

# 石油类污染土壤基础呼吸作用的影响因素研究

王威<sup>1</sup>, 张玉玲<sup>2</sup>, 马震<sup>1</sup>, 陈彭<sup>1</sup>

1. 中国地质调查局天津地质调查中心, 天津 300170
2. 吉林大学环境与资源学院, 长春 130026

**摘要** 石油类污染物进入土壤环境, 会对土壤的理化性质、微生物活性等产生危害, 进而影响土壤呼吸强度。以某石油类污染场地为研究对象, 通过调查取样, 采用分子生物学手段对污染发生后包气带、含水层的土壤现状微生物量、土壤化学指标、基础呼吸作用进行研究。研究发现, 土壤呼吸强度首要受微生物量影响, 其次受硝酸盐、氨氮、亚硝酸盐等因子影响。石油污染对土壤基础呼吸强度的影响, 主要体现在对浅层土壤(0.5 m)、地下水位变动带(1.5 m)的土壤基础呼吸强度具有一定的抑制作用。

**关键词** 土壤基础呼吸; DNA; 石油污染; 包气带; 含水层

**中图分类号** P641

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.07.010

## Basal Respiration Influence Factors of Petroleum Polluted Soil

WANG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Yuling<sup>2</sup>, MA Zhen<sup>1</sup>, CHEN Peng<sup>1</sup>

1. Tianjin Center, China Geological Survey, Tianjin 300170, China
2. College of Environment and Resources, Jilin University, Changchun 130026, China

**Abstract** The petroleum pollutants permeating into the soil environment will affect the soil physical and chemical properties and microbial activity, which in turn affects soil respiration intensity. Some certain pollution area is taken as the research object in this paper, and through surveying and sampling, and by means of molecular biology method, the soil microbial biomass, soil chemical indicators, and soil basal respiration of the polluted vadose and aquifer are studied. It is shown that the basal soil respiration is mainly affected by microorganism quantity, followed by nitrate, ammonia nitrogen, nitrite, etc. The influence of oil pollution on soil basic respiration is mainly the inhibitory effect in the shallow soil depth (0.5 m) and in the underground water level change area (1.5 m).

**Keywords** basal soil respiration; DNA; petroleum pollution; unsaturated zone; aquifer

土壤呼吸作用主要是由包气带、含水层中各种微生物的生命活动引起的, 呼吸强度主要用来衡量微生物活性强弱、有机质分解速度快慢等, 通常用CO<sub>2</sub>释放量衡量。土壤中微生物量、化学特征、植被条件等都会对土壤呼吸作用产生影响, 土壤呼吸作用产生的CO<sub>2</sub>, 除少量由植被根系、动物呼吸作用产生外, 85%以上由微生物活动产生<sup>[1]</sup>。已有研究表明, 土壤是陆地生态系统最大的碳库, 而土壤呼吸作用则是土壤碳库的主要输出途径和大气CO<sub>2</sub>的重要来源<sup>[2,3]</sup>, 土壤呼吸作

用的小幅变化也会对大气中CO<sub>2</sub>浓度产生很大影响<sup>[4]</sup>, 所以全面了解土壤呼吸作用的控制因子, 对未来全球气候变化的预测具有重要意义<sup>[5]</sup>。

目前各国对石油的需求量不断加大, 在石油勘探、开采、运输、加工过程中, 淋落、泄漏等环境污染事故比较普遍<sup>[6]</sup>, 石油类污染物进入土壤环境会对土壤的理化性质、微生物活性产生危害, 进而影响土壤呼吸强度, 造成CO<sub>2</sub>释放量变化。以往对于土壤呼吸作用研究多集中在农田、森林等特定的土地

收稿日期: 2013-10-10; 修回日期: 2014-02-07

基金项目: 中国地质调查局河北渤海新区地质环境调查评价项目(1212011120087)

作者简介: 王威, 工程师, 研究方向为水文地质、环境地质, 电子邮箱: wangwei\_wangwei@126.com

引用格式: 王威, 张玉玲, 马震, 等. 石油类污染土壤基础呼吸作用的影响因素研究[J]. 科技导报, 2014, 32(7): 67-70.

利用单元,针对石油污染土壤的呼吸作用研究较少,本文选择某石油类污染场地作为研究区,开展石油污染场地的土壤呼吸作用影响因素研究,为查明类似有机污染对土壤的CO<sub>2</sub>排放影响及石油污染场地土壤微生物活性分布特征奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 调查取样

研究所选场地曾遭受石油类污染,污染源浅部土壤中总石油烃(TPH)含量略高,达20~100 mg/kg。为了对受污染场地的土壤呼吸作用进行研究,设置3个钻孔进行取样,沿地下水流向记为ZK1、ZK3、ZK6。ZK1和ZK3分别在石油泄漏和地表油水坑污染源处,ZK6在产地边缘,受污染影响较小。采样时地下水埋深为1.5 m,包气带厚度约为1.5 m,为了充分反映包气带、含水层的微生物量和基础呼吸特征,分别在0.2、0.5、1.0、1.5、1.8 m采集土样,土样保持原状冷藏保存送至实验室。测定土壤基础呼吸作用以及主要物理化学指标的土样于4℃冷藏保存,测定总DNA的土壤样品于-20℃冷冻保存。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 土壤物理、化学指标测试

采用前述冷藏保存的土样测试土壤化学指标,包括硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮、总氮、总磷含量。土壤硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮含量主要采用KCl浸提法制作土壤浸提液,离心后取上清液,分别采用紫外分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法、纳氏剂光度法测试得到;土壤总氮采用半微量开氏法测试;土壤总磷采用HClO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法测试。通过颗粒分析实验确定样品岩性,实验结果显示本次采集样品以砂质粉土为主。

#### 1.2.2 土壤基础呼吸强度测定

土壤基础呼吸强度的测定采用密闭碱液吸收滴定法<sup>[7]</sup>。准备干净的250 mL广口瓶15个,每瓶加入0.1 mol/L NaOH 20 mL。将供试新鲜土壤去除植被根系等可见杂物后称取20 g,与0.1 g葡萄糖(增强呼吸作用)均匀混合后放置于纱布上,悬空放置在广口瓶内部,溶液上方,用瓶塞压住纱布,防止掉落后接触瓶中液体。准备好后,放置于28℃培养箱中避光恒温培养24 h。实验结束后,将纱布取出,在瓶中加入酚酞指示剂,用0.1 mol/L HCl滴定,滴定过程重复3次。空白样采用相同操作过程,只是纱布中不添加土样。根据空白样和供试土样消耗HCl的差值计算得到CO<sub>2</sub>的释放速率。

#### 1.2.3 总DNA的提取

取少量供试土壤去除植物根系、杂质后,采用美国MoBio公司的PowerSoil DNA试剂盒对土壤样品DNA进行提取,按照MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit试剂盒说明书主要步骤进行操作。操作过程中应用到的主要仪器有:SW-CJ-1D超净工作台(苏州,中国),台式高速离心机Sigma3-18K(Sigma,德国),快速恒温数显水浴锅HHS-2(江苏金坛市医疗器械厂,中国),高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂,中国),VDRTEX-5涡旋仪(海门,中国),DYY-8C型电泳仪

(北京市六一仪器厂,中国),蓝盾552可见光凝胶电泳透射仪(百维信生物,中国),DNR凝胶成像仪MiniBIS(DNR成像系统有限公司,以色列),微孔板分光光度计(EpochTM)(伯腾公司,美国)。DNA提取过程中用到的其他试剂和材料主要有:EB染料、琼脂糖、loading Buffer、土壤样品、MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit试剂盒。

## 2 结果与分析

### 2.1 基础呼吸强度空间分布特征

本研究沿地下水流向设置观测孔ZK1、ZK3、ZK6,并采集不同深度土壤样品测定基础呼吸强度,结果见图1。从各孔不同深度的基础呼吸强度看,主要表现为呼吸强度随深度增加而逐渐减弱,包气带整体的基础呼吸强度高于含水层。包气带0~0.5 m基础呼吸强度最高,说明包气带受日照、植被、大气环境等影响较大,微生物生命活动强烈。地下水位变动带(1.5 m)的土壤呼吸强度略低于含水层,主要是由于地下水中石油类污染物随水位变动在土壤中不断吸附富集,导致地下水位变动带的土壤污染物浓度较其他层位略高,土壤微生物活性低。从不同观测孔看,总体上ZK3孔的基础呼吸强度大于ZK1、ZK6孔,这是由于ZK3距离泄漏形成的油水坑区域较近,土壤水、热条件,有机质含量要高于其他区域,能够满足微生物生命活动需求,代谢能力高于其他区域。

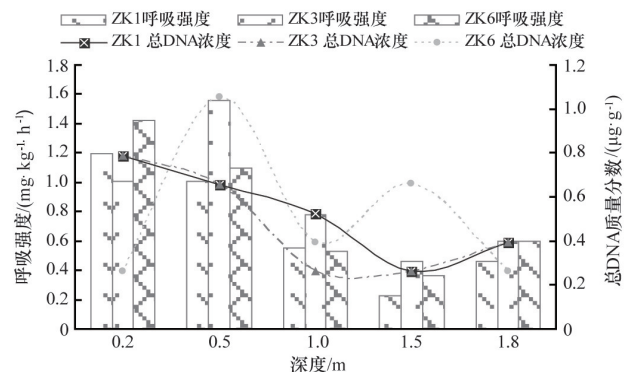


图1 不同深度土壤呼吸强度和土壤样品总DNA分布规律

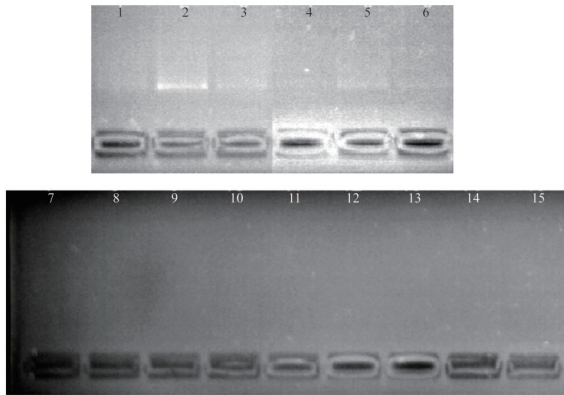
Fig. 1 Distributions of respiration intensity and total DNA at different depths of soil

### 2.2 微生物代谢能力影响因素分析

#### 2.2.1 微生物量对代谢能力的影响

土壤微生物量虽然只占土壤有机质的3%左右<sup>[8,9]</sup>,但它却是植物养料转化、有机碳代谢及污染物降解的驱动力,在土壤肥力和生态系统中具有重要的作用。以往通常采用微生物量碳表征微生物量,采用氯仿熏蒸法对微生物量碳进行提取<sup>[10,11]</sup>,即以CO<sub>2</sub>释放量等间接的方式反映微生物量,实验影响因素较多,转换系数K也存在一定的不确定性<sup>[8]</sup>,为了避免这种不确定性对结果产生影响,本研究直接从场地包气带、含水层介质中提取土壤总DNA,这是对场地微生物量最直接的反映,结果更加精确、直观。

场地土壤中总 DNA 含量直接反映了场地土壤中微生物量,对试剂盒提取的 DNA 进行凝胶电泳实验。发现深度 0.2~0.5 m 的包气带土壤总 DNA 含量较高,凝胶成像亮条明显(图 2),说明微生物含量较高;含水层介质总 DNA 样品在凝胶成像过程中没有明显亮条带出现,说明总 DNA 浓度较低。



1—ZK1,20 cm;2—ZK3,20 cm;3—ZK6,20 cm;4—ZK1,50 cm;  
5—ZK3,50 cm;6—ZK6,50 cm;7—ZK1,1.0 m;8—ZK3,1.0 m;  
9—ZK6,1.0 m;10—ZK1,1.5 m;11—ZK3,1.5 m;12—ZK6,1.5 m;  
13—ZK1,1.8 m;14—ZK3,1.8 m;15—ZK6,1.8 m

图 2 研究场地包气带、含水层不同深度土壤样品总 DNA 凝胶电泳图

Fig. 2 DNA gel electrophoresis diagram of the vadose zone and aquifer

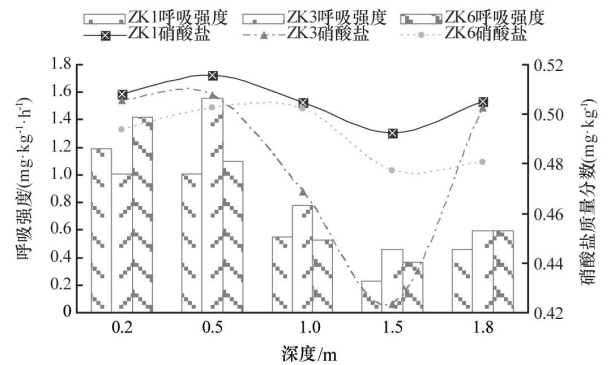
为了更加准确地分析总微生物量特征,在 DNA 电泳实验结束后,对样品 DNA 浓度进行了定量检测。从检测结果(图 1)看,总 DNA 呈现随深度增加逐渐减少的趋势,ZK1、ZK3 孔尤为明显,但进入含水层后略有升高。距离地表较近(0.2~0.5 m)时,受外界环境影响明显,温热条件、水分、养分等均有利于微生物生长,故微生物量较大,总 DNA 浓度高;随着深度增加,从外界环境补充的养分逐渐减少,不利于微生物生长,微生物量下降;进入含水层后略有升高(1.8 m),可能是地下水带来的养分和水分等促进了介质中微生物的生长。总 DNA 和基础呼吸强度具有相似的空间分布规律,均为包气带较高,随着深度的增加逐渐降低,说明基础呼吸作用和微生物量有直接关系,总体呈现微生物量越大,呼吸作用越强的特点。

### 2.2.2 土壤营养盐对代谢能力的影响

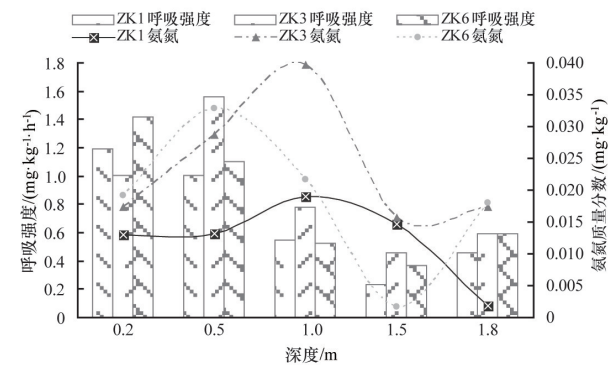
土壤硝酸盐、氨氮、亚硝酸盐含量同呼吸强度分布规律具有一定相似性。从基础呼吸强度和硝酸盐、氨氮关系图(图 3(a)、(b))可以看出,微生物呼吸强度除浅层 0.2 m 受外界环境影响大外,其他深度均同硝酸盐、氨氮含量表现出相似的变化规律,说明硝酸盐、氨氮含量虽然较低,但对土壤呼吸强度影响较为明显,是污染场地包气带、含水层介质微生物生长的主要养分来源。

土壤中亚硝酸盐通常来源于硝酸盐的微生物反硝化作用和石油类污染物生物降解过程的副产物,所以深度 0.5 m 以下的包气带、含水层介质亚硝酸盐含量同呼吸强度成相似的变化规律(图 3(c)),但含量较低,且在地下水中检出量也较低。

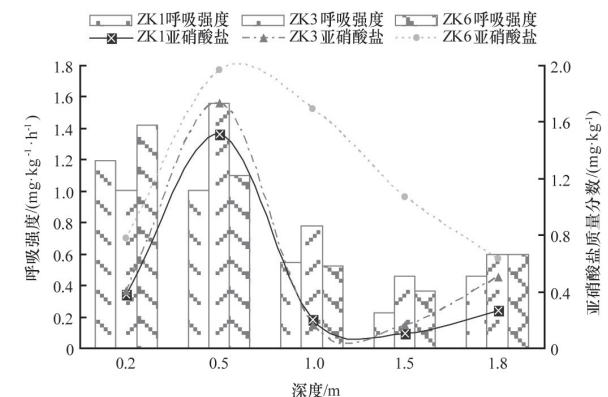
化规律(图 3(c)),但含量较低,且在地下水中检出量也较低。



(a) 硝酸盐



(b) 氨氮



(c) 亚硝酸盐

图 3 不同深度土壤呼吸强度及硝酸盐、氨氮、亚硝酸盐分布规律

Fig. 3 Distributions of soil respiration intensity and nitrate, ammonia nitrogen, nitrite at different depths

### 2.3 相关性分析

本研究通过对不同深度土壤的硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮、总氮、总磷含量进行检测,采用 SPSS 18.0 计算不同指标的 Pearson 相关系数,分析不同因子对基础呼吸强度的影响。从 Pearson 相关系数矩阵(表 1)看,基础呼吸强度同土壤总 DNA、氨氮、硝酸盐、亚硝酸盐具有相对显著的相关性。土壤呼吸强度首要受微生物量影响,其次硝酸盐、氨氮作为微生物生长的主要营养来源,对微生物活性的影响较为明显。亚

硝酸盐为微生物反硝化作用的主要产物,同微生物活动具有一定的相关性。

场地土壤中的总氮、总磷含量虽然相对较高,但成分往往较为复杂,除游离态、有机态,还包括矿质态氮磷等,能被

微生物利用的成分有限,所以总氮、总磷含量并未同基础呼吸作用呈现出较为明显的相关性,对微生物代谢作用影响并不明显,也从侧面证明容易被生物利用的硝态氮和氨氮是场地包气带、含水层介质中微生物活动的主要养分来源。

表1 土壤化学性质、微生物生物量及呼吸强度指标相关系数矩阵

Table 1 Correlation coefficient matrix of soil chemical properties, microbial biomass and soil respiration intensity

指标	呼吸强度	硝酸盐	亚硝酸	氨氮	总氮	总磷	总DNA
呼吸强度	1.000						
硝酸盐氮	0.384	1.000					
亚硝酸盐	0.422	-0.050	1.000				
氨氮	0.445	0.377	0.251	1.000			
总氮	-0.073	-0.175	-0.132	-0.227	1.000		
总磷	-0.202	0.037	-0.679	-0.240	0.281	1.000	
总DNA	0.447	0.483	0.062	0.533	-0.060	0.192	1.000

### 3 讨论

土壤呼吸作用主要是由包气带、含水层中的各种微生物的生命活动引起的,以往对于基础呼吸作用的研究多以区域性单一影响因素为对象,采用面状取样,本研究为综合考虑多种影响因素,以某场地为研究对象开展不同深度基础呼吸作用研究,发现土壤基础呼吸强度受微生物量影响最大,其次受硝酸盐、氨氮等微生物主要营养来源影响,土壤基础呼吸强度同微生物含量、营养物质含量随深度的变化具有相似的规律。虽然个别样点、深度的土壤基础呼吸作用出现波动,但大体上呈现出随着深度增加逐渐降低的趋势,这与随深度增加土壤中微生物含量、养分条件、氧气含量、水热条件变化有关。土壤中微生物生命活动影响因素较为复杂,除微生物量、营养来源等主要影响因素外,还受其他诸多影响,诸如包气带中微生物活动还受降水、热、光等影响,含水层中微生物活动则会受到水、土壤化学环境等其他外在因素影响,正是这些影响因素造成土壤基础呼吸作用的局部波动,为深入研究提供了条件。

### 4 结论

浅层(0.5 m)以及地下水变动带(1.5 m)土壤的石油污染较同层位其他深度略高,对土壤基础呼吸强度具有一定的抑制作用,基础呼吸强度略低,但从整体取样深度看,石油污染影响不大,仅对个别层位产生影响。对土壤总DNA进行检测,结果显示,土壤总DNA呈现随深度增加逐渐降低的趋势,但进入含水层后略有升高,同基础呼吸强度具有相似的空间分布规律,均为包气带较高,进入含水层后随着深度的增加逐渐降低,说明基础呼吸作用受微生物量影响明显,微生物量越大,呼吸作用越强。

#### 参考文献(References)

[1] 魏媛, 张金池, 俞元春, 等. 退化喀斯特植被恢复过程中土壤基础呼吸及代谢熵的变化[J]. 土壤通报, 2010, 41(4): 787-801.  
Wei Yuan, Zhang Jinchi, Yu Yuanchun, et al. Changes of soil basal respiration and  $qCO_2$  along successional processes of degraded karst

vegetation[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2010, 41(4): 787-801.  
[2] 施政, 汪家社, 何容, 等. 武夷山不同海拔土壤呼吸及其主要调控因子[J]. 生态学杂志, 2008, 27(4): 563-568.  
Shi Zheng, Wang Jiashe, He Rong, et al. Soil respiration and its regulating factor along an elevation gradient in Wuyi Mountain of Southeast China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(4): 563-568.  
[3] Kirschbaum M U F. The temperature dependence of soil organic matter decomposition and the effect of global warming on soil organic C storage[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27(6): 753-760.  
[4] Schlesinger W H, Andrews J A. Soil respiration and the global carbon cycle[J]. Biogeochemistry, 2000, 48(1): 7-20.  
[5] 刘颖, 韩士杰. 长白山四种森林土壤呼吸的影响因素[J]. 生态环境学, 2009, 18(3): 1061-1065.  
Liu Ying, Han Shijie. Factors controlling soil respiration in four types of forest of Changbai Mountains, China[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(3): 1061-1065.  
[6] 王威, 苏小四, 张玉玲, 等. 石油类污染场地的自然衰减作用[J]. 吉林大学学报: 地球科学版, 2011, 41(S1): 310-314.  
Wang Wei, Su Xiaosi, Zhang Yuling, et al. Natural attenuation of a petroleum contaminated site[J]. Journal of Jilin University: Earth Science Edition, 2011, 41(S1): 310-314.  
[7] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006.  
Yao Huaiying, Huang Changyong. Microbial ecology and microbial ecology experimental techniques[M]. Beijing: Science Press, 2006.  
[8] 张海燕, 张旭东, 李军, 等. 土壤微生物量测定方法概述[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 95-99.  
Zhang Haiyan, Zhang Xudong, Li Jun, et al. Outline of soil microbial biomass measurement methods[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(4): 95-99.  
[9] 陶水龙, 林启美, 赵小蓉. 土壤微生物量研究方法进展[J]. 土壤肥料, 1993, 12(6): 15-18.  
Tao Shuilong, Lin Qimei, Zhao Xiaorong. Advances in microbial biomass research methods[J]. Soil and Fertilizer, 1993, 12(6): 15-18.  
[10] 元炳成, 刘权, 黄伟, 等. 镁碱化盐土微生物生物量和土壤基础呼吸[J]. 土壤, 2011, 43(1): 67-71.  
Yuan Bingcheng, Liu Quan, Huang Wei, et al. Microbial biomass and basal soil respiration in alkalized magnesian soils[J]. Soils, 2011, 43(1): 67-71.  
[11] 苏慧敏, 李叙勇, 欧阳扬. 土壤微生物量和土壤呼吸对降雨的响应[J]. 生态环境学报, 2011, 20(10): 1399-1402.  
Su Huimin, Li Xuyong, Ouyang Yang. Responses of soil microbial biomass and soil respiration to rainfall[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20(10): 1399-1402. (责任编辑 王媛媛)