

不同土地利用方式下土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力分析

余红¹, 范萍², 檀文炳¹, 张颖^{1*}

1. 中国环境科学研究院, 国家环境保护地下水污染模拟与控制重点实验室, 北京 100012

2. 南昌大学资源环境与化工学院, 江西 南昌 330031

摘要: 由于腐殖质的氧化还原活性官能团可以在连续的缺氧和有氧交替中将电子从微生物可持续地传递到氧气, 土地利用方式可以影响土壤腐殖质的电子转移能力, 但土地利用方式是否会影响土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力尚不明确. 选取水稻地、葡萄园和杨梅园的土壤, 采用微生物还原和氧气氧化的循环周期试验, 评估土壤中胡敏酸(HA)和富里酸(FA)作为胞外电子穿梭体的持续能力对不同土地利用方式土壤的响应. 结果表明: 土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力在 *Shewanella oneidensis* MR-1 和 *Shewanella putrefaciens* 200 两种微生物体系下并无明显差异, 但在水稻地、葡萄园和杨梅园间具有显著差异. 水稻地、葡萄园和杨梅园土壤中 HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力分别为 75.9%、80.5% 和 72.1%, FA 作为胞外电子穿梭体的持续能力分别为 58.2%、62.2% 和 62.9%. 该结果可能是由不同土地利用方式下土壤腐殖质的组成、分解和转化过程以及微生物电子供体碳源驱动的动力学过程差异造成的. 研究显示, 不同土地利用方式下腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力具有显著差异, 且 HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力明显强于 FA, 可通过环境调控措施形成 HA, 以实现土壤污染物的降解转化.

关键词: 腐殖质; 土地利用方式; 电子穿梭体; 微生物还原

中图分类号: X53

文章编号: 1001-6929(2021)07-1737-10

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2021.04.06

Sustainability of Soil Humic Substances as Extracellular Electron Shuttle in Different Types of Land Use

YU Hong¹, FAN Ping², TAN Wenbing¹, ZHANG Ying^{1*}

1. State Environmental Protection Key Laboratory of Simulation and Control of Groundwater Pollution, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

2. College of Environmental and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China

Abstract: The redox-active functional groups of soil humic substances (HS) can continuously transfer electrons from microorganisms to oxygen in continuous anoxic and aerobic alternations. Therefore, HS is essential for regulating the methane cycle in the temporary anoxic system. Land-use types could affect the electron transferability of soil HS. However, it remains unclear whether the land-use types would affect the sustainability of HS as the extracellular electron shuttle. In this study, we combined the cycle test of microbial reduction and oxygen re-oxidation to evaluate the response of soil humic acid (HA) and fulvic acid (FA) sustainability as the extracellular electron shuttle to different types of land use. The results showed that HS sustainability as the extracellular electron shuttle did not differ significantly between *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Shewanella putrefaciens* 200 microbial systems, although significant differences could be observed among the land-use types of paddy (ST), grapevine (PT), and myrica rubra (YM). The HA sustainability as an extracellular electronic shuttle in ST, PT, and YM was 75.9%, 80.5% and 72.1%, respectively. The FA sustainability as an extracellular electronic shuttle was 58.2%, 62.2% and 62.9%, respectively. These results might be due to different types of land use, resulting in different soil HS composition, decomposition, and transformation processes, and different dynamic processes driven by microbial electron donor carbon sources. Our results showed that the sustainability of soil HS as an extracellular electronic shuttle was significantly different among the different types of land use, and HA sustainability as an extracellular electronic shuttle was obviously greater than that of FA. Therefore, the degradation and transformation of soil pollutants could be achieved by improving the environmental

收稿日期: 2020-07-08

修订日期: 2021-03-30

作者简介: 余红(1981-), 女, 四川眉山人, 高级工程师, 博士, 主要从事环境规划管理、土壤环境化学与污染环境修复研究, yuhong1018@126.com.

* 责任作者, 张颖(1987-), 女, 安徽砀山人, 工程师, 硕士, 主要从事地下水环境化学研究, zhying010@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.41977030)

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.41977030)

control measures to form HA.

Keywords: humic substances; land-use types; extracellular electron shuttle; microbial reduction

土壤腐殖质是由植物和微生物残体分解的中间产物重新组合形成的有机聚合物,是土壤有机物的主要组成部分.在厌氧条件下,溶解与固相颗粒状的腐殖质都可能会接受来自厌氧微生物呼吸产生的电子^[1-2].腐殖质的微生物还原过程会涉及将电子转移到腐殖质中的醌基团和其他具有氧化还原活性官能团以及腐殖质中的络合金属^[3-6].还原后的腐殖质既可以作为厌氧微生物呼吸链中的电子供体^[7],又可以将电子转移到土壤中溶解性较差的Fe(Ⅲ)氢氧化物和Fe(Ⅲ)氧化物矿物质^[1,8-9],从而在微生物还原Fe(Ⅲ)过程中充当电子穿梭体的角色^[10].此外,还原后的腐殖质还可以将电子转移到各类有机与无机污染物中^[11],从而影响其分解和转化,这在土壤污染修复方面具有重要意义.

当土壤处于间歇性缺氧环境时,腐殖质作为微生物呼吸链的电子受体会对其他末端电子受体的还原产生竞争性地抑制^[12].由此推测,当土壤处于间歇性曝气环境后,被微生物还原的腐殖质会被氧气重新氧化,从而恢复腐殖质在后续间歇性缺氧的土壤环境中充当电子受体的能力,这使其他末端电子受体的还原继续被抑制.土壤腐殖质电子穿梭体功能并非持续恒定,其具有一定“寿命”,目前很少有研究涉及土壤腐殖质电子穿梭体功能的持续能力,即土壤腐殖质的电子循环能力.如果土壤腐殖质的电子穿梭能力在这些间歇性缺氧和曝气的环境中能够保持很好的稳定性,这对降低土壤CH₄和N₂O等温室气体的排放将起到十分重要的作用^[13-14].

尽管之前有很多研究在化学或电化学的还原与氧气重新氧化的循环周期试验中,证明了腐殖质在接受电子和供给电子上具有很强的可逆性^[4,14-15],实际上,腐殖质并不是通过化学或电化学的途径获得电子,而是通过与微生物相互作用接受电子,因此,采用化学或电化学的还原方法并不能真实反映土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力.此外,土地管理和土地利用方式影响陆地生态系统中天然有机物和腐殖质的降解和转化^[16],进而影响土壤腐殖质的内在化学结构^[17-20].因此,不同的土地管理和土地利用方式对土壤腐殖质电子转移能力会产生重大影响^[21-25],但是否对土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力产生影响至今仍不清楚.为此,该研究选取水稻地、葡萄园和杨梅园的土壤,通过微生物还原

和氧气重新氧化的循环周期试验模拟真实存在的间歇性缺氧-曝气循环过程,分析不同土地利用方式下土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力及其影响因素,以期为深入理解土壤腐殖质的氧化还原动力学行为与土壤有机碳循环及温室气体形成过程之间的关系提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究区位于江苏省常州市武进农业土壤示范基地(31°33'N~31°34'N、119°59'E~120°01'E),主要种植水稻、葡萄和杨梅等.该区地处北亚热带向北温带过渡的气候区域,属湿润季风气候.气候特征是四季分明、雨热同步、光照充足.年均气温为15.8℃,年均降水量为1 092 mm,全年日照总时数为1 940 h.区域土壤类型主要为黄棕壤和红壤,成土过程的特点是强烈的黏化与轻微的富铝化.

1.2 土壤腐殖质化学结构特征分析

1.2.1 土壤样品采集

2013年8月在研究区选择分布面积大且具有代表性的水稻地、葡萄园和杨梅园的土壤,3种土地利用方式下施肥耕作等管理方面存在明显差异.每种土地利用方式下选取3个采样点,采集表层(0~20 cm)土壤.土壤样品取回后立即进行冷冻干燥,去除其中的植物根系残体等杂物,保存备用.土壤理化性质见表1.

表1 试验土壤的理化性质

Table 1 Properties of the soil used in the experiment

土地利用方式	有机碳含量/ (g/kg)	总氮含量/ (g/kg)	C:N	pH	土壤质地组成/%		
					砂粒	粉粒	黏粒
水稻地	10.7	1.2	8.9	6.2	36	35	30
葡萄园	20.1	1.3	16.0	5.9	42	32	26
杨梅园	24.8	1.6	15.7	6.4	38	29	33

1.2.2 土壤腐殖质的提取、纯化与溶液制备

土壤腐殖质的提取和纯化:根据国际腐殖质学会的标准化程序提取土壤腐殖质的胡敏酸(HA)和富里酸(FA)^[26].简言之,将萃取剂与样品质量比设为10:1,通过溶液(0.1 mol/L NaOH水溶液和0.1 mol/L Na₄P₂O₇的1:1混合物)来提取土壤样品.将悬浮液在充入氮气的封闭玻璃瓶中于25℃下机械摇动24 h.每个样品重复提取3次.用6 mol/L HCl将提取物酸化

至 pH 为 1, 然后 5 000 r/min 下离心提取物, 提取的腐殖质会分离成 HA(沉淀)和 FA(上清液)两部分. 将 HA 悬浮在 0.1 mol/L HCl 和 0.3 mol/L HF 的溶液中以除去矿物杂质并透析直到氯离子被去除. 将 FA 用吸附树脂 XAD-8 纯化, 并使碱性洗脱液通过阳离子交换树脂.

腐殖质溶液的配制: 将 HA 和 FA 干样加到去离子水中, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8, 使 HA 和 FA 充分溶解后, 用 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 6, 再用 0.45 μm 纤维素滤膜过滤, 最后稀释至 100 mg/L 胡敏酸或富里酸的溶液, 备用.

1.2.3 异化铁还原菌微生物富集培养试验

采用两种异化铁还原菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 (*S. oneidensis* MR-1) 与 *Shewanella putrefaciens* 200 (*S. putrefaciens* 200), 将纯种微生物接种至 100 mL 的微生物培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH=7.2)中, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱培养 12 h, 得到 10^8 cells/mL 的菌液浓度^[27].

1.3 腐殖质作为胞外电子穿梭体的循环周期试验

根据已有试验方案^[28]开展循环周期试验. 采用异化铁还原菌微生物(*S. oneidensis* MR-1 或 *S. putrefaciens* 200)对腐殖质溶液(40 mL)进行接种, 加入 5 mmol/L 的乳酸钠溶液作为微生物的碳源及无机盐营养液, 充入 N_2 保持厌氧状态, 25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱培养 24~36 h 后测定腐殖质的微生物还原容量. 具体步骤: 取培养后的腐殖质溶液 5 mL, 加入到 5 mL 5 mmol/L 的柠檬酸铁溶液[(Fe(III)Cit)]反应 12 h 以充分氧化腐殖质, 过滤后利用邻菲罗啉法测定滤液中还原生成的 Fe(II)含量, 从而得出腐殖质的第 1 次循环周期微生物还原容量. 向剩余腐殖质溶液中充入高纯 O_2 , 以重新氧化被微生物还原后的腐殖质, 然后重复第 1 次循环周期微生物还原容量的测定步骤, 测定腐殖质的第 2 次循环周期微生物还原容量. 按照同样的方法测定腐殖质的第 3 次循环周期微生物还原容量. 该研究中腐殖质的微生物还原容量用来表征电子供给能力(EDC), 第 3 次与第 1 次循环周期 EDC 的比值可用于评估腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力(ESC), 采用式(1)计算.

$$\text{ESC} = \frac{\text{EDC}_{\text{Red}_3}}{\text{EDC}_{\text{Red}_1}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: ESC 为腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力, %; $\text{EDC}_{\text{Red}_1}$ 、 $\text{EDC}_{\text{Red}_3}$ 分别为第 1 次、第 3 次循环周期的电子供给能力, mmol/mol (以单位碳的电子当量计).

1.4 荧光光谱分析及其平行因子分析

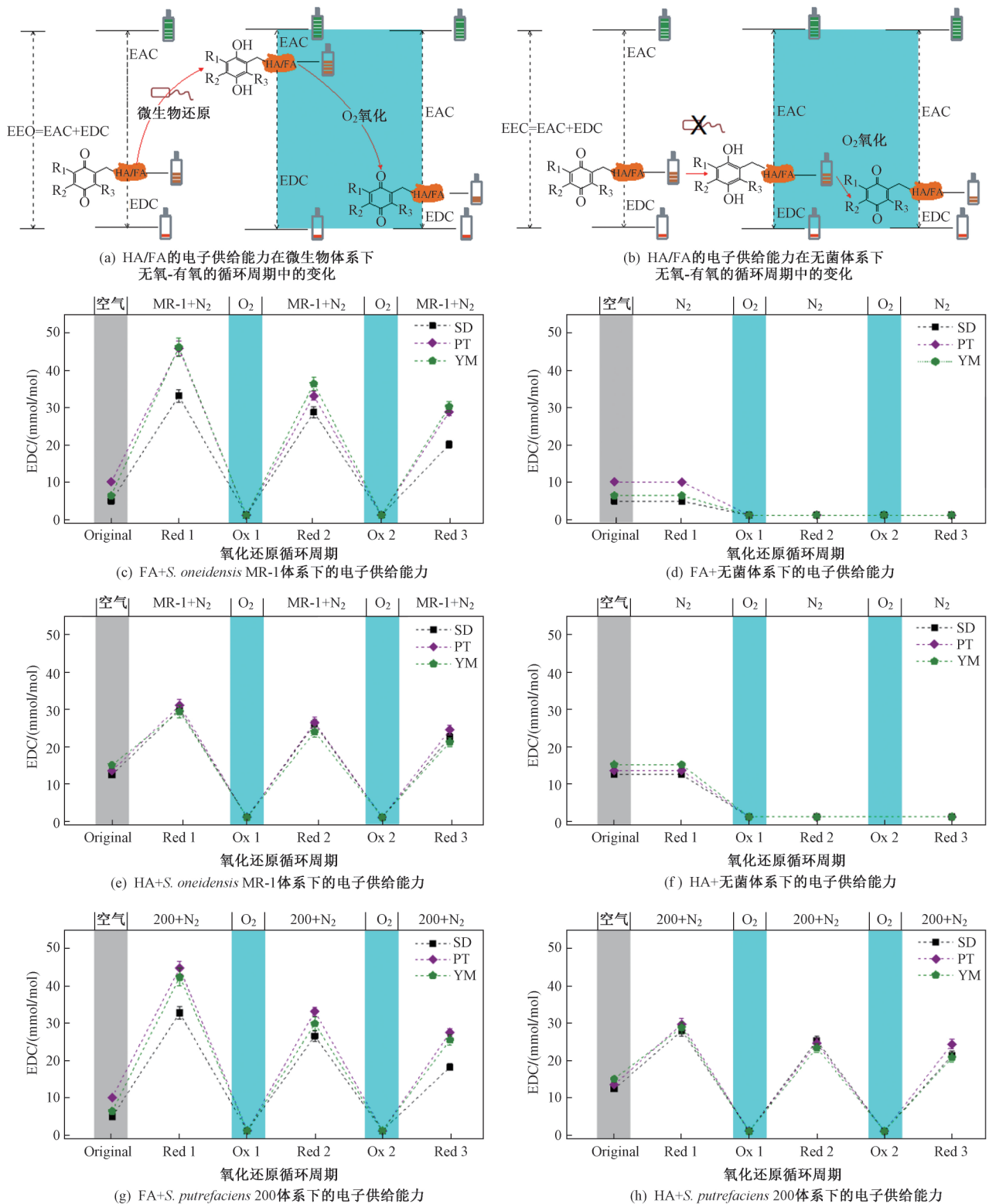
荧光光谱采用荧光光度计[Hitachi F-7000 型, 日立(中国)有限公司]进行测定. 激发光源为 150 W 氙弧灯, 光电倍增管电压为 700 V, 信噪比>110, 扫描速率为 12 000 nm/min, 激发和发射单色仪的狭缝宽度均为 10 nm, 响应时间设置为自动. 激发波长(λ_{Ex})范围为 200~450 nm, 增量为 5 nm; 发射波长(λ_{Em})范围为 280~550 nm, 增量为 5 nm. 三维荧光光谱的平行因子分析是采用带有 DOMFluor 工具箱的 MATLAB R2100a 软件进行模拟, 具体程序编写与操作步骤见文献[29]. 对于微生物厌氧还原后的 HA 和 FA 溶液样品, 需预先进行离心(10 000 r/min)以去除溶液中微生物, 并采用元素分析仪(Multi N/C 2100 型, 德国耶拿分析仪器股份公司)测定 TOC 浓度, 调节所有样品的 TOC 浓度一致以保证荧光强度不受 HA 或 FA 浓度的影响, 然后再进行荧光光谱分析.

2 结果与讨论

2.1 土壤腐殖质电子供给能力在微生物还原- O_2 氧化循环周期中的波动特征

该研究通过定量分析土壤 HA 和 FA 在 3 个 *S. oneidensis* MR-1/*S. putrefaciens* 200 厌氧还原- O_2 氧化循环周期中 EDC 的变化特征来分析土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力, 结果如图 1 所示. 从图 1 可以看出, 不管是 HA 还是 FA, 二者的电子供给能力在各循环周期中均表现出相同的变化规律, 在经过第 1 次 48 h 微生物厌氧还原后其电子供给能力显著提高, 而当利用 O_2 对还原的样品进行第 1 次氧化后其电子供给能力呈降低趋势, 这种波动特征在第 2 次和第 3 次微生物厌氧还原- O_2 氧化循环周期中也得到了很好的体现, 说明土壤 HA 和 FA 在微生物与电子受体[Fe(III)Cit]之间起到了电子穿梭体的作用, 且这种作用具有一定的持续性. HA 和 FA 的电子穿梭体功能与充电电池相类似, 被微生物厌氧还原后的状态相当于电池的充电状态, 而被 O_2 重新氧化后的状态则相当于电池的放电状态[见图 1(a)]. 充电电池经过多次充电放电之后其最大充电量就无法达到原来的水平, 与之类似, HA 和 FA 经过多次还原氧化之后其潜在的电子供给能力也会有所降低.

微生物厌氧还原后 HA 和 FA 的电子供给能力随循环周期呈逐渐降低的趋势, 说明 HA 和 FA 作为电子穿梭体的功能会呈逐渐下降趋势. 然而也有研究表明, 评判这种电子供给能力的大小还需要考虑提供电子给微生物的乳酸盐的丰富程度^[30], 这就需要在循环周期的后期及时补充乳酸盐, 以保证微生物在代



注: EAC 为电子接受能力, EEC 电子转移量. SD、PT 和 YM 分别为水稻地、葡萄园和杨梅园. Original 表示初始状态,

Red 1、Red 2 和 Red 3 分别表示第 1 次、第 2 次和第 3 次还原, Ox 1 和 Ox 2 分别表示第 1 次和第 2 次氧化.

MR-1+N₂、200+N₂ 和 N₂ 分别表示 *S. oneidensis* MR-1、*S. putrefaciens* 200 和无菌体系. 下同.

图 1 HA/FA 在微生物与无菌体系下的电子供给能力随无氧-有氧循环周期的变化

Fig.1 The change of HA/FA electron donating capacity under microbial and sterile system with anaerobic-aerobic cycles

谢过程中有持续电子来源. 同时测定微生物厌氧还原后 HA 和 FA 的电子接受能力(EAC), 以更好地

判断 HA 和 FA 作为电子穿梭体的持续能力. 如果腐殖质的电子供给能力和电子接受能力的总和在整个

循环周期中都没有产生明显波动,就可以断定 HA 和 FA 作为电子穿梭体的功能具有可持续性,因为腐殖质电子供给能力与电子接受能力的总和是由腐殖质中具有氧化还原活性的官能团水平所决定的。Klöpfer 等^[12]研究发现,HA 和 FA 从微生物厌氧还原到 O_2 重新氧化的过程,氧化还原电位发生了较大变化,但就单一比较微生物厌氧还原后或 O_2 重新氧化后的 HA 和 FA 的氧化还原电位,不同样品之间差异不大,均集中在一个很窄的范围内,说明 HA 和 FA 的微生物厌氧还原过程是一个由乳酸盐驱动的动力学过程。

该研究在微生物厌氧还原- O_2 氧化的循环周期中对 HA 和 FA 提纯后进行三维荧光光谱分析,并采用平行因子分析法识别出 HA^[25] 和 FA 中的 4 个荧光组分(见图 2),其中组分 C1、C2 和 C3 为类胡敏酸或类富里酸组分,C4 为类蛋白质物质。基于上述 4 个荧光组分计算得到类胡敏酸和类富里酸组分(C1、C2 和 C3)占全荧光组分的百分比,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,除极个别样品外,大部分样品的 HA 和 FA 氧化还原官能团含量在整个循环周期中没有发生显著变化,表明被微生物厌氧还原后 HA 和 FA 的电子供给能力随循环周期的进行呈逐渐降低的趋势与腐殖质氧化还原官能团的变化无关,而可能与乳

酸盐被逐渐消耗导致后期供应不足有关,这也间接地为 HA 和 FA 作为电子穿梭体具有较好的可持续性提供了有力证据。

在微生物还原- O_2 氧化的循环周期中,HA 和 FA 初始的电子供给能力高于经过 O_2 重新氧化后的电子供给能力[见图 1(c)(e)(g)(h)],表明初始的 HA 和 FA 没有被充分氧化,仍保存有一定的本底还原容量,也表明空气对 HA 和 FA 的氧化不如纯 O_2 对 HA 和 FA 的氧化那么彻底。由此可见,HA 和 FA 的潜在电子供给能力需要经过纯 O_2 的彻底氧化才可以得到体现。3 次微生物厌氧还原后 HA 和 FA 的电子供给能力在不同样品之间表现出较大波动,而在两次 O_2 重新氧化后 HA 和 FA 的电子供给能力在不同样品之间却比较集中(见图 1),这也进一步说明了从微生物厌氧还原到 O_2 重新氧化的过程中 HA 和 FA 的电子得到了彻底释放。另外,还有一种可能存在的机制是,即使 HA 和 FA 没有被 O_2 彻底氧化,但由于其中氧化还原活性官能团的失效而导致无法释放电子,这在以 $Fe(III)$ Cit 为电子受体时的情况中也是如此。

2.2 两种微生物体系下土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体持续能力的比较

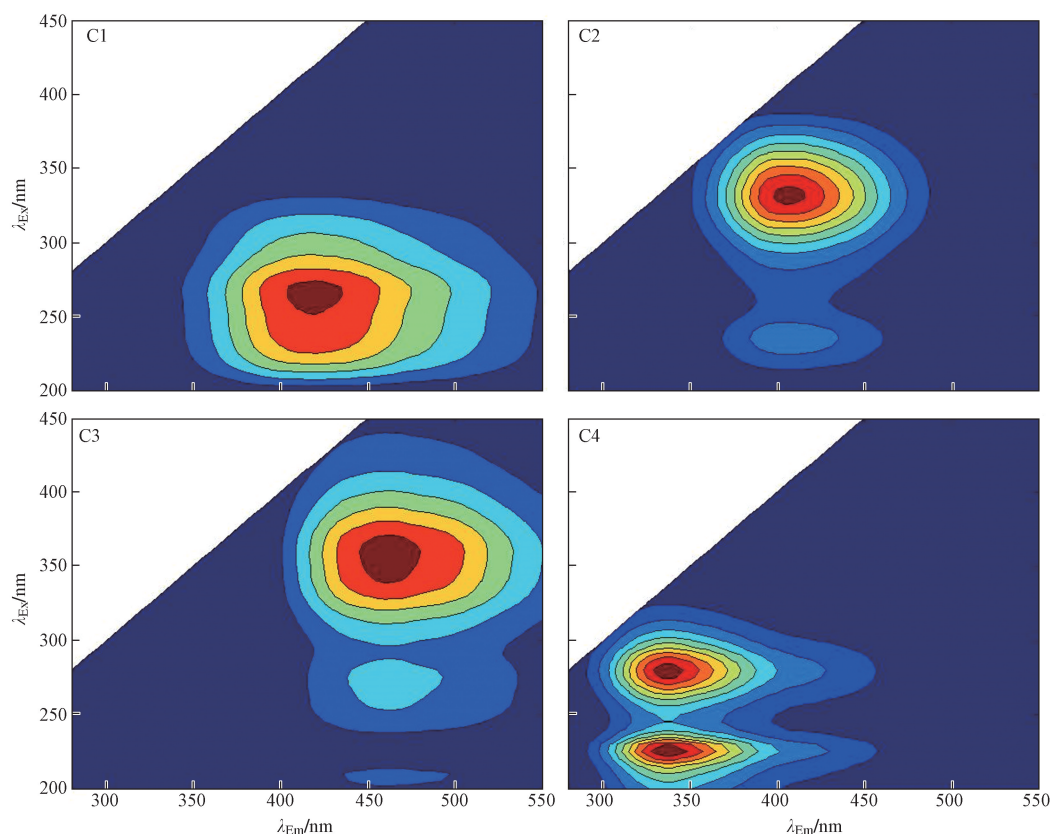


图2 土壤 FA 中平行因子分析鉴定出的 4 个荧光组分

Fig.2 Parallel factor analysis identified four independent fluorescence components of FA in soil

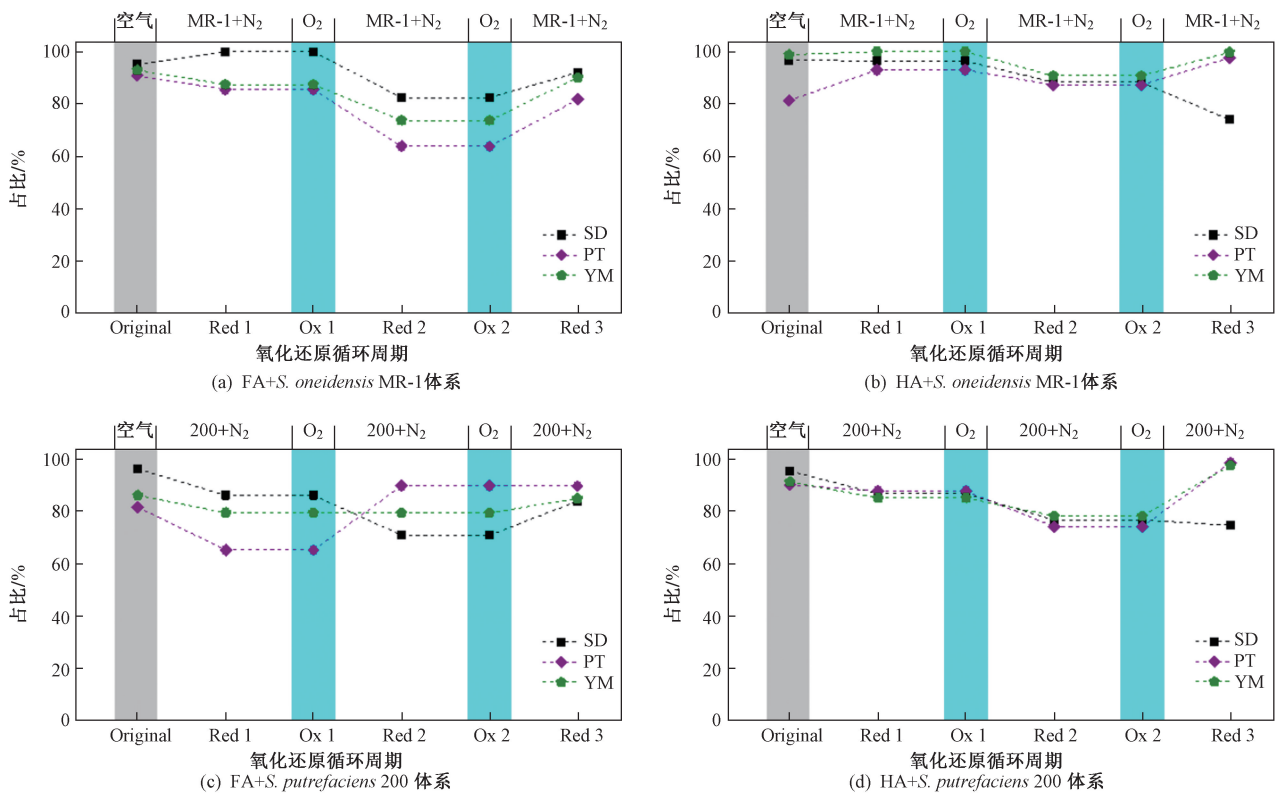


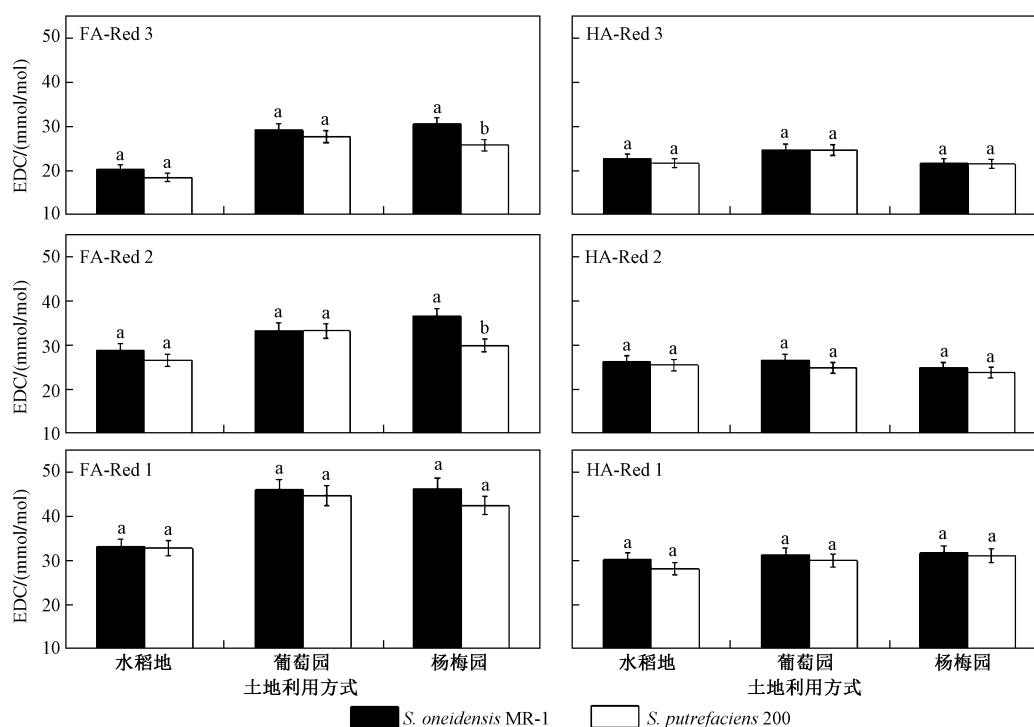
图3 微生物体系下 HA/FA 中类胡敏酸和类富里酸荧光组分 (C1、C2 和 C3) 在全荧光组分中的占比在 3 个连续无氧-有氧循环周期中的变化

Fig.3 Changes of humic acid-like and fulvic acid-like fluorescent components (C1, C2 and C3) in HA/FA under three microbial systems in three consecutive anaerobic-aerobic cycles

在 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 两种微生物体系下, HA 和 FA 的电子供给能力在整个循环周期中呈规律性的变化特征, 经微生物厌氧还原后电子供给能力增加, 而经 O_2 重新氧化后又恢复至初始水平 (见图 1), 表明两种微生物都可以很好地在这种间歇式的缺氧和曝气的环境中生存. HA 的电子供给能力在 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 两种微生物体系下没有明显差异, 而杨梅园土壤中 FA 在第 2 次和第 3 次微生物厌氧还原后的电子供给能力表现为 *S. oneidensis* MR-1 体系显著高于 *S. putrefaciens* 200 体系 ($P < 0.05$) (见图 4), 表明在 *S. oneidensis* MR-1 体系下腐殖质具有更强的电子穿梭体功能. 尽管 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 都能适应兼气性环境, 但在土壤、湿地、海洋与湖泊沉积物等环境中 *S. oneidensis* MR-1 比 *S. putrefaciens* 200 具有更广泛的分布^[31-33], 表明 *S. oneidensis* MR-1 在间歇性缺氧和曝气的环境中具有更强的适应能力和生存策略. 该研究中 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 都是在相同浓度的乳酸盐条件下进行, 但 *S. oneidensis* MR-1 可能对碳源乳酸盐具有更高的利用

效率, 导致其体系下腐殖质表现出更高的电子穿梭体功能. *S. putrefaciens* 200 可能具有较低的乳酸盐利用效率, 导致其将腐殖质作为新陈代谢的碳源, 这可能使 HA 和 FA 中部分氧化还原活性官能团失效, 进而导致腐殖质作为电子穿梭体的功能减弱.

尽管 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 对还原后 HA 和 FA 的电子供给能力会产生不同的影响机制, 但还原后 HA 和 FA 的电子供给能力随循环周期进行所产生的降幅在 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 两种微生物体系下并没有明显差异, 表明两种微生物与土壤腐殖质之间的电子传递机制是相同的. 由于纳米导线机制通常是在微生物无法接触到电子受体的情况下才被诱导产生^[34-35], 但该研究中采用的电子受体 HA 和 FA 都是溶解性的, 与微生物具有良好的接触机会, 因此, *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 两种微生物可能主要是通过直接电子传递的机制将细胞内代谢产生的电子传递给电子受体 HA 和 FA. 间歇性的曝气会对微生物的生长产生影响, 但 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 两种微生物之间直接电子传递机制的一致性却没有



注:不同小写字母表示 HA 或 FA 的电子供给能力在 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 微生物体系下差异显著 ($P < 0.05$).

图4 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 微生物体系下 HA/FA 厌氧还原后电子供给能力的比较

Fig.4 Comparison of the electron donating capacity after HA/FA anaerobic reduction in *S. oneidensis* MR-1 and *S. putrefaciens* 200

发生改变,说明两种微生物在直接电子传递机制上可能是由相同或同源的外膜蛋白在起作用,这种外膜蛋白主要由 OmcA 和 MtrC 构成^[36].

2.3 HA 和 FA 作为胞外电子穿梭体的持续能力的比较

由表 2 可知,HA 初始的电子供给能力强于 FA,说明在空气条件下 HA 能够保存更多有还原态的官能团.通常情况下,HA 的分子量和有机碳密度均大于 FA^[22,37],HA 的结构中羧基碳的含量低于 FA^[38],HA 的这种特征会保证其中的氧化还原活性官能团处于较掩蔽位置,从而使其较难被空气所氧化.然而,当经过第 1 次微生物厌氧还原后,所有土壤样品中 HA 的电子供给能力却明显弱于 FA(见表 2),说明 FA 中含有更多的能够被微生物还原的氧化还原活性官能团,而分子量较大的 HA,尽管可能含有更多的氧化还原活性官能团,但由于大部分处于掩蔽位置,从而使其无法被微生物所接触,这也间接地说明了微生物与土壤腐殖质之间的电子传递过程主要是通过直接电子传递机制.当经过第 2 次微生物厌氧还原后,水稻地土壤样品中 HA 与 FA 的电子供给能

力无显著差异,经过第 3 次微生物厌氧还原后的水稻地样品中 HA 的电子供给能力大于 FA(见表 2),说明 HA 和 FA 作为电子穿梭体的持续能力存在差异,其中 HA 的持续能力强于 FA.

进一步对比分析每次经过微生物厌氧还原后 HA 和 FA 电子供给能力变化幅度的差异,结果如表 3 所示.由表 3 可知,FA 经过第 1 次微生物厌氧还原 (Red 1) 后的电子供给能力与初始 (Original) 电子供给能力的比值 (EDC_{Red1}/EDC_{Orig}) 大于 HA,但 FA 的 EDC_{Red2}/EDC_{Red1} 和 EDC_{Red3}/EDC_{Red1} (即 ESC) 均小于 HA,说明经过多次微生物厌氧还原后,HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力明显强于 FA.这种现象说明 FA 的结构更不稳定,在电子穿梭过程中更容易失效.实际上,尽管 FA 的氧化度较高,但其在缺氧和溶液体系中较为稳定,HA 则相反.假设 HA 和 FA 电子供给能力的降低是由乳酸盐逐渐被消耗所引起的,说明微生物还原 FA 比还原 HA 需要更多的乳酸盐,但无论如何,在乳酸盐-微生物-土壤腐殖质体系下,HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力明显强于 FA.在真实土壤环境中,微生物的碳源尽管被逐渐消耗,但也会

表 2 HA 与 FA 经微生物厌氧还原后电子供给能力的比较

Table 2 Comparison of electron donating capacity of HA and FA after anaerobic reduction in microbial system

土地利用方式	EDC _{Orig} / (mmol/mol)	<i>S. oneidensis</i> MR-1 体系			<i>S. putrefaciens</i> 200 体系		
		EDC _{red1} / (mmol/mol)	EDC _{red2} / (mmol/mol)	EDC _{red3} / (mmol/mol)	EDC _{red1} / (mmol/mol)	EDC _{red2} / (mmol/mol)	EDC _{red3} / (mmol/mol)
SD	12.5±0.62 ^b	30.1±1.50 ^{bc}	26.2±1.31 ^{bc}	22.6±1.13 ^b	28.1±1.40 ^c	25.4±1.27 ^{cd}	21.5±1.08 ^c
HA PT	13.6±0.68 ^{bc}	31.1±1.56 ^{bc}	26.5±1.33 ^{bc}	24.6±1.23 ^b	29.9±1.49 ^{bc}	24.7±1.23 ^{cd}	24.5±1.23 ^b
YM	15.2±0.76 ^a	29.5±1.48 ^c	24.1±1.20 ^c	21.3±1.06 ^{bc}	29.0±1.45 ^c	23.5±1.17 ^d	20.9±1.04 ^{cd}
SD	4.92±0.25 ^f	33.1±1.66 ^b	28.8±1.44 ^b	20.1±1.00 ^c	32.7±1.64 ^b	26.5±1.33 ^c	18.2±0.91 ^d
FA PT	10.1±0.50 ^d	46.0±2.30 ^a	33.2±1.66 ^a	28.9±1.44 ^a	44.7±2.23 ^a	33.1±1.66 ^a	27.5±1.37 ^a
YM	6.42±0.32 ^c	46.2±2.31 ^a	36.4±1.82 ^a	30.3±1.51 ^a	42.3±2.12 ^a	29.8±1.49 ^b	25.5±1.28 ^{ab}

注: EDC_{Orig}、EDC_{red1}、EDC_{red2}和 EDC_{red3}分别表示初始、第1次还原、第2次还原和第3次还原的电子供给能力;不同小写字母表示 HA 和 FA 的电子供给能力差异显著($P<0.05$).

表 3 不同微生物体系下厌氧还原后 HA 与 FA 电子供给能力相对变化幅度的比较

Table 3 Comparison of the relative changes of HA and FA electron donating capabilities after anaerobic reduction in different microbial systems

土地利用方式	<i>S. oneidensis</i> MR-1 体系			<i>S. putrefaciens</i> 200 体系		
	EDC _{red1} /EDC _{Orig}	EDC _{red2} /EDC _{red1}	ESC/%	EDC _{red1} /EDC _{Orig}	EDC _{red2} /EDC _{red1}	ESC/%
SD	2.41 ^c	0.87 ^a	75.1 ^a	2.25 ^c	0.91 ^a	76.7 ^{ab}
HA PT	2.29 ^c	0.85 ^a	79.0 ^a	2.20 ^c	0.83 ^{bc}	82.1 ^a
YM	1.94 ^d	0.82 ^a	72.1 ^a	1.91 ^d	0.81 ^c	72.1 ^b
SD	6.73 ^a	0.87 ^a	60.7 ^b	6.65 ^a	0.81 ^c	55.7 ^d
FA PT	4.56 ^b	0.72 ^b	62.8 ^b	4.43 ^b	0.74 ^{cd}	61.5 ^c
YM	7.20 ^a	0.79 ^b	65.5 ^b	6.59 ^a	0.71 ^d	60.3 ^{cd}

注: 不同小写字母表示 HA 和 FA 的电子供给能力相对变幅差异显著($P<0.05$).

有新碳源的不断输入,从而保证了在微生物生长周期内碳源会处于一个相对平衡的状态^[37],这在一定程度上可能会削弱 FA 和 HA 作为电子穿梭体的持续能力的差异.

不同土壤环境条件下 HA 和 FA 的形成顺序也存在差异^[36,39],从利用土壤腐殖质作为电子穿梭体来促进污染物降解转化的角度来说,可通过一定的环境调控措施形成 HA,实现土壤污染物的降解转化.然而,目前关于土壤腐殖质形成的机制仍不甚清晰,存在很多不同的土壤腐殖质形成学说,不同学说对 HA 和 FA 形成的顺序甚至持对立观点^[40],因此,弄清土壤腐殖质的形成机制是理解腐殖质环境效应的前提.

2.4 不同土地利用方式土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体持续能力的比较

不同土地利用方式之间,土壤中 HA 初始电子供给能力的波动比较大,而 FA 初始电子供给能力的波动则相对较为稳定(见图1).水稻地和果园(葡萄园和杨梅园)土壤具有相同的成土过程,但前者 HA 和 FA 的

初始电子供给能力明显小于后者(见图1和表2),且杨梅园土壤中 HA 初始电子供给能力最高,而葡萄园土壤中 FA 初始电子供给能力最高,表明土地利用方式对土壤 HA 和 FA 的初始电子供给能力具有显著影响.

当经过第1次微生物厌氧还原后,水稻地、葡萄园和杨梅园土壤之间 HA 的电子供给能力差异不大,而水稻地土壤中 FA 的电子供给能力明显小于葡萄园和杨梅园土壤 FA 的电子供给能力;经过第2次和第3次微生物厌氧还原后,三者表现出相同的变化趋势,可能是由于负载在 FA 表面的氧化还原活性官能团含量受控于土壤成土过程和用地类型.

进一步对比分析每次经过微生物厌氧还原后不同土地利用方式下土壤中 HA 和 FA 电子供给能力变化幅度的差异,由表3可知,*S. oneidensis* MR-1 体系下,水稻地和葡萄园土壤中 HA 经第1次微生物厌氧还原后其 EDC_{red1}/EDC_{Orig} 明显高于杨梅园,而水稻地和杨梅园土壤中 FA 的 EDC_{red1}/EDC_{Orig} 明显高于葡萄园;水稻地土壤中 HA 和 FA 经过第2次微生物厌氧还原后

EDC_{Red2}/EDC_{Red1} 显著高于葡萄园和杨梅园;而 HA 或 FA 经过第 3 次微生物厌氧还原后 EDC_{Red3}/EDC_{Red1} (电子穿梭体的持续能力)在水稻地、葡萄园和杨梅园之间无显著差异。*S. putrefaciens* 200 体系下,第 1 次和第 2 次微生物还原后的 EDC_{Red1}/EDC_{Orig} 和 EDC_{Red2}/EDC_{Red1} 表现出相同的变化趋势。但是,第 3 次微生物还原后电子穿梭体的持续能力在 3 种土地利用方式中表现出不同的趋势,HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力表现为葡萄园最大,水稻地次之,杨梅园最小;FA 作为胞外电子穿梭体的持续能力表现为葡萄园最大,杨梅园次之,水稻地最小。平均而言,水稻地、葡萄园和杨梅园土壤中 HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力分别为 75.9%、80.5%和 72.1%,FA 作为胞外电子穿梭体的持续能力分别为 58.2%、62.2%和 62.9%,不同土地利用方式下腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力有所不同。这可能是土地利用方式、耕作管理方式和土壤理化性质的不同,引起土壤腐殖质的组成、转化和分解过程不同^[21],进而导致不同土地利用方式下土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力存在差异。此外,不同土地利用方式引起微生物电子供体碳源驱动的动力学过程不同,也会导致土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力存在差异。

3 结论

a) 土壤腐殖质在微生物与电子受体铁矿物间的电子传递过程中可以很好地充当胞外电子穿梭体的角色,其持续能力随微生物还原- O_2 氧化循环周期的变化主要由微生物电子供体碳源驱动的动力学过程所控制。

b) 相对于 *S. putrefaciens* 200 体系而言,*S. oneidensis* MR-1 体系下土壤腐殖质具有更强的电子穿梭体功能,但土壤腐殖质作为胞外电子穿梭体的持续能力在 *S. oneidensis* MR-1 和 *S. putrefaciens* 200 两种微生物体系下并没有明显差异。

c) 水稻地、葡萄园和杨梅园土壤中 HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力分别为 75.9%、80.5%和 72.1%,FA 作为胞外电子穿梭体的持续能力分别为 58.2%、62.2%和 62.9%,不同土地利用方式土壤间具有显著差异;同时,HA 作为胞外电子穿梭体的持续能力明显强于 FA,这可能是由 FA 结构稳定性较差以及微生物在还原 FA 过程中电子供体碳源利用效率较低所致。

参考文献 (References):

[1] LOVLEY D R, COATES J D, BLUNT-HARRIS E L, et al. Humic

substances as electron acceptors for microbial respiration [J]. Nature, 1996, 382: 445-448.

[2] RODEN E E, KAPPLER A, BAUER I, et al. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances [J]. Nature Geoscience, 2010, 3(6): 417-421.

[3] SCOTT D T, MCKNIGHT D M, BLUNT-HARRIS E L, et al. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms [J]. Environmental Science & Technology, 1999, 32: 2984-2989.

[4] AESCHBACHER M, SANDER M, SCHWARZENBACH R P. Novel electrochemical approach to assess the redox properties of humic substances [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(1): 87-93.

[5] AESCHBACHER M, VERGARI D, SCHWARZENBACH R P, et al. Electrochemical analysis of proton and electron transfer equilibria of the reducible moieties in humic acids [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45: 8385-8394.

[6] TAN Wenbing, XI Beidou, WANG Guo'an, et al. Increased electron-accepting and decreased electron-donating capacities of soil humic substances in response to increasing temperature [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51: 3176-3186.

[7] LOVLEY D R, KASHEFI K, VARGAS M, et al. Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms [J]. Chemical Geology, 2000, 169: 289-298.

[8] KAPPLER A, BENZ M, SCHINK B, et al. Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47: 85-92.

[9] WOLF M, KAPPLER A, JIANG J, et al. Effects of humic substances and quinones at low concentrations on ferrihydrite reduction by *Geobacter metallireducens* [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(15): 5679-5685.

[10] SHENG A, LIU J, LI X, et al. Labile Fe(III) from sorbed Fe(II) oxidation is the key intermediate in Fe(II)-catalyzed ferrihydrite transformation [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2020, 272: 105-120.

[11] BORCH T, KRETZSCHMAR R, KAPPLER A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44: 15-23.

[12] KLÜPFEL L, PIEPENBROCK A, KAPPLER A, et al. Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments [J]. Nature Geoscience, 2014, 7(3): 195-200.

[13] LANDMAN W. Climate change 2007: the physical science basis [J]. South African Geographical Journal, 2010, 92(1): 86-87.

[14] TAN W, JIA Y, HUANG C, et al. Increased suppression of methane production by humic substances in response to warming in anoxic environments [J]. Journal of Environmental Management, 2018, 206: 602-606.

[15] RATASUK N, NANNY M A. Characterization and quantification of reversible redox sites in humic substances [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(22): 7844-7850.

[16] BAUER I, KAPPLER A. Rates and extent of reduction of Fe(III) compound and O_2 by humic substances [J]. Environmental Science

- & Technology, 2009, 43:4902-4908.
- [17] SHAVER G R, CANADELL J, CHAPIN F S, *et al.* Global warming and terrestrial ecosystems: a conceptual framework for analysis [J]. *BioScience*, 2000, 50(10): 871-882.
- [18] FENG X, SIMPSON A J, WILSON K P, *et al.* Increased cuticular carbon sequestration and lignin oxidation in response to soil warming [J]. *Nature Geoscience*, 2008, 1(12): 836-839.
- [19] PISANI O, HILL K M, COURTIER-MURIAS D, *et al.* Accumulation of aliphatic compounds in soil with increasing mean annual temperature [J]. *Organic Geochemistry*, 2014, 76: 118-127.
- [20] 朱仁欢, 郑子成, 李廷轩, 等. 植茶年限对土壤水稳性团聚体腐殖质组分特征的影响 [J]. *环境科学研究*, 2018, 31(6): 1096-1104.
- ZHU Renhuan, ZHENG Zicheng, LI Tingxuan, *et al.* Effect of tea plantation age on humus fractions in soil water-stable aggregates [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2018, 31(6): 1096-1104.
- [21] PISANI O, FREY S D, SIMPSON A J, *et al.* Soil warming and nitrogen deposition alter soil organic matter composition at the molecular-level [J]. *Biogeochemistry*, 2015, 123(3): 391-409.
- [22] XI B, TANG Z, JIANG J, *et al.* Responses of the electron transfer capacity of soil humic substances to agricultural land-use types [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(57): 32588-32596.
- [23] TAN W B, YUAN Y, ZHAO X Y, *et al.* Soil solid-phase organic matter-mediated microbial reduction of iron minerals increases with land use change sequence from fallow to paddy fields [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 676: 378-386.
- [24] TAN W, YUAN Y, ZHAO X, *et al.* Soil solid-phase organic matter-mediated microbial reduction of iron minerals increases with land use change sequence from fallow to paddy fields [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 676: 378-386.
- [25] XI B, TANG Z, JIANG J, *et al.* Responses of the electron transfer capacity of soil humic substances to agricultural land-use types [J]. *RSC Advances*, 2018, 8: 32588.
- [26] SWIFT R S. *Organic Matter Characterization* [M]. Madison: Soil Science Society of America, 1996: 1018-1021.
- [27] TAN Wenbing, XI Beidou, WANG Guo'an, *et al.* Microbial-accessibility-dependent electron shuttling of in situ solid-phase organic matter in soils [J]. *Geoderma*, 2019, 338: 1-4.
- [28] TAN W, WANG G, ZHAO X, *et al.* Molecular-weight dependent redox cycling of humic substances of paddy soils over successive anoxic and oxic alternations [J]. *Land Degradation & Development*, 2019, 30: 1130-1144.
- [29] STEDMON C A, BRO R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial [J]. *Limnology and Oceanography-Methods*, 2008, 6: 572-579.
- [30] JIANG J, KAPPLER A. Kinetics of microbial and chemical reduction of humic substances: implications for electron shuttling [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42: 3563-3569.
- [31] DICHRISTINA T J, DELONG E F. Design and application of ribosomal-rna-targeted oligonucleotide probes for the dissimilatory iron-and manganese-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 59(12): 4152-4160.
- [32] TODOROVA S G, COSTELLO A M. Design of *Shewanella*-specific 16S rRNA primers and application to analysis of *Shewanella* in a minerotrophic wetland [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(3): 426-432.
- [33] ZIEMKE F, BRETTAR I, HÖFLE M G. Stability and diversity of the genetic structure of a *Shewanella putrefaciens* population in the water column of the central Baltic [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1997, 13: 63-74.
- [34] MALVANKAR N S, LOVLEY D R. Microbial nanowires: a new paradigm for biological electron transfer and bioelectronics [J]. *ChemSusChem*, 2012, 5(6): 1039-1046.
- [35] MALVANKAR N S, LOVLEY D R. Microbial nanowires for bioenergy applications [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 88-95.
- [36] LOVLEY D R, UEKI T, TIAN Z, *et al.* Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology and practical applications [J]. *Advances Microbial Physiology*, 2011, 59: 1-100.
- [37] STEVENSON F J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1982: 309-336.
- [38] 王嗣淇, 张伟强, 邱素芬. 腐殖质胶结团聚体对苯酚的富集特征 [J]. *环境科学研究*, 2018, 31(11): 1940-1948.
- WANG Siqi, ZHANG Weiqiang, QIU Sufen. Enrichment characteristics of phenol on humus cemented aggregates [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2018, 31(11): 1940-1948.
- [39] TRESEDER K K, HOLDEN S R. Fungal carbon sequestration [J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1528-1529.
- [40] 窦森. 土壤有机质 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 46-71.

(责任编辑: 周巧富)