

淹水培养过程中水稻土地杆菌科微生物群落结构变化特征

拓晓骅¹, 朱 辉¹, 王保莉^{1*}, 曲 东²

(1.西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:采用淹水非种植水稻土微环境模式系统,对水稻土进行 1 h 和 1、5、10、20、30 d 淹水培养,利用 PCR-DGGE 技术检测、多元统计分析淹水培养过程中地杆菌科微生物的群落结构和多样性变化规律及其影响因子。结果表明,淹水培养过程中地杆菌科微生物群落结构发生了明显的演替性变化:由 r-对策优势种群演替至 k-对策优势种群,且群落结构由不稳定向稳定演变(培养 1 h 和 1 d 处理间相似性最低,群落结构变化最大,20 d 和 30 d 处理间相似性最高,群落结构变化最小);该过程中,地杆菌科微生物物种丰富度指数和 Shannon-Weiner 指数在 1 h 处理中均为最小,5 d 处理的最大;CCA 相关性分析表明,淹水培养过程中 Fe(Ⅱ)浓度与群落结构多样性指数呈正相关,证实该类微生物对于异化铁还原能力具有重要作用;测序结果表明,19 个优势 DGGE 条带与来自水稻土中的未培养地杆菌科微生物亲缘关系相近。

关键词:地杆菌科微生物;群落结构;水稻土;变性梯度凝胶电泳

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)06-1165-07

Changing Characteristics of *Geobacteraceae* Community Structure in Paddy Soil During Flooding Incubation

TUO Xiao-hua¹, ZHU Hui¹, WANG Bao-li^{1*}, QU Dong²

(1.College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China; 2.College of Resources and Environment, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Geobacteraceae* is identified as a typical family of dissimilatory iron(Ⅲ) reducer with distribution in anaerobic environment. It plays an important role on the decomposition of organic matter, the suppression of methane production, the bioremediation of heavy metal pollution with valence fluctuation, and the transformation of phosphorus, sulfur and other nutrient elements. In this study, total DNA was extracted from six paddy soil slurries including 1 h, 1 d, 5 d, 10 d, 20 d and 30 d treatments of flooding incubation. The changing characteristics of community diversity and succession of *Geobacteraceae* were analyzed by using denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) based on 16S rRNA gene (rDNA) of *Geobacteraceae*. The influence factors on characteristics of community diversity and succession of *Geobacteraceae* in different flooding treatments were analyzed by canonical correspondence analysis (CCA). It showed that the *Geobacteraceae* community structure was taken place the successive changes under different flooding time. The r-strategists organisms dominated in the early succession, while the k-strategists organisms gradually replaced them in the late succession. Similarity coefficient indices were the lowest between 1 h and 1 d treatment and the highest between 20 d and 30 d treatment. Richness indices and Shannon-Weiner indices were the highest in flooding 5 d treatment, and the lowest in flooding 1 h treatment. The result of PCA (principal component analysis) based on digitized DGGE patterns and the sequences showed that the changes of the community structure were stable at the end of flood incubation. The CCA ordination among DGGE profiles and environmental variable factors demonstrated that Fe(Ⅱ) concentration strongly correlated with the total variation of the bacterial community. The phylogenetic tree of preponderant DGGE bands could be divided into two groups. The major sequences could get together with the sequences of uncultured *Geobacter* spp. from paddy soil. The dynamic variation of community structure resulted from different flooding time will provide a theoretical basis to clarify the characteristics of community structures of iron-reducing bacteria and phylogenetic classification.

Keywords: *Geobacteraceae*; community structure; paddy soil; denatured gradient gel electrophoresis(DGGE)

收稿日期:2011-11-21

作者简介:拓晓骅(1986—),男,陕西渭南人,硕士研究生,主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail:tuoxiaohuaky@126.com

* 通讯作者:王保莉 E-mail:wbl@nwsuaf.edu.cn

地杆菌科(*Geobacteraceae*)微生物是普遍存在于铁还原环境中的主要微生物^[1-4],尤其是存在于被污染的或者富含有机物的地下水中^[5]。研究表明,所有可培养的地杆菌科微生物都具有异化铁还原能力^[6-7]。为了更好地理解这类微生物在重金属污染土壤修复^[8]、有机污染物降解^[9]、无介体微生物燃料电池的研制^[10]以及对甲烷产生的抑制^[11-12]等方面的作用,就需要首先研究不同生态环境中地杆菌科微生物的群落结构变化特征。

水稻土以其所具有的周期性的氧化还原变化,且对存在于其中的微生物群落结构的显著影响,已经成为微生物分子生态学的研究对象。2000 年, Lüdemann 等^[13]建立了厌氧非种植的水稻土淹水培养模式,用以研究水稻土中微生物的生态学特征。Noll 等^[14]采用基于细菌 16S rRNA 转录水平的 T-RFLP 技术分析了意大利水稻土在淹水培养过程中细菌的群落结构动态变化,发现在淹水 1 h 到 2 d 的时间段内群落结构变化最为活跃,淹水 21 d 以后活跃程度下降,21 d 后群落结构几乎处于稳定状态。Wang 等^[15]研究了湖南水稻土中异化铁还原菌多样性,发现地杆菌是水铁矿富集培养下的优势菌群之一。Hori 等^[16]通过同位素标记证实,在添加水铁矿的水稻土中参与乙酸盐代谢的地杆菌种群占总群落的 85% 左右,表明地杆菌在水稻土微生物铁还原过程中的重要地位。鉴于地杆菌科微生物是地杆菌中的最主要的微生物类群,我们实验室^[17]于 2011 年采用 RFLP 技术分析了淹水时间对水稻土中地杆菌科微生物群落结构的影响,表明在不同淹水时期微生物群落结构发生了显著性变化,其优势地杆菌科微生物存在演替性变化。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术由 Muzyer 等^[18-19]于 1993 年引入到微生物分子生态研究中。该技术以其结果可靠、重现性好、操作方便等特点,迅速成为研究微生物群落多样性和动态变化的有力工具。本实验采用基于 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术对水稻土中地杆菌科微生物群落结构进行分析,以进一步分析淹水培养过程中地杆菌科微生物群落动态演替的变化规律,为研究地杆菌科微生物在重金属污染土壤修复及其在铁元素的地球化学循环中的作用提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土样

供试水稻土于 2008 年 10 月采自陕西省汉中市

南郑县董家营村水稻收获后的稻田。捡去其中的植物残体,自然风干后磨细并过 1 mm 土壤筛,将处理过的土样存于塑料容器中备用。

取 3.000 g 风干土样若干份,置于灭菌的血清瓶中,按土液比 1:1 加入去离子水,充 N₂ 5 min 用于去除其中氧气,保证厌氧环境。用带铝盖的橡胶塞封闭后置于 30 ℃ 的恒温培养箱中闭光培养,设置 1 h 和 1、5、10、20、30 d 6 个淹水时间处理,每个处理设置 3 个重复。到达培养时间后将土壤泥浆样品于 -20 ℃ 保存。淹水培养过程中 Fe(Ⅱ)含量及 pH 值列于表 1 中。

表 1 水稻土样淹水培养过程中土壤 pH 值及 Fe(Ⅱ)含量^[17]

Table 1 Fe(Ⅱ) concentration and pH in paddy soil during flooding incubation

淹水处理 Flooding time treatment	1 h	1 d	5 d	10 d	20 d	30 d
pH	6.64	6.12	6.63	6.70	6.69	6.52
Fe(Ⅱ)含量 Fe(Ⅱ) content/mg·g ⁻¹	0.553	0.780	6.123	8.396	9.807	10.480

1.2 土壤微生物总 DNA 的提取

将冻藏样品取出解冻后,按照 Zhou 等^[20]的方法提取土壤泥浆总 DNA。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取的纯度和提取效率,并用胶回收试剂盒进行 DNA 回收。

1.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

采用巢式 PCR 策略制备适合 DGGE 分析的 PCR 产物。第一轮反应以土壤总 DNA 为模板,采用地杆菌科微生物的 16S rRNA 基因的通用引物 Geo163F1 和 Geo163F2/825R^[17,3]进行 PCR 扩增。反应体系为:模板 1 μL、premix Taq 25 μL、正反引物各 1 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s、50 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。第二轮 PCR:对第一轮 PCR 产物稀释 40 倍,以其为模板,采用细菌通用引物 GC-341F/518R^[18]进行扩增。反应体系为:稀释 40 倍的第一轮扩增产物 1 μL、premix Taq 25 μL、正反引物各 1 μL。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s、50 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用 Bio-Rad 公司的 Dcode™ 基因突变分析仪对 PCR 反应产物进行分离。使用梯度混合仪制备变性剂浓度从 30% 到 60% (100% 变性剂为 7 mol·L⁻¹ 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物) 的 10% 的聚

丙酰胺胶,变性胶的浓度从上到下依次递增。待胶完全凝固后,将胶放入电泳槽中,每个孔加入含有 6× Loading Buffer 的 PCR 产物 35 μL。先在 50 V 电压下电泳 1 h,然后在 100 V 电压下电泳 10 h,系统温度为 60 ℃。采用 EB 染色 15 min 后,用 Bio-Rad 的紫外凝胶成像系统采集图像。本实验设置重复 2 次。

1.5 切胶回收测序

将 DGGE 图谱上的代表性条带分别切割后置于 1.5 mL 离心管中,加入 50 μL ddH₂O 过夜溶解,分别取 2 μL 上清液作为模板,以 341F/518R 为引物进行 PCR 扩增。将 PCR 产物切胶回收纯化后,连接到 pMD19-T 载体上,并转化进入大肠杆菌 JM109。将阳性克隆接入 5 mL LB 液体培养基中,37 ℃摇床 220 r·min⁻¹ 过夜培养。将菌液送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.6 构建系统发育树

DGGE 条带的测序结果在 Genbank 中比对分析;利用 ClusterW 软件进行多重序列比对;根据 N-J 法及 K2 模型,利用 MEGA4.0 软件构建系统发育树。

1.7 统计分析

用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱相似性、丰富度和 Shannon-Weiner 多样性指数^[21]。Sorensen 群落相似度指数计算公式为 $C_{ij}=2L_{ij}/(L_i+L_j)$,其中 C_{ij} 为样品 i 和样品 j 上位置相同的条带数, L_i 为样品 i 上的条带数, L_j 为样品 j 上的条带数。丰富度指数的计算公式为 $R=S-1/\ln N$,其中 R 为样品的丰富度指数, S 为样品的条带数, N 代表所有峰的总面积。多样性的 Shannon-Weiner 指数(H')计算公式为 $H'=-\sum P_i \ln P_i$,其中, $P_i=N_i/N$, N_i 代表单一条带的峰面积, N 代表所有峰的总面积, P_i 为特定条带亮度相对于所有条带总亮度的比率。

采用 UnFrac 进行基于进化树的地杆菌微生物群落构成的主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)^[22]。采用典范对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA) 对不同处理的生境相似度以及与环境因子的关系进行分析^[23-24]。CCA 排序采用软件 CANOCO 4.5 完成。

2 结果与分析

2.1 淹水培养过程中水稻土地杆菌科微生物群落结构变化分析

2.1.1 微生物群落变化相似性与演替分析

淹水培养过程中,水稻土地杆菌科微生物的群落

结构发生了明显的变化(图 1A)。1 h 和 1 d 处理的地杆菌科微生物的群落结构差异最大,相似性系数仅为 0.47,而 20 d 和 30 d 处理的群落相似性系数最大为 0.85(图 1B),表明培养初期地杆菌科微生物群落结构不稳定,而随着淹水时间延长群落结构趋于稳定。

DGGE 图谱表明各处理均分离出了数目不等的条带,且各个条带的灰度和迁移率都有所不同(图 1A)。按其特征主要分为 3 类:

(1)各处理中存在共同条带。如条带 1、7、8、9 和 19,但灰度有所不同。条带 1 在 1~5 d 处理灰度不断增强,而 10 d 和 30 d 处理则有所减弱;条带 8 在各处理中的灰度基本一致,是灰度最强的一类;条带 9 在 1 d 处理灰度最大,而随着培养时间的延长呈下降趋势。条带 19 在 1 h 处理中灰度最大,1 d 处理快速减弱,且随着培养时间增加逐渐增强。

(2)仅存在于几个处理中。如条带 3、4 和 17,分别在 1 d 处理、5 d 处理和 20 d 处理中存在;条带 5 在 5 d 处理和 30 d 处理中存在;条带 6 则在 5 d 和 10 d 处理中存在;条带 10 在 1 h 处理、1 d 处理、5 d 处理和 20 d 处理中存在;条带 11 则在 1 d 处理、5 d 处理、20 d 处理和 30 d 处理中存在。

(3)存在于特定时期。如条带 2 和条带 16 在 5 d 处理中开始出现,并在以后的培养过程中都存在,而条带 18 在 10 d 处理开始出现。

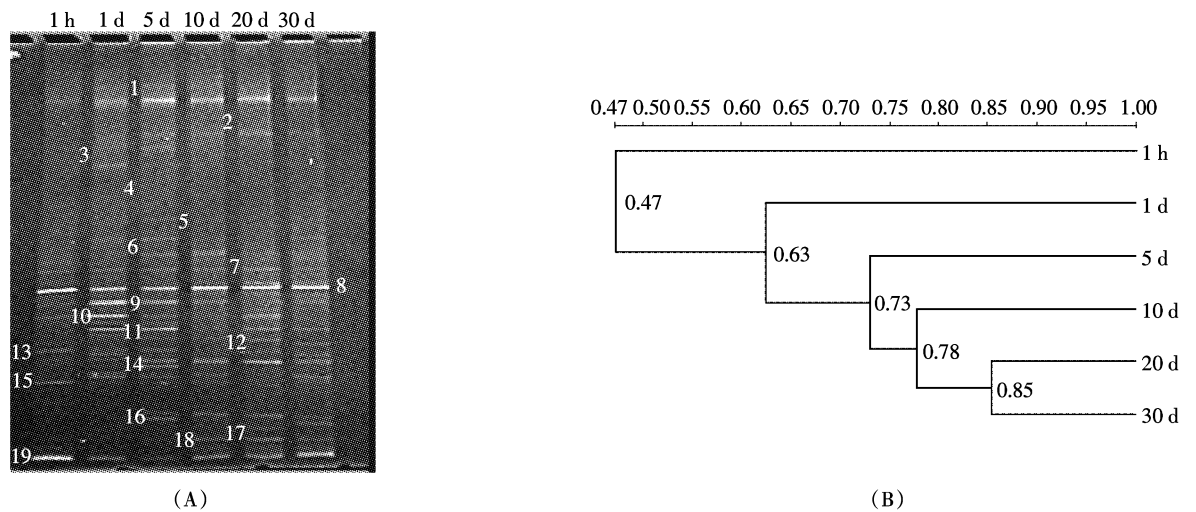
由此可见,在淹水培养的不同时期地杆菌科微生物群落结构存在演替变化,有些微生物持续存在但表现为数量上的恒定或增减,有些则在特定的时期出现。

2.1.2 不同淹水时间处理的 PCA 分析

通过系统发育分析,获得不同处理中优势地杆菌微生物群落的 16S rRNA 基因的序列进化关系,然后通过 UniFrac 进行 PCA 分析,结果如图 2 所示。两个排序轴共同解释了处理分布变化的 91.9%,说明使用第一和第二排序轴构建的排序分布图能够充分反映各个处理微生物构成相似度的情况。1 d 和 1 h 处理的点紧密聚集在一起,而 10、20 d 和 30 d 处理的点聚集在一起,5 d 处理的点与前两个集群明显疏远,说明 1 h 和 1 d 处理中的优势细菌群落构成相似,10、20 d 和 30 d 处理的优势细菌组成相似。

2.1.3 微生物群落多样性指数分析

水稻土中地杆菌科微生物群落丰富度指数(R)和 Shannon-Weiner 指数(H')见表 2。 R 在 1 h 处理最小,为 1.420。随着培养时间的延长 R 增大,5 d 处理



1 h 和 1、5、10、20、30 d 分别表示 6 个淹水处理,图 A 中数字表示进行序列测定的代表性条带
The 1 h, 1 d, 5 d, 10 d, 20 d and 30 d stand for different treatments and the data in figure A stand for typical DGGE band for sequencing

图 1 不同淹水时间处理中水稻土地杆菌科微生物的 DGGE 电泳图谱(A)和相似性聚类图(B)

Figure 1 DGGE profile of *Geobacteraceae* in paddy soil during flooding incubation(A) and cluster analysis of similarities(B)

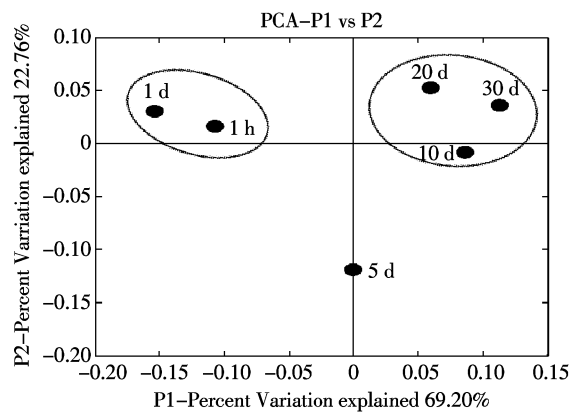


图 2 基于优势 DGGE 条带的 16S rRNA 基因序列的主成分
关联分析散点图

Figure 2 ScatterPlot of PCA analysis by UniFrac basis on
16S rDNA sequences of preponderant DGGE types

达到峰值;从 5~10 d 期间, R 快速下降,10 d 处理时 R 降至 1.635,而从 10~30 d, R 又呈上升趋势。1 h 淹水处理的 H' 最小(为 1.944),5 d 处理最大(为 2.759),而 20 d 和 30 d 处理的 Shannon-Weiner 指数最为接近,表明群落结构多样性相似,地杆菌科微生物群落

结构有稳定趋势。

2.2 不同淹水处理中优势地杆菌科微生物系统发育树分析

从 6 个淹水处理水稻土地杆菌科微生物的 PCR-DGGE 的聚丙烯酰胺凝胶中切胶回收了 19 个优势条带,测序分析结果表明,19 个测序序列都属于地杆菌科微生物,且与水稻土中的未培养地杆菌科微生物亲缘关系相近。从系统发育树可以看出(图 3),优势条带主要聚为两簇,主要与采用 RFLP 技术得到的淹水培养水稻土中的地杆菌优势菌^[17]、采用水铁矿富集得到的水稻土中的地杆菌优势菌^[16]和添加柠檬酸铁富集培养水稻土的优势地杆菌^[15]序列聚在一起,也与地下水中优势地杆菌科微生物具有高的相似性^[25]。

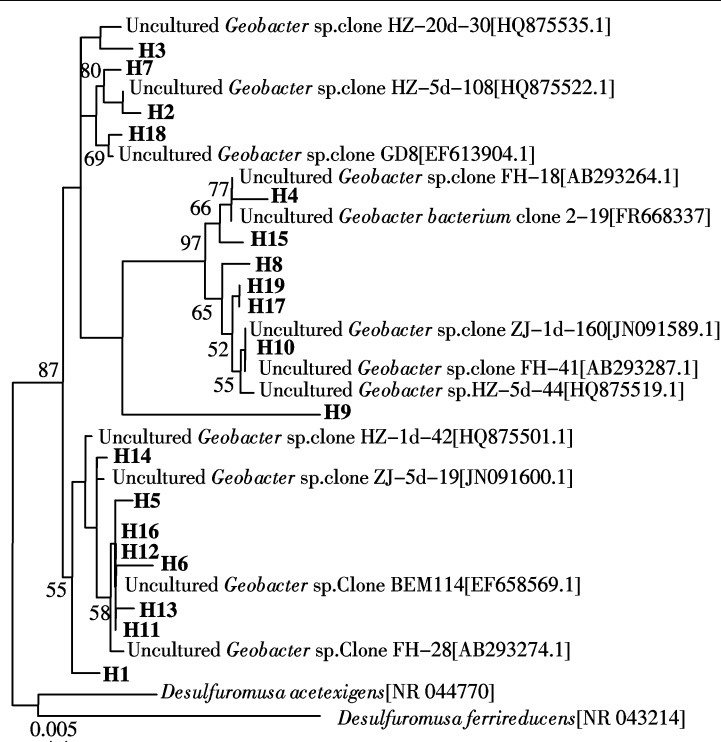
2.3 环境因子对淹水培养过程中土壤地杆菌科微生物的影响

采用 CCA 法对 6 个淹水处理的淹水时间(time)、pH 值、 Fe^{2+} 浓度、丰富度指数 R 和 Shannon-winner 多样性指数 H' 5 个环境因子进行关联分析,结果如图 4 所示。排序图中前两个排序轴的特征值分别

表 2 不同淹水时间处理的水稻土中地杆菌群落多样性指数
Table 2 Diversity indices of *Geobacteraceae* community structure in paddy soil in different treatments

淹水处理 Flooding time treatment	1 h	1 d	5 d	10 d	20 d	30 d
丰富度指数 Richness indices(R)	1.420±0.241	2.049±0.087	2.542±0.055	1.635±0.168	1.896±0.255	2.060±0.070
Shannon-Weiner 指数 Shannon-Weiner indices(H')	1.944±0.140	2.527±0.311	2.759±0.241	2.274±0.345	2.470±0.176	2.510±0.220

注:数据以“平均值±标准偏差”表示。



黑体字代表本文得到的测序基因序列, 步长值(>50%) 表示核苷酸替换率, 刻度尺表示 5% 序列估计偏差

Boldface type indicates gene sequences obtained in this study. Bootstrap values(>50%) represent nucleotide substitution rate, and the scale bar represents 5% estimated sequence divergence.

图 3 优势 DGGE 条带的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of preponderant DGGE types based on 16S rDNA sequences

为 0.068 和 0.005, 共同解释了不同淹水时间处理分布特征的 99.2%。两个环境排序轴的相关系数为 0, 表明排序结果可靠, 能够较好地反映不同处理分布与环境因子的关系。与 CCA 排序图中第一排序轴相关系数较高的是 Fe^{2+} 浓度($r=-0.8916$)和淹水时间

($r=-0.6853$), 说明第一排序轴从右至左 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原活动强度增加; 与第二排序轴的相关性较高的是 pH 值($r=-0.9051$)和 Shannon-weiner 指数 H' ($r=0.4246$), 第二排序轴反映了不同淹水处理的 pH 值变化和对应生境中地杆菌科微生物多样性变化的特征。

3 讨论

采用淹水非种植水稻土微环境模式对水稻土淹水培养过程中微生物的分布、群落结构和功能进行研究是目前常用的研究方式。水稻土中地杆菌科微生物群落结构和功能的变化与其在生长过程中的营养条件即电子供体和受体的数量和种类有着极其密切的关系^[16], 厌氧培养过程中地杆菌科微生物可以利用的电子供体主要为乙酸盐。有研究表明, 在水稻土淹水培养过程中最初乙酸盐含量快速积累, 培养中期乙酸盐快速消耗, 22 d 后乙酸盐浓度维持在较低的恒定水平^[25-26]。与本实验中 20 d 和 30 d 处理的地杆菌科微生物群落结构趋于稳定相一致。Hori 等^[16]向水稻土中添加水铁矿(Ferrihydrite)和针铁矿(Goethite), 分别富集得到了不同的地杆菌科微生物, 证实了该类微生物

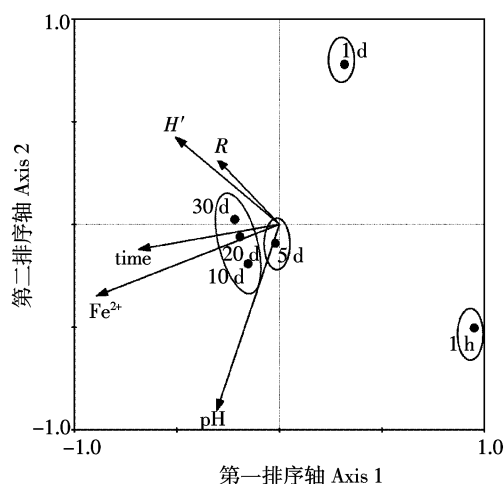


图 4 不同淹水时间处理与环境因子的二维排序图

Figure 4 Biplot of CCA ordination for treatments of different flooding periods and environmental factors

可以利用不同类型氧化铁作为电子受体。一般认为,水稻土中的非晶体氧化铁易被地杆菌科微生物作为电子受体还原^[27-28]。由此推测,在淹水培养初期非晶体氧化铁的存在促进了地杆菌科微生物的生长,导致淹水 1 h、1 d 和 5 d 期间群落多样性增大,直至 5 d 处理达到峰值,而培养后期易利用的氧化铁含量减少以及地杆菌可以利用的电子供体乙酸盐含量处于较低水平导致群落多样性减少,并维持相对稳定水平。

通过 Unifrac 软件进行基于优势 DGGE 条带的 PCA 分析,结果也表明淹水培养前期群落结构相似性低,特别是培养 5 d 时相似性最低,群落多样性高,与此时期乙酸盐含量丰富和地杆菌科微生物可利用的 Fe(Ⅲ)浓度较高有关,这一结果与由焦化等^[17]得出的水稻土淹水培养过程中 Fe(Ⅱ)还原的最大反应速率对应时间为 4.84 d 相吻合。CCA 分析也表明淹水培养过程中 Fe(Ⅱ)浓度变化与淹水培养过程中地杆菌科微生物群落结构的变化呈现正相关关系,进一步表明水稻土淹水过程中地杆菌科微生物群落结构的变化与铁还原过程密切相关。

采用 16S rDNA-PCR-DGGE 技术能够更直观地反映淹水培养过程中地杆菌科微生物群落结构的演替变化。从优势 DGGE 条带的演替变化可以看出,不同淹水时间处理中优势条带及所占比例均发生了明显的变化。同样,也可以用 r-和 k-生存策略来解释淹水培养过程中地杆菌科种群演变的原因^[17]。通常,r-策略的物种具有很强的繁殖能力,而 k-策略的物种具有很强的竞争能力。在淹水培养早期,营养条件即碳源和可还原 Fe(Ⅲ)充足时,采用 r-策略的地杆菌科微生物物种迅速增长繁殖;随着可还原 Fe(Ⅲ)不断的消耗,对电子受体的竞争加剧,采用 k-策略的地杆菌科微生物物种逐渐取代了采用 r-策略的物种,成为培养后期的优势物种。本实验中,条带 1、7、8、9 和 19 所代表的微生物既具有强的繁殖能力也具有强的竞争能力,在淹水过程中持续存在,尤其是条带 1 和 8,表现出对环境变化具有强的适应性和竞争能力。条带 3 和 4 代表的微生物推测为 r-策略生存的物种,仅存在于培养早期,而条带 2、16、18 代表的微生物属于 k-策略的物种,具有一定的竞争能力,均在淹水培养中后期出现。上述结果表明,水稻土淹水培养过程中优势地杆菌科微生物群落存在演替性变化,且与其生存环境以及其对环境变化的适应性相关。

代表性 DGGE 条带通过与 GenBank 中数据的 Blast 分析显示,经 DGGE 获得的优势地杆菌科微生物

(条带 H2、H3 和 H10 等)能够分别与采用 RFLP 分析^[12]获得的优势地杆菌科微生物 HZ-1d-42、HZ-5d-44、HZ-5d-108 和 HZ-20d-30 等聚为一体,显示采用 RFLP 和 DGGE 两种不同的分子生态学分析技术可以获得一致的结果。本文获得的一部分测序结果还分别与采自浙江和湖南的水稻土中的优势地杆菌科微生物聚在一起,说明不同地域水稻土的地杆菌科微生物在进化定位上存在相似之处。

4 结论

淹水培养过程中地杆菌科微生物群落结构存在演替性变化特征:培养 1 h 到 5 d 期间群落结构多样性变化显著,且以 r-对策的地杆菌科微生物为优势种群,而在第 20~30 d 期间群落结构趋于稳定,以 k-对策的微生物为优势种群,这种变化主要受土壤 pH 和 Fe(Ⅱ)的制约。不同淹水时间土壤中地杆菌多样性变化与水稻土中 Fe(Ⅱ)含量呈现相关性。因此,本研究进一步证实,地杆菌科微生物与铁的生物地球化学循环紧密相关,但本研究的不足之处在于未能将各优势地杆菌科微生物在铁的地球化学循环中的贡献准确反映出来。对于水稻土这种干湿交替频繁(氧化还原电位变换频繁)的生境,如何通过合理的管理措施有效利用和调控土壤地杆菌科微生物的群落结构及其生态功能,将是未来进一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Snoeyenbos-West O L, Nevin K P, Anderson R T, et al. Enrichment of *Geobacter* species in response to stimulation of Fe(Ⅲ) reduction in sandy aquifer sediments[J]. *Microb Ecol*, 2000, 39(2):153-167.
- [2] Holmes D E, Finneran K T, O'Neil R A, et al. Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5):2300-2306.
- [3] Cummings D E, Snoeyenbos-West O L, Newby D T, et al. Diversity of *Geobacteraceae* species in habiting metal-polluted fresh water lakes sediments ascertained by 16S rDNA analyses[J]. *Microb Ecol*, 2003, 46(2):257-269.
- [4] Islam F S, Gault A G, Boothman, et al. Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments[J]. *Nature*, 2004, 430(6995):68-71.
- [5] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. Dissimilatory Fe(Ⅲ) and Mn(Ⅳ) reduction[J]. *Adv Microb Physiol*, 2004, 49(2):219-286.
- [6] Lovley D R, Giovannoni S J, White D C, et al. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals [J]. *Arch Microbiol*, 1993, 159(4):336-344.

- [7] Winderl C, Schaefer S, Lueders T. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifer using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker[J]. *Environ Microbiol*, 2007, 9(4):1035–1046.
- [8] Holmes D E, O'Neil R A. Transcriptome of *Geobacter uraniireducens* growing uranium contaminated subsurface sediments[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(6):216–230.
- [9] Lee K Y, Bosch J, Meckenstock R U. Use of metal-reducing bacteria for bioremediation of soil contaminated with mixed organic and inorganic pollutants[M/OL]. *Environ Geochem Health*, 2011, 34(Suppl 1):135–142.
- [10] Bond D R, Lovley D R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(3):1548–1555.
- [11] Qu D, Stefan R, Schnell S. Microbial reduction of weakly crystalline iron(III) oxides and suppression on methanogenesis in paddy soil[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2004, 72(6):1172–1181.
- [12] Jäeckel U, Schnell S. Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization[J]. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32(11–12):1811–1814.
- [13] Lüdeman H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(2):754–762.
- [14] Noll M, Matthies D, Frenzel P, et al. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient[J]. *Environ Microbiol*, 2005, 7(3):382–395.
- [15] Wang X J, Yang J, Chen X P, et al. Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China [J]. *J Soil Sediment*, 2009, 9(6):568–577.
- [16] Hori T, Muller A, Igarashi Y, et al. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ^{13}C -acetate probing [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(2):267–278.
- [17] 由焦化, 夏淑红, 王保莉, 等. 淹水时间对水稻土中地杆菌科群落结构及丰度的影响[J]. *微生物学报*, 2011, 51(6):796–804.
YOU Jiao-hua, XIA Shu-hong, WANG Bao-li, et al. Effect of flooding time on community structure and abundance of *Geobacteraceae* in paddy soil[J]. *Acta Microbiol Sin*, 2011, 51(6):796–804.
- [18] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3):695–700.
- [19] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1):127–144.
- [20] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2):316–322.
- [21] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43(1):1–11.
- [22] Lozupone C, Knight R. Unifrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12):8228–8235.
- [23] Hoy C W, Grewal P S Lawrence, et al. Canonical correspondence analysis demonstrates unique soil conditions for entomopathogenic nematode species compared with other free-living nematode species[J]. *Biological Control*, 2008, 46(3):371–379.
- [24] Terbraak C J F, Verdonschot P F M. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology[J]. *Aquatic Sciences*, 1995, 57(3):255–289.
- [25] Holmes D E, O'Neil R A, Vronis H A, et al. Subsurface clade of *Geobacteraceae* that predominates in a diversity of Fe(III)-reducing subsurface environments[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(8):663–677.
- [26] Rui J P, Peng J J, Lu Y. Succession of bacterial populations during plant residue in rice field soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(14):4879–4886.
- [27] 曲东, Schnell S. 外源氧化铁对水稻土甲烷形成的抑制[J]. *环境科学学报*, 2002, 22(1):65–69.
QU Dong, Schnell S. Suppression of methanogenesis by iron oxides in paddy soil[J]. *Acta Scientia Circumstantiae*, 2002, 22(1):65–69.
- [28] 曲东, 张一平, Schnell S, 等. 水稻土中铁氧化物的厌氧还原及其对微生物过程的影响[J]. *土壤学报*, 2003, 40(6):858–863.
QU Dong, ZHANG Yi-ping, Schnell S, et al. Reduction of iron oxides and effect on microbial processes in anaerobic soil[J]. *Acta Pedologica Sin*, 2003, 40(6):858–863.