广西桂林新村屯洞穴细菌群落的生境特异性及网络分析

曹静¹, 程晓钰¹, 曾智霖¹, 杨梓琪¹, 刘晓燕¹, 王红梅^{1,2*}, 马丽媛¹, 鲁小璐¹, 苏春田³, 黄奇波³

1. 中国地质大学(武汉)环境学院, 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, 武汉 430074;

3. 中国地质科学院岩溶地质研究所, 自然资源部岩溶动力学重点实验室, 桂林 541004

* 联系人, E-mail: wanghmei04@163.com, hmwang@cug.edu.cn

2021-01-05 收稿, 2021-03-30 修回, 2021-03-31 接受, 2021-04-01 网络版发表

国家自然科学基金(91951208)、广西自然科学基金(2020GXNSFAA297025)和中国地质调查局地质调查项目(DD20190343)资助

摘要 洞穴是研究深地生物圈的天然实验室, 对认识深地生物圈微生物多样性及群落分布特征至关重要. 以我国岩溶最为发育的广西桂林市为研究区, 对新村屯洞穴内不同小生境进行了系统采样, 通过Illumina高通量测序和生物信息学的分析, 发现洞穴中细菌群落以放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)占优势, 不同生境间细菌群落 α 多样性存在显著差异, 以洞穴上覆土壤 α 多样性最高, 洞穴内微生物席 α 多样性最低. 洞穴内细菌组成按生境聚类, 不同生境具有各自的指示类群, 干燥石笋表面生物膜指示属为*Nitrospira*和*Polycyclovoran*; 上覆土壤、微生物席、沉积物和风化结皮的指示属分别为*Candidatus Udaeobacter*、*Vicinamibacter*、*Bacillus*和*Longimicrobium*, 显示出洞穴细菌群落的生境特异性. 冗余分析结果证实pH和TOC(total organic carbon)对微生物群落的空间分布具有重要影响. 共现性网络分析表明, 洞穴细菌群落网络高度模块化, γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、*Candidatus Udaeobacter*和嗜热油菌纲(Thermoleophila)为排名前三的关键种, 对维持细菌网络的稳定性起着重要作用. 共现性网络节点之间以正相关连接占主导, 表明微生物主要通过相互协作以共同抵抗洞穴中的极端条件. 这些结果揭示了新村屯洞穴生态系统中微生物群落的生境特异性和微生物之间的相互作用, 提升了人们对洞穴生态系统这一陆地深地生物圈的认识.

关键词 细菌群落, 共现性网络分析, 深地生物圈, 喀斯特洞穴, 生境特异性

洞穴作为典型的喀斯特地貌单元, 具有黑暗、寡营养和地理位置相对隔离等特征, 通常被认为是一种极端环境^[1]. 尽管如此, 洞穴仍蕴含着丰富多样的微生物类群^[2], 它们通常具有一些特殊的代谢途径, 能够适应洞穴环境^[3]. 在洞穴中, 细菌、真菌和古菌是主要的微生物类群, 但在富含H₂S等还原性气体的深成岩溶洞穴中, 则还有鞭毛虫和钩虾^[4]等高等真核生物, 其生态系统类似于海底热液喷口. 细菌是洞穴生物多样性的主要组成部分, 在维持洞穴生态系统中起着关键作用^[5]. 同时洞穴细菌与矿物的相互作用^[6-8]以及放线菌

在新药物开发中的重要地位^[9,10]均与科学前沿和国家需求紧密相关, 因此深入了解洞穴细菌的多样性、分布特征以及地球化学作用等对深地生物圈微生物资源的开发、利用以及探讨微生物对极端环境的生存适应机制等均具有重要意义.

早期洞穴微生物的研究, 大多是基于传统的纯培养技术. 通过纯培养实验获得了硫酸化细菌、铁氧化细菌、硝化变形杆菌、异养变形杆菌、低G+C含量的异养革兰氏阳性细菌和放线菌等类群^[11-13]. 尽管纯菌株的获得为了解洞穴微生物的生理功能、代谢途径以

引用格式: 曹静, 程晓钰, 曾智霖, 等. 广西桂林新村屯洞穴细菌群落的生境特异性及网络分析. 科学通报, 2021, 66: 4003-4016

Cao J, Cheng X Y, Zeng Z L, et al. Habitat specificity and co-occurrence network of bacterial communities in the Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 4003-4016, doi: 10.1360/TB-2021-0021

及生态作用等提供了重要信息,但由于人们对自然界大多微生物的代谢特性尚缺乏足够的认识,因此细菌群落中只有很少一部分可培养,远不能满足洞穴生态系统微生物多样性的研究.高通量测序技术的出现以及后续数据处理技术的迅猛发展,极大地提升了人们对极端环境中微生物群落多样性及潜在功能的认识.洞穴中存在多种小生境,前期人们对洞穴微生物的研究主要集中在上覆土壤^[14]、滴水、岩壁^[15]、沉积物^[16]和蝙蝠粪便^[17]等样本中,而对湿润石笋表面生物膜、干燥石笋表面生物膜以及洞穴微生物席细菌群落的认识还十分薄弱,而这些生境中的生物量与洞穴其他生境相比相对较高,可能对洞穴中的地球化学循环具有重要作用.

已有研究表明,洞穴微生物群落组成受多种理化参数的影响^[18].由于洞穴本身发育的地质条件、水文条件、上覆岩层的厚度、洞口的大小以及通风状况、CO₂浓度等在不同洞穴中差异显著,因此,不同洞穴中微生物的分布规律以及受控的环境因子可能有所不同.前期对发育在寒武纪白云岩中湖北清江和尚洞的不同生境微生物群落的研究表明,pH和固体样品总有机碳(total organic carbon, TOC)是控制群落分布的重要因子^[19],但这些因子对洞穴微生物群落的控制作用是否具有普适性目前还不得而知.

为了回答上述问题,本研究选择了我国岩溶作用最为发育的广西的一个岩溶洞穴为研究对象,对洞穴不同生境包括上覆土壤、湿润石笋表面生物膜、干燥石笋表面生物膜、风化结皮、松散沉积物及微生物席进行了系统采样,通过16S rRNA扩增子的高通量测序,以期阐明洞穴中不同生境细菌的多样性、分布规律及主控的环境因子.在此基础上,对细菌群落的功能以及

微生物之间的互作关系进行探讨,研究结果将提升人们对深地生物圈的认识.

1 材料方法

1.1 研究地简介

新村屯洞位于桂林市永福县三皇镇永福村(24°58'38.5"N, 109°44'15.7"E),海拔340 m.地处中亚热带季风气候区,年平均气温18.8°C,雨量充沛,年平均降雨量为1950 mm,降水主要集中在3~8月.新村屯洞发育在上泥盆统融县组厚层状亮晶砂屑灰岩中,洞长386 m,由两个支洞组成,本研究采样的左支洞长100 m.洞高2~7 m,洞宽约3 m.洞穴内部未进行旅游开发,人为活动少.新村屯洞穴上覆岩层厚度相对较薄,采样时洞内无明显的滴水点、积水以及地下河,较为干旱,洞穴内松散沉积物发育.

1.2 样品采集

样品采集于2019年1月,按20 m的间距,由洞口向洞内分别对新村屯左侧支洞的不同小生境(图1)进行采样.为了对比整个喀斯特洞穴系统的微生物组成及多样性,本研究对洞穴上覆土壤(OS)也进行了采样.洞穴内的样品类型包括岩壁(W)、风化结皮(WC)、松散沉积物(S)、干燥石笋表面生物膜(DS)、湿润石笋表面生物膜(WS)和微生物席(MM).上覆土壤样品采用五点采样法进行样品的采集,样品深度小于5 cm.岩壁和沉积物用酒精灼烧灭菌后的铁铲采集,采样方法为五点采样法,混合均匀后用50 mL无菌离心管收集样本,低温保存.3号和5号采样点处的岩壁表层生长大片红褐色结壳,用铲子将其剥落,用无菌采样袋收集、碾碎,混

图1 (网络版彩色)广西桂林新村屯洞穴采集点及样品分布示意图. W: 岩壁; S: 沉积物; WS: 湿润石笋表面生物膜; DS: 干燥石笋表面生物膜; WC: 风化结皮; MM: 微生物席

Figure 1 (Color online) Skeleton map showing the sampling sites in Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi. W: Cave wall; S: Sediment; WS: Wet surface of the stalagmite; DS: Dry surface of stalagmite; WC: Weathered crust; MM: Microbial mat

匀分装至无菌50 mL离心管内。生物膜采用淋滤收集法：用1 L无菌的去离子水洗刷石笋表面，用漏斗及1 L聚乙烯细口瓶对淋洗液进行收集，随后用蠕动泵对淋洗液进行抽滤，将微生物细胞收集在滤膜上(0.22 μm , 47 mm, Supor[®]-200, Pall Corporation, 美国)。用镊子将滤膜放入无菌50 mL离心管内，低温保存。采样所用的器具均事先进行灭菌处理，野外采样全程佩戴无菌手套和口罩，防止污染。样品置于保温箱中运回中国地质大学(武汉)地质微生物实验室，存放于-80℃备用。

1.3 理化参数测定

将固体样本冷冻干燥24 h以去除水分(ALPHA 1-2 LD, Christ, 德国)。将冷冻干燥研磨后的约10 g固体样本按照1:1(w/v)的比例加入超纯水，连续振荡5 min(Vortex-Genie[®] 2, QIAGEN, 德国)，以6800×g离心(TGL-16A, 长沙)10 min获得上清液。上清液经过0.22 μm 的膜过滤后，利用多参数水质检测仪(HACH, Loveland, CO, 美国)测定pH^[19]，利用离子色谱(ICS-600, Thermo, 美国)和ICP-OES(iCAP 7600+, Thermo, 美国)测定样品阴离子和阳离子的含量^[20]。TOC含量用元素分析仪(Vario MACRO cube, Elementar, 德国)进行测定。生物膜样品理化参数未做测试。

1.4 DNA提取及测序

岩壁、沉积物、上覆土壤、风化结皮以及微生物席样品经冷冻干燥后，取0.5 g样品用PowerSoil[®] DNA Isolation Kit(QIAGEN, 德国)试剂盒提取总DNA。生物膜样品采用PowerWater[®] DNA Isolation Kit(QIAGEN, 德国)试剂盒提取DNA。所得DNA用Nanodrop 2000分光光度计(ND2000, Thermo Scientific, 美国)测定其浓度。对每个样本进行barcode标记，利用细菌通用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因的V3~V4区片段进行扩增^[21]，扩增产物等摩尔比例混匀后，利用Illumina MiSeq测序PE250进行高通量测序(上海派森诺生物公司)。所有原始序列数据均已上传至National Omics Data Encyclopedia(<https://www.biosino.org/node/>)(NODE)，项目编号为OER094313。

1.5 高通量测序及生物信息学分析

根据样本所对应的Barcode序列，获得对应样本的有效序列。利用FLASH软件(v1.2.7)(<http://ccb.jhu.edu/>

[software/FLASH/](http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/))^[22]拼接序列。用QIIME2(2018.2, Quantitative Insight Into Microbial Ecology)软件调用DADA2检查并剔除嵌合体序列。对前述获得的序列构建ASV(Amplicon sequence variant)表，得到ASV代表序列(DADA2不以相似度聚类，只进行去重或者说相当于以100%相似度聚类，使用DADA2质控后产生的每个去重序列称为ASV)。将获得的ASV代表序列在SILVA数据库(<http://greengenes.secondgenome.com/>)(Release 134)^[23]中进行注释并获得其分类关系。对ASV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。

单因素方差分析和Pearson相关性分析利用SPSS Statistics软件(v 10.0)进行。ANOSIM和ADONIS分析采用R软件的“vegan”包，前者用来检验微生物群落的组间差异是否大于组内差异，分组是否有意义；后者用来探究不同分组因素对样品差异的影响程度，并使用置换检验对划分的统计学意义进行显著性分析。箱线图和堆叠柱状图均采用R软件中的“ggplot2”包进行可视化。韦恩图采用“plotrix”包进行绘制。ASV水平上的主成分分析PCoA(principal coordinates analysis)基于Bray-Curtis距离算法进行可视化，该分析利用了R软件的“vegan”包。细菌群落和理化参数的冗余分析RDA(redundancy analysis)使用Canoco5软件分析得到。相关性分析热图利用“corrplot”包进行分析及绘制。不同生境中的指示类群是利用LEfSe(the least discriminant analysis effect size)^[24]方法在交互网页(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)中在线获得，其中线性判别分析LDA(linear discriminant analysis)阈值设定为3.0，指示类群可以用来展示不同生境中细菌群落的差异。使用FAPROTAX数据库^[25]预测细菌潜在的生态功能，该数据库有助于注释环境样本中细菌潜在的地球化学作用。使用Gephi软件(v.0.9.2, <https://gephi.org/>)对ASV水平的共现网络进行可视化，为降低网络复杂度，保留相对丰度占比>0.01%且在>20%样本中出现的ASV，Spearman相关系数 $r \geq 0.7$ ，显著性 $P < 0.01$ ^[26]。

2 结果

2.1 理化性质

所有样本均呈现弱碱性，pH变化范围为7.32 $\pm$ 0.03

到 8.84 ± 0.01 , 由洞口到洞内 pH 增加, 岩壁 pH 普遍低于沉积物 pH, 上覆土壤的 pH 显著低于沉积物和风化结皮 pH(表1). 岩壁样品 K^+ 浓度显著高于沉积物、上覆土壤和风化结皮样品中 K^+ 的浓度, X4W 样品中 K^+ 浓度最高 (115.04 ± 1.75 mg/kg). 风化结皮样品 TOC 显著高于岩壁和沉积物样品的 TOC(X5W 和 X5S 除外). Na^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 的浓度在 4 种生境(岩壁、沉积物、上覆土壤和风化结皮)无显著差异. 岩壁样品的 Mg/Si 和 Ca/Si 显著高于沉积物和上覆土壤的 Mg/Si 和 Ca/Si.

2.2 细菌群落的组成及多样性

通过对 7 种生境样品的测序分析, 共获得 60 个样本的 50163 个 ASV, 分属 36 个门和 85 个纲. α 多样性分析结果显示不同生境微生物多样性指数差异显著(图2). Chao1 指数用来反映细菌群落的丰富度, 香农威纳指数用来评价细菌群落的多样性. ANOVA 检验结果显示, Chao1 和香农威纳指数在不同生境间存在显著性差异 ($P < 0.05$). 其中, 上覆土壤细菌多样性最高 (9.63 ± 0.13), 微生物席的多样性最低 (7.03 ± 0.13). 香农威纳指数由高到低依次为上覆土壤 > 风化结皮 > 沉积物 > 湿润石笋表面生物膜 > 岩壁 > 干燥湿润表面生物膜 >

微生物席(图2(b)).

不同细菌门类在不同生境的细菌群落中所占比例不同(图2(c)). 微生物席、岩壁、上覆土壤、沉积物和风化结皮中以放线菌门(Actinobacteria)占优势, 平均相对丰度分别为 80.29%、61.36%、50.31%、40.16% 和 39.12%. 其次是变形菌门(Proteobacteria), 其中岩壁、沉积物、风化结皮和微生物席以 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)为主, 其平均相对丰度分别为 19.24%、12.44%、32.83% 和 5.78%(图2(c)). 上覆土壤则以 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)占优势, 平均相对丰度为 11.03%. 干燥石笋表面生物膜和湿润石笋表面生物膜中占优势的菌门是变形菌门, 平均相对丰度为 56.53% 和 43.04%, 以 γ -变形菌纲为主, 其平均相对丰度分别为 45.00% 和 24.60%(图2(c)). 其他细菌门类相对丰度较低, 如酸杆菌门(Acidobacteria, 2.91%)、己科杆菌门(Rokubacteria, 1.06%)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 1.44%)的相对丰度小于 3%, 而硝化螺旋菌门(Nitrospirae, 0.58%)、浮霉菌(Planctomycetes, 0.91%)、厚壁菌门(Firmicutes, 0.57%)和绿弯菌门(Chloroflexi, 0.25%)的相对丰度则低于 1%. 基于 ASV 水平、Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析表明不同生境的样品具有明显的特异性,

表 1 广西桂林新村屯洞穴各生境样品的理化参数^{a)}

Table 1 Sample physicochemical properties of different niches in Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi

样品编号	pH	K^+ (mg/kg)	Na^+ (mg/kg)	TOC (%)	Cl^- (mg/kg)	NO_3^- (mg/kg)	SO_4^{2-} (mg/kg)	Mg/Si	Ca/Si
X1W	7.55 ± 0.04^{ab}	4.51 ± 0.07^a	4.20 ± 0.66^a	3.27^b	1.29 ± 0.07^a	10.95 ± 0.43^a	20.98 ± 0.13^a	na	6.36 ± 1.13^a
X2W	7.82 ± 0.01^{ab}	2.70 ± 0.08^a	7.94 ± 1.07^a	0.39^b	3.59 ± 0.08^a	1.28 ± 0.15^a	34.24 ± 0.27^a	0.48 ± 0.52^a	6.55 ± 0.48^a
X3W	7.96 ± 0.03^{ab}	10.79 ± 0.20^a	9.64 ± 0.54^a	3.13^b	4.95 ± 0.06^a	28.59 ± 0.77^a	18.62 ± 0.19^a	0.02 ± 0.00^a	8.65 ± 0.75^a
X4W	7.67 ± 0.03^{ab}	115.04 ± 1.75^a	11.48 ± 0.07^a	2.46^b	28.05 ± 0.04^a	968.90 ± 6.11^a	3996.23 ± 23.84^a	3.86 ± 0.04^a	82.81 ± 2.45^a
X5W	8.59 ± 0.02^{ab}	8.35 ± 0.09^a	8.45 ± 0.67^a	5.16^b	5.40 ± 0.04^a	50.94 ± 0.80^a	22.61 ± 0.18^a	0.36 ± 0.01^a	6.84 ± 0.28^a
X1S	7.68 ± 0.04^a	2.26 ± 0.33^b	5.46 ± 0.13^a	2.02^b	1.61 ± 0.06^a	na	18.68 ± 0.25^a	na	3.18 ± 0.26^b
X2S	7.93 ± 0.00^a	2.73 ± 0.19^b	5.50 ± 0.16^a	1.96^b	1.69 ± 0.04^a	32.71 ± 0.37^a	22.95 ± 0.35^a	0.18 ± 0.10^b	5.01 ± 0.25^b
X3S	8.14 ± 0.03^a	1.40 ± 0.09^b	5.44 ± 0.74^a	1.90^b	0.84 ± 0.06^a	7.09 ± 0.50^a	18.79 ± 0.13^a	0.03 ± 0.00^b	4.70 ± 0.35^b
X4S	8.16 ± 0.04^a	3.63 ± 0.19^b	9.07 ± 1.19^a	1.42^b	1.53 ± 0.03^a	10.70 ± 0.41^a	19.43 ± 0.12^a	0.11 ± 0.01^b	3.87 ± 0.25^b
X5S	8.84 ± 0.01^a	0.61 ± 0.11^b	5.38 ± 0.52^a	5.70^b	0.92 ± 0.08^a	1.17 ± 0.43^a	15.23 ± 0.33^a	na	4.53 ± 0.17^b
X1OS	7.73 ± 0.02^b	4.29 ± 0.32^b	5.90 ± 0.37^a	3.93^{ab}	1.13 ± 0.06^a	3.02 ± 0.29^a	19.68 ± 0.21^a	0.04 ± 0.00^b	1.65 ± 0.24^b
X2OS	7.79 ± 0.04^b	2.71 ± 0.14^b	4.57 ± 0.58^a	1.12^{ab}	1.09 ± 0.14^a	na	16.46 ± 0.34^a	na	1.94 ± 0.11^b
X3OS	7.32 ± 0.03^b	4.76 ± 0.35^b	5.81 ± 0.69^a	5.57^{ab}	1.22 ± 0.08^a	10.50 ± 0.25^a	18.04 ± 0.63^a	0.03 ± 0.00^b	0.90 ± 0.12^b
X3WC	8.15 ± 0.03^a	5.27 ± 0.32^b	6.61 ± 0.59^a	4.04^a	2.16 ± 0.17^a	4.76 ± 0.45^a	18.63 ± 1.25^a	0.03 ± 0.01^{ab}	9.24 ± 0.54^{ab}
X5WC	8.23 ± 0.03^a	3.78 ± 0.36^b	6.05 ± 0.77^a	5.91^a	2.33 ± 0.05^a	1.94 ± 0.17^a	22.31 ± 0.2^a	0.25 ± 0.04^{ab}	6.34 ± 0.81^{ab}

a) 字母a和b表示生境间存在显著性差异($P < 0.05$). na: 低于检测限; X: 新村屯; 样品编号中的数字表示采样点; W: 岩壁; WC: 风化结壳; S: 沉积物; OS: 上覆土壤

图 2 广西桂林新村屯洞不同生境细菌的群落结构及多样性特征. Alpha多样性指数: Chao1指数(a)、香农威纳指数(b). (a)和(b)图中的字母a~d表示样本间存在显著性差异($P < 0.05$). (c) 细菌群落在门/纲水平的组成. (d) 细菌群落基于ASV水平和Bray-Curtis距离的PCoA分析. W: 岩壁; S: 沉积物; WS: 湿润石笋表面生物膜; DS: 干燥石笋表面生物膜; MM: 微生物席; WC: 风化结皮; OS: 上覆土壤

Figure 2 Characteristics of bacterial community structure and diversity of different niches in Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi. Alpha diversity indices (Chao 1 (a) and Shannon-Wiener index (b)) of bacterial communities. Letters a~d in (a) and (b) showed significantly difference ($P < 0.05$) among different niches. (c) Bacterial compositions of different microhabitats at the phylum/class level. (d) Bacterial PCoA plot based on Bray-Curtis distance at ASV level. W: Cave wall; S: Sediments; WS: Wet surface of stalagmite; DS: Dry surface of stalagmite; MM: Microbial mat; WC: Weathering crust; OS: Overlying soil

群落组成按不同生境分别聚类(图2(d)). PCo1解释了不同生境细菌群落结构差异的14.04%, 而PCo2则解释了12.04%. ADONIS结果($R^2 = 44.3\%$, $P = 0.001$)同样证明细菌群落以生境分组具有统计学意义.

2.3 不同生境微生物群落的差异

图3(a)展示了不同生境中共有和独有的ASV, 7个生境共有ASV数目仅为6, 而岩壁、沉积物、上覆土壤、湿润石笋表面生物膜、风化结皮、干燥石笋表面生物膜和微生物席中独有的ASV则分别为12941、

12302、9620、8629、5891、5572和8629个, 差异显著, 表明生境可能是影响细菌群落组成的关键因素. 7种生境细菌群落的ANOSIM分析结果($R = 0.40$, $P = 0.0001$)进一步证实了细菌群落组间差异大于组内差异, 以生境分组是有意义的.

对新村屯洞不同生境细菌群落组成进行多级物种差异判别分析(LEfSe), 寻找对样本划分产生显著性差异影响的物种, 即指示类群(indicator taxa). 采用LDA对数据进行降维, 评估差异显著的指示类群效应值(LDA score = 3), 将具有显著差别的不同分类水平指

图3 广西桂林新村屯洞不同生境ASV的韦恩图(a)和不同生境基于LDA=3的LEfSe分析(b)。字母含义同图2

Figure 3 Venn plot of ASVs from different niches in Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi (a) and the LEfSe analysis (b) with LDA=3. Abbreviations of sample ID are the same as those in Fig. 2

示类群以树图的形式表现出来。结果表明,在60个样本中共找出32个从门到属级别的分类单元,即指示类群。LEfSe结果显示(图3(b)),干燥石笋表面生物膜的指示类群主要包括:硝化螺旋菌门和硝化螺旋菌纲(Nitrospira)。微生物席的指示类群是酸杆菌门。松散沉积物的指示类群包括厚壁菌门和芽孢杆菌纲(Bacilli)。放线菌门和放线菌纲(Actinobacteria)是岩壁和风化结皮的指示类群。 γ -变形菌纲是湿润石笋表面生物膜的指示类群。每个生境也有其特殊的指示属,如属于干燥石笋表面生物膜的Nitrospira和Polycyclovoran;上覆土壤、微生物席、沉积物和风化结皮的指示属分别为Candidatus Udaeobacter、Vicinamibacter、Bacillus和Longimicrobium。不同生境样品的指示物种不同,进一步证实生境对细菌群落的影响。

使用FAPROTAX对洞穴微生物群落的生物地球化学过程(特别是碳、氮、硫等元素循环)进行功能注释预测,在9586个ASV中,有146个ASV被注释到至少一种功能,注释程度仅为1.52%(图S1)。氮循环(89.65%)和硫循环(9.12%)相关功能包含的序列数最多,碳循环(1.22%)相关功能包含的序列数相对较少。

2.4 环境因子对细菌群落的影响

RDA分析了理化参数对4种不同生境(岩壁、沉积物、上覆土壤和风化结壳)细菌群落的影响。RDA1和

RDA2分别解释了62.23%和12.05%的群落变量(图4(a)),其中pH和TOC是极显著影响细菌群落组成的环境因子($P = 0.002$),对群落结构的解释度分别为43.8%和30.3%,而风化指数Mg/Si对细菌的群落结构也具有显著的影响($P = 0.016$),解释度为11.3%(图4(a))。相关性分析结果表明,pH和TOC与丰富门类呈显著相关性(图4(b))。pH与放线菌门呈显著负相关,与 γ -变形菌纲、己科河菌门和硝化螺旋菌门呈显著正相关。TOC与酸杆菌门呈显著负相关,与 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲和Planctomycetes呈显著正相关(图4(b))。

2.5 细菌群落的网络分析

利用共发生网络研究7个生境中细菌群落的共现性特征^[27,28],构建了基于ASV水平的共发生网络(图5)。该网络由352个节点和3780条边组成,其中正相关边数远大于负相关边数,代表细菌群落之间的拮抗作用较小^[29]。网络拓扑指数如下:平均路径长度为4.1,网络直径为12,平均聚类系数为0.664,模块化指数为0.552(模块化指数大于0.4^[30],表明网络具有模块化结构)。将网络中的节点按门划分,其中占比最高的节点为放线菌门和变形菌门,占有节点的73%以上(图5(a))。介数中心性排名前三的节点分别是 γ -变形菌纲、Candidatus Udaeobacter和嗜热油菌纲(Thermoleophila)。

共发生网络大部分节点被划分为6个主要模块(图5

图4 广西桂林市新村屯洞细菌群落组成与理化因子的RDA分析(a)和环境因子与细菌不同类群之间的相关性热图(b)。蓝色/红色星号代表环境因子对细菌群落组成具有显著影响, *: 0.01 < P < 0.05; **: P < 0.01。 (b)中蓝色圈表示负相关, 红色表示正相关

Figure 4 RDA of bacterial communities and environmental variables in Xincuntun Cave (a) and correlative heatmap between environmental variables and microbial groups (b) in Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi. Environmental variables significantly impacting on bacterial communities were marked with one (with 0.01 < P < 0.05) or two blue/red stars (P < 0.01) respectively. Blue and red solid circles in (b) indicated negative and positive correlations

(b)。每个模块的节点对洞穴生境的偏好不同(图5(c))。在模块1中, 主要节点是来自岩壁和风化结皮样品; 模块2中, 大部分节点来自沉积物样品; 模块3中, 主要节点来自上覆土壤样品; 模块4和6中, 主要节点来自岩壁样品; 模块5中, 大部分节点以风化结皮样品为主。其他生境的样品由于样本量相对较少, 所占比例偏低。

3 讨论

3.1 洞穴细菌群落的生境特异性

新村屯洞不对外开放, 只有当地居民和少数的研究人员偶尔进入, 对洞穴细菌群落影响较小, 因此研究结果能够反映洞穴原始的细菌群落结构特征。细菌群落 α 多样性指数在不同生境中差异显著(图2), 洞穴上覆土壤细菌多样性最高(9.63 ± 0.13), 洞穴内部生境细菌多样性相对较低, 微生物席的多样性最低(7.03 ± 0.13)。这与对美国加利福尼亚州7个熔岩洞穴微生物群落的研究结果一致^[31], 这些洞穴上覆土壤样本中微生物群落的多样性也高于洞穴内3种颜色(棕褐色、白色和黄色)的微生物席样本的细菌群落多样性, 这可能与土壤中营养物质比较丰富有关。

同时, 不同生境中特有的ASV数量差异(从上覆土壤的12941个ASV到微生物席的2135个ASV), 也表明细菌群落的生境特异性较大(图3(a))。群落的PCoA分析

显示微生物群落结构按照生境聚类, 进一步证实了细菌群落的生境特异性(图2(d))^[32]。

放线菌门和变形菌门是洞穴微生物群落组成中的主要类群^[33,34], 这与本研究的结果一致。新村屯洞样品除DS和WS外, 其他生境中细菌群落均以放线菌门占主导。在对墨西哥州两个熔岩洞穴的研究发现, 放线菌通常分布在湿度较高的地方, 在干燥地区丰度下降^[35]。在新村屯洞穴中放线菌门在干燥石笋表面生物膜中的丰度低于湿润石笋表面生物膜, 与上述墨西哥熔岩洞穴中放线菌的分布特点一致。变形菌门不仅是土壤细菌中最主要的细菌类群, 在洞穴微生物群落中也占主导地位, 该类群具有高度的代谢多样性, 在全球碳、氮和硫循环中发挥重要作用^[36]。与富含H₂S的深成洞穴不同, γ -变形菌纲在新村屯洞穴中占据主导地位(图2(c)), 而Epsilonproteobacteria则在富含H₂S的深成洞穴占主导, 如美国Lower Kane洞穴^[37]和Glenwood Springs^[38]洞穴的细菌优势群落均为Epsilonproteobacteria。绿弯菌门是一种自养的绿色非硫细菌, 具有固定二氧化碳的作用, 是洞穴中常见的类群^[39,40]。对印度5个洞穴细菌群落的研究结果表明洞穴沉积物中的细菌类群主要以放线菌门和酸杆菌门为主^[41]; 湖北清江和尚洞中岩壁中以放线菌门为主^[19], 新村屯洞穴的优势类群与其他寡营养环境洞穴的优势类群一致。值得注意的是, 在新村屯洞中未分类的细菌(unclassified bacteria)占比相对较

图5 广西桂林新村屯洞细菌群落共现网络。共现网络节点分别按分类单元门(a)和模块(b)进行着色。(c)网络中每个模块不同生境节点所占比例。两个节点之间的连接表示显著相关性($r \geq 0.7$, $P < 0.01$), 其中粉色代表正相关, 绿色代表负相关。(c)中字母的含义同图2

Figure 5 Co-occurrence network of bacterial communities in Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi. The nodes of co-occurrence network were colored by phylum (a) and module (b). (c) The proportion of ASV from different niches in each module in the network. A connection between two nodes stands for a significant correlation ($r \geq 0.7$, $P < 0.01$). Positive correlations are in pink, whereas negative correlations in green edges. Abbreviations in (c) are designated the same as those in Fig. 2

大(7.81%~19.88%), 表明洞穴中可能存在着许多分类和功能未知的类群, 对微生物资源的进一步挖掘具有重要意义。

不同生境的样品除了细菌多样性和组成存在差异外, 指示类群也存在差异(图3(b)), 表明微生物对特定生境的偏好以及微生物潜在功能的变化。新村屯洞穴中

放线菌门是岩壁和风化结皮的指示类群。据报道放线菌通常生长在洞穴的岩壁上,在许多洞穴中部分自养型放线菌能够吸收二氧化碳,进而溶解岩石,参与岩石的风化或碳酸钙晶体的形成^[42],所以放线菌被认为是岩壁微生物群落的先锋物种。大多数放线菌在弱碱性条件下生长最佳^[43,44],在本研究中,岩壁和风化结皮样品pH为 7.55 ± 0.04 到 8.23 ± 0.03 ,这有利于放线菌的生长。厚壁菌门中的芽孢杆菌纲是松散沉积物的指示类群,芽孢杆菌纲内的大多数物种可形成抗逆性极强的芽孢,从而具有很强的环境适应性^[45]。硝化螺旋菌门是干燥石笋表面生物膜的指示类群,在氮循环中起重要作用,结合功能预测结果看,干燥石笋表面生物膜样品中涉及氮循环的序列最多(图S1),暗示着生物膜中可能存在着活跃的氮循环。酸杆菌门是微生物席的指示类群,通常是寡营养、低pH土壤中的优势类群,具有降解环境中有机化合物的能力^[46]。 γ -变形菌纲是湿润石笋表面生物膜的指示类群,它的适应性很强^[47],广泛分布在不同的环境中。

群落功能预测结果也证实不同生境中细菌类群的代谢功能也具有差异(图S1),不同的细菌类群参与的地球化学过程不同。 α -变形菌纲中的Unclassified Rhizobiales被推测能够介导硫循环^[48],与硫酸盐呼吸和硫化合物呼吸作用有关的ASV在洞穴系统中分布广泛,硫酸盐呼吸是硫酸盐还原细菌在无氧条件下获取能量的方式,最终把硫酸盐还原为 H_2S 。推测甲基杆菌属(*Methylobacterium*)与碳循环密切相关^[49],与碳循环有关的ASV仅在干燥和湿润石笋表面生物膜样品被注释到,这可能与石笋表面生物膜活跃参与碳酸盐矿物的溶解/沉淀有关。硝化螺菌属(*Nitrospira*)在7种生境中都有,主要参与氮循环。已有研究发现参与氮循环中的氨氧化古菌——奇古菌在洞穴中占显著地位,氨氧化是洞穴微生物的主要能量来源,洞穴微生物有可能参与了氮循环的每个环节^[50,51]。

3.2 环境因子对细菌群落的影响

业已证实,pH是影响土壤细菌群落组成和多样性的关键因素^[52,53],在新村屯洞穴中,pH也是控制群落结构的主要环境因子。进一步的研究显示pH还影响某些微生物类群在群落结构中的相对丰度^[54]。如和尚洞的研究结果显示 α -变形菌门(Alphaproteobacteria)与pH呈负相关^[19],但在新村屯洞 α -变形菌门与pH呈负相关但不显著($P = 0.619$)。这种差异可能与两个洞穴所处地

理环境以及气候条件的不同有关。和尚洞位于中国中部,受酸雨影响较大,表层土壤呈酸性或中性^[19],而新村屯受酸雨影响相对较小。一般认为酸杆菌门与pH呈负相关^[55],如高寒土壤中酸杆菌门丰度随深度增加而减少的原因被解释为受土壤pH升高的影响^[56]。美国加利福尼亚州7个熔岩洞穴的研究也证实酸杆菌门与pH($R = -0.80, P < 0.001$)呈负相关^[14],pH<5.5时细菌数量最多。而新村屯洞穴中酸杆菌门与pH也不存在显著的相关性,这可能与新村屯整个样品的pH变化范围较小有关。

大多数洞穴系统属于寡营养环境,缺乏来自光合作用的有机质,但洞穴中通过滴水^[57]或者空气流动^[58]带入洞穴、来自蝙蝠粪便等痕量的有机质以及洞穴自养细菌等均能为异养细菌提供能量和食物来源。尤其是季节性的降水通过岩石裂隙或者季节性的溪流将外界有机质带入洞穴,造成洞穴内有机质含量在短时间内的突然增加,使得能够利用有机质的异养微生物快速增加,从而使TOC对洞穴微生物群落造成显著影响,这与和尚洞的研究结果一致^[29]。

此外,化学风化指数如Mg/Si、Ca/Si也是显著影响新村屯洞穴微生物群落结构的重要因素。化学风化通常被用来衡量风化壳、土壤/古土壤和陆源碎屑沉积物或岩石等的化学风化强度^[59],Mg、Ca元素在风化作用中易被溶出,而Si则相对稳定,因此,Mg/Si、Ca/Si比值越大,表明化学风化程度越剧烈^[60]。微生物在岩石风化以及成土作用中发挥着重要作用^[61],在对岩石进行风化的过程中,微生物分泌代谢产物如酸性物质促使矿物分解^[62],或者通过电子传递对矿物中的变价元素进行氧化/还原^[63],进而汲取矿物中所包含的痕量营养元素或者获得生长的能量,被风化的岩石表面粗糙度增加,进而为各种异养微生物的定殖提供了合适的条件。已有研究表明,在喀斯特地区的土壤中,不同土地利用方式下土壤微生物群落组成也与化学风化指数密切相关^[53]。

3.3 洞穴细菌类群的相互作用

共现网络分析通过微生物类群丰度之间的相关性来衡量复杂的微生物群落中不同微生物类群之间的相互作用关系^[64]。正相关和负相关的连接代表不同ASV之间正或负的相关作用,正相关作用反映物种之间的合作和生态位重叠,负相关作用反映物种之间的竞争和生态位分离^[65]。在新村屯洞穴中,微生物整个网络正

向连接多于负向连接(图5),不同模块内部也以正相关作用为主,表明微生物之间的协同作用在洞穴极端环境中的重要性,大多数微生物通过与其他微生物物种之间的合作来抵抗恶劣的环境条件^[66]。

共现网络分析中,利用节点拓扑结构来确定微生物如关键种的潜在重要性。研究表明,介数中心性(betweenness centrality)得分高的节点对维持网络的连通性尤为重要^[67]。在介数中心性排名前三的微生物类群中, γ -变形菌纲来自沉积物和风化结皮,属于变形菌门,在水体沉积环境中分布广泛,可以代谢多种物质,如它们在厌氧条件下介导硫的代谢^[68]。*Candidatus* Udaeobacter 属于疣微菌门(Verrucomicrobia)的一个分支,是厌氧异养微生物,可以利用有限的碳源进行生长,可以参与葡萄糖、丙氨酸、壳二糖以及具有多糖、个别氨基酸和维生素的代谢^[69]。疣微菌门具有很高的多样性以及广泛的代谢能力,具有甲烷氧化(营养)功能,暗示着新型的由微生物介导的甲烷氧化途径与机制可能存在^[70]。嗜热油菌纲来自洞穴沉积物和上覆土壤,是放线菌门的一个分支。放线菌(Actinobacteria)少数是自养型,绝大多数为异养型,可以参与岩溶作用,通过细小的菌丝深入到碳酸盐岩微细的孔隙中,并在此分泌有机酸、碳酸酐酶等,加速岩石的溶蚀与风化。同时,在岩石的沉积过程中,因为它们的参与,使喀斯特地区微生物参与下的矿化作用更加复杂^[71,72]。

此外,新村屯微生物群落共生网络的模块性好,处

于同一模块的微生物类群要么具有相同的生态功能,要么具有相同的生境偏好,而我们对不同模块中节点的样品来源的分析结果显示,同一模块的节点大多来自相同的生境,进一步证实了洞穴小生境对微生物群落的选择作用。

4 结论

新村屯洞穴细菌群落具有显著的生境特异性,不同生境的多样性和丰富度存在显著差异。总体来讲,该洞细菌群落的优势门为放线菌门、变形菌门和酸杆菌门。LEfSe分析显示,不同生境的指示类群不同,干燥石笋表面生物膜的指示类群为硝化螺旋菌门和硝化螺旋菌纲;岩石表面微生物席的指示类群是酸杆菌门;松散沉积物的指示类群包括厚壁菌门及其下的芽孢杆菌纲; γ -变形菌纲是湿润石笋表面生物膜的指示类群;而放线菌门则是岩壁及风化结壳中的指示类群。RDA分析表明,pH、TOC和化学风化指数Mg/Si是细菌群落主要的环境驱动因素。网络共现分析表明,洞穴微生物之间通过紧密的协作关系来抵御极端环境条件,关键物种对维持网络的稳定性起着重要作用。本研究结果揭示了细菌群落在新村屯洞内不同生境之间的分布特征及环境驱动因子,阐明了微生物之间的互作关系,对系统理解微生物在原始喀斯特洞穴系统的分布规律、生境特异性以及潜在的生态功能等具有重要意义,同时也为理解深部生物圈的地球化学循环提供了重要参考。

参考文献

- Northup D E, Lavoie K H. Geomicrobiology of caves: A review. *Geomicrobiol J*, 2001, 18: 199–222
- Marques E L S, Dias J C T, Silva G S, et al. Organic matter enrichment affects archaea community in limestone cave sediments. *J Cave Karst Stud*, 2017, 79: 95–99
- Ghosh S, Kuisiene N, Cheeptham N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochem Pharmacol*, 2017, 134: 18–34
- Lu X, Li Z, An J M. Diversity of the cave-dwelling crustaceans and their adaptation to the cave environment in China (in Chinese). *Zool Syst*, 2010, 35: 108–116 [陆霞, 李竹, 安建梅. 中国洞穴甲壳动物多样性及其对洞穴环境的适应性. *动物分类学报*, 2010, 35: 108–116]
- Ortiz M, Neilson J W, Nelson W M, et al. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. *Microb Ecol*, 2013, 65: 371–383
- Zhou J P. Bacterial and fungal diversity and microbial mineral phosphate-solubilizing (MPS) function in weathered rocks from Heshang Cave (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: China University Geosciences, 2018 [周健平. 和尚洞风化岩壁细菌、真菌群落组成特征及解磷微生物研究. 博士学位论文. 武汉: 中国地质大学(武汉), 2018]
- Zu J, Liu S W, Tuo L, et al. Studies on diversity and anti-microbial activity of Actinobacteria isolated from karst caves in Lichuan, Hubei (in Chinese). *Chin J Antibiot*, 2016, 41: 186–195 [祖健, 刘少伟, 庾利, 等. 湖北利川喀斯特洞穴放线菌多样性及抗菌活性研究. *中国抗生素杂志*, 2016, 41: 186–195]
- Dai S J, Guo L, Liu S W, et al. Preliminary study on the diversity and antimicrobial activity of actinomycetes from Shuanghe cave: A case study of Yinhedong and Shanlindong (in Chinese). *Carsol Sin*, 2015, 34: 624–630 [戴素娟, 郭琳, 刘少伟, 等. 双河洞放线菌多样性和抗菌活性的初步研究]

究——以阴河洞和杉林洞为例. 中国岩溶, 2015, 34: 624–630]

- 9 Sarbu S M, Kane T C, Kinkle B K. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 1996, 272: 1953–1955
- 10 Saiz-Jimenez I G C. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiol J*, 1999, 16: 1–8
- 11 Groth I, Vettermann R, Schuetze B, et al. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J Microbiol Methods*, 1999, 36: 115–122
- 12 Cunningham K I, Northup D E, Pollastro R M, et al. Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environ Geol*, 1995, 25: 2–8
- 13 Mangrola A V, Dudhagara P, Koringa P, et al. Shotgun metagenomic sequencing based microbial diversity assessment of Lasundra hot spring, India. *Genom Data*, 2015, 4: 73–75
- 14 Ward N L, Challacombe J F, Janssen P H, et al. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 2046–2056
- 15 Pasic L, KovÄe B, Sket B, et al. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiol Ecol*, 2010, 71: 50–60
- 16 Adetutu E, Thorpe K, Shahsavari E, et al. Bacterial community survey of sediments at Naracoorte Caves, Australia. *IJS*, 2012, 41: 137–147
- 17 De Mandal S, Zothansanga S, Panda A K, et al. First report of bacterial community from a Bat Guano using Illumina next-generation sequencing. *Genom Data*, 2015, 4: 99–101
- 18 Barton H, Taylor N, Kreate M, et al. The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *Int J Speleol*, 2007, 36: 93–104
- 19 Yun Y, Wang H M, Man B Y, et al. The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1955
- 20 Benedicto A, Begg J D, Zhao P, et al. Effect of major cation water composition on the ion exchange of Np(V) on montmorillonite: $\text{NpO}_2^+ - \text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}_2^+ - \text{Mg}_2^+$ selectivity coefficients. *Appl Geochem*, 2014, 47: 177–185
- 21 Shu D, Yue H, He Y, et al. Divergent assemblage patterns of abundant and rare microbial sub-communities in response to inorganic carbon stresses in a simultaneous anammox and denitrification (SAD) system. *Bioresour Technol*, 2018, 257: 249–259
- 22 Magoč T, Salzberg S L. Flash: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2957–2963
- 23 DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 5069–5072
- 24 Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, 2011, 12: R60
- 25 Louca S, Parfrey L W, Doebeli M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 2016, 353: 1272–1277
- 26 Liu J, Zhu S, Liu X, et al. Spatiotemporal dynamics of the archaeal community in coastal sediments: Assembly process and co-occurrence relationship. *ISME J*, 2020, 14: 1463–1478
- 27 Zhou J Z, Deng Y, Luo F, et al. Functional molecular ecological networks. *mBio*, 2010, 1: e00169-10
- 28 Chow C E T, Kim D Y, Sachdeva R, et al. Top-down controls on bacterial community structure: Microbial network analysis of bacteria, T4-like viruses and protists. *ISME J*, 2014, 8: 816–829
- 29 Williams R J, Howe A, Hofmockel K S. Demonstrating microbial co-occurrence pattern analyses within and between ecosystems. *Front Microbiol*, 2014, 5: 358
- 30 Barberán A, Bates S T, Casamayor E O, et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J*, 2012, 6: 343–351
- 31 Lavoie K H, Winter A S, Read K J H, et al. Comparison of bacterial communities from Lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA. *PLoS One*, 2017, 12: e0169339
- 32 Adetutu E M, Thorpe K, Bourne S, et al. Phylogenetic diversity of fungal communities in areas accessible and not accessible to tourists in Naracoorte caves. *Mycologia*, 2011, 103: 959–968
- 33 Tomczyk-Żak K, Zielenkiewicz U. Microbial diversity in caves. *Geomicrobiol J*, 2016, 33: 20–38
- 34 Lepinay C, Mihajlovski A, Tournon S, et al. Bacterial diversity associated with saline efflorescences damaging the walls of a French decorated prehistoric cave registered as a world cultural heritage site. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2018, 130: 55–64
- 35 Hathaway J J M, Garcia M G, Balasch M M, et al. Comparison of bacterial diversity in Azorean and Hawai’ian Lava cave microbial mats. *Geomicrobiol J*, 2014, 31: 205–220
- 36 Spain A M, Krumholz L R, Elshahed M S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *ISME J*, 2009, 3: 992–1000
- 37 Engel A S, Meisinger D B, Porter M L, et al. Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane cave (USA). *ISME J*, 2010, 4: 98–110
- 38 Rossmassler K, Hanson T E, Campbell B J. Diverse sulfur metabolisms from two subterranean sulfidic spring systems. *FEMS Microbiol Lett*,

- 2016, 363: fnw162
- 39 Zhu H Z, Zhang Z F, Zhou N, et al. Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1726
- 40 Hugler M, Menendez C, Schagger H, et al. Malonyl-coenzyme A reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation. *J Bacteriol*, 2002, 184: 2404–2410
- 41 De Mandal S, Chatterjee R, Kumar N S. Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiol*, 2017, 17: 90
- 42 Cañveras J C, Sanchez-Moral S, Soler V. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiol J*, 2001, 18: 223–240
- 43 Kontro M, Lignell U, Hirvonen M R, et al. pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 41: 32–38
- 44 Lewin G R, Carlos C, Chevrette M G, et al. Evolution and ecology of *Actinobacteria* and their bioenergy applications. *Annu Rev Microbiol*, 2016, 70: 235–254
- 45 Song Z Q, Wang L, Liu X H, et al. Diversities of Firmicutes in four hot springs in Yunnan and Tibet (in Chinese). *Biotechnology*, 2015, 25: 481–486, 436 [宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 等. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性. *生物技术*, 2015, 25: 481–486, 436]
- 46 Ivanova A A, Zhelezova A D, Chernov T I, et al. Linking ecology and systematics of acidobacteria: Distinct habitat preferences of the *Acidobacteriia* and *Blastocatellia* in tundra soils. *PLoS One*, 2020, 15: e0230157
- 47 Kuang J L, Huang L N, Chen L X, et al. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *ISME J*, 2013, 7: 1038–1050
- 48 Glockner F O, Fuchs B M, Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3721–3726
- 49 Bowman J P, McCammon S A, Dann A L. Biogeographic and quantitative analyses of abundant uncultivated γ -proteobacterial clades from marine sediment. *Microb Ecol*, 2005, 49: 451–460
- 50 Zhao R, Wang H, Yang H, et al. Ammonia-oxidizing archaea dominate ammonia-oxidizing communities within alkaline cave sediments. *Geomicrobiol J*, 2017, 34: 511–523
- 51 Tetu S G, Breakwell K, Elbourne L D H, et al. Life in the dark: Metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *ISME J*, 2013, 7: 1227–1236
- 52 Zhang S S, Jin Z J, Jia Y H, et al. Comparison of soil bacterial community structures from three soil land-use between karst and non-karst areas under three kinds of land use (in Chinese). *Carso Sin*, 2019, 38: 164–172 [张双双, 靳振江, 贾远航, 等. 岩溶区与非岩溶区3种土地利用方式下土壤细菌群落结构比较. *中国岩溶*, 2019, 38: 164–172]
- 53 Cheng X Y, Yun Y, Wang H M, et al. Contrasting bacterial communities and their assembly processes in karst soils under different land use. *Sci Total Environ*, 2021, 751: 142663
- 54 Kaiser K, Wemheuer B, Korolkow V, et al. Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Sci Rep*, 2016, 6: 33696
- 55 Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40: 2407–2415
- 56 Kang B, Bowatte S, Hou F. Soil microbial communities and their relationships to soil properties at different depths in an alpine meadow and desert grassland in the Qilian mountain range of China. *J Arid Environ*, 2021, 184: 104316
- 57 Yun Y, Cheng X Y, Wang W Q, et al. Seasonal variation of bacterial community and their functional diversity in drip water from a karst cave (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 3932–3944 [云媛, 程晓钰, 王玮琦, 等. 喀斯特洞穴滴水细菌群落组成及其代谢功能的季节性变化. *科学通报*, 2018, 63: 3932–3944]
- 58 Dong H L. Recent developments and future directions of deep biosphere research (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 3885–3901 [董海良. 深地生物圈的最新研究进展以及发展趋势. *科学通报*, 2018, 63: 3885–3901]
- 59 Tuncay T, Dengiz O, Bayramin I, et al. Chemical weathering indices applied to soils developed on old lake sediments in a semi-arid region of Turkey. *Eur J Soil Sci*, 2019, 8: 60–72
- 60 Liu L W, Chen J, Wang H T, et al. An indicator of chemical weathering independent of wind separation: Fe/Mg values in loess acid insoluble materials (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2001, 46: 578–581 [刘连文, 陈骏, 王洪涛, 等. 一个不受风力分选作用影响的化学风化指标: 黄土酸不溶物中Fe/Mg值. *科学通报*, 2001, 46: 578–581]
- 61 Lian B, Yuan D X, Liu Z H. Understanding of the effect of microorganism on karstification in karst ecosystem (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2011, 56: 2158–2161 [连宾, 袁道先, 刘再华. 岩溶生态系统中微生物对岩溶作用影响的认识. *科学通报*, 2011, 56: 2158–2161]
- 62 Zhou J P, Wang H M, Cravotta C A, et al. Dissolution of fluorapatite by *Pseudomonas fluorescens* P35 resulting in fluorine release. *Geomicrobiol J*, 2017, 34: 421–433

- 63 Liu D. Mineral transformations associated with structural Fe(III) reduction in clay minerals by different microbial functional groups (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: China University Geosciences, 2012 [刘邓. 不同厌氧微生物功能群对黏土矿物结构Fe(III)的还原作用及其矿物转变. 博士学位论文. 武汉: 中国地质大学(武汉), 2012]
- 64 Gilbert J A, Steele J A, Caporaso J G, et al. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J*, 2011, 6: 298–308
- 65 Deng Y, Zhang P, Qin Y, et al. Network succession reveals the importance of competition in response to emulsified vegetable oil amendment for uranium bioremediation. *Environ Microbiol*, 2016, 18: 205–218
- 66 Hoek T A, Axelrod K, Biancalani T, et al. Resource availability modulates the cooperative and competitive nature of a microbial cross-feeding mutualism. *PLoS Biol*, 2016, 14: e1002540
- 67 Banerjee S, Kirkby C A, Schmutter D, et al. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biol Biochem*, 2016, 97: 188–198
- 68 Bai J, Li H Y, Zhao Y G. Bacterial distribution at different stations in the Northern Yellow Sea (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49: 343–350 [白洁, 李海艳, 赵阳国. 黄海北部不同站位海洋细菌群落分布特征. *微生物学报*, 2009, 49: 343–350]
- 69 Brewer T E, Handley K M, Carini P, et al. Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium ‘*Candidatus Udaeobacter copiosus*’. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16198
- 70 Zheng Y, Zheng Y M, Zhang L M, et al. Advances in thermoacidophilic methanotrophs from extreme environments (in Chinese). *Acta Ecol Sin*, 2009, 29: 3864–3871 [郑勇, 郑袁明, 张丽梅, 等. 极端环境下嗜热酸甲烷营养细菌研究进展. *生态学报*, 2009, 29: 3864–3871]
- 71 Lian B, Chen Y, Zhu L J, et al. Effect of microbial weathering on carbonate rocks (in Chinese). *Earth Sci Front*, 2008, 15: 90–99 [连宾, 陈烨, 朱立军, 等. 微生物对碳酸盐岩的风化作用. *地学前缘*, 2008, 15: 90–99]
- 72 Zhang X J, Yang C Z, Yang J. The status and prospect of microbial carbonic anhydrase research in karst development (in Chinese). *Chem Bioeng*, 2011, 28: 9–11 [张小菊, 杨翠珍, 杨娟. 微生物碳酸酐酶在岩溶发育中的研究现状及展望. *化学与生物工程*, 2011, 28: 9–11]

补充材料

图S1 广西桂林市新村屯洞不同生境细菌群落基于16S rRNA和FAPROTAX的功能预测结果

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “广西桂林新村屯洞穴细菌群落的生境特异性及网络分析”

Habitat specificity and co-occurrence network of bacterial communities in the Xincuntun Cave, Guilin, Guangxi

Jing Cao¹, Xiaoyu Cheng¹, Zhilin Zeng¹, Ziqi Yang¹, Xiaoyan Liu¹, Hongmei Wang^{1,2*}, Liyuan Ma¹, Xiaolu Lu¹, Chuntian Su³ & Qibo Huang³

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

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

³ Key Laboratory of Karst Dynamics, Ministry of Natural Resources, Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Guilin 541004, China

* Corresponding author, E-mail: wanghmei04@163.com, hmwang@cug.edu.cn

Although karst systems comprise approximately 5%–20% of the Earth's ice-free land surface, only 10% of them have so far been explored. Karst caves are important components of karst systems and represent one of the most unique and poorly understood ecosystems on Earth. They are extreme environments in terms of nutrition deficiency, permanent darkness, and isolation from other ecosystems, and serve as a natural laboratory to study the deep biosphere. Caves are also ideal places to discover microbial dark matter such as microbial biodiversity and novel metabolic pathways and metabolites. Microorganisms in caves have been demonstrated to be involved in the dissolution and formation of minerals, biogeochemical cycles, and degradation of organic matter and thus have a fundamental role in sustaining the cave ecosystems. However, knowledge about microbial distribution, diversity, potential functions, and interactions in subsurface caves has remained limited to date particularly in different niches, which limits the utilization of microbial resources and hampers our understanding of biogeochemical processes in the deep biosphere. To address these issues, bacterial communities from seven different niches including cave wall, weathered crust, loose sediments, biofilms from the wet surface of stalagmite, biofilms from the dry surface of stalagmite, microbial mat on rock surface, and overlying soils in the Xincuntun Cave, Southwest China, were investigated via high-throughput sequencing and bioinformatics. Alpha diversities of bacterial communities significantly differed from one niche to the other. Specifically, bacterial diversity was the highest in the overlying soil, followed by those in weathering crust, sediments, wet surface of stalagmite, cave wall, dry surface of stalagmite, and microbial mat. Bacterial communities were dominated by *Actinobacteria* and *Proteobacteria* and showed high specificity for their niches as indicated by principal coordinates analysis (PCoA) and bacterial indicator groups identified by the linear discriminant analysis effect size (LEfSe) method. *Nitrospira* and *Polycyclovoran* were indicator genera on the dry surface of stalagmite. *Candidatus Udaeobacter*, *Vicinamibacter*, *Bacillus*, and *Longimicrobium* were indicator genera in overlying soils, microbial mat, sediments, and weathering crust, respectively. Redundancy analysis was conducted to investigate the relationship between environmental factors and bacterial communities. Results showed that pH, TOC, and Mg/Si (chemical weathering index) were of significance to construct bacterial communities. The pH had significantly positive association with *Gammaproteobacteria*, *Rokubacteria*, and *Nitrospirae*, whereas it was negatively related with *Actinobacteria*. TOC had a significantly positive correlation with *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Planctomycetes* and negative correlation with *Acidobacteria*. Bacterial interactions among different groups were analyzed via co-occurrence networks. The results indicated a high-modularity network with *Gammaproteobacteria*, *Candidatus Udaeobacter*, and *Thermoleophilia*, being the top-three keystone members, which may contribute to the stability of microbial network. The high proportion of positive links between nodes inferred fundamental cooperation among different microbial groups surviving under the extreme conditions in karst caves. Our results revealed habitat specificity of bacterial communities, microbial interactions, and environmental driving forces for bacterial communities in the Xincuntun Cave, enhancing our understanding of the deep terrestrial biosphere.

bacterial communities, co-occurrence analysis, deep biosphere, karst cave, niche specificity

doi: [10.1360/TB-2021-0021](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0021)