



## 喀斯特洞穴沉积物中可培养固碳和固氮细菌多样性分析

冉光娟<sup>1</sup>, 吴庆珊<sup>1</sup>, 方正<sup>1</sup>, 安妮<sup>1</sup>, 陈秀<sup>1</sup>, 李诗霞<sup>1</sup>, 任萋<sup>1</sup>, 翁庆北<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550001;

2. 黔南民族师范学院生物科学与农学院, 贵州 都匀 558000)

**摘要:** 微生物固碳和固氮作用在生物地球化学循环和能量流动中具有重要作用. 洞穴黑暗和寡营养极端环境中蕴藏丰富独特的微生物资源. 为了解喀斯特洞穴固碳细菌和固氮细菌群落结构组成和多样性, 利用 9 种分离培养基, 分离筛选喀斯特洞穴沉积物固碳细菌和固氮细菌, 并基于 16S rDNA 序列测定, 分析分离菌株的系统发育和多样性. 共分离获得 230 株固碳细菌, 隶属于 3 门、16 属和 64 种, 优势属为假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*). 固碳细菌 Shannon-Wiener 多样性指数为 3.65, Margalef 丰富度指数为 11.58, Pielou 均匀度指数为 0.88. 共分离获得 425 株固氮细菌, 分别属于 3 门、14 属和 68 种, 优势属为假单胞菌属、不动杆菌属和贪铜菌属 (*Cupriavidus*). 固氮细菌 Shannon-Wiener 多样性指数为 3.43, Margalef 丰富度指数为 11.07, Pielou 均匀度指数为 0.81. 此外, 无碳培养基 CFMD 和无氮培养基 NFb 分离获得的菌株多样性最高. 以上结果表明, 荔波喀斯特洞穴沉积物中存在丰富的固碳和固氮细菌类群, 这些结果为进一步研究固碳和固氮微生物在喀斯特洞穴生态系统中的功能以及农业应用提供了菌种资源.

**关键词:** 喀斯特洞穴; 可培养; 固碳细菌; 固氮细菌; 多样性

中图分类号: Q939.1 文献标志码: A 文章编号: 0258-7971(2024)02-0379-13

碳循环和氮循环是生态系统中最重要物质循环之一. 固碳和固氮微生物一直以来是农业菌种资源利用关注的重点, 作为主要的初级生产者, 对不同生态系统的碳和氮支配起着积极而重要的作用<sup>[1]</sup>. 碳循环包括碳固定、甲烷代谢和碳降解等多个重要代谢过程<sup>[2]</sup>. 固碳微生物通过吸收 CO<sub>2</sub> 并将其转化成细胞自身物质或者有机物, 不仅为异养生物提供了完成碳循环所需的有机碳, 也为实现“碳中和”提供了一条有前景的新途径<sup>[3-4]</sup>. 氮循环包括固氮、氨化、硝化、反硝化等主要过程<sup>[5-6]</sup>. 固氮微生物通过固氮酶将大气中的气态氮转化为生物可利用氨, 在不同的环境中调节固氮或其它多种促生功能<sup>[7]</sup>.

喀斯特洞穴是指可溶性岩石经喀斯特作用所形成的地下空间, 是石灰岩地区地下水长期溶蚀的

结果<sup>[8]</sup>, 被认为是一种陆地寡营养极端地下生态系统<sup>[9]</sup>. 洞穴内总有机碳质量浓度通常不超过 2 mg/L, 氮源也较匮乏. 尽管如此, 喀斯特洞穴作为一个天然的微生物群体库, 蕴含丰富的微生物资源, 是研究微生物多样性的天然实验室. 据报道每克洞穴沉积物平均含 10<sup>6</sup> 个微生物<sup>[10]</sup>. 洞穴微生物通过促进碳酸盐矿物的生物风化或加速碳酸钙沉淀促进洞穴形成, 并在洞穴元素循环中起着重要作用<sup>[11]</sup>. 由于黑暗和贫营养, 洞穴微生物通过固碳和固氮等代谢途径来获取营养和能量. 随着宏基因组学测序的快速发展, 使用免培养技术研究洞穴环境中微生物的组成及其代谢功能, 结果表明洞穴中含有固碳固氮微生物类群<sup>[10]</sup>. 有研究表明, 湖北省长阳县和尚洞固碳细菌类群包含变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和浮霉菌门 (*Planctomycetes*)

收稿日期: 2023-08-28; 接受日期: 2023-12-05; 网络出版日期: 2024-02-02

基金项目: 国家自然科学基金委-贵州省喀斯特科学研究中心联合基金(U1812401); 贵州省科技创新人才团队[黔科合平台人才(2019)5617号]; 贵州省优秀青年科技人才[黔科合平台人才(2019)5655号].

作者简介: 冉光娟(1995-), 女, 贵州人, 硕士生, 主要研究微生物资源开发利用. E-mail: 2711547348@qq.com.

\*\* 通信作者: 翁庆北(1975-), 女, 贵州人, 博士, 教授, 主要研究环境资源微生物. E-mail: wengqb@126.com.

等<sup>[12]</sup>. 对葡萄牙亚述尔群岛 Terceira 熔岩洞穴分析揭示了弗兰克氏菌属(*Frankia*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)以及其它未培养细菌等包含固氮基因 *nifH*, 推测这些微生物对洞穴氮固定起着一定的作用<sup>[13]</sup>. 洞穴中细菌通过特殊的碳代谢和氮代谢途径以适应洞穴环境, 并对洞穴的碳氮循环起着重要的作用. Zhu<sup>[10]</sup>从贵州遵义的洞穴岩石、水体和沉积物样品中共分离 3 562 株细菌, 包括 102 属 329 种(含 14 个新描述种), 其中 KEGG 通路预测含有一氧化碳氧化基因, 通过碳代谢为洞穴提供碳源. 同时, 也检测到大量的氮代谢相关基因, 显示出微生物具有固氮的潜力, 超过 50% 的分离菌株具有硝酸盐还原的潜力, 并获得了一株新的可培养固氮细菌 *Azospirillum cavernae*. Wischer 等<sup>[14]</sup>从 Movile 洞穴中分离获得了能够使用一碳化合物的细菌, 这种细菌被认为是该群落的主要初级生产者之一. 研究洞穴固碳固氮细菌资源, 对研究洞穴生态系统的碳和氮循环具有重要意义. 但尽管如此, 迄今对喀斯特洞穴生态系统的认识以及洞穴微生物的发掘应用仍较有限<sup>[15]</sup>.

由于海洋、湖泊、土壤、河流等自然环境中营养物质远远低于实验室细菌的培养条件, 在寡营养条件下筛选获得功能性微生物正逐步成为生物治理领域的研究热点<sup>[16]</sup>. 本研究以中国西南地区贵州省荔波县的喀斯特洞穴沉积物为研究对象, 通过无碳无氮筛选培养基分离固碳细菌和固氮细菌, 阐明寡营养喀斯特洞穴生境中固碳细菌和固氮细菌的多样性和群落结构组成, 并为洞穴细菌资源的开发和利用提供菌种资源.

## 1 材料与方法

**1.1 样品采集** 洞穴石笋沉积物样品于 2020 年 8 月采集于贵州省黔南布依族苗族自治州荔波县的 6 个喀斯特洞穴, 采集信息见表 1. 洞穴海拔用 GPS

定位仪(eTrex Venture)测定; 温、湿度用温湿度计(JWSA2-2 型, 北京亚光仪器有限责任公司)测定. 按照洞穴深度, 每个洞穴在无光区每间隔 3~10 m 采集 5~8 份样品, 混合后作为各洞穴试验样品. 样品用无菌牛皮纸袋收集后低温带回实验室 4 °C 保藏备用.

**1.2 分离培养基** 参照文献, 利用 5 种无碳无机培养基(carbon free medium, CFM) CFMA<sup>[17]</sup>、CFMB<sup>[17]</sup>、CFMC<sup>[18]</sup>、CFMD<sup>[19]</sup>和 CFME<sup>[20]</sup>分离固碳细菌. 利用 4 种无氮培养基包括 LGI 培养基(LGI medium)<sup>[21]</sup>、无氮苹果酸钠培养基(nitrogen-free malate medium, Nfb)<sup>[22]</sup>、阿须贝氏培养基(Ashby medium, Ashby)<sup>[23]</sup>和改良无氮培养基(modified nitrogen-free medium, MNF)<sup>[24]</sup>分离固氮细菌.

**1.3 样品处理及固碳固氮菌株的分离** 称取 30 g 研磨后的样品置盛有 270 mL 无菌水的锥形瓶中, 180 r/min 震荡 20 min, 悬浮液以 10 倍梯度稀释 3 次后, 涂布分离培养基, 25 °C 恒温培养. 挑取不同菌落形态单菌落, 纯化后, 置斜面 4 °C 低温保藏或加入 20% 甘油-80 °C 冷冻保存.

## 1.4 菌株鉴定

**1.4.1 菌株基因组 DNA 提取** 挑取单菌落置相应的 5 mL 液体培养基中, 25 °C 180 r/min 震荡培养过夜, 12 000 r/min 离心 2 min. 菌体沉淀参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)说明书提取菌株基因组 DNA. 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

**1.4.2 菌株 16S rRNA 基因的扩增、测序和分析** 以菌株 DNA 为模板, PCR 扩增 16S rDNA. PCR 反应条件为 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 再延伸 7 min. 通用引物序列为 27F(5'-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGYTACCTTGT TACGA CTT-3'). PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测

表 1 样品采集信息

Tab. 1 Sample collection information

洞穴	温度/°C	相对湿度/%	地理坐标	海拔/m
JH洞(JH)	16.5	91	25°26'26"N, 107°47'18"E	850
WM洞(WM)	19.0	79	25°31'6"N, 107°40'0"E	850
SC洞(SC)	20.0	78	25°26'10"N, 107°47'22"E	840
A洞(A)	19.0	75	25°24'56"N, 107°52'32"E	844
B洞(B)	18.5	80	25°32'17"N, 107°38'7"E	839
C洞(C)	17.0	71	25°32'6"N, 107°40'15"E	933

序. 获得序列上传到 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 数据库进行比对, 相似度小于等于 98.65% 的为潜在新种<sup>[25]</sup>. 利用 MEGA 7.0 软件通过邻接法构建系统发育树.

**1.5 多样性分析** 使用 Shannon-Wiener 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Pielou 均匀度指数对细菌群落多样性进行分析<sup>[26]</sup>, 利用 SPSS 20.0 软件单因素方差进行统计分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 喀斯特洞穴可培养固碳细菌群落结构及多样性分析

2.1.1 喀斯特洞穴可培养固碳细菌群落结构分析 分离共获得 230 株固碳细菌(表 2). 16S rDNA 序列相似性比对分析表明, 分离菌株隶属 3 门、5 纲、10 目、11 科、16 属、64 种. 在门水平上, 变形菌门(*Proteobacteria*) 为优势菌门, 占比 76.09% (175/230), 其次为拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 15.65%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 8.26%). 在属水平上, 假单胞菌属(*Pseudomonas*) 为优势属, 占比 47.39%, 其次为不动杆菌属(*Acinetobacter*, 20.00%) 和黄杆菌属(*Flavobacterium*, 15.65%). 固碳细菌分离种类及菌株数量如表 3 所示. 基于 16S rDNA 序列构建的各代表菌株系统发育树见图 1.

变形菌门获得菌株包括 3 纲、7 目、8 科、11 属、51 种. 在纲水平上, 优势类群为  $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*, 94.29%). 在属水平上, 优势属为假单胞菌属(62.29%). 在种水平上, 优势种为 *Acinetobacter bohemicus*(14.86%)、*Pseudomonas neuropathica*(9.14%)、*Pseudomonas brassicae*(8.00%) 和 *Acinetobacter oryzae*(6.29%).

拟杆菌门获得菌株 36 株, 均为黄杆菌纲(*Flavobacteria*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*). 优势种为 *Flavobacterium chungangensis*(41.67%), 其次是 *Flavobacterium fluviale*(16.67%)、*Flavobacterium ginsengisoli*(16.67%).

放线菌门获得细菌 19 株, 隶属 1 纲、2 目、2 科、4 属、6 种. 包括节杆菌属(*Arthrobacter*, 52.63%)、红球菌属(*Rhodococcus*, 26.32%)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*, 15.79%) 和拟杆菌属(*Paenarthrobacter*, 5.26%). 优势种为 *Arthrobacter methylotrophus*(42.11%)、*Arthrobacter gyeryongensis*(10.53%)、*Paenarthrobacter nitroguajacolicus*(5.26%)、*Rhodococcus erythropolis*(21.05%)、*Rhodococcus baikonurensis*(5.26%) 和 *Pseudarthrobacter psychrotolerans*(15.79%).

多样性指数分析表明, 洞穴沉积物固碳细菌 Shannon-Wiener 多样性指数为 3.65, Margalef 丰富度指数为 11.58, Pielou 均匀度指数 0.88.

表 2 基于 16S rDNA 序列的喀斯特洞穴固碳细菌代表菌株的近缘菌株

Tab. 2 Closely related strains of representative strains of carbon-fixation bacteria in karst caves based on 16S rDNA sequences

分类	近缘菌株		菌株 编号	分离菌株			GenBank 登录号
	种	登录号 (GenBank)		数量/株	相似度/%	占比/%	
变形菌门	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	KF679797.1	MS33	26	98.92	11.30	OQ195469.1
Proteobacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NR_119113.1	MW9	1	99.40	0.43	OQ195622.1
	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	APOS01000028.1	CJ19	3	98.96	1.30	OQ194045.1
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MG594813.1	MS7	4	98.87	1.73	OQ195378.1
	<i>Acinetobacter oryzae</i>	GU954428.1	MJ34	11	99.08	4.78	OQ195206.1
	<i>Acinetobacter portensis</i>	KX870877.1	CJ37	1	96.65	0.43	OQ194047.1
	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	CDDF01000007.1	CS42	1	99.87	0.43	OQ194058.1
	<i>Aeromonas lusitana</i>	PGCP01000030.1	CS7	1	99.00	0.43	OQ194054.1
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	KJ803869.1	CW33	1	97.99	0.43	OQ552887.1
	<i>Ensifer adhaerens</i>	MF077128.1	MJ3	2	99.37	0.86	OQ195169.1
	<i>Escherichia coli</i>	CP057589.1	MJ5	3	99.93	1.30	OQ195170.1
	<i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	MK240448.1	B613	1	98.26	0.43	OQ194032.1
	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	MF716701.1	CJ11	3	97.41	1.30	OQ194042.1
	<i>Pseudomonas alvanda</i>	CP077080.1	CW4	1	98.10	0.43	OQ194059.1
	<i>Pseudomonas baetica</i>	MT078669.1	MW24	1	99.60	0.43	OQ195624.1
	<i>Pseudomonas brassicae</i>	LC514379.1	MW4	14	99.28	6.08	OQ195568.1
	<i>Pseudomonas brenneri</i>	NR_025103.1	C19	2	99.03	0.86	OQ194036.1

续表 2

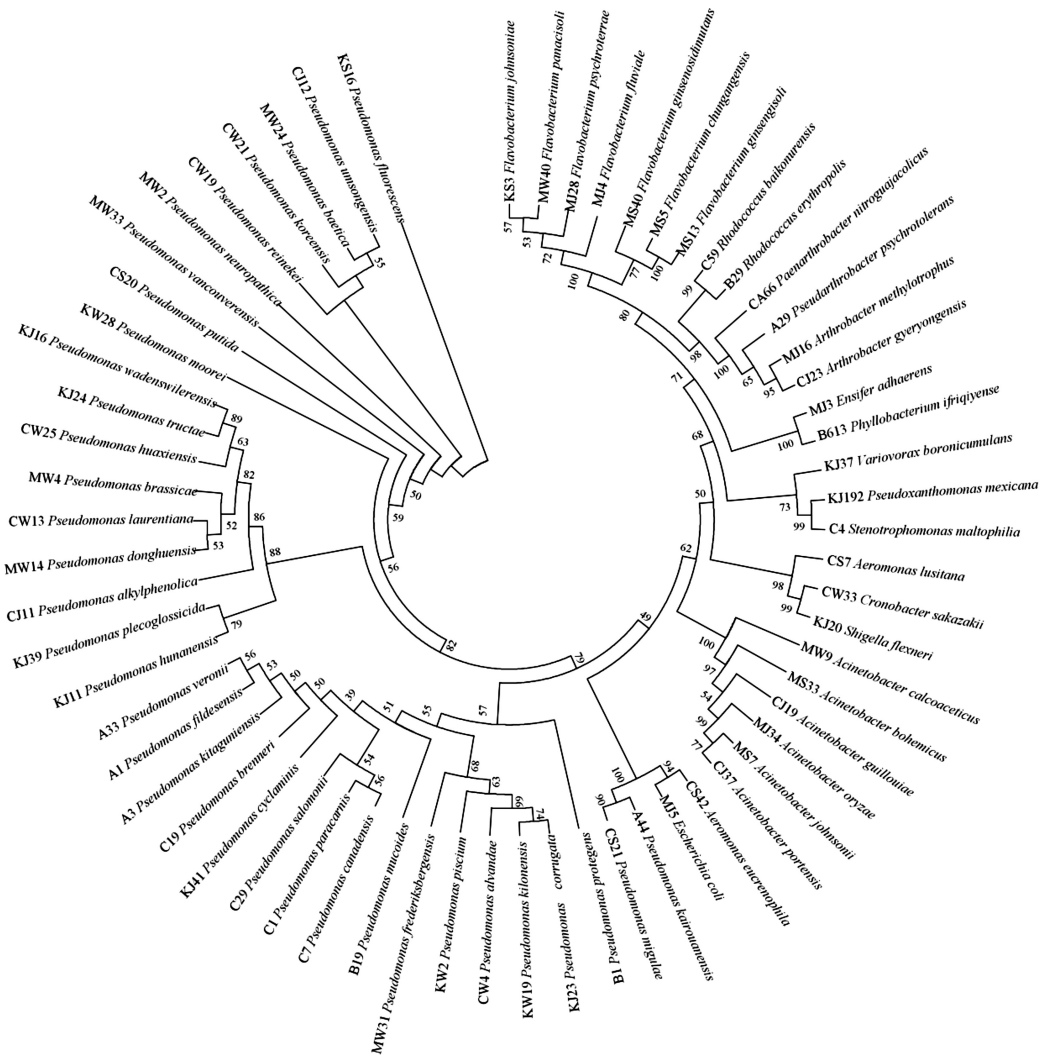
分类	近缘菌株		菌株 编号	分离菌株			GenBank 登录号
	种	登录号 ( GenBank )		数量/株	相似度/%	占比/%	
	<i>Pseudomonas canadensis</i>	NR_156852.1	C7	1	99.93	0.43	OQ194038.1
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	NR_037135.1	KJ23	2	98.44	0.86	OQ195080.1
	<i>Pseudomonas cyclaminis</i>	LC582666.1	KJ41	1	97.92	0.43	OQ195085.1
	<i>Pseudomonas donghuensis</i>	MF170832.1	MW14	8	100	3.47	OQ195623.1
	<i>Pseudomonas fildesensis</i>	NR_170438.1	A1	1	99.15	0.43	OQ193163.1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MK774791.1	KS16	3	99.90	1.30	OQ195093.1
	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	MW391603.1	MW31	6	99.80	2.60	OQ195760.1
	<i>Pseudomonas huaxiensis</i>	MH428812.1	CW25	7	98.29	3.04	OQ194065.1
	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	JX545210.1	KJ11	1	98.64	0.43	OQ195077.1
	<i>Pseudomonas kairouanensis</i>	LR031357.1	A44	2	99.50	0.86	OQ194021.1
	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	MN826556.1	KW19	1	99.60	0.43	OQ195096.1
	<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>	LC500862.1	A3	1	99.43	0.43	OQ193166.1
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MW048888.1	CW21	3	97.98	1.30	OQ194063.1
	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	MG719526.1	CW13	5	96.95	2.17	OQ253476.1
	<i>Pseudomonas moorei</i>	NR_042542.1	KW28	1	99.12	0.43	OQ195097.1
	<i>Pseudomonas migulae</i>	LK391510.1	CS21	2	99.73	0.86	OQ194057.1
	<i>Pseudomonas mucoides</i>	LR797589.1	B19	1	98.54	0.43	OQ194028.1
	<i>Pseudomonas neuropathica</i>	LR797591.1	MW2	16	99.56	6.95	OQ195491.1
	<i>Pseudomonas paracarnis</i>	KX186983.1	C1	1	99.09	0.43	OQ194034.1
	<i>Pseudomonas piscium</i>	LR797558.1	KW2	4	99.00	1.73	OQ195094.1
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	MF716680.1	KJ39	1	98.00	0.43	OQ195084.1
	<i>Pseudomonas protegens</i>	LT906567.1	B1	1	98.89	0.43	OQ194026.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	LC507959.1	CS20	2	98.02	0.86	OQ194055.1
	<i>Pseudomonas reinekei</i>	LT629709.1	CW19	1	98.19	0.43	OQ194061.1
	<i>Pseudomonas tractae</i>	CP035952.1	KJ24	1	99.56	0.43	OQ195083.1
	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	AY972402.1	CJ12	2	98.37	0.86	OQ194044.1
	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	LT629803.1	MW33	9	99.30	3.91	OQ195772.1
	<i>Pseudomonas veronii</i>	OK136201.1	A33	1	99.80	0.43	OQ193171.1
	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i>	NR_157778.1	KJ16	2	98.89	0.86	OQ195078.1
	<i>Pseudomonas salomonii</i>	JX134631.1	C29	1	98.53	0.43	OQ194037.1
	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	MF170831.1	KJ192	1	98.20	0.43	OQ267776
	<i>Shigella flexneri</i>	MT604864.1	KJ20	4	97.08	1.73	OQ195079.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KF818622.1	C4	1	99.08	0.43	OQ194035.1
	<i>Variovorax boronicumulans</i>	NR_041588.1	KJ37	5	99.06	2.17	OQ195082.1
放线菌门	<i>Arthrobacter gyveryongensis</i>	NR_133699.1	CJ23	2	98.20	0.86	OP210298.1
Actinobacteria	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	MG322224.1	MJ16	8	98.98	3.47	OQ195202.1
	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	NR_024784.1	C59	1	99.03	0.43	OQ194039.1
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	MW927175.1	B29	4	99.23	1.73	OQ194029.1
	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	MW578413.1	CA66	1	99.17	0.43	OQ194041.1
	<i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i>	NR_174315.1	A29	3	99.33	1.30	OQ193168.1
拟杆菌门	<i>Flavobacterium chungangensis</i>	NR_165772.1	MS5	15	99.05	6.52	OQ195289.1
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium fluviale</i>	MF991893.2	MJ4	6	97.70	2.60	OQ195168.1
	<i>Flavobacterium ginsenosidimitans</i>	NR_108688.1	MS40	4	97.53	1.73	OQ195490.1
	<i>Flavobacterium ginsengisoli</i>	NR_109024.1	MS13	6	97.09	2.60	OQ195425.1
	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	DQ530073.1	KS3	2	99.19	0.86	OQ195091.1
	<i>Flavobacterium psychroterrae</i>	MH100901.1	MJ28	2	98.09	0.86	OQ195204.1
	<i>Flavobacterium panacisoli</i>	NR_169438.1	MW40	1	98.16	0.43	OQ195777.1



表 3 喀斯特洞穴可培养固碳细菌种类及菌株数

Tab. 3 Types and strains of culturable carbon-fixation bacteria in karst caves

属	种	种类数占比/%	菌株/株	菌株数占比/%
黄杆菌属 ( <i>Flavobacterium</i> )	7	10.93	36	15.65
不动杆菌属 ( <i>Acinetobacter</i> )	6	9.37	46	20.00
假单胞菌属 ( <i>Pseudomonas</i> )	35	54.68	109	47.39
气单胞菌属 ( <i>Aeromonas</i> )	2	3.12	2	0.86
节杆菌属 ( <i>Arthrobacter</i> )	2	3.12	10	4.34
克罗诺杆菌属 ( <i>Cronobacter</i> )	1	1.56	1	0.43
剑菌属 ( <i>Ensifer</i> )	1	1.56	2	0.86
埃希氏杆菌属 ( <i>Escherichia</i> )	1	1.56	3	1.30
拟杆菌属 ( <i>Paenarthrobacter</i> )	1	1.56	1	0.43
叶杆菌属 ( <i>Phyllobacterium</i> )	1	1.56	1	0.43
假节杆菌属 ( <i>Pseudarthrobacter</i> )	1	1.56	3	1.30
假黄色单胞菌属 ( <i>Pseudoxanthomonas</i> )	1	1.56	1	0.43
红球菌属 ( <i>Rhodococcus</i> )	2	3.12	5	2.17
志贺氏菌属 ( <i>Shigella</i> )	1	1.56	4	1.73
寡养单胞菌属 ( <i>Stenotrophomonas</i> )	1	1.56	1	0.43
贪噬菌属 ( <i>Variovorax</i> )	1	1.56	5	2.17



分支上的数值为 1000 次重复抽样检测的自展支持率, 大写字母和数字组合为各代表菌株的编号.

图 1 基于 16S rDNA 序列构建的固碳细菌代表菌株系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of representatives strains of carbon-fixing bacteria constructed based on 16S rDNA sequences

2.1.2 不同培养基分离洞穴固碳细菌比较(表4) 分离固碳细菌 Shannon-Wiener 多样性为 1.98~3.05, 分离菌株优势属均为假单胞菌属、不动杆菌属和黄杆菌属. 利用 CFMD 和 CFME 培养基分离固碳细菌菌株数最多, 分别为 66 株(28.70%)和 65 株(28.26%), 且分离菌株种数最多, 分别为 29 种(45.31%)和 28 种(43.75%). 相比较, CFMB 培养基分离菌株数最少, 为 12 株(5.22%), 包含 8 种(12.50%). 多样性指数分析表明, CFMD 培养基分离的固碳细菌 Shannon-Wiener 多样性指数(3.05)和 Margalef 丰富度指数(6.68)最高; 而 Pielou 均匀度指数最高的是 CFMA 培养基分离的固碳细菌类群, 为 0.97. 此外, 某些属的固碳细菌仅从少数培养基分离获得, 如寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)仅从 CFMA 培养基分离获得, 拟杆菌属(*Paenarthrobacter*)仅从 CFMB 培养基分离获得, 克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)

则仅从 CFMD 培养基分离获得.

## 2.2 喀斯特洞穴可培养固氮细菌群落结构及多样性分析

2.2.1 喀斯特洞穴可培养固氮细菌群落结构分析 分离共获得 425 株固氮细菌(表5). 经 16S rDNA 序列相似性比对分析, 分离固氮菌株分别隶属 3 门、5 纲、9 目、13 科、14 属、68 种. 在门水平上, 变形菌门为优势门类群, 为 420 株, 占比 98.82%, 其次为放线菌门(0.71%)和拟杆菌门(0.47%). 固氮菌株分离结果如表6所示. 在属水平上, 优势属为假单胞菌属(72.70%)、不动杆菌属(15.53%)、贪铜菌属(*Cupriavidus*, 7.53%). 基于 16S rDNA 序列构建的各代表菌株系统发育树见图2.

变形菌门获得菌株 420 株, 包括 3 纲、7 目、10 科、10 属、63 种. 在纲水平上, 优势纲类群为  $\gamma$ -变形菌纲, 为 377 株, 占比 89.76%. 在属水平上, 优势属为假单胞菌属(73.57%). 在种水平上, 获得菌

表 4 不同培养基分离喀斯特洞穴固碳细菌菌株的多样性

Tab. 4 Diversity of carbon-fixation bacteria isolated from karst caves by different media

培养基	菌株数	占比/%	种数	占比/%	Shannon-Wiener 多样性指数	Margalef 丰富度指数	Pielou 均匀度指数
CFMA	27	11.74	22	34.38	2.99	6.37	0.97
CFMB	12	5.22	8	12.50	1.98	2.82	0.95
CFMC	60	26.09	20	31.25	2.59	4.64	0.86
CFMD	66	28.70	29	45.31	3.05	6.68	0.91
CFME	65	28.26	28	43.75	3.01	6.47	0.90

表 5 基于 16S rDNA 序列喀斯特洞穴固氮细菌代表菌株的近缘菌株

Tab. 5 Relatives strains of representative strains of nitrogen-fixing bacteria in karst caves based on 16S rDNA sequences

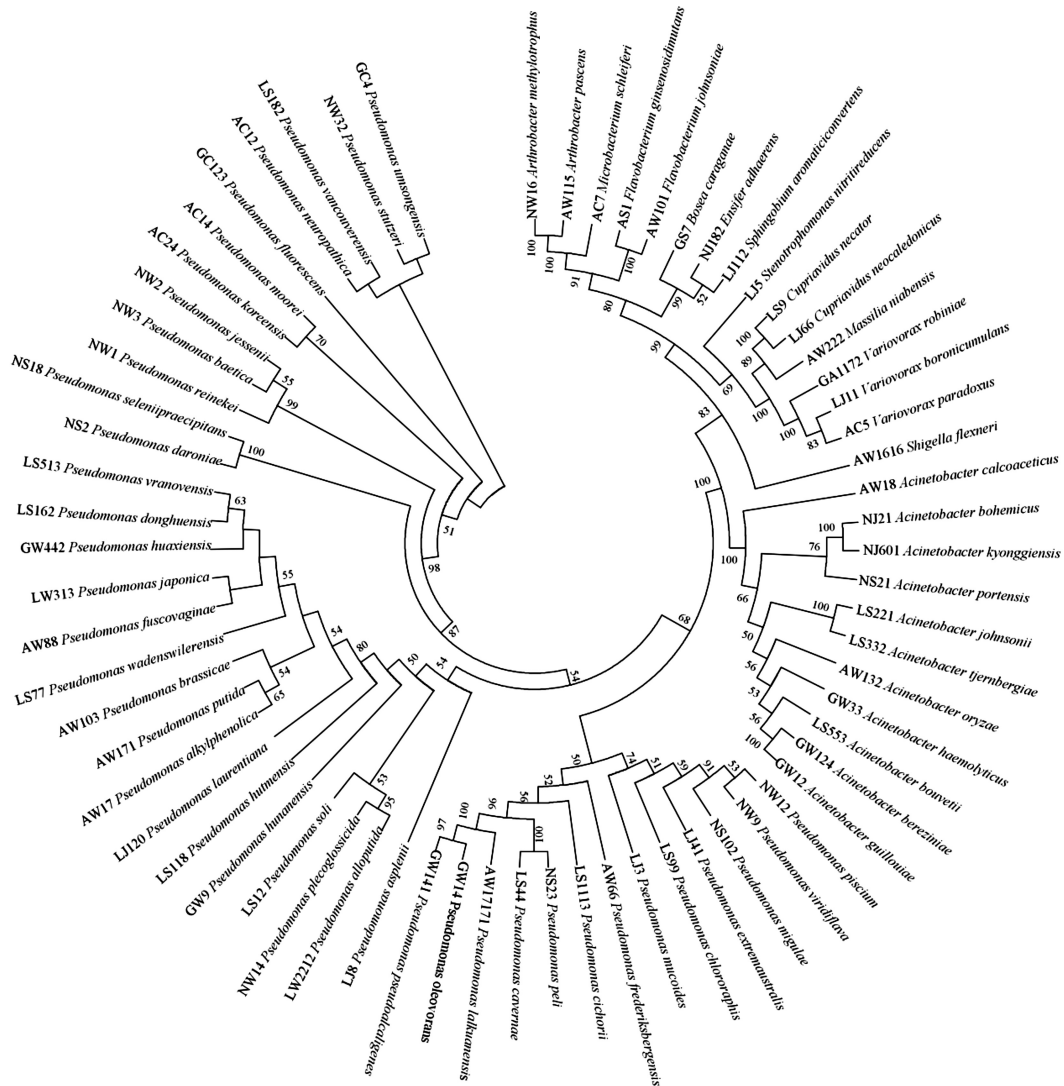
分类	近缘菌株		菌株编号	分离菌株			GenBank 登录号
	种	登录号 (GenBank)		数量/株	相似度/%	占比/%	
变形菌门	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	AIEI01000248.1	GW124	3	99.10	0.70	OQ202076.1
Proteobacteria	<i>Acinetobacter bohemicus</i>	KF679797.1	NJ21	5	99.06	1.17	OQ202110.1
	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	NR_117 628.1	LS553	4	97.65	0.94	OQ202106.1
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NR_119 113.1	AW18	2	98.63	0.47	OQ202049.1
	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	MW468435.1	GW12	30	99.20	7.05	OQ202072.1
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	SJOD01000002.1	GW33	2	99.09	0.47	OQ202077.1
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	KP763485.1	LS221	4	99.50	0.94	OQ202103.1
	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i>	MT323127.1	NJ601	1	98.76	0.23	OQ202113.1
	<i>Acinetobacter oryzae</i>	MW487455.1	AW132	9	99.79	2.11	OQ202058.1
	<i>Acinetobacter portensis</i>	KX870877.1	NS21	2	97.34	0.47	OQ202119.1
	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	KM070562.1	LS332	4	99.58	0.94	OQ202102.1
	<i>Bosea caraganae</i>	MH633716.1	GS7	1	97.46	0.23	OQ202067.1
	<i>Cupriavidus necator</i>	MT845856.1	LS9	31	99.51	7.29	OQ202094.1
	<i>Cupriavidus neocaledonicus</i>	MH699182.1	LJ66	1	98.45	0.23	OQ202091.1
	<i>Ensifer adhaerens</i>	MW391597.1	NJ182	1	98.75	0.23	OQ202111.1
	<i>Massilia niabensis</i>	NR_044571.1	AW222	1	96.59	0.23	OQ202059.1
	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i>	MT072104.1	AW17	39	99.59	9.17	OQ202050.1

续表 5

分类	近缘菌株		菌株编号	分离菌株			GenBank 登录号
	种	登录号 (GenBank)		数量/株	相似度/%	占比/%	
	<i>Pseudomonas alloputida</i>	MW198149.1	LW2212	1	98.95	0.23	OQ202109.1
	<i>Pseudomonas asplenii</i>	NR_040802.1	LJ8	2	98.74	0.47	OQ202082.1
	<i>Pseudomonas baetica</i>	MT078669.1	NW3	6	99.82	1.41	OQ202123.1
	<i>Pseudomonas brassicae</i>	LC514379.1	AW103	61	99.39	14.35	OQ202054.1
	<i>Pseudomonas cavernae</i>	CP032419.1	LS44	1	98.29	0.23	OP210296.1
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	NR_164626.1	LS99	8	99.57	1.88	OQ202096.1
	<i>Pseudomonas cichorii</i>	MK302219.1	LS1113	3	98.36	0.70	OQ202105.1
	<i>Pseudomonas daroniae</i>	MK159357.1	NS2	5	99.43	1.17	OQ202115.1
	<i>Pseudomonas donghuensis</i>	MF170832.1	LS162	12	99.93	2.82	OQ202099.1
	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	MN826583.1	LJ41	1	99.52	0.23	OQ202088.1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KU977128.1	GC123	2	99.30	0.47	OQ202066.1
	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	MT078678.1	AW66	12	99.80	2.82	OQ202052.1
	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	AB638424.1	AW88	1	98.99	0.23	OQ202053.1
	<i>Pseudomonas huaxiensis</i>	MH428812.1	GW442	8	99.30	1.88	OQ202079.1
	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	JX545210.1	GW9	3	99.08	0.70	OQ202073.1
	<i>Pseudomonas hutmensis</i>	NR_165748.1	LS118	5	99.89	1.17	OQ202100.1
	<i>Pseudomonas japonica</i>	MZ571943.1	LW313	5	99.35	1.17	OQ202108.1
	<i>Pseudomonas jessenii</i>	NIWT01000013.1	NW2	3	99.27	0.70	OQ202121.1
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MW048888.1	AC24	2	97.98	0.47	OQ202048.1
	<i>Pseudomonas lalkuanensis</i>	MF943158.1	AW17171	1	98.89	0.23	OQ202061.1
	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	MG719526.1	LJ120	12	99.02	2.82	OQ202093.1
	<i>Pseudomonas migulae</i>	MN704789.1	NS102	3	99.60	0.70	OQ202120.1
	<i>Pseudomonas moorei</i>	NR_042542.1	AC14	4	99.11	0.94	OQ202047.1
	<i>Pseudomonas mucoides</i>	LR797589.1	LJ3	4	99.30	0.94	OQ202081.1
	<i>Pseudomonas neuropathica</i>	LR797591.1	AC12	32	99.22	7.52	OQ202045.1
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	MT102301.1	GW14	5	99.60	1.17	OQ202074.1
	<i>Pseudomonas peli</i>	MT373673.1	NS23	1	98.72	0.23	OQ202118.1
	<i>Pseudomonas piscium</i>	LR797558.1	NW12	19	99.41	4.47	OQ202126.1
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	MH997642.1	NW14	1	99.70	0.23	OQ202127.1
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	KJ586277.1	GW141	2	99.80	0.47	OQ202078.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	AB110608.1	AW171	18	98.81	4.23	OQ202057.1
	<i>Pseudomonas reinekei</i>	LT629709.1	NW1	1	99.89	0.23	OQ202122.1
	<i>Pseudomonas seleniipraecipitans</i>	KT710798.1	NS18	3	99.25	0.70	OQ202116.1
	<i>Pseudomonas soli</i>	MN538257.1	LS12	2	99.09	0.47	OQ202095.1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CP018050.1	NW32	1	99.58	0.23	OQ553653.1
	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	MK883110.1	GC4	1	99.50	0.23	OQ202065.1
	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	LT629803.1	LS182	10	99.72	2.35	OQ202101.1
	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	MZ931317.1	NW9	1	99.89	0.23	OQ202124.1
	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	HQ202845.1	LS513	4	99.55	0.94	OQ202104.1
	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i>	LT009706.2	LS77	4	99.79	0.94	OQ202097.1
	<i>Shigella flexneri</i>	MN746200.1	AW1616	1	98.68	0.23	OQ202060.1
	<i>Sphingobium aromaticiconvertens</i>	AM181012.1	LJ112	1	98.22	0.23	OQ202092.1
	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	NZ_CP016756.1	LJ5	1	96.51	0.23	OQ202080.1
	<i>Variovorax boronicumulans</i>	MT078666.1	LJ11	5	99.89	1.17	OQ202090.1
	<i>Variovorax paradoxus</i>	NR_113736.1	AC5	1	98.51	0.23	OQ195783.1
	<i>Variovorax robiniae</i>	NR_169353.1	GA1172	1	98.15	0.23	OQ202062.1
放线菌门	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	NR_025083.1	NW16	1	97.92	0.23	OQ202129.1
Actinobacteria	<i>Arthrobacter pascens</i>	MF077186.1	AW115	1	99.49	0.23	OQ202056.1
	<i>Microbacterium schleiferi</i>	NR_112003.1	AC7	1	98.44	0.23	OQ202046.1
拟杆菌门	<i>Flavobacterium ginsenosidimitans</i>	NR_108688.1	AS1	1	97.99	0.23	OQ202051.1
Bacteroidetes	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	NR_115473.1	AW101	1	97.93	0.23	OQ202055.1

表 6 喀斯特洞穴可培养固氮细菌种类及菌株数  
Tab. 6 Types and strains of culturable nitrogen-fixing bacteria in karst caves

属	种	种数占比/%	菌株数	菌株数占比/%
不动杆菌属 ( <i>Acinetobacter</i> )	11	16.17	66	15.52
节杆菌属 ( <i>Arthrobacter</i> )	2	2.94	2	0.47
博斯氏菌属 ( <i>Bosea</i> )	1	1.47	1	0.23
贪铜菌属 ( <i>Cupriavidus</i> )	2	2.94	32	7.52
剑菌属 ( <i>Ensifer</i> )	1	1.47	1	0.23
黄杆菌属 ( <i>Flavobacterium</i> )	2	2.94	2	0.47
马赛菌属 ( <i>Massilia</i> )	1	1.47	1	0.23
微杆菌属 ( <i>Microbacterium</i> )	1	1.47	1	0.23
假单胞菌属 ( <i>Pseudomonas</i> )	41	60.29	309	72.70
志贺氏菌属 ( <i>Shigella</i> )	1	1.47	1	0.23
鞘脂菌属 ( <i>Sphingobium</i> )	1	1.47	1	0.23
寡养单胞菌属 ( <i>Stenotrophomonas</i> )	1	1.47	1	0.23
贪噬菌属 ( <i>Variovorax</i> )	3	4.41	7	1.64



分支上的数值为 1000 次重复抽样检测的自展支持率, 大写字母和数字组合为各代表菌株的编号.

图 2 基于 16S rDNA 序列构建的固氮细菌代表菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of representative strains of nitrogen-fixing bacteria constructed based on 16S rDNA sequences



株数占比依次为 *Pseudomonas brassicae*(14.52%)、*Pseudomonas alkylphenolica*(9.29%)、*Pseudomonas neuropathica*(7.62%)、*Cupriavidus necator*(7.38%)、*Acinetobacter guillouiae*(7.14%)。

放线菌门获得菌株 3 株, 隶属 1 纲、1 目、2 科、2 属、3 种。属放线菌纲, 节杆菌属 (*Arthrobacter*, 66.67%) 和微杆菌属 (*Microbacterium*, 33.33%)。包括 *Arthrobacter methylotrophus*(33.33%)、*Arthrobacter pascens*(33.33%) 和 *Microbacterium schleiferi*(33.33%)。

拟杆菌门获得菌株 2 株, 属黄杆菌纲, 黄杆菌属 (*Flavobacterium*)。包括 *Flavobacterium ginsenosidimutans* 和 *Flavobacterium johnsoniae*。

经多样性指数分析表明, 洞穴固氮细菌

Shannon-Wiener 多样性指数为 3.43, Margalef 丰富度指数为 11.07, Pielou 均匀度指数为 0.81。

2.2.2 不同培养基分离固氮细菌多样性比较 由表 7 可知, 4 种无氮培养基分离菌株 Shannon-Wiener 多样性为 2.58~3.13, 优势属均为假单胞菌属。其中, MNF 分离菌株数最多, 为 139 株(32.70%), 包含 26 种(38.23%)。LGI 和 Nfb 培养基分离菌株物种数较高, 分别为 128 株(30.11%)和 100 株(23.53%), 分离菌株分别包含了 32 种(47.05%)和 33 种(48.53%)。Ashby 培养基分离菌株数最少(58 株, 占 13.64%); 包含 23 种(33.82%)。多样性分析表明, 培养基 Nfb 分离的可培养固氮细菌 Shannon-Wiener 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Pielou 均匀度指数均最高, 分别为 3.13、6.95 和 0.90。

表 7 不同培养基分离洞穴固氮菌株的多样性

Tab. 7 Diversity of nitrogen-fixing strains isolated from caves by different medium

培养基	菌株数	占比/%	种数	占比/%	Shannon-Wiener 多样性数	Margalef 丰富度数	Pielou 均匀度指数
MNF	139	32.71	26	38.24	2.58	5.07	0.79
LGI	128	30.12	32	47.06	2.96	6.39	0.85
Ashby	58	13.65	23	33.82	2.73	5.42	0.87
Nfb	100	23.53	33	48.53	3.13	6.95	0.90

一些属的固氮细菌仅从少数培养基上分离获得。如氏菌属仅在 MNF 培养基分离获得, 黄杆菌属、志贺氏菌属 (*Shigella*)、马赛菌属 (*Massilia*) 以及微杆菌属仅在 Ashby 培养基分离获得, 鞘脂菌属 (*Sphingobium*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 仅在 LGI 无氮培养基上分离获得, 剑菌属 (*Ensifer*) 仅在 Nfb 无氮培养基分离获得。

### 3 讨论与结论

细菌在维持洞穴生态系统平衡以及物质循环和能量流动中扮演重要角色<sup>[27]</sup>。喀斯特洞穴的独特环境使得该生态系统拥有独特的微生物资源<sup>[28]</sup>。本研究利用 9 种筛选培养基分离获得 230 株固碳细菌(包括 3 门、16 属、64 种, 25 株潜在新种)和 425 株固氮细菌(包括 3 门、14 属、68 种, 17 株潜在新种), 洞穴中丰富多样的固碳和固氮细菌为今后进一步研究洞穴微生物生理生态作用及农业生产应用提供了菌种资源。

荔波喀斯特洞穴沉积物中固碳细菌具有丰富的多样性, 分离的 230 株固碳细菌隶属 3 门、16 属、

64 种。其中, 变形菌门中的  $\gamma$ -变形菌纲以及假单胞菌属、不动杆菌属和黄杆菌属为固碳细菌优势类群。这些自养型微生物在黑暗洞穴环境中, 可能通过同化二氧化碳, 将其转化成有机物, 作为洞穴生态环境中的初级生产者和公共能量输入者<sup>[29]</sup>, 并通过氧化硫化物<sup>[30]</sup>, 溶解岩石生成碳酸钙晶体<sup>[31]</sup>等作用, 在洞穴环境固碳和碳循环中起重要作用。自养微生物还可以作为生物肥料, 促进植物生长和提高农作物产量<sup>[32]</sup>。

目前, 洞穴中已预测到全部 6 种与微生物固定二氧化碳相关的途径, 包括磷酸乙酰转移酶-乙酸激酶途径、不完全柠檬酸循环、还原性乙酰辅酶 A 循环、3-羟基丙酸循环、还原性三羧酸循环和羟基丁酸循环途径<sup>[33]</sup>。Tebo 等<sup>[34]</sup>研究发现洞穴固碳细菌类群隶属于酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、变形菌门、蓝细菌门 (*Cyanobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*), 其中酸杆菌门和绿弯菌门是优势菌群, 具有丰富的编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (*RubisCO*) 的 I 型和 II 型基因多样性(分别为 *cbbL* 和 *cbbM*) 和 ATP 柠檬酸裂解酶基因 (*acIB*), 表明该洞穴中

微生物的固碳途径主要为卡尔文-本森循环和还原性三羧酸(rTCA)循环途径. Ortiz 等<sup>[35]</sup>通过宏基因组和固碳基因分析表明, Kartchner 碳酸盐洞穴沉积物中碳固定相关的细菌门类包括变形菌门、硝化螺杆菌门(Nitrospirae)、放线菌门和绿弯菌门, 其中变形菌门为优势门类群. 变形菌门和拟杆菌门是寡营养、有机碳含量少的喀斯特河流生态系统中的主要固碳微生物类群<sup>[36]</sup>. 而岩溶地区土壤则为变形菌门中的  $\alpha$ -变形菌纲和  $\beta$ -变形菌纲<sup>[37]</sup>. 纯培养和宏基因组分析表明, 不同喀斯特洞穴环境固碳细菌类群结构组成不同, 一方面由于不同洞穴地球化学组成以及所用分离培养基不同等原因所致; 另一方面也进一步表明洞穴及寡营养环境中微生物可能尚存在较多的未培养细菌.

由于洞穴生态系统氮源十分匮乏, 微生物通过固氮作用获取氮源, 从而维持洞穴生态系统功能稳定<sup>[38]</sup>. 荔波喀斯特洞穴沉积物 425 株固氮细菌隶属 3 门 14 属 68 种, 其中包括 17 株潜在的新菌.  $\gamma$ -变形菌纲, 假单胞菌属、不动杆菌属和贪铜菌属为优势类群. 具有固氮功能的微生物分布在 60 余属<sup>[39]</sup>. 变形菌门是土壤中氮循环参与度最高的细菌类群<sup>[40]</sup>, 在农田生态系统尤其在缺乏共生固氮(SNF)的自然和农业生态系统中, 变形菌门固氮细菌类群是氮的关键自然来源, 也是潜在的细菌生物肥料, 在植物营养和土壤生物肥力方面具有广泛应用<sup>[41]</sup>. 已有报道表明其不仅为植物根际土壤<sup>[42]</sup>中优势固氮菌群, 也广泛存在于营养贫乏、有机碳和氮含量少的尾矿<sup>[43]</sup>, 并与固氮、反硝化作用等氮代谢过程密切相关<sup>[44]</sup>.

一直以来, 由于采样、实验室分离和培养条件等原因, 微生物分离培养仍有局限性. 利用多种寡营养培养基和改良微生物培养基, 如添加细胞复苏因子、解毒物质以及微量元素等, 将有助于提高固碳和固氮微生物的可培养性<sup>[45]</sup>. 本研究采用无机或有机碳含量较低的分培养基, 能较好地筛选栖息于洞穴等寡营养环境的微生物<sup>[46]</sup>. 此外, LGI、Nfb、MNF 等 3 种培养基中含有钼酸钠和铁离子, 而钼离子和铁离子是组成 *nifD* 和 *nifK* 基因编码的钼铁蛋白和 *nifH* 基因编码的铁蛋白构成的固氮酶复合物的必需元素<sup>[47]</sup>, 有利于洞穴寡营养环境固氮酶微生物筛选<sup>[48]</sup>. 进一步将宏基因组、宏代谢组等分子生物学方法和纯培养相结合, 将更加准确评价和发掘洞穴生态环境中固碳和固氮微生物的组

成和多样性.

## 参考文献:

- [1] Vikram S, Guerrero L D, Makhalyane T P, et al. Metagenomic analysis provides insights into functional capacity in a hyperarid desert soil niche community[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1 875-1 888. DOI: 10.1111/1462-2920.13088.
- [2] Crowther T W, Thomas S M, Maynard D S, et al. Biotic interactions mediate soil microbial feedbacks to climate change[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(22): 7 033-7 038. DOI: 10.1073/pnas.1502956112.
- [3] Hugler M, Sievert S M. Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic carbon fixation in the ocean[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2011, 3(2): 261-289. DOI: 10.1146/annurev-marine-120709-142712.
- [4] 胡贵鹏, 宋伟, 高聪, 等. 异养微生物固定 CO<sub>2</sub> 的合成生物学研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1 339-1 350. DOI: 10.13345/j.cjb.210627. Hu G P, Song W, Gao C, et al. Advances in synthetic biology of CO<sub>2</sub> fixation by heterotrophic microorganisms[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1 339-1 350.
- [5] Dixon R, Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(8): 621-631. DOI: 10.1038/nrmicro954.
- [6] 孙许超, 郭彦海, 张士兵, 等. 生活垃圾焚烧厂周边土壤硝化和反硝化功能基因分布特征及影响因子 [J]. *生态环境学报*, 2018, 27(2): 373-380. DOI: 10.16258/j.cnki.1674-5906.2018.02.023. Sun X C, Guo Y H, Zhang S B, et al. Investigation of distribution characteristics of nitrification and denitrification functional genes in soils surrounding a municipal solid waste incineration plant and the relevant influence factors[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2018, 27(2): 373-380.
- [7] 王加龙, 刘驰, 雷丽, 等. 非共生固氮菌及其固氮作用 [J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2 861-2 878. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20210697. Wang J L, Liu C, Lei L, et al. Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria and their nitrogen fixation potential: A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2 861-2 878.
- [8] Duan Y F, Li M, Xu K W, et al. Protect China's karst cave habitats[J]. *Science*, 2021, 374(6568): 699. DOI: 10.1126/science.abm5389.
- [9] Biagioli F, Coleine C, Piano E, et al. Microbial di-

- iversity and proxy species for human impact in Italian karst caves[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 689-699. DOI: [10.1038/s41598-022-26511-5](https://doi.org/10.1038/s41598-022-26511-5).
- [10] Zhu H Z, Zhang Z F, Zhou N, et al. Bacteria and metabolic potential in karst caves revealed by intensive bacterial cultivation and genome assembly[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(6): e02440-20. DOI: [10.1128/AEM.02440-20](https://doi.org/10.1128/AEM.02440-20).
- [11] 张仕颖,董星凡,王永霞,等.石林喀斯特碳酸钙高效沉积菌的筛选及其沉积条件优化[J].*云南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(3): 568-576. DOI: [10.7540/j.ynu.20170605](https://doi.org/10.7540/j.ynu.20170605).  
Zhang S Y, Dong X F, Wang Y X, et al. Screening efficient calcium carbonate mineralization bacteria from Shilin Karsts and optimization of mineralization conditions[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2018, 40(3): 568-576.
- [12] 云媛,程晓钰,王纬琦,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[J].*科学通报*, 2018, 63(5): 3 932-3 944. DOI: [10.1360/N972018-00627](https://doi.org/10.1360/N972018-00627).  
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[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2018, 63(5): 3 932-3 944.
- [13] Hathaway J J, Sinsabaugh R L, Dapkevicius M L, et al. 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. DOI: [10.1080/01490451.2012.752424](https://doi.org/10.1080/01490451.2012.752424).
- [14] Wischer D, Kumaresan D, Johnston A, et al. Bacterial metabolism of methylated amines and identification of novel methylotrophs in Movile Cave[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(1): 195-206. DOI: [10.1038/ismej.2014.102](https://doi.org/10.1038/ismej.2014.102).
- [15] Bogdan D F, Baricz A I, Chiciudean I, et al. Diversity, distribution and organic substrates preferences of microbial communities of a low anthropic activity cave in North-Western Romania[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 962452. DOI: [10.3389/fmicb.2023.962452](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.962452).
- [16] 张万芹,张永光,房保柱.贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选[J].*微生物学通报*, 2016, 43(5): 955-964. DOI: [10.13344/j.microbiol.china.150897](https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.150897).  
Zhang W Q, Zhang Y G, Fang B Z. Studies on diversity of culturable bacteria in karst cave soil of Xingyi, Guizhou and their protease and amylase activities[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 955-964.
- [17] 郭珺,樊芳芳,王立革,等.固碳微生物菌株的分离鉴定及其固碳能力测定[J].*生物技术通报*, 2019, 35(1): 90-97. DOI: [10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0544](https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0544).
- Guo J, Fan F F, Wang L G, et al. Isolation, identification of carbon-fixing bacteria and determination of their carbon-fixing abilities[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(1): 90-97.
- [18] Kumar M, Morya R, Gnansounou E, et al. Characterization of carbon dioxide concentrating chemolithotrophic bacterium *Serratia* sp. ISTD04 for production of biodiesel[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243(11): 893-897. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.07.067](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.067).
- [19] Bravo D, Braissant O, Cailleau G, et al. Isolation and characterization of oxalotrophic bacteria from tropical soils[J]. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(1): 65-77. DOI: [10.1007/s00203-014-1055-2](https://doi.org/10.1007/s00203-014-1055-2).
- [20] Srivastava S, Bharti R K, Thakur I S. Characterization of bacteria isolated from palaeoproterozoic metasediments for sequestration of carbon dioxide and formation of calcium carbonate[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(2): 1 499-1 511. DOI: [10.1007/s11356-014-3442-2](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3442-2).
- [21] Singh R K, Singh P, Li H B, et al. Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: A comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 220-241. DOI: [10.1186/s12870-020-02400-9](https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9).
- [22] Tang A, Haruna A O, Majid N M A, et al. Potential PG-PR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 442-464. DOI: [10.3390/microorganisms8030442](https://doi.org/10.3390/microorganisms8030442).
- [23] Fang K, Bao Z S, Chen L, et al. Growth-promoting characteristics of potential nitrogen-fixing bacteria in the root of an invasive plant *Ageratina adenophora*[J]. *Peer Journal*, 2019, 7(1): e7 099-e7 120. DOI: [10.7717/peerj.7099](https://doi.org/10.7717/peerj.7099).
- [24] 李方玲,张雅坤,梁立宝,等.石油污染环境中固氮和寡氮营养细菌的分离鉴定及其特性[J].*微生物学报*, 2022, 62(2): 661-671. DOI: [10.13343/j.cnki.wsxb.2021.0294](https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.2021.0294).  
Li F L, Zhang Y K, Liang L B, et al. Identification and characterization of nitrogen-fixing bacteria and oligotrophic-nitrogen bacteria from the polluted petroleum [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 661-671.
- [25] Kim M, Oh H S, Park S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of System-*

- atic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(2): 346-351. DOI: 10.1099/ijs.0.059774-0.
- [26] 茶琦雁, 朵金玲, 周兴奎, 等. 贵州天洞洞穴的细菌群落特征及产酶菌株分析 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2019, 41(2): 390-397. DOI: 10.7540/j.ynu.20180371. Cha Q Y, Duo J L, Zhou X K, et al. Analysis on the community characteristics and enzyme-producing strains of bacteria from Tiandong Cave, Guizhou[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2019, 41(2): 390-397.
- [27] Martin-Pozas T, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, et al. Role of subterranean microbiota in the carbon cycle and greenhouse gas dynamics[J]. Science of the Total Environment, 2022, 831(21): 154 921-154 933. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154921.
- [28] Ai J, Guo J, Li Y, et al. The diversity of microbes and prediction of their functions in karst caves under the influence of human tourism activities-a case study of Zhijin Cave in Southwest China[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2022, 29(17): 25 858-25 868. DOI: 10.1007/s11356-021-177 83-x.
- [29] Reitschuler C, Spötl C, Hofmann K, et al. Archaeal distribution in moonmilk deposits from Alpine caves and their ecophysiological potential[J]. Microbial Ecology, 2016, 71(3): 686-699. DOI: 10.1007/s00248-015-0727-z.
- [30] Zhang Y, Yang Q, Ling J, et al. The diversity of alkane-degrading bacterial communities in seagrass ecosystem of the South China Sea[J]. Ecotoxicology, 2021, 30(9): 1 799-1 807. DOI: 10.1007/s10646-021-02450-1.
- [31] Fang B Z, Salam N, Han M X, et al. Insights on the effects of heat pretreatment, pH, and calcium salts on isolation of rare Actinobacteria from karstic caves[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1 535. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01535.
- [32] Alori E T, Babalola O O. Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2 213-2 225. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02213.
- [33] 曾智霖, 程晓钰, 王红梅, 等. 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, 2023, 48(12): 4 711-4 726. DOI: 10.3799/dqkx.2022.068. Zeng Z L, Chen X Y, Wang H M, et al. Niche specificity and potential functions of microbial communities in karst caves as exemplified by the Panlong Cave in Guilin City, Guangxi Province[J]. Earth Science, 2023, 48(12): 4 711-4 726.
- [34] Tebo B M, Schiffman P, Laurie B, et al. Microbial communities in dark oligotrophic volcanic ice cave ecosystems of Mt. Erebus, Antarctica[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 179-193. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00179.
- [35] Ortiz M, Neilson J W, Nelson W M, et al. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on Speleothem surfaces in Kartchner caverns, AZ[J]. Microbial Ecology, 2013, 65: 371-383. DOI: 10.1007/s00248-012-0143-6.
- [36] Xiang S Z, Li Y Q, Wang W Y, et al. Antibiotics adaptation costs alter carbon sequestration strategies of microorganisms in karst river[J]. Environmental Pollution, 2021, 288: 117 819-117 830. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117819.
- [37] 张双双, 靳振江, 贾远航, 等. 岩溶地区不同土地利用方式土壤固碳细菌群落结构特征 [J]. 环境科学, 2019, 40(1): 412-420. DOI: 10.13227/j.hjcx.201804123. Zhang S S, Jin Z J, Jia Y H, et al. Community structure of CO<sub>2</sub>-fixing soil bacteria from different land use types in karst areas[J]. Environmental Science, 2019, 40(1): 412-420.
- [38] He Z, Gentry T J, Schadt C W, et al. GeoChip: A comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes[J]. The ISME Journal, 2007, 1(1): 67-77. DOI: 10.1038/ismej.2007.2.
- [39] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(5): 263-276. DOI: 10.1038/nrmi-cro.2018.9.
- [40] Nelson M B, Martiny A C, Martiny J B. 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): 8 033-8 040. DOI: 10.1073/pnas.1601070113.
- [41] Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, et al. Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628 379-628 398. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628379.
- [42] 靳希桐, 胡文革, 贺帅兵, 等. 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): 1 600-1 611. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20180591. Jin X T, Hu W G, He S B, et al. Diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms in Salicornia europaea community of Ebinur Lake wetland during different periods[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(8): 1 600-1 611.



- [43] 詹婧, 阳贵德, 孙庆业. 铜尾矿废弃地生物土壤结皮固氮微生物多样性 [J]. *应用生态学报*, 2014, 25(6): 1 765-1 772. DOI: [10.13287/j.1001-9332.20140409.013](https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.20140409.013).  
Zhan J, Yang G D, Sun Q Y. Diversity of nitrogen-fixing microorganisms in biological soil crusts of copper mine wastelands[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(6): 1 765-1 772.
- [44] Kraft B, Tegetmeyer H E, Sharma R, et al. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration[J]. *Science*, 2014, 345(6197): 676-679. DOI: [10.1126/science.1254070](https://doi.org/10.1126/science.1254070).
- [45] 孙创, 王金燕, 张钰琳, 等. 利用改良培养基探究西太平洋海水可培养细菌多样性 [J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): 845-861. DOI: [10.13343/j.cnki.wsxb.20200687](https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20200687).  
Sun C, Wang J Y, Zhang Y L, et al. Exploring the diversity of cultivated bacteria in the Western Pacific waters through improved culture media[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 845-861.
- [46] Johnson D B. Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 81(1): 2-12. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2011.01293.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01293.x).
- [47] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539-554. DOI: [10.1046/j.1462-2920.2003.00451.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00451.x).
- [48] Eady R R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases[J]. *Chemical Reviews*, 1996, 96(7): 3 013-3 030. DOI: [10.1021/cr950057h](https://doi.org/10.1021/cr950057h).

## Diversity of culturable carbon-fixing and nitrogen-fixing bacteria in karst cave sediments

RAN Guangjuan<sup>1</sup>, WU Qingshan<sup>1</sup>, FANG Zheng<sup>1</sup>, AN Ni<sup>1</sup>, CHEN Xiu<sup>1</sup>,  
LI Shixia<sup>1</sup>, REN Lou<sup>1</sup>, WENG Qingbei<sup>1,2\*\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. College of Biology Sciences and Agriculture, Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun 558000, Guizhou, China)

**Abstract:** Microbial carbon fixation and nitrogen fixation play crucial roles in biogeochemical cycles and energy flow in the biosphere. The dark and nutrient-limited environments of caves harbor rich and unique microbial resources. To understand the composition and diversity of carbon-fixing and nitrogen-fixing bacterial communities in karst caves, this study used nine isolation media to selectively culture bacteria from karst cave sediments. Based on 16S rDNA sequencing, the phylogeny and diversity of the isolated strains were analyzed. A total of 230 strains of carbon-fixing bacteria were isolated, belonging to 3 phyla, 16 genera, and 64 species, with dominant genera being *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. The Shannon-Wiener diversity index for carbon-fixing bacteria was 3.65, the Margalef richness index was 11.58, and the Pielou evenness index was 0.88. A total of 425 strains of nitrogen-fixing bacteria were isolated, belonging to 3 phyla, 14 genera, and 68 species, with dominant genera being *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Cupriavidus*. The Shannon-Wiener diversity index for nitrogen-fixing bacteria was 3.43, the Margalef richness index was 11.07, and the Pielou evenness index was 0.81. Additionally, strains isolated on carbon-free medium (CFMD) and nitrogen-free medium (NFb) exhibited the highest diversity. The results indicate the presence of abundant carbon-fixing and nitrogen-fixing bacterial groups in the cave sediments of Libo Karst, providing microbial resources for further research on the functions of these microorganisms in karst cave ecosystems and their potential agricultural applications.

**Key words:** karst cave; culturable; carbon-fixing bacteria; nitrogen-fixing bacteria; diversity