

张旺园, 张绍良, 陈 浮, 等. 模拟地下 CO₂ 泄漏对土壤微生物群落的短期影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(6): 1167–1176.

ZHANG Wang-yuan, ZHANG Shao-liang, CHEN Fu, et al. Short-term effects of simulated underground CO₂ leakage on the soil microbial community[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(6): 1167–1176.

模拟地下 CO₂ 泄漏对土壤微生物群落的短期影响

张旺园¹, 张绍良¹, 陈 浮^{1,2}, 侯湖平¹, 冯启言¹, 马 静^{1,2*}

(1. 中国矿业大学环境与测绘学院, 江苏 徐州 221043; 2. 中国矿业大学低碳能源研究院, 江苏省煤基 CO₂ 捕集与地质储存重点实验室, 江苏 徐州 221008)

摘要:为研究地质封存 CO₂ 泄漏对土壤微生物的影响,以徐州市褐潮土为研究对象,利用减压阀和可调节流量计控制 CO₂ 的通入,模拟地质封存 CO₂ 泄漏,测定 CO₂ 通气处理前后的土壤理化性质、酶活性以及微生物群落多样性。结果表明:土壤 CO₂ 浓度的增加使土壤 pH 值降低,最大变化幅度为 8.15 降至 7.29;硝态氮平均含量从通气前的 1.01 mg·kg⁻¹ 上升至 4.03 mg·kg⁻¹,有机质和有效磷含量变化明显。土壤 CO₂ 浓度的增加抑制了 FDA 水解酶的活性,各组平均含量从 22.69 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 下降至 11.25 mg·kg⁻¹·h⁻¹,多酚氧化酶活性上升幅度达 230%,脲酶活性也表现为上升趋势。土壤 CO₂ 浓度的增加导致 Alpha 多样性降低,表现为 Chao1 指数减小,Shannon 指数从 7.35 降低至 6.23。在确定种类的微生物中,变形菌门丰度迅速增大,比例从 29%增至 64%,酸杆菌门比例从 20%降至 13.25%;在属水平上,*Methylophilus*、*Methylobacillus*、*Methylovorus* 三属丰度增大,*Gp4*、*Gp6*、*Gp7* 丰度减小,其余菌属变化不明显。CCA 分析结果表明,在土壤 CO₂ 浓度增加条件下,硝态氮、脲酶、多酚氧化酶活性的增加,FDA 水解酶活性、全磷、有效磷的减少与变形菌门、酸杆菌门物种丰度变化之间存在相关性。

关键词:地质封存 CO₂ 泄漏;模拟试验;土壤;微生物群落;理化性质;酶活性

中图分类号:S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2017)06-1167-10 **doi:**10.11654/jaes.2016-1559

Short-term effects of simulated underground CO₂ leakage on the soil microbial community

ZHANG Wang-yuan¹, ZHANG Shao-liang¹, CHEN Fu^{1,2}, HOU Hu-ping¹, FENG Qi-yan¹, MA Jing^{1,2*}

(1. School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221043, China; 2. Coal-based CO₂ Capture and Geological Storage Key Laboratory, Low Carbon Energy Institute, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: The technology of CO₂ Capture and Storage (CCS) has provided a new option for mitigating global anthropogenic CO₂ emissions with its unique advantages. The potential risk of gas leakage from CO₂ sequestration and utilization processes has been attracting a large amount of attention. In addition, the resulting threat to soil ecosystems cannot be ignored. In this paper, a simulation experiment was designed to investigate the effects of CO₂ geological storage leakage on the soil microbial consortia, with fluvo-aquic soil as the research subject. A pressure relief valve and an adjustable flow meter were used to control the amount of CO₂ injected into the soil during the experiment. By comparing soil physicochemical properties, enzyme activity, and microbial community diversity before and after stress treatments of different CO₂ concentrations, some interesting results were obtained. The increase of soil CO₂ concentration decreased the soil pH, and the maximum variation amplitude ranged from 8.15 to 7.29. Nitrate nitrogen average content varied from 1.01 mg·kg⁻¹ to 4.03 mg·kg⁻¹, whereas, both Olsen-phosphorus and organic matter contents changed significantly. The increase of soil CO₂ concentration inhibited the activity of

收稿日期: 2016-12-06

作者简介: 张旺园(1993—),女,浙江舟山人,硕士研究生,从事环境微生物学研究。E-mail: zwy2014zs@126.com

* 通信作者: 马 静 E-mail: jingma2013@cumt.edu.cn

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAC24B05); 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)

Project supported: The National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China(2012BAC24B05); Opening-funds Projects of the Key Laboratory of Coal-based CO₂ Capture and Geological Storage of Jiangsu Province(2015A01, 2015B02)

fluorescein diacetate (FDA) hydrolytic enzyme, with the average content varying from $22.69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ to $11.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, whereas the activity of polyphenol oxidase enzyme increased by 230%. The urease activity also increased. The increase of soil CO_2 concentration decreased the alpha diversity of the soil microbial community. The Chao1 index decreased and the Shannon index reduced from 7.35 to 6.23. Of the identified microorganisms, the abundance of Proteobacteria increased rapidly, with the proportion rising from 29% to 64%. However, the proportion of Acidobacteria decreased from 20% to 13.25%. On the genus level, the abundances of *Methylophilus*, *Methylobacillus*, and *Methylovorus* increased, whereas the abundances of *Gp4*, *Gp6*, and *Gp7* decreased. Moreover, the abundances of other genera did not show obvious changes. The canonical correspondence analysis results showed that there was a correlation between the abundance variations of Proteobacteria and Acidobacteria and the increasing nitrate nitrogen, urease and polyphenol oxidase enzyme activities, as well as the decreasing FDA hydrolytic enzyme activity and Olsen-phosphorus and total phosphorus contents. These results might be useful for evaluating the risk of potential CO_2 leakages on the ecosystems associated with CCS processes.

Keywords: CO_2 geological storage leakage; simulation experiment; soil; microbial community; physicochemical properties; enzyme activity

二氧化碳捕集与封存技术(Carbon Dioxide Capture and Storage, 简称 CCS),是指从点源将 CO_2 分离捕集后注入深层地质储层,并长期与大气隔离^[1]。在全球经济快速发展以及化石能源燃料迅速消费的背景下,因减排潜力大,长期应用成本低等优势,CCS 被视为一项重要的减排手段^[2]。但 CCS 技术存在着地质封存泄漏的可能性。强烈的快速泄漏会引起生命财产的巨大损失,而 CO_2 缓慢向上入侵土壤,将会引发土壤气体、土壤水分、土壤 pH 以及土壤微生物群落组成的改变,进而引起土壤理化性质和土壤环境的变化。因此,重新衡量 CCS 技术的利弊是至关重要的。

从先前的研究来看,土壤 CO_2 浓度变化对土壤性质产生影响是必然的。但受技术手段限制,实验较难反映真实的泄漏情景,土壤性质及微生物群落与环境因子的对应关系并不清晰。邓书林等^[3]认为土壤 CO_2 浓度升高主要通过影响氮等养分来限制真菌和细菌的生长;张丙华等^[4]以胜利油田正在实施 CO_2 驱油的某区块土壤为研究对象,发现随着 CO_2 泄漏浓度的增大,土壤 pH 降低,土壤含水率和有机碳含量降低;张习美等^[5]在开顶式气箱(OTC)中采用盆栽试验,发现 CO_2 浓度升高可以显著增加美洲商陆(*Phytolacca americana* Linn)根际土壤中细菌、放线菌、真菌的数量,增幅分别为 19%~32%、41%~21%、25%~58%。尹飞虎等^[6]在新疆石河子棉田土壤进行的试验表明,当 CO_2 浓度升高到 $540 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $720 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,0~40 cm 土壤中细菌和 0~20 cm 土壤中放线菌数量均呈增加趋势,20~40 cm 土壤中真菌数量则呈减少趋势;施翠娥等^[7]开展的 OTC 平台和青菜盆栽试验结果表明, CO_2 升高不同程度地提高了土壤可溶性有机碳、全磷、总碳、铵态氮、硝态氮含量,进而不同程度地提高了土壤微生物量以及土壤各种酶活性。

本研究建立了廉价实用的简易地质封存 CO_2 泄漏模拟装置,完全满足短期影响实验的要求,不同于我们先前的的大田模拟实验平台^[8-9]。通过模拟泄漏、土样采集、实验测试,研究土壤理化性质、酶活性以及土壤微生物群落结构对 CO_2 泄漏的响应,探讨在土壤 CO_2 增加的情况下,土壤环境因子变化与微生物群落变化之间的关系,揭示地质封存 CO_2 泄漏可能产生的生态风险,旨在为建立 CCS 技术安全评估提供科学依据,促进 CCS 项目更快、更安全的实施。

1 材料与方法

1.1 试验设计和样品采集

原始土样为褐潮土^[9],来源于中国矿业大学南湖校区内农田(117.2°N, 34.2°E),未经人为处理。当地属暖温带季风性气候,年均降水量 800~930 mm,年均气温 14 °C。

将原始土样装入室外露天放置的花盆中,以进行 CO_2 泄漏模拟实验。花盆高度 30 cm,土层厚度至少可达 25 cm。通过将气瓶、减压阀、分流器、塑料管等装置的连接,形成 CO_2 输出控制装置。将塑料管固定在花盆底部中心位置,使其出气口位置保持在底部以上 2~3 cm 处(图 1)。试验设置无气体通入的控制组和其他四组 CO_2 泄漏胁迫组,调整减压阀和可调节流量计使得进气浓度始终保持在 400、1000、1500、2000 $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 。控制组记为 C 组,胁迫组根据 CO_2 浓度高低分别记为 L、M、H、E 组,共 5 组处理,每组 3 个重复,共 15 盆。实验过程中,每天进行实验装置的检查,保证气体通入不间断,同时使用便携式 CO_2 检测仪确定采集点浓度是否稳定。

自 2016 年 3 月 19 日开始通气,共采样 6 次。通气前,即 3 月 19 日,采集第一批土样,第二批至第五

图1 地质封存CO₂泄漏模拟装置Figure 1 CO₂ geological storage leakage simulation appliance

批采样时间分别为4月1日、4月16日、5月1日、6月3日。6月3日采集土样后立即结束通气,一个月后,即7月4日,采集第六批土样,尝试观察解除CO₂泄漏胁迫后的土壤环境的恢复状况。上述6个时间点分别记为0、10、25、40、70、100 d。

不同样点采用随机多点土壤混合样,一部分放置室内阴干,手工去除砂石和植物残枝,研磨过100目筛,用于测试土壤理化性质和酶活性,另一部分新鲜土样存入-20℃冰箱备用。

1.2 土壤理化性质测定

土壤pH用电位法测定;电导率用电导率仪测定;土壤有机质用水合热重铬酸钾氧化-比色法测定;硝态氮用紫外分光光度法测定;全磷含量采用酸溶-钼锑抗比色法测定;有效磷采用氯化铵浸提-钼锑抗比色法测定^[10]。

1.3 土壤酶实验

脲酶用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定,脲酶活性以24 h后1 g土壤中NH₃-N的毫克数表示;用邻苯三酚比色法测定多酚氧化酶,其活性以培养2 h后1 g土壤中紫色没食子素的毫克数表示;蛋白酶用茚三酮比色法测定,其活性以24 h以后1 g土壤中氨基氮的毫克数表示^[11];脱氢酶用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定,离心比色后,将1 h产生1 μg TF的量作为一个酶活力单位^[12];荧光素二乙酸酯(FDA)水解酶用荧光素比色法测定^[13]。各测试均设置三组重复,并分别设置无基质的土壤和无土壤的基质作对照组。

1.4 土壤DNA测序

采用E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit的试剂盒提取土壤样品DNA,从20个土壤样本提取DNA进行PCR扩增。20个土样分别为通气前(0 d)5个样,此处记为C0、L0、M0、H0、E0;通气一个月后(40 d)15

个样,控制组记为C1、C2、C3,胁迫组记为L1、L2、L3;M1、M2、M3;H1、H2、H3;E1、E2、E3。

第一轮PCR扩增利用Qubit 2.0 DNA检测试剂盒对基因组DNA精确量,以确定PCR反应加入的DNA量。PCR所用引物已经融合了Miseq测序平台的V3-V4通用引物,341F(CCCTACACGACGCTCTTCC-GATCTG(barcode)CCTACGGGNGGCWGCAG)和805R(GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCAGAC-TACHVGGGTATCTAATCC)。50 μL PCR聚合酶链式反应体系包含:5 μL 10×PCR buffer,0.5 μL dNTP(10 mmol·L⁻¹ each),10 ng Genomic DNA,两个特异引物各0.5 μL(50 μmol·L⁻¹),0.5 μL Plantium Taq(5 U·μL⁻¹),最后用超纯无菌水加至50 μL。PCR扩增程序如下:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,45℃退火20 s,65℃延伸30 s,持续5个循环周期;94℃变性20 s,55℃退火20 s,72℃延伸30 s,持续20个循环周期;最后72℃持续10 min,降温至10℃。随后第二轮扩增程序,PCR体系除DNA增加至20 ng,其余与第一轮一致,扩增程序则为:95℃预变性30 s;95℃变性15 s,55℃退火15 s,72℃延伸30 s,持续5个循环周期;最后72℃持续5 min则程序结束。

PCR扩增结束后,PCR产物进行琼脂糖电泳检测,再对DNA进行纯化回收。对于细菌和古菌扩增的PCR产物和正常扩增片段在400 bp以上的PCR产物,选用0.6倍的磁珠(Agencourt AMPure XP)处理。利用Qubit 2.0 DNA检测试剂盒对回收的DNA精确量,以方便按照1:1等量混合后测序。进行等量混合时,每个样品DNA量取10 ng,最终上机测序浓度为20 pmol。

1.5 测序数据处理

利用SPSS 20软件对土壤理化性质和酶活性测定结果进行配对样本t检验,将胁迫组与控制组数据进行差异性分析,可判定CO₂通气处理是否对土壤存在影响;同时对各胁迫组之间也进行差异性分析,判断不同浓度的CO₂是否产生不同影响。

测序所得原始数据采用双端(Pair-end)FASTQ格式保存(R1.fastq和R2.fastq,Read1和Read2序列)。先对原始序列进行去接头、质量剪切等处理(即质量控制),再通过去除特异性扩增序列及嵌合体等预处理,然后运用Qiime软件进行OTU聚类分析,将序列划分为操作分类单元(OTU)。根据样本OTU数据,利用Mothur计算Chao1和Shannon丰富度指数,衡量样本物种多样性,随后筛选每个OTU代表性序

列,采用 RDP classifier 将序列进行物种分类,赋予物种分类单元。对每个样本和每个物种单元分类进行序列丰度计算,已分类 Reads 数目较少的菌群种属归入 Others,未确定种属的菌群归入 Unclassified,并结合 Origin 8 构建样本和物种分类单元序列丰度矩阵,得到物种丰度条形图。为检测环境因子、样品、菌群三者之间的关系,利用 Canoco windows for 4.5 将 0 d 和 40 d 的土壤理化性质、酶活性、OTU 信息数据继续做 CCA 分析。

2 结果与分析

2.1 地质封存 CO₂ 泄漏对土壤理化性质的影响

原始土样为褐潮土,通气前土壤 pH 为 8.12 ± 0.03 ,电导率为 $(203.78 \pm 4.43) \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$,有机质含量为 $(15.13 \pm 0.40) \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷和全磷含量分别为 $(15.99 \pm 1.22) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $(0.41 \pm 0.01) \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,硝态氮和全氮含量分别为 $(1.02 \pm 0.04) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $(0.85 \pm 0.07) \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

图 2A 显示,土壤 pH 在 CO₂ 胁迫下发生显著变化($P < 0.05$),相对控制组,胁迫组 pH 值随着通气时间的增加呈现显著下降趋势($P < 0.05$)。L 组、M 组的 pH 值最终下降至 7.34 左右,而 H、E 组在 100 d 时已下降至 7.29。随着通气的进行,pH 值下降趋势为先迅速下降,后逐渐趋于平缓,可能是由于 CO₂ 通气造成的酸性影响趋于稳定。电导率在通气阶段仅略有波动,基本稳定,无显著差异(图 2B)。

土壤有机质是评价土壤肥力和质量的重要指标^[14]。图 2C 显示土壤有机质呈急剧下降后上升的趋势。0~40 d 期间,有机质含量基本为下降趋势,到 70 d 出现急剧增加的现象。恢复期阶段,有机质含量再次下降至接近初始含量,但控制组和胁迫组之间无明显差异。

磷是植物生长发育不可缺少的营养元素,但绝大部分以非有效态积累于土壤中^[15]。由图 2D 可知,土壤有效磷总体变化趋势复杂,表现为大幅升降。全磷变化趋势较有效磷平缓(图 2E),经检验控制组及各胁迫组之间无显著差异,从通气时长上来看,表现为前期累积,随后消耗,后期保持不变。

CO₂ 胁迫通过影响氮固定、硝化作用、反硝化作用、厌氧氨氧化等过程,影响土壤中的氮含量^[16]。图 2F 显示各胁迫组硝态氮含量呈波动性上升,前期变化显著,且各胁迫组相比控制组在 CO₂ 通气后出现显著变化($P < 0.05$)。通气前,各胁迫组平均值为 $1.01 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而 100 d 时高达 $4.03 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。全氮含量略有波动,但

无显著变化(图 2G)。

2.2 地质封存 CO₂ 泄漏对土壤酶活性的影响

土壤酶在土壤生态系统的物质循环和能量转化中起着重要的作用,是比理化性质更敏感的指标^[17]。

经检验,胁迫组和控制组的 FDA 水解酶含量存在显著的差异($P < 0.05$),说明 CO₂ 泄漏对 FDA 水解酶活性产生一定的抑制作用(图 3A)。通气前各胁迫组 FDA 水解酶含量平均值为 $22.69 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,至 100 d 时已降至 $12.15 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。不同浓度胁迫组的响应程度相似,不存在显著差异。多酚氧化酶活性在通气后出现显著($P < 0.05$)上升趋势(图 3B)。根据通气时长分析,各胁迫组在通气初期立即出现活性变化,且变化显著($P < 0.05$),通气后期虽有变化,但并不显著,至 100 d 平均值相比通气前增加了约 230%,100 d 恢复期的活性相对于 70 d 无变化。

蛋白酶活性无显著变化。图 3C 表明,通入 CO₂ 后蛋白酶活性出现波动,随后基本不变。土壤脲酶和脱氢酶分别是影响尿素水解、氮素循环和土壤微生物活性的重要酶类^[18]。图 3D 表明,脱氢酶出现降-升-降的趋势,变化显著($P < 0.05$),但各胁迫组响应的时间点并不相同,总体上无显著变化。经检验,脲酶相邻胁迫组之间存在显著差异,通气时长对脲酶活性也存在显著影响($P < 0.05$)。由图 3E 可知,脲酶在 10 d 时含量下降,随后上升并保持稳定,且 M 组、E 组上升幅度大于 L 组、H 组。

2.3 地质封存 CO₂ 泄漏对土壤微生物群落的影响

取通气前及通气一个月之后(40 d)的 20 个土壤样本进行微生物多样性检测,0、40 d 时样本标记与前文相同。Alpha 多样性分析可以反映微生物群落的多样性和丰富度,结果如表 1 所示。对比通气后各组 Chao1 指数可以发现,随着通气的进行和 CO₂ 胁迫浓度的增加,土壤群落丰富度在 C、L、M 组不断下降,H、E 组又出现微弱的上升。Shannon 指数用于衡量群落的异质性,数据显示 CO₂ 浓度越高,香农指数越低,说明土壤中微生物群落多样性在 CO₂ 胁迫下降低。

图 4A 显示,20 个样本中所含菌群门类较丰富。变形菌(Proteobacteria)、酸杆菌(Acidobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)、疣微菌(Verrucomicrobia)、放线菌(Actinobacteria)、芽单胞菌(Gemmatimonadetes)、绿弯菌(Chloroflexi)、浮霉菌(Planctomycetes)、厚壁菌(Firmicutes)、蓝藻菌(Cyanobacteria)在各供试土样中均有分布。变形菌门相对丰度最大,0 d 时平均比例高达

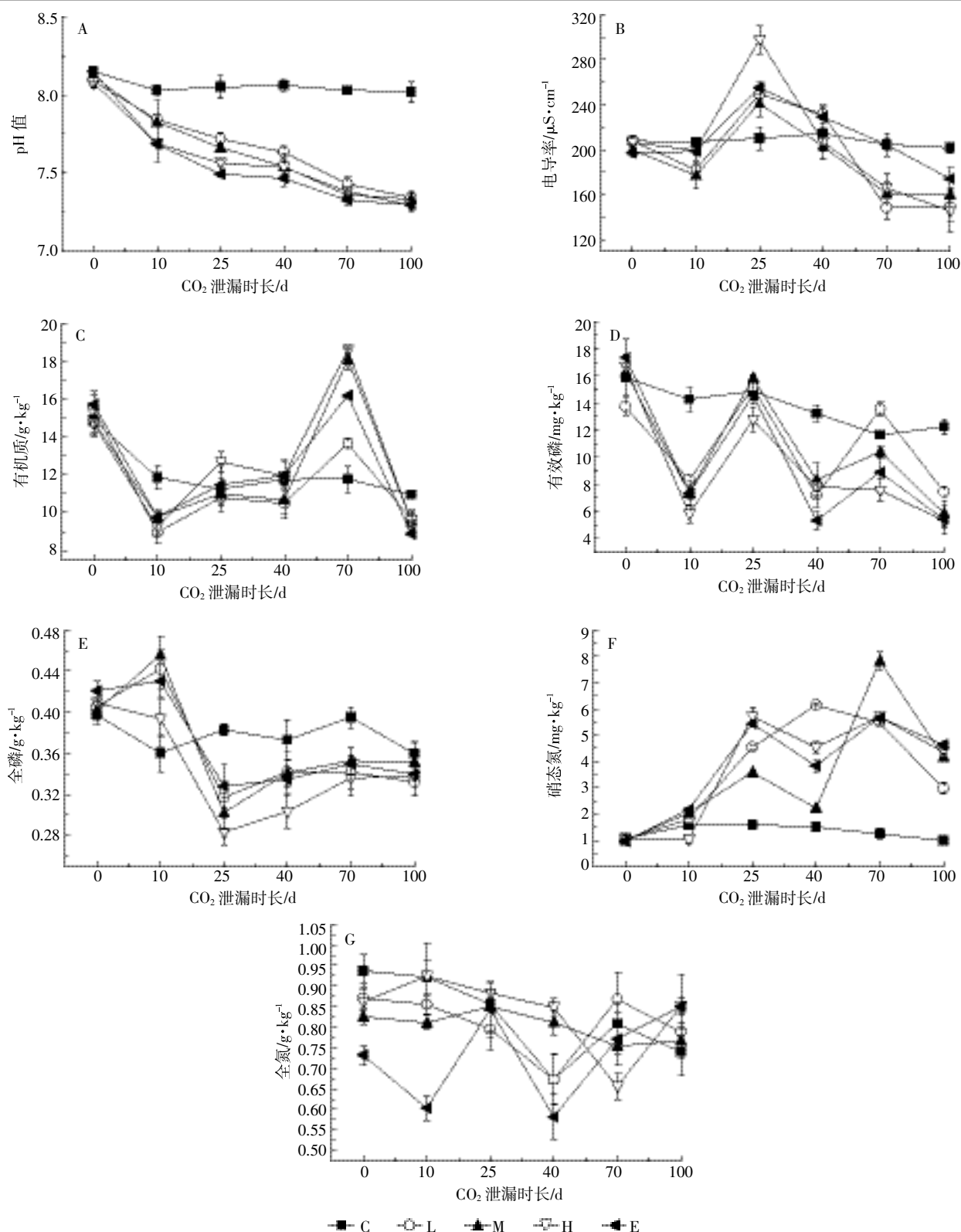


图 2 土壤理化性质变化情况

Figure 2 Change in soil physical and chemical properties

30.5%, 随着 CO₂ 浓度增加其丰度增大, E 组变形菌门丰度甚至高达 64%, 是供试土样的优势菌门。酸杆菌

门的平均丰度从通气前的 20% 降低至 13.25%。其余门类丰度变化基本呈降低趋势。

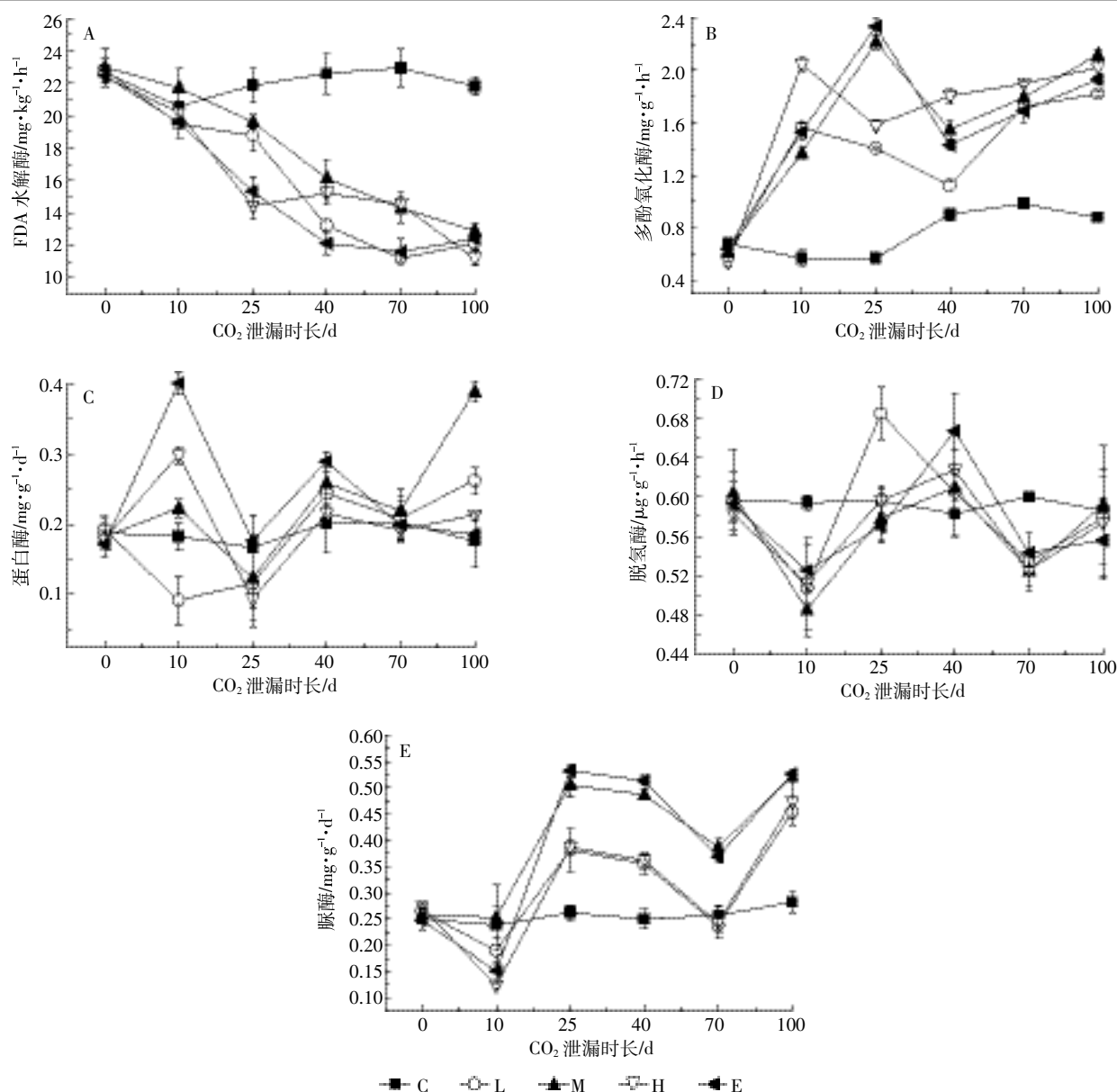


图3 土壤酶活性变化情况

Figure 3 Changes in soil enzyme activity

在属水平上,按平均丰度大小排列的前11个属中,变形菌门中的嗜甲基菌属(*Methylophilus*)、甲基芽孢杆菌(*Methylobacillus*)、甲基营养菌(*Methylovorus*) 在通气后丰度迅速增长,而且CO₂胁迫浓度越高,丰度越大(图4B)。控制组三属比例为0.1%、0.07%、0.01%,E组分别增加至22%、10.3%、10.2%。酸杆菌门的三个属 *Gp6*、*Gp4*、*Gp7*,在通气胁迫下表现为抑制生长。

由于单因子无法完整解释土壤微生物群落结构变化,本研究引入典范对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA),解析多个环境因子和微生物群

落之间的关系,结果如图5所示。为使结果更加显著,简化0d样方信息,选择C0、M0、H0重新定义为K1、K2、K3,其余标记与前文相同。考虑OTU序列特征,选择丰度较大且具有样点特征的15个OTU作为物种信息元数据。10个环境因子分别为pH、有机质、有效磷、全磷、硝态氮、FDA水解酶、多酚氧化酶、蛋白酶、脱氢酶、脲酶。

结果(图5A)表明,未通气K组与一个月后控制组物种信息相近。胁迫组的微生物对应菌属丰度均产生明显变化。比较样方和物种的直线距离发现,OTU01、OTU02、OTU04、OTU05、OTU13 相对其他OTU

表 1 土壤微生物 Alpha 多样性

Table 1 Alpha diversity of soil microorganism

样本	Chao1 指数	Shannon 指数
C0	14 604.19±1 704.23	7.35±0.24
L0	15 601.76±425.67	7.66±0.13
M0	16 543.62±1 022.00	7.63±0.26
H0	17 185.51±677.13	7.45±0.32
E0	15 136.54±645.32	7.44±0.11
C1	13 815.69±1 714.73	7.38±0.19
C2	11 666.78±1 144.13	7.03±0.07
C3	13 567.04±1 403.89	7.10±0.04
L1	12 457.13±1 062.83	7.11±0.46
L2	12 044.64±1 172.41	7.23±0.43
L3	11 238.16±1 177.58	6.38±0.29
M1	13 163.37±1 289.13	6.88±0.85
M2	12 900.97±1 346.37	6.03±0.49
M3	10 660.81±1 103.01	5.19±0.54
H1	13 105.19±652.46	6.20±0.04
H2	14 614.52±572.32	6.15±0.04
H3	12 509.60±998.91	6.23±0.52
E1	11 398.76±627.14	5.31±0.46
E2	14 295.70±917.41	5.68±0.30
E3	13 238.25±216.18	6.23±0.35

距离控制组样方更远, 距胁迫组更近, 说明这部分 OTU 随胁迫组变化, 相关性较大。

同时, 沿箭头方向, 样方中的环境变量值增加, 说明胁迫组中, 硝态氮、脲酶、多酚氧化酶的含量是增加的。其余环境因子变量不同程度减小, 仅部分样方的脱氢酶含量增加, 该结果与前文理化性质及酶活性分析结果一致。环境因子和物种信息的相关性, 可以通过物种点与中心点连线在环境因子箭头上的投影来表示。图 5B 表明, 左侧硝态氮、脲酶、多酚氧化酶和

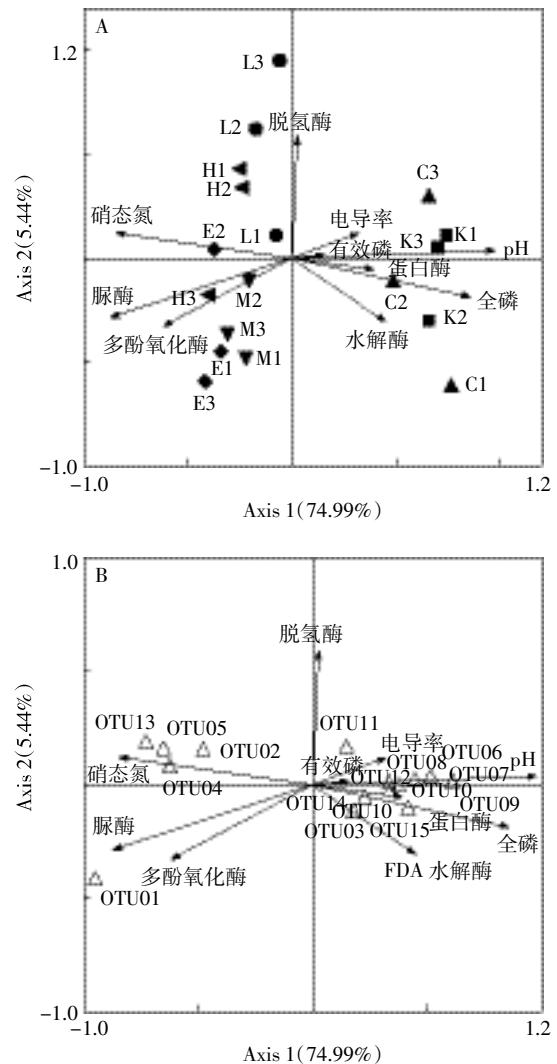


图 5 环境因子与样点、环境因子与 OTU 的 CCA 分析图
Figure 5 CCA environ+samples, environ+OTU analysis charts

OTU01、OTU02、OTU04、OTU05、OTU13 相关性较大。剩余环境因子, 除脱氢酶外, 与其他 OTU 信息相关性

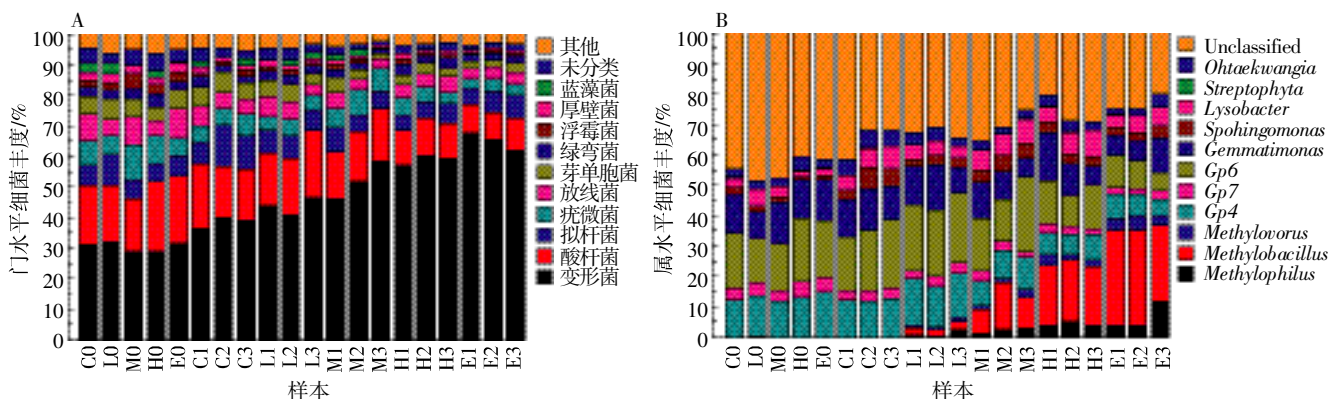


图 4 样本菌群丰度条形图
Figure 4 Abundance barplot of genus and phylum

较大。根据酶的来源^[19]推测,土壤 CO₂ 浓度升高,直接影响理化性质及土壤微生物群落结构,从而影响酶活性。同时,理化性质和酶活性的改变间接影响土壤群落结构。因此,CO₂ 胁迫下,硝态氮、脲酶、多酚氧化酶活性的增加及 FDA 水解酶、蛋白酶活性的减少可能导致 OTU01 等丰度的增加和 OTU06、OTU07 等丰度的减少,同时,OTU01 等丰度增加产生的群落结构变化促进了酶活性的变化。

3 讨论

在本试验中,供试材料为徐州市地区褐潮土,属弱碱性土壤。土壤 CO₂ 浓度的增加使得土壤 pH 值大幅降低,而对电导率则基本无影响,有效磷和有机质变化复杂,其余理化性质与对照组无明显差异,与先前报道^[4]一致。在无植物土壤中,有机碳来源主要为微生物代谢活动,因此 CO₂ 浓度增加可能导致微生物数量下降从而影响有机质含量。CO₂ 气体进入土壤后,形成酸性环境,可以通过影响碳酸根离子的浓度来改变铵根离子浓度,同时也可以通过形成厌氧环境来影响厌氧氨氧化过程。同理,土壤 CO₂ 浓度的增加可能促进了硝化作用,从而使得硝态氮浓度增加。

影响土壤酶活性的因素很多,土壤重金属污染以及不良水热条件会对土壤酶活性和土壤微生物多样性产生影响^[19]。本实验中土壤 CO₂ 浓度的增加使得 FDA 水解酶活性出现明显的下降,对多酚氧化酶和脲酶都表现出不同程度的促进作用,与先前报道^[18]一致。脱氢酶活性与呼吸代谢作用相关,因此其复杂变化可能与 CO₂ 浓度升高后抑制土壤微生物呼吸代谢有一定关系。

结合 Alpha 多样性以及物种丰度图分析,土壤 CO₂ 浓度增加使得变形菌门丰度增加,微生物群落结构逐渐趋于单一,证实了先前报道的结论^[20-22]。Sibanc 等^[23]研究发现 CO₂ 浓度升高会导致土壤微生物群落结构变化,但是优势种群不变而其丰度上升,与本研究结论基本一致。本研究中,在 CO₂ 通气影响下,微生物群落多样性略有变化,丰富度明显越低,说明 CO₂ 模拟泄漏已产生重要影响。张帆等^[24]对鄂尔多斯 CO₂ 地质封存地区的土壤研究过程中,得到了高浓度 CO₂ 入侵包气带对土壤微生物群落结构产生显著影响的结论,与本研究相似。另外,在 CO₂ 通气过程中,不同微生物丰度出现的变化不同,与 Dunbar 等^[25]在 11 年的大气 CO₂ 浓度升高变化过程中检测到的细菌群落丰度明显增加趋势有所不同。本实验中酸杆菌门和拟

杆菌门丰度也较高。土壤 CO₂ 浓度增加使得疣微菌门、放线菌门、芽单胞菌门丰度下降。也有研究表明,随着 CO₂ 泄漏时间的变化,土壤中不同门类细菌丰度变化不同^[20]。

在属水平上,由 CO₂ 泄漏导致的土壤微生物属水平测定结果可知,变形菌门下的嗜甲基菌、甲基芽孢杆菌、甲基营养菌丰度上升。针对嗜甲基菌属的研究目前国内较少,国外较多,而在地质封存 CO₂ 泄漏胁迫研究中,尚未有提及嗜甲基菌属的报道,测序结果分析一般表示到变形菌门为止。嗜甲基菌属于变形菌门下 β -变形菌纲,是一种专性甲基营养菌,因此土壤 CO₂ 浓度增加可能促进土壤中某些带甲基有机物质或其他间接刺激变量的增加,导致环境发生更适于嗜甲基菌的变化。Tsujimoto 等^[26]设计了甲基营养嗜甲基菌(*Methylophilus methylotrophus*)的 L-赖氨酸的生物合成方式,研究表明嗜甲基菌有一个良好的赖氨酸生成量的控制系统。Xia 等^[27]在用甲烷富集甲烷氧化菌的过程中,从自来水中分离出了 *Methylophilus* sp. TWE2,并通过其完整序列探究利用该细菌将甲烷基团转换成甲醛的途径。Khan 等^[28]通过在微生物菌剂中添加淀粉作为碳源提高了 TNT 的解毒效果,并在培养过程中发现嗜甲基菌丰度急剧增长逐渐成为优势菌属。具体的相关变量因子,将在未来试验中作更详细的探索。

通气后,土壤中的酸杆菌门下三属 *Gp6*、*Gp4*、*Gp7* 丰度下降。王春香等^[29]的研究提到,酸杆菌是异养型微生物,其在土壤中的分布随着碳源浓度的变化而改变。Lauber 等^[30]的研究指出,土壤中酸杆菌相对丰度与土壤 pH 呈显著负相关。其他学者亦发现,向土壤中施加氮肥会导致酸杆菌丰度降低。此外,研究还发现酸杆菌的相对丰度与平均降水量、土壤有机碳含量和土壤碳氮比呈显著的正相关^[20,23,31]。然而,中性甚至碱性的环境中也检测到了酸杆菌的基因序列^[32],与本次实验结果一致。此外,近几年对酸杆菌属的研究打破了一些既定规律,如对我国东北旱地黑土农田细菌群落结构研究发现^[33],黑土农田中酸杆菌相对丰度与土壤 pH 值没有显著的相关关系。Jones 等^[34]对北美和南美的 87 个土壤样品大尺度分析发现酸杆菌亚群 *Gp1*、*Gp2*、*Gp3*、*Gp12*、*Gp13* 和 *Gp15* 相对丰度与 pH 值呈显著负相关关系,而 *Gp4*、*Gp6*、*Gp7*、*Gp10*、*Gp11*、*Gp16*、*Gp17*、*Gp18*、*Gp22* 和 *Gp25* 相对丰度与 pH 值呈显著正相关关系。因此,不同属的酸杆菌对土壤 pH 的响应不同。

总之,小型模拟试验仍需要长期持续定点监测,完善监测数据序列,提高试验的操作便利性和数据的精确度,力求达到从机理上详细解析土壤对CCS泄漏的反馈过程,在此基础上优化大田试验方案,缩短试验周期并节约经费。

4 结论

(1)土壤CO₂浓度的增加较大程度地改变了土壤理化性质。土壤pH值、有效磷、有机质以及硝态氮含量发生明显变化。

(2)土壤CO₂浓度的增加影响了土壤酶活性。FDA水解酶活性明显下降,多酚氧化酶和脲酶活性增强,蛋白酶和脱氢酶活性变化不甚明显。

(3)土壤CO₂浓度的增加对土壤微生物群落结构影响显著。随着土壤CO₂浓度的增加,变形菌门所占丰度上升,其余菌门基本表现为抑制作用,土壤微生物结构多样性逐渐降低,趋于单一。

(4)地质封存CO₂泄漏对土壤环境的扰动作用较大,可能出现危害性较大甚至不可逆的生态风险。因此,需尽快完善CCS技术安全评估系统,建立CO₂泄漏控制措施。

参考文献:

- [1] Ko D, Yao G, Yun S T, et al. Impacts of CO₂ leakage on plants and microorganisms: A review of results from CO₂ release experiments and storage sites[J]. *Greenhouse Gases Science and Technology*, 2016, 6(3): 319–338.
- [2] 张晓暄. 二氧化碳捕集与封存的国际法律研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 8–10.
ZHANG Xiao-xuan. A study on the CCS international legal system[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 8–10.
- [3] 邓书林, 刘芙蓉, 张咏梅. 增温和CO₂浓度加倍对川西亚高山针叶林土壤微生物群落结构的影响[J]. *应用与环境生物学*, 2016, 22(1): 20–26.
DENG Shu-lin, LIU Fu-rong, ZHANG Yong-mei. Effects of elevated temperature and doubling of CO₂ concentration on the soil microbial community structure in the subalpine coniferous forest of western Sichuan, China[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(1): 20–26.
- [4] 张丙华, 张倩, 耿春香, 等. 地质封存CO₂泄漏对土壤理化性质的影响[J]. *广州化工*, 2016, 44(7): 156–159.
ZHANG Bing-hua, ZHANG Qian, GENG Chun-xiang, et al. Influence on physical and chemical properties of soil for the leakage of carbon dioxide during geological storage[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2016, 44(7): 156–159.
- [5] 张习美, 唐世荣, 宋正国, 等. CO₂浓度升高对美洲商陆富积铍及其根际微生物特征的影响[J]. *核农学报*, 2010, 24(6): 1255–1261.
ZHANG Xi-mei, TANG Shi-rong, SONG Zheng-guo, et al. Effect of elevated CO₂ on Cs uptake and microbial characteristics in rhizosphere soil of *Phytolacca americana* L.[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(6): 1255–1261.
- [6] 尹飞虎, 高志建, 谢宗铭, 等. 大气CO₂浓度升高和施氮对棉田土壤理化性质及微生物区系的影响[J]. *地理研究*, 2013, 32(2): 214–222.
YIN Fei-hu, GAO Zhi-jian, XIE Zong-ming, et al. Influence of elevated CO₂ and nitrogen supply on cotton field soil properties and microbial flora[J]. *Geographical Research*, 2013, 32(2): 214–222.
- [7] 施翠娥, 艾弗逊, 汪承润, 等. 大气CO₂和O₃升高对菜地土壤酶活性和微生物量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(6): 1103–1109.
SHI Cui-e, AI Fu-xun, WANG Cheng-run, et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on soil enzyme activities and microbial biomass[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(6): 1103–1109.
- [8] 陈浮, 杨宝丹, 马静, 等. CO₂地质封存泄漏对土壤微生物群落的影响[J]. *中国矿业大学学报*, 2016, 45(6): 1129–1138.
CHEN Fu, YANG Bao-dan, MA Jing, et al. Effects of CO₂ geological storage leakage on soil microbial community[J]. *Journal of China University of Mining & Technology*, 2016, 45(6): 1129–1138.
- [9] 陈浮, 杨宝丹, 马静, 等. 高浓度CO₂地下泄漏对土壤微生物群落结构的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54(1): 180–190.
CHEN Fu, YANG Bao-dan, MA Jing, et al. Effects of high concentrations of CO₂ underground leakage on soil microbial community structure[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(1): 180–190.
- [10] 林大仪. 土壤学实验指导[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 109–121.
LIN Da-yi. Soil science experiment instruction[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2004: 109–121.
- [11] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 274–320.
GUAN Yin-song. Soil enzyme and its study method[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1986: 274–320.
- [12] 戴满伊, 吴季荣, 徐剑宏, 等. 小麦根际土壤脱氢酶活性测定方法的改进[J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(4): 772–776.
DAI Ru-yi, WU Ji-rong, XU Jian-hong, et al. Improvement of determination dehydrogenase activity in wheat rhizospheric soil[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(4): 772–776.
- [13] 马星竹. 长期施肥土壤的FDA水解酶活性[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2010, 36(4): 451–455.
MA Xing-zhu. FDA hydrolase activity of long-term fertilization soil[J]. *Journal of Zhejiang University(Agriculture & Life Sciences)*, 2010, 36(4): 451–455.
- [14] 韩新忠, 朱利群, 杨敏芳, 等. 不同小麦秸秆还田量对水稻生长、土壤微生物生物量及酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(11): 2192–2199.
HAN Xin-zhong, ZHU Li-qun, YANG Min-fang, et al. Effects of different amount of wheat straw returning on rice growth, soil microbial biomass and enzyme activity[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(11): 2192–2199.
- [15] 王永壮, 陈欣, 史奕. 农田土壤中磷素有效性及影响因素[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(1): 260–268.
WANG Yong-zhuang, CHEN Xin, SHI Yi. Phosphorus availability in

- cropland soils of China and related affecting factors[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(1):260–268.
- [16] 张春辉, 吴永贵, 付天岭. 矿山废水污染对稻田土壤环境特征及不同形态氮含量的影响[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(1):122–126.
- ZHANG Chun-hui, WU Yong-gui, FU Tian-ling. Effects of mine drainage pollution on paddy soil environment characteristics and contents of different soil nitrogen forms[J]. *Guizhou Agricultural Science*, 2014, 42(1):122–126.
- [17] 杨宁, 邹冬生, 杨满元, 等. 衡阳紫色土丘陵坡地不同植被恢复阶段土壤酶活性特征研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(6):1516–1524.
- YANG Ning, ZOU Dong-sheng, YANG Man-yuan, et al. Soil enzyme activities in different re-vegetation stages on sloping-land with purple soils in Hengyang of Hunan Province[J]. *China Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2013, 19(6):1516–1524.
- [18] 袁传卫, 姜兴印, 殷万元, 等. 吡啶醚菌酯对土壤微生物呼吸作用及土壤酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(5):897–903.
- YUAN Chuan-wei, JIANG Xing-yin, YIN Wan-yuan, et al. Effects of pyraclostrobin on soil microbial respiration and enzymatic activities[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(5):897–903.
- [19] 田然, 周辉, 黄娟, 等. 大气CO₂浓度升高条件下土壤镉污染对土壤酶及微生物群落多样性的影响[J]. 南京大学学报(自然科学), 2011, 47(6):712–717.
- TIAN Ran, ZHOU Hui, HUANG Juan, et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on the soil enzymes and microbial communities under stress of Cd pollution[J]. *Journal of Nanjing University(Natural Sciences)*, 2011, 47(6):712–717.
- [20] 田地, 马欣, 李玉娥. 利用高通量测序对封存CO₂泄漏情景下土壤细菌的研究[J]. 环境科学, 2013, 34(10):4096–4104.
- TIAN Di, MA Xin, LI Yu-e. Research on soil bacteria under the impact of sealed CO₂ leakage by highthroughput sequencing technology[J]. *Environment Science*, 2013, 34(10):4096–4104.
- [21] Liu Y, Zhou H M, Wang J Q, et al. Short-term response of nitrifier communities and potential nitrification activity to elevated CO₂ and temperature interaction in a Chinese paddy field[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96:88–98.
- [22] 赵光影, 刘景双, 王洋, 等. CO₂浓度升高对三江平原湿地活性有机碳及土壤微生物的影响[J]. 地理与地理信息科学, 2011, 27(2):96–100.
- ZHAO Guang-ying, LIU Jing-shuang, WANG Yang, et al. Effects of elevated CO₂ on the soil active carbon and microbe of freshwater marsh in Sanjiang Plain[J]. *Geography and Geo-Information Science*, 2011, 27(2):96–100.
- [23] Sibanc N, Dumbrell A J, Mandić-Mulec I, et al. Impacts of naturally elevated soil CO₂ concentrations on communities of soil archaea and bacteria[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 68:348–356.
- [24] 张帆, 李春荣, 邓红章, 等. 高浓度CO₂入侵包气带对土壤微生物的影响[J]. 应用化工, 2015, 44(10):1778–1783.
- ZHANG Fan, LI Chun-rong, DENG Hong-zhang, et al. Effects of high concentration CO₂ invasion into vadose zone on soil microbes[J]. *Applied Chemical Industry*, 2015, 44(10):1778–1783.
- [25] Dunbar J, Gallegos-Graves L V, Steven B, et al. Surface soil fungal and bacterial communities in aspen stands are resilient to eleven years of elevated CO₂ and O₃[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 76(1):227–234.
- [26] Tsujimoto N, Gunji Y, Ogawa-Miyata Y, et al. L-Lysine biosynthetic pathway of *Methylophilus methylotrophus* and construction of an l-lysine producer[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124:327–337.
- [27] Xia F, Zou B, Shan C, et al. Complete genome sequence of *Methylophilus* sp. TWE2 isolated from methane oxidation enrichment culture of tap-water[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 211:121–122.
- [28] Khan M I, Lee J, Yoo K, et al. Improved TNT detoxification by starch addition in a nitrogen-fixing *Methylophilus*-dominant aerobic microbial consortium[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 300(1):873–881.
- [29] 王春香, 田宝玉, 吕睿瑞, 等. 西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌群落结构和多样性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1):24–29.
- WANG Chun-xiang, TIAN Bao-yu, LÜ Rui, et al. Distribution and diversity of *Acidobacteria* in tropical rain forest soil of Xishuangbanna[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(1):24–29.
- [30] Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, et al. The influences of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across landuse types[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(9):2407–2415.
- [31] 王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2):14–20.
- WANG Guang-hua, LIU Jun-jie, YU Zhen-hua, et al. Research progress of acidobacteria ecology in soils[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(2):14–20.
- [32] Xiong J B, Liu Y Q, Lin X G, et al. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(9):2457–2466.
- [33] Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, et al. Soil carbon content drives the biogeographical distribution of fungal communities in the black soil zone of Northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83:29–39.
- [34] Jones R T, Robeson M S, Lauber C L, et al. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(4):442–453.