

DOI: 10.11766/trxb202003160122

马静, 卢永强, 张琦, 李肖肖, 肖栋, 陈浮. 黄土高原采煤沉陷对土壤微生物群落的影响[J]. 土壤学报, 2021, 58(5): 1278–1288.
MA Jing, LU Yongqiang, ZHANG Qi, LI Xiaoxiao, XIAO Dong, CHEN Fu. Effects of Coal Mining Subsidence on Soil Microbial Community in the Loess Plateau[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(5): 1278–1288.

黄土高原采煤沉陷对土壤微生物群落的影响*

马静¹, 卢永强², 张琦², 李肖肖², 肖栋³, 陈浮^{1†}

(1. 中国矿业大学低碳能源研究院, 江苏徐州 221008; 2. 中国矿业大学环境与测绘学院, 江苏徐州 221116; 3. 中国矿业大学煤炭资源与安全开采国家重点实验室, 江苏徐州 221116)

摘要: 采矿对环境本底影响极大, 近自然恢复是唯一可行的手段。土壤微生物影响物质循环转化, 对生态恢复起重要作用。厘清土壤微生物群落如何适应和进化, 不同菌群之间如何互作, 哪些功能群更适应干旱、贫瘠的环境, 对提升矿山生态恢复力至关重要。利用高通量测序和分子生态网络方法探索东坪煤矿和大柳塔煤矿地表沉陷区土壤微生物群落结构与组成、主要种群及与环境因素间的互馈机制。结果表明: 沉陷环境对土壤微生物群落多样性、结构和分布模式影响显著, 但放线菌门 (Actinobacteria) 一直最为丰富。东坪煤矿分子生态网络互作关系较大柳塔煤矿更复杂、网络节点和连接数更多。前者的关键菌群属于放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和奇古菌门 (Thaumarchaeota), 后者的关键菌群属于变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria)。此外, 网络结构与土壤性状之间存在显著相关性。为适应矿山土壤营养贫瘠, 微生物种群间更偏向相互合作, 其中 *Holophagae* 与 *Aquabacterium* 为优势菌属, 或可助力矿山生态修复。

关键词: 地表沉陷; 群落多样性; 分子生态网络; 关键菌群; 生态恢复

中图分类号: Q938.1^{†1} **文献标志码:** A

Effects of Coal Mining Subsidence on Soil Microbial Community in the Loess Plateau

MA Jing¹, LU Yongqiang², ZHANG Qi², LI Xiaoxiao², XIAO Dong³, CHEN Fu^{1†}

(1. Low Carbon Energy Institute, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221008, China; 2. School of Environmental Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 3. State Key Laboratory of Coal Resources and Safe Mining, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: 【Objective】Mining activity has posed a great impact on the environmental background of the areas. To meet the challenge, the near-natural recovery method might be the only feasible way. Soil microorganisms not only affect the material cycling and transformation of soil substances, but also play an important role in the restoring ecological systems. So to improve resilience of the mining ecological system, it is essential to clarify how soil microbial communities adapt to the environment and

* 国家自然科学基金项目 (51974313, 41907405) 和江苏省自然科学基金项目 (BK20180641) 共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 51974313 and 41907405) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (No. BK20180641)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: chenfu@cumt.edu.cn

作者简介: 马静 (1982—), 女, 安徽淮北人, 博士, 副研究员, 主要从事土壤生态学研究。E-mail: jingma2013@cumt.edu.cn

收稿日期: 2020-03-16; 收到修改稿日期: 2020-05-28; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2020-07-29

evolve therein; how do different microbial groups interacted with each other; and which of their functional groups are more suitable for the arid and barren environments? Moreover, knowledge about interactions between soil microbial communities and their responses to coal mining subsidence are crucial to ecological restoration and resilience of the ecosystems in the semiarid and/or damaged mining areas. However, so far little has been done in this aspect. 【Method】 To explore the structures and compositions of soil microbial communities, and mechanisms of reciprocal feedback between the dominant microbial groups and the environment in the subsidence areas of the Dongping (DP) and Daliuta (DLT) Coal Mines, the methods of high-throughput sequencing and molecular ecological network were adopted. 【Result】 Results showed that the subsidence environment posed a significant impact on the diversity, structure and distribution of the soil microbial communities. Actinobacteria remained to be the dominant phylum in the DP and DLT Coal Mines, whereas DP had two more dominant phyla than DLT did, namely Nitrospira and Cyanobacteria. In the soil of DP, *RB41*, *Solirubrobacter*, *Roseiflexus*, *Gaiella* and *Lysobacter* were the genera > 1% in relative abundance, while in the soil of DLT, *Nocardioidea*, *RB41*, *Solirubrobacte* and *Roseiflexus* were. The molecular ecological networks in the soil of the DP Coal Mine interacted more complicatedly than those in the soil of the DLT Coal Mine, with more network nodes and connections. The soil microbial groups in the soil of the DP Coal Mine belonged to the phyla of Actinobacteria, Chloroflexi, and Thaumarchaeota, whereas the key species in the soil of the DLT Coal Mine were of the phyla of Proteobacteria and Actinobacteria. Moreover, significant relationships were observed between network structure and soil properties in both mining areas. For instance, among the DP networks, Modules 1, 2 and 3 were significantly and positively related to the soil EC, while module 2 was to the soil water content; Module 6 was significantly and positively related to soil available phosphorus, and Module 1 was to nitrate-nitrogen content; Modules 6 and 7 were significantly and positively related to soil dehydrogenase activity, while Modules 2 and 5 were to activity of soil urease. And among the DLT networks, Module 1 was significantly and positively related to pH and soil temperature, while Module 2 was to soil temperature only; Modules 1 and 2 were significantly and negatively related to soil water content and clay percent, whereas Module 5 was to nitrate-nitrogen content, but reversely. 【Conclusion】 In order to adapt to the nutritional infertility of the poor soil in the subsided mining areas, soil microbial communities tended to interact with each other. *Holophagae* and *Aquabacterium* were found to be the dominant species, and/or applicable to restoration of the ecological systems in the mining areas in the future.

Key words: Surface subsidence; Community diversity; Molecular ecological network; Key species; Ecological restoration

中国 50%煤炭产能位于生态脆弱的黄土高原, 采矿造成地表形变、沉陷、裂缝、滑坡, 加剧了水土流失、植被衰减、土壤退化和生物多样性锐减等问题^[1-3]。采煤每年损毁土地达 4.88 万 hm^2 , 累积损毁土地超 800 万 hm^2 。全域生态空间修复是新时代生态文明建设的重大任务之一, 但如此大规模的修复仅靠人工是无法实现的。为此, 激发矿山生态系统的自恢复能力倍受关注^[4]。土壤理化特征、种子库、微生物等多因素决定了生态系统的自恢复能力, 其中微生物对生态恢复起着重要的催化作用^[5]。半干旱受损矿山由于缺水、土壤贫瘠和环境污染等问题, 如仅实施植被重建、地形改造、土壤改良等工程, 而离开微生物参与, 则生态恢复潜力受限, 恢复效果和速率差^[1-3]。因此, 矿山生态修复必须重视土壤微生物演替、生态过程及其恢复潜力。

微生物是生态系统的关键组分, 在全球生态修

复、环境监测及污染治理、生物保护等方面具有重要的价值^[6-7]。近几年有关矿山土壤微生物的研究明显增多, 采煤扰动改变了土壤环境的立地条件, 不可避免地造成微生物适应性下降, 且微生物生物量亦呈下降态势^[8]。如, Chen 等^[9]发现, 内蒙古锡林郭勒采煤活动造成了土壤微生物多样性下降。煤矿开采带来的土壤破坏, 给微生物群落和相应的生态系统服务带来不利影响^[10]。Sun 等^[11]发现, 土壤微生物在采煤矿区塌陷后减少。Ezeokoli 等^[12]发现丛枝菌根真菌群落随着煤矿塌陷区复垦时间的增加而呈显著变化。矿山复垦则偏向积极作用。一些学者开始关注土壤微生物群落变化与环境要素之间的关系。Dimitriu 等^[13]报道了采矿干扰后土壤细菌群落结构和多样性的变化。此外, 不同物种之间的相互作用通常形成复杂的生态网络, 它控制着菌群组装, 从而影响了群落结构与功能^[14]。微生物菌属之间相

互作用对了解环境变化下微生物群落组装的动力学至关重要。尽管从全球图谱到特定环境微生物生态网络日益受关注,但对采矿沉陷环境中土壤微生物的相互作用知之甚少^[15]。

近十年高通量测序打开了微生物黑箱之门,但如何提取、分析与综合海量信息一直是难点^[16]。分子生态网络方法利用测序数据可视化表达微生物种群复杂的潜在互作关系,探索不同生态过程、生态功能稳定性与复杂性及关键类群作用^[17]。Zhou 等^[14]和 Luo 等^[18]使用该方法研究了 CO₂ 水平升高和土豆连作环境下土壤细菌种群在网络结构、互作关系、关键物种上联系和差异。采矿作为高强度扰动,势必影响土壤物质养分循环。探索微生物种群的互作关系、寻找适应沉陷环境的关键类群、厘清矿山微生物群落分布的主控因素,对重建矿山生态系统自恢复力至关重要^[19]。为此,选取黄土高原东坪煤矿、大柳塔煤矿采矿沉陷区作为研究对象,利用高通量测序技术和生态网络分析方法,探索在矿山干旱、贫瘠、污染等特定环境条件下土壤微生物的发育与适应状况、微生物种群与环境之间互作及互馈机制,寻找对生态自恢复起关键作用的功能类群,为黄土高原生态恢复和绿色矿山建设服务。

1 材料与方 法

1.1 研究区概况

黄土高原聚集了中国 50% 煤炭生产能力,资源储量丰富,开采历史悠久,生态破坏严重。本研究区选取东坪煤矿和大柳塔煤矿,二者均为黄土高原典型的采矿沉陷区。东坪煤矿位于山西省阳泉市盂县(113°15'E~113°18'E, 38°01'N~38°03'N),属于温带大陆性气候,年均气温 8.7℃,年均降水 450.0~550.4 mm。1982 年正式投产,多年采矿造成地表塌陷、裂缝纵横,水土流失严重,土壤贫瘠,植被覆盖下降,甚至形成裸地。大柳塔煤矿位于陕西省榆林市神木县(110°12'E~110°23'E, 39°13'N~39°22'N),属于温带大陆性气候,年均气温 8.6℃,年均降水 290.4~410.3 mm。1996 年正式开采,地下采空区占比 70%,长期开采造成地下水位下降,地表干砂层增厚,土壤含水率下降,灌木、草类大面积枯死。

1.2 样品采集与分析

2018 年 8 月 15 日—18 日在东坪煤矿(Dongping, 记为 DP)和大柳塔煤矿(Daliuta, 记为 DLT)沉陷区分别采集了 24 个样品。土壤水分(soil water content, SWC)、温度(soil temperature, ST)采用便携式温度湿度仪(TR-6, 广东顺科达, 广州)现场速测法测定。再五点采样法采集 0~10 cm 表土混合样 500 g, 使用无菌专用袋密封包装, 车载冰箱冷藏送回实验室处理。一份新鲜土样泡沫箱冷藏、密封后直接邮寄至上海派森诺测序, 另一份土样室内自然风干后剔除石砾、动植物残体, 磨碎过 100 目筛, 测定土壤理化和酶活性^[20-21]。

土壤 pH 和电导率(electronic conductivity, EC)采用电位法(水:土=1:5)测定(DDS-307A, 上海雷磁)。土壤机械组成和土壤黏粒占比(clay percent, CP)采用比重计法测定。土壤有机质(soil organic matter, SOM)采用重铬酸钾氧化—比色法测定, 土壤有效磷(available phosphorus, AP)采用碳酸氢铵浸提—钼锑抗比色法测定, 土壤速效钾(available potassium, AK)采用醋酸铵浸提—火焰光度计(TAS-990, 北京普析)法测定, 土壤铵态氮(ammonium nitrogen, AN)用氯化钾浸提—紫外分光光度法测定, 土壤硝态氮(nitrate-nitrogen, NN)用氯化钙浸提—紫外分光光度法测定^[20]。脱氢酶(dehydrogenase, DHG)活性采用氯化三苯基四氮唑法测定, 脲酶(urease, URA)活性用苯酚钠—次氯酸钠比色法测定, 蛋白酶(protease, PRO)活性用茚三酮比色法测定^[21]。

1.3 DNA 提取与纯化及 PCR 扩增和高通量测序

采用 E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 提取 48 个土壤样品的 DNA, 对 16S rRNA 的 V4 和 V5 区进行 PCR 扩增, 引物为 515F(5'-GTGCCAGCMGCCG CGGTAA-3')和 907R (CCGTCAATTCMTTTRA GTTT); 98℃预变性 2 min, 98℃变性 15 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 25 个循环, 72℃延伸 5 min, 降温至 10℃, 进行 PCR 扩增。再用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 扩增产物检测, 用凝胶回收试剂盒(Axygen, 美国)对目标片段进行切胶回收。按照前述电泳定量结果, 选取 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 荧光试剂, Microplate reader (FLx800, BioTek, 美国)定量仪器, 将 PCR 扩增回收产物进

行荧光定量，对各样本按等比混合。利用 Illumina 公司 (Illumina, 美国) 开发的文库制备试剂盒制备测序文库。构建好的合格文库，使用 HiSeq2500 PE2500 (Illumina, 美国) 进行上机测序，具体委托上海派森诺测序。

1.4 分子生态网络分析

选取 16S rRNA 测序数据使用 <http://ieg4.rccc.ou.edu/mena> 平台构建和统计分析土壤微生物分子生态网络,本研究共构建了 4 个网络^[14,17]。具体方法为:平行样本中的 OTU (operational taxonomic unit, 操作分类学单位) 数加和大于等于 120 的 OTU (前 75%) 按 log₁₀ 转换,计算 OTUs 之间的皮尔森 (Pearson) 相关系数,并转换为相似矩阵。选择最优相似阈值,利用每对节点之间的连接强度构成邻接矩阵,分析最近邻间距分布特征值预测分子生态网络。利用 Cytocape 3.7.1 软件可视化处理分子生态网络,一个网络被分成多个模块,每个模块代表一个功能单位。利用模块内连接度 (Z_i) 与模块间连接度 (P_i) 对网络节点功能进行划分。网络节点代表微生物群落中的种群或环境因子,节点之间的连接线代表物种或者环境因子之间的相互关系。

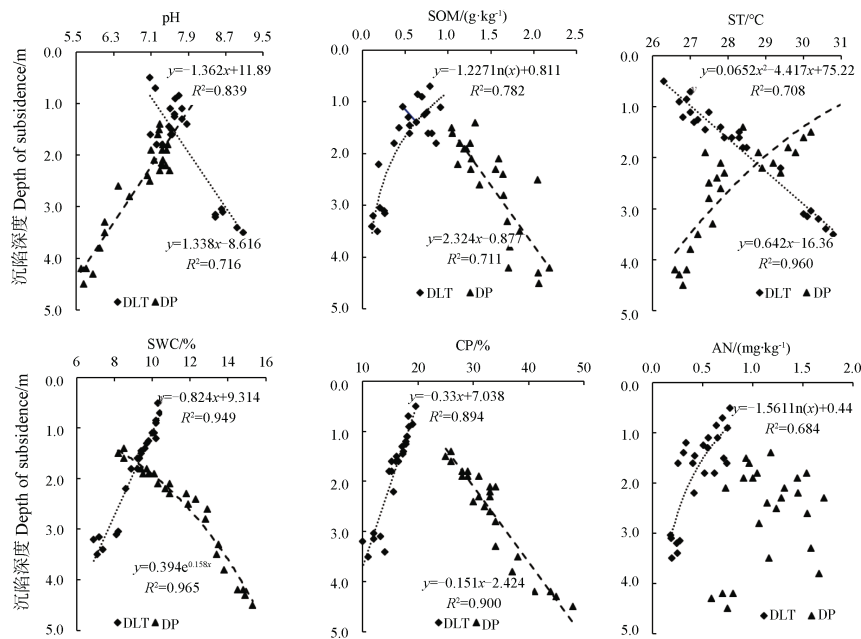
1.5 数据统计与处理

基于 galaxy 平台 (<http://mem.rcees.ac.cn.8080/>) 计算阿尔法 (Alpha) 多样性指数,并进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、非度量多维尺度 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 分析、典范对应分析 (canonical correspondence analysis, CCA)、曼特尔检验 (Mantel Test) 及热图分析。采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA, analysis of variance); 用 Origin9.0 软件绘制土壤微生物群落在不同分类水平上的丰度图。

2 结 果

2.1 采煤沉陷对土壤环境因子的影响

从图 1 可以看出,采煤沉陷对土壤环境因子产生了显著的影响,但不同的沉陷深度对土壤环境因子的影响程度不同,方向不一。DLT 沉陷区土壤 pH、土壤温度随沉陷深度变大,土壤有机质、含水率、温度随沉陷深度减小,土壤有机质、含水率、黏粒占比随沉陷深度变大,但 AN 呈随机分布。尽管 DLT 和 DP 均处黄土高原,但采煤沉陷造成的土壤环境



注: SOM: 土壤有机质; ST: 土壤温度; SWC: 土壤含水率; CP: 黏粒占比; AN: 铵态氮。下同。Note: SOM: Soil organic matter; ST: Soil temperature; SWC: Soil water content; CP: Clay percent; AN: Ammonium nitrogen. The same below.

图 1 东坪 (DP) 和大柳塔 (DLT) 煤矿采煤沉陷深度与土壤环境因子间的相互关系

Fig. 1 Relationships of depth of subsidence with soil environmental factors in the Dongping (DP) and Daliuta (DLT) Coal Mine

因子变化差异明显。地形特征与植被覆盖变化可能是重要因素, DLT 属内蒙草原, 地形平坦, 沉陷深处通常土壤沙化、植被退化、盐度上升, 沉陷浅处一般维持草或灌草; DP 则为丘陵区, 沉陷对其影响不明显, 但会造成坡面上部的拉伸、断裂以及下部的挤压。上部尽管沉陷深度小, 但根系和水份受损严重, 植被枯死。因此, DLT 和 DP 土壤环境因子对采煤沉陷表现为不同的响应。

2.2 采煤沉陷对土壤微生物群落结构和组成的影响

本研究 DP 全部 24 个样品共检测到 1 152 916 条有效序列, 每个样品序列数量介于 30 615~54 632 条。DLT 全部 24 个样品共检测到 902 912 条有效序

列, 每个样品序列数量介于 32 834~41 666, 分布更为均匀。采用 97%相似水平对测序获得的 OTU 进行归类划分, 土壤微生物 Alpha 多样性计算结果见表 1。超 1 指数显示 DP 土壤微生物群落丰富度高于 DLT, 但香农 (Shannon) 指数接近, 又说明两处微生物群落结构多样性几乎相同。反辛普森 (Inv_Simpson) 指数、皮洛均匀度 (Pielou_evenness) 指数和辛普森均匀度 (Simpson_evenness) 指数的计算结果表明 DLT 土壤微生物群落均匀度高于 DP。

DP 和 DLT 各 24 个样品中的微生物被归类为 34 和 39 个细菌门, 放线菌门 (Actinobacteria) 最为丰富, 分别占 25.6%和 28.9% (图 2a、图 2b)。DP 所

表 1 东坪和大柳塔煤矿采煤沉陷区土壤微生物 Alpha 多样性指数

Table 1 Alpha diversity index of soil microorganisms in mining subsidence area of DP and DLT Coal Mine

矿区	OTU 数量	超 1 指数	香农指数	反辛普森指数	皮洛均匀度	辛普森均匀度
Coal Mine	OTU number	Chao1	Shannon	Inv_Simpson	Pielou_evenness	Simpson_evenness
DP	48 038±5 174***	7 137±309.0	7.36±0.08	473.4±32.12	0.871 2±0.005 3*	0.098 7±0.005 5*
DLT	37 621±2 499	7 467±136.0	7.47±0.04	535.2±22.82	0.885 7±0.003 7	0.115 8±0.004 6

注: *代表 0.01<P<0.05 差异显著, **代表 0.001<P<0.01 差异极显著; ***代表 P<0.001 非常显著。下同。Note: * mean significant difference at 10% level, ** mean significant difference at 5% level, *** mean extremely significant difference at 1% level. The same below.

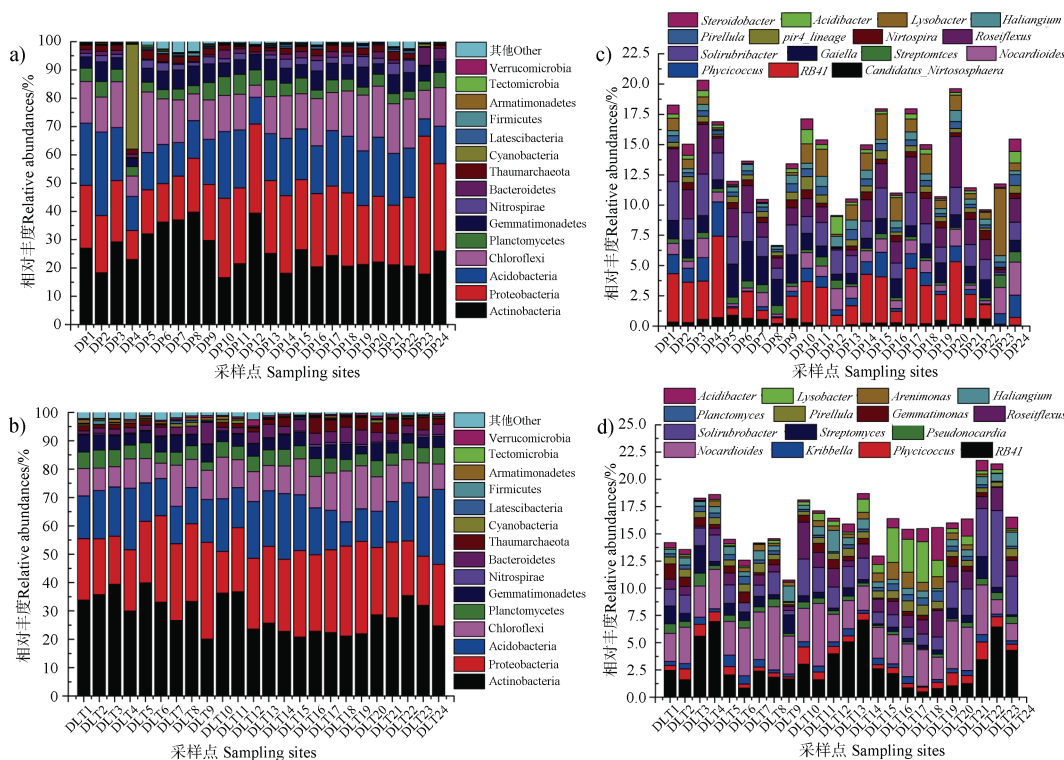


图 2 东坪和大柳塔煤矿采煤沉陷区土壤微生物细菌群落在门水平 (a, b) 和属水平 (c, d) 上丰度
Fig. 2 Abundance of soil bacterial communities at the phylum (a, b) and genus (c, d) levels in the DP and DLT Coal Mine

有样本中相对丰度大于 1% 的优势菌门有 10 个, 而 DLT 所有样本中相对丰度大于 1% 的优势菌门有 8 个。尽管二处土壤主要菌门相似, 但丰度有明显的不同。此外, DP 较 DLT 多了 2 个优势菌门, 即硝化螺旋菌门 (*Nitrospira*, 2.2%) 和蓝细菌门 (*Cyanobacteria*, 1.7%) (图 2a)。为了进一步区分两组样品的差异, 对相对丰度排名前 15 (TOP 15) 的属进行分析, 结果显示, DP 所有样本中相对丰度大于 1% 的属有 *RB41* (2.5%)、*Solirubrobacter* (1.9%)、*Roseiflexus* (1.8%)、*Gaiella* (1.4%) 和 *Lysobacter* (1.1%) (图 2c), 而 DLT 所有样本中相对丰度大于 1% 的属有 *Nocardioides* (3.3%)、*RB41* (2.9%)、*Solirubrobacter* (2.1%) 和 *Roseiflexus*

(1.2%) (图 2d)。其他 TOP 15 菌属的相对丰度也差异明显。

2.3 采煤沉陷对土壤微生物分子生态网络的影响

选取 24 个样本序列中 OTU 数加和大于等于 120 作为输入项, 构建 DP 和 DLT 微生物分子生态网络, 具体参数见表 2。 $R^2 > 0.75$ 且主要参数高于随机网络, 表明网络具有可靠性^[18]。DP 网络的节点、连接线和平均连接度远高于 DLT, 反映前者群落更为复杂。DP 平均聚类系数、最大连接数、传递性指数远高于 DLT, 说明各菌群间联系更紧密、关系更复杂, 传递性更强。但 DP 网络测量效率、模块属性低于 DLT, 表明后者对抗外界变化的抗性更高, 反应更快。

表 2 东坪与大柳塔煤矿采煤塌陷区土壤微生物细菌群落的分子生态网络拓扑参数

Table 2 Topological parameter of molecular ecological networks of bacterial communities in the DP and DLT Coal Mine

网络参数 Parameters	东坪 DP	大柳塔 DLT	网络参数 Parameters	东坪 DP	大柳塔 DLT
初始 OTU 数 Number of original OTUs	540	464	阈值 Similarity threshold	0.79	0.79
幂定律 R^2 值 R^2 of power law	0.832	0.930	总节点数 Total nodes	320	166
平均连接度 Average degree	8.706	2.867	总连接线数 Total links	1 393	238
平均聚类系数 Average clustering coefficient	0.336	0.196	模块属性 Modularity	0.395	0.674
平均路径距离 Average path distance	4.643	4.412	密度 Density	0.027	0.017
节点数大于 5 的模块数量 Module number	7	5	最大连接数 Maximal degree	61	21
网络测量效率 Geodesic efficiency	0.280	0.304	连通性 Connectedness	0.755	0.307
传递性指数 Transitivity	0.447	0.317			

不同节点借助模块内或模块间连接性在网络中发挥作用, 为此可从模块内连接度 (Z_i) 和模块间连接度 (P_i) 判断一些类群或功能是否起决定作用。一般将 $Z_i \geq 2.5$ 或 $P_i \geq 0.62$ 的节点视为关键物种^[14]。从图 3 可以看出, 大于 97.4% 的节点是外围节点, DP 含 6 个模块枢纽节点, 分别是 OTU_9950 和 OTU_105680 (绿弯菌门)、OTU_11725 和 OTU_18161 (放线菌门)、OTU_97093 (奇古菌门) 以及 OTU_84960 (酸杆菌门)。DLT 仅含 2 个模块枢纽节点, 分别是 OTU_133539 (变形菌门) 和 OTU_81764 (放线菌门)。这 8 个 OTU 可能是两处群落的关键物种, 但无连接节点和网络枢纽节点, 说明无支配种。

分子生态网络可视化图显示各物种之间的相互关系, DP 网络含 7 个模块, OTU_84960 (酸杆菌门)、

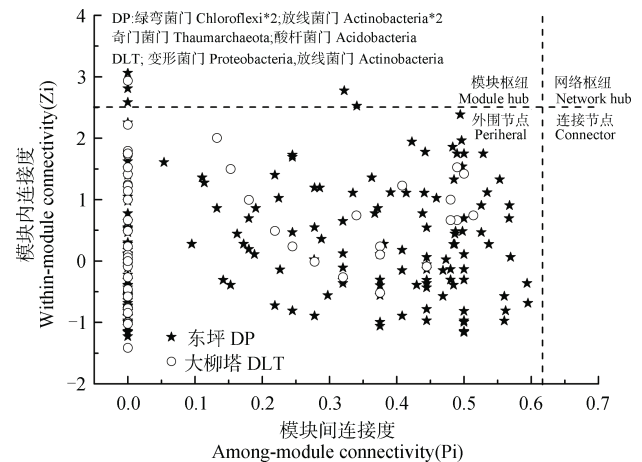


图 3 东坪和大柳塔煤矿采煤沉陷区土壤微生物分子生态网络 Z-P 图

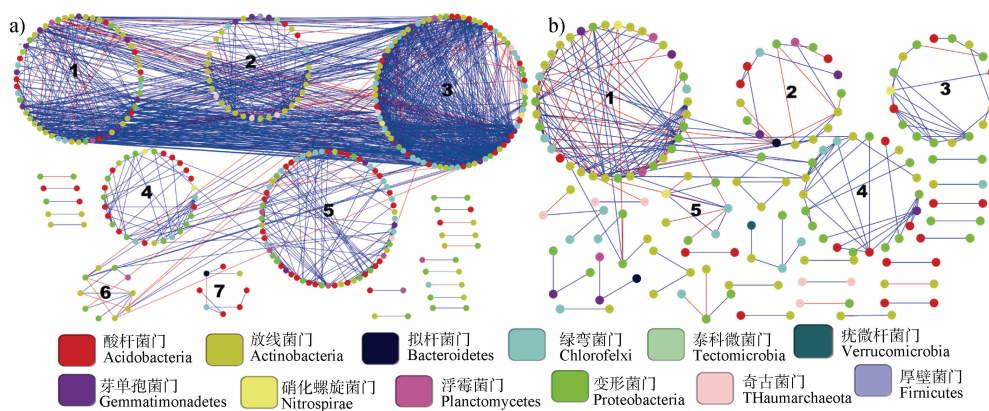
Fig. 3 Plots of soil bacterial molecular ecological networks Z-P in the DP and DLT Coal Mine

OTU_105680 (绿弯菌门)、OTU_44932 (芽单胞菌门)、OTU_111599 (变形菌门) 和 OTU_122057 (奇古菌门) 具有最高的连接度, 介于 50~62, 它们均属于模块 3 (图 4a)。可以推断, 模块 3 应为 DP 网络的关键模块, 而 OTU_84960 和 OTU_105680 是关键物种。DLT 网络含 5 个模块, 最大的 5 个节点是 OTU_133539 (变形菌门)、OTU_74153 (变形菌门)、OTU_16577 (绿弯菌门)、OTU_25372 和 OTU_124598 (放线菌门), 连接度介于 11~22, 均属于模块 1, OTU_133539 是关键物种 (图 4b)。此外, DP 网络各节点间正相关关系优势明显, 说明该

区土壤微生物为应对沉陷造成的养分贫瘠时趋向相互合作 (图 4a)。DLT 网络中模块减少, 模块间连接线也少。一些模块内正相关关系优于负相关, 说明该区微生物对抗外界干扰的抗性不断增强, 有助于提升土壤的自恢复潜力 (图 4a)。

2.4 土壤微生物群落与环境因子的互作关系

将 OTUs 和土壤理化性质进行 Mantel Test 分析, 结果显示 DP 土壤微生物 OTUs 与 SWC、AP、NN、AN 及 URA 呈显著性相关 ($P<0.05$), DLT 土壤微生物 OTUs 与 pH、ST、SWC、CP、DHG 及 PRO 呈显著性相关 ($P<0.05$) (表 3)。土壤微生物 OTUs



注: 连线代表菌群之间的相互作用, 蓝色代表正向, 红色代表负向。阿拉伯数字 1, 2, 3 等代表模块。Note: The connection line represents interaction between microbial groups, with blue representing positive and red representing negative. Arabic numbers, such as 1, 2 and 3, stand for module numbers.

图 4 东坪 (a) 和大柳塔 (b) 煤矿采煤沉陷区土壤微生物分子生态网络图

Fig. 4 Plots of the soil bacterial molecular ecological networks in the DP (a) and DLT (b) Coal Mine

表 3 东坪和大柳塔煤矿采煤沉陷区土壤微生物 OTUs 与环境因子曼特检验

Table 3 Mantel Test of soil microbial OTUs with environmental factors in the DP and DLT Coal Mine

环境因子 Environmental factors	东坪 DP	大柳塔 DLT	环境因子 Environmental factors	东坪 DP	大柳塔 DLT
pH	0.1032	0.1833*	AK	-0.0882	-0.0056
EC	0.3426	-0.1252	NN	0.2709*	-0.0327
SOM	0.1909	0.1131	AN	0.2405**	0.1462
ST	0.0074	0.2675**	DHG	-0.0838	0.2134*
SWC	0.1627*	0.1898*	URA	0.5311***	0.0476
CP	0.0425	0.2780**	PRO	0.1445	0.2825**
AP	0.2386*	0.1237			

注: EC: 电导率; AP: 有效磷; AK: 有效钾; NN: 硝态氮; DHG: 脱氢酶; URA: 脲酶; PRO: 蛋白酶。*代表 $0.01<P<0.05$ 显著, **代表 $0.001<P<0.01$ 极显著, ***代表 $P<0.001$ 非常显著。下同。Note: EC: Electronic Conductivity; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium; NN: Nitrate-nitrogen; DHG: Dehydrogenase; URA: Urease PRO: Protease. * mean significant difference at 10% level, ** mean significant difference at 5% level, *** mean extremely significant difference at 1% level. The same below.

与多环境因子存在显著性相关，且驱动微生物演替的主控因子组合明显不同，说明矿山土壤微生物群落变化不是单一因子驱动的，受多重环境因子叠加作用驱动。

为厘清土壤微生物演替的驱动力，将图 4a、图 4b 中大于 5 个节点的模块与环境因子作热图分析（图 5）。结果表明：DP 网络中模块 1、2、3 与 EC 呈显著正相关，模块 2 与 SWC 呈显著正相关，模块 6 与 AP 呈显著正相关，模块 1 与 NN 呈显著正相关，模块 1 和 3 与 AN 呈显著正相关，模块 6 和 7 与 DHG 呈显著正相关，模块 2 和 5 与 URA 呈显著正相关。pH 与模块 2 呈显著负相关，SOM、AK 和 PRO 与任何模块均无显著相关性（图 5a）。DLT 网络中模块 1 与 pH、ST 呈显著正相关，模块 2 与 ST 呈显著正相关，模块 1、2 与 SWC、CP 呈显著负相关，模块 5 与 NN 呈显著正相关，模块 3 与 PRO 呈显著正相关。DHG 与模块 3 呈显著负相关（图 5b）。特征模块中优势物种通常是网络的关键物种，不同模块与环境因子之间的驱动关系解释了微生物群落对环境变化的不同响应，结果也反证了前述 OTUs 与环境因子之间的相互关系。

3 讨 论

3.1 土壤微生物群落对采煤沉陷环境的适应性

尽管 DP 和 DLT 微生物群落多样性存在着一定的差异，但相对丰度最高的菌门几乎完全一致，即放线菌门（Actinobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）、酸杆菌门（Acidobacteria）和绿弯

菌门（Chloroflexi）（图 2）。这说明沉陷已干扰土壤微生物区系发育，微生物不断地调整自身的结构并对沉陷环境作普适性变化。放线菌门具有特征性丝状形态，又有降解和利用有机物的潜在能力^[22]，它更适应在矿山恶劣环境中生存。变形菌门具有多样化的生物地理分布，富含能降解各种污染物的好氧菌以及促生氧化酶的菌群^[23]。黄土高原矿区地表沉陷后上覆土壤普遍干燥，无法形成积水，裂缝、滑坡、拉伸加大了土体孔隙度，更利于好氧菌的发育，并成为优势菌门。酸杆菌门在矿山土壤酸化生态过程起重要作用，并广泛分布于各种恶劣的自然环境中^[24]。部分绿弯菌门的微生物具有固碳生态功能，这种功能在采煤沉陷区贫瘠土壤中显得尤为重要，亦有报道，当土壤变得更加缺氧时，绿弯菌门会增加^[25]。这好像与变形菌门成为优势菌门存在矛盾，事实上更说明了沉陷土壤的环境复杂性，丘陵沉陷的坡底或平原沉陷的谷底通常受挤压，土体孔隙度减少，甚至形成季节性或间歇性积水。这有利于绿弯菌门的生存，并发育为相对丰度高的菌门。从微生物群落菌门组成和网络模块可以推测，土壤微生物群落依据矿山特定的环境作适应性变化，沉陷区地形特征和土地利用进一步修饰了土壤微生物区系的演替。

3.2 采煤沉陷区土壤微生物的关键类群

分子生态网络分析可揭示土壤微生物菌属间相互作用，如模块化、小区域或无尺度。DP 和 DLT 网络中存在一些蜂窝特征，有效地促进不同物种间的沟通并提升对采矿干扰的响应能力。DP 网络较 DLT 复杂且连接更加紧密（表 2、图 4），具备更高

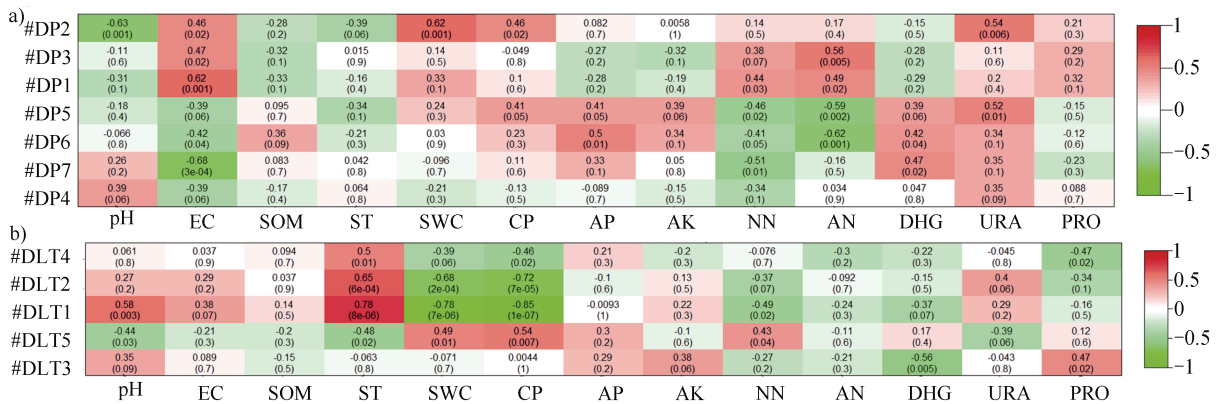


图 5 东坪 (a) 和大柳塔 (b) 煤矿采煤沉陷区主要模块层次结构及其与环境因子的相关关系
Fig. 5 Relationships of the hierarchies of the main modules with environmental factors in the DP (a) and DLT (b) Coal Mine

的干扰耐受性^[26]。DP 和 DLT 网络特征显示微生物组间的相互作用以及所涉及的物种变化,尤其是优势物种的变化(图 3 和图 4)。DLT 网络复杂性更低,因此更易对生物地球化学功能产生负面影响,从而导致微生物群落呈不稳定或更脆弱的状态。尽管 DP 和 DLT 均属黄土高原,但二者的自然参数仍有差异,如降水、气温和土地利用。事实上在微生物群落结构与组成相似的情况下,不同的网络复杂性差异也暗示除矿山环境要素外,自然参数也重要的影响因素,如 DP 微生物群落多样性低于 DLT(表 1、图 2)。地理特性、土地利用可能以不同的方式影响着微生物群落多样性和网络关系,未来仍需进一步证实。

分子生态网络分析也为探寻关键类群提供了便利,关键类群在微生物组中发挥重要作用,缺失或导致微生物结构和功能发生重大变化^[15]。尽管先前研究报道了各种环境中的关键类群^[6-22],但有关受损矿山土壤关键类群的报道几乎空白。本研究依据网络参数识别了 DP 土壤微生物关键类群,连接线大于 50 的 OTU_84960(酸杆菌门)等 5 个节点和 OTU_105680(绿弯菌门)等 6 个模块枢纽中优势物种作为关键类群。虽然图 2c)显示 OTU_97093(奇古菌门)和 OTU_44932(芽单胞菌门)的相对丰度并不高,但并不影响它们的重要作用,这表明相对丰度与关键功能之间缺乏有效的关联^[27]。OTU_44932 所属的芽单胞菌门被认为既可在有氧条件又可无氧条件下生长^[28],具备广泛的适应性是它能够成为采煤沉陷环境中关键类群的重要原因。OTU_97093 属于的奇古菌门是第一个被确定参与硝化作用的古细菌^[29],可以氧化极低浓度的铵以应对采矿沉陷导致的土壤养分贫瘠环境。连接线大于 11 的 OTU_133539(变形菌门)等 5 个节点和 OTU_81764(放线菌门)等 2 个模块枢纽中优势物种作为 DLT 网络的关键类群,DLT 的关键类群不同于 DP,且较少。Ezeokoli 等^[30]研究露天煤矿沙化土壤微生物群落时未发现关键类群,尽管与本研究的发现有所不同,但均说明采矿扰动易损害微生物群落,并对土壤养分循环和生态系统可持续性产生负面作用。

3.3 采煤沉陷区土壤微生物群落与环境因子的互馈机制

模块中 OTUs 的联系反映微生物菌群间的相互作用,也表明对共同环境参数的响应。负载重要功

能的 OTUs 通常随环境变化改变在网络中的角色,模块成员、拓扑角色和系统发育提供有用的信息来识别关键 OTU。因此,了解土壤微生物类群间的互作及环境适应性可为矿山生态恢复提供洞察力,尤其是对人为干扰的响应,具有重要意义^[22-27]。土壤 pH、水分含量、有机碳等环境因子对矿区生态恢复中土壤细菌群落结构和组成具有较大影响,Xiao 等^[31]研究认为土壤环境因子在不同程度上影响土壤微生物活性,且微生物在养分循环利用和土壤肥力中起着至关重要的作用;da Silva 等^[32]发现土壤微生物学特性在一定程度上影响微生物生物量碳和微生物的呼吸作用。微生物是矿山土壤质量提升、生物多样性恢复的重要手段,因此,理解微生物重要功能群与土壤因子间的关系对矿山生态恢复至关重要。

本研究发现模块、节点连通性与环境因子之间存在显著相关性,如 DP 网络中,分属模块 1、2、3 的是关键菌群 OTU_18161(放线菌门)、OTU_97093(奇古菌门)、OTU_105680(绿弯菌门)和 OTU_84960(酸杆菌门)与 EC 密切相关(表 3、图 4 和图 5),这可能与采矿干扰土壤中流导致浸出液水溶性盐含量变化有关,从而影响微生物群落。Sun 等^[11]发现煤矿区土壤细菌分布主要受 SOM、AK 和 AP 的影响。DP 网络中模块 6 与 AP 显著相关(图 5a),这可能与模块 6 中关键菌群 OTU_11725(放线菌门)有关,磷是不可缺少的营养元素之一,受干扰微生物溶解一些难溶的磷酸盐参与自身新陈代谢,从而影响 AP 含量。不同采矿活动会影响土壤微生物丰度、分类学多样性和功能多样性。pH 在代谢和遗传中非常重要,这与 DLT 模块 1 中关键菌群 OTU_133539(变形菌门)与 pH 的关系相似,说明外部环境变量影响不同微生物组之间的相互关系,且这种变化与土壤特性密切相关。土壤酶活性对采煤沉陷引起的土壤环境变化反应十分迅速,本研究发现 DP 网络中模块 2、模块 5 与 URA 显著相关,DLT 网络模块 3 则与 DHG 及 PRO 显著相关(图 5b)。采煤沉陷扰动降低土壤含水量,影响土壤酶活性,长期无法修复将使土壤养分循环受阻^[8-10]。

就相对丰度前 50 的 OTU 与土壤环境因子的网络互作关系而言,DP 网络中环境因子 SOM 具有最高连接度,AN、DHG、AK 次之,而 DLT 网络中,具有较高连接度的环境因子的排序依次为 ST、SWC、CP、DHG(图 6)。这些高连接度环境因子与占支配

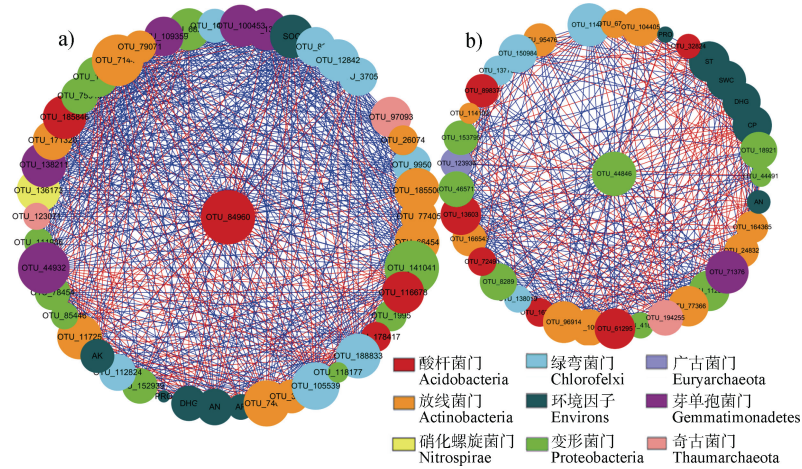


图 6 东坪 (a) 和大柳塔 (b) 煤矿采煤沉陷区相对丰度前 50 的 OTU 与土壤理化性状分子生态网络图

Fig. 6 Molecular ecological networks of the TOP 50 genera in OTU and soil physicochemical properties in the DP (a) and DLT (b) Coal Mine

地位的放线菌门、变形菌门、酸杆菌门和绿弯菌门之间的连接也多,且不同的环境因子与 OTU 连接的相关关系不一。就网络参数而言,DP 网络中属于酸杆菌门的 OTU_84960 (*Holophagae*) 的连接度最高,且与土壤 SOC、AP、AK、DHG 和 PRO 直接相连呈负相关,与 AN 直接相连呈正相关,关系密切。DLT 网络中 OTU_44846 (*Aquabacterium*) 的连接度最高,且与土壤 SWC、CP、DHG、AN 和 PRO 直接相连且呈负相关,与 ST 直接相连呈正相关,关系密切。就环境适应性而言, *Holophagae* 与 *Aquabacterium* 可视为沉陷土壤微生物群落优势菌群,或可助力今后黄土高原矿区生态恢复。

4 结 论

采煤通常对矿山土地生态系统产生颠覆式破坏,沉陷、裂缝、滑坡和堆压等高强度扰动势必干扰土壤物质养分循环,从而影响国土空间生态修复。本研究利用高通量测序和分子生态网络方法探索微生物类群间的互作关系,厘清矿山微生物群落分布的主控因素,寻找适应沉陷环境的关键功能群。沉陷环境对土壤微生物群落多样性、结构和分布模式影响显著,但放线菌门一直最为丰富。东坪煤矿分子生态网络互作关系较大柳塔煤矿更复杂、网络节点和连接数更多。一些关键类群,如放线菌门、绿弯菌门和奇古菌门与环境因子直接相连且关系密切。此外,为适应矿山土壤营养贫瘠,微生物种群间更偏向相互合作,其中 *Holophagae* 与 *Aquabacterium* 为优势关键菌群,

或可助力矿山生态修复。本研究为脆弱矿山生态系统生态修复提供了一种新思路,未来进一步加强功能网络研究,丰富对自恢复机制的理解,为黄土高原生态恢复和绿色矿山建设服务。

参考文献 (References)

- [1] Bian Z F, Miao X X, Lei S G, et al. The challenges of reusing mining and mineral-processing wastes[J]. Science, 2012, 337 (6095): 702—703.
- [2] Bai Z K, Zhou W, Wang J M, et al. Rethink on ecosystem restoration and rehabilitation of mining areas[J]. China Land Science, 2018, 32 (11): 1—9. [白中科, 周伟, 王金满, 等. 再论矿区生态系统恢复重建[J]. 中国土地科学, 2018, 32 (11): 1—9.]
- [3] Huang M H, Luo Y M. Land remediation and ecological restoration of mined land[J]. Acta Pedologica Sinica, 2003, 40 (2): 161—169. [黄铭洪, 骆永明. 矿区土地修复与生态恢复[J]. 土壤学报, 2003, 40 (2): 161—169.]
- [4] Bian Z F, Lei S G, Jin D, et al. Several basic scientific issues related to mined land remediation[J]. Journal of China Coal Society, 2018, 43 (1): 190—197. [卞正富, 雷少刚, 金丹, 等. 矿区土地修复的几个基本问题[J]. 煤炭学报, 2018, 43 (1): 190—197.]
- [5] Ayala-Orozco B, Gavito M E, Mora F, et al. Resilience of soil properties to land-use change in a tropical dry forest ecosystem[J]. Land Degradation & Development, 2018, 29 (2): 315—325.
- [6] Fierer N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15 (10): 579—590.
- [7] Zhu Y G, Shen R F, He J Z, et al. China soil microbiome initiative: Progress and perspective[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2017, 32 (6): 554—565. [朱永官, 沈仁芳, 贺纪正, 等. 中国土壤微生物组: 进展与展望[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32 (6): 554—565.]

- [8] Meng H Q, Xiong R P, Wang C, et al. Spatial variability of soil moisture, organic matter content and soil texture in coal mining subsidence area as affected by land use[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55 (4) : 911—922. [孟红旗, 熊仁鹏, 王崇, 等. 采煤沉陷区不同土地利用类型土壤水分、有机质和质地的空间变异性[J]. *土壤学报*, 2018, 55 (4) : 911—922.]
- [9] Chen J, Mo L, Zhang Z C, et al. Evaluation of the ecological restoration of a coal mine dump by exploring the characteristics of microbial communities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 147: 103430.
- [10] Ngugi M R, Fechner N, Neldner V J, et al. Successional dynamics of soil fungal diversity along a restoration chronosequence post-coal mining[J]. *Restoration Ecology*, 2020, 28 (3) : 543—552.
- [11] Sun S Y, Sun H, Zhang D S, et al. Response of soil microbes to vegetation restoration in coal mining subsidence areas at Huaibei coal mine, China[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16 (10) : 1757.
- [12] Ezeokoli O T, Mashigo S K, Maboeta M S, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal community differentiation along a post-coal mining reclamation chronosequence in South Africa: A potential indicator of ecosystem recovery[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 147: 103429.
- [13] Dimitriu P A, Prescott C E, Quideau S A, et al. Impact of reclamation of surface-mined boreal forest soils on microbial community composition and function[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42 (12) : 2289—2297.
- [14] Zhou J Z, Deng Y, Luo F, et al. Functional molecular ecological networks[J]. *mBio*, 2010, 1 (4) : e110—e169. <https://doi.org/10.1128/mbio.00169-10>.
- [15] Delgado-Baquerizo M, Oliverio A M, Brewer T E, et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil[J]. *Science*, 2018, 359 (6373) : 320—325.
- [16] Wang S P, Brose U. Biodiversity and ecosystem functioning in food webs: The vertical diversity hypothesis[J]. *Ecology Letters*, 2018, 21 (1) : 9—20.
- [17] Deng Y, Zhang P, Qin Y J, et al. Network succession reveals the importance of competition in response to emulsified vegetable oil amendment for uranium bioremediation[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18 (1) : 205—218.
- [18] Luo C W, Rodriguez-R L M, Johnston E R, et al. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (5) : 1777—1786.
- [19] Liu Y, Lei S G, Gong C G. Comparison of plant and microbial communities between an artificial restoration and a natural restoration topsoil in coal mining subsidence area[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2019, 78 (6) : 1—13.
- [20] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [21] Guan S Y. Soil enzyme and its research method[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1986. [关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.]
- [22] Banerjee S, Walder F, Büchi L, et al. Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots[J]. *bioRxiv*, 2018, DOI: 10.1101/416271.
- [23] Ma J, Zhang W Y, Zhang S L, et al. Short-term effects of CO₂ leakage on the soil bacterial community in a simulated gas leakage scenario[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e4024.
- [24] Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, et al. Diversity and distribution patterns of acidobacterial communities in the black soil zone of northeast China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 95: 212—222.
- [25] Chen F, Zhang W Y, Ma J, et al. Experimental study on the effects of underground CO₂ leakage on soil microbial consortia[J]. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2017, 63: 241—248.
- [26] Hunt D E, Ward C S. A network-based approach to disturbance transmission through microbial interactions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1182.
- [27] Wang X L, Wang M X, Xie X G, et al. An amplification-selection model for quantified rhizosphere microbiota assembly[J]. *Science Bulletin*, 2020, 65 (12) : 983—986.
- [28] Park D, Kim H, Yoon S. Nitrous oxide reduction by an obligate aerobic bacterium, *Gemmatimonas aurantiaca* strain T-27[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83 (12) : 502—517. <https://doi.org/10.1128/aem.00502-17>.
- [29] Bergauer K, Sintés E, van Bleijswijk J, et al. Abundance and distribution of archaeal acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase genes indicative for putatively chemoautotrophic Archaea in the tropical Atlantic's interior[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84 (3) : 461—473.
- [30] Ezeokoli O T, Mashigo S K, Paterson D G, et al. Microbial community structure and relationship with physicochemical properties of soil stockpiles in selected South African opencast coal mines[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2019, 65 (4) : 332—341.
- [31] Xiao L, Bi Y L, Du S Z, et al. Effects of re-vegetation type and arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on soil enzyme activities and microbial biomass in coal mining subsidence areas of Northern China[J]. *Catena*, 2019, 177: 202—209.
- [32] da Silva E P, de Armas R D, Ademar Avelar Ferreira P, et al. Soil attributes in coal mining areas under recovery with bracinga (*Mimosa scabrella*) [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2019, 68 (6) : 497—504.

(责任编辑: 陈荣府)