

水稻土中铁还原菌多样性*

黎慧娟^{1,2**} 彭静静^{1,2}

(¹中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室, 福建厦门 361021; ²中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 微生物介导的异化 Fe(III) 还原是非硫厌氧环境中 Fe(III) 还原生成 Fe(II) 的主要途径, 然而相关的铁还原菌还不是很清楚, 特别是在水稻土中。本文采用富集培养的方法, 以乙酸和氢气作为电子供体, 水铁矿和针铁矿作为电子受体, 通过末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术和 16S rRNA 基因克隆测序相结合的分子生物学方法研究了水稻土中铁还原菌的多样性。结果表明: 无论是以乙酸或氢气为电子供体, 水铁矿或针铁矿为电子受体, 地杆菌(*Geobacter*)和梭菌(*Clostridiales*)是富集到的主要微生物群落; 乙酸为电子供体时, 富集到的主要微生物群落还包括红环菌(*Rhodocyclaceae*); 因此, 除地杆菌外, 梭菌和红环菌很可能也是水稻土中重要的铁还原菌。

关键词 水稻土 异化铁还原菌 富集培养 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术

文章编号 1001-9332(2011)10-2705-06 **中图分类号** S154.3 **文献标识码** A

Phylogenetic diversity of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria in paddy soil. LI Hui-juan^{1,2}, PENG Jing-jing^{1,2} (¹Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, Fujian, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2011, 22(10): 2705-2710.

Abstract: Microorganism-mediated dissimilatory Fe(III) reduction is recognized as the dominant mechanism for Fe(III) reduction to Fe(II) in non-sulfidogenic anaerobic environments, but the microorganisms involved, especially in paddy soil, are still poorly understood. In this paper, an enrichment culture was conducted to study the phylogenetic diversity of Fe(III)-reducing bacteria in paddy soil, with acetate or hydrogen as the electron donor and with ferrihydrite or goethite as the electron acceptor, and by the methods of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technology and 16S rRNA genes cloning and sequencing. No matter what the electron donor and electron acceptor were supplemented, the most abundant microorganisms were *Geobacter* and *Clostridiales*, and *Rhodocyclaceae* were also abundant, when acetate was supplemented as electron donor, which suggested that besides *Geobacter*, *Clostridiales* and *Rhodocyclaceae* could be also the important Fe(III)-reducing bacteria in paddy soil.

Key words: paddy soil; dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria; enrichment culture; terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technology.

铁是地壳中含量第四丰富的元素, 在自然界中主要以 Fe(II) 和 Fe(III) 的形式存在。微生物介导的异化 Fe(III) 还原是生态系统中 Fe(III) 还原生成 Fe(II) 的主要途径^[1]。在非硫厌氧环境中, 异化 Fe(III) 还原是重要的生物地球化学循环过程, 它对有机物分解、抑制甲烷生成及有机污染物的降解都有重要贡献, 同时对微量元素、重金属和放射性核素的迁移有重要影响^[2-3]。

与异化 NO₃⁻ 还原及异化 SO₄²⁻ 还原相比, 异化 Fe(III) 还原的研究开始较晚。直到 20 世纪 80 年代末, 可以通过还原 Fe(III) 获得能量用于生长的微生物陆续得到分离^[4-8], 异化 Fe(III) 还原才被广泛关注, 并成为环境研究领域的热点问题。目前, 异化 Fe(III) 还原的研究主要集中于沉积物及自然湿地, 对水稻土的相关研究国内报道较少。水稻是我国乃至亚洲的主要粮食作物之一, 我国水稻土面积达 3000 万 hm²^[9], 是生态系统中重要的生境类型, 因此, 研究水稻土中异化 Fe(III) 还原菌具有重要意义。

* 国家自然科学基金重点项目(41090282)资助。

** 通讯作者。E-mail: hqli@iue.ac.cn

2011-02-28 收稿, 2011-07-31 接受。

乙酸和氢气是水稻土中有机物分解生成的重要中间产物^[10],同时,它们也是铁还原菌的重要电子供体。铁氧化物在自然界中存在各种形态,其中针铁矿是一种稳定的铁氧化物形态,在生态系统中广泛存在^[11];而由于丰富的有机质含量及活跃的铁循环,水铁矿也是湿地及水稻土中重要的铁氧化物形态^[12-13]。因此,本研究选择乙酸和氢气作为异化铁还原菌电子供体,水铁矿和针铁矿作为电子受体。由于铁还原菌通用的功能基因尚未报道,故本研究采用富集培养的方法来研究水稻土中铁还原菌的多样性。

1 材料和方法

1.1 供试土壤

试验用水稻土采自湖南冷水江市锑矿区非污染水稻田。采集的土壤淹水保存于PVC瓶中运回实验室。土壤的分析方法参考《土壤农业化学分析法》^[14]。土壤理化性质:pH 6.7, 有机碳 29.2 g·kg⁻¹, 总铁 22.3 g·kg⁻¹。

1.2 富集培养试验

富集培养采用PIPER缓冲液(10 mmol·L⁻¹, pH 6.8)淡水培养基。培养基包含:25 mmol·L⁻¹合成铁氧化物, 0.11 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.61 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 2 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 0.5 mmol·L⁻¹ NH₄Cl, 0.05 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 维生素及微量元素^[15]。培养基灭菌后在高纯氮气(99.999%)下冷却至室温并分装成每瓶8 mL(乙酸为电子供体)或9 mL(氢气为电子供体)若干瓶。水铁矿及针铁矿合成参照Schwertmann 和 Cornell^[16], 并用X-射线衍射验证。铁氧化物表面积测定参照Bosch等^[17], 水铁矿和针铁矿表面积分别为279和49 m²·g⁻¹。

试验共进行两代富集培养,第一代富集培养采用水铁矿作为电子受体,分别采用乙酸和氢气作为电子供体;第二代富集培养分别采用水铁矿和针铁矿作为电子受体,乙酸和氢气作为电子供体。具体操作如下:称取10 g新鲜水稻土放入含有玻璃珠的90 mL无菌无氧水中,震荡摇匀。在高纯氮气(99.999%)保护下,取1 mL的土壤悬液加入到上述分装好的培养基中。以乙酸为电子供体的处理,再加入1 mL 100 mmol·L⁻¹的乙酸钠;以氢气为电子供体的处理,通入混合气体(N₂:CO₂:H₂=90:5:5)。30℃避光培养,每个处理3次重复。

1.3 分析方法

Fe(II)的测定参照鲁如坤^[14]及 Lovley 和 Philpips^[4]。具体操作如下:用无菌注射器抽取100 μL已经充分混匀的培养悬液,立即加入含1.5 mL 0.5 mmol·L⁻¹ HCl提取液的离心管中。浸提15 min, 12000 ×g 离心5 min, 取100 μL上清液加入含邻菲罗啉的HEPES缓冲液中,30 min后通过分光光度计比色测定。

1.4 DNA提取

在试验结束时收集富集培养液用于提取DNA。样品中先加入草酸铵(200 mmol·L⁻¹)-草酸(120 mmol·L⁻¹)混合液,放置于暗处。待铁氧化物完全溶解后,离心,用DNA提取缓冲液洗涤沉淀,以去除残留的草酸铵-草酸对DNA提取的影响。DNA提取参照Su等^[18],采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法。

1.5 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)分析

以提取的菌液DNA为模板,用细菌通用引物27f和1492r扩增大约1500 bp的16S rRNA基因片段^[19]。引物27f采用6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)进行荧光标记。PCR反应体系(50 μL)为:5 μL 10×缓冲液(天根), 3.6 μL 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1 μL 10 mmol·L⁻¹ dNTP(天根), 2 μL 150 μmol·L⁻¹ BSA, 1.6 μL 10 μmol·L⁻¹ 上下游引物(天根), 2.5 U Taq DNA聚合酶(TakaRa), 1 μL DNA模板。反应条件采用touchdown程序,具体为:94℃预变性4 min, 94℃变性60 s(60℃~0.5℃, 30 s), 72℃延伸60 s, 进行10个循环, 再94℃变性60 s, 55℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 进行22个循环, 最后72℃延伸10 min。PCR产物采用试剂盒纯化(TakaRa),用Msp I(TakaRa)37℃酶切。酶切产物用50 μL 100%乙醇、2.5 μL 3 mol·L⁻¹乙酸钠(pH 5.2)在-20℃过夜沉淀,离心(18000 ×g, 30 min)。得到的DNA沉淀用70%乙醇洗涤,再离心(18000 ×g, 30 min)。纯化产物风干后,采用3130xl Genetic Analyzer测序(Applied Biosystems)。

1.6 克隆、测序、系统发育分析及片断校正

采用上述同样的方法扩增16S rRNA基因片段,但引物27f不采用6-羧基荧光素标记。得到的PCR产物用试剂盒(TakaRa)切胶纯化,最后溶于25 μL去离子水。克隆所用载体为pMD19-T,感受态细胞为Escherichia coli JM109(Bioteka)。随机挑选克隆子进行菌落PCR验证。使用限制性核酸内切酶Hha I(TaKaRa)对上述各阳性克隆子扩增出的基因

片段进行酶切消化(37°C , 4 h), 用3%的琼脂糖凝胶分离酶切片段。具有相同酶切图谱的克隆子被认为是一个分类单元(OTU)。

分析酶切图谱, 选择有代表性的克隆子测序。对所有获得的序列进行 *in silico* 酶切, 同时挑选有代表性的克隆子质粒或菌落用荧光标记的细菌通用引物扩增, 通过T-RFLP分析(具体方法同1.5), 进行片断校正。

所获得的序列在 RDP-II 数据库中进行系统分类分析, 同时在 NCBI 网站中比对同源性, 下载合适的序列用于系统发育分析。提交试验序列, 序列登录号为: FR774779 ~ FR774833。利用 MEGA 4.0 软件, 使用邻接法(neighbor-joining method)进行系统发育分析, 用 Bootstrap 值(1000 Bootstrap)检验系统进化树上各节点的置信水平。

2 结果与分析

2.1 Fe(III)的还原

从图1可知, 第一代富集培养以乙酸为电子供体时, Fe(III)还原速率较慢, 为 $251 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,

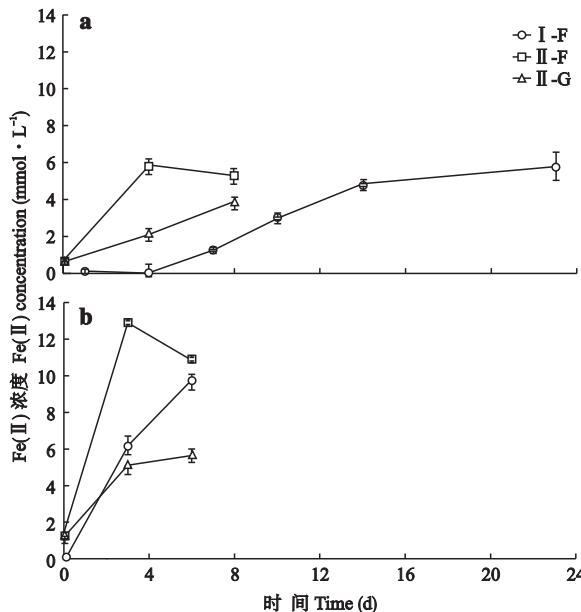


图1 富集培养过程中 Fe(II) 的动态变化

Fig. 1 Dynamics of Fe(II) during the enrichment culture (mean \pm SD, n=3).

a) 乙酸为电子供体 Acetate was used as the electron donor; b) 氢气为电子供体 Hydrogen was used as the electron donor. I-F: 第一代富集培养, 水铁矿为电子受体 The first-generation enrichment cultures with ferrihydrite as the electron acceptor; II-F: 第二代富集培养, 水铁矿为电子受体 The second-generation enrichment cultures with ferrihydrite as the electron acceptor; II-G: 第二代富集培养, 针铁矿为电子受体 The second-generation enrichment cultures with goethite as the electron acceptor. 下同 The same below.

23 d后, Fe(III)还原量为26%;而以氢气为电子供体时, Fe(III)还原速率为 $1632 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 6 d后, Fe(III)还原量达45%。第二代富集培养以水铁矿为电子受体时,无论电子供体是乙酸或氢气, Fe(III)还原速率均大于第一代富集培养过程中相应处理的Fe(III)还原速率, 到第3或第4天时, Fe(III)还原均达到稳定;以乙酸为电子供体时, Fe(III)还原速率为 $1443 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 还原量为26%;以氢气为电子供体时, 还原速率为 $4313 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 还原量达59%。第二代富集培养以针铁矿为电子受体, 乙酸和氢气为电子供体时, Fe(III)还原速率分别为483和937 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, Fe(III)还原量分别为18%和26%。

2.2 克隆子片断校正、克隆文库的构建及系统发育分析

克隆子片断校正结果见表1。尽管本试验中随机挑选未挑到60和515 bp 对应的克隆子, 但是我们之前试验结果(尚未发表)表明, 60和515 bp 分别对应地杆菌(*Geobacter*)和梭菌(*Clostridiales*)。

分别挑选89和65个克隆子构建了克隆文库 II-A-G(第二代富集培养, 乙酸为电子供体, 针铁矿为电子受体)和 II-H-F(第二代富集培养, 氢气为电子供体, 水铁矿为电子受体)。两个克隆文库中均以变形杆菌(*Proteobacteria*)和厚壁菌(*Firmicutes*)为优势种群, 具体以 δ -变形杆菌和梭菌为主(图2, 表2)。

2.3 微生物群落的 T-RFLP 分析

电子供体对T-RFLP图谱有明显影响(图3), 不过无论是以乙酸或氢气为电子供体, 159 bp 都是主要片断, 相对丰度为11% ~ 47%。具体来说, 以乙酸

表1 试验培养富集到的主要 Fe(III) 还原菌 T-RFs 片断的系统发育分析

Table 1 Assignment of dominant T-RFs to defined bacterial taxa

片断 T-RF (bp)	系统发育 Phylogenetic affiliation
76	红环菌 <i>Rhodocyclaceae</i>
123	除硫单胞菌 <i>Desulfuromonas</i>
128	地杆菌 <i>Geobacter</i>
159	地杆菌 <i>Geobacter</i>
213	醋杆菌 <i>Acetobacterium</i>
224	醋杆菌 <i>Acetobacterium</i>
489	红环菌/动胶菌 <i>Rhodocyclaceae/Zoogloea</i>
509	梭菌 <i>Clostridium</i>
518	梭菌 <i>Clostridium</i>

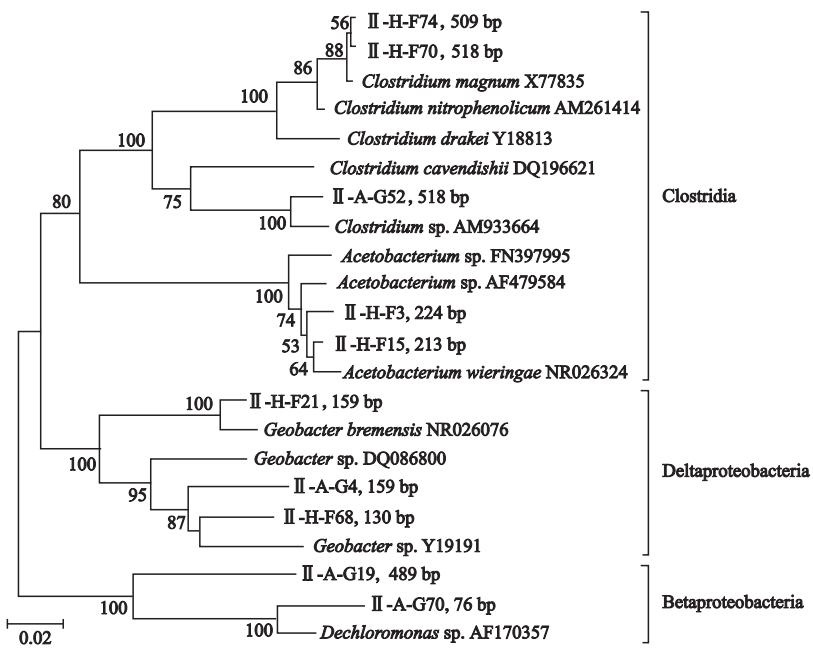


图2 基于16S rRNA基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of representative bacterial 16S rRNA gene sequences.

表2 水稻土富集培养条件下16S rRNA基因克隆子系统发育、数量及百分比分析

Table 2 Phylogenetic affiliations, numbers and percentage of 16S rRNA gene clones retrieved from paddy soil enrichment culture

系统发育关系 Phylogenetic affiliation	克隆个数(百分比) Clone number (Percentage)	
	II-A-G	II-H-F
变形杆菌门 Proteobacteria		
α-变形杆菌 α-Proteobacteria	1 (1.1%)	0 (0%)
β-变形杆菌 β-Proteobacteria	8 (9.0%)	1 (1.5%)
γ-变形杆菌 γ-Proteobacteria	10 (11.2%)	0 (0%)
δ-变形杆菌 δ-Proteobacteria	53 (60.0%)	36 (55.4%)
未知变形杆菌 Unclassified Proteobacteria	0 (0%)	1 (1.5%)
厚壁菌门 Firmicutes		
芽孢杆菌 Bacillales	1 (1.1%)	0 (0%)
梭菌 Clostridiales	8 (9.0%)	12 (18.5%)
未知厚壁菌 Unclassified Firmicutes	1 (1.1%)	0 (0%)
其他 Others	7 (7.9%)	22 (33.8%)

II-A-G: 第二代富集培养,乙酸为电子供体,针铁矿为电子受体 The second-generation enrichment cultures with acetate as the electron donor and goethite as the electron acceptor; II-H-F: 第二代富集培养,氢气为电子供体,水铁矿为电子受体 The second-generation enrichment cultures with hydrogen as the electron donor and ferrihydrite as the electron acceptor.

为电子供体时,60、76、159、489和509 bp是主要片断;以氢气为电子供体时,128、159、213、224和515 bp是主要片断。当以乙酸为电子供体针铁矿为电子受体时,123 bp也是主要片断。

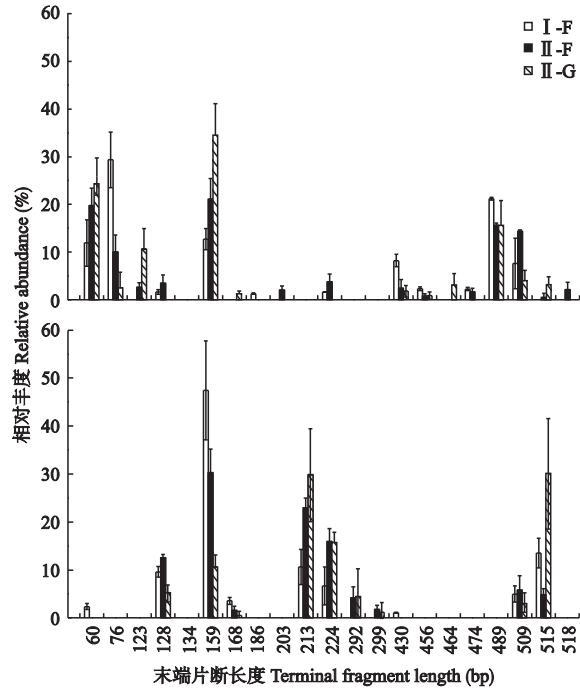


图3 富集培养结束时微生物群落16S rRNA基因T-RFLP分析

Fig. 3 T-RFLP analysis of the 16S rRNA gene of the microbial community after the enrichment culture (mean±SD, n=3).

3 讨 论

本研究以乙酸/氢气为电子供体,水铁矿/针铁矿为电子受体,采用富集培养的方法研究了水稻土中铁还原菌的多样性。结果表明,无论以哪种物质为

电子供体和电子受体,地杆菌和梭菌都是富集到的主要微生物群落;乙酸为电子供体时,红环菌也是富集到的主要微生物群落。地杆菌广泛存在于各种厌氧环境中,是许多沉积物中主要的铁还原菌^[2]。在生物修复重金属污染水体时,通过添加乙酸或其他有机质,通常能刺激地杆菌大量富集,甚至其相对丰度可达微生物群落的80%^[20-22]。最近研究表明,以乙酸为电子供体水铁矿为电子受体时,地杆菌也是水稻土中富集到的主要铁还原菌^[23]。地杆菌广泛存在于各种厌氧环境很可能与它们能利用乙酸为电子供体有关^[2]。除乙酸外,大部分(63%)地杆菌也能利用氢气作为电子供体^[2,24-28]。

梭菌是水稻土淹水培养中的主要菌落,特别是培养的早期阶段,这可能与它们能分解简单有机质的功能相关^[29]。梭菌通常被认为是发酵型铁还原菌,即它们把Fe(III)作为电子库而不是电子受体,在发酵氧化有机质时只是把少量的还原当量(约5%)传递给Fe(III)^[1-2]。在发酵型铁还原中,Fe(III)与发酵过程中产生的NAD(P)H进行氧化还原耦合,产生的吉布斯自由能只是副产物,而不是发酵微生物生长所必需的,因此,发酵型铁还原菌不能通过还原Fe(III)获得能量用于生长^[1-2]。目前已经分离得到数株具有发酵型铁还原能力的梭菌^[30-33]。在本研究中,无论是提供乙酸还是氢气为电子供体,梭菌都是富集到的主要微生物群落,这与Wang等^[34]的研究结果一致。此外,在以水铁矿和针铁矿为电子受体的处理中,梭菌都有大量富集;Wang等^[34]也发现,梭菌既可以利用柠檬酸铁又可以利用水铁矿,这说明梭菌在利用电子供体方面有很大的灵活性^[34]。Wang等^[34]认为,土壤接种液中残余的有机质很可能在发酵过程中提供了电子驱动Fe(III)还原,以致梭菌大量富集。然而本研究中,梭菌在第二代富集培养中仍然是富集到的主要微生物群落,这表明不是残存的有机质通过发酵为其提供了电子而是添加的乙酸和氢气提供了电子。关舒元^[35]从水稻土中分离到的梭菌(*Clostridium butyricum*)除了可以利用葡萄糖作为底物,还能利用非发酵型底物乙酸来还原Fe(III)。因此,除了发酵型铁还原外,梭菌很可能还可以进行呼吸型铁还原,即以Fe(III)为电子受体氧化有机物。

氢气是发酵产物,梭菌是最受关注的发酵产氢微生物^[36]。氢气同时也是生态系统中重要的电子供体,能被许多微生物异化氧化,如硫还原菌。氢气的产生与消耗(被氧化)都是由氢化酶催化。基因组学

研究表明,梭菌具有大量氢化酶基因,其中包括具有氧化氢气的氢化酶基因,此基因之前只在产甲烷古菌和硫还原菌中发现过^[37]。同时,研究也发现梭菌(*C. pasteurianum*)同时具有吸收氢化酶(uptake hydrogenase)和双向氢化酶(bidirectional hydrogenase)^[38]。这些证据表明,梭菌很有可能以氢气作为电子供体异化还原Fe(III)。

尽管尚未有报道表明醋杆菌(*Acetobacterium*)是铁还原菌,但醋杆菌可以以氢气为电子供体氧化二氧化碳^[39]。最新研究表明,在水稻土中以乙酸为电子供体针铁矿为电子受体时,红环菌也是可以富集到的铁还原菌^[23]。因此,除了地杆菌,水稻土中可能还存在着许多其他的铁还原菌,它们在原位环境中对铁还原的贡献还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Lovley DR. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 1991, **55**: 259-287
- [2] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, **49**: 219-286
- [3] Qu D(曲东), Zhang Y-P(张一平), Schnell S, et al. Effect of iron oxide addition on hydrogen, carbon dioxide and methane geneses in paddy soil. *Chinese Journal of Applied Ecology*(应用生态学报), 2003, **14**(8): 1313-1316 (in Chinese)
- [4] Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, et al. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, 1987, **330**: 252-254
- [5] Lovley DR, Phillips EJP. Novel mode of microbial energy metabolism: Organic-carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**: 1472-1480
- [6] Myers CR, Nealson KH. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron-acceptor. *Science*, 1988, **240**: 1319-1321
- [7] Caccavo F, Blakemore RP, Lovley DR. A hydrogen-oxidizing, Fe(III)-reducing microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**: 3211-3216
- [8] Caccavo F, Lonergan DJ, Lovley DR, et al. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen-oxidizing and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**: 3752-3759
- [9] Yang R-C(杨仁崔), Tang S-X(汤圣祥). Rice Almanac. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2003 (in Chinese)
- [10] Peng JJ, Rui JP, Lu YH. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**: 2894-2901
- [11] Cornell RM, Schwertmann U. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. New York: Wiley-VCH, 2003

- [12] Wang HD, White GN, Turner FT, et al. Ferrihydrite, lepidocrocite, and goethite in coatings from east Texas vertic soils. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, **57**: 1381–1386
- [13] Kögel-Knabner I, Amelung W, Cao ZH, et al. Biogeochemistry of paddy soils. *Geoderma*, 2010, **157**: 1–14
- [14] Lu R-K (鲁如坤). Analytical Methods for Soil and Agricultural Chemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999 (in Chinese)
- [15] Lovley DR. The Prokaryotes. New York: Springer-Verlag, 2000
- [16] Schwertmann U, Cornell RM. Iron Oxides in the Laboratory Preparation and Characterization. New York: Wiley-VCH, 1996
- [17] Bosch J, Heister K, Hofmann T, et al. Nanosized iron oxide colloids strongly enhance microbial iron reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76**: 184–189
- [18] Su JQ, Yang XR, Zheng TL, et al. An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*: A PSP-producing dinoflagellate. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **69**: 425–430
- [19] Lane DJ. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: John Wiley and Sons, 1991
- [20] Anderson RT, Vrionis HA, Ortiz-Bernad I, et al. Stimulating the *in situ* activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 5884–5891
- [21] Holmes DE, O’Neil RA, Vrionis HA, et al. Subsurface clade of *Geobacteraceae* that predominates in a diversity of Fe (III)-reducing subsurface environments. *ISME Journal*, 2007, **1**: 663–677
- [22] Moon HS, McGuinness L, Kukkadapu RK, et al. Microbial reduction of uranium under iron- and sulfate-reducing conditions: Effect of amended goethite on microbial community composition and dynamics. *Water Research*, 2010, **44**: 4015–4028
- [23] Hori T, Muller A, Igarashi Y, et al. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ¹³C-acetate probing. *ISME Journal*, 2010, **4**: 267–278
- [24] Coates JD, Bhupathiraju VK, Achenbach LA, et al. *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe (III)-reducers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**: 581–588
- [25] Nevin KP, Holmes DE, Woodard TL, et al. *Geobacter bemandjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe (III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, **55**: 1667–1674
- [26] Sung Y, Fletcher KF, Ritalaliti KM, et al. *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 2775–2782
- [27] Nevin KP, Holmes DE, Woodard TL, et al. Reclassification of *Trichlorobacter thiogenes* as *Geobacter thiogenes* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, **57**: 463–466
- [28] Prakash O, Gihring TM, Dalton DD, et al. *Geobacter daltonii* sp. nov., an Fe (III)- and uranium (VI)-reducing bacterium isolated from a shallow subsurface exposed to mixed heavy metal and hydrocarbon contamination. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, **60**: 546–553
- [29] Rui JP, Peng JJ, Lu YH. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**: 4879–4886
- [30] Dobbin PS, Carter JP, San Juan CGS, et al. Dissimilatory Fe (III) reduction by *Clostridium beijerinckii* isolated from freshwater sediment using Fe (III) maltol enrichment. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **176**: 131–138
- [31] Park HS, Kim BH, Kim HS, et al. A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 2001, **7**: 297–306
- [32] Scala DJ, Hacherl EL, Cowan R, et al. Characterization of Fe (III)-reducing enrichment cultures and isolation of Fe (III)-reducing bacteria from the Savannah River site, South Carolina. *Research in Microbiology*, 2006, **157**: 772–783
- [33] Lin B, Hyacinthe C, Bonneville S, et al. Phylogenetic and physiological diversity of dissimilatory ferric iron reducers in sediments of the polluted Scheldt estuary, Northwest Europe. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**: 1956–1968
- [34] Wang XJ, Yang J, Chen XP, et al. Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China. *Journal of Soils and Sediments*, 2009, **9**: 568–577
- [35] Guan S-Y (关舒元). Characterization and Phylogenetic Analysis of Ferric Reducing Microorganism. Master Thesis. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2007 (in Chinese)
- [36] Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, **29**: 173–185
- [37] Calusinska M, Happe T, Joris B, et al. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: A comparative genomic perspective. *Microbiology*, 2010, **156**: 1575–1588
- [38] Adams MWW, Mortenson LE. The purification of hydrogenase II (uptake hydrogenase) from the anaerobic N₂-fixing bacterium *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, **766**: 51–61
- [39] Balch WE, Schöberth S, Tanner RS, et al. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1977, **27**: 355–361

作者简介 黎慧娟,女,1981年生,博士研究生。主要从事环境微生物分子生态学研究。E-mail: hjli@iue.ac.cn

责任编辑 肖红