

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(6):796-804; 4 June 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

淹水时间对水稻土中地杆菌科群落结构及丰度的影响

由焦化¹, 夏淑红¹, 王保莉¹, 曲东^{2*}

西北农林科技大学,¹ 生命科学学院,² 资源环境学院, 杨凌 712100

摘要:【目的】通过模拟水稻土淹水过程,探讨地杆菌科(*Geobacteraceae*)群落结构和相对丰度随淹水时间的动态变化特征,揭示其群落结构和相对丰度变化与微生物 Fe(III)还原的内在联系。【方法】提取水稻土淹水培养1 h、1 d、5 d、10 d、20 d和30 d后的微生物总 DNA,构建地杆菌科 16S rDNA 克隆文库,采用 PCR-RFLP 方法分析地杆菌科的群落结构和多样性变化特征,通过 Real-time PCR 技术测定地杆菌科相对丰度的动态变化。采用厌氧泥浆培养方法,测定水稻土中 Fe(II)产生量变化。【结果】供试水稻土中,微生物 Fe(III)还原过程在淹水培养初期变化明显,培养20 d后达到稳定期,最大铁还原潜势为10.16 mg/g,最大反应速率为1.064 mg/(g·d),最大反应速率对应的时间为4.84 d。 α 多样性指数显示,水稻土中地杆菌科的多样性随淹水时间延长呈现波动性变化,淹水5 d和20 d处理出现2个峰值,而淹水10 d和30 d处理的多样性明显减小。 β 多样性指数表明淹水过程中群落结构存在明显差异。不同淹水时间共产生了10种地杆菌科优势类型,分别属于 Clade 1 和 Clade 2。Real-time PCR 结果表明,地杆菌科与总细菌 16S rDNA 丰度的比值在淹水培养1 d时最小(1.20%),而20 d时达到最大值(4.54%)。【结论】淹水培养的水稻土中,地杆菌科微生物的多样性和相对丰度的动态变化与微生物 Fe(III)还原过程密切相关。

关键词: 水稻土, 地杆菌科, 群落结构, 丰度, RFLP

中图分类号: S153.3; X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 06-0796-09

地杆菌科(*Geobacteraceae*)作为典型的异化铁还原菌隶属于变形杆菌纲的 δ -亚纲,能够利用乙酸盐为惟一碳源,并以 Fe(III)作为终端电子受体进行厌氧呼吸^[1]。自1987年 Lovley^[2]从河水沉积物中分离到第一株 *Geobacter metallireducens* (GS-15)至今,已经在各种厌氧及金属还原环境中发现和分离得到不同的地杆菌科菌株,并已证实其对于环境中的重金属及有机物污染具有重要的生物修复功能^[3]。因此,针对厌氧环境中地杆菌的生态和生理功能探索已成为当前的研究热点之一^[4-5]。

周期性的氧化还原状态变化对水稻土中微生物

群落结构有着显著的影响,其中细菌^[6]、甲烷氧化菌^[7]、硫酸盐还原菌^[8-9]以及产甲烷古细菌^[10]群落的动态变化已有相关报道。Noll等^[11]采用16S rRNA水平的 T-RFLP 技术研究了未种植水稻土中细菌群落水平的演替动力学过程,发现淹水后2天内的细菌群落结构变化活跃程度最显著,第2天至21天的变化程度显著下降,而第21天到168天微生物群落结构趋于稳定。在淹水水稻土和水稻根际中已经检测到与地杆菌科相关的16S rRNA 基因序列,且占细菌16S rRNA 文库比例大约为5%^[12-13]。Wang等^[14]研究了湖南水稻土中

基金项目: 国家自然科学基金(40971158)

* 通信作者。Tel: +86-29-87082624; E-mail: dongqu@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 由焦化(1985-),男,陕西富平人,硕士研究生,主要从事土壤微生物研究。E-mail: youjiaohua403@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-29; **修回日期:** 2011-03-21

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^[15]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。目前,地杆菌科细菌群落结构的研究主要集中在受污染的地下环境中^[16-18],关于水稻土淹水厌氧培养中地杆菌科群落结构及丰度的动态变化则鲜有报道。另一方面,土壤中的微生物群落变化大多集中于给出一个总体的概念,而与群落功能的联系相对薄弱。水稻土淹水后,铁还原微生物的群落演替及丰度变化究竟对土壤中铁还原特征有何影响? 或者,土壤中铁还原能力变化能否通过典型铁还原菌的群落演替过程描述? 这些问题的解答对于深入认识稻田微生物生态过程与环境变化的关系具有重要的科学意义。本研究通过水稻土厌氧培养试验,采用 RFLP 和 Real-time PCR 技术,比较不同淹水培养时期土壤中地杆菌科群落结构和相对丰度的变化,以期探讨地杆菌科种群变化与水稻土异化铁还原能力的关系,为进一步阐明地杆菌科在土壤中的环境功能提供必要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤: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,属于华中湿润单、双季稻作区。采集 0-20 cm 耕层土壤,捡去植物残体,自然风干,磨细,过 1 mm 土壤筛,储存于塑料容器中,备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:pGEM-T 载体购自美国 Promega 公司;pMD19-T 载体、普通 PCR 聚合酶 *Premix Taq* 和 SYBR® *Premix Ex Taq*TM II 均购自大连宝生物工程有限公司;DNA 纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶 *Msp* I 和 *Mnl* I 购自美国 NEB 公司;基因的测序由南京金思瑞公司完成;其他生化试剂为国产分析纯。冷冻离心机(5417R, Eppendorf);电泳仪(DYY-2C 型,北京市六一仪器厂);PCR 仪(S1000, Bio-Rad);凝胶成像系统(GelDoc XR, Bio-Rad);荧光定量 PCR 仪(CFX96 型, Bio-Rad)。

1.2 厌氧恒温培养及土样中 Fe(III)还原量测定

称取风干土样 3.000 g 若干份,置于灭菌的血清瓶中,按土液比 1:1 (*m:v*) 添加无菌去离子水,充 N₂ 除去瓶中 O₂,用橡胶盖及铝盖密封后置于 30℃ 恒温培养箱中(避光)。分别设置 1 h、1 d、5 d、10 d、20 d 和 30 d 的淹水培养时间处理,各处理重复 6 份。采样时,将 3 份培养后的泥浆直接用于土壤中 Fe(III)还原程度测定,另外 3 份样品置于 -20℃ 冰箱中冷冻,以备提取土壤总 DNA 之用。土壤中 Fe(II)浓度测定及采用 Logistic 模型的动力学拟合方法见文献[19]。

1.3 土样中微生物总 DNA 提取

将冻藏的泥浆样品融解后,转入研钵中,加入液氮,快速研磨。参考程林等^[20]的 DNA 提取方法,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 DNA。

1.4 地杆菌科 16S rDNA 的 PCR 扩增和克隆文库构建

以 *E. coli* DH1 的 16S rDNA 序列为参比序列,设计地杆菌科上游引物,命名为 Geo163F1 (5'-TAATACCGRATAAGCCYACG-3') 和 Geo163F2 (5'-TAATACCTGATAAGC CCACG-3')。以提取纯化的总 DNA 为模板,扩增地杆菌科 16S rDNA 序列,扩增体系: Premix 25 μL, Geo163F1 和 Geo163F2 各 1 μL (10 μmol/L), Geo825R^[21] 1 μL (10 μmol/L), DNA 模板 2 μL,用水补足 50 μL。PCR 反应条件同文献[21]。扩增产物用 0.8% 琼脂糖电泳纯化回收后与 pGEM-T 载体连接,转化到 JM109 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选。

1.5 16S rDNA 的 RFLP 分型及多样性指数

用 M13 通用引物进行菌落 PCR 扩增,筛选阳性克隆子。菌落 PCR 产物分别用 *Msp* I 和 *Mnl* I 限制性内切酶酶切(37℃, 6 h),酶切产物用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳并银染。将电泳图谱转化为 0/1 数据,采用 UPGMA 法用 NTsys2.10 软件进行数据处理。具有相同酶切条带类型称之为一个操作分类单元(OTU)。

多样性指数参照文献[22]计算,其中 α 多样性指数包括了 Shannon-Wiener 指数 (H')、Simpson 指数 (D_s)、Margalef 指数 (d_{Ma})、Pielou 均匀度指数 (E)、Menhinick 指数 (R_2) 及种间相遇机率多样性指数 (PIE);选用 Jaccard 指数表示 β 测度多样性,计算式为 $C_j = c/(a + b - c)$,其中 a 和 b 分别为 2 个

群落各自的 OTU 数, c 为两个群落共有 OTU 数。

1.6 构建系统发育树

统计 RFLP 分型结果, 挑选各处理的克隆文库中优势菌测序。在 NCBI 中进行 blastN 比对, 选取参比序列, 利用 MEGA4.0 软件, 依据 N-J 法及 K2 模型构建系统发育树。

1.7 16S rDNA 的 Real-time PCR

定量 PCR 反应体系为 SYBR Green 2 × Buffer 12.5 μL, 引物^[21] Geo494F 和 Geo825R 各 1 μL (10 μmol/L), 总 DNA 模板 2 μL, ddH₂O 补足 25 μL, 设置 3 个重复。反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 反应 40 个循环, 融解温度为 65℃ - 95℃。

标准曲线^[8]: 用细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增 *Geobacter surfularreducens* 的 16S rDNA, 并与 pMD19-T 载体连接, 转化到 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆子。提取质粒, 测定质粒浓度并计算质粒拷贝数 (copies/μL)。以 10 倍梯度稀释后的质粒为模板, 构建标准曲线。

2 结果和分析

2.1 不同淹水培养时间的土壤中 Fe(III) 还原特征

水稻土厌氧培养过程中 Fe(II) 浓度变化如图 1 所示。由图 1 看出, Fe(II) 浓度从 1 h 到 8 d 呈快速增加, 淹水培养 25 d 后 Fe(II) 浓度基本达到稳定状态。采用 Logistic 模型拟合, 得到其最大铁还原潜势为 10.16 mg/g, 最大反应速率 (V_{max}) 为 1.064 mg/(g·d), 最大反应速率对应的时间 ($T_{V_{max}}$) 为 4.84 d。

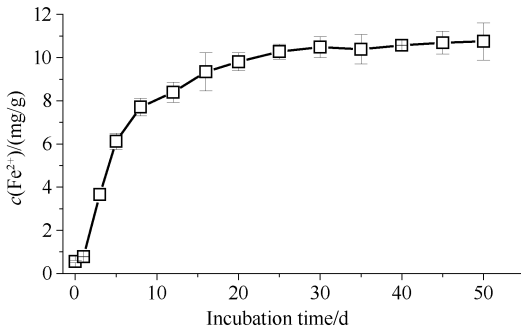


图 1 水稻土淹水培养过程中 Fe(II) 浓度变化

Fig.1 Variation of Fe(II) concentration in paddy soil during flooding incubation.

2.2 地杆菌科 16S rDNA 克隆文库多样性分析

菌落 PCR 产物的 *Msp* I 和 *Mnl* I 酶切图谱见图 2。统计淹水不同时期的 RFLP 分型, 分型结果见图 3。从图 3 和表 1 可知, 不同淹水时间地杆菌科 16S rDNA 克隆文库中, 20 d 的酶切类型最多为 85 种, 其次为 5 d 的 (76 种), 最少的是 30 d 的, 只有 54 种。将克隆文库中酶切类型只出现一次的克隆子称为单一克隆, 其所占比例依次分别为: 淹水 20 d 处理 (38.71%), 5 d 处理 (32.10%), 10 d 处理 (26.32%), 1 d 处理 (23.38%), 1 h 处理 (21.29%), 30 d 处理 (18.18%)。各处理的库容值 C 介于 61.29% - 81.82%, 说明文库的覆盖程度较高, 能够较好的代表土壤中地杆菌科群落的真实情况。

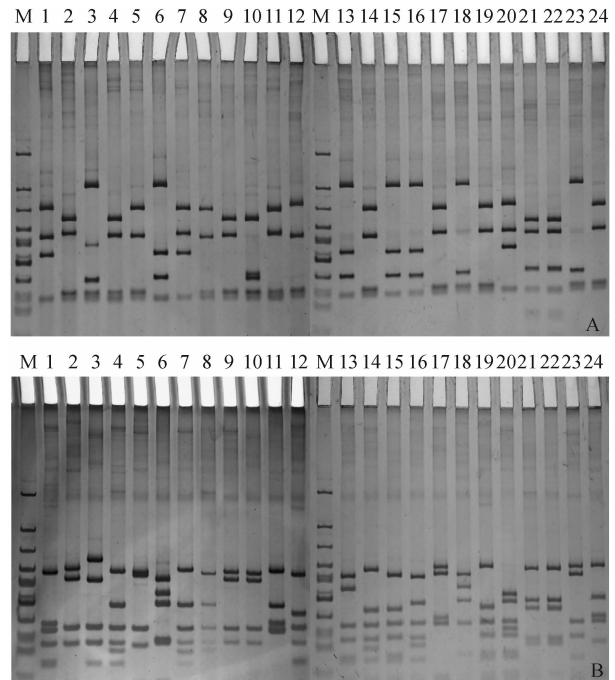


图 2 地杆菌科 16S rDNA 部分克隆子的双酶切图谱

Fig.2 Profile of partial 16S rDNA clones digested by *Msp* I and *Mnl* I respectively. Line 1-24: RFLP profile of partial clones; M: low molecular weight DNA ladder. A: *Msp* I; B: *Mnl* I.

基于 α 测度的地杆菌科群落多样性指数如表 1 所示。从表 1 看出, Shannon-Wiener 指数 (H')、丰富度指数 (d_{Ma})、Menhinick 指数 (R_2)、优势度指数 (D_s) 和种间相遇机率多样性指数 (PIE) 均表现为淹水 20 d 处理的最高, 而淹水 30 d 处理的最小; 各个处理之间的均匀度指数 (E) 表现为 1 h > 1 d > 20 d > 5 d > 30 d > 10 d。在选择 6 种多样性指数中, d_{Ma}

与 R_2 、 D_s 与 PIE 的变化趋势完全相同, H' 与 d_{Ma} 仅在 1 h 和 1 d 的顺序上有细微差别。

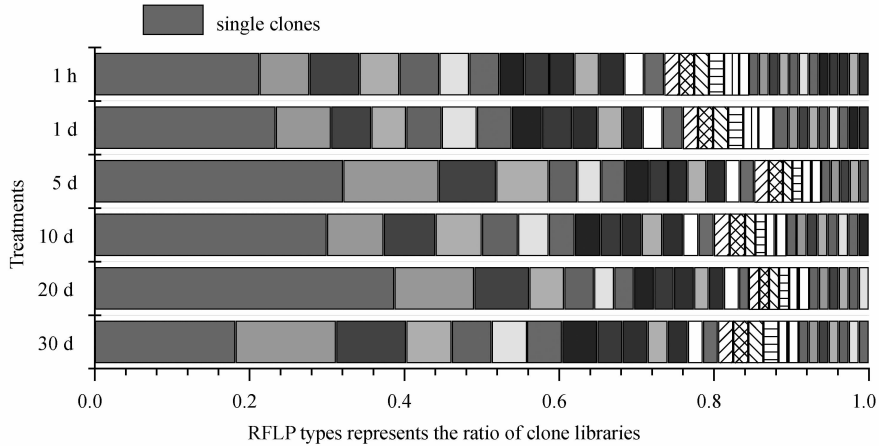


图 3 不同淹水时期水稻土地杆菌科 16S r DNA-RFLP 类型统计结果

Fig. 3 Statistical results of RFLP profile from 16S rDNA clone libraries in paddy soil during flooding incubation.

表 1 不同淹水时期水稻土地杆菌科群落 α 多样性指数

Table 1 α diversity indices of 16S rDNA clone libraries in paddy soil during flooding incubation

Flooding time	OTU/ N	Coverage/ %	Diversity indices					
			H'	D_s	d_{Ma}	R_2	E	PIE
1 h	64 / 155	78.71	3.8392	0.9714	12.4915	5.1406	0.9231	0.9777
1 d	64 / 154	76.62	3.8299	0.9712	12.5076	5.1573	0.9209	0.9776
5 d	76 / 162	67.90	3.8602	0.9633	14.7417	5.9711	0.8913	0.9693
10 d	62 / 152	73.68	3.6239	0.9574	12.1420	5.0289	0.8781	0.9638
20 d	85 / 155	61.29	4.0709	0.9717	16.6553	6.8274	0.9163	0.9780
30 d	54 / 154	81.82	3.5202	0.9541	10.5222	4.3514	0.8825	0.9604

N was the number of clone in each library.

不同处理间的相似性可通过 β 测度的 Jaccard 指数判断,其数值越高,则群落组成相似性越高。由表 2 看出,淹水 20 d 与其他处理之间的 Jaccard 指数为 0.073 - 0.198 之间,而 1 h 和 1 d 处理之间、10 d 和 30 d 及 5 d 与 30 d 之间的 Jaccard 指数为 0.247 - 0.336。总体上看,不同淹水处理之间的地杆菌科群落相似性均较低,表明淹水时间将影响地杆菌科群落结构,其群落结构随培养时间的增加存在连续性演替过程。

表 2 不同淹水时期水稻土处理之间的 Jaccard 指数

Table 2 Jaccard indices in paddy soil during flooding incubation

Flooding time	Similarity					
	1 h	1 d	5 d	10 d	20 d	30 d
1 h	1					
1 d	0.255	1				
5 d	0.167	0.177	1			
10 d	0.200	0.212	0.290	1		
20 d	0.192	0.146	0.073	0.195	1	
30 d	0.229	0.255	0.336	0.247	0.198	1

2.3 优势菌类型的演替变化

本试验将大于 5% 的 OTU 定义为优势类型。不同淹水时期处理中共产生了 10 种地杆菌科的优势类型,随淹水时间增加而产生的优势类型演替变化如图 4 所示。淹水 1 h 处理中的优势菌类型为 A、B、C 和 F (所占比例分别为 6.45%、5.16%、5.16% 和 6.45%), 1 d 处理中为 B 和 C (比例为 5.19% 和 7.14%), 5 d 处理中为 B、C 和 D (比例为 6.79%、12.35% 和 7.41%), 10 d 处理中为 B、C、D、H 和 I (比例为 7.89%、6.58%、11.84%、5.92% 和 5.92%), 20 d 处理中为 C 和 D (比例为 10.32% 和 7.10%), 30 d 处理中为 D、E、G 和 J (比例为 9.09%、5.84%、5.19% 和 12.99%)。类型 A 和 F 仅在 1 h 处理中为优势类型,在 1 d 到 10 d 处理之间所占比例显著降低,20 d 和 30 d 处理中又有所增加;类型 C 在淹水 1 h 到 20 d 处理中均为优势类型,总体表现为先升后降的趋势,其中 5 d 为最大峰值;类型 D 在淹水 5 d 到 30 d 处理中均为优势类型,也表现为先

升后降的趋势,其中10 d为最大峰值;类型E和G仅在淹水30 d处理中为优势类型,淹水20 d处理中为最低,但30 d时显著增大;类型H和I在淹水10 d

处理中为优势类型,而在其他处理中比例很低或为0;类型J在前5个时间内为单一克隆或未出现,但在30 d显著增加,并成为绝对优势类型。

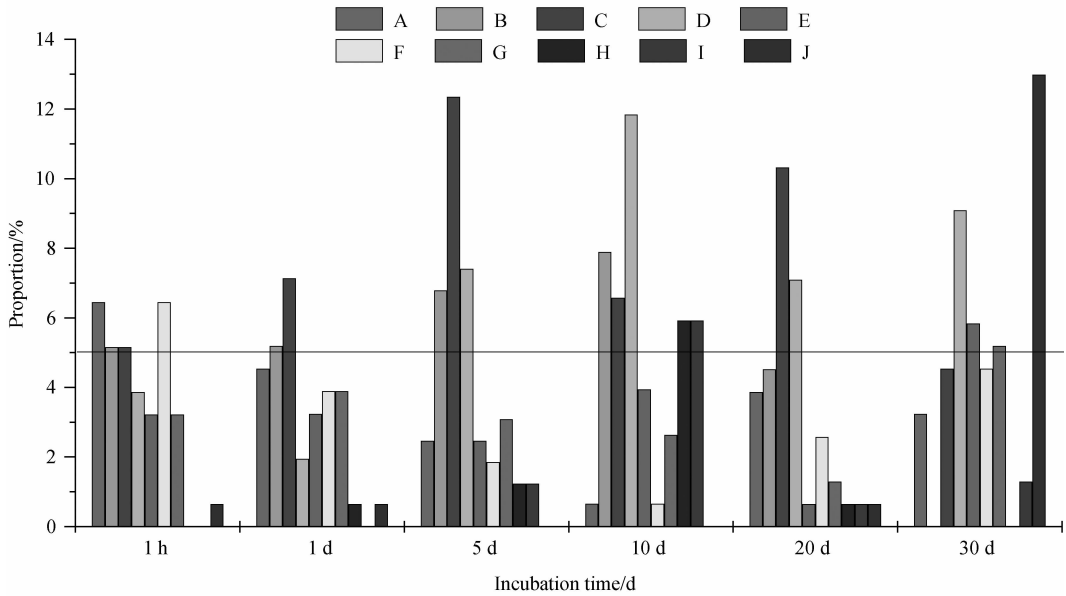


图4 水稻土中地杆菌科优势类型的连续性演替变化

Fig. 4 Successional change of preponderant RFLP types in paddy soil during flooding incubation.

2.4 淹水条件下水稻土中优势地杆菌科的系统发育树

通过对优势类型测序所构建的系统发育树如图5所示。从图5可以看出,优势类型主要分布于Clade 1和Clade 2中,而与Clade GM (*G. metallireducens* Clade)差异较大。类型A、C、D、F、G、I和J属于Clade 2,而类型B、H和E属于Clade 1。在不同淹水时期处理中,B、C和D类型的出现频率明显高于其他类型,对群落的贡献较大。在分类特征上属于Clade 2的类型C、D和属于Clade 1的类型B各自聚为一簇,与来自于淡水表层沉积物和受污染的水体的参比菌株距离较远,这表明供试水稻土中地杆菌科细菌的分布与沉积物和水体中的分布存在一定差别。所测序列已提交至NCBI,登录号为:HQ875495-HQ875554。

2.5 不同淹水时期水稻土中地杆菌科及细菌的丰度变化

采用Real-time PCR获得的不同淹水时期水稻土中地杆菌科丰度以及与细菌丰度比值结果见表3。以每克风干土含地杆菌科和总细菌16S rDNA基因拷贝数表示两者的丰度。由表3可以看出,地杆菌科丰度在 $1.063 \times 10^6 - 18.357 \times 10^6$ 之间,且

在淹水10 d处理中丰度最大,而20 d处理的值最小。细菌丰度在 $0.234 \times 10^8 - 8.915 \times 10^8$ 之间,淹水1 d处理的丰度最大,20 d处理为最低。从地杆菌科占总细菌的比例比较,淹水1 d处理的比值最低(1.199%),淹水5 d处理的比值迅速增加到4.161%,从淹水5 d到20 d处理其比值缓慢增加并达到最高值(4.537%),而淹水30 d处理的比值有所下降。

3 讨论

3.1 淹水培养时间与土壤中地杆菌科多样性的关系

从 α 多样性指数变化趋势来看,不同淹水时间处理中的多样性呈现波动性变化。淹水5 d和20 d处理出现2个峰值,而淹水10 d和30 d处理的多样性明显减小。导致这种变化的原因或许与土壤中电子供体和受体的数量变化有关。从地杆菌科的电子供体分析,其仅以乙酸盐为惟一碳源,在淹水培养过程中乙酸盐含量的变化必定会影响地杆菌科的繁殖和多样性。有研究报道^[9,23],水稻土淹水培养后乙酸盐先是快速积累,然后在10 d-22 d又快速地消

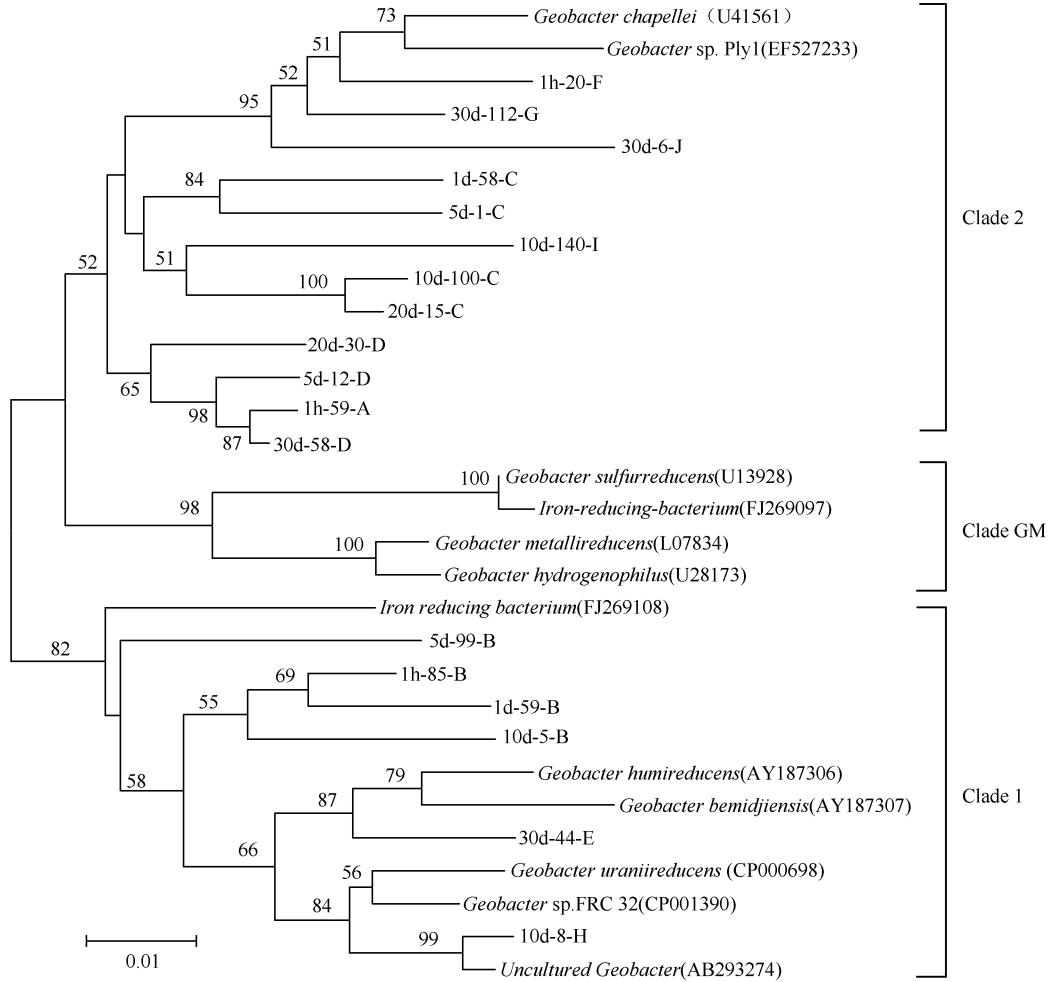


图 5 优势类型 16S rDNA 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of preponderant RFLP types based on 16S rDNA sequences. A phylogenetic tree was constructed using MEGA 4.1 software. The neighbor-joining method and kimura 2-parameter model was applied, bootstrap analysis was done with 500 replicates, 689 bp-691 bp were considered. The scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide site.

表 3 水稻土中地杆菌科和总细菌的 16S rDNA 拷贝数

Table 3 The 16S rDNA copies of *Geobacteraceae* and Bacteria in paddy soil during flooding incubation

Flooding time	Copies of 16S rDNA g ⁻¹ dry soil		
	<i>Geobacteraceae</i> × 10 ⁶	Bacteria × 10 ⁸	Proportion/%
1 h	3.091 ± 0.130 ^{de}	1.883 ± 0.053 ^{de}	1.642
1 d	10.687 ± 0.912 ^b	8.915 ± 1.179 ^b	1.199
5 d	6.837 ± 0.307 ^c	1.643 ± 0.196 ^c	4.161
10 d	18.357 ± 3.905 ^a	4.300 ± 0.093 ^a	4.269
20 d	1.063 ± 0.109 ^e	0.234 ± 0.023 ^e	4.537
30 d	5.186 ± 0.609 ^{cd}	1.641 ± 0.084 ^{cd}	3.161

The different superscript of small letters within samples were significant differences ($P < 0.05$).

耗, 22 d后乙酸盐浓度维持在较低的恒定水平。淹水 5 d 处理的多样性增加与乙酸盐的快速积累有关, 而 10 d 和 30 d 多样性降低则受微生物对乙酸盐的快速消耗影响, 由于营养匮乏, 最终可能导致地杆

菌科的丰富度和多样性降低。然而, 对于淹水 20 d 处理具有最大多样性, 从电子受体的变化可得到较为合理的解释。水稻土中氧化铁是主要的电子受体, 但土壤中不同铁还原微生物对氧化铁的利用能

力存在差异。通常,非晶体态氧化铁易被微生物还原^[24-26],在此过程中电子受体可能是调控其多样性的主要因素。当非晶体态的易还原氧化铁消耗以后,一些弱晶体及部分晶体态氧化铁开始还原,从而导致地杆菌科群落再次发生改变,而此时的 Fe(III) 可能成为地杆菌科生长的限制因素。从试验中水稻土的 Fe(III) 还原过程分析(见图 1),淹水 1 h - 10 d、10 - 25 d 和 25 - 30 d 可分为 3 个不同的反应阶段。前期反应速率快,铁还原微生物以利用易还原态氧化铁的地杆菌科为优势菌群,淹水 10 d 为该阶段结束期,导致群落多样性快速下降;第二个阶段中,Fe(III) 还原速率迅速降低,微生物以较难利用的晶体氧化铁为电子受体,此时将有利于新的地杆菌科种群出现及生长,使多样性再次增加;第三阶段中,Fe(III) 还原达到稳定,可利用的氧化铁基本消耗(极限),此时的地杆菌科群落多样性将迅速下降。

3.2 淹水培养时间与土壤中地杆菌科优势类型演替的关系

从优势菌类型的演替变化可以看出,不同淹水时间处理中地杆菌科的优势类型及所占比例均发生了明显的变化。*r* 和 *k* 生存策略^[11, 23] 可用来解释淹水培养过程中地杆菌科种群演变的原因。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* 策略的地杆菌科物种,如类型 B、C、D、H 和 I 等迅速增长繁殖,成为优势菌种,比例最大值对应的淹水时间分别为 5 - 10 d。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,如类型 E、G 和 J,尤其是类型 J 在淹水 30 d 处理中的比例显著增大。类型 A 和 F 尽管仅在淹水 1 h 处理中属于大于 5% 的优势类型,但在其后的培养处理中表现为“V”变化趋势,在淹水 10 d 处理中为最低,淹水 20 - 30 d 处理又显著最大,推测它们也是采用 *k* 生存策略进行生长,由于在 1 h - 10 d 期间,*r* 策略的物种繁殖速度较快,使得 A 和 F 的相对比例下降。

3.3 土壤中地杆菌科丰度变化与 Fe(III) 还原能力的关系

从基于 16S rDNA 拷贝数的地杆菌科和总细菌

Real-time PCR 结果看出,不同淹水时间处理中的地杆菌科丰度呈现波动性变化,但与总细菌的丰度变化具有一致性。所以,采用地杆菌科丰度占总细菌丰度比例(G/B)变化则更容易看出其变化规律。首先,在不同淹水处理中 G/B 处在 1.199% - 4.537%,与前人研究^[12-13] 结果大体相符(约 < 5%)。其次,水稻土在淹水培养 1 d 时 G/B 最低,是因为淹水 1 h 到 1 d 时土壤中其他细菌的繁殖速度大于地杆菌科细菌,造成 G/B 从 1.642% 降低为 1.119%。从淹水 1 d - 5 d 的 G/B 快速增加,达到 4.161%,于此对应的 Fe(III) 还原速率也在 5 d 左右达到最高值($T_{V_{max}}$ 为 4.84 d)。淹水 5 d - 20 d 处理中的 G/B 缓慢增加,这与 Fe(III) 还原量变化特征相一致。淹水 20 d 处理中的 G/B 最大,此时的 Fe(III) 还原反应开始趋于稳定。这些结果表明了地杆菌科微生物的相对丰度对水稻土中的 Fe(III) 还原能力具有重要的影响。第三,在淹水 20 d - 30 d 处理中的 G/B 明显下降,则与厌氧培养 25 d 后可还原的 Fe(III) 达到极限有关。研究表明^[23],当水稻土中 NO_3^- 、Fe(III)、 SO_4^{2-} 等电子受体消耗完之后,产甲烷菌大量繁殖,因此 G/B 也会随之降低。

4 结论

淹水培养的水稻土中,地杆菌科微生物的多样性和相对丰度动态变化与微生物 Fe(III) 还原密切相关。不同淹水时间土壤中地杆菌多样性呈现波动性变化的原因受土壤中电子供体和 Fe(III) 数量变化的影响。地杆菌科微生物的相对丰度对水稻土中的 Fe(III) 还原能力具有重要的影响,采用地杆菌科丰度占总细菌丰度比例变化可较好的反映其变化规律。

参考文献

- [1] Lovley DR. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(2): 259-287.
- [2] Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, Phillips EJP. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, 1987, 330(6145): 252-254.
- [3] Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 219-286.

- [4] Prakash O, Gihring TM, Dalton DD, Chin KJ, Green SJ, Akob DM, Wanger G, Kostka JE. *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(3) : 546-553.
- [5] Franks AE, Nevin KP, Glaven RH, Lovley DR. Microtoming coupled to microarray analysis to evaluate the spatial metabolic status of *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *International Society for Microbial Ecology*, 2010, 4(4) : 509-519.
- [6] Liesack W, Schnell S, Revsbech NP. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(5) : 625-645.
- [7] Zheng Y, Zhang LM, Zheng YM, Di HJ, He JZ. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(6) : 406-414.
- [8] Liu XZ, Zhang LM, Prosser JI, He JZ. Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41(4) : 687-694.
- [9] He JZ, L XZ, Zheng Y, Shen JP, Zhang LM. Dynamics of sulfate reduction and sulfate-reducing prokaryotes in anaerobic paddy soil amended with rice straw. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46(3) : 283-291.
- [10] Peng JJ, Lü Z, Rui JP, Lu Y. Dynamics of methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(9) : 2894-2901.
- [11] Noll M, Matthies D, Frenzel P, Derakshani M, Liesack W. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3) : 382-395.
- [12] Lueders T, Pommerenke B, Friedrich MW. Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits; syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10) : 5778-5786.
- [13] Lu Y, Rosencrantz D, Liesack W, Conrad R. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(8) : 1351-1360.
- [14] Wang XJ, Yang J, Chen XP, Sun GX, Zhu YG. Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China. *Journal of Soils and Sediments*, 2009, 9(6) : 568-577.
- [15] Hori T, Muller A, Igarashi Y, Conrad R, Friedrich MW. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ¹³C-acetate probing. *International Society for Microbial Ecology*, 2010, 4(2) : 267-78.
- [16] Cummings DE, Snoeyenbos-West OL, Newby DT, Niggemyer AM, Lovley DR, Achenbach LA, Rosenzweig RF. Diversity of *Geobacteraceae* species inhabiting metal polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microbial Ecology*, 2003, 46(2) : 257-269.
- [17] Lin B, Braster M, Breukelen BM, Verseveld HW, Westerhoff HV, R? ling WFM. *Geobacteraceae* community composition is related to hydrochemistry and biodegradation in an iron-reducing aquifer polluted by a Neighboring Land? ll. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10) : 5983-5991.
- [18] Holmes DE, O'Neil RA, Vronionis HA, N'guessan LA, Ortiz-Bernad I, Larrahondo MJ, Adams LA, Ward JA, Nicoll JS, Nevin KP, Chavan MA, Johnson JP, Long PE, Lovley DR. Subsurface clade of *Geobacteraceae* that predominates in a diversity of Fe (III)-reducing subsurface environments. *International Society for Microbial Ecology*, 2007, 1(8) : 663-677.
- [19] 易维洁, 曲东, 王庆. 碳源和淹水时间对水稻土微生物 Fe (III) 还原能力的影响. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2010, 21(12) : 3133-3140.
- [20] 程林, 刘桂婷, 王保莉, 曲东. 渭北旱塬长期施肥试验中氨氧化细菌的多样性及群落结构分析. 农业环境科学学报 (*Journal of Agro-Environment Science*), 2010, 29(7) : 1333-1340.
- [21] Holmes DE, Finneran KT, O'Neil RA, Lovley DR. Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium- contaminated aquifer sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5) : 2300-2306.
- [22] 王英, 滕齐辉, 崔中利, 曹慧, 胡锋. 免耕水稻土壤中细菌多样性及其空间分布的研究. 土壤学报 (*Acta Pedologica Sinica*). 2007, 44(1) : 137-143.
- [23] Rui JP, Peng JJ, Lu Y. Succession of bacterial populations during plant residue in rice field soil. *Applied*

and *Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4879-4886.

- [24] 曲东, 张一平, Schnell S, Conrad R. 水稻土中铁氧化物的厌氧还原及其对微生物过程的影响. *土壤学报* (*Acta Pedologica Sinica*), 2003, 40(6): 858-863.
- [25] 曲东, Schnell S. 纯培养条件下不同氧化铁的微生物还原能力. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*),

2001, 41(6): 745-749.

- [26] Qu Dong, Stefan R, Schnell S. Microbial reduction of weakly crystalline iron(III) oxides and suppression on methanogenesis in paddy soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 72(6): 1172-1181.

Effect of flooding time on community structure and abundance of *Geobacteraceae* in paddy soil

Jiaohua You¹, Shuhong Xia¹, Baoli Wang¹, Dong Qu^{2*}

¹College of Life Sciences, ²College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: [**Objective**] The dynamic characteristics of community structure and relative abundance of *Geobacteraceae* were investigated to understand their response to microbial iron(III) reducing in flooded paddy soil. [**Methods**] The paddy soil was incubated anaerobically and the amount of Fe(II) was determined during the flooding incubation. We retrieved *Geobacteraceae* sequences from clone libraries constructed for different time points (1 h and day 1, 5, 10, 20 and 30) after flooding of the paddy soil. The diversity and community structure were analyzed by using RFLP method, and the relative abundance of *Geobacteraceae* was detected by real-time PCR. [**Results**] Microbial reduction of iron(III) changed greatly in early time and was stable after incubated for 20 d in paddy soil. The largest iron reduction potential was 10.16 mg/g with a V_{max} of 1.064 mg/(g·d) at the time of 4.84 d whereas this process achieved plateau after 20 days flooding. Diversity of *Geobacteraceae*, given by alpha indices, fluctuated during the flooding incubation. Two peaks of diversity were observed in treatments of 5 d and 20 d respectively, while significant low diversity appeared in samples of 10 d and 30 d. Beta indices described the differences between community structures of *Geobacteraceae* and hence reflected the variation of the flooding situation over time. In all samples, 10 RFLP-based preponderant types were found, which fell into clade 1 and clade 2 of *Geobacteraceae*. The relative abundance of *Geobacteraceae* was the lowest in 1 d (1.20%) and the highest in 20 d (4.54%). [**Conclusion**] The dynamic variation of *Geobacteraceae* diversity, community structure and abundance are closely related to microbial iron(III) reducing in flooding paddy soil.

Keywords: paddy soil, *geobacteraceae*, community structure, abundance, RFLP

(本文责编: 张晓丽)