

地球炭素循環に寄与する結晶性酸化鉄還元微生物の選択的分離培養

Targeted Isolation of Crystalline Iron(III) Oxides Reducing Bacteria Responsible for Global Carbon Cycle

堀 知行*
TOMOYUKI HORI*

産業技術総合研究所環境管理研究部門 〒305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1

* TEL: 029-849-1107

* E-mail: hori-tomo@aist.go.jp

Environmental Management Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),
16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

キーワード：結晶性酸化鉄，鉄還元微生物，分離培養，地球炭素循環

Key words: Crystalline iron(III) oxides, Iron(III)-reducing bacteria, Isolation and cultivation, Global carbon cycle

(原稿受付 2019年3月10日/原稿受理 2019年4月23日)

1. はじめに

鉄は、地球上第四位の構成元素であり、その多くは結晶性鉄鉱物として土壌および堆積物に広く分布している¹⁻³⁾。鉱物などの配位化合物を形成する際、鉄は二価または三価の陽イオンの形態をとっており、両者の安定性の差は小さい。このことは、鉄原子が電子を他から受け取りやすく、かつ他へ渡しやすいという性質を生み出している。生物学的および非生物学的な作用により生じる鉄の酸化還元サイクリングは、地球規模の生物地球化学(有機物の分解・貯蔵、生物に対する栄養源や汚染物質の動態等)において極めて重要な役割を担っている⁴⁻⁶⁾。この中でも微生物による鉄還元は、自然環境の大部分を占める嫌気条件下において、有機物酸化で発生する電子の主要シンクとして捉えられる⁷⁻¹⁰⁾。それ故、鉄還元は地球上最大の最終電子受容プロセス「メタン生成反応」の競合反応として、地球炭素循環や地球気候変動に大きな影響を及ぼしている^{11,12)}。

ゴーサイト(α -FeOOH)、リピトクロサイト(γ -FeOOH)、ヘマタイト(α -Fe₂O₃)、マグネタイト(Fe₃O₄)等の結晶性酸化鉄(水酸化鉄)は、フェリハイドライト等の非結晶質な酸化鉄よりも大量に土壌や堆積物に存在していることが知られている^{3,13,14)}。フェリハイドライトは、生物利用されやすいため、鉄還元微生物を培養するための電子受容体基質として広く用いられてきた一方、結晶性酸化鉄の微生物還元活性は検出できないレベルか、もしくは極めて微弱であった¹⁵⁻¹⁹⁾。しかし、過去の研究において鉄還元微生物の数種が、結晶性酸化鉄を電子受容体として、熱力学限界条件下で生き延びることが示唆されている²⁰⁻²³⁾。加えて、酸化鉄との共沈時にしばしば観察されるアルミニウムによる置換は、非結晶質のフェリハイドライトの微生物還元を抑制するが、結晶性酸化鉄

であるゴーサイトやリピトクロサイトの還元にはほぼ影響を与えない²⁴⁾。このことは、自然環境において結晶性酸化鉄の還元がより頻繁に起こっている可能性を示すものである²⁵⁾。さらに、ゴーサイトの存在する嫌気土壌において、新規な鉄還元微生物が酢酸を低速であるものの分解・同化していることが Stable Isotope Probing (SIP) によって証明された^{9,26)}。しかし、結晶性酸化鉄の還元に関与する微生物の多様性およびその還元機構についてはほぼ明らかになっていない。これまで得られている分離株の少なさに起因して、結晶性酸化鉄還元微生物の生理学および生態学的インパクトを理解するのは極めて困難な課題となっている。以前、Lentini らにより結晶性酸化鉄で集積された鉄還元微生物群集が特徴付けられてきたが、その純粋分離株の取得は為されていなかった²⁷⁾。

2. 結晶性酸化鉄還元微生物の選択的分離培養法の考案と適用

増殖速度が極端に遅い微生物、貧栄養性微生物、共生微生物等の未知未培養微生物にアクセスするため、これまでに多くの分離技術や培養戦略が発展されてきた²⁸⁻³⁰⁾。私達の研究グループでは、結晶性酸化鉄還元微生物を選択的に分離培養するための新しい二段培養法を考案した。一段目培養として、非標的の富栄養性微生物を死滅・排除させるため、結晶性酸化鉄(ゴーサイト、リピトクロサイト、ヘマタイト、マグネタイト)を電子受容体、酢酸を電子供与体とした嫌気制限培地にて長期間の継代培養を行った。標的とする鉄還元微生物は、電子伝達の促進のため結晶性酸化鉄の表面に付着し、固相(結晶性酸化鉄)と液相(培地)の境界にて長期間存続することができる^{31,32)}。鉄還元微生物が高度に集積された

後、エネルギー的により有利な溶解性鉄(III)培地による二段目培養へと供し、標的微生物を一気に増殖させた。さらに段階希釈培養法やロールチューブ法を用いることで、最終的に鉄還元微生物の純粋分離株を取得した。また、低い溶解性と高い結晶性を示す酸化鉄の微生物還元活性を評価するには、二価鉄の生成を指標とする従来までの標準法では不十分である。そこで私達は、様々な分子生態学的ツール(イルミナシークエンサー解析, 分子フィンガープリント解析 [Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: T-RFLP], クローンライブラリ解析)を適用することで、一段目の集積培養系の微生物群集構造を綿密に追跡し、系統的に新規な酸化鉄還元微生物を見出した後、その解析データに基づき、二段目培養を戦略的に展開した。この融合的アプローチにより、従来は捉えることのできなかった、増殖は極めて遅いが生態学的に重要な役割を担う結晶性酸化鉄還元微生物の効率取得を可能にした。

3. 一段目培養：結晶性酸化鉄による微生物集積とその分子生態学的特徴づけ

一段目培養の微生物接種源として水田土壌、森林土壌、湿地土壌、用水路底泥、海底堆積物を用い、上記4種の結晶性酸化鉄および酢酸を基質とした2種類の淡水嫌気培地で、合計136の培養条件にて2年間の長期集積培養を行った。なお、培地に含まれる結晶性酸化鉄の色の変化を指標に2-3回の継代を行った。その結果、培養終了時の58条件から16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR増幅が観察され、微生物の存続が確認された。使用した結晶性酸化鉄の観点から見ると、14, 16, 10, 18の集積系がそれぞれゴーサイト、リピトクロサイト、ヘマタイト、マグネタイトの添加により得られた。鉄還元微生物である *Shewanella putrefaciens* と *Shewanella decolorationis* では、リピトクロサイト \geq ゴーサイト $>$ ヘマタイトの順で最大還元速度が観察されている³³⁻³⁶。この報告された結晶性酸化鉄の利用性の減少と合致して、本実験で得られた集積培養系の数も減少した。また各種微生物反応の酸化還元電位によると³⁾、有機物酸化と共役するマグネタイト還元は4種の結晶性酸化鉄の還元反応の中でエネルギー生成が最も低い。それにも関わらず、マグネタイトを電子受容体として最多の18条件で集積系が得られた。マグネタイトは二価と三価の鉄イオンの両方を含有する鉱物であり、高い電気伝導性を示す。このことは、微生物間および微生物-酸化鉄間の電子共生を誘導し^{37,38}、長期培養における微生物の生き残りに有利であったと考えられた。また微生物接種源の観点から見ると、水田土壌では培養を仕掛けた合計48条件のうち大部分(80%以上)の40条件から集積系が得られたが、森林土壌では合計16条件のうち1条件、湿地土壌では合計16条件のうち2条件、用水路底泥では合計16条件のうち9条件、海底堆積物では合計40条件のうち6条件と、比較的少数の集積系しか得ることができなかった。水田土壌では鉄還元はメタン生成に次ぐ第二の最終電子受容プロセスであり⁷⁾、鉄還元微生物の高い代謝活性と存在量が報告されている^{9,26}。このことは、使用した4種の結晶性酸化鉄全てから水田土壌を接種源と

して微生物集積系が得られた本結果を支持する。一方、用水路底泥と海底堆積物を接種源とした培養では、それぞれマグネタイトとゴーサイトからの集積系が多く得られた。森林土壌と湿地土壌から取得された集積系は極めて僅かであったが、マグネタイトを電子受容体とした系が主であった。

58条件の集積系から得られた16S rRNA 遺伝子のPCR産物をイルミナシークエンサー解析に供し、合計で1,845,969配列(1条件あたり35,008配列)の塩基配列を解読した。集積系の微生物群集構造を比較すべく、シークエンスデータの主座標分析(PCoA: Principal Coordinate Analysis)を実施したところ、大部分(60.3%)の集積系がPCoAプロット中央(図1A)の赤四角線の中(図1B)に密集して配置した。この密集度合はヘマタイトによる集積系が、他の結晶性酸化鉄(50-61%)に比べて突出して高かった(90%:合計10条件のうち9条件)。このことは、ヘマタイトで集積された微生物群集がそれぞれ構造的に似ており、ヘマタイトの持つ微生物集積の選択圧の高さを示すものである。結晶性酸化鉄の生物利用性の低さ³³⁻³⁶や酸化還元共役で生産されるエネルギーの低さ³⁾がヘマタイトの高い選択圧の要因になっていると考えられた。また4種の結晶性酸化鉄で得られた集積系はPCoAプロット上で幾分重なり合って配置され、このことは4種全ての結晶性酸化鉄を還元可能な微生物の存在を示唆している。一方、微生物接種源の観点からは、水田土壌の集積系がプロット全体に分布しており、その微生物多様性の高さを強く示唆している。その他の接種源はPCoAプロット上で大まかにグルーピングされており(図1:点線)、接種源ごとに特徴的な微生物群集が構築されていることが示された。これらの結果は、16S rRNA 遺伝子に基づくT-RFLPデータの主成分分析(PCA: Principal Component Analysis)の結果とよく一致した(データ割愛)。

次に、イルミナシークエンサー解析およびクローンライブラリ解析により、58の集積系の構成微生物種を系統的に特徴づけた(図2)。結晶性酸化鉄ごとに解析結果をまとめ、ゴーサイト、リピトクロサイト、ヘマタイト、マグネタイトの集積系から得られたイルミナシークエンスライブラリをそれぞれISG(373,633配列)、ISL(490,300配列)、ISH(331,059配列)、ISM(650,977配列)と定義した。16S rRNA 遺伝子に基づくクローンライブラリも、同様にCG(125配列)、CL(148配列)、CH(89配列)、CM(163配列)と定義した。イルミナシークエンスの結果、Deltaproteobacteria綱が最優占メンバーとして検出され、ISG、ISL、ISH、ISMライブラリで51.7%、60.0%、72.1%、43.8%の高い相対存在量を示した(図2A)。中でもGeobacteraceae科が最も主要な構成員で、全体の14.1%(ISG)から29.1%(ISH)を占めた。この結果は、クローンライブラリ解析結果とよく一致していた(図2B)。Deltaproteobacteria綱を対象とした系統樹解析により、得られたクローンのほとんどが異化型鉄還元微生物として知られるGeobacter属、Pelobacter属、Desulfovibrio属、Anaeromyxobacter属^{8,39-41}の新しい系統群に分類されることが明らかになった(データ割愛)。さらに、イルミナシークエンスライブラリの種(OTU: Operational Taxonomic Unit)レ

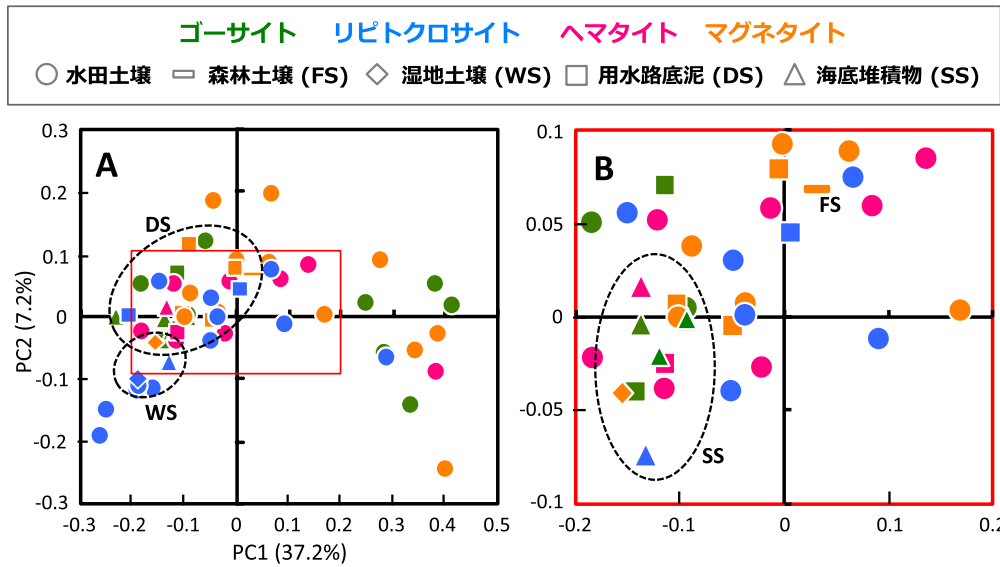


図1. イルミナシーケンスデータの主座標分析 (PCoA) プロット (A) およびその赤四角線内の高解像度表示 (B)。PCoA プロットは重みありの UniFrac 分析により作成された (供試遺伝子配列数: 3,810)。緑, 青, ピンク, オレンジのシンボルは, それぞれ ゴーサイト, リピトクロサイト, ヘマタイト, マグネタイトによる集積系を示す。円, 線, ひし形, 四角, 三角は, それぞれ水田土壌, 森林土壌, 湿地土壌, 用水路底泥, 海底堆積物から得られた集積系を示す。水田土壌以外の接種源の集積系は点線で囲む。

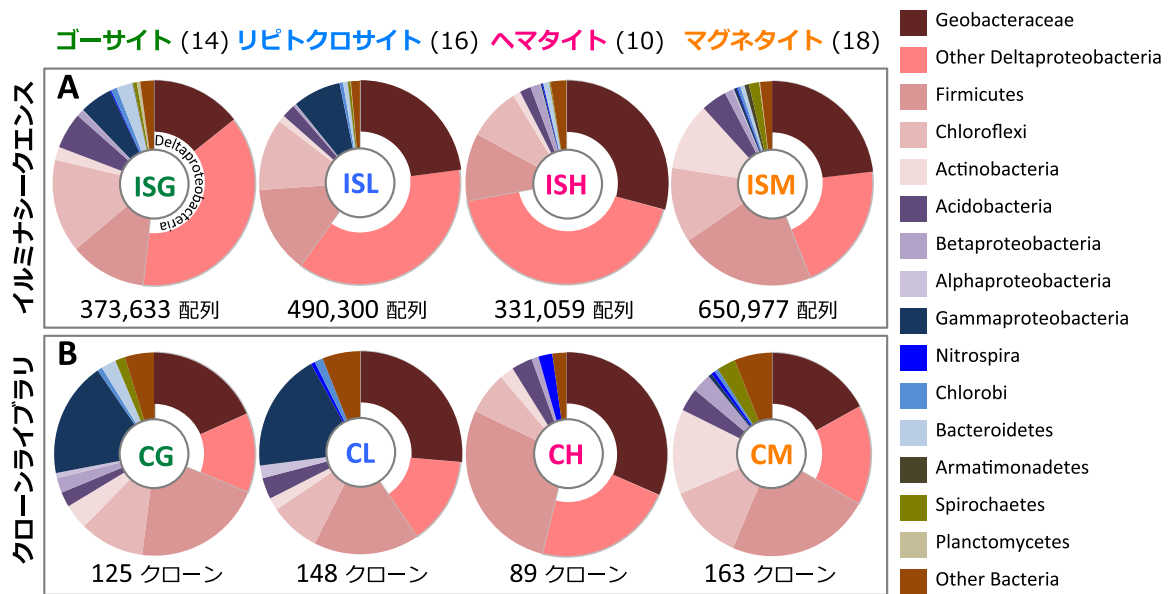


図2. イルミナシーケンス (A) とクローンライブラリ (B) により決定された集積系の微生物群集構造。構成要員を色で示し, その種類を図右の凡例に示す。ゴーサイト, リピトクロサイト, ヘマタイト, マグネタイトの集積系から得られたイルミナシーケンスライブラリをそれぞれ ISG, ISL, ISH, ISM と定義し, 同様にクローンライブラリを CG, CL, CH, CM と定義した。本研究で解析した配列およびクローンの総数を円グラフの下に示す。括弧内の値は得られた集積系の数を示す。

ベルでの分布を詳細に追跡したところ (図3), 合計 1,845,969 配列のうち 411,343 配列と 600,048 配列がそれぞれ Geobacteraceae 科の 301 種 (OTUs) と Deltaproteobacteria 綱の 1,225 種 (OTUs) に分類された (図3A-C)。ベン図解析の結果, 4 種全ての結晶性酸化鉄で集積されたコア微生物種は Geobacteraceae 科で多く見られ, 構成種の 39.9% を占めた (図3B)。この値は全細菌を対象としたコア微生物の割合 (28.1%) と比べると極めて大きく (図3A), 全ての結晶性酸化鉄を還元可能な微生物が Geobacteraceae 科に多数存在することを強く示唆している。ヘマタイトで集積された微生物種の

割合も, Geobacteraceae 科では全細菌に比べ著しく大きかった (81.7% vs 57.9%)。また, その他の Deltaproteobacteria 綱の微生物種では, リピトクロサイトで集積される微生物種の割合 (78.4%) が全細菌での解析値 (66.2%) に比べて高い (図3C)。このように, ISG, ISL, ISH ライブラリで検出される Geobacteraceae 科やその他の Deltaproteobacteria 綱の微生物種数の割合が他の分類群よりも相対的に大きかったことから, Deltaproteobacteria 綱 (特に Geobacteraceae 科) に属する微生物種がゴーサイト, リピトクロサイト, ヘマタイトの還元に中心的に関与していることが強く示唆された。

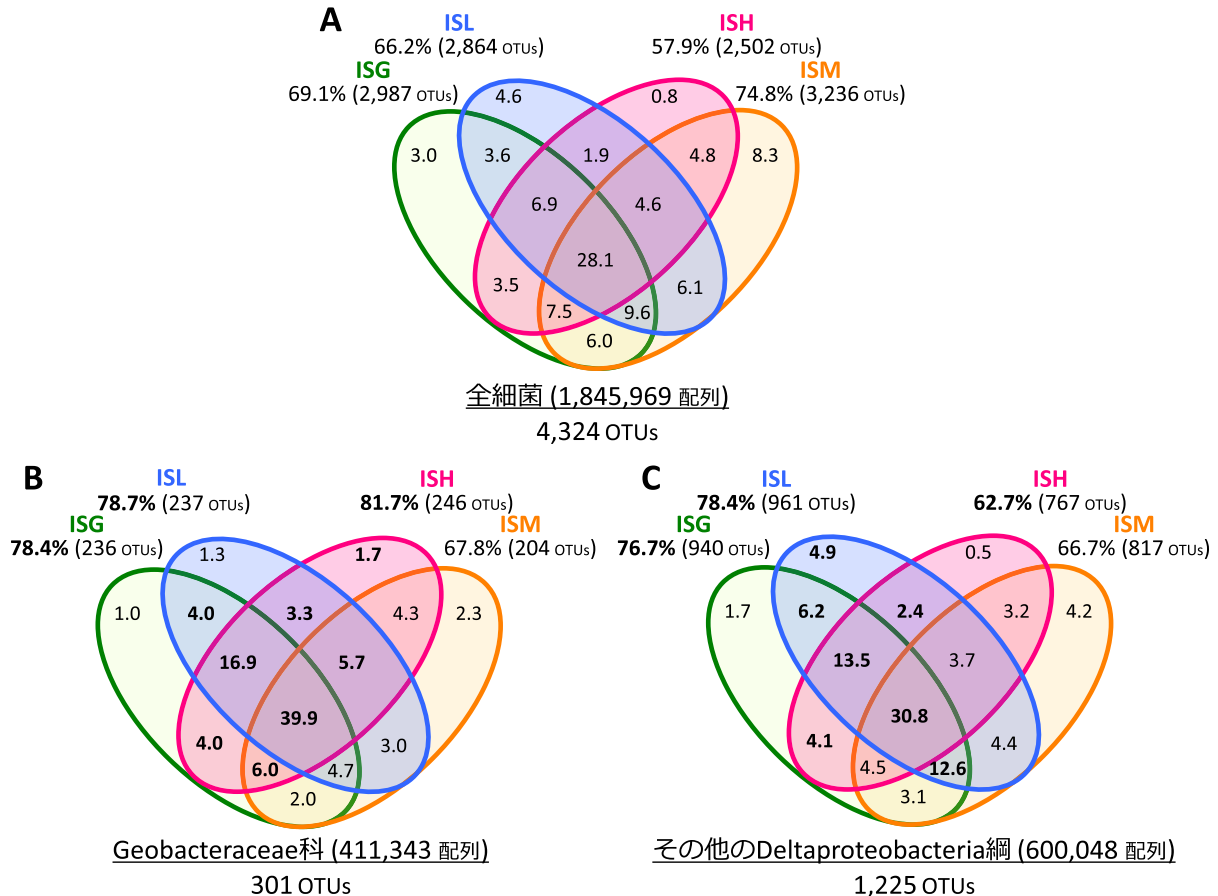


図3. イルミナシーケンスデータのベン図解析結果：全細菌 (A), Geobacteraceae 科 (B), その他の Deltaproteobacteria 綱 (C)。緑, 青, ピンク, オレンジの円はそれぞれ ISG, ISL, ISH, ISM ライブラリを示す。配列および OTU の総数をそれぞれの系統分類群に対して示す。ベン図内の値は, それぞれの系統分類群で検出される OTU 総数に対しての割合を示す。全細菌数で検出された割合 (A) よりも, それぞれの系統分類群 (B, C) での割合が高い場合には太字で示す。

4. 二段目培養：結晶性鉄還元微生物の選択的分離培養

一段目培養で得られた 58 条件の集積系の中から, 系統的に新規な鉄還元微生物を含む 38 の集積系を選抜し, 溶解性鉄 (III) 培地へ継代することで, それら鉄還元微生物の増殖を誘導した。段階希釈培養法やロールチューブ法により, Deltaproteobacteria 綱に属する 6 株 (AOG1-5 株と AOP6 株と命名) の純粋培養系を獲得した。それらの 16S rRNA 遺伝子全長の塩基配列を解読したところ, AOG1-5 株は *Geobacter* 属に, AOP6 株は *Pelobacter* 属に分類された (図 4)。AOG1 株と AOG4 株は, 水田土壌を接種源, リピトクロサイトを電子受容体とする集積系より得られ, それぞれ *Geobacter luticola* (AB682759 ; 98.1% 配列相同性)⁴²⁾ とカオリン粘土に由来する *G. pickeringii* (NR_043576 ; 95.5% 相同性) に近縁であった⁴³⁾。AOG2 株と AOG3 株は, マグネタイトを添加した湿地土壌と森林土壌の集積系から取得され, 金属還元・脱ハロ呼吸微生物 *G. lovleyi* (NR_074979 ; 96.4% 相同性)⁴⁴⁾ と地下帯水層に由来する *G. chapelleii* (NR_025982 ; 96.7% 相同性)⁴⁵⁾ に近縁であった。AOG5 株は, ヘマタイトを添加した用水路底泥の集積系から得られ, *G. pickeringii* (NR_026077 ; 94.8% 相同性)⁴⁶⁾ と類縁であった。AOP6 株は, ゴーサイトを電子供与体とする海底堆積物の集積系から得られ, *Pelobacter*

acetylenicus (NR_029238)⁴⁷⁾ に 95.5% の配列相同性を示した。これら 6 つの純粋分離株は, 異なる微生物接種源 (水田土壌, 森林土壌, 湿地土壌, 用水路底泥, 海底堆積物) と異なる結晶性酸化鉄 (ゴーサイト, リピトクロサイト, ヘマタイト, マグネタイト) により獲得されたことから, 一段目培養にて採用した様々な培養条件が新規な鉄還元微生物の分離培養に極めて有効であったことが証明された。

これらの分離株が異化型鉄還元能を実際に有するか否かを判断するため, 溶解性鉄 (III) と酢酸を基質とした培養試験に供し, 鉄 (II) 生成, 酢酸分解, 細胞増殖, タンパク質合成の生理学的パラメーターを追跡した (図 5)。AOG1 株, AOG2 株, AOG5 株は鉄 (III) を迅速に還元することで, 系内の鉄 (II) 濃度が上昇し, 培養 10 日以内に最終濃度 (6.84–7.14 mM) でプラトーに達した (図 5A)。一方で, それら以外の 3 株は, 相対的に低い鉄還元速度を示し, 鉄 (II) の最終濃度 (6.88–7.32 mM) に到達するまで ~ 30 日を要した。酢酸分解と鉄還元とは並行して起こり, それらの共役は想定される化学量論 (酢酸 : 鉄 [III] = 1 : 8) にほぼ一致していた (図 5B)。定量 PCR 法による 16S rRNA 遺伝子コピーの定量と Bradford 法による全タンパク質の定量を培養期間を通して行うことで細胞増殖とタンパク質合成を評価したところ, 6 株はそれぞれ異なる生育挙動を示

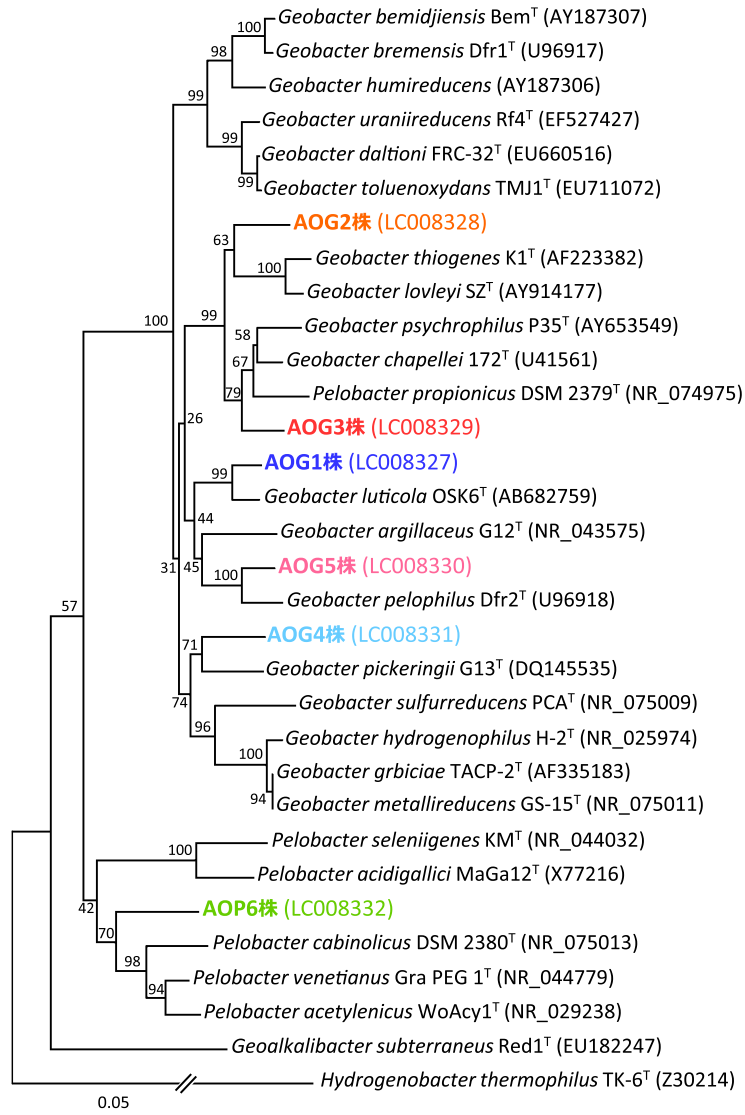


図4. 純粋分離株 (AOG1-5 株と AOP6 株) とそれらの近縁種の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹。16S rRNA 遺伝子全長を解析に用い、系統樹は neighbor-joining 法により作成された。ブートストラップ値は 1,000 回の反復により得られ、スケールバーは 5% 配列分散を示す。GenBank アクセッション番号を括弧内に示す。

した (図 5C, 5D)。AOG1 株と AOG5 株は 2 オーダー ($1.17\text{--}1.22 \times 10^2$ コピー/ml) の増加を示し、その他の 4 株は 1 オーダー ($1.52\text{--}6.07 \times 10$ コピー/ml) の増加を示した。細胞増殖とタンパク質合成は、AOG4 株を除き、鉄還元と酢酸分解にほぼ同調して起こっていた。AOG4 株は、培養試験開始直後に増殖し、その後一定の菌体密度を維持したが、鉄還元が観察された培養 15 日目以降に旺盛なタンパク質合成が検出された。このことからここで得られた 6 種の分離株は、酢酸と鉄 (III) を基質として生育することが可能な異化型鉄還元微生物であり、特に増殖速度の点において異なる生理学的特性を有していることが明らかになった。以上から、二段目培養法の適用によって *Geobacter* 属と *Pelobacter* 属に分類される新規な 6 種の鉄還元微生物の分離培養に成功した。これにより、結晶性酸化鉄を還元する微生物が自然環境中に普遍的に存在し、それぞれユニークな代謝様式を有していることが強く示唆された⁴⁸⁾。

5. おわりに ～結晶性酸化鉄還元微生物と地球炭素循環との関係解明に向けて～

鉄鉱物が豊富な海底地下圏における鉄還元微生物を探索すべく、国際深海掘削計画 (IODP) 第 337 次研究航海「下北八戸沖石炭層生命圏探査」に乗船研究者として参画した。これまでに海底下約 2.5 km までの地球深部に微生物生細胞が存在し、現場の有機物が微生物により分解され、さらにメタン生成が第一の最終電子受容プロセスであるという証拠が複数示されている^{49,50)}。その一方で、近年報告された地球化学的データによると、ある特定の海底下深度において生物活動由来と思われるナノマグネタイトが高濃度で検出され、結晶性酸化鉄還元が地下深部の最終電子受容プロセスの一端を担っていることが強く示唆されている⁵¹⁾。私達の研究グループでは、深度の異なる 15 の海底コア堆積物試料を微生物接種源に用い、結晶性酸化鉄と酢酸を基質とした長期間集積培

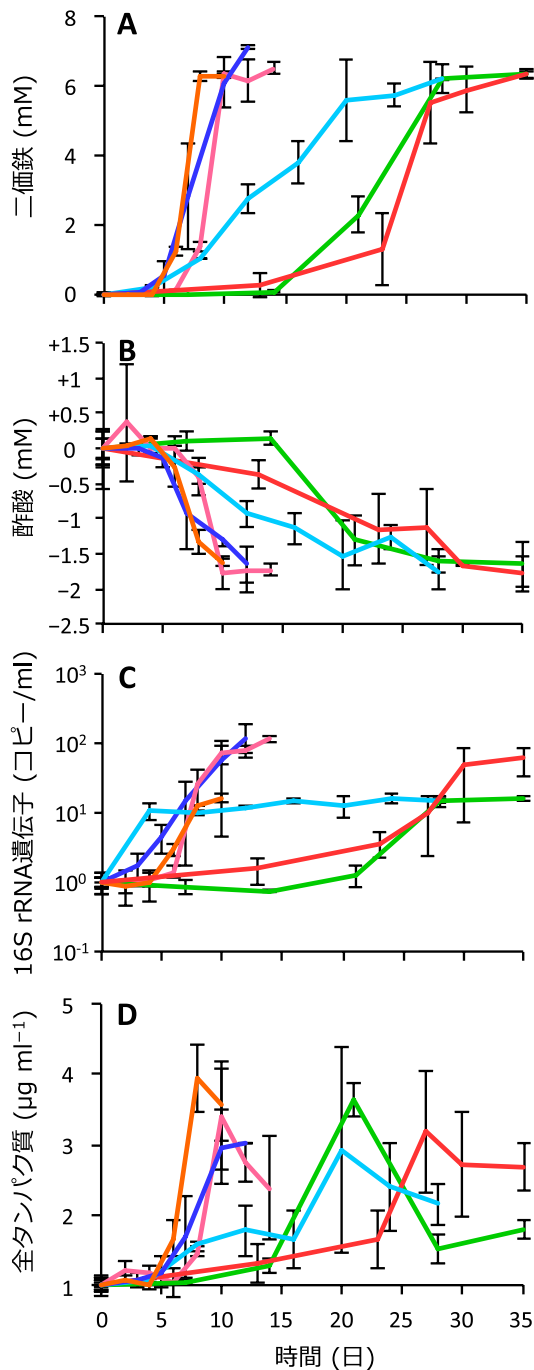


図5. 純粋分離株 (AOG1-5 株と AOP6 株) の培養試験における生理学的パラメーターの変化: 二価鉄濃度 (A), 酢酸濃度 (B), 16S rRNA 遺伝子コピー数 (C), 全タンパク質濃度 (D)。培養試験には、溶解性鉄 (III) と酢酸をそれぞれ電子受容体基質, 電子供与体基質として用いた。6つの分離株の生理学的パラメーターを異なる色のラインで示す。色と分離株の対応関係は図4に示す通りである。エラーバーは3連実験の標準偏差を示す。

養を行っている。その集積過程をイルミナシークエンスにより網羅的に明らかにするとともに、上述の二段培養法を適用することで、ナノパイライト蓄積が観察された深度付近から Firmicutes 門に属する2種の鉄還元微生物の分離培養に成功した。これらのことは、海底下深部の炭素循環に結晶性酸化鉄還元微生物が密接に関与してい

ることを強く示唆するものである。また、陸上土壌環境から多く検出された *Deltaproteobacteria* 綱に属する鉄還元微生物が地下深部からは獲得されなかったことから、海底下では陸上とは異なる結晶性酸化鉄の還元機構が存在していることが推察される。現在、海底下の結晶性酸化鉄の微生物還元をより直接的に証明するため、海底コア堆積物試料自体に ^{13}C -酢酸と結晶性酸化鉄を投入し、内在する微生物による ^{13}C -酢酸の酸化分解および ^{13}C 取り込みの高感度検出を試みている。結晶性酸化鉄の還元と地球炭素循環の関わりは、まだそのほんの一部しか垣間見えていないが、未知の鉄還元微生物の選択的分離培養と高感度機能解明、地球化学等の異分野領域との融合を通して、その全貌が明らかにされていくものと期待される。

謝 辞

本研究成果の一部は、JSPS 科研費事業 16H05886 の研究成果である。ここに感謝の意を表す。

文 献

- 1) Stumm, W. and Sulzberger, B. 1992. The cycling of iron in natural environments: Considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 56: 3233-3257.
- 2) Davison, W. 1993. Iron and manganese in lakes. *Earth Sci. Rev.* 34: 119-163.
- 3) Weber, K.A., L.A. Achenbach, and J.D. Coates. 2006. Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 752-764.
- 4) Borch, T., R. Kretzschmar, A. Kappler, P.V. Cappellen, M. Ginder-Vogel, A. Voegelin, et al. 2010. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environ. Sci. Technol.* 44: 15-23.
- 5) Lalonde, K., A. Mucci, A. Ouellet, and Y. Gelin. 2012. Preservation of organic matter in sediments promoted by iron. *Nature.* 483: 198-200.
- 6) Melton, E.D., E.D. Swanner, S. Behrens, C. Schmidt, and A. Kappler. 2014. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 797-808.
- 7) Yao, H., R. Conrad, R. Wassmann, and H.U. Neue. 1999. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry.* 47: 269-295.
- 8) Lovley, D.R., D.E. Holmes, and K.P. Nevin. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol.* 49: 219-286.
- 9) Hori, T., A. Muller, Y. Igarashi, R. Conrad, and M.W. Friedrich. 2010. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ^{13}C -acetate probing. *ISME J.* 4: 267-278.
- 10) Braunschweig, J., J. Bosch, and R.U. Meckenstock. 2013. Iron oxide nanoparticles in geomicrobiology: From biogeochemistry to bioremediation. *N. Biotechnol.* 30: 793-802.
- 11) Conrad, R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO , CH_4 , OCS , N_2O , and NO). *Microbiol. Rev.* 60: 609-640.
- 12) Yvon-Durocher, G., A.P. Allen, D. Bastviken, R. Conrad, C. Gudas, A. St-Pierre, et al. 2014. Methane fluxes show consistent temperature dependence across microbial to ecosystem scales. *Nature.* 507: 488-491.
- 13) Roden, E.E. and M.M. Urrutia. 2002. Influence of biogenic Fe(II) on bacterial crystalline Fe(III) oxide reduction. *Geomicrobiol. J.* 19: 209-251.
- 14) Cornell, R.M. and U. Schwertmann. 2004. The iron oxides.

- Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 15) Lovley, D.R. and E.J. Phillips. 1986. Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal potomac river. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 751–757.
 - 16) Lovley, D.R. and E.J. Phillips. 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1536–1540.
 - 17) Lovley, D.R. and E.J. Phillips. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: Organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1472–1480.
 - 18) Qu, D., S. Ratering, and S. Schnell. 2004. Microbial reduction of weakly crystalline iron (III) oxides and suppression of methanogenesis in paddy soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 1172–1181.
 - 19) Kukkadapu, R.K., J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, J.P. McKinley, D.W. Kennedy, S.C. Smith, et al. 2006. Reductive biotransformation of Fe in shale–limestone saprolite containing Fe(III) oxides and Fe(II)/Fe(III) phyllosilicates. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 70: 3662–3676.
 - 20) Kostka, J.E. and K.H. Nealson. 1995. Dissolution and reduction of magnetite by bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2535–2540.
 - 21) Kostka, J.E., J.W. Stucki, K.H. Nealson, and J. Wu. 1996. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. *Clays Clay Miner.* 44: 522–529.
 - 22) Fredrickson, J.K., J.M. Zachara, D.W. Kennedy, H. Dong, T.C. Onstott, N.W. Hinman, et al. 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 62: 3239–3257.
 - 23) Kukkadapu, R.K., J.M. Zachara, S.C. Smith, J.K. Fredrickson, and C. Liu. 2001. Dissimilatory bacterial reduction of Al-substituted goethite in subsurface sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 65: 2913–2924.
 - 24) Ekstrom, E.B., D.R. Learman, A.S. Madden, and C.M. Hansel. 2010. Contrasting effects of Al substitution on microbial reduction of Fe(III) (hydr)oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 74: 7086–7099.
 - 25) van der Zee, C., D.R. Roberts, D.G. Rancourt, and C.P. Slomp. 2003. Nanogoethite is the dominant reactive oxyhydroxide phase in lake and marine sediments. *Geology.* 31: 993–996.
 - 26) Ding, L.J., J.Q. Su, H.J. Xu, Z.J. Jia, and Y.G. Zhu. 2015. Long-term nitrogen fertilization of paddy soil shifts iron-reducing microbial community revealed by RNA-¹³C-acetate probing coupled with pyrosequencing. *ISME J.* 9: 721–734.
 - 27) Lentini, C.J., S.D. Wankel, and C.M. Hansel. 2012. Enriched iron(III)-reducing bacterial communities are shaped by carbon substrate and iron oxide mineralogy. *Front. Microbiol.* 3: 404.
 - 28) Puspita, I.D., Y. Kamagata, M. Tanaka, K. Asano, and C.H. Nakatsu. 2012. Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes Environ.* 27: 356–366.
 - 29) Narihiro, T. and Y. Kamagata. 2013. Cultivating yet-to-be cultivated microbes: The challenge continues. *Microbes Environ.* 28: 163–165.
 - 30) Prakash, O., Y. Shouche, K. Jangid, and J.E. Kostka. 2013. Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 51–62.
 - 31) Lower, S.K., M.F. Jr. Hochella, and T.J. Beveridge. 2001. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and alpha-FeOOH. *Science.* 292: 1360–1363.
 - 32) Rosso, K.M., J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, Y.A. Gorby, and S.C. Smith. 2003. Nonlocal bacterial electron transfer to hematite surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 67: 1081–1087.
 - 33) Larsen, O. and D. Postma. 2001. Kinetics of reductive bulk dissolution of lepidocrocite, ferrihydrite, and goethite. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 65: 1367–1379.
 - 34) Bonneville, S., T. Behrends, and P. Van Cappellen. 2009. Solubility and dissimilatory reduction kinetics of iron(III) oxyhydroxides: A linear free energy relationship. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 73: 5273–5282.
 - 35) Bonneville, S., P. Van Cappellen, and T. Behrends. 2004. Microbial reduction of iron(III) oxyhydroxides: Effects of mineral solubility and availability. *Chem. Geol.* 212: 255–268.
 - 36) Li, X., T. Liu, F. Li, W. Zhang, S. Zhou, and Y. Li. 2012. Reduction of structural Fe(III) in oxyhydroxides by *Shewanella decolorationis* S12 and characterization of the surface properties of iron minerals. *J. Soils Sediments.* 12: 217–227.
 - 37) Kato, S., K. Hashimoto, and K. Watanabe. 2012. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 10042–10046.
 - 38) Kato, S., R. Nakamura, F. Kai, K. Watanabe, and K. Hashimoto. 2010. Respiratory interactions of soil bacteria with (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 12: 3114–3123.
 - 39) Bale, S.J., K. Goodman, P.A. Rochelle, J.R. Marchesi, J.C. Fry, A.J. Weightman, et al. 1997. *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 515–521.
 - 40) He, Q. and R.A. Sanford. 2003. Characterization of Fe(III) reduction by chlororespiring *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2712–2718.
 - 41) Lovley, D.R., T. Ueki, T. Zhang, N.S. Malvankar, P.M. Shrestha, K.A. Flanagan, et al. 2011. *Geobacter*: the microbe electric’s physiology, ecology, and practical applications. *Adv. Microb. Physiol.* 59: 1–100.
 - 42) Viulu, S., K. Nakamura, Y. Okada, S. Saitou, and K. Takamizawa. 2013. *Geobacter luticola* sp. nov., an Fe(III)-reducing bacterium isolated from lotus field mud. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 442–448.
 - 43) Shelobolina, E.S., K.P. Nevin, J.D. Blakeney-Hayward, C.V. Johnsen, T.W. Plaia, P. Krader, et al. 2007. *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 126–135.
 - 44) Sung, Y., K.E. Fletcher, K.M. Ritalahti, R.P. Apkarian, N. Ramos-Hernandez, R.A. Sanford, et al. 2006. *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2775–2782.
 - 45) Coates, J.D., E.J. Phillips, D.J. Lonergan, H. Jenter, and D.R. Lovley. 1996. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1531–1536.
 - 46) Straub, K.L., M. Hanzlik, and B.E. Buchholz-Cleven. 1998. The use of biologically produced ferrihydrite for the isolation of novel iron-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 442–449.
 - 47) Evers, S., M. Weizenegger, W. Ludwig, B. Schink, and K.-H. Schleifer. 1993. The phylogenetic positions of *Pelobacter acetylenicus* and *Pelobacter propionicus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 216–218.
 - 48) Hori, T., T. Aoyagi, H. Itoh, T. Narihiro, A. Oikawa, K. Suzuki, et al. 2015. Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments. *Front. Microbiol.* 6: 386.
 - 49) Inagaki, F., K.-U. Hinrichs, Y. Kubo, M.W. Bowles, V.B. Heuer, W.-L. Hong, et al. 2015. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science.* 349: 420–424.
 - 50) Trembath-Reichert, E., Y. Morono, A. Ijiri, T. Hoshino, K.S. Dawson, F. Inagaki, et al. 2017. Methyl-compound use and slow growth characterize microbial life in 2-km-deep seafloor coal and shale beds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114: E9206–E9215.
 - 51) Phillips, S.C., J.E. Johnson, W.C. Clyde, J.B. Setera, D.P. Maxbauer, S. Severmann, et al. 2017. Rock magnetic and geochemical evidence for authigenic magnetite formation via iron reduction in coal-bearing sediments offshore Shimokita Peninsula, Japan (IODP Site C0020). *Geochem. Geophys. Geosyst.* 18: 2076–2098.