

胞外聚合物调控脱色希瓦氏菌异化铁还原及羟基自由基生成的作用机制

黄蕴琪^{1,2}, 王逸^{1*}, 安文文², 甘翠芬², 周少锋^{2*}, 许玫英²

- 1 广东工业大学 环境科学与工程学院, 广东省环境催化与健康风险控制重点实验室, 环境健康与污染控制研究院, 广东省固体废物资源化与无害化工程技术研究中心, 广东 广州
- 2 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州

黄蕴琪, 王逸, 安文文, 甘翠芬, 周少锋, 许玫英. 胞外聚合物调控脱色希瓦氏菌异化铁还原及羟基自由基生成的作用机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(6): 3088-3104.

HUANG Yunqi, WANG Yi, AN Wenwen, GAN Cuifen, ZHOU Shaofeng, XU Meiyi. Role of extracellular polymeric substances in regulation of dissimilatory iron reduction and hydroxyl radical generation in *Shewanella decolorationis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(6): 3088-3104.

摘要: 铁还原菌通过异化铁还原调控铁的价态变化, 触发羟基自由基($\cdot\text{OH}$)生成, 该过程被认为是有氧-缺氧交替环境(如潮间带沉积物)中活性氧集团的重要来源, 对地球化学元素循环具有重要贡献。然而, 针对普遍存在且紧密分布于细胞-矿物界面的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)在其中的作用仍缺乏系统认识。【目的】基于脱色希瓦氏菌及其分泌的EPS, 探究在厌氧-有氧过程中EPS对 $\cdot\text{OH}$ 生成过程的影响机制。【方法】以脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12及其胞外电子传递缺陷突变株(S12 Δ BA和S12 Δ ccmA)、提取的EPS和水铁矿为研究对象, 采用多种化学手段解析EPS的理化性质以及其对脱色希瓦氏菌产 $\cdot\text{OH}$ 过程的影响。【结果】尽管EPS具有一定的氧化还原活性, 可介导脱色希瓦氏菌的胞外电子传递, 但其在有氧-缺氧环境下对铁还原效率与 $\cdot\text{OH}$ 生成速率存在宏观上的抑制作用, 其效率分别降低(56.63 \pm 4.67)%和(26.86 \pm 5.30)%, 这主要是因为EPS对铁矿物具有强亲和性, 使两者形成EPS-Fe(III)复合体, 降低了胞外电子传递

资助项目: 国家自然科学基金(42377132, U24A20637, 42377242, 41907122); 广东省科学院发展专项资金(2024GDASZH-2024010102); 广东省科学院优秀青年项目(2024GDASQNR-0201); “广东特支计划”杰出人才项目(2023JC07L096); “广东省特支计划”青年拔尖人才项目(2024TQ08A621); 广东省“百千万工程”农村科技特派员项目(STKJ2025040); 广州市基础与应用基础研究项目(2025A04J5265)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42377132, U24A20637, 42377242, 41907122), the GDAS' Special Project of Science and Technology Development (2024GDASZH-2024010102), the Young Talent Project of GDAS (2024GDASQNR-0201), the Guangdong Special Support Plan for Outstanding Talents (2023JC07L096), the Guangdong Special Support Program for Young Talents (2024TQ08A621), the Guangdong Rural Science and Technology Commissioner Project (STKJ2025040), and the Guangzhou Science and Technology Program (2025A04J5265).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Yi, wangyiii@gdut.edu.cn; ZHOU Shaofeng, zhoushaofeng@gdim.cn

Received: 2026-03-09; Accepted: 2026-04-10; Published online: 2026-04-17

效率。此外, EPS 在脱色希瓦氏菌产 $\cdot\text{OH}$ 过程中可促进水铁矿向生物可利用性较低的矿物形态转化, 从而降低 Fe(III) 的可还原性, 抑制 $\cdot\text{OH}$ 的生成。【结论】EPS 作为微生物-铁矿界面的重要化学介质, 是调控铁还原菌等微生物产生 $\cdot\text{OH}$ 的关键因子。本研究结论对深入认识潮间带沉积物等感潮水土环境中的生物地球化学过程具有重要意义。

关键词: 脱色希瓦氏菌; 胞外聚合物; 微生物芬顿反应; 胞外电子传递; 异化铁还原

Role of extracellular polymeric substances in regulation of dissimilatory iron reduction and hydroxyl radical generation in *Shewanella decolorationis*

HUANG Yunqi^{1,2}, WANG Yi^{1*}, AN Wenwen², GAN Cuifen², ZHOU Shaofeng^{2*}, XU Meiyang²

1 Guangdong Key Laboratory of Environmental Catalysis and Health Risk Control, Institute of Environmental Health and Pollution Control, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Solid Waste Recycling and Safe Treatment, School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] Microbial-Fenton process driven by dissimilatory iron reduction is increasingly recognized as a major source of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) in redox-fluctuating environments (e.g., tidal sediments), thereby playing an important role in biogeochemical element cycling. However, extracellular polymeric substances (EPS), which are ubiquitous and closely associated with the cell-mineral interface, remain poorly understood in terms of their regulatory roles in this process. This study aims to elucidate the mechanisms by which EPS derived from *Shewanella decolorationis* influence $\cdot\text{OH}$ generation under oxic-anoxic conditions. [Methods] *S. decolorationis* S12, its extracellular electron transfer-deficient mutants (S12 Δ BA and S12 Δ ccmA), extracted EPS, and ferrihydrite were employed as model components. By simulating oxic-anoxic alternating conditions, we employed a combination of chemical and spectroscopic approaches to characterize the physicochemical properties of EPS and to investigate their effects on iron reduction and $\cdot\text{OH}$ generation. [Results] Although EPS exhibited intrinsic redox activity and could mediate electron transfer in *S. decolorationis*, they exerted inhibitory effects on iron reduction efficiency and $\cdot\text{OH}$ generation under oxic-anoxic conditions, decreasing the Fe(II) accumulation and $\cdot\text{OH}$ production by up to $(56.63\pm 4.67)\%$ and $(26.86\pm 5.30)\%$, respectively. This inhibition was primarily attributed to the strong affinity between EPS and iron minerals, which led to the formation of EPS- Fe(III) complexes that hindered electron transfer efficiency. In addition, EPS promoted the transformation of ferrihydrite into secondary iron mineral phases with lower

bioavailability, thereby decreasing the reducibility of Fe(III) and further suppressing $\cdot\text{OH}$ generation. **[Conclusion]** EPS act as a critical interfacial chemical mediator in the microbe-iron mineral system, regulating dissimilatory iron reduction and consequently influencing $\cdot\text{OH}$ production. These findings provide new insights into the biogeochemical processes in tidal soil and water environments such as intertidal sediments.

Keywords: *Shewanella decolorationis*; extracellular polymeric substances; microbial-Fenton process; extracellular electron transfer; dissimilatory iron reduction

潮间带沉积物(如红树林、河口区域)是陆海生态系统的重要组成部分,在维持全球生物地球化学循环、保障生态系统功能健康以及维护生物多样性方面发挥着至关重要的作用^[1-4]。潮汐作用引发的淹水效应使沉积物频繁经历有氧与缺氧交替状态,进而形成动态的氧化还原环境以及特殊的微生物代谢过程。在有氧条件下,沉积物中的微生物可通过有氧呼吸生成并释放活性氧(reactive oxygen species, ROS),如过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)和超氧离子自由基(superoxide radicals, $\text{O}_2^{\cdot-}$)等。同时,这些活性氧物种(H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$)能够与厌氧条件下异化铁还原过程中积累的 Fe(II)发生反应,进而触发芬顿反应生成羟基自由基(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$)^[5-6]。由于异化铁还原菌(dissimilatory iron reducing bacteria, DIRB)在沉积物中广泛分布,由 DIRB 驱动的芬顿反应成为潮间带环境独特的生物地球化学机制,被认为是驱动生态系统中元素循环与物质转化的重要动力^[7-9]。

典型的 DIRB (如希瓦氏菌)具有显著的胞外电子传递(extracellular electron transfer, EET)能力,能够利用水铁矿(ferrihydrite, Fh)等铁氧化物作为末端电子受体。该铁氧化还原循环不仅维系了氧-铁耦合的代谢过程,还促进了 $\cdot\text{OH}$ 的生成^[6,10-12]。然而,该过程通常受微生物细胞周围环境介质的显著影响。例如,溶解性有机质(dissolved organic matter, DOM)含有大量氧化还原活性物质[如腐殖质(humic substances, HS)]^[13-14],可作为铁还原菌胞外电子传递过程的

电子穿梭体,加速 Fe(III)还原^[12,15-16]。尽管如此,仍有研究表明 DOM (如 HS)的氧化还原活性具有剂量依赖性,过量 DOM 可能清除 ROS 或形成惰性的铁-有机物复合物,从而抑制自由基的生成^[17-19]。同时,铁与有机物的结合以及微生物活动还可能改变 DOM 中氧化还原活性结构的稳定性,进而削弱其在较长时间尺度上维持电子传递的能力^[17,20]。因此, EPS 的作用仍存在一定争议。

胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)是微生物生长代谢过程自发分泌的一类有机混合物,主要由蛋白质、多糖及类腐殖质组成^[21],在海洋环境中可占总 DOM 的 40% 以上^[22]。与 DOM 类似, EPS 能够通过影响矿物溶解与转化调控 EET 过程,并与 $\cdot\text{OH}$ 发生相互作用^[21,23-24]。然而, EPS 又具有区别于 DOM 的独特微生物属性, EPS 中含有 c 型细胞色素(cytochrome c, Cyt-c)和核黄素等氧化还原组分,且该组分与细胞膜结构及微生物代谢过程(如电子传递)密切相关^[21,25-26]。因此, EPS 可能对微生物芬顿反应产生 $\cdot\text{OH}$ 的过程有直接显著的影响,但其具体作用机制仍有待进一步阐明。

基于此,本研究以典型的兼性铁还原菌模式菌——脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*) S12 及其 EET 缺陷突变株 S12 Δ BA 和 S12 Δ ccmA 为研究对象,阐明 EPS 在有氧-缺氧周期性循环条件下对微生物异化铁还原过程及其后续 ROS 生成的调控作用,以期揭示含 EPS 体系中 $\cdot\text{OH}$ 生成机制提供新的认识。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究采用从活性污泥中筛选的脱色希瓦氏菌(*S. decolorationis*) S12 野生型菌株^[27], 及其 2 个突变株: 敲除部分核黄素合成基因(*ribBA*) 的突变株 S12 Δ BA 和敲除 c 型细胞色素(Cyt-c) 合成基因(*ccmA*)的突变株 S12 Δ *ccmA*^[28-31]。水铁矿(ferrihydrite, Fh)按照文献[32]方法制备: 将 1 mol/L NaOH 溶液逐滴加入持续搅拌的 0.2 mol/L FeCl₃ 溶液中, 直至 pH 约为 7.0。生成的红棕色氢氧化铁悬浮液静置过夜后, 于 6 000 r/min 离心 10 min, 离心 2 次后收集沉淀。所得沉淀用超纯水洗涤至少 3 次后, 转入冷冻干燥机干燥 72 h。干燥完成后取出样品, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器

香豆素(COU, 99%)、7-羟基香豆素(7-hCOU, 98%), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 三氯化铁(FeCl₃, 99.9%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 酵母提取物及胰蛋白胨, Oxoid 公司; 液相色谱级乙腈, CNW Technologies GmbH 公司; 氯化钠(NaCl, 99.8%)、乳酸钠(50%)、氢氧化钠(NaOH, 98%)、甲醇及其他试剂, 广州化学试剂厂; 死活染料试剂盒 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits, ThermoFisher Scientific 公司; 其余化学品均为分析纯, 且所有溶液均使用超纯水配制。

总有机碳分析仪(total organic carbon analyzer, TOC), Shimadzu 公司; 傅里叶变换红外光谱仪, Bruker 公司; 激光共聚焦显微镜, Carl Zeiss 公司; 荧光光谱仪, Edinburgh Instruments 公司; 酶标仪, Agilent Technologies 公司。

1.2 EPS 的提取与表征

采用改进的热提取法从 *S. decolorationis* S12 中提取 EPS^[33-34]。首先在 LB 培养基中活化菌株 24 h, 于 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 并用

0.9% NaCl 溶液反复离心洗涤以去除残留培养基。随后将细胞悬浮液置于 60 °C 水浴中孵育 30 min 以收集菌体颗粒, 再以 10 000 \times g 离心 25 min。所得上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤去除细胞碎片及微小颗粒后, 装入透析袋(截留分子量 100 Da), 在超纯水中透析 30 min 以去除残留盐分等杂质, 从而提升 EPS 样品纯度并减少对后续表征分析的干扰。透析后的 EPS 溶液于 4 °C 避光保存, 并使用总有机碳分析仪测定其总有机碳浓度。此外, 为比较不同来源 EPS 的特性, 本研究还选取了沉积物及活性污泥 2 种环境基质提取的 EPS 进行对比。沉积物样品采自广州珠江沿岸分布的红树林湿地系统海鸥岛的岸边交互带, 该区域处于典型的陆海相互作用带, 受潮汐作用影响显著, 且具有复杂的氧化还原条件及丰富的天然有机质来源, 其 EPS 具有较强的环境响应特征和天然生态代表性。活性污泥样品取自广州净水公司大坦沙净水厂, 代表了典型的人工污水处理体系微生物系统, 其 EPS 通常具有丰富稳定的组成结构和较强的适应能力。为了保证组分的可比性, 对上述 2 种不同来源的样品采用了与 *S. decolorationis* S12 相同的方法的提取 EPS。采用三维荧光光谱(three-dimensional excitation-emission matrix, 3D-EEM)分析 EPS 的组分特征^[35], 激发波长与发射波长分别为 200–500 nm 和 250–550 nm, 扫描幅度为 5 nm/次, 带宽均为 2.5 nm。使用傅里叶变换红外光谱仪在 4 000–400 cm⁻¹ 波数范围内以 4 cm⁻¹ 分辨率对 EPS 官能团进行表征^[35], 并采用 OPUS 7.5 软件进行水汽校正和基线校准。对不同浓度的 EPS 与水铁矿络合后的荧光光谱进行二维相关光谱(two-dimensional correlation spectroscopy, 2D-COS)分析, 进一步探究 EPS 在 25 °C 条件下与水铁矿络合后的结构变化。

1.3 微生物芬顿反应体系的构建

实验体系参照 Han 等^[6]的研究, 在 100 mL 棕色血清瓶(反应体积为 50 mL)中进行(pH 7.0)。以 1.1 节中合成的水铁矿(Fh, 1 g/L)作为电子受

体。培养基参照 Liu 等^[36]的研究, 其组成成分为(g/L): 乳酸钠(作为电子供体和碳源) 4.48, Na₂HPO₄ 4.50, NaH₂PO₄ 1.72, NH₄Cl 1.50, KCl 0.10, 10.00 mL/L 维生素溶液和 5.00 mL/L 矿物质溶液。接种前培养基持续通入 N₂ (30 min) 以去除溶解氧。血清瓶用丁基橡胶塞和铝盖密封, 并配备不锈钢针用于取样和实验过程中的曝气。

三种菌株在 LB 培养基中扩大培养, 经 6 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体颗粒, 之后在 0.9% NaCl 溶液重悬并接种至血清瓶中, 终浓度约为 10⁸ cells/mL (*OD*₆₀₀≈0.5)。反应体系中加入 1.2 节中提取的 EPS (初始浓度为 20 mg TOC/L), 反应过程使用磁力搅拌器持续搅拌(300 r/min)。实验共进行 3 个循环(3 d), 每一个循环首先向反应体系中连续通入约 15 h 的高纯 N₂, 以保持反应体系的厌氧环境, 随后分别连续通入空气、N₂、空气各 3 h, 即一个完整循环(24 h)。通气速率均为 100 mL/min 同时设置多组对照体系, 包括单因素对照(分别仅添加 S12、EPS 或 Fh)以及双因素对照(S12+EPS 和 EPS+Fh)。此外, 设置接种突变株的反应体系(如 S12ΔBA+Fh、S12ΔccmA+Fh 及其添加 EPS 的体系)用于对比分析电子传递能力变化对反应过程的影响。各体系其余实验条件保持一致。实验于每个好氧或厌氧阶段结束时采集样品用于测定 Fe(II) 和 •OH 浓度, 运行 3 d 后收集反应器中的沉淀用于后续分析。反应结束后, 采用死活染料试剂盒进行染色, 并使用激光共聚焦显微镜观察细胞活性。所有实验均在 (25±3) °C 条件下进行, 且均设置 3 次平行。

1.4 总 Fe(II) 的测定及 •OH 的测定

采用 1,10-菲啰啉比色法测定 Fe(II) 浓度^[6]。测定可溶性 Fe²⁺ 时, 取反应体系中 1 mL 悬浮液经 0.22 μm 滤膜过滤; 测定总 Fe²⁺ 时, 将 1 mL 悬浮液与等体积 0.1 mol/L HCl 混合, 反应 15 min 后再经 0.22 μm 滤膜过滤。所得滤液依次加入乙酸钠缓冲液(10%, 1 mL) 和 1,10-菲啰啉溶液(0.1%, 1 mL), 混匀反应 15 min 后, 使用酶标

仪在 510 nm 波长下测定吸光度。

•OH 浓度采用 Han 等^[6]报道的 COU 荧光探针法测定。取 1 mL 样品与 1 mL COU 溶液(1.5 mmol/L) 混合, 在空气中反应 3 h, 生成稳定的荧光产物 7-hCOU。随后加入 0.5 mL 甲醇终止反应, 溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 使用荧光光谱仪进行测定, 设置激发波长为 350 nm, 发射波长为 460 nm。根据 0.01–10.00 μmol/L 范围内的校准曲线定量 7-hCOU 的生成量。•OH 总量按 [7-hCOU]/14.5% 计算, 该方法检出限为 0.034 μmol/L^[6]。

2 结果与讨论

2.1 EPS 对 Fe(III) 还原和 •OH 生成的影响

在厌氧-好氧交替阶段中, 总 Fe(II) 含量和 •OH 浓度呈现周期性波动(图 1)。在厌氧条件下, S12 释放的电子转移至 Fh 中, 将 Fe(III) 还原为 Fe(II), 且在重新通氧后, Fe(II) 又迅速被氧化为 Fe(III)。在 S12+Fh 组中, 总 Fe(II) 的积累量最高可达 (192.07±51.99) mg/L, 而未接种 S12 的对照组几乎未检测到 Fe(II), 表明在缺乏 DIRB 参与的情况下, EPS 无法独立实现水铁矿的还原。相较于 S12+Fh 组, S12+EPS+Fh 组显著抑制了 Fe(II) 的积累, 其 Fe(II) 浓度降低了约 (56.63±4.67)%, 可见 EPS 对异化铁还原过程具有明显的抑制作用, 该结果与 Cui 等^[37]关于 DOM 的研究结果一致。考虑到 EPS 在组成和功能上与 DOM 具有一定的相似性, 推测 EPS 可能通过类似机制参与调控铁循环: EPS 可能与 Fh 结合形成复合体, 阻碍水铁矿表面活性位点, 从而影响 *S. decolorationis* 的电子转移速率, 导致 Fe(II) 积累量下降。此外, 各处理组中的可溶性 Fe(II) 含量均较低(图 1D), 表明微生物产生的 Fe(II) 更可能参与固态次生矿物的形成, 而非以溶解态释放。

在氧化过程中含 Fe(II) 矿物通过芬顿反应生

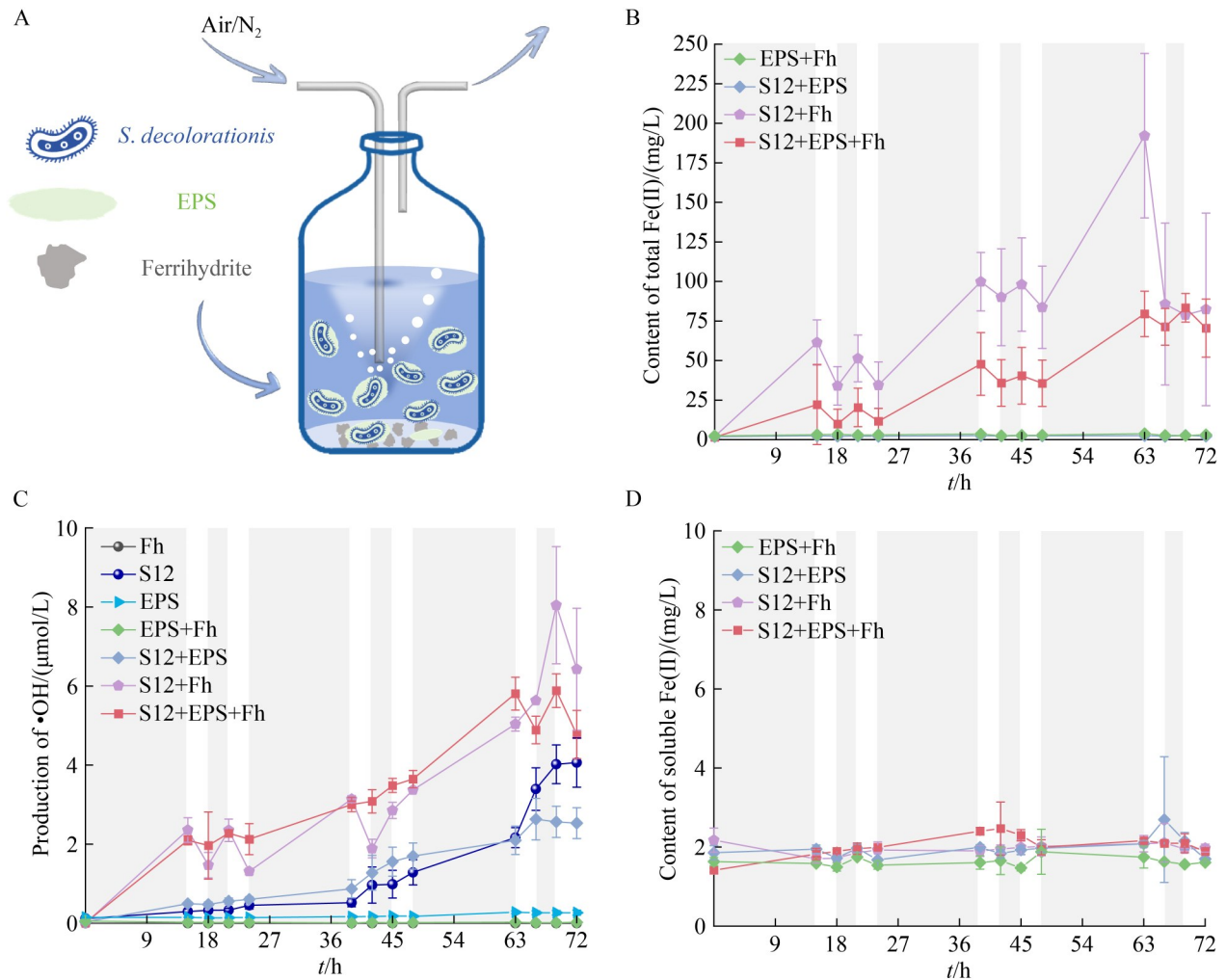


图1 *Shewanella decolorationis* S12在有氧-缺氧条件下的Fe(II)和•OH累积量变化情况

Figure 1 Variations in Fe(II) accumulation and •OH generation by *Shewanella decolorationis* S12 under oxidic-anoxic conditions. A: Schematic illustration for experiments of microbial-Fenton process; B–D: The variation of total Fe(II), •OH accumulated and soluble Fe(II) content during the operation inoculated with *S. decolorationis* S12, the shaded grey areas indicate the anoxic conditions.

成•OH^[6,38-40], 且•OH 主要在反应体系的复氧瞬间(即厌氧阶段结束、有氧阶段开始)生成, 随后在有氧阶段末尾回落(图 1C)。这主要是由于Fe(II)与O₂^{•-}等氧化剂产生•OH的过程具有较快的反应速率^[41], 因此在反应体系的复氧瞬间, 通入的氧气经过一系列生物化学过程与厌氧过程中累积的Fe(II)反应快速生成•OH; 而在有氧阶段末期, 由于Fe(II)被迅速消耗转化为Fe(III)(且多为固态形式, 利用率低), Fe(III)与氧化剂

的反应速率远低于Fe(II), 从而导致•OH生成缓慢甚至停滞。由于•OH具有高氧化性, 其化学寿命不长且易与反应体系中的各种有机质反应, 使其在有氧阶段的末期出现了浓度降低的情况。

如图 1C 所示, S12+Fh 组•OH产量最高达(8.05±1.48) μmol/L, 而在缺乏S12的体系中未检测到自由基, 表明微生物芬顿反应的发生依赖于DIRB的参与, 该浓度水平的•OH并不会对细菌造成明显损伤。活/死菌荧光染色结果显

示, 在整个氧化还原循环过程中, 大部分 S12 细胞仍保持活性(图 2), 这与已有研究结果一致, 即 *S. oneidensis* MR-1 能够耐受较低水平的 $\cdot\text{OH}$ ^[17]。此外, 研究表明, 在氧化阶段失活的细胞可释放核黄素类电子穿梭体, 并保持一定的 Fe(III)还原活性, 从而增强存活细胞的电子传递能力, 并在后期促进 Fe(II)的进一步累积^[42]。

本研究发现尽管 EPS 对 Fe(II)的积累存在抑制作用, 但其对自由基水平的影响相对较小。如图 1 所示, S12+EPS+Fh 实验组的 $\cdot\text{OH}$ 最高浓度约为 $(5.88\pm 0.43) \mu\text{mol/L}$, 仅略低于 S12+Fh 组, 相比下降了 $(26.86\pm 5.30)\%$ 。该现象表明可能存在一种由 EPS 介导的 $\cdot\text{OH}$ 生成途径, 即 *S. decolorationis* 可利用 EPS 本身的氧化还原活性进行有氧呼吸生成一定量的 $\cdot\text{OH}$ 。这也与前期研究希瓦氏菌可利用 DOM 在有氧-缺氧条件下生成 $\cdot\text{OH}$ 的机理类似^[43-44]。有研究表明, EPS 中的腐殖质类物质可作为电子穿梭体, 在微生物呼吸过程中介导胞内电子向外部电子受体的传

递, 通过醌/半醌的可逆氧化还原循环促进 ROS 的生成^[45-46]。这一点也体现在仅含 S12 的体系中(该体系虽未添加 EPS, 但脱色希瓦氏菌在其生长代谢过程中也会分泌 EPS), 该体系的 $\cdot\text{OH}$ 浓度可达 $(4.06\pm 0.62) \mu\text{mol/L}$, 而仅含 Fh 或 EPS 的体系中 $\cdot\text{OH}$ 生成可忽略不计(图 1C), 进一步表明微生物参与是微生物芬顿反应发生的必要条件。总体而言, 尽管 EPS 对脱色希瓦氏菌的铁还原过程存在剂量效应[即添加的过量 EPS 抑制了 Fe(II)积累], 但对 $\cdot\text{OH}$ 生成的宏观影响较为有限。

不同来源的 EPS 在氧化还原循环过程中表现出显著差异的调控特征(图 3), 与脱色希瓦氏菌 EPS 类似, 均对反应体系中 Fe(II)生成有较强的抑制作用。其中 EPS-S12 和 EPS-Sediment 组的 Fe(II)峰值分别下降至约 $(83.29\pm 8.96) \text{mg/L}$ 和 $(81.43\pm 8.62) \text{mg/L}$ 。相比之下, EPS-Sludge 组表现出更为显著的抑制效应, Fe(II)累积量仅约为 $(52.39\pm 16.82) \text{mg/L}$, 表明活性污泥来源的 EPS 对矿物还原过程具有更强的干扰能力。 $\cdot\text{OH}$ 生成也

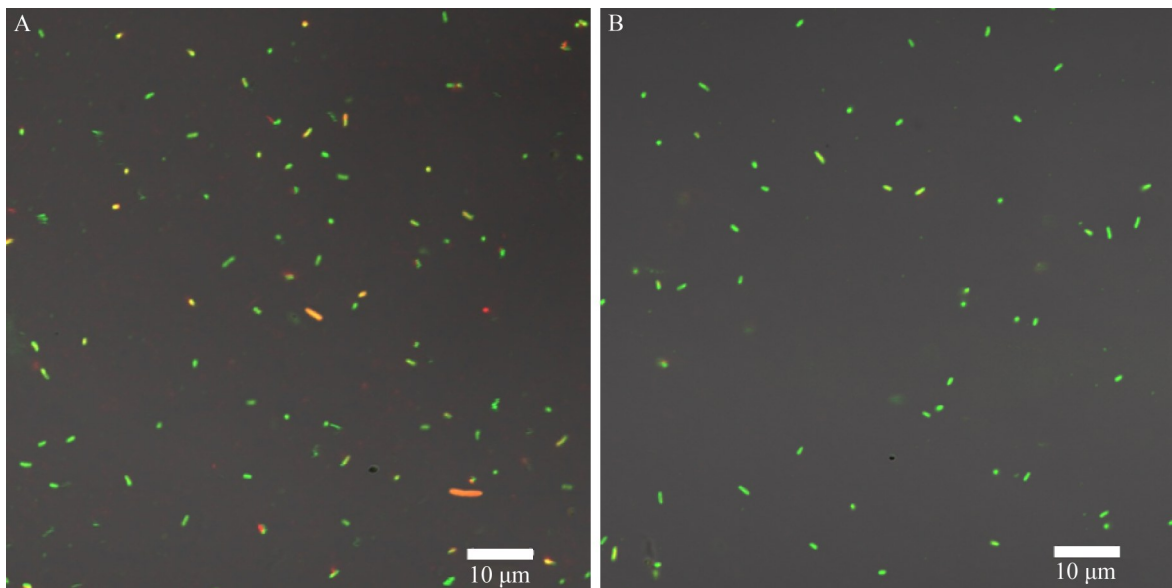


图2 不同体系中细胞活性比较

Figure 2 Comparison of cell viability in different systems. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of cells after live/dead staining on days 2. A: S12+Fh group; B: S12+EPS+Fh group.

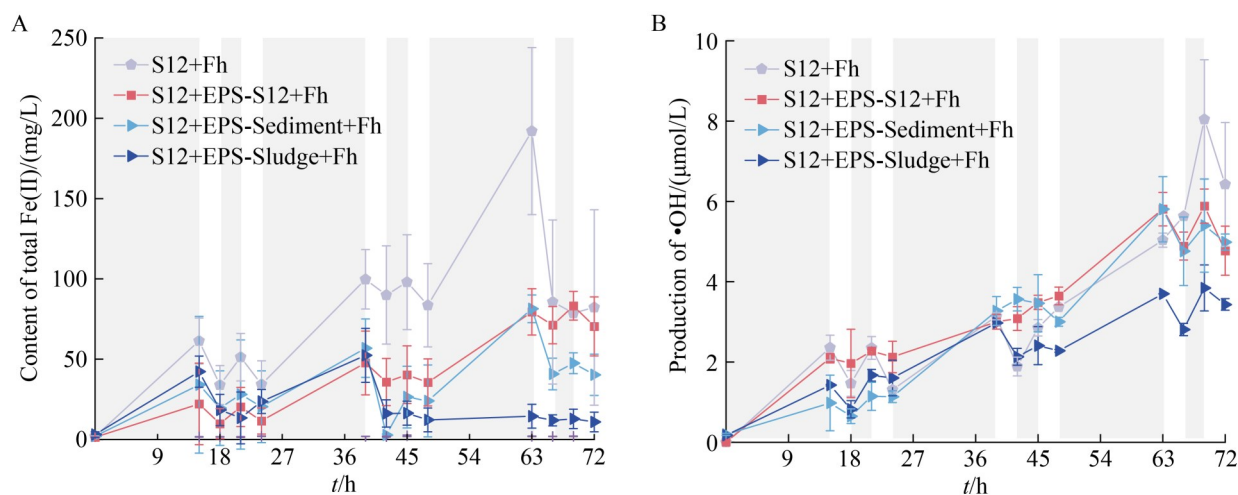


图3 环境相关来源(沉积物和活性污泥) EPS对接种*Shewanella decolorationis* S12体系中Fe(II)累积与•OH生成的影响

Figure 3 Influence of environmentally relevant EPS (sediment and sludge) on Fe(II) accumulation and •OH generation during the operation inoculated with *Shewanella decolorationis* S12. A: The variation of total Fe(II); B: •OH accumulated during the operation.

存在一定程度的下降。EPS-S12 和 EPS-Sediment 组的 •OH 峰值分别为 (5.88 ± 0.43) $\mu\text{mol/L}$ 和 (5.81 ± 0.42) $\mu\text{mol/L}$, 尽管 Fe(II) 浓度明显下降, 但体系仍维持相对较高的自由基水平。这可能与 EPS 中含有具有氧化还原活性的组分有关。相比之下, EPS-Sludge 组的 •OH 峰值仅为 (3.84 ± 0.57) $\mu\text{mol/L}$, 这说明较低的 Fe(II) 前体水平直接限制了芬顿反应的发生。

2.2 EPS 氧化还原活性对微生物芬顿反应的影响

在未添加 EPS 的条件下, S12 Δ BA+Fh 组和 S12 Δ ccmA+Fh 组中总 Fe(II) 的最大浓度分别为 (134.21 ± 27.57) mg/L 和 (100.09 ± 12.85) mg/L (图 4A、4B), 均显著低于 S12+Fh 组 (192.07 ± 51.99) mg/L。这一结果表明核黄素或 Cyt-c 合成基因的缺失削弱了希瓦氏菌的胞外电子传递效率, 从而影响了 Fe(III) 还原。在有氧-缺氧循环过程中, EPS 的添加进一步加剧了对突变株 Fe(III) 还原能力的抑制效应。如图 4A、4B 所示, 添加 EPS 后,

S12 Δ BA 和 S12 Δ ccmA 体系中的总 Fe(II) 分别降低 $(34.76 \pm 20.23)\%$ 和 $(37.30 \pm 17.64)\%$ 。在该过程中, 微生物与矿物之间的界面接触是电子传递的关键环节, 而 EPS 在矿物表面形成的覆盖层可能阻碍细胞与矿物的直接接触, 从而显著抑制 Fe(III) 还原过程。相比之下, 由于突变株 S12 Δ ccmA 的 Cyt-c 合成受阻, 其直接电子传递能力下降, 对 Fe(III) 还原主要依赖于间接电子传递。因此, 在额外添加 EPS 之后, 野生株 S12 反应体系中总 Fe(II) 累积量的下降幅度大于突变株 S12 Δ ccmA。即便如此, 由于野生型 S12 相较于突变株具有完整的电子传递链, 其总 Fe(II) 累积量仍然大于突变株 S12 Δ ccmA。

突变株体系中 •OH 的生成规律与其铁还原能力的趋势一致。S12 Δ BA+Fh 组和 S12 Δ ccmA+Fh 组产生的 •OH 浓度分别为 (7.33 ± 0.58) $\mu\text{mol/L}$ 和 (6.29 ± 1.52) $\mu\text{mol/L}$ (图 4C、4D), 均低于 S12+Fh 组 (8.05 ± 1.48) $\mu\text{mol/L}$ 。其中, S12 Δ ccmA 组中 •OH 的下降更为明显, 表明 Cyt-c 在该过程中发挥主导作用。Liu 等^[47]的研究表明, 类核黄

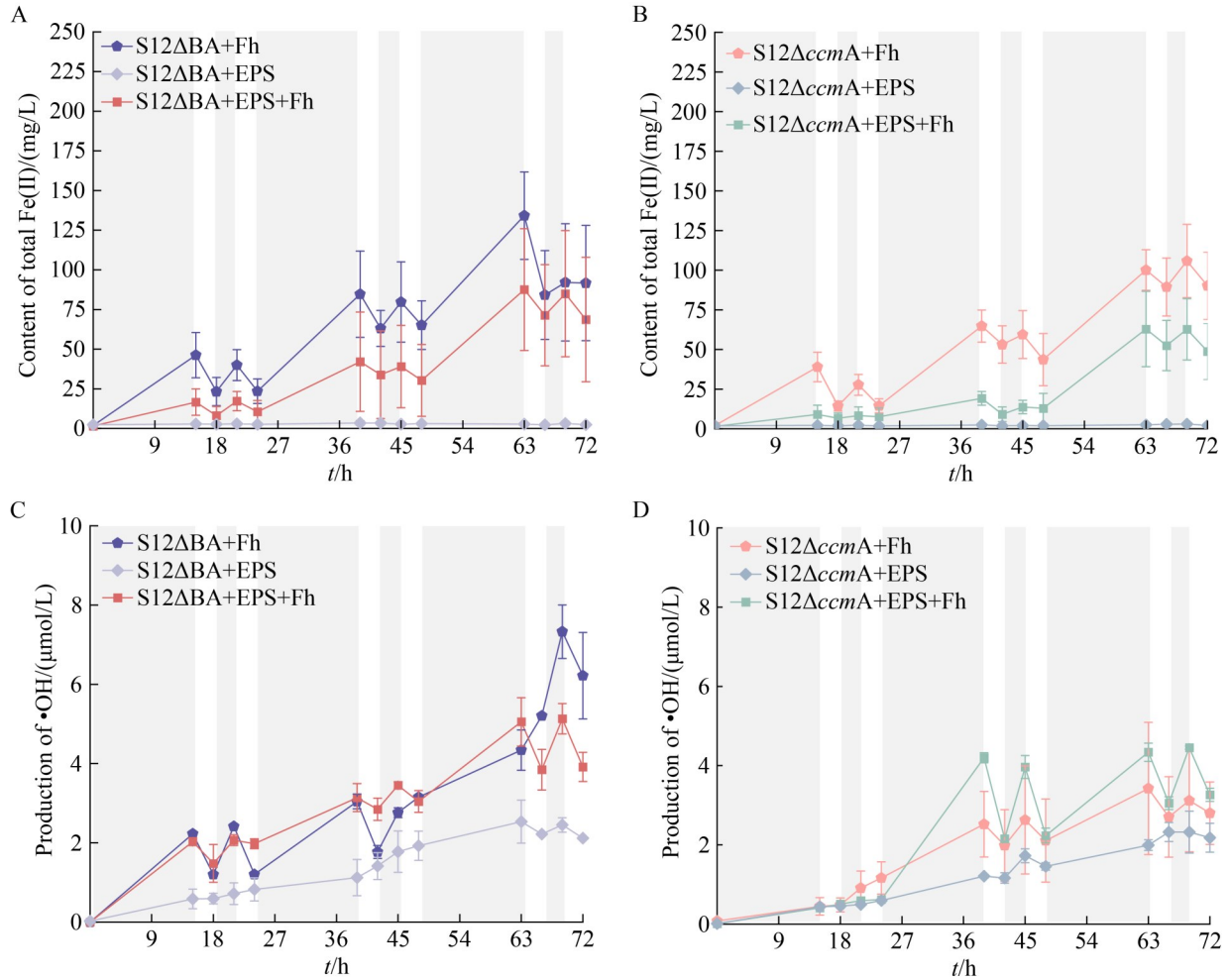


图4 两种*Shewanella decolorationis* S12突变株反应体系中总Fe(II)和•OH的变化

Figure 4 Variation of total Fe(II) and •OH generation during operation inoculated with two *Shewanella decolorationis* S12 mutants. A–B: Total Fe(II) variation inoculated with S12ΔBA and S12ΔccmA; C–D: •OH generation inoculated with S12ΔBA and S12ΔccmA.

素介导的电子穿梭在富含电子受体的介质中同样能够贡献 EET 能力，这也解释了 S12ΔccmA 仍可通过基于核黄素的途径保留部分•OH 生成能力。如图 4C、4D 所示，加入 EPS 后，S12ΔBA 组与 S12 组类似，其•OH 产量下降约 (29.98±5.25)%，而 S12ΔccmA 组的•OH 生成量则有所增加。这一现象表明，EPS 中基于核黄素或其他可溶性氧化还原活性组分的电子穿梭机制在一定程度上能够弥补 Cyt-c 途径缺失所造成的影响^[17,48-49]。因此，EPS 在不同体系中

对•OH 的生成过程表现出双重作用：在 EET 功能完整的体系(S12、S12ΔBA)中主要表现为抑制效应，而在缺失关键电子载体的体系(S12ΔccmA)中则可能提供一定程度的功能补偿。

为进一步阐明这种差异性，对 EPS 进行了 3D-EEM 表征。结果显示，EPS 中以可溶性微生物代谢产物(峰 a, Ex/Em=275–290/315–345)和腐殖质类物质(峰 b, Ex/Em=435–470/510–550)为主要组分(图 5A)。这些峰主要反映具有相似光谱特征的一类有机物组分，而非特定的单一

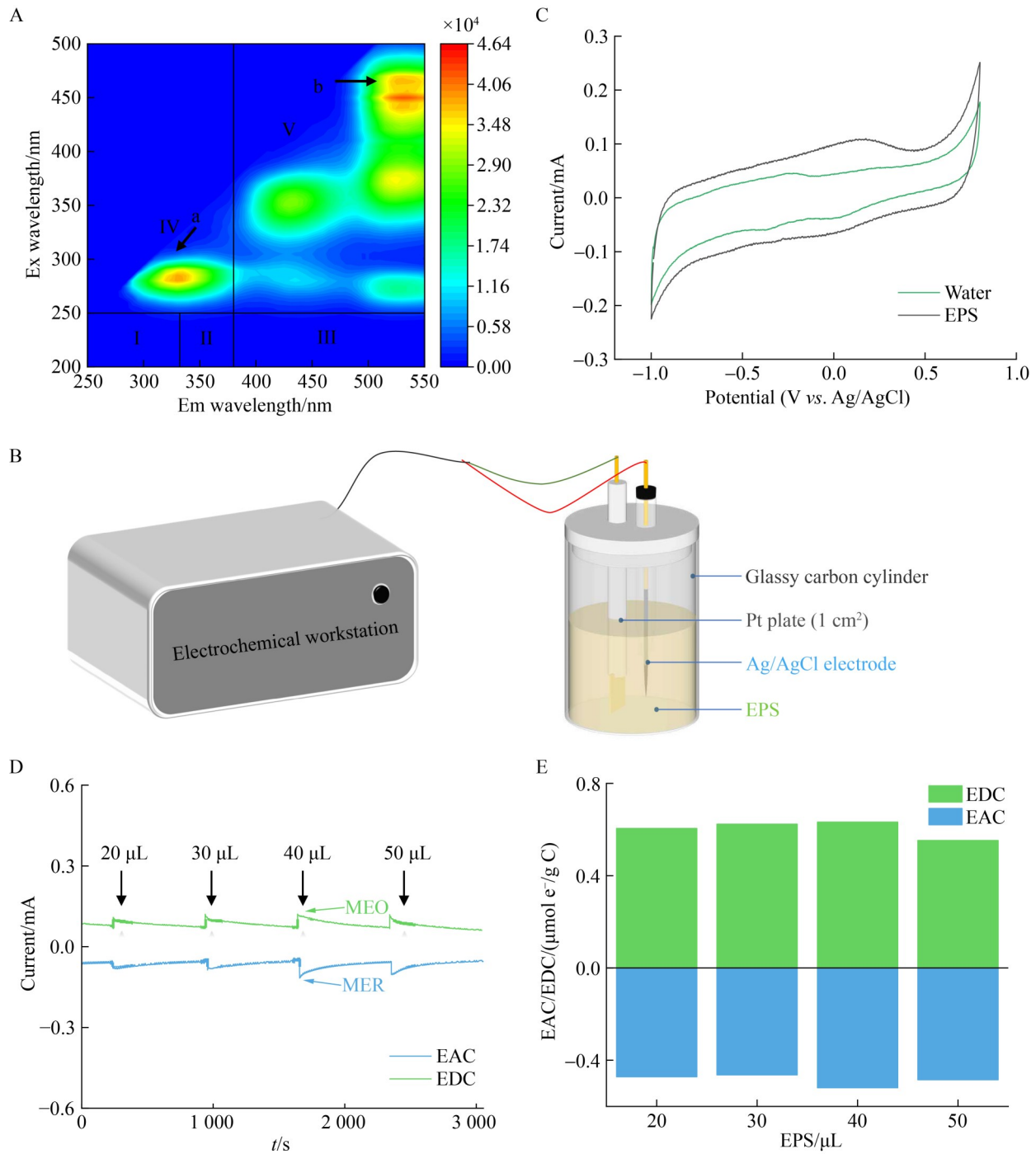


图5 *Shewanella decolorationis* S12的EPS组分及电化学特性表征

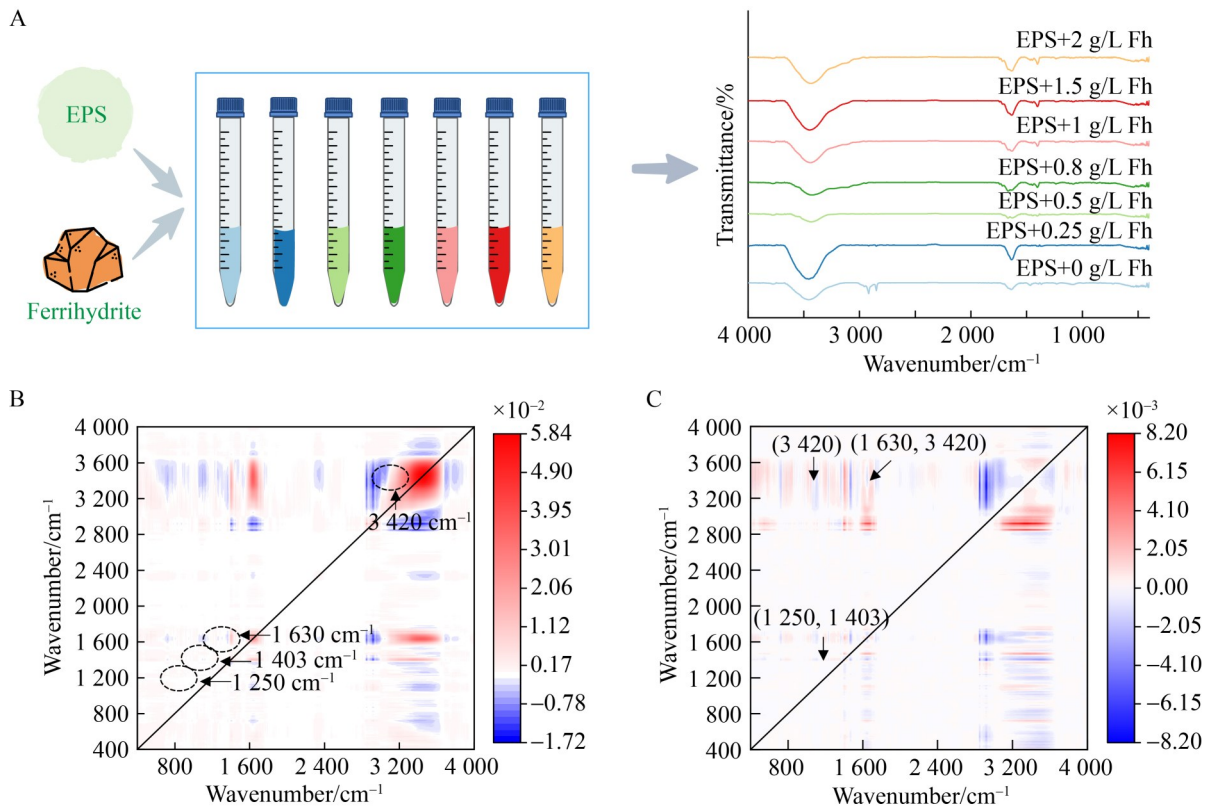
Figure 5 Characterization of EPS composition and electrochemical properties from *Shewanella decolorationis* S12. A: 3D-EEM fluorescence spectrum; B: Schematic diagram of the electrochemical workstation setup; C: Cyclic voltammogram; D: Reductive and oxidative current responses of EPS; E: Electron transfer capacity of EPS calculated based on the reductive and oxidative current responses. The EDC and EAC stand for electron-donating and -accepting capacity.

化学物质^[50], 其具体分类参照 Chen 等^[51]提出的荧光区域积分法。其电化学特性采用图 5B 所示装置进行测定。与超纯水(即空白对照)相比, EPS 在循环伏安曲线中呈现出明显的氧化还原原峰(图 5C), 表明其具有一定的氧化还原活性。定量结果进一步表明, 来源于 S12 的 EPS 含有多种赋予电子供体能力(electron-donating capacity, EDC)和电子受体能力(electron-accepting capacity, EAC)的氧化还原活性基团(图 5D、5E)。这些基团可在微生物呼吸过程中充当可再生的电子中介体^[52-53]。对于 S12 Δ ccmA 菌株, 这种补偿性的氧化还原活性为添加 EPS 在该体系中增加 \cdot OH 生成的现象提供了合理解释。这一特性与 DOM 类似, 扩大微生物代谢的空间范围, 使沉积物中更多含 Fe(III)的物质能够作为电子受体参与反应。因此, 由 DIRB 驱动的微生物芬顿反应能够在更广的空间和时间尺度上影响潮间带沉积物环境的化学元素循环和物质转化。

2.3 EPS 对铁次生矿物的影响

如图 6A 所示, 本研究将 EPS 与不同浓度的 Fh 混合制备了一系列复合样品, 用于后续 FTIR 和二维相关光谱(2D-COS)分析。FTIR 结果表明, EPS 具有 O-H ($3\,420\text{ cm}^{-1}$)、C=O ($1\,630\text{ cm}^{-1}$)、COO⁻ ($1\,403\text{ cm}^{-1}$)和 C-O-C ($1\,250\text{ cm}^{-1}$)等特征吸收峰, 分别对应羟基、羰基、羧酸和醚基官能团。这些官能团可与 Fh 表面的 Fe 发生配位, 参与电子捕获与传递, 并形成 EPS-Fe 复合物^[21,54]。该相互作用通过覆盖或包裹矿物表面降低铁的生物可利用性, 进而抑制电子传递及微生物芬顿过程^[12,55]。

激光共聚焦扫描显微镜结果进一步证实了 EPS 在 Fh 表面的包裹作用(图 6F)。加入 EPS 后, 矿物表面出现液态附着物, 颗粒边缘变得模糊; 而在仅含 Fh 的体系中未观察到该现象, 说明该附着物可能阻碍细菌与矿物表面的直接接触^[56-57]。为探究 Fh 与 EPS 的络合关系, 2D-COS 分析了 EPS 官能团的动态响应。在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$



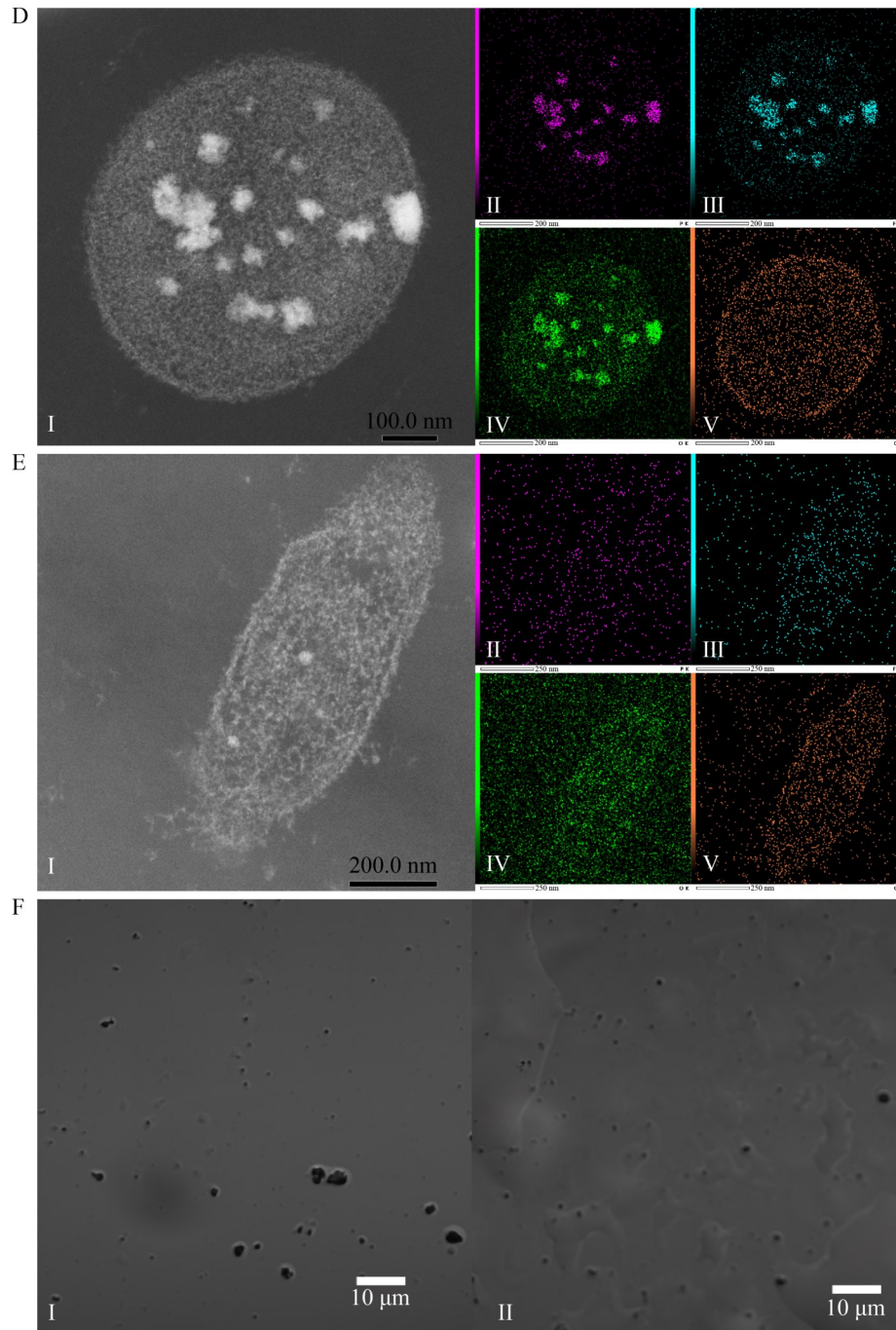


图6 EPS与Fh的相互作用

Figure 6 EPS interacted with Fh. A: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of the interactions between EPS and various concentrations of Fh (0–2 g/L); B–C: Synchronous and asynchronous maps obtained from 2D-COS analyses based on FTIR datasets (25 °C) (EDS spectra of the bacteria after redox cycles); D: S12+Fh group; E: S12+EPS+Fh group [The Roman numerals in the spectrum designate the following elements: II: Phosphorus (P); III: Iron (Fe); IV: Oxygen (O); V: chlorine (Cl)]; F: Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of cells after live/dead staining on days 2 (I: Fh group; II: EPS+Fh group).

下, 响应顺序为 $3\ 420\ \text{cm}^{-1}$ (O-H) \rightarrow $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ (C=O) \rightarrow $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$ (C-O-C) \rightarrow $1\ 403\ \text{cm}^{-1}$ (COO⁻), 其中 $3\ 420\ \text{cm}^{-1}$ 的最早响应, 表明 Fe 与羟基的快速相互作用(图 6B、6C)。如图 6D、6E 所示, EPS 的加入降低了 Fe 在细菌表面的吸附量。总体来看, EPS 能动态结合固态铁, 并通过包覆矿物限制细胞对 Fe 的接触, 从而降低 Fe(III)的生物可利用性。

为阐明 EPS 在氧化还原过程中对铁矿物演化的影响, 本研究采用 X 射线衍射(X-ray

diffraction, XRD)和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)对反应前后的矿物进行了表征(图 7)。XRD 结果显示, 在 S12+Fh 组中, Fe(III)在 Cyt-c 和核黄素作用下被还原生成 Fe(II), 随后与磷酸盐反应沉淀, 形成蓝铁矿及其他次生矿物(如赤铁矿)(图 7C), 且 TEM 进一步揭示了其显著的形态变化(图 7I-7L)。EPS 的加入并未显著改变次生矿物的形成。在细菌作用下, 铁矿物表面呈粗糙状(图 7E-7H), 而在 EPS+Fh 组中矿物表面更加光滑, 可能与 EPS 的

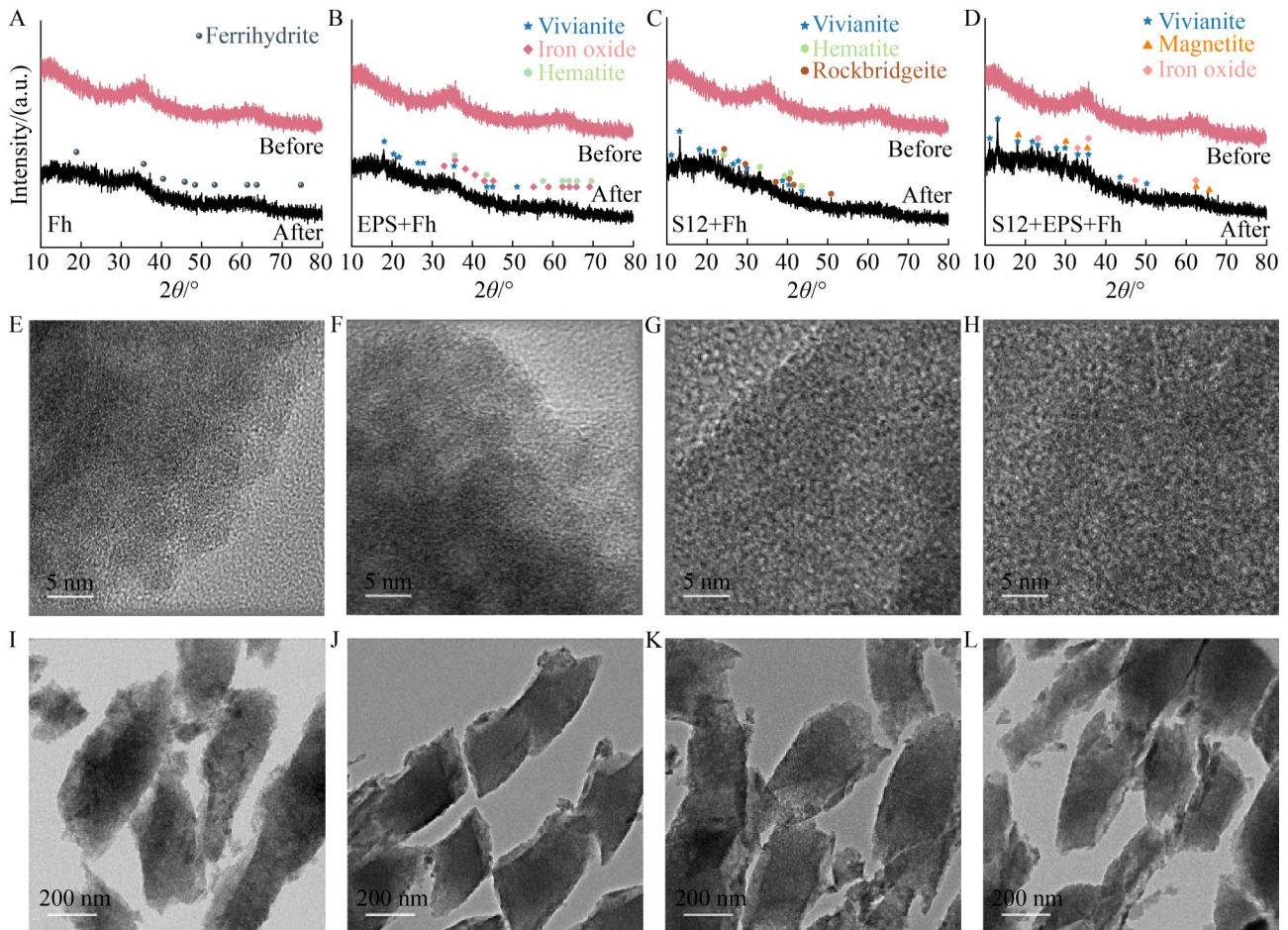


图7 氧化还原循环后水铁矿的转化

Figure 7 Transformation of Fh after redox cycles. A–D: XRD patterns; E–L: TEM images. The different labels represent: A, E, I: Fh group; B, F, J: EPS+Fh group; C, G, K: S12+Fh group; D, H, L: S12+EPS+Fh group. The symbols in the XRD patterns indicate different mineral phases: ferrihydrite, vivianite, hematite, magnetite, and other iron oxides (e. g., iron oxide, rockbridgeite). Each symbol corresponds to a specific crystalline phase identified in the samples.

包覆作用有关。在纯 Fh 组中仍可检测到水铁矿, 未发生明显相转变(图 7A)。当 EPS 加入 Fh 体系后, 仍有少量 Fe(II)生成(约 2 mg/L) (图 1D), 为后续矿物转化提供了必要的反应前驱体。已有研究表明, HS 与 Fe(II)共存可促进蓝铁矿的形成^[58]。考虑到 EPS 与 HS 具有相似性, EPS 也可能参与类似反应, 促进蓝铁矿的生成, 并伴随赤铁矿的形成(图 7B)^[59]。与已有研究中有有机配体主要通过调控 Fe(II)介导的矿物转化过程不同^[59-64], 本研究发现 EPS 主要通过络合 Fh 并占据其表面活性位点抑制 Fe(II)生成, 从而改变矿物转化途径及 ROS 的产生^[59-60], 并可能进一步促进沉积物中含铁矿物的结构异质性和形态多样性。

3 结论

本研究探究了脱色希瓦氏菌(*S. decolorationis*)分泌的 EPS 对其在厌氧-有氧过程中 $\cdot\text{OH}$ 生成过程的影响机制, 揭示了 EPS 在调控微生物芬顿反应过程中的重要作用。研究表明 EPS 具有一定的氧化还原活性, 使其能够作为电子穿梭体参与微生物介导的 Fe(III)/Fe(II)循环, 其作用具有明显的剂量效应。当 EPS 含量过高时, 会抑制 Fe(III)还原并降低 $\cdot\text{OH}$ 生成。这种抑制作用主要源于 EPS 包裹铁矿物形成复合物并降低其生物可还原性。本研究的研究结论对深入认识影响潮间带沉积物等感潮水土环境中的生物地球化学过程及污染物削减具有重要意义。此外, 由于本研究基于实验室模拟体系开展, 尽管该体系能够在一定程度上反映潮间带沉积物中氧化还原振荡条件下的微生物-铁矿物相互作用过程, 但天然环境中仍存在更加复杂的矿物组成、有机质类型及微生物群落结构。因此, EPS 在天然沉积物中的实际作用仍需通过原位或沉积物体系进一步验证。

作者贡献声明

黄蕴琪: 论文撰写, 实验研究, 数据整理与分析; 王逸: 审阅与修改, 项目获取; 安文文: 参与铁矿表征实验; 甘翠芬: 参与死活细胞染色实验; 周少锋: 审阅与修改, 项目获取, 研究构思; 许玫英: 审阅与修改, 项目获取。

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] Schutte CA, Ahmerkamp S, Wu CS, Seidel M, de Beer D, Cook PLM, Joye SB. Biogeochemical dynamics of coastal tidal flats[M]//Coastal Wetlands. Amsterdam: Elsevier, 2019: 407-440.
- [2] Buzzelli CP. Dynamic simulation of littoral zone habitats in lower Chesapeake Bay. I. ecosystem characterization related to model development[J]. Estuaries, 1998, 21(4): 659.
- [3] Childers DL, Day JW Jr, McKellar HN Jr. Twenty more years of marsh and estuarine flux studies: revisiting Nixon (1980)[M]//Concepts and Controversies in Tidal Marsh Ecology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002: 391-423.
- [4] McGenity TJ. Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 27: 46-54.
- [5] Sekar R, DiChristina TJ. Microbially driven Fenton reaction for degradation of the widespread environmental contaminant 1,4-dioxane[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(21): 12858-12867.
- [6] Han RX, Lv JT, Huang ZQ, Zhang SH, Zhang SZ. Pathway for the production of hydroxyl radicals during the microbially mediated redox transformation of iron (oxyhydr)oxides[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(2): 902-910.
- [7] Nosaka Y, Nosaka AY. Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(17): 11302-11336.
- [8] Wang JW, Shan S, Ma Q, Zhang ZJ, Dong HS, Li SZ, Diko CS, Qu YY. Fenton-like reaction driving the degradation and uptake of multi-walled carbon nanotubes mediated by bacterium[J]. Chemosphere, 2021, 275: 129888.
- [9] Takahashi S, Hori K. Long-term continuous degradation of carbon nanotubes by a bacteria-driven Fenton reaction[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1298323.

- [10] Weber KA, Achenbach LA, Coates JD. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(10): 752-764.
- [11] Lovley DR, Phillips EJP. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6): 1472-1480.
- [12] Chang JF, Liang DH, Gao Y, Sun YT, Wang X, Ren NQ, Li N. Nano-magnetite enhances dissimilated iron reduction to vivianite from sewage by structuring an enormous and compact electron transfer network[J]. *Water Research*, 2025, 268: 122583.
- [13] Al-Reasi HA, Wood CM, Smith DS. Characterization of freshwater natural dissolved organic matter (DOM): mechanistic explanations for protective effects against metal toxicity and direct effects on organisms[J]. *Environment International*, 2013, 59: 201-207.
- [14] Hutchins RHS, Aukes P, Schiff SL, Dittmar T, Prairie YT, del Giorgio PA. The optical, chemical, and molecular dissolved organic matter succession along a boreal soil-stream-river continuum[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2017, 122(11): 2892-2908.
- [15] Kappler A, Benz M, Schink B, Brune A. Electron shuttling *via* humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(1): 85-92.
- [16] You XJ, Liu SG, Berns-Herrboldt EC, Dai CM, Werth CJ. Kinetics of hydroxyl radical production from oxygenation of reduced iron minerals and their reactivity with trichloroethene: effects of iron amounts, iron species, and sulfate reducing bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(12): 4892-4904.
- [17] Han RX, Wang Z, Lv JT, Zhu Z, Yu GH, Li G, Zhu YG. Multiple effects of humic components on microbially mediated iron redox processes and production of hydroxyl radicals[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(22): 16419-16427.
- [18] Palmer NE, von Wandruszka R. The influence of aggregation on the redox chemistry of humic substances[J]. *Environmental Chemistry*, 2009, 6(2): 178-184.
- [19] Liu XM, Wang YQ, Wang WW, Huang WF, Yu Z, Zhou SG. Protein-derived structures determines the redox capacity of humic acids formed during hyperthermophilic composting[J]. *Waste Management*, 2021, 126: 810-820.
- [20] Zhou SG, Chen SS, Yuan Y, Lu Q. Influence of humic acid complexation with metal ions on extracellular electron transfer activity[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17067.
- [21] Flemming HC, van Hullebusch ED, Little BJ, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, Wingender J, Wuertz S. Microbial extracellular polymeric substances in the environment, technology and medicine[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2025, 23(2): 87-105.
- [22] Zhou SF, Liao ZY, Zhang BP, Hou R, Wang Y, Zhou SG, Zhang YF, Ren ZJ, Yuan Y. Photochemical behavior of microbial extracellular polymeric substances in the aquatic environment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(22): 15090-15099.
- [23] Chen CM, Sparks DL. Fe(II)-induced mineral transformation of ferrihydrite-organic matter adsorption and co-precipitation complexes in the absence and presence of As(III)[J]. *ACS Earth and Space Chemistry*, 2018, 2(11): 1095-1101.
- [24] Zhang L, Liu CH, Li D, Zhao YJ, Zhang X, Zeng XP, Yang ZN, Li SY. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54: 270-275.
- [25] You GX, Wang C, Wang PF, Chen J, Gao Y, Li Y, Xu Y. Long-term transformation of nanoscale zero-valent iron explains its biological effects in anaerobic digestion: from ferroptosis-like death to magnetite-enhanced direct electron transfer networks[J]. *Water Research*, 2023, 241: 120115.
- [26] Li SW, Sheng GP, Cheng YY, Yu HQ. Redox properties of extracellular polymeric substances (EPS) from electroactive bacteria[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39098.
- [27] Xu MY, Guo J, Cen YH, Zhong XY, Cao W, Sun GP. *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 363-368.
- [28] Yang YG, Kong GN, Chen XJ, Lian YL, Liu WZ, Xu MY. Electricity generation by *Shewanella decolorationis* S12 without cytochrome *c*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1115.
- [29] Chen XJ, Xu MY, Wei JB, Sun GP. Two different electron transfer pathways may involve in azoreduction in *Shewanella decolorationis* S12[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(2): 743-751.
- [30] Mack M, van Loon APGM, Hohmann HP. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(4): 950-955.
- [31] 孔冠楠, 许玫英, 宋达, 杨永刚. Mcc 在脱色希瓦氏菌 S12 电极呼吸中的作用[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1547-1554.
- [32] Kong GN, Xu MY, Song D, Yang YG. Role of Mcc in *Shewanella decolorationis* S12 electrode respiration[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(7): 1547-1554 (in Chinese).
- [32] Lv JT, Zhang SZ, Wang SS, Luo L, Cao D, Christie P. Molecular-scale investigation with ESI-FT-ICR-MS on

- fractionation of dissolved organic matter induced by adsorption on iron oxyhydroxides[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(5): 2328-2336.
- [33] Yang JR, Zhang Y, Wang SL. Over-produced extracellular polymeric substances and activated antioxidant enzymes attribute to resistance of Pb(II) for algal-bacterial granular sludge in municipal wastewater treatment[J]. *Water*, 2023, 15(21): 3833.
- [34] Cui YF, Zhang S, Zhao PB, Cui JY, Song SW, Qu Y, Zhang HP, Ma D. Assessment system and optimization of the thermal extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from *Microcystis*[J]. *Microorganisms*, 2026, 14(1): 116.
- [35] Ruan XD, Li L, Liu JX. Flocculating characteristic of activated sludge flocs: interaction between Al³⁺ and extracellular polymeric substances[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(5): 916-924.
- [36] Liu CX, Kota S, Zachara JM, Fredrickson JK, Brinkman CK. Kinetic analysis of the bacterial reduction of goethite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(12): 2482-2490.
- [37] Cui JY, He H, Shi WQ, Liao ZC, Cui DN, Yang JX, Liu YX, Lai CC, Huang B, Pan XJ. Interactions of extracellular polymeric substances with ferrihydrite and subsequent 17 α -ethinylestradiol photodegradation: impact of Fe(III)-EPS complexes formation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2025, 497: 139746.
- [38] Tong M, Yuan SH, Ma SC, Jin MG, Liu D, Cheng D, Liu XX, Gan YQ, Wang YX. Production of abundant hydroxyl radicals from oxygenation of subsurface sediments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(1): 214-221.
- [39] Zeng Q, Dong HL, Wang X, Yu T, Cui WH. Degradation of 1,4-dioxane by hydroxyl radicals produced from clay minerals[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 331: 88-98.
- [40] Yuan SH, Liu XX, Liao WJ, Zhang P, Wang XM, Tong M. Mechanisms of electron transfer from structural Fe(II) in reduced nontronite to oxygen for production of hydroxyl radicals[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2018, 223: 422-436.
- [41] Zhou SF, Huang SB, Li XH, Angelidaki I, Zhang YF. Microbial electrolytic disinfection process for highly efficient *Escherichia coli* inactivation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 342: 220-227.
- [42] Chen R, Liu H, Tong M, Zhao L, Zhang P, Liu D, Yuan SH. Impact of Fe(II) oxidation in the presence of iron-reducing bacteria on subsequent Fe(III) bio-reduction[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 639: 1007-1014.
- [43] Nothling MD, Cao HW, McKenzie TG, Hocking DM, Strugnell RA, Qiao GG. Bacterial redox potential powers controlled radical polymerization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(1): 286-293.
- [44] Zhou XY, Manna B, Lyu BY, Singhal N. Linking oxygen-induced oxidative stress to resource recovery by enhancing the production of extracellular polymeric substances in activated sludge microbial communities[J]. *Water Research*, 2025, 286: 124238.
- [45] Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration[J]. *Nature*, 1996, 382(6590): 445-448.
- [46] Scott DT, McKnight DM, Blunt-Harris EL, Kolesar SE, Lovely DR. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms[J]. *Environmental Science & Technology*, 1999, 33(2): 372.
- [47] Liu LC, Liu GF, Zhou JT, Jin RF. Energy taxis toward redox-active surfaces decreases the transport of electroactive bacteria in saturated porous media[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(8): 5559-5568.
- [48] Page SE, Sander M, Arnold WA, McNeill K. Hydroxyl radical formation upon oxidation of reduced humic acids by oxygen in the dark[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(3): 1590-1597.
- [49] Pi KF, Markelova E, Zhang P, Van Cappellen P. Arsenic oxidation by flavin-derived reactive species under oxic and anoxic conditions: oxidant formation and pH dependence[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(18): 10897-10905.
- [50] Coble PG. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy[J]. *Marine Chemistry*, 1996, 51(4): 325-346.
- [51] Chen W, Westerhoff P, Leenheer JA, Booksh K. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(24): 5701-5710.
- [52] Sheng YZ, Dong HL, Kukkadapu RK, Ni SS, Zeng Q, Hu JL, Coffin E, Zhao SM, Sommer AJ, McCarrick RM, Lorigan GA. Lignin-enhanced reduction of structural Fe(III) in nontronite: dual roles of lignin as electron shuttle and donor[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2021, 307: 1-21.
- [53] Stern N, Mejia J, He SM, Yang Y, Ginder-Vogel M, Roden EE. Dual role of humic substances as electron donor and shuttle for dissimilatory iron reduction[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(10): 5691-5699.
- [54] Zou MZ, Wu YC, Qu CC, Wang DJ, Liu J, Huang QY, Cai P. Molecular composition determines the adsorption behaviors of loosely- and tightly-bound extracellular polymeric substances (EPS) from *Shewanella oneidensis* MR-1 on hematite nanoparticles[J]. *Environmental Science: Nano*, 2022, 9(12): 4459-4467.
- [55] Warren JJ, Ener ME, Vlček A Jr, Winkler JR, Gray HB. Electron hopping through proteins[J]. *Coordination*

- Chemistry Reviews, 2012, 256(21/22): 2478-2487.
- [56] Chen KY, Chen TY, Chan YT, Cheng CY, Tzou YM, Liu YT, Teah HY. Stabilization of natural organic matter by short-range-order iron hydroxides[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(23): 12612-12620.
- [57] Chen CM, Dynes JJ, Wang J, Karunakaran C, Sparks DL. Soft X-ray spectromicroscopy study of mineral-organic matter associations in pasture soil clay fractions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(12): 6678-6686.
- [58] Li JH, Chen HJ, Bu HL, Wei YF, Chen MQ, Xu WP, Hao XY, Yuan P. Fe(II)-humus interactions drive phosphorus immobilization: insights into vivianite formation[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2026, 163: 209-220.
- [59] Li HY, Li JZ, Wang Y, Chen JH, Wang RZ, Gu L, Jiao BQ, Chen YD. Zero-valent iron-promoted vivianite formation *via* dissimilatory iron reduction: role of humic acid[J]. *Water Research*, 2025, 286: 124212.
- [60] Li CY, Sheng YQ. Organic matter affects phosphorus recovery during vivianite crystallization[J]. *Water Science and Technology*, 2021, 83(8): 2038-2050.
- [61] Wang SN, Cao JS, Zhang JL, Luo JY, Ni BJ, Fang F. Recovery of phosphorus from wastewater containing humic substances through vivianite crystallization: interaction and mechanism analysis[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 331: 117324.
- [62] Adhikari D, Zhao Q, Das K, Mejia J, Huang RX, Wang XL, Poulson SR, Tang YZ, Roden EE, Yang Y. Dynamics of ferrihydrite-bound organic carbon during microbial Fe reduction[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2017, 212: 221-233.
- [63] Xiao W, Jones AM, Li XM, Collins RN, Waite TD. Effect of *Shewanella oneidensis* on the kinetics of Fe(II)-catalyzed transformation of ferrihydrite to crystalline iron oxides[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(1): 114-123.
- [64] Sheng AX, Liu J, Li XX, Qafoku O, Collins RN, Jones AM, Pearce CI, Wang CM, Ni JR, Lu AH, Rosso KM. 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.