稻田土壤微生物驱动的微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程

李晓敏^{1,2}, 牟山^{2,3}, 陈娅婷^{2,4}, 刘同旭², 董军², 李芳柏^{2*}

1. 华南师范大学环境研究院, 广东省化学品污染与环境安全重点实验室, 教育部环境理论化学重点实验室, 广州 510006;

2. 广东省生态环境技术研究所广东省农业环境综合治理重点实验室, 广州 510650;

3. 电子科技大学微电子与固体电子学院, 成都 610054;

4. 四川大学-香港理工大学灾后重建与管理学院, 成都 610207

* 通讯作者, E-mail: cefbli@soil.gd.cn

收稿日期: 2018-07-06; 收修改稿日期: 2018-12-21; 接受日期: 2019-01-02; 网络版发表日期: 2019-03-15

国家自然科学基金项目(批准号: 41571130052、41701295、41271263)和广东省自然科学基金杰出青年基金项目(编号: 2017A030306010)资助

摘要 在富铁的淡水和海洋环境中, 微生物驱动的中性微好氧亚铁氧化过程能够耦合碳同化过程; 而针对中国华南红壤关键带稻田土壤中的这一耦合过程却鲜有报道. 文章分别以FeS和FeCO₃为底物, 以华南淹水稻田根际土壤为接种物, 采用铁氧反向浓度梯度管法富集培养来自稻田土壤中的微好氧型亚铁氧化菌, 利用¹³C-NaHCO₃为无机碳源示踪碳同化量变化, 测定亚铁氧化动力学和表征生物成矿, 并通过16S rRNA基因测序手段分析微生物群落的组成与丰度. 结果发现, 与添加亚铁底物的不接种对照相比, 在含FeS和FeCO₃的接种处理中距培养基表面0.5~1.0cm处形成微生物生长环带, 且两者环带中总蛋白量最高值均出现在第6d, 可达18.7~22.9mg mL⁻¹. 碳同化量在6~15d时进入平稳期, 此时FeS和FeCO₃接种处理的碳同化量分别为0.44~0.54%和1.61~1.98%. FeS接种处理亚铁氧化速率(*r*)为0.156mmol L⁻¹ d⁻¹, 比FeCO₃接种处理的(0.106mmol L⁻¹ d⁻¹)略高; XRD和SEM-EDS结果显示亚铁氧化形成了无定型铁氧化物, 并覆盖在杆状的菌体表面. 与没有添加亚铁底物的对照处理相比, FeS接种处理中*Clostridium*和*Pseudogulbenkiania*的相对丰度明显提高, 而FeCO₃为底物时提高了*Vogesella*、*Magnetospirillum*、*Solitalea*和*Oxalicibacterium*的相对丰度, 表明上述微生物可能具有潜在的微好氧亚铁氧化功能. 上述结果证明, 稻田土壤中存在可驱动微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程的微生物, 可为探讨红壤关键带微好氧区域的铁-碳元素转化耦合过程提供新的视角.

关键词 微好氧, 亚铁氧化, 稻田土壤, 碳同化, 微生物

1 引言

中国华南地区以红壤为主, 其含铁量高达2%(Li

等, 2008; Tao等, 2012). 红壤关键带铁元素的氧化还原循环过程主要由微生物驱动(Weber等, 2006). 由于亚铁(Fe(II))氧化过程不仅耦合其他主要元素如碳、

中文引用格式: 李晓敏, 牟山, 陈娅婷, 刘同旭, 董军, 李芳柏. 2019. 稻田土壤微生物驱动的微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程. 中国科学: 地球科学, 49: 1948–1959, doi: [10.1360/N072018-00191](https://doi.org/10.1360/N072018-00191)

英文引用格式: Li X, Mou S, Chen Y, Liu T, Dong J, Li F. 2019. Microaerobic Fe(II) oxidation coupled to carbon assimilation processes driven by microbes from paddy soil. Science China Earth Sciences, 62: 1719–1729, <https://doi.org/10.1007/s11430-018-9329-3>

氮、硫等转化过程, 还强烈影响着重金属、有机污染物等转化与降解. 因此, 近年来微生物驱动的亚铁氧化过程备受关注(Borch等, 2009; Melton等, 2014). 在中性土壤环境中, 氧气浓度自上而下逐渐减少, 其亚铁氧化过程主要由微氧型亚铁氧化菌(Microaerophilic Fe-oxidizing bacteria)、厌氧光合型亚铁氧化菌和厌氧硝酸盐还原型亚铁氧化菌三种亚铁氧化微生物驱动(Melton等, 2014). 已有研究表明, 这三种亚铁氧化菌能够同时存在于沿海海洋沉积物中, 其中微氧型亚铁氧化菌的含量比其他两种亚铁氧化菌的含量高(Laufer等, 2015).

微氧型亚铁氧化菌是一类自养型微生物, 能够在pH中性、低氧($0.1\sim 1.5\text{mg L}^{-1}$)的环境中, 以Fe(II)为能量来源、以氧气(O_2)为电子受体、以二氧化碳(CO_2)为碳源进行生长代谢(Emerson和Moyer, 1997). 因此, 其驱动的微好氧亚铁氧化过程能够耦合Fe(II)氧化和 CO_2 同化两个过程, 在铁含量丰富的好氧-厌氧水体界面尤为重要, 如富铁地下水、沼泽、湿地、海洋沉积物、深海热泉等(Emerson等, 2010; Lin等, 2012). 迄今为止, 已分离纯化的微氧型亚铁氧化菌均属于变形菌门(Proteobacteria), 其中淡水环境中以 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)为主, 而海洋环境中以 ζ -变形菌纲(Zetaproteobacteria)为主(Emerson和Moyer, 1997; Edwards等, 2003; Sobolev和Roden, 2004; Spring, 2006). 从属水平来看, 微氧型亚铁氧化菌主要包括淡水环境中分离的*Gallionella*、*Sphaerotilus*、*Leptothrix*、*Ferritrophicum*、*Sideroxydans*和海洋环境中分离的*Mariprofundus*属(Emerson和Weiss, 2004; Emerson等, 2010). 这些微氧型亚铁氧化菌可利用的Fe(II)底物种类包括溶解态和固态Fe(II), 如 FeSO_4 、 FeCl_2 、 FeS 、 FeS_2 和 FeCO_3 等(Straub等, 1996; Emerson和Moyer, 1997; Benz等, 1998; Edwards等, 2003).

中国稻田主要分布在华南红壤地区, 其淹水期存在多个潜在的微好氧区域, 如水土界面、水稻根际表面等(Chen等, 2008). 淹水条件下, Fe(II)能够通过厌氧铁还原菌介导的铁还原过程产生, 且Fe(II)浓度随土壤深度的增加而增加; 而 O_2 在水土界面能够形成自上而下逐步降低的浓度梯度(Ratering和Schnell, 2001; Laufer等, 2015), 同时 O_2 还可以通过水稻根系的通气组织及动物的洞穴进入厌氧土壤中, 因此形成了淹水稻田土壤中Fe(II)和 O_2 的逆向浓度梯度, 为微氧型亚

铁氧化菌的生长提供了潜在的场所(Emerson等, 1999). 稻田土壤中微生物驱动的 CO_2 同化过程一直被认识主要通过好氧光合微生物的作用(Ge等, 2013). 然而, Long等(2015)发现化能自养型微生物也能贡献于稻田土壤中无机碳的固定过程. 基于此, 我们推测在上述淹水稻田可能存在的微好氧区域中, 微氧型亚铁氧化菌驱动的微好氧Fe(II)氧化耦合 CO_2 同化过程也会存在. 目前针对稻田土壤中硝酸盐还原型亚铁氧化过程的研究较多(Ratering和Schnell, 2001; Li等, 2016). 陈娅婷等(2016)以FeS为底物采用凝胶梯度管法富集稻田土壤中的微氧型亚铁氧化菌, 发现在三次传代培养过程中的*Azospira*相对丰度最高, 平均达31%. 然而, 关于稻田土壤微好氧亚铁氧化耦合 CO_2 同化过程的研究较少.

本研究拟以华南红壤稻田土壤为接种物来源, 分别以FeS和 FeCO_3 为Fe(II)底物, 采用凝胶梯度管法富集培养稻田土壤中的微氧型亚铁氧化菌; 监测富集培养过程中微生物生长、碳同化量、亚铁氧化速率等变化; 利用XRD、SEM-EDS等方法表征亚铁氧化矿物; 并采用分子生物学技术分析微生物群落组成随培养时间的变化情况, 进而探讨稻田土壤中微生物驱动的微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程, 为红壤关键带的稻田土壤铁-碳元素转化耦合过程提供新的视角.

2 材料与方法

2.1 土壤样品采集及理化指标检测

本研究选用的是石灰岩母质发育的稻田土壤, 于2014年秋季从广西壮族自治区隆安县南坪镇三宝村(23.4901°N , 107.64695°E)试验田采集. 采集时稻田处于淹水状态, 采集深度约为表层以下10cm水稻根部位置, 采集后迅速装入冰盒并尽快带回实验室放置于 4°C 冰箱保存. 其中, 往部分土壤样品添加超纯水, 按供试土壤与超纯水1:1(wt/vol)混合, 让其处于淹水状态, 并置于暗处活化其中的微生物, 用于后续接种; 部分样品利用放射性同位素钴(^{60}Co)进行高能 γ 射线灭菌后, 作为灭菌对照的接种物; 另外取部分样品自然风干后研磨并过100目的筛子, 此样品用于测试该土壤的理化性质. 检测方法参照鲁如坤(2000)的《土壤农业化学分析方法》. 所得理化性质结果为: pH7.97、钙 60.1g kg^{-1} 、有机质 45.4g kg^{-1} 、全氮 2.89g kg^{-1} 、全铁

17.2g kg⁻¹、盐酸提取态亚铁212mg kg⁻¹、盐酸提取态铁387mg kg⁻¹。

2.2 梯度管法富集培养实验

采用凝胶梯度管法富集培养微氧型亚铁氧化菌(Emerson等, 2010), 分别以FeS和FeCO₃为铁源底物, 培养基采用MWMM(Modified Wolfe's mineral medium), 具体配方为: 0.05g L⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O、0.1g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O、0.2g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O及1.0g L⁻¹ NH₄Cl, 并加入5mmol L⁻¹的NaHCO₃(或¹³C-NaHCO₃)作为缓冲溶液和碳源, 充CO₂气体调节pH约为6.15。底层铁源的配制: 将去除上清液的FeS和FeCO₃与MWMM溶液等体积混合, 再加入1%(wt/vol)的琼脂。上层培养基的配制: 在MWMM溶液中分别加入1μL mL⁻¹的维生素和矿物元素溶液, 以及0.15%(wt/vol)的琼脂。待培养基静置24h形成半固态培养管后, 将10μL接种液接种于配有MWMM培养基的凝胶培养管中。如表1所示, 除接种处理(Inocula)以外, 还设置三个对照: 灭菌对照(Killed-inocula)、不接种对照(Non-inocula)、无底物对照(只含培养基, Agar only)。每组处理设置3个平行样品。接种后置培养管于暗态下培养15d, 培养温度为30℃。在培养0d、3d、6d、9d、15d时吸取培养管中的微生物生长环带(1~2mL), 测试其微生物生长情况、碳同化量、亚铁氧化量以及成矿情况; 同时提取两个接种处理中的总DNA, 采用16S rRNA焦磷酸测序分析不同培养时间的微生物群落组成。

2.3 微生物生长测定

微生物的生长情况采用提取微生物总蛋白的方法进行测定(Zhao等, 2013), 具体操作如下: 吸取培养管微生物生长环带至无菌离心管中, 8000r min⁻¹离心5min; 弃去大部分上清液, 用剩余的上清液与沉淀混合定量至1mL后转移至蛋白质提取管中, 并加入适量玻璃珠和1mL 0.5mol L⁻¹的NaOH溶液; 将其固定在核酸提取仪(FastPrep[®]-24, 美国MP Biomedicals)上, 以6.0mol L⁻¹ s⁻¹的振荡速度振荡40s, 随后将其放入低温离心机(4℃)以3000r min⁻¹的转速离心30min, 取上清液进行定量。用标准蛋白溶液作为标样, 分别取20μL不同浓度的标准蛋白溶液和待测样品加入酶标板中, 再分别加入200μL的Bradford蛋白定量试剂盒(生工)中的G250染色液混合均匀, 放置约5min后用酶标仪(iM-

表 1 实验处理设置

序号	处理	底物	土壤接种液(μL)
1	接种处理(Inocula)	FeS	10
		FeCO ₃	10
2	灭菌对照(Killed-inocula)	FeS	10
		FeCO ₃	10
3	不接种对照(Non-inocula)	FeS	—
		FeCO ₃	—
4	无底物对照(Agar only)	—	10

ark, 美国Bio-Rad公司)选用595nm滤光片测定吸光值。每个标准蛋白溶液与待测样品均设置3个重复。

2.4 碳同化量的测定

本研究通过计算¹³C-NaHCO₃进入微生物细胞并转化成生物量的比例来表征微氧型亚铁氧化菌的自养碳同化过程。在吸取培养管微生物生长环带并8000r min⁻¹离心5min后, 保留下层沉淀物质。将每个处理的平行样品分成两组进行熏蒸与不熏蒸处理。熏蒸组采用氯仿熏蒸法(Chloroform fumigation extraction, CFE)(Wu等, 1990)熏蒸24h。随后将所有样品以沉淀与K₂SO₄溶液比为1:4(wt/vol)加入0.05mol L⁻¹的K₂SO₄溶液进行有机碳的提取。将上述悬浊液以转速300r min⁻¹震荡30min, 然后用中速定量滤纸将其过滤并收集滤液。将滤液分为两部分, 一部分利用总有机碳分析仪(TOC-V cph, 日本岛津)测定其总有机碳含量; 另一部分置于-20℃冰箱, 然后进行真空冷冻干燥, 并利用气相色谱-同位素质谱仪(MAT253, 德国Finnigan)测定δ¹³C值, 每个样品重复三次。待测样品的¹³C/¹²C比值(R)的计算参照公式(1)(Kunapuli等, 2007)。

$$R_{\text{sample}} = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Sample}} = [1 + \delta^{13}\text{C}/1000] \times [{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{V-PDB Standard}}], \quad (1)$$

式中, ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{V-PDB Standard}}=0.0112372$ (Werner和Brand, 2001)。

被微生物同化的¹³C含量(%)的计算参照公式(2):

$${}^{13}\text{C} = F(\text{TOC}_f R_f - \text{TOC}_{uf} R_{uf})/R_i M_k, \quad (2)$$

式中, F 代表转换体积; TOC_f 和 TOC_{uf} 分别代表熏蒸样品和不熏蒸样品的TOC浓度(mg L⁻¹); R_f 和 R_{uf} 分别代表熏蒸样品和不熏蒸样品中¹³C的比例(%); R_i 代表半固体

培养基中原始 ^{13}C 占 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 的比例(%); M 代表半固体培养基中原始 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ 的量(mg); k_c 代表转换系数, 取值0.45(Murage和Voroney, 2007; Zumsteg等, 2013).

2.5 亚铁氧化动力学的测定

在吸取培养管微生物生长环带并 8000r min^{-1} 离心5min后, 弃去大部分上清液, 并将剩余上清液与沉淀定量至1mL, 然后迅速加入4mL 0.5mol L^{-1} 的HCl, 置于恒温摇床(180r min^{-1} , 30°C)浸提1.5h. 将所获浸提液过滤, 取1mL滤液直接用邻菲罗啉(0.1%)显色; 取另外1mL滤液用盐酸羟胺(10%)还原后, 再用邻菲罗啉显色, 然后置于紫外-可见分光光度计(TU1800, 北京普析)在波长为510nm处检测HCl提取态 Fe(II) 和总铁浓度. 亚铁氧化的结果通过公式 $\text{Fe(III)浓度} = \text{总铁浓度} - \text{Fe(II)浓度}$ 获得.

2.6 亚铁氧化矿物表征

在培养结束时(15d), 吸取培养管微生物生长环带并 8000r min^{-1} 离心5min后, 保留下层沉淀物质并用脱氧超纯水清洗沉淀5次. 经真空冷冻干燥和研磨处理后, 进行X-射线衍射(XRD)分析. XRD的扫描角度(2θ)范围为 $5^\circ \sim 85^\circ$, 扫描速度为 0.2°s^{-1} . 所获结果采用JADE 5.0软件解析.

为了确定所获细菌形态、细菌与铁氧化物的结合情况, 并定量分析矿物中的关键元素, 采用扫描电子显微镜和X-射线能谱法(SEM-EDS)进行分析. 样品前处理: (1) 取第15d微生物生长环带样品, 离心去除上清液后加入30倍体积的2.5%戊二醛溶液进行固定过夜. (2) 清洗: 离心后用 0.1mol L^{-1} 磷酸盐缓冲液($\text{pH}=7$)清洗沉淀5次, 每次约15min. (3) 脱水: 用梯度乙醇溶液进行逐级脱水, 乙醇溶液的浓度分别为30%、50%、70%、90%和95%, 随后再用无水乙醇清洗两次; 最后用叔丁醇过渡(Lin等, 2012). (4) 置于样品台上冷冻干燥, 随后在真空状态下渡上铂膜, 将其置于扫描电镜下观察和测定主要元素含量.

2.7 微生物DNA提取、扩增与序列分析

对接种处理培养管微生物生长环带进行离心(8000r min^{-1} , 5min)后, 保留沉淀物质进行DNA提取. 每个处理每个反应时间点做三个重复样品. 富集培养物的总DNA提取采用PowerSoil™ DNA Isolation Kit

试剂盒(MO BIO公司), 其具体提取步骤按照说明书进行. 采用通用引物515F($5'\text{-GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA-3'}$)和806R($5'\text{-AACGCACGCTAGCCGGAC-TACVSGGGTATCTAAT-3'}$)对细菌的V4区进行PCR扩增(Bates等, 2011). 正向引物加入样品特异的12-bp条形码序列(barcode). 扩增体系为 $50\mu\text{L}$, 包括: 0.5 units Ex Taq DNA polymerase、 $10\mu\text{L}$ $1\times$ Ex Taq loading buffer、 $8\mu\text{L}$ dNTP mix(TaKaRa, Dalian, China)、 $2\mu\text{L}$ of each primer(10mmol L^{-1})、10~100ng template DNA. 扩增条件为: 95°C 下预变性3min; 94°C 下变性30s, 55°C 退火1min, 72°C 下延伸1min, 一共进行35个循环; 最后 72°C 下延伸10min以保证扩增产物的完整性. 每个样品做3管重复, 扩增完毕后混合成一管. 将PCR产物采用QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, Chatsworth, USA)进行PCR产物纯化, 具体操作按照其说明书进行. 将检测合格的产物使用Illumina HiSeq2500测序平台(Illumina, San Diego, USA)进行测序分析.

测序完成后, 首先进行质量筛选, 利用Sickle软件(版本1.33, Joshi和Fass, 2011)去除质量评分低于25的序列, 并过滤掉长度低于100bp的序列. 在去除低质量的序列后, 以最少序列数31068条为标准, 进行数据抽平. 用Flash软件将双端序列进行拼接, 得到完整的16S rDNA基因V4区目的片段序列. 根据每个样品在引物上所特有的barcode序列, 将测得的序列分配到每个样品. 随后将所有序列按照97%的相似度划分OTU(operational taxonomic unit). 把每个OTU代表序列与Greengene 16S rRNA基因库中的序列进行比对, 并按0.5的置信度对OTU进行物种分类(Wang等, 2007). 对获得的OTUs采用FastTree构建系统发育树(Price等, 2009). 在去除低质量的序列后, 39个实验样品共获得了1992557条序列, 其中单个样品中有效序列最多的为77162条, 最少的为31068条. 所有有效序列共划分为5349个OTUs, 其中每个样品最多有2863个OTUs, 最少有392个OTUs. 接种源土壤(Soil)中的OTU数目(2656~2863)远远大于培养管中所富集微生物群落的OTU数目(392~861).

3 结果与讨论

3.1 微好氧细菌的富集

第0d时, 在培养管接近底部铁源的位置可以观察

到有黄色物质生成(图1a), 这表明培养管底部的铁源发生溶解、向上部扩散和化学氧化过程. 培养3d后的接种处理和无底物对照处理培养管中, 在距培养基表面0.5~1.0cm处有淡淡的环带形成, 表明环带中有微生物富集生长; 而不接种对照和灭菌对照处理培养管中均无此环带形成(图1b). 随着培养时间的推移, 接种处理和无底物对照处理的培养管中微生物生长环带的宽度逐渐增加, 且接种处理培养管中微生物生长环带的颜色也逐渐从浅黄色变成红褐色, 表明微生物主导的亚铁氧化程度逐渐增强(图1c~1e). 同时, 在不接种对照和灭菌对照处理培养管中, 由化学氧化导致的条带, 其宽度也随反应时间逐渐增大, 颜色也随之加深(图1c~1e).

在中性条件下, 能氧化亚铁的微生物很难被富集分离, 尤其是微氧型亚铁氧化菌, 这主要是由于中性条件下亚铁很容易与空气中的氧气发生化学氧化, 而微氧型亚铁氧化菌只有在氧气浓度为0.1~1.5mg L⁻¹的环境中才能生存生长(Emerson和Moyer, 1997). 凝胶梯度管培养法能够模拟微氧型亚铁氧化菌的生长环境, 其原理为: 培养管底部的亚铁底物可以向上部的半固态培养基中溶解和扩散, 形成一个自下到上逐步降低的亚铁浓度梯度; 同时培养管顶部空间的空气通过半固态培养基向下进行扩散, 也形成一个自上而下逐步降低的氧气浓度梯度(Emerson和Moyer, 1997). 在半固态培养基的某个位置, 如本研究中的距培养基表面0.5~1.0cm处(图1), 会形成一个适合微氧型亚铁氧化菌

生存的亚铁和氧气浓度范围, 随着微氧型亚铁氧化菌的不断富集生长与亚铁氧化代谢, 便出现一个含有铁氧化物的微生物生长环带. 因此, 本研究也成功应用凝胶梯度管培养法在含有亚铁底物的培养管中的微氧界面富集了微氧型亚铁氧化菌.

3.2 细菌生长与碳同化

在以FeS和FeCO₃为底物的接种处理和无底物对照处理中, 总蛋白浓度随培养时间呈现先上升后下降的趋势(图2). 从培养0~6d, FeCO₃为铁源的微生物环带中总蛋白浓度从2.5mg mL⁻¹上升到22.9mg mL⁻¹, FeS为铁源的微生物环带中总蛋白浓度从2.9mg mL⁻¹上升到18.7mg mL⁻¹, 而无底物对照处理的微生物环带中总蛋白浓度从1.5mg mL⁻¹上升到12.4mg mL⁻¹. 随着培养时间的继续增长, 三个出现微生物环带的处理中总蛋白浓度均有所下降. 到15d时, FeCO₃接种处理、FeS接种处理和无底物对照处理中, 其浓度分别为15.8、12.8和6.0mg mL⁻¹. 由此表明, 环带中微生物的繁殖增长主要发生在培养前期, 即0~6d.

本研究中为了证明来自稻田土壤的微氧型亚铁氧化菌可以同化无机碳, 采用¹³C标记的NaHCO₃作为无机碳源, 测定不同亚铁底物处理中¹³C标记的碳同化量随反应时间的变化情况. 如图3所示, 在以FeS和FeCO₃为底物的接种处理和无底物对照处理中, 碳同化量在培养前期增加较快, 培养6d时, FeCO₃接种处理、FeS接种处理和无底物对照处理中碳同化量分别达到

图1 以FeS和FeCO₃为亚铁底物的接种处理(Inocula)、不接种对照(Non-inocula)、灭菌对照(Killed-inocula)和无底物对照(Agar only)的培养管随培养时间0d(a)、3d(b)、6d(c)、9d(d)、15d(e)的变化情况

图2 以FeS和FeCO₃作为亚铁底物的接种处理(Inocula)和无底物对照(Agar only)培养管微生物生长环带中总蛋白浓度的变化趋势

图3 以FeS和FeCO₃作为亚铁底物的接种处理(Inocula)和无底物对照(Agar only)培养管微生物生长环带中碳同化量的变化趋势

1.83%、0.44%和0.45%。随后,三个处理中的碳同化量均趋于稳定。由此表明,微生物同化代谢主要发生在培养前期(0~6d),且在培养后期有所放缓。此外,FeCO₃接种处理中的碳同化量比FeS接种处理的高出2~3倍(图3),而图2结果也显示FeCO₃接种处理中的总蛋白浓度比FeS接种处理的高,表明细菌生长情况与碳同化量直接相关。前人报道发现,一株从湿地植物根际分离的微氧型亚铁氧化菌*S. paludicola* BrT,其固碳速率与其生物量增长相符合(Weiss等, 2007),每摩尔的亚铁被氧化就可以产生0.28mol的生物量(Neubauer等, 2002)。FeCO₃为底物时微生物量和碳同化量均比FeS为底物

时高,其可能的原因是,FeCO₃为底物时溶解释放出的更多的碳酸根,可为自养微生物的同化代谢与生长繁殖提供更多的无机碳源(Kappler和Newman, 2004)。而无底物对照处理中所产生的碳同化量有可能来源于:(1)接种土壤中的微好氧亚铁氧化菌,因为红壤含铁量高,接种物很可能把自身所含的铁带入不添加外源铁源培养基中;(2)接种土壤中其他在微好氧条件下也具备碳同化能力的微生物,这些微生物的碳同化过程可能是耦合了接种土壤或者培养基中的硫或氮元素的氧化过程(Wrighton等, 2012; Ortiz等, 2014)。

3.3 亚铁氧化与矿物表征

从培养3d开始,在以FeS和FeCO₃为底物的接种处理微生物环带中,Fe(III)浓度随培养时间逐步上升;到培养结束时(即15d),FeS接种处理和FeCO₃接种处理中的Fe(III)浓度分别高达2.27和1.60mmol L⁻¹(图4)。而在灭菌对照(FeS为底物的除外)、不接种对照和无底物对照处理中,Fe(III)浓度没有显著上升(图4)。进一步采用零级生成动力学模型进行拟合发现,FeS接种处理和FeCO₃接种处理的亚铁氧化速率(*r*)分别为0.156和0.106mmol L⁻¹ d⁻¹;而无底物对照处理的亚铁氧化速率只有0.0024mmol L⁻¹ d⁻¹;灭菌对照和不接种对照处理的亚铁氧化速率只有0.0003~0.015mmol L⁻¹ d⁻¹(表2)。由此表明,培养管环带中的亚铁氧化过程主要是由被富集的微好氧微生物主导的。

由于微氧型微生物主要富集在距培养基表面

图4 以FeS(a)和FeCO₃(b)为亚铁底物的接种处理(Inocula)、灭菌对照(Killed-inocula)、不接种对照(Non-inocula)和无底物对照(Agar only)培养管微生物生长环带中Fe(III)浓度的变化趋势

表 2 不同处理中亚铁氧化动力学零级速率(r)及相关系数(R^2)^{a)}

处理	接种处理		灭菌对照		不接种对照	
	$r(\text{mmol L}^{-1} \text{d}^{-1})$	R^2	$r(\text{mmol L}^{-1} \text{d}^{-1})$	R^2	$r(\text{mmol L}^{-1} \text{d}^{-1})$	R^2
FeS	0.156	0.950	0.015	0.840	0.0003	0.260
FeCO ₃	0.106	0.860	0.003	0.912	0.0009	0.747
无底物对照(Agar only)	0.0024	0.828	—	—	—	—

a) 动力学速率是根据图3动力学结果拟合

0.5~1.0cm处的环带中,微生物与培养管底部的亚铁底物并未直接接触,所以微生物驱动的亚铁氧化过程发生的重要前提之一是亚铁底物向上层培养基扩散 Fe^{2+} ,因此亚铁底物的溶解常数(K_{sp})是控制微生物氧化亚铁的重要因素。Kappler和Newman(2004)运用MINEQL软件根据溶解常数 FeCO_3 ($\text{Log } K_{\text{sp}} = -10.7$)和 FeS ($\text{Log } K_{\text{sp}} = -3.0$)计算出 FeS 在pH偏中性的碳酸盐缓冲体系中释放的溶解态 Fe(II) 平衡浓度是 FeCO_3 的3倍多。这与本研究中图1的结果相匹配,即在以 FeS 为底物的培养管中,释放出更多的铁源到半固态培养基中。虽然 FeCO_3 为底物的培养管中细菌生长量比 FeS 得高(图2),但是 FeS 的亚铁氧化程度和速率均比 FeCO_3 得高(图4和表2),这主要受 FeS 的溶解常数更高、可溶解释放出更多的溶解态 Fe(II) 的影响。

采用XRD分析培养15d时微生物环带中的沉淀物发现,以 FeS 和 FeCO_3 为底物的接种处理中所生成的矿物没有明显的晶体特征峰,以无定形矿物为主(图5)。SEM图显示,以 FeS 和 FeCO_3 为底物的接种处理微生物环带中所富集的细菌以杆状为主,菌体直径约为 $0.5\mu\text{m}$,长约为 $1\sim 2\mu\text{m}$ (图6)。EDS分析结果表明,细菌表面的物质含有氧和铁两种元素,由此推测细菌表面可能被亚铁氧化所生成的铁氧化物包裹;碳和铝元素主要为背景元素;而磷元素可能是源于培养基中磷酸根,经亚铁氧化后与铁形成少量沉淀所致(表3)。

微生物驱动的亚铁氧化过程由于培养生境条件或者微生物的酶促机制不同而生成不同结晶度和结晶类型的含铁矿物,如水铁矿、针铁矿、赤铁矿、纤铁矿、磁铁矿、磷酸铁和绿锈等(Kappler和Newman, 2004; Miot等, 2009; Pantke等, 2012)。本研究所获得的无定型铁氧化物与前人关于微好氧亚铁氧化过程生物成矿的结果相一致。Emerson和Moyer(1997)与Weiss等(2007)在分离纯化中性亚铁氧化菌的研究中均观察到无定型铁氧化物的生成。陈娅婷等(2016)通过透射电

图 5 以 FeS 和 FeCO_3 作为亚铁底物的接种处理(Inocula)培养15d后微生物生长环带中所生成的矿物XRD图谱

子显微镜观察到微好氧亚铁氧化微生物表面散布着一些颗粒状的矿物,且有球状颗粒紧紧包裹在细胞壁上。微生物介导的亚铁氧化过程所形成的铁氧化物很容易覆盖在细菌表面,这也被认为是导致细菌失活或者死亡的原因之一(Emerson等, 2010)。而本研究培养后期,以 FeS 和 FeCO_3 为底物的接种处理中总蛋白量有所下降,其中一个可能的原因是培养基中的营养物质被消耗掉供给不足;另外还可能存在的原因是微生物表面被铁氧化物包裹,阻碍了微生物生长和代谢,并导致微生物死亡。

3.4 微生物群落组成结构与相对丰度

接种源土壤中微生物群落组成十分复杂,其中以细菌门为主,主要包括: Thaumarchaeota(17%)、Proteobacteria(15%)、Chloroflexi(11%)、Acidobacteria(8.7%)、Crenarchaeota(8.0%)、Verrucomicrobia(6.8%)、Euryarchaeota(5.9%)、Bacteroidetes(3.9%)和Firmicutes(3.4%)。在以 FeS 和 FeCO_3 为底物的接种处理

图 6 以FeS(a)和FeCO₃(b)作为亚铁底物的接种处理(Inocula)培养15d后微生物生长环带中微生物的SEM图

和无底物对照处理的培养管中，微生物群落组成结构相对于接种源土壤的群落组成均趋于简单。从门的水平来看，培养3d后上述三个处理中主要提高了Proteo-

bacteria(44~81%)和Firmicutes(17~46%)的相对丰度；随着培养时间的增长，Firmicutes的相对丰度大幅下降，而Bacteroidetes的相对丰度大幅提高；到培养15d时，Proteobacteria(49~68%)和Bacteroidetes(27~38%)成为主要的优势菌门。

从属的水平来看(图7)，接种源土壤中的优势微生物包括Nitrososphaera(17%)、Bellilinea(7.3%)、Pseudomonas(1.6%)和Paenibacillus(1.2%)。在以FeS和FeCO₃为底物的接种处理和无底物对照处理的培养管中，各自优势的微生物群落在属水平上不尽相同。在FeS接种处理培养管中，培养3d时的优势菌属有Clostridium(37%)和Pseudomonas(27%)；培养6~9d期间的优势菌属主要是Pedobacter(15~22%)和Pseudomonas(16~24%)；培养15d时的优势菌属主要包括Pseudomonas(11%)和Pseudogulbenkiania(10%)。在FeCO₃接种处理培养管中，培养3d时以Vogesella(42%)占绝对优势；培养6~15d期间的优势菌属包括：Solitalea(8.2~33%)、Magnetospirillum(13~32%)、Vogesella(11~15%)、Oxalicibacterium(1.9~14%)。无底物对照处理培养管中，培养3d时以Paenibacillus(40%)和Pseudomonas(27%)为主要优势菌属；培养6~15d期间的优势菌属有Pseudomonas(15~20%)、Pedobacter(8.5~16%)、Methylobacillus(4.4~14%)和Prostheobacter(0.1~13%)。值得注意的是，Clostridium、Pseudogulbenkiania、Solitalea、Magnetospirillum、Vogesella和Oxalicibacterium等属在含有亚铁底物的培养管中的相对丰度明显远高于其各自在无底物对照处理中的相对丰度。上述的结果表明：稻田土壤中的微生物群落组成结构比富集培养后的更复杂，而凝胶梯度管法成功把稻田土壤中的微好氧微生物筛选和富集起来；两种亚铁底物对培养管中的微

表 3 以FeS和FeCO₃作为亚铁底物的接种处理(Inocula)微生物表面EDS元素表征^{a)}

元素(K)	FeS		FeCO ₃	
	质量百分数(%)	原子百分数(%)	质量百分数(%)	原子百分数(%)
C	24.76	40.56	17.52	30.52
O	12.48	15.35	13.29	17.38
Al	58.35	42.54	64.96	50.38
P	0.00	0.00	0.49	0.33
Fe	4.40	1.55	3.74	1.40
总百分数	100.00	100.00	100.00	100.00

a) 以上EDS结果是针对图6中Spectrum 1和Spectrum 2分别所指的表面测试所得

图 7 以FeS和FeCO₃为亚铁底物的接种处理(Inocula)和无底物对照(Agar only)培养管微生物生长环带中微生物群落在属水平物种的相对丰度变化趋势

生物群落组成有重要的影响: FeS为底物时更有利于*Clostridium*和*Pseudogulbenkiania*的富集; FeCO₃为底物时*Vogesella*、*Magnetospirillum*、*Solitalea*和*Oxalicibacterium*更容易得到富集。

*Pseudogulbenkiania*属于Proteobacteria菌门, 是一种杆状的具有中性厌氧硝酸盐还原亚铁氧化功能的微生物(Ishii等, 2016), 目前未见报道该菌可以在微氧条件下氧化亚铁。但考虑到由于稻田长期施氮肥, 其中的硝酸盐还原亚铁氧化过程活跃(Ratering和Schnell, 2001; Li等, 2016), 硝酸盐还原亚铁氧化菌可能在稻田土壤中的有氧-无氧界面发挥亚铁氧化的作用(陈娅婷等, 2016; Benz等, 1998)。磁螺菌*Magnetospirillum*也属于Proteobacteria菌门, 广泛存在于海水和淡水沉积物中(Bazylinski和Frankel, 2004)。已有报道发现*Magnetospirillum*可以利用铁并能在FeS为底物的梯度管中生长(Geelhoed等, 2009; 陈娅婷等, 2016), 因此其很可能具有潜在的铁氧化能力。*Clostridium*属于Firmicutes菌门, 是一种杆状的严格厌氧菌, 在厌氧条件下具有铁还原功能(Xu等, 2014), 在本研究中可能由于亚铁氧化后产生了Fe(III)氧化物而引起*Clostridium*的相对丰度提高。*Vogesella*和*Oxalicibacterium*均是属于Proteobacteria菌门的杆状好氧微生物, 广泛存在于淡水环境中, 且*Vogesella*曾在稻田根际土壤中被分离纯化(Sahin等, 2009; Rameshkumar等, 2016); *Solitalea*是属于Bacteroidetes菌门的杆状好氧微生物(Weon等, 2009)。

目前, *Vogesella*、*Solitalea*和*Oxalicibacterium*这三种菌是否具有亚铁氧化耦合碳同化功能仍未见报道, 而三者能够在FeS和FeCO₃为底物的梯度管中生长富集, 表明三者具有潜在的微好氧亚铁氧化耦合碳同化功能。迄今为止, 微好氧亚铁氧化的生物化学机制仍未明确, 且已发现的中性微氧型亚铁氧化菌种类还比较少, 主要集中在*Leptothrix*、*Sideroxydans*和*Gallionella*等属。在本研究中并没有检测到这些微生物群落的存在, 原因之一可能是稻田环境中的微氧型亚铁氧化菌种类跟上述这些从淡水和海洋发现的微氧型亚铁氧化菌不同; 另外也可能是由于缺乏合适的扩增上述微生物16S rRNA基因的引物所致(Wang等, 2009)。

3.5 地球科学意义

微生物能够以铁为底物赖以生长繁殖被认为是一种古老的能量代谢过程, 这个过程很可能发生于24亿年前的“大氧化事件”(Great Oxidation Event)前后, 即中后期的太古代(Archaeon)过渡到早中期的元古代(Proterozoic)的时期(Emerson, 2012)。因为这个时期地球大气从无氧状态转变为含氧状态, 当时的氧气浓度(<50μmol L⁻¹)远低于目前地球大气中的氧气浓度, 而亚铁的浓度可高达10~1000μmol L⁻¹, 这可为微好氧亚铁氧化微生物的生长提供理想的环境(Lyons和Reinhard, 2009; 李俊和李一良, 2014)。巧合的是, 条带状铁矿地层(Banded Iron Formation, BIF)的形成也是在同

一地质时期发生的, 这些由富含铁矿物层和富含硅矿物层重复并相互交替形成的岩石, 很可能是海洋和大气中铁、氧浓度剧烈变化的反映, 而微生物很可能在BIF形成过程中发挥作用(Trouwborst等, 2007; Raiswell和Canfield, 2011).

随着地球大气中氧气浓度的逐渐增加, 直到现代这类微生物的栖息地只能限制于一些富铁的有氧-无氧界面, 其中就包括稻田土壤的水土界面和水稻根际表面(Emerson等, 2010; 陈娅婷等, 2016). 本研究的结果证实来自华南红壤稻田土壤中的微生物可以驱动微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程, 虽然此过程在整个稻田土壤环境中对氧化铁矿物形成和碳同化的贡献量仍未明确, 但鉴于稻田土壤存在多个利于微氧型亚铁氧化菌生长的栖息地, 此过程在红壤关键带微生物驱动的铁碳循环中的作用仍不可忽视. 微氧型亚铁氧化菌主导的铁氧化过程, 很可能是导致水稻根际铁膜形成的途径之一. 在好氧-厌氧水土界面和水稻根际表面所发生的微好氧亚铁氧化过程, 不仅能耦合碳循环过程, 还能产生具有比表面积大、反应活性高的Fe(III)氧化物, 这些含铁矿物能够通过吸附、络合、氧化/还原等作用对重金属或其他有毒有害物质的迁移转化产生重要的影响(Muehe等, 2013; 白建峰等, 2015; 刘承帅等, 2016; Qiao等, 2018). 事实上, 关于微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程所能带来的潜在环境效应, 不仅限于稻田土壤环境, 在一些寡营养的富铁地下水、湿地和海洋沉积物等生境中也会存在并发挥重要作用, 因此值得进一步深入研究(Emerson等, 2010).

4 结论

本研究以华南红壤稻田土壤为研究对象, 分别以FeS和FeCO₃为底物, 通过凝胶梯度管法成功富集培养了来自稻田土壤的微氧型亚铁氧化微生物. 微生物生长环带主要在距培养基表面0.5~1.0cm处形成, 且形成无定型铁氧化物, 覆盖在微生物表面. 添加不同亚铁底物时, 微生物的碳同化和亚铁氧化表现存在差异: FeCO₃为底物时的碳同化量高于FeS为底物的碳同化量; 而FeS为底物时的亚铁氧化速率比FeCO₃为底物时的高. 虽然没有添加亚铁底物的对照处理中也出现微生物生长环带和碳同化现象, 但是微生物群落分析结果表明, FeS和FeCO₃等亚铁底物的存在, 更利于*Clos-*

tridium、*Pseudogulbenkiania*、*Vogesella*、*Magnetospirillum*、*Solitalea*和*Oxalicibacterium*等微生物的富集. 这些可能具有微好氧亚铁氧化功能的微生物的发现, 不仅丰富了中性微氧型亚铁氧化微生物多样性的范围, 还可为深入探讨红壤关键带稻田土壤微好氧亚铁氧化耦合碳同化过程的作用提供一定的基础.

参考文献

- 白建峰, 林先贵, 戴珏, 华建峰, 秦华, 胡君利, 王-明, 张承龙, 王景伟, 苑文仪. 2015. 提高As污染土壤中As可迁移性含量的功能菌株. 中国科学: 地球科学, 45: 688-694
- 陈娅婷, 李芳柏, 李晓敏. 2016. 水稻土嗜中性微好氧亚铁氧化菌多样性及微生物成矿研究. 生态环境学报, 25: 547-554
- 李俊, 李-良. 模拟成岩或低级变质作用对铁氧化菌席的影响. 2014. 中国科学: 地球科学, 44: 1263-1272
- 刘承帅, 韦志琦, 李芳柏, 董军. 2016. 游离态Fe(II)驱动赤铁矿晶相重组的Fe原子交换机制: 稳定Fe同位素示踪研究. 中国科学: 地球科学, 46: 1542-1553
- 鲁如坤. 2000. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社
- Bates S T, Berg-Lyons D, Caporaso J G, Walters W A, Knight R, Fierer N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J*, 5: 908-917
- Bazylinski D A, Frankel R B. 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol*, 2: 217-230
- Benz M, Brune A, Schink B. 1998. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch Microbiol*, 169: 159-165
- Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, Cappellen P V, Ginder-Vogel M, Voegelin A, Campbell K. 2009. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environ Sci Technol*, 44: 15-23
- Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, Shen J P, He J Z. 2008. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil? *Environ Microbiol*, 10: 1978-1987
- Edwards K J, Rogers D R, Wirsén C O, McCollom T M. 2003. Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic alpha- and gamma-proteobacteria from the deep sea. *Appl Environ Microbiol*, 69: 2906-2913
- Emerson D. 2012. Biogeochemistry and microbiology of microaerobic Fe(II) oxidation. *Biochem Soc Trans*, 40: 1211-1216
- Emerson D, Fleming E J, McBeth J M. 2010. Iron-oxidizing bacteria: An environmental and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol*, 64: 561-583
- Emerson D, Floyd M M. 2005. Enrichment and isolation of iron-oxidizing bacteria at neutral pH. *Methods Enzymol*, 397: 112-123

- Emerson D, Moyer C L. 1997. Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4784–4792
- Emerson D, Weiss J V. 2004. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: Findings from the field and the laboratory. *Geomicrobiol J*, 21: 405–414
- Emerson D, Weiss J V, Megonigal J P. 1999. Iron-oxidizing bacteria are associated with ferric hydroxide precipitates (Fe-plaque) on the roots of wetland plants. *Appl Environ Microbiol*, 65: 2758–2761
- Ge T, Wu X, Chen X, Yuan H, Zou Z, Li B, Zhou P, Liu S, Tong C, Brookes P, Wu J. 2013. Microbial phototrophic fixation of atmospheric CO₂ in China subtropical upland and paddy soils. *Geochim Cosmochim Acta*, 113: 70–78
- Geelhoed J S, Sorokin D Y, Epping E, Tourova T P, Banciu H L, Muyzer G, Stams A J M, van Loosdrecht M C M. 2009. Microbial sulfide oxidation in the oxic/anoxic transition zone of freshwater sediment: Involvement of lithoautotrophic *Magnetospirillum* strain J10. *FEMS Microbiol Ecol*, 70: 54–65
- Ishii S, Joikai K, Otsuka S, Senoo K, Okabe S. 2016. Denitrification and nitrate-dependent Fe(II) oxidation in various *Pseudogulbenkiania* strains. *Microbes Environ*, 31: 293–298
- Joshi N A, Fass J N. 2011. Sickie: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33). Citeulike: 13260426
- Kappler A, Newman D K. 2004. Formation of Fe(III)-minerals by Fe (II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochim Cosmochim Acta*, 68: 1217–1226
- Kunapuli U, Lueders T, Meckenstock R U. 2007. The use of stable isotope probing to identify key iron-reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. *ISME J*, 1: 643–653
- Laufer K, Nordhoff M, Røy H, Schmidt C, Behrens S, Jørgensen B B, Kappler A. 2015. Coexistence of microaerophilic, nitrate-reducing, and phototrophic Fe(II) oxidizers and Fe(III) reducers in coastal marine sediment. *Appl Environ Microbiol*, 82: 1433–1447
- Li F, Wang X, Li Y, Liu C, Zeng F, Zhang L, Hao M, Ruan H. 2008. Enhancement of the reductive transformation of pentachlorophenol by polycarboxylic acids at the iron oxide-water interface. *J Colloid Interface Sci*, 321: 332–341
- Li X, Zhang W, Liu T, Chen L, Chen P, Li F. 2016. Changes in the composition and diversity of microbial communities during anaerobic nitrate reduction and Fe(II) oxidation at circumneutral pH in paddy soil. *Soil Biol Biochem*, 94: 70–79
- Lin C, Larsen E I, Nothdurft L D, Smith J J. 2012. Neutrophilic, microaerophilic Fe(II)-oxidizing bacteria are ubiquitous in aquatic habitats of a subtropical Australian coastal catchment (ubiquitous FeOB in catchment aquatic habitats). *Geomicrobiol J*, 29: 76–87
- Long X E, Yao H, Wang J, Huang Y, Singh B K, Zhu Y G. 2015. Community structure and soil pH determine chemoautotrophic carbon dioxide fixation in drained paddy soils. *Environ Sci Technol*, 49: 7152–7160
- Lyons T W, Reinhard C T. 2009. Early Earth: Oxygen for heavy-metal fans. *Nature*, 461: 179–181
- Melton E D, Swanner E D, Behrens S, Schmidt C, Kappler A. 2014. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nat Rev Microbiol*, 12: 797–808
- Miot J, Benzerara K, Morin G, Kappler A, Bernard S, Obst M, Férard C, Skouri-Panet F, Guigner J M, Posth N, Galvez M, Brown Jr G E, Guyot F. 2009. Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria. *Geochim Cosmochim Acta*, 73: 696–711
- Muehe E M, Scheer L, Daus B, Kappler A. 2013. Fate of arsenic during microbial reduction of biogenic versus abiogenic As-Fe(III)-mineral coprecipitates. *Environ Sci Technol*, 47: 8297–8307
- Murage E W, Voroney P R. 2007. Modification of the original chloroform fumigation extraction technique to allow measurement of $\delta^{13}\text{C}$ of soil microbial biomass carbon. *Soil Biol Biochem*, 39: 1724–1729
- Neubauer S C, Emerson D, Megonigal J P. 2002. Life at the energetic edge: Kinetics of circumneutral iron oxidation by lithotrophic iron-oxidizing bacteria isolated from the wetland-plant rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 68: 3988–3995
- Ortiz M, Legatzki A, Neilson J W, Fryslie B, Nelson W M, Wing R A, Soderlund C A, Pryor B M, Maier R M. 2014. Making a living while starving in the dark: Metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *ISME J*, 8: 478–491
- Pantke C, Obst M, Benzerara K, Morin G, Ona-Nguema G, Dippon U, Kappler A. 2012. Green Rust Formation during Fe(II) Oxidation by the Nitrate-Reducing *Acidovorax* sp. Strain BoFeN1. *Environ Sci Technol*, 46: 1439–1446
- Price M N, Dehal P S, Arkin A P. 2009. FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol*, 26: 1641–1650
- Qiao J T, Li X M, Hu M, Li F B, Young L Y, Sun W M, Huang W, Cui J H. 2018. Transcriptional activity of arsenic-reducing bacteria and genes regulated by lactate and biochar during arsenic transformation in flooded paddy soil. *Environ Sci Technol*, 52: 61–70
- Raiswell R, Canfield D E. 2011. The iron biogeochemical cycle past and present. *Geochem Persp*, 1: 1–220
- Rameshkumar N, Lang E, Tanaka N. 2016. Description of *Vogesella oryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of saline tolerant pokkali rice. *Syst Appl Microbiol*, 39: 20–24
- Ratering S, Schnell S. 2001. Nitrate-dependent iron(II) oxidation in paddy soil. *Environ Microbiol*, 3: 100–109

- Sahin N, Portillo M C, Kato Y, Schumann P. 2009. Description of *Oxalicibacterium horti* sp. nov. and *Oxalicibacterium faecigallinarum* sp. nov., new aerobic, yellow-pigmented, oxalotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 296: 198–202
- Sobolev D, Roden E. 2004. Characterization of a neutrophilic, chemolithoautotrophic Fe(II)-oxidizing β -proteobacterium from freshwater wetland sediments. *Geomicrobiol J*, 21: 1–10
- Spring S. 2006. The Genera *Leptothrix* and *Sphaerotilus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K H, Stackebrandt E, eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer. 758–777
- Straub K L, Benz M, Schink B, Widdel F. 1996. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl Environ Microbiol*, 62: 1458–1460
- Tao L, Zhang W, Li H, Li F B, Yu W M, Chen M J. 2012. Effect of pH and weathering indices on the reductive transformation of 2-nitrophenol in south China. *Soil Sci Soc Am J*, 76: 1579–1591
- Trouwborst R E, Johnston A, Koch G, Luther III G W, Pierson B K. 2007. Biogeochemistry of Fe(II) oxidation in a photosynthetic microbial mat: Implications for Precambrian Fe(II) oxidation. *Geochim Cosmochim Acta*, 71: 4629–4643
- Wang J, Muyzer G, Bodelier P L E, Laanbroek H J. 2009. Diversity of iron oxidizers in wetland soils revealed by novel 16S rRNA primers targeting *Gallionella*-related bacteria. *ISME J*, 3: 715–725
- Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole J R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, 73: 5261–5267
- Weber K A, Achenbach L A, Coates J D. 2006. Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol*, 4: 752–764
- Weiss J V, Rentz J A, Plaia T, Neubauer S C, Merrill-Floyd M, Lilburn T, Bradburne C, Megonigal J P, Emerson D. 2007. Characterization of neutrophilic Fe(II)-oxidizing bacteria isolated from the rhizosphere of wetland plants and description of *Ferritrophicum radiculicola* gen. nov. sp. nov., and *Sideroxydans paludicola* sp. nov. *Geomicrobiol J*, 24: 559–570
- Weon H Y, Kim B Y, Lee C M, Hong S B, Jeon Y A, Koo B S, Kwon S W. 2009. *Solitalea koreensis* gen. nov., sp. nov. and the reclassification of [*Flexibacter*] *canadensis* as *Solitalea canadensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59: 1969–1975
- Werner R A, Brand W A. 2001. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15: 501–519
- Wrighton K C, Thomas B C, Sharon I, Miller C S, Castelle C J, VerBerkmoes N C, Wilkins M J, Hettich R L, Lipton M S, Williams K H, Long P E, Banfield J F. 2012. Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science*, 337: 1661–1665
- Wu J, Joergensen R G, Pommerening B, Chaussod R, Brookes P C. 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction—An automated procedure. *Soil Biol Biochem*, 22: 1167–1169
- Xu Y, He Y, Feng X, Liang L, Xu J, Brookes P C, Wu J. 2014. Enhanced abiotic and biotic contributions to dechlorination of pentachlorophenol during Fe(III) reduction by an iron-reducing bacterium *Clostridium beijerinckii* Z. *Sci Total Environ*, 473–474: 215–223
- Zhao L, Dong H, Kukkadapu R, Agrawal A, Liu D, Zhang J, Edlmann R E. 2013. Biological oxidation of Fe(II) in reduced nontronite coupled with nitrate reduction by *Pseudogulbenkiania* sp. Strain 2002. *Geochim Cosmochim Acta*, 119: 231–247
- Zumsteg A, Schmutz S, Frey B. 2013. Identification of biomass utilizing bacteria in a carbon-depleted glacier forefield soil by the use of ^{13}C DNA stable isotope probing. *Environ Microbiol Rep*, 5: 424–437

(责任编辑: 张甘霖)