

研究报告

## 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

唐凯 高晓丹 贾丽娟 徐慧欣 李蘅 孟建宇 陶羽 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】荒漠化是一个重大环境问题,生物土壤结皮(Biological soil crusts, BSCs)可遏制荒漠化,其中的固氮微生物对 BSCs 的形成和发育有重要作用,但目前 BSCs 中固氮细菌群落结构和多样性尚不十分清楚。【目的】阐明浑善达克沙地中不同类型生物土壤结皮及其下层土壤固氮细菌的群落结构、多样性及其影响因素。【方法】利用稀释热法和碱解扩散法检测土壤的有机质(Organic matter, OM)和速效氮(Available nitrogen, AN)含量;利用高通量测序对 *nifH* 基因进行测序,基于 *nifH* 序列比较分析固氮细菌群落结构和多样性;利用典范对应分析(Canonical correlation analysis, CCA)分析群落、样品和土壤理化参数的相关性。【结果】固氮细菌优势菌门除在苔藓结皮(HSM)中为 Cyanobacteria 和 Proteobacteria 外,在其他类型 BSCs 中均只为 Cyanobacteria;苔藓结皮下层土壤(HSMs) (下层土壤中只有 HSMs 检测到了 *nifH*)优势菌门为 Proteobacteria,优势菌纲为 Alphaproteobacteria 和 Betaproteobacteria;优势菌属差异较大,藻结皮(HSA)中 Unclassified\_f\_Nostocaceae 占 90.99%;地衣结皮(HSL)中 *Scytonema* 和 Unclassified\_f\_Nostocaceae 分别占 45.85%和 44.14%;HSM 中 Unclassified\_f\_Nostocaceae、*Scytonema*、*Nostoc*、*Skermanella*、Unclassified\_o\_Nostocales 分别占 29.21%、22.57%、15.34%、14.74%和 10.60%;HSMs 中 *Skermanella*、*Azohydromonas*、Unclassified\_p\_Proteobacteria、Unclassified\_c\_Alphaproteobacteria 分别占 33.80%、25.66%、18.20%和 10.62%;固氮细菌多样性随结皮的发育逐渐提高;OM 和 AN 对结皮的发育起促进作用。【结论】藻结皮、地衣结皮和苔藓结皮及其紧邻下层土壤中的固氮细菌群落结构和多样性差异明显,且固氮细菌类群和多样性指数随 BSCs 发育阶段的提高而增加。本研究为认识和利用生物土壤结皮相关固氮细菌提供了基础依据。

**关键词:** BSCs, 固氮细菌, *nifH*, 高通量, 多样性

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31560030); The 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:** March 19, 2017; **Accepted:** June 05, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 13, 2017

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科技创新项目(KJCX2016011)

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

收稿日期: 2017-03-19; 接受日期: 2017-06-05; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-06-13

## Community structure and diversity of diazotrophs in biological soil crusts and soil underneath crust of Hunshandake deserts

TANG Kai GAO Xiao-Dan JIA Li-Juan XU Hui-Xin LI Heng MENG Jian-Yu  
TAO Yu FENG Fu-Ying\*

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

**Abstract:** [Background] Desertification is a major environmental problem, biological soil crusts (BSCs) can inhibit desertification, and the diazotrophs play an important role in the formation and development of BSCs. However, the community structure and diversity of diazotrophs in BSCs are not clear enough. [Objective] To clarify the community structure and diversity of diazotrophs in different types of biological soil crusts (BSCs) and soils under them and the effectors of soil environmental factors. [Methods] Using dilution heat method and alkali solution diffusion to measure the content of organic matter (OM) and the available nitrogen (AN) of soil, respectively; *nifH* gene was sequenced via the high-throughput sequencing platform, and the community structure, diversity and the variance analysis of diazotrophs were analyzed by bioinformatics analysis; Canonical Correlation Analysis (CCA) were used to analyze the correlation among the community structure, samples and the physico-chemical parameters of soil. [Results] Dominant phylum were Proteobacteria and Cyanobacteria in moss crusts (HSM), Cyanobacteria in the other types of BSCs; the class of Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria accounted for the most fraction in the soil underneath moss crusts (*nifH* was only detected in soil underneath moss crusts, HSMs); significant differences existed in community structure at genus level, algae crusts (HSA) was predominated by unclassified\_f\_Nostocaceae (90.99%), Lichen crusts (HSL) by *Scytonema* (45.85%) and unclassified\_f\_Nostocaceae (44.14%), HSM by unclassified\_f\_Nostocaceae (29.21%), *Scytonema* (22.57%), *Nostoc* (15.34%), *Skermanella* (14.74%), unclassified\_o\_Nostocales (10.60%), and HSMs by *Skermanella* (33.80%), *Azohydromonas* (25.66%), unclassified\_p\_Proteobacteria (18.20%) and unclassified\_c\_Alphaproteobacteria (10.62%). [Conclusion] The community structure and diversity of diazotrophs in Algae, Lichen and Moss crusts and soil underneath crusts were markedly different, and the community species and the diversity increased with the development of the BSCs. This study provides a basis for appreciation and utilization of the diazotrophs in the BSCs.

**Keywords:** BSCs, Diazotrophs, *nifH*, High-throughput sequencing, Diversity

生物固氮是由固氮酶将  $N_2$  还原成氨的过程，是自然界中氮营养的主要来源。*nifH* 是编码固氮酶的基因之一，其核酸序列高度保守、系统进化关系和 16S rRNA 基因较一致，且基因数据库庞大，常用于固氮微生物多样性的研究<sup>[1]</sup>。目前已知的固氮作用仅局限于原核生物。细菌中能够自生固氮的种属主要包括固氮菌属(*Azotobacter*)、固氮螺菌(*Azospirillum*)、拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia*)、着色菌属(*Chromotium*)、脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)、克氏杆菌(*Klebsiella*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红假单胞菌属

(*Rhodopseudomonas*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)和硫杆菌属(*Thiobacillus*)。此外，一部分放线菌、蓝藻、根瘤菌等也可以进行自生或共生固氮<sup>[2]</sup>。

生物土壤结皮(Biological soil crusts, BSCs)分布广泛，在干旱地区覆盖度能达到 40%以上，是由隐花植物如蓝藻、绿藻、地衣、藓类和微生物，以及菌丝体、假根和分泌物构成的；根据其演替阶段可分为藻类结皮、地衣结皮和苔藓结皮<sup>[3]</sup>。BSCs 对干旱半干旱地区土壤中氮营养提高有重要贡献。例如，腾格里荒漠中的藻类结皮、地衣结皮和苔藓结皮的固氮活性分别能达到 14–133、20–101、

4–28  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/(\text{m}^2\cdot\text{h})^{[4]}$ 。但目前有关 BSCs 固氮的研究多集中在影响其固氮能力的因素上,如结皮类型、水分、温度和检测方法<sup>[5]</sup>,而对于固氮作用起关键作用的微生物的研究还较少。并且有限的 BSCs 中固氮微生物相关研究多基于藻结皮,其结果表明这些 BSCs 中固氮微生物以 Cyanobacteria 门细菌为主。而结皮形成早期阶段蓝藻并不是主要固氮者<sup>[6]</sup>,在高山藻结皮中固氮速率与蓝藻生物量不相关<sup>[7]</sup>。这表明不同类型或地域的 BSCs 中固氮细菌类群存在差异,BSCs 中蓝藻之外的、种类众多的其它细菌可能对 BSCs 固氮具有重要贡献。但是,不同类型或发育阶段 BSCs 中固氮细菌群落结构和多样性的异同目前还不清楚、有待明确。

因此,本研究以浑善达克沙地为例,对其中的 3 种 BSCs 及其下层土壤为研究对象,利用 MiSeq 高通量测序技术对 *nifH* 基因进行测序分析,揭示不同类型 BSCs 中固氮细菌群落结构和多样性及其异同,以期理解 BSCs 中固氮细菌的生态功能及其对荒漠生态系统环境的修复潜力提供基础依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物土壤结皮的采集和处理

样品于 2015 年 6 月中旬采自浑善达克沙地(42°25'35.76"N,116°46'9.48"E)。采用五点采样法(点与点之间至少间隔 200 m),使用无菌刀片分别采集藻结皮、地衣结皮和苔藓结皮(表层土 1 cm–2 cm)及其相应下层土壤(结皮下层 2 cm–5 cm)相应等量混匀,运回实验室于–80 °C 保存、备用。

### 1.2 土壤理化指标检测

样品:水为 1:5 (质量体积比),以 pH 计测定 pH;速效氮使用碱解扩散法<sup>[8]</sup>;有机质使用稀释热法测定有机质含量<sup>[9]</sup>。

### 1.3 土壤总 DNA 的提取

采集的不同类型土壤分别取 0.5 g,依土壤 DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A. Soil DNA Kit, D5625-01)操作手册提取土壤总 DNA;将所提取到的 DNA 溶于 50  $\mu\text{L}$  无菌超纯水中;每种类型土壤 DNA 提取

3 个不同重复,将每次所得 DNA 混合均匀,置于–80 °C 保藏、备用。

### 1.4 高通量测序

分别以各样品总 DNA 为模板扩增 *nifH* 基因,所用正向引物为 F:5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3';反向引物 R:5'-TTGTTSGCSGCR TACATSGCCATCAT-3'<sup>[10]</sup>。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):5 $\times$ Fast Pfu Buffer 4  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物(5  $\mu\text{mol/L}$ )各 8  $\mu\text{L}$ , Fast Pfu Polymerase 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 10 ng, BSA 0.2  $\mu\text{L}$ 。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。以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。委托上海美吉生物医药科技有限公司,采用 Illumina MiSeq 测序平台对扩增产物进行测序。

### 1.5 数据分析

以 FLASH 和 Trimmomatic 软件对测序所得序列进行去接头拼接和序列优化去杂;利用 Mothur 和 R 语言工具进行稀释性曲线的计算和绘制;以 USEARCH 软件在 Cutoff=0.05 下,对设定聚类非重复序列、去除嵌合体、确定每个 OTU 的代表序列;通过 FGR/*nifH* GeneBank 的(Release7.3) (<http://fungene.cme.msu.edu/>)功能数据库进行 OTU 注释,并分别在 Phylum (门)、Class (纲)和 Genus (属)三个分类水平统计各样品的群落组成;以 Mothur 软件(v 1.30.1) ([http://www.mothur.org/wiki/Schloss\\_SOP#Alpha\\_diversity](http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity))计算 Alpha 多样性指数;以 R 语言统计物种并绘制 Venn 图;典范对应分析(Canonical correlation analysis, CCA)使用 R 语言 Vegan 包中的 CCA 分析和作图;样品层级聚类,先用 QIIME 计算 Beta 多样性距离矩阵后再以 R 语言作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤理化性质

由土壤的理化性质分析结果(表 1)可知,采集的地衣结皮(HSL) pH 最低(6.26),藻结皮(HSA)、地衣结皮(HSL)、苔藓结皮(HSM)和苔藓结皮紧邻下层土壤(HSMs)的 pH 值接近(6.89–7.07);HSA、

HSL 和 HSM 的有机质含量依次递增,甚至发育高级阶段的下层土壤 HSMs 中的有机质含量与初级阶段的 HSA 只相差 3.36 g/kg; HSM 有机质含量是其下层 HSMs 的 4.12 倍; HSM 速效氮含量最高 (172.67 mg/kg), 其次为 HSMs (145 mg/kg)、HSA (138.83 mg/kg) 和 HSL (115.50 mg/kg)。

## 2.2 BSCs 中固氮菌群落结构

对 3 种类型 BSCs 及其下层土壤样本 *nifH* 基因进行扩增、构建文库和测序分析,其中下层土壤 HSA 和 HSL 未能检测到 *nifH* 基因的存在,可能与该样品 *nifH* 基因含量低有关。其余 4 个样品,即 HSA、HSL、HSM 及其紧邻下层土壤 HSMs 均扩增到了 *nifH*, 并进行了建库和测序。经过序列拼接、比对分析除去未能分类序列,所有固氮菌类群共划分为 3 个门 6 个纲和 16 个属(表 2)。其中, Cyanobacteria 门是 HSA、HSL 中的绝对优势菌门; Proteobacteria 门在 HSM 和 HSMs 中是优势菌门,其在 HSM 中的较在 HSA 和 HSL 中的分别增加了 21.02% 和 16.73%; 而 Actinobacteria 门仅在 HSMs 中检测到,但丰度较低(0.11%)。

在纲分类水平上, HSM 和 HSMs 中 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria/unclassified\_p\_Proteobacteria 的丰度分别为 20.05%、0.06%、0.07%、0.93% 和 49.59%、25.66%、0.47%、18.20%; 相比其它样品,少量(0.11%)的 Actinobacteria 纲只出现 HSMs 中; 而在 HSA 和 HSL 中, Cyanobacteria 门未能分类纲(Norank\_p\_Cyanobacteria)占绝对优势,其丰度分别为 99.90% 和 95.17%; HSA 中属于 Proterobacteria 门的只有丰度极低 Alphaproteobacteria,其在 HSL 中略有增加; HSL 比 HSA 样品中多了极其微量(0.01%)的 Betaproteobacteria,而 HSM 又比 HSL 多一个 Gammaproteobacteria 纲(0.07%); 结皮层中依发育阶段提高(藻结皮-地衣结皮-苔藓结皮)而依次新出现的纲 (Alphaproteobacteria-Betaproteobacteria-Gammaproteobacteria)在 HSMs 中的丰度明显高于结皮层。

在属分类水平上,在各样品中丰度超过 5% 的分别是: HSA 中的 Unclassified\_f\_Nostocaceae (90.99%)、*Scytonema* (6.68%); HSL 中的 *Scytonema* (45.85%) 和 Unclassified\_f\_Nostocaceae (44.14%); HSM 中的 Unclassified\_f\_Nostocaceae、*Scytonema*、*Nostoc*、*Skermanella*、Unclassified\_o\_Nostocale 丰度分别为 29.21%、22.57%、15.34%、14.74% 和 10.60%; HSMs 中的 *Skermanella*、*Azohydromonas*、Unclassified\_p\_Proteobacteria、Unclassified\_c\_Alphaproteobacteria 丰度分别为 33.80%、25.66%、18.20% 和 10.62%。HSM 和 HSMs 中的 *Skermanella* 丰度分别为 14.74% 和 33.80%。*Azohydromonas* 在 HSMs 中最多(25.66%),而在其它样品中含量极微。

## 2.3 固氮菌 Alpha 多样性指数分析

Alpha 多样性指数可反映生物群落的丰富度和多样性。其中, Ace 和 Chaol 指数可以反映物种丰富度,其数值越大表示该样品物种丰富度越大; Shannon 和 Simpson 指数则可以反映群落多样性, Shannon 指数数值越大表示该样品物种多样性越大, Simpson 指数则相反。由表 3 可知,样品 Ace 指数和 Chaol 指数范围分别是 13.53–31.00 和 13–31,两个指数的最低和最高值均分别来自 HSA 和 HSMs,结皮层样品(HSA、HSL 和 HSM)随结皮

表 1 生物土壤结皮理化参数

Table 1 Physicochemical parameters of biological soil crusts and soil underneath crusts

样品 Samples	pH	有机质 Organic matter (g/kg)	速效氮 Available nitrogen (mg/kg)
HSA	6.89	36.67	138.83
HSL	6.26	113.70	115.50
HSM	6.99	137.49	172.67
HSMs	7.07	33.41	145.83

注: HSA、HSL、HSM 和 HSMs 分别代表藻结皮、地衣结皮和苔藓结皮及其苔藓结皮紧邻下层土壤; 仅对扩增出 *nifH* 基因的下层土壤测定了理化性质。

Note: HSA, HSL, HSM and HSMs represents algae crusts, lichen crusts, moss crusts and soil underneath moss crusts, respectively; Only determined physico-chemical properties of soils under crusts that amplified the *nifH* gene.

表 2 BSCs 中固氮细菌群落结构

Table 2 The diazotrophs community structure of the BSCs in phylum, class and genus

样品名称 Samples	属水平 Genus level		纲水平 Class level		门水平 Phylum level	
	属名 Name of Genus	丰度 Abundance (%)	纲名 Name of Class	丰度 Abundance (%)	门名 Name of Phylum	丰度 Abundance (%)
HSA	<i>Skermanella</i>	0.06	Alphaproteobacteria	0.09	Proteobacteria	0.09
	Unclassified_f_	0.02				
	<i>Rhodospirillaceae</i>					
	Unclassified_c_	0.01				
	<i>Alphaproteobacteria</i>					
	Unclassified_f_	90.99	Norank_p_	99.90	Cyanobacteria	99.90
	<i>Nostocaceae</i>		Cyanobacteria			
	<i>Scytonema</i>	6.68				
	Unclassified_o_	1.97				
	<i>Nostocales</i>					
	<i>Nostoc</i>	0.21				
	<i>Trichormus</i>	0.05				
Others					0.01	
HSL	<i>Skermanella</i>	2.00	Alphaproteobacteria	4.12	Proteobacteria	4.38
	Unclassified_c_	1.26				
	<i>Alphaproteobacteria</i>					
	Unclassified_f_	0.68				
	<i>Rhodospirillaceae</i>					
	<i>Rhodopseudomonas</i>	0.15				
	Unclassified_o_	0.02				
	<i>Rhizobiales</i>					
	<i>Rhizobium</i>	0.01				
	<i>Azohydromonas</i>	0.01	Betaproteobacteria	0.01		
	Unclassified_p_	0.25	Unclassified_p_	0.25		
	<i>Proteobacteria</i>		Proteobacteria			
	Unclassified_f_	44.14	Norank_p_	95.17	Cyanobacteria	95.17
	<i>Nostocaceae</i>		Cyanobacteria			
	<i>Scytonema</i>	45.85				
	<i>Trichormus</i>	3.50				
	Unclassified_o_	0.94				
<i>Nostocales</i>						
<i>Nostoc</i>	0.74					
Others					0.45	
HSM	<i>Skermanella</i>	14.74	Alphaproteobacteria	20.05	Proteobacteria	21.11
	Unclassified_f_	2.23				
	<i>Rhodospirillaceae</i>					
	Unclassified_c_	1.69				
	<i>Alphaproteobacteria</i>					
	<i>Bradyrhizobium</i>	1.32				
	<i>Rhizobium</i>	0.04				
	<i>Rhodopseudomonas</i>	0.03				
	<i>Azohydromonas</i>	0.06	Betaproteobacteria	0.06		
	<i>Klebsiella</i>	0.07	Gammaproteobacteria	0.07		

(待续)

(续表 2)

	Unclassified_p_ <i>Proteobacteria</i>	0.93	Unclassified_p_ <i>Proteobacteria</i>	0.93		
	Unclassified_f_ Nostocaceae <i>Nostoc</i>	29.21 15.34	Norank_p_ Cyanobacteria	77.78	Cyanobacteria	77.78
	<i>Scytonema</i>	22.57				
	Unclassified_o_ <i>Nostocales</i> <i>Trichormus</i>	10.60 0.06				
	Others					1.11
HSMs	<i>Skermanella</i>	33.80	Alphaproteobacteria	49.59	Proteobacteria	93.92
	Unclassified_c_ <i>Alphaproteobacteria</i>	10.62				
	Unclassified_f_ <i>Rhodospirillaceae</i>	3.42				
	Unclassified_o_ <i>Rhizobiales</i> <i>Rhizobium</i>	0.93 0.54				
	<i>Rhodopseudomonas</i>	0.22				
	<i>Bradyrhizobium</i>	0.06				
	<i>Azohydromonas</i>	25.66	Betaproteobacteria	25.66		
	<i>Klebsiella</i>	0.47	Gammaproteobacteria	0.47		
	Unclassified_p_ <i>Proteobacteria</i>	18.20	Unclassified_p_ <i>Proteobacteria</i>	18.20		
	<i>Scytonema</i>	2.78	Norank_p_ Cyanobacteria	4.73	Cyanobacteria	4.73
	<i>Nostoc</i>	1.47				
	Unclassified_o_ <i>Nostocales</i> Unclassified_f_ Nostocaceae	0.47 0.01				
	<i>Frankia</i>	0.11	Actinobacteria	0.11	Actinobacteria	0.11
	Others					1.24

注：HSA、HSL、HSM 和 HSMs 分别代表藻结皮、地衣结皮和苔藓结皮及苔藓结皮紧邻下层土壤。

Note: HSA, HSL, HSM and HSMs represents algae crusts, lichen crusts, moss crusts and soil underneath moss crusts, respectively.

表 3 固氮菌群落 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity indexes of diazotrophs community

样品名称 Sample	Ace 指数 Ace index	Chaol 指数 Chaol index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
HSA	13.53	13	0.42	0.83
HSL	22.00	22	1.47	0.30
HSM	26.28	26	2.08	0.16
HSMs	31.00	31	2.39	0.13

注：HSA、HSL、HSM 和 HSMs 分别代表藻结皮、地衣结皮和苔藓结皮及苔藓结皮紧邻下层土壤。

Note: HSA, HSL, HSM and HSMs represents algae crusts, lichen crusts, moss crusts and soil underneath moss crusts, respectively.

的发育其物种丰富度逐渐上升; Shannon 和 Simpson 指数范围分别是 0.42–2.39、0.13–0.83, 其中 HSMs Shannon 指数最大(2.39), Simpson 指数最小(0.13); 随结皮发育, Shannon 指数增大、Simpson 指数减小, 说明物种多样性随结皮的发育逐渐提高。

#### 2.4 基于 OTU 水平样品差异分析

样品层级聚类分析是基于 Beta 多样性距离矩阵、对不同环境样品中微生物进化差异程度进行可视化聚类的分析方法。由本研究的聚类结果(图 1A)可见, HSA、HSL 和 HSM 聚在一起, HSL 和 HSM 更近地一起聚在最里层, 而 HSMs 单独分布在最外层的一支。Venn 图用于统计多组或多个样品中共有和独有的物种数目, 比较直观地表现出样品物种的异同。本研究的 Venn 图(图 1B)表明, 3 个结皮层样品(HSA、HSL 和 HSM)共有 10 个 OTU; HSM 和 HSMs 共有 22 个 OTU, 分别占 HSM 和 HSMs 中 OTU 总数的 84.62% 和 70.97%; HSA 和 HSL 样品没有独有 OTU; HSM 有 1 个独有 OTU, 为 *Rhizobacter* sp. Root404; HSMs 独有 OTU 最多, 7 个独有 OTU 分别是 *Bradyrhizobium japonicum*、

*Lentisphaerae bacterium* GWF2-50-93、*Desulfovibrio putealis*、*Frankia* sp. EUN1f、*Paraburkholderia mimosarum* 和 2 个未知序列; HSA、HSL、HSM 和 HSMs 共有 9 个 OTU, 分别占各自总 OTU 数的 69.23%、40.91%、34.62% 和 29.03%。说明与 HSMs 相比, 不同类型 BSCs 的固氮细菌群落结构相互更相似。

#### 2.5 CCA 分析

典范对应分析(Canonical correlation analysis, CCA), 基于单峰模型将对应分析和多元回归分析相结合, 主要用于反映群落、样品和环境因子的关系。在 CCA 图中, 样品点或种属点的空间距离代表样品或种属间的距离, 样品点或种属点到环境因子向量的投影代表样本或种属受环境因子影响的程度。本研究的 CCA 分析结果(图 2)表明, 第一、二象限分别代表了 66.98% 和 19.66% 固氮细菌群落和环境因子间的差异; OM 和 AN 对样品 HSA、HSL、HSM 和种属 1–6 有促进作用, pH 与之负相关; 样品 HSMs 与种属 7–16 则相反; 样品和种属聚为三组, 即表明样品 HSA 与种属 1 相关; 样品 HSL、

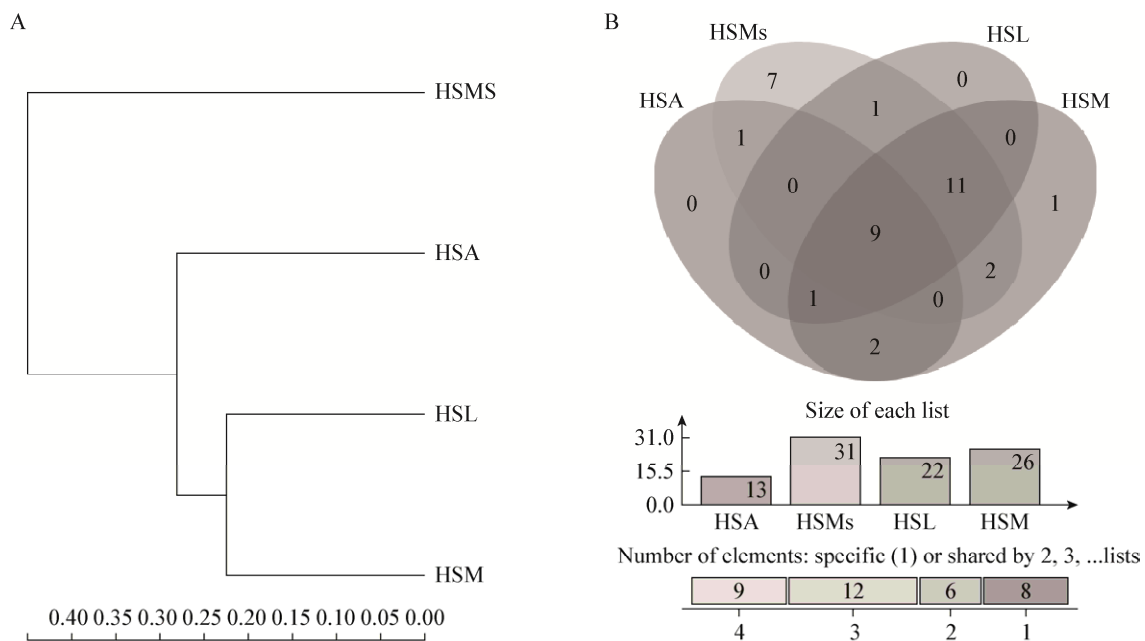


图 1 样品层级聚类分析图(A)和样品 Venn 图(B)

Figure 1 Hierarchical clustering tree of the samples (A) and the Venn of samples (B)

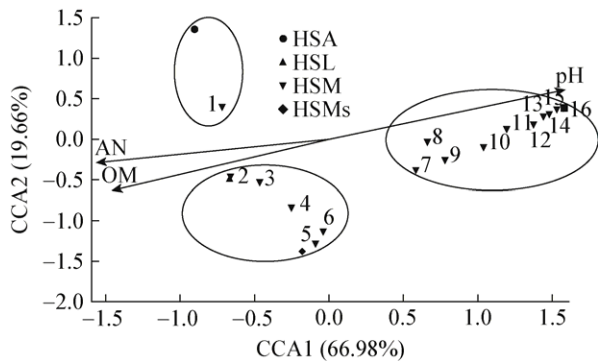


图2 样品属水平 CCA 分析

Figure 2 CCA analysis on genus level of samples

Note: 1: Unclassified\_f; 2: *Trichormus*; 3: *Scytonema*; 4: Unclassified\_o; 5: *Bradyrhizobium*; 6: *Nostoc*; 7: Unclassified\_k; 8: *Rhodospseudomonas*; 9: Unclassified\_f; 10: *Skermanella*; 11: Unclassified\_c; 12: *Klebsiella*; 13: *Rhizobium*; 14: Unclassified\_p; 15: *Azohydromonas*; 16: *Frankia*.

HSM 与种属 2-6 相关, 种属 2-6 之间距离较近; 样品 HSMs 与种属 7-16 相关, 种属 7-16 之间距离较近。

### 3 讨论

生物土壤结皮(Biological soil crusts, BSCs)对土壤中无机氮的积累有重大贡献,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>[11]</sup>;而固氮微生物对于BSCs的形成和发育有着重要的影响<sup>[6]</sup>。BSCs 不同发育阶段的固氮能力存在明显差异<sup>[4]</sup>,其固氮细菌组成也可能不尽相同。可产生异形胞、能固氮的蓝藻如 *Nostoc* 属等在各类型的BSCs 中丰度均较高,使得部分研究者一直以来认为BSCs 中主要固氮微生物为蓝藻,它发挥着主要的固氮作用<sup>[12-14]</sup>。浅色的藻类结皮属于BSCs 发育早期阶段,其中的微生物以蓝藻 *Microcoleus* spp. 为主<sup>[15]</sup>,它们并无固氮功能<sup>[16]</sup>。Pepe-Ranney 等<sup>[6]</sup>研究认为在形成之前以及早期发育阶段BSCs 中的主要固氮微生物为 Clostridiaceae 和 Proteobacteria 中的可固氮类群<sup>[7]</sup>。成熟的各类型 BSCs 在腾格里沙漠中以 *Cylindrospermum* 蓝藻为主<sup>[14]</sup>, Sør Rondane 山中以 *Nostoc* 属蓝藻为主<sup>[17]</sup>。而本研究表明,浑善达克沙地的成熟藻结皮(HSA)、地衣结皮(HSL)和苔藓结皮(HSM)中均以未能分类的 Nostocaceae

科和 *Scytonema* 属的蓝藻为主;BSCs 由低级(藻结皮)、中级(地衣结皮)到高级(苔藓结皮)的发育过程中,固氮菌群落中的 Proteobacteria 门类群丰度逐渐增加,甚至在苔藓结皮中 Proteobacteria 门的 *Skermanella* 属类群成为了仅次于未分类 Nostocaceae 科(29.21%)和 *Scytonema* 属(22.57%)蓝藻的第三优势固氮菌类群、丰度达到了 14.74%;下层土壤中,只有苔藓结皮下层土壤(HSMs)检测到了 *nifH*,其反映出 HSMs 中固氮菌类群以 *Skermanella* (33.80%)、*Azohydromonas* (25.66%)和未分类的 Proteobacteria 类群(18.20%)为主。在营养贫瘠的荒漠生态系统中,生物固氮极其重要,植物通过增加土壤有机质营养控制着这些生态系统中固氮细菌群落组成及其基因多样性<sup>[18]</sup>。有机质含量也是影响古尔班通古特沙漠<sup>[19]</sup>和本研究 BSCs 中固氮菌群落结构的主要因子。可见,蓝藻可能是早期 BSCs 中主要的固氮微生物;而随着 BSCs 的发育,BSCs 及其紧邻下层土壤中有机质含量提高,Proteobacteria 类群(特别是 *Skermanella* 和 *Azohydromonas* 等)可能发挥了越来越大的固氮作用、更进一步地促进了 BSCs 的发育和稳定。

“生态保险”假说认为,生物多样性提供了对环境波动的保险或缓冲,使得群落或生态系统的综合特性是更可预测的<sup>[20]</sup>。本研究结果表明,随着BSCs 的发育固氮菌的多样性明显增加。因此基于“生态保险”理论,固氮菌多样性增加可能是 BSCs 发育高级和稳定的重要体现。

### 4 结论

藻结皮、地衣结皮和苔藓结皮及其紧邻下层土壤中的固氮细菌群落结构和多样性差异明显,而且固氮菌类群和多样性指数随 BSCs 发育阶段的提高而增加。本研究为认识和利用生物土壤结皮相关固氮细菌提供了基础依据。

### REFERENCES

- [1] Chen QH, Han YL, Ma Y, et al. Research progress on structure and evolution of biological nitrogen-fixation gene cluster[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(4):



- 129-138 (in Chinese)  
陈清华, 韩云蕾, 马尧, 等. 生物固氮基因簇结构与进化研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(4): 129-138
- [2] Zhang W, Yang L, Wang ZJ. Advance and development trend of biological nitrogen fixation research[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2015, 30(5): 810-821 (in Chinese)  
张武, 杨琳, 王紫娟. 生物固氮的研究进展及发展趋势[J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2015, 30(5): 810-821
- [3] Belnap J, Weber B, Büdel B. Biological Soil Crusts as an Organizing Principle in Drylands[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2016: 3-13
- [4] Li XR, Zhou HY, Wang XP, et al. 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, 等. 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
- [5] Zhang P, Li XR, Zhang ZS, et al. Nitrogen fixation potential of biological soil crusts in southeast edge of Tengger Desert, Northwest China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(8): 2157-2164 (in Chinese)  
张鹏, 李新荣, 张志山, 等. 腾格里沙漠东南缘生物土壤结皮的固氮潜力[J]. 应用生态学报, 2012, 23(8): 2157-2164
- [6] Pepe-Rannek C, Koechli C, Potrafka R, et al. Non-cyanobacterial diazotrophs mediate dinitrogen fixation in biological soil crusts during early crust formation[J]. The ISME Journal, 2016, 10(2): 287-298
- [7] Janatková K, Řeháková K, Doležal J, et al. Community structure of soil phototrophs along environmental gradients in arid Himalaya[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(9): 2505-2516
- [8] 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
- [9] Bao SD. Soil Agrochemical Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: Agricultural Publishing House, 2000: 34 (in Chinese)  
鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 农业出版社, 2000: 34
- [10] Zhou X, Smith H, Silva AG, et al. Differential responses of dinitrogen fixation, diazotrophic cyanobacteria and ammonia oxidation reveal a potential warming-induced imbalance of the N-Cycle in biological soil crusts[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164932
- [11] 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
- [12] Yeager CM, Kornosky JL, Housman DC, et al. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 973-983
- [13] Yeager CM, Kuske CR, Carney TD, et al. Response of biological soil crust diazotrophs to season, altered summer precipitation, and year-round increased temperature in an arid grassland of the Colorado Plateau, USA[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 358
- [14] Wang J, Bao JT, Li XR, et al. Molecular ecology of *nifH* genes and transcripts along a chronosequence in revegetated areas of the Tengger desert[J]. Microbial Ecology, 2016, 71(1): 150-163
- [15] Beraldi-Campesi H, Hartnett HE, Anbar A, et al. Effect of biological soil crusts on soil elemental concentrations: implications for biogeochemistry and as traceable biosignatures of ancient life on land[J]. Geobiology, 2009, 7(3): 348-359
- [16] Rajeev L, da Rocha UN, Klitgord N, et al. Dynamic cyanobacterial response to hydration and dehydration in a desert biological soil crust[J]. The ISME Journal, 2013, 7(11): 2178-2191
- [17] Tahon G, Tytgat B, Stragier P, et al. Analysis of *cbfL*, *nifH*, and *pufLM* in soils from the Sør Rondane Mountains, Antarctica, reveals a large diversity of autotrophic and phototrophic bacteria[J]. Microbial Ecology, 2016, 71(1): 131-149
- [18] Köberl M, Erlacher A, Ramadan EM, et al. Comparisons of diazotrophic communities in native and agricultural desert ecosystems reveal plants as important drivers in diversity[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(2): fiv166
- [19] Zhang BC, Kong WD, Wu N, et al. 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
- [20] Yachi S, Loreau M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4): 1463-1468