

3 株铁还原细菌利用不同碳源的还原特征分析

易维洁, 曲 东, 朱 超, 王 静

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】在纯培养方式下,研究水稻土中铁还原菌利用葡萄糖、果糖、心肌糖、淀粉和纤维素作为惟一碳源时对异化 Fe(III) 还原的影响。【方法】以 Fe(OH)_3 为惟一电子受体,不同单糖及多糖为惟一碳源,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养过程中,测定了 3 株铁还原细菌的 Fe(III) 还原能力,及体系中剩余还原糖含量。【结果】铁还原菌株 SC-a13、SC-a18 和 SC-a19 在 LB 培养基中厌氧扩繁 24 h,均可达到最大生长量。3 株铁还原细菌总体上利用葡萄糖、果糖和淀粉的铁还原率分别为 $71.03\%\sim 82.86\%$, $80.31\%\sim 85.77\%$ 和 $50.81\%\sim 73.21\%$,而心肌糖和纤维素难以被利用。在利用葡萄糖、果糖和淀粉时,体系 pH 在培养 2~5 d 急剧降低,然后稳定在 $3.5\sim 4.5$,而心肌糖和纤维素几乎没有变化。 Fe(III) 反应潜势总体表现为菌株 $\text{SC-a18}>\text{SC-a13}>\text{SC-a19}$, Fe(III) 反应速率常数和最大反应速率出现的时间表现为 $\text{SC-a13}>\text{SC-a18}>\text{SC-a19}$ 。【结论】葡萄糖和果糖均能作为铁还原菌株 SC-a13、SC-a18 和 SC-a19 还原 Fe(OH)_3 的优势碳源,淀粉的利用能力次之,心肌糖和纤维素则难以被直接利用。不同铁还原菌株之间利用不同糖源的 Fe(OH)_3 还原反应速率常数具有较大差异。体系 pH 降低和剩余还原糖含量,可分别作为铁还原菌是否利用糖源进行 Fe(III) 还原反应及其反应能力大小判定的特征。

【关键词】 铁还原菌;糖类代谢; Fe(III) 还原;纯培养

【中图分类号】 S154.38⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)02-0181-06

Fe(III) reduction characteristics of three iron reducers using different carbon sources

YI Wei-jie, QU Dong, ZHU Chao, WANG Jing

(College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The effect of glucose, fructose, inositol, starch and cellulose as sole carbon substrates on dissimilatory iron reduction in pure culture has been investigated. 【Method】With Fe(OH)_3 as sole electronic acceptor, different monosaccharide and polysaccharide as sole carbon substrate, the yield of Fe(II) and residual reductive glycoses were determined during the incubation under anaerobic condition at $30\text{ }^\circ\text{C}$. 【Result】Strain SC-a13, SC-a18 and SC-a19 attained the most growth after propagating 24 h in LB culture medium. The Fe(III) -reducing rates of glucose, fructose and starch as a whole by the three strains were $71.03\%\sim 82.86\%$, $80.31\%\sim 85.77\%$ and $50.81\%\sim 73.21\%$ respectively. However it was hard to use inositol and cellulose to reduce ferrihydrite. pH reduced rapidly in the initial 2~5 d, then stabilized from $3.5\sim 4.5$ while using glucose, fructose and starch as carbon substrates but inositol and cellulose changed little. The potential of Fe(III) reduction represented $\text{SC-a18}>\text{SC-a13}>\text{SC-a19}$; the Fe(III) -reducing rate constant and the time corresponding to max reaction rate were $\text{SC-a13}>\text{SC-a18}>\text{SC-a19}$. 【Conclusion】Strain SC-a13, SC-a18 and SC-a19 from paddy soil can use glucose and fructose to reduce Fe(OH)_3 well, followed by the ability to use starch, and inositol and cellulose can not be used directly. The Fe(OH)_3

* [收稿日期] 2008-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40271067, 40741005);西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 易维洁(1981—),女,重庆市人,在读博士,主要从事土壤环境化学研究。

[通信作者] 曲 东(1960—),男,河南陕县人,教授,博士生导师,主要从事土壤环境化学研究。E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

reduction rate using different carbon sources among distinct iron reducers has notable discrepancy. pH fall and residual reductive glycolose can play as one characteristic of Fe(Ⅲ)-reducing reaction and estimate the abilities of Fe(OH)₃ indirectly.

Key words: Fe(Ⅲ)-reducing bacterium;metabolism of glucide;Fe(Ⅲ) reduction;pure culture

自从 1987 年分离得到地杆菌(*Geobacter metallireducens*)GS-15 金属还原菌以来,越来越多的研究者开始注意到,在厌氧或兼性厌氧微生物作用下,浸水土壤中发生 Fe(Ⅲ)被还原为 Fe(Ⅱ)的现象^[1-3]。Treude 等^[4]研究发现,从水稻土中分离得到的菌株 FAc12 能在添加柠檬酸铁或 Fe(OH)₃ 的培养基中生长良好,表明其具有利用 Fe(Ⅲ)作为电子受体的能力。通过 GS-15 的纯培养^[5-6]及土壤泥浆试验^[7-8]证实,不同形态氧化铁的微生物还原能力存在差异,其中无定形氧化铁(ferrihydrite)和弱晶体的纤铁矿(lepidocrocite,γ-FeOOH)易被还原,而针铁矿(geothite,α-FeOOH)、Al 取代针铁矿(Al-geothite)、赤铁矿(hematite,Fe₂O₃)及 Al 取代赤铁矿(Al-hematite)等晶体氧化铁难以被微生物利用。向厌氧培养的水稻土中添加乙酸盐、丙酮酸盐、葡萄糖及腐殖酸后,可观察到 Fe(Ⅲ)还原过程显著增加及有机物的大量消耗^[9-10]。在接种水稻土浸提液的培养试验中也发现,不同水稻土来源的微生物群落中存在着能够还原 Fe(OH)₃ 的微生物,但对 Fe(OH)₃ 的还原能力存在差异^[11],并且这些微生物群落对小分子有机酸盐(甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丙酮酸盐及乳酸盐)、单糖(葡萄糖、果糖)及一些大分子(淀粉和纤维素)的利用状况不同。然而,上述研究不能肯定是群落中的铁还原微生物直接利用这些物质充当电子供体和碳源来还原 Fe(Ⅲ),还是通过微生物群落间的种间协同共营养作用,使碳源物质首先被其他微生物分解代谢,铁还原微生物再利用分解代谢产物进行异化铁还原过程。另外,不同水

稻土来源的微生物群落对各种碳源的利用体现在 Fe(Ⅱ)累积量上各有差异,但不确定这种差异是来源于铁还原微生物本身,还是其他微生物竞争碳源的干扰。因此,本试验研究水稻土中铁还原微生物对不同糖类的选择利用能力,并对糖类利用特征进行比较,以期进一步深化对水稻土中微生物铁还原功能的认识,为铁还原微生物筛选及功能研究提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与保存培养基

供试的具有铁还原功能的菌种,由西北农林科技大学资源环境学院实验室从四川水稻土中分离纯化获得,菌株编号分别为 SC-a13、SC-a18 和 SC-a19。3 菌株均为 G⁺,杆状、圆末端。菌落形态相似:菌落较小,白色,隆起,规则圆,不透明,表面光滑。通过 16S rDNA 序列分析,以上 3 株菌在 NCBI 的 BLAST 结果见表 1。菌株 SC-a13 和 SC-a18 与多种丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)菌株的 16S rDNA 有较高的同源性,且在进化关系上亲缘性接近;菌株 SC-a19 与典型的铁还原菌株 *Clostridium* sp. FRB1 有很大的同源性(表 1)。

保存菌种时采用的无机盐培养基组成为:人工合成^[12]的 Fe(OH)₃(ferrihydrite) 3.4 g/L,NH₄Cl 1 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.07 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.6 g/L,K₂HPO₄·3H₂O 0.72 g/L,KH₂PO₄ 0.25 g/L,葡萄糖 10 g/L,培养基的 pH 调节至 6.5~7.0。

表 1 铁还原菌株的鉴定结果

Table 1 Isolation and identification of Fe(Ⅲ) reducing bacteria

菌株 Strain	序列号 Accession number	GenBank 数据库中最大同源性菌株 Max identity in GenBank database	相似性/% Similarity
SC-a13	EU344959	<i>Clostridium butyricum</i> W4.5 ;NCIMB8082;DSM523	93
SC-a18	EU344961	<i>Clostridium butyricum</i> CGS1.2,3,4,6	99
SC-a19	EU344962	<i>Clostridium</i> sp. FRB1; <i>C. akagii</i> CK58; <i>Clostridium pasteurianum</i> AFBR-G,B;CH1.4,5,7	97

1.2 菌液的制备

将保存于无机盐培养基中的菌体转接到 50% 的 LB 培养基中,30℃厌氧扩繁。将菌体生长良好的菌种管于 3 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,

用无菌水洗涤沉淀,去除残留的 LB,离心(3 000 r/min、15 min)后用无菌水将沉淀菌体配置成一定浓度的接种菌液。最佳扩繁时间由菌株在 50% LB 培养基中的生长曲线确定。生长曲线测定用 600

nm 下的光密度值(OD_{600})大小表示。

1.3 试验方案设计及方法

采用厌氧培养方法,以人工合成的 $Fe(OH)_3$ 为惟一电子受体,分别以葡萄糖(glucose)、果糖(fructose)、心肌糖(inositol)、淀粉(starch)和层析柱专用纤维素(cellulose)为惟一碳源。培养容器为 10 mL 灭菌血清瓶,加入经高温灭菌的 100 mmol/L NH_4Cl 和 $Fe(OH)_3$ (含铁量为 3.14 g/L)各 1 mL,再添加过 0.22 μm 滤膜除菌后 25 mmol/L 的 pH 7.0 磷酸缓冲液和碳源各 1 mL,最后添加 1 mL 接种液。充氮除去瓶中氧气,用橡胶盖及铝盖密封,置于恒温培养箱中,于 30 $^{\circ}C$ 培养。采样及 $Fe(II)$ 含量测定方法参见文献 [11]。

培养体系中碳源浓度设置为:葡萄糖、果糖和心肌糖为 60 mmol/L,淀粉(含碳量 45.92%)15 g/L,纤维素(含碳量 42.51%)10 g/L,以不加碳源(加 1 mL 无菌水)为对照(CK)。为了考察体系中不同铁还原微生物对加入碳源的利用能力,选择体系中可溶性总还原糖含量变化作为指标,依据体系中剩余的总还原糖含量,判断不同碳源在微生物代谢过程中的变化特征。还原糖含量的测定方法采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)分光光度法^[13]。

1.4 动力学模型

异化 $Fe(III)$ 还原是微生物介导的生物学过程,可用描述微生物生长动力学的 Logistic 方程^[11],对不同处理 $Fe(III)$ 还原过程中 $Fe(II)$ 累积浓度和时间的关系进行拟合。Logistic 方程的表达式为:

$$y = \frac{a}{1 + be^{-cx}}$$

式中: y 为不同时刻的 $Fe(II)$ 浓度, x 为反应时间, a 、 b 、 c 均为参数。通过方程拟合,可求出 $Fe(III)$ 还原的最大潜势,即 $Fe(II)$ 最大累积量(数值等于参数 a ,单位为 mg/L);反应速率常数(数值等于参数 c)以及最大反应速率出现的时间(T_{vmax} ,数值等于 $\ln b/c$,单位为 d)。

2 结果与分析

2.1 3 株铁还原细菌的生长曲线

由图 1 可知,菌株 SC-a13、SC-a18 和 SC-a19 在 50% LB 培养基中生长 10 h 后,可由迟缓期进入对数生长期,并以最大的速率生长和分裂,24 h 后进入稳定生长期。为了使菌株达到快速生长的要求,制备菌液时统一在 30 $^{\circ}C$ 培养条件下,用 50% LB 培养基扩繁 24 h。

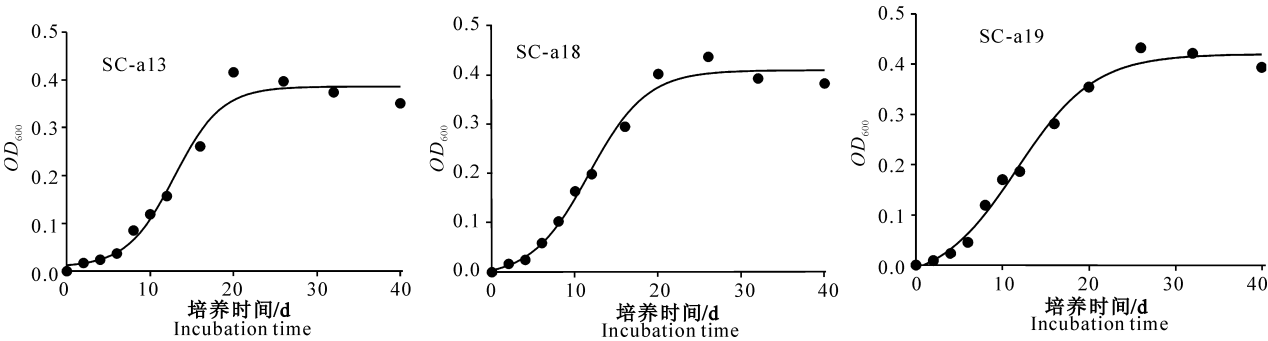


图 1 3 株铁还原细菌的生长曲线

Fig. 1 Growth of strain SC-a13, SC-a18 and SC-a19

2.2 不同碳源对微生物铁还原能力及体系 pH 的影响

在纯培养试验中,3 株分离得到的铁还原菌利用不同碳源的 $Fe(II)$ 累积量及 pH 变化如图 2 所示。由图 2 可知,3 种碳源处理中,各菌株 $Fe(II)$ 最大累积量表现为:果糖>葡萄糖>淀粉,表明果糖是更易被铁还原微生物利用的电子供体。葡萄糖和果糖能较好地充当电子供体来还原 $Fe(OH)_3$,其中 SC-a13 和 SC-a18 对应的 $Fe(II)$ 累积量在第 3 天就达到最大值(平衡);菌株 SC-a19 的铁还原活性相对较低,利用葡萄糖和果糖的处理分别到培养的第 6

天和第 7 天才出现 $Fe(II)$ 累积量的最高峰,且累积量明显低于菌株 SC-a13 和 SC-a18 的对应处理。3 菌株(SC-a13、SC-a18 和 SC-a19)利用心肌糖和纤维素的处理与对照的变化趋势相同,在 23 d 的培养过程中几乎无 $Fe(II)$ 产生。3 株铁还原菌利用淀粉的铁还原效率各有差异,培养前期菌株 SC-a18 的 $Fe(II)$ 累积量滞后于 SC-a13 处理,但到培养 15 d 后迅速增大,铁还原最大累积量为 521.79 mg/L;菌株 SC-a19 利用淀粉的 $Fe(II)$ 累积量增长缓慢,至培养结束, $Fe(II)$ 累积量只有 323.95 mg/L。

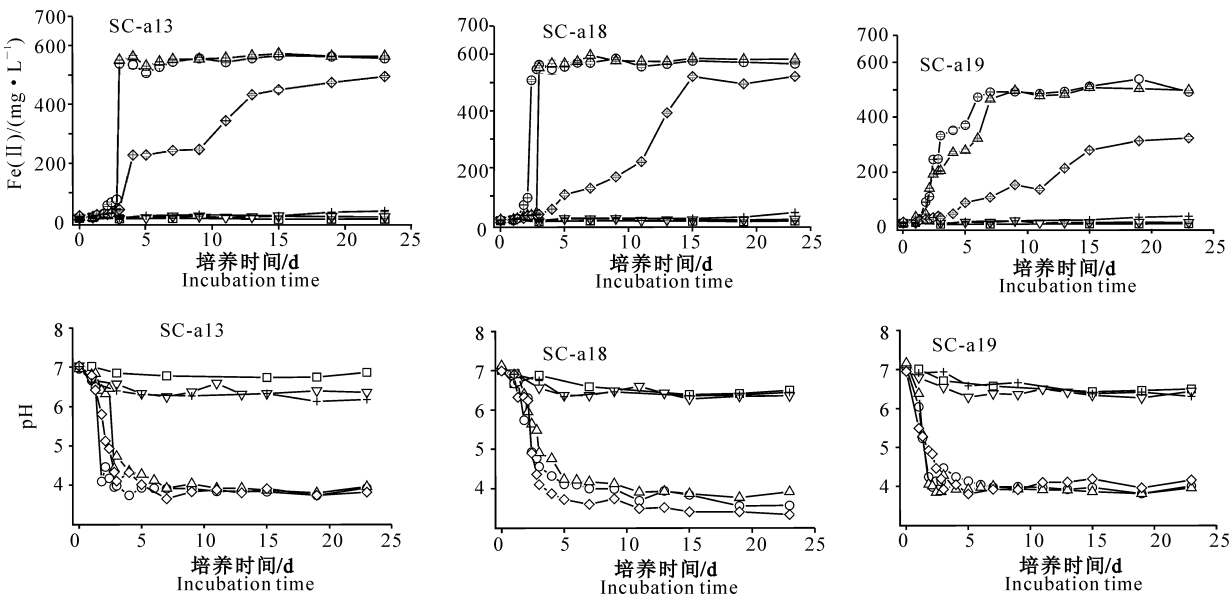


图 2 不同碳源对 3 株铁还原菌株还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 及 pH 的影响
—□—, CK; —○—, 葡萄糖; —△—, 果糖; —▽—, 心肌糖; —◇—, 淀粉; —+—, 纤维素
Fig. 2 Effect of different carbon resources on $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduction and pH
—□—, CK; —○—, Glucose; —△—, Fructose; —▽—, Inositol; —◇—, Starch; —+—, Cellulose

由图 2 可以看出,在培养前 5 d,各菌株利用葡萄糖、果糖和淀粉时,体系 pH 值均从最初的 7.0 左右急剧下降到 3.5~4.5,随着培养时间的延长,pH 基本保持稳定。从菌株 SC-a18 的 pH 变化曲线可以看出,利用不同碳源时其最终 pH 大小顺序为:果糖(4.0)>葡萄糖(3.5)>淀粉(3.25)。3 菌株不能利用心肌糖和纤维素来还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$,对应的 pH 几乎和对照变化一致,维持在 pH 7.0 左右。

2.3 铁还原菌株的 Fe(Ⅲ)还原特征分析

在厌氧纯培养中,氧化铁的微生物还原过程可用 Logistic 方程拟合。由于 3 菌株均难以利用心肌糖和纤维素来还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$,所以不能用 Logistic 模型拟合,其利用葡萄糖、果糖和淀粉 3 种碳源的铁还原反应数学拟合参数见表 2,其中 $\text{Fe}(\text{Ⅲ})$ 还原率用 $\text{Fe}(\text{Ⅱ})$ 最大累积量与加入氧化铁量的比值表示。

表 2 3 株铁还原细菌利用不同碳源铁还原反应的 Logistic 模型动力学参数

Table 2 Kinetics parameters of $\text{Fe}(\text{Ⅲ})$ reduction of different carbon resources

碳源 Carbon resource	菌株 Strain	Logistic 方程参数 Logistic model parameter					T_{vmax}/d	$\text{Fe}(\text{Ⅲ})$ 还原率/% $\text{Fe}(\text{Ⅲ})$ reduction rate
		a	b	c	$\text{CV}/\%$	R^2		
葡萄糖 Glucose	SC-a13	551.75	1.04E+11	8.83	84.28	0.966	3	81.14
	SC-a18	563.43	8.04E+07	6.32		0.951	3	82.86
	SC-a19	482.99	1.41E+01	0.35		0.935	8	71.03
果糖 Fructose	SC-a13	568.61	1.63E+07	7.46	81.40	0.988	2	83.62
	SC-a18	583.25	3.46E+07	6.01		0.952	3	85.77
	SC-a19	546.11	4.72E+01	0.36		0.978	11	80.31
淀粉 Starch	SC-a13	491.32	2.72E+01	1.16	65.98	0.962	3	72.25
	SC-a18	497.84	1.40E+01	0.64		0.960	4	73.21
	SC-a19	345.49	1.63E+01	0.26		0.980	11	50.81

由表 2 可知,3 菌株利用葡萄糖、果糖和淀粉作为电子供体还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的过程,能较好地用 Logistic 方程拟合,其决定系数(R^2)为 0.935~0.988。利用不同碳源的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原反应速率常数的变异系数(CV)较大,为 65.98%~84.28%,说明在 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原过程中分离得到的 3 株铁还原细菌,

对同一碳源的分解代谢存在较大差异,这和系统发育学分析的结果相一致(表 1)。比较不同菌株对 3 种碳源的利用能力可以发现,菌株 SC-a18 的 $\text{Fe}(\text{Ⅲ})$ 还原潜势(参数 a)最大,且由计算比较可知,菌株 SC-a18 在利用葡萄糖、果糖和淀粉为碳源时的 Fe

(Ⅲ)还原率最高,分别达到 82.86%,85.77%和 73.21%;菌株 SC-a13 的 Fe(Ⅲ) 还原潜势次之,但在整个培养过程中,其反应速率常数(参数 c)却高于 SC-a18,对应的最大反应速率出现的时间($T_{v\max}$)较 SC-a18 也提前;而菌株 SC-a19 的反应活性最差,不仅其 Fe(Ⅲ) 还原潜势和反应速率常数均明显低于菌株 SC-a18 和 SC-a13,而且 $T_{v\max}$ 也明显滞后其

他菌株 5~9 d。

2.4 Fe(OH)_3 还原过程中还原糖含量的变化趋势

在微生物培养体系中,剩余还原糖含量代表着多糖水解与微生物对可溶性糖利用的平衡,间接反映体系的微生物活性,可作为判别微生物利用碳源能力的指标。图 3 为 Fe(OH)_3 还原过程中还原糖含量的变化趋势。

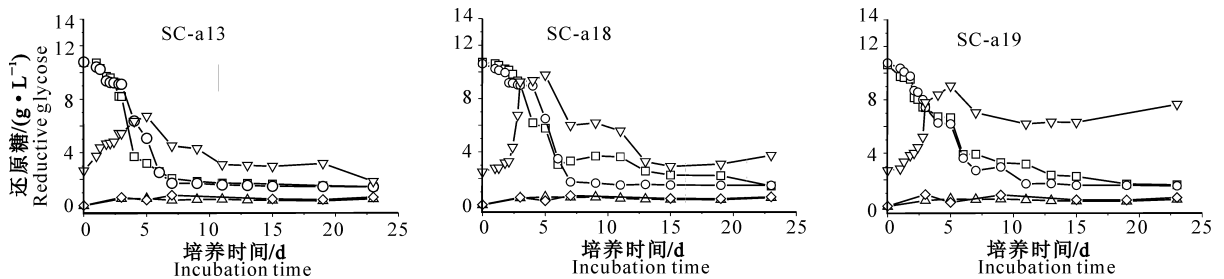


图3 微生物铁还原过程中还原糖的变化曲线

—□—, 葡萄糖; —○—, 果糖; —△—, 心肌糖; —▽—, 淀粉; —◇—, 纤维素

Fig. 3 Trend of reductive glycose in microbial iron reducing process

—□—, Glucose; —○—, Fructose; —△—, Inositol; —▽—, Starch; —◇—, Cellulose

由图 3 可知,3 株铁还原菌利用葡萄糖和果糖的剩余还原糖含量呈逐渐减少趋势;还原糖含量在培养前 7 d 从最初的 10.79~10.61 g/L 迅速降低到 1.72~3.93 g/L,并随着培养时间的延长,还原糖含量继续下降,但降低幅度很小,最终体系中的还原糖含量保持在 1.46~1.57 g/L。3 株铁还原菌对淀粉产生的还原糖利用消耗的程度有一定差异:菌株 SC-a13 的最大还原糖含量约为 7 g/L,最终量为 3 g/L,整个培养过程消耗还原糖 4 g/L;菌株 SC-a18 和 SC-a19 的最大还原糖含量均达到 9 g/L,但从培养终点的剩余量可以看出,前者消耗了 6 g/L,后者只消耗了 2 g/L。这个结果正好和 3 菌株利用淀粉的 Fe(OH)_3 还原率规律一致,电子供体消耗越多 ($\text{SC-a18} > \text{SC-a13} > \text{SC-a19}$),其对应得到的 Fe(Ⅱ) 累积量越大 ($\text{SC-a18} > \text{SC-a13} > \text{SC-a19}$)。整个培养阶段,各菌株利用心肌糖和纤维素的处理几乎未产生可溶性还原糖,说明这 3 株铁还原菌不能分解利用心肌糖和纤维素。

3 讨论

在试验范围内,利用葡萄糖、果糖和淀粉的菌株,体系的 pH 值在培养初期急剧降低,而在培养第 3 天才有 Fe(Ⅱ) 的明显累积。由此推测,分离得到的铁还原菌株本身就是发酵细菌,它们首先对有机物进行厌氧发酵分解,产生大量的有机酸,然后铁还原菌利用小分子的有机酸将 Fe(OH)_3 还原为

Fe(Ⅱ) 。pH 降低到 3~4 后不再变化的主要原因是,该 pH 可能已经达到供试菌株的生存和发酵下限,低于此值,细菌的生理生化过程停止,糖的发酵产酸停止。另外,据文献报道^[14-15], H_2 可被一些微生物 Fe(Ⅲ) 还原菌利用。本试验在添加葡萄糖和果糖溶液的厌氧培养中观察到有大量气体产生,甚至将 Fe(OH)_3 吹浮起来,这可能是糖发酵时微生物在氢化酶的作用下将质子转化为 H_2 ,促进了 Fe(OH)_3 还原过程。

本试验中采用的菌株(SC-a13、SC-a18 和 SC-a19),在 23 d 的培养时间内不能对心肌糖及纤维素作出迅速地响应,这可能是由于供试菌株不能产生同化心肌糖的酶,缺乏纤维素酶的合成能力,因此菌株不能以心肌糖作为碳源来获取细胞生长所必需的能量,不能将纤维素水解为葡萄糖进一步利用。而在混合微生物群落中,对心肌糖和纤维素的利用只能解释为“共营养”作用,即由其他微生物分解代谢心肌糖和纤维素,产生铁还原微生物容易利用的代谢产物,铁还原菌以此为代谢底物继续分解,完成异化铁还原过程。

可溶性淀粉在本试验条件下能被铁还原微生物较好的利用。3 个菌株利用淀粉的剩余还原糖含量变化表现为先升高而后降低的趋势,即培养前 5 d 利用淀粉的还原糖含量呈现增加的趋势,反映了此阶段由葡萄糖聚合形成的大分子——淀粉,在与微生物菌株接触时能够迅速被降解为小分子还原糖,

并且其水解能力大于微生物对碳源的利用能力,故还原糖逐渐累积;在培养后期,还原糖含量又逐渐降低,说明铁还原菌对还原性糖的利用速率大于淀粉的水解速率。还原糖有所累积升高,表明供试的铁还原菌株能不同程度地合成一定量的淀粉酶,但仍不能真实反映铁还原菌分解代谢淀粉的能力。因为淀粉中含有少量的还原糖,而该还原糖很可能是培养初期铁还原微生物还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的电子供体来源;另外,配制淀粉溶液时加热溶解可溶性淀粉的过程以及后面的高温灭菌处理,导致了淀粉的糊化,糊化后的淀粉,由于多糖分子吸水膨胀以及氢键断裂,使之容易被淀粉酶水解,易于消化。在淀粉结构被破坏的情况下,很可能导致铁还原微生物轻易切断 α -1, 4-葡萄糖苷键,形成长短不一的短链糊精、麦芽糖和葡萄糖。因此,关于铁还原微生物能否直接利用自然界中淀粉,还需做进一步深入的研究。

4 结 论

来源于水稻土中的铁还原菌株 SC-a13、SC-a18 和 SC-a19 均能以葡萄糖和果糖作为惟一碳源较好地还原 $\text{Fe}(\text{OH})_3$, 对淀粉的利用能力次之,而对心肌糖和纤维素难以直接利用。不同铁还原菌株之间利用不同糖源的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 还原反应速率常数具有较大差异。体系 pH 降低可作为铁还原菌利用糖源进行 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原反应的特征。依据剩余还原糖含量可间接判断铁还原菌利用糖类 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原能力的大小。

〔参考文献〕

- [1] Lovley D R, Stolz J F, Nord G L, et al. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism [J]. *Nature*, 1987(330): 252-254.
- [2] Lovley D R, Holmes D E, Nevin K P. Dissimilatory $\text{Fe}(\text{III})$ and $\text{Mn}(\text{IV})$ reduction: a review [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 219-286.
- [3] Ding Y-H R, Hixson K K, Giometti C S, et al. The proteome of dissimilatory metal-reducing microorganism *Geobacter sulfurreducens* under various growth conditions [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764: 1198-1206.
- [4] Treude N, Rosencrantz D, Liesack W, et al. Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of *Myxococcales* [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 44(2): 261-269.
- [5] 曲 东, Schnell S. 纯培养条件下不同氧化铁的微生物还原能力 [J]. *微生物学报*, 2001, 41(6): 744-749.
Qu D, Schnell S. Microbial reduction on ability of various iron oxides in pure culture experiment [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2001, 41(6): 744-749. (in Chinese)
- [6] Mahadevan R, Bond D R, Butler J E, et al. Characterization of metabolism in the $\text{Fe}(\text{III})$ -reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1558-1568.
- [7] Qu D, Stefan R, Schnell S. Microbial reduction of weakly crystalline iron(III) oxides and suppression on methanogenesis in paddy soil [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 72(6): 1172-1181.
- [8] 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 D, Zhang Y P, Schnell S, et al. Reduction of iron oxide and its effect on microbial processes in an aerobic paddy soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(6): 858-863. (in Chinese)
- [9] 曲 东, Schnell S, Conrad R. 外源氧化铁对水稻土中有机酸含量的影响 [J]. *应用生态学报*, 2002, 13(11): 1425-1428.
Qu D, Schnell S, Conrad R. Effect of iron oxides addition on organic acids content in paddy soil [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(11): 1425-1428. (in Chinese)
- [10] Fey A, Conrad R. Effect of temperature on the limiting step in the methanogenic degradation pathway in rice field soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1-8.
- [11] 孙丽蓉, 曲 东. 电子穿梭物质对异化铁还原过程的影响 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(4): 192-198.
Sun L R, Qu D. Effects of electron shuttle on dissimilatory iron reduction in paddy soils [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2007, 35(4): 192-198. (in Chinese)
- [12] Schwertmann U, Cornell R M. Iron oxides in the laboratory: Preparation and characterization [M]. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000: 103-110.
- [13] Eriksson K E, Pettersson B. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *sporotrichum pulverulentum* (*chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose [J]. *Eur J Biochem*, 1975, 51(1): 213-218.
- [14] Fauque G, Peck H D, Moura J J, et al. The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1988, 4(4): 299-344.
- [15] Christof A, Alexandra S, Thorsten W, et al. Role of interspecies H_2 transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16(1): 61-69.