



## 中央戈壁石下生物土壤结皮固氮细菌群落结构和多样性

郑超 刘扬 陶羽 杨丽华 冯福应 陈玉萍\*

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

**摘要:**【背景】戈壁荒漠石下生物土壤结皮(Biological Soil Crusts, BSCs)由石下生物定殖繁衍而成,广泛存在于石英石下方,在相关生态系统的物质循环中起重要作用;其细菌群落结构受空间和土壤环境因子影响而变化较大。固氮细菌是石下 BSCs 的形成和发育主要驱动力;中央戈壁面积较大,为温带的代表戈壁之一,但目前其石下 BSCs 中固氮细菌群落结构和多样性尚未有研究报道。【目的】阐释中央戈壁石下 BSCs 中固氮细菌的群落结构、多样性及其影响因素。【方法】应用 MiSeq 对 *nifH* 基因进行高通量测序,并使用生物信息学方法基于 *nifH* 序列分析固氮细菌的群落结构和多样性及其影响因素。使用 CoNet 软件绘制物种共现性图,以期揭示石下固氮细菌群落结构的关键物种。【结果】石下固氮细菌的优势菌门有 *Cyanobacteria* (47.20%–69.90%)和 *Proteobacteria* (27.47%–48.91%);优势菌属为 *Scytonema* (45.05%–69.09%)、*Skermanella* (10.26%–20.48%)和未知属(13.72%–22.00%);9月份物种丰富度较5月份高,但这2个月份的多样性无明显差异;在土壤理化因子中,速效氮对石下固氮细菌群落组成的影响最大;其中各微生物之间均存在较强的互作关系,以共存关系为主(约占66.98%),点度中心性、接近中心性和中介中心性均较高的节点属于 *Alphaproteobacteria*。【结论】中央戈壁石下 BSCs 中固氮细菌以 *Cyanobacteria* 和 *Proteobacteria* 为最优势菌群;*Alphaproteobacteria* 为稳定石下 BSCs 固氮细菌群落的关键类群,可能是主要固氮者,这为认识和利用石下生物土壤结皮固氮细菌提供了基础依据。

关键词: 生物土壤结皮, 固氮细菌, *nifH*, 多样性

## Structure and diversity of hypolithic diazotroph in central gobi

ZHENG Chao LIU Yang TAO Yu YANG Lihua FENG Fuying CHEN Yuping\*

Laboratory for Applied and Environmental Microbiology, College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

**Abstract:** [Background] Hypolithic biological soil crusts (BSCs) in the Gobi desert are colonized and multiplied by under-rock organisms, widely exist under quartzite, and play an important role in the material cycle of related ecosystems. The bacterial community structure was greatly shifted with the change of spaces and different type of soils. Nitrogen-fixing bacteria are the main driving force for the

**Foundation items:** Key Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2019GG001); National Natural Science Foundation of China (31560030); Science and Technology Innovation-Oriented Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2017)

\*Corresponding author: Tel: 86-471-4309240; E-mail: chypapple@126.com

Received: 05-07-2020; Accepted: 31-08-2020; Published online: 12-10-2020

基金项目: 内蒙古自治区关键技术攻关计划(2019GG001); 国家自然科学基金(31560030); 内蒙古自治区科技创新引导项目(2017)

\*通信作者: Tel: 0471-4309240; E-mail: chypapple@126.com

收稿日期: 2020-07-05; 接受日期: 2020-08-31; 网络首发日期: 2020-10-12

formation and development of hypolithic BSCs. The central gobi has a wide area and as a representative of the temperate gobi. However, there are no research reports on the community structure and diversity of nitrogen-fixing bacteria in hypolithic BSCs. **[Objective]** To explain the community structure, diversity and factors influencing nitrogen-fixing bacteria in hypolithic BSCs. **[Methods]** The methods included MiSeq to perform high-throughput sequencing of the *nifH* gene; bioinformatics to analyze the community structure and diversity of nitrogen-fixing bacteria and its influencing factors based on the *nifH* sequence, and CoNet software to map species co-occurrence networks to discover key species. **[Results]** In hypolithic BSCs, the dominant phyla were *Cyanobacteria* (47.20%–69.90%) and *Proteobacteria* (27.47%–48.91%), and genera were *Scytonema* (45.05%–69.09%), *Skermanella* (10.26%–20.48%) and unclassified genera (13.72%–22.00%). The species richness in September was higher than that in May, but there was no significant difference between the two months. Among others, available nitrogen was the soil physical and chemical factor that had the greatest impact on the composition of nitrogen-fixing bacterial communities in the hypolithic BSCs. There was a strong interaction between the microorganisms in nitrogen-fixing bacteria under the rock, and the relationship was mainly coexistence (about 66.98%). In the CoNet network, the nodes with high degree of centrality, close centrality and betweenness centrality all belonging to *Alphaproteobacteria*. **[Conclusion]** *Cyanobacteria* and *Proteobacteria* were the most dominant nitrogen-fixing bacteria in hypolithic BSCs of Central Gobi. *Alphaproteobacteria* was the key species stabilizing the nitrogen-fixing bacterial community and may be the main nitrogen fixers. This study provided a basic basis for understanding and using the nitrogen-fixing bacteria associated with hypolithic BSCs.

**Keywords:** BSCs, nitrogen-fixing bacteria, *nifH*, diversity

荒漠约占地球陆地面积的40%，其中有1/3处于干旱和半干旱地区。因土壤水分和氮营养低而致使荒漠生态系统生产力低下<sup>[1]</sup>，这种氮缺乏会在旱季时加剧<sup>[2]</sup>。在荒漠生态系统中，微生物是生态过程和服务功能的关键驱动者<sup>[3-5]</sup>，特别是在以 *Cyanobacteria* 为优势微生物的生物土壤结皮 (Biological Soil Crusts, BSCs) 与石下和石内生物定殖的微生物中，微生物作为最主要的初级生产者，对于碳和氮的收支起着积极而重要的作用<sup>[6]</sup>。例如，在温带荒漠中藻类 BSCs 的固氮酶活性可高达  $133 \mu\text{mol-C}_2\text{H}_4/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ <sup>[7]</sup>；在南极荒漠土壤中，以乙烯还原法 (Acetylene Reduction Assays, ARA) 测定出石下生物具有固氮能力，固氮活性最高为  $0.174 \text{ nmol-N}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ，并检测到了固氮功能的标志分子 *nifH* 基因，但周边裸土未检测到固氮活性，表明石下生物是北极荒漠的重要氮源<sup>[8]</sup>；在美国 Mojave 荒漠南部，以稳定同位素 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) 标记和 ARA 也检测到了石下微生物的固氮活性<sup>[9]</sup>；基于 GeoChip 基因芯片分析检测到南极石下生物中微生物

介导的完整固氮途径<sup>[10]</sup>。在 Namib 荒漠中初级生产力也可能由石下固氮细菌群落驱动<sup>[11]</sup>。对于荒漠石下固氮细菌群落结构和多样性的相关研究极少，目前仅有南极和 Namib 荒漠有过相关报道。但土壤中细菌<sup>[12]</sup>和固氮细菌<sup>[13]</sup>群落结构和多样性随空间尺度变化有很大的不同。石下生物群落可作为模式系统，是当前研究微生物群落装配及功能的热点<sup>[14]</sup>。

中央戈壁绵亘中亚，跨越中国和蒙古两国，地处温带，属于寒漠，冬和夏以及昼和夜之间的温差巨大，植被稀疏，降雨量极低，其土壤表面散布有大量透光的石英石，为石下生物定殖提供了良好的庇护。研究表明，中央戈壁与其他区域石下细菌的群落结构和多样性存在较大不同<sup>[15]</sup>，但该区域石下固氮细菌的群落结构和多样性尚未见报道。

本研究利用 MiSeq 高通量测序技术对中央戈壁南部 (阿拉善境内东北部) *nifH* 基因进行测序分析，以期揭示中央戈壁石下 BSCs 中固氮细菌群落

结构和多样性以及影响其组装的环境因子,为理解石下固氮细菌的生态功能及其对戈壁生态系统环境的修复潜力提供基础依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 生物土壤结皮的采集和处理

本实验所用样品采集于内蒙古西部阿拉善盟(41°57'58"N, 101°55'44"E, 海拔 941 m), 2016 年 5 月下旬在中央戈壁采集石下 BSCs (样品编号分别为 mHpy1 和 mHpy2); 于同年 9 月下旬在同一地点采集石下 BSCs (样品编号分别为 sHpy1 和 sHpy2)。利用五点采样法, 各采样点相距约 100 m, 轻轻刮取戈壁滩透明石英石底部约 1 mm 厚度的绿色表层, 每个点大约采集 30 块石英石(大小约 8 cm×8 cm), 分别混匀后装入无菌采样袋低温运回实验室, -80 °C 保存备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

E.Z.N.A. Soil DNA 提取试剂盒、TransStart *FastPfu* DNA Polymerase、AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, AXYGEN 公司; Tris-HCl 洗脱剂、TruSeq™ DNA Sample Prep Kit、pEASY-T1 克隆试剂盒、EasyPure HiPure Plasmid MaxiPrep 试剂盒、SYBR Premix *Ex Taq*™ 荧光定量预混液, 北京全式金生物技术有限公司。

精密分析天平, 赛多利斯公司; pH 仪, HANNA 公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; 照胶仪, 北京赛智创业科技有限公司; PCR 仪, Biometra 公司; 酶标仪, Biotek 公司; 核酸定量仪, 上海朗赋实业有限公司。

### 1.3 土壤理化指标

研究所用土样与文献[15]中所用土样相同, 本研究中编号为 mHpy1、mHpy2、sHpy1 和 sHpy2 的样品分别对应其中的 mSX1、mSX2、sSX1 和 sSX2; 理化指标详见文献[14], 相关数据用于本研究中影响石下固氮细菌群落结构的环境

因子分析。

### 1.4 样品总 DNA 的提取

称取土样 0.5 g, 根据土壤基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取样品总 DNA; 每个样品做 3 个重复, 将所得 DNA 混匀, 使用 NanoDrop 2000 对 DNA 质量进行检测, 检测  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8–2.0 之间, 置于 -80 °C 保藏、备用。

### 1.5 高通量分析

以各样品总 DNA 为模板扩增 *nifH* 基因, 正向引物为 F: 5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTC CACCAC-3'; 反向引物为 R: 5'-TTGTTSGCSGC RTACATSGCCATCAT-3'<sup>[8]</sup>。PCR 反应体系: 5×*FastPfu* Buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 正、反向引物 (5 μmol/L) 各 0.8 μL, *FastPfu* Polymerase (2.5 U/μL) 0.4 μL, DNA 模板 10 ng, BSA 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 8 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。委托上海美吉生物医学技术有限公司使用 Illumina MiSeq 测序平台进行 PCR 产物的高通量测序分析。

### 1.6 数据分析

#### 1.6.1 测序数据的质控和处理

FLASH (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 用于拼接每个样本的 Reads, USEARCH 软件平台用于优化和去杂以获得高质量的 Tag 数据 (Clean Tags)。Mothur 和 R 语言工具用于稀释性曲线的绘制和计算。

#### 1.6.2 操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 分类及注释

使用 USEARCH 软件, 当 Cutoff=0.05 时, 对设定聚类非重复序列去除嵌合体, 进而确定每个 OTU 的代表序列; 通过 FGR/*nifH* Gene Bank (Release 7.3) (<http://fungene.cme.msu.edu/>) 功能数据库对 OTU 进行注释, 并在科 (Family) 分类水平统计各样品的群落组成。

### 1.6.3 多样性分析

使用 Mothur 软件(<http://www.mothur.org/>)对  $\alpha$ 多样性进行分析, 通过 Chao1 指数和 ACE 指数反映群落丰富度; 通过香农指数和辛普森指数反映群落多样性。

使用 UniFrac Metric 计算进化树中的不同环境样品间 Unique Branch 长度总和, 进而得到样品聚类分析和样品主成分分析(Principal Component Analysis, PCA), 反映群落  $\beta$ 多样性。

### 1.6.4 物种共现性网络分析

利用 CoNet 软件以测序得到的 OTU 物种相对丰度表为原始数据绘制微生物共现性网络图; 使用 Cytoscape V3.8.0 软件可视化生成的网络图模块化不同的物种, 并分析微生物之间的相互关系。

### 1.6.5 影响群落结构的环境因子分析

利用软件 Canoco 5.0 作相关性 Heatmap 图分析, 揭示影响群落结构的环境因子。将主要固氮菌和采样点分别作为“Sample”和“Species”, 土壤 pH 值、速效氮(Available Nitrogen, AN)、叶绿素 a (Chlorophyll a, Chl a)、速效磷(Available Phosphorus, AP)和有机质(Organic Matter, OM)含量作为“Environment Variable”, 将数据标准化后导入, 生成相关性 Heatmap 图, 分析环境因子对群落结构的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 稀释性曲线

通过对样品高通量数据统计, 4 个样品的 *nifH* 基因测序分别得到 28 449、23 092、34 613、30 726 条序列。稀释性曲线可以用来说明样品的测序数据量是否合理, 趋于平缓的稀释曲线(图 1)说明本研究的高通量测序可良好地反映实验环境中的固氮细菌群落结构。

### 2.2 石下 BSCs 中固氮菌多样性指数分析

$\alpha$ 多样性指数是描述物种多样性的重要指标。其中, Shannon 和 Simpson 指数可以反映物种多样性, ACE 和 Chao1 指数则可以反映物种丰富

度。对不同季节中央戈壁石下结皮中固氮菌的多样性指数进行了分析, 结果(表 1)表明物种丰富度指数(ACE 和 Chao1)表现为 9 月份略高于 5 月份, 而多样性指数在 2 个季节之间无明显差别。

$\beta$ 多样性通过比较不同样品中的微生物群落构成, 进而评估微生物群落间的差异。对样品进行聚类分析和主成分分析, 通过构建样品层级聚类树揭示不同样品的相似性和差异性。如图 2 所示, 在  $\beta$ 多样性样品聚类分析中, 同时期的样品聚在一起, 表明群落结构更为相似。

### 2.3 石下 BSCs 中固氮菌群落结构和组成分析

根据石下 BSCs 样品中固氮菌的 OTU 数目, 对其物种组成进行分析, 构建 Venn 图(图 3)。从图 3 可知, 4 组样品中共有 OTU 为 137 个; 5 月份的 2 组样品共有的 OTU 数目为 7, 9 月份的 2 组样品共有的 OTU 数目为 22。mHpy1、mHpy2、

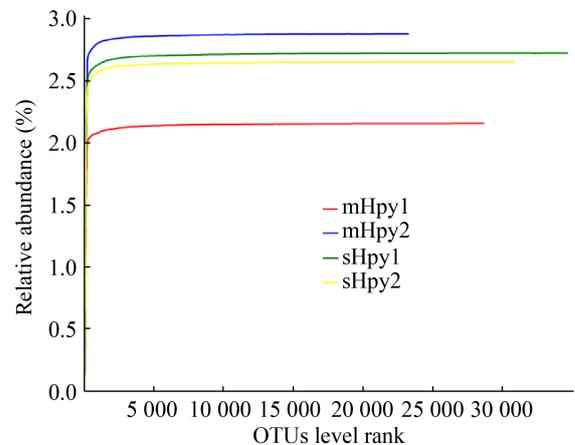


图 1 稀释性曲线

Figure 1 The rarefaction curves

表 1  $\alpha$ 多样性指数

Table 1 Alpha diversity indexes

样品	香农指数	辛普森指数	ACE 指数	Chao1 指数
Sample	Shannon index	Simpson index	ACE index	Chao1 index
sHpy1	2.72	0.16	222.63	225.71
sHpy2	2.65	0.16	213.90	217.24
mHpy1	2.16	0.23	199.08	200.18
mHpy2	2.88	0.11	195.59	195.00

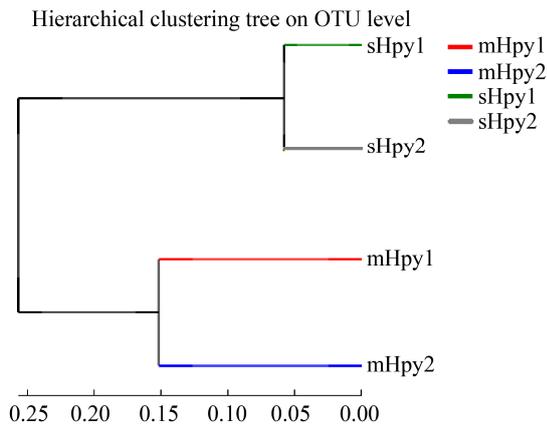


图2 样品层级聚类分析图

Figure 2 Hierarchical clustering tree of the samples

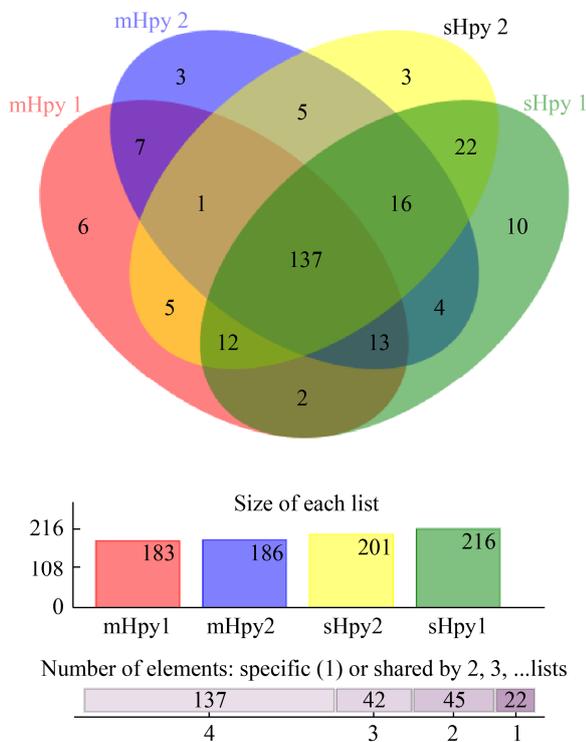


图3 固氮菌 OTU 的 Venn 图

Figure 3 The Venn diagram of nitrogen-fixing bacteria 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

sHpy1 和 sHpy2 特有 OTU 数目分别为 6、3、3 和 10。

在门分类水平上，石下 BSCs 中固氮细菌的群落结构共有 *Cyanobacteria*、*Proteobacteria* 和未知

门三大类。其中优势菌门为 *Cyanobacteria* (47.20%–69.90%) 和 *Proteobacteria* (27.47%–48.91%)。不同季节的石下 BSCs 主要组成群落基本相似，但在物种丰富度上有显著差异。例如 mHpy1 的 *Cyanobacteria* 和 *Proteobacteria* 丰度分别为 69.90% 和 27.47%，而 sHpy1 的 *Cyanobacteria* 和 *Proteobacteria* 丰度分别为 49.57% 和 42.52%。

在科分类水平上，不同季节的石下 BSCs 主要组成群落也大致相似(图 4A)：主要(相对丰度超过 10%)以 *Scytonemataceae* (43.92%–67.80%)、*Rhodospirillaceae* (13.44%–26.62%) 和未知菌科(属于 *Proteobacteria*) (13.51%–21.48%) 为优势菌科。地表 BSCs 中常见的高丰度的 *Nostocaceae* 也在 5 月份的样品中被发现，但是丰度只有 2.12%–3.76%，而且在 9 月份的样品中未发现。

在属分类水平上，石下 BSCs 主要群落组成(相对丰度超过 10%)以 *Scytonema* (45.05%–69.09%)、*Skermanella* (10.26%–20.48%) 和未知属(属于 *Proteobacteria*) (13.72%–22.00%) 为优势菌属。在不同季节，石下 BSCs 的主要组成群落物种丰度有显著差异：5 月份样品中的 *Scytonema* 丰度平均可达 61.34%，而 9 月份样品中的 *Scytonema* 丰度平均为 50.43%，但是 5 月份的 *Skermanella* (17.64%) 和未知属(属于 *Proteobacteria*) (14.27%) 均低于 9 月份的 *Skermanella* (19.38%) 和未知属(属于 *Proteobacteria*) (19.80%)。在 5 月份土样中还发现了一种未知属(属于 *Microchaetaceae*) (0.45%)，但是在 9 月份样品中未发现。

## 2.4 共现性网络分析

物种共现性网络(Co-Occurrence Network, CoNet)分析主要反映物种在环境中的共存关系，是探索物种间假定的生态关联的有力工具<sup>[16]</sup>。对细菌群落网络的研究探索了土壤生态位群落内的微生物相互作用<sup>[17-18]</sup>。结果(图 5)显示，通过 CoNet 分析共得到 44 个节点和 106 条连线，66.98% 呈正相关，33.02% 呈负相关。除 OTU-131 (*Proteobacteria* 中未知属)、OTU-188(分类于

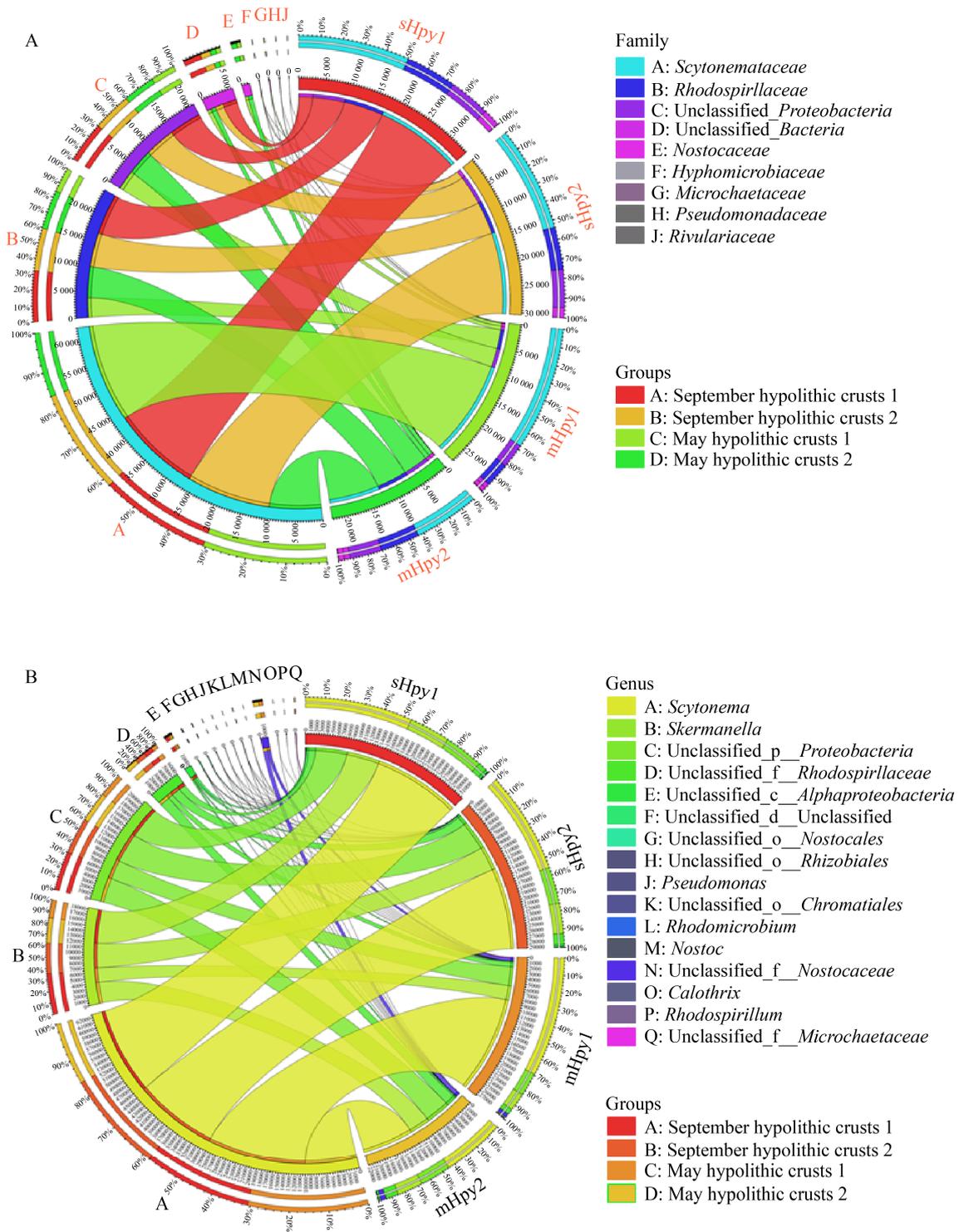


图 4 基于 *nifH* 在科水平(A)和属水平(B)的细菌群落结构

Figure 4 Bacteria community structure at family level (A) and genus level (B) based on *nifH*

注: 连线宽度代表该分组中细菌所占比例

Note: The line width represents the proportion of the bacteria in the group

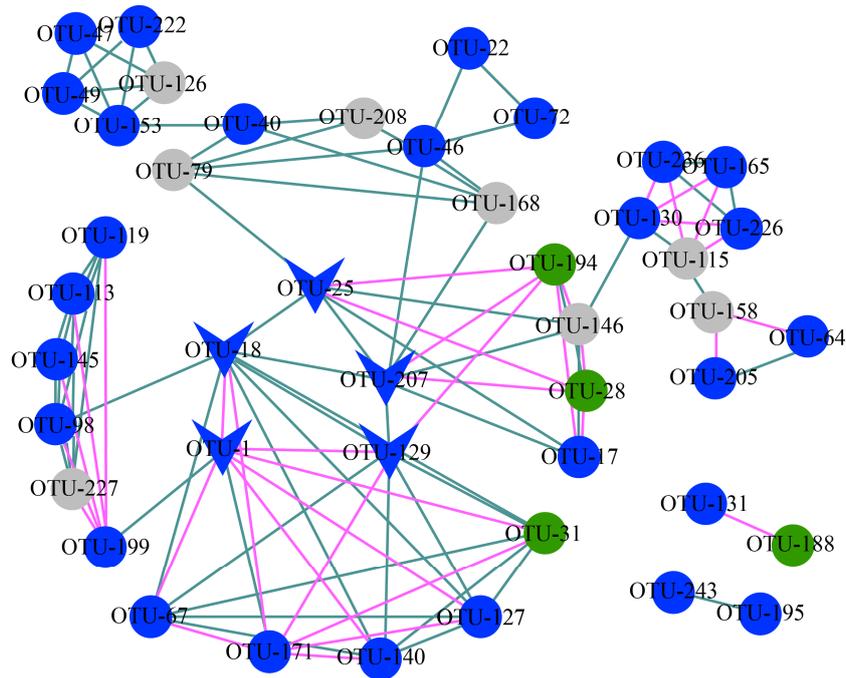


图 5 石下生物土壤结皮中固氮细菌的共现性网络

Figure 5 Co-occurrence network of diazotrophs in hypolithic biological soil crusts

注：蓝色直线表示物种之间关系为正相关，即共存；粉色直线表示物种之间关系为负相关，即相互排斥。倒三角图标为预测的关键物种，蓝色圆圈表示 *Proteobacteria*，绿色圆圈表示 *Cyanobacteria*，灰色圆圈表示未知菌门

Note: The blue line indicates that the relationship between species is positively correlated, i.e. co-occurrence. The pink line indicates that the relationship between species is negatively correlated, i.e. mutual exclusion. Triangle represent putative keystone species. Blue circles for *Proteobacteria*; Green circles for *Cyanobacteria*; Gray circles for unclassified phylum

*Scytonema*)、OUT-195 (分类于 *Rhodospirillaceae* 中未知属)、OUT-243 (分类于 *Skermanella*)与其他物种关系较弱之外，其他物种之间存在较强的相互作用关系( $P < 0.05$ )。连接度和中介中心性较高的节点为预测到的稳定石下固氮细菌群落的关键物种。它们包括 OTU-1 (分类于 *Proteobacteria* 中未知属)、OTU-18 (分类于 *Skermanella*)、OUT-25 (分类于 *Skermanella*)、OTU-207 (分类于 *Proteobacteria* 中未知属)、OTU-129 (分类于 *Proteobacteria* 中未知属)，均属于 *Alphaproteobacteria*。

## 2.5 土壤理化因子与群落结构和组成的关系

相关性 Heatmap 图通过相关性数值可视化展示样本中不同的物种与环境变量之间的关系，评估微生物分类与环境变量之间的相关性。环境因

子对菌群生长的影响程度以相关性  $r$  值与显著性  $P$  值表示， $r$  值在图 6 中以不同颜色展示， $r$  值  $> 0$  则表示正相关， $r$  值  $< 0$  则表示负相关。5 个环境因子中任意 3 个组合的相关性分析结果(图 6)表明，AN、AP 和 OM 对固氮菌群落变化影响较显著，而 pH 的影响相对较弱(数据未列)。其中 AP 和 OM 与固氮细菌类群丰度的相关性基本一致，与 AP 和 OM 呈正相关的有 *Unclassified\_f\_Nostocaceae*、*Nostoc*、*Unclassified\_f\_Microchaetaceae*、*Pseudomonas*、*Unclassified\_d\_Unclassified*、*Unclassified\_o\_Chromatiales*、*Calothrix*、*Unclassified\_f\_Rhodospirillaceae*、*Rhodospirillum* 和 *Rhodomicrobium*；与 AP 和 OM 呈负相关的有 *Scytonema*、*Unclassified\_c\_Alphaproteobacteria*、*Unclassified\_k\_Norank-d-Bacteria*、*Unclassified\_p\_*

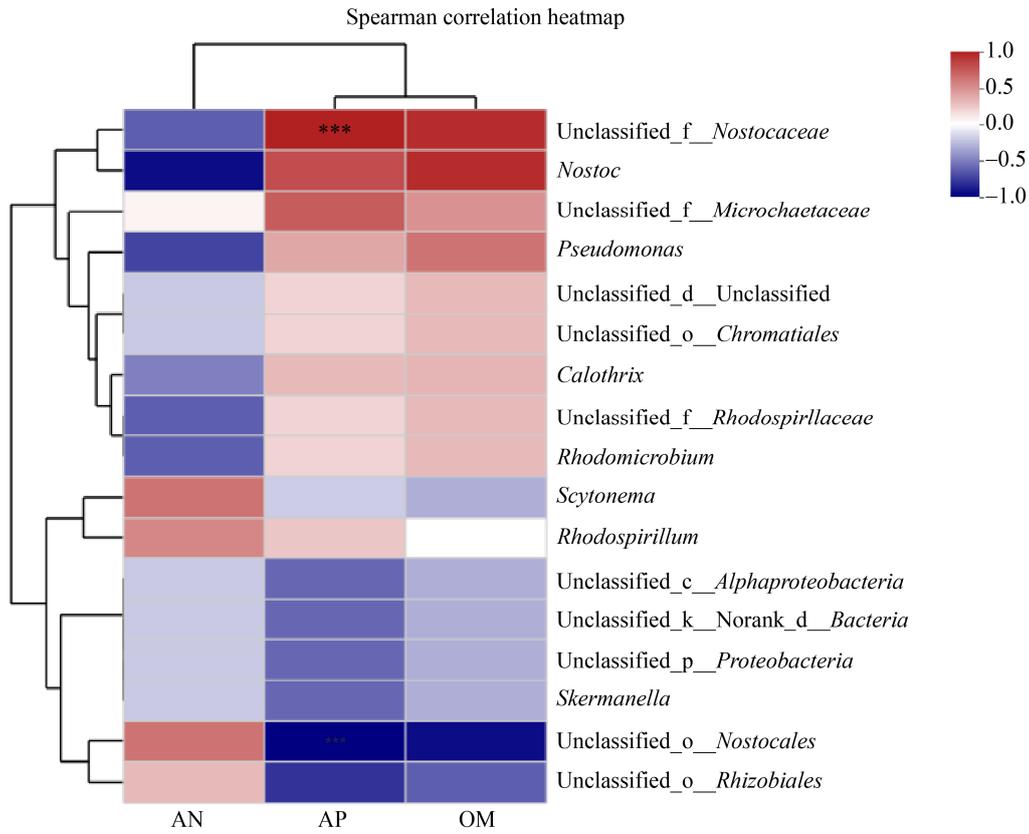


图 6 土壤理化因子与主要固氮细菌类群的相关性热图

Figure 6 The correlation heatmap between soil physiochemical factors and main diazotrophs groups

注: X轴和Y轴分别为环境因子和物种, AN代表速效氮, AP代表速效磷, OM代表有机质;通过计算获得相关性r值和P值。图中不同颜色代表r值,右侧图例表示不同r值对应的颜色区间;\*表示P值,\* : 0.01 < P ≤ 0.05, \*\* : 0.001 < P ≤ 0.01, \*\*\* : P ≤ 0.001

Note: The X-axis and Y-axis are environmental factors and species respectively, AN represents available nitrogen, AP represents available phosphorus, and OM represents organic matter; The correlation r value and P value are obtained through calculation. The r value is shown in different colors in the figure, and the legend on the right represents color intervals corresponding to different r values. \* is the P value, \* : 0.01 < P ≤ 0.05, \*\* : 0.001 < P ≤ 0.01, \*\*\* : P ≤ 0.001

*Proteobacteria*、*Skermanella*、*Unclassified\_o\_Nostocales*和*Unclassified\_o\_Rhizobiales*。AN与菌株的相关性与AP、OM恰好相反。其中*Unclassified\_f\_Nostocaceae*与AP显著相关,  $r > 0.99$ ,  $P < 0.001$ 。

### 3 讨论

戈壁透光的石头下层定殖大量微生物形成BSCs,石下BSCs成为了荒漠戈壁生态系统的重要组成部分,在干旱、半干旱荒漠生态系统氮循环中起到至关重要的作用<sup>[19-20]</sup>;在BSCs的形成和发育的过程中固氮细菌对其有着重要的影响<sup>[21-23]</sup>。

本研究基于 *nifH* 扩增子测序对中央戈壁石下结皮中固氮细菌的群落结构与多样性进行分析,结果表明,石下固氮细菌的优势菌门有 *Cyanobacteria* (47.20%–69.90%) 和 *Proteobacteria* (27.47%–48.91%); 优势菌属为 *Scytonema* (45.05%–69.09%)、*Skermanella* (10.26%–20.48%) 和未知属(属于 *Proteobacteria*) (13.72%–22.00%)。这与沙质荒漠地表 BSCs 中也以 *Cyanobacteria* 的 *Scytonema* (属于 *Nostocales* 的 *Scytonemataceae*) 和 *Proteobacteria* 的 *Skermanella* (属于 *Alphaproteobacteria* 的 *Rhodospirillaceae*) 为主类

似，而且均有较多的未知固氮细菌类属(17.2%–29.1%)<sup>[24]</sup>；类似地，南极荒漠石下固氮细菌也主要为 *Cyanobacteria* 的 *Nostocales*，但未能分类的类属更多<sup>[25–26]</sup>。然而与本研究石下样品相同且使用 16S rRNA 基因(V3–V4 区)扩增子测序分析表明，石下细菌群落优势菌门有 *Cyanobacteria* (45.85%–53.77%)、*Actinobacteria* (15.06%–18.91%)、*Chloroflexi* (7.99%–10.25%) 和 *Proteobacteria* (13.10%–15.22%)；优势属为 *Cyanobacteria* 的 *Trichocoleus*、*Chroococcidiopsis* 和未知属<sup>[14]</sup>。这些结果表明，不同空间尺度下的地表和石下 BSCs 中的固氮细菌的优势类群在门水平均为 *Cyanobacteria* 和 *Proteobacteria*，在低层的分类阶元如属水平结构组成变化较大。一直以来，研究者们认为 BSCs 中起主要固氮功能作用的为 *Cyanobacteria*<sup>[4,27]</sup>。本研究通过共现性网络分析发现，OTU-188 (分类于 *Scytonema*) 与其他类群相关性很差，然而在物种多样性分析中，*Scytonema* 细菌的占比很高(45.05%–69.09%)，OTU-188 与其他类群相关性很差可能是因为该 OTU 自身固氮能力较强，与其他菌属没有较强的相互依赖作用<sup>[28]</sup>。中央戈壁石下结皮中固氮细菌在各微生物之间均存在较强的互作关系，主要以共存关系为主(约占 66.98%)，点度中心性、接近中心性和中介中心性均较高的具有稳定石下固氮细菌群落的关键物种均属于 *Proteobacteria* 的 *Alphaproteobacteria*，而石下的 *Cyanobacteria* 和 *Alphaproteobacteria* 存在强烈的协作关系，是形成石下 BSCs 小生境的主要驱动群落<sup>[14–15]</sup>，这种协作可能是基于 *Cyanobacteria* 作为碳源的主要提供者而 *Alphaproteobacteria* 作为氮源的主要提供者而建立的。

#### 4 结论

中央戈壁石下 BSCs 中固氮细菌以 *Cyanobacteria* 和 *Proteobacteria* 为优势菌群；

*Alphaproteobacteria* 为稳定石下 BSCs 固氮细菌群落的关键类群，可能是主要固氮者。本研究为认识和利用石下生物土壤结皮固氮细菌提供了基础依据。

#### REFERENCES

- [1] Yahdjian L, Gherardi L, Sala OE. Nitrogen limitation in arid-subhumid ecosystems: a meta-analysis of fertilization studies[J]. *Journal of Arid Environments*, 2011, 75(8): 675-680
- [2] Peterjohn WT, Schlesinger WH. Factors controlling denitrification in a Chihuahuan desert ecosystem[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1991, 55(6): 1694-1701
- [3] Makhalyane TP, Valverde A, Gunnigle E, Frossard A, Ramond JB, Cowan DA. Microbial ecology of hot desert edaphic systems[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(2): 203-221
- [4] Lee KC, Archer SDJ, Boyle RH, Lacap-Bugler DC, Belnap J, Pointing SB. Niche filtering of bacteria in soil and rock habitats of the Colorado Plateau Desert, Utah, USA[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1489
- [5] Pointing SB, Belnap J. Microbial colonization and controls in dryland systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 551-562
- [6] Vikram S, Guerrero LD, Makhalyane TP, Le PT, Seely M, Cowan DA. Metagenomic analysis provides insights into functional capacity in a hyperarid desert soil niche community[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1875-1888
- [7] Li XR, Zhou HY, Wang XP, Liu LC, Zhang JG, Chen GX, Zhang ZS, Liu YB, Tan HJ, Gao YH. Ecological restoration and recovery in arid desert regions of China: a review for 60-year research progresses of Shapotou desert research and experiment station, Chinese Academy of Sciences[J]. *Journal of Desert Research*, 2016, 36(2): 247-264 (in Chinese)  
李新荣, 周海燕, 王新平, 刘立超, 张景光, 陈国雄, 张志山, 刘玉冰, 谭会娟, 高艳红. 中国干旱沙区的生态重建与恢复: 沙坡头站 60 年重要研究进展综述[J]. *中国沙漠*, 2016, 36(2): 247-264
- [8] Cowan DA, Sohm JA, Makhalyane TP, Capone DG, Green TGA, Cary SC, Tuffin IM. Hypolithic communities: important nitrogen sources in Antarctic desert soils[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(5): 581-586
- [9] Schlesinger WH, Phippen JS, Wallenstein MD, Hofmockel KS, Klepeis DM, Mahall BE. Community composition and photosynthesis by photoautotrophs under quartz pebbles, southern Mojave Desert[J]. *Ecology*, 2003, 84(12): 3222-3231
- [10] Wei STS, Lacap-Bugler DC, Lau MCY, Caruso T, Rao S,

- De Los Rios A, Archer SK, Chiu JMY, Higgins C, Van Nostrand JD, et al. Taxonomic and functional diversity of soil and hypolithic microbial communities in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1642
- [11] Ramond JB, Woodborne S, Hall G, Seely M, Cowan DA. Namib Desert primary productivity is driven by cryptic microbial community N-fixation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6921
- [12] Zhang BC, Kong WD, Wu N, Zhang YM. Bacterial diversity and community along the succession of biological soil crusts in the Gurbantunggut Desert, Northern China[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56(6): 670-679
- [13] Gao Q, Yang YF, Feng JJ, Tian RM, Guo X, Ning DL, Hale L, Wang MM, Cheng JM, Wu LW, et al. The spatial scale dependence of diazotrophic and bacterial community assembly in paddy soil[J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2019, 28(8): 1093-1105
- [14] Van Goethem MW, Makhalanyane TP, Valverde A, Cary SC, Cowan DA. Characterization of bacterial communities in lithobionts and soil niches from Victoria Valley, Antarctica[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(4): fiv051
- [15] Jia LJ, Tang K, Lan HQ, Xu HW, Guo QW, Ding Y, Tan F, Xing LH, Guo YQ, Feng FY. Diversity and structure of hypolithic bacteria community of Zhongyang Gobi[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(12): 2603-2613 (in Chinese)  
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. 中央戈壁石下生物土壤结皮中细菌群落结构和多样性[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(12): 2603-2613
- [16] Dunne JR, Gannon CJ, Osborn TM, Taylor MD, Malone DL, Napolitano LM. Preoperative anemia in colon cancer: assessment of risk factors[J]. *American Surgeon*, 2002, 68(6): 582-587
- [17] Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease[J]. *The American Journal of Cardiology*, 2012, 110(3): 356-363
- [18] Liu RS. ChemInform abstract: green light-excitable Ce-doped nitridomagnesoaluminate Sr[Mg<sub>2</sub>Al<sub>2</sub>N<sub>4</sub>] phosphor for white light-emitting diodes[J]. *ChemInform*, 2016, 47(51). DOI: 10.1002/chin.201651009.
- [19] Johnson SL, Neuer S, Garcia-Pichel F. Export of nitrogenous compounds due to incomplete cycling within biological soil crusts of arid lands[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 680-689
- [20] Pepe-Ranney C, Koechli C, Potrafka R, Andam C, Eggleston E, Garcia-Pichel F, Buckley DH. Non-cyanobacterial diazotrophs mediate dinitrogen fixation in biological soil crusts during early crust formation[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(2): 287-298
- [21] Wong FKY, Lacap DC, Lau MCY, Aitchison JC, Cowan DA, Pointing SB. Hypolithic microbial community of quartz pavement in the high-altitude tundra of central Tibet[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 730-739
- [22] Cowan DA, Khan N, Pointing SB, Cary SC. Diverse hypolithic refuge communities in the McMurdo Dry Valleys[J]. *Antarctic Science*, 2010, 22(6): 714-720
- [23] Christian K, Kaestli M, Gibb K. Spatial patterns of hypolithic cyanobacterial diversity in Northern Australia[J]. *Ecology and Evolution*, 2017, 7(17): 7023-7033
- [24] Tang K, Gao XD, Jia LJ, Xu HX, Li H, Meng JY, Tao Y, Feng FY. Community structure and diversity of diazotrophs in biological soil crusts and soil underneath crust of Hunshandake deserts[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(2): 293-301 (in Chinese)  
唐凯, 高晓丹, 贾丽娟, 徐慧欣, 李衡, 孟建宇, 陶羽, 冯福应. 浑善达克沙地生物土壤结皮及其下层土壤中固氮细菌群落结构和多样性[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(2): 293-301
- [25] Stomeo F, Valverde A, Pointing SB, McKay CP, Warren-Rhodes KA, Tuffin MI, Seely M, Cowan DA. Hypolithic and soil microbial community assembly along an aridity gradient in the Namib desert[J]. *Extremophiles*, 2013, 17(2): 329-337
- [26] 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
- [27] Valverde A, Makhalanyane TP, Seely M, Cowan DA. Cyanobacteria drive community composition and functionality in rock-soil interface communities[J]. *Molecular Ecology*, 2015, 24(4): 812-821
- [28] Sinclair C, Whitton BA. Influence of nitrogen source on morphology of *Rivulariaceae* (cyanophyta)<sub>1</sub>[J]. *Journal of Phycology*, 1977, 13(4): 335-340