

熊娟,方静,许运,等.腐殖质氧化还原能力评价方法及其应用[J].华中农业大学学报,2025,44(4):22-36.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.04.003

腐殖质氧化还原能力评价方法及其应用

熊娟,方静,许运,谭文峰

华中农业大学资源与环境学院/生态环境部土壤健康诊断与绿色修复重点实验室,武汉 430070

摘要 腐殖质作为土壤和沉积物普遍存在的天然有机物质,在生态系统物质循环和能量流动过程中至关重要。腐殖酸分子结构中含有的醌基等活性官能团赋予腐殖质氧化还原特性,使之在环境污染物转化、土壤肥力提升等方面发挥着关键作用。准确评价腐殖质的氧化还原能力是深入探究其环境行为和功能机制的基础。目前,评估腐殖质氧化还原能力的主要方法包括氧化还原滴定法、电化学法和微生物法等。本文综述了氧化还原滴定法、电化学法和微生物法的原理、实验和应用范围,深入剖析了各方法评价腐殖质氧化还原能力的优势与局限,氧化还原滴定法操作简单但受终点判定方式影响,定量精度受限;电化学法灵敏度高但易受外部环境干扰;微生物法能较好模拟自然条件但分析周期较长。进一步探讨了腐殖质氧化还原能力评价方法的未来发展趋势,包括新型电化学传感器的开发、原位测量技术的优化以及多技术联用策略的应用。

关键词 腐殖质; 有机质; 土壤; 氧化还原; 电子转移

中图分类号 X53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)04-0022-15

氧化还原过程是地球表生环境常见的自然现象,多见于冲积平原、沼泽和水稻土等。土壤腐殖质作为土壤有机质的主要组成部分,在生态系统中承担着多项生态功能。一方面,它作为关键的有机碳来源,不仅在碳素地球化学循环中扮演着重要角色,还可通过螯合矿质元素和自身降解为土壤生物提供养分,构建土壤生物群落,影响土壤的生物多样性^[1-2]。另一方面,腐殖质具有丰富的酸性官能团和表面负电荷,作为土壤重要的氧化还原活性组分和吸附载体,参与土壤中多数氧化还原、吸附解吸等反应,影响污染物在环境中的迁移转化^[3]。因此,腐殖质是衡量土壤肥力和土壤质量的重要指标。

腐殖质是水、土壤和沉积物环境中最重要的电子穿梭体之一,参与和控制着诸多环境行为,如温室气体排放、土壤矿物还原、污染物转化等^[4-6]。它是富含酚羟基、醌基等氧化还原活性官能团的有机高分子化合物,具有电化学活性,即电子转移能力^[7-8]。环境降水事件、河流湖泊水库溢出以及植物种植过程中土壤淹水均会导致土壤或沉积物形成厌氧环境,对腐殖质的氧化还原状态产生显著影响,腐殖质分子中醌基、半醌和酚羟基发生转变,使腐殖质表现出氧化还原能力。腐殖质氧化还原能力不仅影响其自身理化性质和反应活性,还影响环境中的生物地

球化学过程。它能作为电子受体直接参与微生物厌氧呼吸(即“腐殖质呼吸”),也可作为电子供体直接还原污染物^[6],或作为电子穿梭体介导污染物的降解转化过程^[9],促使高毒重金属的还原^[10-11]和有机污染物的生物降解^[12]。此外,腐殖质的氧化还原能力也影响着氮、磷循环,对生态系统健康和功能有着深远影响。

腐殖质氧化还原能力在环境和农业科学中的多重意义使得腐殖质的组成和结构^[13]、来源和生成^[14]、周转与固存^[15]、污染物的转化降解^[11,16-17]、土壤改良和肥力提升等多领域均涉及腐殖质氧化还原活性研究,以促进土壤质量改善、污染治理、生态系统稳定和农业可持续发展。量化评估腐殖质的氧化还原能力,是解析土壤生态系统复杂性、揭示不同环境介质条件下腐殖质的氧化还原状态的关键,便于更好地理解腐殖质在元素地球化学循环和污染物降解的行为和作用。由此可见,准确评价腐殖质的氧化还原能力对解析它在各种环境过程中的作用至关重要。根据腐殖质氧化还原能力测定原理,可将评价方法分为化学滴定法、电化学法、微生物法、光谱法和其他方法。本文通过系统比较不同评价方法在原理与机制、敏感性与精确性,适用范围和局限的异同,旨在为腐殖酸氧化还原能力测定方法的选择及

收稿日期: 2024-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(42277302)

熊娟,E-mail:jeryxiong@mail.hzau.edu.cn

了解腐殖质在氧化还原反应中的行为和功能提供依据。

1 腐殖质的氧化还原能力

腐殖质因含有大量羟基、羧基、羰基等活性官能团,表现出优越的吸附性能和氧化还原能力而备受关注^[18]。现有研究表明腐殖质氧化还原活性主要来源于类醌基团,不同氧化还原条件下腐殖酸的醌与氢醌可相互转化。氧化条件下,还原态氢醌经氧化

形成醌基^[19];还原条件下,氧化态醌基作为电子受体接受氢气、有机酸盐等无机或有机物的电子经还原形成羟醌^[20-22],进而在污染物与微生物间充当电子穿梭体传递电子,加速污染物的还原转化降解^[23]。土壤腐殖质来源广泛、组成复杂且结构多变,因此常以小分子醌物质作为模式分子来研究腐殖质的电子转移能力。如图1所示,其中,蒽醌双磺酸盐(AQDS)被普遍认为是腐殖质电子中介体的模拟物,也是最常用的模式物^[24]。

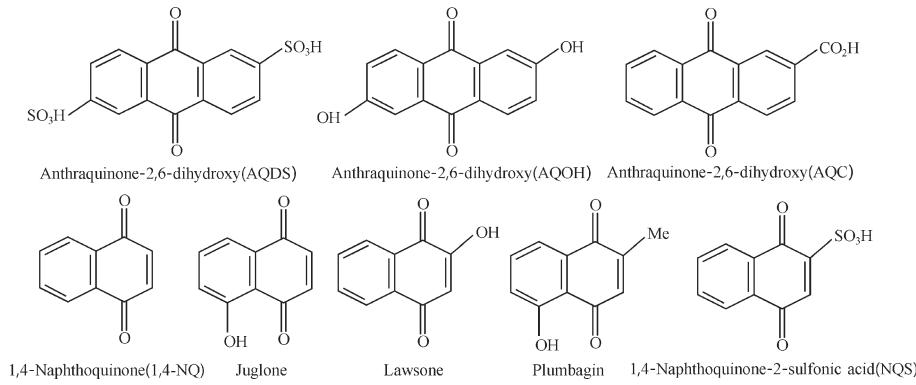
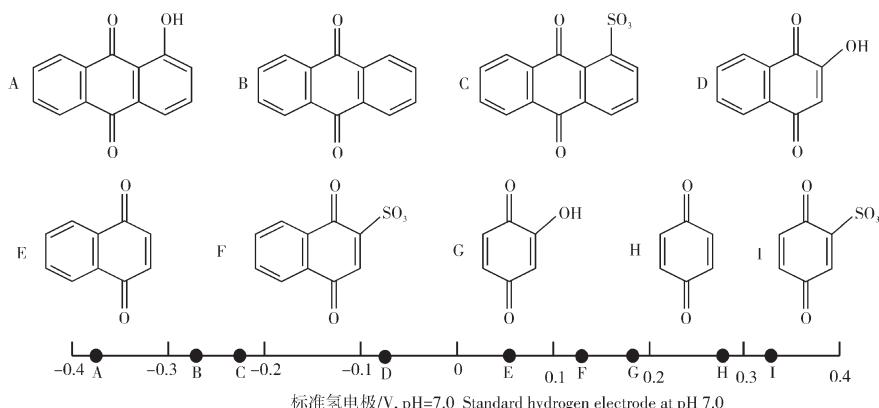


图1 常见模式醌结构^[25-26]

Fig.1 Chemical structure of quinones used as potential redox mediators

环境氧化还原电势决定了氧化还原过程中腐殖质所承担的电子传递角色。研究表明,有氧条件下还原性功能基团依然存在^[27-28],其氧化还原电势多在0.32~0.78 V^[29]。Aeschbacher等^[30]研究表明,腐殖质还原性基团在外加电压下转换为还原态。pH 7.0时,腐殖质氧化还原基团的标准还原电势在+0.15~-0.3 V,与常见醌模式物电势分布相似(图2),反映了土壤、水体等环境中腐殖酸氧化还原反应的普遍性,体现了腐殖酸在降解有机污染物或促进土壤重金属固定和转化过程中的功能和角色。

腐殖质的氧化还原能力很大程度取决于腐殖质分子结构。目前对腐殖质分子质量和结构较为统一的结论是:多芳香核形成腐殖质的中心骨架,连接着脂肪类化合物或单一酚类化合物而形成复杂大分子。也有研究发现,腐殖质表面可剥离出小分子组分,可解离腐殖质小分子与本体通过氢键和非共价键连接,卷曲装配形成超分子结合体;可解离小分子总有机碳是原液的2.0%,但还原能力为原液的33倍^[32-33]。通常而言,腐殖质碳、氢含量越高则还原性越强,富里酸(fulvic acid, FA)、胡敏酸(humic acid,



A:1,2-二羟基蒽醌 Alizarin;B:蒽醌 Anthraquinone;C:1-磺酸蒽醌 Anthraquinone-1-sulfonic acid;D:1-羟基蒽醌 1-Hydroxyanthraquinone;E:1,4-萘醌 1,4-Naphthoquinone;F:5-磺酸-1,4-萘醌 5-Sulfo-1,4-naphthoquinone;G:2-羟基-1,4-苯醌 2-Hydroxy-1,4-benzoquinone;H:1,4-苯醌 1,4-Benzoquinone;I:2-磺酸-1,4-苯醌 2-Sulfo-1,4-benzoquinone.

图2 pH 7.0时,常见醌模式物的氧化还原电势^[31]

Fig. 2 Eh-values at pH 7.0 of quinones

HA)和胡敏素(humin)三者氧含量依次减少而碳含量增多,还原能力依次增强^[34]。富里酸是亲水性非均相混合物,碳氢比值相对较低,氧碳比值相对较高,分子质量一般小于2 ku,较胡敏酸低,但它的羧基、酮羰基和羟基官能团含量高于胡敏酸,氧化还原能力明显更弱^[35]。早期腐殖质氧化还原能力研究多以胡敏酸和富里酸为研究对象,随着研究的不断深入,发现土壤和沉积物中不溶性胡敏素的氧化还原能力对元素地球化学循环、有机污染物还原转化的影响也是不可忽视的^[36]。胡敏素结构更为复杂,现阶段仍缺少深入的研究,但已有研究对原位固相腐殖质的电子转移能力进行了探索^[37-39],为今后深入研究提供了更多方向。

腐殖质氧化还原能力受其来源、pH、温度和光照等因素影响,不同地区和生态环境形成的腐殖质氧化还原能力差异显著。通常,泥炭腐殖质富含羧基和酚基,赋予腐殖质较高的还原能力;河流或湖泊的溶解性腐殖质富含酚基,具有较强的抗氧化性^[40]。除分子结构影响外,腐殖质氧化还原能力与环境条件密切相关,具有很强的pH依赖性^[41]。pH通过改变腐殖质溶解性和直接影响氧化还原体系H⁺浓度,进而影响其氧化还原电势和电子转移能力。温度和光照通过影响电子传递速率而影响腐殖质表观氧化还原能力,较高温度加速电子传递过程,而光照使腐殖质发生光解氧化而降低供电子能力^[42]。

2 腐殖质氧化还原能力评价方法

氧化还原能力是腐殖质一个复杂而多维度的特性,主要评价指标包括电子接受能力(electron-ac-

cepting capacities, EAC)、电子供给能力(electron donor capacity, EDC)和电子转移能力(electron-transfer capacity, ETC)。随分析技术不断发展,评价方法经历了多个重要发展阶段,如图3所示。20世纪初期,通过腐殖质与有机、无机物的还原或氧化反应强度评价腐殖质的氧化还原能力,这些研究提供了腐殖质电子转移的初步见解^[43-45]。进入20世纪中期,化学法已广泛用于腐殖质氧化还原能力评估^[46]。化学法将腐殖酸与不同氧化/还原剂充分反应,通过测量吸光度、电导率、电位等定量反应产物浓度来评价腐殖质氧化还原能力。虽然化学法提供了定量分析腐殖质氧化还原能力的可能性,但准确度有限。20世纪后期至今,循环伏安法、交流阻抗法、恒电流测试法、恒电位测试法等电化学技术飞速发展,通过直接测定腐殖质与电极间的电子传递量进一步提高了实验的准确性和精确度,逐渐成为腐殖质氧化还原能力评估的主流技术^[25,28,47-50];同时光谱技术作为一种高分辨率、高灵敏度的分析工具,其快速发展为腐殖质结构与氧化还原特性之间关系的精确测定提供了有效手段^[51]。近年来,微生物学方法的兴起为研究腐殖质氧化还原能力提供了新视角,通过揭示微生物参与有机物分解、代谢和土壤氧化还原反应,深化了对腐殖质在土壤生物地球化学循环中功能的认识^[38,52]。根据不同方法量化表征腐殖质电子转移能力方式的不同,将腐殖质氧化还原能力评估方法分为3类,分别是氧化还原滴定法、电化学法和微生物法,下面将从分析原理、常用反应物质,对仪器设备的要求和方法局限性等方面对上述方法进行系统性介绍。

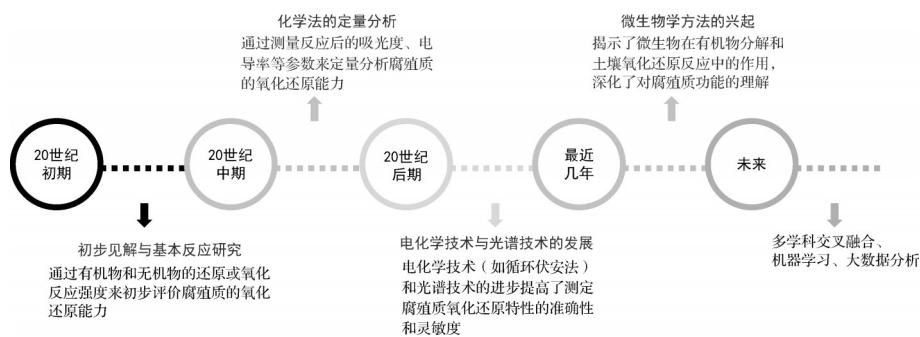


图3 腐殖质氧化还原能力评价方法的发展历程

Fig.3 Development of methods for evaluating the redox capacity of humic substances

2.1 氧化还原滴定法

腐殖质电子转移能力测定化学法可追溯至腐殖质的结构和性质研究。早期研究中,科研工作者主要通过红外光谱、核磁共振等谱学技术研究腐殖质的官能团特征和分子结构,重点关注它对重金属的

吸附^[2]。随着对HA元素组成、分子结构、分子质量、官能团、胶体性质、吸附性能、光学性质和热稳定性等理化性质认识的不断深入,研究者的兴趣逐渐转向腐殖质的电子转移特性及其在环境和生物过程中的作用,促进了腐殖质电子转移能力分析方法的发

展。氧化还原滴定法基于氧化剂/还原剂与腐殖质相互作用时的电子转移,通过测定与腐殖质反应后体系电势、氧化剂/还原剂或氧化/还原产物浓度的变化来表征腐殖质的电子转移能力。常见氧化剂或还原剂如表1所示,试剂选择不同,测定的腐殖质氧化还原能力差异显著。

常用的还原剂有H₂S、Pd/H₂、金属Zn等,反应完全后通过还原剂残余量或还原产物浓度来定量腐殖质电子转移能力,分为一步反应法和两步反应法。一步反应法如Heitmann等^[53]采用H₂S还原泥炭胡敏酸(pahokee peat reference humic acid, PPHA)后,测定H₂S的消耗量或H₂的生成量以定量分析PPHA的电子接受能力。间接滴定法是用还原剂还原腐殖质后,将被还原的腐殖质继续与氧化剂反应,测定第二步反应氧化剂的消耗量或还原产物的生成量表征腐殖质的电子转移能力。例如,Ratasuk等^[26]将不同来源的胡敏酸、富里酸以及模式醣化合物经Pd/H₂催化还原后,继续与柠檬酸铁(Ⅲ)反应,通过测定体系Fe(Ⅱ)浓度定量腐殖质的ETC。Blodau等^[54]将被金属Zn还原的溶解态有机质(DOM)与氰化铁(FeCN)反应,通过Zn的溶解量和FeCN的消耗量来

评价DOM的EAC和EDC。由表1可见,氧化还原滴定法使用不同还原剂/氧化剂还原/氧化同一腐殖质时,所测定的电子转移能力存在差异。例如,以H₂S、Zn及H₂/Pd为还原剂还原PPHA时,测定的电子转移能力大小为Zn>Pd/H₂>H₂S。金属Zn在水中表现出热力学不稳定性,易与水发生反应,以Zn为还原剂测定的电子转移量明显高于H₂S和H₂/Pd^[54]。

常见测量腐殖质电子转移能力的氧化剂包括柠檬酸铁(ferric citrate)^[21, 55]、六氰基高铁酸钾(potassium hexacyanoferrate)^[54]和液态I₂^[34]等。其中,液态I₂是氧化能力极强的氧化剂,标准电极电位远高于环境常见电位,极可能氧化腐殖质中与电子传递无关的有机部分。Peretyazhko等^[48]的研究也表明,以液态I₂和六氰高铁酸钾作为氧化剂测定的电子转移量分别高出柠檬酸铁2个和1个数量级。同一方法测定不同腐殖质的电子转移能力也存在差异。一般而言,影响腐殖质氧化还原特性的官能团包括羧基、酚羟基、苯醌、羟基醌、醇羟基等^[55],而羧基含量为陆源富里酸>水源富里酸>水源天然有机物(NOM)>水源胡敏酸>陆源胡敏酸^[56]。因此,有必要根据实验对象、条件和需求选择合适的氧化剂。

表1 腐殖质氧化还原能力的化学评价法比较

Table1 Comparison of chemical evaluation methods for the redox capacity of humic substances

腐殖质种类 Types of HA	ETC		EAC			EDC		
	Pd/Al ₂ O ₃ pH 6.5/8.0	Pd pH 8.0	H ₂ S pH 6.0/6.5	C ₆ H ₅ FeO ₇	Fe(NO ₃) ₃	FeCN pH 6.5	FeCl pH 5.0	Fe(OH) ₃ pH 6.0
AHA	1.73/1.11	0.88	0.3/3.1					
SRFA	0.60/0.48	0.13						
SRHA	0.94/0.74	0.53						
SHHA	1.68/1.14	0.75						
SHA	2.99/1.94	1.46						
PPHA ₂	0.71/0.65	0.37						
PPFA	0.71/0.65	0.37						
LHA	2.86/1.42	0.78						
阔叶林HA Broad-leaved forest HA				2.17	3.17			
PPHA ₁			0.3/3.1			0.33	0.11	0.23

注:PPHA₁:pH 6.0和6.5时分别利用硫化氢(H₂S)和锌(Zn)还原;阿尔德里奇腐殖酸(AHA)、苏万尼河富里酸(SRFA)、苏万尼河腐酸(SRHA)、苏万尼河疏水性酸(SHHA)、土壤腐殖酸(SHA)、泥炭地腐殖酸(PPHA₂)、泥炭地富里酸(PPFA)、褐煤腐殖酸(LHA)分别在(1)pH=8.0、纯Pd粉末(HA和FA:0.5 mg/mL)^[57];(2)pH 8.0, Pd/Al₂O₃;(3)pH 6.5, Pd/Al₂O₃^[26]条件下还原;常绿阔叶林HA:pH=7.0±0.1,通入H₂添加钯炭催化剂,遮光振荡72 h^[58]还原;某城市污水处理厂处带式压滤处理后的脱水污泥HA、FA:HA、FA与钯炭混合,稀释至TOC至100 mg/L,通入N₂/H₂(95% N₂, 5% H₂)的混合气体15 min,静置于厌氧培养箱遮光反应72 h,加入柠檬酸铁,使用菲洛嗪试剂法进行测定^[59]。Note:PPHA₁: H₂S and Zn reduction at pH 6.0 and 6.5, respectively; AHA, SRFA, SRHA, SHHA, SHA, PPHA₂, PPFA, LHA are respectively (1) pH=8.0, Pure Pd powder (HA and FA: 0.5 mg/mL)^[57]; (2) pH 8.0; Pd/Al₂O₃ (3) pH 6.5, Pd/Al₂O₃^[26]; Evergreen broad-leaved forest HA: pH=7.0±0.1, H₂ was added with palladium-carbon catalyst, and the light was shaken for 72 h^[58]. HA, FA of dehydrated sludge after belt press filtration treatment at a municipal sewage treatment plant: HA and FA were mixed with palladium carbon, diluted to TOC to 100 mg/L, then N₂/H₂ (95% N₂, 5% H₂) was injected into the mixture for 15 min, then placed in an anaerobic incubator for light shielding reaction for 72 h, and ferric citrate was added for determination using the phallozine reagent method^[59].

氧化还原滴定法操作简单,对设备无特殊要求,在常规化学实验室即可实现,因此在相关研究中应用广泛,但也存在明显的局限性。首先,该方法通过定量参与氧化或还原反应的反应物或产物来间接确定腐殖质的EAC和EDC,测定重复性易受实验操作影响,需严格控制操作过程尽可能减少实验误差。其次,添加的氧化剂和还原剂往往与质子发生交换耦合,导致体系pH变化而影响发生氧化还原反应的氧化还原电位^[28]。该方法耗时较长,如采用Fe³⁺再氧化定量腐殖质EDC时,需数小时甚至数天才达到氧化还原反应平衡^[57]。

2.2 电化学法

鉴于氧化还原滴定法存在的明显缺陷,随后发展了电化学法来评价腐殖质电子传递能力的强弱。如图4所示,电化学法通过电化学工作站的三电极体系(工作电极、参比电极和对电极)向腐殖质施加外加电压使其发生氧化还原反应,腐殖质既可作为氧化还原反应的电子受体又可作为电子供体,与电极间发生电子传递而形成氧化还原电流,电化学工作站直接监测还原电流来量化腐殖质的电子转移能力。根据电子传递方式,又可将电化学法分为直接电化学法(direct electrochemical reduction, DER)和介导电化学法(mediated electrochemical reduction, MER)。

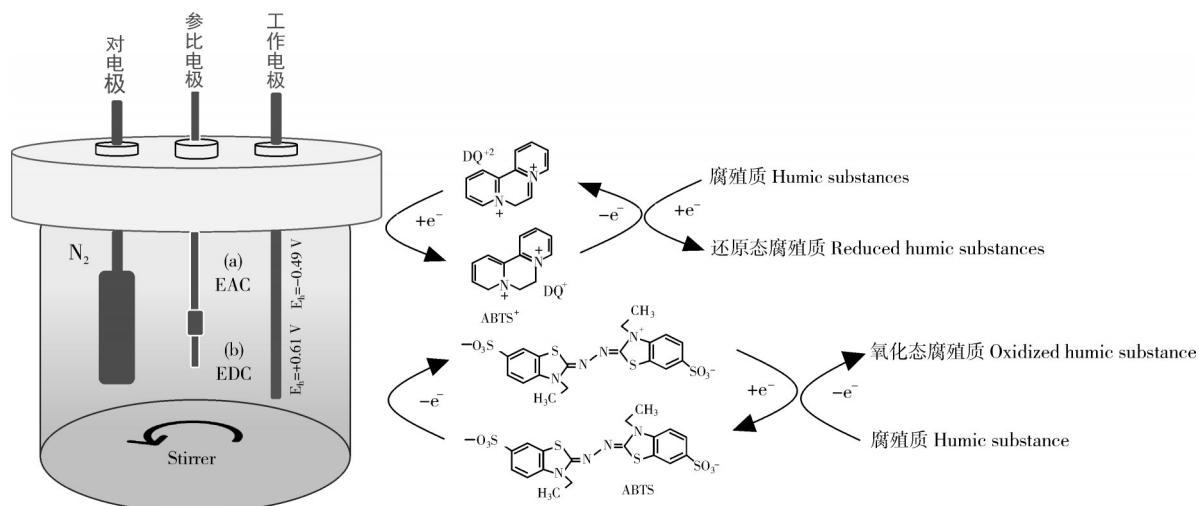


图4 腐殖质氧化还原能力的电化学测试(改自文献[12])

Fig. 4 Electrochemical test of redox capacity of humic substances (Adapted from reference [12])

直接电化学法指电子在电极与腐殖酸之间直接传递而氧化或还原腐殖酸。Yuan等^[60]采用循环伏安法研究了污泥堆肥中DOM的氧化还原行为,采用计时电流法测定了DOM的EAC与EDC,测定结果与化学滴定法相近,但电化学法能更准确地控制实验条件,更快捷地获取实验结果。Aeschbacher等^[28]建立了一套标准的腐殖质EAC与EDC电化学测试装置,如图4所示,并在直接电化学法基础上,以敌草快[(diquat) 1,1'-Ethylene-2,2'-bipyridy]和2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt, ABTS)为电极与腐殖酸间的电子穿梭体,这种测定腐殖质EAC与EDC方法即为介导电化学法。常见的介导物如表2所示,作为电极与腐殖质间的电子穿梭体,可大大加快腐殖质与电极间的电子传递速率,减少腐殖质氧化还原反应所需时间。电化学

法测定的腐殖质转移电子量可通过电流积分得到^[61]:

$$Q_{\text{EAC}} = \frac{\int I_{\text{red}} dt}{F m_{\text{HA}}} \quad (1)$$

$$Q_{\text{EDC}} = \frac{\int I_{\text{ox}} dt}{F m_{\text{HA}}} \quad (2)$$

式(1)~(2)中,I: 电流,A; F: 法拉第常数,96.485 sA/mol^[54];m: 腐殖质质量,g。

直接电化学法和介导电化学法评价腐殖质电子转移能力各有优劣。前者具有操作简单、直接观察电子转移过程等优点,但耗时较长,反应过程需要1~2 d。介导电化学法引入介导物质加快了电子传递过程而缩短了反应时间,为高通量分析和实时监测提供了极大便利,但因介导物的引入,可能影响腐殖质结构或性质、产生与腐殖质重叠的电化学信号、改变反应体系pH、离子强度或微环境等,均能导致对腐殖质电子转移能力评价产生偏差。使用介导电化

表2 介导电化学法测定腐殖质电子转移量时常用的介导物质
Table 2 A mediating substances commonly used in the determination of electron transfer in humus by mediated electrochemical method

介导物质 Mediating substances	标准还原电位/V Standard reduction potential	特性 Quality
氰甲基紫精 1,1'-Bis(cyanomethyl)-4,4'-bipyridyl, cyanomethyl viologen ^[62]	-0.14	结构相互关联,与pH无关的单电子转移反应
敌草快 (diquat) 1,1'-Ethylene-2,2'-bipyridyl ^[63-64]	-0.35	
9,10-蒽醌-2,6-二磺酸(AQDS) 9,10-Anthraquinone-2,6-disulfonic acid ^[62,65]	-0.23	水相应用方便,分子在不同氧化态间转变,是电化学反应的重要参与者
2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt	+0.68	稳定性较好和可重复性
2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸,BTS) 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	+0.22	反应速度较快,稳定性较好
2,6-二氯酚酞(DCPIP) 2,6-Dichlorophenolindophenol	/	迅速转移电子,可逆性
蒽醌-2-羧酸(AQC) Anthraquinone-2-carboxylic acid ^[66]		

学法还原腐殖质时,样品体积通常少于15 mL且浓度较低,难以获取足够的还原态腐殖酸用于后续研究。近10年来,电化学法成为腐殖质电子转移能力评估的主流技术,为研究腐殖质氧化还原的电子穿梭过程提供了诸多关键证据。Liu等^[66]将电化学测量与化学还原动力学相结合,采用电化学法直接测定腐殖质的电子供体/受体容量,研究了12种不同溶解性腐殖质的电子转移特性,提供了更接近环境条件的评价结果。Tan等^[38]将土壤物理分级技术与介导电化学测量方法相结合,利用介导电化学直接测定这些样品的微生物可还原度,反映了土壤物理化学保护机制对腐殖酸氧化还原特性的重要影响。现有研究表明,在利用电化学方法测定腐殖质的电子接受能力(EAC)时,环境中的某些组分可能会影响测定的准确性。Li等^[49]发现,亚硝酸盐(NO_2^-)会干扰电化学测定结果,从而影响对腐殖质氧化还原能力的准确评价,为消除这一影响,研究引入反硝化细菌 *Pseudomonas nitroreducens* 预处理样品,有效去除了不同氧化还原状态下腐殖质样品中的 NO_2^- ,提高了EAC测定的准确性和可靠性。这一优化方法增强了电化学技术在复杂环境体系中的适用性,为更精确地评估腐殖质的氧化还原能力提供了技术保障。此外,不同测定方法在EAC评价中可能存在系统性差异。Rincón-Rodríguez等^[67]采用介导电化学还原法(MER)和化学氧化还原滴定法(CRT)对腐殖酸和土壤的EAC进行了系统测定,并对2种方法的测定结果进行了对比分析,结果表明,2种方法测得的EAC值较为接近,但CRT法普遍高于MER,推测其原因在于CRT反应时间较长,使得更多氧化

还原基团得以充分反应。这些研究表明,在评估腐殖质氧化还原能力时,应根据实验需求选择合适的测定方法,并在必要时优化测定条件,以提高结果的准确性和可比性。

2.3 微生物法

微生物胞外呼吸(microbial extracellular respiration)是近年新发现的厌氧条件下微生物能量代谢方式,指厌氧条件下微生物在胞内彻底氧化有机物释放电子,经胞内呼吸链传递给胞外电子受体使其还原,同时释放能量维持微生物自身生长繁殖的过程^[68]。该代谢方式是涉及微生物细胞内与细胞外的电子受体和电子供体之间传递的呼吸方式。

电子穿梭体是指能够在氧化还原反应中作为中介,传递电子的化合物,是微生物胞外呼吸过程具有氧化活性的化学物质,主要功能是促进微生物胞外电子传递。现有研究证明胡敏酸可作为末端电子受体,促进有机物的厌氧微生物氧化,在有机、无机化合物的生物降解和转化中起着重要作用^[69]。Lovley等^[22]曾发现,*Geobacter metallireducens* 菌以乙酸为碳源,通过厌氧呼吸来还原腐殖质。李东阳等^[70]发现,在微生物还原六氯苯体系内加入腐殖质后,有利于脱氯反应进行,一定程度提升了六氯苯的去除效率。刘思佳等^[71]发现了富里酸在微生物胞外降解五氯苯酚过程中的介导作用,其表面羟基和羧基分别充当电子供体和电子受体的角色,显著提高了 *Shewanella oneidensis* MR-1还原降解五氯苯酚的效率(>80%)。现有研究表明,微生物学方法被广泛用于评估腐殖质在微生物介导的氧化还原反应中的作用,特别是其作为电子穿梭体促进 Fe(Ⅲ) 还原的

机制。研究发现,腐殖质中的醌基官能团在微生物驱动的电子传递过程中发挥关键作用。Li等^[72]采用电化学分析测定了不同合成醌(SQ)的EAC和EDC,发现EAC较高的SQ能够显著增强 *Klebsiella pneumoniae* L17 的 Fe(Ⅲ) 还原速率和电子传递能力,进一步验证了腐殖质作为电子穿梭体的功能。同样,Wu等^[73]研究了腐殖质在碱性细菌 *Corynebacterium humireducens* MFC-5 介导的氧化还原过程中的作用,结果表明,腐殖质的 EAC 与其醌基含量密切相关,EAC 较高的腐殖质能够有效促进 *C. humireducens* MFC-5 还原 Fe(Ⅲ) 的能力。这些研究进一步表明,微生物学方法不仅能够定量分析腐殖质的氧化还原能力,还能够揭示腐殖质在微生物驱动的 Fe(Ⅲ) 还原和环境氧化还原循环中的作用,为解析腐殖质在生物地球化学过程中的功能提供了更深入的证据。溶解性腐殖质可在液相环境中扩散迁移,自由穿梭于菌体和污染物之间,有效促进氧化还原进程^[12,74]。不溶性的胡敏素亦可作为电子介质在微生物和环境污染物的间传递电子,加速污染物还原转化。Zhang 等^[75]发现水稻土和底泥中胡敏素能参与微生物胞外呼吸,也能耦合微生物实现五氯苯酚的还原脱氯。已报道的具有还原腐殖质能力的菌株如表3所示,最常见的菌株为希瓦氏菌和地杆菌;研究者也常将微生物法与滴定法或电化学法联用来自征腐殖质的氧化还原能力。

微生物作为土壤生态系统不可或缺的部分,对腐殖质电子转移过程起着关键作用。利用微生物评价电子转移能力,能深入理解土壤微生物的代谢途径、生态功能和相互作用,有助于揭示土壤有机质循环的具体机制,为了解土壤中微生物的电子转移能力并进而为环境修复提供一定的参考依据。利用微生物评价土壤中的电子转移能力具有多方面的优势,不仅能揭示微生物的代谢途径、评估生态系统功能,还在环境修复中具有应用潜力。此外,它还有助于研究微生物种群的多样性和相互作用。然而,这一方法也面临诸多挑战,包括方法的复杂性、土壤微生物群落的异质性、实验技术的局限性以及可能的生态风险。这要求在实际应用中,需要谨慎设计实验并综合考虑多种环境和生态变量,以确保研究成果的准确性和可行性。

2.4 谱学技术

化学滴定法、电化学方法和微生物法均是通过监测氧化还原反应过程中电子转移来表征腐殖质的

氧化还原能力。腐殖酸的氧化还原活性与其分子结构和官能团特征密切相关,相关研究常采用谱学技术表征腐殖质结构和官能团,间接反映腐殖质的氧化还原活性。常用的谱学技术包括紫外-可见吸收光谱法(ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis)、红外光谱法(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、三维荧光光谱法(three-dimensional excitation-emission matrix, 3DEEM)、核磁共振光谱法(nuclear magnetic resonance, NMR) 和电子自旋共振波谱法(electronspin resonance, ESR)等。上述技术均是通过比较腐殖酸氧化还原反应前后光谱的变化来反映腐殖酸的氧化还原活性。

紫外可见吸收光谱通过测定腐殖酸在紫外和可见光波段的光吸收,分析其电子跃迁(如π-π或n-π跃迁),以揭示腐殖酸的分子结构特征,特别是芳香结构信息。常用的反映腐殖酸芳香性的指标有SUVA₂₅₄、SUVA₄₃₆、E₂₅₃/E₂₀₃等^[88]。SUVA₂₅₄与腐殖质分子的不饱和C=C键有关,SUVA₂₅₄越大,不饱和C=C键越多,腐殖质还原能力增强,电子转移能力越强。SUVA₄₃₆反映腐殖质分子的醌基、半醌基含量,醌基和半醌基是重要的电子受体,SUVA₄₃₆越大,醌基、半醌基含量越高,腐殖质氧化能力增强。

三维荧光光谱提供分子结构和官能团信息,近年该技术得到了广泛应用^[25]。腐殖质分子含有大量不饱和脂肪链和带各种官能团的芳香结构,三维荧光光谱通过同时测量不同激发波长和对应发射波长下的荧光强度,生成激发波长-发射波长的矩阵图谱,从而研究腐殖质的分子结构和官能团变化^[19,51,89-90]。Chen 等^[91]将 HA 和 FA 的荧光光谱分为 5 个区域,将各区域荧光强度进行体积积分,以此计算不同区域百分比反映腐殖质的荧光组分特征(表4)。Ex 260~265 nm、Em 460~485 nm 是典型的腐殖酸荧光区域,通过特征峰强度变化、峰位移动、新峰的出现或消失评估腐殖质的氧化还原能力及其结构变化。

红外光谱通过吸收峰位置判断官能团类型,比较腐殖质反应前后吸收峰峰位和峰强的变化,来反映腐殖酸参与氧化还原反应官能团类型与反应程度^[93]。红外谱图中,羧基和酮基的吸收峰位在1 700~1 750 和 2 500~3 500 cm⁻¹,羟基吸收峰位在3 200~3 600 cm⁻¹,芳香环、C—H 键、羰基(C=O)/烯烃(C=C)吸收峰峰位分别在1 500~1 600、

表3 腐殖质还原菌^[69]
Table 3 Humic substances reducing bacteria

	腐殖质还原菌 Humus reducing bacteria	电子供体 Electron donor	电子受体 Electron acceptor
希瓦氏菌 <i>Shewanella</i>	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 ^[76]	乳酸 Lactic acid	2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (Lawson), AQDS, AQS, HA
	<i>Shewanella putrefaciens</i> ^[77]	葡萄糖 Glucose	AQDS, HA
	<i>Shewanella saccharophila</i> ^[78]	乙酸 Acetic acid	AQDS
	<i>Shewanella cinica</i> D14 T ^[79]	乳酸 Lactic acid	AQDS
地杆菌 <i>Geobacter</i>	<i>Geobacter metallireducens</i> ^[55, 80]	乙酸 Acetic acid	AQDS, HA, HS
	<i>Geobacter sulfurreducens</i> ^[80-81]	乙酸 Acetic acid	AQDS, HA
	<i>Geobacter</i> sp. ^[82-83]	乙酸 Acetic acid、丙酸 Propionic acid、乳酸 Lactic acid、乙醇 Ethyl alcohol	AQDS, HA
	<i>Desulfotobacterium dehalogenans</i> ^[84]	乳酸 Lactic acid, H ₂	AQDS, HA
脱亚硫酸菌 <i>Desulfotobacterium</i>	<i>Desulfotobacterium PCE1</i> ^[84]	乳酸 Lactic acid, H ₂	AQDS, HA
	<i>Desulfotobacterium chlororespirans</i> Co23 ^[85]	乙酸 Acetic acid	AQDS, HA
	<i>Desulfotobacterium SDB-1</i> ^[82]	乙酸 Acetic acid、丙酸 Propionic acid、乙醇 Ethyl alcohol、琥珀酸 Succinic acid	AQDS
	<i>Desulfotobacterium FD-1</i> ^[82]	乙酸 Acetic acid、丙酸 Propionic acid、琥珀酸 Succinic acid	AQDS
发酵细菌 <i>Fermentative bacterium</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^[86]	乙酸 Acetic acid、丙酸 Propionic acid	AQDS
	<i>Enterococcus cecorum</i> ^[86]	葡萄糖 Glucose	HA
	<i>Lactococcus lactis</i> ^[86]	葡萄糖 Glucose	HA
	<i>Methanobacterium palusre</i> F ^[87]	异丙醇 Isopropanol, H ₂	AQDS
产甲烷菌 <i>Methanogen</i>	<i>Methanococcus thermolithothrophicus</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HA
	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	H ₂	AQDS, HA
	<i>Methanococcus voltae</i>	H ₂	AQDS
	<i>Methanolobus vulcani</i> PL-12/M	H ₂	AQDS
嗜热菌 <i>Thermophile</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i> MS	H ₂ 、乙酸 Acetic acid	AQDS
	<i>Methanosarcina cuniculi</i>	H ₂	AQDS, HA
	<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂	AQDS, HA
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> ^[87]	乳酸 Lactic acid, H ₂	AQDS, HS
	<i>Methanopyrus kandleri</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HS
	<i>Pyrobaculum islandicum</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HS
	<i>Pyrococcus furiosus</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HS
	<i>Pyrodictium abyssi</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HS
	<i>Thermococcus celer</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HS
	<i>Thermotoga maritima</i> ^[87]	H ₂	AQDS, HS

注:AQDS:蒽醌双磺酸盐;HS、HA均表示腐殖质。Note: AQDS: Anthraquinone disulfonate; HS and HA represent humic substances.

2 850~2 960和1 600~1 750 cm⁻¹。氧化过程增加羧基和羰基吸收峰强度,减弱芳香环和烷基C—H的吸收峰强度,而还原过程则产生相反效果。

在腐殖质氧化还原特性的表征中,光谱技术的选择需综合考量仪器成本、样品前处理要求、操作便捷性及表征能力等多重因素:从仪器购置成本来看,紫外-可见光谱(UV-Vis)和三维荧光光谱(3D-EEM)经济实用,傅里叶变换红外光谱(FTIR)成本适中,而核磁共振波谱(NMR)与电子顺磁共振波谱(ESR)则因设备昂贵多限于大型研究平台;在样品

前处理方面,UV-Vis和3D-EEM仅需溶解过滤即可测定,FTIR依赖溴化钾压片技术,NMR需氘代试剂溶解高纯度样品,ESR则常需冷冻干燥以稳定自由基信号;操作便捷性方面,UV-Vis、3D-EEM和FT-IR测试流程简单高效,而NMR和ESR需专业人员解析复杂谱图;在表征能力上,UV-Vis通过SU-VA₂₅₄等参数间接评估腐殖质氧化还原特性,3D-EEM解析荧光组分与官能团动态,FTIR揭示官能团结构演变,NMR定量分析碳骨架组成与活性基团关联性,ESR则直接捕获自由基活性位点。因此,针

表4 荧光积分区域划分及归属^[92]
Table 4 Fluorescence integral region division and attribution

区域	Ex/nm	Em/nm	荧光物质归属 Fluorescent component assignment
I	200~250	290~330	类酪氨酸物质 Tyrosine-like fluorophores
II	200~250	>330~380	类色氨酸物质 Tryptophan-like fluorophores
III	200~250	>380~520	类富里酸物质 Fulvic-like fluorophores
VI	>250~400	290~380	微生物代谢产物 Microbial byproduct-like fluorophores
V	>250~400	>380~520	类腐殖酸物质 Humic-like fluorophores

对不同研究目标可优选单一技术或采用多光谱联用策略,以实现腐殖质氧化还原特性与环境行为的多维度解析。

除了与光谱分析技术联用外,研究者也探索将化学滴定法、电化学法和微生物法与其他技术联用来自评价腐殖酸的电子转移能力。Walpen等^[94]将流动注射分析技术(FIA)与电化学法联合量化了溶解性有机质中的电子供体功能基团,检测出皮摩尔级的生育酚醋酸盐和纳克级的溶解性有机质(碳质量浓度<1 mg/L),但该技术操作繁琐且设备不便携,很难用于原位检测。Yuan等^[95]开发了一种简单便携的野外预注入[2,2'-氨基双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)](ABTS+)的测量装置,该设备预先注入ABTS(+),能快速准确地测定不同溶解有机物的EDC。该设备在检测限、适用溶解性有机碳浓度范

围和样品制备等方面明显优于传统的流动注射分析技术和介导电化学氧化法,对不同分子质量腐殖质酸EDC的测定亦具有良好的准确性,溶解性有机质的EDC与其化学需氧量、发色团溶解性有机质含量、相对分子质量和腐殖化程度显著相关。

3 方法比较

化学滴定法、电化学法和微生物法在评价腐殖质的氧化还原能力时各具优缺点,适用于不同研究场景和目的(表5)。化学滴定法通过测定腐殖酸与H₂S、Pd/H₂、金属Zn等还原剂或I₂等氧化剂^[53-54,96]反应后反应物或反应产物浓度来量化腐殖质的氧化还原能力,是三者中最经济、最不受实验条件和设备限制的方法。但该方法精度较低,测定结果的准确性可能受到实验环境、样品组成及操作误差的影响,从而导致测定值的偏差;同时,该方法无法准确区分腐殖质的氧化还原结构单元及功能。具体而言,若体系中含有铁(Ⅲ)(Fe³⁺)、硝酸盐(NO₃⁻)或硫酸根(SO₄²⁻)等强氧化性物质,这些物质可能与还原剂发生竞争性反应,导致氧化剂实际消耗量增加,使测定值高于真实值。同时,腐殖质化学组成较复杂,其中醌基、半醌基及多酚类化合物在氧化还原过程中可能发生缓慢的自还原或共轭电子转移,导致反应不完全,从而低估其氧化还原能力。碱性条件下,化学滴定法可能诱导Fe²⁺、Mn²⁺等金属离子沉淀,降低体系氧化还原活性物质的有效浓度,进一步影响测定的准确性和可重复性。

表5 腐殖质氧化还原能力评价方法比较

Table 5 Comparison of evaluation methods for redox capacity of humic substances

方法 Method	成本 Cost	操作难易程度 Operational complexity	适用范围 Application	信息 Information
化学滴定法	低	简单	快速筛选和大规模分析	表观还原能力
电化学法	高	复杂	腐殖质氧化还原过程	定量电子转移量
微生物法	中等	视情况	腐殖质与微生物活动的相互作用	取决于微生物实验的设计和执行

电化学法利用电化学工作站,采用计时电流法,循环伏安法或安培法等监测腐殖质氧化还原反应过程中电子转移,通过氧化或还原电流量化腐殖质的氧化还原能力,具有高灵敏度,量化电子传递量的优点,实现了腐殖质氧化还原能力的定量评估,但该方法需要电化学工作站、无氧手套箱等设备,且操作较为复杂,易受外部环境影响^[33]。微生物法利用微生物对腐殖质的利用能力来间接反映腐殖质的氧化还原能力。微生物在分解和利用腐殖质过程中,会根

据氧化还原能力的强弱来选择性地分解和利用不同类型以及具有不同相对分子质量和结构的腐殖质。微生物法通过测量微生物在腐殖质存在下的生长速率、代谢产物或其他生物标志物,来评估腐殖质对微生物活性的具体影响,操作相对复杂且需长时间培养。实际应用时综合考虑各方法优劣,根据研究需求选择分析方法,也可结合多种方法综合分析,获取全面信息。

4 小结与展望

腐殖质是土壤、沉积物或水体主要的氧化还原活性物质之一,可作为电子受体或电子供体,参与污染物的氧化还原降解而影响其环境行为。本文总结了氧化还原滴定法、电化学法和微生物法的原理、实验步骤和应用范围,详细分析了各方法在评估腐殖质氧化还原能力时的优势与局限。氧化还原滴定法操作简便,但精确度有限;电化学法灵敏度高,但容易受到外部环境干扰;微生物法能够较好地模拟自然条件,但分析周期较长,所需时间因实验设计和条件而异,通常包括微生物培养、反应过程和分析检测等阶段,总耗时可能从数天到数周不等。这些方法的分析结果为未来环境污染修复、土壤改良、可持续农业和生态系统管理等领域提供应用途径,推动腐殖质氧化还原能力评价技术的发展和应用。

现有的腐殖质氧化还原能力评估方法存在技术更新滞后、忽视生态系统层面的关联性以及应用范围受限等问题。目前的方法缺乏与纳米、机器学习等新兴技术的结合,未能充分探索腐殖质在土壤碳循环和生态系统功能中的作用,也未能有效评估腐殖质在应对气候变化和改善土壤质量方面的潜在应用价值。未来将继续深入探索腐殖质电子转移能力评价方法及其应用的多个方面:

1)进一步探索新型技术在腐殖质氧化还原能力评估中的应用。随着科学技术不断进步,可以预期新型评价方法的涌现,例如基于纳米技术的高灵敏度传感器或结合机器学习的多模态数据处理技术,将为腐殖质氧化还原能力的研究提供更多的可能性。

2)更加注重腐殖质电子转移能力与土壤生态系统功能之间的关联性。深入挖掘腐殖质与土壤微生物、植物等生物因子之间的相互作用,解析腐殖质在土壤碳循环、养分转化以及生态系统稳定性中的作用机制。

3)探讨腐殖质氧化还原能力在应对气候变化、改善土壤质量和生态系统恢复方面的潜在应用价值,为建设健康的土壤与生态环境提供科学依据和技术支持。

参考文献 References

- [1] SERENELLA N, ANDREA E, ORNELLA F, et al. Plant-soil interaction: the role of humic substances [J]. *Soil and plant analysis: the role of humic substances*, 2022(3): 60-66.
- [2] WU J G, XI S Q, JIANG Y. Research progress of soil humic substances in analytical chemistry [J]. *Chinese journal of analytical chemistry*, 1997, 25(10): 1221-1227.
- [3] SERUDO R L, DE OLIVEIRA L C, ROCHA J C, et al. Reduction capability of soil humic substances from the Rio Negro basin, Brazil, towards Hg(II) studied by a multimethod approach and principal component analysis (PCA) [J]. *Geoderma*, 2007, 138(3/4): 229-236.
- [4] SUN T R, LEVIN B D A, GUZMAN J J L, et al. Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon [J/OL]. *Nature communications*, 2017, 8: 14873 [2024-11-28]. <https://doi.org/10.1038/ncomms14873>.
- [5] WU Y D, LI F B, LIU T X. Mechanism of extracellular electron transfer among microbe-humus-mineral in soil: a review [J]. *Acta pedologica sinica*, 2016, 53(2): 277-291 (in Chinese with English abstract).
- [6] YU C, WANG W M, LI C Y, et al. Mechanism of pollutant transformation mediated by environmental carbonaceous materials via extracellular electron transfer [J]. *Environmental chemistry*, 2024, 43(9): 2944-2955 (in Chinese with English abstract).
- [7] 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.
- [8] MA C, YU Z, LU Q, et al. Anaerobic humus and Fe(III) reduction and electron transport pathway by a novel humus-reducing bacterium, *Thauera humireducens* SgZ-1 [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99(8): 3619-3628.
- [9] ZHANG Y L, CHEN X L, WU Y D. Electron shuttle-mediated microbial extracellular electron transfer: mechanisms and geochemical implications [J]. *Ecology and environmental sciences*, 2021, 30(1): 213-222 (in Chinese with English abstract).
- [10] KULIKOWSKA D, GUSIATIN Z M, BUŁKOWSKA K, et al. Humic substances from sewage sludge compost as washing agent effectively remove Cu and Cd from soil [J]. *Chemosphere*, 2015, 136: 42-49.
- [11] CAO Y B, WANG X, ZHANG X Y, et al. An electric field immobilizes heavy metals through promoting combination with

- humic substances during composting [J/OL]. Bioresource technology, 2021, 330: 124996 [2024-11-28]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124996>.
- [12] 胡煜,陈娟,王沛芳,等.腐殖质参与的卤代有机污染物厌氧降解研究进展[J].环境科学与技术,2020,43(10):212-220. HU Y, CHEN J, WANG P F, et al. Research progress in humic substances in anaerobic degradation of halogenated organic pollutants [J]. Environmental science & technology, 2020, 43 (10):212-220 (in Chinese with English abstract).
- [13] 郑延云,张佳宝,谭钧,等.不同来源腐殖质的化学组成与结构特征研究[J].土壤学报,2019,56(2):386-397.ZHENG Y Y, ZHANG J B, TAN J, et al. Chemical composition and structure of humus relative to sources [J]. Acta pedologica sinica, 2019, 56(2):386-397 (in Chinese with English abstract).
- [14] 秦晴晴,张琢,宋子文.腐殖质来源、特征及其与土壤中重金属作用机制的研究进展[J].环境化学,2023,42(6):1899-1910.QIN Q Q, ZHANG Z, SONG Z W. Research progress on sources, characteristics of humus and mechanism of interaction with heavy metals in soil [J]. Environmental chemistry, 2023, 42(6):1899-1910 (in Chinese with English abstract).
- [15] 张士伟,张超,黄建军,等.腐殖质还原菌特性及其在河道修复中的应用[J].环境化学,2022,41(9):2986-2994.ZHANG S W, ZHANG C, HUANG J J, et al. Characteristics of humus reducing bacteria and their application in river remediation [J]. Environmental chemistry, 2022, 41 (9) : 2986-2994 (in Chinese with English abstract).
- [16] 孟凡德,黄秋香,蔡永兵,等.风化煤提取的不溶腐殖质对铅的吸附性能及应用潜力[J].环境化学,2022,41(4):1401-1411.MENG F D, HUANG Q X, CAI Y B, et al. Insoluble humic substances derived from leonardite for lead adsorption and application potential [J]. Environmental chemistry, 2022, 41 (4):1401-1411 (in Chinese with English abstract).
- [17] 努尔比耶柯孜·麦麦提,张春友,薛娇,等.堆肥过程中腐殖质钝化重金属的作用机理研究进展[J].农业与技术,2021,41(20):27-30.MAIMAITI N, ZHANG C Y, XUE J, et al. Research progress on the mechanism of heavy metal passivation by humus during composting [J]. Agriculture and technology, 2021, 41(20):27-30 (in Chinese).
- [18] CHEN J, GU B H, ROYER R A, et al. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron [J]. Science of the total environment, 2003, 307 (1/2/3) : 167-178.
- [19] COATES J D, CHAKRABORTY R, O'CONNOR S M, et al. The geochemical effects of microbial humic substances reduction [J]. Acta hydrochimica et hydrobiologica, 2001, 28(7): 420-427.
- [20] KLAPPER L, MCKNIGHT D M, ROBIN FULTON J, et al. Fulvic acid oxidation state detection using fluorescence spectroscopy [J]. Environmental science & technology, 2002, 36 (14):3170-3175.
- [21] UCHIMIYA M, STONE A T. Reversible redox chemistry of quinones: impact on biogeochemical cycles [J]. Chemosphere, 2009, 77(4):451-458.
- [22] LOVLEY D R, COATES J D, BLUNT-HARRIS E L, et al. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration [J]. Nature, 1996, 382(6590):445-448.
- [23] SCHOLTEN J C M, VAN BODEGOM P M, VOGELAAR J, et al. Effect of sulfate and nitrate on acetate conversion by anaerobic microorganisms in a freshwater sediment [J]. FEMS microbiology ecology, 2002, 42(3):375-385.
- [24] 陈蕾,超峰,王郑,等.天然有机质对环境污染物的转化过程的介导作用[J].生态环境学报,2013,22(7):1244-1249. CHEN L, CHAO F, WANG Z, et al. Transformation of environmental pollutants mediated by natural organic matter [J]. Ecology and environmental sciences, 2013, 22(7): 1244-1249 (in Chinese with English abstract).
- [25] 张雪,丁鑫,杨演,等.腐殖质氧化还原官能团测定新方法[J].环境化学,2016,35(10):2106-2116.ZHANG X, DING X, YANG Z, et al. New methods for the determination of redox functional groups in humic substances [J]. Environmental chemistry, 2016, 35(10):2106-2116 (in Chinese with English abstract).
- [26] RATASUK N, NANNY M A. Characterization and quantification of reversible redox sites in humic substances [J]. Environmental science & technology, 2007, 41(22):7844-7850.
- [27] BAUER I, KAPPLER A. Rates and extent of reduction of Fe (III) compounds and O₂ by humic substances [J]. Environmental science & technology, 2009, 43(13):4902-4908.
- [28] 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.
- [29] STRUYK Z, SPOSITO G. Redox properties of standard humic acids [J]. Geoderma, 2001, 102(3/4):329-346.
- [30] 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 (19) : 8385-8394.
- [31] 袁英,何小松,席北斗,等.腐殖质氧化还原和电子转移特性研究进展[J].环境化学,2014,33(12):2048-2057.YUAN Y, HE X S, XI B D, et al. Research progress on the redox and electron transfer capacity of humic substances [J]. Environmental chemistry, 2014, 33(12):2048-2057 (in Chinese with English abstract).
- [32] PICCOLO A. The supramolecular structure of humic substances [J]. Soil science, 2001, 166(11):810-832.
- [33] YANG Z, KAPPLER A, JIANG J. Reducing capacities and distribution of redox-active functional groups in low molecular weight fractions of humic acids [J]. Environmental science &

- technology, 2016, 50(22):12105-12113.
- [34] 傅平青.水环境中的溶解有机质及其与金属离子的相互作用:荧光光谱学研究[D].贵阳:中国科学院研究生院(地球化学研究所), 2004.FU P Q.Dissolved organic matter in water environment and its interaction with metal ions: fluorescence spectroscopy study [D]. Guiyang: Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [35] 李会杰.腐殖酸和富里酸的提取与表征研究 [D].武汉:华中科技大学, 2013.LI H J.Extraction and characterization of humic acid and fulvic acid [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [36] 石亚芳,刘子雯,代允超,等.土壤胡敏素的自由基特性、氧化还原性及其影响因素[J].科学通报, 2021, 66(20) : 2596-2607.SHI Y F, LIU Z W, DAI Y C, et al.Free radical property, redox capacity, and the relevant influencing factors of soil humin [J]. Chinese science bulletin, 2021, 66(20) : 2596-2607 (in Chinese with English abstract).
- [37] AEPPLI M, THOMPSON A, DEWEY C, et al.Redox properties of solid phase electron acceptors affect anaerobic microbial respiration under oxygen-limited conditions in floodplain soils [J]. Environmental science & technology, 2022, 56(23) : 17462-17470.
- [38] TAN W B, ZHAO X Y, DANG Q L, et al.Microbially reducible extent of solid-phase humic substances is governed by their physico-chemical protection in soils: evidence from electrochemical measurements [J/OL]. Science of the total environment, 2020, 708: 134683 [2024-11-28].<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134683>.
- [39] TAN W B, XI B D, WANG G A, et al.Microbial-accessibility-dependent electron shuttling of *in situ* solid-phase organic matter in soils [J]. Geoderma, 2019, 338: 1-4.
- [40] 蔡茜茜,袁勇,胡佩,等.腐殖质电化学特性及其介导的胞外电子传递研究进展[J].应用与环境生物学报, 2015, 21(6) : 996-1002.CAI X X, YUAN Y, HU P, et al.Progress in study of humic substances: electrochemical redox characterization and extracellular respiration [J]. Chinese journal of applied and environmental biology, 2015, 21 (6) : 996-1002 (in Chinese with English abstract).
- [41] AESCHBACHER M, SCHWARZENBACH R P, SANDER M.Electrochemical characterization of humic substance redox properties [J]. Geochimica et cosmochimica acta, 2009, 73(13): 14.
- [42] SHARPLESS C M, AESCHBACHER M, PAGE S E, et al. Photooxidation-induced changes in optical, electrochemical, and photochemical properties of humic substances [J]. Environmental science & technology, 2014, 48(5):2688-2696.
- [43] WAKSMAN S A.Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus [J]. Soil science, 1932, 34(1) : 43-70.
- [44] 蒋国祥.苏联主要土类中腐殖质成分、含量和胡敏酸性质的某些规律性[J].土壤学报, 1955(2) : 158-159.JIANG G X. Some regularities of humus composition, content and humic acid properties in main soils of soviet union [J]. Acta pedologica sinica, 1955(2):158-159 (in Chinese).
- [45] 袁可能.土壤有机矿质复合体研究 I .土壤有机矿质复合体中腐殖质氧化稳定性的初步研究[J].土壤学报, 1963(3) : 286-293.YUAN K N. Studies on the organo-mineral complex in soil I .the oxidation stability of humus from different organo-mineral complexes in soil [J]. Acta pedologica sinica, 1963 (3):286-293 (in Chinese with English abstract).
- [46] ÖSTERBERG R, SHIRSHOVA L.Oscillating, nonequilibrium redox properties of humic acids [J]. Geochimica et cosmochimica acta, 1997, 61(21):4599-4604.
- [47] MAURER F, CHRISTL I, HOFFMANN M, et al.Reduction and reoxidation of humic acid: influence on speciation of cadmium and silver [J]. Environmental science & technology, 2012, 46(16):8808-8816.
- [48] PERETYAZHKO T, SPOSITO G.Reducing capacity of terrestrial humic acids [J]. Geoderma, 2006, 137(1/2):140-146.
- [49] LI S, BRAUN J C, BUCHNER D, et al.Denitrifier method for nitrite removal in electrochemical analysis of the electron accepting capacity of humic substances [J]. Analytical chemistry, 2020, 92(1):616-621.
- [50] 潘淑贞,于天仁.水稻土中氧化还原过程的研究: X .水稻土中氧的消长平衡[J].土壤学报, 1984, 21(2) : 163-170.PAN S Z, YU T R. Studies on oxidation-reduction processes in paddy soils: X. Consumption and dynamic balance of oxygen in paddy soils [J]. Acta pedologica sinica, 1984, 21 (2) : 163-170 (in Chinese with English abstract).
- [51] CORY R M, MCKNIGHT D M. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter [J]. Environmental science & technology, 2005, 39(21):8142-8149.
- [52] CHAPMAN S J.Comment on “Microbially derived inputs to soil organic matter: are current estimates too low?” [J/OL]. Environmental science & technology, 2008, 42 (8) : 3115 [2024-11-28].<https://doi.org/10.1021/es8000932>.
- [53] HEITMANN T, BLODAU C.Oxidation and incorporation of hydrogen sulfide by dissolved organic matter [J]. Chemical geology, 2006, 235(1/2):12-20.
- [54] BLODAU C, BAUER M, REGENSPURG S, et al.Electron accepting capacity of dissolved organic matter as determined by reaction with metallic zinc [J]. Chemical geology, 2009, 260 (3/4):186-195.
- [55] 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, 1998, 32 (19) : 2984-

- 2989.
- [56] RITCHIE J D, PERDUE E M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter [J]. *Geochimica et cosmochimica acta*, 2003, 67(1): 85-96.
- [57] BAUER M, HEITMANN T, MACALADY D L, et al. Electron transfer capacities and reaction kinetics of peat dissolved organic matter [J]. *Environmental science & technology*, 2007, 41(1): 139-145.
- [58] 江韬, 魏世强, 李雪梅, 等. 几种胡敏酸还原容量的表征与比较 [J]. *土壤学报*, 2012, 49(5): 901-8. JIANG T, WEI S Q, LI X M, et al. Characterization and comparison of the reduction capacity of several humic acids [J]. *Acta pedologica sinica*, 2012, 49(5): 901-908 (in Chinese with English abstract).
- [59] 莫锦韬, 李军, 路一鸣, 等. 间歇通风对污泥好氧堆肥过程中腐殖质电子转移能力的影响 [J]. *中国环境科学*, 2023, 43(5): 2393-2403. MO J T, LI J, LU Y M, et al. Effect of intermittent aeration on the electron transfer capacity of humus during aerobic sludge composting [J]. *China environmental science*, 2023, 43(5): 2393-2403 (in Chinese with English abstract).
- [60] YUAN T, YUAN Y, ZHOU S G, et al. A rapid and simple electrochemical method for evaluating the electron transfer capacities of dissolved organic matter [J]. *Journal of soils and sediments*, 2011, 11(3): 467-473.
- [61] SANDER M, HOFSTETTER T B, GORSKI C A. Electrochemical analyses of redox-active iron minerals: a review of nonmediated and mediated approaches [J]. *Environmental science & technology*, 2015, 49(10): 5862-5878.
- [62] YE R Z, KELLER J K, JIN Q S, et al. Peatland types influence the inhibitory effects of a humic substance analog on methane production [J]. *Geoderma*, 2016, 265: 131-140.
- [63] QIAO J T, LI X M, LI F B, et al. Humic substances facilitate arsenic reduction and release in flooded paddy soil [J]. *Environmental science & technology*, 2019, 53(9): 5034-5042.
- [64] AEPPLI M, VOEGLIN A, GORSKI C A, et al. Mediated electrochemical reduction of iron (oxyhydr-) oxides under defined thermodynamic boundary conditions [J]. *Environmental science & technology*, 2018, 52(2): 560-570.
- [65] AULENTA F, DI MAIO V, FERRI T, et al. The humic acid analogue antraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) serves as an electron shuttle in the electricity-driven microbial dechlorination of trichloroethene to *cis*-dichloroethene [J]. *Bioresource technology*, 2010, 101(24): 9728-9733.
- [66] LIU Y F, ZHENG X J, YIN S J, et al. A significant correlation between kinetics of nitrobenzene reduction by sulfide and electron transfer capacity of mediating dissolved humic substances [J/OL]. *Science of the total environment*, 2020, 740: 139911 [2024-11-28]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139911>.
- [67] RINCÓN-RODRÍGUEZ J C, CÁRDENAS-HERNÁNDEZ P A, MURILLO-GELVEZ J, et al. Comparative evaluation of mediated electrochemical reduction and chemical redox titration for quantifying the electron accepting capacities of soils and redox-active soil constituents [J]. *Environmental science & technology*, 2024, 58(40): 17674-17684.
- [68] 刘星, 周顺桂. 微生物纳米导线的导电机制及功能 [J]. *微生物学报*, 2020, 60(9): 2039-2061. LIU X, ZHOU S G. Electrical conductivity and application of microbial nanowires [J]. *Acta microbiologica sinica*, 2020, 60(9): 2039-2061 (in Chinese with English abstract).
- [69] 武春媛, 李芳柏, 周顺桂. 腐殖质呼吸作用及其生态学意义 [J]. *生态学报*, 2009, 29(3): 1535-1542. WU C Y, LI F B, ZHOU S G. Humus respiration and its ecological significance [J]. *Acta ecologica sinica*, 2009, 29(3): 1535-1542 (in Chinese with English abstract).
- [70] 李东阳, 杨天学, 吴明红, 等. 腐殖酸强化六氯苯厌氧降解规律及其中间产物 [J]. *环境科学研究*, 2016, 29(6): 870-876. LI D Y, YANG T X, WU M H, et al. Anaerobic degradation regulation of hexachlorobenzene and degradation products enhanced by humic acid [J]. *Research of environmental sciences*, 2016, 29(6): 870-876 (in Chinese with English abstract).
- [71] 刘思佳, 何小松, 张慧, 等. 生活垃圾不同填埋阶段的富里酸对五氯苯酚的降解 [J]. *环境科学*, 2018, 39(12): 5699-5707. LIU S J, HE X S, ZHANG H, et al. Degradation of pentachlorophenol by fulvic acid in a municipal solid waste landfill [J]. *Environmental science*, 2018, 39(12): 5699-5707 (in Chinese with English abstract).
- [72] LI X M, LIU L, LIU T X, et al. Electron transfer capacity dependence of quinone-mediated Fe(Ⅲ) reduction and current generation by *Klebsiella pneumoniae* L17 [J]. *Chemosphere*, 2013, 92(2): 218-224.
- [73] WU C Y, ZHUANG L, ZHOU S G, et al. Humic substance-mediated reduction of iron(Ⅲ) oxides and degradation of 2,4-D by an alkaliphilic bacterium, *Corynebacterium humireducens* MFC-5 [J]. *Microbial biotechnology*, 2013, 6(2): 141-149.
- [74] 林霄涵, 杨帆, 赵峰. 微生物的胞外电子传递界面 [J]. *环境化学*, 2021, 40(11): 3283-3296. LIN X H, YANG F, ZHAO F. The interface of microbial extracellular electron transfer [J]. *Environmental chemistry*, 2021, 40(11): 3283-3296 (in Chinese with English abstract).
- [75] ZHANG C, KATAYAMA A. Humin as an electron mediator for microbial reductive dehalogenation [J]. *Environmental science & technology*, 2012, 46: 6575-6583.
- [76] 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.
- [77] ZUO H Y, KUKKADAPU R, ZHU Z H, et al. Role of clay-associated humic substances in catalyzing bioreduction of structural Fe(Ⅲ) in nontronite by *Shewanella putrefaciens* CN32[J/OL]. *Science of the total environment*, 2020, 741:140213[2024-11-28].<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140213>.
- [78] LOVLEY D R, FRAGA J L, BLUNT-HARRIS E L, et al. Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction[J]. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 1998, 26(3):152-157.
- [79] XU M, GUO J, ZHONG X, et al. A broad spectrum decoloration shewanella new species: *Shewanella cinica* [J]. *Acta microbiologica sinica*, 2004, 44(5): 561-566.
- [80] LOVLEY D R, BLUNT-HARRIS E L. Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(Ⅲ) reduction[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1999, 65(9):4252-4254.
- [81] HERNÁNDEZ-MONTOYA V, ALVAREZ L H, MONTES-MORÁN M A, et al. Reduction of quinone and non-quinone redox functional groups in different humic acid samples by *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Geoderma*, 2012, 183:25-31.
- [82] COATES J D, ELLIS D J, BLUNT-HARRIS E L, et al. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1998, 64(4):1504-1509.
- [83] CHEN M J, TONG H, LIU C S, et al. A humic substance analogue AQDS stimulates *Geobacter* sp. abundance and enhances pentachlorophenol transformation in a paddy soil [J]. *Chemosphere*, 2016, 160:141-148.
- [84] CERVANTES F J, DE BOK F A M, DUONG-DAC T, et al. Reduction of humic substances by halorespiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms [J]. *Environmental microbiology*, 2002, 4(1):51-57.
- [85] LUIJTEN M L G C, WEELINK S A B, GODSCHALK B, et al. Anaerobic reduction and oxidation of quinone moieties and the reduction of oxidized metals by halorespiring and related organisms[J]. *FEMS microbiology ecology*, 2004, 49(1): 145-150.
- [86] BENZ M, SCHINK B, BRUNE A. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1998, 64(11): 4507-4512.
- [87] LOVLEY D R, KASHEFI K, VARGAS M, et al. Reduction of humic substances and Fe(Ⅲ) by hyperthermophilic microorganisms[J]. *Chemical geology*, 2000, 169(3/4):289-298.
- [88] 杨毅, 董承璇, 朱裕强, 等. 枯水期西安水体中DOM的组成、性质和来源 [J]. *中国环境科学*, 2024, 44 (2) : 953-960. YANG Y, DONG C X, ZHU Y Q, et al. Composition, properties, and sources of DOM in Xi'an water bodies during the dry season [J]. *China environmental science*, 2024, 44 (2) : 953-960(in Chinese with English abstract).
- [89] BEALE D J, PORTER N A, RODDICK F A. The interaction between natural organic matter in raw waters and pesticide residues:a three dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence investigation [J]. *Water science and technology*, 2013, 67(11):2428-2436.
- [90] DATTA C, GHOSH K, MUKHERJE.S K. Flourescence excitation spectra of disserent fractions of humus [J]. *Journal of the Indian Chemical Society*, 1971, 48(3): 279.
- [91] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter [J]. *Environmental science & technology*, 2003, 37(24) :5701-5710.
- [92] 陈丹, 程澳, 余旭芳, 等. 不同类型堆肥中腐殖酸与富里酸的光谱特性和分子量分布 [J]. *生态与农村环境学报*, 2024, 40(2) : 276-284.CHEN D, CHENG A, YU X F, et al. Spectral characteristics and molecular weight distribution of humic acid and fulvic acid in different types of compost [J]. *Journal of ecology and rural environment*, 2024, 40 (2) : 276-284 (in Chinese with English abstract).
- [93] 王波, 刘德军, 姚军, 等. 泥炭土中腐殖酸的提纯和表征研究 [J]. 辐射防护, 2009, 29(3): 172-180.WANG B, LIU D J, YAO J, et al. Purification and characterization of humic acid from peat soil [J]. *Radiation protection*, 2009, 29 (3) : 172-180 (in Chinese).
- [94] WALPEN N, SCHROTH M H, SANDER M. Quantification of phenolic antioxidant moieties in dissolved organic matter by flow-injection analysis with electrochemical detection[J]. *Environmental science & technology*, 2016, 50(12):6423-6432.
- [95] YUAN Y, ZHANG H, WEI Y Q, et al. Onsite quantifying electron donating capacity of dissolved organic matter [J]. *Science of the total environment*, 2019, 662:57-64.
- [96] 姜杰, 杨湧, 任谦, 等. 土壤腐殖质氧化还原电位及其相应电子转移能力分布 [J]. *环境化学*, 2015, 34(2): 219-224.JIANG J, YANG Z, REN Q, et al. Redox potential of soil humus and the distribution of its corresponding electron transfer capacity [J]. *Environmental chemistry*, 2015, 34 (2) : 219-224 (in Chinese with English abstract).

Method for evaluating redox capacity of humic substances and its applications

XIONG Juan, FANG Jing, XU Yun, TAN Wenfeng

College of Resources and Environment/State Key Laboratory of Soil Health Diagnosis and Green Restoration, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Humic substances, as a natural organic matter commonly present in soil and sediment, is crucial in the processes of biogeochemical cycling and energy flux within ecosystems. The active functional groups including quinones contained in the molecular structure of humic acid endow humic acid with redox properties, making it play a key role in the transformation of environmental pollutants and the improvement of soil fertility. Accurately evaluating the redox capacity of humic substances is the foundation for the in-depth elucidation of its environmental behavior and functional mechanisms. At present, the main methods for evaluating the redox capacity of humic substances include redox titration, electrochemical techniques, and microbial assays. This article reviewed the principles, experimental protocols, and application scope of oxidation-reduction titration, electrochemical techniques, and microbial assays, and deeply analyzed the advantages and limitations of each method in evaluating the redox capacity of humic substances. The results showed that the redox titration is simple to operate, but its quantitative accuracy is limited by the way of determining endpoint. Electrochemical techniques have high sensitivity but are susceptible to external interference from environments. Microbial assays can simulate natural conditions well but have a longer cycle of analyses. The emerging trends for evaluating the redox capacity of humic substances are discussed in terms of developing new electrochemical sensors, optimizing in-situ measurement techniques, and implementing multi-modal analytical strategies. It will offer a theoretical framework for selecting appropriate methods for evaluating the redox capacity of humic substances from diverse sources and establishing a robust scientific foundation for promoting the application of humic substances in remediating environment and boosting agricultural productivity.

Keywords humic substances; organic matter; soil; redox; electron transfer

(责任编辑:张志钰)