

常凯云,王忠诚,魏晓梦,等.喀斯特石质生境高碳酸酐酶活性微生物筛选与分离[J].中国岩溶,2023,42(6):1202-1212.

DOI: 10.11932/karst20230606

# 喀斯特石质生境高碳酸酐酶活性微生物筛选与分离

常凯云<sup>1,2</sup>,王忠诚<sup>1</sup>,魏晓梦<sup>3</sup>,刘秋梅<sup>2</sup>,赵津<sup>1,2</sup>,赵杰<sup>2</sup>,何寻阳<sup>2</sup>

(1.中南林业科技大学林学院,湖南长沙410004;2.中国科学院亚热带农业生态研究所,亚热带农业生态过程重点实验室,湖南长沙410125;3.西北农林科技大学资源环境学院,陕西咸阳712100)

**摘要:**喀斯特地区存在丰富的碳酸盐岩,是地球上最重要的碳库。碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)是地球上催化反应速率最快的几种酶之一,通过催化CO<sub>2</sub>的水合反应,不仅可以促进碳酸盐岩的风化,还可以通过吸收大气中的CO<sub>2</sub>来固定碳源。本研究目的是遴选喀斯特极度退化生境高CA活性菌株/菌群,探讨其用于喀斯特生态修复的可行性。利用碳酸钙培养基从喀斯特石质生境中分离筛选出产CA的菌株,并进行形态学观察、生理生化鉴定和分子生物学鉴定。通过CA活性的测定确定高CA活性的菌株,并比较单菌与多菌株组合群落的CA活性差异。利用碳酸钙培养基共分离得到产CA菌株6株,分别为耐药黄杆菌(*Flavobacterium resistens*)、食酸代尔夫特菌(*Delftia acidovorans*)、嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)、食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)、洞穴农杆菌(*Agrobacterium cavarae*)、白色杆菌(*Bacillus albus*),其中嗜根寡养单胞菌的CA活性最高,且与其它菌株组合后CA活性均降低,说明产CA微生物的竞争作用可能大于协同作用,且在极度寡营养环境中,该嗜根寡养单胞菌具有较大的应用潜力。

**关键词:**喀斯特;碳酸酐酶;碳循环;极度退化生境;石质生境;生态修复

中图分类号: S154.3 文献标识码: A

文章编号: 1001-4810(2023)06-1202-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## 0 引言

在富钙少土的喀斯特生态系统中,其土壤形成速率非常缓慢,形成1 cm厚的土壤需要0.25万~7.38万年<sup>[1-4]</sup>。微生物分泌的碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)是一种含锌的金属酶,催化加速CO<sub>2</sub>水合作用,促进碳酸盐岩的风化<sup>[5]</sup>,为植物定殖提供土壤基质,产生H<sup>+</sup>也可以促进矿质养分溶出,提高环境营养状况<sup>[6]</sup>,帮助微生物自身和植物在恶劣或极端环境下维持正常的代谢与生长<sup>[7]</sup>。同时,该酶还可以用来吸收大气中的二氧化碳,固定碳源,从而参与喀

斯特动力系统的碳循环过程<sup>[8]</sup>。

CA最早在1933年从牛红细胞中提纯出来,CA是一种与锌离子结合的酶,它催化二氧化碳与水的反应,在异养生物的呼吸中发挥着不可替代的作用。刘再华<sup>[9]</sup>以CA为材料的研究发现,在室内模拟条件下,CA于高CO<sub>2</sub>分压时促进石灰岩溶解,在低氧分压下促进白云岩溶解,溶解速率分别提高10倍和3倍,以此认识到CA在自然界风化作用中的必要性。李为<sup>[10]</sup>利用含有碳酸钙的特殊平板从四种不同的喀斯特生态系统中分离出产碳酸酐酶细菌32株、产碳酸酐酶放线菌25株、产碳酸酐酶真菌7株,证明

基金项目:国家自然科学基金区域联合重点项目(U20A2011);广西“八桂学者”项目

第一作者简介:常凯云(1998—),女,硕士研究生,主要从事微生物生态修复方面的研究。E-mail: 15996063515@163.com。

通信作者:何寻阳(1972—),男,博士,研究员,主要从事土壤微生物生态研究。E-mail: hbpjhn@isa.ac.cn。

收稿日期:2022-11-04

了碳酸酐酶在细菌菌株中广泛存在,且大多数细菌都具有在细胞内产生CA的能力,部分细菌能分泌CA到细胞外,真菌和放线菌也有产生胞内或胞外CA的能力。李为等<sup>[11]</sup>在喀斯特系统中加入细菌胞外碳酸酐酶粗酶液,发现微生物碳酸酐酶能使石灰岩中的导电性离子和钙离子释放总量增加40%以上,结果证明微生物胞外碳酸酐酶是喀斯特动力系统的重要驱动力;室内模拟喀斯特环境条件证实了细菌胞外碳酸酐酶的热稳定性,喀斯特的碱性土壤环境更有利于胞外CA活性的相对稳定。李永双<sup>[12]</sup>从云南建水喀斯特地区桉树、云南松和次生林根际土壤中分离筛选得到高产碳酸酐酶的菌株 *Serratia marcescens*(粘质沙雷氏菌),该菌液提高了土壤的微生物数量、微生物多样性和代谢活性,加速了碳酸盐岩的溶解。易哲等<sup>[13]</sup>从典型喀斯特地貌的重庆金佛山景区的土壤样本分离出高产CA的菌株 *Bacillus sp.* (芽孢杆菌属),因其碳酸酐酶能在10~40℃维持较高活性,pH处于7.0~8.5时活性也较高。分泌CA的微生物除了存在于喀斯特土壤中,在藻体、水样与沉积物表面也广泛存在。邓洁等<sup>[14]</sup>从微囊藻水华群体中筛分出一株高产CA菌 *Pseudomonas fluorescens*(荧光假单胞菌);陈羽<sup>[15]</sup>从会仙喀斯特湿地所采水样中筛分出 *Pseudomonas alcaligenes*(产碱假单胞菌);吕现福<sup>[16]</sup>从重庆丰都雪玉洞和水鸣洞2个洞穴沉积物表面和洞穴滴水中筛分出 *Achromobacter*(无色杆菌属)、*Streptomyces hygroscopicus*(吸水链霉菌属)和 *Bacillus*(芽孢杆菌属)等都具有较高的CA活性。

产CA微生物被认为在退化喀斯特生境修复中有良好的应用前景,然而从良好的生境分离目标菌株对极端环境的适应能力可能比较差,无法发挥预

期效果<sup>[17-18]</sup>。因此,本研究以严重退化的喀斯特石质生境样品为分离源,从中分离出产CA的菌株;通过形态学观察、生理生化鉴定、分子生物学鉴定和CA活性分析,挑选出适应喀斯特极端石质生境的高CA活性菌株,为推进喀斯特退化生境快速修复生物菌肥研发和加快喀斯特石漠化地区岩石土壤化进程奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 分离源样品

研究区位于广西壮族自治区河池市(23°41'—25°37'N, 106°34'—109°09'E),属亚热带季风气候区,年均温16.9~21.5℃。该区域具有典型喀斯特地貌,土壤量少且分布零散,岩石裸露率较高。2021年9—10月,采集区域内极度石漠化地地衣、苔藓下风化物、苔藓层土壤和喀斯特原生林地石生苔藓下风化物这四种不同生境样品,将其保存于保鲜袋中带回实验室进行处理,最后于4℃保存备用。

#### 1.1.2 培养基

碳酸钙琼脂培养基、LB培养基、葡萄糖发酵培养基、V-P反应培养基、固体柠檬酸盐培养基、硝酸盐还原培养基、淀粉水解培养基。组成成分见表1。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

主要试剂:0.01M PBS缓冲液、10% NaOH溶液、2% 氯化铁溶液、甲基红酒精溶液、对氨基苯磺酸、 $\alpha$ -萘胺、冰醋酸、革兰氏碘液、二甲苯、吡啶试剂、

表1 培养基的成分

Table 1 Composition of the culture medium

培养基名称	成分
碳酸钙琼脂培养基	CaCO <sub>3</sub> 50 g、ZnSO <sub>4</sub> 1 μmol、琼脂15 g、蒸馏水1 000 mL
LB培养基	胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 5 g、葡萄糖1 g、蒸馏水1 000 mL
葡萄糖发酵培养基	蛋白胨1 g、NaCl 0.5 g、0.2%溴百里香酚兰1.2 mL、葡萄糖1 g、蒸馏水100 mL
V-P反应培养基	蛋白胨1.5 g、葡萄糖1.5 g、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 g、蒸馏水300 mL
固体柠檬酸盐培养基	柠檬酸钠1 g、硫酸镁0.2 g、NaCl 5 g、NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g、琼脂20 g、1%溴麝香草酚蓝酒精溶液10 mL、蒸馏水1 000 mL
硝酸盐还原培养基	硝酸钾0.2 g、蛋白胨5 g、蒸馏水1 000 mL
淀粉水解培养基	牛肉膏0.5 g、蛋白胨1 g、NaCl 0.5 g、可溶性淀粉0.2 g、琼脂2 g、蒸馏水100 mL

2.5% 戊二醛、无水乙醇、叔丁醇、巴比妥、巴比妥钠。

主要仪器:超微量紫外分光光度计(Nanodrop one, 美国 Thermo);凝胶成像分析系统(G:BOX F3, 英国 SYNGENE);电泳仪(DYY—6D型, 北京六一生物科技有限公司);离心机(5434R, 德国 Eppendorf);pH计(FE28—Standard, 瑞士 METTLER TOLEDO);场发射扫描电子显微镜(SU8010, 日本 HITACHI);MILI—Q 纯水仪(Synthesis A10, 美国 MILLIPORE);超净工作台(SW—CJ—1FD, 苏州净化设备有限公司);恒温摇床(SPH—103B, 上海世平实验设备有限公司);恒温培养箱(XT5116IN, 杭州雪中炭恒温技术有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 产碳酸酐酶菌株分离纯化及筛选

分离源由极度石漠化地地衣、苔藓下风化物、苔藓层土壤和喀斯特原生林地苔藓下风化物各 1 g 混合而成。称取新鲜分离源土壤样品 1 g, 置于 100 ml PBS 缓冲液中, 25 °C 180 rpm 震荡过夜, 以提取土壤微生物, 静置 2 h, 沉淀大颗粒物。取悬浊液, 过 30 μm 孔径的 Whatman 滤纸, 以进一步去除土壤颗粒物。取悬浊液进行梯度稀释, 加入喷雾器中, 向 150 mm 的筛选培养基平板喷雾 1~3 s, 25 °C 恒温倒置培养, 观察平板生长情况, 待菌落明显且未出现明显重叠时取出, 选择不同形态的菌落, 在 90 mm 的碳酸钙培养基上进一步划线纯化。最后划线到 LB 固体培养基并 4 °C 保存备用。

### 1.2.2 菌种鉴定

#### (1) 形态学鉴定

将菌株划线在 LB 固体培养基上, 25 °C 恒温倒置培养 2 d 观察菌落形态。挑取单菌落到 LB 液体培养基扩繁, 培养后吸取 800 μL 菌液 3 000 rpm 离心 3 min, 去上清, 加入 500 μL 0.01 M PBS 缓冲液洗 2~3 次; 在沉淀中加入 2.5% 戊二醛 500 μL, 充分混匀, 4 °C 静置过夜; 3 000 rpm 离心 3 min, 倒掉固定液去上清, 加入 500 μL 0.01 M pH 7.0 PBS 缓冲液洗 2~3 次; 乙醇梯度脱水, 依次将样品浸泡在 50%、75%、90% 的酒精溶液, 每次脱水 10 min, 3 000 rpm 离心 3 min; 将样品浸泡在 100% 无水乙醇中两到三次(每次 10 min)以便彻底除掉样品中残留的水分; 依次将

除过水的样品浸泡在 50%、75%、90% 的叔丁醇溶液各 10 min 左右; 再将样品浸泡在 100% 叔丁醇 2~3 次(每次 10 min)以便彻底除掉样品中残留的无水乙醇; 最后保存在 100% 叔丁醇中送至电镜室, 利用场发射扫描电子显微镜微观观察菌体形态。

#### (2) 生理生化鉴定

糖类分解试验: 将被检菌接种于有葡萄糖发酵培养基中, 接种后要轻摇试管, 防止倒置的小试管进入气泡。再将上述试管置 37 °C 温室中培养 2~3 d。观察颜色变化及小试管中是否有气泡。

V-P 试验: 将被检菌接种于 V-P 反应培养基中, 培养 2~7 d 后, 于培养物中加入 1 mL 10% 的 NaOH, 混匀, 再加入 3~4 滴 2% 氯化铁溶液。数小时后, 培养基表面的下层出现红色者, 为阳性。

甲基红试验: 将被检菌接种细菌于培养基, 在 37 °C 培养 2~7 d 后, 于培养物中加入几滴甲基红酒精溶液(0.1 g 甲基红溶于 300 mL 95% 乙醇中, 加蒸馏水至 500 mL), 如呈红色, 表示阳性。

柠檬酸盐利用试验: 将被检菌接种到固体柠檬酸盐培养基上, 37 °C 下培养 2~4 d, 能利用柠檬酸盐的细菌表现为有细菌生长, 培养基变为蓝色, 不能利用柠檬酸盐的细菌不生长, 培养基不变色。

硝酸盐还原试验: 将被检菌接种于硝酸盐培养基中, 37 °C 培养 1~2 d, 每管中先加入甲试剂(对氨基苯磺酸 0.4 g, 加 5 mol·L<sup>-1</sup> 冰醋酸 50 mL) 0.1 mL, 再加乙试剂(α-萘胺 0.25 g, 加 5 mol·L<sup>-1</sup> 冰醋酸 50 mL) 数滴, 如出现红色, 表示阳性。

淀粉水解试验: 将被检菌划线接种于平板上, 37 °C 左右培养 1~2 d, 生长后取出, 在菌落处滴加革兰氏碘液少许, 能水解淀粉的细菌菌落周围有透明环, 培养基会呈深蓝色。

接触酶试验: 用清洁无菌的细玻棒蘸被检菌少许, 插入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液面下, 有气泡者为阳性。

#### (3) 分子生物学鉴定

用无菌的枪头挑取极少量至少经 3 次划线纯化的单菌落, 洗脱至 30.0 μL 无菌超纯水中(盛放在 PCR 管中)作为模板, 16S 引物采用细菌通用引物 27F 和 1492R。正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-TACGACT TAACCCAATCGC-3'。PCR 反应体系为: 10 × PCR Buffer, 2.5 μL; MgCl<sub>2</sub>, 1.5 μL; dNTP, 2.0 μL; 上下游引物, 各 1.0 μL; Taq 酶, 0.4 μL; 模板 2.0 μL; 用

无菌超纯水补足至 25.0  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预反应 2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s; 55  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$  退火 1.0 min, 反应循环 30 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。反应结束后, 用琼脂糖凝胶电泳检验扩增好的 PCR 产物大小, 将 PCR 产物用 TaKaRa DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化, 将纯化产物委托给奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序分析。

### 1.2.3 碳酸酐酶的粗酶液提取

取目的菌株接种于 LB 液体培养基中摇床培养过夜。培养液 7 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  下冷冻离心去除细胞, 获得各菌株的碳酸酐酶粗酶液。

### 1.2.4 碳酸酐酶活性测定

菌株碳酸酐酶的测定采用电极法<sup>[9]</sup>, 具体是 1 mL 粗酶液加入 2 mL pH=8.2 的巴比妥缓冲液, 加入 2 mL 冷的  $\text{CO}_2$  饱和水(向冰冷的去离子水中充入饱和  $\text{CO}_2$  半小时, pH=3.9 则饱和), 立刻用 pH 计测量 pH 下降一个单位的时间。对照则加入 1 mL 灭活的粗酶液、2 mL 的巴比妥缓冲液、2 mL  $\text{CO}_2$  饱和水。整个实验在低温(冰浴)下进行。计算:  $U = 10(T_0/T - 1)$  式中, T 和  $T_0$  分别代表未灭活和灭活粗酶液 pH 值下降的时间。CA 活性用每毫升单位细胞密度 ( $U\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ ) 表示。

## 1.3 数据处理

对于基因序列, 首先去除引物序列, 然后在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库进行 BLAST 比对。先使用 MEGA6 校准, 然后去除比对序列两端多余的部分, 使序列等长, 然后运用 Neighbor-Joining 法进行系统发育树构建。

使用 Microsoft Excel 和 Origin 2018 整理数据和

画图, 用 SPSS 软件进行统计分析。各处理平均数间的多重比较采用邓肯氏新复极差测验 (Duncan's new multiple range test)。

## 2 结果与分析

### 2.1 产 CA 菌株的筛选

分离源在 25  $^{\circ}\text{C}$ 、碳酸钙固体培养基上生长 4 周, 出现不同形态的菌落, 在碳酸钙固体培养基划线纯化 1 次, LB 固体培养基划线纯化 2 次, 最后筛分出 6 株不同的菌种, 分别编号为: N2、N4、N6、N10、N11 和 N13。在培养基表面滴加 1% 溴麝香草酚蓝指示剂, 菌落周围水解圈未变黄, 所以不是细菌产酸水解造成的(图 1)。

### 2.2 形态学鉴定

菌落在 25  $^{\circ}\text{C}$ 、LB 固体培养基上生长 2 天的形态见图 2、表 2。如 N2、N6 菌落呈黄色、表面光滑且边缘整齐; N4、N10、N11、N13 菌落呈白色、表面光滑, 其中 N4 中央凸起周围扁平、N11 呈水滴状、N13 呈蜡状。挑取单菌落处理后进行扫描电子显微形态观察, 菌株均为杆状(图 3)。

### 2.3 生理生化鉴定

菌株的主要生理生化指标测定结果见表 3。由表可知, 菌株 N2、N4、N6、N11、N13 能够利用葡萄糖为 C 源, 菌株 N10 无法利用; 6 株菌 V-P 反应均为阳性; 菌株 N6 和 N13 甲基红反应为阳性, 其余菌株均为阴性; 菌株 N2、N4、N10 具有硝酸盐还原的特征; 菌株 N6、N13 能够分泌胞外淀粉酶; 菌株 N4 柠檬酸盐反应为阳性, 其余菌株均为阴性; N2、N4、N6、N11 接触酶反应为阳性, 其余菌为阴性。

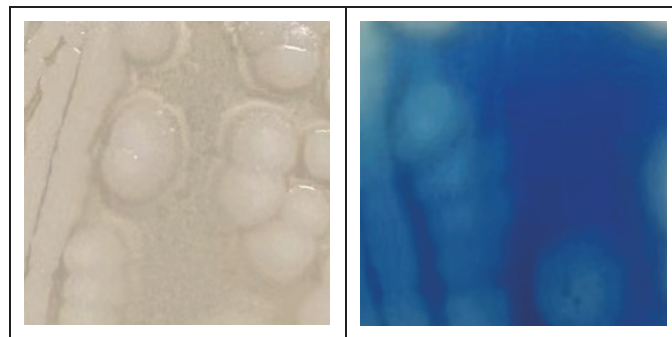


图 1 菌株在碳酸钙固体培养基上的形态

Fig. 1 Strain morphology on the  $\text{CaCO}_3$  solid culture medium

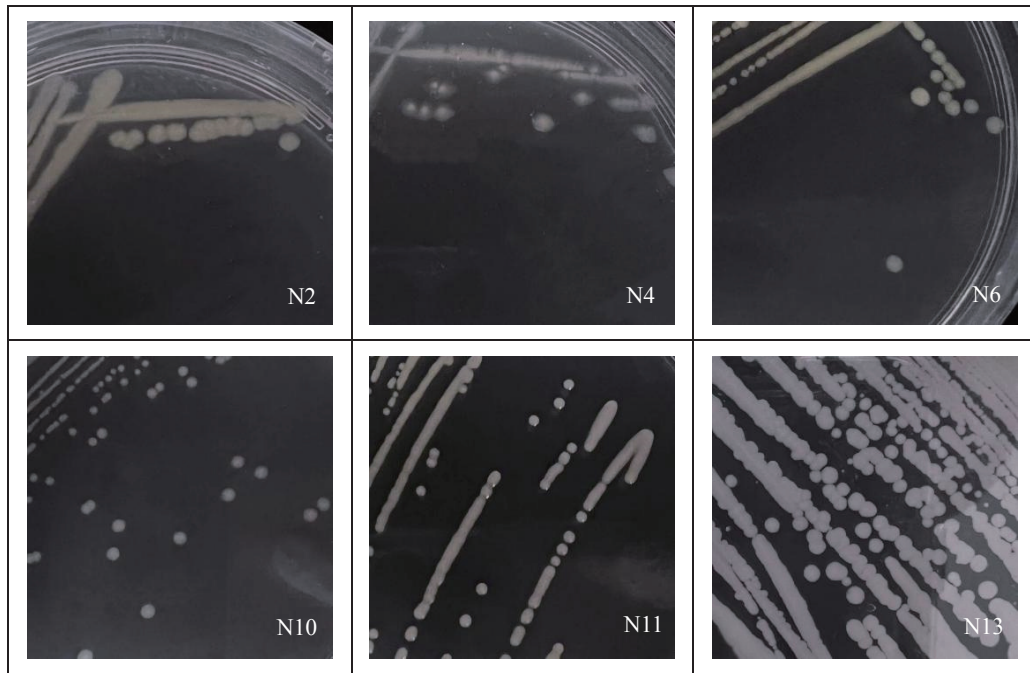


图 2 不同菌种在 LB 固体培养基上的形态比较

Fig. 2 Comparison of different bacteria species on the LB solid culture medium

表 2 不同菌种在 LB 固体培养基上的形态比较

Table 2 Comparison of different bacteria species on the LB solid culture medium

样品编号	菌落形态特征	菌落颜色
N2	表面光滑, 边缘整齐	黄色
N4	表面光滑, 中央凸起周围扁平, 边缘不规则	白色
N6	表面光滑, 边缘整齐	黄色
N10	表面光滑, 边缘整齐	白色
N11	表面光滑饱满, 边缘整齐	白色
N13	表面光滑, 蜡状, 边缘不规则	白色

## 2.4 分子生物学鉴定

对 6 株菌进行 16S rRNA 序列分析(图 4), 用 BLAST 程序将测序结果与 GenBank 中的已登录的序列进行相似性分析, 它们最相似的菌株分别隶属于黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、代尔夫特菌属 (*Delftia*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 同源性均达到 97% 以上。运用 Neighbor-Joining 法对这些菌株序列进行系统发育分析, 初步鉴定 N2 为耐药黄杆菌 (*Flavobacterium resistens*)、N4 为食酸代尔夫特菌 (*Delftia acidovorans*)、N6 菌株为嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*)、N10 菌株为食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*)、N11 菌株为洞穴农杆菌

(*Agrobacterium cavarae*)、N13 菌株为白色杆菌 (*Bacillus albus*)。本研究筛选出的菌株均为细菌, 可能由于细菌、真菌和放线菌胞外酶的最适 pH 分别为 8.2、6.2 和 7.2, 而喀斯特环境富钙偏碱性, 更有利于细菌胞外 CA 活性的表达, 其次是放线菌, 且细菌 CA 活性的峰值明显高于放线菌<sup>[19]</sup>。

## 2.5 不同菌种及菌群的 CA 活性差异

提取了 6 株菌株的粗酶液, 并测定了其碳酸酐酶活性, 结果如图 5 所示。由图 5 可知: 所有菌株均能检测到碳酸酐酶活性, 且个体差异显著。菌株 N6 的碳酸酐酶活性最高, 为  $4.27 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ , 而菌株 N13 的碳酸酐酶活性仅为  $0.46 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ , 这表明虽然碳酸酐酶在原核生物中普遍存在, 但不同细菌的活性特征存在较大差异。在此, 初步选定碳

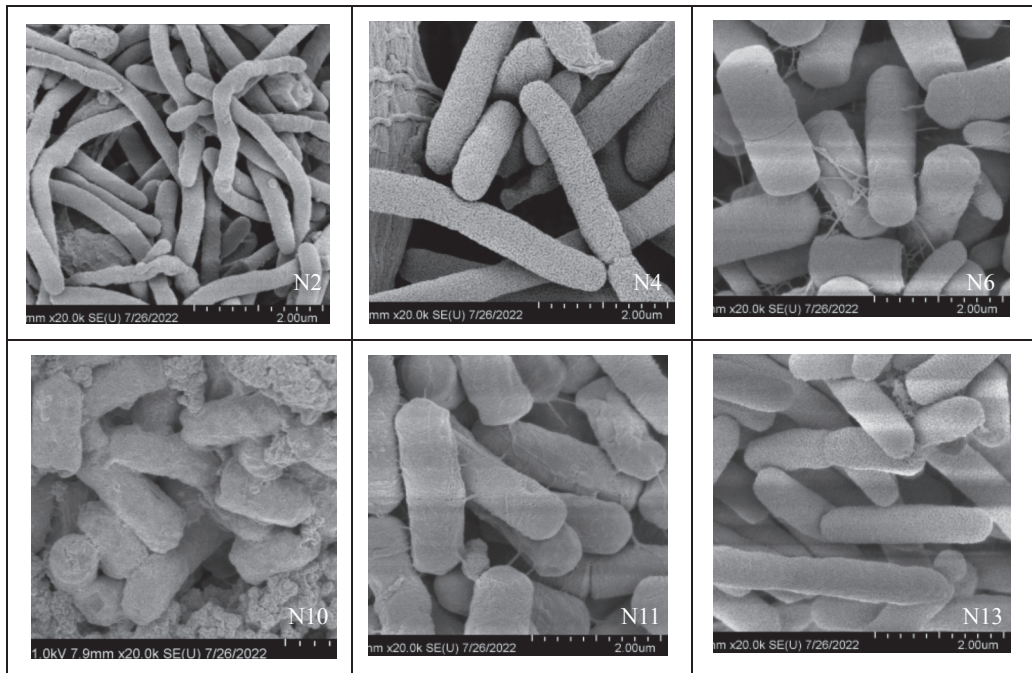


图 3 不同菌种的扫描电子显微图

Fig. 3 Sem micrograph of different bacteria species

表 3 菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strains

样品编号	N2	N4	N6	N10	N11	N13
糖类分解	+	+	+	-	+	+
V-P	+	+	+	+	+	+
甲基红	-	-	+	-	-	+
硝酸盐还原	+	+	-	+	-	-
淀粉水解	-	-	+	-	-	+
柠檬酸盐利用	-	+	-	-	-	-
接触酶	+	+	+	-	+	-

酸酐酶活性最高的菌株 N6 为我们的目的菌株。将目的菌 N6 与其他菌以相同浓度进行组合, 分别为 N6+N2、N6+N4、N6+N6、N6+N10、N6+N11、N6+N13 和 All(N2+N4+N6+N10+N11+N13), 接种于 LB 液体培养基中摇床培养过夜, 分别提取各组合菌群的碳酸酐酶, 测定酶活性。其中纯菌株 N6 的碳酸酐酶活性最高, 与另外 5 株混合活性均降低, 推测由于在极端生境中物种间竞争作用大于协同作用。

### 3 讨论

喀斯特石漠化造成了大量裸露基岩, 导致土壤理化性质较差, 土壤生物群落复杂性较低, 自然恢复过程较慢。在中度和严重干扰后, 土壤条件和土壤

群落可能不再能够维持多样性的植物群落。由于复杂的生存环境, 本土微生物群落的竞争会降低添加微生物的存活效率, 使其难以形成稳定的群落结构, 降低修复效果。本实验以严重退化的喀斯特石质生境样品为分离源, 从中分离出了适应喀斯特极端石质生境的 CA 活性菌株。目前, 对分离筛选的微生物进行分类地位鉴定的常用方法包括传统的分类鉴定方法和分子生物学序列分析的方法。传统的分类鉴定方法是通过形态学观察和生理生化鉴定, 比较分类书中描述的微生物的颜色、形态、质地等形态特征和生理生化特征, 确定微生物的分类地位。缺点是操作复杂、试剂丰富、工作量大、人为误差大。分子生物学序列分析是核酸序列在 NCBI 数据库中进行比对鉴定。由于分子生物学鉴定方法的准确性高,

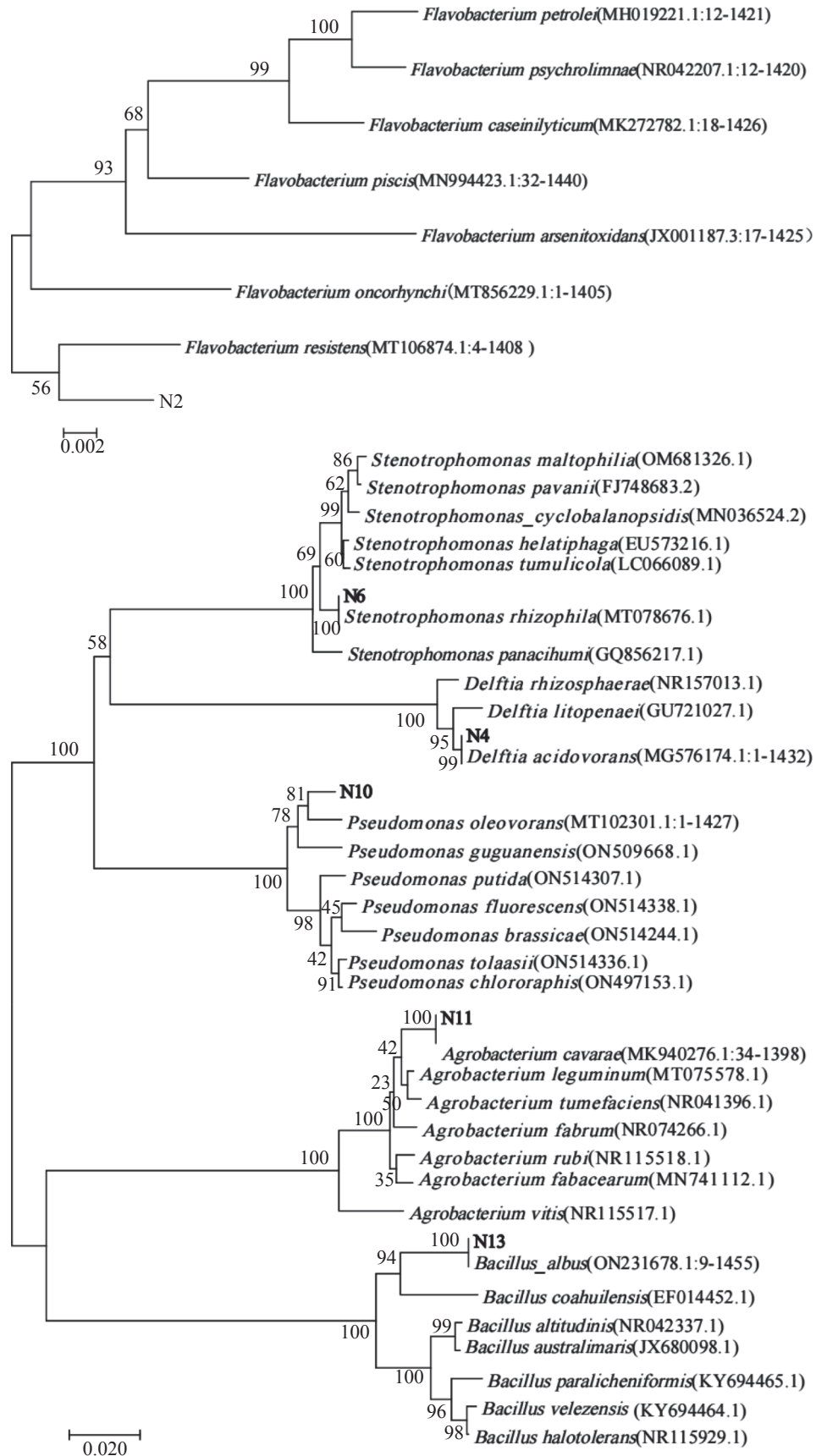


图 4 16SrRNA 基因序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence

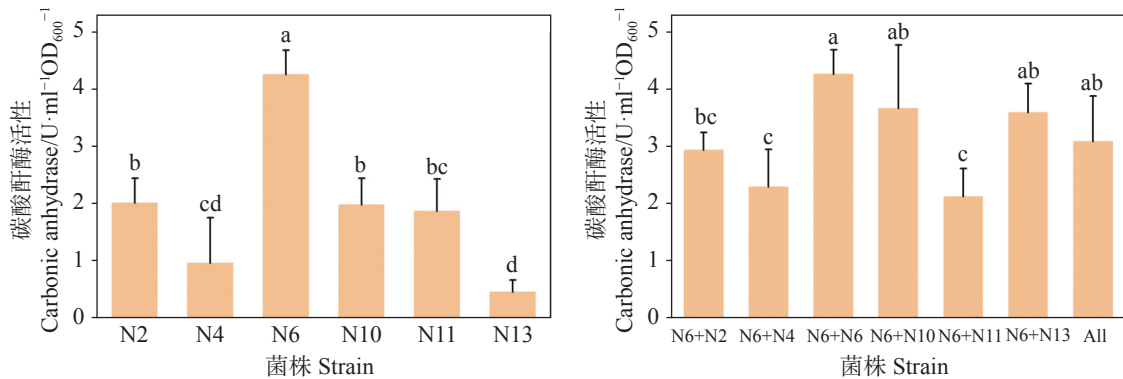


图 5 不同菌种及菌群的碳酸酐酶活性

Fig. 5 CA activity of different bacteria species and microbial communities

操作简单, 结果直接由仪器读取, 因此该方法已成为鉴定微生物分类地位的主要方法之一。本研究通过形态学观察、生理生化分析和分子生物学分析三种方法结合来鉴定适应喀斯特极端石质生境的 CA 活性菌株, 结果较可靠。

在本研究筛选分离出一株高 CA 活性菌为嗜根寡养单胞菌。前人研究发现, 嗜根寡养单胞菌具有水解七叶苷<sup>[20-21]</sup>、同化果糖和 N-乙酰葡萄糖胺、利用海藻糖作为碳源<sup>[22]</sup> 等功能。在盐胁迫条件下, 此菌能够分泌作为渗透保护剂的海藻糖和甘油葡萄糖苷<sup>[23]</sup>, 由于其低分子量高溶解度, 即使在大量积累时也不干扰细胞的生理活动, 对植物的生长具有保护作用。同时, 研究发现, 嗜根寡养单胞菌能够分泌吡啶乙酸, 促进根生长和根毛发育, 促进植物生长<sup>[24]</sup>。因此, 高 CA 活性菌株 N6(*Stenotrophomonas rhizophila*) 通过催化 CO<sub>2</sub> 的水合作用, 可以促进碳酸盐岩的溶解, 加速土壤的形成, 改善基质与岩壁的黏附性, 促进后续定居植被的健康生长, 加速喀斯特地区生态环境的改善和恢复。

碳酸盐岩表面环境恶劣、养分匮乏, 但其上的微生物群落仍然较丰富。Horath 等<sup>[25]</sup> 从阿尔卑斯山白云岩中分离到蓝细菌门、放线菌门、酸杆菌门等 6 个门。唐源<sup>[26]</sup> 对贵州喀斯特地区细菌多样性的研究表明, 从白云岩和石灰岩分离到变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)等 10 个细菌门, 其中变形菌门(Proteobacteria)和蓝菌门(Cyanobacteria)是两种岩石的优势菌门。Tang 等<sup>[27]</sup> 从白云岩和石灰岩中分离到变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacter-

oidetes)以及子囊菌门(Ascomycota), 这些微生物可以生活在碳酸盐岩的这一特殊生境。本研究从喀斯特极端石质生境分离到黄杆菌门(Flavobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 其中变形菌门是石质生境的优势菌门。同一优势菌可从不同的生境分离出, 这其中可能存在一种相似的联系。在本研究中, 筛选分离出一株高 CA 活性嗜根寡养单胞菌与另外 5 株混合培养后 CA 活性均有所降低, 所以喀斯特退化生境恢复过程中是否存在关键的优势菌与嗜根寡养单胞菌 N6 互利共生, 共同促进碳酸盐岩溶解。

## 4 结 论

(1) 从喀斯特石质生境中筛选产 CA 菌株 6 株, 分别为耐药黄杆菌(*Flavobacterium resistens*)、食酸代尔夫特菌(*Delftia acidovorans*)、嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)、食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)、洞穴农杆菌(*Agrobacterium cavarae*)、白色杆菌(*Bacillus albus*), 研究结果为喀斯特极度退化生境生态修复提供了新的菌源。

(2) 嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*) CA 活性最高, 与另外 5 株混合培养后活性均降低, 推测在极端生境中产 CA 微生物的竞争作用可能大于协同作用。在成片岩石裸露、植被破坏严重的极端生境中, 该菌具有较大的应用潜力。

## 参考文献

- [1] 袁道先, 蔡桂鸿. 岩溶环境学[M]. 重庆: 重庆出版社, 1988.
- [2] 王世杰, 季宏兵, 欧阳自远, 周德全, 郑乐平, 黎廷宇. 碳酸盐岩风化成土作用的初步研究[J]. 中国科学(D辑), 1999, 29(5):



- 441-449.
- [3] 曹建华, 袁道先, 潘根兴. 岩溶生态系统中的土壤[J]. *地球科学进展*, 2003, 18(1): 37-44.  
CAO Jianhua, YUAN Daoxian, PAN Genxing. Some soil features in karst ecosystem[J]. *Advance in Earth Sciences*, 2003, 18(1): 37-44.
- [4] 蒋忠诚, 杨德生, 曹建华. 中国水土流失防治与生态安全·西南岩溶卷[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [5] WANG Chenwei, LI Wei, SHEN Taiming, CHENG Wenli, YAN Zhuang, YU Longjiang. Influence of soil bacteria and carbonic anhydrase on karstification intensity and regulatory factors in a typical karst area[J]. *Geoderma*, 2018, 313: 17-24.
- [6] Mailloux Brian J, Alexandrova Ekaterina, Keimowitz Alison R, Wovkulich Karen, Freyer Greg A, Herron Michael, Stolz John F, Kenna Timothy C, Pichler Thomas, Polizzotto Matthew L, Dong Hailiang, Bishop Michael, Knappett Peter S K. Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 2558-2565.
- [7] 吴雁雯, 张金池. 微生物碳酸酐酶在岩溶系统碳循环中的作用与应用研究进展[J]. *生物学杂志*, 2015, 32(3): 78-83.  
WU Yanwen, ZHANG Jinchi. Microbial carbonic anhydrase action and application on carbon cycling in karst dynamic system: A review[J]. *Journal of Biology*, 2015, 32(3): 78-83.
- [8] 蒋忠诚, 章程, 罗为群, 肖琼, 吴泽燕. 我国岩溶地区碳汇研究进展与展望[J]. *中国岩溶*, 2022, 41(3): 345-355.  
JIANG Zhongcheng, ZHANG Cheng, LUO Wei-qun, XIAO Qiong, WU Zeyan. Research progress and prospect of carbon sink in karst region of China[J]. *Carsologica Sinica*, 2022, 41(3): 345-355.
- [9] 刘再华. 碳酸酐酶对碳酸盐岩溶解的催化作用及其在大气CO<sub>2</sub>沉降中的意义[J]. *地球学报*, 2001, 22(5): 477-480.  
LIU Zaihua. The role of carbonic anhydrase as an activator in carbonate rock dissolution and its significance in atmospheric CO<sub>2</sub> precipitation[J]. *Acta Geoscientica Sinica*, 2001, 22(5): 477-480.
- [10] Li Wei, Yu Longjiang, Yuan Daoxian, Wu Yun, Zeng Xiandong. A study of the activity and ecological significance of carbonic anhydrase from soil and its microbes from different karst ecosystems of Southwest China[J]. *Plant and Soil*, 2005, 272(1): 133-141.
- [11] Li Wei, Yu Longjiang, Wu Yun, JIA Liping, Yuan Daoxian. Enhancement of Ca<sup>2+</sup> release from limestone by microbial extracellular carbonic anhydrase[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(4): 950-953.
- [12] 李永双, 范周周, 国辉, 周金星, 彭霞薇. 菌剂添加对不同树种根际土壤微生物及碳酸钙溶蚀的影响[J]. *中国岩溶*, 2020, 39(6): 854-862.  
LI Yongshuang, FAN Zhouzhou, GUO Hui, ZHOU Jinxing, PENG Xiawei. Effects of microorganisms agent addition on soil microbes in different rhizosphere soils and calcium carbonate dissolution[J]. *Carsologica Sinica*, 2020, 39(6): 854-862.
- [13] 易哲, 叶姜瑜, 李大荣, 窦建军, 石玉竹. 喀斯特地貌中碳酸酐酶微生物鉴定与特性研究[J]. *重庆理工大学学报(自然科学)*, 2017, 31(8): 113-119.  
YI Zhe, YE Jiangyu, LI Darong, DOU Jianjun, SHI Yuzhu. Identification and characterization of bacterium with carbonic anhydrase in karst landform[J]. *Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science)*, 2017, 31(8): 113-119.
- [14] 邓洁, 李建宏, 管章玲, 胡碧洋, 赵蕾, 李朋富. 一株产碳酸酐酶附生菌对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生长的影响[J]. *湖泊科学*, 2012, 24(3): 429-435.  
DENG Jie, LI Jianhong, GUAN Zhangling, HU Biyang, ZHAO Lei, LI Pengfu. Effect of attached bacteria of carbonic anhydrase on the growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2012, 24(3): 429-435.
- [15] 陈羽. 会仙岩溶湿地藻与微生物及其碳酸酐酶的碳效应研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2014.  
CHEN Yu. Research on the carbon effects of algae and microorganisms and their carbonic anhydrase in Huixian karst wetland[D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2014.
- [16] 吕现福. 岩溶洞穴微生物群落特征及微生物在碳酸钙沉积中的作用[D]. 重庆: 西南大学, 2018.  
LYU Xianfu. Geomicrobiology of karst cave: Bacterial community and controls on calcium carbonate formation[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [17] Van Elsas J D, Duarte G F, Rosado A S, Smalla K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 32(2): 133-154.
- [18] Kizilkaya Ridvan. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains[J]. *Ecological Engineering*, 2008, 33(2): 150-156.
- [19] 黄芬, 黄艳梅, 高喜, 曹建华. 岩溶环境因子对桂林毛村岩溶区土壤微生物胞外碳酸酐酶活性的影响[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(10): 1792-1797.  
HUANG Fen, HUANG Yanmei, GAO Xi, CAO Jianhua. Effects of karst environmental factors on activity of soil microorganic extracellular Carbonic anhydrase of karst area in Maocun village, Guilin[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(10): 1792-1797.
- [20] Lee Myungjin, Woo Sunggeun, Chae Myoungsoo, Shin Mincheol, Jung Haemin, Ten Leonid N. *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(3): 598-604.
- [21] Ouattara Aboubakar Sidiki, Le Mer Jean, Joseph Manon, Macarie Hervé. Transfer of *Pseudomonas pictorum* Gray and Thornton 1928 to genus *Stenotrophomonas* as *Stenotrophomonas pictorum* comb. nov., and emended description of the genus *Stenotrophomonas*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(6): 1894-1900.
- [22] Palleroni Norberto J, Bradbury John F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980)

- Swings et al. 1983[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 1993, 43(3): 606-609.
- [23] Hagemann Martin, Ribbeck Busch Kathrin, Klähn Stephan, Hasse Dirk, Steinbruch Robert, Berg Gabriele. The plant-associated bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* expresses a new enzyme for the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(17): 5898-5906.
- [24] Suckstorff I, Berg Gabriele. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(4): 656-663.
- [25] Horath Thomas, Bachofen Reinhard. Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the central Alps (Switzerland)[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58: 290-306.
- [26] 唐源, 连宾, 程建中. 贵州喀斯特地区碳酸盐岩表生古菌群落结构及多样性研究: 以南江大峡谷为例[J]. *中国岩溶*, 2017, 36(2): 193-201.
- TANG Yuan, LIAN Bin, CHENG Jianzhong. Archaeal community structure and diversity of the carbonate rocks in karst regions, Guizhou: A case study of the Nanjiang canyon[J]. *Carologica Sinica*, 2017, 36(2): 193-201.
- [27] Tang Yuan, Cheng Jianzhong, Lian Bin. Characterization of endolithic culturable microbial communities in carbonate rocks from a typical karst canyon in Guizhou (China)[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2016, 65(4): 413-423.

## Screening and isolation of carbonic anhydrase-producing microorganisms from rocky karst habitats

CHANG Kaiyun<sup>1,2</sup>, WANG Zhongcheng<sup>1</sup>, WEI Xiaomeng<sup>3</sup>, LIU Qiumei<sup>2</sup>, ZHAO Jin<sup>1,2</sup>, ZHAO Jie<sup>2</sup>, HE Xunyang<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Central South University of Forestry & Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha, Hunan 410125, China; 3. College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Xianyang, Shaanxi 712100, China)

**Abstract** In China, the total area of rocky desertification covers  $1.01 \times 10^7$  hm<sup>2</sup>, accounting for 22.3% of the karst area. Nowadays, rocky desertification has become one of the three major land degradation problems in our country, which has seriously affected our economic development and environmental governance. Naturally, rock weathering in the karst area is so long that it takes from a few decades to a hundred years to form a centimeter thick of red soil. Because the karst area is rich in calcium and barren in soil, ecological restoration of this area is urgent in both rocky desertification control and karst carbon sink. Carbonic Anhydrase (CA), one of the fastest catalyzing enzymes, can promote the weathering of carbonate rocks by accelerating the hydration reaction of CO<sub>2</sub>, thus providing soil matrices for plant colonization. At the same time, CA can also be used to absorb CO<sub>2</sub> in the atmosphere to fix the carbon source, thereby participating in the carbon cycle process of karst dynamic system. The CA-producing microorganisms are considered to have good application prospects in the restoration of degraded karst habitats. However, for the target strains isolated from favorable habitat, their weak adaptability to the extreme environment may constrain them from exerting their expected effects.

In order to select the strain with high CA activity in the extremely degraded karst habitat, CA-producing strains were isolated from the samples of severely degraded rocky karst habitats in this study. The study area is located in Hechi City, Guangxi Zhuang (23°41'–25°37' N, 106°34'–109°09' E). It has a subtropical monsoon climate, with an average annual temperature of 16.9–21.5 °C. The area is typically developed with karst, scattered with thin soil and highly exposed with rocks. From September to October 2021, four different habitat samples were collected, including lichen in the area with extreme rocky desertification weathered materials under moss, soil under moss, and weathered materials under moss in karst native forest. The source of isolation was a mixture of the four different habitat samples, 1g of each. CA-producing strains were isolated and screened from karst rocky habitats by inoculating suspension of isolation source in calcium carbonate medium with a sprayer. The field emission scanning electron microscope was used for morphological identification of the strain. The physiological and biochemical characteristics of the strain were confirmed by carbohydrate decomposition test, V-P test, methyl red test, citrate utilization test, nitrate reduction test, starch hydrolysis test and contact enzyme test. Strains were identified by 16S rRNA sequence analysis. The CA

activity of single strain and mixed strain was determined by electrode method. The sequence alignment was performed in the National Center for Biotechnology Information Database. In MEGA6, Neighbor-Joining method is used to construct the phylogenetic tree. SPSS software was used to analyze whether there were significant differences in CA activity among different strains/microflora.

The results show that six CA-producing strains were isolated by calcium carbonate medium, namely, *Flavobacterium resistens*, *Delftia acidovorans*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Pseudomonas oleovorans*, *Agrobacterium cavarae* and *Bacillus albus*. The CA activity of *Stenotrophomonas rhizophila* was the highest, up to  $4.27 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ , while that of *Bacillus albus* was only  $0.46 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{OD}_{600}^{-1}$ , which indicated that although CA commonly existed in prokaryotes, the activity of different species of bacteria varied greatly. Mixed culturing of *Stenotrophomonas rhizophila* whose CA activity is high with other strains led to a decrease in CA activity, indicating the great potential application of *Stenotrophomonas rhizophila* in the extremely oligotrophic environment.

The results provide a new bacterial source for ecological restoration of extremely degraded karst habitats. However, all the CA activity decreased when the isolated *Stenotrophomonas rhizophila* strain N6 with high CA activity is mixed with other 5 strains. Because of the complex living environment, the competition of indigenous microbial community will reduce the survival efficiency of the added microorganisms, make it difficult to form a stable community structure, and then reduce the repair effect. In restoration of degraded karst habitat, whether there is a kind of dominant bacteria that is symbiotic with *Stenotrophomonas rhizophila* N6 to jointly promote carbonate dissolution is a research focus. Therefore, future studies should identify the core species that drive the restoration of degraded habitats, and explore the relationship between the isolated and culturable CA dominant bacteria and the core species. These study focuses will promote the research and development of biological fertilizer for the rapid restoration of degraded karst habitats.

**Key words** karst, carbonic anhydrase, carbon cycle, extremely degraded habitat, rocky habitat, ecological restoration

(编辑 杨杨)

---

## 《中国岩溶》期刊被 Scopus 数据库收录

近日,中国地质调查局岩溶地质研究所主办的《中国岩溶》期刊通过 Scopus 数据库内容遴选与审查委员会(CSAB)的严格审查,被 Scopus 数据库正式收录!评审专家高度肯定本期刊的办刊宗旨、发文质量和学术影响力。

Scopus 数据库是由爱思唯尔(Elsevier)推出的全球规模最大的文摘和引文数据库,也是全球最具影响力的五大文献检索系统之一。目前收录了全球 11 678 家出版商出版的 36 377 种期刊,其中 34 346 种是顶级学科领域的同行评审期刊,目前收录中文期刊 1 000 余种。数据库内容全面、学科广泛,

覆盖自然科学、技术、工程、医学、社会科学、艺术与人文等众多学科。Scopus 数据库因其功能强大,受到国内外学术界普遍关注,其数据在世界大学排行榜、中国高被引学者榜单、高校学科评估等得到广泛应用。

《中国岩溶》期刊被国际主流数据库 Scopus、DOAJ、CA、EBSCO、JST 等收录,标志着期刊发表文献的学术水平,期刊的标准化、规范化等得到了国际学术界的认可,对岩溶学科发展将产生积极的推动作用。

(供稿:杨杨)