

研究报告

中央戈壁石下生物土壤结皮中细菌群落结构和多样性

贾丽娟 唐凯 兰慧青 徐黄纬 国情文 丁悦 谭芳 邢丽华 郭雨晴 冯福应*

(内蒙古农业大学生命科学学院应用与环境微生物研究所 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【背景】戈壁石下生物土壤结皮(Biological soil crusts, BSCs)中的微生物在干旱、半干旱地区生态系统物质循环中起重要作用,其细菌群落结构和多样性因气候和地理环境的不同而存在较大差异。中央戈壁面积大,其石下 BSCs 中细菌群落结构和多样性却知之甚少。【目的】比较中央戈壁石下 BSCs 和周围裸土中细菌群落结构和多样性的异同,揭示环境因子对它们的影响以及细菌之间的相互作用关系。【方法】利用 Illumina MiSeq 对 16S rRNA 基因进行高通量测序,使用生物信息学分析方法分析细菌群落结构和多样性及其影响因素;基于 CoNet 软件绘制物种共现性网络图,利用 Cytoscape 3.5.1 软件将网络图可视化。【结果】石下 BSCs 的速效磷(Available phosphorus, AP)、速效氮(Available nitrogen, AN)和叶绿素 a (Chlorophyll a, Chl a)的含量均明显高于周围裸土(最高高出 471%),而 pH 则略低于周围裸土;石下 BSCs 中细菌的最优势菌门为 Cyanobacteria (45.85%–53.77%),优势属(9.25%–18.42%)有 *Trichocoleus*、*Chroococcidiopsis* 和属于 Cyanobacteria 纲的 1 个未知属;临近裸土中细菌的最优势菌门为 Actinobacteria (38.82%–44.69%),优势属(>5%)有 *Arthrobacter*、*Rubrobacter* 和其它 3 个属于放线菌门或酸杆菌门的未知属;在土壤理化因子中,AP 对石下细菌群落组成的影响最大;除 *Actinophytocola* 属和 Cyanobacteria 纲中的未知属外,其他微生物之间均存在较强的互作关系,其中以共存的互作关系为主(约占 60%),点度中心性、接近中心性和中介中心性均较高的节点都属于 Cyanobacteria 门和 α -Proteobacteria 纲。【结论】中央戈壁石下 BSCs 中的细菌群落结构和多样性明显不同于临近裸土,Cyanobacteria 门和 α -Proteobacteria 纲的细菌是该地区石下早期 BSCs 形成和发育最初及最重要的驱动力。

关键词: 石下生物, 16S rRNA 基因, 高通量测序, 物种共现性网络

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560030); Program for Young Talents of Science and Technology in Universities of Inner Mongolia Autonomous Region (NJYT-14-A05); Collaborative Innovation Team Project for Teachers and Students of College of Life Science of Inner Mongolia Agricultural University (KJCX2016011)

***Corresponding author:** Tel: 86-471-4309240; E-mail: foyefeng@hotmail.com

Received: January 12, 2018; **Accepted:** May 18, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31560030); 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”(NJYT-14-A05); 内蒙古农业大学生命科学学院师生协同创新项目(KJCX2016011)

***通信作者:** Tel: 86-471-4309240; E-mail: foyefeng@hotmail.com

收稿日期: 2018-01-12; **接受日期:** 2018-05-18; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-06

Diversity and structure of hypolithic bacteria community of Zhongyang Gobi

JIA Li-Juan TANG Kai LAN Hui-Qing XU Huang-Wei GUO Qing-Wen DING Yue
TAN Fang XING Li-Hua GUO Yu-Qing FENG Fu-Ying*

(Institute for Applied & Environmental Microbiology, College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Background] Bacteria of hypolithic biological soil crusts (BSCs) in Gobi play an important role in the biogenic elements circling in arid and semi-arid regions. The bacterial community structure and diversity vary greatly due to different climatic and geographical environments. The area of Zhongyang Gobi is large, but little is known so far about the structure and diversity of the hypolithic bacteria community. [Objective] To compared and analyzed the similarities and differences of bacterial community structure and diversity in hypolithic BSCs and bare soil around in the Zhongyang Gobi, and discover the effect of environmental factors on bacterial community and the interaction relationships among the bacteria. [Methods] Illumina MiSeq was applied to sequence 16S rRNA gene, bioinformatics approach was used to reveal the diversity and structure of the bacteria community, the co-occurrence network was constructed based on CoNet software and Cytoscape 3.5.1 to visualize the network. [Results] The contents of available phosphorus (AP), available nitrogen (AN) and chlorophyll a (Chl a) of the soil were significantly higher (the most of 471% higher), while pH were slightly lower in the BSCs than that in the bare soil. The bacteria was mostly dominated by the phylum of Cyanobacteria (45.85%–53.77%) and by the genera *Trichocoleus*, *Chroococcidiopsis* and unknown one belonged to Class Cyanobacteria (9.25%–18.42%) in the hypolithic BSCs, and did by the phylum of Actinobacteria (38.82%–44.69%) and by the genera *Arthobacter*, *Rubrobacter* and three unknown genera belonged to the phylum of Actinobacteria or Acidobacteria (>5%) in the adjacent bare soil. Among all the soil physicochemical factors, AP had the most significant influence on the composition of hypolithic bacterial communities. Except the genera of *Actinophytocola* and one unclassified of Class Cyanobacteria, there were strong interaction existed among other phylotypes, in which the co-occurrence relationship was dominant (about 60%) and the nodes were all belonged to Phylum Cyanobacteria and Class α -Proteobacteria with higher degree, closeness and betweenness centralities. [Conclusion] Bacterial diversity and community structure of hypolithic BSCs is remarkably distinguished from that of bare soil in the Zhongyang Gobi. Members of Phylum Cyanobacteria and Class α -Proteobacteria are the primary and most important driver in the early development of hypolithic BSCs in the Zhongyang Gobi.

Keywords: Hypoliths, 16S rRNA gene, High-throughput sequencing, Co-occurrence network

戈壁(又称砾漠)源自蒙古语,意为“难生草木的土地”,其基本特征主要为地面由砾石覆盖、植被稀疏或缺乏^[1]。戈壁地表表观常荒凉、无生机,但在色浅、疏松多孔隙的石英砾石下方(埋入土中的部分)且与土壤紧密接触的砾石表面常定殖有生物,即为石下生物(Hypoliths)^[2],形成石下生物土壤结皮(Biological soil crusts, BSCs)。石下生物

中的光合自养生物(如蓝细菌)对土壤碳封存具有巨大贡献^[3],可产异形胞的蓝细菌还可将空气中的氮直接固定^[4]。全球陆地被砾石覆盖的干旱区土地面积高达 50%。因此,从全球范围来看,干旱区石下生物非常重要^[5],而且石下生物已成为许多微生物群落装配和功能研究的焦点^[6]。研究表明,石下生物群落组成与裸露的荒漠土壤以及石上和石内

截然不同^[7-8]; 石下生物以细菌为主, 其所占总生物数量的比例可高达 93%^[9]; 相比裸土, 系统分类组成上的差异反映了石下生物在营养循环中的重要作用^[10]; 宏基因组学研究揭示了石下生物适应相关逆境的一些机制^[9,11]。少量研究还表明, 石下生物共存明显, 如蓝细菌和 α -变形菌^[6,12]; 水分而非温度是中国境内热和冷荒漠戈壁石下生物群落差异形成的驱动力^[13-14], 但对澳大利亚北部石下生物的分析表明, 空间距离是影响其群落组成的主要因素(距离几米就有明显差异)^[15]。

戈壁在中国北方干旱和极干旱区域广泛分布^[13], 这里的戈壁多石英砾石^[16]。虽然 Pointing 等^[14]使用 BG11 培养基富集培养和分离等技术对位于中国西北部(柴达木、吐鲁番和塔克拉玛干荒漠)的戈壁石下蓝细菌群落进行了分析, 但揭示的群落信息有限; 而中央戈壁(位于内蒙古阿拉善北部, 面积约 14 280 km²)与这些已研究采样点相距较远, 石下生物群落结构和多样性可能存在差异。

本研究利用高通量测序技术(High-throughput sequencing, HTS)对细菌的 16S rRNA 基因进行扩增和测序, 对比分析中央戈壁石下生物土壤结皮和周围裸土中细菌群落结构和多样性异同、细菌互作以及环境因子对群落结构的影响, 以期了解石下生物在该地区生态系统中的功能和作用提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

1.1.1 主要仪器

生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 紫外分光光度计, 日立公司; 超微核酸定量仪, Thermo Scientific 公司; PCR 仪, 耶拿分析仪器股份公司。

1.1.2 主要试剂

(1) 邻菲罗啉指示剂: 称取 0.297 g 邻菲罗啉和 0.139 g 七水合硫酸亚铁, 溶于 20 mL 水中; (2) 1 mol/L 1/6 K₂Cr₂O₇ 溶液: 称取 49.04 g 于 105 °C 烘干的 K₂Cr₂O₇ 溶于 400 mL 水中, 稀释至 1 L; (3)

0.5 mol/L FeSO₄ 溶液: 称取 70 g 七水合硫酸亚铁溶于水中, 加入 7.5 mL 浓硫酸, 冷却稀释至 500 mL。(4) 1.0 mol/L NaOH 溶液: 称取 20.0 g NaOH 溶于水, 冷却后定容至 500 mL; (5) 0.005 mol/L (1/2 H₂SO₄) 标准溶液: 将 2.83 mL 浓硫酸稀释至 5 L, 标准碱标定后再稀释 4 倍; (6) 碱性胶液: 称取 20.0 g 阿拉伯胶和 25 mL 水, 在 75 °C 水浴锅中搅拌溶解, 完全溶解后, 加入 10 mL 甘油和 10 mL 饱和 K₂CO₃ 水溶液, 搅拌、冷却, 6 000 r/min 离心 5 min 去除气泡后储存在玻璃瓶中备用; (7) 钼锑抗试剂: A 液: 称取 0.5 g 酒石酸氧锑钾溶于 100 mL 水中; B 液: 称取 10 g 钼酸铵, 溶于 450 mL 水中, 缓慢加入 153 mL 浓硫酸; 将 A 液和 B 液混合, 定容至 1 L, 充分混匀后存于棕色瓶中备用。使用时在钼锑抗混合液中加入 15 g/L 的抗坏血酸, 混合后使用。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

于 2016 年 5 月下旬在中央戈壁(41°57'58"N, 101°55'44"E, 海拔 941 m, 内蒙古西部阿拉善盟境内)相距约 100 m 采集石下 BSCs (mSX1、mSX2); 于同年的 9 月下旬在同一地点采集石下 BSCs (sSX1、sSX2)和相应周围裸土(sOS1、sOS2)。利用 5 点采样法, 分别用无菌小刀轻轻刮取戈壁滩石英石底部 1 mm 厚度的绿色表层, 每点大约采集 30 块(大小约 8 cm×8 cm), 裸土采集厚度约 1 cm, 分别混匀后装入无菌采样袋, 运回实验室, -80 °C 保存备用。

1.2.2 样品理化性质的分析

将采集的石下生物土壤结皮和周围裸土样品风干, 分别测定土壤 pH 值、速效磷(Available phosphorus, AP)、速效氮(Available nitrogen, AN)、叶绿素 a (Chlorophyll a, Chl a)和有机质(Organic matter, OM)含量^[17-19]。

1.2.3 样品总 DNA 的提取

分别取 0.5 g 石下 BSCs 和周围裸土, 按照 E.Z.N.A. Soil DNA Kit 说明书进行样品总 DNA 的

提取,重复3次,提取的DNA溶于50 mL无菌超纯水中,使用NanoDrop 2000超微量核酸定量仪对DNA浓度和质量进行检测。将DNA混合均匀,置于-80 °C保存备用。

1.2.4 16S rRNA 基因序列 V3 可变区的 PCR 扩增和测序

利用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGC GTWTCT AAT-3')对 16S rRNA 基因序列的 V3 可变区进行扩增。每个样品的引物序列前均单独加入长度为 7 个碱基的不同碱基序列标签,用以标记不同的样品。PCR 反应体系:5×FastPfu buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 上、下游引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, FastPfu polymerase 0.4 μL, BSA (Bull serum albumin) 0.2 μL, 模板 DNA 10 ng, 补足 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增的 PCR 产物经 1%琼脂糖电泳检测后,委托上海美吉生物医药科技有限公司基于 MiSeq 平台进行高通量测序和分析。

1.2.5 测序数据的分析

(1) 测序数据的质控和处理

根据 Barcode 序列将获得的测序数据拆分为不同样品数据,并截去 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列;将拆分的数据使用 FLASH (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)对每个样品的 Reads 进行拼接,得到的拼接序列为原始 Tag 数据(Raw tags);拼接得到的 Raw tags,需要经过过滤处理后,得到高质量的 Tag 数据(Clean tags)。

(2) 操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU)分类及注释

对获得的测序数据,用 Uclust (V1.1.579)对所有样品的全部 Effective tags 序列聚类,以 97%的一致性将序列聚类成为 OTU 结果。同一 OTU 中的序列被视为相同分类单元的序列,作为一个假定的分类单元。选取代表性序列采用 RDP classifier 软件进行物种分类,研究 OTU 之间的系统发生关系。

(3) 多样性分析

α 多样性分析采用 Mothur 软件,相关网址为 <http://www.mothur.org/>。采用 Chao1 算法估计群落中含 OTU 数目的指数,采用香农指数衡量群落的异质性。香农指数计算公式为: $H'=-\sum P_i \times \ln P_i$ 。其中 P_i 为各种群物种数与样品总物种比值)。Chao1 指数计算公式为: $S_{\text{Chao1}}=S_{\text{obs}}+n_1(n_1-1)/2(n_2+1)$ (S_{Chao1} :估计的 OTU 数; S_{obs} :实际 OTU 数; n_1 :只有一条序列的 OTU 数目; n_2 :只有两条序列的 OTU 数目)。

β 多样性中的样品聚类 and 样品主成分分析 (Principal component analysis, PCA)均是利用 UniFrac metric, UniFrac metric 是通过计算进化树中不同环境样品间 Unique branch 长度总和获得。UniFrac metric 值在 0-1 之间,值越小说明样品间相似度越高。分析中首先将 OTU 种子序列比对到 Greengene 核心 16S rRNA 基因序列中,根据多序列队列构建以种子序列为节点的系统发育树,而后通过进化树计算 UniFrac metric。

1.2.6 影响群落结构的环境因子分析

利用软件 Canoco 5.0 作典范对应分析 (Canonical analysis, CCA),揭示影响群落结构的环境因子。将采样点和主要细菌类群分别作为“Sample”和“Species”,pH、OM、AP、Chl a 和 AN 作为“Environment variable”,标准化数据后导入,计算单峰响应值(SD);当 $SD>2.0$ 时,选用典范对应分析;而当 $SD<2.0$ 时,选用冗余分析 (Redundancy analysis, RDA)作图。环境因子(pH、OM、AP、AN 和 Chl a)的数目需小于样品的数目(4 个石下 BSCs 样品),因此每 3 个环境因子进行组合,之后分别分析环境因子对菌群组成的影响。

1.2.7 网络分析

网络分析通常用来对不同样品间的物种丰度信息进行相关性分析,可以获得物种在同一环境样品中的共存和相互作用关系,进一步解释样品间表型差异的形成机制,包括共线性网络分析和物种相关性网络分析。以高通量测序得到的 OTU 物种丰

度表为原始数据,采用 Sperman 相关系数类型,相关系数 $R^2 < 0.5$, 显著性 $P < 0.05$, 计算丰度在前 100 的物种之间的相似性,利用 CoNet 软件绘制微生物共现性网络图^[20]。利用 Cytoscape 3.5.1 软件^[21]将得到的网络图可视化,并将不同的物种进行模块化,分析微生物之间的相互关系。网络图包括节点和边,各节点可以代表不同的物种、环境,节点越多说明该物种在环境中的作用越重要,并将重要的物种以不同颜色的节点表示,边代表物种之间或者物种和环境之间的相互作用,不同颜色代表物种之间呈现的关系,即正相关或负相关。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质分析

土壤理化性质见表 1。由表 1 可知,石下 BSCs 的 pH 均明显低于裸土(最大相差 0.94),而营养相关如 AN 等均高于相应裸土(AN、AP 和 OM 最大相差分别为 0.65、0.32 mg/kg 和 15.87 g/kg);5 月份石下 BSCs 的营养水平普遍高于 9 月份,而 2 个季节的 pH 相差不大;石下 BSCs 中代表生产力的 Chl a 浓度均高于相应裸土,相差 1.8 ng/kg,相应裸土 Chl a 浓度较小;5 月份石下 BSCs 中 Chl a 的浓度高于 9 月份。

2.2 稀释性曲线

通过对样品高通量数据统计,mSX1、mSX2、sSX1、sSX2、sOS1 和 sOS2 分别得到 38 162、33 041、31 861、33 895、33 973 和 41 643 条序列;稀释性曲线(图 1)用来反映样品的测序深度,比较样品中

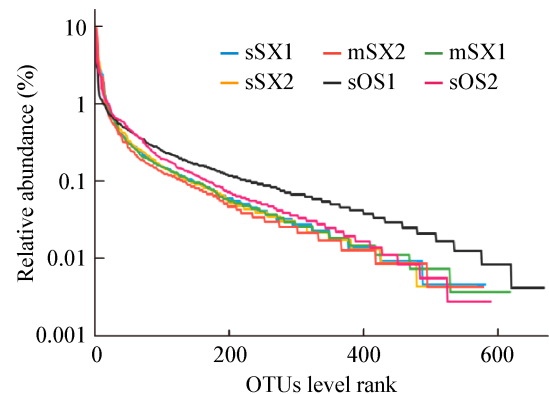


图 1 稀释性曲线

Figure 1 The rarefaction curves

物种的丰富度。从图 1 可以看出,6 个样品的稀释性曲线基本趋于平缓,表明测序结果可良好地反映环境中的细菌群落结构。

2.3 细菌群落结构和组成分析

根据细菌 OTU 数目,对样品中物种组成进行分析,构建 Venn 图(图 2)和群落组成柱形图(图 3)。从图 2 可知,6 个样品中共有 OTU 为 287 个,5 月份的 2 个样品共有的 OTU 数目为 3,9 月份的 2 个

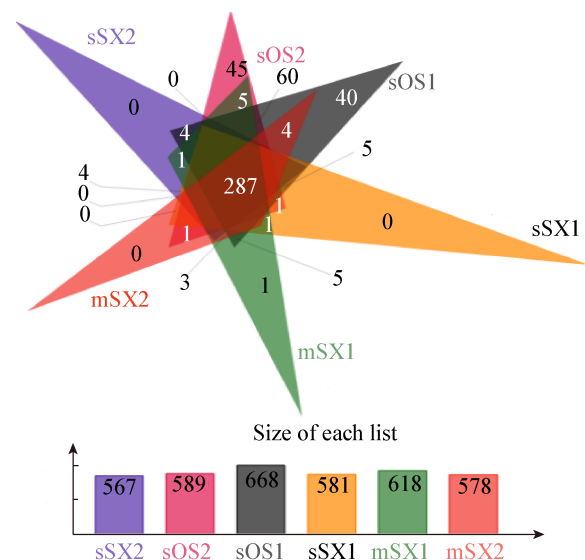


图 2 细菌 OTU 的 Venn 图

Figure 2 The Venn diagram of bacterial OTUs

注:图中数字为各样品中的 OTU 数量。

Note: The number in the figures is the OTUs amount.

表 1 土壤理化性质

Table 1 Soil physicochemical properties

样品 Samples	pH	速效磷 AP (mg/kg)	速效氮 AN (mg/kg)	有机质 OM (g/kg)	叶绿素 a Chl a (ng/kg)
mSX1	8.43	0.38	1.40	20.43	1.46
mSX2	8.28	0.40	1.05	28.11	2.16
sSX1	8.21	0.26	1.35	20.43	1.17
sSX2	8.46	0.21	1.40	18.18	1.05
sOS1	9.15	0.08	0.75	12.24	0.63
sOS2	8.92	0.07	0.76	13.71	0.44

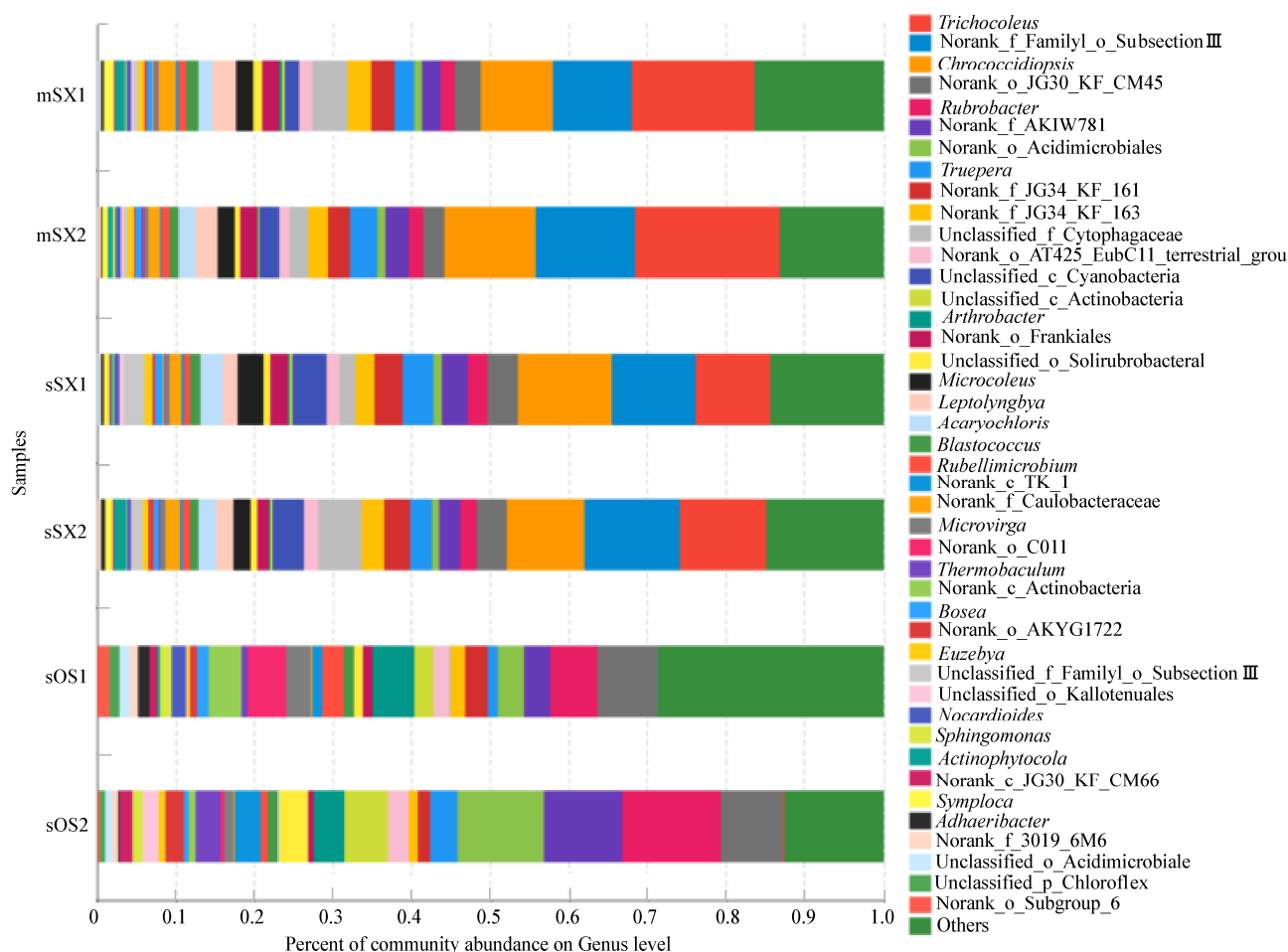


图3 属水平上的群落柱形图

Figure 3 Bacterial community composition at genus level

注：在属水平未能分类的逐级上推，直至有明确分类阶元。图中右侧分类单元中单字母 f、o、c 和 p 分别代表科、目、纲和门，指未能在属水平分类的类群分别属于字母所代表的分类阶元。

Note: Sequences failed to be classified at the genus level were located at a higher position until a definite taxon were ascertained. The single letter f, o, c and p present for family, order, class and phylum at right taxon in figure, respectively.

样品共有的 OTU 数目为 4。mSX1 中特有 OTU 数目为 1，mSX2、sSX1 和 sSX2 特有 OTU 数目均为 0，sOS1 和 sOS2 样品中特有 OTU 数目分别为 40 和 45。

在门水平上，石下 BSCs 与裸土的细菌群落结构和组成差异明显，而季节之间或同类型样品之间相近：石下 BSCs 中细菌共分为 17 个门，其中优势门有蓝细菌门(45.85%–53.77%)、放线菌门(15.06%–18.91%)、绿弯菌门(7.99%–10.25%)、变形菌门(13.10%–15.22%)、拟杆菌门(2.81%–7.15%)

和耐热球菌(2.71%–4.33%)；裸土中的细菌共分为 19 个门，其中优势菌门为放线菌门(38.82%、44.69%)、绿弯菌门(24.32%、33.10%)和变形菌门(9.74%、20.85%)。

在属水平上(图 3)，季节与样点位置差异不大，石下 BSCs 中均以蓝细菌门中的 *Trichocoleus*、*Chroococcidiopsis* 和未知属(属于蓝细菌纲)为优势属(9.25%–18.42%)，其余属的丰度都低于 5%，而地表 BSCs 中常见的、高丰度的 *Microcoleus* 属也存在，但丰度只有 2%左右；裸土中属分布比较分

散, 优势属(>5%)主要有 *Arthrobater*、*Rubrobacter* 和其他 3 个未知属(属于放线菌门或酸杆菌门)。

2.4 多样性分析

α 多样性指数可反映生物群落的丰富度和多样性。其中, 香农指数可以反映群落多样性, ACE 指数则可以反映物种丰富度。由表 2 可知, 裸土中细菌的香农指数和 ACE 指数较高, 例如 sOS1 的香农指数和 ACE 指数均为最高, 分别达到了 5.50 和 694.13; 在季节比较中, 9 月份的相应多样性指数普遍高于 5 月份的同类样品。

β 多样性表示的是微生物群落构成的比较, 评估微生物群落间的差异。对样品距离矩阵进行聚类分析, 构建样品层级聚类树研究不同样品的相似性和差异关系。本研究中 β 多样性样品聚类分析结果

表 2 α -多样性指数
Table 2 Alpha-diversity indexes

样品 Samples	香农指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index
mSX1	4.59	683.66
mSX2	4.33	622.69
sSX1	4.65	649.29
sSX2	4.62	639.52
sOS1	5.50	694.13
sOS2	4.95	638.52

(图 4A)表明, 同类型样品优先聚在一起, 其次是同季节的聚在一起。

PCA 分析即主成分分析, 通过分析不同样品群落组成可以反映样品间的差异和距离, 将多组数据的差异反映在二维坐标图上, 坐标轴取能够最大反映样品间差异的 2 个特征值, 样品物种组成越相似, 反映在 PCA 图中的距离越近。由 PCA 主成分分析结果(图 4B)可知, 主成分 PC1 和主成分 PC2 分别在样品差异性贡献率上为 76.84%和 17.67%, 合计达到 94.51%; 同季节的石下 BSCs 相距很近, 细菌群落结构更相似, 而 BSCs 与相应周围裸土样品的距离相聚较远, 两裸土之间相距也较远, 表明它们之间体现在 OTU 水平的细菌群落结构差异较大。

2.5 土壤理化因子与群落结构和组成的关系

环境因子与群落结构相关性分析将微生物按照分类水平与环境变量比较, 评估微生物群落与环境变量之间的关系: 环境因子对菌群分布的影响程度以向量的长度表示, 点到向量做垂线, 垂足的位置表示菌群与环境因子的相关性(正半轴: 正相关; 负半轴: 负相关), 向量间夹角为锐角表示两向量呈正相关, 钝角则呈负相关。5 个环境因子中任意 3 个组合的冗余分析结果表明, AP、OM 和 Chl a 组对细菌群落变化的解释度为最高, 可达 96.26% (图 5); 而且 AP、OM 和 Chl a 在其他

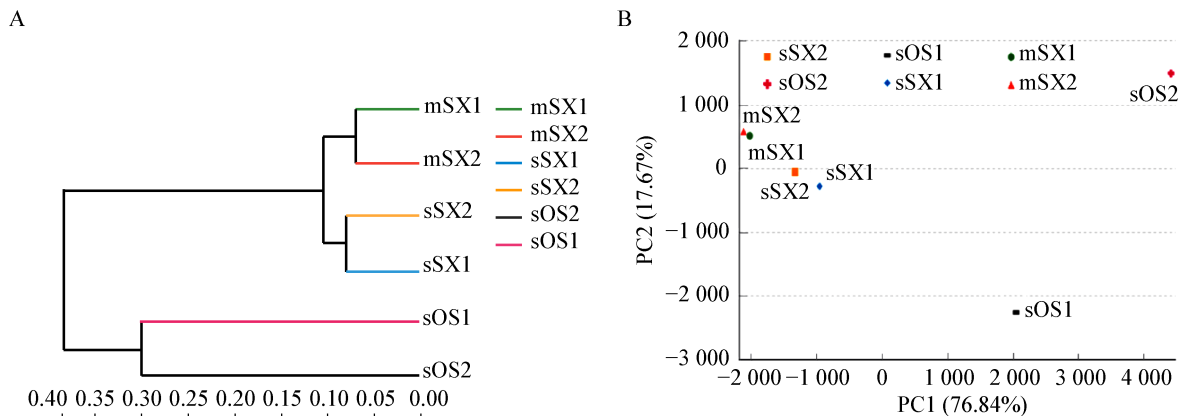


图 4 基于 Beta 多样性距离的样品层级聚类树(A)和主成分分析图(B)

Figure 4 Hierarchical clustering tree based on the beta diversity of distance (A) and principal component analysis (B)

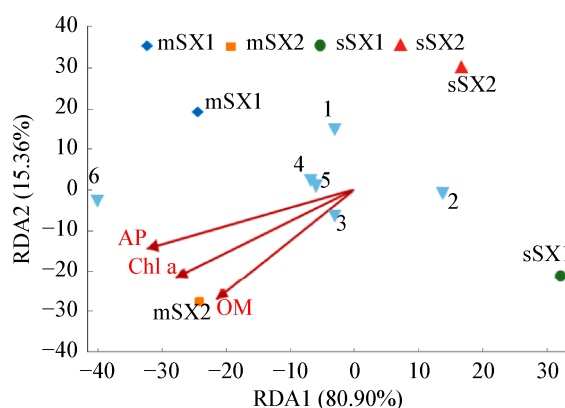


图 5 基于冗余分析土壤理化因子与主要细菌类群的关系

Figure 5 Relationship between soil physiochemical properties and major bacterial groups revealed by RDA

注：1：Unclassified_f_Cytophagaceae；2：Uncultured_c_Cyanobacteria；3：Chroococcidiopsis；4：Leptolyngbya；5：Uncultured_f_Methylobacteriaceae；6：Trichocoleus。

Note: 1: Unclassified_f_Cytophagaceae; 2: Uncultured_c_Cyanobacteria; 3: Chroococcidiopsis; 4: Leptolyngbya; 5: Uncultured_f_Methylobacteriaceae; 6: Trichocoleus.

组的分析也表明它们是对菌群结构影响最主要的因子，而 AN 和 pH 的影响相对较弱(数据未列)；其中，AP 的射线最长，说明其对细菌群落组成的影响程度最大，但未达到显著水平($P=0.4>0.05$)；而 AP、Chl a 和 OM 与 *Chroococcidiopsis*、*Leptolyngbya*、Uncultured_f_Methylobacteriaceae 和 *Trichocoleus* 呈正相关，与 Unclassified_f_Cytophagaceae 和 Uncultured_c_Cyanobacteria 呈负相关，其中与 *Chroococcidiopsis* 和 *Trichocoleus* 的相关性最强、相关系数 $R^2>0.9$ 。

2.6 网络分析

石下 BSCs 中细菌共现性网络分析结果(图 6)表明，除 OTU-137 (*Actinophytocola* 属)和 OTU-99 (Cyanobacteria 纲中未知属)与其它物种关系较弱之外，其它物种之间存在较强的直接或间接相互作用关系($P<0.05$)。呈正相关的 OTU 所占比例为 59.0%。网络图中模块之间的连接点，以及模块内以点度中心性、接近中心性和中介中心性均较高的

节点为预测关键或核心物种，它们包括 OTU-93 (*Leptolyngbya* 属)、OTU-398 (Actinobacteria 门)、OTU-69 (Alphaproteobacteria 纲中未知属)、OTU-98 (*Chroococcidiopsis* 属)、OTU-97 (*Microcoleus* 属)、OTU-566 (*Rubellimicrobium* 属)、OTU-712 (*Bosea* 属)、OTU-760 (α -Proteobacteria 纲中未知属)、OTU-102 (Cyanobacteria 纲中未知属)、OTU-52 (α -Proteobacteria 纲中未知属)、OTU-745 (*Acaryochloris* 属)、OTU-614 (*Microvirga* 属)和 OTU-259 (*Truepera* 属)；其中，除 OTU-259 外其余均属于 Cyanobacteria 门和 α -Proteobacteria 纲。

3 讨论

相比其它石头或裸土，戈壁里透光的石头下常定殖有大量微生物，形成石下 BSCs，对荒漠生态系统的元素循环起重要作用。而环境因素对这些石下 BSCs 中的细菌群落结构具有很大的影响^[15]。在本研究中，中央戈壁地处蒙古高原，昼夜温差大，远离海洋，极其干旱，属典型的中温带大陆性气候，其石下 BSCs 中细菌以 Cyanobacteria 为最优势菌门(46%–53%)，其次为 Actinobacteria (15%–19%)、Chloroflexi (8%–10%)、Proteobacteria (13%–15%)、Bacteroidetes (3%–7%) 和 Gemmatimonadetes (1%–2%)，而 Firmicutes 却不足 0.1%，占优势(>5%)的目有 Oscillatoriales (13.12%)、Nostocales (9%–12%)和 Rhizobiales (约 6%)。中央戈壁细菌群落结构在季节和采样点位置上差异不明显，而石下 BSCs 与相邻裸土的种类相近，但是组成比例差异显著，其他研究中也存在类似情况^[7-8]，推测石下 BSCs 细菌群落是从裸土演变而来。石下 BSCs 存在分别以有蓝细菌、真菌和苔藓为主的 3 种类型^[22]，但蓝细菌为主型之外的其它 2 种类型只在南极相关研究中有所报道。因为细菌群落中是以 Cyanobacteria 为主且颜色为绿色，而且肉眼未见明显的黑色/菌丝缠绕砂砾和苔藓，判断本研究中的石下 BSCs 属于初级阶段的 Type I 型(*Cyanobacteria* 型)；而其他研究虽未明确指出石下 BSCs 类型，但



采样时的平均温度差异不大有关(相较寒温带与热带巨大的温度差别而言)。此外,西藏戈壁较中央戈壁所处蒙古高原海拔更高,其蓝细菌的比例也更高;在南极高海拔石下蓝细菌比例也较低海拔地区为高^[8,23-24]。这似乎说明,随海拔的升高,石下 BSCs 中的蓝细菌所占细菌比例增加,海拔也是影响石下细菌群落结构的重要因素之一。海拔的增高可能使得荒漠逆境加重,而蓝细菌具有的固碳和固氮等能力可使其在严重的逆境中支撑自我及其它异养细菌的发展^[12]。地表 BSCs 一般会经历“藻-地衣-苔藓结皮”这样由低级到高级的发育演替历程,并分为相应的 3 种类型,细菌群落结构与发育阶段相关^[28]。因此,尽管目前相关支撑数据还很少,石下 BSCs 细菌群落结构也可能与 BSCs 类型有关^[24-25]。无论是地表还是石下 BSCs,土壤水分对它们的微生物群落结构都具有决定性影响,尤其是石下 BSCs 形成的先决条件^[13-14,28]。磷是生物大分子的主要组分,它是地壳中含量最丰富的代谢元素之一。已有研究证明添加外源生物可利用磷(Bio-available phosphorus, BAP)可极大地促进地表 BSCs 的发展和演替^[29]。本研究还表明 AP、OM 和 Chl a 与石下 BSCs 细菌群落结构息息相关,这些土壤理化因子既是细菌群落演替的“果”,也是“因”,蓝细菌等定殖引起 Chl a 和有机质等变化,这些变化为异养细菌定殖创造了条件,因而又使菌群结构改变^[24]。而且,AP、OM 和 Chl a 又与蓝细菌门中的 *Trichocoleus* 和 *Chroococcidiopsis* 属的关系最为密切($R^2 > 0.9$,相关性较高)。*Trichocoleus* 和 *Chroococcidiopsis* 属的成员,可能因为它们具有固氮和/或光合固碳功能以及高的抗热和耐缺水等特性^[30-32],从而成为中央戈壁石下 BSCs 中的主要初级生产者,以及关键生源要素循环的主要作用者。有网络分析研究表明,Cyanobacteria 门是石下 BSCs 微生物群落装配和功能的驱动者^[6,12],同时 α -Proteobacteria 纲是与 Cyanobacteria 互作密切形成石下 BSCs 小生境的主要群落^[6],这与本研究网络分析结果类似,我们

发现 Cyanobacteria 门和 α -Proteobacteria 纲是中央戈壁石下 BSCs 中关键或核心的物种,它们驱动了中央戈壁石下 BSCs 的早期发育。

4 结论

中央戈壁石下 BSCs 明显不同于临近裸土的细菌群落结构和多样性,Cyanobacteria 门和 α -Proteobacteria 纲是该地区石下早期 BSCs 形成和发育最初和最重要的驱动力。

REFERENCES

- [1] Shen YC, Wang XH, Cheng WM, et al. Integrated physical regionalization of stony deserts in China[J]. Progress in Geography, 2016, 35(1): 57-66 (in Chinese)
申元村, 王秀红, 程维明, 等. 中国戈壁综合自然区划研究[J]. 地理科学进展, 2016, 35(1): 57-66
- [2] Chan Y, Lacap DC, Lau MCY, et al. Hypolithic microbial communities: between a rock and a hard place[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(9): 2272-2282
- [3] Cockell CS, Stokes MD. Ecology: widespread colonization by polar hypoliths[J]. Nature, 2004, 431(7007): 414
- [4] Hutchins PR, Miller SR. Genomics of variation in nitrogen fixation activity in a population of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*[J]. The ISME Journal, 2017, 11(1): 78-86
- [5] Laity JJ. Deserts and Desert Environments[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009
- [6] van Goethem MW, Makhalanyane TP, Cowan DA, et al. Cyanobacteria and Alphaproteobacteria may facilitate cooperative interactions in niche communities[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2099
- [7] Cowan DA, Sohm JA, Makhalanyane TP, et al. Hypolithic communities: important nitrogen sources in Antarctic desert soils[J]. Environmental Microbiology Repress, 2011, 3(5): 581-586
- [8] van Goethem MW, Makhalanyane TP, Valverde A, et al. Characterization of bacterial communities in lithobionts and soil niches from Victoria Valley, Antarctica[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92: fiw051
- [9] Vikram S, Guerrero LD, Makhalanyane TP, et al. Metagenomic analysis provides insights into functional capacity in a hyperarid desert soil niche community[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(6): 1875-1888
- [10] Chan Y, Van Nostrand JD, Zhou JZ, et al. Functional ecology of an Antarctic dry valley[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(22): 8990-8995
- [11] Le PT, Makhalanyane TP, Guerrero LD, et al. Comparative metagenomic analysis reveals mechanisms for stress response in hypoliths from extreme hyperarid deserts[J]. Genome Biology and Evolution, 2016, 8(9): 2737-2747
- [12] Valverde A, Makhalanyane TP, Seely M, et al. Cyanobacteria drive

- community composition and functionality in rock-soil interface communities[J]. *Molecular Ecology*, 2015, 24(4): 812-821
- [13] Warren-Rhodes KA, Kevin LR, Boyle LN, et al. Cyanobacterial ecology across environmental gradients and spatial scales in China's hot and cold deserts[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(3): 470-482
- [14] Pointing SB, Warren-Rhodes KA, Lacap DC, et al. Hypolithic community shifts occur as a result of liquid water availability along environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 414-424
- [15] Christian K, Kaestli M, Gibb K. Spatial patterns of hypolithic cyanobacterial diversity in Northern Australia[J]. *Ecology and Evolution*, 2017, 7(17): 7023-7033
- [16] Lü YW, Gu ZY, Aldahan A, et al. 10 Be in quartz gravel from the Gobi Desert and evolutionary history of alluvial sedimentation in the Ejina Basin, Inner Mongolia, China[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2010, 55(33): 3802-3809
- [17] Zhang JE. A Common Experimental Study of Methods and Techniques on Ecology[M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2007: 225 (in Chinese)
- 章家恩. 生态学常用实验研究方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 225
- [18] Bao SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis [M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 34 (in Chinese)
- 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 34
- [19] Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents[J]. *Photosynthesis Research*, 2006, 89(1): 27-41
- [20] Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome[J]. *PLoS Computational Biology*, 2012, 8(7): e1002606
- [21] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504
- [22] Makhalanyane TP, Valverde A, Birkeland NK, et al. Evidence for successional development in Antarctic hypolithic bacterial communities[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(11): 2080-2090
- [23] Stomeo F, Valverde A, Pointing SB, et al. Hypolithic and soil microbial community assembly along an aridity gradient in the Namib Desert[J]. *Extremophiles*, 2013, 17(2): 329-337
- [24] Cowan DA, Khan N, Pointing SB, et al. Diverse hypolithic refuge communities in the McMurdo Dry Valleys[J]. *Antarctic Science*, 2010, 22(6): 714-720
- [25] Wong FKY, Lacap DC, Lau MCY, et al. Hypolithic microbial community of quartz pavement in the high-altitude tundra of central Tibet[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 730-739
- [26] Martiny JBH, Eisen JA, Penn K, et al. Drivers of bacterial β -diversity depend on spatial scale[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(19): 7850-7854
- [27] Armstrong A. Seasonal dynamics of edaphic bacterial communities in the hyper-arid Namib desert[D]. South Africa: Master's Thesis of University of the Western Cape, 2014
- [28] Belnap J, Weber B, Büdel B. Biological soil crusts as an organizing principle in drylands[A]//*Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2016: 3-13
- [29] Schmidt SK, Nemergut DR, Todd BT, et al. A simple method for determining limiting nutrients for photosynthetic crusts[J]. *Plant Ecology and Diversity*, 2012, 5(4): 513-519
- [30] Charpy L, Palinska KA, Casareto B, et al. Dinitrogen-fixing cyanobacteria in microbial mats of two shallow coral reef ecosystems[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(1): 174-186
- [31] Hagemann M, Henneberg M, Felde VJMN, et al. Cyanobacterial diversity in biological soil crusts along a precipitation gradient, northwest Negev desert, Israel[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 219-230
- [32] Büdel B. Cyanobacteria: habitats and species[A]//*Plant Desiccation Tolerance*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 11-21