

# 高通量测序揭示某石化固废填埋场污染对土壤微生物群落结构和功能的影响<sup>\*</sup>

余诗航 刘珈佑 李占杰 王金生 左锐 李剑<sup>†</sup>

(北京师范大学水科学研究院,北京师范大学地下水污染控制与修复教育部工程中心,100875,北京)

**摘要** 石油化工行业产生大量固体废物,包含有毒有害污染物,其填埋处置可能对周边环境造成潜在危害,亟待开展石化固废填埋场对周边环境的影响研究.本文选择中国北方某石化固废填埋场作为研究对象,采用16S rDNA和宏基因组高通量测序技术揭示填埋场土壤微生物群落结构和功能特征,评估其对周边土壤微生物的影响.研究表明:填埋场土壤微生物群落结构较背景点存在差异,属水平上,*Solirubrobacter*等丰度降低;*Mycobacterium*、*Sphingomonas*、*Arthrobacter*和*Bradyrhizobium*等丰度增加;同时其微生物群落功能也区别于背景点,直系同源蛋白簇(COG)注释到高丰度的生物学功能,不仅有助于维持微生物正常的生理活动,也可帮助其适应外源污染胁迫;与背景点相比,填埋场土壤差异表达的基因功能与微生物对于污染胁迫的降解反应及毒性响应相关.填埋场构筑的防渗墙以及低渗透性介质条件能够有效地降低填埋场污染对于周边土壤微生物群落结构和功能的影响.相关性分析证实污染胁迫,特别是多环芳烃污染胁迫,是填埋场土壤微生物群落结构和功能改变的重要原因.

**关键词** 石化固废填埋场;污染胁迫;微生物群落结构;微生物功能;高通量测序

**中图分类号** X826

**DOI:** 10.12202/j.0476-0301.2021266

## 0 引言

石油化工行业日常的生产活动产生大量的固体废物.据报道,仅2016年全国工业固废产生量就达309 210万t,其中处置量为65 522万t<sup>[1]</sup>.填埋处置在很长一段时间内都是工业固废处置的重要方式<sup>[2]</sup>,在我国已形成了大量的固废填埋场.一些填埋场由于存在服务时间长、防渗措施不到位、管理缺失等问题,出现污染渗漏,导致污染物进入土壤、地下水等环境介质,对周边环境造成潜在危害,带来严重的环境问题<sup>[3-4]</sup>.鉴于石化行业产生的固体废物中包含大量有毒有害污染物,如多环芳烃(PAHs)、苯系物(BTEX)、铬(Cr)、铅(Pb)等<sup>[5]</sup>,渗漏进入土壤或地下水环境将会对土著生物甚至人类健康构成潜在威胁.杨凯等<sup>[6]</sup>研究证实,填埋场覆土层重金属铜(Cu)、镉(Cr)含量高于下层粉质黏土层和周边未污染土壤;相关研究也表明,渗滤液中的PAHs可在防渗粉质黏土层中迁移<sup>[7]</sup>.由此可见,亟需开展石化固废填埋场对周边环境的影响研究,旨在为场地环境污染管理提供重要支撑.

微生物以群落的形式存在于土壤环境中,对土壤环境品质变化十分敏感,常被用作土壤生态系统和土壤健康状况变化的早期预警指标<sup>[8]</sup>.其中,土壤微生物量、群落结构和多样性被证实可用于衡量土壤污染程度.已有研究证实PAHs、苯系物等污染胁迫可显著改变土壤微生物量、微生物群落组成,降低土壤微生物生态体系的稳定性<sup>[9-10]</sup>.随着研究的发展,土壤微生物功能也被证实与土壤污染间存在显著的响应关系,可作为土壤生态毒理学诊断的重要指标.例如,研究表明PAHs胁迫能够抑制土壤微生物硝化/反硝化作用,诱导编码PAHs降解酶功能基因的高度富集<sup>[11]</sup>.目前已有研究关注土壤污染胁迫对微生物群落结构及多样性的影响,但是关于石化固废填埋场土壤微生物群落结构和功能特征及其对周边土壤微生物影响的系统性研究相对较少.

高通量测序技术具有高效、准确、信息量丰富等特点,已被广泛应用于微生物群落结构和功能的研究<sup>[12]</sup>.例如,基于16S rDNA的高通量测序技术常用于解析微生物群落结构组成特征,揭示污染物对于微生物群

<sup>\*</sup> 国家重点研发计划资助项目(2018YFC1800900)

<sup>†</sup> 通信作者:李剑(1980—),博士,副教授.研究方向:环境风险评价. E-mail: lijian@bnu.edu.cn

收稿日期:2021-11-07

落结构及多样性的影响。王继玥等<sup>[13]</sup>采用该技术证实 Pb 污染会显著降低土壤细菌总量,减少群落多样性。近年来发展的宏基因组学技术,通过基因组测序探测环境中微生物群落全基因组,结合生物信息学分析技术,能够最大限度地挖掘生物资源,为全面探索微生物群落功能、揭示微生物与污染胁迫之间的相互作用及机制提供技术支撑,是目前国际上微生物响应与反馈污染胁迫研究的主流方法<sup>[14]</sup>。

本文选择中国北方某石化固废填埋场作为研究对象,分别采集填埋场及其上、下游表层土壤,采用 16S rDNA 高通量测序技术和宏基因组学技术,识别不同采样点微生物群落结构和功能特征,解析固废填埋场对周边土壤微生物的影响,揭示污染胁迫与微生物群落结构、功能变化之间的相关性。研究结果可为评估石化固废填埋场潜在环境风险提供基础数据和理论支持,为填埋场环境管理政策的制定奠定基础。

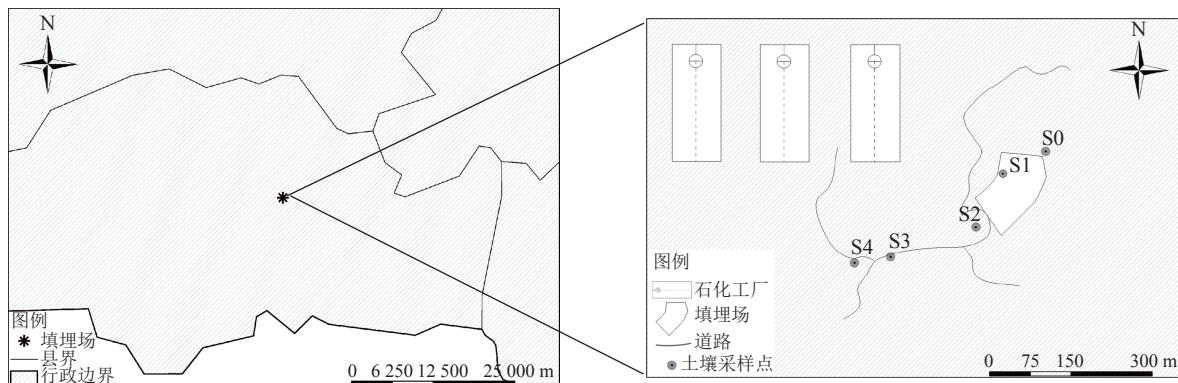


图 1 采样点示意

**1.2 DNA 提取和高通量测序** DNA 提取和高通量测序参考文献[15]报道进行,可简述为:采用 PowerSoil DNA 分离试剂盒(MO BIO, CA, USA)提取土壤样品 DNA;为减少土壤异质性对测试结果的影响,避免单次 DNA 提取的偏差,并避免样品中 DNA 含量较低对测试结果的影响,每个采样点土壤样品多次提取 DNA 混合后开展后续检测。采用 NanoDrop 1000 分光光度计法(Thermo Scientific, DE, USA)、Picogreen 法(Quantus, PA, USA)和琼脂糖凝胶电泳方法<sup>[17]</sup>分别检测 DNA 的纯度、浓度和完整性。通过测试后,提取的基因组 DNA 基于 Illumina HiSeq 6000 平台(Illumina Inc., San Diego, CA, USA)完成宏基因组测序。同时,以提取的基因组 DNA 为模板,扩增 16S rDNA 序列的 V3-V4 区域,经 PCR 扩增后,进行 Illumina HiSeq 高通量测序<sup>[18]</sup>。

**1.3 高通量测序数据分析** 参考实验室已有方法<sup>[15]</sup>对高通量测序数据进行分析,可简述为:利用软件

## 1 材料与方 法

**1.1 研究区概况** 本文选择中国北方某石化固废填埋场作为研究对象,该填埋场面积约 1.5 hm<sup>2</sup>,使用时间超过 40 年,场地地层除厚度较薄的人工堆积层和第四系冲积层外,出露地层为燕山期花岗闪长岩。为预防污染物向下游方向迁移,填埋场下游修建有防渗墙。本研究分别在填埋场(S1)及其上游(S0)、下游(S2~S4)采集表层土壤样品 5 件,如图 1 所示。根据场地调研收集的资料和课题组的前期研究基础,S0 点选作背景点。样品采集参照文献[15]报道方法进行,样品于-80℃冰箱中保存,24 h 内送至上海美吉生物医药科技有限公司(上海,中国)开展 16S rDNA 和宏基因组高通量测序。土壤理化性质包括 pH、总有机碳(TOC)和氧化还原电位(Eh)参考文献[16]报道方法进行检测。

fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0)对原始数据进行质控;软件 MEGAHIT(<https://github.com/voutcn/megahit>, version 1.1.2)对优化序列进行拼接组装;软件 MetaGene(<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/>)开展开放阅读框(ORF)预测;软件 CD-HIT(<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>, version 4.6.1)对预测的基因序列进行聚类,构建非冗余基因集;软件 SOA-Paligner(<http://soap.genomics.org.cn/>, version 2.21)将样品高质量的 reads 与非冗余基因集进行比对(95% identity),计算基因丰度。使用 Diamond(<http://www.diamondsearch.org/index.php>, version 0.8.35)将非冗余基因集与 eggNOG 数据库进行比对,开展直系同源蛋白簇(COG)功能注释<sup>[17]</sup>。

16S rDNA 高通量测序结果通过聚类分析和物种分类学分析相似性大于 97% 的序列定义为一个操作分类单元(OTU)。计算 Alpha 多样性指数表征不同样品的菌群多样性和相对丰度,其中:Shannon 和 Simpson

指数用于评估菌群多样性; ACE 和 Chao1 指数用于评估菌群丰度; Coverage 指数用于表征每个样本文库的覆盖率<sup>[19]</sup>.

**1.4 统计分析** 所有实验均设置3组平行. 基于 SPSS 软件(版本 19.0, SPSS Inc., IL, USA)开展统计分析: Kolmogorov-Smirnov 检验, 以确定变量是否符合正态分布; 单方差分析(ANOVA)评估不同采样点间的差异性; 聚类分析对于不同采样点进行分组; 冗余分析(RDA)评估不同样品微生物结构/功能与环境因子间的相关性<sup>[20]</sup>.

## 2 结果与讨论

**2.1 土壤微生物多样性分析** 微生物多样性分析结果如表 1 所示, 结果表明: 所建立的细菌文库覆盖率均>98%, 表明本文建立的文库能够真实有效地反映土壤环境细菌的多样性. 不同采样点 OTU 数量为 1641~2193, 其中 Shannon 指数最大值出现在 S4 点(6.54), 最小值出现在 S0 点(5.93); Simpson 指数为 0.004~0.019, 最大和最小值分别出现在 S0 和 S2 点; ACE 指数和 Chao1 指数在不同的采样点表现出类似

表 1 Alpha 多样性指数统计 (N=3)

采样点	OTU	指数				
		Shannon	Simpson	ACE	Chao 1	Coverage
S0	1641	5.93	0.019	1809.66	1806.73	0.990
S1	1769	6.00	0.008	2030.04	2015.50	0.987
S2	1812	6.36	0.004	2072.30	2064.91	0.987
S3	2193	6.45	0.009	2497.42	2476.78	0.984
S4	2185	6.54	0.008	2421.65	2387.37	0.984

的分布, 其最大、最小值分别出现在 S3 和 S0 点. 如图 1 所示: S0 点为采自填埋场上游的背景点, 微生物多样性的分析结果证实, 该点土壤样品中细菌的总量和群落多样性, 如 Shannon 指数、ACE 指数和 Chao1 指数, 均较小; S1 点为填埋场采样点、S2~S4 点为填埋场下游采样点, 其多样性测试结果与 S0 相比明显增加, 说明污染胁迫不是细菌多样性的重要影响因素. 张建等<sup>[21]</sup>在鄱阳湖开展了重金属污染对微生物多样性的影响研究, 也报道了类似结果, 重金属污染严重的采样点检测到较为丰富的微生物多样性; 王宝山等<sup>[22]</sup>也证实机油污染土壤的细菌多样性高于未污染土壤, 揭示微生物多样性不仅仅受到单一因子(如污染胁迫)影响, 而是多重因子共同作用的结果. 由此可见, 污染物对于土壤微生物的影响, 并非简单地增加或减少多样性, 需要从更多的角度, 例如微生物群落结构和功能, 开展深入分析.

**2.2 土壤微生物群落结构组成及差异分析** 根据 16S rDNA 高通量测序结果, 在属水平上共检测出 707 类细菌菌属, 其中有 15 类菌属的占比超过 1%. 不同采样点菌属分布结构存在差异, 如图 2 所示: S0 点的优势菌属为 *Solirubrobacter*, 相对丰度达 23.68%, 其次为 *Nocardioideis*(12.06%)、*Pseudonocardia*(12.03%) 和 *Microvirga*(10.22%). S1 点相对丰度最大的菌属为 *Mycobacterium*(20.38%), 其次为 *Sphingomonas*、*Arthrobacter* 和 *Bradyrhizobium*, 占比分别为 15.56%、15.17% 和 12.45%. S0 和 S1 点微生物群落结构在属水平上表现出较大的差异性, 与 S0 相比, S1 点 *Solirubrobacter* 相对丰度明显降低, 而 *Mycobacterium*、*Sphingomonas*、*Arthrobacter* 和 *Bradyrhizobium* 相对丰度增加, 进一步

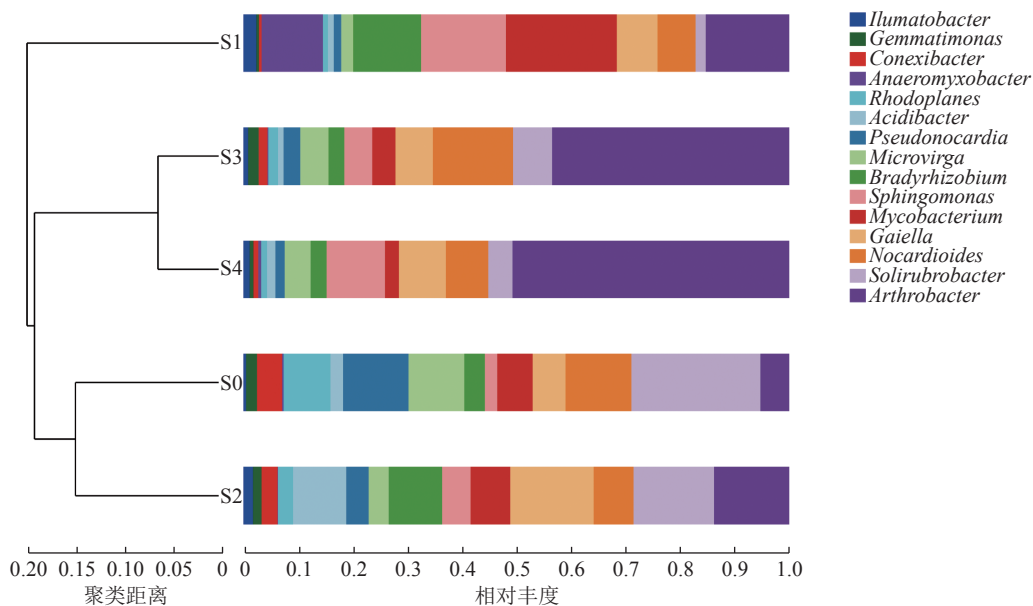


图 2 不同采样点土壤微生物属水平群落结构特征分析 (N=3)

证实了石化填埋场对于土壤微生物群落结构的影响。一般认为 *Solirubrobacter* 菌属对于污染胁迫较为敏感, Li 等<sup>[23]</sup> 的研究也证实 PAHs 能够显著抑制 *Solirubrobacter* 菌属微生物生长, 导致其相对丰度降低, 因此 S1 点该菌属丰度的降低可能与污染胁迫增加相关。与之相反的是, *Mycobacterium*、*Sphingomonas*、*Arthrobacter* 和 *Bradyrhizobium* 在 S1 点的相对丰度显著增加, 这可能与菌属中包含大量石化污染降解活性功能菌相关。已有相关文献证实: 来自 *Mycobacterium* 和 *Bradyrhizobium* 的功能菌包含 PAHs 和 BTEX 降解关键基因, 具有 PAHs 和 BTEX 的降解活性, 能够利用 PAHs 和 BTEX 作为碳源促进生长<sup>[24-25]</sup>; 除此之外, *Sphingomonas* 和 *Arthrobacter* 菌属中也筛选到降解活性功能菌, 并用于土壤 PAHs 污染修复<sup>[26-27]</sup>。由此可见, 上述菌属丰度的升高可能是由于其对于污染胁迫具有较好的适应性所致。

对于填埋场下游的采样点 S2, 其优势菌属与 S0 点类似; 聚类分析也进一步证实 S2~S4 点与 S0 点的菌属组成具有相似性, 而显著区别于 S1。虽然 S3 和 S4 的菌属组成与 S0 和 S2 亦存在一定差异, 这可能是由于环境因子、土壤理化性质 (pH、TOC、Eh)、植被等影响因素共同作用的结果<sup>[28]</sup>, 但是 S2~S4 菌属组成与 S1 点的明显差异, 还是能够初步推断填埋场对下游土壤微生物群落组成的影响有限, 推测构筑的防渗墙能够有效地阻挡污染扩散。课题组前期已开展土壤 PAHs 浓度的检测, 测试结果表明与 S1 相比 S2~S4 点土壤中 PAHs 浓度显著降低, 进一步证实了防渗设施的有效性。Dajić 等<sup>[29]</sup> 也报道了类似的结果, 认为由防渗材料构筑的人工屏障能够有效防止石化固废填埋场的污染扩散, 防范周边土壤和地下水污染。除此之外, 填埋场的地质条件也不利于污染物的迁移, 如前文所述, 该场地除厚度较薄的人工堆积层和第四系冲积层外, 主要为花岗闪长岩层, 花岗岩渗透系数较小, 防污性能较好, 有助于降低填埋场周边土壤和地下水污染的风险<sup>[30]</sup>。

**2.3 土壤微生物基因功能注释及差异分析** 根据宏基因组测序结果, 基于 COG 数据库对于微生物的功能进行注释, 结果如图 3 所示。COG 高度富集的 10 种功能依次为 E (氨基酸运输和代谢)、C (能量产生和转换)、G (碳水化合物运输和代谢)、L (复制、重组和修复)、P (无机离子运输和代谢)、M (细胞壁/膜/包膜生物发生)、I (脂质转运与代谢)、Q (次生代谢产物生物合成、运输和分解代谢)、H (辅酶的运输和代谢) 和 F (核苷酸的运输和代谢)。其中: 相对丰度最高的为 E, 占比达 17.09%~19.66%; 其次依次为 C (14.10%~

15.88%)、G (10.20%~12.52%)、L (9.49%~12.90%)、P (10.04%~11.04%)、M (8.24%~10.76%)、I (7.40%~8.15%)、Q (5.35%~6.44%)、H (5.12%~5.56%) 和 F (4.03%~4.39%)。不同采样点间微生物功能差异较大, 聚类分析的结果表明 5 个采样点主要聚为 2 类, 其中 S0 以及 S2~S4 聚为 1 类, S1 单独成为 1 类。因此, 进一步比较 S0 和 S1 样品间微生物功能的差异, 结果如图 4: 样品间在主要的功能 E、C、L、P、I、Q 和 F 都表现出显著的差异性 ( $P < 0.01$ ); 除功能 E 和 Q, 其余功能在 S1 点的丰度均显著高于 S0。相关文献报道证实, COG 注释中占比最大的一些功能, 例如 E、C、G 以及 L, 不仅有助于维持微生物进行正常的生理活动, 也可帮助其适应外源环境胁迫<sup>[31]</sup>。Li 等<sup>[15]</sup> 在典型的石油烃污染场地土壤中也注释到了类似的功能。特别是 C、G、L 以及 Q 等功能的激活, 被认为是微生物为了适应来自污染的压力采取的重要防御策略<sup>[32]</sup>。例如, Xu 等<sup>[31]</sup> 的研究就表明, 充足的能量不仅是正常微生物生长和繁殖的关键, 更是石油烃类污染在微生物体内运输和代谢的关键。

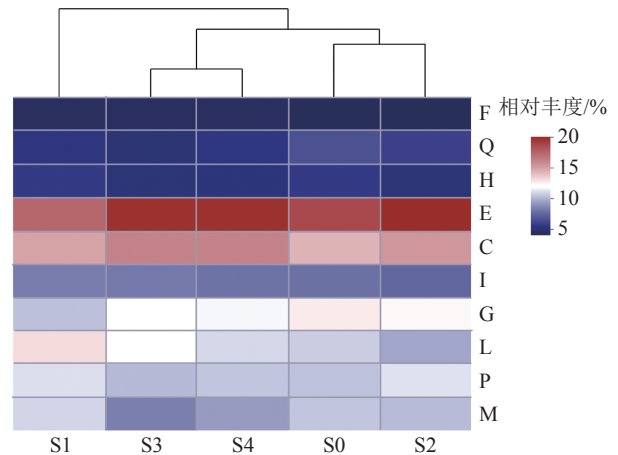
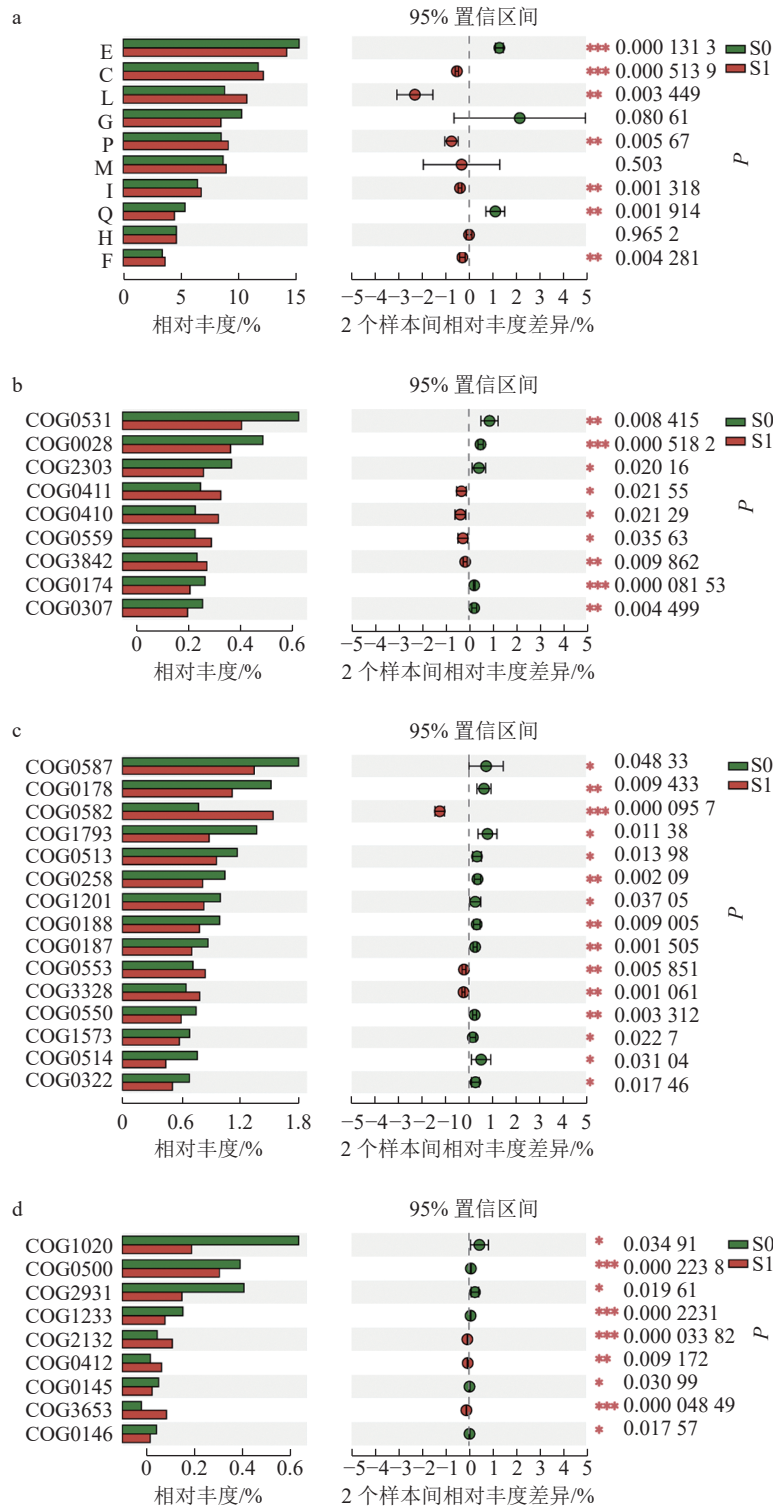


图 3 不同采样点的微生物 COG 功能热图分析 (N=3)

考虑到氨基酸运输和代谢是土壤 S0 和 S1 间差异最为显著的功能类型, 其他功能如 L 以及 Q 也常被报道参与微生物的污染胁迫响应<sup>[33-34]</sup>, 因此对上述 3 类功能开展进一步的解析。如图 4-b~d, 与 S0 相比, S1 注释到显著上调的 ABC 转运蛋白基因 (COG0411、COG0410、COG0559、COG3842)、整合酶基因 (COG0582)、解旋酶基因 (COG0553)、转位酶基因 (COG3328)、多铜氧化酶基因 (COG2132)、二内酯水解酶基因 (COG0412) 和脱酰酶基因 (COG3653) ( $P < 0.05$ ) 等; 显著抑制的谷氨酰胺合成酶基因 (COG0174)、乳酸合成酶基因 (COG0028)、甲基转移酶基因 (COG0500) 和茄红素基因 (COG1233) ( $P < 0.001$ )。ABC 转运蛋白是一类跨膜蛋白, 其主要功能是利用 ATP 水解产生的能



a COG 注释到的 S0 与 S1 功能差异; b S0 与 S1 在 E 功能下的差异; c S0 与 S1 在 L 功能下的差异; d S0 与 S1 在 Q 功能下的差异. COG0531. 氨基酸; COG0028. 乳酸合成酶; COG2303. 氧化还原酶; COG0411. ABC 转运蛋白的 LivG 系统; COG0410. ABC 转运蛋白的 LivF 系统; COG0559. ABC 转运蛋白的通透酶成分; COG3842. ABC 转运蛋白的 Fe<sup>3+</sup>/亚精胺/腐胺转运系统; COG0174. 谷氨酰胺合成酶; COG0308. 氨基肽酶; COG1020. 非核糖体肽合成酶; COG0500. 甲基转移酶; COG2931. 溶血素型钙结合酶; COG1233. 茄红素; COG2132. 多铜氧化酶; COG0412. 二烯内酯水解酶; COG0145& COG0146. 羟脯氨酸酶; COG3653. 脱酰酶; COG0587. DNA 聚合酶 III 亚基; COG0178. UvrABC 修复系统催化 DNA 损伤的识别和处理; COG0582. 整合酶; COG1793. DNA 连接酶; COG0513. 嘌呤解旋酶; COG0258. 特异性结构核酸酶; COG1201. 嘌呤解旋酶; COG0187& COG0188. DNA 旋回酶; COG0553. 解旋酶; COG3328. 转位酶; COG0550. DNA 扭转过程的张力释放; COG1573. 尿嘧啶 DNA 糖基酶; COG0514. 依赖 ATP 的 DNA 解旋 rep 基因; COG0322. UvrABC 修复系统催化 DNA 损伤的识别和处理. \*0.05 < P < 0.1, \*\*0.001 < P < 0.05, \*\*\*P < 0.001.

图 4 采样点 S0 与 S1 微生物功能差异分析

量将底物进行逆浓度梯度运输<sup>[35]</sup>,是细菌对于污染物外排与消减的重要通道<sup>[36]</sup>. Li 等<sup>[15]</sup>在典型的石油烃污染场地土壤中也发现了 ABC 转运蛋白基因的富集,支持本文结论. Aubé 等<sup>[36]</sup>的研究进一步证实,ABC 转运蛋白的激活有助于微生物应对烃类化合物污染. 整合酶、解旋酶和转位酶是参与 L 功能的主要酶类,已有研究支持 PAHs, 例如菲,其微生物降解与整合酶和转位酶的激活有关<sup>[37]</sup>. 解旋酶是一类参与核苷酸切除修复和转录偶联修复的关键酶,其与生物体的 DNA 修复密切相关,有关研究已经证实,PAHs 对解旋酶的诱导可显著影响其 DNA 损伤甚至是致癌风险的水平<sup>[38]</sup>. 多铜氧化酶、二内酯水解酶和脱酰酶是 Q 过程中的关键酶,其中,多铜氧化酶和二内酯水解酶已被证实广泛参与工业污染物的降解<sup>[39]</sup>,例如二氯苯就能够显著诱导二内酯水解酶活性<sup>[40]</sup>. 除此之外,

一些基因,例如谷氨酰胺合成酶基因、乳酸合成酶基因、甲基转移酶基因和茄红素基因的表达在 S1 点被显著抑制,已有文献证实这些基因的转录调节受到环境污染物,例如 Cr<sup>[41]</sup>、除草剂<sup>[42]</sup>、有机氯农药<sup>[43]</sup>等的影响,甚至与上述污染物的毒性效应密切相关. 由此可见,S1 点对于上述功能基因的诱导或抑制,均与微生物应对污染胁迫的生物学过程相关,例如污染胁迫下的降解反应或毒性响应.

**2.4 土壤微生物群落结构、功能与环境因子的相关性** 建立微生物群落结构、功能与土壤理化性质 (pH、TOC、Eh) 以及总 PAHs 含量之间的相关性,结果如图 5、6 所示. RDA 结果证实,土壤 pH、TOC、Eh,特别是总 PAHs 含量是微生物群落结构和功能的重要影响因素. 进一步开展热图分析,证实 pH、TOC、Eh 与微生物群落结构和功能的相关性不强,仅

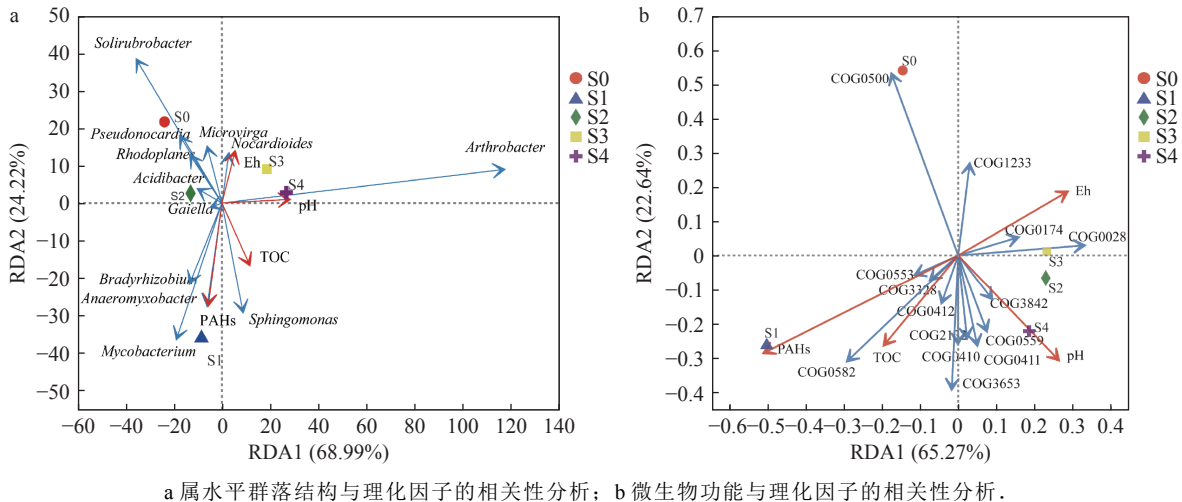


图 5 RDA 构建土壤微生物群落结构和功能与理化因子的相关性

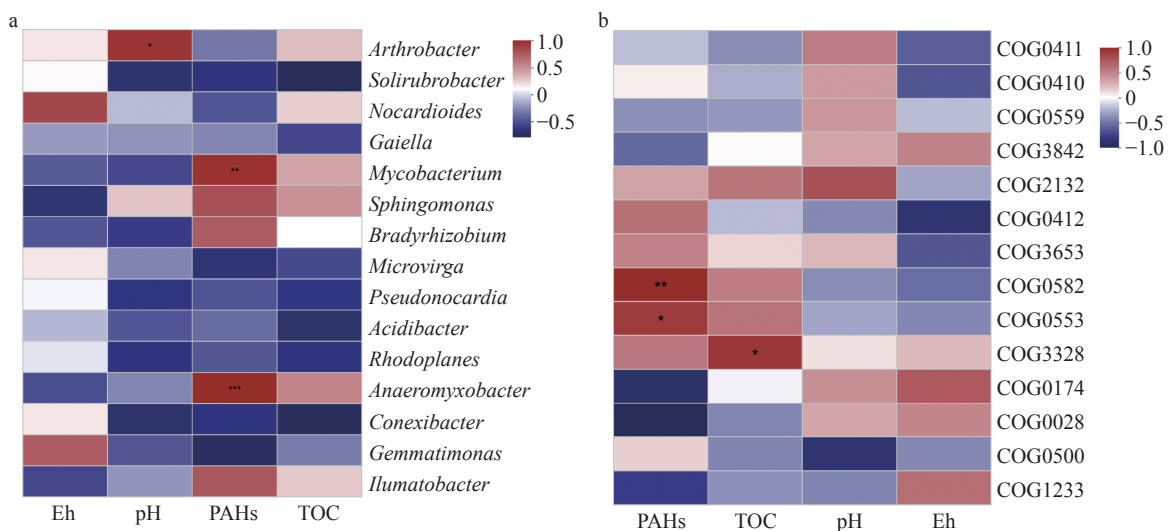


图 6 Heatmap 分析构建土壤微生物群落结构和功能与理化因子的相关性

pH 与 *Arthrobacter* 菌属 ( $P < 0.05$ ), TOC 与转位酶基因 ( $P < 0.05$ ) 间存在正相关。但是 PAHs 含量是微生物群落结构和功能的重要影响因素, 其与 *Mycobacterium* ( $P < 0.01$ ) 和 *Anaeromyxobacter* ( $P < 0.001$ ) 菌属丰度呈现出显著的正相关关系; 同时, 整合酶 ( $P < 0.01$ ) 和解旋酶 ( $P < 0.05$ ) 基因均表现出与 PAHs 浓度之间显著的正相关关系。

正如前文所述, 环境胁迫因子是影响微生物群落结构和功能的重要因素, 经过相关性分析, 进一步佐证了污染场地 PAHs 可能是导致微生物群落结构和功能改变的重要驱动因素。相关文献报道也支持本文的研究结果, 已在不同类型的污染场地建立了 PAHs 驱动和微生物群落结构、功能变化之间的相关性<sup>[44-45]</sup>。特别是一些菌属(如 *Mycobacterium* 和 *Anaeromyxobacter*) 以及功能基因(如整合酶和解旋酶)与 PAHs 浓度之间表现出明显的相关性, 指示上述指标对于 PAHs 污染胁迫较为敏感, 可能作为土壤生态系统和土壤健康状况变化的早期预警指标。后续可进一步加强研究, 筛选出灵敏度高、特异性好的早期预警指标。

### 3 结论

本文采用 16S rDNA 和宏基因组高通量测序技术, 开展了中国北方某石化固废填埋场污染对土壤微生物群落结构和功能的影响研究。主要结果如下:

1) 中国北方某石化固废填埋场土壤微生物群落结构组成明显异于背景点, 其敏感物种丰度降低, 具有降解活性的功能微生物丰度增加。填埋场构筑的防渗墙以及低渗透性介质条件能够有效地降低其对于周边土壤微生物群落结构的影响。

2) 填埋场土壤微生物群落注释到的生物学功能, 不仅有助于维持微生物进行正常的生理活动, 而且可帮助其适应外源污染胁迫; 与背景点相比, 填埋场土壤差异表达的基因功能, 与微生物对于污染胁迫的降解反应及毒性响应等生物学过程相关。

3) RDA 及热图分析证实, 填埋场土壤 PAHs 污染胁迫是导致微生物群落结构和功能改变的重要驱动因素。

综上所述, 本文初步证实了填埋场污染, 特别是 PAHs 胁迫, 对于土壤微生物群落结构和功能的影响, 同时证实防渗墙以及低渗透性介质条件能够有效降低污染影响; 研究成果有助于指导填埋场环境管理, 为场地潜在环境风险的识别与管控提供数据与理论支持。

### 4 参考文献

- [1] 李金惠, 段立哲, 郑莉霞, 等. 固体废物管理国际经验对我国的启示[J]. 环境保护, 2017, 45(16): 69
- [2] KARTHIKEYAN L, SURESH V, KRISHNAN V, et al. The management of hazardous solid waste in India: an overview[J]. *Environments*, 2018, 5(9): 103
- [3] DUNKLE M N, PIJCKE P, WINNIFORD W L, et al. Method development and evaluation of pyrolysis oils from mixed waste plastic by GC-VUV[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1637: 461837
- [4] KAPILAN S, ELANGO VAN K. Potential landfill site selection for solid waste disposal using GIS and multi-criteria decision analysis (MCDA) [J]. *Journal of Central South University*, 2018, 25(3): 570
- [5] 王积才. 辽宁省建设用地土壤污染风险筛选值制定研究[D]. 北京: 中国环境科学研究院, 2019
- [6] 杨凯, 卫丽, 卢毅, 等. 黄土高原地区某简易固废填埋场铜、镉元素在土壤中的迁移研究[J]. *环境科学与管理*, 2015, 40(7): 65
- [7] 庞雅婕. 多环芳烃在垃圾填埋场孔隙介质中迁移规律的研究[D]. 北京: 中国地质科学院, 2013
- [8] 张粉果, 张全国. 土壤细菌和真菌群落的物种续存模式对抗扰动的响应[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 53(5): 548
- [9] AHMAD M, YANG Q S, ZHANG Y Y, et al. The distinct response of phenanthrene enriched bacterial consortia to different PAHs and their degradation potential: a mangrove sediment microcosm study[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 380: 120863
- [10] 豆俊峰, 丁爱中, 孙寓姣. BTEX 污染物的厌氧降解机制及微生物特性分析[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 45(增刊1): 547
- [11] LINDGREN J F, HASSELLÖV I M, DAHLLÖF I. PAH effects on meio- and microbial benthic communities strongly depend on bioavailability[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 146: 230
- [12] 刘开朗, 王加启, 卜登攀, 等. 环境微生物群落结构与功能多样性研究方法[J]. *生态学报*, 2010, 30(4): 1074
- [13] 王继玥, 刘燕, 刘勇, 等. 基于高通量测序检测 Pb 污染对三叶草根际土壤细菌多样性的影响[J]. *环境科学研究*, 2018, 31(1): 102
- [14] 李慧, 何晶晶, 张颖, 等. 宏基因组技术在开发未培养环境微生物基因资源中的应用[J]. *生态学报*, 2008, 28(4): 1762
- [15] LI J, XU Y, SONG Q W, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and n-alkane pollution characteristics and structural and functional perturbations to the microbial community: a case-study of historically petroleum-

- contaminated soil[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2021, 28(9): 10589
- [16] WANG Z C, LIU S S, HUANG C, et al. Impact of land use change on profile distributions of organic carbon fractions in peat and mineral soils in Northeast China[J]. CATENA, 2017, 152: 1
- [17] LOU J L, LIU M, GU J L, et al. Metagenomic sequencing reveals microbial gene catalogue of phosphinothricin-utilized soils in South China[J]. Gene, 2019, 711: 143942
- [18] 李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 134
- [19] 刘驰, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 16S rRNA基因在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2769
- [20] 苏为华. 多指标综合评价理论与方法问题研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2000
- [21] 张建, 黄小兰, 张婷, 等. 鄱阳湖河湖交错带重金属污染对微生物群落与多样性的影响[J]. 湖泊科学, 2018, 30(3): 640
- [22] 王宝山, 温成成, 孙秦川, 等. 石油烃类污染对青藏高原北麓河地区冻区土壤微生物多样性的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12(10): 2917
- [23] LI X N, QU C S, BIAN Y R, et al. New insights into the responses of soil microorganisms to polycyclic aromatic hydrocarbon stress by combining enzyme activity and sequencing analysis with metabolomics[J]. Environmental Pollution, 2019, 255: 113312
- [24] CAVALCA L, DELL'AMICO E, ANDREONI V. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(4): 576
- [25] HAN X M, LIU Y R, ZHENG Y M, et al. Response of bacterial pdo1, nah, and C12O genes to aged soil PAH pollution in a coke factory area[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2014, 21(16): 9754
- [26] HAMANN C, HEGEMANN J, HILDEBRANDT A. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 173(1): 255
- [27] THOMAS J C, CABLE E, DABKOWSKI R T, et al. Native Michigan plants stimulate soil microbial species changes and pah remediation at a legacy steel mill[J]. International Journal of Phytoremediation, 2013, 15(1): 5
- [28] 郑运. 附城红树林生态恢复对土壤主要理化性质与细菌群落结构的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014
- [29] DAJIĆ A, MIHAJLOVIĆ M, JOVANOVIĆ M, et al. Landfill design: need for improvement of water and soil protection requirements in EU Landfill Directive[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2016, 18(3): 753
- [30] MET İ, AKGÜN H. Geotechnical evaluation of Ankara clay as a compacted clay liner[J]. Environmental Earth Sciences, 2015, 74(4): 2991
- [31] XU J, ZHANG L, HOU J, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the global response to 17 $\beta$ -estradiol in estrogen-degradation strain *Pseudomonas putida* SJTE-1[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41682
- [32] WANG H Q, YANG Y, XU J, et al. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Rhodococcus* sp. BAP-1 induced by fluoranthene[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 169: 282
- [33] YAN C C, WANG F, LIU H J, et al. Deciphering the toxic effects of metals in gold mining area: microbial community tolerance mechanism and change of antibiotic resistance genes[J]. Environmental Research, 2020, 189: 109869
- [34] FENG G, XIE T, WANG X, et al. Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 11
- [35] 刘艳青, 赵永芳. ABC转运蛋白结构与转运机制的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(3): 223
- [36] AUBÉ J, SENIN P, BONIN P, et al. Meta-omics provides insights into the impact of hydrocarbon contamination on microbial mat functioning[J]. Microbial Ecology, 2020, 80(2): 286
- [37] SHETTY A R, DE GANNES V, OBI C C, et al. Complete genome sequence of the phenanthrene-degrading soil bacterium *Delftia acidovorans* Cs1-4[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10: 55
- [38] SAMSON M, SINGH S S, RAMA R, et al. XPD Lys751Gln increases the risk of breast cancer[J]. Oncology Letters, 2011, 2(1): 155
- [39] CHANDRA R, CHOWDHARY P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes[J]. Environmental Science Processes & Impacts, 2015, 17(2): 326
- [40] SOMMER C, GÖRISCH H. Enzymology of the degradation of (di)chlorobenzenes by *xanthobacter flavus* 14p1[J]. Archives of Microbiology, 1997, 167(6): 384
- [41] RODRIGUEZ E, AZEVEDO R, REMÉDIOS C, et al. Exposure to Cr(VI) induces organ dependent MSI in two loci related with photophosphorylation and with glutamine metabolism[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(5): 534
- [42] MA J Y, XU L G, WANG S F, et al. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 51(2): 128
- [43] PARK S Y, KIM K S, LEE Y M, et al. Persistent organic

- pollutants and promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene[J]. *Biomarkers*, 2015, 20(2): 136
- [44] STINGLEY R L, KHAN A A, CERNIGLIA C E. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322(1): 133
- [45] YUAN K, CHEN B W, QING Q, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enrich their degrading genera and genes in human-impacted aquatic environments[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 230: 936

## Influence of pollutants on soil microbial community structure and function at a petrochemical landfill site: a high-throughput sequencing study

YU Shihang LIU Jiayou LI Zhanjie WANG Jinsheng ZUO Rui LI Jian

(Engineering Research Center of Groundwater Pollution Control and Remediation, Ministry of Education, College of Water Sciences, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

**Abstract** The petrochemical industry produces a large amount of solid wastes, including toxic and harmful pollutants. Landfill disposal of such wastes may cause potential harm to surrounding environment. Thus, it is urgent to study environmental influence of pollutants at petrochemical landfill site. In this work, 16S rDNA and metagenomics were examined to study soil microbial community structure and functions at a typical landfill site in northern China. Soil microbial community structure was found shifted when compared with a normal background site. At the genus level, abundance of *Solirubrobacter* was found decreased, abundance of *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter* and *Bradyrhizobium* increased. Functions of soil microbial community at this landfill site showed marked differences from a control background site. High-abundance biological functions, as annotated by Cluster of Orthologous Groups of proteins (COG), were found involved in both maintaining normal physiological activities of microorganisms and adapting to exogenous pollution stress. Compared with the background site, differentially expressed genes at landfill site were found, mainly related to microbial degradation and toxicity response to pollution stress. Constructed impermeable system and low permeability medium conditions could effectively lessen impacts of landfill on microbial community structure and functions in the surrounding soil. Correlation analysis confirmed that pollution stresses, especially polycyclic aromatic hydrocarbons pollution stress, were an important factor causing alterations in soil microbial community structure and function.

**Keywords** petrochemical landfill; pollution stress; microbial community structure; microbial function; high-throughput sequencing

【责任编辑:武佳】