

苏良湖, 王赛尔, 纪荣婷, 等. 基于 3DEEM-PARAFAC 的短期稻虾共作土壤 DOM 荧光光谱分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 639-650.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.03.012

基于 3DEEM-PARAFAC 的短期稻虾共作土壤 DOM 荧光光谱分析

苏良湖, 王赛尔, 纪荣婷, 刘臣炜, 陈梅, 张龙江

(生态环境部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

摘要: 稻虾共作模式已在中国长江中下游地区广泛应用。为研究短期稻虾共作对土壤溶解性有机物(DOM)组成和腐殖化的影响,采用三维荧光光谱耦合平行因子法(3DEEM-PARAFAC)分析土壤 DOM 荧光组分和各组分变化规律,利用腐殖化指数(HIX)、腐殖酸与色氨酸荧光比值(A:T)、新鲜指数($\beta:\alpha$)、McKnight 荧光指数(MFI)、Y 型荧光指数(YFI)等多种荧光光谱指数表征 DOM 腐殖化程度,并通过皮尔逊相关系数进行相关性分析。研究发现,土壤 DOM 包括 3 个荧光组分,C1 为较低相对分子质量的腐殖质类物质,C2 为较高芳香度的 UVC 类腐殖质,C3 为酪氨酸类物质,未发现高相对分子质量腐殖质类物质。在 0~20.0 cm 表层土壤中,C1、C2 组分荧光强度随采样时间的推迟呈先上升后下降趋势,峰值出现在水稻分蘖期或抽穗期,而 C3 组分荧光强度无明显变化规律。皮尔逊相关系数分析结果显示,腐殖质类物质 C1 荧光强度与 C2 荧光强度呈显著正相关性($r=0.99, P<0.001$),蛋白质类物质 C3 荧光强度与其他荧光指数(强度)相关性均较弱($r<0.40$)。HIX 与 C1 荧光强度、A:T 呈显著正相关,均可被线性函数拟合。相较于 MFI, YFI 更能反映土壤中 DOM 的腐殖化变化特性, YFI 与 HIX 可被指数函数较好拟合。研究认为,短期稻虾共作土壤的腐殖化特征主要受内源有机质降解影响,而受外源蛋白质类物质输入的影响较小,且难以通过分析溶解性有机碳含量来监测土壤有机质腐殖化程度。

关键词: 稻虾共作; 土壤溶解性有机物(DOM); 三维荧光光谱(3DEEM); 平行因子(PARAFAC)分析

中图分类号: S153.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2021)03-0639-12

Fluorescence spectrometric analysis of dissolved organic matter(DOM) in soil from a short-term integrated rice-crayfish system based on 3DEEM-PARAFAC

SU Liang-hu, WANG Sai-er, JI Rong-ting, LIU Chen-wei, CHEN Mei, ZHANG Long-jiang

(Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China)

Abstract: Integrated rice-crayfish system has been widely used in the middle and lower reaches of Yangtze River in China. To study the effects of short-term integrated rice-crayfish system on composition and humification of dissolved organic matter (DOM) from the soil, three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectroscopy coupled parallel factor method (3DEEM-PARAFAC) was used to analyze the fluorescence components and the changes of each component of soil DOM. Different

收稿日期: 2020-11-18

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(GYZX190203);
国家重点研发计划项目(2016YFD0800601)

作者简介: 苏良湖(1986-), 男, 福建泉州人, 博士, 副研究员, 主要研究方向为绿色发展技术与模式。(E-mail) sulianghu@nies.org

通讯作者: 陈梅, (E-mail) chenmei@nies.org; 张龙江, (E-mail) zlj@nies.org

fluorescence spectrum indexes including humification index (HIX), ratio of humic acid fluorescence intensity to tryptophan fluorescence intensity (A:T), freshness index ($\beta:\alpha$), McKnight fluorescence index (MFI), Y-type fluorescence index (YFI) were used to characterize the degree of DOM humification. Pearson correlation coefficient was used to analyze the correlation. The results showed that three fluorescence components were identified from soil DOM, containing

humic substances with low relative molecular weight (C1), UVC humic substances with high aromatic degree (C2) and tyrosine-like substances (C3), no humic substance with relative high molecular weight was found. In the surface soil of 0–20.0 cm depth, the fluorescence intensity of C1 and C2 components increased firstly and then decreased as the sampling time postponed, the highest value appeared at the tillering or heading stage of rice, while no definite trend was found for the C3 component. Pearson correlation coefficient analysis demonstrated that the fluorescence intensity of humic substances C1 and C2 showed significant positive correlation ($r=0.99$, $P<0.001$); the fluorescence intensity of protein substance C3 had weak relationship with other fluorescence indices (intensities) ($r<0.40$). *HIX* showed significant positive correlation with the fluorescence intensity of C1 and $A:T$, which could be fitted by a linear function. Compared with *MFI*, *YFI* had sufficient distinguishing capacity to characterize the humification process of DOM in the soil; *YFI* and *HIX* could be fitted well by an exponential function. It can be concluded from the study that the humification characteristics of the soil in the short-term integrated rice-crayfish system are mainly affected by the degradation of endogenous organic matter, but are less affected by the input of exogenous protein substances. It is hard to monitor the humification degree of soil organic matter by analyzing dissolved organic carbon content of the soil.

Key words: integrated rice-crayfish system; soil dissolved organic matter (DOM); three-dimensional excitation emission matrix fluorescence spectrum (3DEEM); parallel factor (PARAFAC) analysis

稻鱼综合种养是绿色生态的农渔发展模式,是渔业产业扶贫和助力乡村振兴的重要抓手,对促进稳粮增收和水产品稳产保供具有重要作用^[1]。其中,稻虾共作模式在中国发展迅速,在长江中下游地区被广泛应用。据统计,近十年来中国克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)产量快速增长,从2006年的 1.31×10^5 t大幅跃升至2016年的 8.52×10^5 t,占全球比例达83.6%~92.7%。2016年全国稻虾共作面积约 4.2×10^5 hm²^[2],主要分布在湖北、安徽、江苏、江西、湖南等省。全国适宜稻虾共作的面积高达 4.5×10^6 hm²,占现有稻田总面积的15%,稻虾共作的发展潜力巨大^[2]。

稻虾共作生态系统是一个以水稻为主体,以克氏原螯虾为绝对优势种群,以土壤为基础,并结合水体养殖的生态系统,包括生物圈、土壤圈、水圈在内的生物与环境系统^[3]。稻田生态系统中引入克氏原螯虾,构成了比常规稻作生态系统更为复杂的食物链网络结构^[3],克氏原螯虾的饲料、粪便排放及活动改变了稻田生态环境,使得稻田生态系统结构与功能更复杂,提高了能量、水、肥等的利用率,增强了稻田生态系统的稳定性及抗外界冲击的能力^[4-5]。有研究结果显示,在水稻稳产增产的前提下,稻虾共作1 hm²化肥使用量减少48.46%,费用减少38.9%。1 hm²农药使用量减少1.07 kg,且无需使用除草剂^[6]。而且,稻虾共作模式促进了系统中物质的循环,阻止了稻田物质流的外溢,使稻田生态系统从结构与功能上得到改善和提升^[7]。

溶解性有机物(Dissolved organic matter, DOM)具有比固相有机质更多的活性点位,是土壤有机质

中最活跃、最重要的组分^[8]。DOM对土壤营养物质的活化、重金属和有机污染物的迁移转化等具有极其重要的作用^[9],并在微生物生长代谢、土壤有机质分解转化等过程中发挥重要作用^[10]。因此,解析稻虾系统土壤DOM的变化规律具有重要意义。目前关于稻虾共作的研究,主要聚焦在稻田土壤微生物群落结构^[11-12]、线虫^[13]、土壤理化性质^[5]、养分循环^[14-15]、温室气体排放^[16]等方面,对稻田土壤DOM影响的研究还较少,尤其是DOM荧光光谱特征的变化规律鲜有报道。与其他分析技术相比,三维荧光分析具有灵敏度高、选择性强、信息量大等特点,可定性区分和定量测定DOM含量和组成特征。

为此,本研究采用三维荧光光谱耦合平行因子法(3DEEM-PARAFAC)分析土壤DOM荧光组分和各组分变化规律,利用多种荧光光谱指数表征DOM腐殖化程度,并通过皮尔逊相关系数分析各荧光指数(强度)的相关性,旨在揭示短期稻虾共作模式下稻田土壤DOM组分、来源及其DOM动态变化过程,为稻虾共作模式下土壤生态系统的健康发展及肥力培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验区位于生态环境部南京环境科学研究所黄山野外科研基地(安徽省黄山区三口镇,30.24°N,118.39°E),属亚热带季风性湿润气候,年均气温15.5℃,无霜期约220 d,年均降水量1556 mm。2019年3月,参考湖南省地方标准《稻虾生态种养技术规程

(DB43/T 1381-2017)》,建设了 1.36 hm² 的稻虾共作标准试验田(160 m×85 m),主要建设内容包括土地平整、开挖“回”形沟、建设进排水设施、安装防逃网和隔离网等。2019 年 6 月底,移栽稻秧,按 150 kg/hm² 投放克氏原螯虾幼苗。稻虾共作系统中,不定期投放黄粉虫及虫粪分别作为克氏原螯虾饲料和水稻肥料,不施加化肥或农药(本研究称为“有机稻虾共作系统”)。以水稻生育期确定采样时间,分别于移栽前(3月24日,T1)、水稻分蘖期(6月28日,T2)、水稻抽穗期(9月12日,T3)、水稻收获期(11月19日,T4),在稻虾共作试验田取 10 个采样点(沿水稻田长边一侧均匀分布取样,S1~S10),同时在田块附近常规水稻田选取 2 个采样点(CK1、CK2),作为对照。分别采集各时期稻田 0~40.0 cm 土壤样品,并按深度分为 0~10.0 cm、10.1~20.0 cm、20.1~30.0 cm 和 30.1~40.0 cm,剔除可见的动植物残体和石块等杂质,放置于通风阴凉处风干。

1.2 分析方法

1.2.1 DOM 提取和溶解性有机碳(DOC)测定 将所有土壤样品风干并过 40 目筛,将 5 g 土壤样品称质量放入 100 ml 锥形瓶中,添加 30 ml 去离子水,土壤与水的质量比为 1:6^[17]。将锥形瓶室温下在摇床 160 r/min 振荡 3 h,静置后将样品通过 0.45 μm 微孔滤膜,即得到提取的 DOM 溶液。土壤的 DOC 含量利用湿式氧化法总有机碳分析仪(Aurora 1030C,美国 OI 分析仪器公司产品)测定。该分析仪由进样针模块、红外 CO₂ 分析仪等组成。用 0.2 ml 的 2 mol/L HCl 酸化样品(每次进样 1.0 ml),将酸添加步骤中释放的 CO₂ 注入 CO₂ 分析仪。随后燃烧样品中任何残留的碳,并通过差值获得 DOC 含量。

1.2.2 三维荧光光谱分析 三维荧光光谱(Three-dimensional excitation emission matrix, 3DEEM)采用吸收和三维荧光扫描光谱仪(Aqualog,美国 HORIBA Jobin Yvon 公司产品)分析,配以 1 cm×1 cm 石英荧光样品池。Aqualog 荧光光谱仪包含 1 个像差校正的双光栅激发单色仪和 1 个发射检测器。荧光扫描光谱仪以氙气灯为激发光源,信噪比>20 000:1。激发波长(*Ex*)范围为 211~618 nm,扫描间隔为 3 nm。发射波长(*Em*)范围为 240~600 nm,采用电制冷 CCD 检测器,扫描间隔为 3.54 nm。对于荧光光谱测试,DOM 提取液与超纯水按照 1:4(体积比)稀释。对测得的三维荧光光谱,采用 Aqualog V3.6 软件处理数据,包

括去除拉曼散射、消除一级二级瑞丽散射、内滤效应校正。内滤效应的校正公式如公式 1 所示:

$$F_{\text{ideal}} = F_{\text{obs}} \times 10^{(Abs_{Ex} + Abs_{Em})/2} \quad (1)$$

其中, F_{obs} 和 F_{ideal} 分别为测量和校正后的荧光强度; Abs_{Ex} 和 Abs_{Em} 分别为激发波长和发射波长的吸光度。对处理后的三维荧光光谱,采用 SOLO+MIA 8.6.1 软件(美国 Eigenvector Research 公司产品)进行平行因子分析,并通过核一致性诊断和半劈裂分析(Split-half analysis)验证模型。由于荧光强度为负值在化学上是不可能的,因此将非负约束应用于模型参数^[18]。通过 OpenFluor 在线数据库(<https://openfluor.lablicate.com/>)^[19] 设定 Tucker's 一致性系数为 0.95,与相关研究结果比对,确定 DOM 的荧光组分。

1.2.3 荧光光谱指数 以校正后的荧光光谱计算不同荧光光谱指数(腐殖化指数、*A:T*、新鲜指数、McKnight 荧光指数、*Y* 型荧光指数)。其中,腐殖化指数(*HIX*)指激发波长为 254 nm 时,发射波长在 435~480 nm 和 300~345 nm 处积分值(或平均值)的比值^[20]。*A:T* 是腐殖酸与色氨酸荧光比值,由峰 *A* [*Ex*(激发波长)=260 nm, *Em*(发射波长)=450 nm] 与峰 *T* (*Ex*=275 nm, *Em*=304 nm) 强度之比计算^[21]。新鲜指数($\beta:\alpha$)是指 *Ex*=310 nm 时, *Em* 在 380 nm 与 420~435 nm 内最大发射强度之比^[21]。McKnight 荧光指数(*MFI*)是 *Ex*=370 nm 处激发时, *Em* 在 450 nm 与 500 nm 的荧光强度比值^[22]。*Y* 荧光指数(*YFI*)是 *Ex*=280 nm 处激发时, *Em* 在 350~400 nm 与 400~450 nm 内平均荧光强度的比值^[23]。

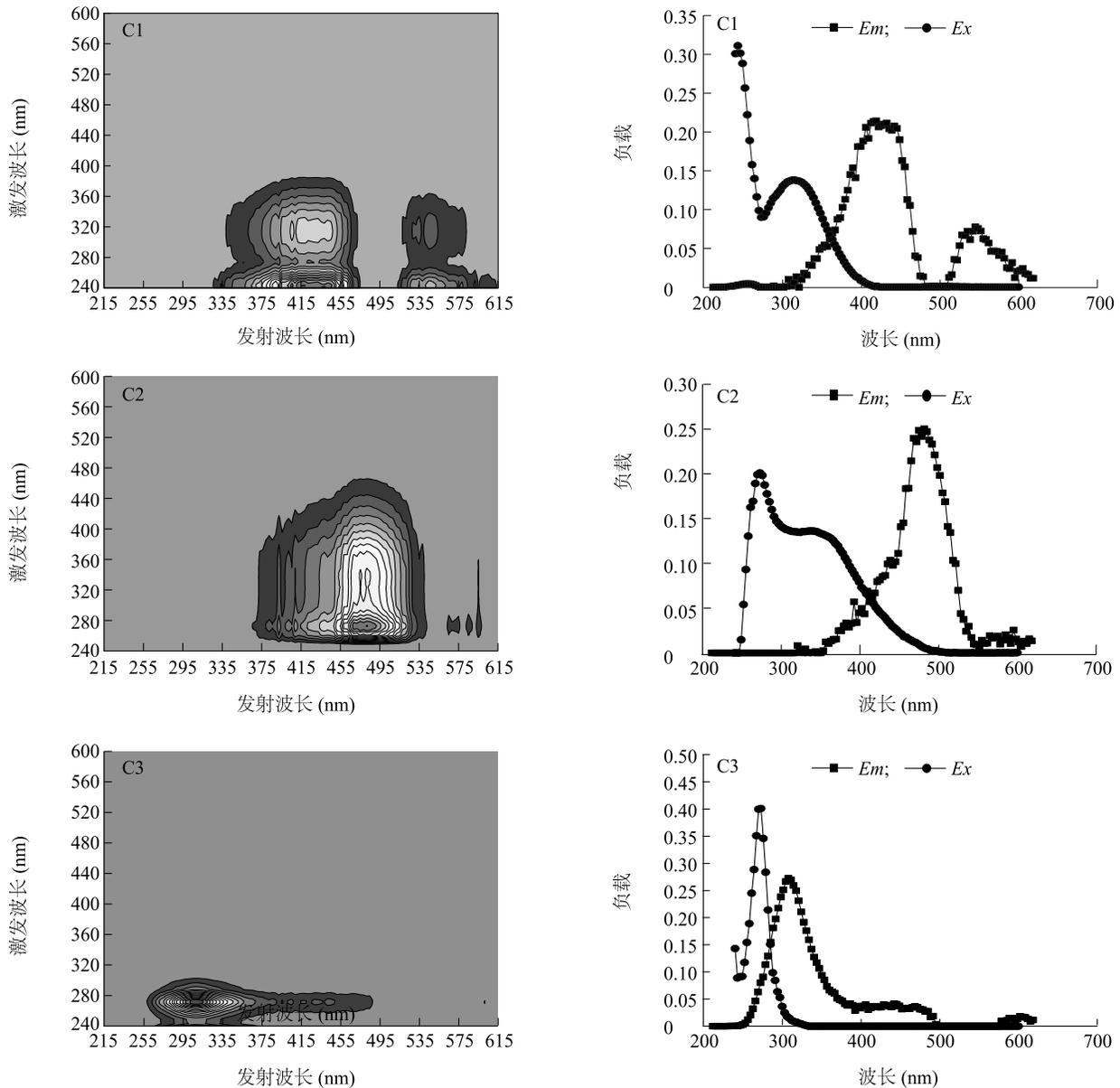
2 结果与分析

2.1 土壤 DOM 平行因子分析

对稻虾共作田样品(160 个)和常规水稻田样品(32 个)的土壤 DOM 分别进行平行因子(PARAFAC)分析,建立组分数量为 3~10 个的 PARAFAC 模型。研究发现,稻虾共作田和常规水稻田土壤的 DOM 荧光组分特性无明显差异,均包括 3 个有效荧光光谱组分。为比较常规水稻田和稻虾共作田 DOM 各组分荧光强度的变化趋势,对采集的所有土壤样品(共计 192 个)统一进行 PARAFAC 分析,并使用核一致性诊断和半劈裂分析验证组分数量的正确性。模型分析结果显示,构建的 PARAFAC 模型稳健;半劈裂分析结果显示,与总体模型相似度达 96.9%。3 种荧光组分(标记为 C1, C2 和 C3)的代表性荧光光谱和荧光光谱负载如图 1 所

示。这些成分属于腐殖质类(C1、C2)和酪氨酸类(C3)化合物,通常存在于土壤、水中。其中,C2的激发和发

射负载中具有较大的重叠光谱(>120 nm),这表明C2具有更为复杂的DOM组成^[24]。



C1、C2:腐殖质类荧光组分;C3:酪氨酸类荧光组分;Em:发射波长;Ex:激发波长。

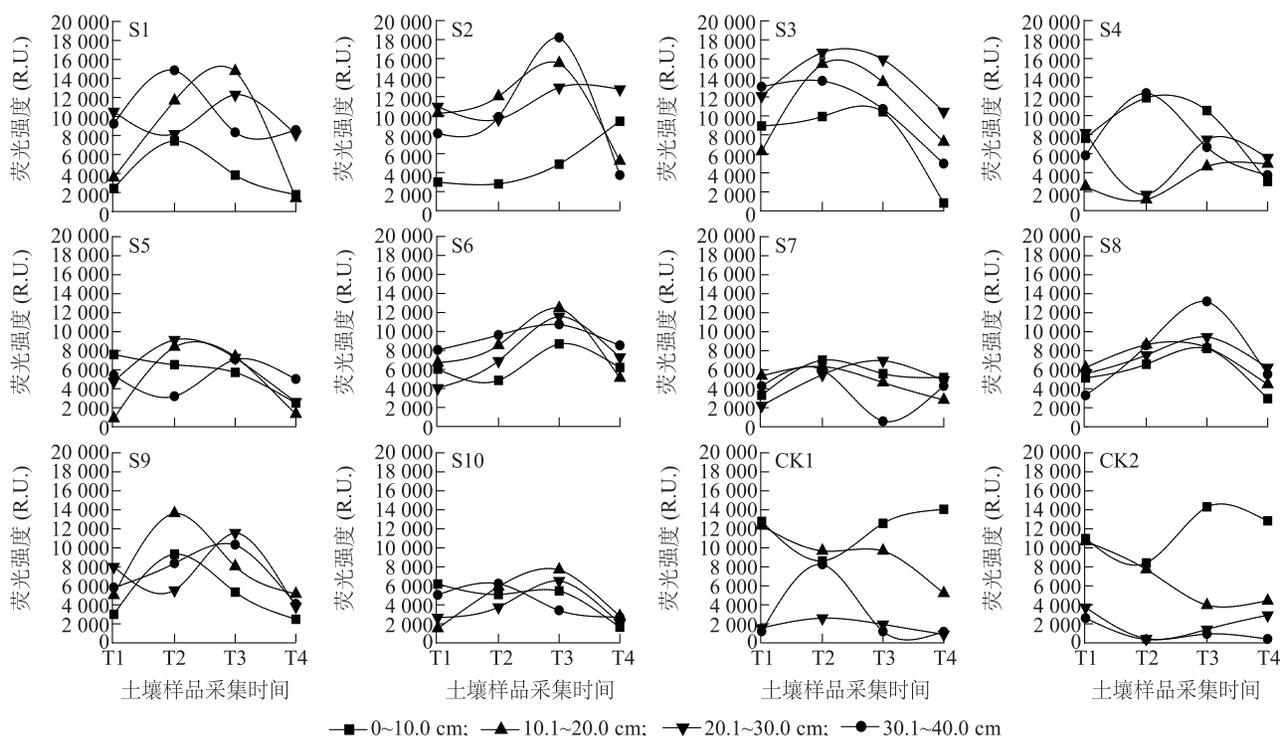
图1 PARAFAC分析鉴定的3个组分的代表性荧光光谱和荧光光谱负载

Fig.1 Representative excitation emission matrix fluorescence spectroscopy (EEMs) and fluorescence spectral loading of three components identified by PARAFAC analysis

2.2 EEM-PARAFAC 组分荧光强度变化规律

EEM-PARAFAC 各荧光组分的表征,对了解稻虾共作系统土壤 DOM 的演变特征具有重要意义。不同深度土壤(0~40.0 cm) DOM 荧光成分的最大荧光强度(F_{max})的变化规律如图2、图3、图4所示。由图2、图3、图4可以看出,在4次采集的土壤样品中,不同深度土壤的腐殖质类和蛋白质类物质的分布均没有

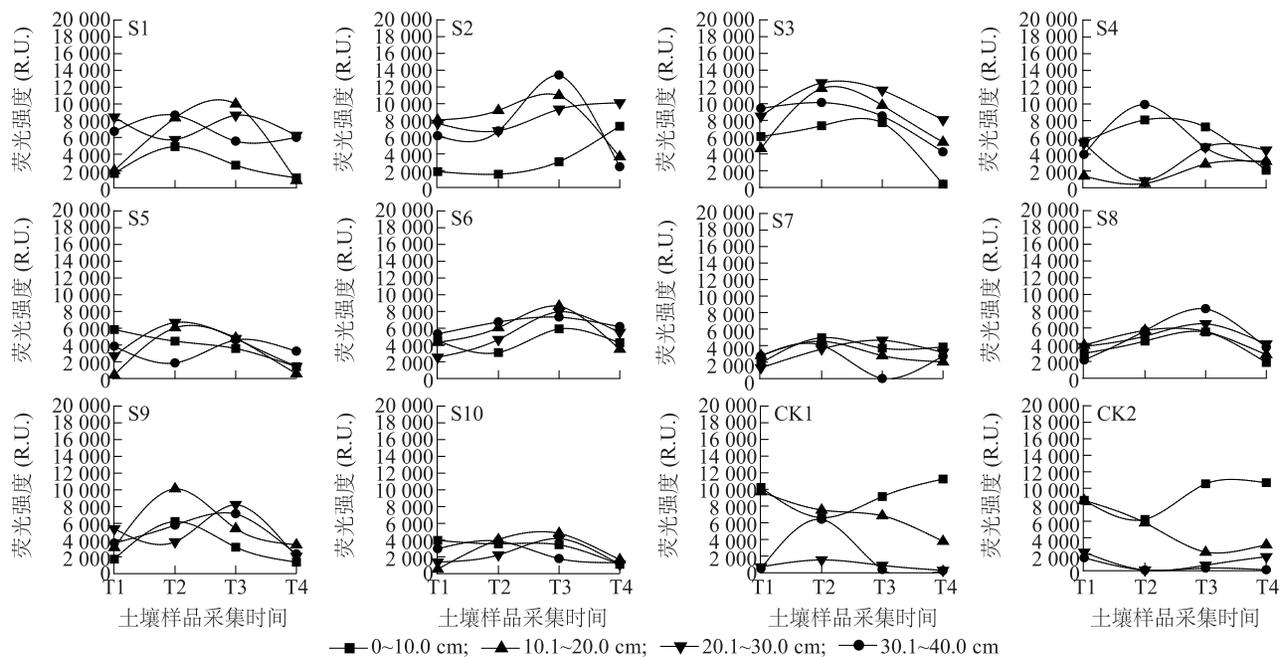
明显规律。这显然与本研究中地块被激烈扰动密切相关。在稻虾共作系统建立过程中,需对面积不等的小田块进行开挖、平整等作业。在此过程中,由于土壤被激烈扰动,不同深度土壤的 DOM 规律性较差。而且,由于扰动过程中,原农田的纤维素类物质(杂草等)可能被翻抛到土壤底层,进而被缓慢腐殖化,这也将影响土壤 DOM 随深度的变化规律。



T1:3月24日;T2:6月28日;T3:9月12日;T4:11月19日;S1~S10表示稻虾共作试验田的10个采样点,CK1、CK2为常规水稻田(对照)2个采样点。

图2 不同深度(0~40.0 cm)土壤 DOM 的 PARAFAC 荧光组分 C1 荧光强度变化规律

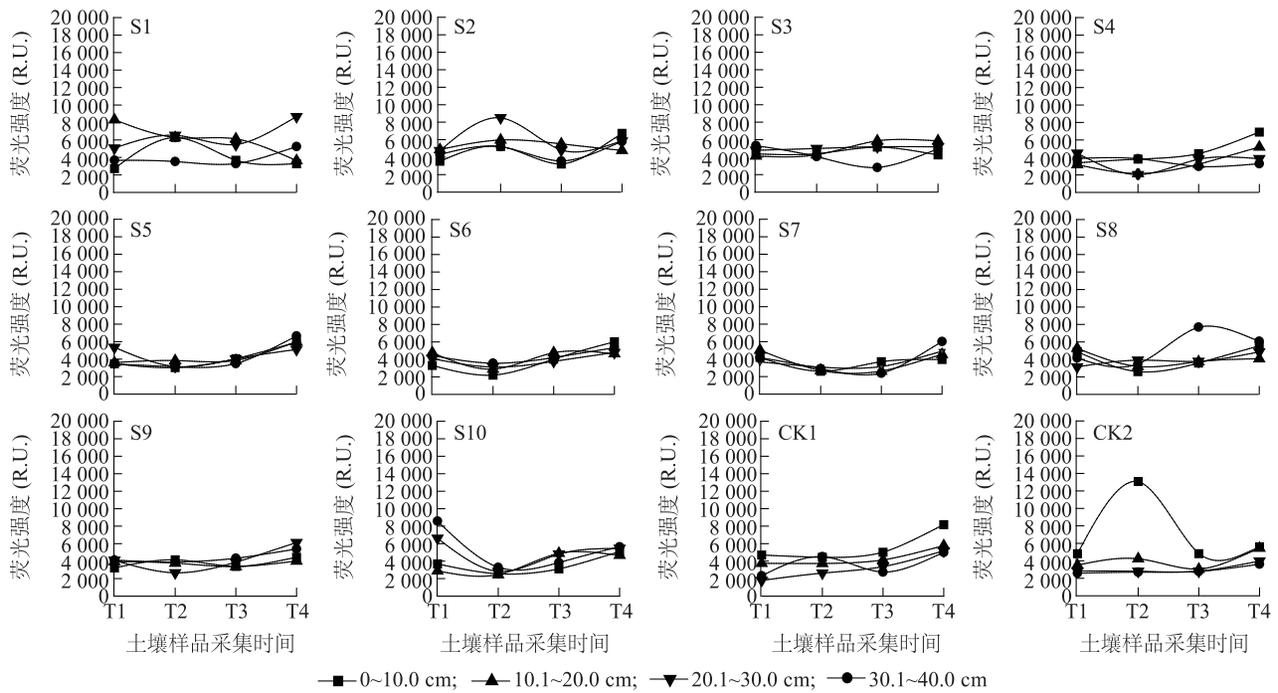
Fig.2 Changes of fluorescence intensity of PARAFAC fluorescence component C1 of dissolved organic matter (DOM) from soil with different depths (0~40.0 cm)



T1:3月24日;T2:6月28日;T3:9月12日;T4:11月19日;S1~S10表示稻虾共作试验田的10个采样点,CK1、CK2为常规水稻田(对照)2个采样点。

图3 不同深度(0~40.0 cm)土壤 DOM 的 PARAFAC 荧光组分 C2 荧光强度变化规律

Fig.3 Changes of fluorescence intensity of PARAFAC fluorescence component C2 of dissolved organic matter (DOM) from soil with different depths (0~40.0 cm)



T1:3月24日;T2:6月28日;T3:9月12日;T4:11月19日;S1~S10表示稻虾共作试验田的10个采样点,CK1、CK2为常规水稻田(对照)2个采样点。

图4 不同深度(0~40.0 cm)土壤DOM的PARAFAC荧光组分C3荧光强度变化规律

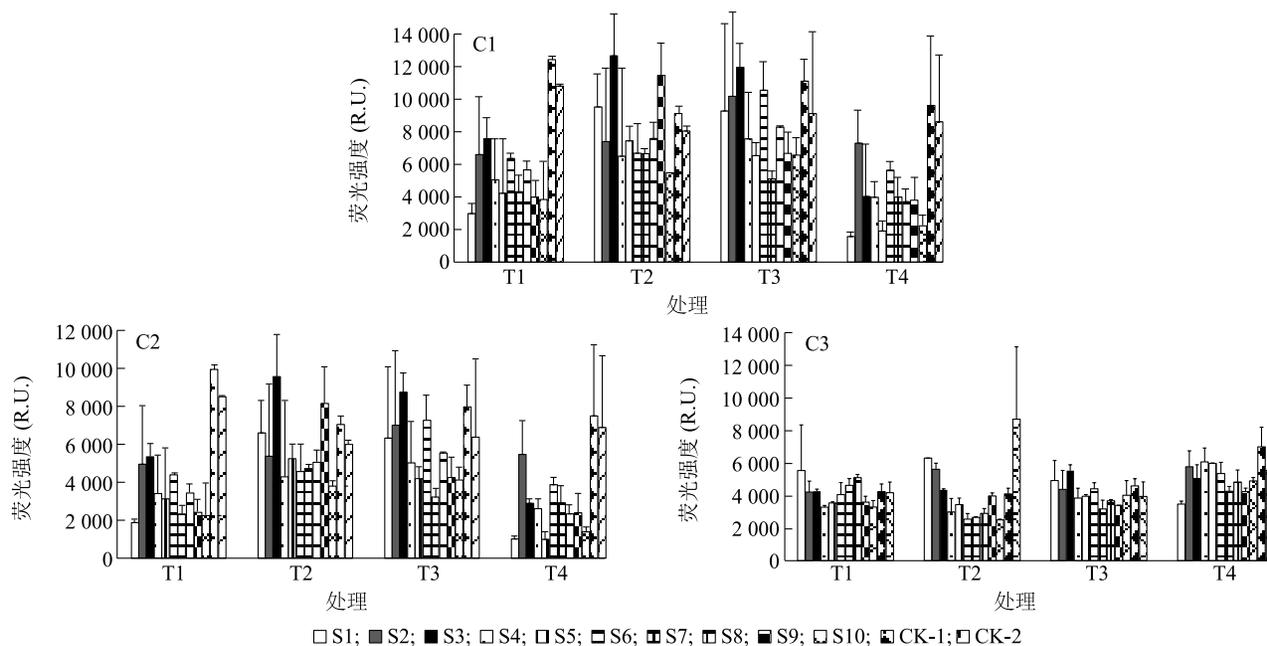
Fig.4 Changes of fluorescence intensity of PARAFAC fluorescence component C3 of dissolved organic matter (DOM) from soil with different depths (0~40.0 cm)

在有机稻虾共作系统中,所有样品不同深度的土壤DOM的C1组分和C2组分变化规律均一致,这表明该区域土壤DOM的2种腐殖酸类物质C1和C2具有类似来源及发生类似生化反应。在有机稻虾共作系统10.1~20.0 cm的土壤样品层,腐殖酸类物质荧光强度随采样时间的推迟呈现先上升后逐渐下降的趋势(除S4样品),表层土壤(0~10.0 cm)腐殖酸类物质荧光强度也主要呈现类似规律。这表明,插秧前土壤中含有的有机质物质进一步腐殖化,以及在水稻分蘖期或水稻抽穗期引入的外源有机类物质,使得土壤中腐殖质类物质的荧光强度显著上升。而后,0~20.0 cm土层土壤DOM腐殖酸类物质含量的降低,可能是部分源于腐殖酸的进一步矿化和土壤固相腐殖质类物质向水体中转移等原因。

此外,相对于10.1~20.0 cm土层,0~10.0 cm土层土壤腐殖质类物质的变化趋势更容易受到外源有机物、土壤有机物固-液相迁移等的影响,而使得其变化趋势不完全一致。如S2在0~10.0 cm土层中,其腐殖质类物质的含量随采样时间推迟呈现逐步上升的趋势,而S5则呈现逐步下降的趋势。不同深度土层的土壤蛋白质类物质C3,其荧光强度变化无明显

规律。在常规水稻田(CK1和CK2样品),其10.1~20.0 cm土层土壤腐殖质类物质的荧光强度在采样期内随采样时间的推迟呈现显著下降的趋势,这与稻虾共作系统的土壤变化不同。这种差异性可能源于农田中土壤有机物固-液相迁移,而无外源有机质加入等因素导致的。

如前所述,有机稻虾共作系统对土壤的影响主要集中于表层(如0~20.0 cm),本研究进一步分析表层土壤PARAFAC 3种组分的平均荧光强度变化趋势,结果如图5所示。总体上,C1、C2组分的荧光强度随采样时间的推迟呈先上升后下降的趋势,峰值出现在水稻分蘖期(T2)或抽穗期(T3)。t检验结果显示,相较于T1,T2和T3的土壤DOM腐殖酸类荧光强度极显著增加($P < 0.01$),T4的腐殖酸类物质的荧光强度与T1差异不显著($P = 0.067$)。0~20.0 cm土层中,C3组分的荧光强度无明显变化趋势,这显示外源有机类物质(主要是黄粉虫粪)并不能提升土壤表层的蛋白质含量,可能原因在于:(1)黄粉虫粪颗粒较小,其DOM组分更容易迁移到水环境中;(2)黄粉虫粪含有的蛋白质类物质容易被农田系统中的微生物快速分解矿化。



T1~T4, S1~S10, CK1, CK2 见图 2 注。

图 5 0~20.0 cm 表层土壤 DOM 的 PARAFAC 3 种组分平均荧光强度的变化规律

Fig.5 Changes of average fluorescence intensity of three PARAFAC components of dissolved organic matter (DOM) from the soil with the depths of 0~20.0 cm

2.3 土壤 DOC 质量浓度变化规律

由于受土方作业扰动影响,不同深度(0~10.0 cm、10.1~20.0 cm、20.1~30.0 cm 和30.1~40.0 cm)土壤的 DOC 质量浓度并无明显的变化规律。本研究进一步分析表层0~20.0 cm 土壤 DOC 质量浓度的变化趋势,如表 1 所示。T1 不同土壤样品的 DOC 质量浓度差别较大(3.76~28.57 mg/L),这是由于研究区域内土壤性质差异引起的。Gao 等^[17]报道中国亚热带季风气候区农田土壤 DOC 质量浓度为 24.00~86.00 mg/L,本研究地块 DOC 质量浓度显著低于该值,这与各地温度、降水和太阳辐射密切相关,也与当地耕作方式关系密切,因为这些因素可能会影响土壤 DOM 的含量、组成和结构^[25]。0~20.0 cm 取样深度不同取样点的土壤 DOC 质量浓度变化规律也不一致,如取样点 S1、S2、S3、S5 等随采样时间的推迟呈现先上升后下降的趋势,而取样点 S10 则呈现波动状态。在有机稻虾共作系统中,S1~S10 样品在 T1、T2、T3、T4 的平均 DOC 质量浓度分别为(12.87±8.33) mg/L、(11.43±10.21) mg/L、(14.54±6.08) mg/L、(7.84±3.65) mg/L。*t* 检验结果显示,T1、T2 和 T3 之间的土壤 DOC 质量浓度无明显差异,T4 的土壤 DOC 质量浓度显著低于 T1 ($P<0.01$)。这

说明,水稻收获期排水是导致有机稻虾共作系统土壤 DOC 流失的重要原因。这与佘国涵等的研究结果不一致^[5]。佘国涵等^[5]发现稻虾共作模式显著提高了0~40.0 cm 土层有机碳的含量,这种差异的原因可能是运行时间(长期,>10 年)和田间管理方式等不同。

表 1 表层(0~20.0 cm)土壤 DOC 质量浓度 (mg/L)

Table 1 Mass concentrations of dissolved organic matter (DOM) in soil at 0~20.0 cm (mg/L)

编号	T1	T2	T3	T4
S1	4.37±1.07	24.00±12.63	7.55±0.02	3.41±0.29
S2	10.57±4.39	34.57±4.73	21.12±12.21	14.94±10.74
S3	12.07±2.05	14.95±2.38	28.26±3.27	11.84±8.63
S4	28.57±20.41	4.53±1.28	13.93±4.78	10.10±3.27
S5	3.76±1.19	6.42±0.73	12.07±0.72	4.03±1.15
S6	7.39±2.40	5.19±0.93	14.29±1.76	8.78±1.25
S7	8.83±1.36	4.59±0.18	9.80±1.21	5.52±0.27
S8	12.54±1.65	5.39±0.09	11.70±1.06	6.59±0.66
S9	25.74±3.61	8.76±1.51	10.89±0.14	7.98±1.72
S10	14.90±1.49	5.88±1.15	15.80±1.96	5.25±0.90
CK1	28.40±10.21	13.74±1.42	10.60±1.55	21.53±7.41
CK2	15.96±0.05	12.92±1.92	21.02±10.05	14.49±7.20

T1~T4, S1~S10, CK1, CK2 见图 2 注。

2.4 PARAFAC 荧光组分鉴别

进一步将 PARAFAC 解析的荧光组分与 OpenFluor 数据库^[19]、Coble^[26] 的前期研究结果进行对比,结果如表 2 所示。利用 OpenFluor 数据库识别的荧光组分与 Coble 的峰值法的报道非常接近。C1 在 420 nm 处显示最大发射峰,分别在 <250 nm 和 320 nm 具有激发峰。C1 是具有较低相对分子质量的腐殖类物质,经常出现在海洋、废水、湿地和农田等环境中,Coble^[26] 研究认为 C1 是陆地源腐殖质类峰 A 和峰 C 的混合物。C2 在 475 nm 处显示最大发射峰,在 270 nm 处显示最大激发峰,在 340 nm 处显

示较宽的次级激发峰。C2 被认为是 UVC 类腐殖物质^[26],考虑到它们特别长的发射波长,该组分具有较高的芳香度^[27]。位于 $Ex=270\text{ nm}$ 、 $Em=305\text{ nm}$ 的 C3 是酪氨酸类物质,代表氨基酸或结合蛋白^[28],该化合物可表示氨基酸的多样性和蛋白质的丰度^[17]。Gao 等^[17] 研究了中国各地农业土壤中溶解性有机物的光谱特征,除了本研究发现的 C1 和 C2 腐殖质类组分,还观察到高相对分子质量的腐殖质类物质 ($Ex=400\text{ nm}$ 、 $Em=525\text{ nm}$)。这与本研究结果不同,这种差异性可能是由研究区域的土壤类型、土壤耕作方式等多因素引起的^[17]。

表 2 荧光 PARAFAC 模型解析的 3 个组分特征以及同已鉴别组分的比较

Table 2 Characteristics of three components identified with fluorescence PARAFAC modelling and comparison with previously identified components

组分	Ex_{\max} (nm)	Em_{\max} (nm)	基于 OpenFluor 数据库的源解析 ^[19]	相关文献报道的荧光峰 (Ex_{\max}/Em_{\max} , nm)	
				Coble ^[26]	OpenFluor 数据库 ^d
C1	<250(320)	420	陆地源腐殖质类	A; 260/400 ~ 460; C; 320 ~ 360/420~460	C1; <250(320)/422 ^[29] ; C2; <260(280~340)/340~460 ^[30] ; C3; <260(<315)/421 ^[31]
C2	270(340) ^c	475	陆地源腐殖质类	A; 260/400~460	C1; 260(370)/475 ^[32]
C3	270 ^c	305	酪氨酸类、蛋白质类	B; 275/305	C2; 260 ~ 270/310 ~ 320 ^[33] ; C7; 275/308 ^[34] ; C4; 270/309 ^[35]

Ex_{\max} : 最大激发波长; Em_{\max} : 最大发射波长; c: 括号中数值为次级荧光峰。

2.5 不同荧光指数的变化特征

本研究进一步探索了腐殖化指数 (HIX)、 $A:T$ 、新鲜指数 ($\beta:\alpha$)、McKnight 荧光指数和 Y 型荧光指数等多种荧光指数的变化特征,以表征稻虾系统中土壤 DOM 的组成、转化和腐殖化过程(表 3)。 HIX 与土壤 DOM 的芳香性密切相关,与碳水化合物含量呈负相关关系^[36]。通常,较高的 HIX 值与更稠合的芳族结构的富集和(或)脂族链的更多共轭有关^[37]。在本研究中,S1~S10 样品在 T1、T2、T3、T4 的 HIX 均值分别为 1.777、2.847、2.161、1.275。初始 HIX 值显著高于 Gao 等^[17] 报道的 1.1 左右,这可能与本研究地块土壤具有更低 DOC 质量浓度有关。常规水稻种植地块 CK1 和 CK2 取样点,其土壤 DOM 腐殖化程度相对较高。随着有机稻虾共作系统的运行, t 检验分析发现,T2 土壤 DOM 的 HIX 显著高于 T1 ($P<0.05$),这与 PARAFAC 荧光组分 C1、C2 的变化趋势类似,因此认为 HIX 的上升主要归因于腐殖质类物质的形成,而非蛋白质类物质的快速降解。经过 8 个月(移栽前到收获期), t 检验分析发现,T4 土壤 DOM 的 HIX 显著低于 T1 ($P<$

0.05)。

$A:T$ 可用于描述难降解荧光物质和不稳定荧光物质之间的比率^[38]。 $A:T$ 的变化与 HIX 非常相似,随采样时间的推迟整体呈现先上升后下降的趋势(除 S2)。S1~S10 样品在 T1、T2、T3、T4 的 $A:T$ 均值分别为 0.615、1.230、0.934、0.327。 t 检验分析发现,T2 和 T4 土壤 DOM 的 $A:T$ 均显著高于 T1 ($P<0.01$)。

在稻虾共作系统中, MFI 随采样时间的推迟呈不规则的波动,S1~S10 取样点 MFI 的最大值和最小值的变化小于 0.2,S1~S10 的平均 MFI 数值为 1.432(T1)、1.381(T2)、1.38(T3) 和 1.411(T4)。 t 检验显示,S1~S10 样品在 T1~T4 的 MFI 无显著差异。因此, MFI 难以监测稻虾共作系统中土壤 DOM 的变化规律。而 YFI 具有区分能力,较好地描述了土壤 DOM 的腐殖化过程,总体上随采样时间的推迟呈先下降后上升的趋势。 t 检验显示,T3 土壤 DOM 的 YFI 显著低于 T1 ($P<0.05$)。这与 HIX 和 $A:T$ 的趋势相反,这是由于土壤 DOM 中腐殖质类物质占据主导位置,而荧光指数通常与芳香族含量

呈负相关^[22]。 t 检验结果显示, S1~S10 样品的 $\beta : \alpha$ 在 T1~T4 间无显著差异。

2.6 不同荧光指数(强度)的相关性分析

进一步通过皮尔逊相关系数(r)分析土壤表层(0~20.0 cm)DOM 各种荧光指数(强度)的相关性,结果如表 4 所示。这些指数可综合使用,以进一步描述稻虾共作模式下土壤 DOM 特性。蛋白质类物质 C3 与其他荧光指数(强度)相关性均较弱($r < 0.40$)。尽管 C2 具有更高的 DOM 组分复杂性,腐殖质类物质 C1 和 C2 的高相关性,表明两者来源相同并经历类似的腐殖化进程。如 A:T 的变化与 HIX

非常相似,均反映土壤 DOM 的腐殖化特性,A:T 与 HIX 表现出非常强的正相关性($r = 0.952, P < 0.001$),并可被线性函数很好地拟合, $R_{Adj}^2 = 0.9038$,如图 6a 所示。A:T 和 HIX 与腐殖质类物质 C1 和 C2 均呈现很强的正相关($r \approx 0.80, P < 0.001$),而与蛋白质 C3 相关性较低,C1 荧光强度与 HIX 可被线性函数拟合, $R_{Adj}^2 = 0.6314$,如图 6b 所示。这表明土壤的腐殖化特征主要受内源有机质降解的影响,受外源蛋白质类物质(施加黄粉虫粪等有机肥)的影响较小。

表 3 0~20.0 cm 表层土壤 DOM 不同荧光指数的变化

Table 3 Changes of different fluorescence indices of dissolved organic matter (DOM) from soil at 0~20.0 cm

指标	取样时间	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	CK1	CK2
HIX	T1	1.25	2.11	2.48	2.07	2.18	2.37	1.37	1.55	1.18	1.21	3.86	3.44
	T2	2.05	1.79	3.57	2.07	2.93	3.25	3.34	3.19	3.5	2.78	2.87	2.08
	T3	1.96	2.35	2.45	2.16	1.83	2.63	1.99	2.45	2.03	1.76	2.69	2.45
	T4	0.81	2.24	1.19	1.12	0.58	1.67	1.6	1.27	1.42	0.85	2.11	2.61
A:T	T1	0.40	0.83	0.95	0.86	0.52	0.72	0.35	0.45	0.56	0.51	1.79	1.51
	T2	0.76	0.60	1.66	0.98	1.06	1.43	1.36	1.45	1.70	1.30	1.25	0.86
	T3	0.79	1.03	1.12	0.92	0.71	1.18	0.73	1.15	0.92	0.79	1.22	1.08
	T4	0.20	0.56	0.32	0.28	0.12	0.43	0.45	0.35	0.37	0.19	0.67	0.78
$\beta : \alpha$	T1	0.69	0.77	0.81	0.93	1.08	1.16	1.28	1.36	1.58	1.68	1.60	1.72
	T2	0.67	0.75	0.78	1.15	1.04	1.16	1.24	1.37	1.42	1.60	1.65	1.75
	T3	0.70	0.79	0.85	0.98	1.08	1.14	1.32	1.37	1.49	1.59	1.68	1.79
	T4	0.58	0.71	0.82	0.95	1.18	1.16	1.25	1.36	1.48	1.56	1.62	1.70
MFI	T1	1.52	1.44	1.36	1.44	1.24	1.40	1.49	1.37	1.49	1.57	1.33	1.33
	T2	1.40	1.40	1.31	1.47	1.42	1.34	1.33	1.37	1.37	1.40	1.34	1.41
	T3	1.37	1.30	1.34	1.43	1.33	1.33	1.50	1.32	1.44	1.44	1.35	1.48
	T4	1.41	1.41	1.48	1.48	1.39	1.36	1.31	1.42	1.50	1.35	1.41	1.40
YFI	T1	1.14	0.74	0.70	0.78	0.85	0.67	0.85	0.79	0.83	0.93	0.56	0.59
	T2	0.71	0.82	0.61	0.82	0.63	0.64	0.60	0.65	0.64	0.67	0.61	0.95
	T3	0.71	0.66	0.65	0.70	0.72	0.64	0.70	0.66	0.68	0.71	0.63	0.65
	T4	0.91	0.65	1.05	0.93	1.14	0.76	0.79	0.84	0.83	0.97	0.76	0.69

T1~T4, S1~S10, CK1, CK2 见图 2 注。

$\beta : \alpha$ 与其他荧光指数(强度)的相关性均较弱, $R \leq 0.40$ 。相较于 MFI, YFI 更能反映土壤中 DOM 的腐殖化变化特性: YFI 与 C1 荧光强度和 C2 荧光强度呈负相关, r 值分别为 $-0.749 (P < 0.001)$ 和 $-0.728 (P < 0.001)$, YFI 与 A:T 和 HIX 也呈负相关, r 值分别达 $-0.787 (P < 0.001)$ 和 $-0.834 (P <$

$0.001)$ 。新产生的 DOM (即较低的 A:T 或 HIX 值), 将具有较低的芳族含量和较高的荧光强度(即较高的 YFI 值), 反之亦然。进一步分析 HIX 与 YFI 的关系, 发现指数函数可较好拟合两者关系 ($R_{Adj}^2 = 0.8190$), 如图 6c 所示, 这表明土壤 DOM 荧光强度 (YFI) 主要受到腐殖化进程的影响。研究还发现,

土壤 DOC 质量浓度与腐殖物质 C1 ($r=0.471, P<0.01$) 和 C2 ($r=0.476, P<0.001$) 的荧光强度呈弱正相关, 而 DOC 质量浓度与其他荧光指数的相关性

均很弱 ($R<0.200$)。这暗示, 难以通过分析土壤溶解性有机碳含量来监测土壤有机质腐殖化程度。

表 4 土壤 DOM 不同荧光光谱指数(强度)的皮尔逊相关系数 ($n=48$)

Table 4 Pearson correlation coefficients for different fluorescence indices (intensities) of dissolved organic matter (DOM) in the soil ($n=48$)

	C1 荧光强度	C2 荧光强度	C3 荧光强度	A : T	HIX	$\beta : \alpha$	MFI	YFI
C2 荧光强度	0.990 ***							
C3 荧光强度	0.102	0.139						
A : T	0.803 ***	0.793 ***	-0.364 *					
HIX	0.800 ***	0.809 ***	-0.304	0.952 ***				
$\beta : \alpha$	-0.342 *	-0.402 **	-0.217	-0.233	-0.376 *			
MFI	-0.452 **	-0.473 **	0.034	-0.425 **	-0.500 ***	0.409 **		
YFI	-0.749 ***	-0.728 ***	0.391 *	-0.787 ***	-0.834 ***	0.324 *	0.460 **	
DOC 质量浓度	0.471 **	0.476 **	0.256	0.198	0.155	-0.163	0.024	-0.250

A : T: 腐殖酸与色氨酸比值; HIX: 腐殖化指数; $\beta : \alpha$: 新鲜指数; MFI: McKnight 荧光指数; YFI: Y 荧光指数。*、** 和 *** 分别表示两变量之间在 0.05、0.01、0.001 水平显著相关。

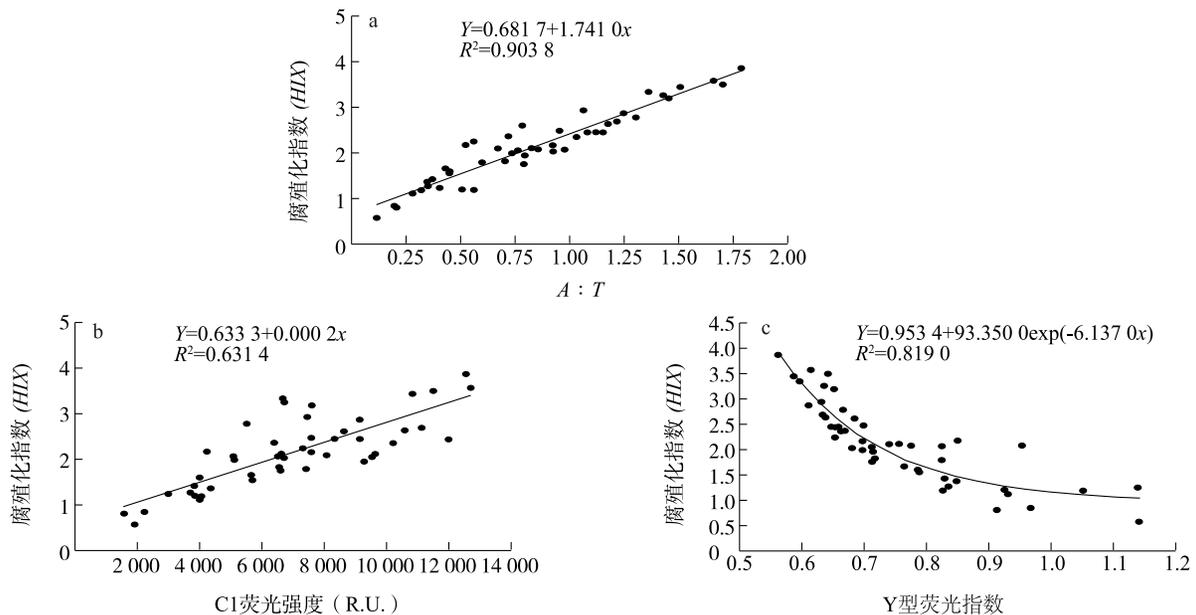


图 6 腐殖化指数与 A : T (a)、腐殖酸类物质 C1 荧光强度 (b)、Y 型荧光指数 (c) 的关系图

Fig.6 Relation between the humification index (HIX) and A : T ratio (a), fluorescence intensity of humic-like compound C1 (b) and Y-type fluorescence index (YFI) (c)

3 结论

(1) 通过三维荧光光谱耦合平行因子法 (3DEEM-PARAFAC) 分析, 发现有机稻虾共作土壤 DOM 包括 3 个荧光组分, C1 为较低相对分子质量的腐殖质类物质、C2 为较高芳香度的 UVC 类腐殖

质、C3 为酪氨酸类物质, 未发现高相对分子质量腐殖质类物质。0~20.0 cm 表层土壤 C1、C2 组分荧光强度随采样时间的推迟呈先上升后下降趋势, 峰值出现在水稻分蘖期或抽穗期, 而 C3 组分荧光强度无明显变化规律。

(2) 皮尔逊相关系数分析结果显示, 腐殖质类

物质 C1 荧光强度与 C2 荧光强度呈显著正相关($r=0.99, P<0.001$), 蛋白质类物质 C3 与其他荧光指数(强度)相关性均较弱($r<0.4$)。HIX 与 C1 荧光强度、A:T 表现出显著正相关, 均可被线性函数拟合。相较于 MFI, YFI 更能反映土壤中 DOM 的腐殖化变化特性, YFI 与 HIX 可被指数函数较好拟合。

(3) 短期稻虾共作土壤的腐殖化特征主要受内源有机质降解影响, 而受外源蛋白质类物质输入的影响较小, 难以通过分析土壤溶解性有机碳含量来监测土壤有机质腐殖化程度。

参考文献:

- [1] 农业农村部办公厅. 稻渔综合种养生产技术指南[农办渔(2020)11号]补标准号[EB/OL].(2020-03-31)[2020-11-08].http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-04/03/content_5498676.htm.
- [2] 曹凑贵, 江洋, 汪金平, 等. 稻虾共作模式的“双刃性”及可持续发展策略[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(9): 1245-1253.
- [3] 肖求清. 稻虾共作对稻田生物多样性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [4] 程慧俊. 克氏原螯虾稻田养殖生态学的初步研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2014.
- [5] 倡国涵, 彭成林, 徐祥玉, 等. 稻虾共作模式对涝渍稻田土壤理化性状的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(1): 61-68.
- [6] 奚业文, 周洵. 稻虾连作共作稻田生态系统中物质循环和效益初步研究[J]. 中国水产, 2016(3): 78-82.
- [7] 倡国涵. 长期稻虾共作模式下稻田土壤肥力变化特征研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [8] 杨佳波, 曾希柏. 水溶性有机物在土壤中的化学行为及其对环境的影响[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(5): 206-211.
- [9] 周江敏, 代静玉, 潘根兴. 土壤中水溶性有机质的结构特征及环境意义[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(6): 731-735.
- [10] 赵劲松, 张旭东, 袁星, 等. 土壤溶解性有机质的特性与环境意义[J]. 应用生态学报, 2003, 14(1): 126-130.
- [11] 朱杰, 刘海, 吴邦魁, 等. 稻虾共作对稻田土壤 nirK 反硝化微生物群落结构和多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(9): 1324-1332.
- [12] SI G, PENG C, YUAN J, et al. Changes in soil microbial community composition and organic carbon fractions in an integrated rice-crayfish farming system in subtropical China[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2856.
- [13] 刘赫群, 李嘉尧, 成永旭, 等. 虾稻共作对稻田土壤线虫群落结构的影响[J]. 土壤, 2017, 49(6): 1121-1125.
- [14] 倡国涵, 袁家富, 彭成林, 等. 稻虾共作模式氮和磷循环特征及平衡状况[J]. 中国生态农业学报, 2019, 27(9): 1309-1318.
- [15] LI Q, XU L, XU L, et al. Influence of consecutive integrated rice-crayfish culture on phosphorus fertility of paddy soils[J]. Land Degradation & Development, 2018, 29(10): 3413-3422.
- [16] 孙自川. 稻虾共作下秸秆还田和投食对温室气体排放的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [17] GAO J, LIANG C, SHEN G, et al. Spectral characteristics of dissolved organic matter in various agricultural soils throughout China[J]. Chemosphere, 2017, 176: 108-116.
- [18] HUNT J F, OHNO T. Characterization of fresh and decomposed dissolved organic matter using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multiway analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2121-2128.
- [19] MURPHY K R, STEDMON C A, WENIG P, et al. OpenFluor-anonline spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment[J]. Analytical Methods, 2014, 6(3): 658-661.
- [20] 张广彩, 于会彬, 徐泽华, 等. 基于三维荧光光谱结合平行因子法的蘑菇湖上覆水溶解性有机质特征分析[J]. 生态与农村环境学报, 2019, 35(7): 933-939.
- [21] HANSEN A M, KRAUS T E C, PELLERIN B A, et al. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation[J]. Limnology and Oceanography, 2016, 61(3): 1015-1032.
- [22] MCKNIGHT D, BOYER E, WESTERHOFF P, et al. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity[J]. Limnology and Oceanography, 2001, 46: 38-48.
- [23] HEO J, YOON Y, KIM D H, et al. A new fluorescence index with a fluorescence excitation-emission matrix for dissolved organic matter (DOM) characterization[J]. Desalination and Water Treatment, 2016, 57(43): 20270-20282.
- [24] MURPHY K R, STEDMON C A, GRAEBER D, et al. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques PARAFAC[J]. Analytical Methods, 2013, 5(23): 6557-6566.
- [25] CHANTIGNY M H. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices[J]. Geoderma, 2003, 113(3): 357-380.
- [26] COBLE P G. Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color[J]. Chemical Reviews, 2007, 107(2): 402-418.
- [27] STEDMON C A, MARKAGER S, BRO R. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy[J]. Marine Chemistry, 2003, 82(3): 239-254.
- [28] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(24): 5701-5710.
- [29] YAMASHITA Y, PANTON A, MAHAFFEY C, et al. Assessing the spatial and temporal variability of dissolved organic matter in Liverpool Bay using excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis[J]. Ocean Dynamics, 2011, 61(5): 569-579.
- [30] SHUTOVA Y, BAKER A, BRIDGEMAN J, et al. Spectroscopic

- characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths[J]. *Water Research*, 2014, 54: 159-169.
- [31] YAMASHITA Y, MAIE N, BRICEÑO H, et al. Optical characterization of dissolved organic matter in tropical rivers of the Guayana Shield, Venezuela[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2010. Doi:10.1029/2009jg000987.
- [32] DAINARD P G, GUÉGUEN C, MCDONALD N, et al. Photobleaching of fluorescent dissolved organic matter in Beaufort Sea and North Atlantic Subtropical Gyre [J]. *Marine Chemistry*, 2015, 177: 630-637.
- [33] D'ANDRILLI J, FOREMAN C M, SIGL M, et al. A 21 000-year record of fluorescent organic matter markers in the WAIS Divide ice core[J]. *Clim Past*, 2017, 13(5): 533-544.
- [34] YAMASHITA Y, BOYER J N, JAFFÉ R. Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy[J]. *Continental Shelf Research*, 2013, 66: 136-144.
- [35] RETELLETTI B S, KIM J H, RYU J S, et al. Exploring sediment porewater dissolved organic matter (DOM) in a mud volcano: clues of a thermogenic DOM source from fluorescence spectroscopy [J]. *Marine Chemistry*, 2019, 211: 15-24.
- [36] KALBITZ K, SCHMERWITZ J, SCHWESIG D, et al. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties[J]. *Geoderma*, 2003, 113(3): 273-291.
- [37] MARTINS O, DEWES T. Loss of nitrogenous compounds during composting of animal wastesa[J]. *Bioresource Technology*, 1992, 42(2): 103-111.
- [38] EHNVAL B. Organic matter properties and their relation to phosphorus and nitrogen concentrations in Swedish agricultural streams [D]. Uppsala:Swedish University of Agricultural Sciences,2017.

(责任编辑:陈海霞)