



# 湖北和尚洞固氮微生物群落的生境特异性及网络分析

李璐<sup>1</sup>, 程晓钰<sup>1</sup>, 刘晓燕<sup>1</sup>, 王映衡<sup>1</sup>, 李晴<sup>1</sup>, 张玮祎<sup>1</sup>, 王红梅<sup>1,2\*</sup>

1 中国地质大学(武汉)环境学院, 湖北 武汉 430074

2 中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

李璐, 程晓钰, 刘晓燕, 王映衡, 李晴, 张玮祎, 王红梅. 湖北和尚洞固氮微生物群落的生境特异性及网络分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2120-2135.

LI Lu, CHENG Xiaoyu, LIU Xiaoyan, WANG Yiheng, LI Qing, ZHANG Weiyi, WANG Hongmei. Habitat specificity and network analysis of nitrogen-fixing bacteria in the Heshang Cave, Hubei Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2120-2135.

**摘要:** 岩溶洞穴是喀斯特地貌的重要组成部分, 由于其长期黑暗、寡营养等极端条件, 使其成为研究陆地深部生物圈的天然实验室。尽管近年来对洞穴微生物多样性的研究不断深入, 但对洞穴中固氮微生物的认识却相对薄弱。【目的】查明洞穴中固氮微生物群落的特征以及与生物、非生物因子之间的关系。【方法】本文以湖北和尚洞为例, 通过对固氮菌功能基因 *nifH* 进行高通量测序和多元统计分析, 系统研究了洞穴内外 3 种生境(洞穴上覆土壤、洞内松散沉积物以及风化岩壁)固氮微生物群落的空间分布特征及其与环境因子之间的关系。【结果】结果表明和尚洞不同生境间固氮菌群落  $\alpha$  多样性存在显著差异( $P < 0.05$ ), 以洞穴上覆土壤  $\alpha$  多样性最高, 洞穴内沉积物  $\alpha$  多样性最低。K<sup>+</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>是驱动和尚洞固氮微生物群落组成的重要因子。和尚洞内固氮菌群落组成和分布具有生境特异性, 除慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)在 3 种生境中相对丰度均较高外, 上覆土壤以地杆菌属(*Geobacter*)占主导, 洞穴沉积物以固氮菌属(*Azotobacter*)占主导, 而风化岩壁中地杆菌属(*Geobacter*)、固氮菌属(*Azotobacter*)以及需盐红螺菌属(*Halorhodospira*)等主要类群占比相当。共现性网络分析结果显示洞穴固氮菌之间形成了紧密的正相关关系, 暗示着固氮菌在洞穴寡营养的极端环境中以协作为主的生存策略。值得注意的是, 洞穴固氮菌中有很大部分未分类的类群, 暗示着洞穴中可能蕴含着大量新的固氮类群, 是挖掘微生物暗物质的热点区域。【结论】该研究结果揭示了地下黑暗寡营养的和尚洞固氮微生物群落的组成, 对深入了解地下黑

资助项目: 国家自然科学基金(91951208)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (91951208).

\*Corresponding author. E-mail: wanghmei04@163.com

Received: 2023-03-21; Accepted: 2023-05-17; Published online: 2023-05-23

暗生物圈的氮循环过程、固氮菌与环境之间以及固氮菌种群之间的互作关系具有重要意义。

关键词: 喀斯特洞穴; 固氮微生物; *nifH* 基因; 氮循环; 共现网络; 生境特异性

## Habitat specificity and network analysis of nitrogen-fixing bacteria in the Heshang Cave, Hubei Province

LI Lu<sup>1</sup>, CHENG Xiaoyu<sup>1</sup>, LIU Xiaoyan<sup>1</sup>, WANG Yiheng<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, ZHANG Weiyi<sup>1</sup>, WANG Hongmei<sup>1,2\*</sup>

1 School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei, China

2 State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei, China

**Abstract:** Karst caves are important karst landforms, serving as natural laboratories to investigate deep biosphere. Despite the diverse microorganisms, little is known about microorganisms capable of fixing nitrogen in the permanent darkness and oligotrophic karst caves. **[Objective]** To reveal the composition of nitrogen-fixers and their correlation with biotic and abiotic factors in karst caves. **[Methods]** We collected samples from overlying soils, loose sediments, and weathered rock inside the Heshang Cave, Hubei Province, and conducted high-throughput sequencing of *nifH* responsible for nitrogen fixation. **[Results]** The nitrogen-fixing bacteria had the highest alpha diversity in the overlying soils and the lowest  $\alpha$  diversity in the sediments.  $K^+$ ,  $NO_2^-$ , and  $NO_3^-$  were the main factors impacting the nitrogen-fixing bacteria, which showed high specificity for habitats. *Bradyrhizobium* widely distributed in all habitats with high relative abundance. *Geobacter* dominated in the overlying soil, whereas *Azotobacter* was dominant in the sediments. *Geobacter*, *Azotobacter*, and *Halorhodospira* had similar relative abundance in weathered rock samples. The co-occurrence network analysis showed that the nitrogen fixers had closely positive correlations, suggesting their cooperative survival strategy under the oligotrophic conditions. It was noted that a large proportion of nitrogen fixers cannot be classified, which indicated rich novel nitrogen fixers in the caves, hot spots for studying microbial dark matter. **[Conclusion]** Our study revealed the composition and structure of the nitrogen-fixing microbial community and their correlations with environmental variables in the underground dark oligotrophic Heshang Cave. The findings are of great significance for the in-depth understanding of the nitrogen cycle in deep biosphere.

**Keywords:** karst caves; nitrogen-fixing microorganisms; *nifH*; nitrogen cycle; co-occurrence network; habitat specificity

氮元素是合成维持生命活动的重要化合物——蛋白质和核酸所必需的大量元素,更是调控植物生长和初级生产力的关键限制性营养

元素。迄今为止,大气中的氮气是可自由获得氮素的最大库存。尽管非生物固氮(如高温、闪电催化的固氮作用)方式是地球上不可或缺的

一部分,但绝大多数地球生物所利用的氮主要依赖于生物固氮作用。生物固氮是指环境中的固氮微生物介导的将大气中的  $N_2$  转化为  $NH_3$  的过程,根据和植物的依存关系可以划分为共生固氮、联合固氮和自生固氮 3 种类型<sup>[1]</sup>。这些微生物能够表达由 *nif* 基因簇编码的钼固氮酶。其中的 *nifH* 基因只存在于固氮微生物中,是进化过程中最古老的功能基因之一,其系统进化关系和 16S rRNA 基因相一致,因此 *nifH* 基因被广泛用于环境中固氮微生物群落的研究<sup>[2-3]</sup>。具有固氮功能的微生物主要包括:(1) 能与植物进行共生固氮的根瘤菌,比如根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)、伯克霍尔德氏菌科(*Burkholderiaceae*)等;(2) 弗兰克氏菌属(*Frankia*)的放线菌;(3) 来自念珠藻科(*Nostocaceae*)的蓝藻;(4) 一些通过基因水平转移获得固氮酶的细菌和古菌<sup>[4]</sup>。

喀斯特地区占全球陆地无冰区面积的 10%–15%,岩溶洞穴是喀斯特地貌的最重要组成成分之一,其主要受到化学溶蚀、机械垮塌等过程而形成,具有与外界环境隔离、常年黑暗、营养贫瘠、空气流动性低及温度相对稳定、湿度趋于饱和等特征。近年来对洞穴微生物的研究取得了系列进展,对洞穴内部不同小生境(如沉积物、岩壁、滴水 and 空气等)内的微生物群落组成、空间分布特征以及与环境因子之间的关系等均有了较好的认识<sup>[5-8]</sup>。岩壁和沉积物中的微生物主要以  $\gamma$ -变形菌纲和放线菌为主,洞穴内水体沉积物和表层土壤中主要微生物类群高度一致,且 pH 和总有机碳(total organic carbon, TOC)对微生物群落具有重要影响<sup>[9-11]</sup>。也有研究发现,洞穴微生物的群落变化可能受到如风化过程等地质作用的影响,并把 Ti/Fe、Mg/Al 以及 Ca/Al 等化学风化指标纳入到微生物与环境相互用的评估范围<sup>[12]</sup>,证实了喀斯特洞穴上覆土壤样本中细菌的群落组成显著受风化作用

(Ca/Al、Mg/Al 和 Si)的影响。对湖北长洞的研究中发现,硝酸盐也能够直接或间接影响洞穴小生境微生物群落的多样性<sup>[7]</sup>。尽管洞穴内部营养贫瘠,但在洞穴内仍发现了丰富的微生物类群。这些微生物类群的功能也逐渐被证实。对洞穴大气甲烷氧化菌的研究进一步证明喀斯特洞穴是一个大气甲烷汇<sup>[13-14]</sup>。对盘龙洞微生物群落功能预测显示<sup>[8]</sup>,洞穴中存在种类丰富的与  $CO_2$  固定有关的酶,随后在罗汉肚洞中分离得到的非光合固碳菌株则在纯培养层面证实了洞穴微生物的固碳功能<sup>[5]</sup>。除此以外,微生物还具有为了应对独特的洞穴环境而适应和进化出的固氮、氨氧化以及与硫循环有关的功能。但对这些微生物功能群的研究还较为匮乏。

与基于 16S rRNA 基因的微生物群落研究相比,基于功能基因 *nifH* 开展的洞穴固氮微生物群落的研究相对薄弱。早期在碳酸盐洞穴中发现了在系统发育上与固氮螺菌属(*Azospirillum*)具有同源性的微生物类群<sup>[15]</sup>。2011 年在对 Andragulla 洞穴的监测中发现蓝藻可能是发挥固氮作用的重要微生物类群,且白天固氮作用强于夜晚<sup>[16]</sup>。而 Desai 等则首次揭示了在永久黑暗、以化能自氧微生物占主导的洞穴中的固氮作用<sup>[17]</sup>。随后, Hathaway 等对熔岩环境的固氮微生物群落的研究表明,在碳源和氮源缺乏的熔岩环境中能够固定氮的微生物在建立其他细菌群落方面发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。对巴西变质砂岩洞穴的研究<sup>[19]</sup>也证实了固氮微生物的存在。

固氮微生物在环境中的组成和分布受到多种环境因子的影响,如土壤水分、有机碳、磷和无机氮含量被证实是影响固氮微生物分布的主要驱动因素。此外,不同的施肥措施也可能对土壤中的固氮微生物产生影响,例如施用氮肥可能会降低固氮微生物的多样性,影响微生物的固氮活性及固氮速率<sup>[20]</sup>。与此同时,部

分研究提出了不同的结论。Rodrigues Coelho 等<sup>[21]</sup>对根际和非根际固氮的对比研究发现,根际固氮对施氮水平的提高更加敏感,而非根际固氮所受到的抑制作用则可忽略不计。多数观点认为,施肥对固氮作用带来的影响是由于改变了土壤的理化性质,从而影响固氮活性。例如, Wakelin 等<sup>[22]</sup>发现,向广泛种植玉米的农田中添加氮肥仅提高了有机碳、总氮及硝态氮,对铵态氮的浓度影响微小,因此对共生固氮几乎无影响。但洞穴作为黑暗寡营养的地下生态系统,与施肥以及营养物质较为丰富的土壤生态系统显著不同,洞穴固氮菌的组成和空间分布特征以及与环境因子之间关系目前还不得而知。

为查明岩溶洞穴这一地下生物圈中固氮微生物的群落组成、分布特征及其环境驱动机制,本研究选取了湖北清江和尚洞作为研究地点,在洞内外采集了洞穴上覆土壤、洞穴内松散沉积物和洞穴风化岩壁 3 种不同小生境的样品进行了 *nifH* 基因的高通量测序和分析,研究结果将为进一步认识深部生物圈的固氮微生物类型及分布特征提供证据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 采样地介绍

和尚洞(30°26'49"N, 110°25'12"E)位于湖北宜昌市长阳县清江(长江支流)流域中游,属于鄂西南岩溶区,是我国岩溶地貌发达的地区之一。该地区具有典型的季风气候特征,春夏季炎热多雨,秋冬季寒冷干燥,年平均温度 16.5 °C,年平均降水量 1 118.3 mm。此外,该地区受酸雨影响严重,年平均降水 pH 值为 4.50。

和尚洞发育在寒武系中统上峰尖组及上统三游洞群中,全长约 250 m,宽约 20–30 m,洞高 15 m,洞顶上覆有约 400 m 的白云岩,上覆

土壤层厚度适中,有机质较为丰富,植被发育良好。洞内常年黑暗,CO<sub>2</sub> 浓度高,洞顶常年有滴水,发育有大量石笋、石钟乳,洞底有间歇性水流,水量随降雨量变化而间歇性变化,水流流经处地面可见松散沉积物。洞内岩壁风化程度高,为微生物研究提供了良好的载体。

### 1.2 样品采集

和尚洞生态系统的样品采集包括洞内的风化岩壁、松散沉积物以及洞外的上覆土壤,其中上覆土壤包括了洞顶原始土壤(CT)和农田土壤(FL) 2 种类型。洞内样品的采样按照等间距由洞口向洞内最深处进行,在强光带、弱光带和无光带 3 个光区分别采集了风化岩壁(W)和表层松散沉积物(S)。每个采样点采集 3 个生物学重复样本。采样方法为五点取样法,使用灭菌后的铁铲进行上覆土壤、风化岩壁和沉积物的采集,混合后使用 50 mL 无菌离心管进行样本收集,使用冷藏箱进行低温保存并运送至实验室–80 °C 保存,以用于后续 DNA 提取。采样过程中均佩戴一次性手套,以避免污染。

### 1.3 样本理化参数测定

本研究所有环境因子数据均来源于团队前期已发表论文<sup>[11]</sup>。具体测定方法如下:将固体样本冷冻干燥 24 h 以去除水分(ALPHA 1-2 LD, Christ),充分研磨后过 200 目筛。取其中 3 g 样本按照 1:5 (质量体积比)的比例加入去离子水,在振荡器中连续振荡 5 min,以 6 800×g 的转速在离心机中离心 10 min 后获得上清液。将上述上清液经过 0.22 μm 的滤膜过滤后,一部分使用 pH 仪(UB-7, Denver Instrument)测定 pH;另一部分使用离子色谱(ICS-600, Thermo)测定阴离子(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>等)和阳离子(K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>等)的含量。总有机碳(TOC)使用 C-S analyser (EA 4000, Analytik Jena AG, Jena)进行测定。

#### 1.4 DNA 提取及 *nifH* 的高通量测序

风化岩壁、沉积物和上覆土壤样品经冷冻干燥和研磨后,取 0.5 g 样本使用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA 提取试剂盒(QIAGEN)提取样本中的总 DNA,之后使用微量核酸蛋白检测仪检测 DNA 浓度及质量后,选取 DNA 浓度大于 10 ng/L,  $OD_{260/280}$  值处于 1.8–2.0 间的样品,使用目标特异性引物 polF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGAC TC-3')和 polR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGG A-3')对 *nifH* 功能基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L,其中包括:5 $\times$ 反应缓冲液 5  $\mu$ L, 5 $\times$ GC 缓冲液 5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, Q5 DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L,正反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, 无菌水 8.75  $\mu$ L。所得的 PCR 产物通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,并切取目的条带后用试剂盒(Axygen, Union City)进行纯化回收。使用 NanoDrop 2000 分光光度计对回收后的 PCR 产物进行浓度检测,将符合送样要求的样品利用 Illumina MiSeq 测序 PE250 平台进行高通量测序(上海派森诺生物公司)。测序数据已上传至 NCBI,序列号为: PRJNA943929。

#### 1.5 测序数据分析和统计分析

*nifH* 扩增子测序数据根据样本所对应的 barcode 序列,获得对应样本的有效序列。利用 Vsearch (v2.8.1) (<http://github.com/torognes/vsearch>) 对序列进行拼接、质控、去重和去嵌合体,从而获得高质量序列。在 97%相似度水平对高质量序列聚类,得到代表序列和分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU)表。将获得的 OTU 的代表序列使用来自 NCBI 的 nt 数据库 (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>)进行注释并获得其分类关系。对 OTU 丰度矩阵中的全体样本在 95%的最低测序深度水平,统一进行随机重抽样,从而校正测序深度引起的多样性差异。随

后,使用 QIIME2 软件分别对每个样本计算多样性指数。使用 R 软件中的“vegan”包基于 Bray-Curtis 距离矩阵对不同生境的固氮微生物群落进行非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS),固氮微生物群落和环境因子的冗余分析 (redundancy analysis, RDA)通过 Canoco 5.0 实现,并使用 R 软件中的“psych”包计算物种与环境因子的 Spearman 相关性。使用 R 中的“psych”包计算得出 OTU 间相关系数矩阵,计算 OTU 间的两两 Spearman 相关系数。设置过滤相关系数 $|r|$ 大于 0.6、 $P$ 值小于 0.05 为有效关系,使用以上参数生成共现网络并导入 Gephi 软件(<https://gephi.org>),利用 Fruchterman-Reingold 布局进行可视化,并将其按模块和门类分别进行着色。计算网络的平均节点度、聚类系数、平均路径长度、模块性、密度和直径等拓扑特征参数和节点的模块内连通度 (within-module connectivity,  $Z_i$ )及模块间连通度 (among-module connectivity,  $P_i$ )并绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 和尚洞不同生境固氮菌群落组成及多样性

和尚洞洞外上覆土壤和洞内岩壁、沉积物样品基于 *nifH* 功能基因测序共获得了 29 036 个 OTUs,在门水平上变形菌门 (*Proteobacteria*) 在所有生境中均处于主导地位(图 1A),但不同生境中其相对丰度有一定差异,和尚洞上覆土壤中变形菌门相对丰度最高,可达 90%以上,其次为放线菌门 (*Actinobacteria*);洞内沉积物中变形菌门相对丰度约为 85%,其次为厚壁菌门 (*Firmicutes*)。风化岩壁中固氮菌群落组成则与上述 2 种生境差异较大,尽管占主导地位的是变形菌门,但其相对丰度相比于上述 2 种生境则大大减少,占比仅为 58.2%,其他相对丰度较高的还

有厚壁菌门(1.65%)和放线菌门(0.98%)。另外, 相比于沉积物和上覆土壤, 岩壁中的固氮菌群落注释率较低, 其中有 38.2%在门水平上未被注释。

在属水平上, 所有样本中丰度位于前 15 的属除了弗兰克氏菌属(*Frankia*)外均来自于变形菌门, 其中占比较高的几个属有固氮菌属(*Azotobacter*)、地杆菌属(*Geobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、固氮氢自养单胞菌属(*Azohydromonas*)、弗兰克氏菌属(*Frankia*)

和慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)等(图 1B)。洞穴上覆土壤(洞顶原始土壤和农田土壤)样本中的固氮菌群落组成大致相似。其中地杆菌属占比最多, 在洞顶原始土壤和农田土壤样品中占比分别为 24.56%和 26.65%, 慢生根瘤菌属次之, 相对丰度分别为 22.50%和 21.62%。除此以外, 相对丰度较高的还有固氮螺菌属(11.99%和 3.10%)和弗兰克氏菌属(4.09%和 1.48%)。其中农田土壤样品中根瘤菌属(*Rhizobium*)的占比显著高于洞顶原始土壤样品( $P < 0.05$ )。

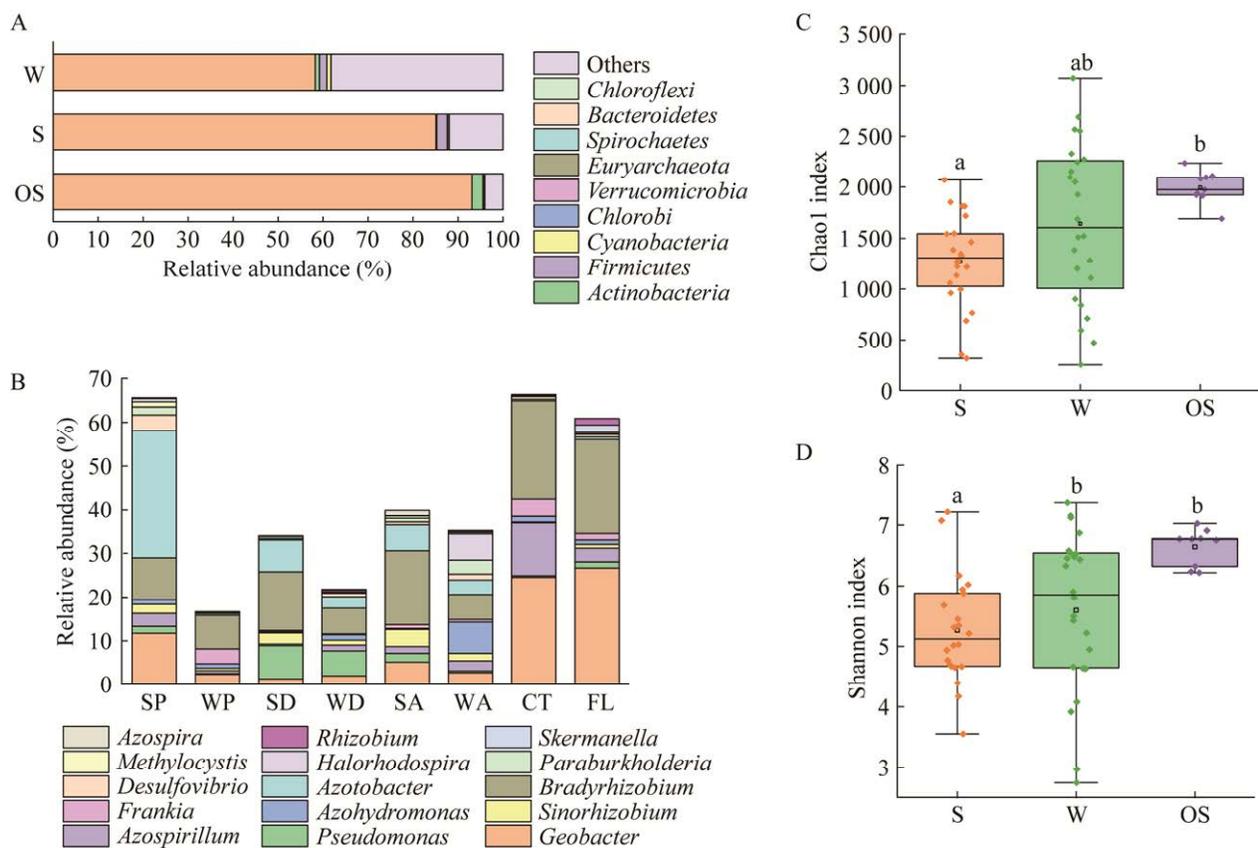


图 1 湖北和尚洞固氮菌群落结构及不同生境样本的  $\alpha$  多样性

Figure 1 Community structure and alpha diversity of  $N_2$ -fixing bacterial communities from different habitats in the Heshang Cave, Hubei Province. A: The relative abundances of the top ten phyla. B: The relative abundances of the top 15 genus. C: The Chao1 index of  $N_2$ -fixing bacterial communities. D: The Shannon index of  $N_2$ -fixing bacterial communities. W: Weathered rocks; S: Sediments; OS: Overlying soils; SP: Sediments in the photic zone; WP: Weathered rock samples in the photic zone; SD: Sediments in the dark zone; WD: Weathered rock samples in the dark zone; SA: Sediments in the aphotic zone; WA: Weathered rock samples in the aphotic zone; CT: Overlying soils above the cave; FL: Farmland soil. The same below.

在洞内样品中, 3 个光区沉积物样品的注释率均高于岩壁样品, 慢生根瘤菌属在所有洞内的岩壁和沉积物的样本中相对丰度均较高。强光区沉积物中丰度位于前 15 的属占有固氮菌群落的 65%以上, 其中相对丰度较高的有固氮菌属(29.18%)、地杆菌属(11.73%)、慢生根瘤菌属(9.45%) (图 1B)。在弱光区和无光区的沉积物中, 假单胞菌属(7.67%和 2.04%)和中华根瘤菌属(2.52%和 3.95%)的相对丰度相对于强光区有所增加, 固氮菌属(7.22%和 5.85%)有所减少, 但 3 个光区沉积物样本的群落结构基本一致。岩壁样本的固氮菌群落结构则与沉积物样本有较大区别。值得注意的是, 强光区岩壁中出现了占比较多的弗兰克氏菌属(3.39%), 无光区岩壁中则出现了一些相对于其他样本点独特的类群。例如, 需盐红螺菌属(*Halorhodospira*)和副伯克霍尔德氏菌属(*Paraburkholderia*), 其相对丰度分别达到了 5.94%和 3.20%。此外, 个别样点中不包含于前 15 属的类群也有相对较高的占比, 如强光区、无光区沉积物和农田土壤中固氮弧菌属(*Azoarcus*)占比约为 3.81%、1.15%和 4.79%; 洞顶原始土壤和农田土壤中伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)占比约为 2.71%和 4.22% (图 1B)。

$\alpha$  多样性分析显示了不同生境的固氮菌多样性差异显著。洞外上覆土壤固氮菌的丰富度和多样性均最高。Chao1 指数显示, 由高到低为上覆土壤、岩壁、沉积物, Shannon 指数由高到低为上覆土壤、岩壁、沉积物(图 1C、1D)。

基于 OTU 水平的非度量多维尺度(NMDS)分析(图 2)显示, 不同生境的固氮菌群落具有较大的生境特异性(stress<0.2,  $P<0.001$ )。其中上覆土壤样品中的固氮群落与其他样品中固氮菌群落的差异较大, 而洞穴内部岩壁与沉积物的固氮菌群落分组则较为接近, 这与固氮菌群落组成的分析结果相对应(图 1B)。

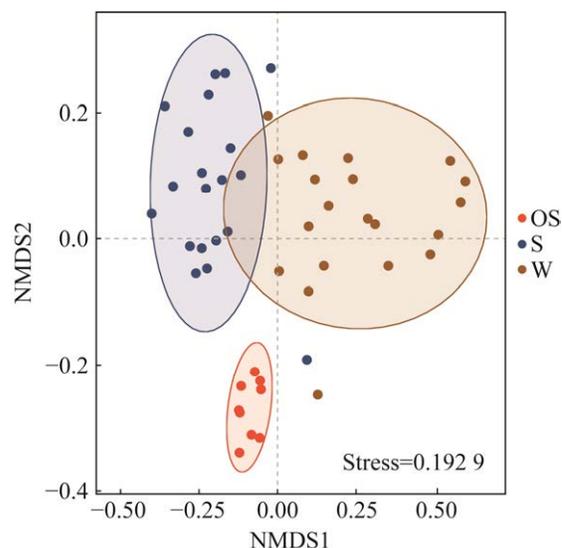


图 2 湖北和尚洞不同生境固氮菌群落的  $\beta$  多样性特征

Figure 2 Beta diversity of  $N_2$ -fixing bacterial communities in different habitats in the Heshang Cave, Hubei Province.

## 2.2 和尚洞固氮菌群落与环境因子之间的关系

和尚洞 3 种生境样本的 pH 值为 7.40–8.34, 洞内外环境样本差异不大, 整体呈中性偏碱性。TOC 含量特征显示, 除无光区岩壁样本(1.87%–2.27%)外, 洞内其他样本(0.16%–0.90%)相较于洞外上覆土壤样本(0.64%–2.50%)碳源含量匮乏, 表明了和尚洞的寡营养特征。

对不同生境所有样本的固氮菌群落结构与环境因子进行冗余分析(RDA), 结果显示 RDA1 和 RDA2 轴对固氮菌群落结构的解释度分别为 70.48%和 0.27% (图 3A)。其中,  $K^+$ 、 $NO_2^-$ 和  $NO_3^-$ 和对固氮菌群落结构的影响显著( $P<0.01$ ), 解释度分别为 54.7%、26.6%和 10.7%。在能够被注释到的相对丰度前 10 的门类中, 变形菌门与  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $NH_4^+$ 、 $Cl^-$ 和  $K^+$ 均呈显著负相关, 放线菌门与  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $NH_4^+$ 和 TOC 均呈显著正相关。除此以外, 与  $NO_3^-$ 、 $NH_4^+$ 具有

正相关关系的还有丰度较低的绿菌门(*Chlorobi*)的固氮菌,厚壁菌门则与 pH 有一定相关性。值得注意的是,  $K^+$  与一些未被注释到的类群呈显著正相关(图 3B)。

### 2.3 和尚洞固氮菌共现网络分析

构建了基于 OTU 水平的和尚洞固氮菌群落的共现网络(图 4)。该网络共包含 129 个点和 1 093 条边。其中正相关边数(99.73%)远大于负

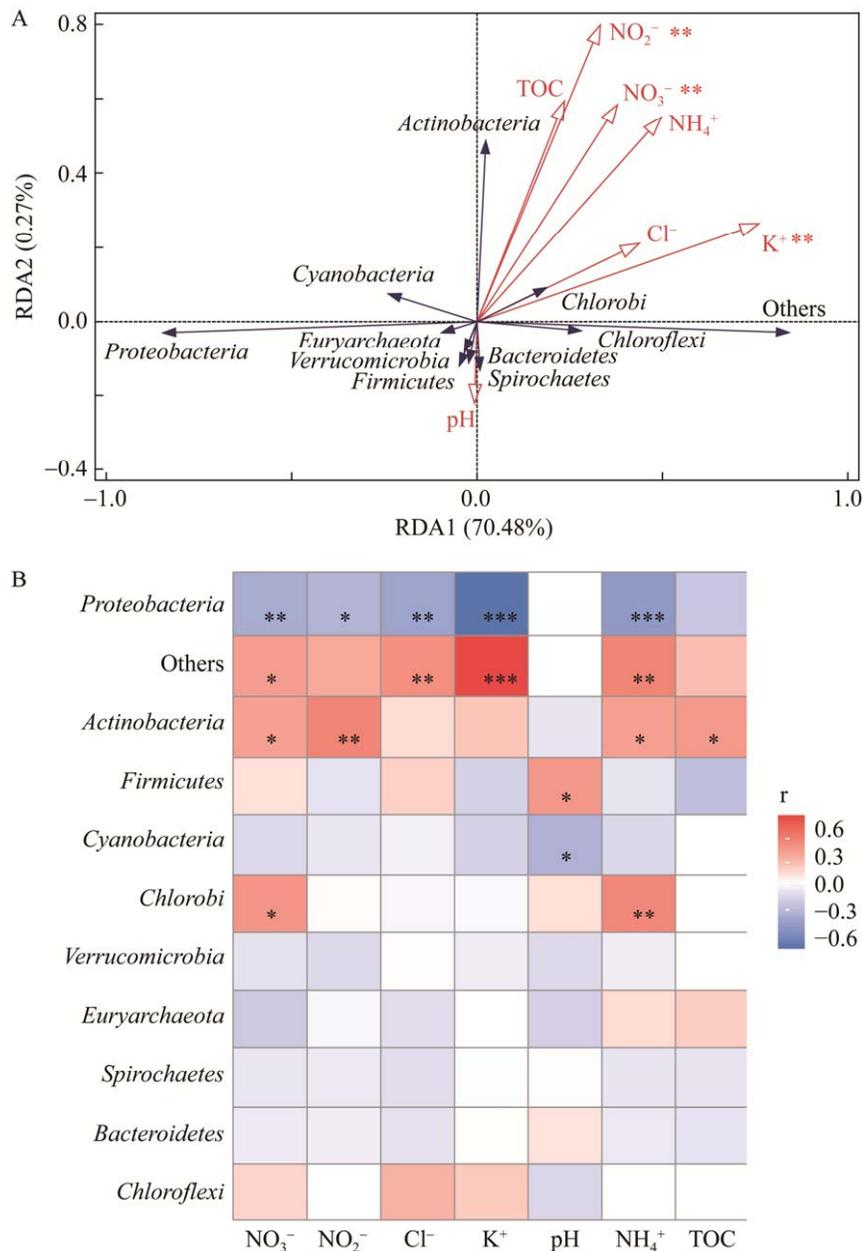


图 3 湖北和尚洞中固氮菌群落结构与环境因子之间的冗余分析(RDA) (A)及不同固氮菌类群多样性与环境因子的相关性热图(B)

Figure 3 Redundancy analysis (RDA) (A) and the heatmap (B) of  $N_2$ -fixing communities and environmental parameters in the Heshang Cave, Hubei Province. \*, \*\*, \*\*\* represents  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

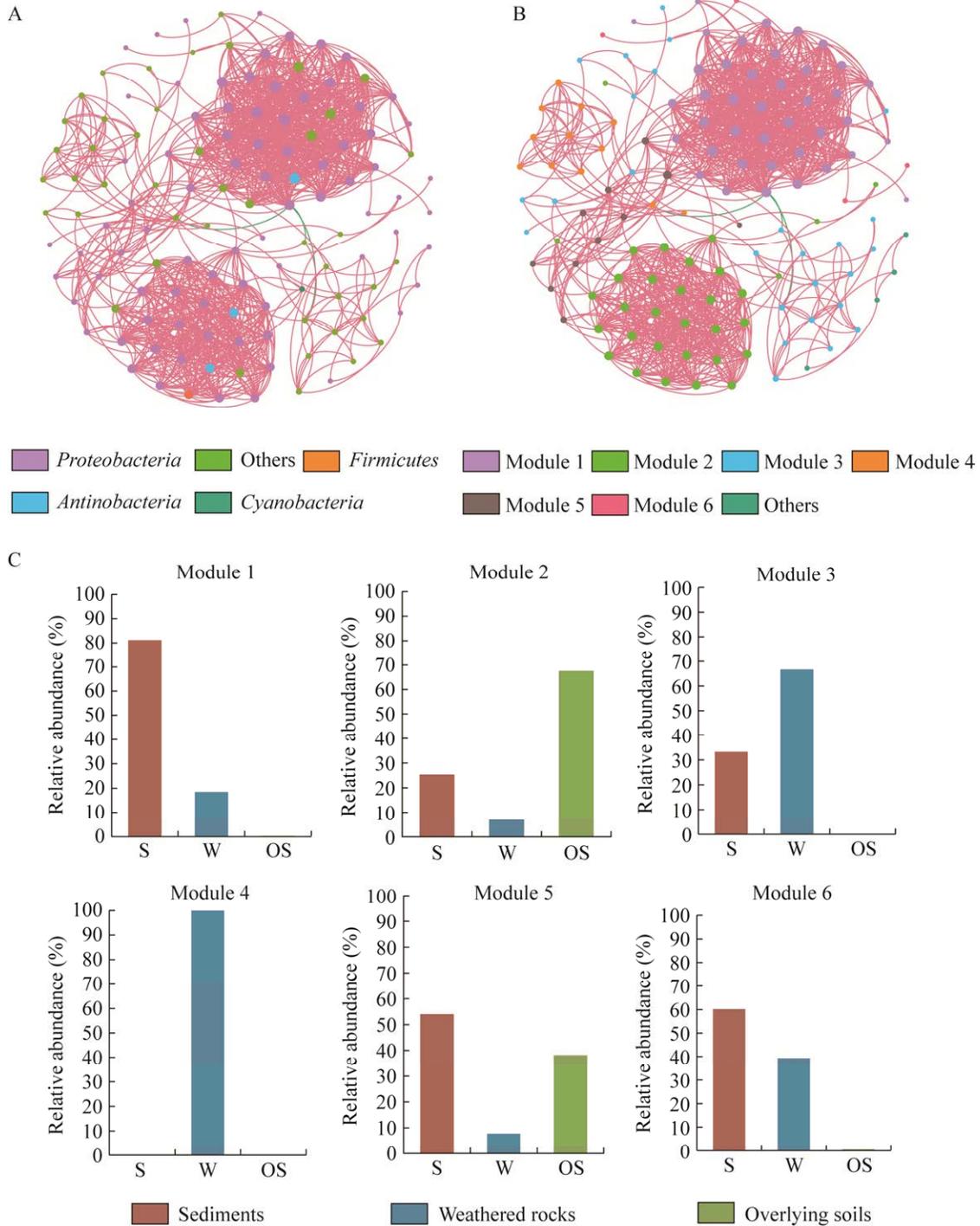


图 4 基于 OTUs 的 Spearman 相关性矩阵构建的和尚洞固氮微生物群落的共生网络

Figure 4 Co-occurrence networks of the  $N_2$ -fixing communities in Heshang Cave (based on Spearman's correlation between OTUs), Hubei Province. All the connections have a correlation coefficient  $>|0.6|$  and a  $P < 0.05$ . Nodes were colored by modules (A) and by bacterial phylum (B). C: The relative abundances of OTUs in different niches within individual modules. Positive links are in pink and negative one in green. W: Weathered rocks; S: Sediments; OS: Overlying soils.

相关边数(0.27%)。网络具有很强的模块化结构, 模块化指数 0.58 (大于 0.40)。此外其他的拓扑参数分别为: 平均度 16.95, 平均聚类系数 0.77, 平均路径长度 3.82, 网络直径 11。和尚洞固氮菌网络整体上节点的聚类程度较好, OTU 之间具有高度连接性。将网络中的节点按门划分(图 4A), 其中占比最高的节点为变形菌门, 占有节点的 62.02%, 其次未被注释到的类群占总节点的 34.11%, 其他门类则占比较少。模块性分析发现在和尚洞固氮菌共现性网络中存在 6 个主要模块, 其中前 5 个模块占比达 93.8%, 每个模块的节点对洞穴生境的偏好不同(图 4C)。在模块 1、3 和 6 中, 节点主要来自于洞内风化岩壁和沉积物样品; 模块 4 中节点大多来自于风化岩壁样品; 模块 2、5 中的节点来自于 3 种生境, 但大部分来自于沉积物和洞外上覆土壤样品, 且模块 2 中来源于上覆土壤样品的节点占比更

多。Zi-Pi 值显示, 网络中发挥关键拓扑作用的节点为连接节点(connectors), 即在 2 个模块之间具有高连通度的节点(图 5)。

## 3 讨论

### 3.1 洞穴固氮微生物的群落结构和生境特异性

固氮微生物生活习性和代谢类型的多样性揭示了其种类和固氮功能体系的多样性, 包括自养型和异养型, 需氧型、厌氧型以及兼性类群。以往对生物固氮的研究证明, 形成根瘤共生体等多种形式的共生固氮体系是自然界中最重要的生物固氮体系, 占生物固氮总量的绝大多数。共生固氮微生物的宿主多为豆科植物以及一些特殊的非豆科植物类群, 因此, 对于固氮菌的研究大多集中于有植被分布的土壤环境, 其多样性和相互作用直接影响着土壤固氮效率

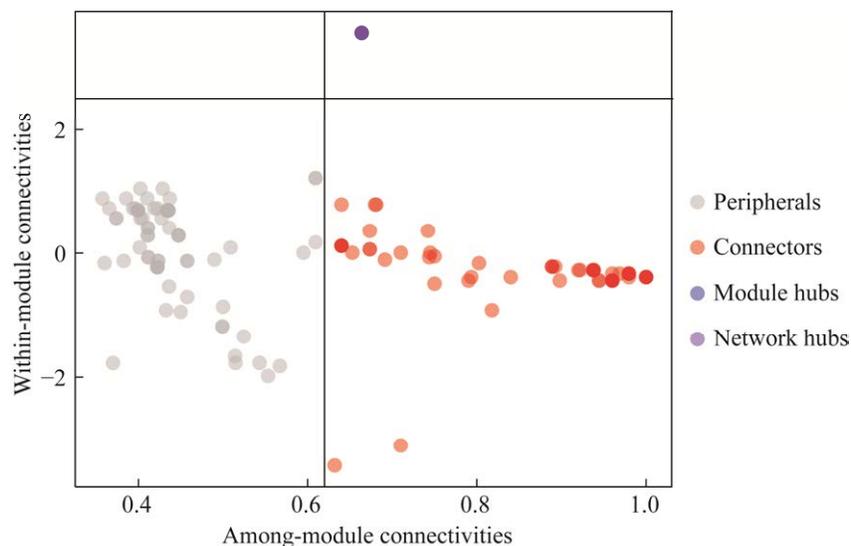


图 5 和尚洞固氮菌共现网络 OTUs 的 Zi-Pi 值分布图

Figure 5 Zi-Pi plots showing the distribution of OTUs with their topological roles in co-occurrence network of  $N_2$ -fixing communities in Heshang Cave. Blue represents the module hubs (node with high connectivity inside the module,  $Z_i > 2.5$  and  $P_i < 0.62$ ); Red represents connectors (nodes with high connectivity between two modules,  $Z_i < 2.5$  and  $P_i > 0.62$ ); Purple represents the network hubs (nodes with high connectivity in the whole network,  $Z_i > 2.5$  and  $P_i > 0.62$ ); Gray indicates peripherals (nodes that do not have high connectivity within or between modules,  $Z_i < 2.5$  and  $P_i < 0.62$ ).

的高低和氮素循环的运转<sup>[23]</sup>。尽管如此,前人的研究中证明,固氮微生物在土壤以外甚至是一些极端环境中也广泛分布,包括深海<sup>[24]</sup>、水库<sup>[25]</sup>、尾矿<sup>[26]</sup>以及酸性矿山废水<sup>[27]</sup>等。本研究对喀斯特洞穴中固氮菌多样性的研究则丰富了人们对除了土壤生态系统以外其他极端环境中固氮过程的认知。

湖北清江和尚洞是典型的喀斯特洞穴环境,其中碳源与氮源普遍缺乏。由于其与外界环境隔绝,偶尔有少数研究人员进入,因此对其固氮菌群落结构的研究能够较好反映喀斯特洞穴内部原始的固氮菌组成及其对环境的响应特征。对和尚洞固氮菌群落的非度量多维尺度分析(NMDS)结果表明,上覆土壤中固氮微生物群落结构与洞穴岩壁和沉积物生境中的固氮群落显著不同。Chao1 指数和 Shannon 指数的结果显示,与洞内样品相比,洞外上覆土壤的  $\alpha$  多样性与洞内样品有显著性差异( $P < 0.05$ ),且上覆土壤  $\alpha$  多样性指数最高,说明与较封闭的洞穴内部相比,有植被的土壤更利于多种类型的固氮微生物形成复杂的群落结构,这可能归因于洞外土壤中提供了较为丰富的营养物质。

尽管洞穴固氮微生物的多样性与洞穴上覆土壤中的固氮微生物群落多样性相比略显匮乏,但在洞内样品中也检测到了丰富的固氮菌多样性,且岩壁样品比沉积物样品有更高的  $\alpha$  多样性。对土壤固氮菌群落的研究发现,在各种类型的土壤中,包括森林、农田、草地、黄土高原等,变形菌门都是土壤固氮菌群落的优势类群<sup>[28]</sup>,且在整个氮循环中参与度最高<sup>[29]</sup>。在对喀斯特洞穴微生物的功能预测中也揭示了变形菌门可能参与了洞穴的固氮作用<sup>[8]</sup>,而功能基因高通量测序的研究结果也证实了变形菌在洞穴固氮菌中的优势地位。蓝细菌门是土壤中发挥重要固氮作用的固氮微生物<sup>[30]</sup>,本研究

中也发现洞穴强光带岩壁和沉积物中蓝细菌门有较高的占比。蓝细菌可以通过光合作用进行碳固定,在洞穴强光带中,光线不会成为限制蓝细菌生长的因子,加上洞穴岩壁和沉积物样本均采自于表面 1–2 cm,因此蓝细菌的相对丰度较高。团队前期对桂林罗汉肚洞穴微生物的研究中发现,液相样本中的指示类群与固氮功能有一定相关性,这可能暗示着在喀斯特洞穴中,丰富的水流及滴水可能在洞穴与外部的连通上起到了关键作用,同时在固氮类群的交流上也作出了贡献<sup>[5]</sup>。此外,洞穴内部厚壁菌门的比例明显高于洞外样品,这可能与它们对极端环境具有良好抗性有关。

在属水平上,不同生境的固氮菌组成具有更高的特异性。不同于门水平上各采样点的均一性,属水平上不同采样点固氮群落组成和多样性也有一定差异,因此文中将不同采样位置的同种生境样品之间也进行了区分(图 1B)。洞外土壤中,地杆菌属在洞顶原始土壤和农田土壤 2 种样品中的占比最高,相对丰度分别为 24.56%和 26.65%,且显著高于洞内 2 种生境( $P < 0.01$ )。地杆菌属是一类严格厌氧的革兰氏阴性菌,在系统分类学上隶属于变形菌门的  $\delta$  变形菌纲,可通过多种方式广泛参与包括 C、N 等多种元素在内的地球化学循环。地杆菌不仅可利用硝酸盐等可溶性电子受体进行胞内呼吸,还能够利用铁(锰)氧化物等不可溶电子受体进行胞外呼吸并获得能量,其拥有的完整固氮基因簇可帮助其在 N 含量匮乏的环境中实现自生固氮作用,具有巨大的固氮潜力<sup>[31]</sup>,因此常被归类为寡营养类群。近年来研究者基于宏基因组技术获得的分析结果表明,地杆菌属在水稻田土壤中发挥着主导作用<sup>[32]</sup>,但多数研究仍认为施肥的农田土壤限制了其固氮能力,且由于其在低氮条件下的生态位优势而导致在高氮

条件下的生态位竞争中被削弱。它们在洞顶原始土壤或者农田土壤中的优势地位可能与环境中的低氮含量(1.98–5.48 mg/L)有关。其次,慢生根瘤菌属在洞穴上覆土壤样本中的占比仅次于地杆菌属。作为典型的共生固氮菌类群,上覆土壤中植物与根瘤菌形成的共生体为慢生根瘤菌属的生存提供了适宜的生存环境。除此以外,洞穴上覆土壤中出现了相对较多的伯克霍尔德氏菌属,近年来不断有研究证明该类群能够定殖于植物根系并发挥固氮作用,因此广泛存在于各类土壤环境中<sup>[33]</sup>。与洞外固氮微生物群落组成不同的是,岩壁和沉积物样本中固氮菌属是除慢生根瘤菌以外丰度最高的类群。尤其是在洞口强光区的沉积物中,其在注释到的固氮菌类群中占比更是具有绝对优势(29.2%)。洞穴内部的黑暗环境限制着植物的生长,因此相比于能进行共生固氮的类群,营化能异养方式生存且无需形成共生体系即可发挥固氮作用的固氮菌属更适合于洞穴环境。洞口与外界连通,更有机会接收到外来有机质,也有利于固氮菌属占据生态优势。值得注意的是,洞穴内部2种生境的样品相比于土壤中,固氮微生物的注释率较低,尤其是岩壁样品在门水平上有38.2%都无法被注释。这种注释率上的差异在属水平上则更为显著,其中3个光区岩壁中固氮微生物的注释率不超过40%,这也导致了岩壁样品中前15属的累计丰度相对偏低。尽管其注释率较前人在艾比湖湿地<sup>[2]</sup>的固氮菌多样性研究中(未注释率>70%)相对偏高,但这一结果依然暗示了喀斯特洞穴这种极端环境中仍有很大一部分固氮微生物值得人们进一步鉴定和挖掘。

### 3.2 环境因子对固氮菌群落的影响

固氮菌的分布受多种因素的影响。在全球范围来看,固氮菌的分布主要受到气候条件的驱动,大多数群落与稳定的炎热或季节性的湿

润气候有关。对西藏高寒草甸固氮微生物的研究表明,土壤固氮菌群落组成受土壤pH的影响显著<sup>[34]</sup>,且固氮菌群落多样性与pH值呈正相关,而Che等在区域尺度上的研究结果则相反<sup>[35]</sup>。在对蓝细菌的研究中发现,其与土壤pH呈U型相关<sup>[4]</sup>。与以上生境的规律不同的是,本研究显示喀斯特洞穴中固氮微生物多样性和群落结构与pH没有显著相关性,这可能与本研究中样本整体pH处在较稳定的范围内(7.40–8.34)有关。

在土壤理化参数中,除pH以外,土壤中各种形式氮的含量与固氮菌类群的多样性和群落结构密切相关,包括 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 。硝酸盐对微生物群落的影响主要表现在直接影响土壤的pH从而改变土壤的多项理化性质,进而影响微生物群落的组成、活性及其在生态系统中的功能<sup>[36]</sup>。此外硝酸盐在寡营养环境中可充当营养物和电子受体,因此这种高可利用性氮源的输入会抑制微生物的固氮作用,从而降低固氮微生物的多样性。和尚洞中 $\text{NO}_3^-$ 浓度与洞外(1.98–5.48 mg/L)环境相比,范围跨度较大(从低于检测限到1 531.75 mg/L),个别采样点的硝酸盐浓度较高。前人在对和尚洞的研究中发现了硝石的存在<sup>[37]</sup>,尽管其来源尚不清楚,但这可能是导致和尚洞内个别采样点硝酸盐浓度异常的原因。本研究显示,变形菌门固氮菌丰度显示出与硝酸盐浓度的显著负相关,说明尽管 $\text{NO}_3^-$ 在低浓度范围内可能为营化能异养的固氮细菌提供了可利用的养分含量,但硝酸盐浓度偏高则会抑制固氮微生物的多样性。此外, $\text{NH}_4^+$ 是活细胞固氮作用的抑制剂,固氮微生物中普遍存在能够防止在高 $\text{NH}_4^+$ 浓度下固定 $\text{N}_2$ 的基因调控元件。但在本研究中多数样品中的 $\text{NH}_4^+$ 浓度低于检测下限,因此 $\text{NH}_4^+$ 对和尚洞固氮微生物群落结构和多样性并无显著影响。对

所有样本的固氮菌群落结构与环境因子进行冗余分析(RDA)结果显示,  $K^+$ 对固氮菌群落结构的影响显著( $P < 0.01$ )且为解释度最高的理化因子。钾对于蛋白质的合成代谢至关重要, 供钾充足能促进硝酸还原酶的诱导合成, 并增强其活性; 同时, 钾离子浓度升高也能改变细胞的渗透势从而促进硝酸盐主动运输进入细胞。Coskun 等的研究表明<sup>[38]</sup>, 钾和氮素在转运和同化上具有一定相似性, 二者的转运蛋白在转录水平上有共调节作用, 且在翻译后会被相同的调节蛋白修饰。因此, 洞穴中不同的  $K^+$ 范围(从低于检测限到 93.16 mg/L)对  $NO_3^-$ 在细胞内外的转运及还原具有一定的调节作用, 从而间接影响了固氮群落的组成和多样性。本研究中  $K^+$ 与变形菌门固氮菌呈显著负相关验证了这一观点, 同时结果显示  $K^+$ 与一些未分类的类群呈显著正相关, 这些未分类固氮菌是否具有特殊的生理机制及其与  $K^+$ 的关联则尚需进一步探究。

### 3.3 洞穴固氮微生物的相互作用

共现网络被用来揭示细菌间的相互作用, 能够直观地展示微生物群落中不同类群之间的相互作用形式, 从而揭示其不同环境中的生存策略<sup>[39]</sup>。正相关表示生物种群之间的合作关系, 负相关表示种群之间的竞争、捕食关系。和尚洞固氮微生物的共现网络中, 99%以上为正相关边数, 这表明洞穴固氮微生物生态位的一致性和协同互作关系的优势地位, 从而构成了较为稳定的固氮微生物群落结构。这与前人对于其他环境固氮微生物群落的分子生态学网络研究结论一致<sup>[40]</sup>。对于洞穴内生境的微生物共现网络的研究中已多次证明, 养分贫乏的环境促使洞穴内部的微生物类群更倾向于协同合作的方式来克服营养限制带来的生存压力<sup>[5-8]</sup>。同样, 对具有固氮功能的微生物群体来说, 这

种协同作用似乎更加显著<sup>[27]</sup>。网络中较高的模块化指数和聚类系数证明了这种生存策略能够使得固氮微生物群落形成紧密的模块化结构, 有利于增加洞穴生态系统的稳定性。

和尚洞固氮菌分子生态网络的模块化程度较高, 大致可划分为 6 个主要模块, 每个模块内节点的生境来源有一定区别(图 4C), 除模块 2 和模块 5 之外, 其余模块中的节点主要来自于洞内岩壁和沉积物, 模块 4 尤为特殊, 其内的节点主要来自于岩壁。这与 NMDS 分析的结果相互印证, 即洞穴固氮微生物具有良好的生境特异性。共现网络分析中, 通常认为关键节点在维持微生物生态系统的稳定方面发挥着重要的生态作用<sup>[7]</sup>。洞穴固氮菌的共现网络中, 关键节点主要属于连接节点(connectors), 说明尽管关键节点并非全部可分类, 但其在模块间紧密连接上起着不可忽视的作用。能够注释到属的关键节点主要来自于慢生根瘤菌属, 该类群在养分流失严重的喀斯特土壤中其能够凭借更好的生存能力在生态位竞争中获得胜利并成为优势类群。除此以外关键节点中还出现了归类于假单胞菌属、固氮菌属、固氮螺菌属、中华根瘤菌属等的 OTUs。对 3 种生境的固氮菌群落共现网络分别进行了关键节点的统计发现, 上覆土壤、沉积物中的关键节点更多来自于丰度较高的类群。固定区域的生态系统中, 高丰度的优势类群通常与低丰度类群共存并同时发挥维持生态系统平衡的作用。本研究表明, 与丰度较低的类群相比, 生长和代谢功能活跃的高丰度类群在洞穴固氮功能的维持上具有更加关键的作用。值得注意的是, 有相当一部分无法被明确分类的类群在生态学网络中发挥着重要作用, 这些发现揭示了洞穴内固氮微生物之间的紧密联系, 并暗示着对洞穴固氮微生物尚有很大的探索空间。

## 4 结论

湖北清江和尚洞固氮菌群落总体上具有良好的生境特异性, 除慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)在3种生境中均占比较高外, 上覆土壤、洞穴沉积物中分别以地杆菌属(*Geobacter*)和固氮菌属(*Azotobacter*)占主导, 而风化岩壁中则出现了大量未分类的固氮菌类群。不同生境间固氮菌群落 $\alpha$ 多样性存在显著差异, 以洞穴上覆土壤 $\alpha$ 多样性最高, 洞穴内沉积物 $\alpha$ 多样性最低。RDA分析表明,  $K^+$ 、 $NO_2^-$ 和 $NO_3^-$ 是驱动和尚洞固氮菌群落组成的主要环境因素。网络共现分析表明, 洞穴固氮菌群落之间形成了紧密的正相关关系, 不同类群通过协作的方式互利互惠, 共同完成寡营养洞穴环境的生物固氮过程。网络中的关键物种为维持网络的稳定性起着重要作用。本研究结果对深入了解洞穴固氮菌的组成、分布规律以及生存策略具有重要意义, 但洞穴中仍存在大量未知的固氮类群, 深入开展洞穴固氮微生物的分离培养、鉴定工作以及固氮能力的验证将对认识深部生物圈的固氮作用起到至关重要的作用。

## 参考文献

- [1] PAJARES S, BOHANNAN BJM. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1045.
- [2] 靳希桐, 胡文革, 贺帅兵, 周婷婷, 王月娥, 钟镇涛. 不同时期艾比湖湿地盐角草群落土壤固氮微生物的多样性分析[J]. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1600-1611. JIN XT, HU WG, HE SB, ZHOU TT, WANG YE, ZHONG ZT. Diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms in *Salicornia europaea* community of Ebinur Lake wetland during different periods[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1600-1611 (in Chinese).
- [3] LIU L, HE XY, DU H, WANG KL. The relationships among nitrogen-fixing microbial communities, plant communities, and soil properties in karst regions[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(12): 4037-4044.
- [4] SEPP SK, VASAR M, DAVISON J, OJA J, ANSLAN S, AL-QURAI SHY S, BAHRAM M, BUENO CG, CANTERO JJ, FABIANO EC, DECOCQ G, DRENKHAN R, FRASER L, GARIBAY ORIEL R, HIIESALU I, KOOREM K, KÖLJALG U, MOORA M, MUCINA L, ÖPIK M, et al. Global diversity and distribution of nitrogen-fixing bacteria in the soil[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1100235.
- [5] 杨梓琪, 程晓钰, 王红梅, 曾智霖, 刘晓燕, 曹静, 苏春田, 黄奇波. 桂林罗汉肚洞细菌群落的环境驱动机制及群落构建过程[J]. *微生物学报*, 2021, 61(12): 4118-4136. YANG ZQ, CHENG XY, WANG HM, ZENG ZL, LIU XY, CAO J, SU CT, HUANG QB. Environmental driving mechanisms and community assembly process of bacterial communities in the Luohandu Cave, Guilin, Guangxi Province, China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 4118-4136 (in Chinese).
- [6] 曹静, 程晓钰, 曾智霖, 杨梓琪, 刘晓燕, 王红梅, 马丽媛, 鲁小璐, 苏春田, 黄奇波. 广西桂林新村屯洞穴细菌群落的生境特异性及网络分析[J]. *科学通报*, 2021, 66(31): 4003-4016. CAO J, CHENG XY, ZENG ZL, YANG ZQ, LIU XY, WANG HM, MA LY, LU XL, SU CT, HUANG QB. Habitat specificity and co-occurrence network of bacterial communities in the Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(31): 4003-4016 (in Chinese).
- [7] LIU XY, WANG HM, WANG WQ, CHENG XY, WANG YH, LI Q, LI L, MA LY, LU XL, TUOVINEN OH. Nitrate determines the bacterial habitat specialization and impacts microbial functions in a subsurface karst cave[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1115449.
- [8] 曾智霖, 程晓钰, 王红梅, 曹静, 杨梓琪, 刘晓燕, 王映衡, 李璐, 苏春田, 黄奇波. 喀斯特洞穴细菌群落的生境特异性及其潜在功能: 以广西桂林盘龙洞为例[J]. *地球科学*, 2022. DOI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1874.P.20220322.1334.008.html>. ZENG ZL, CHENG XY, WANG HM, CAO J, YANG ZQ, LIU XY, WANG YH, LI L, SU CT, HUANG QB. Niche specificity and potential functions of microbial communities in karst caves as exemplified by the Panlong Cave in Guilian City, Guangxi province[J]. *Journal of Earth Science*, 2022. DOI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1874.P.20220322.1334.008.html> (in Chinese).

- [9] CHENG XY, YUN Y, WANG HM, MA LY, WEN T, MAN BY, LIU CY. Contrasting bacterial communities and their assembly processes in karst soils under different land use[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 751: 142263.
- [10] WU YC, TAN LC, LIU WX, WANG BZ, WANG JJ, CAI YJ, LIN XG. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 244.
- [11] YUN Y, WANG HM, MAN BY, XIANG X, ZHOU JP, QIU X, DUAN Y, ENGEL AS. The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(485): 1955.
- [12] HU A, WANG JJ, SUN H, NIU B, SI GC, WANG J, YEY CF, ZHU XX, LU XC, ZHOU JZ, YANG YP, REN ML, HU YL, DONG HL, ZHANG GX. Mountain biodiversity and ecosystem functions: interplay between geology and contemporary environments[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(4): 931-944.
- [13] CHENG XY, LIU XY, WANG HM, SU CT, ZHAO R, BODELIER PLE, WANG WQ, MA LY, LU XL. USC  $\gamma$  dominated community composition and cooccurrence network of methanotrophs and bacteria in subterranean karst caves[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(1): e0082021.
- [14] CHENG XY, WANG HM, ZENG ZL, LI L, ZHAO R, BODELIER PLE, WANG YH, LIU XY, SU CT, LIU SJ. Niche differentiation of atmospheric methane-oxidizing bacteria and their community assembly in subsurface karst caves[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2022, 14(6): 886-896.
- [15] BARTON HA, TAYLOR MR, PACE NR. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2004, 21(1): 11-20.
- [16] ASENSIO A, ABOAL M. In situ nitrogen fixation by *Cyanobacteria* at the Andragulla Cave, Spain[J]. *Journal of Cave and Karst Studies*, 2011, 73(2): 50-54.
- [17] DESAI MS, ASSIG K, DATTA GUPTA S. Nitrogen fixation in distinct microbial niches within a chemoautotrophy-driven cave ecosystem[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(12): 2411-2423.
- [18] HATHAWAY JJM, SINSABAUGH RL, de LURDES N E DAPKEVICIUS M, NORTHUP DE. Diversity of ammonia oxidation (*amoA*) and nitrogen fixation (*nifH*) genes in lava caves of Terceira, Azores, Portugal[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(3): 221-235.
- [19] de LIMA SILVA MARQUES E, GROSS E, TEIXEIRA DIAS JC, PRIMINHO PIROVANI C, PASSOS REZENDE R. Ammonia oxidation (*amoA*) and nitrogen fixation (*nifH*) genes along metasandstone and limestone caves of Brazil[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35(10): 869-878.
- [20] TAN ZY, HUREK T, REINHOLD-HUREK B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 1009-1015.
- [21] RODRIGUES COELHO MR, de VOS M, CARNEIRO NP, MARRIEL IE, PAIVA E, SELDIN L. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of *Sorghum* (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 279(1): 15-22.
- [22] WAKELIN SA, COLLOFF MJ, HARVEY PR, MARSCHNER P, GREGG AL, ROGERS SL, NOTES A. The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 59(3): 661-670.
- [23] LEVY-BOOTH DJ, WINDER RS. Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut Douglas-fir stands by using real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 7116-7125.
- [24] DEKAS AE, FIKE DA, CHADWICK GL, GREEN-SAXENA A, FORTNEY J, CONNON SA, DAWSON KS, ORPHAN VJ. Widespread nitrogen fixation in sediments from diverse deep-sea sites of elevated carbon loading[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(12): 4281-4296.
- [25] 余伟钰, 冯灿, 杨渐, 蒋宏忱. 三峡库区水体中固氮微生物多样性及其影响因素[J]. *微生物学报*, 2019, 59(6): 1127-1142.
- SHE WY, FENG C, YANG J, JIANG HC. Nitrogen-fixing microbial diversity and its influencing environmental variables in waters Three Gorges Reservoir[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1127-1142 (in Chinese).
- [26] SUN XX, KONG TL, HÄGGBLÖM MM, KOLTON M, LI FB, DONG YR, HUANG YQ, LI BQ, SUN WM. Chemolithoautotrophic diazotrophy dominates the nitrogen fixation process in mine tailings[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(10): 6082-6093.
- [27] DAI ZM, GUO X, YIN HQ, LIANG YL, CONG J, LIU

- XD. Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e87976.
- [28] 王晓菲, 罗珠珠, 李玲玲, 牛伊宁, 孙鹏洲, 海龙, 李林芝. 黄土高原不同种植年限苜蓿土壤固氮微生物群落结构和丰度特征[J]. 中国生态农业学报, 2023, 31(5): 665-676.
- WANG XF, LUO ZZ, LI LL, NIU YN, SUN PZ, HAI L, LI LZ. Characteristics of structure and abundance of soil nitrogen-fixing bacterial community in *alfalfa* with different growing ages in The Loess Plateau[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2023, 31(5): 665-676 (in Chinese).
- [29] NELSON MB, MARTINY AC, MARTINY JHB. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(29): 8033-8040.
- [30] WANG J, BAO JT, LI XR, LIU YB. 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.
- [31] 刘璐, 刘星, 靖宪月, 黄玲艳, 周顺桂. 地杆菌: 驱动厌氧生物地球化学循环的“多面手”[J]. 微生物学报, 2022, 62(6): 2277-2288.
- LIU L, LIU X, JING XY, HUANG LY, ZHOU SG. *Geoabcter*: the “generalist” driving anaerobic biogeochemical cycles[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(6): 2277-2288 (in Chinese).
- [32] MASUDA Y, ITOH H, SHIRATORI Y, ISOBE K, OTSUKA S, SENOO K. Predominant but previously-overlooked prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, revealed by metatranscriptomics[J]. Microbes and Environments, 2017, 32(2): 180-183.
- [33] COENYE T, VANDAMME P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(9): 719-729.
- [34] WANG YS, LI CN, KOU YP, WANG JJ, TU B, Li H, Li XZ, WANG CT, YAO MJ. Soil pH is a major driver of soil diazotrophic community assembly in Qinghai-Tibet alpine meadows[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 115: 547-555.
- [35] CHE RX, DENG YC, WANG F, WANG WJ, XU ZH, HAO YB, XUE K, ZHANG B, TANG L, ZHOU HK, CUI XY. Autotrophic and symbiotic diazotrophs dominate nitrogen-fixing communities in Tibetan grassland soils[J]. Science of the Total Environment, 2018, 639: 997-1006.
- [36] RAZA S, MIAO N, WANG PZ, JU XT, CHEN ZJ, ZHOU JB, KUZYAKOV Y. Dramatic loss of inorganic carbon by nitrogen-induced soil acidification in Chinese croplands[J]. Global Change Biology, 2020, 26(6): 3738-3751.
- [37] ZHAO R, WANG HM, YANG H, YUN Y, BARTON HA. Ammonia-oxidizing archaea dominate ammonia-oxidizing communities within alkaline cave sediments[J]. Geomicrobiology Journal, 2017, 34(6): 511-523.
- [38] COSKUN D, BRITTO DT, KRONZUCKER HJ. The nitrogen-potassium intersection: membranes, metabolism, and mechanism[J]. Plant, Cell & Environment, 2017, 40(10): 2029-2041.
- [39] LAYEGHIFARD M, HWANG DM, GUTTMAN DS. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(3): 217-228.
- [40] 郑超, 刘扬, 陶羽, 杨丽华, 冯福应, 陈玉萍. 中央戈壁石下生物土壤结皮固氮细菌群落结构和多样性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 1920-1929.
- ZHENG C, LIU Y, TAO Y, YANG LH, FENG FY, CHEN YP. Structure and diversity of hypolithic diazotroph in central Gobi[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 1920-1929 (in Chinese).

**王红梅**, 中国地质大学(武汉)环境学院教授、博导, 长期从事地质微生物学领域的教学和科研工作。担任国际洞穴联合会微生物与地质微生物分会副主席(2013-2018), 深部生命研究国际中心执行委员(2018-至今), 中国古生物学会地球生物学分会理事(2018-至今), 中国微生物学会地质微生物专业委员会委员。先后在美国俄亥俄州立大学和南加州大学做访问研究。曾获全国优秀博士论文提名奖、教育部自然科学一等奖; 荣获湖北省师德先进个人、湖北省三八红旗手、湖北省百名女性优秀科技创新人才等荣誉称号, 入选教育部新世纪优秀人才支持计划, 主持国家自然科学基金委重点基金项目2项, 面上项目4项, 973子课题2项, 发表论文140余篇, 参与出版专著、教材等5部。

