



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103189599 A

(43) 申请公布日 2013.07.03

(21) 申请号 201180052527.3

R. D. 法伦 E. R. 亨里克森

(22) 申请日 2011.11.01

S. J. 基勒 M. P. 佩里

(30) 优先权数据

61/408731 2010.11.01 US

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李慧惠 李炳爱

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013.04.28

(51) Int. Cl.

E21B 43/22 (2006.01)

C09K 8/58 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/058754 2011.11.01

(87) PCT申请的公布数据

W02012/061364 EN 2012.05.10

(83) 生物保藏信息

PTA-11284 2010.09.08

PTA-11409 2010.10.14

PTA-11410 2010.10.14

PTA-8823 2007.12.04

PTA-11283 2010.09.08

(71) 申请人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州威尔明顿

(72) 发明人 A. W. 阿尔索普 S. M. 安妮泽克

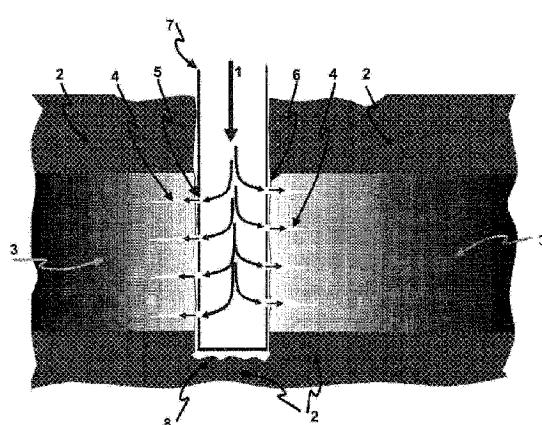
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

注入井处生物质聚集的预防

(57) 摘要

本文所公开的是不同的营养物质溶液制剂向地下目标位点的引入,以在 MEOR 或生物整治过程中防止在注入井钻孔的生产层表面的生物膜的形成和生物质的聚集。第一营养物质溶液制剂支持所引入的微生物的生长,并且第二营养物质溶液制剂被用于促进生物膜的形成,以允许地下目标位点中的孔洞和通道的堵塞,用于 MEOR 或生物整治。



1. 处理地下目标位点的方法,所述方法按顺序包括以下步骤:
 - a) 制备包含一种或多种微生物菌种的生物质悬浮液;
 - b) 将(a)的悬浮液引入所述地下目标位点的注入井钻孔;
 - c) 任选地将一种或多种流体引入所述注入井钻孔;
 - d) 将第一营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔,其中所述第一营养物质溶液在所述地下目标位点处支持(a)的一种或多种微生物的生长而不会促进生物质的聚集和生物膜的产生;以及
 - e) 将第二营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔,其中所述第二营养物质溶液制剂促进所述地下目标位点中的孔洞和通道的生物堵塞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中(c)的一种或多种流体帮助(a)的一种或多种微生物的悬浮液流入所述地下目标位点。
3. 根据权利要求1所述的方法,还包括在步骤(d)之后,将一种或多种流体引入所述注入井钻孔。
4. 根据权利要求1或3所述的方法,还包括在步骤(d)之后,或在步骤(d)之后的将一种或多种流体引入所述注入井钻孔之后,应用关井阶段。
5. 根据权利要求1所述的方法,还包括在步骤(e)之后,将一种或多种流体引入所述注入井钻孔。
6. 根据权利要求5所述的方法,还包括在流体的引入之间周期性地引入附加的第二营养物质溶液制剂。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中(a)的生物质悬浮液在所述第一营养物质溶液中制备。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中步骤(d)被省略。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种微生物菌种选自假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、放线菌纲(*Actinomycetes*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、裂殖菌纲(*Schizomycetes*)、棒状杆菌属(*Corynebacteria*)、无色小杆菌属(*Achromobacteria*)、肠杆菌属(*Enterobacteria*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、酵母纲(*Saccharomycetes*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、弧菌属(*Vibrio*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、索氏菌属(*Thauera*)、石孢菌属(*Petrotoga*)、微球茎菌属(*Microbulbifer*)、海杆菌属(*Marinobacteria*)、梭杆菌属(*Fusibacteria*)和红酵母属(*Rhodotorula*)。
10. 根据权利要求4所述的方法,其中所述一种或多种微生物菌种选自施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)BR5311 (ATCC No. PTA-11283) 和施氏假单胞菌 LH4:15 (ATCC No. PTA-8823)。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一营养物质溶液制剂包含乳酸盐并且不含乙酸盐。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中在所述第一营养物质溶液制剂中的乳酸盐的浓度为约25份每一百万份至约10,000份每一百万份。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一和第二营养物质溶液制剂包含硝酸盐。
14. 根据权利要求8所述的方法,其中硝酸盐的浓度为约20份每一百万份至约10,000份每一百万份。

份每一百万份。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述第二营养物质溶液制剂包含乙酸盐。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中在所述第二营养物质溶液制剂中的乙酸盐的浓度为约 100 份每一百万份至约 10,000 份每一百万份。
17. 处理地下目标位点的方法,所述方法按顺序包括以下步骤 :
 - a) 制备包含一种或多种施氏假单胞菌菌株的生物质悬浮液 ;
 - b) 将(a)的悬浮液引入所述地下目标位点的注入井钻孔 ;
 - c) 任选地将一种或多种流体引入所述注入井钻孔 ;
 - d) 将第一营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔,其中所述第一营养物质溶液包含乳酸盐并且不含乙酸盐,并且其中所述乳酸盐促进施氏假单胞菌的生长并且在悬浮液中维持施氏假单胞菌 ;以及
 - e) 将第二营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔,其中所述第二营养物质溶液包含乙酸盐,并且其中所述乙酸盐通过(a)的施氏假单胞菌菌株促进生物堵塞的形成。

注入井处生物质聚集的预防

[0001] 本专利申请要求 2010 年 11 月 1 日提交的美国临时申请 61/408731 的优先权，该临时申请全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及环境微生物学领域。具体地，其涉及微生物增强的采油和生物整治领域。更具体地，其涉及在微生物增强的采油和生物整治过程中，注入井钻孔处微生物的聚集和生物膜的形成的防止。

背景技术

[0003] 在从油层采油的过程中，含油地下岩层中的原油通常仅有小部分被仅利用了油层中存在的自然力的初级开采方法所回收。二次采油方法如注水法(即，通过注入井将水注入油层)已被用于迫使油通过地下岩层流向生产井，并从而改善了油的开采(Hyne, N. J., 2001, “Non-technical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production”, 第 2 版, Pen Well Corp., Tulsa, OK, USA)。注水操作经常遇到的一个问题是地下岩层异质性能够导致注水过程中降低的波及效率。换句话讲，在水从注入井行进至生产井时，它优先通过油层的更多孔洞的岩层，并形成水淹的岩层，而绕过其他含油地下岩层，即未被水淹的，从而降低了从未被水淹的岩层的采油效率。

[0004] 使用微生物强化采油(MEOR)来帮助采油是已知的(Brown, L. R., Vadie, A. A., Stephen, O. J. SPE59306, SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, Oklahoma, 3-5, 2000, 4 月)。活的微生物能够被注入油层，它们在油层处能够粘附至水淹的区域中的岩石或沙土基质中的孔洞和通道的表面，并将它们堵塞，以在注水过程中阻止水流向水淹的区域，这使得水流靶向尚未被水淹的含油地下岩层的更大的区域(Ramkrishna, S., Prog. Energy Com. Sci., 34 : 714-724, 2008)。

[0005] 与 MEOR 相关的一个问题是外源性地引入的微生物、或天然微生物过早的活性，一旦营养物质溶液被加入注入井，它就会导致生物堵塞的过早形成，并堵塞靠近注入井钻孔的孔洞。在这种情况下，被引入注入井的组分不能够移动至含油地下岩层中去促进 MEOR。

[0006] WO2009017810A1 描述了从含油岩层强化采油的一种方法。该方法涉及将微生物的聚生体和营养物质溶液引入注入井。聚生体被维持一段足够所述微生物在油层中生长和定植的时间以置换油。

[0007] 共同拥有和共同未决的美国专利申请公布 US20100081585A1 (该文献全文以引用方式并入本文) 描述了在 MEOR 和生物整治过程中控制微生物的活化，并且依赖于在被施用至所述位点时，在所应用的浓度对天然的和所引入的微生物均为抑制性的制剂。这些制剂防止了微生物的生长和活化，直到该抑制剂被耗散。

[0008] 美国专利 4,947,923 公开了一种用于 MEOR 的方法，该方法包括将细菌注入井孔和注入营养物质源，以导致细菌生长和选择性地堵塞岩层。所使用的营养物质能够在井下流动并提供磷酸盐如三聚磷酸盐的营养源，而不会在与原生水接触时沉淀。

[0009] 对于成功的 MEOR 和生物整治操作, 防止生物堵塞的过早形成和靠近注入井钻孔的孔洞的堵塞仍然是有待解决的问题。

发明内容

[0010] 在一个方面, 本发明是处理地下目标位点的方法, 所述方法按顺序包括以下步骤:

[0011] a) 制备包含一种或多种微生物菌种的生物质悬浮液;

[0012] b) 将(a)的悬浮液引入所述地下目标位点的注入井钻孔;

[0013] c) 任选地将一种或多种流体引入所述注入井钻孔;

[0014] d) 将第一营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔, 其中所述第一营养物质溶液在所述地下目标位点处支持(a)的一种或多种微生物的生长而不会促进生物质的聚集和生物膜的产生; 以及

[0015] e) 将第二营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔, 其中所述第二营养物质溶液制剂促进所述地下目标位点中的孔洞和通道的生物堵塞。

[0016] 本发明的另一个方面是处理地下目标位点的方法, 所述方法按顺序包括以下步骤:

[0017] a) 制备包含一种或多种施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)菌株的生物质悬浮液;

[0018] b) 将(a)的悬浮液引入所述地下目标位点的注入井钻孔;

[0019] c) 将一种或多种流体引入所述注入井钻孔;

[0020] d) 将第一营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔, 其中所述第一营养物质溶液包含乳酸盐并且不含乙酸盐, 并且其中所述乳酸盐促进施氏假单胞菌的生长并且在悬浮液中维持施氏假单胞菌; 以及

[0021] e) 将第二营养物质溶液制剂引入所述注入井钻孔, 其中所述第二营养物质溶液包含乙酸盐, 并且其中所述乙酸盐通过(a)的施氏假单胞菌菌株促进生物堵塞的形成。

附图说明

[0022] 图 1 是井孔和邻近它的地下位点的示意图。下列全部粗体数字均是指图 1。(1)是进入井管(7)的注射水的流,(2 和 3)是岩石层,(4)是管中的孔眼,(5)是井孔,(6)是注入井钻孔的生产层表面,(8)是井孔在岩石层(2)中的底部。

[0023] 申请人按照国际承认的用于专利程序目的的微生物保藏的布达佩斯条约的有关条款进行了以下生物保藏:

[0024] 保藏菌株信息

| 保藏人鉴定参考 | 国际保藏所命名 | 保藏日期 | |
|---------|--|------------------------|-----------|
| [0025] | 施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>) BR5311 | ATCC No. PTA- 11283 | 9/9/2010 |
| | 施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>) LH4:15 | ATCC No. PTA- 8823 | 12/4/2007 |
| | 施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>) 89AC1-3 | ATCC No. PTA- 11284 | 9/9/2010 |
| | 弓形杆菌属 (<i>Arcobacter sp</i>) 97AE3-3 | ATCC No. PTA- 11410 | 10-14-10 |
| | 弓形杆菌属 (<i>Arcobacter sp</i>) 97AE3-12 | ATCC No. PTA- 11409 | 10-14-10 |

具体实施方式

[0026] 申请人特别在本公开中加入了所有引用的参考文献的全部内容。除非另外指明，否则所有百分数、份数、比率等均按重量计。商标以大写体标示。此外，当数量、浓度或其它数值或参数以范围、优选范围或优选上限数值和优选下限数值的列表形式给出时，其应理解为具体地公开由任何范围上限或优选数值和任何范围下限或优选数值的任何一对所构成的所有范围，而不管所述范围是否被单独地公开。除非另行指出，凡在本文中给出某一数值范围之处，该范围均旨在包含其端点，以及位于该范围内的所有整数和分数。不旨在将本发明的范围限制为限定范围时详述的具体值。

[0027] 提供了下列定义，用于本专利申请中所使用的特定术语和缩写：

[0028] 缩写“ATCC”是指美国典型培养物保藏中心国际保藏(American Type Culture Collection International Depository, Manassas, VA, USA)。“ATCC No.”是指培养物保藏于 ATCC 的登录编号。

[0029] 术语“生物膜”是指微生物的膜或“生物质层”。生物膜通常嵌入细胞外聚合物中，其粘附至淹没在水环境中或经受过水环境的表面。生物膜由具有结构异质性的微生物的致密团块基质组成，其可以具有遗传多样性、复杂的群体互动、和聚合物质细胞外基质。

[0030] 术语“堵塞生物膜”或“生物堵塞物”是指能够改变多孔材料的渗透性，并从而延迟流体通过与所述生物膜或生物堵塞物相关联的多孔材料的移动。

[0031] 本发明涉及在 MEOR 或生物整治应用过程中，通过引入流体和选择性的营养物质制剂，防止注入井钻孔的生产层表面和靠近注入井钻孔的孔洞堵塞的方法。在本发明所公开的方法中，在微生物生物质悬浮液向注入井的引入之后，任选地，流体被加入以将所述生物质从所引入的位点移除。然后接着是将第一营养物质溶液制剂引入注入井，其提供了营养物质供地下目标位点中微生物的生长，而不会促进生物质的聚集和生物膜的形成。然后引入第二营养物质溶液制剂，其促进微生物粘附至地下目标位点中的孔洞和通道，和产生用于形成生物堵塞的生物膜。

[0032] 在一个实施例中，所述微生物生物质悬浮液被制备在所述第一营养物质溶液制剂

中，并且该悬浮液制剂被引入注入井钻孔中。当使用在第一营养物质溶液中制备的生物质悬浮液时，附加的第一营养物质溶液制剂可以在任选的流体的引入之后被引入，或者该步骤可以被省略。

[0033] “注入井钻孔生产层表面”面向通过井管(图 1:4)中的穿孔与注入井连通的地下岩层的岩石层(图 1:2,3)。本发明的方法改变了地下目标位点的渗透性并因此有助于采油或生物整治。如本文所用，短语“地下目标位点”是指在地表以下的由砂岩、非胶结砂岩、或石灰岩构成的区域，在其中 MEOR 或生物整治被应用。如本文所用，短语“改变目标位点渗透性”是指导致水淹的区域的堵塞，并从而使水流重新流向未被水淹的区域的过程。这些过程包括生物膜的形成和所述地下目标位点中砂土和岩石的孔洞通过微生物的堵塞。

[0034] 在附加的实施例中，附加的步骤可以被包括在所述方法中。例如在一个实施例中，在步骤(d)之后，注入井被关井一段时间。在这段时间中，井被关闭，使得没有东西被引入井中，并且微生物将在它们的新环境中生长。在另一个实施例中，在步骤(d)之后，一种或多种流体被引入注入井钻孔中。上述流体被用于将微生物更深地带入地下目标位点。在另一个实施例中，在步骤(d)之后引入一种或多种流体之后，注入井被关井一段时间。在另一个实施例中，在步骤(d)之后，一种或多种流体被引入注入井钻孔中。流体的急流流经未被堵塞的孔洞和通道，移除了供开采的油或用于生物整治的其他物质。在另一个实施例中，在步骤(d)之后，附加的第二营养物质溶液制剂被引入注入井钻孔中，以促进进一步的生物膜形成。所述附加的第二营养物质溶液制剂通常在流体的引入之间被分批地间歇加入。这些其他步骤的任何组合可以被用于本发明的方法中。

[0035] 注入井钻孔和邻近它的地下位点的示意图显示于图 1 中。当流体(1)被引入注入井时，其流入井管(7)中，井管位于钻穿了岩石层(2,3)的井孔(5)内部。在井管(7)和由井孔(5)造成的岩石层的注入井钻孔生产层表面(6)之间存在间隙。岩石层(2)表示在储藏或保留油的可渗透岩石层(3)上方或下方的不可渗透的岩石。被引入井孔的任何流体(1)沿井管(7)流下，并通过管中的穿孔(5)和进入含油地下岩层(3)的岩石基体中的孔眼(4)。然后，上述流体流经含油地下岩层(3)并置换来自这些岩层的油。上述区域放射状地从井孔(5)向各个方向在含油岩层(3)中扩展。

[0036] 在本发明的方法中，当微生物生物质被引入注入井钻孔时，其任选地接着是加入一种或多种流体，以帮助将微生物移入邻近的地下目标位点。适合用于本文的流体能够包括，例如，MEOR 操作过程中所使用的注入和生产水。在本发明的方法中有用的流体包括水。水能够从任何适合的来源被提供，并且能够包括，例如：海水、盐水、生产水、从地下含水层(包括与地下位点中的油接触的那些含水层)开采的水、或来自溪、河、池或湖的地表水。如本领域中已知的，在注入一个或多个井孔之前，可能需要从所述水移除颗粒物，包括尘土、岩石或砂土的小块以及侵蚀副产物如锈。移除此类颗粒物的方法，例如过滤、沉淀和离心，是本领域中为人们所熟知的。

[0037] 在本发明所公开的方法的一个实施例中，来自油层的注入或生产水，在微生物生物质悬浮液的引入之后被引入注入井钻孔，以将被引入所述注入井的微生物更深地带入邻近的地下目标位点。

[0038] 来自此类井的注入水或生产水能够包含多种浓度的包含例如氯、钠、钾、溴、镁、钡、钙的混合盐类(在下文中称为“盐”)。注入或生产井水的盐度能够是约 0 至约 100 份每

一千份(ppt)。

[0039] 即使是制备了充分分散的生物质悬浮液时，在其被引入井孔之后，其也能够聚集并导致注入井钻孔的工作层表面的堵塞，从而降低到达采油或生物整治将在其中发生的地下目标位点的生物质的量，或者在更差的情况下实际上堵塞井孔时，使将流体泵入井孔所需的压力升高。本发明的方法通过引入本文所公开的流体和营养物质溶液制剂(它们允许生物质更深的渗透进地下目标位点)，减少了在注入井钻孔的生产层表面处微生物生物质的聚集和生物膜与生物堵塞物的形成。

[0040] 营养物质溶液制剂

[0041] 在本发明中有用的营养物质溶液制剂可以包括生长基质(为细胞的生长提供物质和能量的化合物)；电子受体；氮和磷源，以及多种微量成分，例如除生长基质和氮源之外微生物的生长和活性通常还需要的维生素和金属。

[0042] 在本发明中有用的营养物质溶液制剂单独地或以组合形式包含下列物质：碳源，以大于0.01%w/v加入；用于微生物生长的电子受体(就厌氧生长条件而言)，以大于0.01%w/v加入；氮源，以大于0.001%w/v加入；磷源，以大于0.001%w/v加入；微量营养物质(例如维生素和金属)的源，以大于0.0001%w/v加入。

[0043] 本文预期的有用的营养物质溶液制剂包括至少一种下列元素的那些：C、H、O、P、N、S、Mg、Fe、或Ca。包含至少一种上述元素的有用的无机自由基的非限制性例子包括，例如： PO_4^{2-} 、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 。生长基质能够包括糖、有机酸、醇、蛋白质、多糖、脂肪、烃、或其他在微生物学领域已被微生物分解的有机物质。主要营养物质包括氮和磷(非限制性例子能够包括 NaNO_3 、 KNO_3 、 NH_4NO_3 、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 NH_4Cl)；维生素(非限制性例子可以包括叶酸、抗坏血酸、和核黄素)；微量元素(非限制性例子可以包括B、Zn、Cu、Co、Mg、Mn、Fe、Mo、W、Ni和Se)；用于环境控制的缓冲剂；催化剂，包括酶；以及天然的和人工的电子受体(非限制性例子可以包括 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 Fe^{+3} 、腐殖酸、金属氧化物、醌化合物、 CO_2 、 O_2 、以及它们的组合)。复合成分例如酵母提取物可以被用于提供多种营养物质，例如维生素和氨基酸。

[0044] 在本发明的方法中，对所引入的一种或多种微生物具有不同效应的分别的营养物质溶液制剂在对地下目标位点的处理过程中被使用。在生物质悬浮液以及任选的一种或多种流体的引入之后，所述营养物质溶液制剂被引入地下目标位点的注入井钻孔中。第一营养物质溶液提供支持所引入的一种或多种微生物生长的营养物质，但它不促进生物质的聚集和生物膜的形成。在第一营养物质溶液制剂的存在下，可能有一些生物膜的形成，但其与在第二营养物质溶液制剂的存在下，由微生物产生的生物膜的形成的量相比是降低的。因此，第一营养物质溶液制剂没有促进生物膜的形成。第一营养物质溶液还可以维持悬浮液中的微生物，而不是促进聚集。因此，随着第一营养物质溶液的引入，所引入的微生物能够散布并遍及地下目标位点地生长，而不会堵塞注入井钻孔的工作层表面和靠近井孔的孔洞。

[0045] 在第一营养物质溶液之后被引入的第二营养物质溶液，促进导致地下目标位点中孔洞和通道的生物堵塞的微生物中的效应。所述效应可以包括聚集、粘附、和生物膜的产生。因此，随着第二营养物质溶液的引入，地下目标位点中孔洞和通道被堵塞，导致改善的采油或生物整治。

[0046] 所述第一和第二营养物质溶液制剂的组成的差异可以是促进以上所述的不同效

应的任何一种或多种组分的差异。例如，在生长基质中可以存在差异。在本发明的方法的一个实施例中，在生物质悬浮液和任选的至少一种流体的引入之后被引入的第一营养物质制剂包含乳酸盐而不含乙酸盐。乳酸盐在所述第一营养物质溶液制剂中的浓度为 25 份每一百万份至约 10,000 份每一百万份。这之后接着是引入包含乙酸盐的第二营养物质溶液制剂。乙酸盐在所述第二营养物质溶液制剂中的浓度能够是至多 30% 重量。所述第一和第二营养物质溶液制剂包含至多 30% 重量的硝酸盐。

[0047] 不同的营养物质溶液制剂对不同的微生物的效应，在不同的盐浓度的存在下也可以变化。例如，包含乳酸盐或乙酸盐的营养物质溶液制剂之间，在高盐的存在下与低盐相比，可以发生生物膜形成的更大差异。高盐浓度可以是至少约 30ppt、35ppt、40ppt、45ppt、50ppt、55ppt、60ppt、65ppt、70ppt、或 75ppt，或者更高。

[0048] 在本发明的方法中，在包含微生物的生物质悬浮液的引入之后，分别含有乳酸盐和乙酸盐的第一和第二营养物质溶液，能够被用于在包含乙酸盐的培养基中与在包含乳酸盐的培养基中相比具有提高的生物堵塞的任何微生物。

[0049] 通过在如本文的一般方法部分所述的生物膜试验中进行测试，微生物能够被鉴定为在不同的营养物质溶液制剂中具有不同的性质。例如，施氏假单胞菌菌株 BR5311 (ATCC No. PTA-11283) 和 LH4:15 (ATCC No. PTA-8823) 在本文中被显示在包含乙酸盐的营养物质溶液中比在包含乳酸盐的营养物质溶液中形成更有效的生物堵塞。生物堵塞反应可以随所使用的营养物质溶液的盐度变化，并且能够由本领域技术人员使用本文所述的检测法容易地评估。

[0050] 在另一个实施例中，其他微生物可以被用于堵塞，其可以需要其他特定的营养物质用于生物膜的形成和堵塞。第一和第二营养物质溶液所需要的组分，可以由本领域技术人员采用本文的一般方法部分所描述的检测法，基于将要在生物质悬浮液中被引入的微生物的堵塞反应容易地确定。

[0051] 生物质

[0052] 对于本文所公开的方法有用的用于形成生物膜和堵塞地下目标位点的孔洞的生物质悬浮液，能够包含兼性厌氧菌、专性厌氧菌和反硝化菌的种类。用于生物膜的形成和聚集，以改善波及效率和强化采油的多种微生物(细菌和真菌) 菌种可以包括但不限于下列的属：假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、放线菌纲(*Actinomycetes*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、裂殖菌纲(*Schizomycetes*)、棒状杆菌属(*Corynebacteria*)、无色小杆菌属(*Achromobacteria*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacteria*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、酵母纲(*Saccharomycetes*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、弧菌属(*Vibrio*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、索氏菌属(*Thauera*)、石孢菌属(*Petrotoga*)、微球茎菌属(*Microbulbifer*)、海杆菌属(*Marinobacteria*)、梭杆菌属(*Fusibacteria*)和红酵母属(*Rhodotorula*)。如本文所用，术语“属”是指在微生物的分类学分类层级中，低于“科”而高于“菌种”的微生物分类。如本文所用，“菌种”是指具有高度的表型、生物化学和基因型相似性的微生物群体。

[0053] 所述生物质悬浮液能够包含仅一个特定菌种、相同属的两种或更多种菌种、不同属的组合、或多个属的多个菌种的组合的微生物。在一个实施例中，用于实施本发明的方法的生物质悬浮液，是使用在共同拥有和共同未决的美国专利申请公布 20090263887 中描

述的施氏假单胞菌 LH4:15 (ATCC No. PTA-8823) 获得的, 该文献的内容全文以引用方式并入本文。在另一个实施例中, 用于实施本发明的方法的生物质悬浮液, 是使用施氏假单胞菌菌株 BR5311 (ATCC PTA-11283) 获得的, 其公开于共同拥有和共同未决的美国专利申请 61/408734 中, 该文献以引用方式并入本文。在另一个实施例中, 所述生物质悬浮液这两种菌株均包含。

[0054] 生物质悬浮液、流体、和营养物质溶液能够通过多种方式被引入井孔, 例如离心泵、活塞泵、齿轮泵或任何其他装置, 或者通过本领域所熟知的任何其他方法。

[0055] 生物质的制备

[0056] 对于本发明的方法有用的生物质悬浮液是通过使所选择的一种或多种微生物在适当的培养基中生长制备的。本领域技术人员熟悉能够被用于所期望的微生物的生物质制备的适合的培养基。当使用施氏假单胞菌时, 适合的培养基能够包含乳酸盐, 其将不会支持生物堵塞的形成。生物质可以被浓缩, 例如通过过滤或离心。生物质能够按要求被制备用于立即引入注入井而没有被储存。作为另外一种选择, 生物质能够被提前制备, 并能够作为糊料被冷冻储存。从冷冻的生物质制备生物质需要特别小心, 并且可能需要应用一种或多种类型的混合器, 以确保生物质的彻底重悬浮和任何细胞团块的不存在。例如, 包括流经生物质分散装置的用于递送生物质群体的方法公开于美国专利申请公布 20110244554 中, 该文献以引用方式并入本文。

[0057] 本发明所公开的方法也能够被用于污染地点的生物整治。

[0058] 实例

[0059] 本发明将在下面的实例中得到进一步阐述。应该理解, 这些实例尽管说明了本发明的优选实施例, 但仅是以例证的方式给出的。根据上面的论述和这些实例, 本领域的技术人员能够确定本发明的基本特征, 并且在不脱离其范围的情况下, 能够对本发明做出各种变化和修改以使其适用于各种用法和条件。

[0060] 一般方法

[0061] 生物质的生长

[0062] 用于厌氧微生物的生长和维持的技术是本领域中为人们所熟知的。厌氧生长通过硝酸盐随着时间从生长营养物质溶液的消耗和亚硝酸盐的积累被测量。

[0063] 生物质能够如共同未决的美国专利申请公布 20090263887 中所描述的生长和储存, 该文献的内容全文以引用方式并入本文。

[0064] PPGAS 培养基包含 :20 毫摩尔每升(mM) NH₄Cl、20mM KC1、120mM Tris-Cl、1. 6mM MgSO₄、1% 蛋白胨、0. 5% 葡萄糖、pH7. 5。

[0065] 在下文的实例中使用的基本盐营养物质溶液制剂的组成显示于表 1 中。

[0066] 表 1

[0067] 基本盐营养物质溶液制剂的组成

| g/L | 化学品 |
|-------------------|---|
| 1.0 | NH ₄ Cl |
| 0.5 | KH ₂ PO ₄ |
| 0.4 | MgCl ₂ .6H ₂ O |
| 0.2 | CaCl ₂ .2H ₂ O |
| 10 | NaCl |
| 0.69 | NaH ₂ PO ₄ |
| 2.5 | NaHCO ₃ |
| 0.073 | KSO ₄ |
| 1000X g/L | 微量元素 |
| 1.5 | FeCl ₂ .4H ₂ O |
| 0.002 | CuCl ₂ .2H ₂ O |
| 0.1 | MnCl ₂ .4H ₂ O |
| 0.19 | CoCl ₂ .6H ₂ O |
| 0.07 | ZnCl ₂ |
| 0.006 | H ₃ BO ₃ |
| [0068] | 0.036 Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O |
| | 0.024 NiCl ₂ .6H ₂ O |
| 0.277 | HCl |
| 1000X g/L | 硒/钨酸盐 |
| 0.006 | Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O |
| 0.008 | Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O |
| 0.5 | NaOH |
| 1000X mg/L | 维生素混合物 |
| 100 | 维生素 B12 |
| 80 | 对氨基苯甲酸 |
| 20 | D (+)-生物素 |
| 200 | 烟酸 |
| 100 | 泛酸钙 |
| 300 | 盐酸吡哆醇 |
| 200 | 硫胺素-HCl.2H ₂ O |
| 50 | α-硫辛酸 |
| 培养基的 pH 被调节至 7.3。 | |

[0069] 购买的营养物质溶液制剂

[0070] Millers LB 生长培养基是购买的(MediTech, Inc, Manassas, VA)。

[0071] 注入水样品

[0072] 注入水取样自各自位于两个不同的石油生产场地的两个分别的场地。井 1 位于加拿大 Saskatchewan 和 Alberta 省边界上的 Senlac 油田。该井在生产和注入水中均具有 30-35 份每一千份(ppt)之间的盐度。井 2 位于加拿大 Alberta 省的 Wainwright 油田。该井具有约两倍于海水的盐度，在 65ppt 范围内。

[0073] 来自油层生产和注入水的样品

[0074] 从生产和注入井(井 1 和井 2)获取了混合的油 / 水液体形式的水样, 水样取在玻璃的 1.0 升(L)棕色瓶中, 充至顶部, 加盖并用胶带密封以防止气体泄漏。内在的厌氧过程中产生的气体足以在运输过程中维持厌氧条件。在取样后 48 小时内, 瓶子在充满了大冰块的大型塑料冷却器中被运输至测试装置。

[0075] 总溶解盐(盐度)的测量

[0076] 使用手持型折射计(型号 RHS10ATC, Huake Instrument Co., Ltd, Shenzhen, China) 测量了总溶解盐。

[0077] 在烧结玻璃过滤器上的生物膜形成

[0078] 使用烧结玻璃过滤器开发了检测方法来就微生物在二氧化硅表面上形成生物膜和防止水流过~ 10 微米孔隙(堵塞)的能力对微生物进行评估。25 毫米(mm)中等粗度烧结玻璃过滤器(stock15254, Adams and Chittenden Scientific Glass, Berkeley CA) 被粘在设计用于膜过滤的塑料支持器基座中。在固化后, 用高压灭菌法对过滤器组件进行灭菌。各个过滤器在支持器中被置于无菌的皮氏培养皿中, 并且包含了来自各种菌株的过夜培养物的种菌的营养物质溶液制剂被添加在玻璃过滤器的顶部。上述生物膜形成 / 堵塞检测中的营养物质溶液制剂是基本盐培养基(表 1)或是补充了氮、磷酸盐、微量元素、维生素、碳源和作为电子受体的硝酸盐的注入或生产水样品。盖上皮氏培养皿, 并于室温在厌氧条件下孵育一至 2 星期。然后将过滤器从营养物质溶液制剂移走, 并将塑料支持器的顶件固定在适当位置。将十厘米长度的管子附接到过滤器支持器的入口, 并用水充满。测量了管中的水流干的时间(以秒计)。没有任何微生物的对照过滤器花了约 10 秒流干。花了大于 10 秒流干的过滤器被认为是“堵塞的”。

[0079] 在替代性的堵塞测定法中, 在使用前用流体浸润了烧结玻璃过滤器, 在添加微生物之前就流速进行了预筛, 并在实验结束时测定了孵育之后流速的百分比变化。

[0080] 实例 1

[0081] 施氏假单胞菌(LH4:15)在二氧化硅表面上形成生物膜的能力

[0082] 为了评估施氏假单胞菌菌株 LH4:15 (ATCC PTA-8823) 在二氧化硅表面上产生稳定的生物膜的能力, 无菌玻璃珠(3mm, 11-312A, Fisher Scientific, Hampton, NH) 被置于 24 孔微量滴定板(353047, BD Biosciences) 的孔中, 并加入注入水或 PPGAS 培养基的等分试样(1.0mL)。0.6% 乙酸盐或 0.6% 乳酸盐被添加至每一孔, 然后加入已经以 200 转每分钟(rpm) 并且于室温在 PPGAS 培养基中有氧生长的菌株 LH4:15 的过夜培养物 10ml。然后在室温孵育平板至约一个星期。通过目测评估了生物膜的形成。

[0083] 结果表明在玻璃珠上形成了不同类型的生物膜。在包含注入水的孔中, 大多数的生物膜在玻璃珠上形成, 而在孔的侧面和底部上仅有少量的生物膜被观察到。然而, 当 PPGAS 培养基被用作营养物质溶液制剂时, 生物膜遍及整个孔地形成。在包含乙酸盐作为附加的碳源的孔中, 所形成的生物膜是更为颗粒状的, 而在包含乳酸盐的孔中, 所形成的生物膜是更平滑的。这些结果表明, 施氏假单胞菌菌株 LH4:15 具有在二氧化硅表面上容易地形成生物膜和根据可用的碳源产生不同类型的生物膜的能力。

[0084] 实例 2

[0085] 碳源对施氏假单胞菌菌株 BR5311 形成生物膜的能力的影响

[0086] 在本实例中, 检测了营养物质溶液制剂中的碳源对通过施氏假单胞菌菌株 BR5311

(ATCC PTA-11283) 的生物膜形成的影响。菌株 BR5311 是作为能够在反硝化条件下在水 / 油界面生长的微生物从位于加拿大中部 Saskatchewan 和 Alberta 省边界上的 Senlac 油田的井 1 的注入水分离的。其通过 16S rDNA 分析被鉴定为施氏假单胞菌菌株, 这描述于共同拥有和共同未决的美国专利申请 61/408734 中。

[0087] 如“一般方法”中所述进行了生物膜形成测试。所使用的培养基是表 1 中显示的基本盐培养基, 并且补充了乙酸盐或乳酸盐作为唯一的碳源和硝酸盐作为电子受体, 如表 2 中所列的。通过将混合物置于包含抗坏血酸盐氧气涤气系统(Becton, Dickinson Co, Sparks, Maryland) 的塑料室中, 使混合物成为厌氧的。该检测中使用的营养物质溶液制剂包含乙酸盐或乳酸盐作为唯一的碳源和硝酸盐作为电子受体, 如表 2 中所显示的。

[0088] 来自井 2 的高盐注入水(67ppt)被过滤除菌, 并向其加入了下列附加的营养物质: 0.5g/L NH₄Cl; 0.69g/L NaH₂PO₄; 1.4g/L KH₂PO₄; 维生素和微量元素如表 1 中所示。硝酸钠和乙酸钠或乳酸钠被添加至测试样品, 以得到表 2 的 e 列中显示的可用的供体 / 受体电子比率。25mL 的上述营养物质溶液制剂和 1.0mL 的过夜生长微生物(如实例 1 中所述制备)被添加至每一玻璃过滤器支持器。在培养箱 / 摆动器中以 28°C 和 100rpm 在厌氧箱中孵育 1 星期后, 移出过滤器, 并如“一般方法”中所述针对堵塞进行了测量。每一过滤器被测量了 3 次。表 2 中给出了每一测试样品的流动时间的结果。

[0089] 表 2

[0090] 添加至用于进行生物膜形成的施氏假单胞菌菌株 BR5311 的营养物质溶液制剂的碳源和相关的流动时间

[0091]

| 测试 | 乙酸钠 | 硝酸钠 | 乳酸钠 | e- | 水流, 秒 |
|----|---------|---------|---------|-----|------------|
| 1 | 1g/L | 2.66g/L | | 1:2 | 16.7+/-3.5 |
| 2 | | 2.66g/L | 0.66g/L | 1:2 | 8.7+/-1.0 |
| 3 | 2.07g/L | 0.66g/L | | 4:1 | 17.7+/-2.8 |
| 4 | | 0.66g/L | 1.33g/L | 4:1 | 11.7+/-2.0 |

[0092] 如表 2 所显示的, 无论碳对硝酸盐的比率如何, 当乙酸盐被用作碳源时(测试 1 和 3)观察到了显著的堵塞。在具有 4:1 的供体 / 受体电子比率的井 2 水的高盐(67ppt)培养基中观察到了最低的堵塞。

[0093] 实例 3

[0094] 在含有乙酸盐或乳酸盐的低盐中采用施氏假单胞菌 BR5311 的生物膜形成

[0095] 针对其在低盐中形成烧结玻璃过滤器的生物膜的能力测试了施氏假单胞菌菌株 BR5311, 如“一般方法”中所述。使菌株 BR5311 在你 Millers LB 生长培养基中于 30°C 以 200rpm 摆动生长过夜。为了开始实验, 一式三份地将 1.0mL 过夜生长的微生物添加至 25mL 下文所述的营养物质溶液制剂, 并加入玻璃过滤器支持器。这些培养物在培养箱 / 摆动器中以 28°C / 100rpm 厌氧生长 2 星期。此外, 采用相同的营养物质溶液制剂, 但没有菌株种菌的一式三份的未接种的对照物, 与接种过的测试处理平行地进行。

[0096] 低盐营养物质溶液制剂组成:NaCl110g/L、NaHCO₃0.25g/L、NaNO₃2g/L、维生素溶液1mL/L B12100mg/L、对氨基苯甲酸80mg/L、D(+) - 生物素20mg/L、烟酸200mg/L、泛酸钙100mg/L、盐酸吡哆醇300mg/L、硫胺素-HCl. 2H₂O200mg/L、α - 硫辛酸50mg/L]、亚硒酸盐 / 钨酸盐溶液1mL/L[NaOH0.5g/L、Na₂SeO₃.5H₂O6.0mg/L、Na₂WO₄.2H₂O8.0mg/L]、SL-10微量元素金属1mL/L[25%HCl110mL/L、FeCl₂.4H₂O1.5g/L、ZnCl₂70mg/L、MnCl₂.4H₂O100mg/L、H₃BO₃6mg/L、CoCl₂.6H₂O190mg/L、CuCl₂.2H₂O2mg/L、NiCl₂.6H₂O24mg/L、Na₂MoO₄.2H₂O36mg/L]、KH₂PO₄0.02g/L、NH₄Cl0.1g/L、MgSO₄.7H₂O0.1g/L、酵母提取物0.1g/L。

[0097] 上述营养物质溶液制剂中的碳源是乙酸钠或乳酸钠(1.0g/L)。盐度为20ppt。

[0098] 两个星期后,如“一般方法”中所述检测了流速。对每一个测试和对照过滤器记录了水通过的时间,每一过滤器测试了3次。计算了流速,并对每一过滤器将孵育后的值与孵育前的值进行了比较。表3中的结果显示,在两个星期的孵育后,施氏假单胞菌菌株BR5311相对于对照处理导致了流速的显著降低。在乙酸盐和乳酸盐对照处理中,流速均是升高的。升高的流速是因为在两个星期的浸没孵育后,过滤器的孔洞有更好的水饱和度。包含施氏假单胞菌菌株BR5311种菌的测试处理表现出流速的降低。低盐条件下,在乙酸盐测试处理中,流速降低了约42%,而在乳酸盐测试处理中,流速降低了约27%。

[0099] 表3

[0100] 在两个星期的孵育后通过中等孔隙度玻璃过滤器的流速的变化

[0101]

| | | 流动, 毫升/秒 | | | | | |
|---------|-------|----------|-------|-------|-------|--------------------|---------|
| 处理 | 孵育前值 | 孵育后值* | | | 平均值 | %流速变化 ¹ | 平均%流速变化 |
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 乙酸盐对照 1 | 0.083 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | + 20 | +16 |
| 乙酸盐对照 2 | 0.091 | 0.125 | 0.111 | 0.111 | 0.116 | + 27 | |
| 乙酸盐对照 3 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0 | |
| 乙酸盐测试 1 | 0.100 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | - 33 | - 42 |
| 乙酸盐测试 2 | 0.100 | 0.043 | 0.042 | 0.038 | 0.041 | - 59 | |
| 乙酸盐测试 3 | 0.091 | 0.059 | 0.059 | 0.063 | 0.060 | - 34 | |
| 乳酸盐对照 1 | 0.083 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | +20 | +9 |
| 乳酸盐对照 2 | 0.091 | 0.100 | 0.091 | 0.100 | 0.097 | +7 | |
| 乳酸盐对照 3 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0 | |
| 乳酸盐测试 1 | 0.111 | 0.125 | 0.111 | 0.111 | 0.116 | + 4 | - 27 |
| 乳酸盐测试 2 | 0.091 | 0.048 | 0.045 | 0.045 | 0.046 | - 49 | |
| 乳酸盐测试 3 | 0.100 | 0.067 | 0.067 | 0.063 | 0.065 | - 35 | |

[0102] *3 连续的测量 / 平行测定

[0103] 1 按照((孵育后平均值, 毫升 / 秒 / 孵育前, 毫升 / 秒)⁻¹) × 100 计算

[0104] 实例 4

[0105] 在含有乙酸盐的高盐中使用施氏假单胞菌菌株 BR5311 的堵塞检测

[0106] 针对其在烧结玻璃过滤器上形成生物膜的能力测试了施氏假单胞菌菌株 BR5311，如“一般方法”中所述，使用了高盐培养基。营养物质溶液制剂的盐度为 70ppt。使菌株 BR5311 在下列组成的营养物质溶液制剂中厌氧生长：NaCl 40.5g/L、NH₄Cl 0.1g/L、KH₂PO₄ 0.02g/L、Na₂SO₄ 0.1g/L、亚硒酸盐 - 钨酸盐溶液 [NaOH 0.5g/L、Na₂SeO₃·5H₂O 6.0mg/L、Na₂WO₄·2H₂O 8.0mg/L] 1mL/L、NaHCO₃ 0.2g/L、维生素溶液 [维生素 B1 2100mg/L、对氨基苯甲酸 80mg/L、D(+) - 生物素 20mg/L、烟酸 200mg/L、泛酸钙 100mg/L、盐酸吡哆醇 300mg/L、硫胺素 - HCl 2H₂O 200mg/L、α - 硫辛酸 50mg/L] 1mL/L、SL-10 微量金属溶液 [25% HC 110mL/L、FeCl₂·4H₂O 1.50g/L、ZnCl₂ 70mg/L、MnCl₂·4H₂O 100mg/L、H₃BO₃ 6mg/L、CoCl₂·6H₂O 190mg/L、CuCl₂·2H₂O 2mg/L、NiCl₂·6H₂O 24mg/L、Na₂MoO₄·2H₂O 36mg/L] 1mL/L、CaCl₂·2H₂O 8.8g/L、酵母提取物 0.025g/L、NaNO₃ 2.4g/L、乙酸钠 1.2g/L、KC1 0.86g/L、MgCl₂·6H₂O 6.4g/L、溴百里酚蓝溶液 0.4% 3mL。

[0107] 实验以及在 2 星期的孵育后的流速测试如实例 3 中所述进行。如同实例 3 中一样，流速在对照中升高，而菌株 BR5311 导致了流速的显著降低（表 4）。对照处理中的流速平均升高了 20%。包含菌株 BR5311 的测试处理表现出平均 55% 的流速降低，显示了施氏假单胞菌菌株 BR5311 在包含乙酸盐的高盐营养物质溶液制剂中堵塞孔洞的能力。

[0108] 表 4

[0109] 在两个星期的孵育后通过中等孔隙度玻璃过滤器的流速的变化。

[0110]

| 处理 | 流动，毫升/秒 | | | | | | |
|------|---------|-------|-------|-------|-------|--------------------|-----|
| | 孵育前值 | 孵育后值* | | | 平均值 | %流速变化 ¹ | |
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 对照 1 | 0.083 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | +10 | +20 |
| 对照 2 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0 | |
| 对照 3 | 0.111 | 0.167 | 0.167 | 0.167 | 0.167 | +50 | |
| 测试 1 | 0.125 | 0.071 | 0.071 | 0.071 | 0.071 | -43 | |
| 测试 2 | 0.083 | 0.048 | 0.048 | 0.048 | 0.048 | -42 | |
| 测试 3 | 0.083 | 0.015 | 0.016 | 0.017 | 0.016 | -81 | |

[0111] *3 连续的测量

[0112] 1 按照 ((孵育后平均值, 毫升 / 秒 / 孵育前, 毫升 / 秒) - 1) × 100 计算。

[0113] 实例 5 (预测的)

[0114] 使用乳酸盐制备施氏假单胞菌(菌株 LH4:15) 的非生物膜形成种菌

[0115] 如上文所述制备了施氏假单胞菌(菌株 LH4:15) 的过夜生长的生物质。然后将上述生物质添加至 200 升容积的发酵器，以制备大量的生物质。生长的生物质被过滤并储存在 -80°C，直到需要使用。

[0116] 使用了包含 6,000L 含乳酸盐的第一营养物质溶液制剂的 9,000 升(L)容量罐车，其包含：氯化钠 :10,000ppm；乳酸钠 :1,000ppm；硝酸钠 :2,000ppm；酵母提取物 :100ppm；氯化铵 :100ppm；磷酸二氢钠 :20ppm；pH (根据需要用 NaOH 或 HCl 调节) 至 6.5 至 7.0。通

过循环罐内的内容物,将第一营养物质溶液制剂的成分混合。当罐的内容物循环时,罐车能够停放在加热的车库内,以在必要时帮助将罐加热至所期望的温度。

[0117] 一块冷冻储存的施氏假单胞菌(菌株 LH4:15)被添加至罐中。罐的内容物的循环持续进行,以提供第一营养物质溶液制剂在冷冻块周围和上方的混合,以加速解冻过程。通过对所述块的目测(如果它漂浮的话),或者通过监测悬浮液光密度(OD_{600} 纳米, nm)的浊度,确定解冻过程的完成。如此获得的施氏假单胞菌(菌株 LH4:15)的悬浮液或者被立即使用,或者被储存一段时间再使用。

[0118] 包含施氏假单胞菌(菌株 LH4:15)在第一营养物质溶液制剂中的悬浮液的罐车被开至注入井。然后,将罐直接地或通过过滤装置(设计为防止任何大的生物质块通过(例如美国专利申请公布 20110244554 中所描述的生物质分散装置)连接至高压注入泵,以对井进行接种。然后,上述高压泵被用于将生物质从罐车转移至注入井内,用于沉积至地下目标位点。注入的速率由进入油层的最大可允许注入压力确定。该注入压力必须维持在低于包含油的岩层的破裂压力。

[0119] 实例 6 (预测的)

[0120] 使用乙酸盐触发通过施氏假单胞菌(菌株 LH4:15)的生物膜形成

[0121] 在如实例 5 中所述将生物质注入注入井之后,通过注入水或如实例 5 所说明的包含乳酸盐的第一营养物质溶液制剂,将生物质挤往地下岩层的更深处。该步骤之后是注入 1,000 至 6,000L 的第二营养物质溶液制剂,所述第二营养物质溶液制剂包含 1,000ppm 乙酸盐并且包含:氯化钠:10,000ppm;硝酸钠:2,000ppm;酵母提取物:100ppm;氯化铵:100ppm;磷酸二氢钠:20ppm;pH(根据需要用 NaOH 或 HCl 调节)至 6.5 至 7.0。当加入的第二营养物质溶液制剂到达施氏假单胞菌所沉积的地下位点,所述假单胞菌细胞开始生长和消耗第二营养物质溶液制剂中的乙酸盐,并在所述地下目标位点的孔洞中产生生物膜和生物堵塞物,从而改变该目标位点的渗透性。

[0122] 实例 7

[0123] 使用乳酸盐制备施氏假单胞菌(菌株 BR5311)的非生物膜形成种菌

[0124] 使施氏假单胞菌菌株 BR5311(ATCC No. PTA-11283)的生物质生长过夜并进行了制备,如上文所述。然后将上述生物质添加至 200 升容量的发酵器中,以制备大量的生物质。生长的生物质被过滤并浓缩为~5X,储存在 -80°C 直到需要使用。

[0125] 准备了包含 6,000L 含乳酸盐的营养物质溶液制剂的 9,000 升(L)容量罐车,其包含:氯化钠:10,000ppm;乳酸钠:1,000ppm;硝酸钠:2,000ppm;酵母提取物:100ppm;氯化铵:100ppm;磷酸二氢钠:20ppm;pH(根据需要用 NaOH 或 HCl 调节)至 6.5 至 7.0。通过循环上述罐的内容物将上述成分混合,产生了第一营养物质溶液制剂。

[0126] 一块冷冻储存的施氏假单胞菌菌株 BR5311 生物质被添加至罐中。罐的内容物的循环持续进行,以提供第一营养物质溶液制剂在冷冻块周围和上方的混合,以加速解冻过程。通过对所述块的目测(如果它漂浮的话),或者通过光密度(OD_{600} 纳米, nm)监测悬浮液的浊度,确定解冻过程的完成。

[0127] 包含施氏假单胞菌 BR5311 生物质在第一营养物质溶液制剂中的悬浮液的罐车被开至注入井。将罐通过过滤装置(设计为防止任何大的生物质块通过,它是美国专利申请公布 20110244554 中所描述的生物质分散装置)连接至高压注入泵,以对井进行接种。然后,

上述高压泵被用于将生物质从罐车转移至注入井内，用于沉积至地下目标位点。注入的速率由进入油层的最大可允许注入压力确定。在泵送种菌时，注入压力维持在低于包含油的岩层的破裂压力。事实上，在将种菌泵入注入井时没有观察到注入压力的升高，表明微生物没有在井孔的表面形成生物膜。

[0128] 实例 8

[0129] 使用乙酸盐触发通过施氏假单胞菌(菌株 BR5311) 的生物膜形成

[0130] 如实例 7 中所述将生物质注入井中之后，通过将注入盐水过夜泵入注入井，将生物质挤往地下岩层的更深处，进行 16 个小时。然后是注入 6 立方米如实例 5 中所说明的包含乳酸盐的第一营养物质溶液制剂。在泵送盐水和第一营养物质溶液过程中，注入压力没有升高，表明微生物尚未在油层中形成任何生物膜。将注入井关闭 5 天。然后将 1,000L 第二营养物质溶液制剂泵入注入井。所述第二营养物质溶液包含：乙酸钠：9 重量%；硝酸钠：18 重量%；酵母提取物：4500ppm；氯化铵：13500ppm；磷酸二氢钠：500ppm。上述第二营养物质溶液的添加每隔一周重复一次，进行了 6 个月。这时，该井的注入压力已升高了 150psi。在与该注入井连通的生产井的生产水中没有观察到乙酸盐或乳酸盐。这些结果清楚地显示，施氏假单胞菌细胞在生长和消耗第二营养物质溶液制剂中的乙酸盐，并且在该地下目标位点的孔洞中产生生物膜和生物堵塞物，从而改变着该目标位点的渗透性。

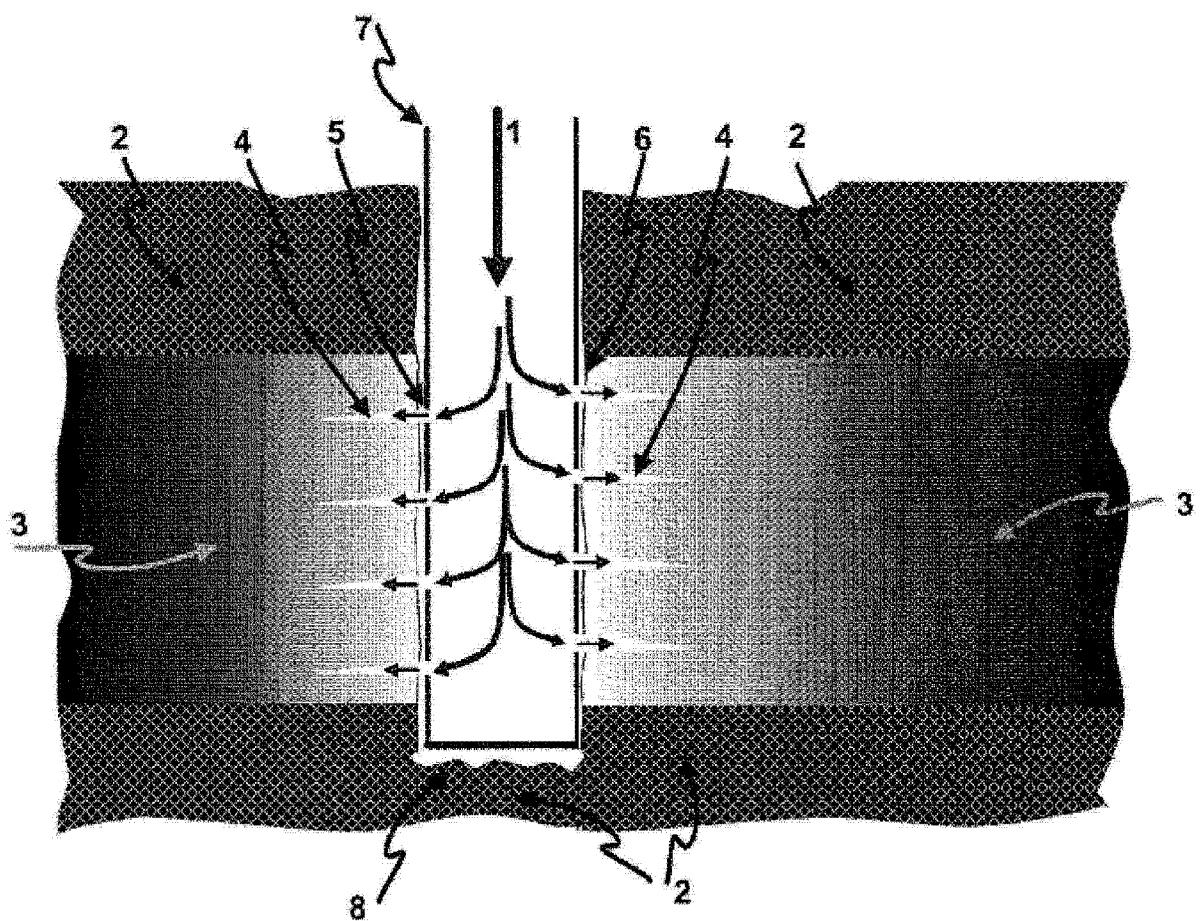


图 1