

## 矿区排土场复垦区玉米根际土壤真菌遗传多样性研究

刘宝勇<sup>1</sup>, 王丽莎<sup>1</sup>, 常敬华<sup>2\*</sup>, 程微<sup>2</sup>

(1. 辽宁工程技术大学环境科学与工程学院, 辽宁阜新 123000; 2. 辽宁工程技术大学理学院, 辽宁阜新 123000)

**摘要** [目的]研究矿区排土场复垦区和普通种植区土壤真菌多样性的差异。[方法]以阜新海州露天矿排土场复垦区玉米田土壤(K1区)、阜新市太平区下洼子村玉米田土壤(F1区)为研究对象,分析土壤的理化性质并利用基因组测序分析复垦区和对照区真菌多样性的差异。在此基础上,对复垦区和对照区样本中的真菌进行分离、纯化和分子鉴定,并分析可培养真菌的多样性。[结果]K1区和F1区土壤有效磷、速效钾、pH呈显著性差异,碱解氮和有机质呈非显著性差异;K1区的物种丰富度和均匀度均低于F1区,K1区鉴定出19个真菌属,而F1区共鉴定出52个真菌属,真菌的预测功能K1区比F1区少11种;K1区分离鉴定的真菌以青霉属(*Penicillium* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.)真菌为主,F1区分离鉴定的真菌以青霉属(*Penicillium* sp.)和木霉属(*Trichoderma* sp.)真菌为主。[结论]该研究为矿区生态修复、土壤改良提供理论依据和实践指导。

**关键词** 排土场复垦区;理化性质;真菌多样性;土壤改良

**中图分类号** S154.3 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2020)21-0063-07

**doi**:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.21.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on Genetic Diversity of Fungi in Maize Rhizosphere Soil in Reclaimed Area of Mining Dump

LIU Bao-yong<sup>1</sup>, WANG Li-sha<sup>1</sup>, CHANG Jing-hua<sup>2</sup> et al (1. School of Environmental Science and Engineering, Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000; 2. College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000)

**Abstract** [Objective] To study the differences in soil fungal diversity in the mining area's wasteland reclamation area and ordinary planting area. [Method] Taking the cornfield soil (K1 area) in the reclamation area of Fuxin Haizhou open-pit mine dumping field and the cornfield soil (F1 area) in Xiawazi Village, Taiping District, Fuxin City as the research objects, the physical and chemical properties of the soil were analyzed and the differences in fungal diversity in the reclamation and control areas were analyzed using genomic sequencing. Based on this, the fungi in the samples from the reclamation area and the control area were isolated, purified and molecularly identified and the diversity of culturable fungi was analyzed. [Result] The soil available phosphorus, available potassium and pH in the K1 and F1 areas showed significant differences, while the alkaline hydrolysis nitrogen and organic matter showed non-significant differences; the species richness and uniformity in K1 area were lower than those in F1 area. 19 fungal genera were identified in K1 area, and 52 fungal genera were identified in F1 area. The predictive function of fungi in K1 area was 11 less than that in F1 area. *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. were the main fungi isolated and identified in K1 area, while *Penicillium* sp. and *Trichoderma* sp. were the main fungi isolated and identified in F1 area. [Conclusion] The study provides theoretical basis and practical guidance for ecological restoration and soil improvement in mining areas.

**Key words** Reclaimed area of mining dump; Physical and chemical properties; Fungal diversity; Soil improvement

阜新露天矿是亚洲第一大露天煤矿,已因资源枯竭而关闭,但由于长期的开采造成生态环境破坏严重,矿区周边排土场土壤重金属含量升高,土壤养分流失,严重影响了排土场复垦区作物的生长<sup>[1-2]</sup>。对矿区排土场的生态重建工作一直是近年来国内众多专家和学者所关注和研究的热点之一。现代农业复垦是对排土场综合治理的重要手段之一。目前我国大部分农业复垦以传统土木工程复垦为主,但传统复垦方式使地表的土壤经过了机械压实,从而使土壤的孔隙度变小,团粒结构也受到了破坏,严重影响了植物根系在复垦地表土壤中的生长和延伸;利用生物复垦能高效恢复和提高土壤的质量和肥力、改善土壤团粒结构、促进土壤生物多样性,从而实现矿区排土场生态修复与土地可持续利用<sup>[3]</sup>。目前,微生物复垦技术已成为国内外研究的前沿和热点。微生物复垦技术与传统复垦方式相比具有技术费用低、复垦效果

好、不会造成二次污染、操作简单等优点<sup>[4]</sup>。土壤真菌生物多样性是影响土壤品质和作物生长的重要因素。Bacon等<sup>[5]</sup>研究发现,感染了木霉菌(*Trichoderma* sp.)的植物和玉米种子被人食用后,可以有效减轻体内的镰刀菌毒素对人体及其动物和牲畜的健康危害。曲霉属(*Aspergillus* sp.)和镰刀菌属(*Fusarium* sp.)真菌是玉米整个生命周期中最主要的致病菌,单格孢属(*Ulocladium* sp.)、链格孢属(*Alternaria* sp.)、木霉属(*Trichoderma* sp.)在我国玉米的生长初期较为多见<sup>[6]</sup>。枝顶孢属真菌(*Acremonium zeae*)可以在土壤中产生多种抗生素,对玉米病原菌串珠镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*)的繁殖和生长起到抑制作用<sup>[7]</sup>。农业中,有害植物真菌的大量积累会直接引起农作物产量的降低,有益植物真菌具有促进农作物植株生长、防治有害真菌及吸附土壤中重金属的作用<sup>[8]</sup>。

因此,对阜新矿区排土场复垦区和普通种植区玉米根际土壤中真菌遗传多样性进行分析,探讨相同的气候和不同土壤条件下真菌遗传多样性的关系和差异,并对2个类型土壤中的真菌进行分离、纯化和鉴定。研究结果有利于完善阜新矿区农业废弃地复垦的方法,有助于降低采矿过程带来的环境微生物污染和促进矿区土地微生物资源的合理利用,同时为同类型的矿区复垦区的土壤改良与治理提供参考,也为阜

**基金项目** 国家重点研发计划“重大自然灾害监测预警与防范”重点专项(2017YFC1503100);科技部基础性工作专项重点项目(2013FY113400)。

**作者简介** 刘宝勇(1975—),男,辽宁葫芦岛人,副教授,博士,从事水土保持与矿山环境工程方面的教学与科学研究;王丽莎(1992—),女,辽宁丹东人,硕士研究生,研究方向:生态修复理论与技术。刘宝勇和王丽莎是共同第一作者。\*通信作者,讲师,博士,从事真菌及真菌毒素控制技术研究。

**收稿日期** 2020-03-30; **修回日期** 2020-04-21

新矿区农业废弃地土壤生态环境的恢复与治理的研究提供理论依据和实践指导。

## 1 材料与方法

**1.1 研究区概况** 阜新市海州露天矿排土场复垦区地处辽宁省西北部低山丘陵区(121°40′12″E,41°57′36″N),总面积约为13 km<sup>2</sup>,排土场区域呈阶梯状,沟壑纵横,陡坎坡平均坡度45°,盘面海拔平均为270 m,相对高差为3~60 m,最高处接近325 m,最低处不低于240 m,年均气温6.5~7.5℃,年均降水量420~540 mm,年均无霜期154 d,≥0℃活动积温3 647℃·d,≥10℃活动积温3 377℃·d。复垦区种植的玉米植株矮化,不结穗或畸形穗,几乎颗粒无收。

阜新市太平区下洼子村距海州露天矿排土场复垦区5 km,与露天矿排土场复垦区气候相同,玉米长势良好,籽粒饱满。

**1.2 土壤样品采集与分析** 于2018年8月分别对阜新海州露天矿排土场复垦区(K1区)和太平区下洼子村对照区(F1区)的玉米种植地的土壤多点取样。K1区和F1区分别设计5个采样点,每个采样点在10 m×10 m的范围内按对角线法取5个子样品(2 cm宽、5 cm深的土壤),混合为1个样品,土壤样本用冰盒保鲜带回。带回的样品过1 mm筛,一部分置于-80℃冰箱保存备用,一部分放于4℃冰箱中保存以便近期试验使用,其余样品自然风干,用于土壤理化性状分析。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 土壤性质测定方法。**K1区和F1区的土壤pH采用pH计法测定(LY/T 1239—1999);碱解氮采用碱解扩散法测定;速效钾采用酸溶法测定;K1区酸性土壤有效磷采用氟化铵-盐酸浸提法测定,F1区的中性土壤有效磷采用碳酸氢钠浸提法测定(LY/T 1228—2015);有机质采用容量分析法测定(LY/T 1237—1999)。

**1.3.2 土壤真菌DNA提取及高通量测序。**采用SDS方法对土壤样本的基因组DNA进行提取并检测纯度和浓度,随后对目标片段进行PCR扩增及PCR产物回收纯化,之后使用TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行文库构建及荧光定量,由北京诺禾致源生物信息技术有限公司利用Illumina NovaSeq测序平台对该文库进行双末端测序(Paired\_End)分析。PCR扩增所用的引物为ITS5-1737F;5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′和ITS2-2043R;5′-CAACTCTTAGCGGTGGAT-3′。

**1.3.3 土壤真菌的分离、纯化与分子鉴定。**采用稀释平板法对土壤真菌进行培养,所用培养基为添加链霉素的PDA培养基,利用无菌接种环挑取菌落边缘菌丝接种于新的平板中进行分离,培养3~5代,确保获得纯化菌株。

将纯化菌株接种于PDA平板上,28℃避光培养5~7 d。挑取菌丝体置于无菌研钵,液氮研磨。参照真菌基因组DNA小量提取试剂盒步骤进行操作,得到提取出的DNA溶液,-20℃保存备用。PCR扩增引物为ITS1(TCCGTAGGT-GAACCTGCGC)和ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC);PCR扩增反应程序:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸90 s,共35个循环,72℃最后延伸7 min。由青岛派森诺生物科技有限公司利用Illumina Mi Seq测序平台进行双端测序分析。

**1.4 数据处理** 采用Microsoft Excel 2010对土壤理化指标进行数据处理和显著性差异分析。

测序数据分析首先对原始数据(Raw reads)进行拼接、过滤,得到Clean Tags,Clean Tags经过嵌合体的去除得到有效数据(Effective Tags),然后利用Uparse软件对有效数据进行聚类,默认以97%的一致性(identity)将序列聚类成为OTUs(operational taxonomic units),同时会选取OTUs的代表性序列,依据其算法原则,筛选OTUs中出现频数最高的序列作为OTUs的代表序列。对OTUs序列进行物种注释,用Mothur方法与SILVA132的SSUrRNA数据库进行物种注释分析(设定阈值为0.8~1.0),获得分类学信息并分别在各个分类水平统计各样本的群落组成。使用MUSCLE软件进行快速多序列比对,得到所有OTUs代表序列的系统发生关系。

使用Qiime软件(Version 1.9.1)计算Observed-otus、Chao1、Shannon、Simpson、ACE、Goods\_coverage、PD\_whole\_tree指数,使用R软件(Version 2.15.3)绘制稀释曲线、等级聚类曲线,并使用R软件进行Alpha多样性指数组间差异分析。

## 2 结果与分析

**2.1 土壤理化分析** 土壤的理化性质是影响微生物多样性和作物生长的重要因素。因此,分别对复垦区(K1区)和对照区(F1区)的5个土壤样品进行理化指标分析,结果见表1。从表1可以看出,K1区和F1区的碱解氮和有机质差异不显著,F1区的有效磷显著高于K1区,速效钾远低于K1区,且K1区土壤呈酸性,pH为5.75±0.14。研究认为,酸性

表1 土壤理化性质组成

Table 1 Composition of soil physical and chemical properties

采样区域 Sampling area	碱解氮 Alkaline nitrogen mg/kg	有效磷 Available phosphorus mg/kg	速效钾 Available potassium mg/kg	有机质 Organic matter mg/kg	pH
K1区 K1 area	92.2±3.2 a	23.3±7.3 a	176.0±20.1 aA	15.8±3.1 a	5.75±0.14 a
F1区 F1 area	91.1±2.7 a	49.4±6.5 b	55.2±10.3 bB	19.1±2.7 a	6.74±0.23 b

注:同列不同大写字母表示不同区域土壤差异极显著( $P<0.01$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different capital letters in the same column indicate extremely significant difference in different regions soils ( $P<0.01$ ), and different lowercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ )

土壤严重影响作物对土壤营养的吸收,其中碱解氮、速效钾在 pH 为 6~8 时有效性最高,有效磷在土壤 pH 为 5.5~7.5 时有效性最大,玉米生长最适的土壤 pH 为 6.0~7.5<sup>[9]</sup>。因此,复垦区土壤 pH 偏低可能是影响微生物多样性和玉米生长状况及产量的重要因素。

## 2.2 土壤真菌遗传多样性分析

**2.2.1 土壤真菌  $\alpha$  多样性指数和物种多样性曲线。**对样本在 97% 一致性阈值下的  $\alpha$  多样性指数 (Shannon、Simpson、Chao1、ACE、Goods\_coverage、PD\_whole\_tree) 进行统计,见表 2。从表 2 可以看出,F1 区土壤样品中真菌群落的  $\alpha$  多样性指数 Shannon、Simpson、Chao1、ACE 和 PD\_whole\_tree 均显著高于 K1 区。

表 2 土壤真菌  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Soil fungus  $\alpha$  diversity index

采样区域 Sampling area	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods_coverage	PD_whole_tree
K1 区 K1 area	1.787 b	0.468 b	194.559 b	199.063 b	1.000 a	61.573 b
F1 区 F1 area	5.697 a	0.954 a	554.804 a	558.404 a	1.000 a	119.985 a

注:同列不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

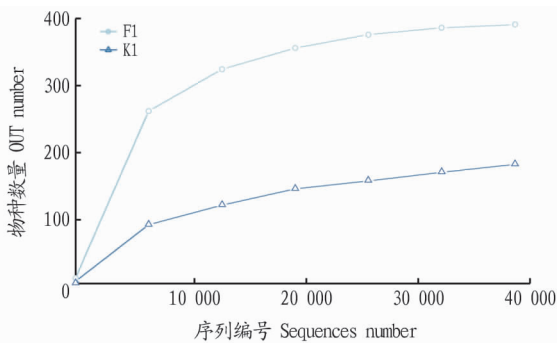


图 1 稀释曲线

Fig. 1 Dilution curve

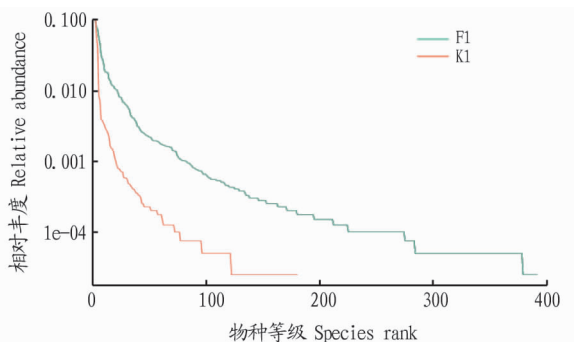


图 2 等级聚类曲线

Fig. 2 Hierarchical clustering curve

**2.2.2 真菌群落共有及特有 OTUs 分析。**将稀有的、丰度值低于全体样本总测序量 1/100 000 (0.001%) 的 OTU 去除,在全部样本中共检测出 OTU 的数量为 602 个,把去除稀有 OTU 丰度的矩阵用于后续研究。根据聚类得到 OTUs 结果,分析不同样本(组)之间共有、特有的 OTUs,绘制成韦恩(Venn)图(图 3)。K1 区与 F1 区经研究分别检测到 185 和

从样本中随机抽取一定测序量的数据,统计它们所代表物种数目(即 OTUs 数目),以抽取的测序数据量与对应的物种数来构建稀释曲线,见图 1。K1 区样本的真菌物种稀释曲线 OUT 数量在 100~200 逐渐趋向平坦,F1 区样本的真菌物种稀释曲线 OUT 数量在 500 以上逐渐趋向平坦,说明两区测序样本数量合理并且数量充足,测序数量逐渐趋于饱和,且 F1 区真菌物种数量比 K1 区更丰富。将样本中 OTUs 的排序编号和 OTUs 中的相对丰度绘制成 Rank Abundance 曲线,见图 2。K1 区样本的真菌等级聚类曲线的跨度较小,总 OTUs 数量接近 200;F1 区样本的真菌等级聚类曲线的跨度较大,总 OTUs 数量在 500~600,说明 F1 区的物种丰富度和均匀度均高于 K1 区。

554 个 OTU,其中共有 OUT 数为 137 个,K1 区与 F1 区特有的 OTU 数分别为 48 和 417 个。

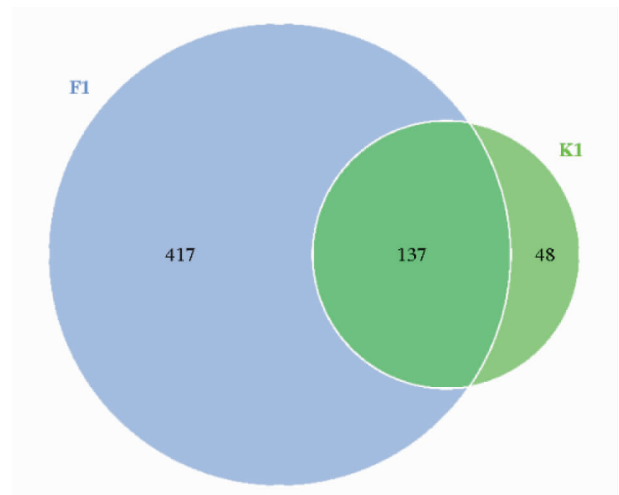


图 3 复垦区与对照区真菌 OTUs 的 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of fungus OTUs in the study area and control area

**2.2.3 真菌物种门水平相对丰度分析。**根据物种注释结果,选取每个样本或分组在各分类水平(Phylum、Class、Order、Family、Genus)上最大丰度排名在前的物种,生成物种相对丰度柱形累加图,以便直观查看各样本在不同分类水平上相对丰度较高的物种及其比例。以门水平物种相对丰度柱形图为例展示如下(图 4),其中 F1 区除未知菌门(47.6%)外,依次为子囊菌门(Ascomycota)38.5%、被孢菌门(Mortierellomycota)6.8%、担子菌门(Basidiomycota)5.9%、球囊菌门(Glomeromycota)0.7%、壶菌门(Chytridiomycota)0.3%、被孢霉门(Mucoromycota)0.1%、捕虫霉门(Zoopagomycota)0.1%;K1 区以担子菌门(Basidiomycota)为主(72.2%),其次

为未知菌门 22.8%、子囊菌门(Ascomycota)4.1%、被孢菌门(Mortierellomycota)0.5%、壶菌门(Chytridiomycota)0.3%、捕虫霉门(Zoopagomycota)0.1%。K1区与F1区相比,缺少了球囊菌门和被孢霉门。

**2.2.4 真菌物种水平丰富度分析。**为了进一步研究属水平物种的系统进化关系,通过多序列比对得到 top100 属的代表序列的系统发生关系(图5)。其中,K1区鉴定出 19 个属,除未知种属 24.2%外,主要为粪伞科(Bolbitiaceae)未知属 72.0%、煤炱目(Capnodiales)未知属 0.8%、毛球壳科(Lasio-sphaeriaceae)*Echria* sp. 属 0.7%、毛壳菌属(*Chaetomium* sp.) 0.5%、镰刀菌属(*Fusarium* sp.) 0.4%、青霉属(*Penicillium* sp.) 0.4%、被孢霉科(Mortierellaceae)未知属 0.4%、赤霉属(*Gibberella* sp.) 0.3%、*Rhizophlyctis* sp. 属 0.3%;而F1区共鉴定出 52 个属,除未知菌属 61.8%外,主要为赤霉属(*Gibberella* sp.) 8.0%、绿僵菌属(*Metarhizium* sp.) 6.2%、镰刀菌属(*Fusarium* sp.) 5.5%、青霉属(*Penicillium* sp.) 4.7%、被孢霉科(Mortierellaceae)未知属 3.9%、毛壳菌属(*Chaetomium* sp.) 3.1%、被孢霉属(*Mortierella* sp.) 2.8%、格孢菌目(Pleosporales)未知属 2.7%、*Solicocozyma* 属 1.3%。其中,煤炱目(Capnodiales)未

知属、毛球壳科(Lasio-sphaeriaceae)*Echria* sp. 属为K1区特有菌属,F1区除上述主要菌属外,另外还包括属于丛枝菌根的无梗囊霉属(*Acaulospora* sp.) 0.7%和木霉属(*Trichoderma* sp.) 真菌 0.6%等益生菌。从以上结果可以看出,K1区和F1区群落在属水平上差异显著。

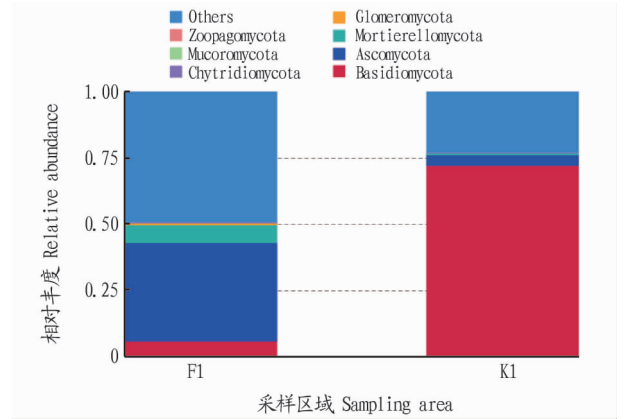
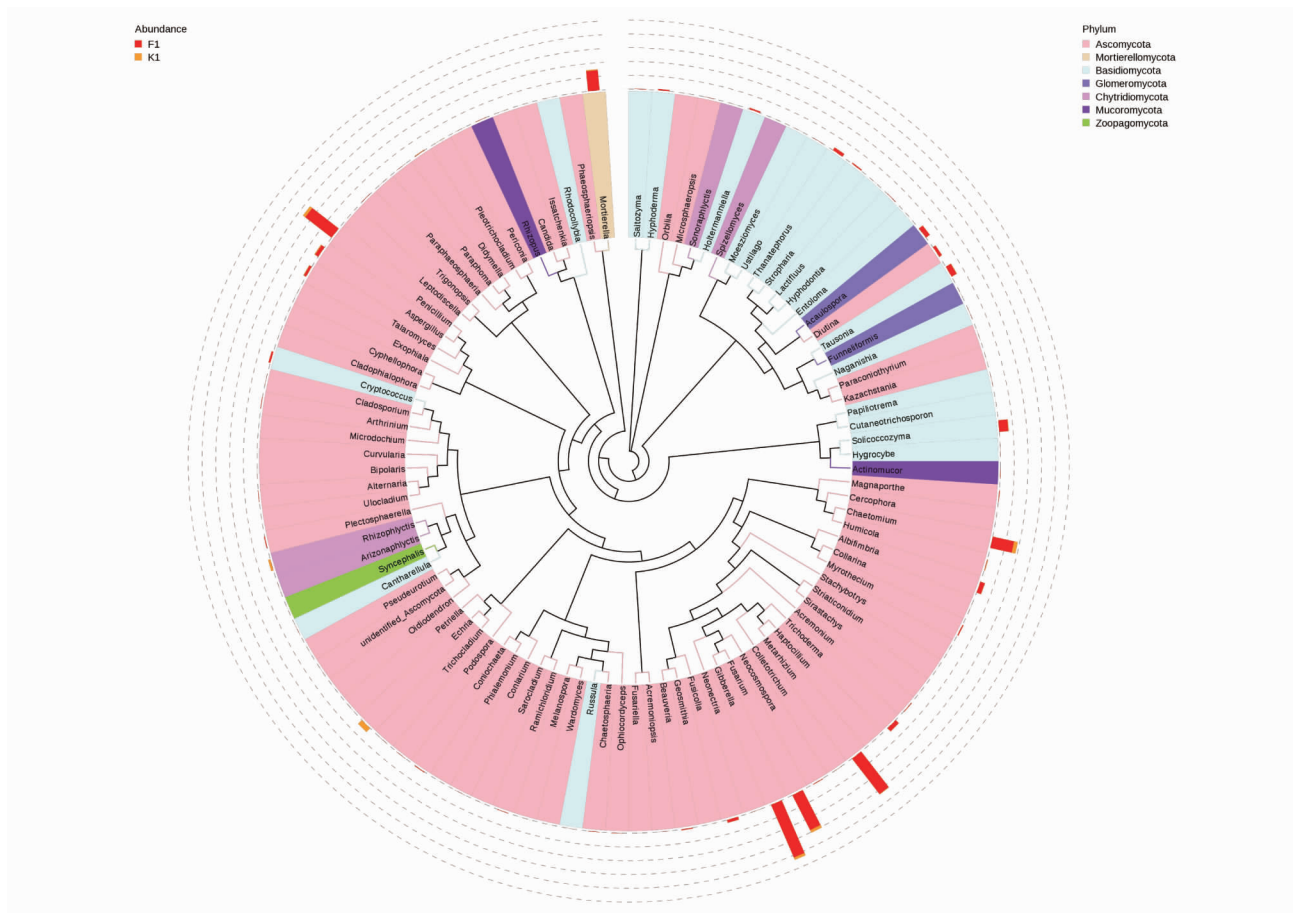


图4 门水平上的物种相对丰度  
Fig.4 Relative abundance of species at phylum level



注:分支的颜色表示其对应的门,每种颜色代表一个门

Note: The color of a branch indicates its corresponding phylum, and each color represents a phylum

图5 K1区与F1区土壤真菌属水平代表序列构建的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic trees constructed from the representative sequences of soil fungal genera in K1 and F1 regions

**2.2.5 土壤真菌功能预测。**利用 FunGuild 真菌环境功能数据库,基于扩增子分析得到的物种信息,分析 K1 区和 F1 区真菌物种在环境中的生态功能,见图 6。K1 区依次主要为未定义功能(97.6%)、未定义腐生物(1.1%)、粪腐-未定义腐生物-木腐生物(0.5%)、植物病原-土壤-木腐生物(0.4%)、植物病原(0.3%)、动物病原(0.1%)。F1 区真菌依次主要为未

定义功能(64.1%)、未定义腐生物(11.7%)、植物病原(8.8%)、动物病原(6.4%)、植物-病原-土壤-木腐生物(5.4%)、粪腐-未定义腐生物-木腐生物(3.0%)、丛枝菌根(0.6%)。K1 区真菌功能范围与 F1 区相比,K1 区比 F1 区少 11 种功能,其中更是缺少了具有重要生态学功能的丛枝菌根。

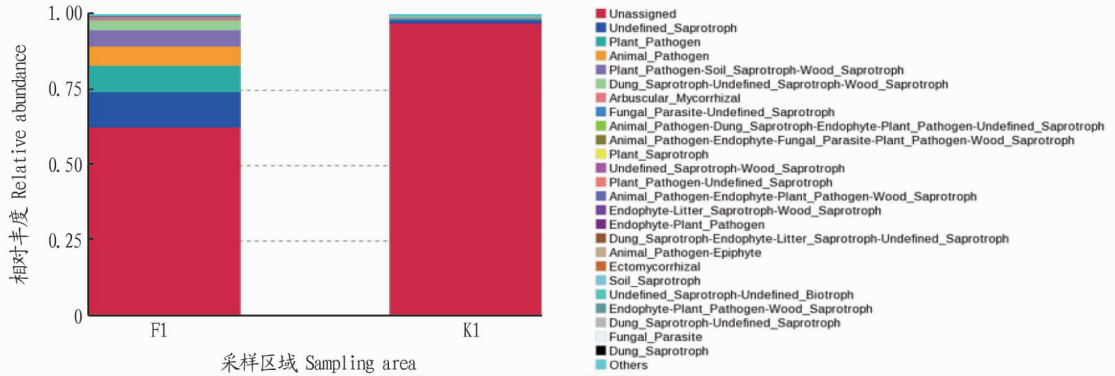


图 6 FunGuild 功能注释相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of FunGuild function annotation

## 2.3 土壤真菌的分离纯化和分子鉴定

**2.3.1 土壤真菌的分离纯化。**在对土壤真菌多样性分析的基础上,对土壤中的真菌进行分离和纯化,进一步分析土壤

中可培养菌种的多样性。K1 区分离纯化出真菌菌株 97 株, F1 区分离纯化出真菌菌株 124 株。分离所得的部分不同形态的真菌如图 7 所示。

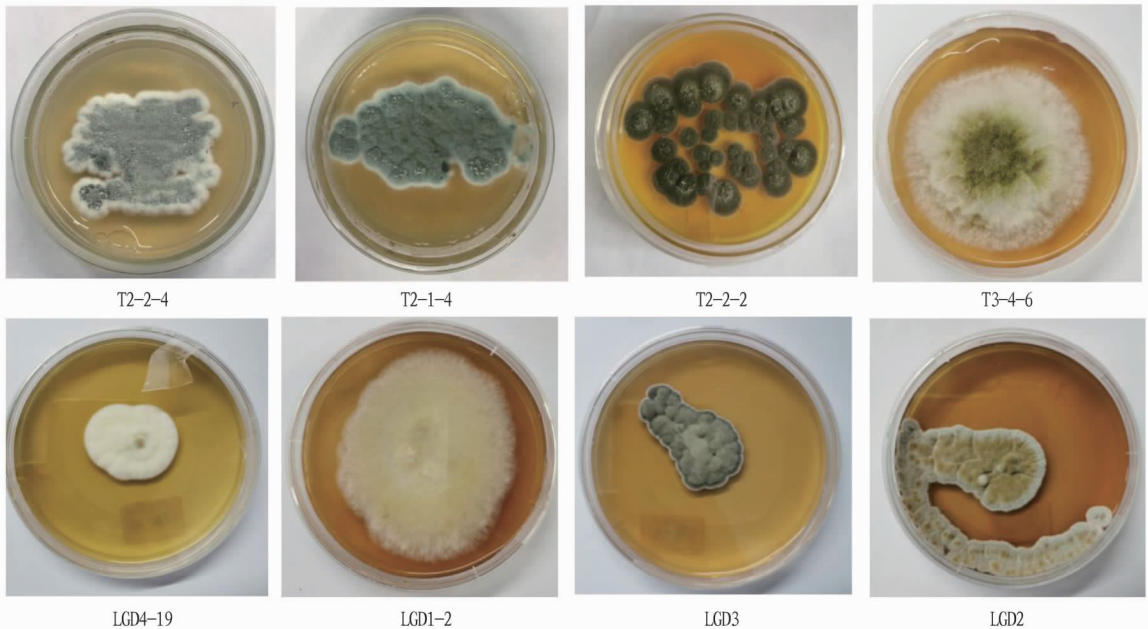


图 7 部分土壤真菌的形态

Fig. 7 Morphological of some soil fungi

**2.3.2 DNA 提取、测序。**对分离的土壤真菌进行 DNA 提取,部分土壤真菌 rDNA ITS 序列电泳图见图 8。取各个菌种纯化后的 PCR 产物进行 DNA 测序。用 NCBI Blast 程序将拼接后的序列文件与 NCBI 核酸数据库中的数据进行了对比,得到与待测物种序列相似性最大的物种信息。其中,K1 区测序成功的菌种共 78 株,F1 区测序成功的菌株 98 株,部分菌种序列比对结果如表 3 所示。

*cillium* sp.) 真菌 32 株(42%),依次为草酸青霉(*P. oxalicum*) 9 株、微紫青霉(*P. janthinellum*) 7 株、波罗尼卡青霉(*P. polonicum*) 5 株、匍匐茎青霉(*P. stoloniferum*) 4 株、黄连青霉(*P. chrysogenum*) 3 株、拜莱青霉(*P. bilaiae*) 2 株、鲁本斯青霉菌(*P. rubens*) 1 株、橘灰青霉(*P. aurantiocandidum*) 1 株;镰刀菌属(*Fusarium* sp.) 真菌 22 株(28%),分别为三线镰刀菌(*F. tricinctum*) 5 株、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) 4 株、串珠镰刀菌(*F. verticillioides*/*G. moniliformis*) 13 株;链格孢霉(*Alternaria*

K1 区测序成功菌株分属 6 个种属,分别为青霉属(*Peni-*

sp.) 链格孢菌 (*A. alternata*) 真菌 8 株 (10%); 曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 菌核曲霉 (*A. sclerotioniger*) 真菌 8 株 (10%); 毛霉菌属 (*Mucor* sp.) 真菌 4 株 (5%), 分别为总状毛霉 (*M. racemosus*) 2 株、脆弱毛霉 (*M. fragilis*) 2 株; 木霉菌属 (*Trichoderma* sp.) 真菌 4 株 (5%), 分别为棘孢木霉 (*T. asperellum*) 2 株、拟康宁木霉 (*T. koningiopsis*) 1 株、哈茨木霉 (*T. harzianum*) 1 株。F1 区测序成功的菌株分属 6 个种属, 依次为青霉菌属 (*Penicillium* sp.) 真菌 56 株 (57%), 分别为草酸青霉 (*P. oxalicum*) 34 株、黄连青霉 (*P. chrysogenum*) 12 株、卧青霉 (*P. decumbens*) 5 株、二毒霉青霉 (*P. dipodomycicola*) 5 株; 哈茨木霉 (*T. harzianum*) 真菌 28 株 (29%); 镰刀菌属 (*Fusarium* sp.) 藤仓镰刀菌 (*F. fujikuroi*) 真菌 5 株 (5%); 枝孢菌属 (*Cladosporium* sp.) 真菌 4 株 (4%), 分别为 *C. Perangustum* 2 株、枝状枝孢菌属 (*C. cladosporioides*) 2 株; 曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 霉白曲霉属 (*A. niveus*) 真菌 2 株 (2%); 链格孢霉属 (*Alternaria* sp.) 链格孢菌 (*A. alternata*) 真菌 2 株 (2%); 毛孢子菌属 (*Trichosporon* sp.) 阿萨希毛孢子菌属 (*T. asahii*) 真菌 1 株 (1%)。从测序结果来看, K1 区和 F1 区分离的菌株在种类和数量上存在一定的差别。

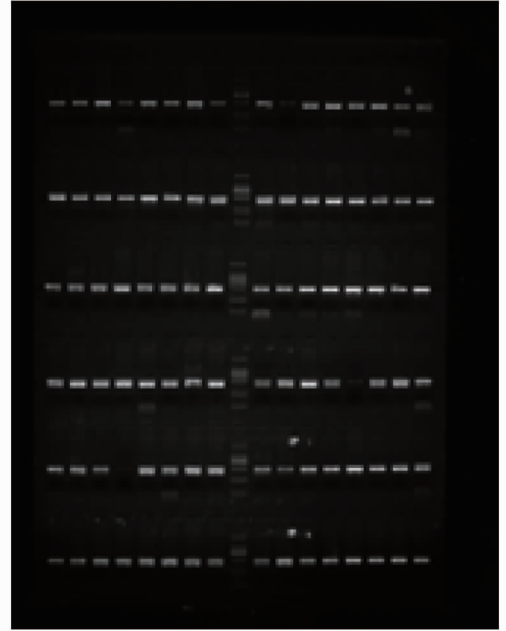


图 8 部分真菌 ITS 序列 PCR 扩增电泳图

Fig. 8 Electrophoretogram of ITS sequence PCR amplification of some fungi

表 3 部分土壤真菌分子鉴定序列对比

Table 3 Comparison of molecular identification sequences of some soil fungi

编号 No.	K1 区菌种 K1 area strains	相似度 Similarity %	登录号 Genbank	编号 No.	K1 区菌种 K1 area strains	相似度 Similarity %	登录号 Genbank
T3-2-4	草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i>	99	MF379648.1	LGD3-9	草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i>	99	MK163534.1
T3-1-1	微紫青霉 <i>Penicillium janthinellum</i>	99	KM268705.1	LGD4-8	草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i>	99	KF152942.1
T2-1-16	波罗尼卡青霉菌 <i>Penicillium polonicum</i>	99	KC329622.1	LGD3-8	草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i>	98	MK036020.1
T2-2-5	匍匐茎青霉 <i>Penicillium stoloniferum</i>	99	MH865730.1	LGD4-20	草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i>	98	MK967559.1
T3-3-10	黄连青霉菌 <i>Penicillium chrysogenum</i>	98	KR011764.1	LGD4-1	草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i>	97	MF379648.1
T2-4-6	拜莱青霉 <i>Penicillium bilaiae</i>	98	LN901118.1	LGD5-3	黄连青霉菌 <i>Penicillium chrysogenum</i>	99	MK967560.1
T2-2-1	鲁本斯青霉菌 <i>Penicillium rubens</i>	98	KU216703.1	LGD2-18	卧青霉 <i>Penicillium decumbens</i>	98	GU082484.1
T2-4-5	橘灰青霉 <i>Penicillium aurantiocandidum</i>	97	MH861314.1	LGD4-9	二毒霉青霉 <i>Penicillium dipodomycicola</i>	99	FJ025172.1
T3-3-9	三线镰刀菌 <i>Fusarium tricinctum</i>	99	JX179207.1	LGD1-5	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>	99	MH393371.1
T2-1-5	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	98	MH789984.1	LGD1-6	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>	98	KU696482.1
T2-3-4	串珠镰刀菌 <i>Fusarium Verticillioides</i>	97	MK790049.1	LGD1-1	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>	98	MK109810.1
T3-4-4	互隔交链孢霉 <i>Alternaria alternata</i>	99	MK370629.1	LGD1-2	藤仓镰刀菌 <i>Fusarium fujikuroi</i>	99	KJ000432.1
T3-4-6	菌核曲霉 <i>Aspergillus sclerotioniger</i>	99	XM_025607228.1	LGD2-1	<i>Cladosporium Perangustum</i>	99	MH141236.1
T2-5-3	总状毛霉 <i>Mucor racemosus</i>	98	AJ271061.1	LGD3-1	枝状枝孢菌 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	98	MF475950.1
T2-1-11	脆弱毛霉 <i>Mucor fragilis</i>	98	MK910073.1	LGD-4-13	霉白曲 <i>Aspergillus niveus</i>	99	MH865243.1
T3-2-3	棘孢木霉 <i>Trichoderma asperellum</i>	99	KU170978.1	LGD4-19	霉白曲霉 <i>Aspergillus niveus</i>	99	AY373853.1
T2-1-9	拟康宁木霉 <i>Trichoderma koningiopsis</i>	98	MK430436.1	LGD2-20	链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i>	99	MN394880.1
T3-2-7	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>	98	JX473716.1	LGD5-1	阿萨希毛孢子菌 <i>Trichosporon asahii</i>	99	KP132862.1

### 3 讨论

**3.1 土壤理化性质对真菌多样性的影响** 土壤真菌群落是有机物质分解和提高土壤生物物质含量的主要来源和组成部分<sup>[10]</sup>, 是土壤健康的重要生物学指标。同时, 土壤中有有机微生物真菌群落的多样性又受到了土壤有机质、pH、C、N、P 及养分有效性等土壤环境因素的直接影[11]。该研究中发现, 虽然样品采集地具有相同的自然气候和土壤条件, 但复垦区的土壤受阜新排土场的影响, 其土壤速效钾、有效磷、pH

与对照区具有显著的差别, 使其真菌的组成、数量、群落生态结构和功能也与对照区相差较大。该研究中对土壤真菌多样性的研究及对真菌的分离纯化同样发现, 复垦区土壤中的有益菌种类和数量均远低于对照区, 而土壤中致病菌的数量和比例却远高于对照区。因此, 研究认为复垦区土壤 pH 偏低等环境因素是造成土壤有益微生物真菌数量减少, 有机质分解及 N、P、K、S 等多种营养元素的生态循环能力降低, 植物有害真菌滋生的重要原因, 从而造成了复垦区玉米植株矮

化和不结穗。因此,阜新矿区复垦区的土壤改良和生态恢复初期,还是应该充分结合传统改良和其他化学改良的方法,如适当增施农家肥、种植耐酸作物(主要如豆类、荞麦等)以及适当增加喷施石灰调节土壤的耐酸性,从而有利于改善土壤的通透性,促进微生物的多样性。

此外,重金属的污染与土壤真菌的多样性密切相关,土壤中的重金属积累到一定程度,会严重影响微生物的种类和数量,进而影响土壤的呼吸作用<sup>[12]</sup>。但某些微生物在重金属污染的土壤中能够生长且对重金属具有一定的解毒作用<sup>[13]</sup>。煤矿的开采,使得矿区及周边地区土壤重金属污染普遍较为严重<sup>[14-16]</sup>,该研究从 K1 区分离的真菌也验证了这一点。K1 区分离出的紫微青霉、草酸青霉、拜莱青霉以及链格孢霉等都是具有土壤重金属吸附作用的典型土壤微生物<sup>[17-18]</sup>。

**3.2 复垦区与对照区真菌多样性差异** 从复垦区与对照区土壤真菌  $\alpha$  多样性指数和土壤真菌物种均匀度多样性指数的曲线可以看出,F1 区的土壤真菌物种丰富度和均匀度均明显高于 K1 区。从真菌物种门水平和属水平相对丰度分析来看,在门水平上,F1 区真菌门数比 K1 区多 2 个门。在属水平上,F1 区比 K1 区多 32 个属,F1 区属的分布比例相对均匀,而 K1 区则严重不平衡。其中 K1 区优势属为粪伞科未知属 72.0%,除去未知种属 24.2%,其余种属比例均小于 1.0%。同时,K1 区缺少了丛枝菌根的无梗囊霉属和木霉属等益生菌属。从真菌的分离情况看,F1 区真菌以青霉属和木霉属真菌为优势菌,K1 区以青霉属和镰刀菌属真菌为优势菌,大多数木霉菌和青霉菌为作物益生菌,而镰刀菌是重要的致病菌。因此,K1 区真菌种类少和比例的不平衡严重影响土壤性能和作物的生长,在利用真菌对土壤进行改良和生态修复时应关注增加真菌多样性的方法和益生菌的利用。

**3.3 应用前景分析** 利用微生物进行生态修复是未来发展的战略方向,复垦区和对照区的真菌生态多样性的关系和差异研究最终为阜新矿区复垦区及相似矿区的土壤改良及生态多样性的恢复工作提供了研究的基础。因此,研究中复垦区和对照区分离纯化的有益真菌为利用微生物进行土壤研究和应用提供了有效资源。目前,开发含有木霉和青霉的微生物制剂和菌株是近年来广泛应用于土壤改良的重要研究方法<sup>[19]</sup>。解晓燕<sup>[20]</sup>发明的一种含有哈茨木霉的菌剂,可以有效增加复垦区的作物产量,改良作物土壤,改善作物的品质,同时对其他具有土传病害的病原菌生长具有较好的抑制性和防治效果;薛应钰等<sup>[21]</sup>通过复合诱变明显提高木霉菌株的溶磷促生能力,为土壤改良及开发多功能木霉制剂提供了资源;唐磊<sup>[22]</sup>研究认为棘孢木霉菌既能提高青蒿的产量,还可提高青蒿素的含量;李学平等<sup>[23]</sup>研究发现草酸青霉具有显著地改善土壤品质、促进玉米生长的功能。

此外,研究人员还认为青霉属、木霉属、枝状枝孢菌属、链格孢属的某些真菌对土壤重金属物质具有显著的吸附作用。段靖禹等<sup>[17]</sup>研究发现青霉菌与土壤生物碳的复合修复作用可以有效地降低土壤中砷的含量;杜爱雪等<sup>[24]</sup>研究发现青霉菌 A1 可有效地改变铬污染土壤中铜和镉离子的多种

化学性质存在和形态;叶斌晖等<sup>[18]</sup>研究发现通过分步处理可以有效地提高草酸青霉 SL2 对高浓度铬和镉污染土壤的总利用铬 TCr 淋出率等;Costa 等<sup>[25]</sup>研究发现链格孢属(*Alternaria*)可以有效地吸附水溶液中的二氧化镍和镉离子;宋瑛瑛等<sup>[26]</sup>研究发现枝状枝孢菌(*Cladosporium*)可吸附铅离子。该试验中分离出的真菌含有上述几乎所有真菌类型,该研究为阜新矿区复垦区土壤改良和生态修复提供了重要的资源和研究方向。

#### 4 结论

阜新海州露天矿排土场复垦区(K1区)和对照区(F1区)土壤理化性质的不同,尤其是复垦区土壤呈酸性是影响 2 个地区微生物多样性和作物生长的重要因素。K1 区的物种丰富度和均匀度均低于 F1 区。在门水平上,K1 区与 F1 区相比,缺少了球囊菌门和被孢霉门;在属水平上,K1 区共鉴定出 19 个属,F1 区共鉴定出 52 个属。功能预测发现,K1 区真菌功能比 F1 区少 11 种。K1 区分离鉴定的真菌以青霉属(*Penicillium* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.)真菌为主,F1 区分离鉴定的真菌以青霉属(*Penicillium* sp.)和木霉属(*Trichoderma* sp.)真菌为主。研究详细分析了 K1 区和 F1 区土壤真菌多样性的差异,并对真菌进行了分离、纯化和鉴定。2 个地区真菌多样性的差异和有益真菌的有效利用,可为阜新海州露天矿排土场复垦区的生态修复以及土壤改良提供坚实的理论依据和精准的实践指导。

#### 参考文献

- [1] TEIXEIRA E C, ORTIZ L S, ALVES M F C C, et al. Distribution of selected heavy metals in fluvial sediments of the coal mining region of Baixo Jacuí, RS, Brazil [J]. *Environmental geology*, 2001, 41(1/2): 145-154.
- [2] 刘巍, 杨建军, 汪君, 等. 准东煤田露天矿区土壤重金属污染现状评价及来源分析[J]. *环境科学*, 2016, 37(5): 1938-1945.
- [3] 王红新, 李富平, 张军. 矿区微生物复垦技术综述[J]. *金属矿山*, 2004(Z1): 96-99.
- [4] 何小燕. 工业区土壤重金属污染的微生物-植物联合修复技术初探[D]. 长沙: 中南林学院, 2005: 9-10.
- [5] BACON C W, YATES I E, HINTON D M, et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize [J]. *Environmental health perspectives*, 2001, 109(S2): 325-332.
- [6] PEREYRA C, PENA G, CAVAGLIERI L, et al. Influence of poultry feed processing on mycobiota and ochratoxin and citrinin co-occurrence [J]. *Revista brasileira de medicina veterinária*, 2009, 31(1): 51-58.
- [7] 卢东升, 王金平, 谢正萍. 豫南茶叶叶部真菌病害及病原鉴定[J]. *河南农业科学*, 2008, 37(8): 95-98.
- [8] VAN ELSAS J D, GARBEVA P, SALLES J F. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens [J]. *Biodegradation*, 2002, 13(1): 29-40.
- [9] 徐雪雪, 王东, 秦舒浩, 等. 沟垄覆膜连作马铃薯根际土壤真菌多样性分析[J]. *水土保持学报*, 2015, 29(6): 301-306, 310.
- [10] LI P, MA L, FENG Y L, et al. Diversity and chemotaxis of soil bacteria with antifungal activity against *Fusarium* wilt of banana [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2012, 39(10): 1495-1505.
- [11] 邓娇娇, 朱文旭, 周永斌, 等. 不同土地利用模式对辽东山区土壤微生物群落多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(7): 2269-2276.
- [12] 常海伟, 刘代欢, 贺前锋. 重金属污染农田微生物修复机理研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(2): 114-121.
- [13] 黄益宗, 郝晓伟, 雷鸣, 等. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(3): 409-417.
- [14] 郭星亮, 谷洁, 陈智学, 等. 铜川煤矿区重金属污染对土壤微生物群落代谢和酶活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(3): 798-806.
- [15] 李晓航, 张飞, 夏楠, 等. 新疆准东煤矿土壤重金属污染方法评价与分析[J]. *中国矿业*, 2016, 25(10): 74-80.

构,认真研究落实土地开发整理的相关政策,借鉴土地整理复垦项目工作的相关工作机制和方法,强化项目管理、规范项目运营,保证开发复垦工作优质、高效完成,确保耕地后备资源得以有效、可持续利用。

**4.2 拓展耕地后备资源开发资金筹备渠道** 静宁县耕地后备资源图斑比较破碎,分布区域零散,多位于偏远乡村,开发施工条件不便。耕地后备资源开发复垦投资大,投资途径相对单一,为了深入开展耕地后备资源开发复垦工作,相关部门要积极衔接,认真研究政策,探索多方位、多渠道筹集资金和实施开发复垦的新路子、新政策,加强政策支持,调动各方积极性。此外,根据资金情况,采用先易后难的开发策略,确保耕地后备资源开发有充足的资金保障。

**4.3 开发复垦与生态保护相结合** 静宁县地处黄土高原丘陵沟壑区,水土流失比较严重,生态环境脆弱。因此,在耕地后备资源开发利用时,要把生态保护放在首要位置,做到“在保护中开发,在开发中保护”<sup>[8]</sup>。在确保不破坏生态环境的前提下结合生态环境治理要求对后备资源宜耕则耕,宜林则林,禁止毁林开荒、陡坡开垦<sup>[9-10]</sup>。

**4.4 制定专项规划,加大宣传力度** 依托专业技术机构,借助先进的技术手段准确调查静宁县耕地后备资源基本情况,建立数据库,制定耕地后备资源开发复垦专项规划,为今后耕地后备资源的开发、复垦提供依据。在制定专项规划的同时,也要加强对耕地后备资源调查与开发的宣传,进一步明

确加强耕地后备资源开发复垦对社会经济各项事业可持续发展的重要意义,增强干部群众的认识水平,使各级政府、企业及个人认清耕地资源的严峻形势,能够积极主动地支持耕地后备资源开发复垦工作。

**4.5 加强宜耕后备资源的管护** 完善耕地后备资源开发利用制度,强化监督管理。对经综合评价可复垦为耕地的后备资源要加强管护,禁止任何组织或个人擅自建设永久性建(构)筑物,或者借退耕还林、产业结构调整的名义随意占用或蚕食耕地后备资源区域。

#### 参考文献

- [1] 帅春雨. 耕地后备资源调查评价分析:以正安县为例[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(22): 258-260.
- [2] 杨霞. 宜耕后备资源评价与限制性因素分析:以内蒙古杭锦旗为例[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(1): 286-288, 324.
- [3] 郭瑞. 县域耕地后备资源调查评价分析:以兰考县为例[J]. 国土与自然资源研究, 2019(3): 25-29.
- [4] 张祥. 康乐县不稳定耕地利用对策分析[J]. 甘肃科技, 2016(5): 8-9.
- [5] 沈锦君. 江南区耕地后备资源调查评价研究:以泰宁县为例[J]. 吉林农业, 2018(6): 65-67.
- [6] 林君强. 闽清县 2017 年度耕地后备资源调查评价研究[J]. 种子科技, 2018(5): 106-107, 109.
- [7] 杨振宇. 耕地后备资源评价方法研究[J]. 中国农业信息, 2015(20): 45-46.
- [8] 陈超, 曹磊. 中部五省低丘缓坡区耕地后备资源开发利用对策分析[J]. 中国农业资源与区划, 2013, 34(2): 37-42.
- [9] 雷云平. 山西省耕地后备资源开发复垦的对策研究[J]. 华北国土资源, 2016(1): 89, 91.
- [10] 李晓会, 南小康. 咸阳市耕地后备资源研究[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(3): 182-185.
- [11] 薛应钰, 叶巍, 杨树, 等. 高效溶磷木霉菌株复合诱变选育及促生作用[J]. 核农学报, 2018, 32(12): 2289-2297.
- [12] 唐磊. 棘孢木霉菌对青蒿生长及青蒿素含量的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [13] 李学平, 任加云, 邹美玲, 等. 一株耐盐解磷菌的解磷能力及对玉米敏感期生长的影响[J]. 水土保持研究, 2015, 22(5): 276-278.
- [14] 杜爱雪, 曹理想, 张仁铎. 青霉菌 A1 对土壤中  $\text{Cu}^{2+}$  化学形态的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 1786-1790.
- [15] COSTA F, TAVARES T. Bioremoval of Ni and Cd in the presence of diethylketone by fungi and by bacteria-A comparative study[J]. International biodeterioration & biodegradation, 2017, 120(5): 115-123.
- [16] 贾亚琪, 程志飞, 刘品祯, 等. 煤矿区周边农田土壤重金属积累特征及生态风险评价[J]. 土壤通报, 2016, 47(2): 474-479.
- [17] 段清禹, 李华, 马学文, 等. 青霉菌与生物炭复合修复土壤砷污染的研究[J]. 环境科学学报, 2019, 39(6): 1999-2005.
- [18] 叶斌晖, 罗亚婷, 龙碧波, 等. 草酸青霉 SL2 对高浓度铬污染土壤的生物淋洗及胞内铬形态转化研究[J]. 环境科学学报, 2018, 38(7): 2825-2833.
- [19] 解晓燕. 一种哈茨木霉和硅肥复配的菌剂及其应用: CN201610095332.1[P]. 2016-08-03.
- [20] 解晓燕. 一种海藻、哈茨木霉和枯草芽孢杆菌复合肥: CN201710827568.4[P]. 2017-11-24.
- [21] 宋瑛瑛, 王春燕, 杨玉荣, 等. 铅吸附深色有隔内生真菌的筛选及其吸附特性[J]. 环境科学学报, 2016, 36(5): 1630-1638.

(上接第 69 页)