

# 甲烷氧化菌群介导的 Fe(III)还原和生物固氮及其耦合机制

李书安, 余林鹏\*, 杨琳, 沈彦汐, 周顺桂

福建农林大学 资源与环境学院, 福建 福州

李书安, 余林鹏, 杨琳, 沈彦汐, 周顺桂. 甲烷氧化菌群介导的 Fe(III)还原和生物固氮及其耦合机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2449-2462.

LI Shu'an, YU Linpeng, YANG Lin, SHEN Yanxi, ZHOU Shungui. Fe(III) reduction and biological nitrogen fixation mediated by a methane-oxidizing consortium and their coupling mechanism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(6): 2449-2462.

**摘要:** 【目的】铁还原依赖的甲烷厌氧氧化(Fe-AOM)是厌氧环境中甲烷减排的重要途径, 然而在缺氮条件下甲烷氧化微生物如何进行 Fe-AOM 仍不清楚。【方法】选取甲烷氧化培养物和水铁矿为研究对象, 通过氮同位素示踪、三维荧光光谱分析、电化学分析和高通量测序等方法, 探究缺氮条件下 Fe-AOM 的效率及其耦合生物固氮的可能性。【结果】在缺氮条件下, 甲烷氧化培养物能够催化 Fe-AOM, 将水铁矿还原转化为菱铁矿等矿物。当添加甲烷时, 甲烷氧化培养物的固氮酶活性和  $^{15}\text{N}$  同化量显著高于无甲烷组, 证明甲烷氧化培养物能够耦合 Fe-AOM 和生物固氮过程。三维荧光光谱分析和电化学分析表明, Fe-AOM 促进了溶解态蛋白质类物质的产生, 增加了甲烷氧化培养物的氧化还原活性, 并且以直接电子传递的方式进行水铁矿的还原。微生物群落结构分析显示, 甲烷杆菌属(*Methanobacterium*, 19.32%), 地杆菌属(*Geobacter*, 6.14%)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*, 17.52%)等铁还原菌及固氮弯曲菌属(*Azoarcus*, 1.69%)、固氮螺菌属(*Azospirillum*, 0.43%)等固氮菌在 Fe-AOM 过程中显著富集。DNA-SIP 分析发现, *Azoarcus* 在标记同位素组的重层显著富集, 证实其固定了同位素氮。【结论】因此推测在该 Fe-AOM 耦合生物固氮过程主要由 *Methanobacterium* 进行甲烷氧化, 而 *Geobacter*、*Desulfovibrio* 等铁还原菌负责水铁矿的还原, *Azoarcus* 则催化了生物固氮。此外, 甲烷氧化细菌[甲基胞囊菌属(*Methylocystis*)]与铁还原菌和固氮菌之间呈现正相关关系, 暗示其可能对该过程具有一定的贡献。这些结果为理解厌氧环境中铁依赖型甲烷氧化耦合固氮过程提供了新视角。

**关键词:** 厌氧甲烷氧化; 铁还原; 生物固氮; 高通量测序

资助项目: 国家自然科学基金(42477255, 42077284); 福建农林大学科技创新专项基金(KFB23121)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42477255, 42077284) and the Science and Technology Innovation Special Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (KFB23121).

\*Corresponding author. E-mail: yulinpeng@fafu.edu.cn

Received: 2024-11-14; Accepted: 2025-01-22; Published online: 2025-03-12

## Fe(III) reduction and biological nitrogen fixation mediated by a methane-oxidizing consortium and their coupling mechanism

LI Shu'an, YU Linpeng\*, YANG Lin, SHEN Yanxi, ZHOU Shungui

College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

**Abstract:** [Objective] Iron reduction-dependent anaerobic oxidation of methane (Fe-AOM) is an important pathway for methane emission reduction in anaerobic environments. However, it remains unclear how methane-oxidizing microbes perform Fe-AOM under nitrogen-limiting conditions. [Methods] Focusing on a methane-oxidizing consortium and ferrihydrite, this study employed nitrogen isotope tracing, three-dimensional fluorescence spectroscopy, electrochemical analysis, and high-throughput sequencing to investigate the Fe-AOM efficiency and the possibility of coupling Fe-AOM with biological nitrogen fixation under nitrogen-limiting conditions. [Results] The methane-oxidizing consortium was able to catalyze Fe-AOM under nitrogen-limiting conditions, reducing ferrihydrite to minerals such as siderite. The nitrogenase activity and  $^{15}\text{N}$  assimilation of the methane-oxidizing consortium in the presence of methane were significantly higher than those in the absence of methane, which demonstrated that the consortium could couple Fe-AOM with biological nitrogen fixation. Three-dimensional fluorescence spectroscopy and electrochemical analysis revealed that Fe-AOM promoted the production of dissolved protein-like substances, enhanced the redox activity of the methane-oxidizing consortium, and reduced ferrihydrite via direct electron transfer. Microbial community structure analysis showed significant enrichment of *Methanobacterium* (19.32%), iron-reducing bacteria such as *Geobacter* (6.14%) and *Desulfovibrio* (17.52%), as well as nitrogen-fixing bacteria like *Azoarcus* (1.69%) and *Azospirillum* (0.43%) during the Fe-AOM process. DNA-SIP analysis found that *Azoarcus* was significantly enriched in the heavy fraction of the labeled isotope group, confirming that it fixed isotope nitrogen. [Conclusion] It is thus hypothesized that the coupling of Fe-AOM with biological nitrogen fixation was primarily carried out by *Methanobacterium* which oxidized methane, *Geobacter* and *Desulfovibrio* responsible for the reduction of ferrihydrite, and *Azoarcus* catalyzing biological nitrogen fixation. Additionally, the positive correlations of the methane-oxidizing bacterium *Methylocystis* with iron-reducing bacteria and nitrogen-fixing bacteria suggested a certain contribution of *Methylocystis* to this process. These results provide new insights into understanding iron-dependent methane oxidation and nitrogen fixation in anaerobic environments.

**Keywords:** anaerobic methane oxidation; iron reduction; biological nitrogen fixation; high-throughput sequencing

甲烷是一种重要的温室气体，其温室效应是二氧化碳的 28–34 倍<sup>[1]</sup>。厌氧甲烷氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)作为厌氧

环境中去除甲烷的主要途径，对全球碳循环起着至关重要的作用。在海洋沉积物中，由厌氧甲烷营养古菌(anaerobic methanotrophic archaea,

ANME) 和硫酸盐还原细菌 (sulfate reducing bacteria, SRB) 联合催化的硫酸盐型厌氧甲烷氧化 (sulphate-dependent anaerobic methane oxidation, S-DAMO), 使得海洋沉积物产生的甲烷在进入大气之前削减了 90%<sup>[2-3]</sup>。除硫酸盐外, 越来越多的电子受体被证实能与 AOM 耦合, 包括硝酸盐<sup>[4]</sup>、铁氧化物<sup>[5-6]</sup>、腐殖酸等<sup>[7]</sup>。与硫酸盐相比, AOM 驱动的铁还原(Fe-AOM)是一个热力学更为有利的过程。因此, AOM 与铁还原的耦合越来越受到人们的关注<sup>[8]</sup>。作为深海沉积物中主要组分之一的氧化铁可能在 AOM 过程中发挥着重要的电子受体作用。Fe-AOM 主要发生在硫酸盐-甲烷交界带以下, 由甲烷氧化菌和铁还原菌共同介导<sup>[9]</sup>。Sivan 等<sup>[10]</sup>证实在海洋渗漏沉积物中, 硫酸盐还原、铁还原、AOM 和产甲烷过程共存, 并且铁还原作用促进了 S-DAMO。在一些硫酸盐贫乏的淡水和海洋沉积环境中, Fe-AOM 可能是重要的甲烷去除途径<sup>[6,11-15]</sup>。除了降低甲烷排放量外, Fe-AOM 产生的大量铁氧化物强烈影响沉积物的铁循环和相关的生物地球化学过程<sup>[16]</sup>。

生物固氮 (biological nitrogen fixation, BNF) 是微生物利用固氮酶将氮气(N<sub>2</sub>)还原为氨(NH<sub>3</sub>)的过程, 是生物可利用氮的重要来源。除了根瘤菌等传统的固氮微生物外, 甲烷氧化菌也是进行 BNF 的一大类群。在厌氧环境中, AOM 与 BNF 的耦合最早发现于 S-DAMO 过程。在该 S-DAMO 过程中, 甲烷厌氧氧化古菌(ANME-2)和硫酸盐还原菌(SRB)共同驱动海洋沉积物的 BNF, 即 S-DAMO 与 BNF 的耦合发生<sup>[17]</sup>。Dong 等<sup>[18]</sup>发现, 在冷泉中甲烷厌氧氧化、铁/锰还原等代谢过程均可提供 ATP 能量, 暗示着 BNF 并不总是与 S-DAMO 耦合。类似地, Liu 等<sup>[19]</sup>发现地下水中 BNF 与铁还原和甲烷氧化等过程紧密关联, 固氮菌可能利用甲烷氧化的中间产物作为底物、Fe(III)作为电子受体进行固氮反应。Yu 等<sup>[20]</sup>发现, 在缺氧条件下好氧甲烷氧化菌可以还原水铁矿, 并驱动 BNF 的发生。然而,

当前研究未能提供 Fe-AOM 耦合 BNF 的直接证据, 因此, Fe-AOM 能否驱动 BNF 仍不清楚。

目前 Fe-AOM 研究大多聚焦于氮充足条件下 AOM 介导的铁转化过程, 而缺氮条件下 Fe-AOM 的效率及机制仍缺乏研究。铁氧化物是水稻土、湖泊沉积物等环境中重要的电子受体, 基于铁氧化物的 Fe-AOM 为众多生物学过程提供能量, 但该能量是否足以驱动生物固氮过程、解除缺氮限制仍不清楚。土壤低丰度氮素通常是甲烷氧化的限制因素之一。氮素的缺乏可能会导致 AOM 过程产生的能量向固氮反应转移, 从而改变 AOM 菌的生长速率和 AOM 速率<sup>[21]</sup>。为此, 本研究探究了在缺氮条件下 AOM 富集培养物的 Fe-AOM 效率及 Fe-AOM 驱动 BNF 的可能性, 并初步揭示了 Fe-AOM 与 BNF 的耦合机制。本研究结果对于未来发展 Fe-AOM 环境生态技术(如土壤增氮保肥、作物增产等)具有参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 接种物和培养基

AOM 活性菌群采集于甲烷微生物燃料电池 (microbial fuel cell, MFC)<sup>[22]</sup>。将 AOM 活性菌群接种于单室 MFC (图 1A)中, 在氮气作为氮源条件下, 富集具有固氮功能的 AOM 菌。单室 MFC 的工作电极由 7 cm×7 cm 的碳布叠加 8 cm×8 cm 的透气布(gas diffusion cloth, GDC)包裹在铜管上组成。碳布/透气布复合电极中的透气布微孔用于分散和传输甲烷至电极外表面, 供 AOM 培养物利用。铜管的另一端通过橡胶管连接装有 50 mL 甲烷(纯度 99.99%)的注射器。单室 MFC 的对电极为 2 cm×3 cm×1.5 mm 石墨板, 参比电极为甘汞电极。电解质溶液(g/L): KHCO<sub>3</sub> 0.5, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.8, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 5.9, 酸性微量元素溶液(1 mL/L)和碱性微量元素溶液(1 mL/L)<sup>[23]</sup>, pH 值为 7.0±0.2。将单室 MFC 与多通道恒电位

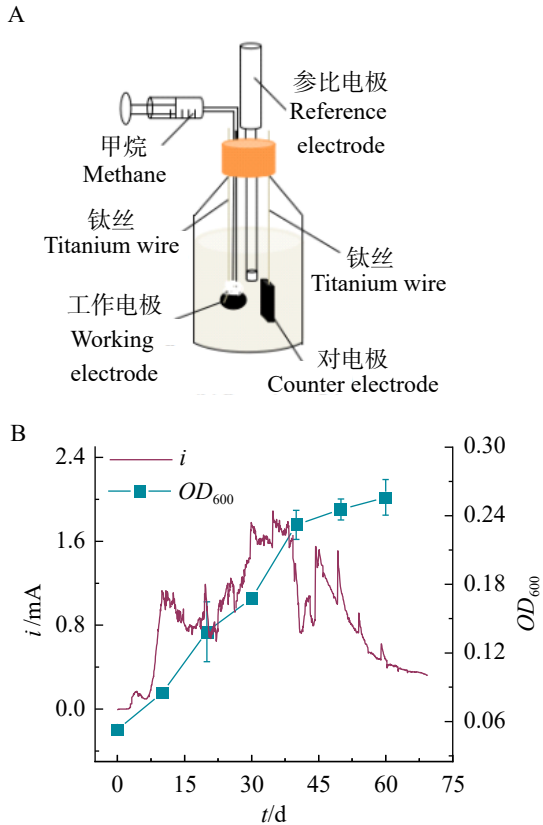


图1 微生物燃料电池中AOM培养物的富集生长。A: 富集AOM培养物的单室MFC装置示意图; B: AOM培养物在MFC中的生长曲线和产电效果。

Figure 1 The enrichment and growth of the AOM culture in a microbial fuel cell. A: Schematic diagram of a single-chamber MFC device used for enriching the AOM culture; B: The growth curve of AOM enrichment culture in MFC and its power generation.

仪(上海辰华仪器有限公司)和计算机连接后,将工作电极的电位固定在 0.3 V (vs. SHE),于 37 °C 水浴锅中富集甲烷氧化固氮菌。在富集的 70 d 期间, AOM 富集培养物生长良好,并展现出较高的产电活性(图 1B)。

## 1.2 甲烷氧化固氮试验

Fe-AOM 固氮试验在厌氧瓶内进行,每个厌氧瓶含有 60 mL 培养基(与电解质溶液相同)和 74 mL 顶空。使用高纯氮气对厌氧瓶中的培养基吹扫 45 min,以确保厌氧条件。采集 20 mL

AOM 培养物, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用厌氧培养基洗涤 3 次后,接入厌氧瓶内,然后用气密橡胶塞密封。试验设计了 4 个处理组,包括 AFC、AF、AC 和 SFC (表 1)。SFC 组中的 AOM 培养物需要经过高温高压灭活(121 °C、20 min)。所有处理组均置于 37 °C、150 r/min 的摇床中避光运行。在添加水铁矿的处理组中,水铁矿浓度为 10 mmol/L;在添加甲烷的处理组中,甲烷添加量为 10 mL,即在顶空抽真空后加入 10 mL CH<sub>4</sub>,并用 N<sub>2</sub> 平衡气压。每 40 d 将培养物 8 000 r/min 离心 10 min 去除上清液,沉淀转入新鲜的培养基,重新补充甲烷后继续运行。通过同位素氮标记来证实 AOM 培养物的固氮能力。同位素氮标记实验按照上述步骤进行,但将瓶子内的 N<sub>2</sub> 全部置换为 <sup>15</sup>N<sub>2</sub> (纯度 99.99%)。

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 理化分析

采用菲罗嗪法测定亚铁浓度,采用靛酚蓝法测定氨氮浓度,均使用 UV-2600 分光光度计完成<sup>[24-25]</sup>。通过气相色谱(岛津公司)进行测定甲烷和乙烯。利用 X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD) (岛津公司)分析铁矿结构。元素分析仪联用稳定同位素比值质谱(Elementar 公司)用于测定菌体同化的 <sup>15</sup>N 丰度,并计算各样的 <sup>15</sup>N 原子百分超,如公式(1)所示。

$$^{15}\text{N}\% \text{ excess} = \text{样品}^{15}\text{N} \text{ 原子百分数} - \text{背景}^{15}\text{N} \text{ 原子百分数} \quad (1)$$

采用三维荧光光谱(安捷伦科技有限公司)分析溶解性有机物的成分和含量,乙炔还原法

表1 实验设计

Table 1 Experimental design

Treatment group number	Experimental conditions
AFC	AOM culture+Ferrihydrite+CH <sub>4</sub>
AF	AOM culture+Ferrihydrite
AC	AOM culture+CH <sub>4</sub>
SFC	Inactivated AOM culture+Ferrihydrite+CH <sub>4</sub>

测量固氮生物体中的固氮酶活性<sup>[26]</sup>。具体步骤如下：将培养结束时厌氧瓶内的顶空气体全部置换成氮气，加入甲醇作为碳源(最终浓度为 50 mmol/L)，顶空乙炔的体积分数为 2%，200 r/min 振荡培养 10 h，固氮酶将乙炔还原为乙烯，通过测定顶空乙烯含量评价固氮酶活性。

### 1.3.2 电化学分析

利用循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)和差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)分析 AOM 培养物的电化学活性<sup>[22]</sup>。CV 和 DPV 分析在电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上进行，具体步骤如下：取 30 mL 菌悬液，经 N<sub>2</sub> (99.99%)吹扫 20 min 除氧后，以玻碳电极(有效直径 5 mm)为工作电极，铂片电极(0.5 cm×0.5 cm)为辅助电极，饱和甘汞电极为参比电极进行 CV 和 DPV 扫描；CV 扫描范围为-0.8-0.6 V (vs. SHE)，扫描速率为 0.005 V/s；DPV 扫描参数设置如下：初始电势为 0.6 V (vs. SHE)，最终电势为-0.8 V (vs. SHE)，电位步增量为 0.005 V，振幅为 0.05 V，脉冲宽度为 0.25 s，样品间隔为 0.02 s，脉冲周期为 0.5 s。上清液的 CV 和 DPV 扫描与菌悬液类似，但需先经 0.22 μm 滤头过滤处理后，再按上述方法测定。

### 1.3.3 稳定性同位素核酸探针

利用稳定性同位素核酸探针技术(DNA-based stable isotope probing, DNA-SIP)结合高通量测序，追踪同化吸收 <sup>15</sup>N<sub>2</sub> 的关键功能微生物。DNA-SIP 的具体步骤如下：在非标记同位素 AFC 组(AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub>)和标记同位素 AFC 组(AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)实验结束时，提取各组 DNA，将 5 μg DNA 与氯化铯溶液混合形成初始浮力密度为 1.714 g/mL 的离心溶液，并转移至 4.9 mL 的超高速离心试管中。利用贝克曼 VTi 90 转子在 20 °C、60 000 r/min 超高速密度梯度离心 66 h，进行 DNA 分层。使用注射泵(保定雷弗流体科技有限公司)获取 24 个等体积(200 μL)的不同浮力密度的 DNA-氯化铯溶液，并用数字折射仪(Reichert 公司)检测每个分层的折光度。用糖原和 2 倍体积的 PEG

沉淀 DNA，并用 70% 乙醇纯化，纯化的 DNA 溶解于 30 μL TE 缓冲液中。采用 qPCR 测定每层 DNA 溶液中 *nifH* 基因的丰度，qPCR 方法与 Yu 等<sup>[20]</sup>相同。最后高通量测序分析重层 DNA 和轻层 DNA 样品中的微生物组成。

### 1.3.4 微生物群落结构分析

为了分析微生物群落组成的变化，采用 Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals 公司)提取基因组 DNA。分别使用细菌和古菌通用 16S rRNA 基因引物 341b4F (5'-CTAYGGRRBG CWGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACNNGGGTA TCTAAT-3')，*nifH* 引物 PolF (5'-TGCGAYCCS AARGCBGACTC-3')和 PolR (5'-ATSGCCATCA TYTCRCCGGA-3')，分别扩增 16S rRNA 基因和 *nifH* 基因，16S rRNA 基因扩增产物在 Illumina MiSeq 平台(上海美吉生物医药科技有限公司)进行高通量测序。Illumina 测序得到的序列经序列质控和过滤、重叠拼接后用于微生物多样性分析。本研究测序获得的原始数据存储于 NCBI 的 SRA 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，生物项目编号为 PRJNA1081667，链接为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/1183654>。利用 R (v4.1.0) 程序包 psych 计算操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)之间的 Spearman 相关系数，相关系数矩阵(|R|>0.6 且 P<0.05)通过 Gephi 软件(v0.9.2)可视化微生物共存网络。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AOM 培养物介导的甲烷氧化和铁矿还原

为了探究 AOM 培养物是否具备 Fe-AOM 功能，监测了各处理组中 CH<sub>4</sub> 浓度的变化以及培养体系中 Fe(II)浓度变化。如图 2A 所示，经过 40 d 的培养后，AFC 组消耗了(0.59±0.04) mmol/L 的 CH<sub>4</sub>，而 AC 和 SFC 组的 CH<sub>4</sub> 浓度无明显变化。这表明在培养过程中，CH<sub>4</sub> 可以被 AOM 培养物所氧化利用。同时，AFC 组和 AF 组体系中的 Fe(II)

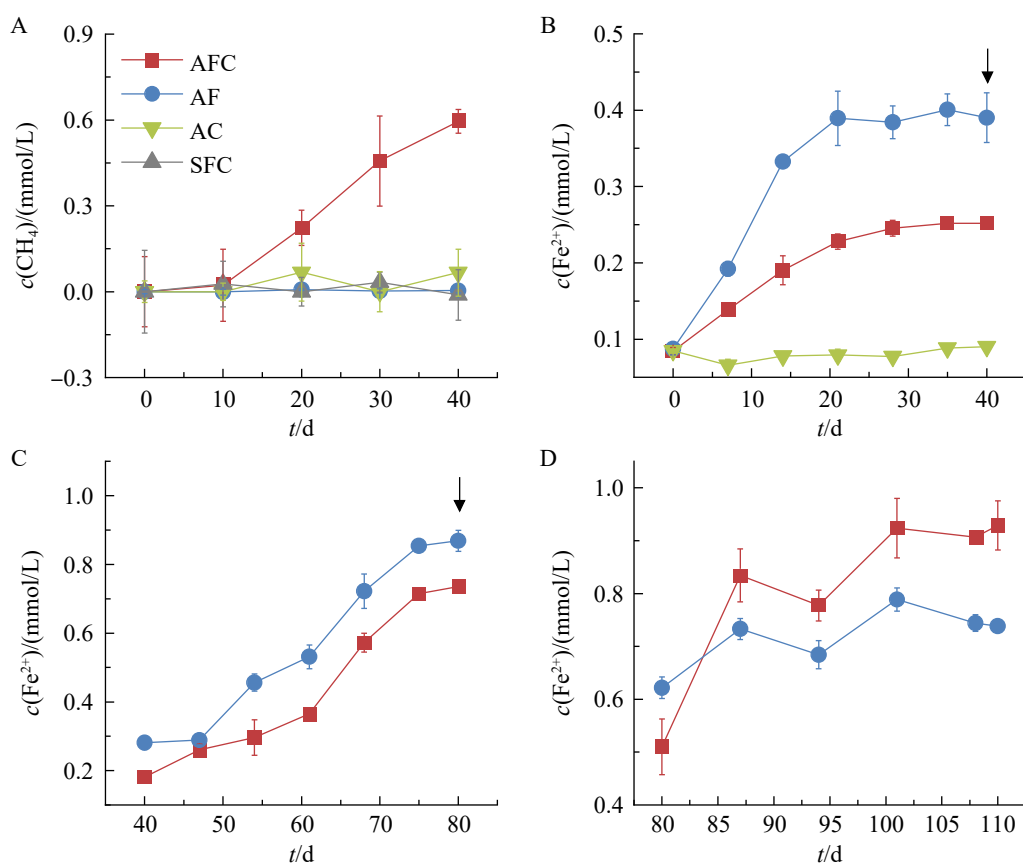


图2 甲烷厌氧氧化培养物的 $\text{CH}_4$ 消耗量(A)和3个连续周期的水铁矿还原效果(B-D)。箭头表示更换新鲜培养液, 导致 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度从新的起点开始积累。

Figure 2  $\text{CH}_4$  consumption by an anaerobic methane-oxidizing culture (A) and the ferrihydrite reduction (B-D) during three consecutive cycles. Arrows indicate the replacement of the culture medium with fresh medium, resulting in the accumulation of  $\text{Fe}(\text{II})$  concentration from a new starting point.

浓度在第40天时分别增加到 $(0.25 \pm 0.01)$  mmol/L和 $(0.39 \pm 0.03)$  mmol/L, 而无生物活性的SFC组 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度无明显变化(图2B)。这表明AOM培养物能够驱动水铁矿的还原。在无甲烷存在的情况下, AF组也表现出了一定的水铁矿还原能力, 可能是由于在单室MFC富集过程中产生的胞外聚合物或细胞内积累的有机物充当了电子供体(图2C、2D)。随着这些电子供体的逐渐耗尽, 甲烷作为电子供体驱动的铁还原过程逐渐占据主导地位(图2D)。因此, 在第110天时, AFC组的 $\text{Fe}(\text{II})$ 浓度 $[(0.93 \pm 0.05)$  mmol/L]明显超过了AF组 $[(0.74 \pm 0.01)$  mmol/L], 证明甲烷在AOM培养物

还原水铁矿的过程中充当了底物和电子来源, 即AOM培养物在缺氮条件下能够驱动 $\text{Fe}$ -AOM反应。然而, 甲烷的消耗量与亚铁的产生量之间的 $\text{CH}_4/\text{Fe}(\text{II})$ 化学计量比远高于理论值1:8。硫酸盐作为AOM过程中常见的电子受体<sup>[3]</sup>, 为了确定其是否增强了甲烷氧化从而导致 $\text{CH}_4/\text{Fe}(\text{II})$ 化学计量比偏高, 对硫酸盐的浓度进行了分析。结果显示, 4个处理组中的硫酸盐浓度均无明显变化(图3)。结合AC组中甲烷也未被消耗的情况, 可以判断硫酸盐在 $\text{Fe}$ -AOM过程中并未充当电子受体。因此, 较低的 $\text{CH}_4/\text{Fe}(\text{II})$ 化学计量比可能源于其他因素, 例如AOM菌群中可

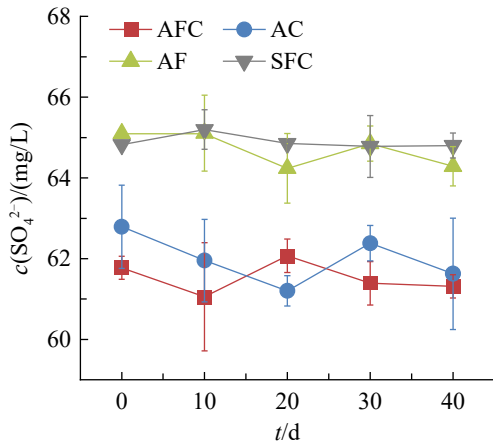


图3 硫酸盐浓度变化

Figure 3 The sulfate concentration change.

能存在一些铁循环菌，如亚铁氧化菌，这些微生物可能导致生成的 Fe(II) 被重新氧化，从而降低了 Fe(II) 的积累量<sup>[27-28]</sup>。

采用 XRD 技术鉴定了实验结束时(第 110 天)水铁矿的还原产物结构。如图 4 所示，AFC 组和 AF 组中的水铁矿还原产物主要为菱铁矿( $\text{FeCO}_3$ )。这与 He 等<sup>[29]</sup>报道的水铁矿还原产物一致。同时，还原产物中还包括少量的磁铁矿( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )和蓝铁矿 [ $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_8$ ]。菱铁矿可能是 Fe(II) 与甲烷氧化产生的碳酸根结合而形成<sup>[30]</sup>。相比之下，SFC 组的样品 XRD 图谱与初始的水铁矿基本一致，表明 SFC 组中的水铁矿并未被还原。这些结果充分证明 AOM 培养物具备还原转化水铁矿的功能。

## 2.2 Fe-AOM 过程的固氮效果

第 40 天实验结束后，利用乙炔还原法检测了各处理组的乙烯和氨氮产量，以探讨 AOM 培养物在 Fe-AOM 过程中的固氮潜力。如图 5A 所示，AFC 组的乙烯浓度达到了  $(1.34 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$ ，而 AF 组仅有  $(0.08 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$ ，SFC 组未检测到乙烯的生成，表明 Fe-AOM 过程增强了 AOM 培养物的固氮酶活性。AFC 组、AF 组和 SFC 组的氨氮浓度分别为  $(0.58 \pm 0.05)$ 、 $(0.41 \pm 0.02)$  和  $(0.10 \pm 0.04) \text{ mg/L}$ ，进一步证明了甲烷的添加促

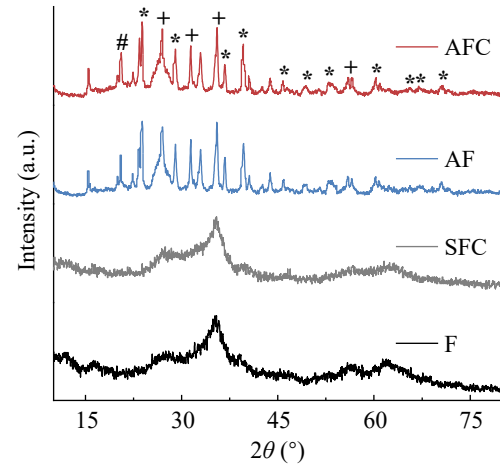


图4 水铁矿还原产物的XRD图谱。\*: 菱铁矿；+: 磁铁矿；#: 蓝铁矿。

Figure 4 The XRD spectra of the products from ferrihydrite reduction. \*: Siderite; +: Magnetite; #: Vivianite.

进了氨氮的生产。这表明 AOM 培养物的 Fe-AOM 过程可能驱动了生物固氮。尽管 AF 组也检测到较高的氨氮浓度，但其固氮酶活性较低。因此 AF 组的氨氮可能主要来源于含氮有机物(如蛋白质和核酸)的分解，而非生物固氮过程<sup>[31]</sup>。

为了进一步验证 AOM 培养物在 Fe-AOM 过程中发挥的生物固氮功能，将样品顶空的普通  $\text{N}_2$  置换为同位素  $^{15}\text{N}_2$ ，进行同位素氮标记实验。如图 5B 所示，在培养了 40 d 后，AFC+ $^{15}\text{N}_2$  组 AOM 培养物菌体同化的  $^{15}\text{N}$  丰度  $[(0.68 \pm 0.09)\%]$  显著高于自然环境  $^{15}\text{N}$  同位素背景值 (0.37%) ( $P < 0.05$ )，其  $^{15}\text{N}$  百分超达  $(0.32 \pm 0.09)\%$ 。AFC+ $^{14}\text{N}_2$  组菌体同化的  $^{15}\text{N}$  丰度与自然环境  $^{15}\text{N}$  同位素背景值接近<sup>[32]</sup>，因此排除了氮同位素分馏效应。相比之下，AF+ $^{15}\text{N}_2$  组菌体同化的  $^{15}\text{N}$  丰度仅比背景值高  $(0.07 \pm 0.02)\%$ ，与背景值无显著差异 ( $P > 0.05$ )，表明 AF 组的氨氮中只有少量来源于生物固氮。AFC 组 AOM 培养物菌体同化的  $^{15}\text{N}$  丰度显著高于 AF 组，证明 AOM 培养物在 Fe-AOM 过程中确实进行了生物固氮。

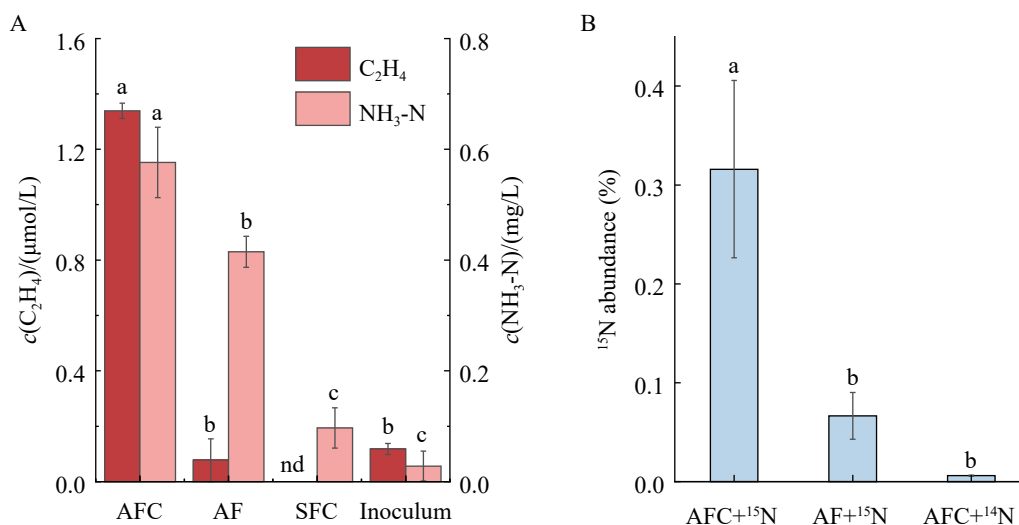


图5 AOM培养物的固氮酶活性, 氨氮产量(A)和 $^{15}N$ 同化量(B)

Figure 5 The nitrogenase activity and ammonium production (A) of the AOM culture as well as its  $^{15}N$  assimilation (B). Different lowercase letters indicate significant differences among treatment at  $P < 0.05$ ; nd indicate that the data was not detected.

### 2.3 AOM 铁还原途径和甲烷代谢产物

AOM 培养物的水铁矿还原速率与其氧化还原活性紧密相关。借助循环伏安法和微分脉冲伏安法测定了 AOM 培养物的氧化还原活性, 并解析了 AOM 微生物的铁还原途径。结果如图 6A 所示, 第 40 天时 AFC 组在 100 mV 和 -80 mV 处观察到一对氧化还原峰( $E_{1/2}=10$  mV), 以及在 -330 mV 和 370 mV 处的氧化峰(图 6A)。第 80 天时, AFC 组在 130 mV 和 -50 mV 处观察到一对氧化还原峰( $E_{1/2}=40$  mV)。中点电位 (10 mV 和 40 mV) 与细胞色素 c (cytochrome c, cyt c) 的中点电位相近 (-204 mV vs. SCE)<sup>[33]</sup>, 并与 *Geobacter soli* 中检测到的氧化还原蛋白接近 (-200 mV vs. Ag/AgCl)<sup>[34]</sup>, 该氧化还原蛋白可能有助于提升胞外电子传递能力。位于 -330 mV 处的氧化峰与  $NAD^+/NADH$  的电位接近 (-320 mV vs. SHE), 因此推测电子的传递方向为  $NADH \rightarrow \text{cyt } c \rightarrow \text{水铁矿}$ 。AF 组培养物分别在 180 mV 和 -60 mV ( $E_{1/2}=60$  mV) 处检测到氧化峰和还原峰, 与 AFC 组在 100 mV 和 -80 mV 处的峰相近, 说明可能是同种电化学活性物质, 但由于缺乏甲

烷, 其活性较低。SFC 组仅在 260 mV 处有一个氧化峰, 说明高温灭菌处理破坏了菌体或氧化还原物质(如细胞色素等)的结构, 导致该组的氧化还原活性受损。通过比较氧化还原峰电流的高度, 发现添加甲烷的 AFC 组氧化还原活性明显高于无甲烷的 AF 组, 证明甲烷有效增强了 AOM 培养物的氧化还原活性。第 80 天时, AFC 组的氧化还原峰位置变为 130 mV 和 -60 mV, 相对于第 40 天有所减弱。这可能是因为随着水铁矿的还原, 新的铁矿产物不断吸附或包裹至菌体表面, 从而阻碍了胞外电子的传递<sup>[35]</sup>。与菌悬液相比, 上清过滤液的 CV 扫描未检测到明显的氧化还原峰(图 6B), 表明氧化还原活性物质主要分布于菌体或固体沉淀中。这证明 AOM 培养物并未分泌可溶性电子穿梭体, 而是主要通过菌体-水铁矿的直接接触方式将电子转移给水铁矿。DPV 测试也显示第 40 天和第 80 天时, AFC 组的峰值电流均高于 AF 组(图 6C), 再次证明了甲烷的存在有利于维持 AOM 培养物的氧化还原活性。在活性 AOM 培养物存在的条件下, AFC 组[(-77±5) mV]、AF 组[(-81±11) mV]

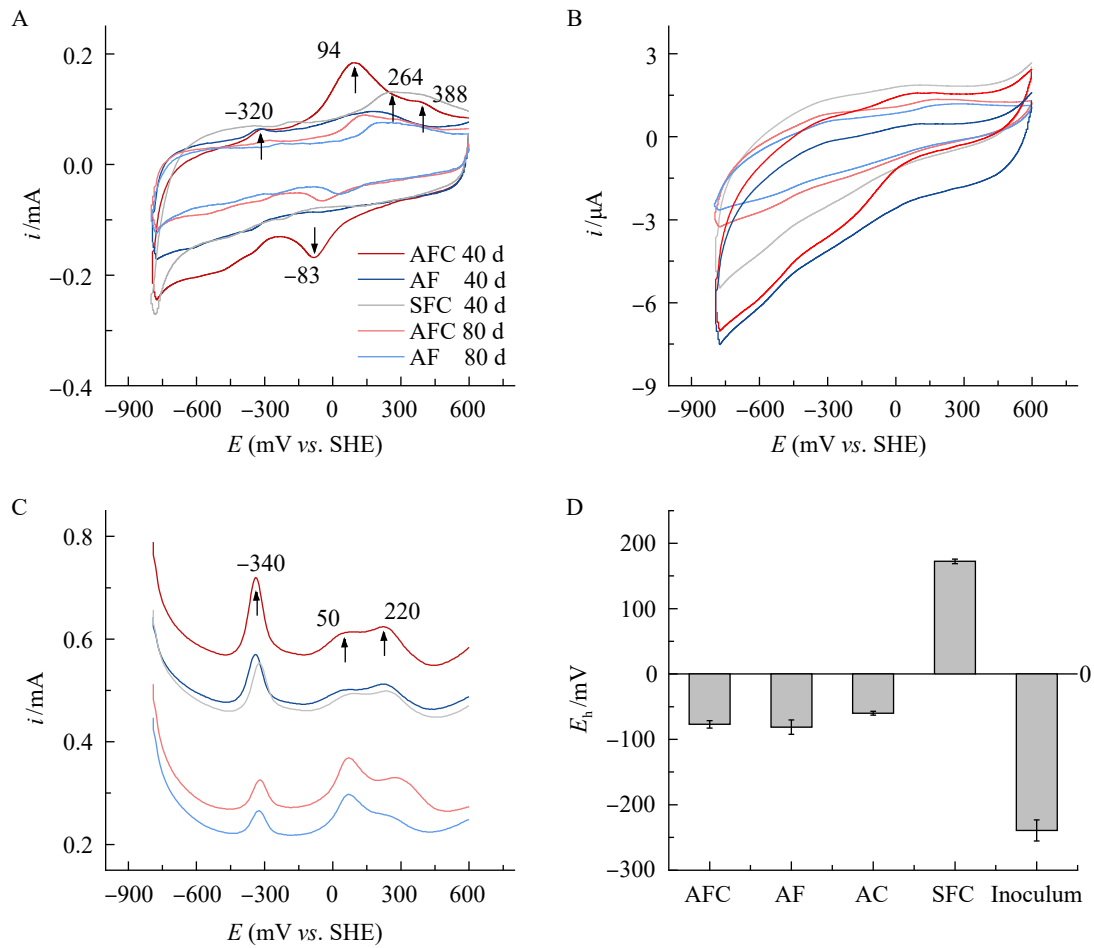


图6 Fe-AOM过程中培养物/上清液的氧化还原活性。A: 菌悬液CV; B: 上清滤液CV; C: 菌悬液DPV; D: 培养物 $E_h$ 。

Figure 6 Redox activity of the AOM culture/supernatant during Fe-AOM. A: CVs for the bacterial suspensions; B: The filtrated supernatants; C: DPVs of the bacterial suspensions; D: The  $E_h$  value of the AOM culture.

和AC组 $(-60 \pm 3)$  mV]的氧化还原电位( $E_h$ )均呈负值,但组间差异不显著(图6D)。相反,无细胞活性的SFC的 $E_h$ 为 $(172 \pm 3)$  mV,与含有水铁矿的初始培养基 $E_h$  [ $(184 \pm 7)$  mV]相近,表明活性AOM培养物降低了体系的氧化还原电位。这些较低的氧化还原电位为AOM菌的水铁矿还原提供了必要条件。

溶解性有机物三维荧光光谱的荧光信号通常可分为5个区域(I、II、III、IV、V),分别与酪氨酸蛋白类物质、色氨酸蛋白类物质、富里酸类物质、溶解性微生物代谢产物类物质和

腐殖酸类物质相关<sup>[36]</sup>。为了探究AOM培养物在Fe-AOM过程中生成的可溶性有机物类型和互营作用,采用三维荧光光谱分析第110天时体系上清液中的有机物。结果显示,AFC组和AF组的上清液中均鉴定出蛋白质类物质、富里酸和溶解性微生物代谢产物(图7),并且AFC组中这些物质的含量均高于AF组。AFC组样品中蛋白类物质和微生物代谢产物的含量明显高于AF组,这是因为AFC组发生了甲烷厌氧氧化,相较于AF组有了更多的能量来源,从而分泌了更多的蛋白和代谢中间产物。这与He等<sup>[37]</sup>发现

甲烷氧化菌在甲烷氧化过程向生境中分泌胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)相似。AOM 微生物群落中的古菌经常与其他成员共享代谢物<sup>[38]</sup>, 例如 SRB 通过消耗 ANME 产生的乙酸进行硫酸盐还原<sup>[39]</sup>。这些有机物的存在暗示 Fe-AOM 培养物成员之间发生了互营作用, 即铁还原菌/固氮菌利用厌氧甲烷氧化古菌氧化甲烷过程中分泌的代谢中间产物作为电子供体进行铁还原/生物固氮。同时厌氧甲烷氧化古菌与铁还原菌竞争利用代谢中间产物或其他溶解性有机物, 这可能是甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)与有相互作用的属均呈负相关关系的原因(图 8B)。

## 2.4 Fe-AOM 耦合生物固氮机制分析

为了探究 Fe-AOM 耦合生物固氮的微生物作用机制, 测定了 AFC 组和 AF 组在第 110 天时的微生物群落结构。如图 8A 所示, 接种物的微生物群落主要由 *Methanobacterium* (33.98%)、食氢产水菌属 (*Hydrogenophaga*, 18.24%)、假拟杆菌属(*Pseudobacteroides*, 18.32%)、地杆菌属(*Geobacter*, 1.39%)等组成。在 AFC 组中, 脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、慢长杆菌属 (*Ignavibacterium*)、*Geobacter* 和脱硫弓菌属(*Desulfarculus*)等表现出

明显的富集现象。与 AF 组相比, AFC 组中的 *Methanobacterium* (19.32%) 和 *Pseudomonas* (19.70%)等微生物的丰度更高, 暗示它们可能与 Fe-AOM 耦合生物固氮过程密切相关。研究表明, *Methanobacterium* 在 Fe-AOM 过程中可以进行甲烷氧化<sup>[40]</sup>。AFC 组中 *Methanobacterium* 的丰度显著高于 AF 组, 因此推测 AFC 组中的甲烷氧化主要由 *Methanobacterium* 完成。作为重要的电活性微生物, *Geobacter* 和 *Desulfovibrio* 具备胞外电子转移能力, 并被广泛认为是铁还原菌<sup>[41]</sup>。与接种物相比, *Geobacter* (6.14%)和 *Desulfovibrio* (17.52%)在 AFC 组中的显著富集表明它们可能参与了铁还原过程。AFC 组中的甲基孢囊菌属(*Methylocystis*, 0.25%)具备甲烷氧化和铁还原功能<sup>[20]</sup>, 它可能对 Fe-AOM 过程具有一定贡献。*Pseudomonas* 在 AFC 组和 AF 组中的丰度均较高, 该属包含了一些亚铁氧化菌, 可能催化了 Fe(II)产物的氧化<sup>[42]</sup>。*Ignavibacterium* 作为清道夫, 能够以死亡的生物体或碳氢化合物降解的代谢物为食<sup>[43]</sup>。*Ignavibacterium* 在 AF 组的丰度明显高于 AFC 组(图 8A), 表明 AF 组中的电子供体可能主要来源于死亡的生物质或碳氢化合物降解的代谢物。这可能是 AF 组铁还原的原因。此外, AFC 组富集到了固氮弯曲菌属

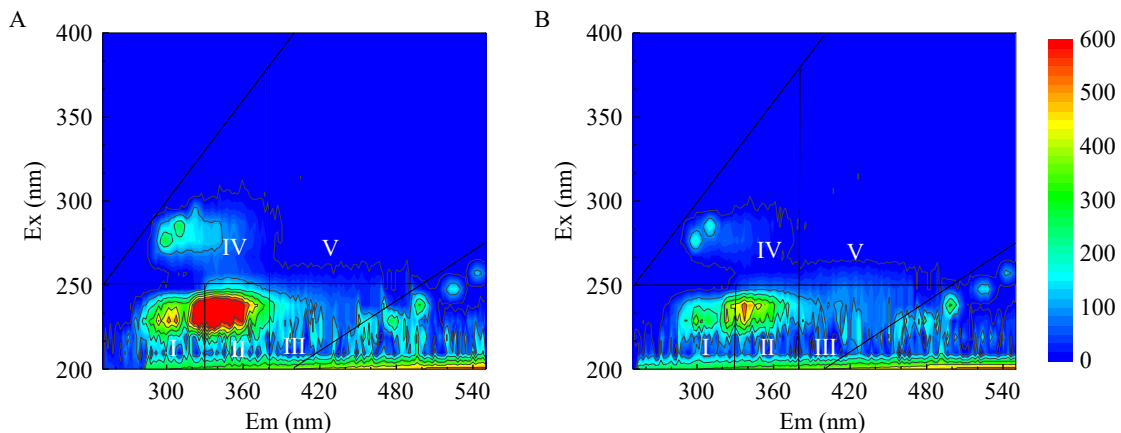


图7 第110天AFC组(A)和AF组(B)上清液可溶性有机物含量

Figure 7 The contents of soluble organic matter in the supernatants from the AFC (A) and AF (B) treatment groups on day 110.

(*Azoarcus*, 1.69%)和固氮螺菌属(*Azospirillum*, 0.43%)。作为典型的固氮菌, *Azoarcus* 能够在植物根部<sup>[44]</sup>、地下水<sup>[19]</sup>中发挥固氮功能。因此, 推测 *Azoarcus* 可能在 Fe-AOM 体系中参与了固氮过程。

图 8B 展示了 AOM 培养物的共现网络。在 AOM 培养物中, *Methanobacterium* 与其他属之间的相互作用均呈负相关(图 8B), 表明 *Methanobacterium* 与这些共存细菌之间存在资源竞争(如氮源、代谢中间产物)。然而, *Methanobacterium* 与 *Geobacter* 之间并未表现出直接关联, 它们之间的相互作用机制仍有待进一步研究。甲烷氧化细菌 *Methylocystis* 与铁还原菌[如 *Geobacter*、地生孢杆菌(*Geosporobacter*)]<sup>[45]</sup> 之间的正相关关系表明它们之间可能存在代谢协作, 有利于甲烷氧化与铁还原的耦合。此外, *Methylocystis* 还与众多微生物存在协同作用, 包

括铁还原菌(如 *Geobacter*)和固氮菌[如固氮螺菌属(*Azospirillum*)], 这种关系可能有利于 Fe-AOM 和固氮过程。

为了明确固氮功能微生物的种类, 将 DNA-SIP 实验中 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub> 和 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub> 处理组的轻层和重层进行 16S rRNA 基因的 Illumina 测序。DNA-SIP 结果如图 9A 所示。在 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub> 和 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub> 处理组中, *nifH* 基因的相对丰度在轻层(1.703 g/mL)达到最大值。然而, 在重层(1.711 g/mL)中 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub> 组的 *nifH* 基因相对丰度(89.72%)显著高于 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub> 组(50.15%), 说明 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub> 组的重层 *nifH* 基因被同位素成功标记。Illumina 测序的结果进一步揭示了微生物群落的组成(图 9B)。在 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub> 的重层中, *Methanobacterium* 的相对丰度为 17.98%, 与其在 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub> 重层中的相对丰度 17.07% 相近, 表明 *Methanobacterium* 可能并未参与生物固氮过程, 而主要起甲烷氧化的

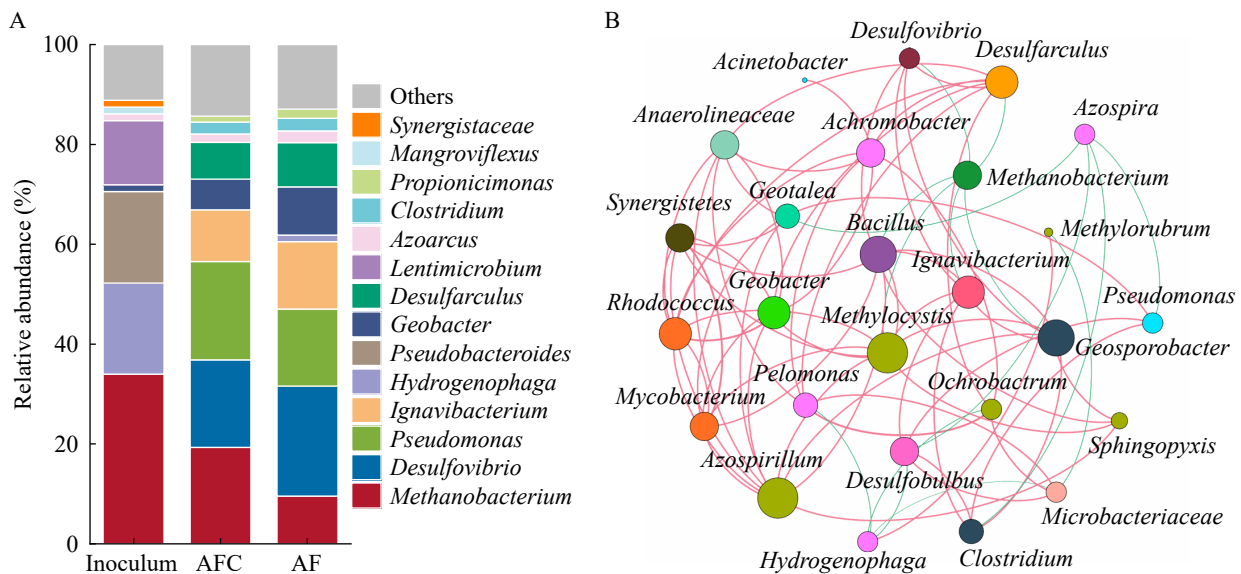


图8 基于16S rRNA基因测序的属水平微生物群落结构(A)和共现网络(B)。红色连线表示正相关, 绿色连线表示负相关; 相同颜色的节点表示属于同一纲, 节点大小与连接线的数量成正比, 即节点越大, 表示它与其他微生物的相互作用越多。

Figure 8 Microbial community structure (A) and co-occurrence network (B) at the genus level based on 16S rRNA gene sequencing. Red lines indicate a positive correlation, green lines indicate a negative correlation; Nodes with the same color represent the same class; The size of the node is proportional to the number of connecting lines, that is, the larger the node, the more interactions it has with other microorganisms.

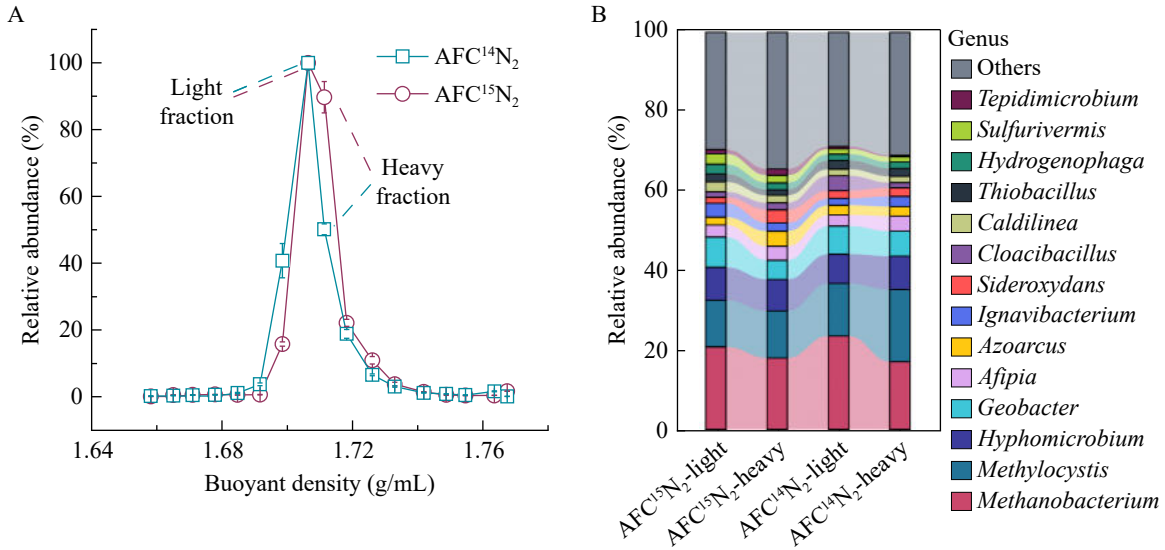


图9 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub>和AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub>处理中*nifH*基因相对丰度随浮力密度的变化(A)和基于16S rRNA基因测序的重层和轻层DNA样品在属水平上的微生物群落组成(B)

Figure 9 Changes in the relative abundance of *nifH* gene with buoyancy density in AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub> and AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub> treatments (A) and microbial community composition of heavy and light fraction DNA samples based on 16S rRNA gene sequencing (B).

作用。在重层中，AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub>组的 *Methylocystis* 相对丰度(11.84%)明显低于 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub>组(18.14%)，未在 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub>重层中得到富集，表明 *Methylocystis* 可能仅具备甲烷氧化的功能。尽管 *Geobacter* 被认为能够在铁氧化物的呼吸过程中进行固氮<sup>[46]</sup>，但在本研究的重层中，AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub>组的 *Geobacter* 相对丰度(4.79%)低于 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub>组(6.28%)，表明 *Geobacter* 在实验中可能只发挥了铁还原功能，而并未进行固氮。*Azoarcus* 在 AFC<sup>15</sup>N<sub>2</sub>重层中的相对丰度为 3.79%，且显著高于 AFC<sup>14</sup>N<sub>2</sub>重层的 2.39%，表明 *Azoarcus* 在反应过程中同化了 <sup>15</sup>N<sub>2</sub>，从而进行了生物固氮。

### 3 结论

(1) AOM 培养物利用甲烷作为底物驱动了水铁矿还原与生物固氮的同步进行。水铁矿还原的产物包括菱铁矿、磁铁矿等。Fe-AOM 过程显著提升了 AOM 培养物的固氮酶活性和 <sup>15</sup>N 同化量，证明 Fe-AOM 可以为生物固氮提供能量，

即 Fe-AOM 与生物固氮之间存在耦合关系。

(2) 在甲烷和水铁矿共存条件下，AOM 培养物产生了较多的水溶性蛋白类似物和微生物代谢产物，这可能有利于加强微生物之间的互营代谢；AOM 培养物并未利用电子穿梭体，而是通过直接电子传递的方式进行水铁矿还原。Fe-AOM 过程有效提升了 AOM 培养物的氧化还原活性。

(3) AOM 培养物中以甲烷氧化古菌 *Methanobacterium*、铁还原菌 *Geobacter* 和 *Desulfovibrio* 为优势菌。耦合机理分析表明，*Methanobacterium*、*Geobacter* 和 *Desulfovibrio* 可能协同催化了 Fe-AOM 过程，其中后两者可能参与了水铁矿还原；而 *Azoarcus* 则利用 Fe-AOM 的代谢中间产物进行生物固氮。

### 作者贡献声明

李书安：实验操作、数据处理与分析、文稿写作及编辑；余林鹏：实验方案设计、监督

指导、文稿审查及编辑；杨琳：实验操作、数据处理与分析；沈彦汐：数据处理与分析；周顺桂：实验方案设计、文稿审查。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] CAI YF, ZHENG Y, BODELIER PLE, CONRAD R, JIA ZJ. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11728.
- [2] CHENG C, ZHANG J, HE Q, WU HM, CHEN Y, XIE HJ, PAVLOSTATHIS SG. Exploring simultaneous nitrous oxide and methane sink in wetland sediments under anoxic conditions[J]. *Water Research*, 2021, 194: 116958.
- [3] REEBURGH WS. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments[J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 1976, 28(3): 337-344.
- [4] RAGHOEBARSING AA, POL A, van de PAS-SCHOONEN KT, SMOLDERS AJP, ETTWIG KF, RIJPSTRA WI, SCHOUTEN S, DAMSTÉ JS, OP DEN CAMP HJ, JETTEN MSM, STROUS M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 918-921.
- [5] ETTWIG KF, BUTLER MK, le PASLIER D, PELLETIER E, MANGENOT S, KUYPERS MMM, SCHREIBER F, DUTILH BE, ZEDELIOUS J, de BEER D, GLOERICH J, WESSELS HJCT, van ALLEN T, LUESKEN F, WU ML, van de PAS-SCHOONEN KT, OP DEN CAMP HJM, JANSSEN-MEGENS EM, FRANCOIJS KJ, STUNNENBERG H, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [6] SEGARRA KEA, COMERFORD C, SLAUGHTER J, JOYE SB. Impact of electron acceptor availability on the anaerobic oxidation of methane in coastal freshwater and brackish wetland sediments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2013, 115: 15-30.
- [7] SCHELLER S, YU H, CHADWICK GL, MCGLYNN SE, ORPHAN VJ. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction[J]. *Science*, 2016, 351(6274): 703-707.
- [8] CAI C, LEU AO, XIE GJ, GUO JH, FENG YX, ZHAO JX, TYSON GW, YUAN ZG, HU SH. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe (III) reduction[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(8): 1929-1939.
- [9] YANG HL, YU S, LU HL. Iron-coupled anaerobic oxidation of methane in marine sediments: a review[J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2021, 9(8): 875.
- [10] SIVAN O, ANTLER G, TURCHYN AV, MARLOW JJ, ORPHAN VJ. Iron oxides stimulate sulfate-driven anaerobic methane oxidation in seeps[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(40): E4139-E4147.
- [11] WERSIN P, HÖHENER P, GIOVANOLI R, STUMM W. Early diagenetic influences on iron transformations in a freshwater lake sediment[J]. *Chemical Geology*, 1991, 90(3/4): 233-252.
- [12] CROWE SA, KATSEV S, LESLIE K, STURM A, MAGEN C, NOMOSATRYO S, PACK MA, KESSLER JD, REEBURGH WS, ROBERTS JA, GONZÁLEZ L, DOUGLAS HAFFNER G, MUCCI A, SUNDBY B, FOWLE DA. The methane cycle in ferruginous Lake Matano[J]. *Geobiology*, 2011, 9(1): 61-78.
- [13] SIVAN O, ADLER M, PEARSON A, GELMAN F, BAR-OR I, JOHN SG, ECKERT W. Geochemical evidence for iron-mediated anaerobic oxidation of methane[J]. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(4): 1536-1544.
- [14] NORDI KÀ, THAMDRUP B, SCHUBERT CJ. Anaerobic oxidation of methane in an iron-rich Danish freshwater lake sediment[J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58(2): 546-554.
- [15] SLOMP CP, MORT HP, JILBERT T, REED DC, GUSTAFSSON BG, WOLTERS M. Coupled dynamics of iron and phosphorus in sediments of an oligotrophic coastal basin and the impact of anaerobic oxidation of methane[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62386.
- [16] EGGER M, RASIGRAF O, SAPART CJ, JILBERT T, JETTEN MSM, RÖCKMANN T, van der VEEN C, BÂNDĂ N, KARTAL B, ETTWIG KF, SLOMP CP. Iron-mediated anaerobic oxidation of methane in brackish coastal sediments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(1): 277-283.
- [17] DEKAS AE, PORETSKY RS, ORPHAN VJ. Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia[J]. *Science*, 2009, 326(5951): 422-426.
- [18] DONG XY, ZHANG CW, PENG YY, ZHANG HX, SHI LD, WEI GS, HUBERT CRJ, WANG Y, GREENING C. Phylogenetically and catabolically diverse diazotrophs reside in deep-sea cold seep sediments[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4885.
- [19] LIU XH, LI P, WANG HL, HAN LL, YANG K, WANG YH, JIANG Z, CUI L, KAO SJ. Nitrogen fixation and diazotroph diversity in groundwater systems[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17(11): 2023-2034.
- [20] YU LP, JIA R, LIU SQ, LI S, ZHONG SN, LIU GH, ZENG RJ, RENSING C, ZHOU SG. Ferrihydrite-mediated methanotrophic nitrogen fixation in paddy soil under hypoxia[J]. *ISME Communications*, 2024, 4(1): ycae030.
- [21] BODELIER PLE, LAANBROEK HJ. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(3): 265-277.
- [22] YU LP, YANG ZJ, HE QX, ZENG RJ, BAI YN, ZHOU SG. Novel gas diffusion cloth bioanodes for high-performance methane-powered microbial fuel cells[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(1): 530-538.
- [23] ETTWIG KF, van ALLEN T, van de PAS-SCHOONEN

- KT, JETTEN MSM, STROUS M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662.
- [24] SOO VWC, MCANULTY MJ, TRIPATHI A, ZHU FY, ZHANG LM, HATZAKIS E, SMITH PB, AGRAWAL S, NAZEM-BOKAEE H, GOPALAKRISHNAN S, SALIS HM, FERRY JG, MARANAS CD, PATTERSON AD, WOOD TK. Reversing methanogenesis to capture methane for liquid biofuel precursors[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 11.
- [25] ZHOU SG, XU JL, YANG GQ, ZHUANG L. Methanogenesis affected by the co-occurrence of iron(III) oxides and humic substances[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(1): 107-120.
- [26] MONTES-LUZ B, CONRADO AC, ELLINGSEN JK, MONTEIRO RA, de SOUZA EM, STACEY G. Acetylene reduction assay: a measure of nitrogenase activity in plants and bacteria[J]. *Current Protocols*, 2023, 3(5): e766.
- [27] SU JF, SHAO SC, HUANG TL, MA F, YANG SF, ZHOU ZM, ZHENG SC. Anaerobic nitrate-dependent iron(II) oxidation by a novel autotrophic bacterium, *Pseudomonas* sp. SZF15[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2015, 3(3): 2187-2193.
- [28] HUSTON WM, JENNINGS MP, MCEWAN AG. The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(6): 1741-1750.
- [29] HE QX, YU LP, LI JB, HE D, CAI XX, ZHOU SG. Electron shuttles enhance anaerobic oxidation of methane coupled to iron(III) reduction[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 664-672.
- [30] FU L, LI SW, DING ZW, DING J, LU YZ, ZENG RJ. Iron reduction in the DAMO/*Shewanella oneidensis* MR-1 coculture system and the fate of Fe(II) [J]. *Water Research*, 2016, 88: 808-815.
- [31] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ C, GARCÍA-ENCINA PA. Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33(8): 1065-1069.
- [32] SHINODA R, BAO ZH, MINAMISAWA K. CH<sub>4</sub> oxidation-dependent <sup>15</sup>N<sub>2</sub> fixation in rice roots in a low-nitrogen paddy field and in *Methylosinus* sp. strain 3S-1 isolated from the roots[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 132: 40-46.
- [33] JIA YT, QIAN DS, CHEN YC, HU YY. Intra/extracellular electron transfer for aerobic denitrification mediated by *in situ* biosynthesis palladium nanoparticles [J]. *Water Research*, 2021, 189: 116612.
- [34] CAI XX, HUANG LY, YANG GQ, YU Z, WEN JL, ZHOU SG. Transcriptomic, proteomic, and bioelectrochemical characterization of an exoelectrogen *Geobacter soli* grown with different electron acceptors [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1075.
- [35] KIKUCHI S, MAKITA H, KONNO U, SHIRAISHI F, IJIRI A, TAKAI K, MAEDA M, TAKAHASHI Y. Limited reduction of ferrihydrite encrusted by goethite in freshwater sediment[J]. *Geobiology*, 2016, 14(4): 374-389.
- [36] 陈诗雨, 李燕, 李爱民. 溶解性有机物研究中三维荧光光谱分析的应用[J]. *环境科学与技术*, 2015, 38(5): 64-68, 73.
- CHEN SY, LI Y, LI AM. Application of three-dimensional fluorescence spectroscopy in the study of dissolved organic matter[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 38(5): 64-68, 73 (in Chinese).
- [37] HE R, MA RC, YAO XZ, WEI XM. Response of methanotrophic activity to extracellular polymeric substance production and its influencing factors[J]. *Waste Management*, 2017, 69: 289-297.
- [38] SCARINCI G, SOURJIK V. Impact of direct physical association and motility on fitness of a synthetic interkingdom microbial community[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17(3): 371-381.
- [39] 丁阿强, 李朝洋, 李薇薇, 卢培利. 厌氧甲烷氧化微生物物质代谢与能量代谢研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(5): 1669-1687.
- DING AQ, LI CY, LI WW, LU PL. Advances in catabolism and energy metabolism of anaerobic methane-oxidizing microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1669-1687 (in Chinese).
- [40] XIAO Y, ZHANG EH, ZHANG JD, DAI YF, YANG ZH, CHRISTENSEN HEM, ULSTRUP J, ZHAO F. Extracellular polymeric substances are transient media for microbial extracellular electron transfer[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700623.
- [41] HE ZF, XU YT, ZHU YH, FENG JN, ZHANG DY, PAN XL. Long-term effects of soluble and insoluble ferric irons on anaerobic oxidation of methane in paddy soil[J]. *Chemosphere*, 2023, 317: 137901.
- [42] LI S, LI XM, LI FB. Fe(II) oxidation and nitrate reduction by a denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* LS-2, isolated from paddy soil[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(4): 1668-1678.
- [43] CAO Q, LI XZ, XIE ZJ, LI CN, HUANG SY, ZHU BJ, LI D, LIU XF. Compartmentation of microbial communities in structure and function for methane oxidation coupled to nitrification-denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125761.
- [44] REINHOLD-HUREK B, HUREK T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1998, 17(1): 29-54.
- [45] JUNG MY, KIM SJ, KIM JG, HONG H, GWAK JH, PARK SJ, KIM YH, RHEE SK. Comparative genomic analysis of *Geosporobacter ferrireducens* and its versatility of anaerobic energy metabolism[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(5): 365-371.
- [46] JING XY, LIU X, ZHANG ZS, WANG X, RENSING C, ZHOU SG. Anode respiration-dependent biological nitrogen fixation by *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Water Research*, 2022, 208: 117860.