

<https://doi.org/10.3799/dqkx.2023.109>



煤矿开采区地下水微生物群落结构 与功能及其对环境的响应

郭林¹, 毛佳玲², 何凯¹, 陈秀云², 黄鑫平², 蒋沙沙², 马丽媛^{2*}

1. 河南省地质研究院, 河南省地下水污染防治与修复重点实验室, 河南郑州 450016

2. 中国地质大学环境学院, 长江流域环境水科学湖北省重点实验室, 湖北武汉 430078

摘要: 为揭示微生物在煤矿开采区地下水环境中的空间分布特征及受控因素, 为煤矿开采区地下水污染生态修复奠定基础, 以河南新密某煤矿开采区地下水微生物为研究对象, 利用16S rRNA高通量测序技术, 分析了饮用水井和废弃矿井地下水微生物群落的结构与功能及其对环境的响应。研究表明在属水平上饮用水井主要以不动杆菌属(*Acinetobacter*)、草地土杆菌属(*Chthonobacter*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)为主, 而废弃矿井中则以短波单胞菌属(*Brevundimonas*)和甲基红色杆菌属(*Methylobacterium*)为主。两组微生物在多种合成酶、脱氢酶以及转运系统ATP结合蛋白等方面的潜在功能上存在显著差异。分子生态网络显示, 矿井水微生物不仅联系更为紧密, 且种间多为正相关关系, 推测物种可能通过合作来应对极端寡营养环境。该区域地下水微生物群落结构主要受溶解性总固体和硝酸盐氮含量的影响, 营养条件是制约当地地下水微生物群落结构与功能的先决因素。

关键词: 地下水; 微生物; 群落结构与功能; 环境响应; 共生网络; 环境地质。

中图分类号: P66

文章编号: 1000-2383(2024)09-3252-12

收稿日期: 2023-03-09

Microbial Community Structure and Function in Groundwater of Abandoned Coal Mine and Its Response to Environment

Guo Lin¹, Mao Jialing², He Kai¹, Chen Xiuyun², Huang Xinping², Jiang Shasha², Ma Liyuan^{2*}

1. Henan Key Laboratory of Groundwater Pollution Prevention and Remediation, Henan Academy of Geology, Zhengzhou 450016, China

2. Hubei Key Laboratory of Yangtze Catchment Environmental Aquatic Science, School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

Abstract: To reveal the spatial distribution characteristics and controlled factors of microorganisms in the groundwater of the coal mining area, and to lay the foundation for the ecological restoration of groundwater pollution in the coal mining area, the structure and function of microbial communities in drinking water wells and abandoned mine wells, and their responses to the local environment were analyzed by using 16S rRNA high-throughput sequencing technology in a coal mining area in Xinmi, Henan Province, China. The results show that at the genus level, drinking water wells were mainly composed of *Acinetobacter*,

基金项目: 地下水污染防治试点项目(No. 2020410183S1-40001); 国家自然科学基金项目(No. 42007306)。

作者简介: 郭林(1987—), 男, 高级工程师, 主要从事地下水污染修复等方面的研究工作。ORCID: 0000-0003-0361-0552. E-mail: guolin_cug@126.com

*** 通讯作者:** 马丽媛, ORCID: 0000-0001-7351-836X. E-mail: maly@cug.edu.cn

引用格式: 郭林, 毛佳玲, 何凯, 陈秀云, 黄鑫平, 蒋沙沙, 马丽媛, 2024. 煤矿开采区地下水微生物群落结构与功能及其对环境的响应. 地球科学, 49(9): 3252-3263.

Citation: Guo Lin, Mao Jialing, He Kai, Chen Xiuyun, Huang Xinping, Jiang Shasha, Ma Liyuan, 2024. Microbial Community Structure and Function in Groundwater of Abandoned Coal Mine and Its Response to Environment. *Earth Science*, 49(9): 3252-3263.

Chthonobacter and *Flavobacterium*, while *Brevundimonas* and *Methylobacterium* were dominant in abandoned mine wells. The significant functional differences between the two groups were in multiple synthases, dehydrogenases and ATP-binding proteins of the transporter system. Molecular ecological network analysis shows that microorganisms in mine water were not only more closely linked but also mostly positively correlated, and species might respond to the extreme oligotrophic environment by cooperation. The groundwater microbial communities in the region were mainly influenced by total dissolved solids and nitrate nitrogen content, indicating that nutrient conditions were the prerequisite factors governing the structure and function of local microbial communities.

Key words: groundwater; microorganism; community structure and function; environmental response; co-occurrence network; environmental geology.

0 引言

作为18世纪以来人类使用的主要能源之一,煤炭在世界科技进步历程中发挥了不容忽视的作用.我国煤炭经过“黄金十年”的高强度开采,被关停的煤矿数量急剧增加(Zhang *et al.*, 2016).废弃煤矿的采空区留存着大量的固体废物,如煤矸石等.矿山开采期间,矿井地下水通过人工疏排来维持生产活动的正常进行,但矿山封闭后,就会停止排放矿井水,从而导致地下水水位迅速回升.地下水水位回升后,固体废物中含有的有毒重金属,如铬(Cr)、锰(Mn)、砷(As)和铅(Pb)等在长时间的溶浸过程中不断被释放到水环境中,造成严重的地下水污染(Hua *et al.*, 2018).闭坑区少部分废弃矿井经处理后可转为饮用水井,但大部分因为地理位置、污染难以去除等原因被直接搁置,煤矿开采区地下水环境问题日益突出(Hasheela *et al.*, 2014).

地下水系统不仅是连接地表生物圈和地下生物圈的重要纽带,也是居民生活用水的重要来源之一(John and Rose, 2005).微生物作为环境中元素循环和能量代谢的驱动者,在地下水的信息传递、物质循环和能量转换上都发挥着重要作用,是地下水中最活跃的因子之一.地下水环境中的微生物群落不仅多样性高且相对稳定,其群落组成的特异性可直观反映地下水环境特征与污染状况,是地下水监测与污染防治过程中不可忽视的研究内容之一(Fillinger *et al.*, 2019).通过研究滨海边疆区高盐度地下水中微生物的分布特征及其环境效应,Lebedeva *et al.* (2019)发现微量元素以Sr、Mn和Fe为主的地下水环境中形成的生物膜受重金属、碱金属和稀土元素浓度的显著影响;Merino *et al.* (2022)通过分析内华达州和加利福尼亚州的地下水微生物群落特征并建立相关生态模型,评估了利用地下微生物群落识别补给区和排放区之间地下水流动路径的可行性,证实了区域尺度下微生物群落作用

模式可用于补充和丰富所处环境的地质和水文数据,以便更深入地刻画地下水流的具体特征.

研究表明,煤矿开采活动驱动了矿井地下水微生物群落和水化学特征的变化(Zhang *et al.*, 2022a).目前针对地下水微生物群落与环境因子的相互作用关系研究多采用冗余分析(RDA)、主成分分析(PCA)等方法,忽视了微生物群落的潜在功能以及物种间的相互作用.因此,本研究选取河南新密某煤矿开采区的饮用水井和废弃矿井,对其地下水开展水化学和微生物学相关研究,探究煤矿开采区饮用水井和废弃矿井微生物群落结构与功能的异同,采用分子生态网络分析,探讨研究区微生物种间相互作用,以揭示地下水微生物对环境因子的响应特征,丰富对煤矿开采区地下水微生物群落的认识,为煤矿开采区地下水污染的生态修复奠定基础.

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于河南省新密市超化镇,地处东经113°24',北纬34°23',东西直径12 km,南北直径14 km.新密矿产资源品种繁多,煤层埋藏浅,储量丰富,境内煤炭远景储量为50亿吨,素称“乌金之乡”.受地理位置和自然条件等因素影响,新密水资源严重短缺,地下水是主要供水水源.笔者调查走访发现,部分饮用水水源井出现浑浊,给地下水及人居环境带来了严重的安全隐患.根据研究区水文地质特征及污染现状,笔者设置了以下采样矿井点位,命名为超化井XMCHJ组和矿井KJ组(图1),其中XMCHJ组包括XMCHJ01、04、14、85和86五口井,为岩溶水或裂隙水,作为饮用、灌溉和养殖用水.XMCHJ01、04和14三口井属于Ⅲ类水体,即集中式生活饮用水水源;点位XMCHJ85和XMCHJ86属于Ⅳ类水体,适当处理后可作生活饮用水,为应急

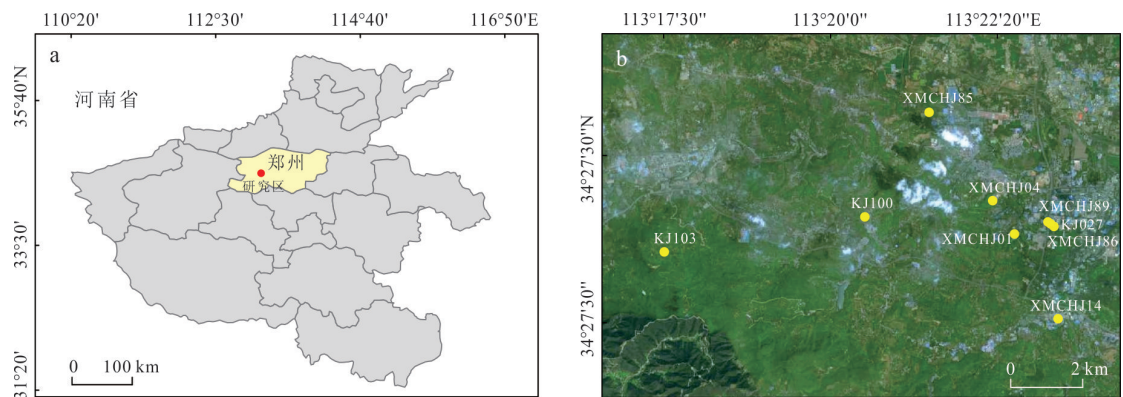


图1 研究区地理位置与采样点分布

Fig.1 Geographical location of study area and distribution of sampling points

备用水源，日常使用频率不高。KJ组包括KJ027、089、100和103四口井，为矿井水（Ⅴ类水体），是煤矿关停后遗留的弃用水井。

1.2 样品采集与检测

取样前开泵洗井 0.5~1.0 h，至水质清澈稳定后，于潜水泵正上方原位地表出水口取样。同步取两份水样，一份按照《生活饮用水标准检验方法》(GB/T 5750—2006)进行样品保存，并运送回实验室。采用干燥称量法测定溶解性总固体 (total dissolved solids, 简称 TDS) 含量，采用电感耦合等离子体光谱仪 (ICP Avio 500) 检测镁、钙、钠、钾、锌等元素含量，采用双通道原子荧光光谱仪 (BAF-2000) 检测砷含量，采用离子色谱仪 (ICS-1100) 测定硫酸盐、硝酸盐氮含量，采用聚四氟乙烯滴定法检测碳酸氢根和高锰酸根含量，采用紫外可见分光光度计 (UV) 测定偏硅酸含量。另一份水样取 5~10 L，用快速滤纸进行粗滤，再用 0.22 μm 滤膜进行抽滤，放入干冰冰盒保存，运送回实验室用于微生物群落测试。

采用 Qiagen 强力水样品 DNA 提取试剂盒 (14900-50-NF) 提取样本的基因组总 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。使用正向引物 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和反向引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWCT-TAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因 V3~V4 区进行 PCR 扩增。PCR 产物纯化后，构建文库并于 Illumina HiSeq 平台进行 2×300 bp 双端测序。测序工作由深圳易基因科技有限公司完成。

1.3 数据分析

利用 QIIME 2 对高通量测序下机数据进行分析，生成 ASVs 表，计算 ASVs 丰度、Alpha 多样性

等，并绘制韦恩 (Venn) 图，以得到样本内物种丰富度和均匀度、不同分组间共有和特有 ASVs 物种信息等。通过 PCoA 降维分析，探究不同组别间样本群落组成的聚类特征。为进一步挖掘分组样本间群落结构的差异，选用 LEfSe 分析 (Chang *et al.*, 2022) 基于显著性检验对分组样本的指示物种进行筛选和鉴定。利用 Tax4Fun2 对微生物组数据进行功能预测，采用 STAMP 法 (Parks *et al.*, 2014) 对组间功能分类丰度进行假设检验，选择具有显著性差异且丰度排名前 10 的功能分类绘制柱状图，基于 R 语言 pheatmap 绘制 KEGG 注释结果热图。采用 SparCC 算法，构建相关性矩阵，结合网络拓扑学性质，利用 Gephi 软件绘制分子生态网络图。采用 R 软件中的 vegan 包进行 RDA 分析并利用 ggplot2 包进行可视化。

2 结果与分析

2.1 水化学特征

研究区地下水样本的主要物理化学参数见表 1。数据显示，该区域地下水水质较硬，总硬度平均值为 469 mg/L。研究区地下水阳离子水化学类型以 Ca²⁺ 为主，阴离子水化学类型以 HCO₃⁻ 为主，地下水矿化度低，根据舒卡列夫分类方法 (Reddy and Kumar, 2010)，确定研究区地下水化学类型为 1-A 型，为矿化度不大于 1.5 g/L 的 HCO₃⁻-Ca 型水，是典型沉积岩地区的溶滤水。

查阅我国现行地下水质量标准 GB/T 14848—2017，发现 XMCHJ14 和 XMCHJ86 地下水样本的硬度超过 III 类 (≤450 mg/L) 和 IV 类标准 (≤650 mg/L)，其中 XMCHJ86 远超其限制值，且该点位硝酸盐氮含量也超过了相应标准 (≤30 mg/L)。

表 1 不同取样点地下水样本的理化参数														
Table 1 Physicochemical parameters of groundwater from different sampling points														
ID	总硬度 (mg/L)	浑浊度 (NTU)	溶解性 总固体 (mg/ L)	高锰酸 盐指数 (mg/ L)	硝酸 盐氮 (mg/ L)	硫酸盐 (mg/ L)	偏硅酸 (mg/ L)	碳酸 氢根 (mg/ L)	砷 (10 ⁻⁴ mg/ L)	镁 (mg/ L)	钙 (mg/ L)	钠 (mg/ L)	钾 (mg/ L)	锌 (mg/ L)
XMCHJ01	349	0	468	0.71	3.40	64.0	16.5	408	11	25.9	79	36.8	0.22	0.083
XMCHJ04	415	0.001	490	0.56	8.23	116.0	16.0	297	4	25.6	99	32.5	0.86	0
XMCHJ14	489	9.8	463	0.68	5.09	41.4	14.7	424	14	48.2	81.4	13.3	0.2	0
XMCHJ85	350	0.6	448	0.64	3.47	59.1	16.2	326	0	27.6	73.8	49.7	1.02	0.221
XMCHJ86	810	1.4	1 080	0.71	54.10	193.0	24.4	439	9	33.2	292	35	0.08	0
KJ027	511	348	721	0.46	14.10	77.6	27.9	481	6	27.1	189	20.3	0	0
KJ089	462	29	529	0.60	9.34	257.0	26.0	229	51	14.0	129	26.6	9.43	1
KJ100	612	2.8	869	0.51	12.10	232.0	21.5	484	5	35.6	226	34.3	0.73	0.106
KJ103	223	1.0	492	0.55	1.12	37.6	21.8	428	8	17.4	44.7	124	4.44	0.160

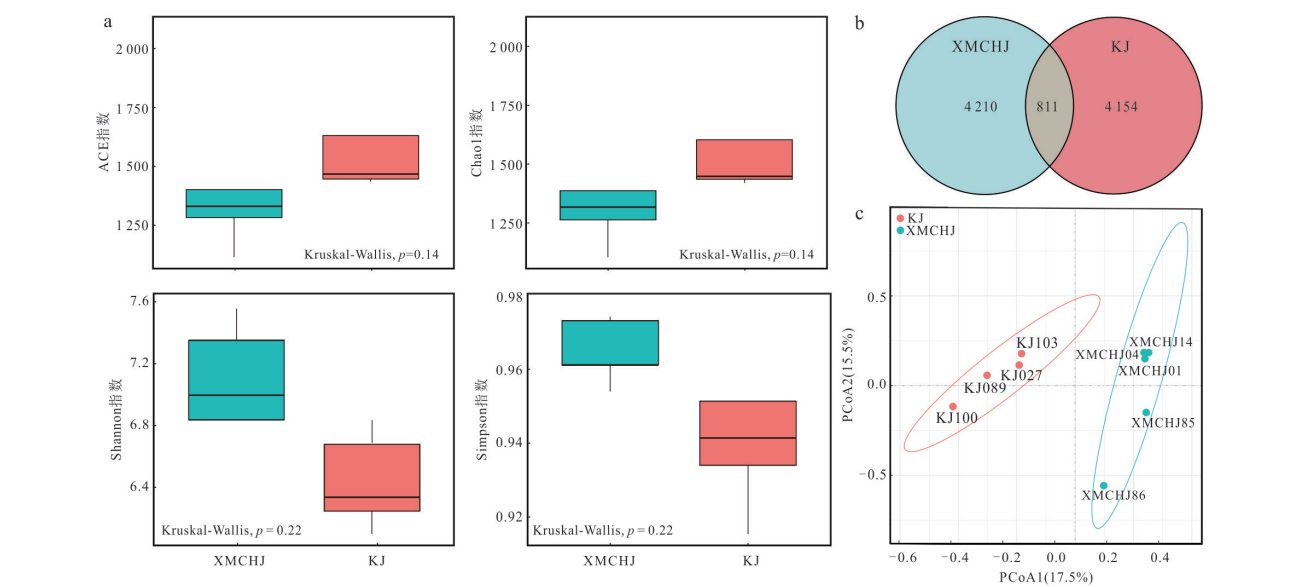


图2 XMCHJ组和KJ组微生物多样性分析

Fig.2 Microbial diversity analysis of XMCHJ group and KJ group

a. α 多样性指数箱线图;b. 两组样本 ASV 水平韦恩图;c. 样本分组 PCoA 分析

两组样本的溶解性总固体、硫酸盐、砷、钠和锌含量符合现行标准.比较饮用水井(XMCHJ组)和废弃矿井(KJ组)样本的溶解性总固体含量,发现XMCHJ组溶解性总固体含量为448~1 080 mg/L,平均值为589.5 mg/L,其中XMCHJ86可能由于日常使用率低,其含量显著高于XMCHJ组其他样本点,而KJ组溶解性总固体含量则普遍较高.在浑浊度方面,KJ组也明显高于XMCHJ组,尤其以KJ027样点为代表.此外,KJ组硫酸盐、偏硅酸、碳酸氢盐等化合物以及钙、钠、钾等金属离子含量均高于XMCHJ组.

2.2 地下水微生物群落结构与潜在功能

2.2.1 群落多样性分析 对XMCHJ组和KJ组的微生物群落多样性进行分析,绘制 α 多样性指数箱线图(图2b).XMCHJ组ACE指数和chao 1指数均低于KJ组,表明KJ组样品具有相对较高的丰富度.XMCHJ组Shannon指数和Simpson指数均高于KJ组,表明XMCHJ组在物种多样性方面占据优势.虽然两组样本的 α 多样性指标并不存在显著差异,但韦恩图(图2b)结果显示,两组共有物种数为811,XMCHJ组和KJ组的特有物种数分别为4 210和4 154,表明两组微生物的类群差异明显.基于binary jaccard算法对两

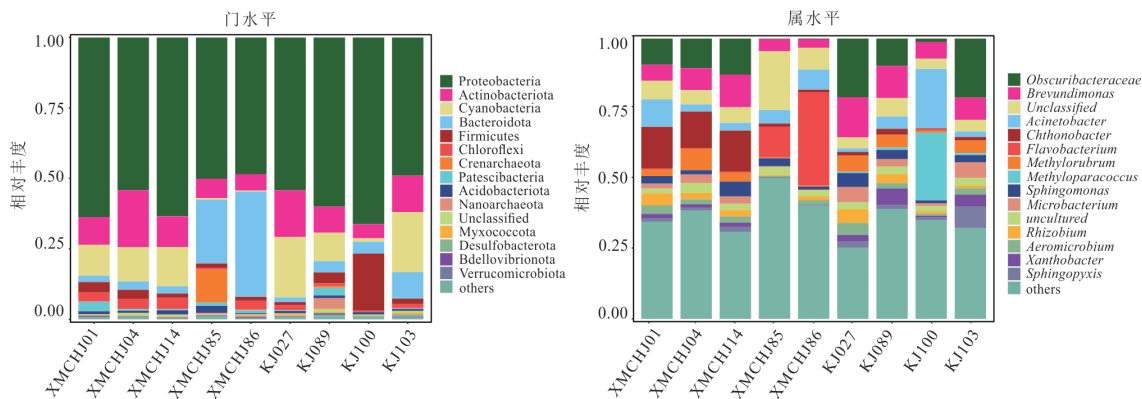


图3 XMCHJ组和KJ组在门水平和属水平上的物种组成

Fig.3 Microbial community composition at the phylum and genus level of XMCHJ group and KJ group

组样本生境间微生物 β 多样性进行分析, PCoA1 和 PCoA2 最大解释量分别为 17.5% 和 15.5%. 聚类结果表明, 同一分组样本之间距离较近, 微生物群落组成差异较小; 将两组样品分别聚类, 无重叠现象, 说明 XMCHJ 组和 KJ 组微生物群落间存在显著差异 (图 2c).

2.2.2 群落物种组成 根据物种注释结果, 选取 XMCHJ 组和 KJ 组微生物在门水平和属水平上丰度排名前 15 的物种, 绘制物种相对丰度柱形堆叠图 (图 3). 在门水平上, XMCHJ 组和 KJ 组的优势菌种均为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteriota) 和蓝细菌门 (Cyanobacteria). XMCHJ01、XMCHJ04 和 XMCHJ14 这三个取样点的群落结构相似, 具有较多与光合作用相关的蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和绿弯菌门 (Chloroflexi), 其中蓝细菌门 (Cyanobacteria) 含量均达到 10% 以上, 绿弯菌门 (Chloroflexi) 占比约为 3.55%. XMCHJ85 和 XMCHJ86 样点的蓝细菌门 (Cyanobacteria) 丰度较低, 而拟杆菌门 (Bacteroidota) 占比高达 30%. 此外, XMCHJ85 群落中还含有较多泉古菌门 (Crenarchaeota), 相对丰度为 11.66%. 在 KJ 组中, 除 KJ100 外均含有较多的蓝细菌门 (Cyanobacteria), 而厚壁菌门 (Firmicutes) 在 KJ100 组占据绝对优势, 其占比仅次于变形菌门 (Proteobacteria). KJ089 群落中纳古菌门 (Nanoarchaeota) 的相对丰度显著高于其他取样点.

在属水平上, XMCHJ01、XMCHJ04 和 XMCHJ14 这三个取样点的群落组成也高度相似, 优势类群为 *Obscuribacteraceae*、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 和草地土杆菌属 (*Chthonobacter*). XMCHJ04 含有较多甲基红色杆菌属 (*Methylorubrum*), 其丰度达 7.53%. XMCHJ85 和 XMCHJ86 这两个取样点含有较多的黄杆菌属 (*Flavobacterium*), 其在 XMCHJ86 群落中丰度高达 33.28%. 在 KJ 组中, 草地土杆菌属 (*Chthonobacter*) 的相对丰度显著降低, 而微杆菌属 (*Microbacterium*) 的丰度比 XMCHJ 组略有升高. KJ100 的生物群落主要由不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和具有甲烷氧化能力的甲基副球菌属 (*Methyloparacoccus*) 组成, 其含量分别为 21.20% 和 24.20%.

对两组微生物群落进行 LEFSe 分析 (图 4), 得到组间在丰度上具有统计学差异的指示物种, XMCHJ 组指示物种是土源黄杆菌 (*Flavobacterium terrigena*)、KJ 组指示性物种是动球菌科 (Planococcaceae)、芽孢杆菌目 (Bacillales)、金黄微菌属 (*Chryseomicrobium*)、甲基球菌科 (Methylococcaceae) 和甲基副球菌属 (*Methyloparacoccus*).

2.2.3 群落潜在功能预测 微生物功能群的差异是在长期演替过程中对栖息环境响应的结果, 反之, 通过对微生物群落的功能进行预测分析, 也可

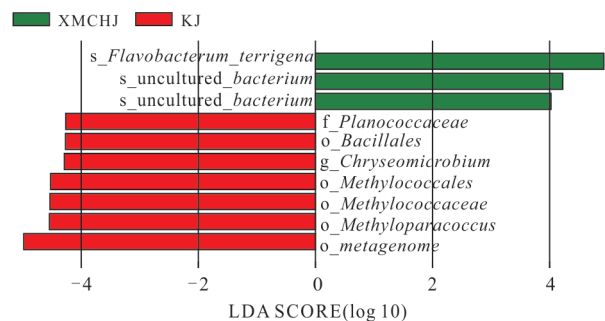


图4 LEFSe指示物种分析

Fig.4 LEFSe indicator species analysis

柱状图颜色代表各自的组别, 长短代表 LDA score, 即不同组间显著差异物种的影响程度

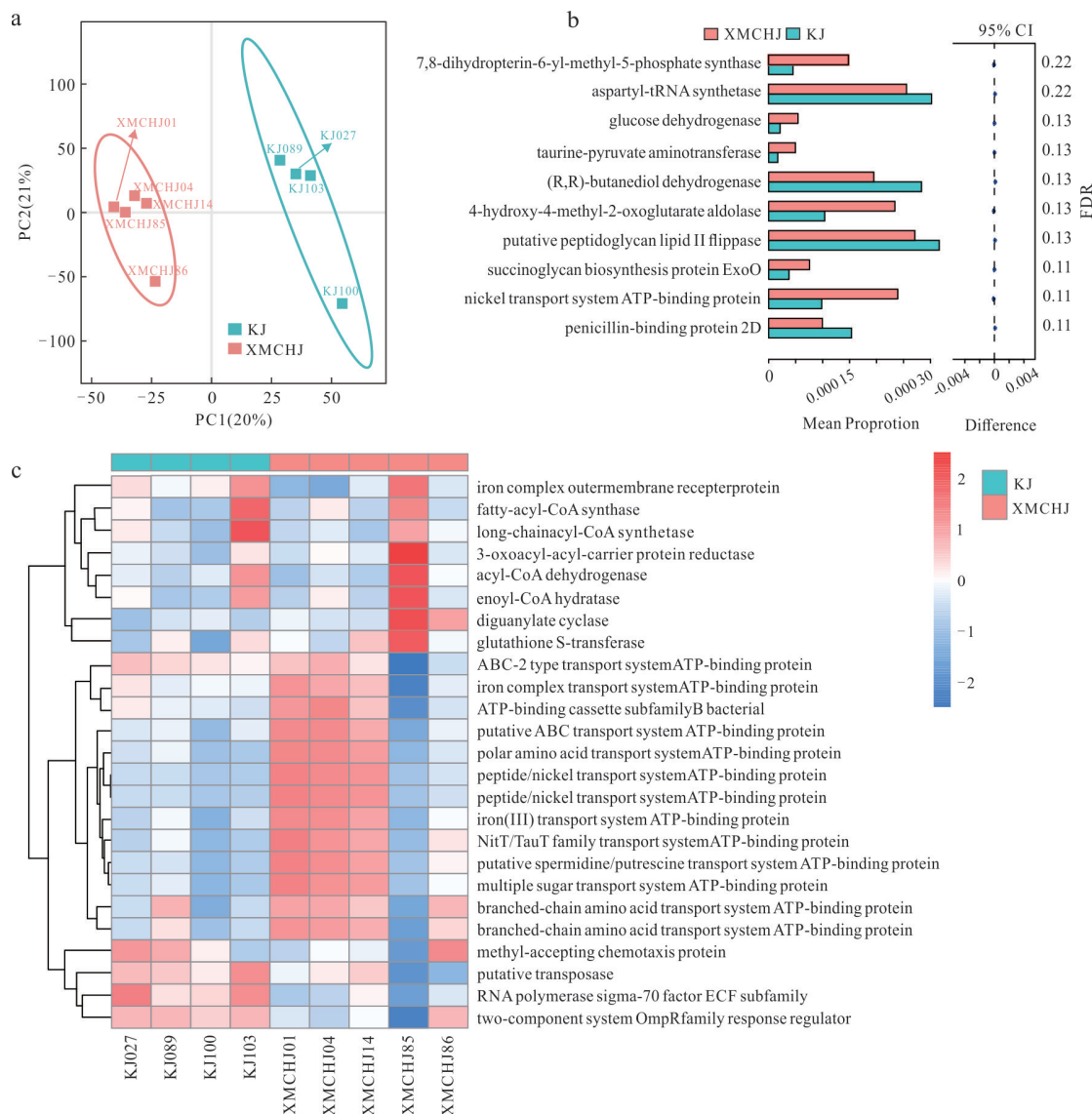


图5 XMCHJ组和KJ组微生物群落的潜在功能比较

Fig.5 Comparison of potential functions of XMCHJ group and KJ group

a. 功能分类的PLS-DA分析图;b. 差异功能基因分类柱形图,左侧为不同功能分类在两个样本中的丰度比例,中间图为95%置信区间内,功能丰度的差异比例,右侧为FDR值,FDR值小于0.05,表示差异显著;c. 差异基因聚类热图

以从侧面反映环境变化的总体趋势.对XMCHJ组和KJ组微生物群落的潜在功能进行聚类,发现XMCHJ组和KJ组组间功能差异显著,主成分坐标轴PCA1和PCA2分别解释了20%和21%的群落功能差异(图5a).采用STAMP法对组间功能分类丰度进行假设检验,发现两组微生物群落在多种合成酶、脱氢酶以及转运系统ATP结合蛋白等相关功能方面存在显著差异(图5b).

KEGG功能聚类热图(图5c)进一步展示了两组微生物群落间的潜在功能差异,XMCHJ01、XMCHJ04和XMCHJ14这三个样本点中肽/镍、

铁和多糖等多个转运系统的ATP结合蛋白潜在功能基因丰度较高,XMCHJ85样本则具有较多关于催化酶(酰基辅酶A脱氢酶、水合酶、双鸟苷酸环化酶和谷胱甘肽转移酶)合成的功能.KJ组中甲基受体趋化性蛋白(*methyl-accepting chemotaxis protein*)、转座酶、RNA聚合酶以及OmpR双组分调节系统反应调节器蛋白(*two-component system, OmpR family, response regulator*)等功能基因丰度均高于XMCHJ组.

2.3 地下水微生物群落与环境的相互作用关系

2.3.1 微生物种间相互作用关系 过滤掉丰度小于

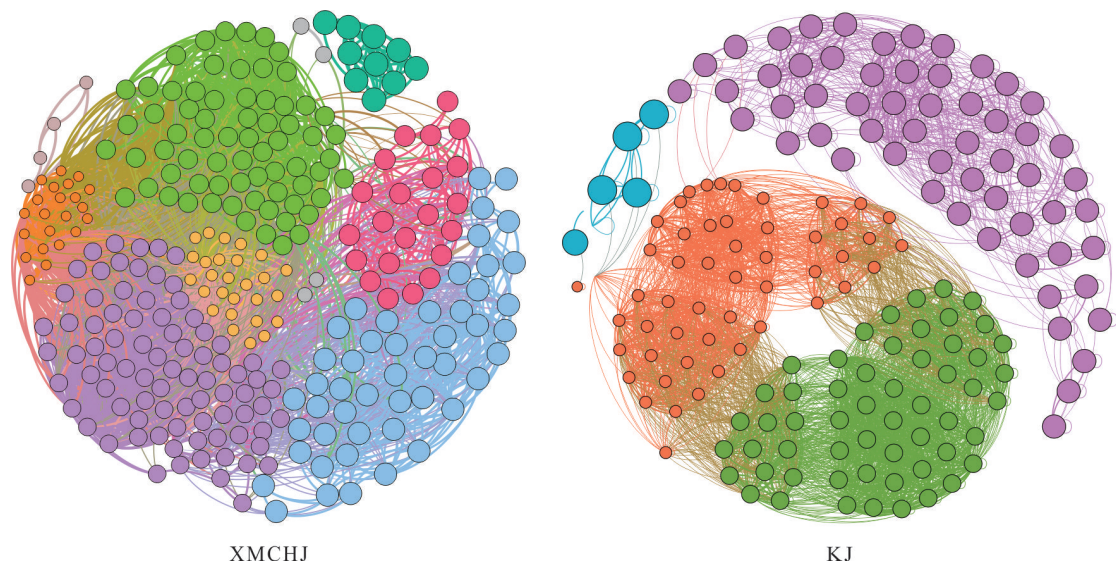


图 6 XMCHJ 组和 KJ 组的生态网络分析

Fig.6 Interaction network analysis of XMCHJ group and KJ group

表 2 组间分子生态网络拓扑结构参数

Table 2 Parameters of the molecular ecological network topology between the two groups

分组	节点数	边数	平均度	平均加权度	模块化系数	平均聚类系数	正相关系数	负相关系数
XMCHJ	290	4 620	31.86	13.49	1.16	0.63	67.68%	32.32%
KJ	170	3 494	41.11	50.75	0.52	0.77	100%	0

0.5% 且出现频次少于 5 的物种进行关联网
分析,采用 SparCC 和 Gephi 绘制 XMCHJ 组
和 KJ 组的生态网络图(图 6)。结果显示,
XMCHJ 组网络的平均度、平均加权度和平均
聚类系数都比 KJ 组低(表 2),表明 KJ 组的微
生物群落间相互作用关系更加紧密,有较高
的连通度,且平均聚类系数高表示其微生物
群落对环境变化更为敏感,即当外界环境发
生改变时,KJ 组微生物群落会更快对其做出
应答.XMCHJ 组网络的正相关系数为 67.68%,
而 KJ 组网络的正相关系数为 100%,表明 KJ
组的微生物种间相互作用均为正相关关系。

利用网络拓扑参数的度量,鉴定 XMCHJ
组和 KJ 组微生物共生网络的关键类群,以中
介中间性(betweenness centrality)为判断标准,
筛选排名前十的物种并确定为生态网络的关键
物种。结果表明,XMCHJ 组关键物种包括条
件致病菌——不动杆菌属(*Acinetobacter*)、具
有芳香化合物降解功能的鞘氨醇单胞菌属
(*Sphingomonas*)、*Patescibacteria*、金黄微菌属
(*Chryseomicrobium*)、条件致病菌黄杆菌属
(*Flavobacterium*)、具有反硝化作用的氢噬胞菌

属(*Hydrogenophaga*)和拟甲色球藻(*Chroococ-
cidiopsis*)。KJ 组的关键物种有 *Siphonobacter*、厌
氧条件生长的瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、微
小杆菌属(*Exiguobacterium*)、短波单胞菌(*Bre-
vundimonas*)和管道杆菌属(*Cloacibacterium*)。

2.3.2 微生物与环境因子的相互作用关系 为了
进一步解析研究区地下水微生物群落与环境因子
之间的相互作用关系,以地下水的理化特征为解
释变量、优势微生物种群为响应变量进行冗余分
析(图 7)。结果显示,RDA1 对群落的解释量达到
60.5%,RDA2 对群落的解释量达到 27.24%,细菌
群落受溶解性总固体和硝酸盐氮含量的显著影
响。其中 XMCHJ85 和 XMCHJ86 样点微生物群落
与硝酸盐氮含量呈显著正相关关系,XMCHJ14
样点微生物群落与碳酸氢根含量呈显著正相关
关系。对具体物种与环境因子的关系进行分析,
笔者发现 *Patescibacteria*、厚壁菌门(*Firmicutes*)
与镁离子含量,泉古菌门(*Crenarchaeota*)、拟杆
菌门(*Bacteroidota*)与高锰酸盐指数,以及硝酸
盐氮、放线菌门(*Actinobacteriota*)与溶解性总
固体和锌离子含量,纳古菌门(*Nanoarchaeota*)
与碳酸氢根含量等均呈显著正相关关系。

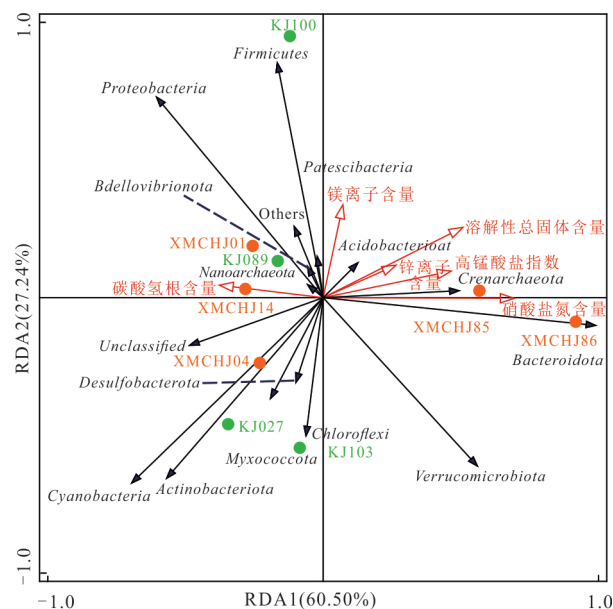


图7 微生物群落与环境因子的冗余分析(RDA)

Fig.7 Redundancy analysis (RDA) of microbial communities and environmental factors

3 讨论

3.1 煤矿开采区地下水微生物组特征

废弃矿井水面临的主要环境问题有缺氧环境导致的氮、磷元素无法被吸收转化以及铁、硫酸盐和难降解有机物过量等。作为XMCHJ组和KJ组优势类群的变形菌门(Proteobacteria),是细菌中最大的门类,广泛存在于土壤、水体等自然环境中,也是厌氧消化处理污水的常用细菌类群(Juretschko *et al.*, 2002)。Yue *et al.* (2018)发现,变形菌门(Proteobacteria)中的 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)和 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)对水环境中氮营养盐的去除发挥了关键作用,且随着氮元素形态和浓度的变化,变形菌门(Proteobacteria)微生物的代谢活性也会随之改变。有研究表明,在煤矿开采过程中,地下水体中普遍存在的硝化细菌在有氧条件下能够进行硝化反应,闭坑停采后,封闭采空区水位逐渐上升,氧气被消耗,环境转为厌氧环境,反硝化作用占据主导地位(Bomberg *et al.*, 2015),地下水中的氮营养盐被大量消耗。这可能也是研究区地下水环境中硝酸盐整体含量较低的原因。XMCHJ01、XMCHJ04和XMCHJ14样本中占比较高且隶属于 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)的草地土杆菌属(*Chthonobacter*),被发现对土壤中的Cd污染有一定的抵抗力,其相对丰度与土壤中Cd

和DDT浓度显著相关,可以用作Cd和DDT的潜在降解菌(Li *et al.*, 2022)。在KJ组中占比较高且隶属于 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)的短波单胞菌属(*Brevundimonas*),在铜胁迫下可以通过分泌植物生长促进因子(促进植物对铜的吸收)和自身生物吸附两种途径来去除环境中的Cu污染(Rathi and Yogalakshmi, 2021);同时,短波单胞菌属(*Brevundimonas*)对去除废水中含有的喹啉等难降解有机物有显著功效(Wang *et al.*, 2015)。放线菌门(Actinobacteriota)在各组中分布相对均匀,其下属的专性嗜酸菌可以进行脱同化铁还原反应,*Olsenella* sp. 可以参与地下水环境中的Fe(III)富集过程(Lentini *et al.*, 2012)。在XMCHJ01、XMCHJ04和XMCHJ14取样点分布着较多的蓝细菌门(Cyanobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi),均为能够在厌氧条件下进行光合作用的细菌门类。据报道,水环境中的绿弯菌门(Chloroflexi)可以依靠环烷烃单加氧酶来降解难降解的有机物(Saw *et al.*, 2020),Wasmund *et al.* (2016)还发现部分绿弯菌门(Chloroflexi)的分支具有还原硫酸盐的代谢潜力。

XMCHJ组的指示物种土源黄杆菌(*Flavobacterium terrigena*),在XMCHJ85和XMCHJ86中维持着较高的相对丰度。黄杆菌属(*Flavobacterium*)不仅具有与铜耐受相关的基因,还拥有与囊多糖生物合成和组装相关的基因,可以参与细胞壁合成、调节信号分子传导等细胞生命过程(Chen *et al.*, 2021)。KJ组的特征物种芽孢杆菌目(Bacillales)是一类分布广泛、对外界有害因子抵抗力强的类群,在恶劣环境中能够产生大量孢子以待条件适宜时再次萌发、分裂和繁殖。研究表明,芽孢杆菌(Bacillales)可产生核糖体/非核糖体合成的抗菌肽以及包括聚酮类在内的多种生物防治代谢物(Abriouel *et al.*, 2011)。KJ组的另一指示物种甲基球菌科(Methylococcaceae)也备受关注。相关研究表明,虽然编码甲醇脱氢酶xoxF的序列来自多种细菌类群,但编码颗粒甲烷单加氧酶pMMO的基因仅与甲基球菌科(Methylococcaceae)有关,这意味着,即使多个细菌类群能够参与甲醇氧化成甲醛的过程,但只有甲基球菌科(Methylococcaceae)可以完成甲烷降解的第一步,即将甲烷氧化为甲醇(Taubert *et al.*, 2019)。

3.2 煤矿开采区地下水微生物组的共存模式

微生物生态网络模式与其对生存环境的适应性密切相关,甚至相比微生物群落结构,微生物生

态网络特征对环境变量的敏感度更高,更能反映环境变化对微生物群落的影响(Liu *et al.*, 2021). 相比 XMCHJ 组, KJ 组微生物网络的平均加权度和平均聚类系数更高,表明 KJ 组种间相关性更强,相互作用更复杂,对外界环境变化具有缓冲作用,群落稳定性好(Zhang *et al.*, 2018). 网络节点之间的相关关系可直观反映微生物群落间的相互作用模式,分为正相互作用和负相互作用. 前者多指代微生物种间的合作关系,后者则表示物种间的竞争关系(Zhang *et al.*, 2018). 分子生态网络的拓扑结构参数中(图 6 和表 2), XMCHJ 组的负相关系数为 32.32%, 而 KJ 组负相关系数为 0, 说明饮用水井地下水环境相对良好, 种间负相互作用驱动了群落组成和功能的稳定, 而 KJ 组微生物群落多为正向合作关系, 表明废弃矿井地下水环境更为恶劣, 群落之间需要协同合作来共同应对极端寡营养环境(Ma *et al.*, 2021).

本研究还利用网络拓扑参数分析了研究区微生物群落的关键物种. XMCHJ 组和 KJ 组的优势物种和关键物种多来自变形菌门(Proteobacteria). γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)的不动杆菌属(*Acinetobacter*)具有降解正烷烃、芳香族化合物(Adebusoye *et al.*, 2007)等碳氢化合物的能力, α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)的鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)也能够生物降解芳香化合物, β -变形菌纲(Betaproteobacteria)的氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)能够参与地下水的反硝化反应(Chung *et al.*, 2007), 这些对于煤矿开采区地下水环境的生态修复具有重要意义. 拟杆菌门(Bacteroidota)是缺氧环境下降解水体有机污染的主要成员之一, 其下属的黄杆菌属(*Flavobacterium*)部分菌种具有降解苯并(α)芘等有机化合物的功能(Jung *et al.*, 2021). 研究区属于煤矿开采区地下水, 具有含氧量低以及污染物含量高等特点, 这可能是拟杆菌门(Bacteroidota)成为关键物种的原因之一.

3.3 煤矿开采区地下水微生物对污染环境的响应

特定的生态环境对微生物种群具有明显的选择作用, 能够适应栖息地环境的微生物存活下来, 形成特有的群落组成并发挥相应的代谢功能. 在长期演变过程中, 微生物群落的结构及功能体现了其对环境变化的响应(张怀胜等, 2023). 由于 XMCHJ 组环境中氧气含量相对 KJ 组更高, 饮用水井受氧含

量的影响, XMCHJ01、XMCHJ04 和 XMCHJ14 样本中需氧的草地土杆菌属(*Chthonobacter*)丰度较高; 不需光照且可降低环境中多环芳烃和重金属污染的短波单胞菌属(*Brevundimonas*)则在废弃矿井中占比较高. 微生物与所处环境相互作用、相互调节, 微生物群落通过影响环境中的各个因子来维持生境的稳定(张攀等, 2022). 多项研究表明, 在寒冷环境中分离的微生物可以帮助植物应对冷胁迫(Tiryaki *et al.*, 2019), 从而有助于维持冷环境条件下植物的多样性. Peixoto *et al.* (2016) 也发现南极地区与植物相关的微生物大多具有异源性代谢、色氨酸代谢和肌醇代谢等功能, 其中肌醇是一种环状的六碳六元醇, 对生物应对恶劣环境具有重要的调节作用. 本文研究区的甲基红色杆菌属(*Methylorubrum*)也被发现可以增强植物对环境胁迫的耐受性, 这对当地地下水系统生态修复具有重要意义.

RDA 分析表明, 硝酸盐氮含量对研究区微生物群落结构具有显著影响. 硝酸盐是微生物重要的营养物质和电子受体, 对缺氧环境中的氮循环和电子转移具有重要影响(Wang *et al.*, 2020). 在研究区地下水中, 泉古菌门(Crenarchaeota)和拟杆菌门(Bacteroidota)与硝酸盐氮含量呈显著正相关关系, 同时泉古菌门(Crenarchaeota)与溶解性总固体含量也呈显著正相关关系. 泉古菌门(Crenarchaeota)作为古菌的两大主要类群之一, 代表着位于系统发育树根部最原始的古菌类群. 研究表明, 不仅细菌通过多种途径参与氮循环, 古菌也可以驱动氮循环的还原过程, 如泉古菌门(Crenarchaeota)中部分类群可编码氨单加氧酶 *amoA* 基因; 且通过对 *amoA* 基因丰度和转录本丰度的分析, 发现即使在正常土壤环境中, 氨氧化古菌的活性也可能高于氨氧化细菌(Prosser and Nicol, 2008). 古菌通常是极端环境中的主导微生物类群, 因此研究区地下水环境中泉古菌门(Crenarchaeota)可能对硝酸盐还原和无机氮代谢过程极为重要(Cabello *et al.*, 2004). 同时有研究表明, 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)可以通过利用环境中的 CO_2 来补充有机碳的不足, 这对延长环境中的碳循环周期具有重要影响(Chen *et al.*, 2023). Brzoska *et al.* (2022) 发现部分拟杆菌门(Bacteroidota)菌株不仅可以编码一氧化氮还原酶(*qNOR*)基因, 还可能具有与砷、铜、镉、等重金属抗性相关的基因. 这对重金属污染严重地区(如废弃煤矿井、工业用地等)的氮循环系统具有重大意义.

Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 是地下水环境中常见的阳离子,多为地下水从周围岩体或土体浸出而来。 Zn^{2+} 与研究区大部分微生物群落呈负相关关系。Huang *et al.* (2021)发现在极酸性矿井排水中 Mg^{2+} 与好氧化学体萎缩和暗铁氧化的潜在代谢功能呈显著正相关,与固氮和硫化物暗氧化潜在代谢功能呈负相关。 HCO_3^- 是地下水环境常见的阴离子, Li *et al.* (2020)发现,水中 HCO_3^- 的存在有利于甲基红色杆菌属(*Methylobacterium*)、食甲基菌(*Methylovorus*)和甲基娇养杆菌(*Methylothermus*)等具有甲烷氧化能力的细菌类群的代谢。在研究区地下水中 HCO_3^- 含量与纳古菌门(Nanoarchaeota)和变形菌门(Proteobacteria)都呈正相关关系,且与纳古菌门(Nanoarchaeota)的正相关关系更为显著。据报道,纳古菌门(Nanoarchaeota)在极端环境中可能会寄生于极端嗜热的泉古菌门(Crenarchaeota),同时其基因组可以编码完整的糖异生途径,而且在缺氧条件下还可以积累足够的还原态低电位铁氧化蛋白,以在 HCO_3^- 存在的情况下支持乙酰辅酶A的羧化(Podar *et al.*, 2013)。这种特点可以使纳古菌门(Nanoarchaeota)即使在类似废弃煤矿井地下水等缺氧环境中也能获得足够的能量来维持细胞活性。

4 结论

本研究基于高通量测序技术探讨了河南新密某煤矿开采区饮用水井和废弃矿井地下水微生物群落结构与功能及其对环境的响应,系统揭示了煤矿开采区地下水中微生物的多样性、群落结构、潜在功能、种间相互作用及其与环境因子之间的关系。研究区饮用水井和废弃矿井地下水微生物在属水平群落组成上差异较大,参与多种关键细胞过程(如细胞信号传导、增殖、分化和细胞凋亡)的ATP结合蛋白在饮用水井的微生物中丰度更高,而废弃矿井水中微生物之间的联系更为紧密,微生物通过种间协同作用来共同抵御极端寡营养环境。硝酸盐氮、溶解性总固体和 Mg^{2+} 是影响环境微生物群落的主控因子。在地下水生态修复过程中,要同时关注多个环境因子对微生物群落的影响以及微生物对栖息环境的响应,以达到环境友好的治理效果。

References

Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Ben Omar, N., et al., 2011. Diversity and Applications of *Bacillus* Bacterio-

cins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1): 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>

Adebusoye, S. A., Ilori, M. O., Amund, O. O., et al., 2007. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons in a Polluted Tropical Stream. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8): 1149–1159. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9345-3>

Bomberg, M., Arnold, M., Kinnunen, P., 2015. Characterization of the Bacterial and Sulphate Reducing Community in the Alkaline and Constantly Cold Water of the Closed Kotalahti Mine. *Minerals*, 5(3): 452–472. <https://doi.org/10.3390/min5030452>

Brzoska, R. M., Edelmann, R. E., Bollmann, A., 2022. Physiological and Genomic Characterization of Two Novel Bacteroidota Strains *Asinibacterium* SPP. OR43 and OR53. *Bacteria*, 1(1): 33–47. <https://doi.org/10.3390/bacteria1010004>

Cabello, P., Roldán, M. D., Moreno-Vivián, C., 2004. Nitrate Reduction and the Nitrogen Cycle in Archaea. *Microbiology*, 150(11): 3527–3546. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27303-0>

Chang, F., He, S. S., Dang, C. Y., 2022. Assisted Selection of Biomarkers by Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) in Microbiome Data. *Journal of Visualized Experiments*, (183): e61715. <https://doi.org/10.3791/61715>

Chen, J. Y., Li, Q., He, Q. F., et al., 2023. Influence of $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ on Microbial Communities in Two Karst Caves with High CO_2 . *Journal of Earth Science*, 34(1): 145–155. <https://doi.org/10.1007/s12583-020-1368-9>

Chen, W. M., You, Y. X., Young, C. C., et al., 2021. *Flavobacterium Difficile* Sp. Nov., Isolated from a Freshwater Waterfall. *Archives of Microbiology*, 203(7): 4449–4459. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02440-1>

Chung, B. S., Ryu, S. H., Park, M., et al., 2007. *Hydrogenophaga Caeni* Sp. Nov., Isolated from Activated Sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 5): 1126–1130. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64629-0>

Fillinger, L., Hug, K., Griebler, C., 2019. Selection Imposed by Local Environmental Conditions Drives Differences in Microbial Community Composition across Geographically Distinct Groundwater Aquifers. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(11): f12160. <https://doi.org/10.1093/femsec/f12160>

Hasheela, I., Schneider, G. I. C., Ellmies, R., et al., 2014. Risk Assessment Methodology for Shut - Down and

- Abandoned Mine Sites in Namibia. *Journal of Geochemical Exploration*, 144: 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.05.009>
- Hua, C. Y., Zhou, G. Z., Yin, X., et al., 2018. Assessment of Heavy Metal in Coal Gangue: Distribution, Leaching Characteristic and Potential Ecological Risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32): 32321–32331. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3118-4>
- Huang, Y., Li, X. T., Jiang, Z., et al., 2021. Key Factors Governing Microbial Community in Extremely Acidic Mine Drainage (pH<3). *Frontiers in Microbiology*, 12: 761579. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.761579>
- John, D. E., Rose, J. B., 2005. Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater. *Environmental Science & Technology*, 39(19): 7345–7356. <https://doi.org/10.1021/es047995w>
- Jung, D. M., Kim, Y. S., Bang, J. H., et al., 2021. *Flavobacterium Hydrocarbonoxydans* Sp. Nov., Isolated from Polluted Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10): 005053 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005053>
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., et al., 2002. The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1): 84–99. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00093>
- Lebedeva, E., Chelnokov, G., Bragin, I., et al., 2019. Microorganisms of Various Ecological-Trophic Groups in the Saline Ground Waters of Primorsky Region (Distribution, Number, Participation in Accumulation of Microelements). *E3S Web of Conferences*, 98: 02006. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20199802006>
- Lentini, C. J., Wankel, S. D., Hansel, C. M., 2012. Enriched Iron(III) - Reducing Bacterial Communities are Shaped by Carbon Substrate and Iron Oxide Mineralogy. *Frontiers in Microbiology*, 3: 404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00404>
- Li, D., Zheng, X. X., Lin, L., et al., 2022. Remediation of Soils Co-Contaminated with Cadmium and Dichlorodiphenyltrichloroethanes by King Grass Associated with Piriformospora Indica: Insights into the Regulation of Root Excretion and Reshaping of Rhizosphere Microbial Community Structure. *Journal of Hazardous Materials*, 422: 126936. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126936>
- Li, S., Zhang, Y. L., Yin, S. Q., et al., 2020. Analysis of Microbial Community Structure and Degradation of Ammonia Nitrogen in Groundwater in Cold Regions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(35): 44137–44147. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10318-w>
- Liu, Z. Q., Wei, H., Zhang, J. E., et al., 2021. Higher Sensitivity of Microbial Network than Community Structure under Acid Rain. *Microorganisms*, 9(1): 118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010118>
- Ma, L. Y., Huang, S. S., Wu, P. Y., et al., 2021. The Interaction of Acidophiles Driving Community Functional Responses to the Re-Inoculated Chalcopyrite Bioleaching Process. *The Science of the Total Environment*, 798: 149186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149186>
- Merino, N., Jackson, T. R., Campbell, J. H., et al., 2022. Subsurface Microbial Communities as a Tool for Characterizing Regional-Scale Groundwater Flow. *Science of the Total Environment*, 842: 156768. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156768>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., et al., 2014. STAMP: Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles. *Bioinformatics*, 30(21): 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Peixoto, R. J. M., Miranda, K. R., Lobo, L. A., et al., 2016. Antarctic Strict Anaerobic Microbiota from Deschampsia Antarctica Vascular Plants Rhizosphere Reveals High Ecology and Biotechnology Relevance. *Extremophiles*, 20(6): 875–884. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0878-y>
- Podar, M., Makarova, K. S., Graham, D. E., et al., 2013. Insights into Archaeal Evolution and Symbiosis from the Genomes of a Nanoarchaeon and Its Inferred Crenarchaeal Host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Biology Direct*, 8: 9. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-9>
- Prosser, J. I., Nicol, G. W., 2008. Relative Contributions of Archaea and Bacteria to Aerobic Ammonia Oxidation in the Environment. *Environmental Microbiology*, 10(11): 2931–2941. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01775.x>
- Rathi, M., Yagalakshmi, K. N., 2021. *Brevundimonas Diminuta* MYS6 Associated Helianthus Annuus L. for Enhanced Copper Phytoremediation. *Chemosphere*, 263: 128195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128195>
- Reddy, A. G. S., Kumar, K. N., 2010. Identification of the Hydrogeochemical Processes in Groundwater Using Ma-

- for Ion Chemistry: A Case Study of Penna-Chitravathi River Basins in Southern India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 170(1): 365–382. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1239-4>
- Saw, J. H. W., Nunoura, T., Hirai, M., et al., 2020. Pangenomics Analysis Reveals Diversification of Enzyme Families and Niche Specialization in Globally Abundant SAR202 Bacteria. *mBio*, 11(1): e02975–e02919. <https://doi.org/10.1128/mBio.02975-19>
- Taubert, M., Grob, C., Crombie, A., et al., 2019. Communal Metabolism by Methylococcaceae and Methylophilaceae is Driving Rapid Aerobic Methane Oxidation in Sediments of a Shallow Seep near Elba, Italy. *Environmental Microbiology*, 21(10): 3780–3795. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14728>
- Tiryaki, D., Aydın, İ., Atıcı, Ö., 2019. Psychrotolerant Bacteria Isolated from the Leaf Apoplast of Cold-Adapted Wild Plants Improve the Cold Resistance of Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) under Low Temperature. *Cryobiology*, 86: 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.11.001>
- Wang, C. R., Zhang, M. R., Cheng, F. L., et al., 2015. Biodegradation Characterization and Immobilized Strains' Potential for Quinoline Degradation by *Brevundimonas* Sp. K4 Isolated from Activated Sludge of Coking Wastewater. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(1): 164–170. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.952615>
- Wang, W. P., Li, Z. Y., Zeng, L. Y., et al., 2020. The Oxidation of Hydrocarbons by Diverse Heterotrophic and Mixotrophic Bacteria that Inhabit Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. *The ISME Journal*, 14: 1994–2006. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0662-y>
- Wasmund, K., Cooper, M., Schreiber, L., et al., 2016. Single-Cell Genome and Group-Specific *dsrAB* Sequencing Implicate Marine Members of the Class *Dehalococcoidia* (Phylum *Chloroflexi*) in Sulfur Cycling. *mBio*, 7(3): e00266–e00216. <https://doi.org/10.1128/mBio.00266-16>
- Yue, X., Yu, G. P., Lu, Y. Q., et al., 2018. Effect of Dissolved Oxygen on Nitrogen Removal and the Microbial Community of the Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite Process in a Submerged Aerated Biological Filter. *Bioresource Technology*, 254: 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.044>
- Zhang, B. G., Zhang, J., Liu, Y., et al., 2018. Co-Occurrence Patterns of Soybean Rhizosphere Microbiome at a Continental Scale. *Soil Biology and Biochemistry*, 118: 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.12.011>
- Zhang, H. S., Wang, M. Y., Cai, W. T., et al., 2023. Characteristics of Microbial Community Composition and Environmental Response in Deep Fluorinated Groundwater. *Earth Science*, 48(9): 3466–3479 (in Chinese with English abstract).
- Zhang, L., Xu, Z. M., Sun, Y. J., et al., 2022a. Coal Mining Activities Driving the Changes in Microbial Community and Hydrochemical Characteristics of Underground Mine Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(20): 13359. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013359>
- Zhang, P., Xie, X. J., Li, Q. H., et al., 2022. Microbial Community Structure and Its Response to Environment in Mangrove Sediments of Dongzhai Port. *Earth Science*, 47(3): 1122–1135 (in Chinese with English abstract).
- Zhang, Y. J., Feng, G. R., Zhang, M., et al., 2016. Residual Coal Exploitation and Its Impact on Sustainable Development of the Coal Industry in China. *Energy Policy*, 96: 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2016.06.033>

中文参考文献

- 张怀胜, 王梦园, 蔡五田, 等, 2023. 深层含氟地下水微生物群落组成及环境响应特征. *地球科学*, 48(9): 3466–3479.
- 张攀, 谢先军, 黎清华, 等, 2022. 东寨港红树林沉积物中微生物群落结构特征及其对环境的响应. *地球科学*, 47(3): 1122–1135.