

DOI: 10.11766/trxb201903060110

徐杨, 窦森, 张一枫, 田宇欣, 段宏美, 白月. 添加蒙脱石是否促进白花苜蓿的腐殖化进程? [J]. 土壤学报, 2020, 57 (5): 1230–1239.  
XU Yang, DOU Sen, ZHANG Yifeng, TIAN Yuxin, DUAN Hongmei, BAI Yue. Does Amendment of Montmorillonite Promote Humification of White Alfalfa? [J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 (5): 1230–1239.

## 添加蒙脱石是否促进白花苜蓿的腐殖化进程? \*

徐 杨, 窦 森<sup>†</sup>, 张一枫, 田宇欣, 段宏美, 白 月

(吉林农业大学资源与环境学院, 长春 130118)

**摘 要:** 植物残体和微生物生物量是腐殖物质 (Humic substance, HS) 形成的主要母体材料, 同时黏土矿物作为土壤的重要组成部分, 在 HS 的形成中也扮演重要角色, 然而目前有关黏土矿物对 HS 形成过程的具体影响还不清楚。选择将黏土矿物-蒙脱石和微生物-土壤浸提液作为控制条件对白花苜蓿进行模拟培养腐殖化, 通过表征培养过程中总有机碳 (Total organic carbon, TOC) 含量、类腐殖质组成、类胡敏酸 (Humic-like acid, HLA) 的元素组成和红外光谱特征, 探究蒙脱石添加对白花苜蓿腐殖化进程的影响。结果表明, 模拟培养腐殖化后, 蒙脱石添加虽然加速了 TOC 的分解, 促进 HLA 的生成, 但使 HLA 的缩合度降低, 结构简单化; 而土壤浸提液添加则使蒙脱石处理加快了结构更加复杂的 HLA 积累。培养后, 不同处理的 HLA 均向着接近土壤胡敏酸 (Humic acid, HA) O/C 和 H/C 值的方向发展, 其中未添加蒙脱石处理 (AnM) 的 HLA 复杂化程度与真正的 HA 最接近, 更进一步说明蒙脱石不能促进 HLA 更接近土壤 HA。综上, 在模拟培养腐殖化条件下, 蒙脱石添加可促进白花苜蓿 TOC 的分解及其 HLA 的形成, 从而加快白花苜蓿的腐殖化进程, 但却使形成的 HLA 结构更加简单化, 与真正的 HA 仍存在较大的差异, 该研究结果为土壤 HS 的形成机理与起源探索提供了一定的科学借鉴。

**关键词:** 白花苜蓿; 模拟培养; 腐殖化; 腐殖物质; 类胡敏酸

**中图分类号:** S151.9      **文献标志码:** A

## Does Amendment of Montmorillonite Promote Humification of White Alfalfa?

XU Yang, DOU Sen<sup>†</sup>, ZHANG Yifeng, TIAN Yuxin, DUAN Hongmei, BAI Yue

(College of Resource and Environmental Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** 【Objective】 Humic substances (HS), the main component of soil organic matter, are kind of macromolecular compounds, specific and multi-phased in property, formed during humification. However, in the past two decades, doubts have been arising about rationality of the disassociation process of HS. Currently, the research has shifted its focus from on chemical properties of HS to on identification of processes and mechanisms related to HS renewal and stabilization. Plant residues and microbial biomass are the main parent materials for the formation of humic substances, meanwhile, clay minerals, as an important part of the soil, also play an important role in the process. However, still little is known about any specific effects of clay minerals on formation of HS. Some scholars have used microbial pure culture methods to study formation of HS, but because of the

\* 国家自然科学基金项目 (41571231) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41571231)

<sup>†</sup> 通讯作者 Corresponding author, E-mail: dousen1959@126.com

作者简介: 徐 杨 (1994—), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 从事土壤环境与生物化学研究。E-mail: 857472355@qq.com

收稿日期: 2019-03-06; 收到修改稿日期: 2019-04-21; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-11-01

absence of clay minerals, the formation of HS studied does not represent that in soil. Therefore, more efforts should be done to further elucidate in detail the complex interactions between HS and the surface of minerals, as well as the role of soil microbes as a participant. In order to explore effects of montmorillonite on humification process, white alfalfa, an angiosperm, was used in an incubation experiment with montmorillonite and microbe-soil extract as control conditions. 【Method】 In this experiment, there were three treatments, i.e. Treatment A, white alfalfa with montmorillonite and soil extract added; Treatment AnM, white alfalfa with soil extract added only; and Treatment AnI, only white alfalfa. Effects of the treatments and duration of the incubation on composition of humus-like substances and structure of humic-like acids (HLA) formed as incubation product of white alfalfa were studied. Water-soluble substances (WSS), fulvic-like acid (FLA), humic-like acid (HLA) and humin-like (HLu) were extracted with the modified humus composition method. HLA samples were extracted with the method recommended by the International Humic Substances Society (IHSS) for analysis of structure of HA with the elemental composition- infrared spectroscopy. 【Result】 Results show that the amendment of montmorillonite promoted decomposition of TOC and accumulation of simple structured HLA. After 90 days of incubation, H/C in Treatment A increased from 1.38 to 1.61, after 180 days from 1.39 to 1.53, and after 360 days from 1.36 to 1.48. The sharp increase in H/C in the early stage in Treatment A made the structure of HLA simple. However, with the incubation going on, the increase in H/C gradually dulled in trend. Its ratio of 2920/1640 in the infrared spectrum tended to be in consistence with that in elemental composition. At the end of the incubation, HLA, regardless of treatments, developed eventually quite close to the O/C and H/C of soil HA in value. Among the treatments, the HLA in Treatment (AnM) was the closest to real soil HA in complexity, indicating that montmorillonite cannot help HLA turn into soil HA. 【Conclusion】 Overall, montmorillonite amendment may promote decomposition of TOC and formation of HLA, and accelerate humification process of white alfalfa; however, it does not enhance the aromatization of HLA in degree and the structure of HLA in complexity as speculated or reported in the literature. Instead, it simplifies the structure of HLA, which is still quite different from real soil HA.

**Key words:** White alfalfa; Simulated incubation; Humification; Humic substances; Humic acid

腐殖物质 (Humic substances, HS) 是土壤有机质 (soil organic matter, SOM) 的主体<sup>[1]</sup>, 执拗性的植物残体和微生物残体是 HS 的重要来源<sup>[2]</sup>。然而, HS 形成的机制仍有待阐明, 这种知识的缺乏阻碍了我们对土壤管理选项的优化或更新<sup>[2]</sup>。改变各种来源和动态将导致 HS 的组成、性质、过程和功能不同。因此, 需要对 HS 的形成途径进行更加深入细致的研究<sup>[7]</sup>。研究者认为被子植物对 HS 的形成与转化起着至关重要的作用<sup>[3-4]</sup>, 其中白车轴草 (*Trifolium repens* L.) 俗称白花苜蓿研究较多, 具有很大的研究价值, 因此本实验选用白花苜蓿为培养材料, 以探究 HS 的形成。

有学者采用微生物纯培养方法来研究 HS 的形成<sup>[5]</sup>, 但由于未加黏土矿物催化, 形成的类腐殖物质 (Humic-like substances, HLS) 与土壤 HS 相差很大<sup>[6]</sup>。因此, HS 与矿物表面之间的复杂相互作用, 以及微生物作为参与者的作用需要比过去更详细地阐明<sup>[7]</sup>。Birkel 等<sup>[8]</sup>为证实黏土矿物催化作用, 通过研究酚类 (邻苯二酚, 连苯三酚和 2,6-二甲苯基酚) 在蒙脱石颗粒表面上的反应, 得出矿物结构中的铁

是黏土催化活性的部分原因的结论。Filip 等<sup>[9]</sup>指出, 黏土矿物可缩短暗色物质形成的时间并增加碱提取腐殖酸类聚合物的数量。黏土矿物的催化作用主要通过间接影响酚类物质的形成而实现, 但所形成的 HS 结构未见差异。Duarte 等<sup>[10]</sup>认为矿物表面对土壤胡敏酸 (Humic acid, HA) 分子中非晶形亚甲基结构数量的提升具有显著抑制作用, 即提高了 HA 的芳香度。然而对 HS 的形成条件仍有诸多不解, 黏土矿物对腐殖化进程的影响仍需要被更加准确和详细的阐明。本研究分别将黏土矿物-蒙脱石和微生物-土壤浸提液作为控制条件, 以探究蒙脱石处理对白花苜蓿腐殖化进程的影响, 结果可为土壤 HS 的形成机理与起源探索提供了一定的科学借鉴。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试材料

白花苜蓿: 选取被子植物门, 车轴草属的白车轴草, 俗称白花苜蓿为培养材料。白花苜蓿于 2017

年 4 月 7 日采自长春市净月区吉林农业大学第三试验田。将采集得到的白花苜蓿进行清洗后风干,置于烘箱中 90℃下高温杀酶 20 min, 65℃烘干 2 d,至重量不再变化。经剪切、磨碎后过 1 mm (20 目)和 0.3 mm (60 目)筛子备用。含碳量为 440.8 g·kg<sup>-1</sup>, C/N 为 26.85。

黏土矿物: 选用蒙脱石, 于 2017 年 3 月购自上海国药集团化学试剂有限公司, CAS NO.: 1318-93-0。

供试土壤及土壤浸提液: 供试土壤为草甸黑土, 于 2017 年 4 月 25 日取自吉林农业大学玉米连作试验田 (43°48'46" N, 125°23'28" E) 0~20 cm 耕层, 土壤含碳量为 9.76 g kg<sup>-1</sup>, C/N 为 7.28。于取土当天按水土比 1:2.5 提取土壤浸提液。其余土壤风干过 1 mm 和 0.3 mm 筛子备用。

## 1.2 实验设计

培养实验于 2017 年 4 月 26 日开始。处理 A 在 250 ml 塑料烧杯内分别加入 45 g 蒙脱石和 15 g 白花苜蓿 (60 目), 混合均匀。接种 10 mL 土壤浸提液并用蒸馏水调节混合物含水量至田间最大持水量的 80% 左右, 用保鲜膜封口, 在保鲜膜上均匀设置 5 个直径为 1 mm 的通气孔, 放置 30℃ 培养箱培养。同时设置了无蒙脱石 (AnM) 和无土壤浸提液 (AnI) 处理, 培养条件和方法均与 A 处理相同。分别于培养 0 d、90 d、180 d 和 360 d 取样分析, 每个取样时间 3 个重复, 每次取走整瓶。

## 1.3 分析方法

土壤腐殖质与培养产物的类腐殖质组分采用腐殖质组成修改法进行提取<sup>[11-12]</sup>。其中水溶性物质 (Water soluble substance, WSS) 含碳量采用 TOC 分析仪 (日本岛津 TOC-VCPH) 测定; 富里酸 (Fulvic acid, FA) / 类富里酸 (Fulvic-like acid, FLA) 和胡敏酸 (HA) / 类胡敏酸 (Humic-like acid, HLA) 采用重铬酸钾容量法; 总有机碳 (Total organic carbon, TOC) 和胡敏素 (Humin, Hu) / 类胡敏素 (Humin-like, HLu) 采用德国碳硫分析仪 (Elementar Analysensysteme GmbH) 测定。用  $PQ=HA/(FA+HA)$  值表示材料的腐殖化程度。

土壤 HA 与培养产物提取物 (HLA) 采用国际腐殖质协会 (International Humic Substances Society, IHSS) 推荐的方法进行提取纯化<sup>[13]</sup>。HA 和 HLA 的

元素组成和红外光谱分别采用德国 Elementar Vario EL III 型元素分析仪和美国 AVATAR 360 傅里叶变换红外光谱仪进行测定。

## 1.4 数据处理

文中数据采用 Excel 2010 与 Origin 7.5 软件进行数据分析处理, 用 SPSS Statistics 20.0 软件进行显著性差异分析,  $P<0.05$ 。

## 2 结果

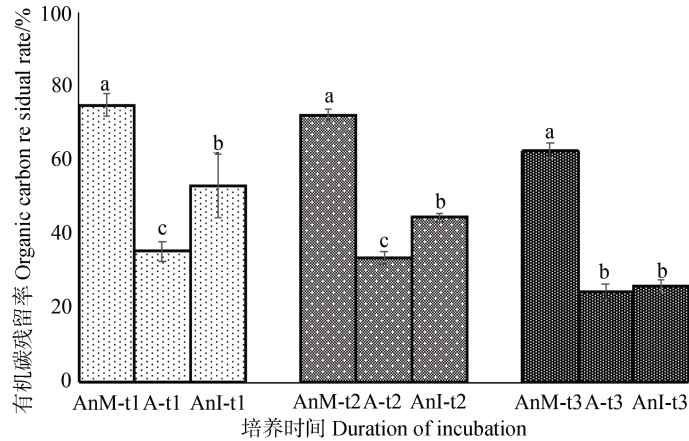
### 2.1 蒙脱石对白花苜蓿培养产物 TOC 的影响

如图 1 所示, 与未添加蒙脱石 (AnM) 相比, 添加蒙脱石 (A) 对白花苜蓿腐殖化进程的影响十分显著, 促进了 TOC 的分解。培养 90 d 后, TOC 的分解率为: A-t1 (64.88%) > AnM-t1 (22.58%); 180 d 后, 总有机碳 (TOC) 进入“缓慢分解阶段”, A-t2 (66.13%) > AnM-t2 (27.72%); 360 d 后, A-t3 (75.36%) > AnM-t3 (37.34%), 蒙脱石处理始终加速 TOC 的分解。与未加土壤浸提液 (AnI) 相比, 添加土壤浸提液 (A) 使蒙脱石处理在培养初期促进 TOC 的分解, 随着培养时间的增加, 两类处理的 TOC 基本接近。培养 90 d 后, TOC 的分解率为: A-t1 (64.88%) > AnI-t1 (47.75%); 180 d 后, TOC 分解缓慢, A-t2 (66.13%) > AnI-t2 (54.64%); 360 d 后, 两类处理 TOC 的减少量基本接近 (A-t3 75.36%, AnI-t3 73.98%)。

### 2.2 蒙脱石对白花苜蓿培养产物中类腐殖质组分的影响及其 PQ 值与土壤的接近程度

从图 2 可知蒙脱石对类腐殖质组分相对含量的影响。蒙脱石促进 TOC 的分解主要是通过促进 WSS 和 HLu 的减少来实现的, 但同时促进了 HLA 的形成和 HLA 与 FLA 的转化。

各处理类腐殖质组分的有机碳含量如表 1 所示。WSS 的相对含碳量为: A-t0 (13.22%) > AnM-t0 (12.90%), AnM-t1 (28.03%) > A-t1 (14.43%), AnM-t2 (15.50%) > A-t2 (10.43%), AnM-t3 (46.48%) > A-t3 (7.581%), 与未添加蒙脱石 (AnM) 相比, 在模拟培养腐殖化过程中添加蒙脱石 (A) 使 WSS 的相对含碳量明显减少。从 HLA 和 FLA 的变化看, 培养 0 d 时, A 类处理的 HLA 相对含量明显低于 AnM 类, 两类处理的 FLA 相对含量相近; 90 d 后,



注：A 为加入白花苜蓿、蒙脱石和土壤浸提液的处理，AnM 和 AnI 分别为无蒙脱石和无土壤浸提液的处理，AnM-t1、A-t1、AnI-t1 均代表培养 90 d，AnM-t2、A-t2、AnI-t2 均代表培养 180 d，AnM-t3、A-t3、AnI-t3 均代表培养 360 d。有机碳残留率为某一时间段的 TOC 与培养 0 d TOC 的比，即有机碳残留率=TOC<sub>t</sub>/TOC<sub>0</sub>。不同小写字母代表同一时间不同处理间类腐殖质组分差异显著 ( $P<0.05$ )。下同。Note: A stands for treatment of addition of white alfalfa, montmorillonite and soil extract; AnM for treatment of addition of white alfalfa and soil extract; AnI for treatment of addition of white alfalfa and montmorillonite; and -t1, -t2 and -t3 for duration of the incubation for 90, 180 and 360 days, respectively. Organic carbon residual ratio is the ratio of TOC after a certain period of incubation to the initial TOC (i.e., organic carbon residual ratio = TOC<sub>t</sub>/TOC<sub>0</sub>). Different lower-case letters represent significant differences in humus-like components between treatments after the same period of incubation ( $P<0.05$ ). The same below.

图 1 蒙脱石添加对不同培养时间白花苜蓿培养产物有机碳残留率的影响

Fig.1 Effects of montmorillonite amendment on organic carbon residual rate of the culture products of white alfalfa relative to duration of incubation

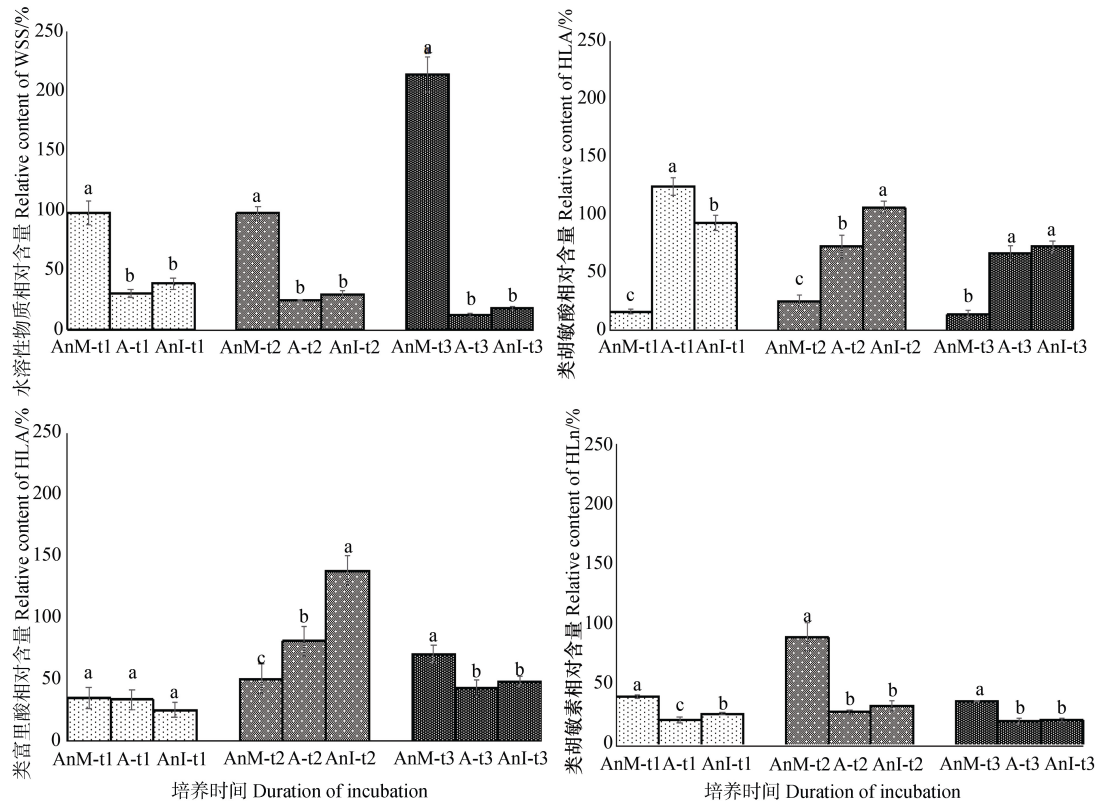
HLA 的相对含碳量：A-t1 (21.38%) > AnM-t1 (4.002%)，FLA 的相对含碳量：A-t1 (5.216%) > AnM-t1 (4.419%)，蒙脱石促进 HLA 和 FLA 的积累；180 d 后，HLA 为：A-t2 (14.19%) > AnM-t2 (2.539%)，FLA 为：A-t2 (8.485%) > AnM-t2 (6.765%)，HLA 的积累量减少，FLA 逐渐增加；随着培养时间增加至 360 d，HLA 为：A-t3 (21.38%) > AnM-t3 (4.002%)，FLA 为：A-t3 (5.216%) > AnM-t3 (4.419%)，蒙脱石进一步促进 HLA 的积累。HLM 在培养初期较容易被微生物分解利用，稳定性较低；随着培养时间的增加，A 类处理和 AnI 类处理的 HLu 的相对含碳量小幅度增加，逐渐变稳定；AnM 类处理的 HLu 则与之相反。

蒙脱石对白花苜蓿培养产物 PQ 值的影响如图 3 所示。在培养 0 d 时，A 类 PQ 值低于 AnM 类处理；90 d 后的 PQ 值为：A-t1 (80.83) > AnM-t1 (48.97)，添加蒙脱石使 PQ 值迅速增加；180 d 后，两类处理 PQ 值接近 (A-t2 49.81, AnM-t2 49.36)；360 d 后，A-t3 (62.84) > AnM-t3 (26.19)，蒙脱石再次使培养产物的腐殖化程度增加，与土壤的 PQ 值 (60.02) 十分接近。从 AnI 类和 A 类处理看，在

蒙脱石条件下，添加土壤浸提液对白花苜蓿碱提取组分的影响较小，360 d 后两类处理的 PQ 值均与土壤十分接近。

### 2.3 蒙脱石对白花苜蓿培养产物 HLA 元素组成的影响及 HLA 与土壤 HA 的接近程度

培养产物 HLA 的元素组成见表 2，各处理的培养产物 HLA 中 C、H 均小于培养物，N 和 O 大体均大于培养物，模拟腐殖化培养促进 N 和 O 元素的积累及 C 和 H 的消耗。三种不同处理随着培养时间的增加，H/C 值逐渐减少，O/C 则先增加后减少。通过对比 AnM 和 A 处理可知蒙脱石对白花苜蓿腐殖化进程的影响，培养 90 d 后，A 处理的 H/C 由 AnM 处理的 1.38 增加至 1.61；180 d 后，由 1.39 变为 1.53；360 d 后，由 1.36 变为 1.48。前期添加蒙脱石使 A 处理的 H/C 大幅度增加，HLA 的结构简单化，而随着培养的进行，H/C 的增加幅度逐渐减少，两者 HLA 的复杂化程度的差距缩小。对比 AnI 和 A 处理，培养 90 d 后，A 处理的 H/C 由 AnI 处理的 1.81 下降为 1.61；180 d 后，由 1.62 变为 1.53；360 d 后，两者差距减小 (AnI 1.50, A 1.48)。在蒙脱石条件下，前期添加土壤浸提液使 A 处理的 H/C 大幅度减小，



注：类腐殖质组分相对含量为某一时间段类腐殖质组分的含碳量与培养 0 d 时类腐殖质组分的比，即相对含量 =  $C_t/C_{t_0}$ 。Note: Relative content of humus-like components is the ratio of the carbon content of the humus-like component after a certain period of incubation to the initial value of the humus-like components (i.e., the relative content =  $C_t/C_{t_0}$ ).

图 2 蒙脱石添加对不同培养时间内类腐殖质组分相对含量的影响

Fig. 2 Effects of montmorillonite amendment on relative content of humus-like components relative to duration of incubation

表 1 蒙脱石添加对培养产物类腐殖质组分相对含量的影响

Table 1 Effects of montmorillonite amendment on relative content of humus-like components in incubation products

处理 Treatment	时间 Time/d	水溶性物质 WSS/%	类胡敏酸 HLA/%	类富里酸 FLA/%	类胡敏素 HLu/%
AnM-t0	0	12.90±0.79ab	10.85±0.42a	5.693±0.273a	70.55±0.79c
A-t0		13.22±0.76a	4.926±1.220b	4.649±1.254a	77.21±1.00b
AnI-t0		11.23±1.04b	4.772±0.255b	4.658±0.409a	79.34±0.60a
AnM-t1	90	28.03±1.18a	4.002±1.128c	4.419±2.065a	63.55±0.27ab
A-t1		14.43±1.91b	21.36±1.128a	5.216±1.896a	59.00±6.046c
AnI-t1		13.99±1.07b	14.35±2.98b	3.838±1.955a	67.83±0.37a
AnM-t2	180	15.50±1.03a	3.440±1.771b	3.489±1.588b	77.57±2.12a
A-t2		10.43±0.38b	11.24±4.07a	11.31±3.97a	67.03±0.41b
AnI-t2		8.120±0.898c	12.36±0.38a	15.71±2.60a	63.81±3.02b
AnM-t3	360	46.48±0.46a	2.539±1.664b	6.765±0.947a	44.22±1.34b
A-t3		7.581±0.666b	14.19±0.26a	8.485±1.918a	69.75±2.20a
AnI-t3		8.485±0.551b	14.00±0.65a	9.057±0.912a	68.46±0.33a

注：不同小写字母代表同一时间不同处理间类腐殖质组分差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: the annotations are the same with Figure 1. Different lower-case letters represent significant differences in humus-like components between treatments, the same in duration of incubation ( $P < 0.05$ ).



表 2 蒙脱石添加对培养产物 HLA 的元素组成的影响

Table 2 Effects of montmorillonite amendment on elemental composition of HLA in incubation products

处理 Treatment	时间 Time/d	C / (g·kg <sup>-1</sup> )	H / (g·kg <sup>-1</sup> )	N / (g·kg <sup>-1</sup> )	O / (g·kg <sup>-1</sup> )
HA-Soil	—	539.2±8.2	50.80±1.51	37.65±1.71	372.4±10.9
HA-AnM-t0		538.5±7.7b	75.18±1.05a	50.25±1.09b	337.7±4.7a
HA-A-t0	0	578.5±7.2a	75.08±0.93a	88.45±1.25a	258.0±8.1b
HA-AnI-t0		576.4±9.0a	75.17±0.79a	87.97±0.71a	260.5±10.1b
HA-AnM-t1		474.5±6.6a	54.55±1.56b	63.98±2.20a	407.0±7.7a
HA-A-t1	90	457.6±115.0a	60.64±11.14ab	75.39±26.28a	406.4±152.4a
HA-AnI-t1		458.5±7.8a	69.42±0.58a	56.16±13.76a	415.9±22.0a
HA-AnM-t2		462.7±10.9a	53.72±2.45a	62.08±0.77a	421.5±12.9a
HA-A-t2	180	427.5±7.6b	54.65±0.62a	78.91±1.72a	439.0±9.6a
HA-AnI-t2		431.0±7.2b	57.99±6.23a	99.03±54.37a	412.0±51.7a
HA-AnM-t3		522.8±39.5ab	59.26±1.70b	70.25±6.30b	347.7±47.2ab
HA-A-t3	360	538.0±12.27a	66.52±2.80a	92.06±5.85a	303.5±20.2b
HA-AnI-t3		470.1±33.5b	58.62±4.43b	82.22±7.92ab	389.1±45.7a

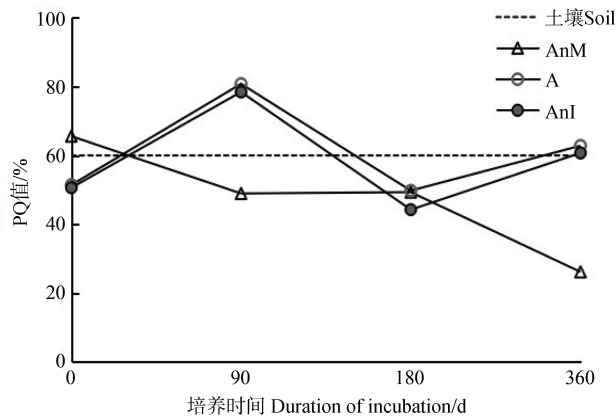


图 3 蒙脱石添加对白花苜蓿培养产物 PQ 值的影响  
Fig. 3 Effects of montmorillonite amendment on PQ of white alfalfa incubation products

促进 HLA 结构的复杂化；而随着培养的进行，两类处理的 HLA 的复杂程度基本接近。

由范卡图（图 4）可知，3 类处理最终均是向着接近土壤 HA 的 O/C 和 H/C 值的方向发展。360 d 后 HLA 与土壤 HA 的接近程度，AnM>A>AnI。未添加蒙脱石的 AnM 处理与土壤 HA 最接近，添加土

壤浸提液的 A 处理其次，添加蒙脱石使形成的 HLA 结构更加简单，与真正的 HA 仍存在较大的差异。

#### 2.4 蒙脱石对白花苜蓿培养产物 HLA 红外光谱的影响及 HLA 与土壤 HA 的接近程度

不同处理的白花苜蓿 HLA 与土壤 HA 的红外光谱主要吸收峰相对强度见表 3。各处理的 HLA 均显示 2 920 cm<sup>-1</sup> 处代表不对称脂族 C-H 伸缩振动的峰，2 850 cm<sup>-1</sup> 处代表 -CH<sub>2</sub>-对称脂族 C-H 伸缩振动的峰，1 640 cm<sup>-1</sup> 处代表芳香 C=C 伸缩振动的吸收峰；培养 360 d 后，各处理显示出了与土壤 HA 相同的 1 720 cm<sup>-1</sup> 的酮、醛、酸中的羧基 C=O 伸缩振动峰。用 2920/1640 比值代表材料脂肪族含量与芳香族含量的比值。

对比 HA-AnM 处理和 HA-A 处理的 2920/1640 比值：HA-A-t0 (0.237) > HA-AnM-t0 (0.186)，HA-A-t1 (0.184) > HA-AnM-t1 (0.145)，HA-A-t2 (0.143) > HA-AnM-t2 (0.138)，HA-A-t3 (0.136) > HA-AnM-t3 (0.132)，加入蒙脱石使生成的 HLA 脂肪族含量增加，结构简单化，随着培养时间的增加，两类处理 HLA 的芳构化程度差距缩小。

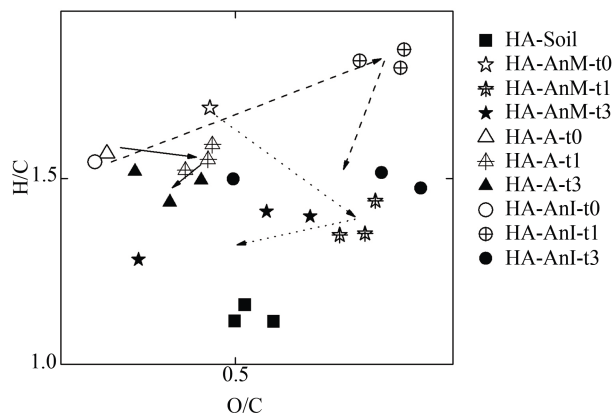


图4 白花苜蓿培养产物的HLA与土壤HA的范卡图  
Fig. 4 Van-Krevelen diagram of HLA of white alfalfa incubation products and soil HA

而对比 HA-AnI 处理和 HA-A 处理, HA-AnI-t0 (0.225) > HA-A-t0 (0.186), HA-AnI-t1 (0.243) > HA-A-t1 (0.184), HA-AnI-t2 (0.156) > HA-A-t2 (0.143), HA-AnI-t3 (0.142) > HA-A-t3 (0.136), HA-AnI-t1 的突然增加与矿质化有关, 添加土壤浸提液使蒙脱石处理有助于 HLA 的芳构化, 随着培养时间的进行, 两类处理芳构化程度的差距逐渐缩小。HLA 的红外光谱规律与元素组成规律

相对应。

### 3 讨论

#### 3.1 蒙脱石对培养产物 TOC 和类腐殖质组分的影响

蒙脱石处理和土壤浸提液处理加快了白花苜蓿 TOC 的分解。由于土壤浸提液中含有与土壤环境相似的微生物群体, 对有机质维持和周转的贡献显著<sup>[14]</sup>; 而蒙脱石不仅可通过影响微生物群落栖息微环境来影响微生物的代谢<sup>[15-17]</sup>, 同时蒙脱石还具有催化作用<sup>[18]</sup>, 因此两种处理共同促进了白花苜蓿 TOC 的分解。蒙脱石促进 TOC 的分解主要通过促进 WSS 减少来实现, 但同时促进了 HLA 和 FLA 的形成与转化。从腐殖质组成的稳定性来看, WSS 不稳定, 易分解<sup>[19]</sup>, 蒙脱石的催化作用使 WSS 迅速减少。而 PQ 值的变化主要与前期蒙脱石对 HLA 的吸附<sup>[20]</sup>、中期 HLA 的积累与后期 HLA 和 FLA 的相互转化有关, 添加蒙脱石使 PQ 值增加, 最终接近土壤 HA, 促进白花苜蓿的腐殖化进程。Loya 等<sup>[19]</sup>指出腐殖化使水溶性 (WS) 和酸溶性 (AS) 组分

表3 蒙脱石添加对培养产物 HLA 的 FTIR 光谱主要吸收峰相对强度的影响

Table 3 Effects of montmorillonite amendment on relative intensity of main absorption peaks in FTIR spectra of HLA in incubation products

处理 Treatment	时间 Time/d	相对强度 Relative intensity/%				比值 Ratio 2920/1640
		2 920 cm <sup>-1</sup>	2 850 cm <sup>-1</sup>	1 720 cm <sup>-1</sup>	1 640 cm <sup>-1</sup>	
HA-Soil	—	1.271±0.103	0.163±0.045	2.863±0.966	6.391±0.663	0.200±0.020
HA-AnM-t0	0	6.184±1.082b	0.984±0.118a	—	33.40±2.23a	0.186±0.038b
HA-A-t0	0	7.616±0.093a	1.036±0.035a	—	32.24±2.29a	0.237±0.020a
HA-AnI-t0	0	7.613±0.122a	1.087±0.023a	—	33.89±2.29a	0.225±0.003ab
HA-AnM-t1	90	4.391±0.229a	0.630±0.034a	—	30.38±1.83a	0.145±0.013c
HA-A-t1	90	4.250±2.110a	0.496±0.276a	—	22.91±11.23ab	0.184±0.006b
HA-AnI-t1	90	2.878±0.781a	1.246±0.688a	—	12.00±4.02b	0.243±0.010a
HA-AnM-t2	180	4.297±0.951a	0.752±0.364a	—	31.06±6.13a	0.138±0.015a
HA-A-t2	180	2.614±0.805a	0.395±0.132a	—	18.99±7.72a	0.143±0.021a
HA-AnI-t2	180	3.083±1.673a	0.771±0.741a	—	20.21±11.38a	0.156±0.011a
HA-AnM-t3	360	4.602±0.166a	0.658±0.072a	1.584±0.713a	34.79±0.49a	0.132±0.003a
HA-A-t3	360	4.296±0.469a	0.625±0.107ab	0.908±0.130a	31.61±1.67b	0.136±0.008a
HA-AnI-t3	360	3.663±0.201b	0.474±0.036b	0.815±0.196a	25.95±1.63c	0.142±0.014a

部分的  $^{14}\text{C}$  活性降低, 但酸不溶组分 (AIS) 中的  $^{14}\text{C}$  活性增加, 微生物代谢物和降解的化合物结合到 SOM 的顽固化合物中, 本实验结果进一步证实了 Loya 等的研究。

在白花苜蓿模拟培养腐殖化过程中, 蒙脱石加快 TOC 的分解, 促进 HLA 的积累, 结果与 Gleixner<sup>[21]</sup> 的研究一致。Gleixner 指出当大多数植物有机碳通过土壤微生物时, 除一部分用于细胞能量需求外, 其余部分用于生物量的积累, 微生物生物量主要由细胞碎片形成土壤有机质 (SOM)。本实验结果证实了前人的研究, 进一步指出蒙脱石促进 HLA 的生成和 FLA 与 HLA 的相互转化, 以及对 WSS、PQ 值的影响, 使对腐殖化进程的认识更具体化。

### 3.2 蒙脱石对培养产物 HLA 结构特征的影响

研究表明: 蒙脱石使 HLA 的芳构化程度降低, 结构趋于简单化。添加土壤浸提液使蒙脱石处理的 HLA 结构复杂化。培养中期 AnI 处理的 HLA 缩合度减少与未添加土壤浸提液前期腐殖化速度较慢有关, 培养仍处于矿质化阶段<sup>[22]</sup>, 白花苜蓿被微生物分解成简单的有机化合物, 使缩合度减少。一些学者认为黏土矿物可提高 HA 的芳香度, 使 HA 的结构更复杂。Duarte 等<sup>[10]</sup> 研究表明, 矿物表面对土壤 HA 分子中非晶形亚甲基结构数量的提升具有显著抑制作用, 即提高了 HA 的芳香度。Filip 等<sup>[9]</sup> 表明黏土矿物的催化作用主要通过间接影响酚类物质的形成而实现, 但所形成的 HS 结构未见差异。Fukuchi 等<sup>[23]</sup> 研究了邻苯二酚、甘氨酸与葡萄糖在天然沸石催化作用下的缩聚反应, 表明沸石有利于类 HA 中氮含量及分子量的提高, 对醌、酮等羰基碳含量亦有提升作用。

本实验的研究结果与前人不同, 在模拟培养腐殖化 360 d 内, 添加蒙脱石使 HLA 的结构简单化, 而添加土壤浸提液则可使蒙脱石处理的 HLA 的芳香度增加。因为在 HS 形成过程中, 生物大分子 (例如, 蛋白质、多糖和木质素) 最初分解为低分子量化合物 (例如, 氨基酸、糖和酚)。低分子量化合物随后通过缩聚反应进行重组, 形成 HS。木质素蛋白理论<sup>[24]</sup> 和美拉德反应<sup>[25]</sup> 已被提出作为低分子量化合物重组并最终形成 HS 的反应途径, 这种反应以亲核反应的形式进行。通常, 在酸性催化剂存在下, 亲核反应得到增强<sup>[26]</sup>。众所周知, 黏土矿物以固体

酸的形式广泛分布在土壤环境中, 所以蒙脱石可加速缩聚反应进行。然而蒙脱石的加入破坏了原本结构相对稳定的 HLA, 促进低分子量化合物 (如氨基酸, 糖和酚) 之间的缩聚反应, 在短时间的培养期内, 新缩聚形成的 HLA 的结构仍然较简单。而在蒙脱石条件下, 在同等破坏 HLA 结构的基础上加入土壤浸提液, 更加速了缩聚反应的进行, 所以添加土壤浸提液使蒙脱石处理的 HLA 结构更加复杂。但是随着培养时间的持续增加, 蒙脱石的加入是否会使 HLA 结构复杂化, 还需要进行进一步研究。

在白花苜蓿培养产物 HLA 与土壤 HA 对比的范卡图中, 3 类处理最终均是向着接近土壤 HA 的 O/C 和 H/C 值的方向发展, 未添加蒙脱石 (AnM) 的 HLA 与真正的 HA 最接近, 说明蒙脱石不能促进形成的 HLA 更接近土壤 HA。Ahn 等<sup>[27]</sup> 研究表明: 自然界中, 土壤矿物通过氧化偶联反应催化酚向腐殖物质聚合物转化, 采用三元体系法通过长绒毛栓菌所分泌的虫漆酶、水钠锰矿 ( $\delta\text{-MnO}_2$ ) 以及邻苯二酚之间的相互作用来模拟土壤过程, 表明酶-土壤矿物-有机质间的相互作用对腐殖质形成过程具有重要意义。本研究证实了蒙脱石的贡献, 可加快白花苜蓿的腐殖化进程, 但蒙脱石使生成的 HLA 更加年轻化, 与真正的 HA 仍存在较大的差异。

## 4 结 论

在模拟培养白花苜蓿腐殖化过程中, 蒙脱石促进 TOC 的分解和 HLA 的生成, 且使 HLA 的缩合度降低; 因此蒙脱石未能像文献报道的那样使 HLA 的芳构化程度增加, 结构复杂化, 相反却使其结构更加简单。而土壤浸提液添加, 则使蒙脱石处理在促进 HLA 积累的同时, 使 HLA 的缩合度增加, 结构更加复杂化。在白花苜蓿培养产物 HLA 与土壤 HA 的范卡图中, 3 类处理最终均是向着接近土壤 HA 的方向发展, 其中培养后未添加蒙脱石 (AnM) 处理中 HLA 与真正的 HA 最接近, 说明蒙脱石不能促进 HLA 更接近土壤 HA。综上, 在模拟培养白花苜蓿腐殖化过程中, 蒙脱石添加可加快白花苜蓿的腐殖化进程, 但却使形成的 HLA 结构更加简单化, 与真正的 HA 仍存在较大的差异。本研究结果探究了 30°C 培养条件下, 蒙脱石对白花苜蓿模拟培养腐殖



化的影响。今后还需要更多的研究来进一步理解黏土矿物对腐殖化过程的具体作用机制。

### 参考文献 (References)

- [ 1 ] Rodríguez F J, Schlenger P, García-Valverde M. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 476/477: 718—730.
- [ 2 ] Garcia C, Nannipieri P, Hernandez T. The future of soil carbon: Its conservation and formation[M]. London, United Kingdom: Academic Press, 2018. Garcia C, Nannipieri P, Hernandez T. The future of soil carbon//The Future of Soil Carbon. Amsterdam: Elsevier, 2018: 239—267.
- [ 3 ] Stewart C E. Evaluation of angiosperm and fern contributions to soil organic matter using two methods of pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Plant and Soil*, 2012, 351 ( 1/2 ): 31—46.
- [ 4 ] Ponge J F. Plant-soil feedbacks mediated by humus forms: A review[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57: 1048—1060.
- [ 5 ] Li Y. Microorganisms use organic materials such as sugars and cyanobacteria to participate in the formation of humus[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016. [李艳. 微生物利用糖类和蓝藻等有机物料参与形成腐殖质的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.]
- [ 6 ] Dou S, Li Y, Guan S, et al. The structural distinctiveness of humic substances and its formation mechanism in simulated incubation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 ( 4 ): 821—831. [窦森, 李艳, 关松, 等. 腐殖物质特异性及其产生机制[J]. *土壤学报*, 2016, 53 ( 4 ): 821—831.]
- [ 7 ] Kallenbach C M, Frey S D, Stuart Grandy A. Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13630. <https://doi.org/10.1038/ncomms13630>.
- [ 8 ] Birkel U, Gerold G, Niemeyer J. Abiotic reactions of organics on clay mineral surfaces[J]. *Developments in Soil Science*, 2002, 28: 437—447.
- [ 9 ] Filip Z, Haider K, Martin J P. Influence of clay minerals on growth and metabolic activity of *Epicoccum nigrum* and *Stachybotrys chartarum*[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1972, 4 ( 2 ): 135—145.
- [ 10 ] Duarte R M B O, Fernández-Getino A P, Duarte A C. Humic acids as proxies for assessing different Mediterranean forest soils signatures using solid-state CPMAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy[J]. *Chemosphere*, 2013, 91 ( 11 ): 1556—1565.
- [ 11 ] Dou S. Soil organic matter[M]. Beijing: Science Press, 2010. [窦森. 土壤有机质[M]. 北京: 科学出版社, 2010.]
- [ 12 ] Dong S S, Dou S, Shao M J, et al. Effect of corn stover deep incorporation with different years on composition of soil humus and structural characteristics of humic acid in black soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54 ( 1 ): 150—159. [董珊珊, 窦森, 邵满娇, 等. 秸秆深还不同年限对黑土腐殖质组成和胡敏酸结构特征的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54 ( 1 ): 150—159.]
- [ 13 ] Kuwatsuka S, Watanabe A, Itoh K, et al. Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1992, 38 ( 1 ): 23—30.
- [ 14 ] Malik A A, Roth V N, Hébert M, et al. Linking molecular size, composition and carbon turnover of extractable soil microbial compounds[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 100: 66—73.
- [ 15 ] Vogel C, Babin D, Pronk G J, et al. Establishment of macro-aggregates and organic matter turnover by microbial communities in long-term incubated artificial soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 79: 57—67.
- [ 16 ] Singh M, Sarkar B, Biswas B, et al. Relationship between soil clay mineralogy and carbon protection capacity as influenced by temperature and moisture[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 109: 95—106.
- [ 17 ] Babin D, Ding G C, Pronk G J, et al. Metal oxides, clay minerals and charcoal determine the composition of microbial communities in matured artificial soils and their response to phenanthrene[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 86 ( 1 ): 3—14.
- [ 18 ] Ertem G, Gan Z H. Role of preparation method on the extent of montmorillonite catalysis for oligomer formation[J]. *Applied Clay Science*, 2014, 101: 90—93.
- [ 19 ] Loya W M, Johnson L C, Nadelhoffer K J. Seasonal dynamics of leaf- and root-derived C in arctic tundra mesocosms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36 ( 4 ): 655—666.
- [ 20 ] Chen H F, Koopal L K, Xiong J, et al. Mechanisms of soil humic acid adsorption onto montmorillonite and kaolinite[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 504: 457—467.
- [ 21 ] Gleixner G. Soil organic matter dynamics: A biological perspective derived from the use of compound-specific isotopes studies[J]. *Ecological Research*, 2013, 28 ( 5 ): 683—695.
- [ 22 ] Kumar M, Kundu D K, Ghorai A K, et al. Carbon and nitrogen mineralization kinetics as influenced by diversified cropping systems and residue incorporation in Inceptisols of eastern Indo-Gangetic Plain[J]. *Soil and Tillage Research*, 2018, 178: 108—117.
- [ 23 ] Fukuchi S, Miura A, Okabe R, et al. Spectroscopic

- investigations of humic-like acids formed via polycondensation reactions between glycine, catechol and glucose in the presence of natural zeolites[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2010, 982 ( 1/2/3 ): 181—186.
- [ 24 ] Tan K H. Humic matter in soil and the environment: Principles and controversies[M]. Boca Raton, United States: CRC Press, 2014.
- [ 25 ] Haffenden L J W, Yaylayan V A. Mechanism of formation of redox-active hydroxylated benzenes and pyrazine in <sup>13</sup>C-labeled glycine/D-glucose model systems[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53 ( 25 ): 9742—9746.
- [ 26 ] Varma R S. Clay and clay-supported reagents in organic synthesis[J]. *Tetrahedron*, 2002, 58 ( 7 ): 1235—1255.
- [ 27 ] Ahn M Y, Martínez C E, Archibald D D, et al. Transformation of catechol in the presence of a laccase and birnessite[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38 ( 5 ): 1015—1020.

( 责任编辑: 卢 萍 )