

DOI: 10.5846/stxb201905070920

徐健鑫, 袁幸运, 李晓明, 丁龙君, 朱永官. 水稻土中铁氧化物对产甲烷古菌群落结构的影响. 生态学报, 2020, 40(9): 3115-3120.

Xu J X, Yi X Y, Li X M, Ding L J, Zhu Y G. Effects of iron oxides in paddy soils on methanogens communities. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(9): 3115-3120.

水稻土中铁氧化物对产甲烷古菌群落结构的影响

徐健鑫^{1,2}, 袁幸运^{1,3}, 李晓明^{1,3}, 丁龙君¹, 朱永官^{1,3,4,*}

1 中国科学院生态环境研究中心土壤环境研究室, 北京 100085

2 中国科学院大学中丹学院, 北京 100049

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 中国科学院城市环境研究所, 厦门 361021

摘要: 产甲烷菌广泛分布在淹水水稻土等各种厌氧环境中, 在全球气候变化、碳循环和能源等领域都发挥着重要的作用。研究发现, 厌氧条件下, 水稻土中铁氧化物的生物还原会抑制产甲烷菌的甲烷合成作用。然而, 目前关于铁氧化物对产甲烷菌群落结构的影响报道较少。通过泥浆厌氧培养实验, 向采集的水稻土中添加甲酸盐作为甲烷合成的底物 (Control, CK 处理), 并设置添加水铁矿作为体系中唯一电子受体的处理组 (Ferrihydrite, Fh 处理)。培养结束后, 与 CK 相比, 添加水铁矿显著降低了古菌在总微生物群落中的占比, 但对古菌群落的物种多样性和均一度没有显著影响; 且两组处理中优势种均为操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU) 2056 和 OTU 911 (76%—80%)。这说明碳源相同时, 产甲烷菌的群落结构不受铁氧化物的影响。本研究为探索土壤中微生物铁还原与碳循环耦合的分子机制奠定基础。

关键词: 水稻土; 产甲烷菌; 铁氧化物; 铁还原

Effects of iron oxides in paddy soils on methanogens communities

XU Jianxin^{1,2}, YI Xingyun^{1,3}, LI Xiaoming^{1,3}, DING Longjun¹, ZHU Yongguan^{1,3,4,*}

1 State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Beijing 100085, China

2 Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Xiamen 361021, China

Abstract: Methanogens are widely distributed in anaerobic environment, such as flooded paddy soils, and are of vital importance in global carbon cycling, climate change and clean energy utilization. Previous studies found that microbial reduction of iron oxides, which are the most abundant oxides in paddy soils, could inhibit methanogenesis as ferric iron acts as a competitive electron acceptor. However, the effects of iron oxides on methanogens communities are less reported. By anaerobic incubation experiments added with formate only (control, CK) and both formate and ferrihydrite (Fh treatment), combined with 16S rRNA gene sequencing technique, we explored the changes of archaea communities induced by iron oxides in flooded paddy soil. Our results showed that compared to CK, adding ferrihydrite significantly reduced the proportion of archaea in total microbial community after incubation. At the operational taxonomic unit (OTU) level, a total of 21 OTUs were found at the end of incubation, 15 of which were detected both in CK and Fh treatments. Meanwhile, the addition of formate induced a lower shannon index and a higher simpson index of archaea community, indicating that the species richness and evenness were reduced. OTU 2056 and OTU 911 were enriched significantly, becoming the dominant

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41571130062, 41430858, 41601242); 国家重点研究开发项目 (2017YFD0800303)

收稿日期: 2019-05-07; 网络出版日期: 2020-03-16

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ygzhu@cees.ac.cn

and occupying 76%—80% in whole archaea communities, but the relative abundance of other OTUs decreased. However, the addition of ferrihydrite had no significant effect on the alpha diversity (shannon index and simpson index) and dominant strains. By means of phylogenetic tree analysis, OTU 2056 and OTU 911 had a close affinity with *Methanobacterium bryantii* which has been reported as hydrogenotrophic methanogens that could utilize formate. It thus indicates that iron oxides may only reduce the release of methane by inhibiting the growth of methanogens, but have no selective effect on the strains that act as the key role. This study helps to lay a foundation for exploring the microbial coupling of iron reduction and carbon cycling in soils.

Key Words: paddy soils; methanogens; iron oxides; iron reduction

甲烷(CH_4)是继二氧化碳(CO_2)之后第二大温室气体,其较强的红外线吸收能力使其单分子增温的潜力是 CO_2 的20—30倍^[1-2]。目前全球每年 CH_4 排放量约 5×10^8 — 6×10^8 t,其中约70%来源于微生物作用^[3]。产甲烷菌是其中最大的贡献者。产甲烷菌是地球上最古老的生命形式之一^[4],广泛分布于稻田、海洋沉积物、厌氧消化器等厌氧环境中^[5-7],是复杂有机质厌氧降解的重要推动者^[8]。根据碳源差异,产甲烷菌的能量代谢方式可分为:以 H_2 或甲酸为电子供体还原 CO_2 、乙酸发酵及甲基营养型等三种^[9]。

稻田是我国最重要的人工湿地生态系统,也是 CH_4 排放的人为源之一^[10]。每年来源于稻田的 CH_4 排放量约 2×10^7 — 1.2×10^8 t,中国位于世界首位^[11]。氧化铁是稻田土中最丰富的氧化物。多形态、高化学活性的氧化铁在周期性干湿交替的稻田土壤中表现出活跃的价态变化,影响着其他营养元素的生物地球化学循环^[12-13]。有研究报道,由微生物介导的铁还原直接影响着甲烷合成等其他代谢途径^[14]。Jackel等研究发现向水稻土中添加15或30 g/kg水铁矿时,甲烷释放的抑制效率分别可达43%和84%^[15];Peng等向不同植区水稻土中添加葡萄糖后发现土壤中 Fe(II) 的产生量与 CH_4 的释放量显著相关,并提出以 $\text{Fe(II)}/[\text{Fe(II)}+\text{Fe(III)}]$ 预估 CH_4 排放量的模型^[16]。然而,目前关于铁氧化物对产甲烷菌群落结构的影响报道较少。

本研究通过泥浆厌氧培养,以甲酸盐为产甲烷底物,水铁矿为唯一电子受体,探究添加铁氧化物(铁还原)对产甲烷菌的群落组成的影响。本实验将为探究水稻土中铁还原与碳代谢间耦合的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 水铁矿的制备

水铁矿($\text{Fe}_5\text{HO}_8\cdot\text{H}_2\text{O}^{[12]}$)的制备方法参照Schwertmann和Cornell^[17]进行了适当修改。用去离子水配制0.4 mol/L FeCl_3 溶液,并用1.0 mol/L NaOH 溶液将pH调至7.0。然后用10倍体积的去离子水洗涤、离心沉淀(5000 r/min, 10 min),直到上清液中 Cl^- 浓度小于1 mmol/L。将洗好的沉淀冷冻干燥,研磨过筛(0.07 mm),室温保存。

1.2 无菌缺氧去离子水的制备

向去离子水中添加微量刃天青作为氧化还原指示剂,将无菌针头插入液面以下并通入高纯 N_2 ,加热并维持沸腾状态30 min,以去除去离子水中的溶解氧,此时液体成粉紫色;稍冷,加入0.3 g/L L-半胱氨酸,持续微热并通入高纯 N_2 至液体变为无色;迅速封装,高压灭菌(121℃, 20 min),冷却待用。

1.3 泥浆厌氧培养

土壤样品采自湖南省桃源县长期施肥实验站(28°21'N, 116°92'E)。采集土壤表层0—20 cm,并去除样品中细小的沙石和根系,放入无菌自封袋中密封,冷藏运回实验室。将样品风干过筛(1 mm),充分混匀。

称取土壤样品7.5 g,在顶层空气为 $\text{N}_2:\text{CO}_2:\text{H}_2=80:10:10$ 的厌氧操作箱中与无菌缺氧去离子水以1:1的比例混匀,成均匀泥浆于血清瓶中。加盖丁基胶塞,并用铝盖密封。为活化土壤中的微生物并耗竭土壤本底 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 等电子受体,将泥浆样品置于25℃黑暗环境下静止预培养22 d。预培养结束后,将15 mL均

匀泥浆转移至 50 mL 血清瓶中,并设置:(i)同时添加甲酸盐和水铁矿(Ferrihydrite, Fh)和(ii)仅添加甲酸盐作为对照(Control, CK)两组处理,每组处理设置三个重复。用无菌注射器将预先用无菌缺氧去离子水配制的甲酸钠溶液和水铁矿溶液分别以 $7 \mu\text{mol/g}$ 和 $530 \mu\text{mol/g}$ 的浓度添加到培养体系中,摇匀。记此时为处理第 0 天。置于 25°C 黑暗环境下静止培养 10 d。

由于微生物对甲酸盐的大量消耗,在 10 d 培养期间每天向体系中按 $7 \mu\text{mol/g}$ 的浓度补充甲酸盐,且培养结束时(记为第 10 天)体系中几乎没有甲酸盐剩余。

1.4 泥浆 DNA 提取及 16S rRNA 基因测序

取培养第 0、10 天的泥浆 0.5 g(干土计),用 FastDNA Spin Kit for Soil(MP bio, CA, USA)试剂盒提取泥浆 DNA。选择 16S rRNA 基因的 V4 高变区(ArBa515f_Arch806r)进行扩增,20 μL PCR 体系包括:4 μL 5 \times FastPfu Buffer,2 μL 2.5 mmol/L dNTPs,前、后引物各 0.8 μL ,0.4 μL FastPfu Polymerase,0.2 μL BSA 和 2 μL DNA,剩余用无菌水补齐。PCR 反应条件如表 1。样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

表 1 PCR 反应引物和反应条件

Table 1 Primers and Conditions for PCR Reaction

引物 Primers	引物序列 Primer sequences	PCR 反应条件 Conditions for PCR reaction
ArBa515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	95 $^\circ\text{C}$, 3 min; 27 \times (95 $^\circ\text{C}$, 30 s; 55 $^\circ\text{C}$, 30 s; 72 $^\circ\text{C}$, 45 s); 72 $^\circ\text{C}$, 10 min
Arch806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	

1.5 数据分析

初始数据分析采用 Excel 2016 进行,采用 SPSS(20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)软件进行显著性分析(one-way ANOVA)。计算香农指数和辛普森指数描述古菌群落的 α 多样性,基于 Weighted normalized Unifrac 距离算法进行主坐标分析。将相对丰度发生显著差异的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)序列与 NCBI 数据库中序列比对,利用 MEGA 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,检验方法为 bootstrap,重复 1000 次。

2 结果

2.1 古菌群落多样性变化分析

基于 16S rRNA 基因测序结果,我们发现微生物群落大多由细菌构成,古菌占比不足 30%,且培养结束后仅 CK 处理中古菌所占比例显著($P < 0.05$)升高,Fh 处理中无显著变化(图 1)。

进一步从 OTU 水平上分析 CK 和 Fh 两组处理中古菌群落组成的多样性,发现两组处理中香农指数均极显著下降($P < 0.001$),而辛普森指数极显著上升($P < 0.001$,图 2)。这说明添加甲酸盐处理 10 天后,不仅降低了体系中古菌群落的物种多样性,同时降低了 OTU 水平上古菌群落的均一性。另外,发现与 CK 相比,添加水铁矿尽管可以降低微生物群落结构中古菌的占比,但对古菌群落组成的多样性没明显影响。基于 Weighted normalized Unifrac 算法的主坐标分析(图 3)表明经 10 天厌氧培养,CK 和 Fh 处理的古菌群落结构均与培养前明显不同,且两者培养后的古菌群落组成也

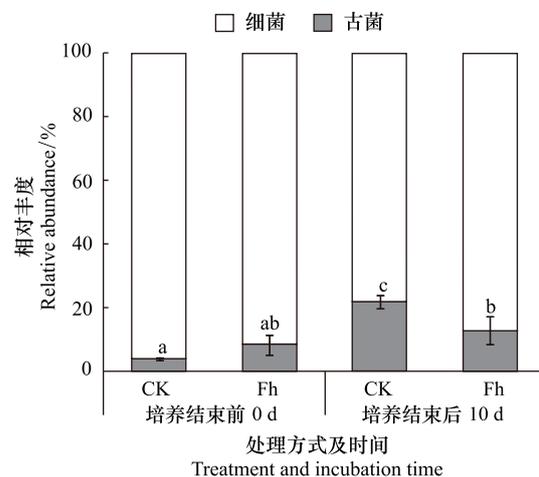


图 1 培养结束前、后微生物群落组成

Fig.1 Barplot of microbial community structure in CK and Fh treatments at day 0 and 10

CK:对照处理 Control; Fh:水铁矿处理 Ferrihydrite.误差线为三组重复的标准偏差,上方的小写字母为不同处理培养前后的显著性差异($P < 0.05$)

具有显著差异;主坐标解释了总方差的 82.84%。

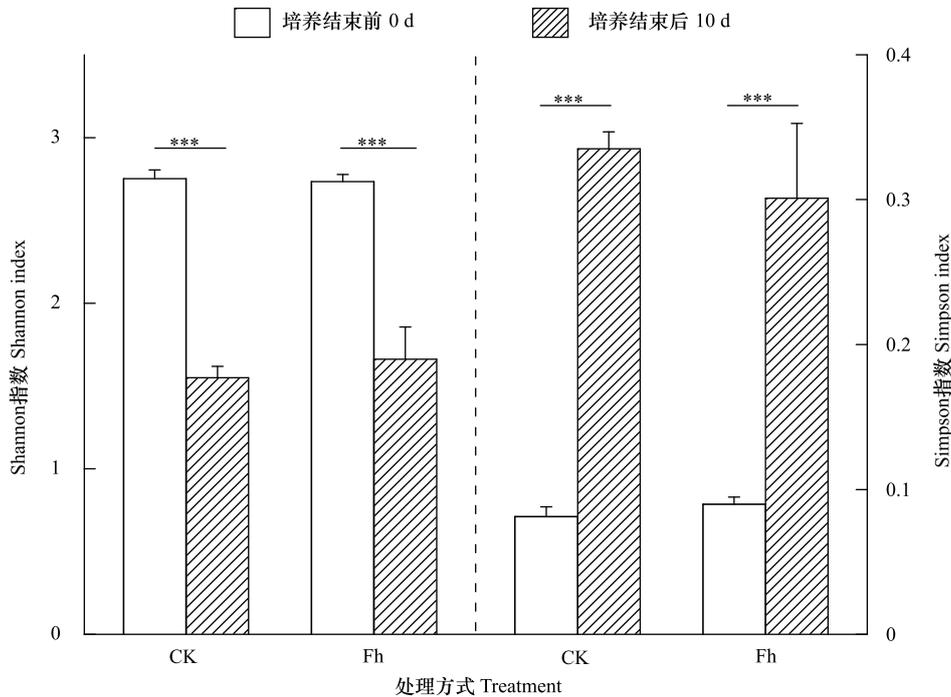


图 2 培养前、后泥浆中古菌群落结构的多样性指数 (***) $P < 0.001$

Fig.2 Barplot of Shannon index and Simpson index of archaea in CK and Fh treatments at day 0 and 10

2.2 OTUs 水平上古菌群落结构变化分析

为进一步分析添加甲酸盐和水铁矿对古菌群落的影响,我们对比不同处理中培养前后每个 OTU 在体系中的相对丰度,最终发现 OTU 2056, OTU 911, OTU 3870, OTU 2032, OTU 1970, OTU 2456, OTU 1931 和 OTU 895 等 8 个培养后相对丰度发生显著 ($P < 0.05$) 变化的 OTU (图 4)。其中,仅 OTU 2056 和 OTU 911 相对丰度升高,分别占 CK 和 Fh 处理古菌群落的 80% 和 76%;根据系统发育分析,两者均与 *Methanobacterium* 具有较近的亲缘关系。OTU 2032 和 OTU 2456 仅在 CK 处理中相对丰度下降,它们与 *Methanosarcina* 具有较高的相似性;而 OTU 1931 和 OTU 895 相对丰度变化仅发生于 Fh 处理中,与 *Methanocellales* 较为相似。

3 讨论

甲酸是生物大分子降解过程中除乙酸外又一重要的中间代谢产物^[18],也是大多 H_2 营养型产甲烷菌可以利用的一种底物^[10]。从能量角度上,除直接还原 CO_2/CO 途径以外,以甲酸盐为电子供体是微生物最容易产甲烷的途径^[10]。本研究结果显示,以甲酸盐为底物进行泥浆厌氧培养后,体系的古菌群落结构从 OTU 水平上发生了明显的改变(图 3),其物种多样性和群落结构的均一性均显著降低 ($P < 0.05$, 图 2)。造成这一结果的原因是添加甲酸盐刺激了 OTU 2056 和 OTU 911 的显著富集 ($P < 0.001$, 图 4),使其成为古菌中的主要优势种,从而降低了其他如 *Methanosarcina*、*Methanocellales* 和 *Crenarchaeote* 等类似古菌的相对丰度。系统发育分析

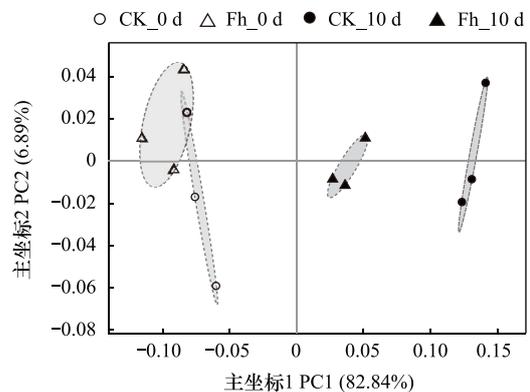


图 3 培养前、后泥浆中古菌 OTU 水平的主坐标分析图

Fig.3 Principal co-ordinate analysis plot for archaea community structure in CK and Fh treatments at OTU level

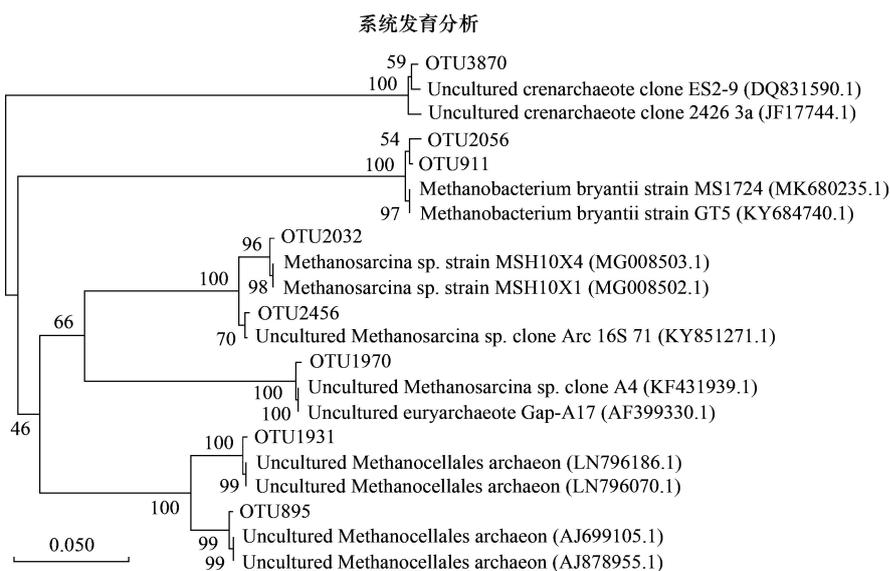
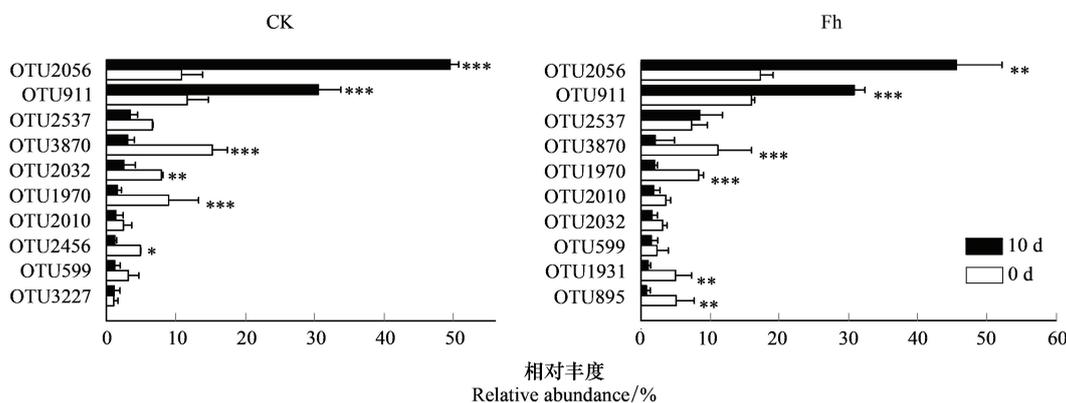


图 4 厌氧培养 10 天后 CK 处理和 Fh 处理中相对丰度显著变化的 OTUs 及其系统发育分析 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$)

Fig.4 Phylogenetic tree of OTUs whose relative abundance change significantly after 10-day anaerobic incubations in control and Fh treatment

结果显示这两个 OTU 均与 *Methanobacterium bryantii* 有较高的相似性。*M. bryantii* 在系统发育上与 *M. formicicum* 相似,两者都能利用甲酸盐产 H_2 和 CH_4 [19]。Bryant 等最早发现 *M. bryantii* 可以利用 S 菌株氧化乙醇的产物 H_2 合成甲烷,降低了 H_2 累积对 S 菌株生长的抑制,从而实现了两者的互营共生 [20]。之后, Guyot 等也发现 *M. bryantii* 可以利用甲酸,与 *Desulfovibrio vulgaris* JJ 共生产甲烷 [21]。我们的体系中是否也存在这种互营关系有待进一步确认。

水稻土中存在着丰富的铁氧化物,在周期性灌溉-排水的管理模式下,铁也发生了活跃的价态变化,并影响着其他生命活动 [13,22]。结果发现,添加水铁矿培养后,古菌在全部微生物群落中的占比没有发生明显变化,显著低于 CK 处理 ($P < 0.05$)。这与早期的研究报道

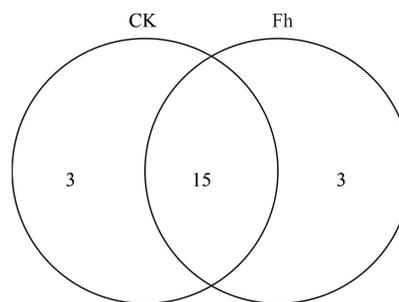


图 5 厌氧培养 10 天后 Fh 和 CK 处理中 OTU 差异的韦恩图
Fig.5 Venn diagram of OTU difference between CK and Fh after 10-day incubations

一致。微生物(细菌)介导的铁还原与产甲烷过程竞争电子和底物,因此与不发生铁还原相比,产甲烷菌的生长会受到抑制^[5]。但我们进一步发现,CK 和 Fh 处理培养前后古菌群落的 α 多样性没有差异,且培养后两个处理组中的优势种均为 OTU 2056 和 OTU 911,占比也相似。这说明添加水铁矿对古菌群落的迁移没有主导作用。培养后 83% OTUs 同时存在于 CK 和 Fh 处理中(图 5),也验证了这一结论。

4 结论

添加甲酸盐可以有效地富集土壤中 *Methanobacterium bryantii* 的类似微生物;添加铁氧化物只能从总体上减少古菌占微生物总体的比重,但对古菌群落的多样性和均一度以及显著富集的菌株类型没有影响。因此,在有机物的厌氧降解过程中,铁氧化物可能只通过抑制产甲烷菌的生长减少甲烷的释放,而对主要发挥功能的菌株不具选择作用。

参考文献 (References):

- [1] Lelieveld J, Crutzen P J, Brühl C. Climate effects of atmospheric methane. *Chemosphere*, 1993, 26(1/4): 739-768.
- [2] 陈槐, 周舜, 吴宁, 王艳芬, 罗鹏, 石福孙. 湿地甲烷的产生、氧化及排放通量研究进展. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(5): 726-733.
- [3] Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 285-292.
- [4] Ueno Y, Yamada K, Yoshida N, Maruyama S, Isozaki Y. Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature*, 2006, 440(7083): 516-519.
- [5] Conrad R, Erkel C, Liesack W. Rice Cluster I methanogens, an important group of *Archaea* producing greenhouse gas in soil. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(3): 262-267.
- [6] Ferry J G, Lessner D J. Methanogenesis in marine sediments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 147-157.
- [7] Karakashev D, Batstone D J, Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 331-338.
- [8] 承磊, 郑珍珍, 王聪, 张辉. 产甲烷古菌研究进展. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1143-1164.
- [9] Thauer R K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson; 1998 Marjory Stephenson prize lecture. *Microbiology*, 1998, 144(9): 2377-2406.
- [10] Liu Y C, Whitman W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 171-189.
- [11] Yan X Y, Akiyama H, Yagi K, Akimoto H. Global estimations of the inventory and mitigation potential of methane emissions from rice cultivation conducted using the 2006 Intergovernmental Panel on Climate Change Guidelines. *Global Biogeochemical Cycles*, 2009, 23(2): GB2002.
- [12] Kappler A, Straub K L. Geomicrobiological cycling of iron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2005, 59(1): 85-108.
- [13] Weber K A, Achenbach L A, Coates J D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(10): 752-764.
- [14] Lovley D R, Phillips E J P. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(11): 2636-2641.
- [15] Jäckel U, Schnell S. Suppression of methane emission from rice paddies by ferric iron fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(11/12): 1811-1814.
- [16] Peng Q A, Shaaban M, Hu R G, Mo Y L, Wu Y P, Ullah B. Effects of soluble organic carbon addition on CH₄ and CO₂ emissions from paddy soils regulated by iron reduction processes. *Soil Research*, 2015, 53(3): 316-324.
- [17] Schwertmann U, Cornell R M. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2000: 105-105.
- [18] Marchaim U. *Biogas Processes for Sustainable Development*. Rome: FAO, 1992.
- [19] Benstead J, Archer D B, Lloyd D. Formate utilization by members of the genus *Methanobacterium*. *Archives of Microbiology*, 1991, 156(1): 34-37.
- [20] Bryant M P, Wolin E A, Wolin M J, Wolfe R S. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 1967, 59(1/3): 20-31.
- [21] Guyot J P, Brauman A. Methane production from formate by syntrophic association of *Methanobacterium bryantii* and *Desulfovibrio vulgaris* JJ. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(6): 1436-1437.
- [22] Lovley D R. Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Advances in Agronomy*, 1995, 54: 175-231.