

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2019.0318

黄耀民, 王亚楠, 孙英杰, 等. 2019. 短期填埋龄垃圾堆体内微生物群落结构与种群分布特征[J]. 环境科学学报, 39(12): 4122-4131

Huang Y M, Wang Y N, Sun Y J, et al. 2019. Microbial community structure and population distribution characteristics in short-term landfill refuse [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 39(12): 4122-4131

短期填埋龄垃圾堆体内微生物群落结构与种群分布特征

黄耀民¹, 王亚楠^{1,*}, 孙英杰¹, 开颜¹, 陈璐²

1. 青岛理工大学 环境与市政工程学院 青岛市固体废物污染控制与资源化工程研究中心, 青岛 266033

2. 青岛市环境保护局, 青岛 266003

摘要: 填埋垃圾的稳定化过程一般经历好氧过渡、水解酸化、初期产甲烷及稳定产甲烷阶段, 固相垃圾的厌氧水解酸化阶段常被视为垃圾降解的限速步骤, 而这一阶段微生物的降解作用是影响垃圾稳定化进程的关键。以青岛市小涧西生活垃圾填埋场短期填埋龄垃圾为研究对象, 采用 MiSeq 高通量测序研究了填埋龄 0~1、1.0~1.5、1.5~2 a 垃圾堆体内微生物的群落结构多样性及种群分布特征。结果表明, 0~1 a 填埋龄垃圾微生物多样性高于 1.0~1.5 a 和 1.5~2 a 垃圾堆体, 且微生物多样性整体上随填埋深度呈降低趋势。参与垃圾降解细菌多样性比真菌更丰富, 而真菌多样性随填埋区域、填埋龄的不同呈现更显著的差异。参与短期填埋龄垃圾降解的细菌中, Firmicutes 在填埋层上层为优势菌门, 最大比例达到 65%, Proteobacteria 在填埋层中下层为优势菌门, 最大比例达到 88%。填埋上层细菌菌属以 *Deftuviitoga*、*Aerococcus*、*Clostridium* III 和 *Proteiniphilum* 为主, 而在中下层以 *Thiopseudomonas*、*Sporosarcina* 和 *Eionea* 为主。真菌主要包括 3 个菌门, Ascomycota 在各点位均为最优势菌门, 属水平上 *Kernia* 及 *Aspergillus* 作为常见的腐生菌属, 在不同点位均有较高的丰度。冗余分析表明短期填埋龄垃圾堆体内微生物不同时空分布存在显著差异性, 且细菌群落结构的变化受 pH 值影响较大, 而真菌群落结构的变化与垃圾有机质密切相关。

关键词: 短期填埋龄; 微生物多样性; 群落结构; 种群分布

文章编号: 0253-2468(2019)12-4122-10

中图分类号: X705

文献标识码: A

Microbial community structure and population distribution characteristics in short-term landfill refuse

HUANG Yaomin¹, WANG Yanan^{1,*}, SUN Yingjie¹, KAI Yan¹, CHEN Lu²

1. School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao Solid Waste Pollution Control and Resource Engineering Research Center, Qingdao 266033

2. Qingdao Environmental Protection Bureau, Qingdao 266003

Abstract: The stabilization process of landfill waste generally went through aerobic transition, anaerobic acidification, initial methanogenesis and stable methanogenesis processes. The hydrolysis-acidification phase of solid waste was usually regarded as a rate-limiting step during the whole anaerobic degradation process, and the microbiological degradation in this period was the key to the stabilization of refuse. Based on the short-term landfill refuse with landfill age of 0~1 year, 1.0~1.5 year and 1.5~2 year from Qingdao Xiaojianxi Landfill, their microbial diversity and community structure distribution characteristics of the landfill were investigated by MiSeq high-throughput sequencing. The results show that the microbial diversity of 0~1 year landfill waste was higher than those of 1.0~1.5 and 1.5~2 years landfill waste, and the microbial diversity decreased with the overall landfill depth. The diversity of bacterial involved in refuse degradation was more abundant than that of fungi, while the diversity of fungi showed more significant differences with different landfill areas and landfill ages. Among the bacteria involved in the short-term landfill waste degradation, Firmicutes was the dominant phylum in the upper layer of the landfill, with a maximum proportion of 65%, and Proteobacteria was the dominant phylum in the deep layer of the landfill, with a maximum proportion of 88%. The upper bacteria of the landfill were mainly consisted of *Deftuviitoga*, *Aerococcus*, *Clostridium* III, and *Proteiniphilum*, while in the middle and deep layers, *Thiopseudomonas*, *Sporosarcina* and *Eionea* were the main genus. The fungi mainly consisted of three phyla, and Ascomycota was the most dominant phylum at each point. *Kernia* and *Aspergillus* were the common genus of saprophytic genus, which had high abundances at different points. The redundancy analysis shows that the distribution of microorganisms in short-term landfill refuse presented significant

收稿日期: 2019-06-16

修回日期: 2019-08-04

录用日期: 2019-08-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.51678315); 山东省自然科学基金重大基础研究项目 (No.ZR2018ZC2364); 山东省自然科学基金博士基金 (No.ZR2018BEE037); 中国博士后科学基金二等资助项目 (No.2018M632642)

作者简介: 黄耀民 (1995—), 男, E-mail: 18453290227@163.com; * 责任作者, E-mail: wangyanan1005@yeah.net

differences in the dimensions of time and space. The change of bacterial community structure was greatly affected by the pH of the landfill, and the change of fungal community structure was closely related to the degradation of waste organic matter.

Keywords: short-term landfill age; microbial diversity; community structure; population distribution

1 引言(Introduction)

卫生填埋是我国生活垃圾处理与处置的重要方式之一.2017 年我国生活垃圾无害化处理量达 21034.2×10^4 t, 其中卫生填埋约占 60% (中国统计局, 2018). 填埋场的稳定化是一个漫长复杂的过程, 且垃圾降解过程中产生的渗滤液、恶臭气体、温室气体等二次污染物存在的环境污染风险达几十年, 甚至上百年. 填埋场垃圾稳定化实质上是垃圾中可降解组分在各种微生物作用下, 经过一系列的分解、吸收、转化等生化反应, 逐步达到无害化和稳定化的一个过程(夏向利等, 2016). 因此, 研究填埋过程中微生物的群落结构变化对于解释填埋场微生物过程及稳定化进程具有重要的意义.

目前, 国内外学者对填埋场稳定化过程中渗滤液特性、填埋气组成和产气量、固相垃圾有机组分特征等进行了大量研究, 并根据固相-液相-气相的变化特性, 将其稳定化过程分为初始调整阶段、水解酸化阶段、初始产甲烷阶段及稳定产甲烷阶段(王罗春等, 2000). 填埋场的稳定化实质上是由堆体内各种微生物共同作用的结果, 且随着填埋层内有机物基质的不断变化, 参与有机物降解的功能微生物菌群(如水解酸化菌、产氢产酸菌、产甲烷菌等)在不同稳定化阶段呈现一定的演替变化(杨琦等, 1997).

近年来, PCR-DGGE、克隆文库、宏基因组等生物技术应用用于填埋场微生物菌群结构和功能的研究. 苏月等利用高通量测序技术研究了北京市大屯垃圾转运站渗滤液细菌、真菌和古菌群落结构, 发现细菌群落的多样性最高, 真菌、古菌次之(苏月等, 2018). Liu 等基于 PCR-DGGE 技术研究表明厚壁菌门、变形菌门、放线菌门是填埋场微生物的优势菌门(Liu *et al.*, 2019). Köchling 等利用 454-焦磷酸测序研究不同填埋龄渗滤液中细菌群落结构, 发现厚壁菌门在所有样品中占比最高, 并且其比例随着填埋龄的升高而增加(Köchling *et al.*, 2015). 垃圾降解过程中, 微生物群落结构的变化与垃圾降解程度相互作用, Xu 等利用高通量测序技术对我国北方和西部两个大型填埋场的细菌群落结构和多样性进行了研究, 结果表明填埋垃圾的理化性质与细

菌群落结构密切相关(Xu *et al.*, 2017).

垃圾降解过程中固相组分中复杂的有机物转变为可溶性有机物才能被微生物有效利用, 且有机组分的水解速率影响后续填埋层甲烷化水平. 瞿贤等研究发现, 垃圾中总糖和蛋白质的快速水解发酵是填埋初期渗滤液有机质浓度高的主要来源, 纤维素的水解速率是甲烷化过程的限速步骤(瞿贤等, 2005). 因此, 固相垃圾的水解酸化阶段常被视为垃圾厌氧降解的限速步骤, 但目前针对这一阶段微生物降解作用的研究相对较少. 基于此, 本文以青岛市小涧西垃圾填埋场短期填埋龄垃圾为研究对象, 研究了短期填埋龄垃圾堆体内细菌和真菌的群落结构组成、分布特征及其与填埋稳定化进程的关系, 从而为加速填埋场有机物的降解及其作用机制提供研究基础.

2 材料与方法(Materials and methods)

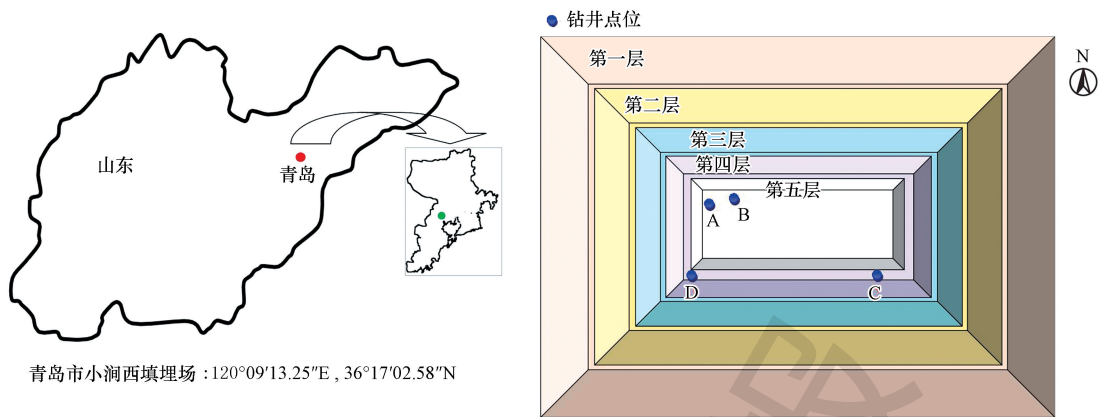
2.1 样品采集

垃圾样品取自青岛市小涧西垃圾填埋场一期工程. 填埋场于 2002 年建成投入使用, 填埋库区占地面积约为 27×10^4 m², 设计标高为 45 m, 设计库容为 710×10^4 m³, 计划使用年限为 21 ~ 27 a. 至 2018 年, 填埋标高增至 55 m, 扩容 24.8×10^4 m³, 目前一期工程已完成封场.

鉴于研究的垃圾样品为水解酸化阶段垃圾, 选取的垃圾为短期填埋龄(0~2 a)垃圾. 填埋场封场前, 钻取第五平台和第四平台垂直深度上的垃圾样品(图 1), 其中, A 和 B 点位位于第五平台, 钻井深度为 15 m, A 点位(0~1 a)采集 5、10、15 m 深度上的垃圾, B 点位(0~1 a)采集 5、15 m 深度上的垃圾; C(1~1.5 a)和 D(1.5~2 a)点位于第四平台, 钻井深度为 15 m, 分别采集 5、10 和 15 m 深度上的垃圾. 将现场采回的湿样送回实验室于 4 °C 保存.

2.2 DNA 提取及测序

采用 Mobio Power Soil® DNA Isolation kit 试剂盒进行垃圾样品 DNA 提取, 提取步骤参照试剂盒说明书进行, 提取的 DNA 样品浓度和纯度采用微量分光光度计进行检测. 提取合格的 DNA 样品委托上海生工生物工程股份有限公司进行测序, 对样品 16S rDNA 基因的 V3 ~ V4 区、ITS rDNA 的 ITS 1-2



青岛市小涧西填埋场: $120^{\circ}09'13.25''E$, $36^{\circ}17'02.58''N$

图1 填埋场地理位置及采样点位

Fig.1 Landfill geographical position and sampling sites

区进行 PCR 扩增,采用 Illumina Miseq 2×250 bp 平台进行测序. V3 ~ V4 区扩增引物为 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Sinclair *et al.*, 2015); ITS1-2 区扩增引物为 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTCTTCATCGATGC-3') (Smith *et al.*, 2014).

2.3 分析方法

样品 pH 采用玻璃电极法 (PHS-3C) 测定,凯氏氮 (KN) 测定采用硫酸汞催化消解法 (KDN-20C 消化炉和 KDN-08C 定氮仪),有机质 (OM) 采用灼烧法 (KSY6D-16 马弗炉) 分析. 填埋垃圾理化性质数据的统计分析采用 SPSS 22.0 软件单因素方差分析、Duncan 法进行多重比较. 采用 Usearch 软件进行操作分类单元 (OTU) 分析,并通过样本聚类树图分析样本间的相似性和差异性. 微生物群落的丰度和多样性通过样本的多样性分析 (α -多样性) 进行表征,包括 ACE/Chao1/Shannon/Simpson/Coverage 等指数. 基于 Bergey's 系统分类方法对 OUT 进行物种分类,并通过 R 语言进行非度量多维尺度分析 (NDMS) 及冗余分析 (RDA), 并采用 SPSS 22.0 进行微生物群落结构与环境因子相关性分析.

3 结果与讨论 (Results and discussion)

3.1 填埋垃圾理化性质

如图 2 所示,短期填埋龄垃圾 pH 各深度变化不显著,中下层垃圾中 A、B、C 点位与 D 点位有显著差异. 不同点位 OM 含量随深度增加呈现显著波

动, A、B 点位随着填埋深度增加, OM 含量逐渐减少, C、D 点位 OM 含量则先增加后减少. 在填埋中上层, A、B、D 点位与 C 点位有显著差异性. 在填埋下层, A、C 点位与 B、D 点位有显著差异性. 不同点位 KN 含量随深度呈现不同规律, A、D 点位随着深度增加, KN 含量逐渐增加, B 点位 KN 含量随深度逐渐减少, C 点位则呈现先增加后减少的趋势. 总体上, A、B 点位在填埋中上层与 C、D 点位有显著差异,而在填埋下层, A、B、D 点位与 C 点位呈现显著差异性,表明即使同一填埋龄的垃圾,由于堆体内部物质分布不均匀可能造成垃圾降解程度的波动,且垃圾的降解程度沿填埋深度呈现较大的差异.

3.2 细菌和真菌群落组成的相似性和差异性

在 97% 相似水平上对不同样本中细菌和真菌进行 OUT 聚类分析. 不同样本间细菌和真菌群落组成的相似性和差异性通过 OUT 样本聚类树图和韦恩图进行表征, 见图 3 和 4.

图 3 表明, A 与 B 点位、C 与 D 点位的微生物群落组成更相近, 表明同一填埋龄垃圾的 OTU 较为相似, 所含微生物种群的相似度较高, 而不同填埋龄的垃圾之间的 OTU 存在一定的差异性, 表明随着垃圾的降解, 微生物群落结构发生了变化.

不同点位细菌和真菌群落组成的相似性及差异性如图 4 所示. A、B、C 和 D 点位的细菌 OUT 数目分别为 4031、2927、2596 和 2767, A 和 B 点位共有 OUT 数目为 1748 (33.55%), C 和 D 点位共有 OUT 数目为 906 (20.33%), A 和 C 点位共有 OUT 数目为 1662 (33.47%), B 和 D 点位共有 OUT 数目为 1103 (24.02%). A、B、C 和 D 点位的真菌 OUT 数目分别

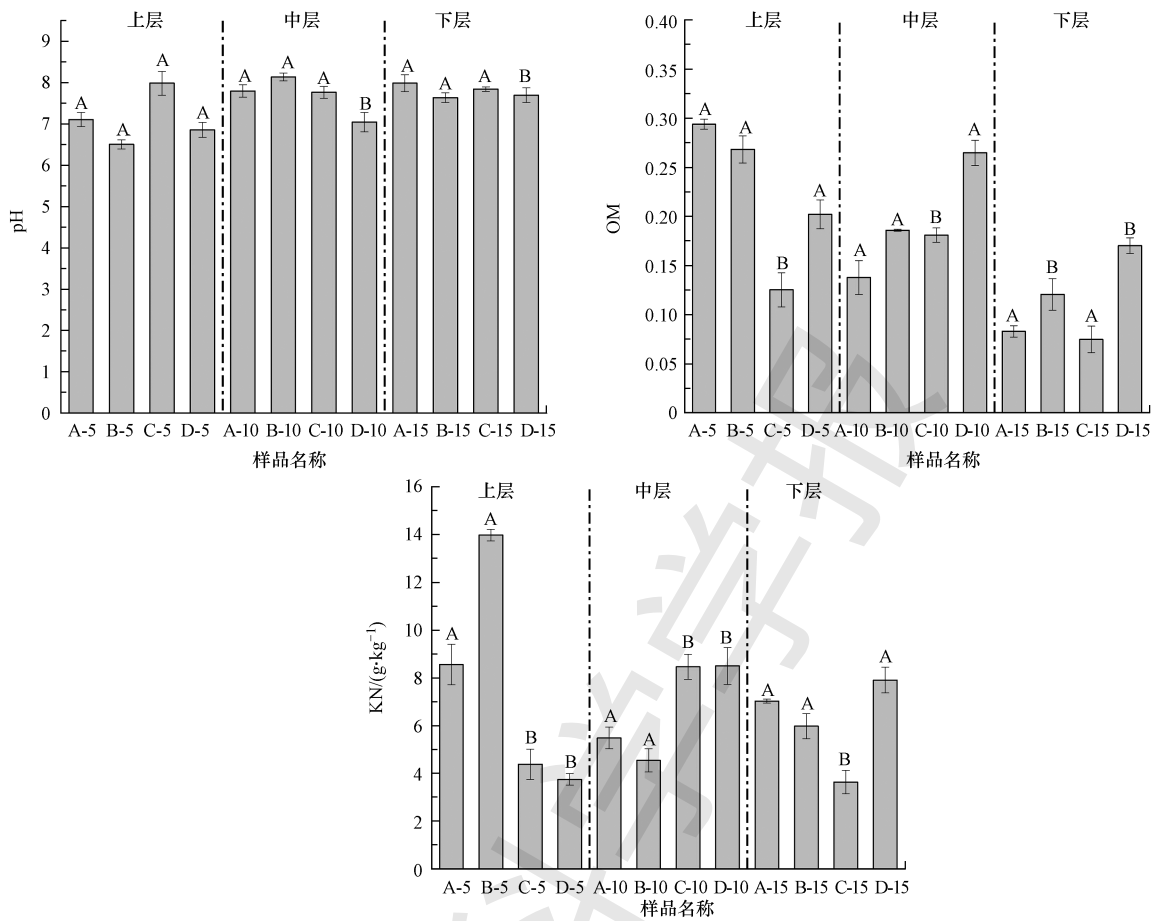


图2 填埋垃圾理化性质

Fig.2 Physicochemical properties of landfill waste

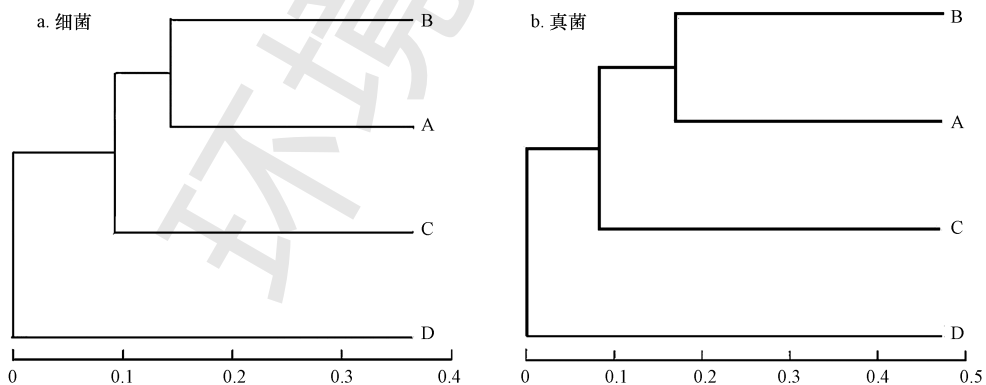


图3 基于 OTU 的样本聚类树图

Fig.3 Hierarchical clustering figure of sample communities

为 1021、1163、971 和 877, A 和 B 点位共有 OUT 数目为 327(17.61%), C 和 D 点位共有 OUT 数目为 70 (3.94%), A 和 C 点位共有 OUT 数目为 219 (12.35%), B 和 D 点位共有 OUT 数目为 213 (11.66%). 总体上, 细菌的 OUT 数目高于真菌, 表明

参与垃圾降解细菌种类更丰富; 而不同点位真菌的共有 OUT 比例低于细菌, 表明真菌多样性随填埋区域、填埋龄的差异呈现更大的差异性. 不同填埋龄垃圾之间存在比例互补的微生物群落, 说明细菌在垃圾降解过程中发生了“此消彼长”的演替特征. 同一

填埋龄但填埋位置不同的垃圾,其微生物群落组成有较大的差异,说明垃圾填埋的异质性造成不同填

埋区微生物群落组成的差异性.

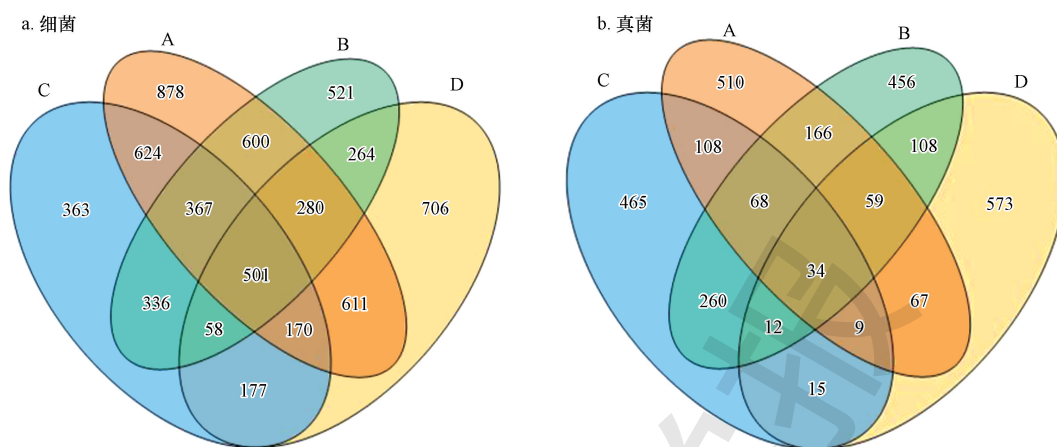


图4 不同垃圾样本 OTU 分布韦恩图

Fig.4 Different garbage samples OTU distribution VENN diagram

3.3 细菌和真菌群落组成的多样性分析

3.3.1 微生物群落 α -多样性分析 α -多样性分析反映了微生物群落的丰富度 (Chao1 和 Ace 指数) 和多样性 (Shannon 和 Simpson 指数), 不同填埋龄垃圾样本的细菌和真菌的 α -多样性见表 1 和表 2.

表 1 细菌 α -多样性指数

Table 1 Bacterial α -diversity index

分组	样品名	Shannon	ACE	Chao1	Simpson	Coverage
A	A-5	4.06	1844.13	1711.84	0.08	0.99
	A-10	2.76	3574.58	2470.27	0.19	0.98
	A-15	2.69	4130.39	2768.63	0.28	0.98
B	B-5	3.43	2940.81	2076.80	0.10	0.98
	B-15	2.73	2818.44	1977.08	0.26	0.98
C	C-5	2.78	3711.43	2536.48	0.34	0.98
	C-10	1.39	3426.57	2446.04	0.71	0.98
	C-15	2.21	3364.87	2165.95	0.52	0.98
D	D-5	4.23	1620.89	1502.5	0.05	0.99
	D-10	3.49	1319.39	1199.49	0.09	0.99
	D-15	2.67	3885.00	2509.46	0.34	0.98

A 点位上细菌的 Chao1 和 ACE 指数随填埋深度的增加而升高, 即其丰富度随深度逐渐升高; Shannon 指数随着填埋深度的增加而降低, Simpson 指数随着填埋深度的增加而升高, 表明细菌群落多样性随深度逐渐降低. B 点位的细菌群落多样性和丰富度随着填埋深度均呈降低的趋势. C 点位的细菌群落多样性随深度呈现先降低后升高的趋势, 丰富度则逐渐降低. D 点位的细菌群落多样性与 A 和

表 2 真菌 α -多样性指数

Table 2 Fungal α -diversity index

分组	样品名	Shannon	ACE	Chao1	Simpson	Coverage
A	A-5	3.64	492	458	0.08	0.998
	A-10	2.89	396	368	0.16	0.998
	A-15	3.53	327	292	0.06	0.999
B	B-5	3.64	395	369	0.05	0.999
	B-15	2.60	769	682	0.25	0.997
C	C-5	3.15	506	498	0.09	0.998
	C-10	2.10	704	672	0.34	0.996
	C-15	1.34	794	744	0.68	0.996
D	D-5	2.93	277	257	0.16	0.999
	D-10	2.74	357	331	0.15	0.999
	D-15	3.70	458	445	0.06	0.999

B 点位呈相似的规律, 但其丰富度却呈现先降低后显著升高的趋势. 总体上, A、B、D 点位的细菌群落多样性高于 C 点位; 且随着深度的增加, 微生物多样性呈降低的趋势.

A 点位上真菌的 Chao1 和 ACE 指数随着填埋深度的增加降低, 即其丰富度随填埋深度的增加而逐渐降低, 多样性随深度呈现先降低后升高的趋势. B 点位上真菌的丰富度随深度逐渐升高; 多样性随深度增加却逐渐降低. C 点位的真菌群落丰富度、多样性变化与 B 点位呈相似的规律. D 点位的真菌群落丰富度随深度逐渐升高, 多样性随深度呈现先降低再升高的趋势. 总体上, A、B、D 点位的真菌群落多样性高于 C 点位, 但丰富度低于 C 点位.

整体上,浅层垃圾中微生物的多样性高于中深层,这可能由于浅层垃圾局部存在好氧区和缺氧区,为好氧、兼性微生物提供了适宜的生长环境,导致浅层微生物多样性高于中层和深层.此外,0~1 a 填埋龄垃圾微生物多样性较高,这与初始填埋过程中堆体内环境的复杂变化有关,既有好氧至厌氧过渡阶段的微生物,也有水解酸化阶段的微生物;而填埋龄 1.5~2 a 垃圾微生物多样性高于 1~1.5 a.

3.3.2 微生物群落 β -多样性分析 微生物群落 β -多样性表征样本间的差异程度,采用非度量多维尺度分析(NMDS)解析不同垃圾样本间的差异性,细菌和真菌的 NMDS 分析见图 5.由图 5a 可知,A 和 D

点位的样本呈现较大的离散度,表明这两个点位不同填埋深度的细菌群落组成存在较大的差异.B 和 C 点位样本相对聚集,表明这两个点位不同深度样本上的细菌群落组成较为相近.由图 5b 可知,C 和 D 点位的样本呈现较大的离散度,表明这两个点位不同填埋深度的真菌群落组成存在较大的差异.A 和 B 点位样本相对聚集,表明它们在各自点位的不同深度上的真菌群落组成较为相近.细菌和真菌的组间差异程度在不同点位上呈现较大的差异;进一步表明了垃圾降解过程中细菌和真菌群落组成的时间和空间分布变异性较大.

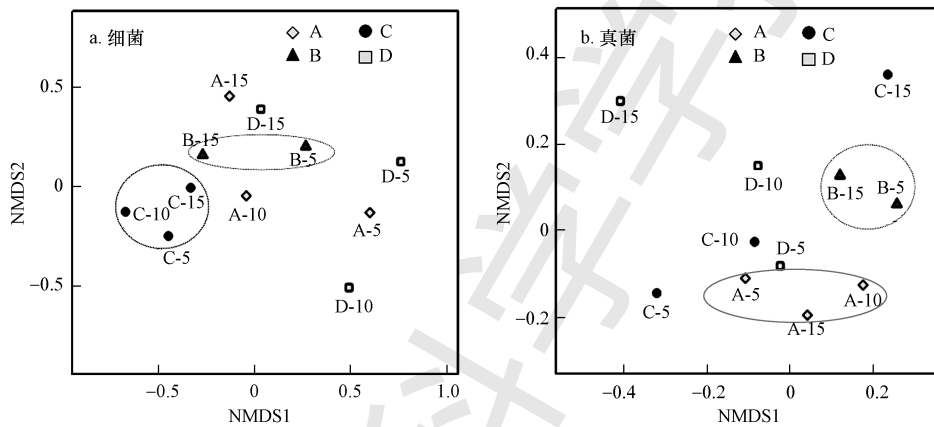


图 5 基于 OTU 的 NMDS 图

Fig.5 OTU-based NMDS map

3.4 微生物物种组成分析

3.4.1 门水平上物种组成 图 6a 反映了不同点位门水平上细菌的物种组成.A 点位中 Firmicutes (厚壁菌门) 和 Proteobacteria (变形菌门) 为优势菌. Firmicutes 随填埋深度呈显著降低的趋势,比例由 63% 降低至 7%,而 Proteobacteria 随深度呈显著升高趋势,比例由 2% 升高至 90%. Thermotogae (热袍菌门) 和 Bacteroidetes (拟杆菌门) 的比例随填埋深度分别由 28% 和 5% 降至 5% 和 0.5%. B 点位中 Firmicutes 和 Proteobacteria 是优势菌门, Firmicutes 的比例随填埋深度由 40% 降至 12%,而 Proteobacteria 的比例则由 56% 升至 87%. C 点位中 Proteobacteria 占有绝对优势,且随填埋深度呈逐渐上升的趋势,比例由 79% 升至 96%,其次是 Firmicutes,占比为 3%~12%, Bacteroidetes (0.1%~3%) 及 Thermotogae (0.5%~4%) 随着填埋深度增加而降低. D 点位中 Firmicutes 和 Thermotogae 在填埋垃圾中上层相对丰度随深度增加而增加,在填埋下

层相对丰度迅速降低,而 Proteobacteria 在深层所占比例最高, Bacteroidetes 相对丰度随深度逐渐降低.总体上,参与短期填埋龄垃圾降解的细菌主要包括 Firmicutes、Proteobacteria、Thermotogae 和 Bacteroidetes. Firmicutes 在填埋层上层占绝对优势,最大比例达到 65%, Proteobacteria 在填埋层中下层占绝对主导,最大比例达到 88%, Thermotogae 和 Bacteroidetes 则主要富集于填埋层上层.此外,不同填埋龄垃圾微生物群落结构呈现显著差异,从图 6a 可以看出, A、B、C 点位门水平上细菌群落结构随填埋深度的演替变化规律相似,其中 A 与 B 点位更为相似, D 点位则显著区别于其他 3 个点位.这与 OUT 的样本聚类树图结果相吻合.

Firmicutes 多为革兰氏阳性菌,包括厌氧的梭菌纲、兼性或专性好氧的芽孢杆菌纲,它们在纤维素降解和发酵产酸方面发挥重要作用 (Burrell *et al.*, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2005). 填埋层上层 Firmicutes 较高的比例可能与其含有兼性或专性好氧芽孢杆

菌纲相关。Proteobacteria 多为革兰氏阴性菌,在兼性或专性厌氧条件下具有较强的分解糖类等有机物的能力。Bacteroidetes 同样具有降解纤维素的能力 (Shipman *et al.*, 2000; Céline *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2012). 吴双等研究了北京市北神树生活垃圾填埋场中细菌群落结构,发现优势菌门主要为 Firmicutes、Proteobacteria (王磊, 2014; 吴双等, 2016). 刘洪杰等在模拟垃圾填埋场稳定化研究中也发现,垃圾中细菌群落主要由 Bacteroidetes、Firmicutes 及 Proteobacteria 三大门类细菌组成。通常,随着垃圾的稳定化进程, Bacteroidetes 所占比例会逐渐升高 (刘洪杰等, 2017), 而研究中 Bacteroidetes 所占比例较低,这与其填埋龄较短密切相关。

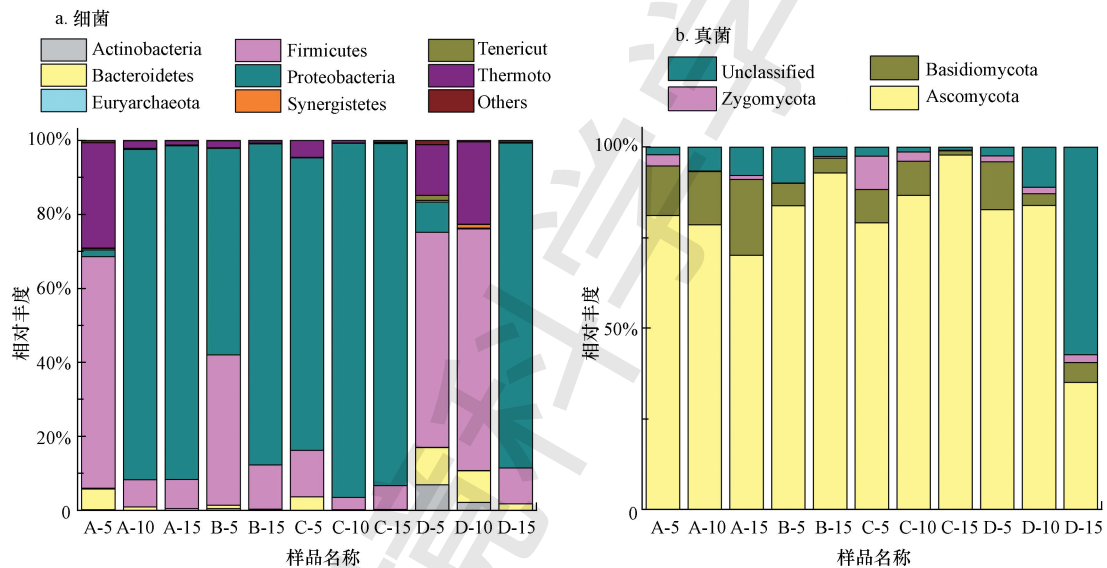


图 6 门水平上细菌(a)和真菌(b)的物种组成

Fig.6 Species composition of bacteria (a) and fungi (b) on phylum level

3.4.2 属水平物种组成 图 7a 反映了不同点位属水平上细菌的物种组成。A 点位中随着填埋深度的增加, *Defluviitoga* 所占比例由填埋层上层的 28.4% 降低至中下层的 1.2%, *Aerococcus* 由 5.3% 降至 0, *Clostridium III* 由 10.3% 降至 0.2%, *Proteiniphilum* 由 3.5% 降至 0.3%; 而 *Thiopsedomonas* 由 0.16% 显著升高至 85%, 同时, *Sporosarcina* (2.6% ~ 14.8%) 和 *Eionea* (0.1% ~ 22.3%) 作为新物种出现在填埋层中下层。填埋层纵向深度上细菌菌属结构的变化,一方面是由于填埋上层垃圾填埋时间相对较短,易受环境因素的影响;另一方面,中下层垃圾的填埋周期相对较长,填埋层内微生物的群落结构变化主要与垃圾自身的降解有关。B 点位上优势菌属有

图 6b 为不同点位门水平上真菌的物种组成。垃圾堆体中存在 3 个真菌菌门, A 点位中优势菌门有子囊菌门 Ascomycota (79% ~ 81%), 其次为担子菌门 Basidiomycota (13.6% ~ 21%), B 点位中优势菌门有 Ascomycota (84% ~ 93%), 其次为 Basidiomycota (4% ~ 9%)。C 点位优势菌门有 Ascomycota (79% ~ 98%)、Basidiomycota (1% ~ 9.4%) 和 Zygomycota (0.2% ~ 9.2%)。D 点位优势菌门有 Ascomycota (35% ~ 83%)、Basidiomycota (3% ~ 13%) 及 unclassified (2% ~ 57%)。总体上, Ascomycota 在各点位均为最优势菌门,其次为 Basidiomycota, 表明腐生的 Ascomycota 和 Basidiomycota 在动植物残体的分解以及有机物的霉烂中起到重要的作用。

Thiopsedomonas (49% ~ 53.6%)、*Sporosarcina* (2.6% ~ 14.8%) 和 *Eionea* (0.1% ~ 22.3%)。C 点位中优势菌属主要为 *Thiopsedomonas* (71% ~ 95%), 其填埋上层参与垃圾降解的菌属种类显著高于中下层。D 点位中优势菌属在填埋上层和中层呈现较高的相似性,优势菌属主要有 *Aerococcus* (比例约为 18.7%)、*Defluviitoga* (比例约为 22%)、*Proteiniphilum* (比例约为 7.7%)、*Clostridium III* (比例约为 7.3%); 而在填埋下层 *Thiopsedomonas* 所占比例显著升高,高达 69%, *Sporosarcina* 和 *Eionea* 作为新物种出现在填埋层下层。

总体上,短期填埋龄垃圾降解阶段的主要细菌菌属主要有 *Thiopsedomonas*、*Defluviitoga*、

Aerococcus、*Clostridium* III、*Proteiniphilum*、*Sporosarcina* 和 *Eionea*。随着填埋深度的变化, 填埋上层细菌菌属结构更具多样性, 以 *Deftuviitoga*、*Aerococcus*、*Clostridium* III、*Proteiniphilum* 为主, 而在中下层以 *Thiopseudomonas*、*Sporosarcina* 和 *Eionea* 为主。*Thiopseudomonas* 在 A、B、C 点位不同填埋深度下均为优势菌属, 这可能是由于 *Thiopseudomonas* 参与了初期填埋垃圾中有 NO_3^- 的厌氧还原。*Clostridium* III 和 *Deftuviitoga* 菌属能够利用纤维素、木聚糖在内的大量单糖、双糖及多糖, 最终代谢产物有乙酸酯、乙醇、丙酸酯、 CO_2 和 H_2 , 是促使垃圾降解进入水解产酸阶段的功能菌 (Maus *et al.*, 2016; 赵磊等, 2018)。同样的, 厌氧菌 *Proteiniphilum* 及兼性厌氧菌 *Sporosarcina* 在垃圾降解的过程中亦具有水解酸化的功能 (韩睿等, 2018)。*Thiopseudomonas* 是一种兼性厌氧反硝化菌属, 可以利用糖酵解和柠檬酸途径代谢垃圾中的有机物, 同时在厌氧环境下可以代谢氮氧化物和硫化物 (熊有为等, 2012; Tan *et al.*, 2014; 谭文勃等, 2017)。

图 7b 反映了不同点位属水平上真菌的物种组成。A 点位上优势菌属随深度变化较大, 填埋层上层主要由 *Aspergillus* (曲霉属)、*Chaetomiaceae* (毛壳菌

属)、unclassified *Trichocomaceae* (未分类发菌科)、*Thermomyces* (嗜热真菌属)、Others 等组成, 随着填埋深度的加深, *Kernia* (闭小囊菌属)、unclassified *Trichocomaceae* 逐渐成为优势菌属。B 点位中, *Aspergillus*、unclassified *Trichocomaceae*、*Thermomyces* 所占比例由上层的 18%、21%、11% 降低至深层的 14%、3%、0, 而 *Kernia* 的比例由 0 显著升高至 50%。C 点位上, 上层菌属主要由 *Aspergillus* (6%)、unclassified *Trichocomaceae* (18%)、*Kernia* (21%) 组成, 而中下层 *Kernia* 所占比例由 61% 显著提升到 88%。D 点位上, unclassified *Capnodiales* (未分类煤炱目) 在上层占有较高的比例, 而随着填埋深度增加, unclassified *Trichocomaceae* 和 unclassified *Pseudallescheria* 在填埋中层成为优势菌属, 而在深层出现了大量的未知菌属。

总体上, A、B、C 点位上参与垃圾降解的真菌主要包括 *Kernia*、unclassified *Trichocomaceae*、*Aspergillus* 和 *Thermomyces*, 而 D 点位上的优势真菌主要为 unclassified *Capnodiales*、unclassified *Pseudallescheria* 和 *Thermomyces*; 且各点位上均含有大量的未知菌属。*Kernia* 及 *Aspergillus* 作为常见的腐生菌属, 在不同点位均有较高的丰度。

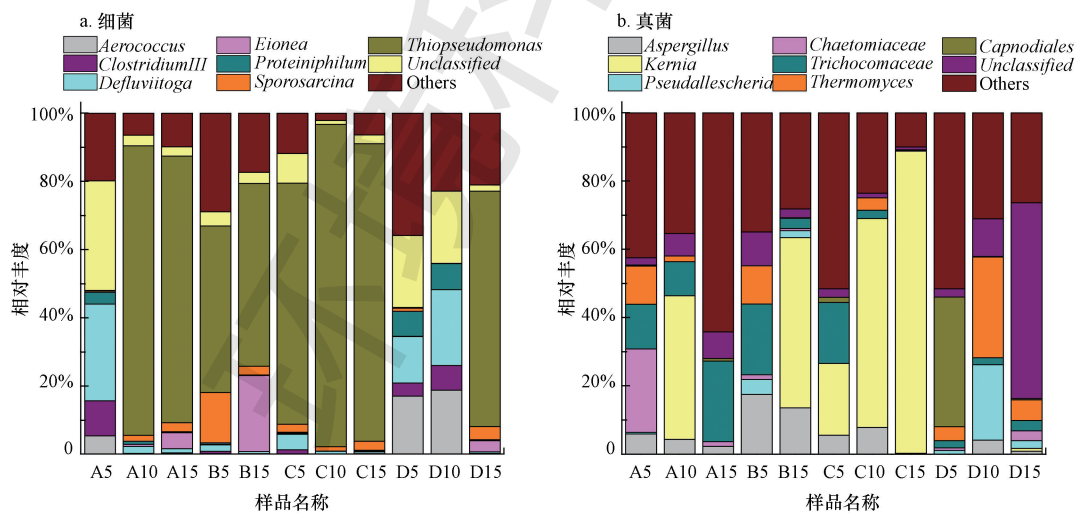


图 7 属水平上细菌(a)和真菌(b)的物种组成

Fig.7 Species composition of bacteria (a) and fungi (b) on genus level

3.5 垃圾降解过程中理化参数对微生物群落组成的影响

不同填埋龄微生物丰度与填埋场理化性质相关性分析如表 3 所示。填埋龄 0~1 a 样品中, *Sporosarcina* 与 KN 显著正线性相关, 相关系数为

0.895。*Thermomyces* 与 OM 显著正线性相关, 相关系数为 0.992。填埋龄 1~2 a 样品中 *Aerococcus*、*Proteiniphilum*、*Capnodiales* 与 pH 显著负线性相关, 相关系数分别为 -0.883、-0.897、-0.856。*Thiopseudomonas* 与 pH 呈显著正相关, 相关系数为 0.882。由于垃圾中

各理化指标波动大,大部分菌属丰度与填埋垃圾理化性质相关性不显著,这主要是因为短期填埋龄垃圾组成的不均匀性及其所处环境的差异是造成填埋场内不同区域的微生物群落结构存在一定的差异(王罗春等,2001)。

采用 RDA 分析垃圾降解过程中微生物群落与环境因子之间的关系,图 8 分别为细菌、真菌二维排序图,图中带箭头的矢量线代表相应环境因子(pH、KN、OM),4 种几何图形代表 A、B、C、D 点位。由图 8a 可知不同空间层次呈现较大差异性,4 个采样点位细菌群落在 0~10 m 填埋层中差异性较大,10~15 m 填埋层则无明显差异。填埋龄 0~1、1~1.5 a 样本较为聚集,而填埋龄 1.5~2 a 样本呈现明显差异性。由图 8b 可知 4 个采样点位真菌群落在 5~15 m 填埋层中差异较小,0~5 m 填埋层中有较大离散度呈现显著差异性。填埋龄 0~1、1~1.5 a 样本较为聚集,而填埋龄 1.5~2 a 样本呈现明显差异性,这与样本 OUT 聚类结果一致。

在 RDA 分析中,矢量线长度反映样本与环境因子的相关程度,矢量线越长,相关性越高。几何图形在矢量线上的垂直投影与箭头距离越近,相应环境因子对样本的作用越大。环境因子对细菌群落结构影响相关性排序为 pH>OM>KN,B、C、D 点位 10~

15 m 样本与 pH 投影距离近,填埋层中细菌群落结构受 pH 影响较高,表明垃圾降解进入水解酸化阶段,填埋堆体 pH 值降低引起细菌群落结构的显著变化。而对真菌群落结构影响较大的环境因子是 OM 和 pH,A、B 点位 0~5 m、10~15 m 及 D 点位 5~15 m 样本与 OM 投影距离近,表明真菌群落结构的变化与垃圾有机质的降解密切相关。

表 3 填埋场理化性质与微生物组成相关性分析

Table 3 Correlation analysis between physicochemical properties and microbial structure

菌属	填埋龄 0~1 a			填埋龄 1~2 a		
	pH	KN	OM	pH	KN	OM
<i>Aerococcus</i>	-0.219	0.001	0.572	-0.883 *	-0.308	0.508
<i>Clostridium</i>	-0.236	0.023	0.588	-0.714	-0.035	0.685
<i>Deftuittoga</i>	-0.219	0.013	0.581	-0.773	-0.087	0.659
<i>Eionea</i>	0.294	-0.488	-0.574	0.490	0.171	0.034
<i>Proteiniphilum</i>	-0.193	0.031	0.589	-0.897 *	-0.328	0.499
<i>Sporosarcina</i>	-0.796	0.895 *	0.512	0.707	0.008	-0.470
<i>Thiopseudomonas</i>	0.531	-0.242	-0.709	0.882 *	0.318	-0.540
<i>Aspergillus</i>	-0.782	0.679	0.441	0.245	0.811	0.426
<i>Kernia</i>	0.414	-0.427	-0.539	0.530	-0.101	-0.746
<i>Pseudallescheria</i>	-0.848	0.802	0.513	-0.294	0.294	0.750
<i>Chaetomiaceae</i>	-0.222	0.002	0.569	0.208	-0.036	0.046
<i>Trichomaceae</i>	-0.200	0.375	0.222	0.100	0.361	0.194
<i>Thermomyces</i>	-0.867	0.782	0.992 **	-0.307	0.318	0.786
<i>Capnodiales</i>	0.544	-0.576	-0.466	-0.856 *	-0.736	-0.119

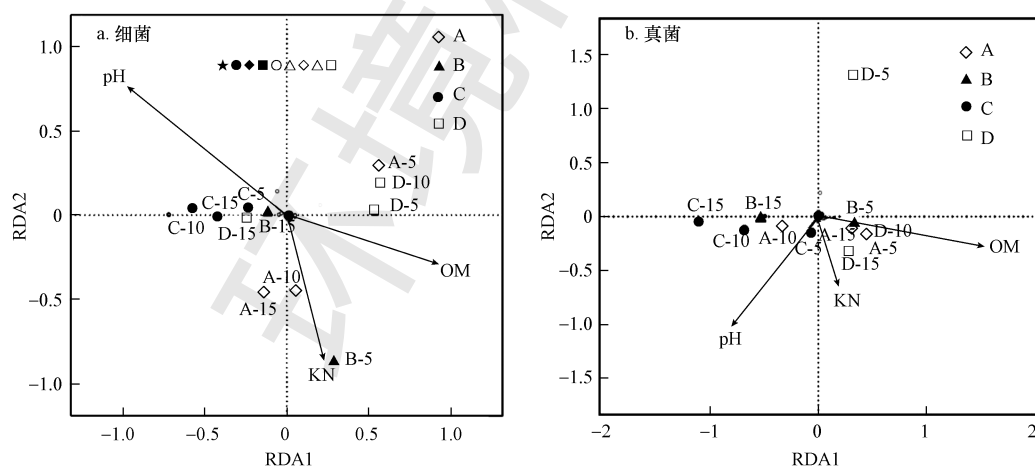


图 8 属水平上微生物群落变化与环境因子冗余分析(RDA)

Fig.8 Microbial community change and environmental factor redundancy analysis on genus level

综上,参与短期填埋龄垃圾降解的细菌多样性比真菌更丰富,而真菌多样性随填埋区域、填埋龄的不同呈现更显著的差异。Firmicutes 和 Proteobacteria 为优势细菌门,填埋上层细菌菌属以 *Deftuittoga*、*Aerococcus*、*Clostridium* III 和 *Proteiniphilum* 为主,而在中下层以

Thiopseudomonas、*Sporosarcina* 和 *Eionea* 为主。Ascomycota 为最优势真菌门,*Kernia* 及 *Aspergillus* 作为优势真菌菌属。此外,细菌群落结构的变化受 pH 值影响较大,而真菌群落结构的变化与垃圾有机质密切相关。研究结果阐明了实际填埋场内部短期填

埋垃圾的微生物群落结构分布特征及其与垃圾理化特性的关系,有助于深入理解短期填埋龄垃圾易腐有机组分降解的微生物作用机制。

4 结论(Conclusions)

1) A、B、D 点位的细菌群落多样性高于 C 点位;且随着深度的增加,微生物多样性呈降低的趋势。A、B、D 点位的真菌群落多样性高于 C 点位,但丰富度低于 C 点位。浅层垃圾中微生物的多样性高于中深层,0~1 a 填埋龄垃圾微生物多样性较高,而填埋龄 1.5~2 a 垃圾微生物多样性高于 1~1.5 a。

2) 细菌的优势菌门主要有 Proteobacteria 和 Firmicutes。Firmicutes 在填埋层上层为优势菌门,最大比例达到 65%,Proteobacteria 在填埋层中下层为优势菌门,最大比例达到 88%。优势菌属包括 *Thiopseudomonas*、*Deftuviitoga*、*Aerococcus*、*Clostridium* III、*Proteiniphilum*、*Sporosarcina* 和 *Eionea*。A、B、C 点位群落结构较为相近,其中 A 与 B 点位更为相近,D 点位则明显不同。真菌主要包括 Ascomycota、Basidiomycota 和 Zygomycota 3 个菌门,其中 Ascomycota 占绝对优势。优势菌属包括 *Kernia*、unclassified *Trichocomaceae*、*Aspergillus* 和 *Thermomyces*、*Kernia* 及 *Aspergillus* 作为常见的腐生菌属,在不同点位均有较高的丰度。

3) 冗余分析结果表明填埋龄 0~1、1~1.5 a 样本微生物群落结构差异较小,而填埋龄 1.5~2 a 样本呈现明显差异性,不同空间层次呈现较大差异性。细菌群落结构的变化受 pH 值影响较大,而真菌群落结构的变化与垃圾有机质密切相关。

参考文献(References):

Burrell P C, O' Sullivan C, Song H, et al. 2004. Identification, detection, and spatial resolution of clostridium populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 2414-2419

Céline Robert, Chassard C, Lawson P A, et al. 2007. *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov. a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 57(7):1516-1520

韩睿. 2018. 青海农用沼气池发酵微生物群落结构与功能研究[D]. 武汉:华中师范大学. 68-69

Köchling T, Sanz J L, Gavazza S, et al. 2015. Analysis of microbial community structure and composition in leachates from a young landfill by 454 pyrosequencing [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13): 5657-5668

刘洪杰,徐晶,赵由才,等. 2017. 生活垃圾填埋场微生物群落结构与

功能[J]. *环境卫生工程*, 25(2): 5-9+14

Liu S J, Xi B D, Qiu Z P. 2019. Succession and diversity of microbial communities in landfills with depths and ages and its association with dissolved organic matter and heavy metals [J]. *Science of the Total Environment*, 651: 909-916

O'Sullivan C A, Burrell P C, Clarke W P, et al. 2005. Structure of a cellulose degrading bacterial community during anaerobic digestion [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(7): 871-878

瞿贤,何晶晶,邵立明,等. 2005. 生物反应器填埋条件下垃圾生物质组分的初期降解规律[J]. *环境科学学报*, 25(9): 1219-1225

苏月,吴双,夏孟婧,等. 2018. 北京市大屯垃圾转运站渗滤液微生物群落分析[J]. *环境科学与技术*, 41(2): 157-163

Sinclair L, Osman O A, Bertilsson S, et al. 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons; evaluating the illumina platform [J]. *Plos ONE*, 10(2): e0116955

Smith D P, Peay K G. 2014. Sequence depth, not per replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing [J]. *Plos ONE*, 9(2): e90234

Shipman J A, Berleman J E, Salyers A A. 2000. Characterization of four outer membrane proteins involved in binding starch to the cell surface of *Bacteroides thetaiotaomicron* [J]. *Journal of Bacteriology*, 182(19): 5365-5372

Mackenzie A K, Pope P B, Pedersen H L, et al. 2012. Two susD-like proteins encoded within a polysaccharide utilization locus of an uncultured ruminant bacteroidetes phylotype bind strongly to cellulose [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16): 5935-5937

Maus I, Cibis K G, Bremges A, et al. 2016. Genomic characterization of *Deftuviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment [J]. *Journal of Biotechnology*, 232: 50-60

Tan W B, Jiang Z, Chen C, et al. 2014. *Thiopseudomonas denitrificans* gen. nov. sp. nov. isolated from anaerobic activated sludge [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 1): 225-229

谭文勃. 2017. 混养反硝化硫细菌 *Thiopseudomonas denitrificans* X2 的分离鉴定与基因组学研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学. 84-85

王磊. 2014. 生活垃圾填埋堆体微生物分布特征及群落结构分析[D]. 北京:北京大学

王罗春,赵由才,陆雍森. 2000. 垃圾填埋场稳定化及其研究现状 [J]. *城市环境与城市生态*, (5):36-39

王罗春,赵由才,陆雍森. 2001. 大型垃圾填埋场垃圾稳定化研究 [J]. *环境污染治理技术与设备*, 2(4): 15-17

吴双,王磊,夏孟婧,等. 2016. 北京市北神树生活垃圾填埋场细菌群落结构和分布特征 [J]. *应用基础与工程科学学报*, 24(6): 1135-1146

夏向利,唐和清,杨子陆,等. 2016. 高温微生物菌剂加速垃圾填埋场好氧稳定化进程的研究 [J]. *环境工程学报*, 10(4):2003-2008

熊有为,王洪江,吴爱祥,等. 2012. 碱性微生物浸矿研究现状及发展趋势 [J]. *湿法冶金*, 31(4): 199-200

Xu S, Lu W J, Liu Y T, et al. 2017. Structure and diversity of bacterial communities in two large sanitary landfills in China as revealed by high-throughput sequencing (MiSeq) [J]. *Waste Management*, 63: 41-48

杨琦,张亚雷,汪立忠,等. 1997. 垃圾填埋场的厌氧降解作用及其微生物类群 [J]. *中国沼气*, (3):7-10

赵磊,刘慧. 2018. 江汉油田波动带土壤氮循环功能菌群分析 [J]. *环境科学与技术*, 41(11): 49-53

中国统计局. 2018. 中国统计年鉴 2018 [M]. 北京:中国统计出版社