

陈宇峰, 郑秀丽, 李晶, 等. 渤海沉积物中甲烷氧化速率及同位素分馏规律研究[J]. 岩矿测试, 2018, 37(2): 164 - 174.  
CHEN Yu-feng, ZHENG Xiu-li, LI Jing, et al. Study on Oxidation Rate and Isotope Fractionation of Methane in Bohai Sea Sediments [J]. Rock and Mineral Analysis, 2018, 37(2): 164 - 174. [DOI: 10.15898/j.cnki.11-2131/td.201707100117]

## 渤海沉积物中甲烷氧化速率及同位素分馏规律研究

陈宇峰<sup>1,2</sup>, 郑秀丽<sup>3</sup>, 李晶<sup>2,4</sup>, 贺行良<sup>2\*</sup>, 刘昌岭<sup>2</sup>, 孟庆国<sup>2</sup>, 秦德谛<sup>1,2</sup>, 张培玉<sup>1</sup>

(1. 青岛大学环境科学与工程系, 山东 青岛 266071;

2. 自然资源部天然气水合物重点实验室, 中国地质调查局青岛海洋地质研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛易科检测科技有限公司, 山东 青岛 266199;

4. 中国地质大学(武汉)工程学院, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 渤海蕴藏着大量的油气资源, 其主要成分是温室气体甲烷, 自然环境下或人为因素的影响会引起其泄露与迁移, 对环境造成负面的影响。但是, 泄露与迁移过程中微生物会氧化绝大部分甲烷, 而不同的环境条件会影响氧化过程中的速率及碳同位素分馏过程。为了更好地认识渤海沉积物中甲烷氧化规律和同位素分馏规律以及为进一步研究此区域的甲烷氧化提供参考, 本文选取渤海沉积物作为进行实验室模拟降解实验原料, 借助气相色谱和气相色谱-同位素比值质谱仪测定渤海沉积物中的甲烷氧化速率, 确定了甲烷氧化碳同位素分馏系数  $\varepsilon$ 。结果表明: 渤海沉积物中甲烷氧化作用以好氧氧化占主导, 氧化温度和气体流速是影响甲烷氧化速率的主要因素。在连续培养的模式下, 当温度由 28°C 降至 15°C 时, 甲烷的平均氧化速率降低  $60\% \pm 10\%$ , 即温度越低越不利于甲烷氧化作用的发生。而气体流速由 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  增加至 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  时, 甲烷的平均氧化速率增加  $90\% \pm 10\%$ , 即增加气体流速有利于氧化反应速率的提高。实验还发现, 甲烷碳、氢同位素的分馏效应主要受氧化温度制约, 分馏程度与温度呈正相关。实验结论认为温度是影响甲烷氧化速率和同位素分馏规律的重要因素。

**关键词:** 渤海沉积物; 甲烷氧化速率; 同位素分馏; 生物降解; 气相色谱法; 气相色谱-同位素比值质谱法  
**要点:**

(1) 选取渤海沉积物进行了不同条件下的甲烷氧化实验。

(2) 渤海沉积物氧化甲烷时以好养氧化为主。

(3) 温度是影响甲烷氧化的重要因素。

**中图分类号:** 0623.11; 0657.71      **文献标识码:** A

气候变暖引起的全球范围内的极端气候, 已经引起学者们对全球气候变化的高度关注<sup>[1-2]</sup>, 而全球气候变暖的主要原因是温室气体的排放。甲烷作为对全球温室效应贡献率仅次于二氧化碳的重要温室气体, 其相同摩尔量所引起的温室效应比  $\text{CO}_2$  高出 20~30 倍, 影响十分显著。研究数据显示, 随着人类对能源的开采与使用, 目前大气中  $\text{CH}_4$  浓度仍

在以每年约 1.0%~1.2% 的速度不断增长<sup>[3]</sup>。海洋中虽然蕴藏着大量的甲烷气体, 但值得注意的是, 全球甲烷排放总量中来自于海洋中的仅占 2%<sup>[4]</sup>。其主要原因是, 海洋环境中海底游离烃类气体穿过沉积物发生渗漏的过程中, 会发生一系列的生物降解作用和物理化学作用<sup>[5-7]</sup>, 从而降低了继续向上运移进入海水和大气层中的通量<sup>[8]</sup>。在这一系列

**收稿日期:** 2017-07-10; **修回日期:** 2018-01-12; **接受日期:** 2018-03-21

**基金项目:** 中国地质调查局地质调查项目“天然气水合物测试技术与模拟实验”(DD20160216); 国家自然科学基金资助项目(41406076)

**作者简介:** 陈宇峰, 硕士研究生, 环境工程专业。E-mail: 861956316@qq.com。

**通信作者:** 贺行良, 硕士, 高级工程师, 从事同位素有机地球化学分析测试与研究工作。E-mail: qdhxl2008@126.com。

过程中,微生物作用下的甲烷氧化降解过程占主导作用,消耗了超过90%的渗漏甲烷<sup>[9]</sup>。

在深海处,主要是由甲烷厌氧氧化古菌和硫酸盐还原细菌共同作用发生甲烷厌氧氧化,其化学计量关系为:CH<sub>4</sub> + SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + HS<sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sup>[10]</sup>。当海水较浅即氧气含量较高时,则容易发生甲烷好氧氧化,主要是在甲烷好氧氧化菌的作用下,将甲烷氧化成二氧化碳和水,其化学计量关系为:CH<sub>4</sub> + 2O<sub>2</sub> → CO<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O<sup>[11]</sup>。因此,甲烷的生物氧化作用在调控全球甲烷收支平衡以及缓解因甲烷引起的温室效应等方面扮演着十分重要的角色,已经成为近年来海洋生物地球化学领域的研究热点之一<sup>[12-15]</sup>。

研究海底沉积物中渗漏甲烷气体的迁移、转化过程,定量揭示甲烷气体的氧化速率、碳氢同位素分馏规律等科学问题,有助于人们更好地认识海底渗漏甲烷对全球气候、海洋生态环境的负面影响。然而,以往的研究多集中在油气田、天然水合物赋存区和海洋冷泉渗漏区微生物菌属的分离鉴定研究<sup>[16-19]</sup>,以及利用微生物异常情况作为指示来寻找油气藏<sup>[20-22]</sup>、分析轻烃的渗漏情况<sup>[23-24]</sup>。由于同位素间的化学、物理等性质存在着微小的差异,因此甲烷氧化菌在氧化CH<sub>4</sub>时对<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>和<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>的选择具有差异性,这种差异被称为同位素效应。甲烷氧化菌优先氧化<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>,导致<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>增多,从而使排向大气的<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>与<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>之间的分配发生改变,这种作用称为“同位素分馏作用”。利用这个原理,可以测定同位素分馏系数 $\varepsilon$ ,即表示甲烷氧化菌喜好<sup>12</sup>CH<sub>4</sub>的程度。还可以测定CH<sub>4</sub>氧化过程中 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化来确定其影响因素。

利用稳定性碳同位素法来研究甲烷氧化过程中的影响因素更加准确。因此,国内外学者已将稳定性碳同位素法广泛应用到甲烷的相关研究中。尽管陈立雷等<sup>[25]</sup>通过轻烃的生物降解模拟实验,探讨了海洋油气微生物对C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>轻烃组分的降解规律,但有关利用烃类气体含量变化及同位素分馏系数等参数,定量研究渤海沉积物中甲烷气体的氧化速率及碳、氢同位素分馏规律的工作鲜有报道。本文以渤海油气田区沉积物为研究对象,开展不同培养条件(温度、流速、氧气量等)和不同培养方式(分批培养、连续培养)下甲烷气体的微生物氧化降解试验,利用气相色谱仪和气相色谱-同位素比值质谱仪测定渤海沉积物中的甲烷氧化速率,探索研究了碳、氢同位素分馏规律。

## 1 实验部分

### 1.1 沉积物来源与采集

实验选用采自渤海湾的黏土质新鲜海洋沉积物,采集容器事先进行了充分洗涤和高温消毒灭菌,沉积物采集后装入无菌袋中密闭冷藏保存以保证样品中原始细菌的存活并排除其他污染。

### 1.2 仪器和主要试剂

Trace GC Ultra型气相色谱仪(GC-FID/TCD,美国ThermoFisher公司),MAT 253型气相色谱-同位素比值质谱仪(GC-IRMS,美国ThermoFisher公司),HP-PLOT Q毛细管色谱柱(30 m × 0.32 mm × 20.0 μm,美国J&W公司)。

气密性微量注射器(美国Hamilton公司),玻璃顶空瓶(120 mL,德国CNW公司),双口玻璃柱筒(青岛海洋地质研究所研制),丁基橡胶密封塞(美国Bellco公司),ZQP-75D型恒温振荡器(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司),LT-BIX低温温生化培养箱(立德泰勃科学仪器有限公司),SW-CJ-1CU型洁净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

高纯甲烷、高纯氧气、高纯氮气:纯度均为99.999%,购自青岛德海伟业科技有限公司。

### 1.3 培养液

磷酸氢二钾1.5500 g,二水磷酸二氢钠1.1050 g,氯化铵2.0000 g,六水氯化镁0.0750 g,硫酸铵0.1000 g,七水硫酸锌0.0044 g。蒸馏水1000 mL, pH=7。

微量元素(淡红色):氯化钙1.3850 g,四水氯化锰1.9880 g,七水硫酸亚铁2.2820 g,钼酸铵0.2960 g,五水硫酸铜0.6130 g,六水氯化钴0.7370 g。蒸馏水250 mL, pH=7,添加0.2 mL。

### 1.4 实验方法

模拟实验采用分批氧化和连续氧化两种不同培养方式进行。其中分批氧化是将沉积物、培养液、甲烷、氧气等加入顶空瓶,然后置于恒温摇床中进行实验,此过程主要模拟降解在海水中的溶解甲烷。连续氧化实验是将装有沉积物和培养液的双口玻璃柱筒以及装有甲烷、氧气、氮气的气体瓶用塑料软管连接,再利用蠕动泵使实验气体(甲烷、氧气等)不断从沉积物中渗透穿过。实验中,利用控制变量法分别设置不同温度、蠕动泵流速等变量参数进行实验,该过程主要模拟海水中游离态甲烷的氧化分解。

#### 1.4.1 分批氧化

取120 mL玻璃顶空瓶,加入40 g新鲜沉积物

和20 mL培养液,密封,抽真空。实验组顶空瓶中注入100 mL O<sub>2</sub>、80 mL N<sub>2</sub>和20 mL甲烷,对照组顶空瓶中注入100 mL O<sub>2</sub>和100 mL N<sub>2</sub>。最后,将顶空瓶摇匀,倒置,置于恒温摇床中进行分批氧化实验。实验中N<sub>2</sub>的添加是作为对照组中甲烷的替代品以及增加反应系统中的气体压力,以便在实验后期氧气消耗以后能准确检测到压力值。

#### 1.4.2 连续氧化

取100 mL双口玻璃柱筒,注入120 g新鲜沉积物和60 mL培养液,密封,抽真空。向实验组气体瓶中分别注入300 mL O<sub>2</sub>、500 mL N<sub>2</sub>和60 mL CH<sub>4</sub>,向对照组气体瓶中分别注入300 mL O<sub>2</sub>和560 mL N<sub>2</sub>。最后,将双口玻璃柱筒置于恒温生化培养箱中进行连续氧化实验,其中,N<sub>2</sub>的作用与分批氧化中的相同。

#### 1.4.3 仪器分析

CH<sub>4</sub>和CO<sub>2</sub>含量采用GC-FID/TCD法测定。色谱条件为:载气为99.999%高纯He;进样量50 μL,分流进样,分流比为10:1;进样口温度200℃;柱流速3.0 mL/min;柱箱温为140℃保持4 min。FID温度280℃,氢气、空气、尾吹气流速分别为40 mL/min、450 mL/min、40 mL/min。详细测定方法参见贺行良等<sup>[26]</sup>。

CH<sub>4</sub>和CO<sub>2</sub>碳氢同位素采用GC-IRMS法测定。GC升温程序:初始温度60℃(保持3 min);高纯He(99.999%)作载气;柱流速2.0 mL/min;进样口温度100℃;分流进样,分流比与进样量根据各组分含量高低实时调整。测定δ<sup>13</sup>C时燃烧炉温度1000℃;测定δD时裂解炉温度为1420℃。IRMS离子化能量70 eV;发射电流1.5 mA,加速电压10 kV;真空度为2.0 × 10<sup>-9</sup> kPa。测定δ<sup>13</sup>C值时,IRMS监测离子(m/z)为44、45、46;测定δD值时,IRMS监测离子为2、3。δ<sup>13</sup>C和δD测定结果的表达式如下:

$$\delta_{\text{样品}} = \left( \frac{R_{\text{样品}}}{R_{\text{标准}}} - 1 \right) \times 1000\%$$

式中:R<sub>样品</sub>、R<sub>标准</sub>分别为样品、国际标准物质PDB和SMOW中<sup>13</sup>C与<sup>12</sup>C的丰度比(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)或D与H的丰度比(D/H)。详细测定方法参见贺行良等<sup>[27]</sup>。

#### 1.4.4 计算方法

甲烷氧化速率按以下公式计算:

$$v = \frac{n_0 - n_t}{m \cdot t}$$

式中:v表示氧化速率(μmol/g · d<sup>-1</sup>);n<sub>0</sub>表示开始时体系中甲烷的物质的量(μmol);n<sub>t</sub>表示某个时间

点体系中甲烷的物质的量(μmol);m表示沉积物的质量(g);t表示氧化时间(d)。

甲烷碳氢同位素分馏系数(分馏因子)使用下述方程式确定,该式可定量计算封闭同位素体系中甲烷气体在单步骤单向反应中发生的分馏效应<sup>[28-29]</sup>。

$$\varepsilon = \frac{10^3 \times \ln \frac{10^{-3} \delta_f + 1}{10^{-3} \delta_i + 1}}{\ln(1 - f)}$$

式中:δ<sub>i</sub>是实验开始时体系中的δ<sup>13</sup>C-CH<sub>4</sub>或δD-CH<sub>4</sub>值,δ<sub>f</sub>是实验过程中某个时间点δ<sup>13</sup>C-CH<sub>4</sub>或δD-CH<sub>4</sub>的测量值,f是在某个时间点消耗的甲烷气体分数。分馏因子ε可以通过绘制方程式右边表达式的分子与分母ln(1-f)制作线性回归曲线来求解,方程式中的斜率即为分馏因子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 沉积物中氧气含量对甲烷氧化作用的影响

甲烷的生物氧化类型包括好氧氧化和厌氧氧化两种,分别由甲烷好氧氧化菌和甲烷厌氧氧化菌参与完成。为确定渤海沉积物中甲烷气体的氧化作用类型,在分批氧化模式下,分别考察了不同氧气含量(V<sub>氧气</sub>/V<sub>甲烷</sub>=5:1,V<sub>氧气</sub>/V<sub>甲烷</sub>=0:1)对甲烷氧化作用的影响,结果见图1。从图1可知,在温度为28℃、转速为50 r/min的实验条件下,氧气含量为零(即厌氧氧化)时,甲烷含量呈“快-慢”的规律降低,约前15天内甲烷剩余含量降低较为明显,之后趋于稳定,直至近90天时,其含量仍剩余约90%保持不变。而在有氧气参与反应(即好氧氧化)时,甲烷含量呈“快-慢-快”的规律降低,同样在前15天内出现一个明显的降低趋势,在实验的后15天,甲烷剩余含量并未保持稳定,而是继续氧化,直至几乎全部氧化完毕,甲烷剩余含量约为零。

实验结果表明,在厌氧氧化和好氧氧化两种方式中,前15天内甲烷含量均出现减少约5%,这种含量的微弱变化可能主要是由培养液和沉积物对甲烷气体的溶解与吸附作用所致,与陈立雷等<sup>[30]</sup>的研究结论相似。同时,从15天后甲烷含量变化趋势可见,氧气含量对试验沉积物中甲烷气体氧化作用的影响十分显著。有氧气参加的实验组中,甲烷含量降低十分明显,甲烷好氧氧化菌的生物降解作用占主导,实验中的甲烷会被全部氧化。而厌氧培养实验组中短期内沉积物中甲烷厌氧降解作用的贡献较弱,在之后的90天内的培养中,其甲烷含量趋于稳

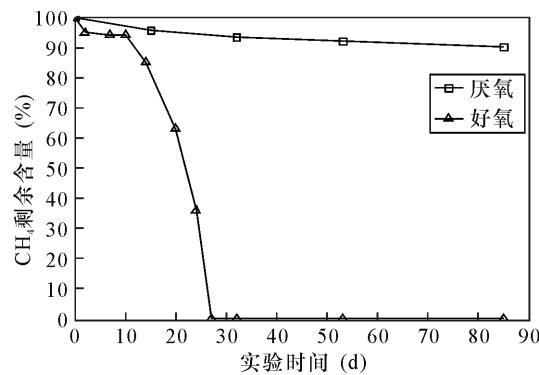


图1 氧气含量对甲烷氧化作用的影响

Fig. 1 Effect of oxygen content on methane oxidation

定状态,与好氧培养差异明显。产生这种差异的原因可能是由于渤海地貌为浅海盆地,长久以来大量的河沙注入,导致渤海平均水深仅为18 m,最深处也仅为84 m。因此,沉积物以及海水中含氧量较高,其含有的微生物种类主要为好养型微生物<sup>[31]</sup>,更容易发生的是甲烷好氧氧化。

鉴于此,本文后续实验将重点研究甲烷好氧氧化降解作用,同时忽略甲烷气体在培养液和沉积物中的溶解与吸附损失。

## 2.2 渤海沉积物中甲烷氧化速率及影响因素

### 2.2.1 不同氧化方式下甲烷含量随氧化时间的变化规律

渤海海底自然环境中,当甲烷气体较少时会以溶解气形式存在。然而,当海底发生自然运动或者人工作业等活动造成甲烷的迁移或者泄露时,甲烷的通量会变大,并且以游离气形式存在,此时的甲烷将穿透沉积层向上连续逸散并在沉积物层中发生动态氧化作用。为模拟海底沉积物中溶解甲烷气体和游离态的甲烷气体的动态氧化过程,分别考察了好氧氧化时分批氧化和连续氧化两种不同培养方式下甲烷含量随氧化时间的变化规律(图2)。

从图2中不难发现,两种氧化方式下,甲烷在氧化约25天时均被彻底降解。甲烷含量随氧化时间的变化规律基本相似,变化曲线均呈明显的反“S”形,这与甲烷降解菌的生物降解活性规律变化基本一致。因为微生物在其主要生长过程中需要经历适应期、对数期、稳定期和衰亡期,其生长曲线呈“S”形<sup>[32]</sup>。在不同时期微生物的生物活性不同,其对底物的消耗亦有所差异。微生物接种初始处于适应期,其代谢系统开始复苏,并对底物缓慢消耗。在微生物培养一定数量后,进入对数期,此时微生物的生长速度将以对数的方式逐渐加快,微生物的数量将

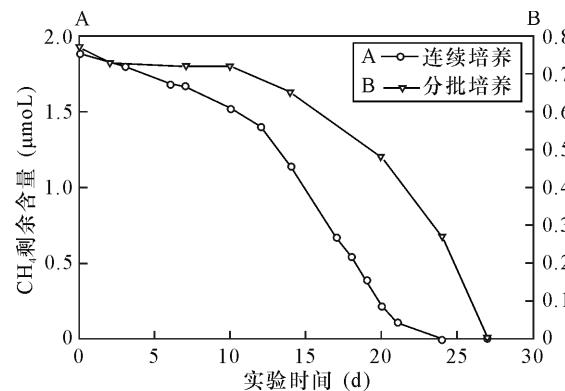


图2 不同条件下甲烷含量随氧化时间的变化趋势

Fig. 2 Change trends of methane content with oxidation time in different conditions

以恒定的几何级数大量增加,同时底物的消耗量也不断增加。进入对数期后,细菌高速增长,底物被迅速消耗。在对数期末期,底物已被大量消耗,进入稳定期。由于对数期末期微生物数目很大,底物可能被迅速吸收利用,所以稳定期可能会很短,甚至观察不到。经过稳定期的过渡,底物几乎被耗尽,微生物降解菌相互竞争,进入衰亡期,甲烷的氧化降解速率也迅速下降。对比图2中的两种培养方式,本研究发现,低速连续培养和分批培养在相同温度下的差异并不显著,仅在适应期的时候氧化快慢有些差别。适应期时期,低速连续培养甲烷含量变化更为明显,而分批培养中甲烷含量变化较为平缓。然而,氧化进入对数期,二者的氧化趋势变得接近,差别逐渐减小。由此我们可以推断相同条件下分批氧化和低速连续氧化类似。因此,在进行甲烷氧化实验的时候,如果是低速连续氧化可以根据需要选择分批氧化来替代,这样更方便实验的操作。

### 2.2.2 氧化方式对甲烷氧化速率的影响

在相同的氧化温度(28℃)、氧气甲烷比( $V_{\text{氧气}}/V_{\text{甲烷}} = 5:1$ )下,对比研究了好氧氧化时不同氧化方式(分批氧化和连续氧化)对甲烷氧化速率的影响,实验结果见表1。从表1中可见,低速(50 μL/min)连续氧化的适应期(6天)与分批氧化的适应期(10天)相当,但前者适应期氧化速率较后者快约三倍。这可能与连续培养时气体动态流动与沉积物接触更充分、甲烷氧化菌的代谢系统复苏较快有关。进入对数期后,两种氧化方式的氧化时间相近,氧化速率亦相近,分别为 $1.48 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ (分批氧化)和 $1.31 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ (连续氧化)。从全部氧化过程来看,分批氧化和低速连续氧化的平均氧化速率

( $1.14 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $1.05 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 基本一致。因此,从数据角度上进一步证明了相同条件下分批氧化和低速连续氧化对甲烷氧化速率影响的差异不大。

尽管两种方式下甲烷氧化速率基本相同,但考虑连续氧化更接近于海底渗漏时,甲烷会以游离态向上运移穿过沉积层的连续动态氧化模式以及海底渗漏更容易对大气环境造成影响,因此,后续实验将以连续氧化为主。

表1 不同实验条件  $\text{CH}_4$  实验时间及氧化速率

Table 1 Experiment time and oxidation rate of  $\text{CH}_4$  in different experimental conditions

培养方式	摇床转速或气体流速	实验温度(°C)	实验时间(天)	氧化速率( $\mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )		
				适应期	对数期	平均值
分批氧化	50 r/min	28	27	0.18 (0~10天)	1.48 (10~27天)	1.14
连续氧化	50 $\mu\text{L}/\text{min}$	28	24	0.42 (0~7天)	1.31 (7~24天)	1.05
连续氧化	50 $\mu\text{L}/\text{min}$	15	74	0.25 (0~46天)	0.40 (46~74天)	0.34
连续氧化	150 $\mu\text{L}/\text{min}$	28	14	0.52 (0~5天)	2.29 (3~15天)	1.90

### 2.2.3 氧化温度对甲烷氧化速率的影响

渤海是我国地处北温带的内海,水温变化受北方大陆性气候影响,年平均气温在  $10.7^{\circ}\text{C}$  左右,夏季时平均温度在  $20^{\circ}\text{C}$  以上。因此,在相同的气体流速( $50 \mu\text{L}/\text{min}$ )下,对比考察了好氧连续氧化时不同氧化温度( $15^{\circ}\text{C}$  和  $28^{\circ}\text{C}$ )对甲烷氧化作用的影响。实验结果(表1)表明:实验温度为  $15^{\circ}\text{C}$  时,氧化等量甲烷气体所需时间为 74 天,约是  $28^{\circ}\text{C}$  下氧化所需时间(24 天)的三倍,氧化时间较长。 $15^{\circ}\text{C}$  时甲烷氧化速率从适应期( $0.25 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )到对数期( $0.40 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )并无显著提高。温度为  $28^{\circ}\text{C}$  时,对数期的甲烷氧化速率( $1.31 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )约为适应期( $0.42 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )的三倍。从整个氧化过程来看,  $28^{\circ}\text{C}$  时的平均氧化速率( $1.05 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )是  $15^{\circ}\text{C}$  时( $0.34 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ )的三倍,可见氧化温度对甲烷氧化速率的影响十分显著。这是由于当温度较低时,甲烷氧化菌的代谢系统复苏较慢,所需的恢复时间较长,即使进入对数期后,甲烷氧化菌的活性依旧较弱,其反应速度仍然缓慢。因此,温度越低越不利于甲烷好氧氧化作用的发生。由此可

见,温度是沉积物中甲烷氧化的一个重要影响因素。早期国外学者 Nesbit 等<sup>[33]</sup>对美国路易斯安娜州土壤的培养试验也发现甲烷氧化菌氧化甲烷时受温度影响较为明显。本文实验中也是利用甲烷菌,因此实验结论也是类似的。

### 2.2.4 甲烷气体流速对甲烷氧化速率的影响

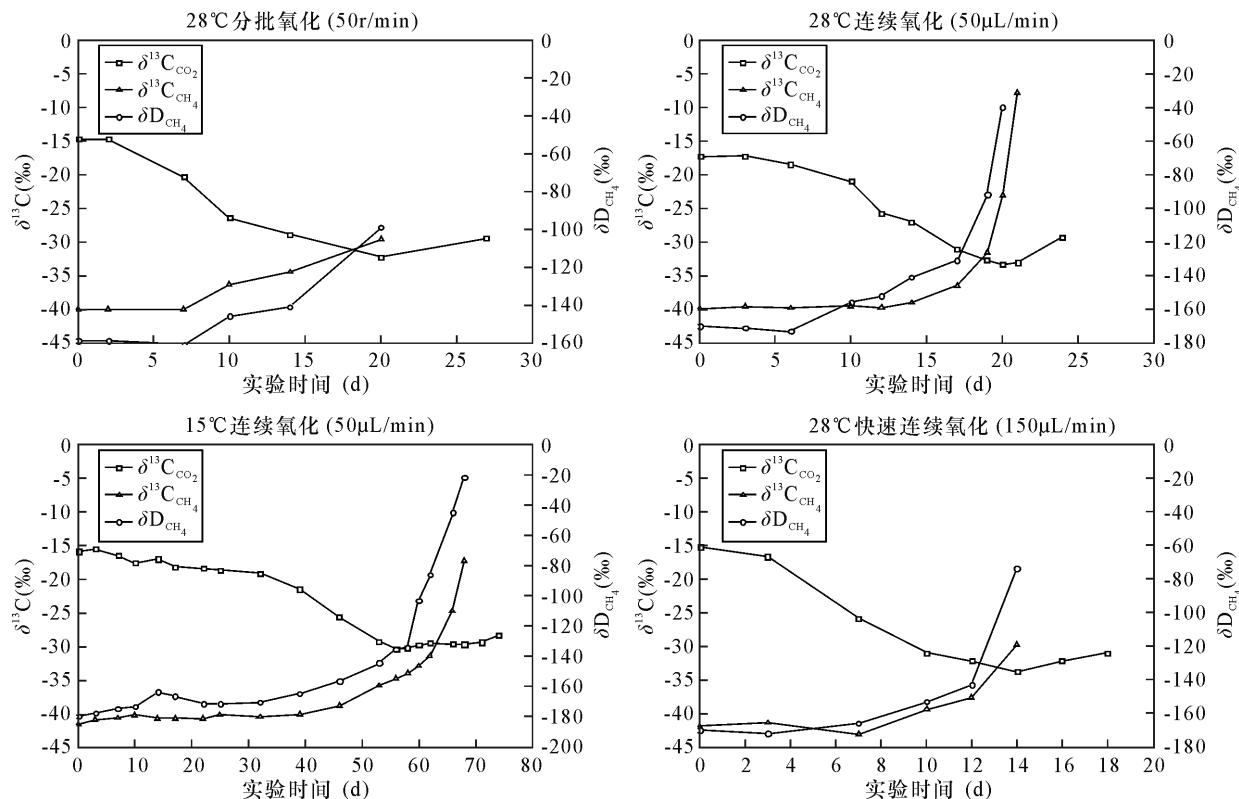
在相同的氧化温度( $28^{\circ}\text{C}$ )下,研究了好氧连续氧化时不同甲烷气体流速( $50 \mu\text{L}/\text{min}$  和  $150 \mu\text{L}/\text{min}$ )对甲烷氧化速率的影响(表1)。从表1可知,甲烷气体流速从  $50 \mu\text{L}/\text{min}$  增加到  $150 \mu\text{L}/\text{min}$  时,甲烷平均氧化速率从  $1.05 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$  增加至  $1.90 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ ,平均氧化速率提高约 90%。适应期时,两种流速下的氧化速率几乎一致( $0.42 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $0.52 \mu\text{mol/g} \cdot \text{d}^{-1}$ ),导致这种现象的原因可能是由于在此期间气体扩散速率足以满足甲烷氧化菌活性复苏的需要。然而,进入对数期后较低的气体扩散速率( $50 \mu\text{L}/\text{min}$ )低于甲烷氧化菌活性的增加和数量增长的需求,从而成为限制  $\text{CH}_4$  氧化速率的因素。因此,高流速下氧化时进入对数期后,气体流速加快更有利于甲烷氧化菌与底物甲烷的接触,底物消耗更快。由此可以得出甲烷氧化速率与甲烷气体流速成正比且主要提升对数期甲烷氧化速率。

### 2.3 渤海沉积物中甲烷氧化的同位素分馏特征

#### 2.3.1 甲烷氧化过程中碳氢同位素的变化规律

甲烷气体碳、氢同位素数据有助于反映其气体来源、成因、演化和运聚特征,是气体类型划分、运移特征的重要参数<sup>[34]</sup>。在上述各实验条件下,本文对渤海沉积物中气体氧化过程中的甲烷中碳、氢同位素( $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta\text{D}$ )和二氧化碳中碳同位素( $\delta^{13}\text{C}$ )变化规律进行了比较分析,结果如图3所示。

从图3可以看出,不同实验条件下甲烷气体的  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta\text{D}$  值在适应期内的变化均较小,由此可知,这个阶段  $\text{CH}_4$  中的  $^{12}\text{CH}_4$  和  $^{13}\text{CH}_4$  含量没有发生明显变化,即  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  比值没有发生较大的变化。进一步说明此时期甲烷几乎没有发生氧化反应,而是以溶解、吸附作用为主,这与前文研究结论一致。甲烷氧化进入对数期后,各实验中甲烷气体的  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta\text{D}$  值的变化趋势一致,均同步变正;而好氧氧化产物二氧化碳的碳同位素值( $\delta^{13}\text{C}$ )均同步变轻。这一同步变化现象表明,实验体系中甲烷碳氢同位素的分馏变化是由甲烷被氧化降解而引起的。氧化过程中甲烷氧化菌首先降解分子量较轻的  $^{12}\text{CH}_4$  或  $\text{CH}_4$  气体,产生  $^{12}\text{CO}_2$  气体。之后,随着  $^{12}\text{CH}_4$  或  $\text{CH}_4$  气体氧化

图3 不同实验条件下  $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$  碳、氢同位素分馏特征Fig. 3 Characteristics of carbon and hydrogen isotope fractionation of  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  in different experimental conditions

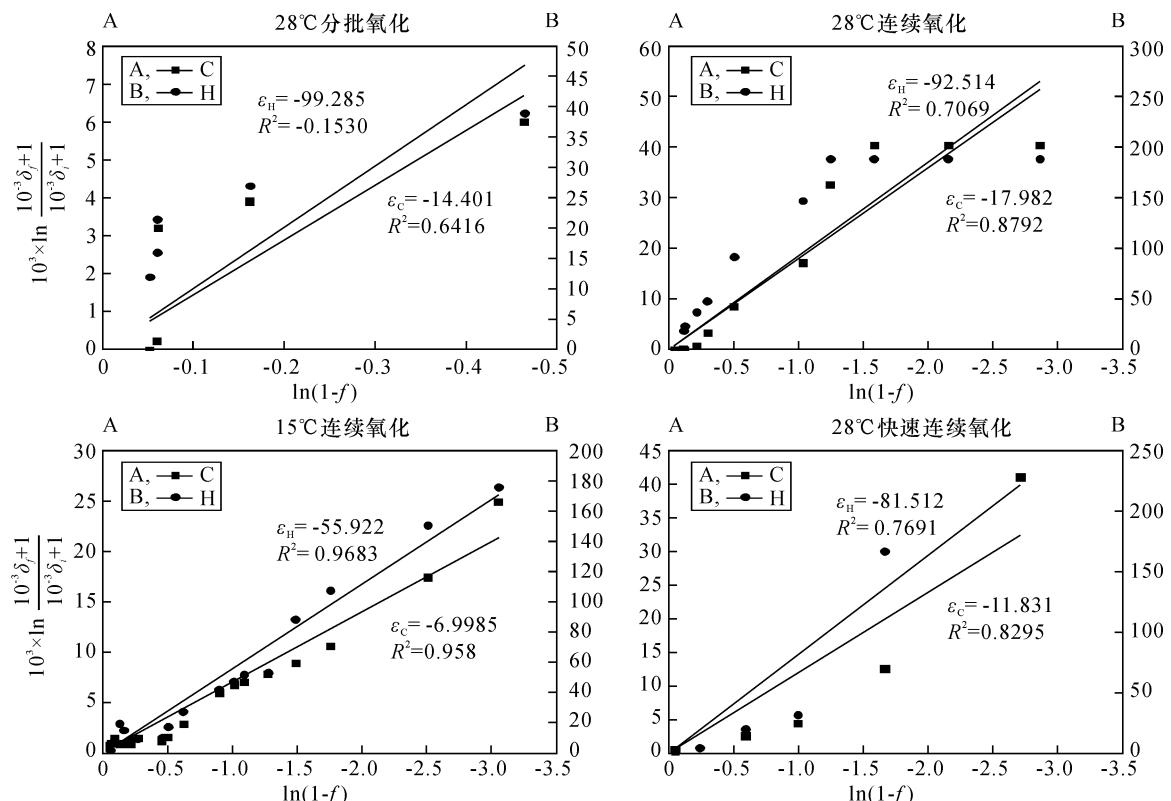
量的不断增加,体系内 $^{13}\text{CH}_4$ 和 $\text{CD}_4$ 气体不断富集,导致未被氧化的甲烷碳、氢同位素( $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta\text{D}$ )值不断变正,与此同时产物二氧化碳的碳同位素值( $\delta^{13}\text{C}$ )逐渐变负。

从图3可发现,当甲烷氧化过程进入稳定期和衰亡期后,即甲烷接近被完全氧化时,将主要是剩余的分子量较重的 $^{13}\text{CH}_4$ 气体被氧化生成 $^{13}\text{CO}_2$ 气体,导致二氧化碳的 $\delta^{13}\text{C}$ 值由逐渐变负突然逆转变正,而此时甲烷因含量较低无法测定其碳氢同位素值。从图3中还可以发现,相同实验条件下的分批氧化和连续氧化中的甲烷气体碳、氢同位素数据变化趋势是类似的。由此,进一步说明相同条件下分批氧化和低速连续氧化对甲烷氧化速率影响的差异不大。此外,不同温度和气体流速对实验过程中甲烷气体碳、氢同位素数据变化趋势影响十分显著。呈现出低温、低流速时, $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比值变化缓慢,即低温、低流速不利于提高甲烷氧化速率,这与本文前面的研究结论一致。

### 2.3.2 甲烷氧化过程中碳氢同位素分馏系数

从图3适应期内同位素变化情况可知,甲烷在培养液和沉积物中的溶解与吸附作用对其碳、氢同

位素分馏的影响均较小,故本实验将此影响忽略不计。从图4中  $10^3 \times \ln \frac{10^{-3} \delta_f + 1}{10^{-3} \delta_i + 1}$  与  $\ln(1 - f)$  的回归曲线不难发现:在相同氧化温度( $28^\circ\text{C}$ )下,“分批氧化”和“低速连续氧化”两种氧化方式中, $\text{CH}_4$ 碳同位素的分馏系数分别为  $-14.401$  和  $-17.982$ , $\text{CH}_4$ 氢同位素的分馏系数分别为  $-99.285$  和  $-92.514$ 。可见,温度相同时,两种氧化方式下甲烷碳氢同位素的分馏系数相近,即温度相同时,两种氧化方式下,甲烷氧化菌对于 $^{12}\text{CH}_4$ 的喜好程度是类似的。进一步说明了两种氧化方式对甲烷的氧化作用无显著差异,这与前文所得结论一致。但氧化温度对甲烷碳氢同位素的分馏系数影响明显, $15^\circ\text{C}$ 时甲烷碳、氢同位素的分馏系数分别变为  $-6.998$  和  $-55.922$ ,分馏系数明显增大,分馏程度缩小,说明低温条件下不利于甲烷氧化菌氧化甲烷,即分馏系数与温度呈正相关。当温度为  $28^\circ\text{C}$ 、气体流速为  $150 \mu\text{L}/\text{min}$  时, $\text{CH}_4$ 碳、氢同位素的分馏系数分别为  $-11.831$  和  $-81.512$ ,较低速连续氧化时的分馏系数差异较小,并未因气体流速的改变而发生显著变化。导致此现象的原因可能是由于相同温度下,气体流速的增加并没有增加甲烷氧化菌对于甲烷的喜好程度。尽管

图4 甲烷氧化的碳氢同位素的分馏系数 $\varepsilon$ Fig. 4 Carbon and hydrogen isotope fractionation factors  $\varepsilon$  of methane

高速下的实验组甲烷氧化较快,其主要原因可能是对数期的甲烷氧化菌数量快速增加而引起底物甲烷消耗的增加。

综上,影响  $\text{CH}_4$  碳、氢同位素分馏效应的主要因素为温度,气体流速与氧化方式的影响较小。

#### 2.4 甲烷氧化过程中 $\text{CO}_2$ 变化特征

微生物作用下的甲烷氧化,会有温室气体  $\text{CO}_2$  副产物产生。为进一步揭示甲烷气体被氧化生成  $\text{CO}_2$  后,其碳原子在体系内的转化、循环特征,本实验利用 28°C 快速连续氧化实验组,在甲烷氧化完毕后继续探索了实验体系中  $\text{CO}_2$  气体含量及  $\delta^{13}\text{C} - \text{CO}_2$  值的变化规律,结果见图 5。从图 5 可以看出,随着甲烷氧化反应的不断进行,  $\text{CO}_2$  含量逐渐增加,说明实验体系中的甲烷被氧化分解并产生  $\text{CO}_2$ 。经过约 20 天的反应后,甲烷全部氧化结束,体系中  $\text{CO}_2$  气体含量增至最高约 0.14  $\mu\text{mol}$ ,然后逐渐减少,在 110 天时降至最低约 0.04  $\mu\text{mol}$ ,并在之后的 70 天内,  $\text{CO}_2$  含量变化进入动态平衡,稳定维持在 0.04  $\mu\text{mol}$  左右。与  $\text{CO}_2$  含量变化对应的是,在甲烷氧化过程中,产物  $\text{CO}_2$  的碳同位素值 ( $\delta^{13}\text{C} - \text{CO}_2$ ) 首先逐渐变负,直至  $\text{CH}_4$  气体氧化完成后  $\delta^{13}\text{C} - \text{CO}_2$  值

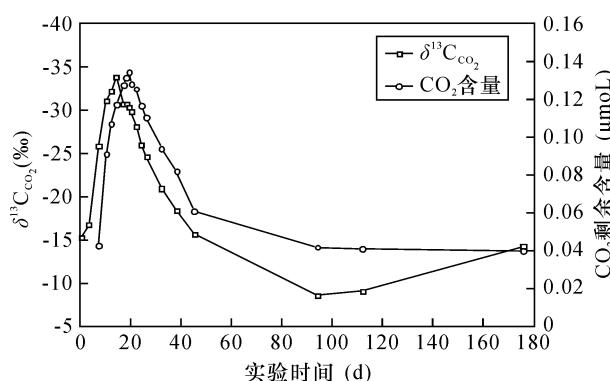


图5 二氧化碳同位素分馏特征图

Fig. 5 Isotope fractionation factors of carbon dioxide

逆转逐渐变正,且随实验时间的不断延长,  $\text{CO}_2$  含量渐渐降低,而  $\delta^{13}\text{C} - \text{CO}_2$  值同步不断变正,这可能与  $\text{CO}_2$  的溶解或与  $\text{Ca}^{2+}$  的沉淀作用有关。这种结果表明,在合适的海洋环境下,渤海海底渗漏逸出的  $\text{CH}_4$  气体可被氧化成  $\text{CO}_2$ ,阻止了其继续逸散至大气层中引起温室效应的可能。而且,甲烷氧化后生成的温室气体  $\text{CO}_2$ ,其大部分亦将通过溶解与沉淀作用在海水或沉积物层中被消耗与转化,从而减少了产物中温室气体  $\text{CO}_2$  逸散进入大气层中。

### 3 结论

通过模拟实验研究了海底渗漏甲烷气体运移穿透渤海沉积物层时的生物氧化作用,定量研究了渤海沉积物中甲烷生物降解过程中的氧化速率及碳、氢同位素分馏规律。研究表明,渤海沉积物中甲烷好氧氧化降解作用占主导,这与渤海的地貌特征是相吻合的。气体流速和氧化温度是影响该海域甲烷气体氧化速率的主要因素,且甲烷的碳、氢同位素分馏效应主要受氧化温度制约,而氧化方式对氧化速率和分馏效应的影响较小,由此说明氧气含量、温度和气体流速是制约渤海沉积物中的甲烷氧化速率的关键因素。所以,在温度较低的冬季,渤海的海水温度较低,微生物氧化游离态的甲烷的速率很低,甚至会受到抑制,从而容易出现较多的甲烷逸散到大气中,给环境带来负面效应。因此,为防止甲烷泄露造成大气环境破坏,在油气开采时可集中在气温较高的夏季作业。如果开采过程中出现甲烷泄露情况,可以适当对泄露区附近进行曝气,以增加该区域附近的氧气含量,加快甲烷的氧化,从而降低海底甲烷气体迁移到大气中。

氧化产物  $\text{CO}_2$  气体的碳循环与转化特征表明,虽然甲烷生物氧化的产物是温室气体  $\text{CO}_2$ ,但是,  $\text{CO}_2$  会和海水中的无机盐离子产生沉淀,并不会增加温室气体的排放,海底微生物的氧化降解作用可有效降低渤海渗漏甲烷气体向上逸散进入大气层的可能。本文研究结论为渤海沉积环境中甲烷气体的迁移与转化、碳循环、环境效应等研究工作提供了基础参考。

### 4 参考文献

- [1] Asadieh B, Krakauer N Y. Global trends in extreme precipitation: Climate models versus observations [J]. *Hydrology & Earth System Sciences Discussions*, 2014, 11(11):11369–11393.
- [2] Cai W J, Borlace S, Lengaigne M, et al. Increasing frequency of extreme El Nino events due to greenhouse warming [J]. *Nature Climate Change*, 2014, 4(2): 111–116.
- [3] Solomon S, Qin D, Manning M, et al. Summary for Policymakers Climate Change 2007: The Physical Science Basis [R]. 2007.
- [4] Judd A G, Hovland M, Dimitrov L I, et al. The geological methane budget at continental margins and its influence on climate change [J]. *Geofluids*, 2010, 2(2): 109–126.
- [5] 李广之, 汪林自. 吸附态轻烃的解吸与分析 [J]. 物探与化探, 2000, 24(1): 34–42.
- [6] Li G Z, Wang L Z. The desorption, analysis and application of adsorbed light hydrocarbon [J]. *Geophysical & Geochemical Exploration*, 2000, 24(1): 34–42.
- [7] Wang W, Wang L, Shao Z. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase genes in the subtropical seawater of Xiamen Island [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 429–439.
- [8] Rasheed M A, Prasanna M V, Kumar T S, et al. Geo-microbial prospecting method for hydrocarbon exploration in Vengannapalli Village, Cuddapah Basin, India [J]. *Current Science*, 2008, 95(3): 361–366.
- [9] Martens C S, Berner R A. Methane production in the interstitial waters of sulfate depleted marine sediments [J]. *Science*, 1974, 185(4157): 1167.
- [10] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63(63): 311.
- [11] Wegener G, Boetius A. An experimental study on short-term changes in the anaerobic oxidation of methane in response to varying methane and sulfate fluxes [J]. *Biogeosciences*, 2009, 6(5): 867–876.
- [12] Kinnaman F S, Valentine D L, Tyler S C. Carbon and hydrogen isotope fractionation associated with the aerobic microbial oxidation of methane, ethane, propane and butane [J]. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 2007, 71(2): 271–283.
- [13] Redmond M C, Valentine D L, Sessions A L. Identification of novel methane-, ethane-, and propane-oxidizing bacteria at marine hydrocarbon seeps by stable isotope probing [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2010, 76(19): 6412–6422.
- [14] 吴自军, 任德章, 周怀阳. 海洋沉积物甲烷厌氧氧化作用(AOM)及其对无机硫循环的影响 [J]. 地球科学进展, 2013, 28(7): 765–773.
- [15] Wu Z J, Ren D Z, Zhou H Y. Anaerobic oxidation of methane (AOM) and its influence on inorganic sulfur cycle in marine sediments [J]. *Advances in Earth Science*, 2013, 28(7): 765–773.
- [16] Wegener G. Methane Oxidation and Carbon Assimilation in Marine Sediments [R]. University of Bremen, 2008: 1–153.
- [17] Blees H J R. Methane Oxidation and Emission in Lake Lugano (Southern Switzerland): A Lipid Biomarker and Isotopic Approach [R]. 2015.
- [18] Yoshioka H, Maruyama A, Nakamura T, et al. Activities

- and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin [J]. *Geobiology*, 2010, 8(3): 223–233.
- [17] Knittel K, Lösekann T, Boetius A, et al. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 467–479.
- [18] 刘涛, 郑国东, 潘永信, 等. 地质微生物对海洋天然气水合物的影响 [J]. *天然气地球科学*, 2009, 20(6): 992–999.
- Liu T, Zheng G D, Pan Y X, et al. Influence of geo-microbes on the formation of marine gas hydrates [J]. *Natural Gas Geoscience*, 2009, 20(6): 992–999.
- [19] Reed D W, Fujita Y, Delwiche M E, et al. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a Forearc Basin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3759–3770.
- [20] 金文标, 姚建军, 陈孟晋, 等. 天然气微生物勘探指示菌的筛选 [J]. *天然气工业*, 2002, 22(5): 20–22.
- Jin W B, Yao J J, Chen M J, et al. Screening of microbial exploration indicators for natural gas [J]. *Natural Gas Industry*, 2002, 22(5): 20–22.
- [21] 胡国全, 张辉, 邓宇, 等. 微生物法在油气勘探中的应用研究 [J]. *应用与环境微生物学报*, 2006, 12(6): 824–827.
- Hu G Q, Zhang H, Deng Y, et al. Application of microbial technique in prospection for oil and gas [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(6): 824–827.
- [22] 贺行良, 王江涛, 刘昌岭, 等. 天然气水合物客体分子与同位素组成特征及其地球化学应用 [J]. *海洋地质与第四纪地质*, 2012, 32(3): 163–174.
- He X L, Wang J T, Liu C L, et al. Guest molecular and isotopic compositions of natural gas hydrates and its geochemical applications [J]. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 2012, 32(3): 163–174.
- [23] Kleindienst S, Herbst F A, Stagars M, et al. Diverse sulfate-reducing bacteria of the Desulfosarcina/Desulfococcus clade are the key alkane degraders at marine seeps [J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(10): 2029–2044.
- [24] 韩冰. 甲烷氧化菌的微生态解析及其应用基础研究 [D]. 北京: 清华大学, 2008.
- Han B. Molecular Ecology Study on Methanotrophs and Fundamental Research on the Applications of Methanotrophs [D]. Beijing: Tsinghua University, 2008.
- [25] 陈立雷, 李双林, 赵青芳, 等. 海洋油气微生物好氧降解轻烃模拟试验 [J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(6): 922–925.
- Chen L L, Li S L, Zhao Q F, et al. Simulating test of aerobic marine oil and gas microbial degradation of light hydrocarbons [J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(6): 922–925.
- [26] 贺行良, 夏宁, 刘昌岭, 等. FID/TCD 并联气相色谱法测定天然气水合物的气体组成 [J]. *分析测试学报*, 2012, 31(2): 206–210.
- He X L, Xia N, Liu C L, et al. Compositional analysis of gases in natural gas hydrates by GC-FID/TCD [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(2): 206–210.
- [27] 贺行良, 刘昌岭, 王江涛, 等. 气相色谱–同位素比值质谱法测定天然气水合物气体单体碳氢同位素 [J]. *岩矿测试*, 2012, 31(1): 154–158.
- He X L, Liu C L, Wang J T, et al. Measurement of carbon and hydrogen isotopes of natural gas hydrate-bound gases by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry [J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2012, 31(1): 154–158.
- [28] Mariotti A, Germon J C, Hubert P, et al. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes [J]. *Plant and Soil*, 1981, 62(3): 413–430.
- [29] Chu K H, Mahendra S, Song D L, et al. Stable carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of chlorinated ethenes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(11): 3126.
- [30] 陈立雷, 贺行良, 赵青芳, 等. 轻烃在海洋沉积物中的吸附与解吸行为研究 [J]. *天然气地球科学*, 2013, 24(4): 798–802.
- Chen L L, He X L, Zhao Q F, et al. Experimental research on the behavior of the absorption and desorption of light hydrocarbons in marine sediments [J]. *Natural Gas Geoscience*, 2013, 24(4): 798–802.
- [31] 陈义兰, 吴永亭, 刘晓瑜, 等. 渤海海底地形特征 [J]. *海洋科学进展*, 2013, 31(1): 75–82.
- Chen Y L, Wu Y T, Liu X Y, et al. Features of seafloor topography in the Bohai Sea [J]. *Advances in Marine Science*, 2013, 31(1): 75–82.
- [32] 唐玉斌, 孙常宇, 陈芳艳, 等. 一株蒽高效降解菌的分离鉴定及其降解特性 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 593–597.
- Tang Y B, Sun C Y, Chen F Y, et al. Isolation and identification of a chrysene-degrading strain and its degradation characteristics [J]. *Microbiology*, 2009, 36(4): 593–597.

- [33] Nesbit S P, Breitenbeck G A. A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils [J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1992, 41(1): 39–54.
- [34] 贺行良, 刘昌岭, 王江涛, 等. 天然气水合物气体组成

分析技术[J]. *海洋地质前沿*, 2011, 27(6): 65–73.  
He X L, Liu C L, Wang J T, et al. An overview of analytical techniques for composition of hydrates-bound gas[J]. *Marine Geology Frontiers*, 2011, 27(6): 65–73.

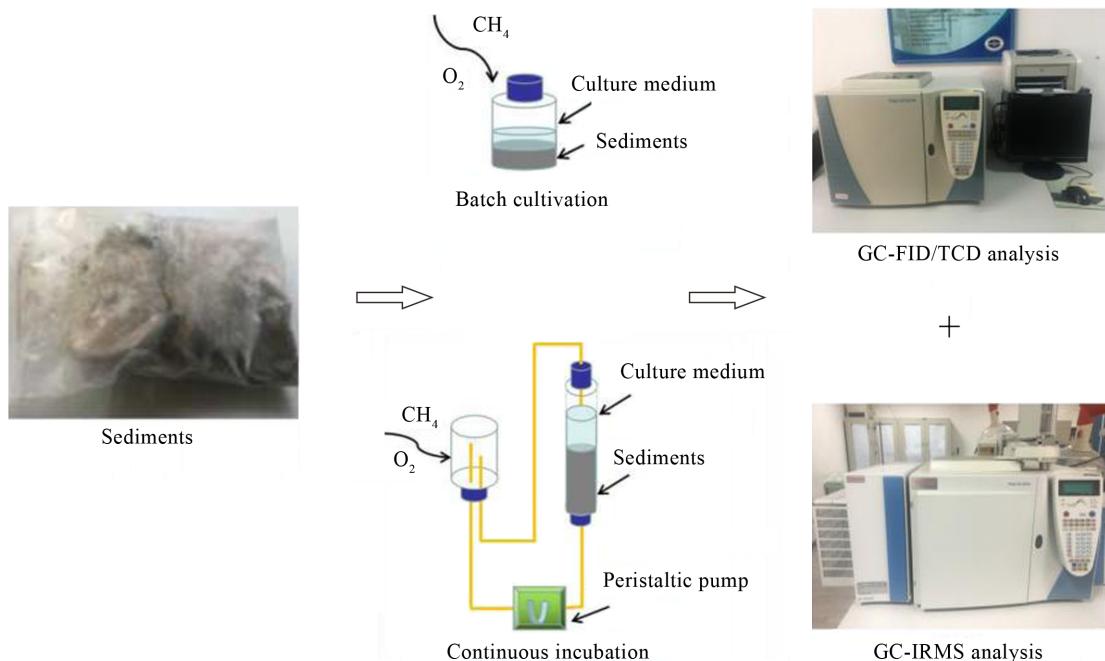
## Study on Oxidation Rate and Isotope Fractionation of Methane in Bohai Sea Sediments

CHEN Yu-feng<sup>1,2</sup>, ZHENG Xiu-li<sup>3</sup>, LI Jing<sup>2,4</sup>, HE Xing-liang<sup>2\*</sup>, LIU Chang-ling<sup>2</sup>,  
MENG Qing-guo<sup>2</sup>, QIN De-di<sup>1,2</sup>, ZHANG Pei-yu<sup>1</sup>

- (1) Institute of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China;  
2. The Key Laboratory of Gas Hydrate, Ministry of Natural Resources; Qingdao Institute of Marine Geology, China Geological Survey, Qingdao 266071, China;  
3. Qingdao ECH Testing Co., LTD., Qingdao 266199, China;  
4. Faculty of Engineering, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, China

### HIGHLIGHTS

- (1) Bohai Sea sediments were selected for methane oxidation experiment under different conditions.
- (2) The aerobic oxidation of methane oxidation was dominant.
- (3) The temperature was an important factor affecting the rate of methane oxidation.



**ABSTRACT****BACKGROUND:**

The Bohai Sea contains a large amount of oil and gas, the main component of which is methane. The influence of natural or human factors will cause its leakage and migration and then have a negative impact on the environment. However, most of the methane would be oxidized by microorganisms during the leakage and migration processes. Meanwhile, the different environmental conditions will affect oxidation rate and carbon isotope fractionation of methane.

**OBJECTIVE:**

In order to better understand the law of isotope fractionation and methane oxidization in the sediments and to provide reference for further related research in this area, the Bohai Sea sediments were selected as laboratory raw materials for the degradation of laboratory experiments and are described in this paper.

**METHODS:**

Gas Chromatography and Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry were used to determine the methane oxidation rate, and the carbon isotope fractionation coefficient  $\varepsilon$  of methane was determined.

**RESULTS:**

The results show that the aerobic oxidation of methane is dominant. Oxidation temperature and gas flow rate are the main factors affecting the rate of methane oxidation. In the mode of continuous incubation, when the temperature reduced from 28°C to 15°C, the average oxidation rate reduced by 60%  $\pm$  10%, indicating that the lower temperature is not helpful for methane oxidation. When the gas flow rate increases from 50 to 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ , the average oxidation rate of methane increases by 90%  $\pm$  10%. This indicates that the higher gas flow rate is favorable to the increase of oxidation rate. It is also found that the fractionation effect of carbon and hydrogen isotopes are mainly affected by temperature where the fractionation degree is positively correlated with temperature.

**CONCLUSIONS:**

Temperature is an important factor affecting methane oxidation rate and isotopic fractionation.

**KEY WORDS:** Bohai sediments; oxidation rate of methane; isotope fractionation; biodegradation; Gas Chromatography; Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry