

黄土高原草地土壤固碳微生物菌株特性及其固碳条件

雷发丹¹, 黄倩¹, 陆晓钰¹, 曹雨晴¹, 魏宾¹, 徐嘉宜¹, 陈芳¹, 王宝荣², 黄懿梅^{1*}

1 西北农林科技大学 资源环境学院, 农业农村部西北旱地农业绿色低碳重点实验室, 陕西 杨凌

2 西北农林科技大学 草业与草原学院, 陕西 杨凌

雷发丹, 黄倩, 陆晓钰, 曹雨晴, 魏宾, 徐嘉宜, 陈芳, 王宝荣, 黄懿梅. 黄土高原草地土壤固碳微生物菌株特性及其固碳条件[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2642-2654.

LEI Fadan, HUANG Qian, LU Xiaoyu, CAO Yuqing, WEI Bin, XU Jiayi, CHEN Fang, WANG Baorong, HUANG Yimei. CO₂-fixing microbial strains in the grassland soil of the Loess Plateau: characteristics and CO₂ fixation conditions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(6): 2642-2654.

摘要: 【目的】筛选并明确草地土壤固碳微生物菌株的生理生化特性及其最适固碳条件, 为深入认识土壤固碳微生物的固碳机制、提升草地土壤碳汇能力提供理论依据。【方法】采用无碳源固体培养基和稀释涂布法, 从黄土高原草地土壤中分离筛选可培养的固碳微生物菌株, 并借助16S rRNA基因鉴定物种。依据革兰氏染色、淀粉水解、吲哚、甲基红和乳酸发酵试验确定其生理生化特性。利用无碳源液体培养基及灭菌土壤的培养试验, 确定温度(20–40 °C)、水分(3.00%–27.00%), 以及亚硝酸钠(NaNO₂)和硫化钠(Na₂S)电子供体的存在对固碳微生物固碳效率的影响。【结果】共分离出9株固定CO₂效果良好的细菌, 分属芽孢杆菌属、链霉菌属、剑菌属、农杆菌属、肠杆菌属、短波单胞菌属和噬肺氨酸菌属。其中, 属于农杆菌属的A4和属于短波单胞菌属的A7固碳效率最高($P < 0.05$), 均为革兰氏阳性菌。这9株细菌在25–30 °C, 以及土壤水分3.00%、15.00%和27.00%的条件下, 固碳效率较高($P < 0.05$)。添加电子供体可提升菌株固碳效率, 提升效果依次为: 单独添加NaNO₂ > 单独添加Na₂S > 共同添加NaNO₂+Na₂S ($P < 0.05$)。【结论】本研究确定了优势固碳微生物菌株以及适宜固定CO₂的条件, 为提升黄土高原陆地生态系统碳汇、减缓温室效应提供了理论依据和技术支持。

关键词: 黄土高原草地; 固碳微生物菌株; 固碳条件; 固碳效率; 电子供体

资助项目: 国家自然科学基金(42477372); 西北农林科技大学大学生创新创业训练计划(XN2025007089)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42477372) and the College Students' Innovative Entrepreneurial Training Program of Northwest A&F University (XN2025007089).

*Corresponding author. E-mail: ymhuang1971@nwsuaf.edu.cn

Received: 2025-02-19; Accepted: 2025-04-08; Published online: 2025-05-07

CO₂-fixing microbial strains in the grassland soil of the Loess Plateau: characteristics and CO₂ fixation conditions

LEI Fadan¹, HUANG Qian¹, LU Xiaoyu¹, CAO Yuqing¹, WEI Bin¹, XU Jiayi¹, CHEN Fang¹, WANG Baorong², HUANG Yimei^{1*}

¹ Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northwestern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China

² College of Grassland Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] To screen CO₂-fixing microbial strains in grassland soil, clarify their physiological and biochemical characteristics, and determine their optimal CO₂ fixation conditions, providing a theoretical basis for understanding the mechanisms of soil CO₂ fixation and enhancing grassland soil carbon sink. [Methods] The carbon-free solid medium and the dilution plating method were employed to isolate CO₂-fixing microbial strains from grassland soil in the Loess Plateau. The strains were identified *via* 16S rRNA gene sequencing. Physiological and biochemical characteristics of the strains were determined by Gram staining and starch hydrolysis, indole production, methyl red, and lactic acid fermentation tests. Culture experiments with carbon-free liquid medium and sterilized soil were carried out to assess the CO₂ fixation efficiency under varying temperatures (20–40 °C), soil moisture levels (3.00%–27.00%), and the presence of electron donors (NaNO₂ and Na₂S). [Results] Nine bacterial strains with effective CO₂ fixation were isolated, belonging to *Bacillus*, *Streptomyces*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Brevundimonas*, and *Prolinoborus*. Among them, strains A4 (*Agrobacterium*) and A7 (*Brevundimonas*) exhibited the highest CO₂ fixation efficiency ($P < 0.05$), both being Gram-positive. Optimal conditions for CO₂ fixation of the nine strains were 25–30 °C and soil moisture of 3.00%, 15.00%, or 27.00% ($P < 0.05$). Electron donor supplementation enhanced CO₂ fixation efficiency, and the enhancement effect followed the order: single addition of NaNO₂ > single addition of Na₂S > co-addition of NaNO₂+Na₂S ($P < 0.05$). [Conclusion] This study identified the dominant CO₂-fixing microbial strains and the conditions suitable for CO₂ fixation, providing a theoretical basis and technical support for enhancing the carbon sink of the terrestrial ecosystem on the Loess Plateau and mitigating the greenhouse effect.

Keywords: Loess Plateau grassland; CO₂-fixing microbial strains; CO₂ fixation conditions; CO₂ fixation efficiency; electron donor

作为陆地生态系统最主要的碳库，土壤有机碳的微小波动就能显著改变大气 CO₂ 浓度，影响全球碳平衡^[1]。土壤微生物碳泵理论的提出，凸显了微生物在土壤碳转化与储存过程中的核心地位^[2]。固碳微生物作为这一过程的特殊

执行者，能够同化 CO₂ 贡献有机碳库的形成，其包括光能自养型和化能自养型微生物，以及部分异养微生物^[3]。自养微生物每年为陆地有机碳库(1 550 pg)贡献 4.90 pg C^[4]，其固碳潜力不可忽视。目前已知的固碳微生物及其固碳潜力

研究, 大多采用稳定同位素标记耦合宏基因组测序技术进行, 虽能全面明确群落和固碳潜力, 但设备和操作要求高, 且无法获得功能菌株^[5-6]。最新的高通量菌株筛选技术能够快速处理大量样本、挖掘稀有固碳微生物并分析基因信息, 但存在设备成本高、对人员要求高、田间应用受限及鉴定不够精确等问题^[7]。尽管传统的分离培养法受培养基成分和培养条件限制, 可成功分离鉴定的固碳微生物种类有限^[8], 但可以获得可挖掘的菌株, 且结合目前的 PCR 测序技术, 可准确鉴定其类群^[9], 有助于挖掘土壤固碳微生物菌株资源和深入认识其生理特性。

温度、降水、生态系统与土壤类型、土壤有机质及养分含量等气候与环境因素均会影响固碳微生物群落及功能^[10-13]。能量和电子源也是影响微生物固定 CO₂ 的关键因素。在特定电子供体作用下, 固碳微生物的固碳效率可提升数倍以上^[14-16]。明确固碳菌株的固碳效率、电子供体偏好性及环境适应性, 能为后续菌株功能改良及应用提供重要理论依据^[17-19]。黄土高原气候条件恶劣, 土壤侵蚀现象严重, 土质贫瘠, 有机质含量处于较低水平。在各类土地利用方式中, 草地对于维持该地区生态系统的稳定与可持续性具有显著优势^[20]。草地覆盖了约 1/3 的黄土高原区域^[21], 该区域草地土壤固碳量占草地总固碳量的 59.53%^[22], 其中固碳微生物对有机碳的贡献率可达 0.03%^[23]。然而, 可培养固碳菌株的种类、特性、功能以及适宜的固碳条件仍不明确。

本研究聚焦黄土高原草地, 旨在从其土壤中分离鉴定 CO₂ 固定菌株, 通过 16S rRNA 基因测序分析、形态观察以及生理生化反应测定, 全面鉴定菌株。同时, 探究不同温度、不同水分, 以及亚硝酸钠(NaNO₂)和硫化钠(Na₂S) 2 种电子供体单独和共同作用对固碳菌群生长情况和固碳效率的影响, 以期确定优势固碳微生物菌株以及适宜固定 CO₂ 的条件, 为提升黄土高

原地生态系统碳汇、减缓温室效应提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤

2019 年 8 月, 在黄土高原安塞区(36°51'30"N, 109°19'23"E)选择 3 个坡向和海拔相近(100 m×100 m, 间隔 100 m)的样地。在每个样地沿“S”型布设 7 个样点, 采集 0-5 cm 表层土壤, 均匀混合为 1 个代表样品。草地主要植被包括狗尾草[*Setaria viridis* (L.) P. Beauv.]、草木樨(*Melilotus suaveolens* Ledeb.)、斜茎黄芪(*Astragalus laxmannii* Jacq.)、地锦草(*Euphorbia humifusa* Willd. ex Schtdl.)、细裂叶莲蒿(*Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm.)、兴安胡枝子[*Lespedeza davurica* (Laxm.) Schindl.]、苦马豆[*Sphaerophysa salsula* (Pall.) DC.]和披针叶野决明(*Thermopsis lanceolata* R. Br.)。3 个土壤样品的理化性质并无显著差异($P < 0.05$), 土壤呈偏碱性, pH 值为 8.24±0.09, 含水率为 (15.00±2.00)%, 有机碳含量为 (5.74±0.98) g/kg, 全氮含量为 (0.64±0.07) g/kg。

1.1.2 培养基

本研究使用的培养基包括: 无碳源培养基^[24]、淀粉培养基^[22]、葡萄糖蛋白胨水培养基^[25]、蛋白胨水培养基^[22]、乳酸发酵培养基^[25]。

1.2 CO₂ 固定菌株的分离纯化、筛选及鉴定

1.2.1 分离纯化及筛选

将 10.00 g 土壤样品充分混合于 90 mL 无菌水中, 30 °C、150 r/min 振荡 20 min 后制成土壤悬浊液。将悬浊液进行浓度稀释(无菌操作), 并吸取 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释浓度下的样品悬浊液 1 mL 均匀涂布于无碳源固体培养基(凝结物质: 琼脂)上, 28 °C 倒置培养 10-14 d (光 12 h+暗 12 h)。待菌株长出后, 进行多次划线分离纯化, 挑取单菌落于 4 °C 保存备用。

1.2.2 菌体总 DNA 的提取及 16S rRNA 基因鉴定

将挑取的单菌落接种于无碳源液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 48 h。培养结束后吸取菌液至无菌 5 mL 离心管中, 25 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 储存在 4 °C 冰箱中。按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒的操作步骤, 提取不同菌株的基因组 DNA, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。细菌物种鉴定由上海美吉生物医药科技有限公司 (Shanghai Majorbio Bio-pharm Technology Co., Ltd.) 完成。采用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 10×*Ex Taq* buffer 2.00 μL, *Ex Taq* (5 U/μL) 0.20 μL, dNTP Mix (2.50 mmol/L) 1.60 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 0.50 μL, ddH₂O 13.70 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 25 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增完成后, 以 120 V 电压进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min。扩增的序列使用 ABI 3730XL 测序仪进行一代双末端测序, 获得 ABI 测序峰图文件。将正常峰的菌株碱基序列与 NCBI GenBank 核酸序列数据库进行比对, 获取近源物种信息, 并构建系统发育树[原始数据存储在 国家微生物科学数据中心 (<http://nmdc.cn>), 编号为 NMDCN0007OUI、NMDCN0007OUJ、NMDCN0007OUK、NMDCN0007OUL、NMDCN0007OUM、NMDCN0007OUN、NMDCN0007OUO、NMDCN0007OUP、NMDCN0007OUQ、NMDCN0007OUR]。

1.3 CO₂ 固定菌株的形态及生理生化特性测定

1.3.1 菌株革兰氏染色

对分离筛选到的菌株进行菌落特征、生长情况的观察以及革兰氏染色、镜检^[26]。

1.3.2 菌株生理生化试验

将分离筛选到的菌株进行淀粉水解试验、吲哚试验、甲基红试验以及乳酸发酵试验, 观察并记录生理生化反应结果^[27]。

1.4 不同温度梯度和电子供体对菌株固碳效率影响的模拟试验

将 40 mL 无碳源液体培养基装入 100 mL 三角瓶, 灭菌后加入 1 mL 菌液, 用封口膜封口, 置于摇床 (28 °C、100 r/min) 振荡培养 72 h 活化菌株。

采用单时间点终止培养法探讨温度对固碳微生物的影响, 选择 20–40 °C 作为温度探究区间, 此范围覆盖了该地区一年中大部分时段的土壤温度变化, 能够有效考察固碳微生物在黄土高原常规温度条件下的生长与固碳表现^[28]。设计 5 个温度梯度: 20、25、30、35、40 °C, 吸取活化后的菌株 1 mL 接种于无碳源液体培养基中在不同温度梯度下置于摇床 (100 r/min) 振荡培养 72 h。

采用单时间点终止培养法探讨电子供体对固碳微生物的影响, 设计 NaNO₂ 和 Na₂S 这 2 种处理, 采用 0 g/L 和 1.00 g/L 两个浓度水平。将各菌株接种于无碳源液体培养基中, 分别加入对应浓度水平的电子供体后, 置于摇床 (100 r/min) 振荡培养 72 h。

1.5 不同水分对菌株固碳效率影响的模拟试验

在水分条件设置上, 基于黄土高原降水不稳定, 土壤水分在不同季节和年份呈现出较大幅度变化的特点^[28], 以该地区草地土壤自然水分 (15.00%) 为基准, 增设增减 30.00%、增减 60.00% 以及增减 80.00% 的梯度, 系统研究固碳微生物在接近自然状态下不同水分胁迫与充裕条件下的固碳特性。土壤水分设计 7 个梯度: 3.00%、6.00%、10.50%、15.00%、19.50%、24.00% 和 27.00% 含水率。称取安塞草地表层土壤 13.00 g 于 50 mL 烧杯中, 铺成 1 cm 厚的薄

层，封口并扎紧，并使用高压蒸汽灭菌锅(121 °C、20 min)将土壤灭菌 6 次并烘干。在不同水分梯度下添加菌液 1 mL，于 28 °C 下培养 30 d。培养期间，间隔 3 d 补充灭菌蒸馏水，以维持土壤含水率。

1.6 基础指标和固碳效率的测定及计算

土壤含水率采用称重法测定，土壤 pH 通过土水质量体积比 1:2.5 使用 pH 计测定，土壤有机碳(soil organic carbon, SOC)采用重铬酸钾外加热法^[23]测定，土壤总氮采用凯氏定氮法^[23]测定，菌液总有机碳(total organic carbon, TOC)值通过总有机碳分析仪(岛津公司)进行测定，测定时需提前用浓盐酸将待测菌液调至 pH 4.0 左右，以消除无机碳对测定结果的影响。

不同温度梯度和电子供体条件下菌株固碳效率 TOC (mg/L)的计算如公式(1)所示。

$$\text{TOC}=\text{TOC}_{72\text{h}} \quad (1)$$

式中：TOC_{72h} (mg/L)为液体培养基培养 72 h 后的 TOC 值。

不同水分梯度条件下菌株固碳效率 ΔSOC [g/(kg·d)]的计算如公式(2)所示。

$$\Delta\text{SOC}=(\text{SOC}_{30\text{d}}-\text{SOC}_{0\text{d}})/30 \quad (2)$$

式中：SOC_{30d} (g/kg)为添加菌株后培养第 30 天时的土壤有机碳含量，SOC_{0d} (g/kg)为添加菌株后培养第 0 天时的土壤有机碳含量，30 为培养天数。

1.7 数据处理和分析方法

所有数据均以平均值±标准偏差的形式表示。使用 SPSS 软件对所有样品进行单因素方差分析以及最小显著差异多重比较，以显著性水平($P<0.05$)分析组间数据的差异。数据绘图在 Origin 2018 中完成。

2 结果与分析

2.1 黄土高原草地土壤中可培养的 CO₂ 固定菌株

从草地土壤中分离得到了 24 株菌株，测定

第 1、2、5、6、7、11、13、14、16 和 22 株菌在 1 400 bp 附近出现的 PCR 产物条带清晰，未观察到明显的非特异性条带或拖尾现象，且 ABI 测序峰图为正常峰，证实以上 10 株菌株为纯菌株。将 10 株纯菌株的碱基序列输入 NCBI GenBank 核酸序列数据库进行比对，结果显示：1 号菌株与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) M9 相似度为 98.32%，属于假单胞菌属；2 号菌株与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) LPBS12 相似度为 91.80%，属于芽孢杆菌属；5 号菌株与链霉菌属(*Streptomyces*) FXJ3.004 相似度为 98.94%，属于链霉菌属；6 号菌株与草木栖剑菌(*Sinorhizobium meliloti*) TSA1 相似度为 98.75%，属于剑菌属；7 号菌株与农杆菌属(*Agrobacterium*) CRR1-74 SB13A 相似度为 97.68%，属于农杆菌属；11 号菌株与链霉菌属(*Streptomyces*) IRB27B 相似度为 96.84%，属于链霉菌属；13 号菌株与华西医院肠杆菌(*Enterobacter huaxiensis*) N7 相似度为 98.06%，属于肠杆菌属；14 号菌株与泡囊短波单胞菌(*Brevundimonas vesicularis*) TK026 相似度为 95.55%，属于短波单胞菌属；16 号菌株与农杆菌属(*Agrobacterium*) S3D11 相似度为 98.96%，属于农杆菌属；22 号菌株与小束噬脯氨酸菌(*Prolinoborus fasciculus*) L61 相似度为 97.56%，属于噬脯氨酸菌属(图 1)。其中芽孢杆菌属菌株隶属于厚壁菌门，链霉菌属菌株隶属于放线菌门，其余菌株均隶属于变形菌门。

对以上 10 株纯菌株进行初步筛选，发现 1 号菌株在后续预培养过程中对试验条件极为敏感，培养基成分或培养条件的轻微波动都会导致其生长停滞。基于以上原因，为了确保试验过程高效稳定、结果准确可靠，后续研究中仅选取了其余 9 株纯菌株作为研究对象，并对这 9 株纯菌株重新编号。原 2、5、6、7、11、13、14、16、22 号菌株分别重新编号为 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9。

2.3 不同温度对 CO₂ 固定菌株固碳效率的影响

可培养的 CO₂ 固定菌株在不同温度下均表现出一定的固碳能力，且对温度变化的响应规律一致：在 25–30 °C 时固碳效率达到峰值，温度升高或降低均会导致固碳效率下降(图 2, $P < 0.05$)。在 25 °C 和 30 °C 时，菌株 A4 的固碳效率在所有受试菌株中最高，分别为 4.04 mg/L 和 3.98 mg/L，而其他菌株在这 2 个温度下的平均固碳效率分别为 3.20 mg/L 和 3.16 mg/L。与 20、35、40 °C 相比，菌株 A4 在 25 °C 时的 TOC 值分别显著增加了 77.30%、71.50% 和 95.90%；在 30 °C 时，其 TOC 值相比上述温度也分别显著提升了 74.70%、69.00% 和 93.00%。

2.4 不同土壤水分对 CO₂ 固定菌株固碳效率的影响

可培养的 CO₂ 固定菌株对土壤水分变化的响应规律一致(图 3, $P < 0.05$)。在自然水分(15.00%)及增减 80.00%(27.00% 和 3.00%)的水分条件下，菌株固碳效率最高。其中，菌株 A4

在 3.00% 和 27.00% 水分条件下的固碳量显著高于其他水分条件，分别达到 0.15 g/(kg·d) 和 0.11 g/(kg·d)。在 15.00% 水分条件下，各菌株固碳量无显著差异。在 10.50% 水分条件下，菌株 A8 固碳量最高，为 0.03 g/(kg·d)；19.50% 水分条件下，菌株 A2 固碳量最高，为 0.02 g/(kg·d)；在 6.00% 水分条件下，各菌株固碳量无显著差异；在 24.00% 水分条件下，菌株 A4 和 A5 固碳量最高，均为 0.01 g/(kg·d)。在 3.00% 水分条件下，菌株 A6 和 A7 固碳量最低，分别为 0.06 g/(kg·d) 和 0.05 g/(kg·d)；27.00% 水分条件下，菌株 A6 固碳量最高，达到 0.19 g/(kg·d)。

2.5 不同电子供体对 CO₂ 固定菌株固碳效率的影响

同一菌株在不同电子供体处理条件下的固碳效率差异显著：单独添加 NaNO₂>单独添加 Na₂S>共同添加 NaNO₂+Na₂S>空白对照(图 4, $P < 0.05$)。在空白对照组中，菌株 A4 和 A7 的固碳量最高，TOC 值分别为 4.22 mg/L 和 4.08 mg/L，其余菌株的平均固碳量为 3.42 mg/L。添加电子

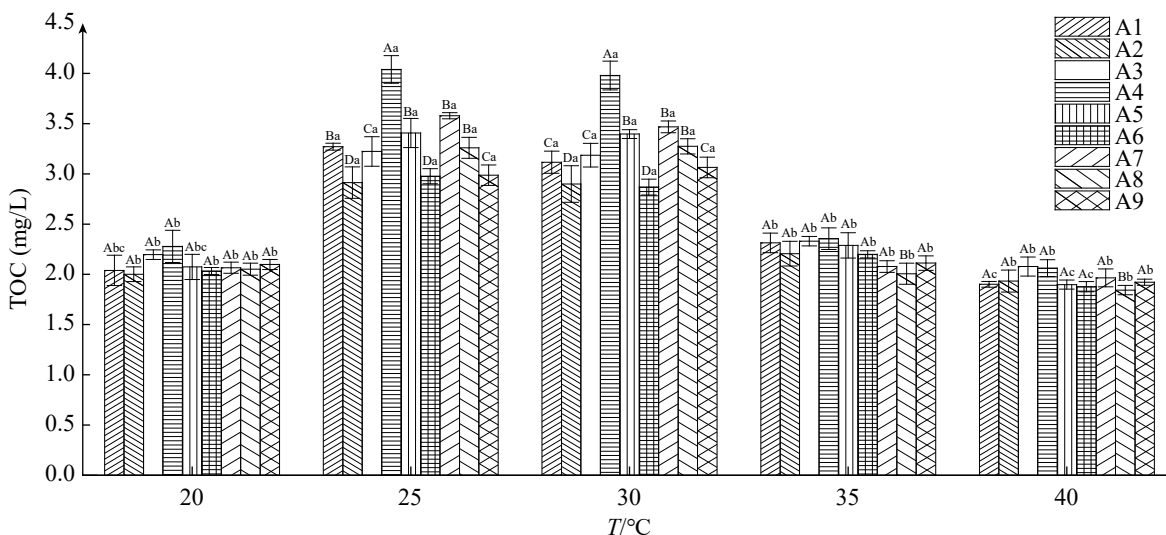


图2 不同温度对CO₂固定菌株固碳效率的影响

Figure 2 Effects of different temperatures on CO₂ fixation efficiency of CO₂-fixing strains. Different lowercase letters: The significant difference between different treatments of the same strain ($P < 0.05$); Different capital letters: The significant differences among different strains under the same treatment conditions ($P < 0.05$).

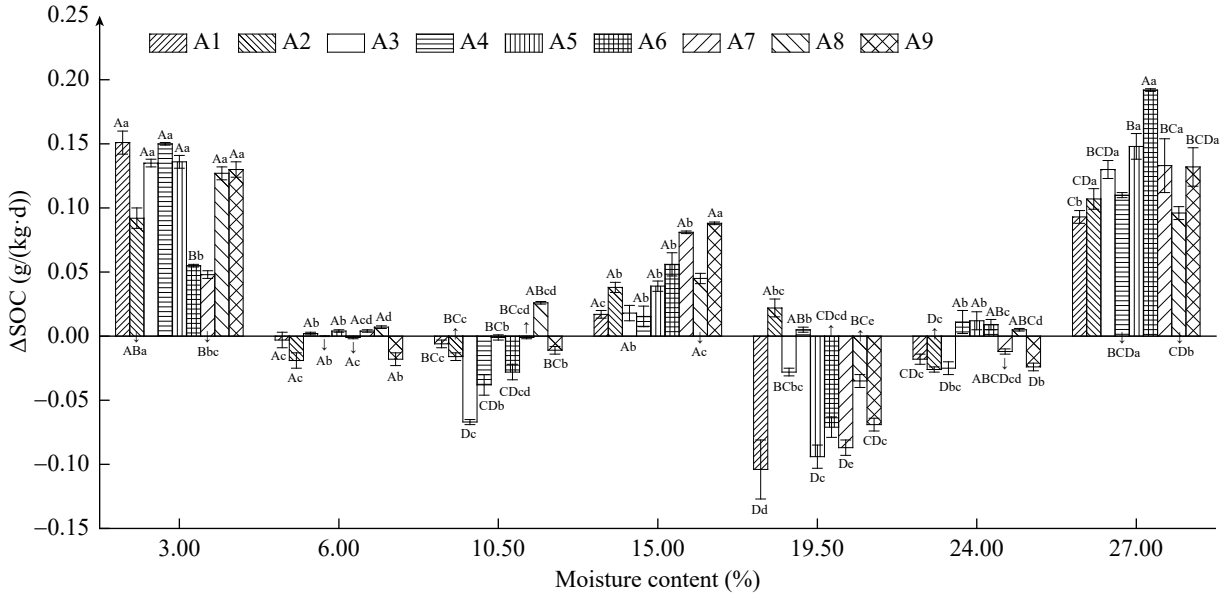


图3 不同水分对CO₂固定菌株固碳效率的影响

Figure 3 Effects of different moisture on CO₂ fixation efficiency of CO₂-fixing strains. Different lowercase letters: The significant difference between different treatments of the same strain ($P<0.05$); Different capital letters: The significant differences among different strains under the same treatment conditions ($P<0.05$).

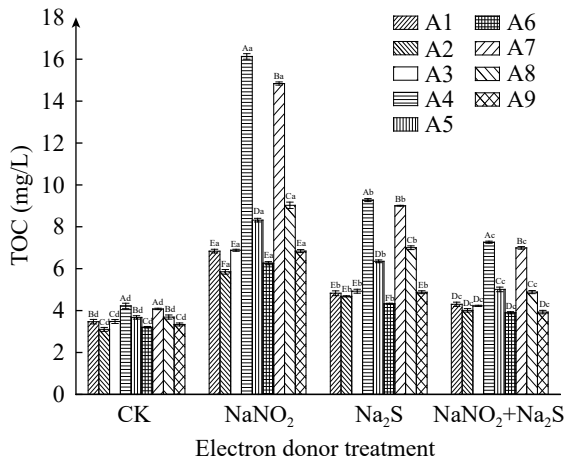


图4 不同电子供体对CO₂固定菌株固碳效率的影响

Figure 4 Effects of different electron donors on CO₂ fixation efficiency of CO₂-fixing strains. CK: Blank control; Different lowercase letters: The significant difference between different treatments of the same strain ($P<0.05$); Different capital letters: The significant differences among different strains under the same treatment conditions ($P<0.05$).

供体后，固碳效率显著提升，其中提升最显著的是菌株 A4，其次是 A7。单独添加 NaNO₂ 时，菌株 A4 的 TOC 值达到 16.10 mg/L，是空白对照组的 3.82 倍；菌株 A7 的 TOC 值为 14.80 mg/L，是空白对照组的 3.64 倍。单独添加 Na₂S 时，菌株 A4 的 TOC 值为 9.28 mg/L，是空白对照组的 2.20 倍；菌株 A7 的 TOC 值为 9.00 mg/L，是空白对照组的 2.21 倍。共同添加 NaNO₂+Na₂S 时，菌株 A4 的 TOC 值为 7.26 mg/L，是空白对照组的 1.72 倍；菌株 A7 的 TOC 值为 6.99 mg/L，是空白对照组的 1.71 倍。此外，菌株 A5 和 A8 在不同电子供体环境下的固碳量仅次于 A4 和 A7。菌株 A5 在单独添加 NaNO₂、Na₂S 及共同添加 NaNO₂+Na₂S 环境下的固碳量分别为 8.32、6.35、5.01 mg/L；菌株 A8 对应值分别为 9.03、7.00、4.89 mg/L。其余 5 株菌株在单独添加 NaNO₂、单独添加 Na₂S 和共同添加 NaNO₂+Na₂S 环境下的平均固碳量分别为 6.54、4.73、4.07 mg/L。

3 讨论

3.1 黄土高原草地土壤中可培养的 CO₂ 固定菌

本研究从黄土高原草地土壤中成功分离筛选出 9 株 CO₂ 固定菌株, 这些菌株与从海水、深海热液区筛选出的化能自养菌, 包括弧菌属 (*Vibrio*)、硫膨大杆菌属 (*Thioclava*)、大洋芽孢杆菌属 (*Oceanobacillus*)、食烷菌属 (*Alcanivorax*)、氢单胞菌属 (*Hydrogenimonas*)、氧化硫单胞菌属 (*Sulfurimonas*) 及硫化螺旋菌属 (*Sulfurospirillum*) 等, 分属于不同的微生物类群^[14,29]; 与从种植花生的农田土壤中筛选出的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) SS105 及种植竹子的根际土壤中筛选出的链霉菌属 (*Streptomyces*) BS19 属于相同菌属^[9,30], 但具体菌株有所不同。前人筛选出的酸硫杆状菌属 (*Acidithiobacillus*) 和食酸菌属 (*Acidovorax*) 等固碳菌株, 因其独特的生理代谢特征和极端环境适应性, 已广泛应用于生物浸出、生物修复等领域^[31-32]。本研究的 9 株固碳菌株均为新菌株, 能在更宽的温度和湿度范围内保持高固碳效率, 且对特定电子供体的利用效率更高, 为土壤碳汇提供了新的资源^[33]。在无碳源培养基中, 通过终态 TOC 值的增加, 证实了菌株能够同化 CO₂ 合成有机碳^[34]。尽管未测定初始 TOC 背景值可能存在轻微误差, 但菌株间终态 TOC 的显著差异仍清晰地呈现出固碳效率的排序^[35]。其中, A4 和 A7 的固碳效率最高, 终态 TOC 值分别达到 4.22 mg/L 和 4.08 mg/L。需要注意的是, 实验室中的单菌培养与土壤中环境不同, 土壤中复杂的碳源可能抑制菌株固碳酶的活性^[36], 空间异质性也可能限制 CO₂ 的扩散^[37]。因此, 菌株在实际土壤中的固碳效能需要借助 ¹³C 同位素标记微宇宙试验进行验证^[38], 并结合转录组学解析其在多碳源胁迫下的代谢调控网络^[39]。未来的研究将整合固碳动力学建模、菌体-分泌碳分配量化^[40]以及田间原位验证, 以评估菌株在生态固碳工程中的应用潜力。

3.2 温度和水分对 CO₂ 固定菌的影响

本研究筛选的可培养 CO₂ 固定菌株, 在 25–30 °C 区间内固碳效率达到峰值, 推测该温度范围有利于提升固碳酶的活性, 而温度的升高或降低则因抑制酶活性而导致固碳效率降低^[41]。不同生态系统的固碳菌株最适固碳温度区间存在差异, 例如武满满等^[10]从海水及其沉积物中分离的固碳微生物在 20–30 °C 时固碳效率较低, 但温度的改变反而能提升其效率。这可能源于不同生态环境使菌株进化出了不同的适应策略^[41]。黄土高原草地夏季高温期长、冬季寒冷且温差大^[22,28], 本研究菌株在较大温度范围内具有固碳能力, 预示其在该地区具有良好的应用潜力。研究还发现, 菌株在自然水分(15.00%)及极端水分(3.00% 和 27.00%)条件下均表现出显著的固碳效率峰值, 呈现出“双向胁迫响应”特性, 这可能与固碳菌维持代谢活性的多维度适应策略相关^[42-43]。黄土高原降水不均, 早雨季土壤水分差异大^[28], 这些菌株能够适应此类极端水分变化。在自然水分条件下, 微生物细胞的生理功能稳定, 有利于固碳酶发挥活性^[5]; 而在水分极低(3.00%)时, 固碳菌启动应激反应, 合成相容性溶质、表达特殊转运蛋白以提高固碳效率^[27]; 在水分极高(27.00%)时, 固碳菌可能调整代谢途径以应对缺氧挑战(如采用厌氧还原柠檬酸循环或乙酰辅酶 A 途径)^[5]。此外, 在 15.00% 和 6.00% 水分条件下, 9 株菌株的固碳效率无显著差异, 这可能是由于相关代谢途径及关键酶的运行状态相同^[27]。

3.3 电子供体 (NaNO₂ 和 Na₂S) 对 CO₂ 固定菌的影响

研究表明, NaNO₂ 和 Na₂S 作为电子供体, 可有效提升 CO₂ 固定菌的固碳效率, 这与化能自养型固碳微生物以还原性无机物为能源、CO₂ 为碳源合成生命物质时的 ATP 合成及无机化合物氧化过程相关^[14]。黄土高原草地土壤中含有一定量的 NO₂⁻ 和 S²⁻^[44], 该研究结果对区

域固碳应用具有重要意义。在空白对照中, 菌株 A4 和 A7 的固碳效率较高。添加电子供体后, A4 的固碳效率提升效果显著且在各菌株中最高, A7 次之。这表明 A4 和 A7 自身固碳能力强, 为深入研究黄土高原草地土壤环境中微生物固碳机制提供了优质的菌株模型。单独添加 NaNO_2 时, 提升固碳效率的效果最显著, 其次单独添加 Na_2S 。这与 Hu 等^[43]的研究相反(其研究中, Na_2S 对从海水中分离的非光合微生物群落固 CO_2 效率的提升效果高于 NaNO_2), 可能是本试验菌株对 NO_2^- 的利用能力强, 有利于其在 NO_2^- 环境下繁殖及还原 CO_2 ^[45]。研究表明, 合适的电子供体可优化微生物的呼吸代谢途径, 增强 CO_2 固定能力^[43]。单独添加 Na_2S 时, 固碳效果次之, 这可能是因为 S^{2-} 参与菌株代谢时, 氧化过程的能量和电子传递效率较低; 共同添加 NaNO_2 和 Na_2S 时, 固碳效果反而减弱, 甚至低于单独添加 Na_2S , 这可能是 NO_2^- 和 S^{2-} 存在竞争性关系, 干扰了菌株细胞内电子传递链和能量代谢; 在微生物代谢中, 电子传递链是固碳反应能量产生的关键, NO_2^- 和 S^{2-} 竞争关键酶, 影响酶正常作用和能量产生效率^[46]。例如在某些固碳微生物中, 细胞色素氧化酶对 NO_2^- 和 S^{2-} 的亲合力不同, 二者同时存在会打破酶与底物结合的平衡, 影响电子传递, 进而降低固碳效率^[47-49]。

本研究表明, 温度、水分和电子供体显著影响菌株的固碳能力, 且不同菌株之间的差异明显。未来在黄土高原草地退化区的生态修复中, 可根据需要定制菌剂: 在环境恶劣的退化区, 选用 A4、A7 等固碳能力强、适应性好的菌株, 加快生态恢复; 在环境温和的退化区, 选择 A2 等菌株, 优化微生物群落, 提升土壤碳汇能力。

4 结论

(1) 本研究从黄土高原草地土壤中筛选鉴定出 9 株 CO_2 固定菌, 分属芽孢杆菌属、链霉菌

属、剑菌属、农杆菌属、肠杆菌属、短波单胞菌属、噬脲氨酸菌属。其中, A4 和 A7 的固碳效率显著高于其他菌株($P<0.05$)。(2) 这些菌株在 20–40 °C 均可固定 CO_2 , 25–30 °C 为最适温度。在土壤自然水分(15.00%)及增减 80.00% 含水率(27.00% 和 3.00%)的极端条件下, 固碳效率最高($P<0.05$)。(3) 添加电子供体能提升固碳效率, 提升效果依次为: 单独添加 NaNO_2 >单独添加 Na_2S >共同添加 $\text{NaNO}_2+\text{Na}_2\text{S}$ ($P<0.05$)。本研究深化了对固碳微生物的认知, 为增强黄土高原土壤固碳微生物活性提供了理论支撑。

作者贡献声明

雷发丹: 数据收集和处理, 文章撰写和修改; 黄倩: 研究构思和设计; 陆晓钰: 协助固碳条件探究试验; 曹雨晴: 协助筛菌工作; 魏宾: 协助菌株特性测定; 徐嘉宜: 协助筛菌工作; 陈芳: 协助指标测定; 王宝荣: 参与文章讨论; 黄懿梅: 项目管理, 经费支持, 文章审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] NIU XG, ZHANG SL, ZHANG CB, YAN PK, WANG H, XU WT, SONG MK, AURANGZEIB M. Key factors influencing the spatial distribution of soil organic carbon and its fractions in Mollisols[J]. *Catena*, 2024, 247: 108522.
- [2] 朱雪峰, 孔维栋, 黄懿梅, 肖可青, 罗煜, 安韶山, 梁超. 土壤微生物碳泵概念体系 2.0[J]. *应用生态学报*, 2024, 35(1): 102-110.
ZHU XF, KONG WD, HUANG YM, XIAO KQ, LUO Y, AN SS, LIANG C. Soil microbial carbon pump conceptual framework 2.0[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2024, 35(1): 102-110 (in Chinese).
- [3] 赵立成. 盐沼湿地土壤固碳菌的分离鉴定与固碳特性研究[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2024.
ZHAO LC. Isolation, identification of carbon-fixing bacteria from salt marsh wetland soil and characteristics

- of carbon sequestration[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2024 (in Chinese).
- [4] YUAN HZ, GE TD, CHEN CY, O'DONNELL AG, WU JS. Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(7): 2328-2336.
- [5] 郭强, 韩子琛, 夏允, 杨柳明, 范跃新, 杨玉盛. 土壤微生物固碳机理及其影响因素研究进展[J]. *植物生态学报*, 2024, 48(11): 1406-1421.
GUO Q, HAN ZC, XIA Y, YANG LM, FAN YX, YANG YS. Study advances on the mechanism of soil microbial carbon fixation and associated influencing factors[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2024, 48(11): 1406-1421 (in Chinese).
- [6] LIU X, WU QS, WANG H, ZHAO Y, LIU ZH, YUAN Q. Effects of different land-use types on the activity and community of autotrophic microbes in Karst soil[J]. *Geoderma*, 2023, 438: 116635.
- [7] HE SJ, YANG LH, DU YH, TONG LL, WANG Y, GUO DS. Development of a novel microplate for high-throughput screening and optimization of DHA producing strains based on CFD technology[J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(11): e2300169.
- [8] 张亚茹, 申振涛, 吴小红, 廖清颖. 土壤自养固碳微生物研究进展与热点分析[J]. *广西林业科学*, 2024, 53(1): 124-134.
ZHANG YR, SHEN ZT, WU XH, LIAO QY. Analysis on progress and hotspots of research on carbon dioxide fixation by autotrophic microorganisms in soils[J]. *Guangxi Forestry Science*, 2024, 53(1): 124-134 (in Chinese).
- [9] MAHESHWARI N, KUMAR M, THAKUR IS, SRIVASTAVA S. Cloning, expression and characterization of β - and γ -carbonic anhydrase from *Bacillus* sp. SS105 for biomimetic sequestration of CO₂[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 445-452.
- [10] 武满满, 孙佩哲, 胡佳俊, 王磊, 李军, 付小花, 乐毅全. 温度、pH对非光合微生物菌群固碳效率的影响及其成因分析[J]. *工业微生物*, 2012, 42(1): 45-51.
WU MM, SUN PZ, HU JJ, WANG L, LI J, FU XH, LE YQ. Influence of temperature and pH on CO₂ fixation by a non-photosynthetic microbial community and its mechanism analysis[J]. *Industrial Microbiology*, 2012, 42(1): 45-51 (in Chinese).
- [11] 尤云楠, 朱燕峰, 陈浮, 程彦郡, 董文雪, 马静. 植被类型对露天矿复垦土壤微生物固碳潜力及路径的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2023, 39(9): 1170-1179.
YOU YN, ZHU YF, CHEN F, CHENG YJ, DONG WX, MA J. Effects of vegetation types on the potential and pathway of microbial carbon sequestration in reclaimed soil of open-pit mine[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2023, 39(9): 1170-1179 (in Chinese).
- [12] GE TD, WU XH, LIU Q, ZHU ZK, YUAN HZ, WANG W, WHITELEY AS, WU JS. Effect of simulated tillage on microbial autotrophic CO₂ fixation in paddy and upland soils[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19784.
- [13] LYNN TM, GE TD, YUAN HZ, WEI XM, WU XH, XIAO KQ, KUMARESAN D, YU SS, WU JS, WHITELEY AS. Soil carbon-fixation rates and associated bacterial diversity and abundance in three natural ecosystems[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(3): 645-657.
- [14] 祝思媛, 席雪飞, 王磊. 混合电子供体促进非光合微生物菌群固碳效率的分子生态机制[J]. *工业微生物*, 2019, 49(6): 1-8.
ZHU SY, XI XF, WANG L. Molecular ecological mechanism of mixed electron donors promoting carbon fixation efficiency of non-photosynthetic microbial community[J]. *Industrial Microbiology*, 2019, 49(6): 1-8 (in Chinese).
- [15] 武满满, 孙佩哲, 胡佳俊, 王磊, 李军, 廖元琨, 魏恺. 混合电子供体对好氧非光合微生物菌群固碳效率影响的析因实验分析[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(6): 1220-1226.
WU MM, SUN PZ, HU JJ, WANG L, LI J, LIAO YK, WEI K. Effect evaluation of different electron donors on CO₂ fixation by a non-photosynthetic microbial community under aerobic conditions using factorial design[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(6): 1220-1226 (in Chinese).
- [16] ALVAREZ-GUZMÁN CL, MUÑOZ-PÁEZ KM, VALDEZ-VAZQUEZ I. Effect of electron donors on CO₂ fixation from a model cement industry flue gas by non-photosynthetic microbial communities in batch and continuous reactors[J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16(12): 2387-2400.
- [17] 何媛秋, 李存, 陈柔雯, 崔林青, 田新朋. 不同培养条件对海洋沉积环境细菌的选择性分离[J]. *生物资源*, 2020, 42(5): 540-548.
HE YQ, LI C, CHEN RW, CUI LQ, TIAN XP. Selective isolation of bacteria from marine sedimentary environment by different culture conditions[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 540-548 (in Chinese).
- [18] RAMONEDA J, STALLARD-OLIVERA E, HOFFERT M, WINFREY CC, STADLER M, NIÑO-GARCÍA JP, FIERER N. Building a genome-based understanding of bacterial pH preferences[J]. *Science Advances*, 2023, 9(17): eadf8998.
- [19] 胡佳俊, 王磊, 李艳丽, 付小花, 乐毅全, 徐殿胜, 陆兵, 于建国. 非光合CO₂同化微生物菌群的选育/优化及其群落结构分析[J]. *环境科学*, 2009, 30(8): 2438-2444.
HU JJ, WANG L, LI YL, FU XH, LE YQ, XU DS, LU B, YU JG. Breeding, optimization and community structure analysis of non-photosynthetic CO₂ assimilation microbial flora[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(8):

- 2438-2444 (in Chinese).
- [20] WANG Y, LI CY, HU SJ. Land use effects on the dynamics of soil C, N and microbes in the water-wind erosion crisscross region of the northern Loess Plateau, China[J]. *Pedosphere*, 2024, 34(1): 181-190.
- [21] WANG YY, DENG L, WU GL, WANG KB, SHANGGUAN ZP. Estimates of carbon storage in grassland ecosystems on the Loess Plateau[J]. *Catena*, 2018, 164: 23-31.
- [22] 黄倩. 黄土高原土壤固碳微生物及其固定 CO₂ 的机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
HUANG Q. The mechanism of CO₂ fixation by soil carbon-fixation microorganisms in the Loess Plateau[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [23] HUANG Q, HUANG YM, WANG BR, DIPPOLD MA, LI HH, LI N, JIA PH, ZHANG HX, AN SS, KUZYAKOV Y. Metabolic pathways of CO₂ fixing microorganisms determined C-fixation rates in grassland soils along the precipitation gradient[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 172: 108764.
- [24] 郭珺, 樊芳芳, 王立革, 武爱莲, 郑军. 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.
GUO J, FAN FF, WANG LG, WU AL, ZHENG J. Isolation, identification of carbon-fixing bacteria and determination of their carbon-fixing abilities[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(1): 90-97 (in Chinese).
- [25] 黄青兰, 袁文婧, 庄原, 罗清, 彭程, 叶波平. 一株青藏高原来源的链霉菌菌株鉴定及其抑菌活性的初步分析[J]. *药物生物技术*, 2016, 23(4): 308-312.
HUANG QL, YUAN WJ, ZHUANG Y, LUO Q, PENG C, YE BP. Identification of a *Streptomyces* strain isolated from Qinghai-Xizang Plateau and its antibacterial activity[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2016, 23(4): 308-312 (in Chinese).
- [26] 徐德峰, 李彩虹, 王雅玲, 叶日英, 孙力军. 细菌革兰氏染色探究式实验教学设计 and 实施效果分析[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(5): 871-876.
XU DF, LI CH, WANG YL, YE RY, SUN LJ. Experimental design and efficiency assessment of Bacterium gram stain based on inquiry teaching[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(5): 871-876 (in Chinese).
- [27] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
SHEN P. *Microbiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese).
- [28] 郝睿超, 王淇葆, 王辰, 董冰雪, 玛尔比亚古丽·斯拉依, 张天旭, 姚宁. 气候变化背景下黄土高原干湿演变特征及成因分析[J]. *灌溉排水学报*, 2024, 43(12): 74-83.
HAO RC, WANG QB, WANG C, DONG BX, MAERBIYAGULI·Silayi, ZHANG TX, YAO N. Alterations in drying and wetting spells and their determinants in the Loess Plateau under the influence of climate change[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2024, 43(12): 74-83 (in Chinese).
- [29] 刘贝贝. 深海热液区高温化能自养菌 *Hydrogenimonas thermophila* SWIR-17 的氢/硫氧化特性的研究[D]. 北京: 中国地质大学(北京)硕士学位论文, 2021.
LIU BB. The hydrogen- and sulfur-oxidation metabolism of thermophilic chemolithoautotroph *Hydrogenimonas thermophila* SWIR-17 isolated from deep-sea hydrothermal vent[D]. Beijing: Master's Thesis of China University of Geosciences, 2021 (in Chinese).
- [30] SANGEETHA M, SIVARAJAN A, RADHAKRISHNAN M, SIDDHARTHAN N, BALAGURUNATHAN R. Biosequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase from novel *Streptomyces kunmingensis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(5): 270.
- [31] 高雪彦, 陈林旭, 陈显轲, 庞昕, 潘登, 林建群. 嗜酸硫杆菌在工农业中的应用[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(5): 36-46.
GAO XY, CHEN LX, CHEN XK, PANG X, PAN D, LIN JQ. Application of *Acidithiobacillus* spp. in industry and agriculture[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(5): 36-46 (in Chinese).
- [32] 彭科, 欧阳泽坪, 吴晓燕, 王红帅, 杨柯, 叶坚, 大贯敏彦. 氢自养微生物的驯化及其反硝化特性研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 821-833.
PENG K, OUYANG ZP, WU XY, WANG HS, YANG K, YE J, OHNUKI Toshihiko. Cultivation of hydrogenotrophic microorganisms and the denitrification characteristics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 821-833 (in Chinese).
- [33] LATAGAN MJD, NAGARAJAN D, HUANG WM, de LUNA MDG, CHEN JH, ROLLON AP, NG IS, LEE DJ, CHANG JS. Bicarbonate-based microalgal cultivation technologies: mechanisms, critical strategies, and future perspectives[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 502: 157998.
- [34] 赵志敏, 叶永安, 王硕仁, 朱陵群, 高永红, 孙逸坤. 细胞培养实验中条件培养基相关问题探讨[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2010, 20(1): 23-26.
ZHAO ZM, YE YA, WANG SR, ZHU LQ, GAO YH, SUN YK. Study on the conditioned medium *in vitro* experiments[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*, 2010, 20(1): 23-26 (in Chinese).
- [35] GAO M, SHEN Y, PENG Y, TAN FY, LV YS, ZHU CJ, GUO YX, LIU X. Bioenhancement mechanism of PVA-SA immobilized composite strains *Alishewanella fetalis* and *Exiguobacterium profundum* in pyridine degradation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2025, 213: 109559.
- [36] SHAMSHITOV A, SATKEVIČIŪTĖ E, DECOROSI F, VITI C, SUPRONIENĖ S. Phenotypic profiling of selected cellulolytic strains to develop a crop residue-

- decomposing bacterial consortium[J]. *Microorganisms*, 2025, 13(1): 193.
- [37] CHEN XL, GE H, CHEN JW, WANG CZ. Impact of pore heterogeneity on CO₂ capture efficiency in porous media[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2025, 215: 77-82.
- [38] HÜGLER M, SIEVERT SM. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2011, 3: 261-289.
- [39] LV CY, HE Y, JIANG ZQ, HU WJ, ZHANG M. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses reveal critical gene regulatory network in response to drought stress in *Dendrobium Nobile* Lindl[J]. *BMC Plant Biology*, 2025, 25(1): 145.
- [40] TANG KH, BLANKENSHIP RE. Both forward and reverse TCA cycles operate in green sulfur bacteria[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(46): 35848-35854.
- [41] 辛明秀, 周培瑾. 温度对嗜冷酵母糖代谢途径某些关键酶的活性效应[J]. *微生物学报*, 2000, 40(5): 518-522.
XIN MX, ZHOU PJ. Effect of temperature on the activity of some enzymes representative of emp pathway and tca cycle in psychrophilic yeast[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(5): 518-522 (in Chinese).
- [42] OKYAY TO, NGUYEN HN, CASTRO SL, RODRIGUES DF. CO₂ sequestration by ureolytic microbial consortia through microbially-induced calcite precipitation[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 572: 671-680.
- [43] HU JJ, WANG L, ZHANG SP, FU XH, LE YQ. Optimization of electron donors to improve CO₂ fixation efficiency by a non-photosynthetic microbial community under aerobic condition using statistical experimental design[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 7062-7067.
- [44] LIAO LR, WANG J, DIJKSTRA FA, LEI SL, ZHANG L, WANG XJ, LIU GB, ZHANG C. Nitrogen enrichment stimulates rhizosphere multi-element cycling genes via mediating plant biomass and root exudates[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2024, 190: 109306.
- [45] 周盛, 韦彬勤, 张琼, 蒋小娟, 林冬婵, 甘耀坤, 莫昭展. 一种能同时固定CO₂和N₂的微生物: 兼性固CO₂、N₂菌的分离鉴定及其验证实验[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(4): 1043-1050.
ZHOU S, WEI BQ, ZHANG Q, JIANG XJ, LIN DC, GAN YK, MO ZZ. Isolation, identification and validation of the facultative fixed carbon and nitrogen bacteria: a type of microorganisms that can fix CO₂ and N₂ at the same time[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(4): 1043-1050 (in Chinese).
- [46] ENGLISH RS, WILLIAMS CA, LORBACH SC, SHIVELY JM. Two forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Thiobacillus denitrificans*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 73(1/2): 111-119.
- [47] 张庆芳, 李美玉, 王晓辉, 胡善松, 于爽, 迟乃玉. 微生物亚硝酸盐还原酶的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(11): 3148-3157.
ZHANG QF, LI MY, WANG XH, HU SS, YU S, CHI NY. Research progress of microbial nitrite reductase[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(11): 3148-3157 (in Chinese).
- [48] 汤明芳, 盛光遥, 李长鑫, 丁静. 基于细胞色素c的胞外电子传递过程[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 509-522.
TANG MF, SHENG GY, LI CX, DING J. The process of extracellular electron transfer based on cytochrome c[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 509-522 (in Chinese).
- [49] YOSHIZAWA Y, TOYODA K, ARAI H, ISHII M, IGARASHI Y. CO₂-responsive expression and gene organization of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzymes and carboxysomes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(17): 5685-5691.