•研究报告•

腾格里沙漠东南缘不同生物土壤结皮 细菌多样性及其季节动态特征

靳新影¹ 张肖冲¹ 金 多¹ 陈 韵¹ 李靖宇^{1,2*}¹ (北方民族大学生物科学与工程学院, 银川 750021)² (宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室, 银川 750021)

摘要: 微生物多样性对于生物土壤结皮在沙漠生态系统中改善局部环境以及提升生态功能具有重要作用。本研究对腾格里沙漠东南缘沙坡头地区藻结皮、藓结皮及其下层的四季样品进行了16S rDNA高通量测序, 以期阐明细菌多样性及其在生物土壤结皮演替过程中的季节变化规律。结果表明4种类型样品的细菌丰富度在夏季显著低于其他3个季节。4种类型样品中主要的细菌类群为变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、蓝细菌门等, 其中变形菌门和放线菌门为优势类群, 夏季时变形菌门的相对多度显著高于春季、秋季、冬季, 且在结皮层中相对多度显著高于结皮下层。放线菌门的相对多度在春季、夏季显著高于秋季、冬季, 且结皮下层相对多度高于结皮层。生物土壤结皮演替过程中细菌多样性及其相对多度季节动态变化表明其对沙漠土壤局部环境的变化作出了响应, 这为深入理解生物土壤结皮在沙漠生态系统中的生态功能提供了微生物多样性数据。

关键词: 生物土壤结皮; 季节动态; 高通量测序; 细菌多样性

Diversity and seasonal dynamics of bacteria among different biological soil crusts in the southeast Tengger Desert

Xinying Jin¹, Xiaochong Zhang¹, Duo Jin¹, Yun Chen¹, Jingyu Li^{1,2*}¹ College of Biological Science & Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021² Ningxia Key Laboratory of Microbial Resources Development and Applications in Special Environment, Yinchuan 750021

Abstract: Microbial diversity plays important roles in improving local soil environment and ecological functions of biological soil crusts in desert ecosystems. In this study, high throughput sequencing of 16S rDNA was carried out to reveal the seasonal dynamics of bacterial diversity of algae crusts, moss crusts and their sublayer soils for four seasons during the evolution of biological soil crusts in the southeast Tengger Desert. The results showed that the bacterial richness of the sampled soils was significantly lower in summer than in the other three seasons. The main bacterial groups in the four soils were Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria and Cyanobacteria, of which Proteobacteria and Actinobacteria were the dominant groups. The relative abundance of Proteobacteria was significantly higher in summer than in spring, autumn and winter, and significantly higher in the biocrust samples than in the sublayers. The relative abundance of Actinobacteria was significantly higher in spring and summer than in autumn and winter, and significantly higher in sublayers of biocrusts than in biocrusts. The seasonal dynamics of bacterial diversity and relative abundance during the processes of biocrust succession indicate that it responds to changes in the local desert environment, which provides bacteria diversity data for understanding the ecological functions of biocrusts in the desert ecosystems.

Key words: biological soil crusts; seasonal dynamics; high throughput sequencing; bacterial diversity

收稿日期: 2019-09-23; 接受日期: 2020-02-15

基金项目: 国家自然科学基金(41661053)、2018年度北方民族大学校级一般科研项目(2018XYZSK01)、宁夏特色微生物资源开发与利用创新团队科研项目(2018TSW04)、宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室科研项目(2019TSWZCX01)和2019年北方民族大学研究生创新项目(YCX19106)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lijingyu1986@126.com

生物土壤结皮(biological soil crusts, BSCs)是由隐花植物如蓝细菌、藻类、地衣、苔藓和土壤微生物,以及相关的其他生物体通过菌丝体、假根和分泌物等与土壤表层颗粒胶结形成的十分复杂的复合体,是干旱半干旱荒漠地表的重要组成部分,其覆盖度占了全球干旱、半干旱地区裸地面积的70%,在生态系统中发挥着非常重要的功能(Belnap & Lange, 2003; 李新荣等, 2009; 张元明和王雪芹, 2010; Pointing & Belnap, 2012)。生物土壤结皮的发展、拓殖和演替是荒漠及沙地生态系统健康的重要标志(吴玉环等, 2002),促进其生长和发育被认为是改善荒漠化的有效方法之一(Hu et al, 2002)。因其重要的生态功能和在荒漠化治理中的作用,生物土壤结皮近些年来引起了国内外研究人员的广泛关注(Elbert et al, 2009)。

生物土壤结皮在发育演替的过程中,根据优势种类的不同,一般将其划分为藻结皮、地衣结皮和藓结皮3个主要演替阶段(Su et al, 2009)。藻结皮的优势类群是丝状蓝藻,随着结皮的发育演替,地衣和藓类逐渐成为生物土壤结皮表面的优势类群(Hu et al, 2004; Li et al, 2004)。随着结皮的发育演替,结皮中微生物群落结构不断发生变化(Lan et al, 2012)。已有研究表明,不同发育演替阶段的生物土壤结皮在固碳、固氮效率、抗压强度、土壤质地、土壤孔隙度等方面存在明显差异(吴丽等, 2014; 韩炳宏等, 2017)。

土壤微生物在维护土壤结构、有机质分解、能量和养分循环等方面起着至关重要的作用(Falkowski et al, 2008; Douterelo et al, 2010)。细菌是生物土壤结皮中数量最多的微生物类群,能直观地反映出沙漠地区生态功能及环境的变化,在生物土壤结皮的能量流动、养分循环、碳氮固定等过程中发挥着重要的作用(Eldridge & Koen, 1998; 吴楠等, 2004)。而这些过程随着温度、湿度等环境因子的季节性变化发生了明显的变化(López-Mondéjar et al, 2015)。因此,研究季节动态对生物土壤结皮细菌群落结构及多样性的影响可为深入探究其生态功能提供重要信息。

自然界中多数微生物是不可培养的,利用传统方法来揭示这些微生物的多样性、群落结构、生态功能有一定的局限性(张薇等, 2015)。近年来,随着分子生物学理论与技术在微生物生态学研究中的

不断应用,土壤微生物多样性的研究有了新的突破,很多未知微生物得到了鉴定,其功能得到了有效的应用。高通量测序技术作为核酸测序手段的一项重要技术创新,能够更加全面、准确和深入地挖掘微生物群落结构及其多样性,已经广泛应用在地衣结皮、藓类结皮的原核微生物群落结构与多样性研究中,这为研究生物土壤结皮的微生物群落结构和多样性提供了新的技术路径(Abed et al, 2012; Angel & Conrad, 2013; Dojani et al, 2014; Maier et al, 2014)。

本文采用Illumina Miseq高通量测序技术手段对腾格里沙漠不同类型生物土壤结皮及下层土壤细菌群落结构及多样性进行了分析,试图回答以下几个问题:(1)不同类型生物土壤结皮及下层土壤细菌多样性的差异如何?(2)同种类型土壤的细菌群落组成与多样性在季节更替下的变化规律?研究结果可为腾格里沙漠生态系统的研究提供土壤微生物方面的基础数据,为进一步深入分析生物土壤结皮微生物群落及其生态功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域与样品的采集

研究区域设在宁夏回族自治区中卫市沙坡头地区腾格里沙漠东南缘(37°32' N, 105°2' E)。该地区年均气温10.0℃,低温极值为-25.1℃,高温极值38.1℃,全年日照时数3,264 h,年均降水量186.2 mm,且主要集中在5-9月,年潜在蒸发量高达3,000 mm。年平均风速2.9 m/s。该区域海拔高度约为1,339 m,是荒漠化草原向草原化荒漠的过渡地带,也是沙漠与绿洲的过渡区,格状新月形沙丘由西北向东南倾斜,呈阶梯状分布(Li et al, 2009)。本实验于2018年7月中旬(夏季)、10月中旬(秋季)、2019年1月中旬(冬季)、4月中旬(春季)分别进行采样。在沙坡头人工固沙区域中藻结皮和藓结皮发育良好的位点选取5处5 m × 5 m的藻结皮样方,5处5 m × 5 m的藓结皮样方,在样方内随机选取5个采样点进行取样。先按两种结皮的自然厚度采集结皮层,然后去除结皮层厚度至下层10 cm以内采集结皮下层样品。分层取样后进行装袋编号,将土样迅速运回实验室。后续处理将样品过0.5 mm筛,将每个样方内样品按结皮层与结皮下层分别均匀混合。每个季节处理后所得样品20个,每种样品设置5个重复,4个季节共计80个样品(10样方 × 2土层 × 4季节)。样品经前期处理

后于-80℃冷冻保存,用于后续的高通量测序分析。

1.2 DNA抽提和PCR扩增及Illumina Miseq测序

根据E.Z.N.A.[®]soil试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行总DNA提取, DNA浓度和纯度利用NanoDrop2000进行检测,利用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测;用338F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和806R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3')引物(Xu et al, 2016)对V3-V4可变区进行PCR扩增。扩增程序为: 95℃预变性3 min, 27个循环(95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s), 最后72℃延伸10 min (PCR仪: ABI GeneAmp[®] 9700型)。扩增体系为20 μL, 4 μL 5 × FastPfu缓冲液, 2 μL 2.5 mM dNTPs, 0.8 μL引物(5 μM), 0.4 μL FastPfu聚合酶; 10 ng DNA模板, 使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物, 利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AxygenBiosciences, Union City, CA, USA)进行纯化, Tris-HCl洗脱, 2%琼脂糖电泳检测。利用QuantiFluor[™]-ST (Promega, USA)进行定量。根据Illumina MiSeq平台(Illumina, San Diego, USA)标准操作规程将纯化后的扩增片段构建PE 2 × 300的文库。构建文库步骤: (1)连接“Y”字形接头; (2)使用磁珠筛选去除接头自连片段; (3)利用PCR扩增进行文库模板的富集; (4)氢氧化钠变性, 产生单链DNA片段。然后根据Illumina MiSeq测序平台的标准流程进行双端测序。

1.3 数据处理

使用Trimmomatic软件(Bolger et al, 2014)原始测序序列进行质控, 使用FLASH软件(Magoc & Salzberg, 2014)进行拼接。序列去杂方法和参数: (1)过滤reads尾部质量值20以下的碱基, 设置50 bp的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于20, 从窗口开始截去后端碱基, 过滤质控后50 bp以下的reads, 去除含N碱基的reads; (2)根据PE reads之间的overlap关系, 将成对reads拼接(merge)成一条序列, 最小overlap长度为10 bp; (3)拼接序列的overlap区允许的最大错配比率为0.2; (4)根据序列首尾两端的barcode和引物区分样品, 并调整序列方向, barcode允许的错配数为0, 最大引物错配数为2。

使用UPARSE软件version 7.1 (<http://drive5.com/uparse/>), 根据97%的相似度对序列进行OTU聚类。使用UCHIME软件剔除嵌合体, 具体流程如下: (1)对优化序列提取非重复序列, 去除没有重复的单序

列; (2)按照97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行OTU聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到OTU代表序列; (3)将所有优化序列map至OTU代表序列, 选出与OTU代表序列相似性在97%以上的序列, 生成OTU表格, 每个OTU被认为可代表一个物种(Edgar, 2010)。对每个样品的reads按照最小样本序列数进行抽平处理, 然后使用mothur计算不同随机抽样下的Alpha多样性指数, 利用R语言工具制作稀释曲线。利用RDP (Maidak et al, 1997) classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释, 比对Silva数据库(SSU128), 设置比对阈值为70%。80个样品一共获得3,659,240条有效序列, 序列平均长度424 bp。物种多样性使用mothur软件v.1.30.1 (http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity)计算, 单因素方差分析(one-way ANOVA)使用SPSS 20.0进行。

样品稀释曲线趋于平缓, 说明样本的OTUs覆盖度已经可以较全面地反映土壤细菌群落的真实情况(附录1)。Alpha多样性用于度量群落生态单样本的物种多样性, 是反映丰富度和均匀度的综合指标。菌群丰富度(community richness)指数主要是Chao指数、Ace指数和Sobs指数, 其值越大, 说明菌群丰富度越高。菌群多样性(community diversity)用Shannon-Wiener指数表示, 该指数值越大, 说明群落多样性越高(张田田等, 2019)。Venn图可直观反映细菌群落结构组成的差异以及环境中的核心微生物群落, 可说明季节变化对同一种生物土壤结皮的细菌群落产生的影响。

2 结果

2.1 不同生物土壤结皮及其下层样品细菌群落alpha多样性

结果表明4种类型样本的细菌群落组成丰富度具有相似的变化规律, 即反映藻结皮、藻结皮下层、藓结皮以及藓结皮下层细菌群落丰富度的Chao、Ace以及Sobs指数在夏季显著低于其他3个季节(附录2)。同种类型样品不同季节在纲水平以及OTU水平呈现的共有和特有细菌群落组成存在差异(附录3, 附录4)。在沙漠这种极端环境中生物土壤结皮及其下层细菌群落随着季节变化而变化, 但核心类群较为明显, 可能在结皮的形成及环境变化中发挥着重要的作用(附录3, 附录4)。

2.2 不同生物土壤结皮层及其下层样品细菌群落组成和不同季节比较分析

80个样品共检测到细菌34门87纲225目399科730属1,457种, OTUs数量为7,044。实验地样品检测到的主要微生物类群有变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、蓝细菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门、Patescibacteria、装甲菌门、疣微菌门、异常球菌-栖热菌门(图1)。不同季节不同类型样品在细菌群落结构组成上存在差异。主坐标成分1 (PCoA1)可解释全部样品类型细菌群落结构差异的29.93%, 主坐标成分2 (PCoA2)可解释细菌群落结构差异的15.39%, 两者总计可解释样品的45.32% (图2)。不论是生物土壤结皮层(藻结皮和藓结皮)还

是生物土壤结皮下层(藻结皮下层和藓结皮下层), 夏季样品与其他季节样品在细菌群落结构上均存在明显差异, 且夏季的生物土壤结皮层和生物土壤结皮下层二者之间也存在明显差异。

在门水平下, 每种类型样品中选择相对多度前5的类群进行不同季节同一类型样品细菌组成的显著性差异分析(图3)。藻结皮样品中细菌菌群平均相对多度最高的为变形菌门, 且夏季样品相比其他3个季节具有更高的相对多度, 存在显著性差异。放线菌门、绿弯菌门、酸杆菌门在不同季节样品之间具有显著性差异, 放线菌门相对多度在冬季样品中最低, 而酸杆菌门和绿弯菌门相对多度在冬季最高; 蓝细菌门在不同季节样品之间没有显著性差异(图3A)。

图1 在四季样品中细菌门的相对多度

Fig. 1 Relative abundance of bacteria at phylum level in four seasons

图2 OTU水平下微生物群落的PCoA分析

Fig. 2 PCoA showing the community composition of bacteria at OTU level

图3 不同季节的细菌门水平的相对多度。P < 0.05表示差异显著; P < 0.01表示差异极显著。

Fig. 3 Relative abundance of bacteria at phylum level among different seasons. P < 0.05 indicates a significant difference, P < 0.01 indicates an extremely significant difference.

图4 不同类型样品的细菌门水平的相对多度。P < 0.05表示差异显著; P < 0.01表示差异极显著。

Fig. 4 Relative abundance of bacteria at phylum level among different samples. P < 0.05 indicates a significant difference; P < 0.01 indicates an extremely significant difference.

藻结皮下层样品中放线菌门相对多度在春季样品中最高, 冬季最低, 且四季样品之间存在显著性差异; 绿弯菌门在冬季样品中相对多度最高, 夏季最低, 且四季样品之间存在显著性差异; 变形菌门在夏季样品中相对多度显著高于其他3个季节; 酸杆菌门在秋、冬季样品中显著高于春、夏季节样品(图3B)。

藓结皮样品中变形菌门平均相对多度最高且具有显著性差异, 且夏季样品相对多度显著高于其他3个季节; 放线菌门在冬季样品中相对多度最低, 夏季最高, 且四季样品之间存在显著性差异; 酸杆菌门和绿弯菌门相对多度在夏季样品中显著低于其他三季样品; 蓝细菌门在夏季样品中相对多度最低, 秋季达到最高, 且不同季节之间存在极显著差异(图3C)。

藓结皮下层样品中放线菌门在夏季样品中显著高于其他三季样品, 且在冬季样品中最低; 变形菌门相对多度在夏季达到最高, 秋季最低, 且四季样品之间存在显著性差异(图3D)。

综上, 季节更替对4种类型样品中的主要菌群变形菌门、放线菌门、蓝细菌门等有显著影响。

2.3 同一季节不同生物土壤结皮层及其下层样品细菌群落组成比较分析

在门水平上, 每一个季节不同类型样品中选择相对多度前5的类群进行显著性差异分析(图4)。春季样品中, 放线菌门的相对多度在结皮层(藓结皮和藻结皮)显著低于结皮下层(藓结皮下层和藻结皮下层), 藻结皮下层显著高于藓结皮下层; 变形菌门相对多度在结皮层显著高于结皮下层, 从高到低依次为藓结皮、藻结皮、藓结皮下层和藻结皮下层; 绿弯菌门的相对多度在结皮层显著低于结皮下层, 且在藓结皮、藻结皮、藓结皮下层、藻结皮下层中依次升高; 酸杆菌门的相对多度在藓结皮及其下层样品中显著高于藻结皮及其下层样品; 蓝细菌门的相对多度在结皮层显著高于结皮下层, 且藻结皮明显高于藓结皮(图4A)。

夏季样品中, 变形菌门的相对多度在结皮层显著高于结皮下层, 且藓结皮样品显著高于藻结皮样品; 放线菌门的相对多度在结皮层显著低于结皮下层, 且藓结皮样品显著高于藻结皮样品; 绿弯菌门的相对多度在藓结皮、藻结皮、藓结皮下层、藻结皮下层中依次升高, 且存在显著性差异; 酸杆菌门

的相对多度在结皮下层显著高于结皮层(图4B)。

秋季样品中, 放线菌门的相对多度在结皮层显著低于结皮下层, 而变形菌门的相对多度正好相反; 绿弯菌门的相对多度在藓结皮、藻结皮、藓结皮下层、藻结皮下层中依次升高, 呈现出与夏季相似的变化规律; 酸杆菌门的相对多度在结皮下层显著高于结皮层; 蓝细菌门的相对多度在结皮层显著高于结皮下层(图4C)。

冬季样品中, 变形菌门的相对多度在藓结皮、藻结皮、藓结皮下层、藻结皮下层中依次降低, 且具有显著性差异; 放线菌门的相对多度在结皮层显著低于结皮下层, 且在藻结皮样品中相对多度最低; 绿弯菌门的相对多度呈现出与春季、夏季、秋季相似的变化规律; 酸杆菌门的相对多度在结皮下层显著高于结皮层; 蓝细菌门的相对多度在结皮层显著高于结皮下层, 且藻结皮显著高于藓结皮(图4D)。

3 讨论

在生态系统中, 微生物存在季节性的变化, 这与土壤温度和湿度的季节性变化相关(Kaiser et al, 2010, 2011), 季节更替会引起光照、水分、热量的变化, 进而引起土壤环境的变化, 从而直接或间接影响土壤微生物的群落结构。

本研究结果表明变形菌门为最优势类群, 这与多数研究结果一致。变形菌门是土壤中最主要的细菌类群, 该类群的代谢活动是土壤中最主要的细菌活动类型(刘兴等, 2015)。放线菌门为第2优势类群, 能够降解纤维素和几丁质, 是土壤养分供给的主要来源, 并且产生的孢子能够抵抗外界不利的环境条件, 使其成为本研究区的优势菌群。其结皮下层多度高于结皮层, 是因为放线菌适宜生长在中性偏碱性pH值的土壤中, 而结皮层草本植物的生长会降低土壤的pH (梁博文等, 2014), 不利于放线菌的生长。绿弯菌门是研究区平均相对多度第3高的门, 可通过光合作用固定CO₂, 因此在有机质含量低的土壤中具有竞争力(Klatt et al, 2013), 而结皮表层有草本植物的腐殖质, 有机质含量高于下层土壤, 这可能是造成结皮层多度比下层低的主要原因。

本研究区域为极端环境, 营养匮乏, 酸杆菌门成为优势物种。有研究发现酸杆菌门一般存在于营养比较匮乏的环境, 与本研究结果类似。在结皮表层, 季节对其多度影响明显, 夏季时多度最低。在

结皮下层, 季节变化对其影响没有表层明显, 可能的原因阳光的直射和夏季沙漠温度过高使其生长受到抑制, 而下层土壤受到的影响较小。大量研究表明, 在沙漠生物土壤结皮中, 蓝细菌占绝对优势, 本文与前人研究结果一致。本研究中蓝细菌门在BSCs层多度远高于结皮下层, 这与蓝藻具有特殊的形态结构和生态适应特点相关, 其可产生大量丝状蓝藻胶鞘和分泌胞外多糖(Costa et al, 2018)。有研究表明, 蓝藻是固定沙面的重要因素。在BSCs演替过程中, 蓝藻的丰度逐渐减少。在演替初期, 蓝藻自身的生长促进了土壤中矿物质的矿化, 这有利于物质的循环和流动, 同时也为土壤提供了氮源和碳源, 能有效增加荒漠土壤的肥力, 加速土壤的演替过程。另外, 在蓝藻的生长过程中, 细胞不断地分泌胞外聚合物加上生物量的增加, 能显著提高土壤酶活性, 促进土壤的熟化和发育。随着土壤肥力的提高, 藻结皮逐渐向苔藓结皮甚至其他高等植物演替(Castle et al, 2015), 其中蓝藻起着不可或缺的作用。

已有研究表明拟杆菌门细菌属于耐冷菌, 在冬季具有较高的相对多度(张宝贵等, 2012)。本研究结果表明拟杆菌门的多度在冬季的藓结皮中达到了最大值。这些细菌具有独特的生理机制来抵御低温, 使它们可以在寒冷的环境中生长(Margesin & Schinner, 2015)。

这些结果表明细菌群落季节性变化可归因于细菌对土壤温度的生理适应。一般来说, 温度的升高会增强微生物活性和物种丰富度(Sierra et al, 2015), 温度降低时微生物的活性会降低(Lipson et al, 2002)。这可能是因为低温会减少微生物的膜脂流动性, 导致细胞内液冰冻、细胞破裂和死亡(Yergeau & Kowalchuk, 2008), 所以夏季的高温为土壤细菌的生长提供了适宜的环境。但沙漠生态系统中因植被缺失、阳光直射、气候干燥以及夏季温度高于一般生态环境, 在夏季时所有类型的土壤细菌多样性并没有达到最高, 说明细菌群落的变化在某种程度上依赖于研究区域特殊的地理生态环境, 土壤细菌群落对各种环境因素变化的承受能力不同, 造成了细菌群落在季节间的差异。

本实验没有进一步分析季节更替过程中微生物的群落结构与环境因子以及土壤理化性质的相互联系, 在下一步的实验中深入探讨。

季节动态变化对藻结皮、藻结皮下层、藓结皮、藓结皮下层4种类型样品的细菌群落结构产生了显著影响, 特别是夏季的细菌群落结构显著不同于春季、秋季和冬季。其中, 放线菌门在季节动态变化过程中呈现出结皮下层显著高于结皮层, 而变形菌门呈现出结皮层显著高于结皮下层, 且其相对多度在夏季达到最高。绿弯菌门呈现出按照藓结皮、藻结皮、藓结皮下层和藻结皮下层的顺序依次递增的变化规律, 其相对多度最大值出现在冬季, 最小值出现在夏季。蓝细菌门相对多度在夏季最低, 秋季最高, 特别是在春季藻结皮样品的相对多度显著高于藓结皮样品。这些研究结果有助于深入理解腾格里沙漠东南缘生物土壤结皮演替过程中不同类型生物土壤结皮之间的细菌群落结构差异, 也为理解生物土壤结皮细菌群落结构的时间动态变化提供了短期参考数据。细菌群落结构的季节动态变化数据将有助于深入挖掘生物土壤结皮不同演替阶段不同细菌类群的生态功能。

参考文献

- Abed RMM, Ramette A, Hübner V, Deckker PD, de Beer D (2012) Microbial diversity of eolian dust sources from saline lake sediments and biological soil crusts in arid Southern Australia. *FEMS Microbiology Ecology*, 80, 294–304.
- Angel R, Conrad R (2013) Elucidating the microbial resuscitation cascade in biological soil crusts following a simulated rain event. *Environmental Microbiology*, 15, 2799–2815.
- Belnap J, Lange OL (2003) *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, 2nd edn. Springer, Berlin.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114–2120.
- Castle SC, Morrison CD, Barger NN (2015) Extraction of chlorophyll *a* from biological soil crusts: A comparison of solvents for spectrophotometric determination. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 853–856.
- Costa OYA, Raaijmakers JM, Kuramae EE (2018) Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1636.
- Dojani S, Kauff F, Weber B, Büdel B (2014) Genotypic and phenotypic diversity of Cyanobacteria in biological soil crusts of the succulent Karoo and Nama Karoo of Southern Africa. *Microbial Ecology*, 67, 286–301.
- Douterelo I, Goulder R, Lillie M (2010) Soil microbial community response to land-management and depth, related to the degradation of organic matter in English wetlands:

- Implications for the *in situ* preservation of archaeological remains. *Applied Soil Ecology*, 44, 219–227.
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461.
- Elbert W, Weber B, Büdel B, Andreae MO, Pöschl U (2009) Microbiotic crusts on soil, rock and plants: Neglected major players in the global cycles of carbon and nitrogen? *Biogeosciences Discussions*, 6, 6983–7015.
- Eldridge DJ, Koen TB (1998) Cover and floristics of microphytic soil crusts in relation to indices of landscape health. *Plant Ecology*, 137, 101–114.
- Falkowski PG, Fenchel T, DeLong EF, Falkowski PG, Fenchel T, DeLong EF (2008) The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320, 1034–1039.
- Han BH, Niu DC, He L, Ren YT, Wu R, Fu H (2017) A review on the development and effect of biological soil crusts. *Pratacultural Science*, 34, 1793–1801. (in Chinese with English abstract) [韩炳宏, 牛得草, 贺磊, 任运涛, 吴让, 傅华 (2017) 生物土壤结皮发育及其影响因素研究进展. 草业科学, 34, 1793–1801.]
- Hu CX, Liu YD, Song LR, Zhang DL (2002) Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. *Journal of Applied Phycology*, 14, 281–292.
- Hu CX, Zhang DL, Liu YD (2004) Research progress on algae of the microbial crusts in arid and semiarid regions. *Progress in Natural Science*, 14, 289–295.
- Kaiser C, Fuchslueger L, Koranda M, Gorfer M, Stange CF, Kitzler B (2011) Plants control the seasonal dynamics of microbial N cycling in a beech forest soil by belowground allocation. *Ecology*, 92, 1036–1051.
- Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, Fuchslueger L, Schnecker J, Schweiger P, Rasche F, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitsch A, Richter A (2010) Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytologist*, 187, 843–858.
- Klatt CG, Liu Z, Ludwig M, Kuhl M, Jensen SI, Bryant DA, Ward DM (2013) Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic *Chloroflexi* inhabiting a microbial mat in a geothermal spring. *The ISME Journal*, 7, 1775–1789.
- Lan SB, Wu L, Zhang DL, Hu CX (2012) Successional stages of biological soil crusts and their microstructure variability in Shapotou region (China). *Environmental Earth Sciences*, 65, 77–88.
- Li XR, Xiao HL, Zhang JG, Wang XP (2004) Long-term ecosystem effects of sand-binding vegetation in the Tengger Desert, northern China. *Restoration Ecology*, 12, 376–390.
- Li XR, Zhang YM, Zhao YG (2009) A study of biological soil crusts: Recent development trend and prospect. *Advances in Earth Science*, 24(1), 11–24. (in Chinese with English abstract) [李新荣, 张元明, 赵允格 (2009) 生物土壤结皮研究: 进展、前沿与展望. 地球科学进展, 24(1), 11–24.]
- Liang BW, Liu CL, Wang YZ, Li WY, Yuan YB (2014) Effects of natural cover grass in pear orchard on soil pH in Yellow River Delta. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 30(1), 143–148. (in Chinese with English abstract) [梁博文, 刘成连, 王永章, 李文燕, 原永兵 (2014) 黄河三角洲梨园自然生草对土壤pH的影响. 中国农学通报, 30(1), 143–148.]
- Lipson DA, Schadt CW, Schmidt SK (2002) Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt. *Microbial Ecology*, 43, 307–314.
- Liu X, Wang SJ, Liu XM, Huang TZ, Li Y (2015) Characteristics and changes of soil bacterial community structure in karst area of Guizhou. *Earth and Environment*, 43, 490–497. (in Chinese with English abstract) [刘兴, 王世杰, 刘秀明, 黄天志, 李勇 (2015) 贵州喀斯特地区土壤细菌群落结构特征及变化. 地球与环境, 43, 490–497.]
- López-Mondéjar R, Voříšková J, Větrovský T, Baldrian P (2015) The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 43–50.
- Magoc T, Salzberg SL (2011) FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27, 2957–2963.
- Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, Mccaughey MJ, Woese CR (1997) The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 25, 109–110.
- Maier S, Schmidt TSB, Zheng LJ, Peer T, Wagner V, Grube M (2014) Analyses of dryland biological soil crusts highlight lichens as an important regulator of microbial communities. *Biodiversity and Conservation*, 23, 1735–1755.
- Margesin R, Schinner F (2015) Biological decontamination of oil spills in cold environments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 381–389.
- Pointing SB, Belnap J (2012) Microbial colonization and controls in dryland systems. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 551–562.
- Sierra CA, Trumbore SE, Davidson EA, Vicca S (2015) Sensitivity of decomposition rates of soil organic matter with respect to simultaneous changes in temperature and moisture. *Journal of Advances in Modeling Earth Systems*, 7, 335–356.
- Su YG, Li XR, Zheng JG, Huang G (2009) The effect of biological soil crusts of different successional stages and conditions on the germination of seeds of three desert plants. *Journal of Arid Environments*, 73, 931–936.
- Wu L, Zhang GK, Chen XG, Lan SB, Zhang DL, Hu CX (2014) Development and succession of biological soil crusts and the changes of microbial biomasses. *Environmental Science*, 35, 1479–1485. (in Chinese with English abstract) [吴丽, 张高科, 陈晓国, 兰书斌, 张德禄, 胡春香 (2014) 生物结皮的发育演替与微生物生物量变化. 环境科学, 35, 1479–1485.]
- Wu N, Pan BR, Zhang YM (2004) Effects and ecological

- significance of soil-inhabiting microorganisms in the formation of biological soil crusts. *Arid Zone Research*, 21, 444–450. (in Chinese with English abstract) [吴楠, 潘伯荣, 张元明 (2004) 土壤微生物在生物结皮形成中的作用及生态学意义. *干旱区研究*, 21, 444–450.]
- Wu YH, Gao Q, Cheng GD (2002) Ecological function of biological soil crusts. *Chinese Journal of Ecology*, 21(4), 41–45. (in Chinese with English abstract) [吴玉环, 高谦, 程国栋 (2002) 生物土壤结皮的生态功能. *生态学杂志*, 21(4), 41–45.]
- Xu N, Tan GC, Wang HY, Gai XP (2016) Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure. *European Journal of Soil Biology*, 74, 1–8.
- Yergeau E, Kowalchuk GA (2008) Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*, 10, 2223–2235.
- Zhang BG, Zhang W, Liu GX, Chen T, Wang L, Zhang GS, Wu XK, Tai XS, Long HZ, Mao WL (2012) Effect of freeze-thaw cycles on soil bacterial communities under different ecosystems in Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 34, 1499–1507. (in Chinese with English abstract) [张宝贵, 张威, 刘光琇, 陈拓, 王鹭, 章高森, 伍修锟, 台喜生, 龙昊知, 毛文梁(2012)冻融循环对青藏高原腹地不同生态系统土壤细菌群落结构的影响. *冰川冻土*, 34, 1499–1507.]
- Zhang TT, Wang X, Ren HB, Yu JP, Jin Y, Qian HY, Song XY, Ma KP, Yu MJ (2019) A comparative study on the community characteristics of secondary and old-growth evergreen broad-leaved forests in Gutianshan, Zhejiang Province. *Biodiversity Science*, 27, 1069–1080. (in Chinese with English abstract) [张田田, 王璇, 任海保, 余建平, 金毅, 钱海源, 宋小友, 马克平, 于明坚 (2019) 浙江古田山次生与老龄常绿阔叶林群落特征的比较. *生物多样性*, 27, 1069–1080.]
- Zhang W, Wei HL, Gao HW, Hu YG (2005) Advances of studies on soil microbial diversity and environmental impact factors. *Chinese Journal of Ecology*, 24(1), 48–52. (in Chinese with English abstract) [张薇, 魏海雷, 高洪文, 胡跃高 (2005) 土壤微生物多样性及其环境影响因子研究进展. *生态学杂志*, 24(1), 48–52.]
- Zhang YM, Wang XQ (2010) Summary on formation and developmental characteristics of biological soil crusts in desert areas. *Acta Ecologica Sinica*, 30, 4484–4492. (in Chinese with English abstract) [张元明, 王雪芹(2010)荒漠地表生物土壤结皮形成与演替特征概述. *生态学报*, 30, 4484–4492.]

(责任编辑: 张丽梅 责任编辑: 时意专)

附录 Supplementary Material

附录1 四季土壤样品的稀释曲线

Appendix 1 Dilution curve of soil samples for four seasons

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298-1.pdf>

附录2 土壤样本的Alpha多样性分析

Appendix 2 Alpha diversity analysis of soil samples.

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298-2.pdf>

附录3 纲水平下四季土壤样品的Venn图分析

Appendix 3 Venn analysis of the same soil type samples among four seasons at Class level

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298-3.pdf>

附录4 OTU水平下四季土壤样品的Venn图分析

Appendix 4 Venn analysis of the same soil type samples among four seasons at OTU level

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298-4.pdf>

靳新影, 张肖冲, 金多, 马志山, 陈韵, 李靖宇. 腾格里沙漠东南缘不同生物土壤结皮细菌多样性及其季节动态特征. 生物多样性, 2020, 28 (6): 718–726.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298>

附录1 四季土壤样品的稀释曲线

Appendix 1 Dilution curve of soil samples for four seasons

靳新影, 张肖冲, 金多, 马志山, 陈韵, 李靖宇. 腾格里沙漠东南缘不同生物土壤结皮细菌多样性及其季节动态特征. 生物多样性, 2020, 28 (6): 718–726.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298>

附录 2 土壤样本的 Alpha 多样性分析。数据为均值 $\pm$ SD, 不同字母表示同一土壤不同季节的差异显著($P < 0.05$)。Z: 藻结皮; ZD: 藻结皮下层; X: 藓结皮; XD: 藓结皮下层; Sp: 春天; Su: 夏天; Au: 秋天; Wi: 冬天。

Appendix 2 Alpha diversity analysis of soil samples. The data were mean $\pm$ SD. The different letters indicates that there was significant difference among different seasons for the same type soil ($P < 0.05$). Z, algae crusts; ZD, algae crust sublayer; X, moss crusts; XD, moss crust sublayer; Sp, spring; Su, summer; Au, autumn; Wi, winter.

样品	Sobs 指数	香农指数	Ace 指数	Chao 指数
Sample	Sobs index	Shannon index	Ace index	Chao index
Z_Sp	2,089.4 $\pm$ 220.2 ^b	6.11 $\pm$ 0.199 ^a	3,238.82 $\pm$ 255.0 ^b	3,060.49 $\pm$ 315.9 ^b
Z_Su	1,797.0 $\pm$ 119.3 ^a	5.87 $\pm$ 0.121 ^a	2,523.61 $\pm$ 154.0 ^a	2,560.97 $\pm$ 161.0 ^a
Z_Au	2,072.4 $\pm$ 98.2 ^b	6.02 $\pm$ 0.206 ^a	3,233.56 $\pm$ 232.9 ^b	3,025.47 $\pm$ 139.7 ^b
Z_Wi	2,144.0 $\pm$ 66.6 ^b	6.11 $\pm$ 0.033 ^a	3,059.60 $\pm$ 103.2 ^b	3,078.02 $\pm$ 150.5 ^b
ZD_Sp	2,546.4 $\pm$ 72.8 ^b	6.53 $\pm$ 0.099 ^a	3,878.55 $\pm$ 359.8 ^b	3,697.43 $\pm$ 101.4 ^b
ZD_Su	2,215.6 $\pm$ 41.0 ^a	6.33 $\pm$ 0.116 ^a	3,279.95 $\pm$ 219.5 ^a	3,199.59 $\pm$ 67.3 ^a
ZD_Au	2,485.6 $\pm$ 105.1 ^b	6.48 $\pm$ 0.129 ^a	3,786.54 $\pm$ 295.7 ^b	3,655.00 $\pm$ 106.9 ^b
ZD_Wi	2,522.0 $\pm$ 107.9 ^b	6.38 $\pm$ 0.106 ^a	3,738.42 $\pm$ 112.6 ^b	3,671.60 $\pm$ 120.4 ^b
X_Sp	2,301.8 $\pm$ 103.9 ^b	6.30 $\pm$ 0.066 ^b	3,491.10 $\pm$ 281.9 ^b	3,362.20 $\pm$ 108.1 ^a
X_Su	1,753.4 $\pm$ 129.4 ^a	5.71 $\pm$ 0.254 ^a	2,621.49 $\pm$ 226.5 ^a	2,540.77 $\pm$ 141.5 ^b
X_Au	2,113.2 $\pm$ 215.2 ^b	5.80 $\pm$ 0.415 ^a	3,490.63 $\pm$ 225.1 ^b	3,144.18 $\pm$ 284.3 ^b
X_Wi	2,283.0 $\pm$ 147.3 ^b	6.19 $\pm$ 0.123 ^b	3,331.16 $\pm$ 218.6 ^b	3,305.59 $\pm$ 164.2 ^b
XD_Sp	2,682.6 $\pm$ 186.6 ^b	6.58 $\pm$ 0.114 ^b	4,098.45 $\pm$ 393.3 ^b	3,929.48 $\pm$ 295.3 ^b
XD_Su	2,277.2 $\pm$ 87.6 ^a	6.37 $\pm$ 0.042 ^a	3,429.24 $\pm$ 289.0 ^a	3,322.67 $\pm$ 204.2 ^a
XD_Au	2,553.4 $\pm$ 78.3 ^b	6.51 $\pm$ 0.128 ^{ab}	3,784.10 $\pm$ 91.9 ^b	3,768.98 $\pm$ 145.6 ^b
XD_Wi	2,648.2 $\pm$ 100.3 ^b	6.45 $\pm$ 0.101 ^{ab}	3,872.93 $\pm$ 121.4 ^b	3,812.90 $\pm$ 118.3 ^b

靳新影, 张肖冲, 金多, 马志山, 陈韵, 李靖宇. 腾格里沙漠东南缘不同生物土壤结皮细菌多样性及其季节动态特征. 生物多样性, 2020, 28 (6): 718–726.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298>

附录3 纲水平下四季土壤样品的Venn图分析。Z: 藻结皮; ZD: 藻结皮下层; X: 藓结皮; XD: 藓结皮下层; Sp: 春天; Su: 夏天; Au: 秋天; Wi: 冬天。

Appendix 3 Venn analysis of the same soil type samples among four seasons at Class level. Z, algae crusts; ZD, algae crust sublayer; X, moss crusts; XD, moss crust sublayer; Sp, spring; Su, summer; Au, autumn; Wi, winter.

靳新影, 张肖冲, 金多, 马志山, 陈韵, 李靖宇. 腾格里沙漠东南缘不同生物土壤结皮细菌多样性及其季节动态特征. 生物多样性, 2020, 28 (6): 718–726.
<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2019298>

附录4 OTU水平下四季土壤样品的Venn图分析。Z: 藻结皮; ZD: 藻结皮下层; X: 藓结皮; XD: 藓结皮下层; Sp: 春天; Su: 夏天; Au: 秋天; Wi: 冬天。
Appendix 4 Venn analysis of the same soil type samples among four seasons at OTU level. Z, algae crusts; ZD, algae crust sublayer; X, moss crusts; XD, moss crust sublayer; Sp, spring; Su, summer; Au, autumn; Wi, winter.