

# 不同来源风化煤腐植酸化学特征与生物活性研究

侯晓婵<sup>1</sup>, 张强<sup>1</sup>, 杨治平<sup>1</sup>, 闫敏<sup>1\*</sup>, 武文丽<sup>1</sup>, Maris Klavins<sup>2</sup>, 王永亮<sup>1</sup>

(1. 山西农业大学资源环境学院, 山西省太原 030031;

2. Department of Environmental Science, University of Latvia, Raina Blvd. 19, Riga, LV-1586, Latvia)

**摘要:**【目的】探究不同来源风化煤所含腐植酸的生物活性差异及其与风化煤性质特征的关系, 为寻找高活性腐植酸风化煤提供依据。【方法】选用山西左权、五台、静乐三地的风化煤, 以不同方法处理、进行植物培养试验, 采用紫外光谱、红外光谱、根系扫描的方法, 比较分析不同风化煤的加工化学特征、产出腐植酸的生物活性。【结果】左权、五台、静乐三地风化煤总腐植酸含量在 37.1%~40.9%, 但游离腐植酸含量差异较大, 分别为 1.92%、10.09% 和 30.62%; 总酸性官能团酚羟基含量差异明显, 其含量比为 1.00:1.22:1.83, 静乐风化煤的羟基含量和羧基含量最高; 钙镁含量比为 2.65:1.25:1.00; 不同风化煤的 E4/E6 差异较小, 但提取出的腐植酸 E4/E6 差异较大, 分别为 7.5、6.2 和 4.39。生物活性研究表明, 3 地风化煤腐植酸对绿豆再生根均有促进作用, 呈现与 IAA 具有的相同功效的典型激素反应; 其腐植酸促生活性依次为静乐>五台>左权, 左权和五台腐植酸浓度在 0.01%、静乐腐植酸浓度在 0.05% 时最高。【结论】左权、五台、静乐三地风化煤提出的腐植酸以静乐生物活性最高, 五台次之, 左权最低; 风化煤中的钙镁含量越低、游离腐植酸含量越高, 羟基红外光谱吸收峰越宽、总酸性基团含量越高腐植酸的生物活性就高。可为腐植酸加工选用优质的风化煤原料, 为腐植酸应用选择适宜浓度范围提供参考。

**关键词:** 风化煤; 腐植酸; 紫外光谱; 红外光谱; 促生活性

**中图分类号:** S143.92   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0564-3945(2022)03-0540-08

DOI: 10.19336/j.cnki.trtb.2021090102

侯晓婵, 张强, 杨治平, 闫敏, 武文丽, Maris Klavins, 王永亮. 不同来源风化煤腐植酸化学特征与生物活性研究 [J]. 土壤通报, 2022, 53(3): 540-547

HOU Xiao-chan, ZHANG Qiang, YANG Zhi-Ping, YAN Min, WU Wen-li, MARIS Klavins, WANG Yong-liang. Chemical Characteristics and Bioactivity of Humic Acids from Weathered Coals with Different Sources[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022, 53(3): 540-547

**【研究意义】**本论文对 3 地不同来源风化煤进行活化提取、纯化制备腐植酸, 测定其特性和结构等的差异及不同的生物活性表现, 以期明确不同风化煤制备的腐植酸的生物活性及适宜的用量, 可为腐植酸行业选用优质的风化煤提供数据参考, 为腐植酸应用于农业生产提供理论依据。**【前人研究进展】**风化煤存储于地表, 山西分布着 251 亿吨低阶煤炭资源, 其中优质的风化煤主要分布于太原、大同、晋城、长治等地<sup>[1]</sup>。风化煤中含多种含氧官能团及丰富的再生腐植酸<sup>[2]</sup>, 是腐植酸主要来源之一<sup>[3]</sup>。风化煤提取腐植酸主要采用碱提取法<sup>[4]</sup>, 提取后去除了蜡、沥青等杂质<sup>[5]</sup>, 增加了水溶性腐植酸的含量, 其结构和性质也随之发生变化。李丽<sup>[6]</sup>利用元素、<sup>13</sup>C 核磁共振和气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 分

析研究, 表明腐植酸并不是均一的有机大分子, 元素组成与结构较为复杂, 来源与形成过程的不同导致了其性质的多样化。訾昌毓<sup>[7]</sup>研究褐煤中提取的腐植酸的元素含量、含氧官能团、微晶结构、热稳定性, 结果表明腐植酸的性质特征与原煤较为接近, 腐植酸的环状有机物质更多, 不存在碳酸盐的分解, 结构较稳定。王学江<sup>[8]</sup>利用风化煤活化处理, 研究表明水溶性腐植酸含量达 40%。**【本研究切入点】**腐植酸的提取是从风化煤、褐煤、泥炭等物质中添加化学试剂将腐植酸纯化的过程<sup>[9]</sup>。腐植酸内部含有的官能团具有弱酸性, 可以与碱反应<sup>[10]</sup>, 加入碱液后, 形成对应的腐植酸盐<sup>[11]</sup>, 因此可以用风化煤制备腐植酸。腐植酸中含有富里酸、胡敏素和纯腐植酸, 依据其溶解度的不同, 可以制备出本文所用的腐植酸。

收稿日期: 2021-09-07; 修订日期: 2022-01-10

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (201803D221003-7、201903D421039), 山西省平台基地和人才专项 (201805D211017), 山西省农业科学院农业科技创新研究课题 (YCX2020109), 山西省 1331 工程项目 (20211331-15) 和国家重点研发计划 (2019YFC1710802) 资助

作者简介: 侯晓婵 (1997-), 女, 河北省邢台市人, 硕士研究生, 主要进行腐植酸及柳枝稷耐盐机理的研究。E-mail: 1720387494@qq.com

\*通讯作者: E-mail: ymrice@163.com

腐植酸是一种可以促进植物生长发育的有益物质, 其含氧官能团是腐植酸最具特征性的基团, 主要包括羧基、羰基、酚羟基、醇羟基、烯醇基、甲氧基、磺酸基、醌基和酮基等<sup>[12]</sup>。腐植酸骨架是通过烷烃键、醚键等键合作用随机组成, 连接着—COOH、C=O、—OH 等含氧官能团。Olaetxea 等<sup>[13]</sup>发现腐植酸有利于植物根冠的生长。Silva-Matos 等<sup>[14]</sup>研究腐植酸施入对西瓜幼苗的影响, 结果表明增大了根长和根体积, 促进了幼苗地上部生长。张水勤等<sup>[15]</sup>研究发现腐植酸直接刺激主根和侧根伸长, 提高根系活力, 增加营养吸收率。关于不同来源风化煤所含腐植酸的生物活性的研究较少。【拟解决的问题】通过紫外、红外、根系扫描等手段研究风化煤所提腐植酸

的性质及生物活性之间的差异, 明确腐植酸应用农业中的最佳浓度范围, 以期腐植酸行业选用优质的风化煤提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

风化煤采自山西省左权、五台、静乐三地的煤矿, 去除杂质后经粉碎机研磨、过 0.149 mm 筛后保存于自封袋内。一部分用于测定风化煤的基本性质, 另一部分用于提取腐植酸、研究腐植酸性质。供试作物为绿豆, 品种为晋绿 5 号。

### 1.2 腐植酸的制备方法(样品处理)

腐植酸采用下表(表 1)方法活化提取制备<sup>[16]</sup>。

表 1 不同来源风化煤制备腐植酸的过程  
Table 1 The preparation methods of humic acids from weathered coals sampled in different sites

风化煤采集地 Site of sampling coal	称样 Weight	添活化剂 Activator	加水 Water added	提取 Extraction	制腐植酸 Preparation of Humic acid
左权		10.0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1:1 固液比(质量比) 加纯水, 50 °C, 30 min	在 40 °C, 2.5%KOH 浓度条件下反应 30 min	用稀 HCl 调 pH 至 7.00, 10000 r 离心, 取上清液用浓盐酸调 pH 至 1.00, 离心后收集沉淀; 用 0.10 mol L <sup>-1</sup>
五台	100.0 g 风化煤于 1000 ml 烧杯	20.0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	水浴锅中; 烘干, 按 1:8 固液比加入 KOH 溶液	在 50 °C, 1.5%KOH 浓度条件下反应 45 min	NaOH 溶解沉淀, 调 pH 至中性置 10000 Dal 透析袋内, 纯水透析 24 h;
静乐		7.3 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 和 16.0 g NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	液提取	在 40 °C, 2.0%KOH 浓度条件下反应 30 min	冷冻或喷雾干燥

### 1.3 腐植酸促进绿豆再生根效果试验(生物试验)

配制 0、0.5、1、2.5、5 μg ml<sup>-1</sup>、7.5 μg ml<sup>-1</sup> 的吲哚乙酸 (IAA) 溶液, 配制 0.01%、0.05%、0.1%、0.2% 的腐植酸溶液<sup>[16]</sup>, 每处理 5 株, 3 次重复。

育苗盘每个穴盘播 1~2 颗绿豆种子, 在自然光照下生长 10 天, 温度在 22 °C~28 °C 之间, 待生长高度为 12 cm 左右时, 选用高度基本一致的绿豆幼苗, 在子叶节下面 3 cm 处将根部剪掉, 取植株上部浸泡于不同浓度的腐植酸和吲哚乙酸 (IAA) 溶液中, 溶液置于 50 ml 离心管内, 内部溶液为 35 ml, 插入深度为 2.5 cm。人工气候箱中培养 10 天, 湿度 77%, 温度 26 °C, 光照与黑暗每 12 h 交替 1 次, 光照时光强 2000 Lux。期间观察绿豆再生根生长情况, 并及时补充培养液的数量; 于培养第 10 天时测定绿豆苗再生根鲜重、总根长、表面积、平均直径、根尖数指标。

### 1.4 测定项目与方法

风化煤元素含量由国土资源部太原矿产资源监督检测中心测定。总腐植酸与游离腐植酸含量参考 DB51/T 842—2008 标准方法测定<sup>[17]</sup>, 酸性基团含量参照《土壤有机质研究法》测定<sup>[18]</sup>, 全量钙镁参照

GB/T 19203—2003 采用四酸消煮法测定<sup>[19]</sup>。腐植酸溶液的 E4/E6、E270/E400、E280/E472、E472/E664 参考 Janis Kruminis 的研究测定<sup>[20]</sup>。

不同风化煤及其提取腐植酸的红外光谱分析使用傅立叶红外光谱仪(型号 VECTOR22)完成; 样品事先经 KBr 压片处理, 测试波长范围为 4000~400 cm<sup>-1</sup>, 分辨率 4 cm<sup>-1</sup>, 每一样品扫描 32 次取其平均值。

绿豆再生根鲜重用 1/10000 分析天平称重, 总根长、表面积、平均直径、根尖数 4 项指标使用 Epson 扫描仪扫描、WinRHIZO 软件处理数据。

### 1.5 数据处理与统计分析

采用 SPSS 22 软件对数据进行 One-way ANOVA 单因素方差分析, 采用 Duncan's 法对进行多重比较, 采用 LSD 法进行差异显著性检验 ( $\alpha=0.05$ )。红外光谱图采用 Origin 2018 制作, 其余图使用 WPS Office 2019 制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同来源风化煤及其提取腐植酸的元素含量

不同来源风化煤及其提取腐植酸的元素含量测定结果如表 2 所示。由表 2 可知, 风化煤和腐植酸

主要以碳、氧、氢三种元素为主,氮、硫两种元素含量较少;其中,碳元素含量范围为 61.76~75.38%,氧元素含量在 21.17~33.80%,氢元素含量在 2.22~

3.04% 之间。与风化煤相比,自该风化煤提取出的腐植酸碳、硫元素含量下降,氧、氢、氮元素含量均有不同程度上升。

表 2 不同来源风化煤及其提取腐植酸的化学元素含量  
Table 2 Chemical element content of humic acid extracted from weathered coals from different sources

材料 Material	来源 Different source	碳(%) Carbon(C)	氧(%) Oxygen (O)	氢(%) Hydrogen (H)	氮(%) Nitrogen(N)	硫(%) Sulfur(S)
风化煤	左权	63.16	32.91	2.94	0.31	0.68
	五台	75.38	21.17	2.22	0.32	0.91
	静乐	72.09	24.22	2.37	1.13	0.19
腐植酸	左权	61.76	33.80	3.04	0.98	0.42
	五台	70.06	25.77	2.34	1.11	0.72
	静乐	70.20	25.79	2.45	1.40	0.16

## 2.2 不同来源风化煤及其提取腐植酸的含氧官能团含量等性质特征

从表 3 中可以看出,左权、五台风化煤中总腐植酸含量没有显著性差异,且与静乐含量差异不大。3 地游离腐植酸的含量差异较大,且都有明显的显著性差异。计算出风化煤游离腐植酸含量占总腐植酸含量的百分比值(F/T 值)<sup>[6]</sup>看出,左权、五台和静乐风化煤差异较大,分别为 5.17%、27.16% 和 74.79%。风化煤的比值越大,钙镁呈现更低的含量,所以静乐风化煤钙镁含量最低。所提腐植酸中的游离腐植

酸含量较原煤明显升高,F/T 值增大,且相近。不同风化煤中各官能团含量有较大的差异,除五台和静乐的羧基含量差异不显著外,其余官能团都有明显的显著性差异。静乐风化煤的酚羟基含量是左权风化煤的 1.83 倍;左权风化煤的钙镁含量是五台风化煤的 1.25 倍,是静乐风化煤的 2.65 倍。其中,总酸性基团主要是由酚羟基含量组成,风化煤及所提腐植酸中酚羟基含量差异性显著,且远远高于羧基官能团的含量。

表 3 不同来源风化煤及其提取物中腐植酸类物质及含氧官能团含量

Table 3 Content of humic acids and oxygen-containing functional groups in weathered coals and their extracts from different sources

材料 Material	来源 Different source	总腐植酸含量 Total humic acid content (%)	游离腐植酸含量 Free humic acid content (%)	F/T 值 (%)	钙镁含量 Calcium and magnesium content (%)	总酸性基团 Total acid group (mmol g <sup>-1</sup> )	羧基含量 Carboxyl content (mmol g <sup>-1</sup> )	酚羟基含量 Phenolic hydroxyl (mmol g <sup>-1</sup> )
风化煤	左权	37.14 ± 0.56 b	1.92 ± 0.21 c	5.17	6.28 ± 0.26 a	1.64 ± 0.32 c	0.08 ± 0.02 b	1.56 ± 0.02 c
	五台	37.15 ± 0.30 b	10.09 ± 0.34 b	27.16	5.03 ± 0.15 b	2.52 ± 0.25 b	0.18 ± 0.03 a	2.34 ± 0.05 b
	静乐	40.94 ± 0.28 a	30.62 ± 0.22 a	74.79	2.37 ± 0.09 c	3.04 ± 0.27 a	0.19 ± 0.02 a	2.85 ± 0.03 a
腐植酸	左权	82.24 ± 0.21 b	67.86 ± 0.55 b	82.51	0.13 ± 0.08 c	1.37 ± 0.08 c	0.37 ± 0.03 b	1.00 ± 0.02 c
	五台	87.61 ± 0.87 a	72.77 ± 0.67 a	83.06	1.04 ± 0.06 b	2.38 ± 0.02 b	0.68 ± 0.05 a	1.70 ± 0.06 b
	静乐	79.29 ± 0.54 c	68.20 ± 0.38 b	86.01	1.74 ± 0.11 a	3.86 ± 0.06 a	0.34 ± 0.04 c	3.52 ± 0.03 a

注:3地风化煤、3地腐植酸之间的不同字母表示差异达5%的显著水平,相同字母表示没有显著水平。

## 2.3 不同来源风化煤及其腐植酸紫外光谱分析

表 4 紫外光谱结果表明,不同来源风化煤的紫外结果差异不大,腐植酸间的紫外结果差异较大,且都有明显的显著性差异。风化煤 E4/E6 值(在可见分光光度计上波长 465 nm (E4) 和 665 nm 处 (E6) 吸光度的比值)在 3.31~3.85 之间,制备出腐植酸的 E4/E6 值差异较大,左权腐植酸 E4/E6 值最高,是静乐腐植酸的 1.7 倍,表示左权分子量最小、碳含量最低。风化煤 E270/E400 值在 2.94~3.01 之

间,所提腐植酸的值在 3.08~3.97 之间,此比值表明酚类化合物在腐植酸中的分解程度,比率越高,分解越大,所以腐植酸的分解程度大小依次为左权、五台、静乐。E280/E472 的风化煤的范围是 4.14~4.42,所提腐植酸的范围是 5.04~7.15,其比值表明木质素与腐植化程度的关系,所以腐植酸中芳香族成分的聚合和缩合程度高低为左权、五台、静乐。风化煤 E472/E644 值在 3.03~3.5 之间,所提腐植酸的值在 3.88~6.56 之间,比值越低,腐植化程度越



表 4 不同来源风化煤及其腐植酸紫外光谱分析结果  
Table 4 Ultraviolet spectrum analysis of weathered coals and their humic acid from different sources

材料 Material	不同来源 Different source	E4/E6	E270/E400	E280/E472	E472/E664
风化煤	左权	3.85 ± 0.02 a	3.01 ± 0.03 a	4.40 ± 0.18 a	3.50 ± 0.07 a
	五台	3.71 ± 0.07 b	2.94 ± 0.02 b	4.14 ± 0.10 b	3.43 ± 0.02 b
	静乐	3.31 ± 0.08 c	2.99 ± 0.03 a	3.43 ± 0.02 b	3.03 ± 0.18 c
腐植酸	左权	7.50 ± 0.32 a	3.97 ± 0.24 a	7.15 ± 0.21 a	6.56 ± 0.13 a
	五台	6.20 ± 0.21 b	3.37 ± 0.02 b	5.75 ± 0.13 b	5.41 ± 0.21 b
	静乐	4.39 ± 0.01 c	3.08 ± 0.02 c	5.04 ± 0.03 c	3.88 ± 0.01 c

注: 3地风化煤、3地腐植酸之间的不同字母表示差异达5%的显著水平, 相同字母表示没有显著水平。

高, 因此静乐风化煤、静乐腐植酸的腐殖化程度更高。

## 2.4 不同来源风化煤钙镁含量与 E4/E6、F/T、酚羟基含量的关系

由图 1 可以看出, 风化煤中的钙镁含量与官能团中的酚羟基含量有明显的负相关关系, 所以风化煤中钙镁含量值越大, 则官能团中的酚羟基含量就越低; 与风化煤的 E4/E6 比值有明显的正相关关系, 所以风化煤中钙镁含量值越大, E4/E6 比值则越大;

与风化煤 F/T 值有明显的负相关关系, 因此风化煤中钙镁含量值越大, F/T 值就越低。钙镁含量与三者的线性回归方程如下: (1) 与酚羟基含量之间的关系为:  $y = -0.3083x + 3.6557$ ,  $R^2 = 0.8977$ ; (2) 与 E4/E6 值之间的关系为:  $y = 0.14x + 2.9848$ ,  $R^2 = 0.9957$ ; (3) 与 F/T 值之间的关系为:  $y = -17.821x + 116.52$ ,  $R^2 = 1$ 。图 1 的关系图可以说明钙镁含量高的风化煤中酚羟基的含量就比较低, F/T 值也小, 但 E4/E6 比值大。

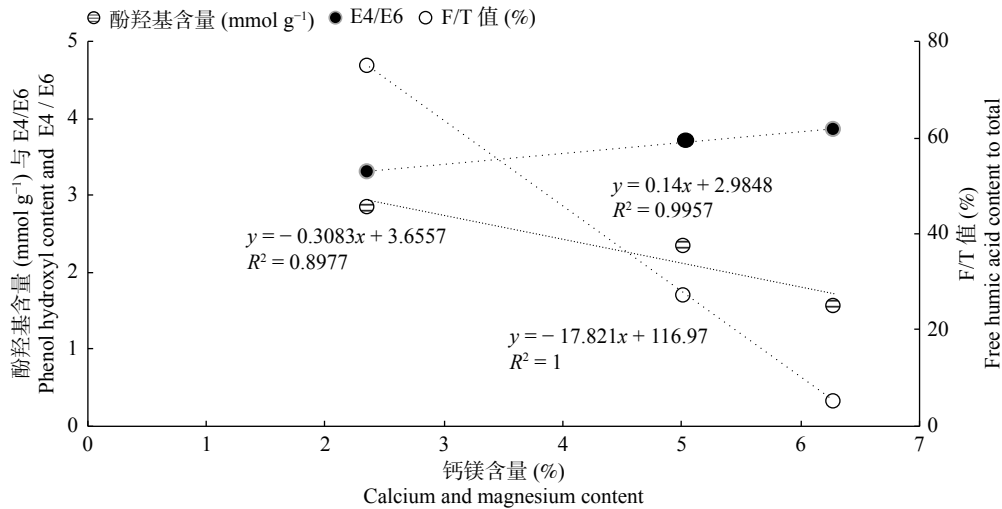


图 1 不同来源风化煤钙镁含量与 E4/E6、F/T、酚羟基含量的关系图

Fig.1 Relationship between calcium and magnesium content of weathered coal from different sources and E4/E6, F/T value and phenolic hydroxyl content

## 2.5 不同来源风化煤及其腐植酸红外光谱扫描结果

由图 2 可知, 3 地风化煤在  $4000 \text{ cm}^{-1} \sim 750 \text{ cm}^{-1}$  波数扫描出的红外光谱呈现的图像基本一致, 风化煤的主要特征吸收峰基本类似, 都有羟基伸缩振动以及碳氢伸缩振动。在  $3500 \text{ cm}^{-1}$  的波数处三者吸收峰都较宽, 且静乐峰面积最大, 该峰的形成是由于羟基的伸缩振动, 说明静乐的羟基含量最高, 与前文测定出静乐酚羟基含量最高结果相同。在  $1600 \text{ cm}^{-1}$  的波数处形成的吸收峰可能是由于羧基的振动,  $920 \text{ cm}^{-1}$  波数处形成的吸收峰是由形成羧基的 O-H 键的面外弯曲振动形成, 但峰面积较小, 所以羧基

含量低。其中, 左权风化煤峰面积最小, 羧基含量最低。

由图 3 可知, 3 地所提腐植酸利用红外光谱在  $1500 \text{ cm}^{-1} \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$  波数扫描, 呈现的图像走势也基本一致, 与图 2 风化煤的主要吸收峰一致, 且峰面积增大, 说明腐植酸的官能团含量增加。在  $3500 \text{ cm}^{-1}$  波数处的吸收峰由羟基振动形成, 所以左权羟基含量最高。波数  $920 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰代表的官能团是羧基, 静乐的峰面积最小, 所以静乐羧基含量最低。

## 2.6 不同来源风化煤所提腐植酸对绿豆的生物活性

由图 4 可知, 由于吲哚乙酸 (IAA) 具有促进植

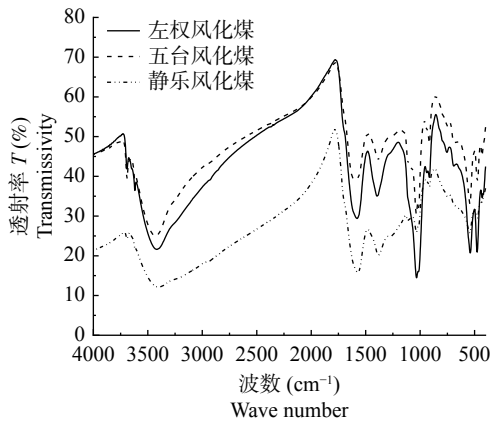


图 2 不同来源风化煤的红外光谱扫描结果  
Fig.2 Infrared spectrum scanning results of weathered coals from different sources

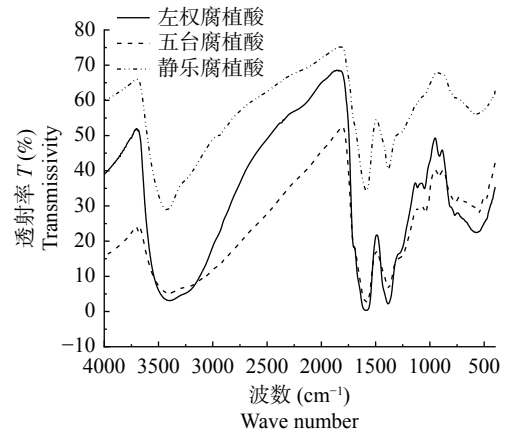


图 3 不同来源风化煤提取的腐植酸红外光谱扫描结果  
Fig.3 Infrared spectrum scanning of humic acids from different coals

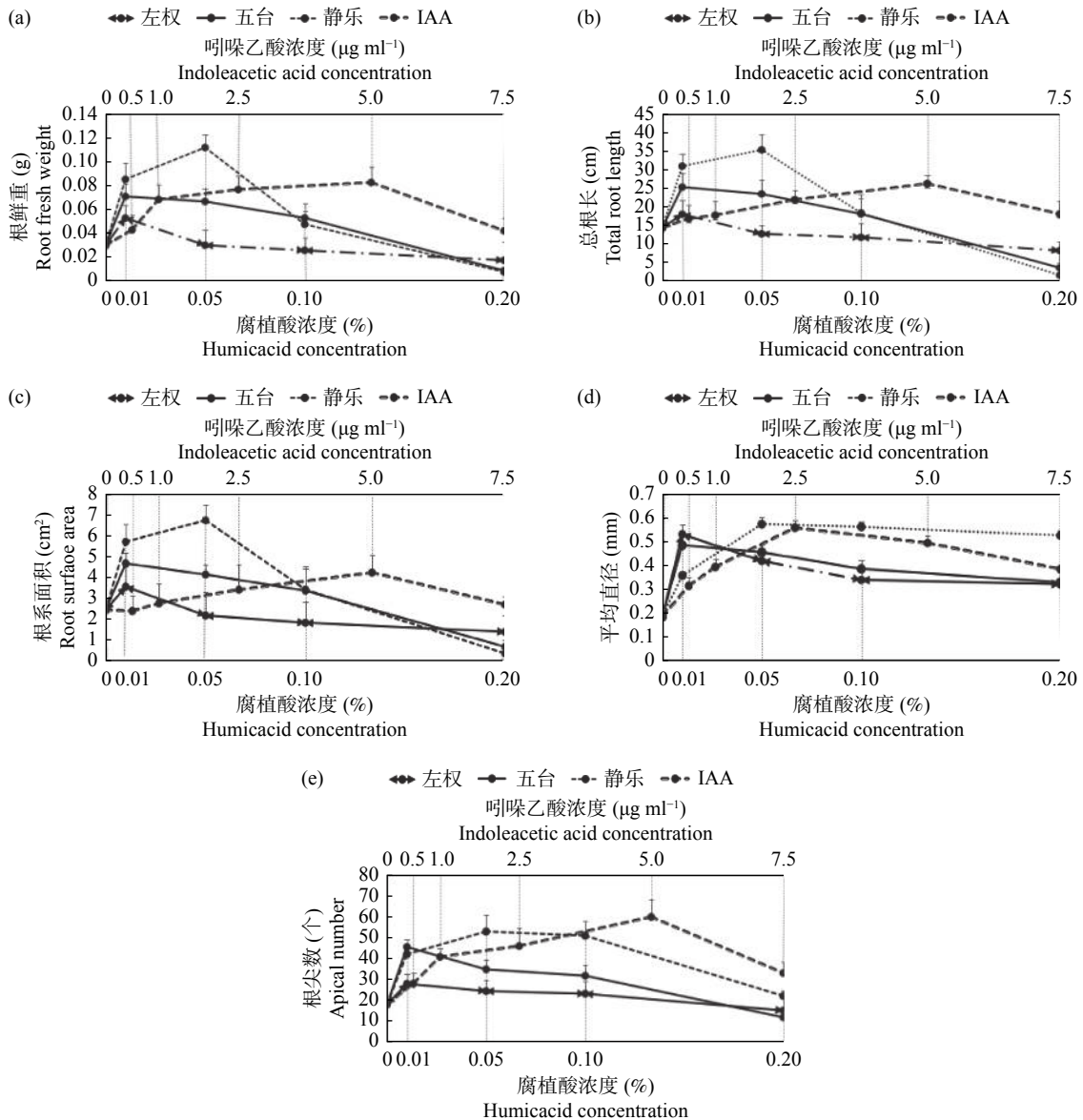


图 4 由不同风化煤提取的腐植酸对绿豆再生根的促进效果  
Fig.4 Promoting effect of humic acid extracted from different weathered coals on rerooting of mung bean

物生根的活性, 腐植酸也具有相似的促进功能, 且有低促高抑的生物刺激素功能, 因此将腐植酸处理结果与 IAA 处理结果进行比较, 以此判断腐植酸的促根活性与多少浓度 IAA 处理相当, 从而评价腐植酸的生物活性。由图 4 可知, 不同风化煤所提腐植酸对绿豆幼苗再生根的促进效果与 IAA 处理促进的作用相似, 随着处理浓度的增加, 呈现出低浓度条件下促进再生根, 高浓度条件下抑制再生根, 促进作用高于对照的纯水处理。除平均直径外, 其余 4 项指标在 IAA 为  $5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  处理浓度时, 促进绿豆再生根的能力最大。左权腐植酸和五台腐植酸的浓度为 0.01% 时, 静乐腐植酸的浓度为 0.05% 时, 促进绿豆再生根的能力最大。

由图 4 (a) 知, 与 IAA 处理的促生作用相比, 0.05% 静乐腐植酸促进绿豆再生根根鲜重的作用明显大于 IAA 的最佳处理, 单根重达 0.1113 g, 较 IAA 高出 35.56%; 0.01% 五台腐植酸处理促进绿豆再生根效果与 IAA 的最佳处理接近, 单根重达 0.0704 g; 0.01% 左权腐植酸处理介于 IAA 处理  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1} \sim 1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  之间, 单根重达 0.0524 g。由图 4 (b) 知, 与 IAA 处理的促生作用相比, 0.05% 静乐腐植酸对绿豆的再生根根长的促进作用明显优于 IAA 的最佳处理, 单根长达 35.46 cm, 较 IAA 高出 34.67%; 0.01% 五台腐植酸处理促进绿豆再生根根长效果与 IAA 的最佳处理接近, 单根长达 25.40 cm; 0.01% 左权腐植酸处理介于 0.01% 五台腐植酸与 0.05% 静乐腐植酸之间, 单根长达 18.06 cm。由图 4 (c) 知, 与 IAA 处理的促生作用相比, 0.05% 静乐腐植酸对绿豆的再生根根表面积的促进作用明显优于 IAA 的最佳处理, 根表面积达  $6.740 \text{ cm}^2$ , 较 IAA 高出 59.71%; 0.01% 五台腐植酸处理促进绿豆再生根效果与 IAA 的最佳处理接近, 单根表面积达  $4.663 \text{ cm}^2$ ; 0.01% 左权腐植酸处理介于 IAA 处理  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1} \sim 2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  之间, 单根面积为  $3.542 \text{ cm}^2$ 。由图 4 (d) 知, 与 IAA 的促进作用相比, 0.01% 五台腐植酸、0.01% 左权腐植酸和 0.05% 静乐腐植酸对绿豆的再生根平均直径的促进作用接近于 IAA 的最佳处理, 单根平均直径分别达 0.4837 mm、0.5297 mm 和 0.5729 mm, 其中静乐促进作用最大。由图 4 (e) 知, 与 IAA 的促进作用相比, 0.01% 左权腐植酸、0.01% 五台腐植酸和 0.05% 静乐腐植酸对绿豆的再生根根尖数的促进作用明显低于 IAA 的最佳处理。0.05% 静

乐腐植酸的根尖数达 53 个, 0.01% 五台腐植酸的根尖数达 46 个, 0.01% 左权腐植酸的根尖数达 28 个。综合分析, 3 地风化煤所提腐植酸对绿豆幼苗再生根的促生活性高低为: 静乐腐植酸 > 五台腐植酸 > 左权腐植酸。

### 3 讨论

风化煤中游离腐植酸含量差异较大, 左权为 1.92%, 五台为 10.09%, 静乐为 30.62%; 腐植酸中游离腐植酸含量趋于一致高达 70% 且明显高于风化煤, 其中静乐腐植酸含量最高。游离腐植酸含量升高的原因是 KOH 的提取使风化煤中的腐植酸得到纯化, 这与李家家<sup>[21]</sup>和钟世霞等<sup>[22]</sup>研究的结果一致。酸性基团有较强的疏水性, 能够产生更好的生物效应, 静乐腐植酸的总酸性基团含量高达  $3.86 \text{ mmol g}^{-1}$ 。本实验与杨敏等<sup>[23]</sup>的研究都证实了腐植酸中含有的活性官能团含量差异较大, 静乐风化煤的酚羟基含量是左权风化煤的 1.83 倍; 左权风化煤的钙镁含量是五台风化煤的 1.25 倍, 是静乐风化煤的 2.65 倍。静乐风化煤中酚羟基含量最高、钙镁含量最低。红外光谱显示静乐风化煤在  $3500 \text{ cm}^{-1}$  和  $920 \text{ cm}^{-1}$  处有较宽吸收峰, 其羟基和羧基含量最高。不同来源风化煤所提腐植酸的紫外结果差异较大, 贺婧等<sup>[24]</sup>研究结果表明 E4/E6 的比值越大, 分子量越小, 所以腐植酸的分子量较小; 静乐风化煤及其制备出的静乐腐植酸腐殖化程度更高。

3 地腐植酸对绿豆再生根均有促进效果, 生物活性大小为静乐腐植酸 > 五台腐植酸 > 左权腐植酸, 左权腐植酸和五台腐植酸在较低浓度 0.01% 条件下生物活性最高, 静乐腐植酸在 0.05% 条件下生物活性最高。静乐腐植酸对绿豆的再生根根鲜重达 0.1113 g, 较 IAA 高出 35.56%; 对绿豆的再生根根长达 35.46 cm, 较 IAA 高出 34.67%; 对绿豆的再生根根表面积达  $6.740 \text{ cm}^2$ , 较 IAA 高出 59.71%; 静乐腐植酸的根尖数达 53 个。3 地最适浓度对绿豆的再生根平均直径的促进作用接近于 IAA 的最佳处理, 单根平均直径达 0.5 mm。本文研究对绿豆活性所用的腐植酸与孙中新<sup>[25]</sup>研究马来酸依那普利所起的刺激作用相似, 施入外源物质后植株表现出类似添加不同生长素的刺激反应, 发挥腐植酸<sup>[26]</sup>的效能。Olaetxea 等<sup>[13]</sup>和张水勤等<sup>[15]</sup>的研究都表明腐植酸刺激主根和侧根伸长, 腐植酸对根表面积的促进作用

高出一倍<sup>[27]</sup>。

有学者认为,影响植物生物活性的因素主要是腐植酸组成中含有多酸性基团<sup>[28]</sup>和小分子量的特征<sup>[29]</sup>,本论文对绿豆再生根的结果与前人结论相一致,也认为与酸性基团、小分子结构有关。Marcelle 等<sup>[30]</sup>研究表明产量增加,说明发挥了腐植酸生物活性的作用。

## 4 结论

来源山西左权、五台和静乐三地的风化煤总腐植酸含量在 37.1%~40.9%,其游离腐植酸含量差异较大,分别为 1.92%、10.09% 和 30.62%;钙镁含量相差也较大,比值为 2.65:1.25:1.00;三地风化煤的 E4/E6 差异不大,而由风化煤所制备出的腐植酸的 E4/E6 值差异却较大,分别为 7.5、6.2 和 4.39;由三地风化煤提取的腐植酸对绿豆再生根均有与 IAA 类似的促进作用,其效果大小表现为静乐腐植酸>五台腐植酸>左权腐植酸,且左权和五台风化煤提取的腐植酸在 0.01%、静乐风化煤提取的腐植酸在 0.05% 浓度条件下生物活性最高。

综上所述,由不同来源风化煤制取的腐植酸的生物活性不同,而腐植酸的活性与其活性基团种类和数量有关。风化煤钙镁含量越低、游离腐植酸含量越高,从中提取的腐植酸的总酸性基团含量越大,其生物活性也越高。

**致 谢** 特别感谢各位老师的悉心指导,感谢实验过程中帮助我的同学以及环资所提供的实验条件。

## 参考文献:

- [1] 贾丹莉. 风化煤对苏打盐化土盐分离子及有机碳组分的影响[D]. 山西大学, 2017.
- [2] 张恒源, 朱旭东, 刘汉斌, 等. 山西低阶煤分布特征分析和开发利用前景[J]. *矿产勘查*, 2020, 11(11): 2440-2447.
- [3] 赵 燕, 何德民, 尚建选, 等. 褐煤空气氧解生产腐植酸及腐植酸絮凝研究[J]. *化学工程*, 2019, 47(11): 74-78.
- [4] 若 禹, 张 盼, 马鸿文. 赤峰某地褐煤制取腐植酸钾实验研究[J]. *应用化工*, 2017, 46(9): 1720-1722+1727.
- [5] 王家盛, 茹铁军, 李香红. 原煤中腐植酸的活化处理研究[J]. *磷肥与复肥*, 2011, 26(2): 10-11.
- [6] 李 丽, 冉 勇. 超滤分级研究腐植酸的结构组成[J]. *地球化学*, 2004, 33(4): 387-394.
- [7] 瞿昌毓. 褐煤制备腐植酸工艺优化及其结构特性的研究[D]. 昆明理工大学, 2020.
- [8] 王学江, 袁 蕊, 李 峰, 等. 山西风化煤腐植酸活化研究[J]. *磷肥与复肥*, 2017, 32(8): 10-12+41.
- [9] 胡一奇, 张 强, 杨治平, 等. 超声波-KOH联合提取腐植酸工艺研究[J]. *山西农业科学*, 2019, 47(2): 235-238.
- [10] 张传祥, 张效铭, 程 敢. 褐煤腐植酸提取技术及应用研究进展[J]. *洁净煤技术*, 2018, 24(1): 6-12.
- [11] 于 建, 吴钦泉, 洪丕征, 等. 简述生化腐植酸的功能、制备及其肥料应用[J]. *腐植酸*, 2016, (2): 6-10.
- [12] 王思怿, 商照聪, 于秀华, 等. 腐植酸的研究进展及相关欧盟管理制度解析[J]. *化肥工业*, 2019, 46(1): 1-4+72.
- [13] Olaetxea M, Mora V, Bacaicoa E. Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids[J]. *Plant physiology*, 2015, 169(4): 2587-2596.
- [14] Silva-Matos RRS, Cavalcante IHL, Júnior GBS, et al. Foliar spray of humic substances on seedling production of watermelon cv. Crimson Sweet[J]. *Journal of Agronomy*, 2012, 11(2): 60-64.
- [15] 张水勤, 袁 亮, 林治安, 等. 腐植酸促进植物生长的机理研究进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(4): 1065-1076.
- [16] 闫嘉欣. 不同来源风化煤腐植酸活化提取与活性研究[D]. 山西大学, 2020.
- [17] 《含腐植酸水溶肥料》标准主要技术指标及腐植酸含量的测定[J]. *腐植酸*, 2019(3): 61-63.
- [18] 文启孝. 土壤有机质研究法[M]. 农业出版社. 1984, 137-142+143-145.
- [19] 桂 坤, 桂 鹏, 王 刚, 等. 褐煤中腐植酸活化实验研究[J]. *磷肥与复肥*, 2017, 32(7): 22-23.
- [20] Janis Krumins J, Yang Z, Zhang Q, et al. A study of weathered coal spectroscopic properties[J]. *Energy Procedia*, 2017, 128: 51-58.
- [21] 李家家. 超声波活化风化煤对土壤中汞形态及土壤酶活性的影响研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [22] 钟世霞, 徐玉新, 骆洪义, 等. 超声波活化风化煤腐植酸的影响研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 45(1): 6-9, 16.
- [23] 杨 敏, 王红斌, 戴 云. 山基土中腐植酸的提取及其红外光谱[J]. *腐植酸*, 2008, (3): 42.
- [24] 贺 婧, 颜 丽, 杨 凯. 不同来源腐植酸的组成和性质的研究[J]. *腐植酸*, 2008, (3): 43.
- [25] 孙中新. 马来酸依那普利对绿豆下胚轴插条生根的影响[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(1): 92-93.
- [26] 何一通, 孙志梅. 煤炭腐植酸作为土壤改良剂对土壤物理性质和小麦产量的影响[J]. *腐植酸*, 2016, (3): 26-32.
- [27] Urazova T S, Bychkov A L, Lomovskii O I. Mechanochemical modification of the structure of brown coal humic acids for preparing a sorbent for heavy metals[J]. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2014, 87(5): 651-655.
- [28] 谢尚强, 王文霞, 张付云, 等. 植物腐植酸研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(3): 487-496.
- [29] Trevisan S, Botton A, Vaccaro S. Humic substances affect arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 74: 45-55.



[ 30 ] Marcelle M, Bettoni, Átila F, et al. Idoia Garmendia. Nutritional quality and yield of onion as affected by different application

methods and doses of humic substances[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2016: 51.

## Chemical Characteristics and Bioactivity of Humic Acids from Weathered Coals with Different Sources

HOU Xiao-chan<sup>1</sup>, ZHANG Qiang<sup>1</sup>, YANG Zhi-Ping<sup>1</sup>, YAN Min<sup>1\*</sup>, WU Wen-li<sup>1</sup>,  
MARIS Klavins<sup>2</sup>, WANG Yong-liang<sup>1</sup>

(1. Shanxi Key Laboratory of Soil Environment and Nutrient Resources, Taiyuan 030031, China;

2. Department of Environmental Science, University of Latvia, Raina Blvd. 19, Riga, LV-1586, Latvia)

**Abstract:** [Objective] To explore the differences in biological activity of humic acids derived from weathered coals of different sources, this study clarified the relationship between their biological activities and the properties of weathered coal, so as to provide a reference for finding out active humic acids from weathered coal. [Method] The weathered coal samples from Zuoquan, Wutai and Jingle in Shanxi Province were collected, treated with different methods and subjected to plant culture tests. The processing chemical characteristics and biological activity of humic acids derived from weathered coal samples of different origins were compared and analyzed with ultraviolet spectrometry, infrared spectrometry and root scanning. [Result] The results showed that the total humic acid contents of weathered coal from Zuoquan, Wutai and Jingle were between 37.1% and 40.9%, but the free humic acid contents varied greatly (1.92%, 10.09% and 30.62%, respectively). The content of total acidic functional group phenolic hydroxyl was significantly different, and the content ratio of the three samples was 1.00 : 1.22 : 1.83. The hydroxyl group content and carboxyl group content of weathered coal samples from Jingle was the highest. The content ratio of calcium to magnesium among the three samples was 2.65 : 1.25 : 1.00. There was small difference in the E4/E6 value of different weathered coal samples, but the E4/E6 value of humic acids extracted was 7.5, 6.2 and 4.39, respectively. Bioactivity assays showed that humic acids derived from the weathered coal samples of the three places promoted the regeneration of mung bean roots, showing a typical hormone response similar to that induced by IAA. The weathered coals were ranked as Jingle sample > Wutai sample > Zuoquan sample based on the growth-promoting activities of their humic acids. The highest growth-promoting activity of humic acid was found at 0.01% in Zuoquan sample and Wutai sample, 0.05% in Jingle sample. [Conclusion] Among the humic acids extracted from the weathered coals of three origins, the Jingle sample has the highest biological activity, followed by the Wutai and Zuoquan samples. The lower the contents of calcium and magnesium are in weathered coal, the higher the contents of free humic acids are. The wider the absorption peak of hydroxyl is in infrared spectrum, the higher the content of total acidic groups is, the higher the biological activity of humic acid is. The results provide references for the selection of high-quality weathered coal used as raw materials for humic acid production, and the appropriate concentrations of humic acids in the application.

**Key words:** Weathered coal; Humic acid; UV spectrum; Infrared spectrum; Somatotrophic activity

[责任编辑: 刘轶飞]