

徐基胜, 赵炳梓, 张佳宝. 长期稻草还田对胡敏酸化学结构的影响——高级 ^{13}C NMR 研究[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(1): 116-123.

XU Ji-sheng, ZHAO Bing-zi, ZHANG Jia-bao. Advanced ^{13}C NMR analysis of humic acid after long-term rice straw incorporation into paddy soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(1): 116-123.

长期稻草还田对胡敏酸化学结构的影响

——高级 ^{13}C NMR 研究

徐基胜^{1,2}, 赵炳梓^{1*}, 张佳宝¹

(1.土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 封丘农田生态系统国家试验站, 南京 210008; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:为了从分析技术上对胡敏酸的结构分异进行定量化研究,以湖南桃源地区的长期(1990—2011年)田间试验为平台,采用元素分析、稳定碳同位素分析和高速多重倾斜幅度交叉极化/魔角自旋(Multiple cross-polarization/magic angle spinning, multiCP/MAS)定量测定技术结合选择性官能团测定的固态 ^{13}C 核磁共振(Nuclear magnetic resonance, NMR)方法,旨在利用系列技术阐明连续22年稻草还田对土壤胡敏酸化学结构的影响。结果表明,稻草还田后胡敏酸含量增加了78%,但元素组成没有发生显著变化,其分子饱和程度、氧化度和极性都与不施肥对照很接近。稻草还田土壤胡敏酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值低于对照,表明长期稻草还田提高了非极性物质来源的碳。定量 multiCP/MAS NMR 方法则证实稻草还田后主要提高了土壤胡敏酸的脂类、芳香族物质和木质素比例,而蛋白质、多肽和糖类物质的比例则有所降低,从而导致烷基/烷氧基比值及疏水性指数增大,表明其分解程度增加,疏水性特征更加明显。高级 NMR 技术进一步发现胡敏酸中有大量的质子化碳,稻草还田后质子化芳香碳比例增加,但质子化异头碳和烷氧基比例降低,而它们的非质子化碳相对稳定; δ^{113-93} 化学位移内除异头碳外还含有芳香碳,且稻草还田的芳香碳在此化学位移内的比例更高。可见稻草还田后土壤胡敏酸的量和结构均有所变化,高级测定技术对结构的刻画有助于了解长期稻草还田肥力的提升机制。

关键词:胡敏酸;水稻土;multiCP/MAS; $\delta^{13}\text{C}$;元素分析

中图分类号:S153 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2017)01-0116-08 doi:10.11654/jaes.2016-1032

Advanced ^{13}C NMR analysis of humic acid after long-term rice straw incorporation into paddy soil

XU Ji-sheng^{1,2}, ZHAO Bing-zi^{1*}, ZHANG Jia-bao¹

(1.State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture(Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), State Experimental Station of Agro-Ecosystem in Fengqiu, Nanjing 210008, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract:As an essential component of soil organic matter, humic acid may vary in chemical composition after long-term straw incorporation. However, the quantitative studies on structural differentiations of soil humic acid were limited by the development of analytical techniques, especially for samples in the paddy soil. This study investigated the qualitative and quantitative characteristics of humic acids extracted from a paddy soil from Taoyuan County in China after 22 years of rice-rice (*Oryza sativa* L.) rotations, with two fertilizations i.e. no fertilizer application as a control and rice straw incorporation. Several analytical techniques including elemental analysis, isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$) and advanced ^{13}C NMR[i.e. multiple cross-polarization/magic angle spinning(multiCP/MAS) and spectral-editing techniques] were used. Results indicated that the yield of humic acid increased from 2.25 g·kg⁻¹(as in the control) to 4.01 g·kg⁻¹ in the rice straw incorpo-

收稿日期:2016-08-11

作者简介:徐基胜(1987—),男,安徽安庆人,博士研究生,主要从事土壤有机质研究。E-mail:jsxu@issas.ac.cn

* 通信作者:赵炳梓 E-mail:bzhao@issas.ac.cn

基金项目:国家自然科学基金面上项目(41271311);国家重点研发计划项目(2016YFD0200107, 2016YFD0300802);中国科学院科技服务网络计划(STS计划)项目(KFJ-SW-ST5-142-03);现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-03)

Project supported:The National Natural Science Foundation of China(41271311);The National Key Research and Development Program(2016YFD0200107, 2016YFD0300802);The Science and Technology Service Network Initiative Program of Chinese Academy of Sciences(KFJ-SW-ST5-142-03);The Earmarked Fund for China Agriculture Research System(CARS-03)

ration treatment, whereas elemental compositions of the two humic acids were similar. The average atomic ratios of H/C, O/C and (N+O)/C were 1.35, 0.51 and 0.60, respectively, indicating the two humic acids experienced similar degree of saturation, oxidation, and polarity. In comparison with the control, the $\delta^{13}\text{C}$ value of humic acid decrease from -2.783% to -2.849% after straw incorporation, which represents the contents of apolar components increased. The increase was verified through multiCP/MAS results and was ascribe to the higher proportion of lipids, aromatics and lignin. The contents of proteins, peptides, and carbohydrates decreased after rice straw incorporation. The conversion of constituents resulted in higher ratio of the alkyl C to O-alkyl C in humic acids and improved their hydrophobicity, indicating the higher decomposition degree and more obvious hydrophobic characteristics of humic acids after straw incorporation. As revealed by advanced NMR results, substantial protonated carbon existed in two humic acids. More protonated aromatic carbon were found in humic acids after straw incorporation while the protonated anomeric and O-alkyls in the samples decreased. The proportion of nonprotonated carbon were independent of the rice straw incorporation. Specially, aromatics between $\delta 113$ and $\delta 93$ were found in both humic acids while the experimental samples showed higher proportion. Our results indicate that both the quantity and chemical structures of humic acid changed after rice straw incorporation and stress the importance of advanced NMR techniques in elucidating the fertility-improving mechanism through rice straw incorporation on soil.

Keywords: humic acid; paddy soil; multiCP/MAS; $\delta^{13}\text{C}$; elemental analysis

红壤性水稻土广泛分布于我国南方稻作区,为保障粮食高产该地区往往过量施用化肥,导致农田面源污染和湖泊富营养化^[1-2]。稻草秸秆可为土壤提供丰富的有机质和速效养分^[3],长期稻草还田可以促进土壤有机碳积累、提高土壤肥力和作物产量^[4]。研究表明,稻草在腐解转化过程中可影响土壤腐殖质的性质与结构^[5],而土壤腐殖质正是构成土壤肥力的物质基础^[6]。胡敏酸作为土壤腐殖质的重要组成部分,其含量和结构的变化会影响到土壤肥力、作物产量以及土壤污染物的行为^[7-8]。以往的研究表明施用不同有机物料如秸秆能不同程度提高土壤胡敏酸的含量,甚至影响其化学结构^[9-10]。Chien等^[9]报道施用猪粪堆肥增加了土壤胡敏酸中烷基比例,Dou等^[10]研究发现长期稻草还田能使辽宁盘锦水稻土胡敏酸结构变得更加简单,脂肪性更强。但目前对腐殖化途径或过程学界仍没有统一的认识^[7],对胡敏酸的精细结构也缺乏足够的了解,其中一个重要原因是受限于当前的测定技术^[11]。¹³C核磁共振波谱(Nuclear magnetic resonance, NMR)技术是目前为止研究有机质结构最有效的方法之一,可以直接测定碳骨架^[10,12]。但学者们大都采用常规的交叉极化/魔角自旋(Cross-polarization/magic angle spinning, CP/MAS)技术^[13-15],由于交叉极化效率低、易受自旋边带影响,因此难以量化结果^[16-17]。准确把握胡敏酸的化学结构对于深入研究腐殖化作用和提升土壤肥力都有重要的意义,一方面要从定性分析发展到定量分析,另一方面要从粗放的官能团结构细化到特定的官能团结构。高速多重倾斜幅度交叉极化/魔角自旋(Multiple cross-polarization/magic angle spinning, multiCP/MAS)技术是近年来发展出的简单快速

测定有机质结构的新兴技术^[18],可以实现胡敏酸的定量分析。高级NMR技术^[17,19]则可以选择性测定特定结构的官能团,如偶极相移(Dipolar dephasing, DD)可测定非质子碳和可转动碳,化学位移各向异性过滤(Chemical-shift-anisotropy, CSA)技术可测定 sp^3 杂化碳,CH编辑和 CH_2 编辑分别测定带有一个和两个质子的碳,而 CH_n -only编辑技术则能测定质子化碳。高级技术之间的组合能提供更为准确精细的有机质结构。目前这些技术已成功应用于秸秆分解^[20]、古土壤^[16]和腐殖质^[12,17]等多个领域,但用于长期施肥对胡敏酸结构的研究还很少。

为此,本研究以湖南桃源地区的长期田间定位试验为平台,采用元素分析、稳定碳同位素分析和高级固态¹³C NMR技术,包括multiCP/MAS、DD、CSA和 CH_n -only编辑技术对水稻土长期稻草还田土壤中胡敏酸的结构特征进行了定量研究,旨在为探明土壤肥力与胡敏酸之间的相互关系以及腐殖化过程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计与样品采集

土壤样品采自中国科学院桃源农业生态试验站(111°33'E, 28°55'N)的长期肥料定位试验。该站年平均气温16.5℃,降水量1448mm,日照1531h。土壤为发育于第四纪红色黏土的水稻土,土壤类型为水耕人为土,种植制度为早稻-晚稻。试验始于1990年,共设10个施肥处理,详细介绍请见文献[21]。本研究选取两种施肥处理:不施肥对照和连续稻草还田。每个处理3次重复,每个小区面积33m²。稻草还田处理为将

小区的稻草还田到相应小区,每年的还田量为 14.5 t·hm⁻²。本研究用样品于 2011 年 3 月在每个小区采用五点取样法采集 0~20 cm 表层土壤,混匀,即截止样品采集时间,该长期试验已经历 22 年的连续不同施肥处理。采集样品风干后磨细,过 2 mm 筛备用。连续 22 年不同施肥处理的土壤基本理化性质见表 1。

1.2 胡敏酸的提取和纯化

胡敏酸的提取和纯化主要参考国际腐植酸协会(IHSS)和 Preston 等^[22]的研究。按土液比 1:10(m/V)加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 和 0.1 mol·L⁻¹ Na₄P₂O₇ 溶液(1:1, V/V),室温下进行碱提取,每次振荡时间为 16 h,离心收集上清液。碱提取步骤多次重复,直到离心液无色。所有的离心液汇总,并酸化到 pH 为 1~2,在室温下静置 12~16 h,离心分离出沉淀。沉淀继续用 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶解,用盐酸酸化。反复溶解、酸化,直到离心液无色,最终的沉淀为粗胡敏酸。粗胡敏酸用 HF:HCl(1%:1%)去除矿物质,纯化 5 次后用去离子水反复清洗,冷冻干燥后得到纯胡敏酸。

1.3 分析测定

1.3.1 元素分析

样品的 C、N 和 H 含量用元素分析仪(Vario micro cube, Elementar Analysensysteme GmbH, 德国)测定。灰分含量在 800 °C、4 h 条件下测定。氧含量用差减法求得,即 O% = 100% - C% - H% - N% - 灰分%。样品的内部氧化度(ω)根据 Debska 等^[23]计算: $\omega = (2O + 3N - H)/C$,其中 O、N、H 和 C 均为原子百分比。

1.3.2 稳定性碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)分析

$\delta^{13}\text{C}$ 值用 FLASH EA-DELTA V 联用仪(Flash-2000 Delta V ADVANTAGE, 赛默飞世尔)测定,采用 Pee Dee Belemnite(PDB)标准。

1.3.3 ^{13}C 核磁共振

核磁共振实验分析在 Bruker Avance 400 核磁共振仪上完成,采用固体双共振探头,4 mm 转子。 ^{13}C 的检测共振频率为 100 MHz。主要采用的 NMR 技术有

以下几种:

(1) ^{13}C 高速多重倾斜幅度交叉极化-魔角自旋(multiCP/MAS)NMR:魔角自旋频率为 14 kHz,接触时间 0.1 ms,循环延迟时间 0.35 s,90° ^{13}C 脉宽 4 μs 。图谱旋转边带峰面积非常小(<3%),与中心峰重叠很少。

(2) ^{13}C multiCP/MAS 与偶极相移(DD)技术联用:偶极相移时间为 68 μs ,其他条件同 ^{13}C multiCP/MAS。

(3) ^{13}C 化学位移各向异性过滤(CSA)技术:在全碳图谱中 $\delta 90\sim 120$ 区域内 sp³ 杂化的异头碳和 sp² 杂化的芳香碳都有吸收峰,两种官能团信号互相重叠。利用五脉冲 CSA 技术可以将异头碳信号区分开来,CSA-滤波时间为 35 μs 。将该技术再与 DD 技术联用可以进一步区分出非质子异头碳(OC_qO),偶极相移时间为 40 μs 。

(4)CH_n-only 图谱编辑技术:该图谱由两个交叉极化-总边带抑制(CP/TOSS)子图谱进行差减而得。第一个子图谱交叉极化接触时间为 50 μs ,该子图谱主要包括不可转动官能团中的质子化碳信号和双键磁化转移过程中残留的季碳信号。第二个子图谱交叉极化接触时间为 50 μs 并配合 DD 技术,偶极相移时间为 40 μs ,该子图谱只包含残留的季碳信号或可转动碳如 CH₃。这两个子图谱的差值显示的就是 CH₂ 和 CH 官能团信号,并含有少量 CH₃ 信号。

为准确计算出芳香度,应区分 $\delta 90\sim 120$ 区域的芳香碳和异头碳信号,具体计算方法参见 Mao 等^[19]。烷基/烷氧基比值(A/O-A)计算公式为:A/O-A = ($\delta 0\sim 44$)/($\delta 64\sim 93$)。疏水性指数(HI)为所有非极化烷基和芳香碳信号与极化官能团信号的比值^[17],计算公式为:HI = [($\delta 0\sim 44$) + ($\delta 113\sim 142$)]/[($\delta 44\sim 113$) + ($\delta 142\sim 220$)]。

2 结果与讨论

2.1 胡敏酸碳回收率和含量

纯化后不施肥和稻草还田处理中胡敏酸碳含量

表 1 连续 22 年不同处理的土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soils after 22 years of rice straw incorporation and no fertilization

处理 Treatments	pH(H ₂ O)	有机碳 SOC/ g·kg ⁻¹	总氮 Total N/ g·kg ⁻¹	总磷 Total P/ g·kg ⁻¹	总钾 Total K/ g·kg ⁻¹	速效氮 Available N/ mg·kg ⁻¹	速效磷 Available P/ mg·kg ⁻¹	速效钾 Available K/ mg·kg ⁻¹	黏土 Clay/%
不施肥 No fertilization	4.65a	17.50b	1.93b	0.43a	12.25b	122.40a	10.68a	53.89b	31.0a
稻草还田 Rice straw incorporation	4.73a	22.47a	2.37a	0.49a	14.54a	128.09a	12.97a	111.01a	29.7a

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05, n=3)。下同。

分别为 51.5% 和 52.8%; 有机碳回收率较高, 分别为 84.7% 和 79.8% (表 2)。长期稻草还田的胡敏酸含量比不施肥处理增加了 78%, 说明稻草还田有利于胡敏酸的产生, 从而改善土壤有机质品质。该研究结果与周卫军等^[4]一致, 但胡敏酸含量有所不同, 可能与胡敏酸提取和纯化方法不同有关。Dou 等^[10]研究结果也表明, 与不施肥处理相比, 长期稻草还田增加了辽宁盘锦水稻土胡敏酸含量。一般施用有机物料如粪肥、绿肥都会提高土壤中的胡敏酸含量^[9,24]。

表 2 胡敏酸的碳含量、有机碳回收率和产量

Table 2 Carbon content, organic carbon recovery rate and yield of humic acid after rice straw incorporation

处理 Treatments	碳含量 Carbon content/%	有机碳回收率 Organic carbon recovery rate/%	胡敏酸碳产量 HA-C/g·kg ⁻¹
不施肥 No fertilization	51.5a	84.7a	2.25b
稻草还田 Rice straw incorporation	52.8a	79.8a	4.01a

注: 有机碳回收率=(纯化后胡敏酸含碳量-纯化前胡敏酸含碳量)×纯化过程中胡敏酸质量回收率。

2.2 元素分析和同位素分析

由表 3 可见, 稻草还田后胡敏酸各元素组成与不施肥相比变化不大, 其中碳含量略有增加, 而氮和氧含量略有下降。因此二者原子比大小和内部氧化度均较为接近。H/C 表征胡敏酸的分子饱和程度或缩合度, O/C 表征氧化度, (N+O)/C 表征分子极性^[8,25], 3 种原子比的均值分别为 1.35、0.51 和 0.60。内部氧化度 ω 表示胡敏酸氧化过程的程度, 其值越高表明腐殖化程度也越高^[7,23]。Chien 等^[9]也发现长期施用粪肥和绿肥并未显著改变胡敏酸的 H/C 和 O/C, 且与本实验结果较为接近。Jindo 等^[13]研究表明, 无论是添加新鲜的有机物还是成熟堆肥, 土壤胡敏酸的 H/C 和 O/C 都没有明显变化。这一方面表明了稻草还田难以改变水稻土胡敏酸的元素组成, 但另一方面也暗示

其化学结构的深入刻画还依赖于更高级的分析手段。

稳定碳同位素可以指示有机质来源^[15]。长期稻草还田后 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低 (表 3), 说明稻草还田使土壤胡敏酸积累了新的有机碳, 这部分碳来源于稻草输入转化的新鲜有机质。 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化还可能与胡敏酸的结构有关^[26]。极性化合物如糖类和氨基酸一般富 ¹³C, 而非极性物质如脂类和木质素等则贫 ¹³C^[15], 由此推断稻草还田处理的胡敏酸相对不施肥处理可能还有更多的非极性物质, 而极性物质则较少。

2.3 高级¹³C NMR 分析

长期稻草还田及不施肥对照土壤胡敏酸的全碳图谱和选择性碳图谱如图 1 所示。其中图 1(a) 和图 1(f) 为 multiCP/MAS NMR 图谱, 可显示 $\delta 0\sim 220$ 所有碳吸收峰。不同化学位移区域对应的官能团及其可能的来源物质如表 4 所示。可见长期稻草还田和对照土壤胡敏酸的全碳图谱很相似; 其中烷基吸收峰最高, 其次为羧基, 表明胡敏酸中可能含有较多的角质、软木脂和蜡等植物大分子物质^[27], 以及来自于多肽或蛋白质的羧酸或酰胺类物质^[16]。但稻草还田处理中胡敏酸的 $\delta 56$ 处的吸收峰比对照更加明显。

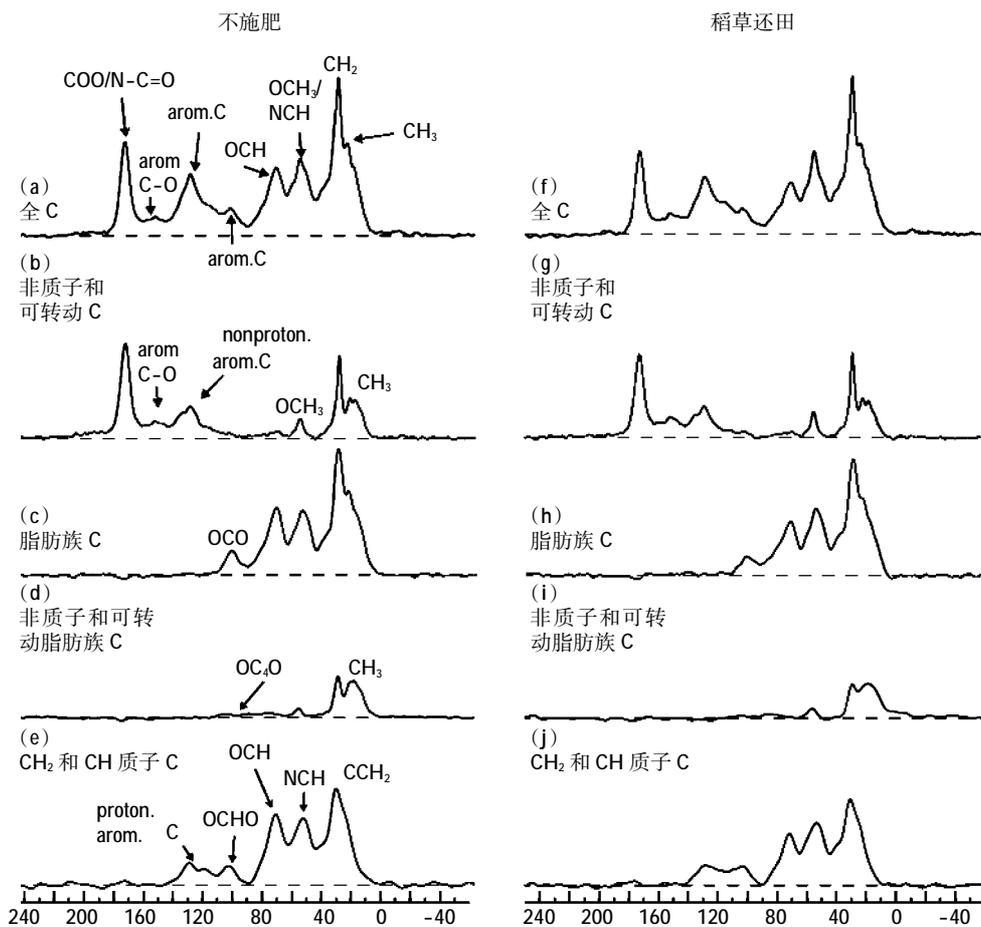
通过 DD 技术可以选择性识别出非质子碳和可转动碳信号, 如图 1(b) 和图 1(g), 包括 $\delta 173$ 处的羧基、 $\delta 156$ 的酚碳、 $\delta 130$ 的非质子芳香碳、 $\delta 72$ 的烷氧基、 $\delta 56$ 的甲氧基、 $\delta 30$ 的聚亚甲基和 $\delta 20$ 的甲基。其中芳香碳信号相比全碳图谱降低较多, 表明胡敏酸多数芳香碳都是质子化碳。 $\delta 72$ 峰高相比全碳图谱下降明显, 说明胡敏酸含有很少的非质子烷氧基 (OC_q)。经过 DD 处理后, $\delta 56$ 处残留一个小尖峰, 说明胡敏酸在该处的吸收峰大多来自于含氮烷基 (NCH) 而非甲氧基 (OCH_3)。含氮烷基主要来自于多肽^[17], 而甲氧基和酚碳是木质素的显著特征^[14]。综上, 长期稻草还田的土壤胡敏酸经 DD 技术处理后图谱与对照也较为相似。

通过 CSA 技术可以识别出脂肪族碳尤其是异头

表 3 胡敏酸的元素组成(无灰分)、原子比、内部氧化度和同位素成分

Table 3 Elemental content(ash-free), atomic ratios, ω and isotopic compositions of humic acid after rice straw incorporation

处理 Treatments	灰分含量 Ash/ g·kg ⁻¹	元素含量(无灰分)Weight(on ash-free basis)/%				原子比 Atomic ratios			ω	$\delta^{13}\text{C}/\%$
		C	N	H	O	H/C	O/C	(N+O)/C		
不施肥 No fertilization	12.1	52.2	5.63	5.91	36.3	1.36	0.52	0.61	-0.04	-2.783
稻草还田 Rice straw incorporation	2.3	52.9	5.37	5.89	35.8	1.34	0.51	0.59	-0.06	-2.849



左列代表不施肥对照,右列为稻草还田处理。(a,f)multiCP/MASNMR 图谱;(b,g)multiCP/MAS 的偶极相移图谱;(c,h)化学位移各向异性过滤图谱;(d,i)化学位移各向异性与偶极相移联用图谱;(e,j)质子化碳图谱。扫描次数:(a,b,c,f,g,i)4 096 次;(d)12 288 次;(e)2048 次;(h)2400 次;(j)1600 次
The control (left column) vs the rice straw incorporation (right column).(a, f) multiCP/MAS NMR spectra for reference; (b, g) corresponding dipolar-dephased multiCP/MAS spectra; (c, h) selection of alkyl carbons by a ^{13}C chemical shift anisotropy (CSA) filter; (d, i) selection of nonprotonated or mobile alkyl carbons with a 35- μs CSA filter and 40- μs dipolar dephasing; and (e, j) selection of protonated carbons.

Numbers of scans: (a, b, c, f, g, i) 4096; (d) 12 288; (e) 2048; (h) 2400; (j) 1600

图 1 胡敏酸的 multiCP/MAS NMR 图谱和选择性官能团碳图谱

Figure 1 MultiCP/MAS NMR and identification of ^{13}C NMR signals from specific functional groups in humic acids

碳(OCO)信号。从图 1(c)和图 1(h)看, $\delta 113\text{--}93$ 的碳信号相对全碳图谱衰减较少,表明该区域主要为异头碳,而非芳香碳。异头碳主要来自于多糖中的糖环^[16],且在不施肥对照处理中的信号要比稻草还田处理的略强。CSA 技术与 DD 技术联用后可以识别出非质子异头碳(OC_4O)信号。非质子异头碳可能来源于单宁酸^[12]。由图 1(d)和图 1(i)可知,两种胡敏酸的异头碳只有很少是非质子化的。这一点可以从图 1(e)和图 1(j)上进一步得到证实,其中 $\delta 113\text{--}93$ 处的吸收峰为质子化异头碳(OCHO),与全碳图谱相比信号相当。另外还能观察到 $\delta 130$ 的质子芳香碳、 $\delta 72$ 的质子烷氧基(OCH)、 $\delta 56$ 的含氮烷基和 $\delta 20$ 的聚亚甲基信号;其

中对照土壤胡敏酸中 $\delta 72$ 峰要比 $\delta 56$ 峰高,而在稻草还田处理中则刚好相反。表明尽管长期稻草还田与对照土壤胡敏酸中都含有大量的质子化碳,但稻草还田后不同质子化碳的比例与对照有别。

通过对图谱进行积分,可以获得胡敏酸中不同官能团的相对比例,尤其是借助高级 NMR 技术可以获得更为详细的定量结果,包括准确的芳香碳和异头碳比例以及质子和非质子碳的比例(表 5)。这一点比常规的 CP/MAS NMR 结果有明显的优势。由表 5 可知,水稻土胡敏酸中烷基比例最高,占全碳的 31.9%~33.0%,稻草还田使烷基比例略有增加;其次为芳香碳、烷氧基、含氮烷基和羧基,相对比例在 10%~20%

表4 不同化学位移区域对应的官能团及其可能的来源物质

Table 4 Assignments of the chemical shift region to types of carbon and their organic matter sources

化学位移 Chemical shift region	官能团 General assignment	化学结构 Structure unit	可能的来源物质 Potential sources	参考文献 References
δ220-188	羰基 C=O		醛、酮、醌类化合物	[16]
δ188-162	羧基 COO/N-C=O		羧酸盐、多肽、蛋白质和酰胺类化合物	[16]
δ162-142	酚碳 Aromatic C-O		木质素等	[14]
δ142-93	芳香碳 Aromatic C		芳香族物质包括生物炭、木质素等	[28]
δ113-93	异头碳 Anomeric		多糖中的糖环和单宁酸等物质	[12, 16]
δ93-64	烷氧基 O-alkyl		纤维素、半纤维素等糖类物质	[13, 20]
δ64-44	甲氧基 + 含氮烷基 OCH ₃ /NCH		木质素、多肽、蛋白质等	[14, 17]
δ44-0	烷基 Alkyl		角质、软木脂和蜡等	[27]

注: R、R'、R''和 R''' 代表侧链碳。

表5 胡敏酸不同官能团碳占总碳的相对比例(%)

Table 5 Percentages of total spectral area assigned to different functional groups obtained by multiCP/MAS ¹³C NMR and spectral-editing techniques for the humic acids (%)

处理 Treatments	化学位移 Chemical shift(δ)															
	220-188	188-162	162-142	142-93		113-93			93-64		64-44		44-0			
	羰基 C=O	羧基 COO/ N-C=O	酚碳 Aromatic C-O	芳香碳 Aromatic C		异头碳 Anomeric			烷氧基 O-alkyl C		甲氧基+含氮烷基 OCH ₃ /NCH		烷基 Alkyl C			
			合计 Total	非质子芳 香碳 C-C	质子芳 香 C-H	合计 Total	非质子异 头 碳 Nonproton. anom.	质子异 头 碳 Proton. anom.	合计 Total	非质子 烷氧基 OC _q	质子烷 氧 OC	合计 Total	甲氧基 OCH ₃	含氮 烷基 NCH		
不施肥 No fertilization	0.9	11.6	4.3	18.2	7.7	10.6	4.1	0.6	3.5	14.3	1.2	13.2	14.6	2.3	12.3	31.9
稻草还田 Rice straw incorporation	0.6	10.8	5.0	19.9	8.0	11.9	3.4	0.5	2.8	12.2	1.2	11.0	15.2	3.1	12.1	33.0

注: 芳香碳比例计算方法参照文献[19]; 异头碳比例根据 multiCP/MAS ¹³C NMR 和 CSA 技术计算。

之间; 而酚碳、异头碳、甲氧基比例较少, 均低于5%; 羧基比例最低(<1%)。长期稻草还田和不施肥对照土

壤胡敏酸中芳香碳非质子化的比例分别为 40%和 42%; 异头碳和烷氧基则大多数质子化, 其中异头碳

质子化比例分别为 84%和 85%，烷氧基质子化比例分别为 91%和 92%。

通过高级 NMR 技术可甄别出长期稻草还田对胡敏酸结构的影响。主要体现在以下几方面:首先,稻草还田整体上降低了羧基和含氮烷基的比例,这和元素分析结果中胡敏酸氮含量略有降低是一致的(表 3),据此推测稻草还田导致土壤胡敏酸中蛋白质和多肽类物质^[16]比例降低。其次,稻草还田增加了芳香族物质(包括酚碳和芳香碳)比例,增幅为 10%,其中增加的芳香碳主要是质子化碳;而主要来源于糖类物质的异头碳和烷氧基比例降低,且主要是质子化碳的降低。再次,甲氧基比例虽然整体较低,但稻草还田后其比例相对对照增加了 37%;综合稻草还田对酚碳比例的增加,推测稻草还田还提高了胡敏酸中木质素^[14]的比例。最后,值得注意的是 $\delta 113\sim 93$ 化学位移区域同时存在异头碳和芳香碳,根据其积分值和异头碳相对比例(表 5)可计算出稻草还田后胡敏酸异头碳在此化学位移内的比例由 71%降到 57%,即稻草还田后有更多的芳香碳来源于 $\delta 113\sim 93$ 。综上,可推测稻草还田后土壤胡敏酸中的芳香族物质增加,而糖类物质降低;非质子化碳相对较稳定,而质子化碳则易受稻草还田影响。稻草还田后胡敏酸的糖类、多肽物质比例降低和脂类、木质素比例的增加与同位素分析结果非极性物质的增加也是一致的(表 3)。

由于稻草还田后烷基的增加和烷氧基的降低,导致 A/O-A 要高于不施肥对照(图 2),说明稻草还田加速了胡敏酸的分解和腐殖化^[5,13]。同时不施肥和稻草还田处理胡敏酸的芳香度均较低,分别为 0.23 和 0.26,表现出明显的脂肪族特性。赵光等^[9]研究紫色水稻土稻草腐解过程中胡敏酸的形成,发现胡敏酸也以

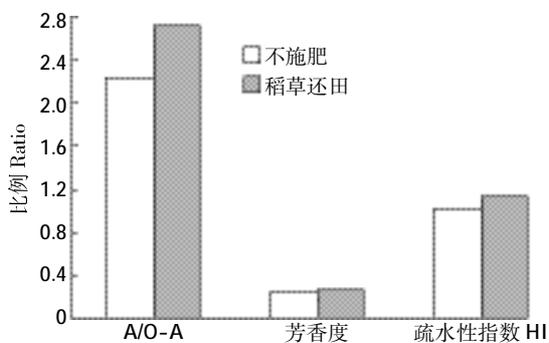


图 2 胡敏酸的 A/O-A、芳香度和疏水性指数

Figure 2 Variations of A/O-A, aromaticity and hydrophobic index (HI) of humic acids in paddy soil

脂肪族化合物为主,芳香度介于 0.27~0.28 之间。胡敏酸的疏水性指数则是稻草还田的略高,说明稻草还田后胡敏酸的疏水性特征更加明显^[15]。疏水性结构可以保护生物活性分子如生长素,同时能够提高微生物和根际区域中根系生长的交互作用^[13]。

3 结论

(1)长期稻草还田有利于水稻土胡敏酸的增加,相比不施肥处理提高了 78%。

(2)胡敏酸的元素组成、分子饱和程度、氧化度和极性在稻草还田后均未发生明显改变。 $\delta^{13}\text{C}$ 结果显示稻草还田使胡敏酸中积累了新的有机碳,含有更多的非极性物质。

(3)根据高级 NMR 定量分析结果可推测,水稻土胡敏酸以脂肪族化合物为主,且含有大量的质子化碳,芳香度较低。稻草还田增加了胡敏酸在 $\delta 113\sim 93$ 化学位移内芳香碳的比例,以及芳香族物质和木质素比例,但整体上降低了蛋白质、多肽类和糖类物质的比例。非质子化碳相对不易受稻草还田影响,而质子化芳香碳增加,质子化异头碳和烷氧基比例降低。稻草还田还提高了胡敏酸中烷基和烷氧基比值,疏水性特征也更加明显。

致谢:本研究在采集土壤样品过程中得到中国科学院桃源农业生态试验站魏文学研究员和相关工作人员的大力帮助和支持,在此谨表谢意!

参考文献:

- [1] 陈惟财,王凯荣,谢小立. 长期不同施肥处理对红壤性水稻土团聚体中碳、氮分布的影响[J]. 土壤通报, 2009, 40(3): 523-528.
CHEN Wei-cai, WANG Kai-rong, XIE Xiao-li. Effects on distributions of carbon and nitrogen in a reddish paddy soil under long-term different fertilization treatments[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2009, 40(3): 523-528.
- [2] 马力,杨林章,肖和艾,等. 长期施肥和秸秆还田对红壤水稻土氮素分布和矿化特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(4): 898-905.
MA Li, YANG Lin-zhang, XIAO He-ai, et al. Effects of long-term fertilization and straw returning on distribution and mineralization of nitrogen in paddy soils in subtropical China[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2011, 17(4): 898-905.
- [3] 陈春兰,陈哲,朱亦君,等. 水稻土细菌硝化作用基因(amoA 和 hao)多样性组成与长期稻草还田的关系研究[J]. 环境科学, 2010, 31(6): 1624-1632.
CHEN Chun-lan, CHEN Zhe, ZHU Yi-jun, et al. Effects of rice straw on the diversity of nitrifying genes(amoA and hao) in paddy soil[J]. En-

- environmental Science, 2010, 31(6): 1624-1632.
- [4] 周卫军, 王凯荣, 郝金菊, 等. 红壤稻田生态系统有机物料循环对土壤有机碳转化的影响[J]. 生态学杂志, 2006, 25(2): 140-144.
ZHOU Wei-jun, WANG Kai-rong, HAO Jin-ju, et al. Effects of organic materials cycling on soil organic carbon turnover in a red soil paddy ecosystem[J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 25(2): 140-144.
- [5] 赵光, 唐晓红, 吕家格, 等. 紫色水稻土胡敏酸的形成: 稻草腐解试验[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(12): 2596-2602.
ZHAO Guang, TANG Xiao-hong, LÜ Jia-ke, et al. The formation of humic acids in purple paddy soil: Based on decomposition of rice straw[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(12): 2596-2602.
- [6] 张葛, 窦森, 谢祖彬, 等. 施用生物炭对土壤腐殖质组成和胡敏酸结构特征影响[J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 614-620.
ZHANG Ge, DOU Sen, XIE Zu-bin, et al. Effect of biochar application on composition of soil humus and structural characteristics of humic acid[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(2): 614-620.
- [7] Tan K H. Humic matter in soil and the environment: Principles and controversies[M]. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- [8] 张晋京, 窦森, 谢修鸿, 等. 长期石油污染土壤中胡敏酸结构特征的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(6): 1531-1535.
ZHANG Jin-jing, DOU Sen, XIE Xiu-hong, et al. Structural characteristics of humic acids from a long-term petroleum contaminated soil[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(6): 1531-1535.
- [9] Chien S W C, Wang M C, Hsu J H, et al. Influence of fertilizers applied to a paddy-upland rotation on characteristics of soil organic carbon and humic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(18): 6790-6799.
- [10] Dou S, Zhang J J, Li K. Effect of organic matter applications on ¹³C-NMR spectra of humic acids of soil[J]. European Journal of Soil Science, 2008, 59(3): 532-539.
- [11] Mao J D, Chen N, Cao X Y. Characterization of humic substances by advanced solid state NMR spectroscopy: Demonstration of a systematic approach[J]. Organic Geochemistry, 2011, 42(8): 891-902.
- [12] Mao J D, Xing B S, Schmidt-Rohr K. New structural information on a humic acid from two-dimensional ¹H-¹³C correlation solid-state nuclear magnetic resonance[J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(10): 1928-1934.
- [13] Jindo K, Hernandez T, Garcia C, et al. Influence of stability and origin of organic amendments on humification in semiarid soils[J]. Soil Science Society of America Journal, 2011, 75(6): 2178-2187.
- [14] Panettieri M, Knicker H, Murillo J M, et al. Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence under different tillage regimes evaluated by organic matter pools, enzymatic activities and CP-MAS ¹³C NMR[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 78: 170-181.
- [15] Spaccini R, Piccolo A, Haberhauer G, et al. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by ¹³C distribution and CP-MAS-NMR spectra[J]. European Journal of Soil Science, 2000, 51(4): 583-594.
- [16] Zhou Z G, Chen N, Cao X Y, et al. Composition of clay-fraction organic matter in Holocene paleosols revealed by advanced solid-state NMR spectroscopy[J]. Geoderma, 2014, 223/224/225: 54-61.
- [17] Mao J D, Tremblay L, Gagné J-P. Structural changes of humic acids from sinking organic matter and surface sediments investigated by advanced solid-state NMR: Insights into sources, preservation and molecularly uncharacterized components[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2011, 75(24): 7864-7880.
- [18] Johnson R L, Schmidt-Rohr K. Quantitative solid-state ¹³C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization[J]. Journal of Magnetic Resonance, 2014, 239: 44-49.
- [19] Mao J D, Schmidt-Rohr K. Accurate quantification of aromaticity and nonprotonated aromatic carbon fraction in natural organic matter by ¹³C solid-state nuclear magnetic resonance[J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(9): 2680-2684.
- [20] Gao H J, Chen X, Wei J L, et al. Decomposition dynamics and changes in chemical composition of wheat straw residue under anaerobic and aerobic conditions[J]. PLoS one, 2016, 11(7): e0158172.
- [21] 周卫军, 王凯荣, 刘鑫. 有机物循环对红壤稻田土壤N矿化的影响[J]. 生态学杂志, 2004, 23(1): 39-43.
ZHOU Wei-jun, WANG Kai-rong, LIU Xin. Effects of organic residue cycling on soil nitrogen mineralization characteristics of rice cropping system in red soil region of China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2004, 23(1): 39-43.
- [22] Preston C M, Hempfling R, Schulten H R, et al. Characterization of organic-matter in a forest soil of coastal British-Columbia by NMR and pyrolysis-field ionization mass-spectrometry[J]. Plant and Soil, 1994, 158(1): 69-82.
- [23] Debska B, Szobathova N, Banach-Szott M. Properties of humic acids of soil under different management regimes[J]. Polish Journal of Soil Science, 2009, 42(2): 131-138.
- [24] Pramanik P, Kim P J. Fractionation and characterization of humic acids from organic amended rice paddy soils[J]. Science of the Total Environment, 2014, 466/467(1): 952-956.
- [25] Yang Y, Shu L, Wang X L, et al. Impact of De-Ashing humic acid and humin on organic matter structural properties and sorption mechanisms of phenanthrene[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(9): 3996-4002.
- [26] 张晋京, 窦森, 张大军. 长期施肥对土壤有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值影响的初步研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(2): 382-387.
ZHANG Jin-jing, DOU Sen, ZHANG Da-jun. Preliminary study of impact of long-term fertilization on $\delta^{13}\text{C}$ values of soil organic matter[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(2): 382-387.
- [27] Wang C, He N, Zhang J, et al. Long-term grazing exclusion improves the composition and stability of soil organic matter in Inner Mongolian grasslands[J]. PLoS one, 2015, 10(6): e0128837.
- [28] Alexis M A, Rasse D P, Knicker H, et al. Evolution of soil organic matter after prescribed fire: A 20-year chronosequence[J]. Geoderma, 2012, 189/190: 98-107.