Fenton 氧化对微生物群落结构和功能基因的影响

高春阳[1,2,3,4] 张 羽[2,3,4] 张坤峰[3,4] 于文赫[3,4] 杜显元[3,4] 郑 瑾[3,4] 韩占涛[1]

(1. 中国地质科学院水文地质环境地质研究所;2. 中国地质大学(北京)
3. 中国石油集团安全环保技术研究院有限公司;4. 石油石化污染物控制与处理国家重点实验室)

摘 要 通过使用 H_2O_2 和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 所形成的两种类 Fenton 试剂对原油污染的土壤进行氧化修复,在比较两种试剂氧化效果的基础上,采用 16s rDNA 技术对氧化后土壤中土著微生物的群落结构和功能基因的影响进行了比较。结果表明:$Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 所形成的类 Fenton 试剂对原油的降解效果较好,原油降解率达到 50.48%;两种试剂氧化后土壤中的优势菌种均发生变化,由原来的放线菌门(*Actinobacteria*)变为变形菌门(*Proteobacteria*),同时氧化后土壤中的总功能基因含量下降,由原来的 58 093 193 个分别下降到 36 282 211个和 32 355 524 个,而各种通路基因在总基因的占比变化不大。

关键词 Fenton; 原油污染; 土壤; 微生物群落结构; 功能基因

DOI:10.3969/j.issn.1005-3158.2019.01.010 文章编号:1005-3158(2019)01-0037-04

0 引 言

石油被广泛应用于生产及生活的各个领域,包括工业、农业、交通运输业等,素有工业"血液"之称,目前,全球石油总产量超过 30 亿 t[1-3]。然而,在石油的开采以及运输等过程中出现的"跑、冒、滴、漏"等现象常导致其进入土壤和地下水进而造成污染[4-5]。石油是由烷烃、环烷烃、芳香烃等组成的混合物,具有高黏度、低流动性、低挥发性和低生物降解性等特点,一旦进入土壤和地下水将很难通过土壤和地下水的自我净化能力去除[6]。现有石油类污染土壤的修复方法大体包括物理法、化学法和生物法[7-11]。其中化学氧化法具有修复污染物范围广、修复周期短、氧化剂易得等优点,是目前处理地下水、沉积物和土壤石油污染的主流方法[12]。

化学氧化技术中常用的化学药剂包括 O_3、$KMnO_4$、$Na_2S_2O_8$ 和 Fenton 试剂等,其中 Fenton 试剂因其氧化后不产生其他副产物而被广泛应用[13]。在高浓度石油烃污染土壤修复中通常采用化学氧化技术作为预处理将高浓度的石油烃降低为低浓度的石油烃,然后再采用微生物技术或自然监测法进行后续修复[14]。然而,化学试剂不仅能降解石油烃同时也是一种杀菌剂,在氧化过程中不可避免地对土著微生物造成影响,而致使后续的生物过程失效。因此评价化学氧化后土壤中的微生物的群落结构和功能基因的变化对后期的生物降解过程具有重要的意义。

目前在对 Fenton 试剂的研究中提出采用固体 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$(溶于水后分解:$Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2 \rightarrow Na_2CO_3 + 1.5H_2O_2$)来替代 H_2O_2 形成 Fenton 试剂,通过 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 缓慢释放 H_2O_2 来避免与石油烃反应时发生的自由基淬灭反应[15]。因此,本研究采用 H_2O_2 和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 所形成的两种类 Fenton 试剂对石油烃污染的土壤进行氧化处理,然后通过 16s rDNA 高通量技术对土壤中土著微生物的群落结构和功能基因进行分析。

1 实验部分

1.1 试剂材料和仪器

过氧化氢($\omega(H_2O_2)=30\%$,分析纯)、过碳酸钠($Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$,分析纯)、四氯化碳(CCl_4,分析纯)、七水合硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$,分析纯)、一水合柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$,分析纯),FastDNA kit for soil(MP Biomedicals),Tris-HCl 缓冲液。

实验土壤采自新疆油田原油污染地区,挑除石块、动植物残体后过 2 mm 筛,密封后于 −70℃ 冰箱保存。石油污染土壤的基本理化性质见表 1。

表 1 石油污染土壤的基本理化性质

原油含量/(mg·kg^{-1})	pH 值	含水率(ω)/%	总铁/(mg·kg^{-1})	总锰/(mg·kg^{-1})	砂砾/%	粉粒/%	黏粒/%
42 326.24	7.68	1.03	1 983.31	52.18	86.56	12.06	1.38

高春阳,中国地质大学(北京)2016 级在读硕士研究生,现于中国石油集团安全环保技术研究院有限公司实习,研究方向:土壤地下水修复。通信地址:北京市昌平区沙河镇西沙屯桥西中国石油创新基地 A 座,102206。E-mail:1278027305@qq.com。

实验所用仪器包括：KH-600TDB 型超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）、LD5-10B 型低速大容量离心机（江苏同居科技仪器有限公司）、Oil-480 型红外测油仪（北京华夏科创仪器股份有限公司）、7900 型 PCR 仪（美国 ABI）、QuantiFluor™-ST 微型荧光计（美国 Promega-GloMax Prome）。

1.2 分析方法

土壤含油率的测定采用超声萃取法[16]，即称取干重为 5 g 的土壤于 EPA VOA 瓶中，然后在瓶中加入 10 mL CCl_4溶液后于 100 W 的超声波条件下超声 10 min；随后在 800 r/min 的离心机中进行离心 5 min；将上清液通过盛有 1 cm 厚度的无水硫酸钠（300℃干燥 2 h）长颈玻璃漏斗（漏斗颈部塞有少许玻璃棉）收集至锥形瓶中；然后重复上述步骤至样品液无色。最后上清液通过稀释于红外测油仪中进行测定。

1.3 土壤微生物的测序

采用 FastDNA kit for soil 试剂盒对土壤中的 DNA 进行提取，完成基因组 DNA 抽提后，利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA，再使用带有 barcode 的特异引物进行 PCR 扩增；参照电泳初步定量结果，将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 进行检测定量，之后按照每个样本的测序量要求，进行相应比例的混合。

1.3.1 Miseq 文库构建

Miseq 文库构建主要包括以下步骤：

1）通过 PCR 将 Illumina 官方接头序列添加至目标区域外端；

2）使用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物；

3）Tris-HCl 缓冲液洗脱，2%琼脂糖电泳检测；

4）氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段。

1.3.2 Miseq 测序

Miseq 测序主要包括以下步骤：

1）DNA 片段的一端与引物碱基互补，固定在芯片上；

2）以 DNA 片段为模板，芯片上固定的碱基序列为引物进行 PCR 合成，在芯片上合成目标待测 DNA 片段；

3）变性、退火后，芯片上 DNA 片段的另一端随机与附近的另外一个引物互补，也被固定住，形成“桥（bridge）”；

4）PCR 扩增，产生 DNA 簇；

5）DNA 扩增子线性化成为单链；

6）加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，每次循环只合成一个碱基；

7）用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类；

8）将“荧光基团”和“终止基团”化学切割，恢复 3′端黏性，继续聚合第二个核苷酸；

9）统计每轮收集到的荧光信号结果，获知模板 DNA 片段的序列。

1.4 实验设计

实验共分 3 组，分别为空白组（CK）、H_2O_2形成的类 Fenton 试剂组（HP）和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$形成的类 Fenton 组（SPC），每组称取所采集土壤样品 100 g于 250 mL 锥形瓶中，实验前分别配置 0.5 M 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.5 M 的 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 溶液，过程中依次加入柠檬酸溶液和硫酸亚铁溶液，然后加入 H_2O_2溶液和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$固体，最后补充去离子水使水土比控制为 1∶1。药剂添加后，将锥形瓶置于恒温摇床中于 30℃、150 r/min 下反应 2 d，实验配方如表 2。

表 2 实验配方

编号	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$/mL	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$/mL	H_2O_2（ω=30%）/mL	$Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$/g	去离子水/mL
CK	0	0	0	0	100
HP	0.6	0.6	0.6	0	98.2
SPC	0.6	0.6	0	0.62	98.8

2 结果与讨论

2.1 两种氧化方式对原油的降解效果比较

氧化后土壤中的原油含量如图 1 所示，由图 1 可见，SPC 组对原油的降解效果明显好于 HP 组，其中 SPC 组经过氧化后原油含量从 42 326.24 mg/kg 降解到 20 960.33 mg/kg，相应的降解率达到 50.48%，而 HP 组氧化后的原油含量为 27 689.33 mg/kg，降解率为 34.58%。占升等[15]应用 H_2O_2和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$活化 $Na_2S_2O_8$对 PAHs 污染的土壤进行降

解,得出 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 活化好于 H_2O_2,这可能是由于 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 为有载体的 H_2O_2,在反应的过程中缓慢释放 H_2O_2,进而避免了氧化剂产生的自由基间的淬灭反应,导致其降解效果更好。

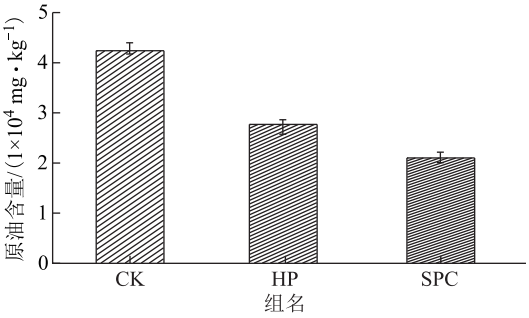


图 1　氧化后各组的原油含量

2.2 两种氧化方式对土著微生物多样性的影响

氧化反应后,对 3 个样品土壤中的 Alpha 微生物多样性分析,计算的 Shannon、Simpson、Ace、Chao、Coverage 等指数如表 3 所示。

表 3　土壤样品微生物群落多样性指数

样品名称	Shannon	Simpson	Ace	Chao	Coverage
CK	3.100 845	0.097 251	283.126 841	287.833 333	0.999 304
HP	3.379 973	0.060 110	218.276 225	217.555 556	0.999 355
SPC	3.138 511	0.093 248	213.083 685	219.071 429	0.999 363

Chao 和 Ace 指数表征样品微生物群落丰度,数值越大丰度越高,从表 3 得出,两种氧化剂均使微生物群落丰度降低,未进行氧化的 CK 组,其 Chao 指数和 Ace 指数分别为 287.833 333 和 283.126 841,而经过 HP 和 SPC 氧化处理后的 Chao 和 Ace 则降低到 210～220,且这两种氧化方式对微生物群落丰度的影响相差不大。Shannon 指数和 Simpson 指数表征微生物的多样性及均匀性。由表 3 可知,经过氧化处理后 Shannon 指数变化不大,即说明氧化后对微生物的多样性影响不大。比较两种氧化剂氧化后的 Simpson 指数发现,HP 氧化后其 Simpson 指数降低,这表明经过 HP 氧化后土壤中的微生物群落均匀性变差,而 SPC 氧化后的 Simpson 指数则变化不大。

通过对图 2 的 3 个土壤样品 OUT 分布物种 Venn 图可以得出 CK 组、HP 组和 SPC 组共有的 OUT 有 146 个,经过氧化处理的 HP 和 SPC 组均与未进行氧化处理的空白组共有的 OUT 有 166(146+20),且经过 HP 和 SPC 氧化后的物种大部分是相同的。

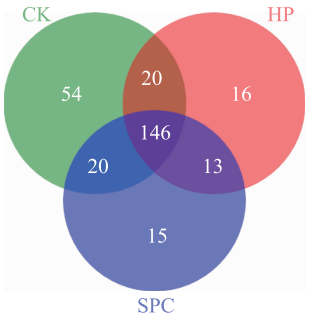


图 2　土壤样品 OUT 分布 Venn 图

在门水平分析土壤样品中的微生物群落结果组成,如图 3 所示,化学氧化后,土壤中的优势菌种发生变化,未进行氧化的 CK 组,其优势菌种为放线菌门(*Actinobacteria*)占整体的 47.16%,其次为变形菌门(*Proteobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)分别占总体的 31.54%和 18.58%。而经过 HP 和 SPC 氧化后土壤中的优势物种均变为了变形菌门(*Proteobacteria*),放线菌门(*Actinobacteria*)则变为次级优势种群,但所占的比例各有不同,在 HP 组中占 80.66%,而在 SPC 组则占据 61.16%。其次 CK 组中存在的异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)(1.46%)则在氧化后消失。有研究表明[17] 放线菌门(*Actinobacteria*)可以在高温,低含水量的条件下形成孢子,被认为是对有机质分解均有良好作用的菌门。在本研究中放线菌门在长期原油污染土壤中形成了优势菌属,具有一定的原油降解能力,但经过化学氧化后此菌门变为次一级的优势物种,因此若后续进行生物修复,可能化学氧化具有一定的影响。

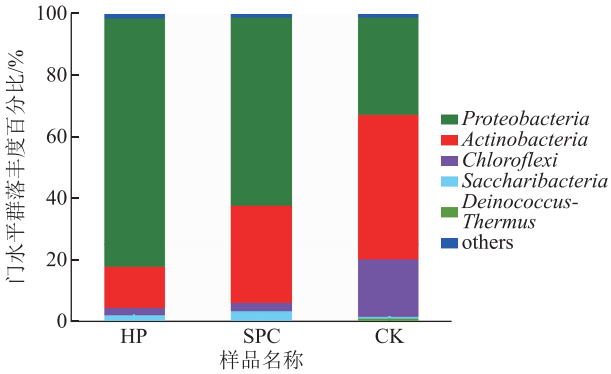
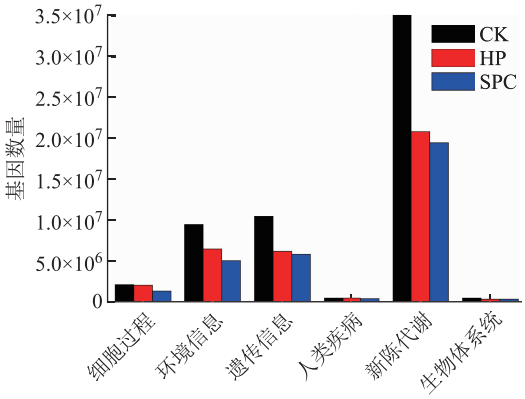


图 3　不同氧化处理后样品中微生物群落结构组成(门水平)

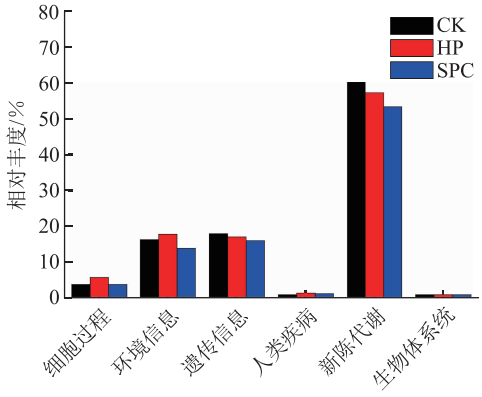
2.3 氧化后功能基因变化情况

氧化后功能基因变化采用 KEGG 基因组数据库进行分析,具体包括细胞过程通路、新陈代谢通路、遗传信息处理通路、环境信息处理通路、人类病症相关通路和生物体系统通路[18]。不同氧化方式氧化前后

在 KEGG Pathway 功能分类上所含基因数目和丰度情况如图 4 所示。从图 4 可看出两种氧化剂氧化后在基因数量上均出现降低的现象，未进行氧化的 CK 组总基因数量为 58 093 193 个，而经过 HP 和 SPC 氧化后总基因数量则分别下降到 36 282 211 个和 32 355 524个，其中对控制新陈代谢通路上的基因影响最大，由 CK 的 34 975 895 个分别降低到 20 775 146 和 19 424 732 个，SPC 对基因数量的影响更大。这是由于氧化剂也是杀菌剂，氧化过程中致使一部分的土著微生物死亡所致[14]。然而在各种基因在总体基因的丰度上变化不大，其中 HP 氧化后在细胞过程通路和环境信息处理通路占比略有增加，分别从原占比的 3.74 和 16.3 增加到 5.68 和 17.76。



(a) 各功能基因数量



(b) 各功能基因占比

图 4 氧化前后在 KEGG Pathway 功能分类上所含基因数目和丰度情况

3 结 论

1) H_2O_2 和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 形成的类 Fenton 试剂对原油污染土壤的石油类降解率分别为 34.58% 和 50.48%，$Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 所形成的类芬顿试剂降解效果更好。

2) H_2O_2 和 $Na_2CO_3 \cdot 1.5H_2O_2$ 形成的类 Fenton 试剂氧化后均对土壤中的土著微生物丰度产生影响，表征微生物群落丰度的 Chao 和 Ace 指数有原来的 287.833 333 和 283.126 841 降低到 210～220，且氧化后土壤中的优势微生物种群发生变化，原来的放线菌门(*Actinobacteria*)变为次级优势种群，而变形菌门(*Proteobacteria*)成为新的优势种群。

3) 氧化后土壤中的总基因数量降低，两种氧化方式氧化后总基因数量由 58 093 193 个分别下降到 36 282 211个和 32 355 524 个，而各种通路基因在总基因的占比变化不大，其中 HP 氧化后在细胞过程通路和环境信息处理通路占比略有增加，分别从原占比的 3.74 和 16.3 增加到 5.68 和 17.76。

参 考 文 献

[1] 黄曼曼，邓百万，武晓雨，等. 石油污染土壤的微生物修复技术研究进展[J]. 黑龙江农业科学，2017(4)：149-153.

[2] 崔丽虹. 石油烃降解菌的筛选、鉴定及复合菌群降解效果的研究[D]. 北京：中国农业科学院，2009：1-56.

[3] 韩寒冰，刘杰凤. 机油降解菌的分离及其降解特性研究[J]. 安徽农业科学，2009，37(21)：9883-9884.

[4] LU M, ZHANG Z, QIAO W, et al. Remediation of petroleum-contaminated soil after composting by sequential treatment with Fenton-like oxidation and biodegradation[J]. Bioresource technology, 2010, 101(7): 2106-2113.

[5] CHEN M, XU P, ZENG G, et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs[J]. Biotechnology advances, 2015, 33(6): 745-755.

[6] TZAITANG T, CHIHMING K, TZUNGYUH Y, et al. Remediation of fuel oil-contaminated soils by a three-stage treatment system[J]. Environmental engineering science, 2009, 26(3): 651-659.

[7] 薛蓉蓉. 克拉玛依石油污染土壤石油烃降解菌及其降解特性研究[D]. 青岛：中国石油大学(华东)，2010：1.

[8] 孙燕英，陈鸿汉，何炜. 土壤中石油类污染物的化学氧化去除研究[J]. 土壤，2008，40(1)：130-134.

[9] KOMMALAPATI R R, VALSARAJ K T, CONSTANT W D, et al. Aqueous solubility enhancement and desorption of hexachlorobenzene from soil using a plant-based surfactant[J]. Water research, 1997, 31(9): 2161-2170.

[10] SRA K S, THOMSON N R, BARKER J F. Persulfate injection into a gasoline source zone[J]. Journal of contaminant hydrology, 2013, 150(5): 35-44.

(下转第 47 页)

展研究，高振兴[7]通过实验证明应该降低回注水中的CO_2组分，因为它会加速地层方解石的溶解速率。回注标准的更新及判定其对地层造成的影响需要开展更多因素更深入的研究佐证。此外，回注井的安全是建立在做好通道隔层的加固的基础之上，应加强监测工作。

页岩气采出水的回用目前均未复配压裂液，其处理技术的选择取决于所复配压裂液时各企业执行的标准，因污水产生的行业限制，多为企业标准。开发现场多使用化学氧化、杀菌、化学絮凝等技术，页岩气开采时，周边环境有自然水体时，以一定比例掺复配压裂液使用，可以更好的使复配压裂液的黏度、张力、配伍性指标达到要求。采出水的回用是“十三五”节水减排的环保需求。

目前，因页岩气开采具有周期短的特性，在技术储备方面，要结合地方标准，并考虑撬装化处理设施，便于移动作业。少数具有前瞻性的开采单位，已经积极筹备基于达标处理的页岩气污水处理平台。本文强调地方外排标准中新增 TDS、氯化物等指标，需页岩气开采单位重点关注并积极开展小试、中试研究，做好技术调研及储备。

特别强调做好脱盐技术的储备方案，建议选择适度脱盐、逐级浓缩、多种技术耦合的脱盐工艺流程以降低运行成本，提高脱盐效率及产水水质。

我国页岩气储量丰富，具有较大的开发潜力，现场处理技术的选择不仅要考虑多撬装化处理设施，还应在技术集成、装置一体化、处理成本控制等方面深入研究。也为压裂液复配后，残余无法回用的废水的达标处理做技术储备。

参 考 文 献

[1] 宋磊，张晓飞，王毅琳，等．美国页岩气巧裂返排液处理技术进展及前景展望[J]．环境工程学报，2014，11：4721-4725．

[2] 张东晓，杨婷云．美国页岩气水力压裂开发对环境的影响[J]．石油勘探与开发，2015，42(6)：801-807．

[3] ERM. Recovered water management study in shale wells, ERM project 0243719[C]. Finally Report, 2014.

[4] 刘飞，潘登，覃勇．页岩气藏压裂返排液回收处理技术探讨[J]．钻采工艺，2015，38(3)：69-72．

[5] 杨志刚，魏彦林，吕雷，等．页岩气压裂返排液回用处理技术研究与应用[J]．天然气工业，2015，35(5)：131-137．

[6] 杨贡林，许景媛，夏珊．气田废水中高盐、高钙的多效蒸发综合治理工程技术的应用研究[J]．中国井矿盐，2018，49(3)：7-10．

[7] 高振兴．四川某地页岩气开发中压裂液组分演化及其对地下水的影响[D]．北京：中国地质大学，2017：7-9．

（收稿日期　2018-10-08）
（编辑　李　娟）

（上接第 40 页）

[11] WOLICKA D, SUSZEK A, BORKOWSKI A, et al. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. [J]. Bioresource technology, 2009, 100(13): 3221-3227.

[12] YEN C H, CHEN K F, KAO C M, et al. Application of persulfate to remediate petroleum hydrocarbon-contaminated soil: Feasibility and comparison with common oxidants [J]. Journal of hazardous materials, 2011, 186: 2097-2102.

[13] 金学锋，张国华，乔昌明，等．类芬顿试剂应用于地下水石油烃污染修复的实践[J]．中国资源综合利用，2017，35(2)：15-17．

[14] 徐金兰，黄廷林，GROTENHUIS T．呼吸试验评价化学氧化前后石油污染土壤微生物活性的研究[J]．土木工程学报，2010(增刊)：440-444．

[15] 占升，郑义，李森，等．不同氧化剂活化过硫酸钠对土壤中多环芳烃降解的影响[J]．浙江农业学报，2017，29(1)：129-136．

[16] 陈昌照，于文赫，陈宏坤，等．热洗后油泥砂化学氧化处理可行性研究[J]．油气田环境保护，2017，27(2)：14-17．

[17] JURADO M, LOPEZ M J, SUAREZESTRELLA F, et al. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting [J]. Bioresource technology, 2014, 162(6): 283-293.

[18] 王东旭．基于 KEGG 的代谢通路最短路径问题的研究[D]．哈尔滨：哈尔滨工业大学，2007：1-44．

（收稿日期　2018-11-13）
（编辑　王　蕊）