

DOI: 10.11766/trxb201607110265

高浓度CO₂地下泄漏对土壤微生物群落结构的影响*

陈 浮^{1, 2} 杨宝丹¹ 马 静^{2†} 张绍良² 张媛媛³

(1 中国矿业大学环境与测绘学院, 江苏徐州 221116)

(2 中国矿业大学低碳能源研究院, 江苏徐州 221008)

(3 中石化石油工程设计有限公司, 山东东营 257026)

摘 要 通过模拟高浓度CO₂在农田土壤中的地下泄漏, 研究了不同浓度CO₂泄漏情景下土壤微生物多样性的变化。实验设置了400 g m⁻² d⁻¹、800 g m⁻² d⁻¹、1 200 g m⁻² d⁻¹和2 000 g m⁻² d⁻¹持续CO₂通气60 d共计4个处理, 并与对照组、恢复组(2 000 g m⁻² d⁻¹组停止通气60 d后)分期采集土壤样品, 分析土壤理化性质、土壤闭蓄的气体浓度、微生物多样性指数及主要类群变化规律。结果表明, 4种处理均提高了土壤中CO₂浓度, 分别为1.60%、4.80%、10.80%和19.60%。土壤微生物多样性Chao指数和Shannon指数随CO₂通入量增加而减少, 降幅分别达17.00%~27.80%和6.10%~9.50%。相反, 非度量多维尺度(NMDS)分析显示土壤微生物β多样性在中、低浓度升高, 在高、极端浓度表现为降低。拟杆菌属(*Bacteroidales*)相对丰度随CO₂泄漏量增加从3.09%上升至21.20%, 可作为高浓度CO₂泄漏生态安全性评估的敏感性指标。基于高通量序列相似度OTU分类的RDA分析表明土壤环境因子的变化能够较好地解释微生物多样性演替。研究结果为评估和监测地下CO₂泄漏对近地表生态系统环境风险提供科学依据。

关键词 碳捕集与封存; CO₂泄漏; 微生物群落; 高通量测序; 多样性分析

中图分类号 X171 **文献标识码** A

温室气体减排已经成为各国政府高度关注的议题和目标, CO₂捕集与封存(CCS, CO₂ Capture and Geological Storage)是一项重要的减排技术, 因其经济与环境双赢的特点而倍受关注^[1]。尽管CCS工程一直将防止CO₂泄漏列为首要条件, 但现有的技术体系还很难保证封存的CO₂完全不发生泄漏, 例如, 储运、地质活动或人为操作失误等均可能导致地下封存的CO₂发生泄漏风险^[2]。1986年喀麦隆尼奥斯湖沉积相CO₂暴发导致周边数十平方千米范围内2 000多人、数万牲畜窒息死亡^[3]。目前中国已开展了16项CCS试验, 其中鄂尔多斯咸水层封存和胜利油田驱油开采均为1 Mt级CO₂封存项

目, 一旦发现泄漏极可能对近地表生态系统产生严重的负面影响^[4]。现行的CCS工程建设和安全评估均侧重于封存选址和CO₂地下运移^[5-8], 更多关注泄漏的环境后果和评估。然而, 由于CO₂地下封存技术涉及的因素较多, 如地质环境、封存材质和CO₂含量等, 很难采用统一的标准进行CCS环境风险评估, 如近几年欧美国家已经多次出现CCS项目环境侵权诉讼^[9]。因此, 在我国开展高浓度CO₂地下泄漏的生态环境影响研究, 具有重要意义。

已有的研究表明, 由于深部高压和浮力作用, CO₂从断层、裂隙、废弃通道等逐步向上迁移, 改变浅层地下水pH^[10], 影响矿化物的平衡控制、

* 国家科技支撑计划项目(2012BAC24B05)和江苏省煤基CO₂捕集与地质储存重点实验室开放基金项目(2015A01、2015B02)资助 Supported by the National Key Technology R&D Program of China (No. 2012BAC24B05) and the Project of Key Laboratory of Coal-based CO₂ Capture and Geological Storage, Jiangsu Province (Nos. 2015A01, 2015B02)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jingma2013@cumt.edu.cn

作者简介: 陈 浮(1974—), 男, 江苏射阳人, 博士, 教授, 主要从事生态安全监测、评价与修复研究。E-mail: chenfu@cumt.edu.cn

投稿日期: 2016-07-11; 收到修改稿日期: 2016-09-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-20

迁移转化和水环境^[11], 并进一步对上层土壤-植物生态系统产生直接或间接的负面影响^[12]。英国ASGARD项目组、美国ZERT研究组、欧盟Geo-Net和中国农业科学院等机构已实施了多项人工控制地下CO₂释放的模拟试验, 探测农田土壤-植被生态系统对地下CO₂泄漏的响应状况, 但取得的结论并不一致^[13-20]。主要原因可归于三点: 一是试验平台不一, 有盆栽, 有小块实验田, 土壤中CO₂扩散方式和浓度难以精确测定; 二是持续暴露的时间不一, 短的约为30 d, 最长的则达90 d, 很难明确土壤微生物群落转变的临界点; 三是种植体系不一, 不同根系分泌物对土壤微生物群落影响差异巨大, 不同研究之间缺乏可比性。此外, 以往的大气CO₂浓度升高对生态系统影响的研究很难作为CCS环境风险评估的参考。主要原因包括两点, 首先是作用途径不同, 大气CO₂浓度倍增实验中其浓度仅仅8.0‰, 从地表向土壤中渗透, 土壤中CO₂浓度一般不高于1.00%, 因此, 外源CO₂对土壤本身CO₂气体浓度的影响较小, 通常变化幅度小于10%, 但地下CO₂泄漏则由深层土壤向地表逃逸, 其浓度可高达20.00%, 导致土壤中CO₂浓度增加数倍甚至数十倍; 二是持续时间不同, 地表CO₂受空气流动影响, 极容易发生扩散, 因此多采用封闭栽培箱, 对土壤气的影响相对小, 而地下泄漏CO₂在土壤保存时间很长, 其对土壤性质包括微生物多样性的影响可能更加剧烈。

据此, 本研究在中国矿业大学南湖校区内建立了大田实验平台, 模拟高浓度CO₂地下泄漏情景, 研究土壤微生物群落结构对CO₂地下泄漏的响应, 为评估和监测地下CO₂泄漏对近地表生态系统环境风险提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验场地

本试验平台在中国矿业大学南湖校区内, 地理位置为117°08'08"E、34°12'31"N, 属暖温带半湿润季风气候, 年均温度14.2℃, 年均降水量833 mm。土壤类型为潮褐土, 阳离子交换量约为14.91 ± 3.27 cmol kg⁻¹, 质地为轻壤, 机械组成(<0.001 mm、0.001~0.005、0.005~0.01、>0.01 mm)为15.12:22.34:9.15:53.39。2012年9月利用铲车分0~20 cm、20~90 cm二层取土

并分别堆放, 由下至上平铺10 cm粗砂、布设内带PVC软管的多孔钢管、10 cm细沙和1 cm多孔纳米板, 最后再分别铺上50 cm下层土壤和20 cm表土, 剩余土铺设田间路^[21]。尽量保持原土壤构型, 简单平整后放置1.5 a自然压实。实验田总面积约为1 000 m² (40 m × 25 m), 共建成48个2.5 m × 2.5 m标准样方(图1)。

1.2 试验设计

试验平台包含自动控制系统室、地下管路、田间路、水利设施和田地。本研究针对15个样方开展, 首先清除杂草和根系, 种植玉米。2014年3月7日开始持续通气60 d, 气源为工业级CO₂, 体积浓度为99.8%。设计低浓度(L-400, 400 g m⁻² d⁻¹)、中浓度(M-800, 800 g m⁻² d⁻¹)、高浓度(H-1200, 1 200 g m⁻² d⁻¹)、极端高浓度(E-2000, 2 000 g m⁻² d⁻¹)和对照组(C-0), 各设3个重复。通气后采3次土样, 分别在14 d、30 d和60 d。对照组通气前(C1)和试验结束时(C2)各采1次。恢复组(R-0)为极端高浓度E组停止CO₂通气60 d后采样1次。通入量由气体调节阀和流量控制器控制, 按下列公式计算注入速率:

$$V=FS/\rho \quad (1)$$

式中, V 为流量控制器上CO₂注入速率(ml s⁻¹); F 为设计注入浓度(400 g m⁻² d⁻¹); S 为样方面积(m²); ρ 为CO₂密度(g L⁻¹)。

1.3 样品采集与分析

采用五点法采集10~20 cm混合土样。一部分室内自然风干, 过2 mm筛剔除石砾和植物残体等杂物, 4℃冷藏备用。另一部分无菌袋密封, 存放-20℃冰箱, 用于微生物测试。

土壤有机质采用重铬酸钾-外加热法测定, 阳离子交换量采用EDTA-铵盐快速法测定, 机械分析采用比重计法测定^[22], NO₃⁻-N采用双波长分光光度法测定, 土壤pH采用电位法测定(土:水=1:2.5)^[23]。

土壤中CO₂气体浓度测量: 每个样方内均垂直埋深20 cm气体探针(长40 cm, 内径2 cm), 底端密封, 最下端10 cm管壁上均匀钻直径0.3 cm的小孔, 外贴防水生物膜, 保证气体自由扩散又不积水。气体探针顶端设密封阀门, 连接到改制的带自动传输数据功能的便携式气体检测仪GT901 (TES, 台湾)上测量土壤中CO₂体积浓度, 量程0~30.00%, 数据传输间隔为1 h。

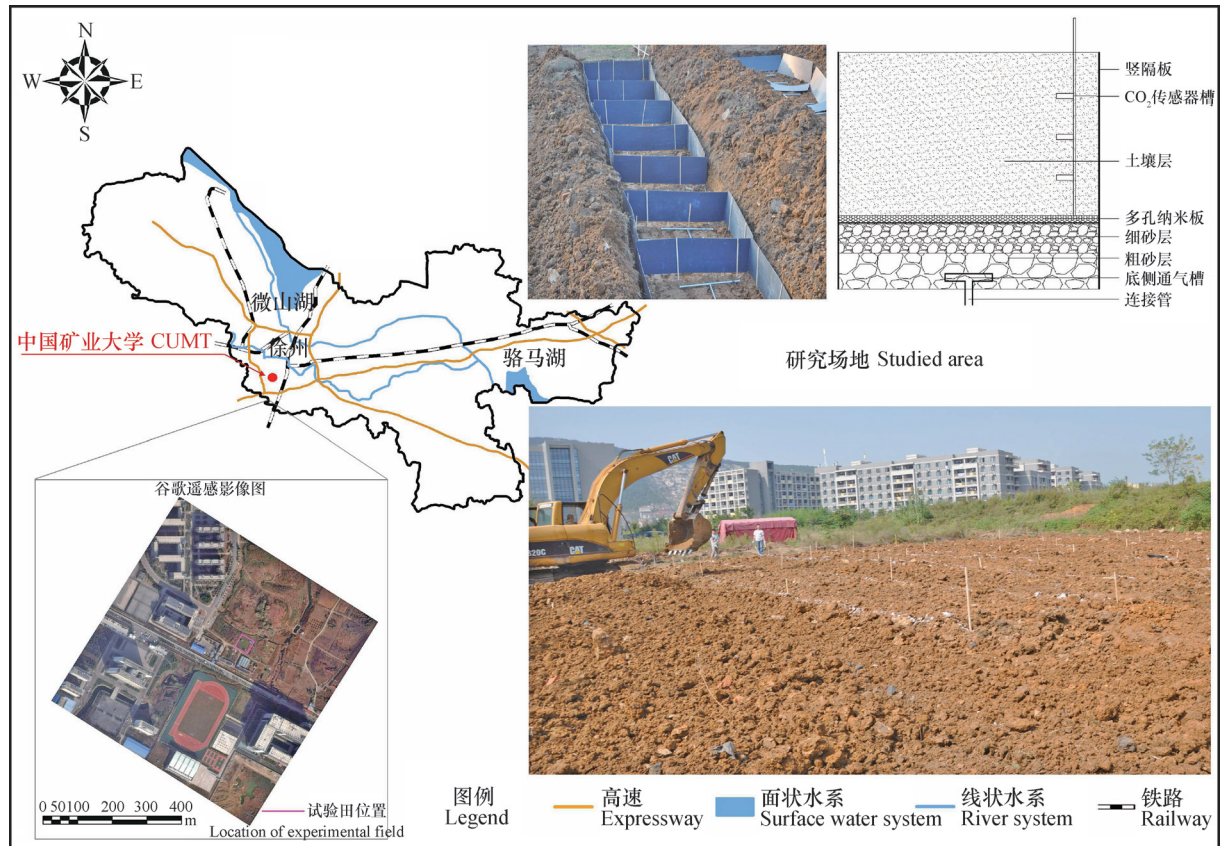


图1 试验平台位置与建设方案

Fig. 1 Location and construction scheme of the experimental platform

DNA提取、扩增与测序：按DNA快速提取试剂盒（Felix bio-tech，美国）上操作说明从45个（每个0.5 g）土样中提取总DNA，利用核酸定量仪（NanoDrop ND-1000，美国）检测提取的总DNA浓度和纯度。采用特异引物338F（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'）和806R（5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'）对16S rDNA基因的V4区进行PCR扩增（Pyrobest DNA Polymerase, TaKaRa, DR500A）。25 μl PCR体系包含：5 μl 5 \times Q5 反应缓冲剂，5 μl 5 \times Q5 GC 强化剂，2 μl 2.5 mmol L⁻¹ dNTPs，两个特异引物各1 μl （10 μmol L⁻¹），0.25 μl Q5 聚合酶，8.75 μl 超纯无菌水和2 μl 模板DNA（20 ng μl^{-1} ）。PCR扩增具体程序如下：98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min，98 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，50 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s，共持续25个循环周期。最后72 $^{\circ}\text{C}$ 持续10 min结束程序。进行1%琼脂糖凝胶电泳检测，割胶回收目标条带（Axygen Biosciences, Union City, CA, USA），Tris-HCL洗脱。最终利用AxyPrep DNA凝胶抽取

仪对PCR进行定量（Axygen Biosciences, Union City, CA, USA）。利用PCR选择性地富集两端连有接头的DNA片段，同时扩增DNA文库。利用PicoGreen和荧光分光光度计方法定量文库。此外，使用Agilent 2100对PCR富集片段进行质量控制，验证DNA文库的片段大小及分布。将所有样品DNA文库均一化至10 nmol L⁻¹后等体积混合。再将混合好的文库（10 nmol L⁻¹）逐步稀释定量至4~5 pmol L⁻¹后进行上机测序。

1.4 数据处理

首先需要去除引物接头序列，再根据PE reads之间的overlap关系，将成对的reads拼接（merge）成一条序列，然后按照barcode标签序列识别并区分样品得到各样本数据，最后对各样本数据的质量进行质控过滤，得到各样本有效数据。利用QIIME（Version 1.7.0, <http://qiime.org/>）对原始FASTQ文件进行多路复用剔除和质量筛选，调用uclust对优质序列按序列相似度97%进行聚类分析，选取每个类中最长的序列作代表序列。再将

优化序列map比对回OTU代表序列, 获得每个OTU代表序列的分类学信息。选取相似度在97%条件下OTU生成预期的稀释曲线, 利用Chao (The Chao1 estimator, <http://www.mothur.org/wiki/Chao>) 和 Shannon (The Shannon index, <http://www.mothur.org/wiki/Shannon>) 指数反映单样本 (一个特定区域或生态系统) 群落的丰富度和均匀性, 即 α 多样性; 利用非度量多维标度指数 (NMDS index) 计算各样本间的进化及丰度信息的距离来反映是否具有显著的群落差异, 即 β 多样性; 利用SPSS17.0 和Canoco windows for 4.5 (<http://www.canodraw.com/>) 软件进行数据统计和冗余分析 (RDA)。多重相关比较显著性检验采用最小显著差法 (LSD)。

2 结 果

2.1 高浓度CO₂地下泄漏对土壤理化性质的影响

从表1可以看出, 持续通气60 d后土壤化学特性发生显著变化。土壤pH、电导率和NO₃⁻-N随CO₂泄漏量增加而下降, pH和NO₃⁻-N尤为显著。停止通气后pH则恢复明显, NO₃⁻-N略有回升, 但电导率则继续下降, 有机质含量却随CO₂泄漏量呈上升趋势, 停止通入后明确回落。统计分析发现CO₂泄漏量与主要土壤因子变化存在显著性相关关系 (表1)。

2.2 泄漏对土壤中CO₂浓度的影响

根据上述公式计算, L-400、M-800、H-1200、E-2000对应的注入速率分别为16.64 ml s⁻¹、

表1 不同处理各时期土壤理化特征变化

Table 1 Soil physicochemical properties relative to treatment and timing of sampling

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	电导率 EC (dS m ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N (mg kg ⁻¹)
C-0	7.89 ± 0.16a	15.98 ± 1.27a	241 ± 14a	6.07 ± 0.51a
L-400	7.68 ± 0.13a	16.91 ± 1.55a	174 ± 13b	2.88 ± 0.15b
M-800	7.49 ± 0.11b	16.34 ± 0.98a	185 ± 8b	1.87 ± 0.19b
H-1200	7.23 ± 0.08b	18.86 ± 1.15b	177 ± 6b	1.41 ± 0.14b
E-2000	6.70 ± 0.28b	19.20 ± 1.27b	178 ± 10b	1.12 ± 0.10b
R-0	7.34 ± 0.17b	16.62 ± 2.07a	156 ± 11b	1.20 ± 0.16b

注: 同列无相同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。C-0, L-400, M-800, H-1200, E-2000和R-0分别为通入CO₂ 0, 400, 800, 1 200, 2 000 g m⁻² d⁻¹和停止注气60 d后E组取样, 下同 Note: Different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level. C-0, L-400, M-800, H-1200 and E-2000 stands for 0, 400, 800, 1 200, and 2 000 g m⁻² d⁻¹ in CO₂ flux and R-0 for Recovery group of the former Treatment E-2000, 60 days after the stop of leakage. The same below

29.27 ml s⁻¹、43.91 ml s⁻¹和73.18 ml s⁻¹。样品主要采集10~20 cm表层土壤, 因此CO₂传感器探针设置监测位置为埋深10~20 cm处。从图2可以看出, E-2000组通气6 h后土壤中CO₂浓度趋向稳定, 约为20.00%, H-1200组通气8 h后趋向稳定, 约为10.06%, 24 h内各组CO₂浓度均呈现饱和, C-0组一直保持约0.60%, 组内差异不显著。其中的主要原因是, 土壤中CO₂浓度受通气量、气体来源、地表气候因子、通气时间、土壤孔隙度、土壤含水率和pH等多因素的影响, 本模拟平台设置的CO₂泄漏呈近似均匀扩散, 与先前模拟试验呈同心圆点源扩散完全不同, 保证土壤中CO₂浓度只受土壤自身状

况的影响^[24]。当通气一段时间后土壤中CO₂浓度达到饱和, 持续通气则向地表逸散, 并不能持续增加土壤中CO₂浓度。

2.3 土壤微生物群落多样性和丰富度变化

全部45个样品采用Illumina Miseq测序技术共获取了2 121 986个序列, 所有样品的稀释曲线均倾向于饱和平稳状态, 表明测序数据量合理。图3a显示Chao和Shannon指数随CO₂泄漏量和时间变化, 2个指数均随CO₂泄漏量增加而减小, L-400、M-800组与C-0对照组变化小, 说明中、低浓度CO₂通入对土壤微生物影响较小。E-2000组与C-0对照组相比二个指数最大分别下降了

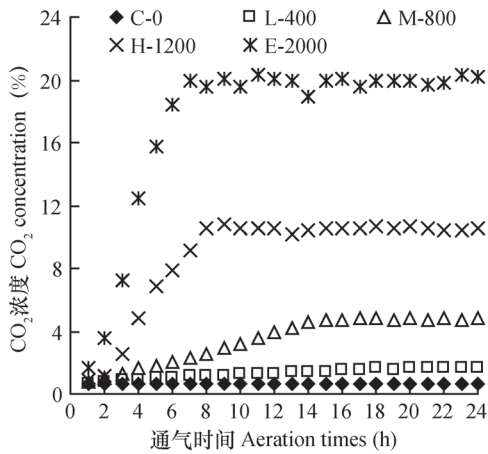


图2 土壤中CO₂浓度随通气时间的变化

Fig. 2 Variation of CO₂ concentration in the soil with aeration going on

17.00% ~ 27.80%和6.10% ~ 9.50%，说明高、极高浓度CO₂通入对微生物影响显著。CO₂泄漏量800 g m⁻² d⁻¹可能是微生物的一个重要阈值，更高的浓度可能彻底改变了微生物对土壤的环境适应性。与此同时，停止CO₂通入60 d，微生物群落α多样性和丰富度均呈现大幅度反弹，说明土壤微生物对CO₂胁迫具备较强的耐受性。

在OTU分类基础上采用非度量多维尺度(NMDS)指数作β多样性分析。NMDS指数显示C-0、L-400、和R-0样品和其他样品群落区分开，第2轴又将M-800和H-1200、E-2000组样品分开(图3b)。NMDS指数更好地解释了H-1200、

E-2000组高浓度下“抑制状态”与L、M组低浓度下“促进状态”下土壤微生物群落结构的变化。

2.4 土壤微生物结构与组成变化

所有样品中95%以上的序列可以明确分类至不同类群，包括酸杆菌门(*Acidobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)等9大菌门相对丰度占90%以上，其中放线菌门(*Actinobacteria*)最为丰富，约占35.51%(图4)。CO₂泄漏造成了厌氧环境，酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)等好氧菌门相对丰度随CO₂泄漏量呈下降趋势，拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)等厌氧菌门则呈相反的趋势。其中拟杆菌属(*Bacteroidales*)变化最为显著，随CO₂通入从C-0处理开始时相对丰度3.09%上升至E-2000处理60 d后相对丰度21.20%，乳酸菌属(*Lactobacillus*)次之，从C-0处理开始时相对丰度1.10%增加至E-2000处理60 d后相对丰度6.95%。热微菌属(*Thermomicrobia*)则随CO₂通入从C-0处理开始时相对丰度16.70%下降至E-2000处理60 d后相对丰度3.20%。

为进一步检测土壤环境因子与微生物群落变

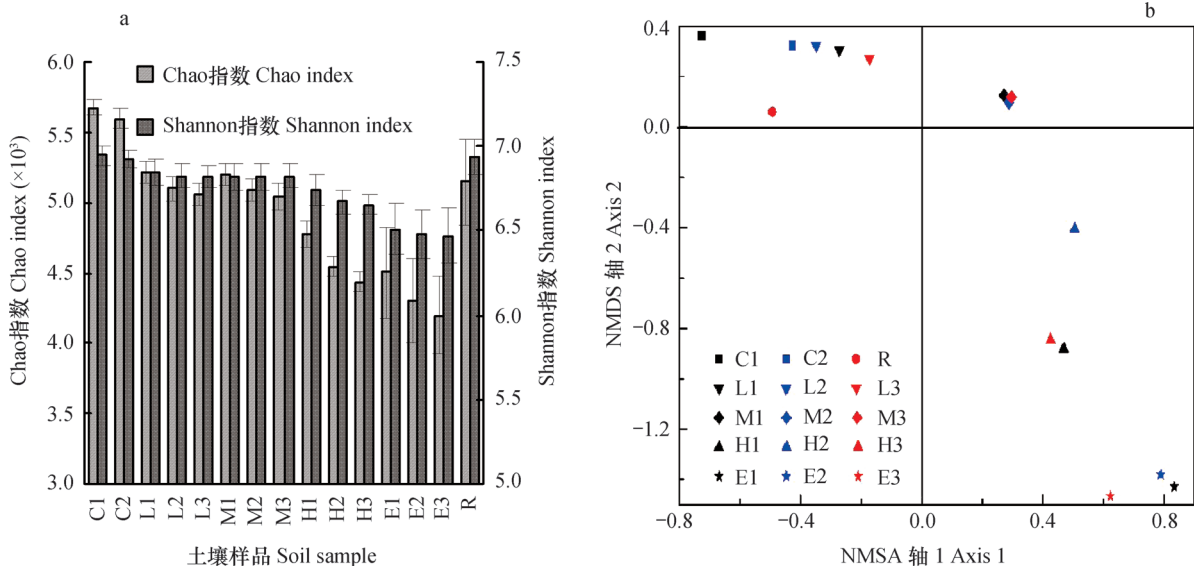


图3 不同处理微生物群落α多样性(a)与β多样性(b)分析

Fig. 3 Alpha diversity (a) and beta diversity (b) analysis of microbial community relative to treatment

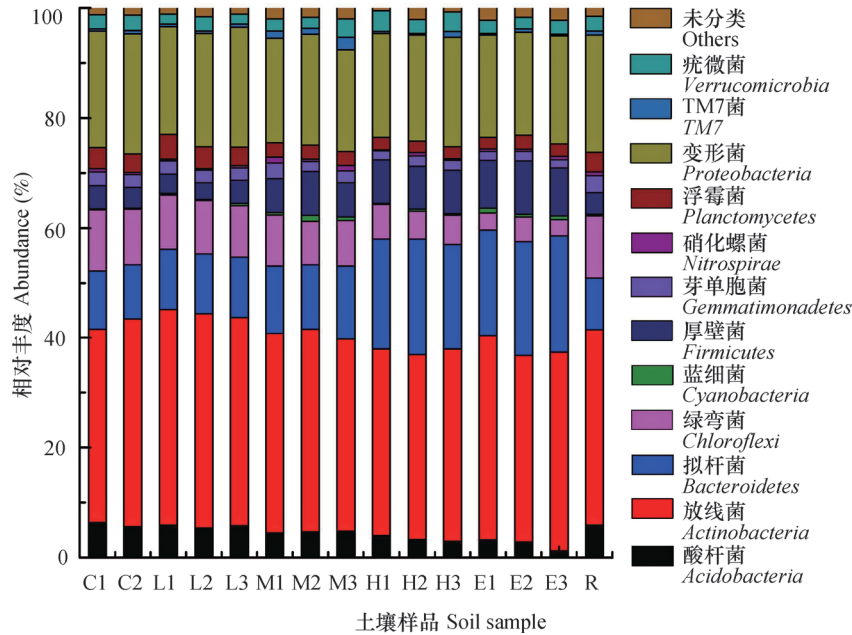


图4 不同处理的土壤微生物菌门相对丰度变化

Fig. 4 Phylum composition of the soil microbes relative to treatment

化的对应关系，引入了RDA分析。从图5可以看出：不同处理各时期土壤微生物群落与pH、EC值和NO₃-N等环境因子呈现显著相关 ($p < 0.005$)，在第1轴上解释了C-0、L-400组与M-800、H-1200、E-2000组之间的差异，pH是最长的箭头，表示其是引起群落分异的最重要因子。有机质在第2轴上较好地解释了L-400、M-800组与H-1200、E-2000组之间群落差异。

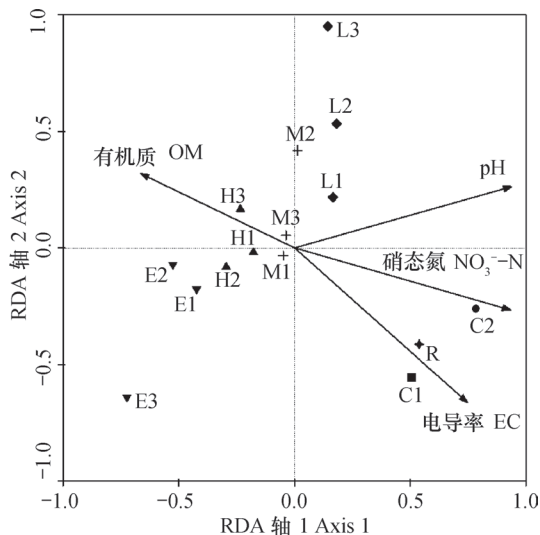


图5 土壤微生物群落结构与土壤因子RDA分析

Fig. 5 RDA analysis of soil microbial community with soil factors

3 讨论

CO₂浓度、根系分泌物和时间通常被认为是影响土壤微生物多样性的3个重要变量^[25]，本研究在考虑上述变量基础上设计了4个通气梯度研究高浓度CO₂地下泄漏对土壤微生物的胁迫，结果发现多样性、丰富度和群落结构均发生了变化，这与前人CO₂浓度倍增实验取得的结论相对一致^[26-29]，但变化特征却具有明显的差异。理论而言，地下CO₂泄漏对土壤和农作物的影响完全不同于以往的大气CO₂浓度倍增实验，前者首先影响土壤环境，土壤CO₂浓度饱和后再逸散入大气，同时在近地表受气流影响很难形成高浓度的聚集^[30]。因此，实际状况下地下CO₂泄漏对农作物几乎不可能产生“施肥”效应，为此精准的实验模拟平台至关重要。以往模拟试验均采用点源，尤其是盆栽实验几乎不考虑泄漏与土壤中CO₂浓度的关系，一般情况下点源扩散在土壤中CO₂浓度呈同心圆状^[16-18]，但环状条带极不稳定，易造成多重浓度反复交叉干扰。这与地下CO₂泄漏以及大气CO₂浓度倍增实验缓慢向上或向下均匀的影响特征完全不同，每次采样均需要重复测定土壤气浓度，耗时费力精度差。后续植被实验更难，往往一个浓度条带上仅能生长一株玉米，样品难以满足实验要求。本模拟

实验平台解决了泄漏与土壤中CO₂浓度的关联性,获取均匀态扩散,极大地方便了研究^[24]。CO₂注入加大了土壤中CO₂浓度,可能改变了土壤物理化学性质,导致微生物群落结构的变化。一般认为CO₂等酸气对土壤pH属性影响最为明显影响,本实验结果显示土壤pH随CO₂通入浓度梯度降低而逐渐下降,这与Beaubien^[26]和Oppermann^[31]等关于泄漏点pH呈下降趋势的结论一致,但McFarland等^[32]并未发现极端CO₂浓度变化会引起pH的明显变化。造成这一差异的原因可能来自两个方面:一是与土壤本底pH有关,CO₂泄漏不可能造成土壤无限的酸化;二是当土壤中CO₂达到饱和后,大量CO₂外排并逸散入大气,换言之,大气中CO₂浓度即使再高,也不可能无限扩大土壤中CO₂浓度,这与地下泄漏直接作用于土壤环境的影响完全不同。此外,本实验证实了Luis等^[33]关于土壤有机质随CO₂通入呈上升的趋势,表明60 d高浓度CO₂泄漏能改变土壤有机碳库,这可能与还原条件下有机质转化率更低密切相关。同时发现NO₃⁻-N也是随着CO₂泄漏量急剧下降的,可能是CO₂通入促进反硝化菌生长,利用硝态氮参加反硝化反应有关^[34],然而,已知的绝大多数反硝化菌均为异养微生物,利用有机碳而非CO₂生长,因此,也有可能是其他土壤性质的变化,例如土壤酸化导致大量有机碳溶出,进而刺激了反硝化微生物生长,或者是土壤理化性质的变化,导致土壤硝态氮快速淋溶至深层土壤。但也有相反的研究结果,如McFarland等^[32]认为NO₃⁻-N会随CO₂增加而增大,其原因可能是CO₂通入可能会抑制生物的生长,减少植被和土壤微生物对氮的需求,但具体的机制仍需进一步研究,并在不同CO₂封存条件下具有不同的响应规律。

根系分泌物是影响微生物群落结构及多样性的重要因子^[27, 35],但相互作用关系极为复杂。本实验前剔除了杂草和根系,再统一种植玉米,目的即是消除不同植物根系分泌物对微生物影响的不确定性,同一植物根系且初始土壤因子基本无差异,CO₂注入则成为影响微生物的单一因子。已有报道表明高浓度CO₂泄漏会降低土壤微生物多样性和丰富度,本研究也得到了类似结果^[3, 25, 36]。不同处理各时期群落特征存在差异,说明CO₂泄漏已经对土壤微生物多样性产生了重要影响。2014年5月胜利油田G89-1驱油开采区生态本底值调查时

发现了数处地下CO₂泄漏点,连续观察了3 a,最高一处近地表CO₂浓度高达0.20%,是正常大气CO₂浓度值的5倍,泄漏点周边1.5 m范围内植物均无法成活。与天然CO₂通道周边观察结果极为相似^[26],影响范围小主要原因是CO₂在风速大于1 m s⁻¹时就能迅速扩散^[30],一旦发生大量泄漏则破坏力极大^[3]。此外,本研究发现玉米根系下拟杆菌目(*Bacteroidales*)相对丰度随CO₂通气量持续显著增加,但这类群的新陈代谢及功能多样性还需要更充分的信息加以分析,这是未来研究的一个重要方向。

尽管很难解释高浓度CO₂泄漏条件下一些微生物的增加或减少,但高通量测序技术提供了不同类群微生物的动态变化趋势^[18, 37],可在一定程度较为明确地解释与CO₂通入量相关的土壤环境下微生物群落的差异性。此外,不同处理组类群中序列分布是不同的,它表明时间和CO₂通入量均产生了显著的影响,R-0组群落 α 多样性和丰富度更为接近C-0对照组,但反映群落结构和组成的 β 多样性则更接近H-1200组和E-2000组,它显示土壤微生物尽管可以适应新的环境体系,但其功能的恢复需要更长的时间,不同于 α 多样性和丰富度的恢复。这些研究结果表明,高浓度CO₂地下泄漏极可能对土壤微生物群落及其功能产生重要影响,未来仍需对土壤微生物群落的底物利用方式,生长代谢速率及其恢复力对CO₂泄漏的适应规律进一步研究。

4 结论

不同CO₂泄漏情景下农田土壤微生物群落结构、多样性和丰富度存在显著性差异。Chao指数和Shannon指数随CO₂泄漏量增加而减少,降幅分别达17.00%~27.80%和6.10%~9.50%。同时,微生物类群随CO₂泄漏梯度增加发生了明显的异化。 β 多样性分析表明不同CO₂泄漏情景影响了农田土壤微生物群落组成,土壤pH和CO₂通入量可能是影响微生物多样性的最重要环境因子。拟杆菌属(*Bacteroidales*)相对丰度随CO₂泄漏量增加从3.09%上升至21.20%,可作为监测和评估CO₂地下泄漏生态环境风险的敏感性指标。尽管60 d恢复实验表明土壤微生物群落多样性和丰富度恢复较好,但其功能恢复力尚未可知,未来仍需重点研究高浓度CO₂地下泄漏对土壤生态系统功能的潜在风险。

参 考 文 献

- [1] Dai Z X, Stauffer P H, Carey J W, et al. Pre-site characterization risk analysis for commercial-scale carbon sequestration. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48 (7) : 3908—3915
- [2] 任韶然, 李德祥, 张亮, 等. 地质封存过程中泄漏途径及风险分析. *石油学报*, 2014, 35 (3) : 591—601
Ren S R, Li D X, Zhang L, et al. Leakage pathways and risk analysis of carbon dioxide in geological storage (In Chinese). *Acta Petrolei Sinica*, 2014, 35 (3) : 591—601
- [3] Patil R H, Colls J J, Steven M D. Effects of CO₂ gas as leaks from geological storage sites on agro-ecosystems. *Energy*, 2010, 35 (12) : 4587—4591
- [4] IPCC. Climate change 2014: Mitigation of climate change//Contribution of working group III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press, 2014: 18—28
- [5] Bachu S, Bonijoly D, Bradshaw J, et al. CO₂ storage capacity estimation: Methodology and gaps. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2007, 1 (4) : 430—443
- [6] Gibson-Pool C M, Svendsen L, Underschultz J, et al. Site characterization of a basin-scale CO₂ geological storage system: Gippsland basin, Southeast Australia. *Environmental Geology*, 2008, 54 (1) : 1583—1606
- [7] Okwen R T, Stewart M T, Cunningham J A. Analytical model for screening potential CO₂ repositories. *Computational Geosciences*, 2011, 15 (4) : 755—770
- [8] Wielopolski L, Mitra S. Near-surface soil carbon detection for monitoring CO₂ seepage from a geological reservoir. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 60 (2) : 307—312
- [9] Wilson E J, Mark A, Figueiredo D. Geologic carbon dioxide sequestration: An analysis of subsurface property law. *Journal of Environmental Law Report*, 2006, 36: 114—121
- [10] Lemieux J M. Review: The potential impact of underground geological storage of carbon dioxide in deep saline aquifers on shallow groundwater resources. *Hydrogeology Journal*, 2011, 19 (4) : 757—778
- [11] Kharaka Y K, Thordsen J J, Kakouros E, et al. Changes in the chemistry of shallow groundwater related to the 2008 injection of CO₂ at the ZERT field site, Bozeman, Montana. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 60 (2) : 273—284
- [12] 李琦, 刘桂臻, 张建, 等. 二氧化碳地质封存环境监测现状及建议. *地球科学进展*, 2013, 28 (6) : 718—727
Li Q, Liu G Z, Zhang J, et al. Status and suggestion of environmental monitoring for CO₂ geological storage (In Chinese). *Advances in Earth Science*, 2013, 28 (6) : 718—727
- [13] West J M, Jones D G, Annunziatellis A, et al. Comparison of the impacts of elevated CO₂ soil gas concentrations on selected European terrestrial environments. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2015, 42: 357—371
- [14] Fessen J E, Clegg S M, Rahn T A, et al. Novel MVA tools to track CO₂ seepage tested at the ZERT controlled release site in Bozeman, MT. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 60 (2) : 325—334
- [15] Wells A, Strazisar B, Diehl J R, et al. Atmospheric tracer monitoring and surface plume development at the ZERT pilot test in Bozeman, Montana, USA. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 60 (2) : 299—305
- [16] Oldenburg C M, Lewicki J L, Pan L, et al. Origin of the patchy emission pattern at the ZERT CO₂ release test. *Environmental Earth Sciences*, 2010, 60 (2) : 241—250
- [17] 伍洋, 马欣, 李玉娥, 等. 地质封存CO₂泄漏对农田生态系统的影响评估及耐受阈值. *农业工程学报*, 2012, 28 (2) : 196—205
Wu Y, Ma X, Li Y E, et al. Impact assessment and tolerable threshold value of CO₂ leakage from geological storage on agro-ecosystem (In Chinese). *Transactions of the CSAE*, 2012, 28 (2) : 196—205
- [18] 田地, 马欣, 李玉娥, 等. 利用高通量测序对封存CO₂泄漏情景下土壤微生物的研究. *环境科学*, 2013, 34 (10) : 4096—4104
Tian D, Ma X, Li Y E, et al. Research on soil bacteria under the impact of sealed CO₂ leakage by high-throughput sequencing technology (In Chinese). *Environmental Science*, 2013, 34 (10) : 4096—4104
- [19] 蒋金豹, Michael D S, 何汝艳, 等. 利用大豆光谱特征判定地下封存CO₂泄漏. *农业工程学报*, 2013, 29 (12) : 163—169
Jiang J B, Michael D S, He R Y, et al. Judgment of CO₂ leaking in underground storage using spectral characteristics of soybean (In Chinese). *Transactions of the CSAE*, 2013, 29 (12) : 163—169
- [20] 聂莉娟, 马俊杰, 赵雪峰, 等. 模拟CCS技术CO₂泄漏对C₃、C₄作物土壤化学性质的影响. *水土保持学报*, 2015, 29 (5) : 200—205

- Nie L J, Ma J J, Zhao X F, et al. Effects of simulation CO₂ leakage of CCS on soil chemical properties under C3 and C4 crops (In Chinese). *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29 (5): 200—205
- [21] Chen F, Zhang S L, Ma J, et al. A set of efficient device simulating the potential impact of CO₂ leakage from CO₂ enhanced oil recovery on farmland ecosystem// The 14th annual carbon capture, utilization & storage conference. Pittsburgh: Access Intelligence Press, 2015: 81
- [22] 张红, 吕家珑, 曹莹菲, 等. 不同植物秸秆腐解特性与土壤微生物功能多样性研究. *土壤学报*, 2014, 51 (4): 743—752
- Zhang H, Lü J L, Cao Y F, et al. Decomposition characteristics of different plant straws and soil microbial functional diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51 (4): 743—752
- [23] 杨帆, 黄来明, 李德成, 等. 高寒山区地形序列土壤有机碳和无机碳垂直分布特征及其影响因素. *土壤学报*, 2015, 52 (6): 1226—1236
- Yang F, Huang L M, Li D C, et al. Vertical distributions of soil organic and inorganic carbon and their controls along toposequences in an alpine region (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (6): 1226—1236
- [24] 陈浮, 谭敏, 马静, 等. 一种模拟CO₂在土壤中均匀扩散的试验装置与方法. 中国专利: 201510375957.9. 2015-08-06
- Chen F, Tan M, Ma J, et al. A Set of devices and methods simulating CO₂ homogeneous diffusion in soil (In Chinese). China Patent: 201510375957.9. 2015-08-06
- [25] Fernández M I, Touceda M, Pedescoll A, et al. Short-term effects of simulated below-ground carbon dioxide leakage on a soil microbial community. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2015, 36: 51—59
- [26] Beaubien S E, Ciotoli G, Coombs P, et al. The impact of a naturally occurring CO₂ gas vent on the shallow ecosystem and soil chemistry of a Mediterranean pasture (Latera, Italy). *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2008, 3 (2): 373—387
- [27] West J M, Pearce J M, Coombs P, et al. The impact of controlled injection of CO₂ on the soil ecosystem and chemistry of an English lowland pasture. *Energy Procedia*, 2009, 1 (1): 1863—1870
- [28] Antruck H, Imek M. Effect of soil CO₂ concentration on microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 25 (3): 269—273
- [29] Morales S E, Holben W E. Simulated geologic carbon storage leak reduces bacterial richness and alters bacterial community composition in surface soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 76: 286—296
- [30] Xu Y Q, Zhang S L, Hou H P, et al. Influence of CO₂ leakage from oil-producing wells on crop growth based on improved CASA model. *International Journal of Remote Sensing*, 2016, 37 (2): 290—308
- [31] Oppermann B I, Michaelis W, Blumenberg M, et al. Soil microbial community changes as a result of long-term exposure to a natural CO₂ vent. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010, 74 (9): 2697—2716
- [32] McFarland J W, Waldrop M P, Haw M. Extreme CO₂ disturbance and the resilience of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 65: 274—286
- [33] Luis E S M, Paula A, Estanislao L C, et al. High-throughput sequencing of 16S RNA genes of soil bacterial communities from a naturally occurring CO₂ gas vent. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2014, 29: 176—184
- [34] 周汉昌, 刘文钊, 刘毅, 等. 土壤团聚体N₂O释放与反硝化微生物丰度和组成的关系. *土壤学报*, 2015, 52 (5): 1144—1152
- Zhou H C, Liu W Z, Liu Y, et al. Relationships of N₂O emission with abundance and composition of denitrifying microorganisms in soil aggregates (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (5): 1144—1152
- [35] Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, et al. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57 (2): 204—211
- [36] Liu Y, Zhou H M, Pan G X, et al. Short-term response of nitrifier communities and potential nitrification activity to elevated CO₂ and temperature interaction in a Chinese paddy field. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 88—98
- [37] Singh K M, Shah T, Deshpange S, et al. High throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (12): 10595—10602

Effects of Underground Leakage of High Concentration CO₂ on Soil Microbial Community Structure

CHEN Fu^{1, 2} YANG Baodan¹ MA Jing^{2†} ZHANG Shaoliang² ZHANG Yuanyuan³

(1 School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

(2 Low Carbon Energy Institute, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221008, China)

(3 Sinopec Petroleum Engineering Design Company Limited, Dongying, Shandong 257026, China)

Abstract 【Objective】 To cope with the trend of global warming, CO₂ capture and storage (CCS) is one of the major technologies for reduction of CO₂ emission. And then the captured CO₂, nil in commercial value, is injected underground to raise the output of petroleum or coalbed methane, so as to maximize its economic profit. However, the prevailing technologies are far from being capable of guaranteeing zero leakage of the stored CO₂ during the processes of CO₂ storage and transportation, geological activities and human misoperation. Once the risk of potential CO₂ leakage becomes real, the leakage will pose an enormous threat to the near surface ecosystem. It is, therefore, essential to explore in depth effects of underground CO₂ leakage on farmland soil environment, especially tolerance and sensitivity of soil microbial communities to different concentrations of CO₂. So the study was conducted. 【Method】 An experimental platform to simulate underground CO₂ leakage was constructed in an idle farmland, in the South Lake Campus of the China University of Mining and Technology. The platform was used to simulate leakage of CO₂ varying in intensity, i.e. 400 g m⁻² d⁻¹, 800 g m⁻² d⁻¹, 1 200 g m⁻² d⁻¹ and 2 000 g m⁻² d⁻¹ for 60 days, thus forming four treatments, i.e. L-400, M-800, H-1200 and E-2000. Besides, the experiment also had a control group and a recovery group. Soil samples were collected from the four treatments and their 3 replicates on the 14th, 30th and 60th day after the start of simulated leakage, from the control group on the day before the start of leakage (C1) and at the end of the experiment (C2), and from the recovery group, which was actually Treatment E2000, 60 days after the stop of the leakage. The soil samples were analyzed for soil physical and chemical properties, concentration of occluded soil, structure and α and β diversities of soil microbial community with the conventional physicochemical analysis method and the Illumina second generation gene sequencing method based on the Miseq platform. 【Result】 Results show that CO₂ leakage decreased soil pH, electrical conductivity and nitrate nitrogen content and the effect was enhanced with rising CO₂ concentration whereas it had an opposite effect on soil organic matter content. In all the four treatments. Soil CO₂ concentration increased till it reached saturation in 24 h, when soil CO₂ gas concentration leveled off at 1.60%, 4.80%, 10.80% and 19.60%, respectively. Along with increasing CO₂ flux, soil microbial community decreased in diversity, Chao index and Shannon index, by 17.00% ~ 27.80% and 6.10% ~ 9.50%, respectively. In contrast, soil microbial community increased in β diversity (NMDS index) in Treatments L-400 and M-800 (low CO₂ concentration) but decreased in Treatments H-1200 and E-2000. Some bacteria, like *Bacteroidales*, varied extremely, either rising up or falling down in relative abundance with increasing CO₂ leakage. 【Conclusion】 The structure, diversity and abundance of soil microbial community varied significantly from treatment to treatment. Soil pH and CO₂ flux were the two most important environmental factors affecting soil microbial diversity. *Bacteroidales* was very sensitive to CO₂ stress so that it can be

used as a key indicator in monitoring and evaluating ecological risk of underground CO₂ leakage. The 60 d short term recovery experiment indicates that the soil microbial community recovered well in diversity and richness, but it is still unclear whether it did in function. Therefore, in future studies, focuses should be laid on impacts of underground high concentration CO₂ leakage on functions of the soil ecosystem.

Key words Carbon capture and storage; CO₂ leakage; Microbial community; High-throughput sequencing; Diversity analysis

(责任编辑: 卢 萍)