究与应用[J]. 石油钻采工艺, 2018, 40(3): 400-404.  
SONG YT, LI CF, CAO YB, SUN GZ, WU XL. Research and application of indigenous and exogenous microbial compound huff & puff technique in conventional heavy oil low-efficiency wells[J]. Oil Drilling & Production Technology, 2018, 40(3): 400-404 (in Chinese).
- [10] ZHENG CG, HE JL, WANG YL, WANG MM, HUANG ZY. Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9155-9161.
- [11] 崔庆锋, 俞理, 张群, 代学成, 王红波. 内源微生物驱油及其对油藏微生物活动的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2173-2184.  
CUI QF, YU L, ZHANG Q, DAI XC, WANG HB. Indigenous microbial flooding and its influence on microbial activities in reservoirs[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2173-2184 (in Chinese).

- [12] GAO CH. Experiences of microbial enhanced oil recovery in Chinese oil fields[J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2018, 166: 55-62.
- [13] LE JJ, WU XL, WANG R, ZHANG JY, BAI LL, HOU ZW. Progress in pilot testing of microbial-enhanced oil recovery in the Daqing Oilfield of North China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 97: 188-194.
- [14] LI CF, LI Y, LI XM, CAO YB, SONG YT. The application of microbial enhanced oil recovery technology in Shengli Oilfield[J]. *Petroleum Science and Technology*, 2015, 33(5): 556-560.
- [15] 伍晓林, 乐建君, 王蕊, 柏璐璐. 大庆油田微生物采油现场试验进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(8): 1478-1486.
- WU XL, LE JJ, WANG R, BAI LL. Progress in pilot tests of microbial enhanced oil recovery in Daqing Oilfield[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(8): 1478-1486 (in Chinese).
- [16] 曹功泽, 李彩凤, 陈琼瑶, 刘涛, 汪卫东, 汪庐山, 孙刚正. 胜利油田微生物吞吐体系的性能评价及应用[J]. *油田化学*, 2022, 39(3): 493-497.
- CAO GZ, LI CF, CHEN QY, LIU T, WANG WD, WANG LS, SUN GZ. Performance evaluation and application of microbial huff and puff system for Shengli Oilfield[J]. *Oilfield Chemistry*, 2022, 39(3): 493-497.
- [17] WU G, LIU Y, LI Q, DU HJ, YOU J, LI H, KE CY, ZHANG X, YU JL, ZHAO T. *Luteimonas huabeiensis* sp. nov., isolated from stratum water[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (Pt\_9): 3352-3357.
- [18] 魏晓霞, 尹珺, 纪淑玲, 程涛, 马莎莎, 薛成, 耿朋学. 混合菌系 QZ-10 对原油的作用性能表征及现场清防蜡应用[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(3): 1057-1066.
- WEI XX, YIN J, JI SL, CHENG T, MA SS, XUE C, GENG PX. Effect of consortium QZ-10 on crude oil and its application in the removal of oil well paraffin[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(3): 1057-1066 (in Chinese).
- [19] SONG BH, SPRINGER J. Determination of interfacial tension from the profile of a pendant drop using computer-aided image processing: 1. Theoretical[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, 184(1): 64-76.
- [20] GENG PX, MA AZ, WEI XX, CHEN XK, YIN J, HU FT, ZHUANG XL, SONG MY, ZHUANG GQ. Interaction and spatio-taxonomic patterns of the soil microbiome around oil production wells impacted by petroleum hydrocarbons[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 307: 119531.
- [21] SHARMA BK, SAROWHA SS, BHAGAT SD, TIWARI RK, GUPTA SK, VENKATARAMANI PS. Hydrocarbon group type analysis of petroleum heavy fractions using the TLC-FID technique[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 360(5): 539-544.
- [22] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [23] GAO XY, LIU Y, MIAO LL, LI EW, SUN GX, LIU Y, LIU ZP. Characterization and mechanism of anti-*Aeromonas salmonicida* activity of a marine probiotic strain, *Bacillus velezensis* V4[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3759-3768.
- [24] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 191-195.
- [25] BYUN H, BROCKETT MR, PU QQ, HRYCKO AJ, BELD J, ZHU J. An intestinal *Bacillus velezensis* isolate displays broad-spectrum antibacterial activity and prevents infection of both Gram-positive and Gram-negative pathogens *in vivo*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2023, 205(6): e0013323.
- [26] ZAID DS, CAI SY, HU C, LI ZQ, LI YG. Comparative genome analysis reveals phylogenetic identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and genomic insights into its plant growth promotion and biocontrol effects[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0216921.
- [27] YIN J, WEI XX, HU FT, CHENG CK, ZHUANG XL, SONG MY, ZHUANG QG, WANG F, MA AZ. Halotolerant *Bacillus velezensis* sustainably enhanced oil recovery of low permeability oil reservoirs by producing biosurfactant and modulating the oil microbiome[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 453: 139912.
- [28] 张丽娟, 黄伟, 王宁, 宋博, 朱静, 热依罕姑丽·阿卜杜克依穆, 布坚乃提·阿巴斯, 王玮. 耐辐射芽胞杆菌 JK23 的鉴定及其生防活性研究[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(5): 997-1006.

- ZHANG LJ, HUANG W, WANG N, SONG B, ZHU J, ABDUKEYIM RYHGL, ABBAS BJNT, WANG W. Identification of radiation-resistant *Bacillus velezensis* JK23 and its biocontrol activity[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(5): 997-1006 (in Chinese).
- [29] KRYACHKO Y. Novel approaches to microbial enhancement of oil recovery[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 266: 118-123.
- [30] GUIMARÃES CR, PASQUALINO IP, de SOUSA JS, NOGUEIRA FCS, SELDIN L, de CASTILHO LVA, FREIRE DMG. *Bacillus velezensis* H<sub>2</sub>O-1 surfactin efficiently maintains its interfacial properties in extreme conditions found in post-salt and pre-salt oil reservoirs[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 208: 112072.
- [31] LIU Q, NIU JJ, LIU YJ, LI LK, LV J. Optimization of lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* L20 and performance evaluation of biosurfactant mixed system for enhanced oil recovery[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2022, 208: 109678.
- [32] 王卫强, 崔静, 吴尚书, 董美, 张海娟. 石油烃降解菌 *Pseudomonas* sp. 及其生物表面活性剂对原油处理效果分析[J]. 石油学报(石油加工), 2020, 36(5): 1039-1046.
- WANG WQ, CUI J, WU SS, DONG M, ZHANG HJ. Effect of petroleum hydrocarbon decomposing bacteria *Pseudomonas* sp. and its biosurfactants on crude oil treatment[J]. Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section), 2020, 36(5): 1039-1046 (in Chinese).
- [33] VARJANI SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons[J]. Bioresource Technology, 2017, 223: 277-286.
- [34] DAS S, DAS N, CHOURE K, PANDEY P. Biodegradation of asphaltene by lipopeptide-biosurfactant producing hydrocarbonoclastic, crude oil degrading *Bacillus* spp.[J]. Bioresource Technology, 2023, 382: 129198.
- [35] 张亚楠, 杨兴伦, 卞永荣, 谷成刚, 王芳, 王代长, 蒋新. 鼠李糖脂与  $\beta$ -环糊精复合提取预测污染土壤中 PAHs 的生物有效性[J]. 环境科学, 2016, 37(8): 3201-3207.
- ZHANG YN, YANG XL, BIAN YR, GU CG, WANG F, WANG DC, JIANG X. Prediction of PAHs bioavailability in spiked soil by composite extraction with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and rhamnolipid[J]. Environmental Science, 2016, 37(8): 3201-3207 (in Chinese).
- [36] BUCKLEY JS. Asphaltene deposition[J]. Energy & Fuels, 2012, 26(7): 4086-4090.
- [37] OSMAN SA, YOUSSEF AM, ABDEL HAKIM M, SABRY SA, GHOZLAN HA. Biodegradation of paraffin wax using *Bacillus* sp. SASH for quality improvement of crude oil properties[J]. Petroleum Science and Technology, 2023, 41: 1-18.
- [38] WANG XT, YU L, LI XZ, LI Y, CUI QF, DONG H, LIN W. A thermotolerant surfactant-producing strain XT-1 applied for exogenous microbial enhanced oil recovery[J]. Petroleum Science and Technology, 2018, 36(8): 609-617.
- [39] KE CY, LU GM, WEI YL, SUN WJ, HUI JF, ZHENG XY, ZHANG QZ, ZHANG XL. Biodegradation of crude oil by *Chelatococcus daeguensis* HB-4 and its potential for microbial enhanced oil recovery (MEOR) in heavy oil reservoirs[J]. Bioresource Technology, 2019, 287: 121442.
- [40] NIU JJ, LIU Q, LV J, PENG B. Review on microbial enhanced oil recovery: mechanisms, modeling and field trials[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2020, 192: 107350.