

# 同步荧光结合主成分与二维相关研究盐碱性土溶解性有机质组成与结构特征

陈莹莹<sup>1,2</sup>, 郑昭佩<sup>1\*</sup>, 杨芳<sup>2</sup>, 白杨<sup>2</sup>, 于会彬<sup>2</sup>

1. 山东师范大学地理与环境学院, 山东 济南 250014

2. 中国环境科学研究院流域水环境污染综合治理研究中心, 北京 100012

**摘要** 为解决同步荧光光谱(SFS)荧光峰重叠而产生的应用局限性,应用同步荧光技术结合二维相关与主成分等方法,对重叠峰进行解析,研究土壤溶解性有机质(SDOM)组成与结构特征。选取河套灌区典型常见的芦苇、白杨、玉米、籽瓜等四种植被覆盖的土壤为研究对象,采集四个样点的土样,每个样点按0~20, 20~40, 40~60和60~80 cm等四层采集植被下土壤,共计16个土样,提取溶解性有机质,检测SFS。结果表明瓜地和玉米地SDOM荧光强度大于林地和芦苇地SDOM的荧光强度,瓜地SDOM荧光强度随着土层深度的增大而增大,而其他三种植被SDOM的荧光强度随着土壤深度的增大而减小,表明瓜地水浇过程中土层以淋溶作用为主,而其他土层以渗滤作用为主。应用主成分分析方法(PCA),识别出酪氨酸、色氨酸、微生物代谢产物、富里酸和胡敏酸等5种荧光组分,酪氨酸荧光峰出现了红移现象,表明瓜地土壤中的酪氨酸荧光强度明显高于其他三种植被土壤。基于二维相关光谱分析,芦苇土壤中的色氨酸与微生物代谢产物呈正相关变化趋势,光谱波段先后变化顺序为370 nm→337 nm→290 nm,表明组分变化顺序为富里酸→微生物代谢产物→色氨酸;玉米土壤中富里酸与胡敏酸呈正相关,波段变化顺序为318 nm→350 nm→420 nm→274 nm,表明组分变化顺序为微生物代谢产物→富里酸→胡敏酸→酪氨酸;林地土壤中酪氨酸、富里酸和胡敏酸呈正相关,波段变化顺序为270 nm→392 nm→426 nm→305 nm→337 nm,表明组分变化顺序为酪氨酸→富里酸→胡敏酸→色氨酸→微生物代谢产物;瓜地土壤中富里酸与胡敏酸呈正相关,而与酪氨酸呈负相关,波段变化顺序为410 nm→355 nm→334 nm→309 nm→275 nm,表明组分变化顺序为胡敏酸→富里酸→微生物代谢产物→色氨酸→酪氨酸。因此,运用SFS结合PCA与二维相关光谱分析SDOM的荧光光谱特征,识别荧光组分,揭示荧光组分的空间变化规律具有十分显著的效果。

**关键词** 同步荧光光谱;二维相关;碱性土壤;主成分;土壤溶解性有机质

**中图分类号:** X53 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)02-0489-05

## 引言

土壤溶解性有机质(soil dissolved organic matter, SDOM)是一种复杂混合物,具有多种生态功能和地球化学特征,是地球多个圈层间的联系枢纽<sup>[1]</sup>。SDOM对营养物与污染物的迁移转化及碳循环有重要影响,SDOM含量与质量深受物理、化学和生物、过程的控制<sup>[2-4]</sup>。因此,SDOM被视为评估生态环境的重要指标。

<sup>13</sup>C核磁共振、高效液相色谱、红外光谱、紫外可见光谱

与荧光光谱等被用来研究SDOM组成与结构特征<sup>[5-8]</sup>。荧光光谱具有检测速度快、不改变样品性状、成本低与信息量大等优点<sup>[7-8]</sup>,广泛应用于表征SDOM中的芳香族氨基酸、腐殖质等荧光类物质<sup>[9]</sup>。通过传统的寻峰法,SDOM表征类蛋白、微生物代谢产物及腐殖酸类物质<sup>[10]</sup>。由于荧光峰的叠加而降低了光谱的分辨率,在SDOM的分析应用中存在着一定的局限性。应用二维相关方法来分析同步荧光光谱(synchronous fluorescence spectroscopy, SFS),不仅通过放大波段信号而分解重叠峰,而且能够区分外部扰动而引起的细微光谱变化顺序<sup>[10-11]</sup>。此外,PCA已被广泛应用到SFS中,将

收稿日期:2019-01-22,修订日期:2019-05-03

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07111001),中国博士后科学基金项目(2013T60148)资助

作者简介:陈莹莹,女,1994年生,山东师范大学地理与环境学院硕士研究生 e-mail: qdchenyingying@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: zzp999@163.com

复杂的光谱信号分解成线性独立分量, 而且表征样本的相似性和差异性特征。

本研究利用 SFS 结合 PCA 与二维相关光谱, 分析盐碱土 DOM 组成与结构特征, 揭示荧光组分的空间分异规律, 阐释荧光组分响应关系及迁移转化机制。

## 1 实验部分

### 1.1 研究区域

河套灌区位于内蒙古自治区巴彦淖尔市境内, 灌区东西长 250 km, 南北宽 50 km, 总灌溉面积 5 740 km<sup>2</sup>。灌区属温带大陆性季风气候, 夏季高温干旱, 冬季严寒少雪。多年平均气温在 3.7~7.6 °C。降雨多集中在 7、8 月份, 多为暴雨。年均降水量为 130~285 mm, 年均蒸发量为 2 030~3 180 mm。受地质构造、灌溉、排水与气候等因素影响, 灌区内土壤盐碱化现象普遍存在。

### 1.2 样本采集

在灌区采集芦苇(LW)、白杨(LD)、玉米(YM)和籽瓜(GD)四种植被下覆盖的土壤为研究对象, 按 0~20, 20~40, 40~60, 60~80 cm 等四层采集样品共计 16 个。土壤样品自然风干后研磨过 100 目筛。将 20 g 土壤样品与 100 mL 超纯水(Milli-Q, 电阻率为 18.2 MΩ·cm)混合, 恒温避光连续震荡 24 h, 用离心机 7 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 将上清液过 0.45 μm 醋酸纤维膜, 得到 SDOM 溶液。

### 1.3 同步荧光测定

采用荧光分光光度计(HitachiF-7000, Japan)进行同步

荧光光谱测定, 激发光源为 150 W 氙弧灯, 光电倍增管电压为 700 V。SFS 激发波长范围为 260~545 nm, 狭缝 5 nm, 响应时间为 0.5 s, 波长差常数  $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 55$  nm, 扫描速度 240 nm·min<sup>-1</sup>。

### 1.4 二维相关光谱

运用 Kwansai-Gakuin 大学发布的 2D shige 软件, 对 SFS 数据进行二维相关光谱分析, 采样点土壤剖面深度为外部扰动因素。二维相关的读谱规则参阅相关文献<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 同步荧光光谱

SFS 显示出 4 个不同强度的峰(图 1), 第一个峰在激发波长 260~310 nm 之间与类蛋白质物质有关, 而类蛋白质与酪氨酸和色氨酸的存在密切相关; 第二个峰表示微生物代谢产物, 其波长在 315~340 nm 之间; 第三个峰与富里酸有关, 波长 340~400 nm; 第四个峰波长在 410~450 nm 之间, 与胡敏酸对应<sup>[11]</sup>。芦苇与林地 SDOM 荧光强度明显小于玉米与瓜地 SDOM 荧光强度, 表明 SDOM 深受人类活动的影响。玉米 SDOM 荧光强度明显高于瓜地 SDOM, 与玉米秸秆含有较高的木质纤维素具有一定相关性<sup>[13]</sup>。芦苇、玉米与林地的 SDOM 荧光强度随着土层深度的增大而减小, 而瓜地 SDOM 荧光强度随着土层深度的增加而增加, 表明瓜地水浇过程中土层以淋溶作用为主, 而其他土层以渗滤作用为主<sup>[14]</sup>。

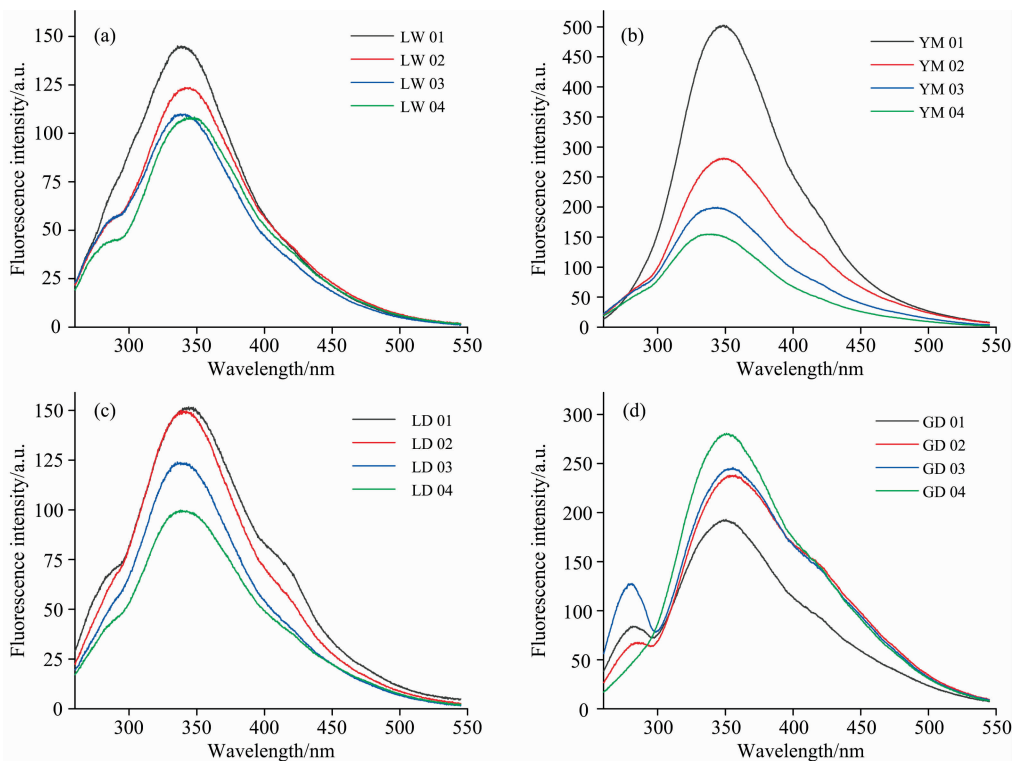


图 1 4 种土壤中提取的 16 个 DOM 样品的 SFS

Fig. 1 SFS of 16 DOM samples extracted from 4 types of soil

### 2.2 主成分分析

应用 PCA 分析 SFS 数据得到因子得分与因子载荷, 因子得分与波长的关系图提供了每个 PC 的光谱波形的变化迹象, 从而识别出导致光谱信号差异的荧光团, 而载荷量可以表征样本空间分布的差异<sup>[10-11]</sup>。在 PCA 中 Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) 决定抽样充分性, 对于可接受的 PCA, 抽样充分性应大于 0.5, Bartlett 的球度检验 ( $P$ ) 是检验种群相关矩阵中变量不相关的零假设的另一个指标, 观测到的显著性水平应  $p < 0.001$ <sup>[10-11]</sup>。在本研究中, KMO 数值是 0.927, 并且  $p < 0.001$ , 表明 PCA 处理数据可行。

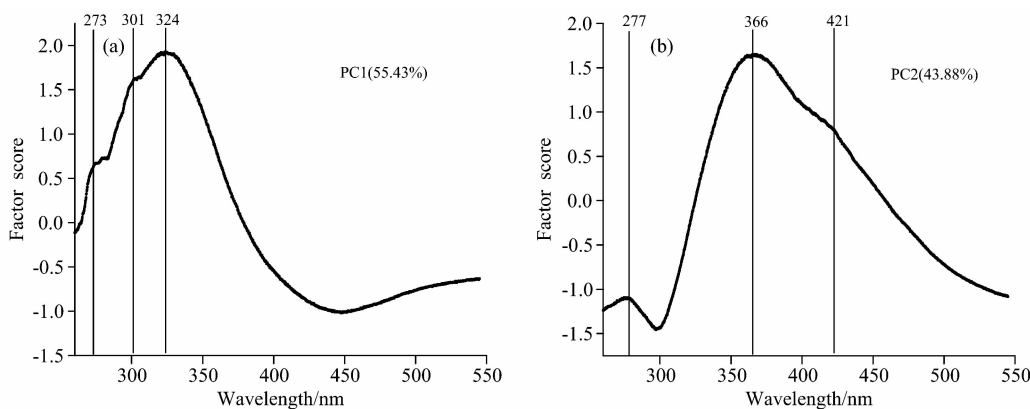


图 2 16 个土壤样品光谱波长 PC1 和 PC2 的得分图

Fig. 2 Spectral wavelength PC1 and PC2 scores of 16 soil samples

图 3 为 SDOM 同步荧光光谱的因子载荷图, 对角线将所有样本分为两个部分, 左上方为玉米与瓜地土壤样本, 右下方为林地与芦苇地样本(除 YM03、YM04), 说明农作物与非农作物间 SDOM 荧光特征具有显著差异。以得分值 0.7 为截点, 可将对角线上方与下方各分为两个区域, 如图 3 所示。区域 I 包括 7 个样品(LW01-03, LD02-04, YM04), PC1 负荷  $> 0.8$ , PC2 负荷  $< 0.6$ , 说明类蛋白质(酪氨酸和色氨酸)荧光团占优势; 区域 II (YM 03, LW 04 和 LD 01) 的 PC1 负荷量相对较高 ( $> 0.75$ ), 与微生物代谢产物荧光团相对应; 区域 III (YM01-02 和 GD01) 的 PC2 负荷量相比于 PC1 负荷量较多, 以富里酸为主。区域 IV (GD02-04) 的 PC2 负荷  $> 0.8$ , PC1 负荷  $< 0.55$ , 三个 SDOM 样品中胡敏酸荧光团占优势。

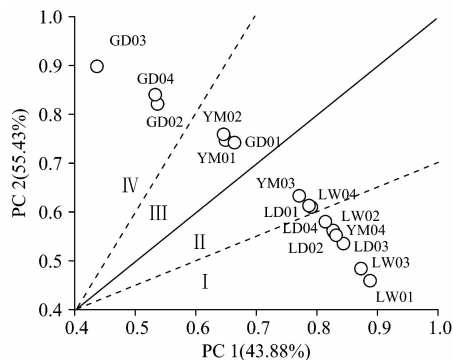


图 3 因子载荷图

Fig. 3 Factor loading diagram

PCA 得到两个主成分 (PCs), 占总方差的 99.31% (图 2)。PC1 (55.43%) 识别出 3 个荧光峰, 即在波长 273, 301 和 324 nm 处, 分别与酪氨酸、色氨酸和微生物代谢产物对应<sup>[11]</sup>。PC2 (43.88%) 显示了 2 个尖峰和 1 个肩峰。第一个尖峰 (277 nm) 代表酪氨酸, 与 PC1 相比发生了 4 nm 的红移, 表明瓜地土壤中的酪氨酸荧光强度明显高于其他三种植被土壤的酪氨酸荧光强度 (图 1); 第二个尖峰 (366 nm) 与富里酸组分对应; 421 nm 处的肩峰代表胡敏酸<sup>[11]</sup>。每个 PC 上光谱的负载表明每个 PC 与单个 SFS 相关 (图 1), 这证明 PC 捕获了荧光光谱的特征。

### 2.3 同步二维相关光谱

运用 2D Shige 软件对 SFS 进行二维相关分析, 减少光谱重叠的影响, 分析 SDOM 组分的空间变化特征。在同步二维相关光谱中, 主对角线上的峰称为自动峰, 自动峰总为正值。自动峰代表了系统在外扰条件影响下, 随着光强变化不同区域相关光谱变化的敏感性<sup>[13]</sup>。位于对角线两侧的光谱峰则称作交叉峰, 表示自动峰间的同步变化, 白色代表正相关, 阴影代表负相关, 交叉峰的存在意味着自动峰间的变化有着共同的起源<sup>[11-12]</sup>。

以土壤剖面深度为扰动因素, 分析出四种植被覆盖土壤的同步二维相关光谱图 (图 4)。LW 显示出两个显著的自动峰 (303 和 337 nm), 且两者之间变化趋势为正相关, 表明芦苇土壤中色氨酸与微生物代谢产物呈正相关; YM 显示出一个显著 (350 nm) 与一个微弱 (420 nm) 自动峰, 分别与富里酸和胡敏酸对应, 且两者间呈正相关; LD 表现出三个自动峰位于 284, 346 和 426 nm 处, 分别对应酪氨酸、富里酸与胡敏酸, 且交叉峰为白色。表明三者之间均呈正相关, 即富里酸随着外扰因素土壤剖面深度的增加而减少时, 酪氨酸与胡敏酸的变化趋势与富里酸一致, 这与 SFS 是对应的 (图 1 LD)。GD 与其他三种植被土壤有着显著差异, 表现出两个显著自动峰 (275 和 355 nm) 和一个微弱自动峰 (410 nm)。在两个显著自动峰间的交叉峰为阴影, 表明酪氨酸与富里酸呈负相关, 而富里酸与胡敏酸 (410 nm) 呈正相关。

### 2.4 异步二维相关光谱

在异步相关光谱中, 相关峰是关于主对角线反对称的,

只在对角线外存在交叉峰,没有自动峰的形成。异步相关光谱中的交叉峰特性可以帮助区分紧密靠近重叠在一起的起源不同的峰,异步交叉峰的值可正可负<sup>[12-13]</sup>。

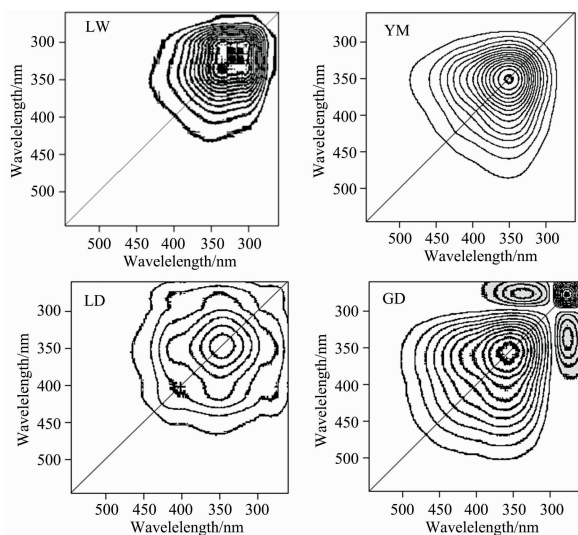


图 4 以土壤剖面为扰动的 4 种土壤的同步二维相关光谱图

Fig. 4 Synchronous two-dimensional correlation spectra of 4 types of soil disturbed by soil profile

图 5 表征的是四种植被土壤的异步二维相关光谱图,与同步二维相关光谱图相比,组分数量表现出明显差异。在 LW 中显示出三个交叉峰(对角线上方),位于 290/337, 321/337 和 337/370 处。根据二维相关图解析规则,得到波段变化顺序为 370 nm→337 nm→290 nm,表明随着扰动因素剖面深度的变化,荧光组分的变化顺序为富里酸→微生物代谢产物→色氨酸;YM 的异步相关图显示出两个显著交叉峰(274/350 和 350/420)和两个微弱交叉峰(318/350 和 420/470),波段变化为 318 nm→350 nm→420 nm→274 nm。证明微生物代谢产物变化最快,其次是富里酸、胡敏酸和酪氨酸;LD 显示四个显著交叉峰(270/337, 305/325, 337/426, 426/392),波段变化为 270 nm→392 nm→426 nm→305 nm→337 nm,所以 LD 剖面中组分变化顺序为酪氨酸→富里酸→胡敏酸→色氨酸→微生物代谢产物。GD 的异步相关光谱相对复杂,表现出强弱不同交叉峰五个,分别位于 262/275, 275/309, 275/355, 334/410 和 402/455,波段变化顺序为

410 nm→355 nm→334 nm→309 nm→275 nm,对应荧光组分变化顺序为胡敏酸→富里酸→微生物代谢产物→色氨酸→酪氨酸。

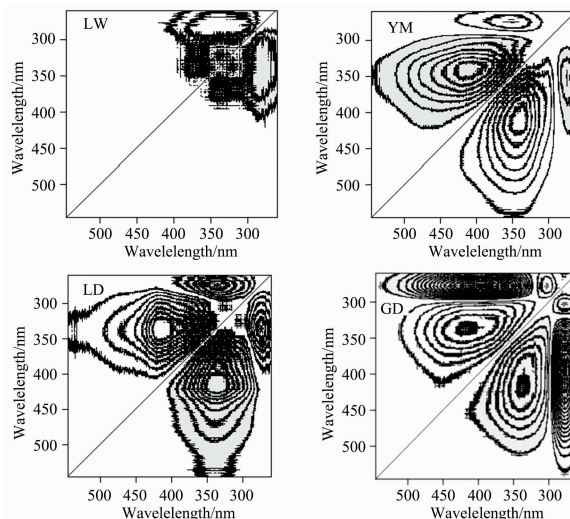


图 5 以土壤剖面为扰动的 4 种土壤的异步二维相关光谱图

Fig. 5 Asynchronous two-dimensional correlation spectra of 4 types of soil disturbed by soil profile

### 3 结 论

四种植被的 SDOM 主要含有酪氨酸、色氨酸、微生物代谢产物、富里酸和胡敏酸等 5 种荧光组分。瓜地和玉米地 SDOM 荧光强度大于林地和芦苇 SDOM 的荧光强度,瓜地 SDOM 荧光强度随着土层深度的增大而增大,而其他三种植被 SDOM 的荧光强度随着土壤深度的增大而减小,表明瓜地水浇过程中土层以淋溶作用为主,而其他土层以渗滤作用为主。芦苇 SDOM 中的色氨酸与微生物代谢产物呈正相关,且荧光组分的变化速度顺序为富里酸→微生物代谢产物→色氨酸;玉米 SDOM 中富里酸与胡敏酸呈正相关,且微生物代谢产物变化最快,其次是富里酸、胡敏酸和酪氨酸;林地 SDOM 中的酪氨酸、富里酸和胡敏酸呈正相关,且组分变化顺序为酪氨酸→富里酸→胡敏酸→色氨酸→微生物代谢产物;瓜地 SDOM 中的富里酸与胡敏酸呈正相关,而与酪氨酸呈负相关,胡敏酸变化最快,其次是富里酸、微生物代谢产物、色氨酸与酪氨酸。

### References

- [1] Lee M H, Osburn C L, Shin K H, et al. *Water Research*, 2018, 147: 164.
- [2] Liu C, Li Z W, Berhe A A, et al. *Geoderma*, 2019, 334: 37.
- [3] Poirier V, Roumet C, Munson A D. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 120: 246.
- [4] Jovanovic U D, Markovic M M, Cupac S B, et al. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2013, 176(5): 674.
- [5] Landry C, Tremblay L. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(3): 1700.
- [6] Li W T, Xu Z X, Li A M, et al. *Water Research*, 2013, 47(3): 1246.
- [7] Wei Z M, Zhao X Y, Zhu C W, et al. *Chemosphere*, 2014, 95: 261.
- [8] Yu H B, Song Y H, Tu X, et al. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 595.
- [9] LI Shuai-dong, JIANG Quan-liang, LI Ye, et al (李帅东, 姜泉良, 黎 焯, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*

析), 2017, 37(5): 1448.

[10] Guo X, Yuan D, Jiang J, et al. *Chim. Acta A*, 2013, 104: 280.

[11] Yu H, Song Y, Pan H, et al. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, 188(10): 579.

[12] Lasch P, Noda I. *Aual. Chem.*, 2017, 89(a): 5008.

[13] Liu X, Zhou F, Hu G Q, et al. *Geoderma*, 2019, 333: 35.

[14] ZHANG Hong-wei, HU Guang-lu, LIU Gui-min, et al(张宏伟, 胡广录, 刘桂民, 等). *Chinese Journal of Soil Science(土壤通报)*, 2016, 47(6): 1325.

## The Composition and Structure of Dissolved Organic Matter in Saline Soil Were Studied by Synchronous Fluorescence Spectroscopy Combined with Principal Components and Two-Dimensional Correlation

CHEN Ying-ying<sup>1,2</sup>, ZHENG Zhao-pe<sup>1\*</sup>, YANG Fang<sup>2</sup>, BAI Yang<sup>2</sup>, YU Hui-bin<sup>2</sup>

1. College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China

2. Watershed Research Center for Comprehensive Treatment of Water Environmental Pollution, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

**Abstract** In order to solve the research limitations caused by overlapping fluorescence peaks of synchronous fluorescence spectroscopy, the overlapping peaks were analyzed by using synchronous fluorescence technology in combination with two-dimensional correlation and principal components and other methods to study the composition and structural characteristics of soil dissolved organic matter (SDOM). The typical and common reeds, poplar, corn, melon four planted soils in betao irrigation area were selected as the research objects, and soil samples from the four sample points were collected, a total of 16 soil samples were collected under four layers of vegetation, namely 0~20, 20~40, 40~60 and 60~80 cm. Dissolved organic matter was extracted and Synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) was detected. SFS showed that melon and corn SDOM fluorescence intensity was greater than the woodlands and reed, melon SDOM fluorescence intensity increased with the increase of soil depth, while for the other three plantings SDOM fluorescence intensity decreased with the increase of soil depth, indicating that for the melon soil, in the process of watering soil layer gave priority to eluviation, and other soil layers gave priority to filtration. Principal component analysis (PCA) was used to identify five fluorescence components, including tyrosine, tryptophan, microbial metabolites, fulvic acid and humic acid. Based on two-dimensional correlation spectrum analysis, tryptophan in reed soil was positively correlated with the change trend of microbial metabolites. The change order of spectral bands was 370 nm→337 nm→290 nm, indicating that the change order of components was fulvic acid→microbial metabolites→tryptophan. There was a positive correlation between fulvic acid and humic acid in maize soil, and the change order of the band was 318 nm→350 nm→420 nm→274 nm, indicating that the change order of components was microbial metabolites→fulvic acid→humic acid→tyrosine. There was a positive correlation between tyrosine, fulvic acid and humic acid in woodland soil, and the change order of band was 270 nm→392 nm→426 nm→305 nm→337 nm, indicating that the change order of components was tyrosine fulvic acid→humic acid→tryptophan→microbial metabolites. There was a positive correlation between humic acid and humic acid, but a negative correlation between humic acid and tyrosine in the soil of melons, and the change order of band was 410 nm→355 nm→334 nm→309 nm→275 nm, indicating that the change order of components was humic acid→fulvic acid→microbial metabolite→tryptophan→tyrosine. Therefore, it is very effective to analyze the fluorescence spectral characteristics of SDOM and identification of fluorescence component by using SFS combined with PCA and two-dimensional correlation spectroscopy, and to reveal the spatial variation law of fluorescence components.

**Keywords** Synchronous fluorescence; Two-dimensional correlation; Saline-alkali soil; Principal components; Soil dissolved organic matter

(Received Jan. 22, 2019; accepted May 3, 2019)

\* Corresponding author