



研究报告

织金洞钟乳石沉积物表面可培养细菌多样性和网络分析

杨珺¹ 董乙义^{1,2} 吴庆珊¹ 方正¹ 牛晓娟¹ 王玉倩¹ 翁庆北^{*1,3}

1 贵州师范大学生命科学学院 贵州 贵阳 550025

2 中国科学院西双版纳热带植物园热带森林生态学重点实验室 云南 勐腊 666303

3 黔南民族师范学院 贵州 都匀 558000

摘要:【背景】洞穴环境中蕴含丰富而独特的细菌资源,对洞穴环境中细菌的分离培养有助于了解洞穴细菌多样性及细菌资源的挖掘和利用。【目的】利用不同培养基分离细菌,探究钟乳石表面可培养细菌的多样性及其种间互作关系。【方法】通过 11 种培养基对织金洞内钟乳石沉积物表面的细菌进行分离纯化,并利用 16S rRNA 基因序列分析初步确定分离菌株的分类地位。在 R 软件下,通过 Bipartite 包分析可培养细菌属间的相互作用。【结果】从钟乳石沉积物表面共分离出 206 株细菌,它们隶属于 4 门 25 属 45 种,香农(Shannon)指数为 4.78,辛普森(Simpson)指数为 0.95。变形菌门(*Proteobacteria*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)分别为样品中可培养细菌的优势门(47.09%)和优势属(29.61%)。无机寡营养培养基有助于洞穴钟乳石沉积物细菌的分离。属水平-采样点网络分析表明,可培养细菌分布具有非随机、显著的嵌套性。芽孢杆菌属(*Bacillus*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)和短杆菌属(*Brevibacterium*)在细菌群落中存在较多的有效合作值(Effective Partners)和亲密度(Closeness),被其他细菌所依赖程度(Species Strength)较高,是该群落中的重要组成类群。【结论】织金洞内钟乳石沉积物表面存在丰富的细菌资源,分析细菌类群在群落中的作用应结合细菌相对丰度和网络分析。

关键词: 钟乳石, 沉积物, 可培养细菌, 多样性, 织金洞, 网络分析, 寡营养

Foundation items: Program on Platform and Talent Development of the Department of Science and Technology of Guizhou Province ([2019] 5617, [2019] 5655); Joint Fund of the National Natural Science Foundation of China and the Karst Science Research Center of Guizhou Province (U1812401)

***Corresponding author:** Tel: 86-854-8737008; E-mail: wengqingbei@gznu.edu.cn

Received: 04-06-2020; **Accepted:** 03-11-2020; **Published online:** 24-02-2021

基金项目: 贵州省科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2019] 5617 号, 黔科合平台人才[2019] 5655 号); NSFC-贵州喀斯特科学研究中心联合基金(U1812401)

***通信作者:** Tel: 0854-8737008; E-mail: wengqingbei@gznu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-04; **接受日期:** 2020-11-03; **网络首发日期:** 2021-02-24

Diversity and network analysis of culturable bacteria on stalactite sediment in Zhijin cave

YANG Jun¹ DONG Yiyi^{1,2} WU Qingshan¹ FANG Zheng¹ NIU Xiaojuan¹
WANG Yuqian¹ WENG Qingbei^{*1,3}

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

2 Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China

3 Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000, China

Abstract: [Background] There are abundant bacterial resources in the cave environment. The isolation and cultivation of bacteria in the cave helps for the understanding bacterial diversity, as well as the exploration and utilization of bacterial resources. [Objective] To isolate the bacteria by using different media, and to explore the diversity and interactions of cultivable bacteria on the stalactite surface in cave. [Methods] Totally, 11 kinds of media were used to isolate and purify the bacteria, then the taxonomic position of the isolates was preliminarily determined by analysis of their 16S rRNA gene sequence. Additionally, bipartite packet was used to analyze the interaction among the culturable bacteria under R environment. [Results] A total of 206 strains of bacteria were isolated from the samples. These bacteria belonged to 45 species of 4 genera and 25 genera in community with the Shannon index of 4.78 and the Simpson index of 0.95. *Proteobacteria* and *Bacillus* are the dominant phylum (47.09%) and genus (29.61%), respectively. The inorganic oligotrophic media were helpful for the isolation of bacteria from stalactite sediments in the cave. Based on genus level-sampling site network analysis shows that the distribution of culturable bacteria has a non-random and significant nestedness community. *Bacillus*, *Devosia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Brevibacterium* with more effective cooperation and closeness in community are highly dependent on other bacteria, and are the key groups in the community. [Conclusion] There are abundant bacterial resources on the surface of stalactite sediments in Zhijin cave. The relative abundance and network analysis of different groups should be combined to determine the role of bacteria in communities.

Keywords: stalactite, sediment, culturable bacteria, diversity, Zhijin cave, network analysis, oligotrophic

喀斯特洞穴是一个由地表水和地下水对可溶性岩石溶蚀等作用所形成的一个相对封闭或半封闭的特殊生态环境^[1]。尽管洞穴内具有空气流动性差、温度较恒定、营养物质缺乏、黑暗无光等特点^[2],但仍蕴藏着大量而独特的细菌资源^[3]。细菌在洞穴生态系统中的能量和物质循环、生物多样性的形成和维持、沉积物的形成和地质化学演变等过程中都发挥着重要作用^[4-9]。因此,对洞穴环境中细菌多样性和资源进行探究具有重要意义。

通过传统分离培养,目前已从海洋沉积物^[10-12]、土壤^[3,13-15]、水体^[3,16-17]和洞穴沉积物^[9]等环境样品中分离到可培养细菌,探讨不同环境下可培养细菌的多样性及其功能活性,但对可培养

细菌间可能存在的相互作用却鲜有报道。网络分析为探讨细菌群落内物种的相互作用提供了新的方法,并利用特定的参数和指标对网络结构进行量化。在微生物群落生态学和细菌代谢通路互作分析等方面的研究中得到了广泛应用^[18-19],例如,细菌群落的代谢通路网络^[20]和可培养细菌的共存模式^[21]。

织金洞独特的地质发育反映了喀斯特洞穴和沉积物的演化历程,洞内钟乳石种类形态丰富,具有极高的观赏价值和科研价值^[22]。目前对织金洞的已有研究包括地质演化形成^[22]、洞穴内环境因子检测^[23-24]以及洞穴水细菌多样性的调查^[17]。钟乳石在一定程度上反映了洞穴环境的地质演变

历程^[25]，但织金洞中钟乳石沉积物细菌多样性的研究尚未见报道。了解钟乳石表面细菌的组成将有助于更好地理解钟乳石和洞穴形成过程中微生物的地球生物化学作用。

本研究以织金洞内钟乳石沉积物为研究对象，通过纯培养结合 16S rRNA 基因序列分析的方法对样品中蕴含的细菌资源进行分离，揭示样品中可培养细菌群落的组成，并分析该群落中物种间的网络相互作用，以期为极端环境中细菌多样性以及它们在喀斯特洞穴中的功能研究提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 样点描述与样品采集

织金洞位于贵州省织金县城东北 21 km 处，处于倚结河下段，地理位置为 26°38'31"–26°52'35"N 和 105°44'42"–106°11'38"E，海拔为 900 m–1 670 m，是典型的暗河型溶洞。已开发长度共计 12.1 km，总面积 70 多万 m²。洞内平均 CO₂ 浓度为 0.20%，平均温度为 18–20 °C，平均湿度为 90%。自 1985 年开发游览以来，游客人数从不足 5 万人次逐渐增至 2015 年的 59.457 1 万人次^[22–24]。

本研究于 2016 年 1 月在织金洞内卷曲石洞(A)、玉兔宫(T)、讲经堂(J)、水乡泽国(S)和雪压青松(X)等 5 个洞厅中采集钟乳石沉积物表面生物样品。用棉签蘸取无菌蒸馏水，轻拭钟乳石表面(2 cm×2 cm)以收集其表面的生物样品^[26]，置于无菌的离心管密封。每个采样点擦拭 45 根棉签，4 °C 冷藏保存运输至实验室并尽快分离研究。

1.2 分离培养基

考虑到不同培养基对细菌的培养具有一定的选择性，为了尽可能地反映织金洞钟乳石沉积物表面可培养细菌的组成和多样性，得到更多的可培养细菌资源，共采用牛肉膏蛋白胨培养基(NB)、B4 培养基、酪蛋白矿质培养基(CMM)、ISP5 培养基、淀粉酪蛋白琼脂培养基(SCA)、麦芽浸膏酵母琼脂培养基(MYA)、兼性固碳氮培养基

(JG)、反硝化细菌培养基(FX)、好氧反硝化细菌培养基(HF)、硝化细菌培养基(XB)和改良硝化细菌培养基(GX)等 11 种分离培养基对样品中细菌进行分离培养，各培养基的配制见参考文献[27–29]。

1.3 主要试剂与仪器

2×Power Taq PCR Master Mix、Hha I 和 Hae III 酶，TaKaRa 公司；蛋白酶 K 和溶菌酶，天根生化科技(北京)有限公司；细菌引物 27F 和引物 1492R，生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪、分子成像系统，Bio-Rad 公司；电泳仪，北京六一生物科技有限公司；微量高速离心机，长沙湘智离心机仪器有限公司。

1.4 细菌的分离、纯化与保藏

取 10 根棉签悬浮于 10 mL 无菌水中，通过 10 倍比梯度稀释，取 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 各稀释悬浮液 100 μL 分别涂布 11 种不同培养基平板，每个梯度 3 个重复，20 °C 恒温条件下培养 7–8 d 后，挑取不同形态的单菌落，纯化后转接至斜面，置 20 °C 恒温培养 4–6 d 后，4 °C 低温保藏。

1.5 菌株 DNA 的提取

将菌株接种到 5 mL 液体培养基中，28 °C、160 r/min 培养 5 d。利用 SDS-CTAB 法提取菌株的 DNA^[17]，溶于 30 μL ddH₂O，并置–20 °C 保存。

1.6 16S rRNA 基因扩增与酶切(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA)分型

以 1.5 节提取的细菌 DNA 为模板，使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')，参照文献[17]，对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，用 Hha I 或 Hae III 限制性内切酶进行酶切分析。根据酶切产物图谱的差异聚类，划分为不同操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)^[17]。PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.7 数据分析

将测序结果导入 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 比对, 确定所分离菌株的种类, 进一步对基于酶切分型得到的 OTU 进行聚类划分。基于菌株统计的结果, 计算样品中细菌的香农 (Shannon) 指数和辛普森 (Simpson) 多样性指数^[30]。

Bipartite 是一个在互作网络或物种水平等不同层面分析和描述生态网络的包^[31]。我们在 R 语言环境下^[32]通过 Bipartite 包对样点中分离到的细菌(属水平上)分布进行了二分网络的可视化, 并计算了网络的嵌套结构(Nestedness Metric Based on Overlap and Decreasing Fill, NODF)、物种依赖度 (Species Strength)、有效合作值 (Effective Partners) 和亲密度 (Closeness) 等网络结构参数, 以利于更好地理解网络中物种间的相互作用。通过与零模型比较以评估所分离的细菌群落的组装是否为一个随机过程^[32]。网络中矩阵的嵌套结构是指矩阵的嵌套程度, 值越高说明各节点(细菌属)的嵌套性越高, 反映了细菌属在各样点组成的嵌套程度。物种间的依赖度是指节点被其他节点所依赖程度的总和, 反映了细菌属的依赖性^[33]。有效合作值指节点相互作用的有效值, 反映了细菌属在网络中有效互作对象的多少^[34]。亲密度指节点在网络中的中心度, 反映了细菌属与网络中其他节点(细菌属)的紧密程度^[31,35]。

2 结果与分析

2.1 钟乳石沉积物表面细菌的多样性

从织金洞钟乳石沉积物表面共分离得到 206 株细菌。经过序列比对和基于序列间 98% 的相似性合并后, 共得到 45 个已知细菌物种的不同序列, 它们分别隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)等 4 门 25 属(表 1)。序列提交至 GenBank 所得登录号为 MF170812–MF170856。多样性指数计算结果表明, 织金洞钟乳石沉积物表面细菌的香农多样性指数为 4.78, 辛普森多样性指数为 0.95。

2.2 可培养细菌的组成

2.2.1 变形菌门(*Proteobacteria*)的组成

变形菌门是钟乳石沉积物表面分离细菌中最丰富的类群, 占分离菌株总数的 47.09% (表 1 和图 1), 包括 17 个 OTU。这些细菌隶属于 13 个属: 不动杆菌属(*Acinetobacter*)、颇陌菌属(*Advenella*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、污水菌属(*Aquamicrobium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、剑菌属(*Ensifer*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)和寡养单胞属(*Stenotrophomonas*)。其中德沃斯氏菌属的菌株数较多, 是织金洞内钟乳石沉积物表面分离细菌的次优势类群(14.56%)。

2.2.2 厚壁菌门(*Firmicutes*)的组成

厚壁菌门占样品所分离菌株总数的 31.55% (表 1 和图 1), 这些菌株隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)和赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)。其中芽孢杆菌属所占比例为 29.61%, 是分离细菌的优势类群。

2.2.3 放线菌门(*Actinobacteria*)的组成

放线菌门占样品所分离菌株总数的 20.39% (表 1 和图 1)。包括无色杆菌属(*Achromobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、厄氏菌属(*Oerskovia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)和链霉菌属(*Streptomyces*)等 9 个属。其中, 在放线菌门中, 节杆菌属占比最高, 为 7.77%; 涅斯捷连科氏菌属最少, 仅占所分离菌株总数的 0.19%。

2.2.4 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的组成

从样品中仅分离到拟杆菌门的鞘脂杆菌属(*Sphingobacterium*)的 2 株细菌, 占总分离菌株数的 0.97% (图 1)。BLAST 结果表明分离菌株 SFX-2 的 16S rRNA 基因序列与已知细菌 *S. gobiense* (NR 134178.1) 的一致性最高, 为 96% (表 1)。按照 2 个细菌种间 16S rRNA 基因序列相似性小于 98% 的标准划分^[36], SFX-2 可能为鞘脂杆菌属的一个潜在新种。

表 1 45 个细菌物种的 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 1 BLAST results of 16S rRNA gene sequences for 45 bacterial species

类群	代表菌株	最大相似菌株及 GenBank 登录号	相似度	菌株百分比
Group	Strain	The similarity strain and GenBank accession No.	Similarity (%)	Percentage (%)
变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	XNB-3	<i>Acinetobacter kyonggiensis</i> (NR 116714.1)	99	4.85
	TJG-5	<i>Advenella kashmirensis</i> (NR 074872.1)	99	0.97
	AHF-1	<i>Alcaligenes aquatilis</i> (NR 104977.1)	100	5.83
	AXB-3	<i>Alcaligenes faecalis</i> (NR 113606.1)	99	1.46
	AFX-2	<i>Aquamicrobium aerolatum</i> (NR 116910.1)	98	0.49
	SCMM-5	<i>Brevundimonas bullata</i> (NR 113611.1)	99	0.97
	AHF-5	<i>Brevundimonas diminuta</i> (NR 113602.1)	99	1.46
	SSCA-4	<i>Brevundimonas terrae</i> (NR 043726.1)	99	3.40
	TISP5-7	<i>Citrobacter murlinae</i> (NR 028688.1)	99	0.97
	SGX-3	<i>Devosia limi</i> (NR 042324.1)	99	14.56
	XGX-2	<i>Ensifer adhaerens</i> (NR 113893.1)	99	3.40
	XCMM-4	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (NR 112163.1)	99	0.97
	AXB-1	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (NR 044524.1)	99	0.49
	JHF-3	<i>Phyllobacterium loti</i> (NR 133818.1)	99	0.49
	JJG-3	<i>Pseudomonas brenneri</i> (NR 025103.1)	99	5.34
	JNB-3	<i>Pseudomonas donghuensis</i> (NR 136501.1)	99	0.49
	TJG-2	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (NR 113973.1)	99	0.49
	JFX-2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (NR 112030.1)	99	0.49
放线菌门 <i>Actinobacteria</i>	JCMM-5	<i>Achromobacter spanius</i> (NR 025686.1)	99	1.46
	XISP5-1	<i>Arthrobacter oxydans</i> (NR 026236.1)	99	3.40
	SCMM-2	<i>Arthrobacter rhombi</i> (NR 026448.1)	99	4.37
	AGX-4	<i>Brevibacterium antiquum</i> (NR 029079.1)	99	0.97
	JNB-6	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (NR 117474.1)	100	1.46
	TMYA-1	<i>Microbacterium foliorum</i> (NR 025368.1)	99	0.49
	SCMM-12	<i>Microbacterium oxydans</i> (NR 044931.1)	99	1.46
	TNB-2	<i>Nesterenkonia xinjiangensis</i> (NR 029075.1)	99	0.49
	SFX-6	<i>Nocardiopsis prasina</i> (NR 044906.1)	100	0.49
	TNB-4	<i>Oerskovia enterophila</i> (NR 026239.1)	99	1.46
	JHF-4	<i>Rhodococcus globerulus</i> (NR 118617.1)	99	1.46
	SXB-2	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> (NR 115383.1)	100	0.97
	AJG-3	<i>Streptomyces finlayi</i> (NR 112373.1)	100	0.97
	SISP5-2	<i>Streptomyces olivoviridis</i> (NR 112325.1)	98	0.49
	SHF-1	<i>Streptomyces pratensis</i> (NR 125619.1)	100	0.49
厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	JB4-4	<i>Bacillus aerius</i> (NR 118439.1)	99	0.97
	JNB-7	<i>Bacillus aryabhattai</i> (NR 115953.1)	99	1.46
	AB4-13	<i>Bacillus cereus</i> (NR 074540.1)	100	4.85
	ANB-11	<i>Bacillus horneckiae</i> (NR 116474.1)	99	1.46
	XNB-8	<i>Bacillus idriensis</i> (NR 043268.1)	100	2.43
	ANB-3	<i>Bacillus mycoides</i> (NR 113990.1)	99	2.91
	XNB-2	<i>Bacillus simplex</i> (NR 114919.1)	100	9.71
	AHF-7	<i>Bacillus subtilis</i> (NR 102783.1)	99	0.49
	ACMM-8	<i>Bacillus thuringiensis</i> (NR 112780.1)	99	5.34
	AMYA-2	<i>Lysinibacillus macroides</i> (KY628807.1)	99	0.97
	XMYA-3	<i>Lysinibacillus macroides</i> (NR 114920.1)	99	0.97
拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>	SFX-2	<i>Sphingobacterium gobiense</i> (NR 134178.1)	96	0.97

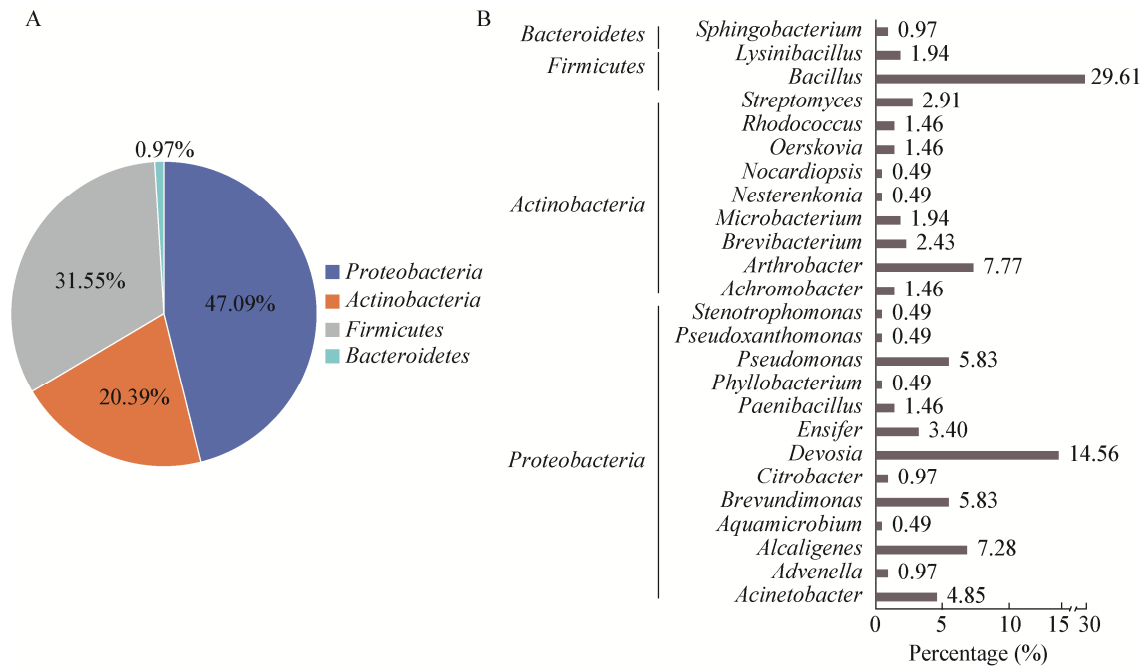


图 1 织金洞钟乳石表面可培养细菌在门水平(A)和属水平(B)上的分布
Figure 1 The composition of cultivable bacteria in sample based on phylum (A) and genus (B) level

2.3 不同培养基的分离结果

采用 11 种培养基分离不同的细菌类群, 结果表明(表 2), 不同培养基分离的菌株数以 NB 培养基分离菌株数最多(37 株), FX 培养基分离菌株数最少(10 株)。利用 CMM (15 属)、JG (13 属)、HF (10 属) 和 NB (10 属)培养基分离所得细菌类群相对较多; B4 培养基分离所得细菌类群较少(2 属)。某些属细菌仅在少数几种培养基中分离, 如寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、污水菌属(*Aquamicrobium*)、拟

诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)都仅从 FX 培养基中分离获得, 假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、叶杆菌属 (*Phyllobacterium*)、涅斯捷连科氏菌 (*Nesterenkonia*)分别仅从 JG、HF 和 NB 培养基中分离获得。

织金洞内不同样点钟乳石可培养细菌多样性略有差异, 香农指数为 2.63–2.91, 辛普森指数在 0.91–0.93 之间; 细菌物种数以从卷曲石洞(A)样点分离的最多(24 种), 从讲经堂(J)样点分离的最少

表 2 不同培养基分离菌株数及各样点的多样性指数
Table 2 Isolation strain number by using different medium and the diversity indices in different sampling sites

采样点 Sites	培养基 Medium											多样性指数 Diversity indices		S*
	FX	XB	HF	GX	JG	NB	B4	MYA	CMM	SCA	ISP5	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	
A	5	6	4	1	4	12	11	2	5	5	1	2.87	0.92	24
T	0	2	4	2	5	5	6	2	4	4	3	2.82	0.93	20
J	2	0	3	2	5	10	4	1	6	5	1	2.63	0.91	18
S	3	2	2	1	7	2	0	4	9	5	4	2.91	0.93	22
X	0	2	4	6	1	8	0	2	6	2	4	2.68	0.92	17

注: A: 卷曲石洞; T: 玉兔宫; J: 讲经堂; S: 水乡泽国; X: 雪压青松; S*: 物种数
Note: A: Juanqushidong; T: Yutugong; J: Jiangjingtang; S: Shuixiangzeguo; X: Xueyaqingsong; S*: Number of species

(17 种); 水乡泽国(S)样点的可培养细菌多样性最高, 香农指数为 2.91, 辛普森指数为 0.93; 讲经堂(J)的可培养细菌多样性指数最低, 香农指数为 2.63, 辛普森指数为 0.91。

2.4 细菌群落的网络结构

分离细菌属水平-采样点的网络分析结果(图 2)表明, 分离细菌中芽孢杆菌属的丰度最大, 可在所有采样点分离到, 部分细菌属仅在特定的采样点中分离到: 假黄色单胞菌属、柠檬酸杆菌属和涅斯捷连科氏菌属仅在样点玉兔宫(T)中分离到; 寡养单胞属和叶杆菌属仅在样点讲经堂(J)中分离到; 污水菌属仅在样点卷曲石洞(A)中分离到; 拟诺卡氏菌属仅在样点水乡泽国(S)中分离到。

分析分离细菌属间的相互作用结果表明(表

3), 芽孢杆菌属依赖度最高(1.43), 其次为德沃斯氏菌属(0.73); 产碱杆菌属、德沃斯氏菌属、芽孢杆菌属和节杆菌属的有效合作值较其他细菌属更多, 分别为 4.78、4.76、4.63 和 4.31; 芽孢杆菌属、短波单胞菌属、德沃斯氏菌属、产碱杆菌属和节杆菌属的亲密度较高, 均为 0.05; 对网络中各细菌的依赖度、有效合作值和亲密度分析表明, 芽孢杆菌属、短波单胞菌属、德沃斯氏菌属、产碱杆菌属和节杆菌属在细菌群落中被其他属的细菌所依赖程度较高, 并可能拥有更多的相互作用。与零模型相比, 织金洞钟乳石表面分离细菌(属水平)-采样点的网络嵌套性(NODF=57.17)显著不同($P<0.01$), 即样点中分离菌株在属水平的分布具有非随机的显著的嵌套性。

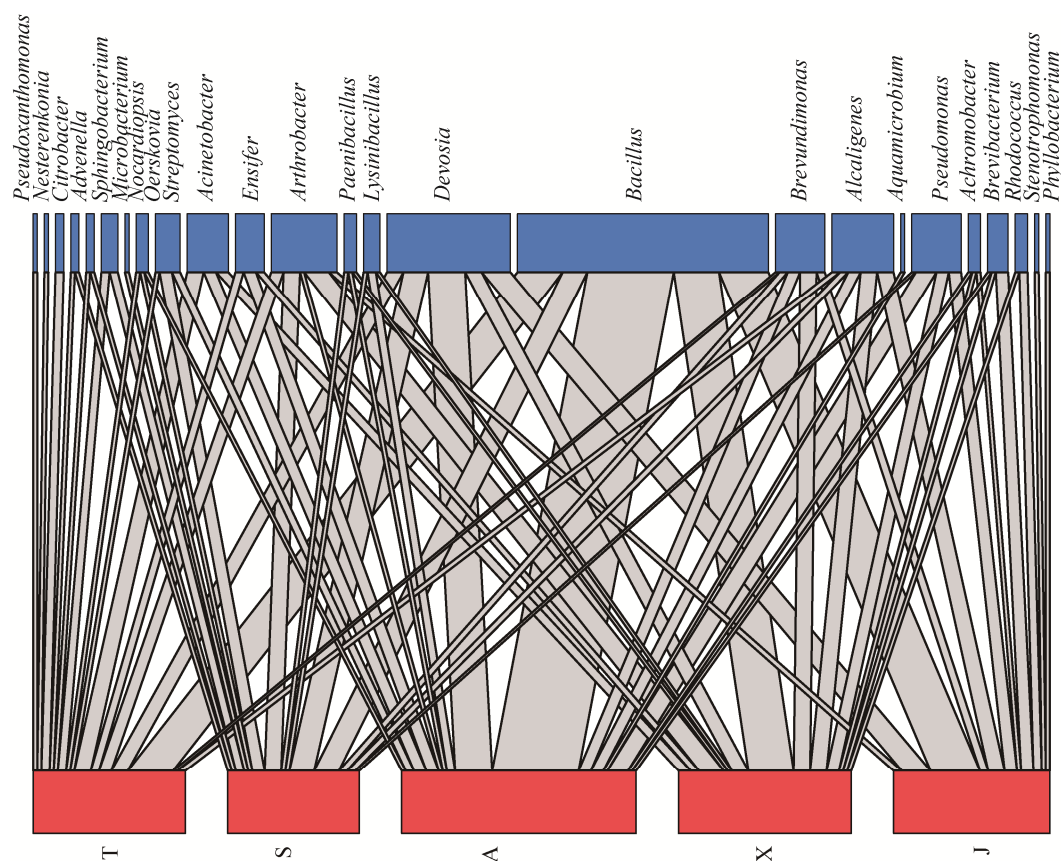


图 2 分离菌株(属水平)在不同采样点的分布

Figure 2 The distribution of cultivable bacteria (genus level) in different sample sites

注: A: 卷曲石洞; T: 玉兔宫; J: 讲经堂; S: 水乡泽国; X: 雪压青松

Note: A: Juanqushidong; T: Yutugong; J: Jiangjingtang; S: Shuixiangzeguo; X: Xueyaqingsong

表 3 网络中可培养细菌属间的相互作用
Table 3 The interactions of cultivable bacteria based on genus level in network

门	属	物种依赖程度	有效合作值	亲密度	
Phylum	Genus	Species strength	Effective partners	Closeness	
变形菌门	<i>Acinetobacter</i>	0.23	2.97	0.04	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Advenella</i>	0.06	2.00	0.04	
	<i>Alcaligenes</i>	0.37	4.78	0.05	
	<i>Aquamicrobium</i>	0.02	1.00	0.04	
	<i>Brevundimonas</i>	0.29	4.56	0.05	
	<i>Citrobacter</i>	0.05	1.00	0.04	
	<i>Devosia</i>	0.73	4.76	0.05	
	<i>Ensifer</i>	0.15	2.94	0.04	
	<i>Paenibacillus</i>	0.07	3.00	0.04	
	<i>Phyllobacterium</i>	0.03	1.00	0.03	
	<i>Pseudomonas</i>	0.27	3.54	0.04	
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.03	1.00	0.04	
	<i>Stenotrophomonas</i>	0.03	1.00	0.03	
	放线菌门	<i>Achromobacter</i>	0.07	3.00	0.04
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i>	0.42	4.31	0.05
<i>Brevibacterium</i>		0.12	2.59	0.04	
<i>Microbacterium</i>		0.12	2.00	0.04	
<i>Nesterenkonia</i>		0.03	1.00	0.04	
<i>Nocardiopsis</i>		0.03	1.00	0.04	
<i>Oerskovia</i>		0.08	3.00	0.04	
<i>Rhodococcus</i>		0.08	1.89	0.04	
<i>Streptomyces</i>		0.16	2.75	0.04	
厚壁菌门		<i>Bacillus</i>	1.43	4.63	0.05
<i>Firmicutes</i>	<i>Lysinibacillus</i>	0.09	2.83	0.04	
拟杆菌门	<i>Sphingobacterium</i>	0.06	2.00	0.04	
<i>Bacteroidetes</i>					

3 讨论与结论

本研究从寡营养、缺乏光照的织金洞洞穴环境中分离获得细菌，并结合网络分析解析了织金洞内钟乳石沉积物表面可培养细菌的多样性，阐明了织金洞内钟乳石沉积物表面可培养细菌的组成、多样性和网络结构信息。织金洞内不同采样点的钟乳石沉积物表面可培养细菌在属水平上呈显著的嵌套结构，是非随机的细菌群落。研究结果为进一步研究喀斯特洞穴特定功能菌株，以及它们在寡营养极端环境中的物质、能量代谢作用和生态功能奠定了基础。

织金洞内钟乳石沉积物表面分离细菌隶属于变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门等 4 个门。这些类群也是海洋沉积物^[11]、白云岩表层土^[14]以及洞穴内土壤^[13]、水^[17]和沉积物^[9]等环境中可培养细菌的主要组成类群。变形菌门和厚壁菌门是沉积物、水体和土壤等环境可培养细菌中最为常见的 2 个优势门。Dong 等基于免培养法的研究也表明变形菌门是织金洞内钟乳石表面优势菌门^[37]。与本研究结果一样，南海南沙海域沉积物^[12]、深海沉积物^[10]以及北欧海水^[16]可培养细菌中的优势类群也为变形菌门，而南海沉积物^[11]、白云岩表层土^[14]和岩盐沉积^[38]中的优势类群则是

厚壁菌门。

属水平上,芽孢杆菌属是织金洞内沉积物样品表面可培养细菌的优势属(29.61%)。芽孢杆菌属是一类好氧异养型细菌,由于其可产生芽孢以抵御严酷环境压力,具有较强的适应性^[10,14],是沉积物或岩石等寡营养环境及其他环境中可培养细菌的优势属^[9-11,14,38]。网络分析表明,织金洞钟乳石表面可培养细菌中,芽孢杆菌较其他细菌具有更多的有效合作值和更高的依赖度、亲密度。已有报道了芽孢杆菌能沉积碳酸钙,在喀斯特洞穴的形成演化过程中扮演着重要的角色^[39-42]。此外,芽孢杆菌可通过代谢作用改变周围环境的pH值,形成生物膜^[43]。生物膜的形成有利于细菌的群体感知(Quorum Sensing)作用,调节群落内相互合作和生理过程^[44],有利于细菌在钟乳石表面上附着和定殖。当面临波动或恶劣的环境条件时,生物膜可为细菌提供保护的场所^[45]。

德沃斯氏菌属(14.56%)、节杆菌属(7.77%)、产碱杆菌属(7.28%)、假单胞菌属(5.83%)和短波单胞菌属(5.83%)为织金洞内沉积物样品表面可培养细菌的次优势可培养属。德沃斯氏菌属和节杆菌属细菌广泛分布在各类环境中,目前的研究主要表明它们具有降解环境中有机污染物的能力,并能将一些有机化合物转化为细胞生物量和二氧化碳^[46-47]。这2类细菌类群也在其他洞穴环境中被检测到^[14,48-49]。这进一步表明它们可以存在于寡营养环境中,但它们在寡营养环境中的作用有待进一步研究。产碱杆菌属细菌可能参与洞穴环境中物质和能量循环途径,在洞穴环境生态系统的维持中扮演着重要角色。例如,粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)具有反硝化和固氮等作用^[50-52],可以为有机营养极度贫乏的洞穴环境提供氮源,并促进氮循环的进行。假单胞菌属是一种分布广泛的细菌,也常见于植物叶片和昆虫肠道等环境。洞穴环境中较高含量(5.83%)的假单胞菌属可能是由于环境中存在昆虫、蝙蝠等。此外,利用营养较丰富的培养基

如NB培养基,假单胞菌属的分离频率较高^[52-53]。短波单胞菌属(5.83%)多为寡营养细菌,具有适应贫营养极端环境的能力^[54]。

Rivett 等研究认为,细菌的相对丰度在一定程度上反映了其在群落中的重要程度,相对丰度较高的细菌在群落中的相互作用可能也更多^[55]。织金洞钟乳石表面可培养菌网络分析表明,具有较高相对丰度的芽孢杆菌属、德沃斯氏菌属、节杆菌属和产碱杆菌属、短波单胞菌属等与其他细菌之间存在更多的相互作用,是该细菌群落中的关键类群。尽管假单胞菌属的相对丰度也较高,在免培养法分析结果中达51.89%,但其在免培养和纯培养网络分析中与其他菌属的网络互作连接均较低^[56]。这暗示我们判断细菌在群落中的重要性不能只关注细菌类群相对丰度,还应结合网络分析结果。此外,免培养和传统分离培养2种方法分析得到的细菌群落组成和丰度存在差异。织金洞钟乳石表面可培养细菌相对丰度排前10的类群中,仅假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属、节杆菌属和赖氨酸芽孢杆菌属5个属是免培养法分析结果中的主要类群(相对丰度前25的属)^[37]。纯培养分离相对丰度较高的德沃斯氏菌属并不是免培养法分析结果中的主要类群,而相对丰度较低的柠檬酸杆菌属(0.97%)在免培养分析结果中却是主要类群;而且,由于我们所采用网络构建方法不同,因而免培养和纯培养这2种方法分析所得节点连接数最多的细菌属也有所不同。

织金洞钟乳石沉积物表面存在一些特殊类群。与海洋沉积物^[10,56-57]、白云岩表层土^[14]和洞穴内壁画^[58]、岩壁、沉积物以及表面生物膜^[3,9,27,59]、土壤^[13,60-61]和水^[17]等类似环境中可培养细菌组成相比,污水菌属、柠檬酸杆菌属、叶杆菌属和涅斯捷连科氏菌属仅在本研究织金洞钟乳石沉积物表面检测到。Bambauer 等研究表明,污水菌属可以还原硝酸盐和代谢磺化芳香合物^[62]。柠檬酸杆菌属是一类肠道细菌中的非致病菌,也常见于土

壤、污水等环境中, 具有修复重金属污染、还原硫酸盐^[63]和还原异化高氯酸盐等作用^[64]。从水稻 (*Oryza sativa* L.) 中分离的柠檬酸杆菌属内生菌具有固氮作用^[65]。叶杆菌属可在紫金牛科 (*Myrsinaceae*) 和茜草科 (*Rubiaceae*) 中某些热带种的叶片上形成共生叶瘤, 作为根瘤菌与三叶草属 (*Trifolium* L.) 等植物形成共生关系^[66]。从高盐碱土壤、盐湖土壤中分离到的多株涅斯捷连科氏菌属为中度嗜盐的好氧菌^[67-68]。另外, 本研究分离到的菌株 SFX-2 与已知鞘脂杆菌属细菌序列的最高相似性仅为 96%, 可能为鞘脂杆菌属的一个潜在新种。具体的分类学信息还需要结合形态、生理生化上的特征差异进行鉴定。对这些细菌类群在喀斯特洞穴环境中的代谢功能以及群落细菌种间的相互作用的进一步研究, 将更好地阐明群落内细菌间的物质、能量循环以及共存模式。

某些细菌仅在特定的洞厅中分布。例如, 污水菌属和拟诺卡氏菌属分别仅在卷曲石洞和水乡泽国的样品中分离到, 这与可培养细菌群落在属水平上呈现出显著嵌套性结果相一致, 即: 不同洞厅之间既分布有相同的细菌属, 也有各自特有的细菌类群。由于织金洞不同洞厅开放程度及受旅游和人为干扰的影响程度不同, 细菌所依赖的环境和营养状况不同, 导致不同洞厅细菌类群组成存在差异^[69]。

不同样品中可培养细菌的优势类群不同, 可能与实验中所选择的培养基、样品的类型、所处的环境以及培养过程中所用的条件等有关^[11]。本研究中, 考虑到不同培养基所分离到的细菌具有一定的偏向性, 因此采用 11 种不同培养基进行分离, 并获得细菌类群共 25 属 45 种。与织金洞洞穴水中分离细菌香农多样性指数相比(2.58)^[17], 钟乳石沉积物表面具有更高的多样性指数(4.78), 暗示虽然洞穴内钟乳石沉积物表面和洞穴水均为寡营养环境, 但其比洞穴水蕴藏着更多的细菌资源。

纯培养分离细菌属占免培养法分析总细菌属(466 个)^[37]的 5.36%, 表明所选培养基能较好地运

用于洞穴细菌的分离。洞穴内细菌长期适应有机营养匮乏环境, 由于营养丰富的培养基并不利于寡营养细菌的生长^[70], 针对特定细菌类群的纯培养需根据其偏好选择不同的培养基。例如污水菌属和拟诺卡氏菌属仅在 FX 培养基上分离获得, 鞘脂杆菌属仅在 FX 和 CMM 培养基上分离获得。综合各培养基分离的属的数量和类群, CMM、JG、NB、HF 以及 FX 等培养基相对而言比较有利于洞穴沉积物细菌的分离。其中, 除 NB 培养基外, CMM、JG、HF 和 FX 培养基均是以无机物为主的寡营养培养基。

由于细菌对不同培养基具有选择倾向性, 传统分离培养在探究细菌群落的多样性和组成上具有一定的局限性。大部分细菌, 如在免培养分析中相对丰度较高的属, 像盐单胞菌属(*Halomonas*)、马赛菌属(*Massilia*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、咸水球形菌属(*Salinisphaera*)等未能通过分离获得。然而免培养法并不能完全代替纯培养法^[71], 例如产碱杆菌属和短杆菌属等通过分离所得相对丰度较高的属, 也未能通过免培养法检测到。因此, 将纯培养与免培养技术结合才能更全面系统地了解洞穴中细菌的多样性。今后进一步对纯培养菌株的特征和生理进行研究, 也将有助于探索不同微生物在洞穴形成发育和洞穴生态系统环境中的功能, 挖掘具有潜在应用价值的微生物资源。

REFERENCES

- [1] Zhou JP, Gu YQ, Zou CS, Mo MH. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(2): 105-112
- [2] Pedersen K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 185(1): 9-16
- [3] Chen JY, Lu ZJ, He QF, Li Q. Characteristics of culturable bacterial communities in karst caves with different CO₂ concentrations: an example of the Xueyu cave and Shuiming cave in Chongqing[J]. *Carsologica Sinica*, 2020, 39(2): 264-274 (in Chinese)
陈济宇, 陆祖军, 贺秋芳, 李强. 不同二氧化碳浓度岩溶洞穴可培养细菌群落特征: 以重庆雪玉洞和水鸣洞为例[J]. *中国岩溶*, 2020, 39(2): 264-274

- [4] Guo LD. Progress of microbial species diversity research in China[J]. Biodiversity Science, 2012, 20(5): 572-580 (in Chinese)
郭良栋. 中国微生物物种多样性研究进展[J]. 生物多样性, 2012, 20(5): 572-580
- [5] Banks ED, Taylor NM, Gulley J, Lubbers BR, Giarrizzo JG, Bullen HA, Hoehler TM, Barton HA. Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis[J]. Geomicrobiology Journal, 2010, 27(5): 444-454
- [6] Sanchez-Moral S, Portillo MC, Janices I, Cuezva S, Fernández-Cortés A, Cañaveras JC, Gonzalez JM. The role of microorganisms in the formation of calcitic moonmilk deposits and speleothems in Altamira cave[J]. Geomorphology, 2012, 139-140: 285-292
- [7] Huang TY, Hsu BM, Fan CW, Tsai HC, Tung CY, Chen JS. Role of microbial communities in the weathering and stalactite formation in karst topography[J]. Biogeosciences, 2019. DOI: 10.5194/bg-2019-12
- [8] Simon KS. Cave ecosystems[A]//White WB, Culver DC. Encyclopedia of Caves[M]. Amsterdam: Elsevier, 2012: 99-102
- [9] Banerjee S, Joshi S. Culturable bacteria associated with the caves of Meghalaya in India contribute to speleogenesis[J]. Journal of Cave and Karst Studies, 2016, 78(3): 144-157
- [10] Yu QW, Hu LQ, Li F, Yi XX, Gao CH. Diversity and biotoxicity of cultivable marine bacteria isolated from deep-sea sediment of the South China Sea[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(12): 2203-2208 (in Chinese)
于清武, 胡丽琴, 李菲, 易湘茜, 高程海. 南海深海沉积物可培养细菌多样性及其生物毒性分析[J]. 南方农业学报, 2015, 46(12): 2203-2208
- [11] Liu YJ, Tian XP, Huang XF, Long LJ, Zhang S. Diversity of cultivable bacteria isolated from marine sediment environments in South China Sea[J]. Microbiology China, 2014, 41(4): 661-673 (in Chinese)
刘玉娟, 田新朋, 黄小芳, 龙丽娟, 张隹. 中国南海沉积环境可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(4): 661-673
- [12] Sun FQ, Wang BJ, Li GY, Liu XP, Du YP, Lai QL, Shao ZZ. Diversity of bacteria isolated from the South China Sea sediments[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(12): 1578-1587 (in Chinese)
孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 刘秀片, 杜雅萍, 赖其良, 邵宗泽. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1578-1587
- [13] Zhang WQ, Zhang YG, Fang BZ, Wei DQ, Han MX, Li S, Xiao M, Li WJ. 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 (in Chinese)
张万芹, 张永光, 房保柱, 魏大巧, 韩明贤, 李帅, 肖敏, 李文均. 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
- [14] Wang YQ, Pan ZQ, Weng QB, Xiao W, Gong M, Lu YB, Chen XW, Li M, Fang Z. Diversity of cultivable bacterium in the dolomite topsoil from Yuntai mountain, Guizhou (China)[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 2015, 37(4): 616-622 (in Chinese)
王玉倩, 潘舟强, 翁庆北, 肖炜, 龚敏, 卢玉兵, 陈晓旺, 李敏, 方正. 云台山白云岩表层土可培养细菌多样性[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2015, 37(4): 616-622
- [15] An ZQ, Zhan W, Wu QS, Fang Z, Wang YQ, Yu TH, Weng QB. Diversity and antimicrobial activities of the cultivable rhizospheric bacteria from *Dendrobium nobile*[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 2018, 40(3): 586-602 (in Chinese)
安忠琦, 詹伟, 吴庆珊, 方正, 王玉倩, 余天华, 翁庆北. 金钗石斛根际可培养细菌多样性及抑菌活性研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2018, 40(3): 586-602
- [16] Shang L, Shi XC, Wang XY, Zhang XH. Diversity of culturable bacterial in the surface seawater of the Nordic Sea[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(9): 1323-1331 (in Chinese)
商丽, 史晓翀, 王晓宇, 张晓华. 北欧海海水可培养细菌多样性[J]. 微生物学报, 2017, 57(9): 1323-1331
- [17] Dong YY, Ai YL, Huang Y, Wei WZ, Sun SY, Niu XJ, Zhang CB, Zhou ZF, Weng QB. The effects of human activities on the culturable bacteria diversity of the waters in Zhijindong cave[J]. Journal of Guizhou Normal University: Natural Sciences, 2017, 35(4): 64-70, 76 (in Chinese)
董乙义, 艾义郎, 黄煜, 魏文章, 孙诗语, 牛晓娟, 张传博, 周忠发, 翁庆北. 人类活动对织金洞洞穴水中可培养细菌多样性的影响[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2017, 35(4): 64-70, 76
- [18] Zhu HZ, Zhang ZF, Zhou N, Jiang CY, Wang BJ, Cai L, Liu SJ. Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1726
- [19] Milici M, Deng ZL, Tomasch J, Decelle J, Wos-Oxley ML, Wang H, Jáuregui R, Plumeier I, Giebel HA, Badewien TH, et al. Co-occurrence analysis of microbial taxa in the Atlantic Ocean reveals high connectivity in the free-living bacterioplankton[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 649
- [20] Zelezniak A, Andrejev S, Ponomarova O, Mende DR, Bork P, Patil KR. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the

- United States of America, 2015, 112(20): 6449-6454
- [21] Jaba A, Dagher F, Hamidi Oskouei AM, Guertin C, Constant P. Physiological traits and relative abundance of species as explanatory variables of co-occurrence pattern of cultivable bacteria associated with chia seeds[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(9): 668-680
- [22] Wei YL, Chen WH, Luo QK, He ZF, Tan ZQ. Characteristics and formation and evolution analysis of the karst landscape of Zhijindong cave global geopark, Guizhou province[J]. Acta Geoscientica Sinica, 2016, 37(3): 368-378 (in Chinese)
韦跃龙, 陈伟海, 罗劭侃, 何正芳, 谭政权. 贵州织金洞世界地质公园喀斯特景观特征及其形成演化分析[J]. 地球学报, 2016, 37(3): 368-378
- [23] Cao MD, Zhou ZF, Zhang Q, Xie YT, Zhang SY. Characteristics of physical and chemical properties and associated environmental implications of the karst water in Zhijin Cave of Guizhou province[J]. Carsologica Sinica, 2016, 35(3): 314-321, 348 (in Chinese)
曹明达, 周忠发, 张强, 谢雅婷, 张绍云. 岩溶洞穴水理化性质特征及其环境意义: 以贵州织金洞为例[J]. 中国岩溶, 2016, 35(3): 314-321, 348
- [24] Luo SQ, Yi WY, Li P. Environmental monitoring and affecting factor analysis of Zhijin cave[J]. Guizhou Science, 2014, 32(6): 92-96 (in Chinese)
罗时琴, 易武英, 李坡. 织金洞洞穴环境监测及其影响因素分析[J]. 贵州科学, 2014, 32(6): 92-96
- [25] Lü JB, Zhao SS, Li TY, Wang XY, Li HC. Chronology of a section of Quaternary speleothems in the Shihua cave, Beijing[J]. Geology in China, 2007, 34(6): 993-1002 (in Chinese)
吕金波, 赵树森, 李铁英, 汪训一, 李红春. 北京石花洞第四纪钟乳石剖面的年代学研究[J]. 中国地质, 2007, 34(6): 993-1002
- [26] Ortiz M, Legatzki A, Neilson JW, Fryslie B, Nelson WM, Wing RA, Soderlund CA, Pryor BM, Maier RM. Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave[J]. The ISME Journal, 2014, 8(2): 478-491
- [27] Herzog Velikonja B, Tkavc R, Pašić L. Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia[J]. International Journal of Speleology, 2014, 43(1): 45-56
- [28] Groth I, Vettermann R, Schuetze B, Schumann P, Saiz-Jimenez C. Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo)[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(1/2): 115-122
- [29] Atlas RM, Atlas RM. Handbook of Microbiological Media[M]. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2004
- [30] Ma KP. Measurement of biotic community diversity I α diversity (part I)[J]. Chinese Biodiversity, 1994, 2(3): 162-168 (in Chinese)
马克平. 生物群落多样性的测度方法 I α 多样性的测度方法(上)[J]. 生物多样性, 1994, 2(3): 162-168
- [31] Dormann CF, Fründ J, Blüthgen N, Gruber B. Indices, graphs and null models: analyzing bipartite ecological networks[J]. The Open Ecology Journal, 2009, 2(1): 7-24
- [32] The R Core Team. R: a language and environment for statistical computing[M/OL]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018[2020-02-01]
<https://www.R-project.org>
- [33] Poisot T, Lepennetier G, Martinez E, Ramsayer J, Hochberg ME. Resource availability affects the structure of a natural bacteria-bacteriophage community[J]. Biology Letters, 2011, 7(2): 201-204
- [34] Bersier LF, Banašek-Richter C, Cattin MF. Quantitative descriptors of food-web matrices[J]. Ecology, 2002, 83(9): 2394-2407
- [35] Opsahl T, Agneessens F, Skvoretz J. Node centrality in weighted networks: generalizing degree and shortest paths[J]. Social Networks, 2010, 32(3): 245-251
- [36] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 33(4): 152-155
- [37] Dong YY, Gao J, Wu QS, Ai YL, Huang Y, Wei WZ, Sun SY, Weng QB. Co-occurrence pattern and function prediction of bacterial community in karst cave[J]. BMC Microbiology, 2020, 20: 137
- [38] Xiao W, Yang YL, Liu HW, Wen ML, Cui XL. Culturable bacterial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine, P. R. China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(6): 967-972 (in Chinese)
肖炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 文孟良, 崔晓龙. 昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 967-972
- [39] Achal V, Mukherjee A, Reddy MS. Characterization of two urease-producing and calcifying *Bacillus* spp. isolated from cement[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(11): 1571-1576
- [40] Wang HM, Zeng CP, Liu QY, Liu D, Qiu X, Gong LF. Calcium carbonate precipitation induced by a bacterium strain isolated from an oligotrophic cave in Central China[J]. Frontiers of Earth Science in China, 2010, 4(2): 148-151
- [41] Rao MPN, Dong ZY, Zhang H, Niu XK, Zhang K, Fang BZ, Xiao M, Kang YQ, Li WJ. *Bacillus antri* sp. nov., isolated from cave soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(8): 2335-2339
- [42] Yasir M. Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2018,

- 49(2): 248-257
- [43] Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(5): 990-1004
- [44] Li YH, Tian XL. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms[J]. Sensors: Basel, Switzerland, 2012, 12(3): 2519-2538
- [45] Lee YS, Park W. Enhanced calcium carbonate-biofilm complex formation by alkali-generating *Lysinibacillus boronitolerans* YS11 and alkaliphilic *Bacillus* sp. AK13[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 49
- [46] Li J, Uwaremwe C, Leng Y, Zhang XH, Li SW, Chen XM. Progress on the study of biodegradation of organic pollutants and adsorption of heavy metals with *Arthrobacter* strains[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 40(10): 89-97 (in Chinese)
李娟, Uwaremwe C, 冷艳, 张晓华, 李师翁, 陈熙明. 节杆菌属细菌处理有机物和重金属污染物的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(10): 89-97
- [47] Talwar C, Nagar S, Kumar R, Scaria J, Lal R, Negi RK. Defining the environmental adaptations of genus *Devosia*: insights into its expansive short peptide transport system and positively selected genes[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1151
- [48] Cacchio P, Ercole C, Cappuccio G, Lepidi A. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil[J]. Geomicrobiology Journal, 2003, 20(2): 85-98
- [49] Gan HY, Gan HM, Tarasco AM, Busairi NI, Barton HA, Hudson AO, Savka MA. Whole-genome sequences of five oligotrophic bacteria isolated from deep within Lechuguilla Cave, New Mexico[J]. Genome Announcements, 2014, 2(6): e01133-14
- [50] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191
- [51] Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, De Mot R, Keijers V, Hai WL, Vanderleyden J. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22(2): 215-224
- [52] Jurado V, Laiz L, Rodriguez-Nava V, Boiron P, Hermosin B, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves[J]. International Journal of Speleology, 2010, 39(1): 15-24
- [53] Tomova I, Lazarkevich I, Tomova A, Kambourova M, Vasileva-Tonkova E. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria[J]. International Journal of Speleology, 2013, 42(1): 65-76
- [54] Li Y, Kawamura Y, Fujiwara N, Naka T, Liu HS, Huang XX, Kobayashi K, Ezaki T. *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt3): 819-825
- [55] Rivett DW, Bell T. Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(7): 767-772
- [56] Chen RW, Wang KX, He YQ, Tian XP, Long LJ. Diversity of cultured bacteria isolated from a deep sea sediment in South China Sea[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2018, 40(4): 321-333 (in Chinese)
陈柔雯, 王可欣, 何媛秋, 田新朋, 龙丽娟. 一份南海深海沉积物样品中可培养细菌的多样性[J]. 生物资源, 2018, 40(4): 321-333
- [57] Zhao HY, Fang HX, Wang Y, Liu TJ, Lin XZ. Diversity of bacteria isolated from marine sediment of Arctic and screening of strains with antifungal activity against plant pathogenic fungi[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(17): 149-153 (in Chinese)
赵惠娅, 方海霞, 王燕, 刘同军, 林学政. 北极海洋沉积物可培养细菌多样性及抗植物病原真菌活性菌株筛选[J]. 广东农业科学, 2012, 39(17): 149-153
- [58] Ikner LA, Toomey RS, Nolan G, Neilson JW, Pryor BM, Maier RM. Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(1): 30-42
- [59] Ghosh S, Kam G, Nijjer M, Stenner C, Cheeptham N. Culture dependent analysis of bacterial diversity in Canada's raspberry rising cave revealed antimicrobial properties[J]. International Journal of Speleology, 2020, 49(1): 43-53
- [60] Niu XK, Lan YZ, Li WJ, Cao Y, Huang J, Liao WQ, Kang YQ. Isolation and identification of actinomycetes with antibacterial activity from karst caves in southern Guizhou[J]. Journal of Guizhou Medical University, 2019, 44(5): 519-523, 535 (in Chinese)
牛雪可, 兰永哲, 李文均, 曹煜, 黄劲, 廖万清, 康颖倩. 贵州黔南喀斯特洞穴放线菌抗菌活性筛选及差异研究[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44(5): 519-523, 535
- [61] Zu J, Liu SW, Tuo L, Liu JM, Li FN, Zhang JX, Peng Q, Li XJ, Li J, Sun CH. Studies on diversity and anti-microbial activity of actinobacteria isolated from karst caves in Lichuan, Hubei[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2016, 41(3): 186-195 (in Chinese)
祖健, 刘少伟, 庾利, 刘佳萌, 李飞娜, 张佳璇, 彭琴, 李俊, 李静, 孙承航. 湖北利川喀斯特洞穴放线菌多样性及抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(3): 186-195
- [62] Bambauer A, Rainey FA, Stackebrandt E, Winter J. Characterization of *Aquamicrobium defluvii* gen. nov. sp.

- nov., a thiophene-2-carboxylate-metabolizing bacterium from activated sludge[J]. Archives of Microbiology, 1998, 169(4): 293-302
- [63] Narde GK, Kapley A, Purohit HJ. Isolation and characterization of *Citrobacter* strain HPC255 for broad-range substrate specificity for chlorophenols[J]. Current Microbiology, 2004, 48(6): 419-423
- [64] Bardiya N, Bae J. Role of *Citrobacter amalonaticus* and *Citrobacter farmeri* in dissimilatory perchlorate reduction[J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(2): 88-97
- [65] Hongrittipun P, Youpensuk S, Rerkasem B. Screening of nitrogen fixing endophytic bacteria in *Oryza sativa* L.[J]. Journal of Agricultural Science, 2014, 6(6): 66-74
- [66] Lv F, Jiang X, Xu JJ, Zhu B, Wei GH. 16S rDNA polymorphism and phylogeny of rhizobia isolated from *Trifolium* in Xinjiang Uygur autonomous region and Shaanxi province[J]. Acta Agrestia Sinica, 2009, 17(3): 304-309 (in Chinese)
- 吕飞, 蒋欣, 徐佳洁, 朱博, 韦革宏. 新疆和陕西三叶草属根瘤菌 16S rDNA 多态性及系统发育研究[J]. 草地学报, 2009, 17(3): 304-309
- [67] Chen HH, Li WJ, Zhang YQ, Wang D, Tang SK, Xu LH, Jiang CL. Study on isolation and systematic taxonomy of strains of genus *Nesterenkonia*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 811-815 (in Chinese)
- 陈华红, 李文均, 张玉琴, 王栋, 唐蜀昆, 徐丽华, 姜成林. 涅斯捷连科氏菌属菌株的分离及系统学研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 811-815
- [68] Li XJ, Wu Y, Zhang WM, Li J, Liu SW, Jiang ZK, Huang DL, Sun CH. Biodiversity and antimicrobial activity of culturable actinobacteria isolated from Jiuliancheng Nur in Hebei province[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1473-1484 (in Chinese)
- 李小俊, 吴越, 张伟铭, 李静, 刘少伟, 蒋忠科, 黄大林, 孙承航. 河北九莲城淖尔可培养放线菌多样性及抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1473-1484
- [69] Li LN, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths[J]. Biodiversity & Conservation, 1999, 8(5): 659-677
- [70] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2391-2396
- [71] Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, De La Providencia IE, El Yassimi A, St-Arnaud M, Hijri M. Culture-dependent and -independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128272