

DOI: 10.11766/trxb201611230392

长期施有机肥和化肥对潮土胡敏酸结构特征的影响*

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), 南京 210008)

(2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 以河南封丘长期肥料试验为平台, 选择有机肥(OM)、化肥NPK(NPK)和不施肥(CK)3种处理, 研究了不同施肥措施对潮土胡敏酸(HA)结构特征的影响。HA样品经提取纯化后, 采用一系列固态¹³C核磁共振(NMR)技术并结合元素分析和稳定碳同位素($\delta^{13}\text{C}$)技术对其结构进行定量表征。其中NMR技术包括高速多重倾斜幅度交叉极化/魔角自旋(multiCP/MAS)、偶极相移、化学位移各向异性过滤和质子碳编辑技术。结果表明: 长期施有机肥和NPK肥增加了HA的饱和程度、氧化程度和极性, 但缩合程度降低; HA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低, 表明有新的有机碳进入HA中。潮土HA以脂肪族化合物为主, 烷基比例最高, 占全碳的24.1%~26.3%; $\delta 64 \sim 44$ 处同时存在含氮烷基和甲氧基, 且含氮烷基比例更高; 另外异头碳和烷基中的非质子碳比例均很低。HA的芳香族成分中, $\delta 142 \sim 113$ 芳香碳以质子碳为主, 且有少量质子芳香碳存在于 $\delta 113 \sim 93$ 。结果还表明施肥均降低了HA的羧基和 $\delta 142 \sim 113$ 芳香碳比例, 增加了烷氧基和甲氧基比例; 施有机肥还增加了酚碳和含氮烷基比例, 降低了烷基比例。本研究表明长期施用有机肥和NPK肥使潮土HA结构向着疏水性程度和分解程度降低的方向发展; OM和NPK处理均使糖类物质增加, OM处理还使木质素和多肽增加, 脂类物质降低。不同施肥模式下HA的形成机制不同。

关键词 胡敏酸; 高级核磁共振; $\delta^{13}\text{C}$; 元素分析; 有机肥; NPK肥

中图分类号 S153.6 **文献标识码** A

腐殖物质是土壤有机质的重要组成部分^[1], 同时也是土壤肥力状况的重要表征^[2-3]。胡敏酸(HA)作为土壤腐殖物质的碱溶部分^[4], 其含量和结构的变化与土壤的保肥和供肥性能密切相关^[5]。长期施肥是提高土壤有机质含量和土壤肥力的重要农业措施^[4, 6], 研究长期施肥条件下土壤HA结构特征的变化具有重要的理论和实践意义。

部分研究表明, 与不施肥对照相比, 施用有机肥或配施化肥情况下, 土壤HA的芳香族含量下降, 脂肪性增强, HA结构变得更加简单^[2-3, 5, 7-8]。但Jindo等^[9]通过西班牙栗色土培养实验, 发现成熟堆肥1年后HA的芳香族物质增加, 疏水性特征更

加明显。孟安华和吴景贵^[10]报道新鲜牛粪和腐解牛粪施入2年后均使植菜土壤HA的脂肪族化合物减少、芳香度增加。Chien等^[6]研究发现施用绿肥堆肥和配施不同化肥8年后, 土壤HA的芳香碳比例没有显著变化, 但烷基比例在堆肥处理中明显增加。此外赵楠和吕贻忠^[11]还比较了长期施用不同有机肥对河北潮土HA结构的影响, 发现有机物料不同, HA的结构有明显差异; 如饼肥处理的HA含氨基化合物和羧基最多, 而绿肥处理的HA含羟基和脂肪烃最多。由此可见, 施肥措施、施肥年限以及土壤类型的不同均会对HA的化学结构产生影响。

然而这种环境的差异和管理措施的不同是否

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0200107, 2016YFD0300802)和现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-03)共同资助 Supported by the National Key Research and Development Program (Nos. 2016YFD0200107, 2016YFD0300802) and the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (No. CARS-03)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bzhao@issas.ac.cn

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

收稿日期: 2016-11-23; 收到修改稿日期: 2017-01-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-25

一定导致土壤有机质组分结构的差异尚有争议。Veum等^[12]发现尽管有机肥处理增加了土壤中的有机碳浓度,但并未引起官能团结构的变化。Yan等^[13]认为长期不同施肥并不能改变水稻土有机质的结构。作为土壤有机质的惰性组分,腐殖物质结构的特异性更是受到质疑^[14-15]。尽管窦森等^[16]并不认可这种质疑,但目前的测定技术大多只能达到半定量分析,难以准确认识到腐殖物质的特异性。这就需要一种更深入的定量分析技术。固态¹³C核磁共振(NMR)是研究有机质结构的重要手段,其中比较常用的是交叉极化/魔角自旋(CP/MAS)技术,但该技术存在一些不足之处如不同类型碳的交叉极化效率低、自旋边带的影响和图谱峰重叠,因此难以定量^[17]。最近发展出的高速多重倾斜幅度交叉极化/魔角自旋(multiCP/MAS)技术则能简单快速定量测定有机质的结构^[18]并成功用于秸秆分解^[19]、海藻吸附^[20]和土壤腐殖物质^[21]等多个领域。选择性碳图谱技术的开发则更加丰富了有机质结构的研究^[7, 17],这些高级NMR技术包括偶极相移(DD)、化学位移各向异性过滤(CSA)、CH编辑、CH₂编辑和CH_n-only编辑技术等,可分别测定非质子碳和可转动碳、异头碳、次甲基、亚甲基,以及质子碳。Mao等^[7]利用高级NMR技术研究了两种施肥模式对农场地土壤钙结合HA结构的影响,发现施用无机氮肥增加了非质子芳香碳比例,而施用粪肥增加了含氮烷基比例。

潮土是黄淮海平原的典型土壤,长期施用有机肥和化肥对潮土HA结构的定量化研究目前还少见报道。基于此,本研究采用元素分析、稳定碳同位素分析和高级固态¹³C NMR波谱法,针对连续23年不同施肥措施对潮土HA结构的影响进行了定量深入研究,为土壤肥力提升和腐殖化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验地设置于中国科学院封丘农业生态试验站(35°00'N, 114°24'E),始于1989年秋。供试土壤为黄河冲积物发育的轻壤质黄潮土,种植制度为冬小麦-夏玉米一年两熟轮作制。本研究选取3种施肥处理:有机肥(OM)、化肥NPK(NPK)和不施肥对照(CK)。每个处理重复4次,每个小区面积为48 m²。试验所用的N、P、K化肥分别为尿素、过磷酸钙和硫酸钾。有机肥以粉碎的小麦秸秆为主,加入适量的大豆饼和棉籽饼,按100:40:45的比例混合、堆制发酵而成。有机肥施用以等氮量为标准,磷和钾不足部分用磷肥和钾肥补足到等量,当季有机肥用量约为2 758 kg hm⁻²。

土壤样品于2013年8月在每个小区采用五点取样法采集耕层土壤(0~20 cm),混匀后装入自封袋。样品经室温风干后磨碎,过2 mm筛备用。土壤基本理化性质见表1。

表1 不同处理间土壤的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soil relative to treatment

处理 Treatment	pH (H ₂ O)	有机碳 SOC (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	全磷 Total P (g kg ⁻¹)	全钾 Total K (g kg ⁻¹)	速效氮 Available N (mg kg ⁻¹)	有效磷 Available P (mg kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg kg ⁻¹)	黏粒 Clay (%)
OM	8.40b	10.64a	1.13a	0.68a	19.10a	16.75a	21.43a	244.9a	14.77a
NPK	8.44b	5.76b	0.66b	0.64a	18.94a	9.82b	12.27b	210.6b	15.08a
CK	8.73a	3.98c	0.44c	0.47b	18.76a	7.46b	1.03c	69.69c	14.63a

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著($p < 0.05$) Note: Different lower-case letters in the same column mean significant difference at 0.05 level

1.2 HA的分离提取和纯化

HA的提取和纯化参照国际腐殖物质学会(IHSS)和Preston等^[22]的方法。具体如下:按土液比1:10(w/v)加入提取剂0.1 mol L⁻¹ NaOH + 0.1 mol L⁻¹ Na₄P₂O₇混合溶液,室温下浸提16 h,离

心收集上清液。多次重复提取,直到离心液无色。将离心液酸化到pH为1~2,室温下静置12~16 h,离心分离出沉淀。分别用0.5 mol L⁻¹ NaOH和6 mol L⁻¹ HCl反复溶解-沉淀,直到离心液无色,最终沉淀即为粗HA。粗HA再用HF:HCl(1%:1%)混合

溶液处理5次去除矿物质，最后经去离子水反复清洗至离心液为中性pH，冷冻干燥后得到纯化HA。

1.3 分析测定

元素组成：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加热4 h测定，O含量用差减法计算。

$\delta^{13}\text{C}$ 值：用元素分析-同位素质谱分析联用仪（Flash-2000 Delta V ADVADTAGE, 赛默飞世尔）测定稳定碳同位素比值，以Pee Dee Belemnite（PDB）为标准。 $\delta^{13}\text{C}$ 值可用于判断土壤有机质组分的来源。

核磁共振：固体 ^{13}C 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。本研究中采用的NMR技术包括以下几种。

^{13}C multiCP/MAS NMR：测定所有碳。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。所有样品的扫描次数为4 096。

偶极相移（DD）技术：测定不与氢原子相连的碳（非质子碳）和可转动碳（包括甲基和聚亚甲基）。偶极相移时间为68 μs ，其他条件同multiCP/MAS。所有样品的扫描次数为4 096。

CSA技术： sp^3 杂化的异头碳和 sp^2 杂化的芳香碳在 $\delta 90 \sim 120$ 区域内均有共振峰，利用五脉冲CSA技术可以将两种信号区分开来，CSA-滤波时

间为35 μs 。CSA与DD技术联用后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 。所有样品的扫描次数为2 400 ~ 8 192。

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）图谱差减而得。两个图谱的交叉极化接触时间均为50 μs ，但第二个图谱再配合40 μs 偶极相移时间。两个图谱的差值显示的为 CH_2 和 CH 官能团即质子碳信号，并有少量 CH_3 信号。所有样品的扫描次数为1 600 ~ 2 048。

烷基和烷氧基比值（A/O-A）、芳香度和疏水性指数（HI）^[17]的计算公式分别如下：

$$\text{A/O-A} = (\delta 0 \sim 44) / (\delta 64 \sim 93) \quad (1)$$

$$\text{芳香度} = (\delta 162 \sim 113) / (\delta 162 \sim 0) \quad (2)$$

$$\text{HI} = [(\delta 0 \sim 44) + (\delta 113 \sim 142)] / [(\delta 44 \sim 113) + (\delta 142 \sim 220)] \quad (3)$$

以上计算公式中所有积分结果均由全碳图谱和偶极相移图谱给出。

2 结果

2.1 长期施肥下HA元素组成和同位素的变化

与CK相比，OM和NPK处理有降低潮土HA的C，增加N和O含量的趋势（表2），使得OM和NPK处理的H/C、O/C和（N+O）/C比值较对照高，但OM和NPK处理间相差不大。但施肥后HA中H含量变化较小。类似地，OM和NPK处理之间的 $\delta^{13}\text{C}$ 值也较为接近，但较CK处理分别降低3.12‰和3.88‰。

表2 不同处理间HA的元素组成（无灰分）、原子比和同位素成分

Table 2 Elemental composition (ash-free), atomic ratio and isotopic components of the humic acids in the soil relative to treatment

处理 Treatment	元素含量（无灰分） Weight % on ash-free basis				原子比 Atomic ratios			$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
	C	N	H	O	H/C	O/C	(N+O)/C	
OM	53.3	5.6	5.6	35.5	1.27	0.50	0.59	-25.99
NPK	53.8	5.3	5.7	35.3	1.27	0.49	0.58	-25.23
CK	55.8	5.0	5.6	33.7	1.20	0.45	0.53	-22.11

2.2 长期施肥下HA偶极相移前后的 ^{13}C multiCP/MAS NMR图谱特征变化

图1为潮土HA的multiCP/MAS全碳图谱（黑线）和相应的偶极相移图谱（灰线）。由全碳图谱可看出潮土HA显示出如下特征峰： $\delta 173$ 、 $\delta 153$ 、

$\delta 129$ 、 $\delta 105$ 、 $\delta 73$ 、 $\delta 56$ 和 $\delta 30$ ，对应的碳官能团分别为羧基（ COO/N-C=O ）、酚碳（aromatic C-O）、芳香碳（aromatic C）、异头碳（anomeric C，但也可能显示芳香碳信号）、烷氧基（O-alkyl）、甲氧基 + 含氮烷基（ OCH_3/NCH ）

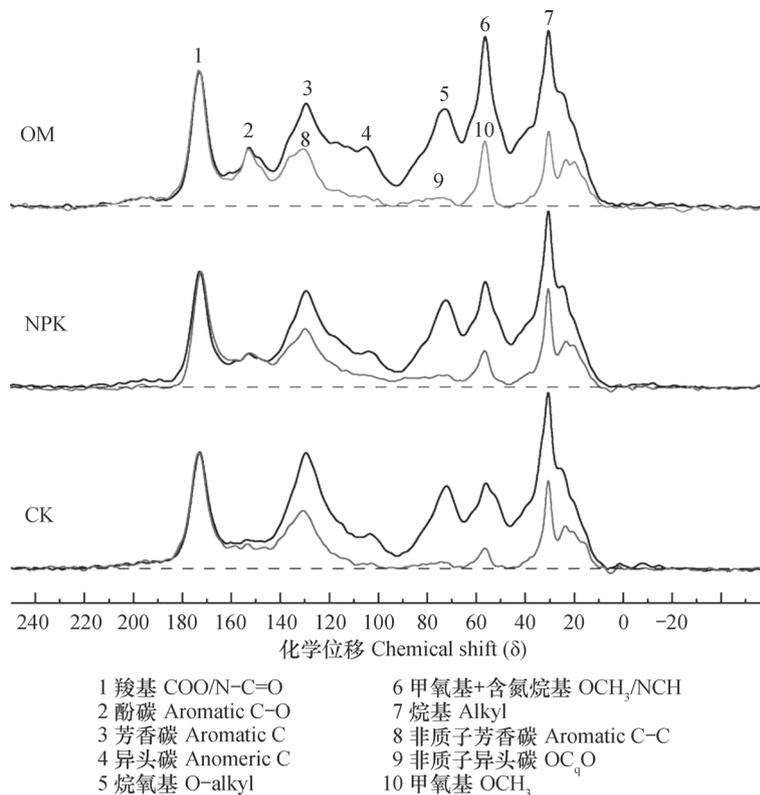


图1 HA的multiCP/MAS¹³C NMR图谱（黑线）和偶极相移图谱（灰线）

Fig. 1 Multiple cross-polarization/magic angle spinning ¹³C NMR spectra (black lines) of HAs, combined with their corresponding dipolar dephasing subspectra (gray lines)

和烷基 (alkyl); 而偶极相移图谱则显示出非质子碳和可转动碳的共振峰信号, 包括羧基、酚碳、非质子芳香碳、非质子烷氧基 (OC_q)、非质子异头碳 (OC_qO)、甲氧基、甲基和聚亚甲基。

潮土HA全碳图谱的最大共振峰均在 $\delta 30$ 处, 且均含有较高的羧基峰 $\delta 173$, 而在 $\delta 220 \sim 188$ 内信号强度不明显, 表明存在较少的羰基; $\delta 129$ 处均显示出较强的芳香碳信号, 且OM处理的峰最低, 而CK处理的最高, 几乎与羧基峰齐平。与CK相比, 施有机肥后HA在 $\delta 153$ 、 $\delta 113 \sim 93$ 和 $\delta 56$ 处的信号增强, 而NPK处理则变化不明显。经偶极相移技术处理后, 潮土HA除在 $\delta 220 \sim 142$ 内碳信号基本不变外, 其他化学位移的碳信号均不同程度下降, 表明存在较多的质子碳。其中 $\delta 129$ 处的峰部分降低, 显示出较多的非质子芳香碳信号; 而 $\delta 113 \sim 93$ 和 $\delta 93 \sim 64$ 的信号强度均大大降低, 表明这两个区域的碳只有很少的非质子碳; 烷基区域内 $\delta 30$ 和 $\delta 23$ 处均有较强的聚亚甲基和甲基峰信号, 且施有机肥后聚亚甲基峰信号减弱, 而NPK处理变化较小。

2.3 OM和NPK处理HA的选择性碳图谱特征

整体而言, 与CK相比, OM处理的HA全碳图谱变化较大, 而NPK处理差异相对较小。全碳图谱和偶极相移图谱尚不能区分 $\delta 113 \sim 93$ 内的异头碳和芳香碳; 异头碳来源于糖类物质^[7], 而芳香碳属于芳香族物质。为了进一步区分这两种结构截然不同的碳, 选择OM和NPK两种处理, 利用CSA和 CH_n -only图谱编辑技术进行测定, 结果如图2所示。

图2a和图2e为全碳图谱, 作为其他图谱的参考对照。由图2b和图2f CSA图谱可知OM和NPK处理的HA在 $\delta 105$ 处均显示出较低的共振峰, 表明存在异头碳; 且OM处理的HA经CSA测定后 $\delta 105$ 峰下降较多, 表明此区域还含有一部分芳香碳; 而在NPK处理中该信号峰下降不明显。由此导致 $\delta 105$ 峰高在全碳图谱中为OM处理高, 而在CSA图谱中二者相当。CSA图谱经偶极相移后在 $\delta 56$ 、 $\delta 30$ 和 $\delta 23$ 处残留有3个低峰(图2c和图2g), 分别归属为甲氧基、聚亚甲基和甲基; 而在 $\delta 113 \sim 93$ 处显示出明显的宽带, 表明两种HA均含有很少的非质

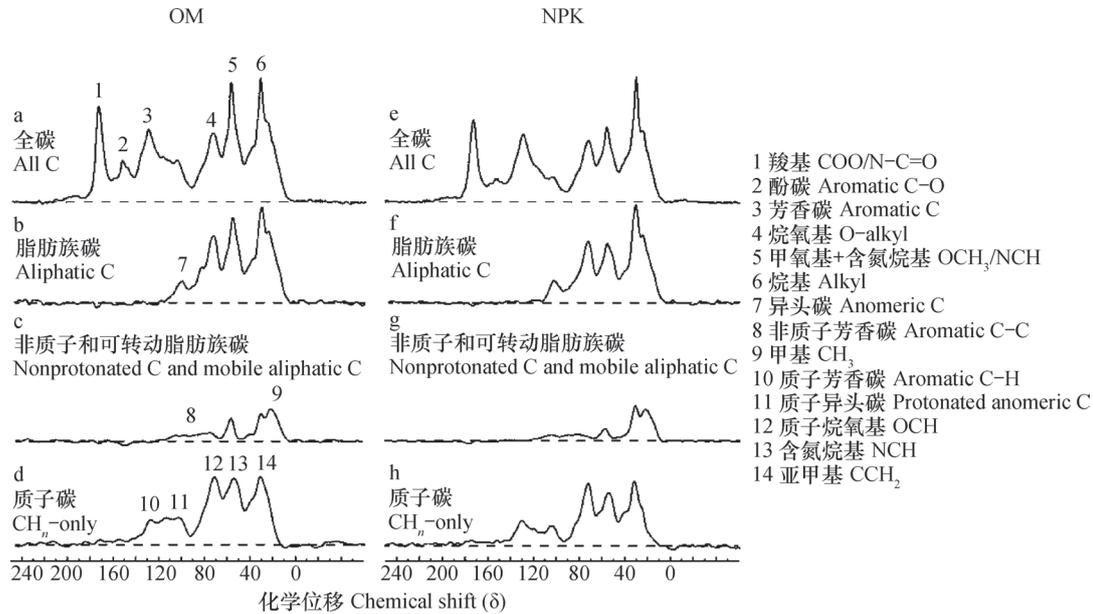


图2 HA的multiCP/MAS NMR图谱和选择性官能团碳图谱

Fig. 2 MultiCP/MAS NMR spectra of humic acids and selective functional group carbon spectra

子异头碳。从图2d和图2h上看两种HA图谱均含有较多的质子碳信号，包括 $\delta 142 \sim 113$ 质子芳香碳、 $\delta 113 \sim 93$ 质子异头碳、 $\delta 93 \sim 64$ 质子烷氧基、 $\delta 56$ 含氮烷基和 $\delta 30$ 聚亚甲基。其中OM处理HA的 $\delta 56$ 峰要较NPK的高。

2.4 长期施肥下HA结构的定量特征变化

由全碳图谱和偶极相移图谱可得到HA各官能团碳的定量分析结果(表3)，包括非质子碳和甲氧基比例。其中 $\delta 113 \sim 93$ 主要为异头碳，芳香碳主要集中于 $\delta 142 \sim 113$ 区间。

由表3可知HA结构中烷基含量最高，占全碳的24.1%~26.3%，其次为 $\delta 142 \sim 113$ 芳香碳(18.7%~23.0%)、烷氧基(13.3%~14.6%)、

羧基(11.0%~12.3%)和含氮烷基(10.0%~11.7%)，而酚碳、 $\delta 113 \sim 93$ 碳、甲氧基和羰基含量最低，占全碳的1.4%~7.5%。与不施肥相比，施肥降低了低场化学位移的碳比例包括羧基和 $\delta 142 \sim 113$ 芳香碳，提高了高场化学位移的碳比例包括 $\delta 113 \sim 93$ 碳、烷氧基和甲氧基+含氮烷基，且除烷氧基外施有机肥对HA结构的改变要比NPK肥大。 $\delta 142 \sim 113$ 芳香碳以质子化碳为主，其比例的降低主要是由质子芳香碳引起，而非质子芳香碳比例变化较小。烷氧基比例的增加在OM处理中主要归因于质子烷氧基，而在NPK处理中主要是由于非质子烷氧基碳。 $\delta 64 \sim 44$ 区域内施有机肥同时增加甲氧基和含氮烷基的相对比例；而施NPK肥

表3 HA不同化学位移区间碳占总碳的相对比例

处理 Treatment	$\delta 220 \sim 188$	$\delta 188 \sim 162$	$\delta 162 \sim 142$	$\delta 142 \sim 113$			$\delta 113 \sim 93$	$\delta 93 \sim 64$			$\delta 64 \sim 44$		$\delta 44 \sim 0$	
	羰基碳 C=O	羧基碳 COO/N-C=O	酚碳 Aromatic C-O	非质子 芳香碳 Aromatic C-C	质子芳 香碳 Aromatic C-H	合计 Total	93	烷氧基O-alkyl C 非质子烷 氧基OC _n 质子烷氧 基OCH 合计 Total			甲氧基+含氮烷基碳 OCH ₃ /NCH 含氮烷 基碳 NCH 合计 Total		烷基碳 Alkyl C	
OM	1.4	11.0	7.0	8.6	10.1	18.7	7.5	1.4	13.0	14.4	4.1	11.7	15.8	24.1
NPK	1.4	11.7	5.7	10.8	9.4	20.2	6.1	2.7	11.9	14.6	4.0	10.0	14.0	26.3
CK	1.5	12.3	5.6	9.8	13.1	22.9	5.7	1.0	12.3	13.3	1.9	10.5	12.4	26.2

主要增加的是甲氧基。另外, 施有机肥还增加了HA中的酚碳比例, 降低了烷基比例, 而NPK肥则没有影响。

根据高级NMR计算的结果(表4), OM处理HA的异头碳相对比例为3.6%, NPK为4.3%, 二者含量较为接近, 分别占 $\delta 113 \sim 93$ 碳的47%和69%。可见与NPK相比, 施有机肥使HA在 $\delta 113 \sim 93$ 内有更多比例的芳香碳(分别占该化学位移内碳的31%和53%), 且绝大多数为质子芳香碳。OM和NPK处理HA的 $\delta 142 \sim 113$ 芳香碳分别占总芳香碳的80%和89%。

表4 根据multiCP/MAS ^{13}C NMR和CSA技术计算的HA芳香碳和异头碳相对比例

Table 4 Relative percentages of aromatic and anomeric in HAs assessed with the multiCP/MAS ^{13}C NMR and CSA filter (%)

处理 Treatment	芳香碳 Aromatic C			异头碳 Anomeric C
	非质子芳香 碳 Aromatic C-C	质子芳香碳 Aromatic C-H	合计 Total	
	OM	8.9	14.5	
NPK	11.1	11.5	22.6	4.3

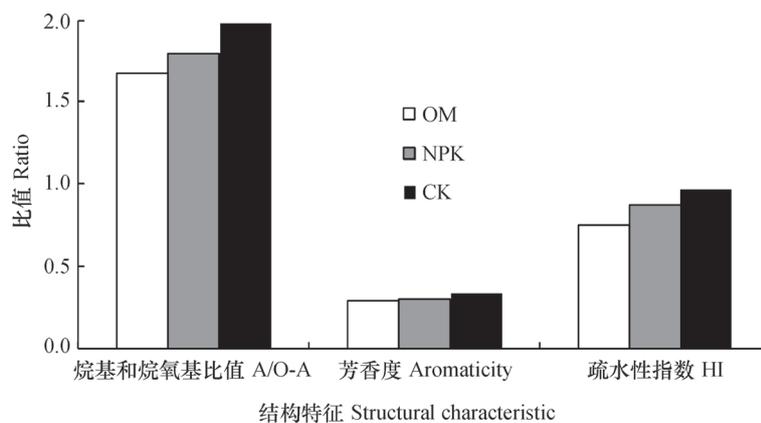


图3 不同处理间HA的A/O-A、芳香度和疏水性指数变化

Fig. 3 Variations of A/O-A, aromaticity and HI of humic acids under different treatments

脂肪性增加, 这与施肥后芳香度降低是一致的(图3); O/C增加与烷氧基和甲氧基官能团比例的增加(表3)一致。Dou等^[8]向棕壤中添加有机肥培养180d后HA的H/C增加, 与本实验结果相似; 而向水稻土中加入有机肥后H/C则降低。可见施肥对HA元素组成和原子比值的改变反映出土壤有机质腐殖化过程的差异; 施肥对胡敏酸H/C比的影响可

由于官能团相对比例的变化, 施肥后HA的A/O-A、芳香度和疏水性指数也发生了变化。由图3可知, A/O-A和疏水性指数表现出CK > NPK > OM的规律, 说明施肥降低了有机碳的分解程度和疏水性特征。HA主要偏脂肪性, 芳香度较低为0.29 ~ 0.33, 施肥后芳香度略有降低。

3 讨论

3.1 长期施肥对潮土HA元素组成和 $\delta^{13}\text{C}$ 值的影响

元素组成能简单判别有机质的结构和特性^[10]。本研究表明长期施肥尤其是有机肥降低了HA的C含量, 增加了N和O含量(表2), 与吴景贵等^[2]及孟安华和吴景贵^[10]的研究结果一致。有机肥和NPK肥的施用相比不施肥对照增加了土壤中的全氮和有效氮含量(表1), 这部分增量则可能通过腐殖化过程反映在胡敏酸N含量的增加上。施肥后HA的(N+O)/C比值增加, 表明其极性增加, 这和施肥后HA疏水性指数降低是一致的(图3); 说明施肥后HA的电性增强, 保肥能力贡献更大^[11]。同时HA的H/C增加、O/C增加, 表明其饱和程度和氧化程度增加, 缩合度减小^[4], 暗示施肥后HA的

能因土壤类型而异, 旱地和水田中的腐殖化过程存在较大差异。

长期施肥后潮土HA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低(表2), 说明在C3作物小麦和C4作物玉米交替条件下, 施肥导致HA的同位素组成出现差异。张晋京等^[23]报道C3和C4植物交替条件下, 田间施用有机肥以及有机肥配施化肥同样也使HA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值呈

下降趋势。 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化一方面与有机物料本身的 $\delta^{13}\text{C}$ 值有关，另一方面也可能与HA的量和结构相关，但尚不能证明二者之间存在显著的相关性^[23]。本研究由于施用的麦秆为C3植物（ $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 $-40\text{‰} \sim -23\text{‰}$ ^[24]）较对照组HA的 $\delta^{13}\text{C}$ （ -22.11‰ ）低，说明有机肥中的碳有可能进入到HA中，由此导致OM处理HA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值较不施肥对照更低。此外NPK和OM处理相对不施肥对照均显著增加了小麦和玉米产量^[25]，而作物产量一般能影响到土壤HA含量；但本研究中HA具有典型的C3特征，而非C4特征，说明来源于C4植物玉米的有机质对 $\delta^{13}\text{C}$ 值的影响有限。果胶、半纤维素、糖类和氨基酸一般富 ^{13}C ，而纤维素、脂类和木质素等则亏 ^{13}C ^[26]。NMR结果表明施肥后HA的糖类含量增加，OM处理的脂类降低，但同时施有机肥后木质素比例也增加（表3），说明HA的结构变化能一定程度上反映出 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化趋势，但 $\delta^{13}\text{C}$ 值并不能完全反映HA的结构，这印证了HA结构的复杂性和非均一性^[16]。

3.2 长期施肥对潮土HA结构的影响

HA结构与其生物活性相关，对其结构的了解能进一步认识HA在土壤中的功能^[27]。本研究中潮土HA的羰基比例很低（表3），说明很少有酮类物质，与前人研究类似^[8, 28]。羧基比例在长期施肥后降低，朱青藤等^[5]研究施有机肥后白土HA的羧基含量也降低，说明施肥后潮土的腐殖化过程发生变化^[1]。Mao^[7]和吴景贵^[2]等的研究表明施用有机肥后土壤HA芳香族含量下降。相应地，张奇春和王光火^[3]及朱青藤^[5]等报道不同配施化肥或有机肥使土壤HA的脂肪族含量增加。本研究也得到同样的结果，施肥后芳香度和芳香族物质比例降低、脂肪族物质增加（表3），说明施肥后潮土HA脂肪性增强、分子结构更加简单^[8, 23]。长期施肥后HA芳香族比例的降低一方面是因为脂肪族比例的增加，另一方面与土壤有机质本身结构的变化也有关系。研究表明长期施肥可能导致土壤酶活性和微生物活性增强，加速大团聚体和微团聚体中芳香族物质的氧化分解从而使潮土OM和NPK处理的全土有机质芳香族比例降低^[29]；该结果和本研究中HA芳香族物质的减少是吻合的。Mao等^[7]也发现无论是游离HA还是钙结合HA，长期施用粪肥后其芳香族物质均降低，其原因可能是微生物活性的增加加剧了类木质素物质的降解。

虽然长期施肥后HA芳香族物质整体上减少而脂肪族物质增加，但本研究发现施有机肥后酚碳比例增加，降低的主要是 $\delta 142 \sim 113$ 的芳香碳；脂肪族物质中增加的主要是烷氧基和甲氧基，而烷基比例降低（表3）。酚碳和甲氧基是木质素的显著特征^[7]，而植物组织中含有较多的木质素^[30]；结果表明有机肥处理下的木质素特征在腐殖化过程中更加明显。烷基同木质素一样难以被微生物分解^[29]，而OM处理的HA中烷基比例更低，说明施有机肥降低了HA中难分解物质的比例。这可能是由于施有机肥提高了微生物的活性^[31]，加剧了有机物的分解；另一方面还与有机肥中较多烷氧基引起的“稀释效应”有关。烷基的降低和烷氧基的增加导致施有机肥后HA的A/O-A降低（图3），一定程度上证实了施有机肥降低了潮土有机质的分解程度^[29]。施用NPK肥也降低了HA的A/O-A，但不如OM处理明显，说明NPK肥的施用对HA结构的影响较小。

由于常规CP/MAS半定量技术^[6, 9, 27]对HA结构的分析受限，一些官能团如异头碳和芳香碳的吸收峰存在重叠现象，若笼统归结为某一种官能团有可能误导对HA结构和腐殖化过程的认识。Cao等^[28]利用高级NMR技术研究了美国爱荷华州农田土壤HA的结构，发现HA中含有大量的质子碳，异头碳和烷氧基中碳非质子化的比例较低，且 $\delta 64 \sim 44$ 处主要为含氮烷基而非甲氧基，与本实验结果均比较类似。本研究中还发现潮土HA在 $\delta 113 \sim 93$ 处除了异头碳外，还含有一定的芳香碳，施有机肥能增加该区域的芳香碳比例，且主要以质子化芳香碳为主（表3和表4）；一方面说明不同处理的HA在腐殖化过程中形成的途径有所差异，另一方面也说明在今后的分析中有必要通过CSA技术来识别出真正的异头碳。Mao等^[7]研究发现长期施用无机肥较有机肥更能增加土壤钙结合HA中的非质子芳香碳，与本实验结果相同（表3），说明NPK处理的HA中可能有更多的碳源于黑炭^[21]。OM处理较NPK处理的HA含有更多的含氮烷基，与Mao等^[7]的结果也类似，说明施有机肥能增加HA中的氨基酸、多肽或蛋白质等物质^[19]。本研究利用高级NMR技术发现的非质子芳香碳不属于Kelleher和Simpson^[14]提出的生物大分子，不同施肥处理下HA的信号也存在诸多差异，因此否认腐殖物质特异性的依据并不充分^[16]。

4 结 论

通过潮土上23年施有机肥和NPK肥的研究表明, 施肥增加了土壤HA的N和O含量, 降低了C含量, 使HA饱和程度、氧化程度和极性增加, 缩合度减小。施肥后 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低, 且OM处理的HA更贫 ^{13}C , 表明HA中新进入了有机碳。高级NMR技术结果表明潮土HA以脂肪族化合物为主, 含有大量的质子化碳。芳香碳主要为质子化碳, 且在 $\delta 113 \sim 93$ 处分布有少量质子化芳香碳, 施有机肥使该化学位移内有更多比例的芳香碳。潮土HA中异头碳和烷氧基的非质子化比例很低, $\delta 64 \sim 44$ 处则主要归属为含氮烷基而非甲氧基。施肥降低了HA羧基和 $\delta 142 \sim 113$ 的芳香碳比例, 但增加了烷氧基和甲氧基比例, 施有机肥还增加了酚碳和含氮烷基比例, 降低了烷基比例。整体上, 施有机肥和NPK肥降低了HA的疏水性程度和分解程度。

参考文献

- [1] Stevenson F J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994
- [2] 吴景贵, 任军, 赵欣宇, 等. 不同培肥方式黑土腐殖质形态特征研究. 土壤学报, 2014, 51 (4) : 709—717
Wu J G, Ren J, Zhao X Y, et al. Morphology of humus in black soil as affected by fertilization method (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2014, 51 (4) : 709—717
- [3] 张奇春, 王光火. 施用化肥对土壤腐殖质结构特征的影响. 土壤学报, 2006, 43 (4) : 617—623
Zhang Q C, Wang G H. Effect of chemical fertilizer on structure of soil humus (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43 (4) : 617—623
- [4] 窦森. 土壤有机质. 北京: 科学出版社, 2010
Dou S. Soil organic matter (In Chinese). Beijing: Science Press, 2010
- [5] 朱青藤, 申连玉, 钱黎慧, 等. 有机物料对白土土壤胡敏酸结构特征的影响. 植物营养与肥料学报, 2015, 21 (2) : 396—403
Zhu Q T, Shen L Y, Qian L H, et al. Effects of organic material application on the structures of humic acids in low yield paddy soil (In Chinese). Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2015, 21 (2) : 396—403
- [6] 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. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (18) : 6790—6799
- [7] Mao J D, Olk D C, Fang X W, et al. Influence of animal manure application on the chemical structures of soil organic matter as investigated by advanced solid-state NMR and FT-IR spectroscopy. Geoderma, 2008, 146 (1) : 353—362
- [8] Dou S, Zhang J J, Li K. Effect of organic matter applications on ^{13}C -NMR spectra of humic acids of soil. European Journal of Soil Science, 2008, 59 (3) : 532—539
- [9] Jindo K, Hernández T, García C, et al. Influence of stability and origin of organic amendments on humification in semiarid soils. Soil Science Society of America Journal, 2011, 75 (6) : 2178—2187
- [10] 孟安华, 吴景贵. 不同处理牛粪对植菜土壤腐殖质结构特征的影响. 水土保持学报, 2015, 29 (4) : 223—228, 266
Meng A H, Wu J G. Effects of different cow dung treatments on humus structure of vegetable planting soil (In Chinese). Journal of Soil and Water Conservation, 2015, 29 (4) : 223—228, 266
- [11] 赵楠, 吕贻忠. 不同施肥处理对潮土胡敏酸结构特性的影响. 光谱学与光谱分析, 2012, 32 (7) : 1856—1859
Zhao N, Lü Y Z. Effects of different fertilization treatments on soil humic acid structure characteristics (In Chinese). Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32 (7) : 1856—1859
- [12] Veum K S, Goynes K W, Kremer R J, et al. Biological indicators of soil quality and soil organic matter characteristics in an agricultural management continuum. Biogeochemistry, 2014, 117 (1) : 81—99
- [13] Yan X, Zhou H, Zhu Q H, et al. Carbon sequestration efficiency in paddy soil and upland soil under long-term fertilization in southern China. Soil & Tillage Research, 2013, 130: 42—51
- [14] Kelleher B P, Simpson A J. Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? Environmental Science & Technology, 2006, 40 (15) : 4605—4611
- [15] Lehmann J, Kleber M. The contentious nature of soil organic matter. Nature, 2015, 528 (7580) : 60—68
- [16] 窦森, 李艳, 关松, 等. 腐殖物质特异性及其产生机制. 土壤学报, 2016, 53 (4) : 1—11
Dou S, Li Y, Guan S, et al. The structural distinctiveness of humic substances and its formation mechanism in simulated incubation (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2016, 53 (4) : 1—11
- [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. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2011, 75 (24): 7864—7880
- [18] Johnson R L, Schmidt-Rohr K. Quantitative solid-state ^{13}C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. *Journal of Magnetic Resonance*, 2014, 239: 44—49
- [19] 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. *PLoS ONE*, 2016, 11 (7): e0158172
- [20] Zhang D N, Ran Y, Cao X Y, et al. Biosorption of nonylphenol by pure algae, field-collected planktons and their fractions. *Environmental Pollution*, 2015, 198: 61—69
- [21] Xu J, Zhao B, Chu W, et al. Chemical nature of humic substances in two typical Chinese soils (upland vs paddy soil): A comparative advanced solid state NMR study. *Science of the Total Environment*, 2017, 576: 444—452
- [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. *Plant and Soil*, 1994, 158 (1): 69—82
- [23] 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. *农业环境科学学报*, 2006, 25 (2): 382—387
- Zhang J J, Dou S, Zhang D J. Preliminary study of impact of long-term fertilization on $\delta^{13}\text{C}$ values of soil organic matter (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25 (2): 382—387
- [24] 窦森, 张晋京, Lichtfouse E, 等. 用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法研究玉米秸秆分解期间土壤有机质数量动态变化. *土壤学报*, 2003, 40 (3): 328—334
- Dou S, Zhang J J, Lichtfouse E, et al. Study on dynamic change of soil organic matter during corn stalk decomposition by $\delta^{13}\text{C}$ method (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40 (3): 328—334
- [25] Xin X L, Zhang J B, Zhu A N, et al. Effects of long-term (23 years) mineral fertilizer and compost application on physical properties of fluvo-aquic soil in the North China Plain. *Soil & Tillage Research*, 2016, 156: 166—172
- [26] 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 ^{13}C distribution and CPMAS-NMR spectra. *European Journal of Soil Science*, 2000, 51 (4): 583—594
- [27] Garcia A C, de Souza L G A, Pereira M G, et al. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports*, 2016, DOI: 10.1038/srep20798
- [28] Cao X Y, Olk D C, Chappell M, et al. Solid-state NMR analysis of soil organic matter fractions from integrated physical-chemical extraction. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, 75 (4): 1374—1384
- [29] 郭素春, 郁红艳, 朱雪竹, 等. 长期施肥对潮土团聚体有机碳分子结构的影响. *土壤学报*, 2013, 50 (5): 922—930
- Guo S C, Yu H Y, Zhu X Z, et al. Effect of long-term fertilization on molecular structure of organic carbon in soil aggregates in fluvo-aquic soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50 (5): 922—930
- [30] Kögel-Knabner I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34 (2): 139—162
- [31] Zhang H J, Ding W X, Yu H Y, et al. Linking organic carbon accumulation to microbial community dynamics in a sandy loam soil: Result of 20 years compost and inorganic fertilizers repeated application experiment. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51 (2): 137—150

Effects of Long-term Application of Organic Manure and Chemical Fertilizer on Structure of Humic Acid in Fluvo-aquic Soil

XU Jisheng^{1, 2} ZHAO Bingzi^{1†} ZHANG Jiabao¹

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract 【Objective】 Fertilization has become increasingly common to increase soil organic matter

(SOM) content and improve soil fertility. Research suggests that fertilization promotes production of humic acids (HAs), one of the most important component of SOM. However little is known about the quantitative effects of fertilization on structural characteristics of HAs. Based on the long-term field fertilization experiment in Fegnqiu of Henan, effects of application of organic manure (OM), chemical fertilizer (NPK) and nothing (CK) on structure of HAs in fluvo-aquic soil were assessed. **【Method】** Soil samples were collected from the surface soil layers of three treatment plots, i.e. OM, NPK and CK, of a long-term winter wheat (*Triticumaestivum* L.) -summer maize (*Zea mays* L.) rotation experiment in Fengqiu, China. HAs were exhaustively extracted from the soil samples with a combined 0.1 mol L⁻¹ NaOH and 0.1 mol L⁻¹ Na₄P₂O₇ solution and obtained through precipitation after acidification with 6 mol L⁻¹ HCl. HF : HCl (1% : 1%) solution was then used to purify the HAs obtained. In the end, the purified HAs were characterized with advanced solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy coupled with elemental analysis and isotopic analysis (δ¹³C). The NMR techniques included multiple cross-polarization/magic angle spinning (multiCP/MAS), dipolar-dephasing (DD), chemical-shift-anisotropy (CSA) filter and spectral editing of immobile CH₂ and CH. **【Result】** Results show that long-term fertilization changed the element compositions, δ¹³C ratios and carbon functional groups of HAs, particularly significant in Treatment OM, and increased saturation degree, oxidation degree and polarity of HAs, but decreased condensation degree of HAs. The decrease of HAs in δ¹³C values indicated incorporation of new organic carbon into HAs. Advanced NMR techniques revealed that HAs in fluvo-aquic soil were composed predominantly of aliphatic compounds with alkyl being the highest in percentage (24.1% ~ 26.3%). OCH₃ and NCH signals both resonated around δ64 ~ 44, while the latter was prominent in proportion. Besides, the proportion of nonprotonated carbon was very low in anomeric and O-alkyl. Among the aromatics of HAs, they were dominated with protonated carbon in δ142 ~ 113, while only a little aromatic carbon existed in δ113 ~ 93, which cannot be detected with the routine cross-polarization/magic angle spinning (CP/MAS) NMR. It was also found that long-term fertilization reduced the percentages of COO/N-C=O and aromatic carbon of δ142 ~ 113, but increased the percentages of O-alkyl and OCH₃. Moreover, application of organic manure also increased the proportions of aromatic C—O and NCH, but decreased that of alkyl. **【Conclusion】** In conclusion, all the findings in this study indicate that HA structure tends to be less hydrophobic with decreasing degree of decomposition. The application of either OM or NPK increases the content of carbohydrates in HAs. The application of OM also increases the contents of lignin and peptides, but decreases the content of lipids. The study also suggests that the advanced NMR techniques could provide great insight into HA structure and mechanisms of HA formation relative to fertilization pattern.

Key words Humic acid; Advanced nuclear magnetic resonance; δ¹³C; Elemental analysis; Organic manure; NPK fertilizer

(责任编辑: 卢萍)