



驯化复合微生物菌群处理废弃钻井泥浆活性研究

高小龙¹, 常允康¹, 侍浏洋¹, 李晓光², 赵建芳², 沙蓓蓓², 黄志勇¹, 王兴彪^{1*}

¹ 中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300308

² 滨州市高盐废水处理工程技术研究中心(筹), 山东 滨州 256602

摘要:【背景】油田废弃钻井泥浆含油量高, 污染物复杂, 环境危害严重, 现有技术无法满足日益发展的石油开采行业在废弃钻井泥浆处理方面的需求。生物法处理废弃钻井泥浆, 工艺简单, 成本低, 但也存在局限, 包括广谱性差、处理周期长、原油降解率低、泥浆性质波动冲击工艺稳定性等。【目的】构建一种高活性和高环境耐受能力的微生物菌群, 分析遗传稳定性和综合性能, 提高废弃钻井泥浆处理技术水平。【方法】通过定向富集、诱导驯化的方法, 提高活性群落对石油烃乳化降解效率, 降低共代谢底物反馈抑制和群体感应系统敏感度, 分析群落结构和活性成员的种群类别, 分析乳化降解石油烃的活性对应关系。【结果】从含油量超过 12 g/kg、芳烃-胶质沥青含量超过 80%、含盐量超过 8 g/kg 的钻井废弃泥浆中富集得到 1 个活性微生物菌群, 主要成员包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、红细菌属(*Rhodobacter*)和嗜碱还原硫素杆菌(*Dethiobacter alkaliphilus*), 比例分别达 27.44%、20.73%、8.54%和 7.93%。在超过 22 代的连续驯化过程中, 假单胞菌(*Pseudomonas*)、类希瓦氏菌(*Alishewanella*)和盐单胞菌(*Halomonas*)数量达 92.72%, 菌群结构和活性趋于稳定。处理钻井废弃泥浆 5 d, 土壤含油率由处理前的 12403 mg/kg 降低到处理后的 42 mg/kg, 综合脱油效率 99.67%, 石油烃降解率 68.9%。分析微生物群落作用前后石油饱和土壤中的石油含量变化, 原始含油量 261 g/kg, 处理后含油量 305 mg/kg, 脱油率 99.88%。【结论】菌群驯化后活性稳定, 耐受高盐环境能力强, 在钻井废弃泥浆、含油土壤及油泥污染物处理方面具有很强的工业应用潜力。

关键词: 钻井泥浆, 石油降解, 活性菌群, 群落结构

基金项目: 天津市科学技术委员会院市合作生态环境治理重大专项(16YFXTSF00560); 中国科学院战略生物资源服务网络计划(ZSYS-008); 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室开放课题

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-84861930; E-mail: wang_xb@tib.cas.cn

收稿日期: 2018-02-27; 修回日期: 2018-06-04; 网络出版日期: 2018-07-17

废弃钻井泥浆是钻井过程中产生的泥-水-油的混合废弃物,它们与污油、污水共同组成了油田生产三大污染物^[1]。废弃钻井泥浆包括废弃钻井液、废液、钻屑,颗粒小(0.01–0.30 μm),含水量高(30%–90%),通常碱性(pH 8–12),半流体形态^[2],含有多环芳烃(PAHs)、重金属以及病原菌,在2016年8月1日起施行的《国家危险废物名录》中列为HW08 (071-002-08) T类(毒性)污染物。石化行业的发展伴随废弃钻井泥浆年产量逐年增加,目前有效的处置技术及工程应用进程缓慢,大量堆置成为潜在的暴露性污染源。随着油田钻井深度的增加和难度加大,添加剂及有毒有害成分更多更复杂,主要有重金属、油类、膨润土、碱性化合物,包括铁铬盐、磺化沥青、磺化栲胶、磺化褐煤,这些废弃钻井泥浆环境危害严重^[3–5],碱性高(8–12)、盐度大(3%以上),再加上石油类物质极易造成土壤板结、肥力下降、营养流失,使植物从土壤中吸收水分困难,根部腐烂,作物减产^[2,6]。各种重金属如铬(Cr)、汞(Hg)、镉(Cd)、铅(Pb)和化学添加剂对动物及植物生长产生影响,甚至富集在动植物体内进而危害人的健康,最终引发多种疾病^[7–8]。一般情况下,小型钻头钻探3000 m油井,产生500–1000 m^3 钻井废弃泥浆^[8–9]。我国要求农用污泥中石油类含量控制在3000 mg/kg以内,如果达不到环保处理要求将征收高额排污费^[10]。

近年来,世界各国都针对废弃泥浆的无害化处理技术进行了大量研究,包括焚烧法、固化处理、回收利用、填埋、土地耕作、注入安全地层以及生物处理法等^[10–11]。但物理化学方法分别具有成本高、二次污染、场地受限、效率低、引入其他污染源以及工艺繁琐等缺点。生物处理法工艺简单,成本低廉,针对于废弃钻井泥浆中的有机物质包括正构烃、异构烃、不饱和烃、酸类和

酯类等化合物,微生物都有明显的乳化、降解效果,但由于其中存在的重金属、盐类、多聚物、化学处理剂对细胞具有毒害和抑制作用,限制了微生物降解石油的活性和细胞自身的生长繁殖速率。生物处理法存在局限,包括菌剂适应性和广谱性差、修复周期长、石油降解率低、泥浆性质波动冲击工艺的稳定性等^[12],所以从生物法处理工艺的核心——微生物菌剂性能角度出发,研究高活性和高环境耐受能力的功能菌剂,成为一个重要且必要的突破口。

本研究通过构建高效的复合菌群用于乳化降解废弃钻井泥浆中的石油烃类污染物,达到脱除废弃钻井泥浆中的石油烃、水-泥-油分离、分流处理的目的,为油田废弃钻井泥浆的无害化处理提供一种生物强化的新型工艺方案。

1 材料和方法

1.1 样品采集

废弃钻井泥浆取自大港油田“港 356-5”井场废弃泥浆池中,搅拌泥浆使其表面及内部混匀后,取样装入无菌取样袋,至实验室于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 理化性质分析

pH值反映样品的酸碱度,其测定方法参照行业标准方法进行^[13],pH计(Mettler-Toledo, FE20)测定样品pH值。样品做3个平行取平均值。

含水量可以判断样品中固体和水分两种组分的具体比例。准确称取预先振荡混匀的100 g废弃钻井泥浆,置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,待烘干至恒重时(前后质量差不超过0.01 g),计算样品含水量。样品做3个平行取平均值。

土壤有机质和盐度含量分析,可以判断微生物基础营养物及有害物质的比例,判断废弃钻井

泥浆处理难度。参照行业标准^[14], 测定废弃钻井泥浆中的土壤有机质含量, 样品 3 个平行取平均值。采用水溶浸提后烘干称重的方法测定土壤中盐度。

采用重量法测定样品中总石油烃百分含量^[15], 采用气相色谱-质谱联用仪(Gas Chromatography-Mass Spectrometer, GC-MS)测定废弃钻井泥浆中萃取的石油各组分的比例^[16]。废弃钻井泥浆中石油烃类物质四组分分析方法参照行业标准进行^[17]。样品做 3 个平行取平均值。

1.3 微生物群落激活与定向驯化

向装有 50 mL 无机盐培养基[g/L, NaCl 5.0, KNO₃ 3.0, K₂HPO₄ 1.0, NH₄H₂PO₄ 1.0, (NH₄)₂SO₄ 1.0, MgSO₄ 0.2, pH 7.0]的三角瓶中加入 10.0 g 废弃钻井泥浆, 添加 0.025 g 酵母提取物, 同时添加 0.01 mg 丙酮酸钠、1.0 μg N-丁酰高丝氨酸内酯(AHL)和 1.0 μg 环磷酸腺苷(c-AMP)作为信号分子和干扰剂, 降低群体感应系统敏感度和种群之间的共代谢抑制作用^[18-19], 于 30 °C、150 r/min 摇床中培养 5 d 以激活本源微生物的活性(设定为第 0 代活性菌群)。同传统分离方法相比较, 本研究的驯化培养基中使用了丙酮酸钠作为抗氧化剂, 降低细胞生长过程中分泌的超氧化物对其他细胞的损害作用^[18]。添加 N-丁酰高丝氨酸内酯(AHL)作为信号分子, 可以促进处于延滞期的革兰氏阳性菌尽快细胞复苏^[19]。添加环磷酸腺苷(cAMP)作为信号分子, 促进细胞参与多种烃类降解相关基因的调节表达, 以期提高群落中活性微生物的降解原油活性^[18]。利用加速细胞自身复苏、降低代谢产物对细胞的损害和促进活性基因表达三种方式, 提高菌群驯化效率。

取 5 mL 上述培养液接种于含有 45 mL 无机盐

培养基的三角瓶中, 添加 1 g 大港油田石油和 10 g 废弃钻井泥浆, 置于 30 °C、150 r/min 的摇床中培养, 每 5 d 转接 1 代, 连续转接驯化 22 代, 以检测微生物菌群降解乳化原油的活性。

1.4 群落功能稳定性检测

分别测定驯化第 0、6、12、16、18、22 代的微生物对总石油烃的降解率来监测群落功能的变化。取 10 mL 驯化体系中培养液接种到含有 90 mL 无机盐培养基的三角瓶中, 添加 2% (W/V)原油为唯一碳源, 于 30 °C、150 r/min 摇床培养 5 d, 以相同培养方式、摇床培养不添加活性微生物培养液的原油-无机盐体系作为空白对照, 验证驯化微生物菌群对原油的降解效率。培养后用正己烷萃取体系中剩余的总石油烃 3 次, 合并有机相挥发干燥, 利用重量法测定不同代数的微生物群落对总烃的降解率, 以反映群落在驯化过程中降解石油烃功能的稳定性。

1.5 微生物群落结构分析

微生物群落结构分析参照文献并稍有优化^[20], 通过构建 16S rRNA 基因克隆文库分析废弃钻井泥浆中的第 0 代微生物群落(本源群落)和驯化第 22 代的复合菌群结构。样品总 DNA 的提取参照土壤样品 DNA 提取试剂盒(Mo Bio Laboratories, Inc., USA)操作说明。以提取的基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGRGTGTTGATC MTGGCTCAG-3') 和 1387R (5'-GGGCGGWT GTACAAGGC-3')扩增, PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环 28 次; 72 °C 7 min。PCR 产物用 1% (W/V)琼脂糖凝胶、100 V 电压电泳检测。目的条带的回收参照凝胶回收试剂盒(Axygen Scientific, Inc., USA)的步骤; 感受态制备和阳性克隆筛选参照文

献[21], 挑选出的克隆样品送华大基因公司测序, 所得序列 NCBI 上进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.6 污泥脱油效果分析

分别测定驯化后的活性微生物群落的脱油效果。钻井废弃泥浆经过 5000 r/min 离心 10 min 除去上清, 沉淀在 60 °C 条件下烘干至恒重, 之后按照 10% (W/W) 比例同水混合后, 按 5% (V/V) 接种量接种活性微生物菌群, 摇床 30 °C、150 r/min 培养 5 d, 利用萃取称重法测定菌群处理效果。

实验采用的样品有 2 个, 一个是上述废弃钻井泥浆, 另一个是耕作土。耕作土风干后于烧杯中加少量蒸馏水使之湿润, 然后加 30% 的 H_2O_2 10 mL, 搅拌混匀后 70–80 °C 水浴加热氧化。不停搅拌土样, 待泡沫平息时, 继续滴加 H_2O_2 , 直至土色变淡, 无反应为止。重复 2–3 次。过量的 H_2O_2 被煮沸排出, 冷却后倾去上清液, 105 °C 烘干除去土壤有机质, 之后磨碎, 按 300 g/kg 原油-土壤比例充分搅拌混匀制作原油饱和土壤, 之后按照上述培养方式检验活性菌群脱油效率。按照相同的处理过程和培养条件, 以不接种微生物菌群的培养体系, 分别设置钻井废弃泥浆和饱和原油的耕作土空白对照。

2 结果和讨论

2.1 废弃钻井泥浆基本理化性质

通过对废弃钻井泥浆的基本理化性质分析, 发现其主要污染状态为盐碱环境下的石油烃污染, 其总石油烃(TPH)含量远远超出 500 mg/kg 的临界值, 达到 12403 mg/kg, 盐度达到 8562 mg/kg, 属于高盐高石油烃含量的钻井泥浆, 结果如表 1。

表 1. 废弃钻井泥浆基本理化性质分析

Table 1. Basic physical and chemical properties analysis of waste drilling mud

pH	Water contents/%	Organic element/(mg/kg)	Total petroleum content/(mg/kg)	Salinity/(mg/kg)
8.2	60	44126	12403	8562

分析废弃钻井泥浆中的原油族组分, 发现含量最高的芳香烃, 达 42.01% (W/W, 下同), 含量最少的是脂肪烃类 18.76%, 沥青质和胶质的含量也很高, 分别为 20.31% 和 18.92% (图 1), 它们的高含量增加了对微生物的毒性和降解难度^[10]。

通常, 原油中组分含量最高的是脂肪烃, 与样品中原油组分有所不同, 原因在于废弃钻井泥浆长期被堆置在泥浆池中, 烷烃类由于其生物可利用性最高优先被本源微生物所降解, 导致其含量最低。芳香烃类、胶质沥青质由于其难降解性, 在多年的堆置中因脂肪烃类的逐渐消耗导致其组分比例逐渐增大^[22]。胶质沥青质都是非烃物质, 流动性差, 粘度高, 密度大, 且易于形成胶质-沥青质胶束进一步提高分子键能, 影响可降解性, 这也是样品中这类物质含量高的原因。

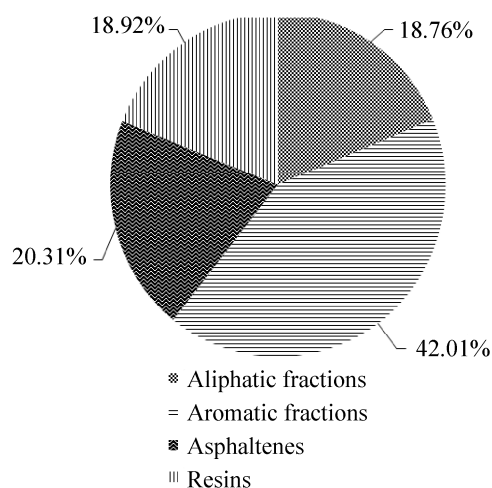


图 1. 废弃泥浆中原油族组分分析

Figure 1. Crude oil components analysis in the waste drilling mud.

2.2 废弃钻井泥浆中本源微生物群落结构

废弃钻井泥浆中本源微生物群落(驯化第 0 天)多样性不高,主要活性成员经过分析发现假单胞菌(*Pseudomonas*)在废弃钻井泥浆中所占的比例最高,达 27.44%;另外,根瘤菌属(*Rhizobium*)、红细菌属(*Rhodobacter*)占比例也较高,分别为 20.73%和 8.54%,这 2 个种属的细菌在烷烃、芳香烃及相关衍生物的降解研究中也经常被提及;嗜碱还原硫素杆菌(*Dethiobacter alkaliphilus*)在群落中占比 7.93%,这与废弃钻井泥浆中硫素含量较高有着直接的关系,嗜碱还原硫素杆菌在硫酸盐的还原中起着重要作用^[23]。其他成员包括 *Anaerovorax* sp.、*Tindallia texcoconensis*、脱亚硫酸盐杆菌(*Desulfitibacter* sp.)、*Alkalibacter saccharofermentans*、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、产卟啉杆菌属(*Porphyrobacter* sp.)成员比例均在 0.10%以下。以上数据表明微生物经过长期进化后已适应废弃钻井泥浆环境,因此,利用本源微生物群落富集驯化提高活性,用于废弃钻井泥浆中的污染物降解是切实可行的。

2.3 群落功能稳定性分析

分别选取第 6、12、16、18、22 代驯化菌群对原油降解率(5 d)来衡量群落功能稳定性,以不添加菌群组作对照。从第 6 代至第 22 代菌群对原油的降解率在 60%浮动,稳定在 58.2%–64.3%。第 0 代处理组对原油有微弱降解能力,是因为废弃钻井泥浆中的本源微生物中有部分微生物能利用石油烃,但其数量较少。随着驯化代数增加,活性微生物得以富集,原油降解能力越来越强。空白对照组中所呈现的原油降解率在 8.5%–9.2%之间波动,主要是在原油萃取过程中,萃取效率不能达到 100%而导致的损失。整体上来说,

在驯化第 6 代以后,群落功能基本趋于稳定,在 18 代以后活性趋于提高,说明功能菌群具有应用于生产的潜在价值(图 2)。

分析驯化第 22 代活性微生物群落对钻井废弃泥浆中不同组分的降解效率。经 5 d 处理后,原油综合降解率为 61.7%,饱和烃、芳烃、胶质和沥青质降解率分别达到了 92.04%、79.50%、10.27%和 16.46%,相对于胶质和沥青质来说,饱和烃和芳烃降解效率很高。如前所述,空白对照的降解率为 8.9%,其中饱和烃、芳香烃、胶质和沥青质的降解率分别为 13.4%、11.6%、5.5%和 4.1%(图 3),造成这些降解率不为 0 的主要原因在于萃取过程损失,以及摇床培养过程中的微量挥发等。Reddy 等利用驯化的污泥对含油污泥进行处理,10 d 后对芳香烃、胶质及沥青质的降解率分别为 48.12%、28.69%和 26.66%^[24],与之相比,本研究中活性菌群降解效率更高。但是,微生物在盐碱环境下对芳香烃、胶质及沥青质等重油污染物进行降解的效率会受到严重限制,目前有关这方面的报道中达到本研究的降解效率的研究尚未发现。

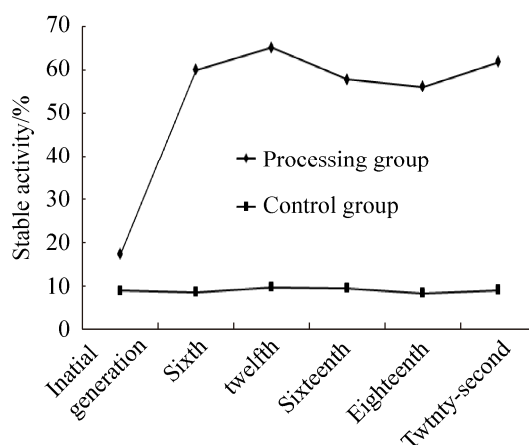


图 2. 菌群对原油的降解效果稳定性

Figure 2. Degradation stability of crude oil in by active microbial community.

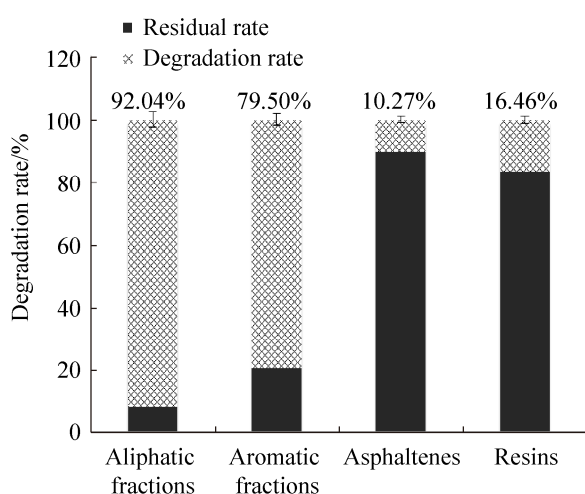


图 3. 萃取的石油烃中各组分降解率

Figure 3. Degradation rates of components in extracted crude oil.

为了进一步分析活性菌群针对原油中不同分子量组分的降解差异,按照石油烃中物质的不同碳原子数归纳,分析钻井废弃泥浆原油中不同组分在降解前后的变化过程,发现<C18的烃类优先被降解,导致长链烃类比例增加,其中C16比例明显降低,从17%降低到10%以下;同时,活性菌群对C11–C15的降解效果较好(图4),在脂肪族烃类含量不高、芳烃比例较高的情况下,说明活

性群落对芳烃的降解效果好,符合钻井废弃泥浆中高含量芳烃类降解的处理要求。

2.4 传代活性群落结构组成

从结果 2.2 废弃钻井泥浆中本源微生物群落结构数据中可以看出,本源微生物群落结构主要活性成员单一,生物多样性水平不高,故小库容 16S rRNA 基因克隆文库即可表征整个复合菌群中微生物的组成情况。经过 22 代的传代驯化,活性进一步强化,多样性进一步降低,故本节研究传代活性群落结构,16S rRNA 基因克隆文库中在转化的平板上共挑取 72 个白色克隆,检测假阳性克隆及 16S 片段的插入方向,将剔除假阳性后剩余的 55 个克隆进行测序分析,结果如表 2 所示。

富集得到的菌群,经过连续 22 代的诱导和驯化,16S rRNA 基因克隆文库分析,第 22 代菌群中假单胞菌、类希瓦氏菌和盐单胞菌数量达 92.72%。其中类希瓦氏菌比例最高,达 49.09%,其次是假单胞菌(27.26%)和盐单胞菌(16.37%) (图 5)。研究发现,类希瓦氏菌 *Alishewanella* 属于

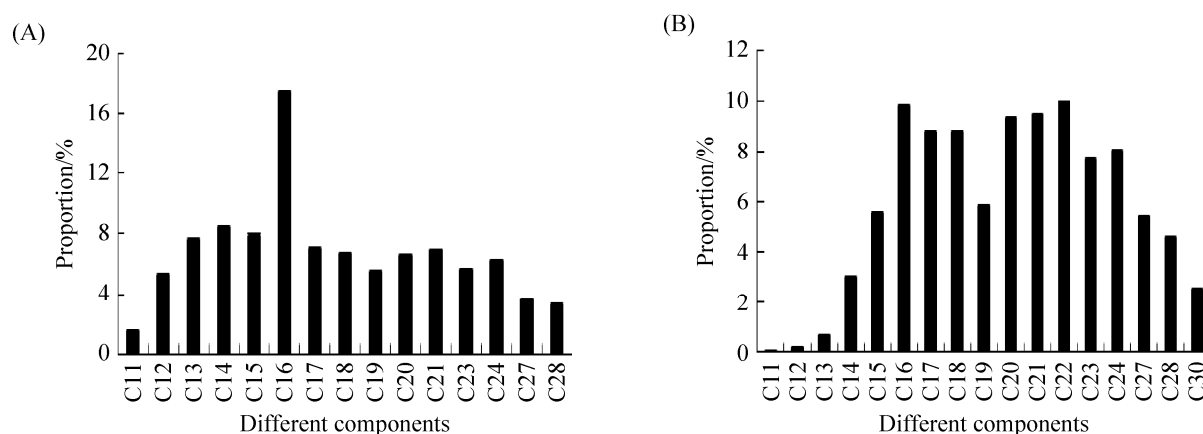


图 4. 第 22 代活性群落降解原油前后不同组分分析

Figure 4. Analysis of different components before (A) and after (B) microbial degradation of crude oil by 22nd generation.

表 2. 驯化第 22 代群落结构克隆测序结果

Table 2. The sequencing results of the domesticated 22nd generation community structure

Clone No.	Identity/%	Similar species	DNA accession	Ratio/%
16,52,55,70–72	99	<i>Pseudomonas</i> sp. G-R2A6	EF554918	10.9
41,62,19,27,47	99	<i>Pseudomonas</i> sp. ws14	AJ704794	9.09
23–24,43,67	99	<i>Pseudomonas stutzeri</i> PTG4-15	EU603456	7.27
36	99	Uncultured <i>Halomonas</i> sp. clone 4-C	EU305592	1.82
30,33,51,61,63,65,68–69	99	<i>Halomonas</i> sp. KM-1	AB477015	14.55
10,14–15,17,21,25–26,31,38–40, 42,44–46,48–49,56–59,64–65	99	<i>Alishewanella jeotgali</i> MS1	EU817498	41.82
12,22,37,53	99	<i>Alishewanella agri</i> BL06	EU909459	7.27
54	97	Uncultured Sphingobacteria bacterium clone A271	EU283535	1.82
28	99	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone NRB41	HM041958	1.82
29	94	<i>Bacillus cellulosilyticus</i> DSM 2522 strain N-4	NR_040850	1.82
50	93	<i>Bacillus</i> sp. M115	DQ227672	1.82

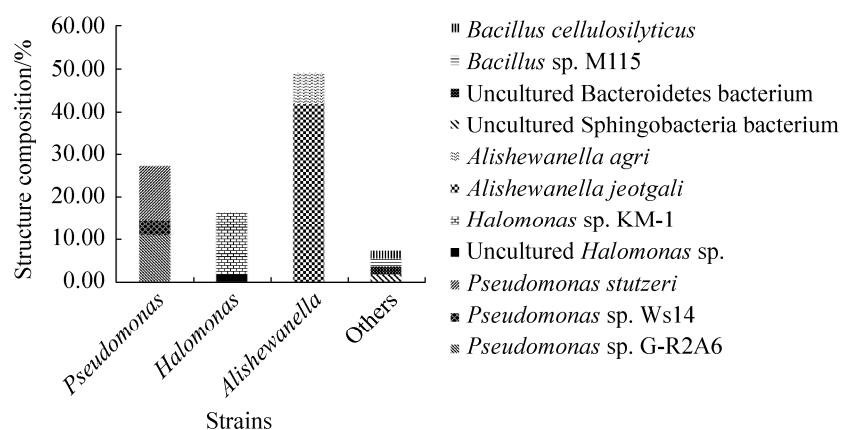


图 5. 驯化第 22 代群落结构组成

Figure 5. Community structure composition of the 22nd domesticated generation.

典型的能利用多种电子受体的种属，对缺氧环境下的石油烃降解有着先天优势，非常适合于增强废弃钻井泥浆中石油烃的降解^[25]；同样，假单胞菌在降解烷烃及芳香烃的研究中有着非常广泛的应用，一株铜绿假单胞菌 312A 对蒎、菲等芳香烃的降解能力很强，尤其是对蒎的降解率在 48 d 后高达 71%^[26]，假单胞菌的大量存在与废弃钻井泥

浆中高浓度石油烃污染及其中高浓度的芳烃有着密切关系；盐单胞菌在石油烃降解尤其是盐碱环境下的石油烃降解有非常多的报道^[27–28]。但对于这 3 种菌同时存在于盐碱条件下的石油烃污染环境中，目前仍没有相关报道。因此，构建的菌群在活性、环境耐受能力以及遗传稳定性和应用方面有深入研究的价值。

2.5 活性菌群处理废弃钻井泥浆土及原油饱和土壤

2.5.1 废弃钻井泥浆土处理：处理前烘干废弃钻井泥浆中土壤含油率 12403 mg/kg，经过 5 d 处理后废弃泥浆土壤含油率 42 mg/kg，脱油效率 99.67%，含油废弃泥浆处理前后形态同原油饱和土壤处理前后形态类似(图 6)。微生物菌群处理废弃钻井泥浆过程中，原油降解率为 68.9%，同结果 2.3 和图 2 的 50%–60%原油降解效果类似，且在不断传代驯化过程中活性有所提高。空白对照培养 5 d 后废弃泥浆土壤含油率 12285 mg/kg，基本没有明显脱油和降解活性，也说明了活性微生物菌群的脱油和降解效果明显。

2.5.2 原油饱和土壤处理：为了分析活性菌群对含油土壤的处理效率，使用原油饱和土壤检验活性菌群的脱油和降解效果。原油饱和土壤起始含油量 261000 mg/kg，微生物群落处理 5 d 后泥土

中含油 305 mg/kg，脱油率 99.88% (表 3，图 6)，同时发现活性菌群乳化土壤原油过程中，对烃类的降解率为 32.56% (表 3)，比上述废弃钻井泥浆的降解率低，原因在于原油饱和土壤中的原油含量很高，超过了细胞生长实际碳源量，导致降解效率降低，但实际降解量较钻井废弃泥浆要高。空白对照培养 5 d 后废弃泥浆土壤含油率 257.6 g/kg，同废弃泥浆土壤类似，也没有明显脱油和降解活性，说明本研究中驯化得到的活性微生物菌群的脱油和降解活性很强。

降解后土壤的颜色和原始土样颜色相近，甚至稍浅，说明驯化的活性群落有很好的脱油活性。结合上述结果中对群落结构稳定性和功能稳定性的分析，说明活性菌群结构经过驯化到了稳定期，同时菌群对化学添加剂、盐类和多聚物的抵抗力强，活性稳定，可用于研发后续的工业生产应用。

表 3. 活性菌群处理废弃钻井泥浆和原油饱和土壤结果

Table 3. Treatment result of waste drilling mud and saturated soil by active bacteria community

Sample type	Pre-treatment oil content/(mg/kg)	Post-treatment oil content/(mg/kg)	Deoiling rate/%	Oil degradation rate/%
Waste drilling mud	12403	42	99.67	68.90
Oil saturated soil	261000	305	99.88	32.56



图 6. 活性群落对原油饱和土壤的处理效果

Figure 6. Treatment effect of active community on petroleum saturated soil. A: Initial soil; B: Oil saturated soil; C: Treated soil.

3 结论

在过去的 20 年内,废弃钻井泥浆的生物处理和资源化回收利用相关研究也有很多,从不同的活性菌株到功能菌群再到不同功能菌群复配都进行了大量的探索,而目前通过研究投加活性菌群进而乳化脱除钻井废弃泥浆中的石油烃类,达到资源化回收利用的目的成了研究热点。目前普遍采用的固化处理,通过烧砖、铺路等是消化处理污泥的主要途径^[29],但是仅仅能达到污泥减量化和减毒,并未达到完全的处理达标和排放要求,因设备成本高、工艺复杂、运行成本高等^[30]。目前看来,也很难有一种新型的、颠覆性的技术解决目前的工业处理瓶颈。

本研究针对大港油田高盐碱含油废弃钻井泥浆开展的环境加压和诱导驯化方法,得到一个活性好、遗传稳定性高、环境耐受能力强的功能菌群,在近一年的不断驯化和活性检测过程中,群落结构和活性趋于稳定,对钻井泥浆中的重金属、盐类、多聚物和化学处理剂具有很强的耐受能力,可以进一步研发应用工艺,包括降低处理成本、微生物-植物联合修复以及缩短微生物处理周期,探讨工业应用潜力。由于钻井废弃泥浆的固体组分比重大,研究水液分离,降低含油量,参数达标后固体用于建筑材料、工程回填、公园填土、道路基底等是可行的。

参 考 文 献

- [1] Peng Y, Yang X, Sun CJ. The overview of the way to recycle municipal domestic refuse. *Environmental Science and Management*, 2007, 32(4): 102–104. (in Chinese)
彭园, 杨旭, 孙长建. 废弃泥浆无害化处理方法研究. *环境科学与管理*, 2007, 32(4): 102–104.
- [2] Zeng YB, Huang F, Liu SH, Jia JP, Li X. Development of biological treatment technology for drilling wastes. *Advances in Fine Petrochemicals*, 2008, 9(2): 42–45. (in Chinese)
曾玉彬, 黄锋, 刘世海, 贾建平, 李霞. 钻井废弃物的生物处理技术研究进展. *精细石油化工进展*, 2008, 9(2): 42–45.
- [3] Zhao XH, Wang FC. Research development of waste drilling fluids disposal. *Drilling Fluid & Completion Fluid*, 2004, 21(2): 43–48. (in Chinese)
赵雄虎, 王凤春. 废弃钻井液处理研究进展. *钻井液与完井液*, 2004, 21(2): 43–48.
- [4] Wang XC, Hu YX, Zheng SJ, Qiang TT. Application status of waste drilling fluid treatment technology at home and abroad. *Journal of Shanxi University of Science & Technology*, 2010, 28(6): 169–174. (in Chinese)
王学川, 胡艳鑫, 郑书杰, 强涛涛. 国内外废弃钻井液处理技术研究现状. *陕西科技大学学报*, 2010, 28(6): 169–174.
- [5] Žurek R, Jamrozik AG, Gonet A. Toxicity evaluation of spent drilling mud and drilling waste. *AGH Drilling, Oil, Gas*, 2017, 34(1): 243–257.
- [6] Yi SJ, Kang Q. The toxicity, hazardousness and disposal method of drilling waste. *Environmental Science and Technology*, 2001, 24(S1): 48–50. (in Chinese)
易绍金, 康群. 钻井废弃物的毒性、危害及其处理处置方法. *环境科学与技术*, 2001, 24(S1): 48–50.
- [7] Jones FV, Rushing JH, Churan MA. The chronic toxicity of mineral oil-wet and synthetic liquid-wet cuttings on an estuarine fish, *Fundulus grandis*/SPE Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production Conference. The Hague, Netherlands: Society of Petroleum Engineers, 1991.
- [8] Wang SQ, Wang LH, Zeng XH, Zhao JF. Analysis of relevant standards and regulations for treatment of waste drilling mud. *Technology Supervision in Petroleum Industry*, 2016, 32(7): 39–41. (in Chinese)
王树强, 王立辉, 曾晓辉, 赵俊峰. 废弃钻井泥浆处理相关标准及法规浅析. *石油工业技术监督*, 2016, 32(7): 39–41.
- [9] Ji GD, Yang YS, Zhou Q, Sun T, Ni JR. Phytodegradation of extra heavy oil-based drill cuttings using mature reed wetland: an *in situ* pilot study. *Environment International*, 2004, 30(4): 509–517.
- [10] Xu X. Current situation of drilling waste biodegradation technology and its development trend. *Environmental Engineering*, 2010, 28(S1): 205–208, 199. (in Chinese)
徐旭. 钻井废物生物降解技术现状及发展趋势. *环境工程*, 2010, 28(S1): 205–208, 199.
- [11] Leonard SA, Stegemann JA. Stabilization/solidification of petroleum drill cuttings: leaching studies. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 174(1/3): 484–491.
- [12] Hu ZB, Wang QC, Chen TT. Treatment and use of waste

- drilling fluid with existing solids control equipment. *Drilling Fluid & Completion Fluid*, 2017, 34(1): 92–95. (in Chinese)
- 胡祖彪, 王清臣, 陈廷廷. 基于现有固控设备的废钻井液处理及利用技术. 钻井液与完井液, 2017, 34(1): 92–95.
- [13] Ministry of Agriculture of the PRC. NY/T 1377-2007 Determination of pH in soil. Beijing: China Agriculture Press, 2007. (in Chinese)
- 中华人民共和国农业部. NY/T 1377-2007 土壤中 pH 值的测定. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [14] Ministry of Agriculture of the PRC. NY/T 1121.6-2006 Soil testing part 6: method for determination of soil organic matter. Beijing: China Agriculture Press, 2006. (in Chinese)
- 中华人民共和国农业部. NY/T 1121.6-2006 土壤检测 第 6 部分: 土壤有机质的测定. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [15] Cai Z, Zhou QX, Peng SW, Li KN. Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183(1/3): 731–737.
- [16] Faraj MAM, Tatjana SK, Ksenija S, Sonja IP, Hans PN, Peter NH, Branimir J. GC-MS vs. GC-MS-MS analysis of pentacyclic terpanes in crude oils from Libya and Serbia—a comparison of two methods. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2017, 82(11): 1315–1331, doi: 10.2298/JSC170419075A.
- [17] National Development and Reform Commission. SY/T 5119-2008 Analysis method for fractions of rock extract and crude oil. Beijing: Petroleum Industry Press, 2008. (in Chinese)
- 中华人民共和国国家发展和改革委员会. SY/T 5119-2008 岩石中可溶有机物及原油族组分分析. 北京: 石油工业出版社, 2008.
- [18] Zeng JM, Zeng ZS, Yuan HJ, Tan ZY. Advances in culture methods of oligotrophic microbes. *Current Biotechnology*, 2012, 2(3): 165–170. (in Chinese)
- 曾建民, 曾振顺, 原红娟, 谭志远. 难培养微生物培养方法的研究进展. 生物技术进展, 2012, 2(3): 165–170.
- [19] Zhao J, Quan CS. Progress in the study of microbial signal molecule degradation enzymes. *China Biotechnology*, 2012, 32(12): 110–116. (in Chinese)
- 赵晶, 权春善. 微生物信号分子降解酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2012, 32(12): 110–116.
- [20] Liu WQ, Mao ZC, Yang YH, Xie BY. Analysis of soil bacterial diversity by using the 16S rRNA gene library. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(10): 1344–1350. (in Chinese)
- 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性. 微生物学报, 2008, 48(10): 1344–1350.
- [21] Zhang J, Li Z, Zhang Y, Yuan QY. One-step preparation and transformation condition optimization of *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cell. *Jiangsu Agricultural Science*, 2016, 44(12): 529–532. (in Chinese)
- 张迹, 李智, 张宇, 袁巧云. 一步法制备大肠杆菌 BL21(DE3)菌株感受态细胞及转化条件优化. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 529–532.
- [22] Aoshima H, Hirase T, Tada T, Ichimura N, Yamaguchi H, Taguchi M, Myoenzono T. Improvement of heavy oil degradation by *Rhodococcus erythropolis* C2. *Journal of Environmental Biotechnology*, 2006, 5(2): 107–109.
- [23] Shi JC, Jia LY. Primary study on microbiological degradation of heavy oil. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2005, 25(6): 427–430. (in Chinese)
- 史继诚, 贾凌云. 微生物降解重油的初步研究. 化工环保, 2005, 25(6): 427–430.
- [24] Reddy MV, Devi MP, Chandrasekhar K, Goud RK, Mohan SV. Aerobic remediation of petroleum sludge through soil supplementation: microbial community analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 197: 80–87.
- [25] Morris JM, Jin S, Crimi B, Pruden A. Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel. *Chemical Engineering Journal*, 2009, 146(2): 161–167.
- [26] Jacques RJS, Santos EC, Bento FM, Peralba MCR, Selbach PA, Sá ELS, Camargo FAO. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 56(3): 143–150.
- [27] Sorkhoh NA, Al-Awadhi H, Al-Mailem DM, Kansour MK, Khanafer M, Radwan SS. Agarolytic bacteria with hydrocarbon-utilization potential in fouling material from the Arabian Gulf coast. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(7): 554–559.
- [28] Shao ZZ, Cui ZS, Dong CM, Lai QL, Chen L. Analysis of a PAH-degrading bacterial population in subsurface sediments on the Mid-Atlantic Ridge. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2010, 57(5): 724–730.
- [29] Han Z. Pilot test of reusing waste drilling mud for road construction. *Journal of Shengli College China University of Petroleum*, 2014, 28(1): 30–32, 35. (in Chinese)
- 韩卓. 钻井废弃泥浆筑路再利用先导试验. 中国石油大学胜利学院学报, 2014, 28(1): 30–32, 35.
- [30] Wang K, Su YP, Huang K, Zhang XJ, Zhang FW. Research on treatment technology of waste drilling mud of oilfield. *Industrial Water & Wastewater*, 2016, 47(5): 80–83. (in Chinese)
- 王凯, 苏艳佩, 黄凯, 张雪娇, 张发文. 油田钻井废弃泥浆处理工艺研究. 工业用水与废水, 2016, 47(5): 80–83.

Treatment of waste drilling mud by domesticated complex microbial flora

Xiaolong Gao¹, Yunkang Chang¹, Liuyang Shi¹, Xiaoguang Li², Jianfang Zhao², Beibei Sha², Zhiyong Huang¹, Xingbiao Wang^{1*}

¹ Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

² Engineering Technology Research Center for High Salt Wastewater Treatment (chips), Binzhou 256602, Shandong Province, China

Abstract: **[Background]** The waste drilling mud in the oil field has high oil content, complex pollutant and serious environmental hazards, and existing technologies cannot meet the requirements of the increasingly developed petroleum exploitation industry in the treatment of waste drilling mud. Biological treatment of waste drilling mud has the advantages of simple process and low cost, but it also has some limitations, including poor broad-spectrum, long processing cycle, low petroleum degradation rate and the fluctuation of sludge properties affects the active stability. **[Objective]** To improve the biological treatment of waste drilling mud, a microbial community with high activity and high environmental tolerance was constructed, and the comprehensive performance and genetic stability was analyzed. **[Methods]** Through directional enrichment, induction and acclimation methods, the efficiency of petroleum hydrocarbons emulsification and degradation was expected to be improved, and the feedback inhibition of co-metabolic substrate and quorum sensing system sensitivity were expected to be reduced. We analyzed the structure and the active members' types of the microbial community, and studied the corresponding relationship with emulsification-degradation of petroleum hydrocarbons. **[Results]** An active microbial community was enriched from drilling waste mud containing more than 12 g/kg oil, more than 80% aromatics-colloid-asphalt and more than 8 g/kg salt. The main members include *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Rhodobacter* and *Dethiobacter alkaliphilus*, with the ratio of 27.44%, 20.73%, 8.54% and 7.93%, respectively. During the continuous acclimation of more than 22 generations, the quantity of *Pseudomonas*, *Alishewanella* and *Halomonas* was accounted for more than 92.72%, the structure and activity of the microbial community was stable. When the waste drilling mud was treated for 5 days by the active community, the oil content of soil decreased from 12403 mg/kg to 42 mg/kg, the comprehensive oil removal efficiency was 99.67%, and the petroleum hydrocarbon degradation rate was 68.9%. The content in crude oil saturated soil was analyzed before and after microbial community action, the original oil content was 261 g/kg, and the oil content after treatment was 305 mg/kg, deoiling rate was 99.88%. **[Conclusion]** After acclimation, the microbial community has stable activity, strong tolerance to high salt environment, the active microbial community has strong industrial application potential in drilling waste mud, oily soil and sludge pollutant treatment.

Keywords: drilling mud, crude oil degradation, active microbial community, community structure

(本文责编: 李磊)

Supported by the Major Ecological and Environmental Governance of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (16YFXTSF00560), by the Strategic Bio-resource Service Network Plan of Chinese Academy of Sciences (ZSYS-008) and by the Open Fund of Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Nankai University

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-84861930; E-mail: wang_xb@tib.cas.cn

Received: 27 February 2018; Revised: 4 June 2018; Published online: 17 July 2018