



重新认识土壤有机质

渠晨晨, 任稳燕, 李秀秀, 蔡鹏, 陈雯莉, 黄巧云*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: qyhuang@mail.hzau.edu.cn

以腐殖质为主要成分的土壤有机质占土壤固相组成的2%~8%, 是土壤中养分元素的承载者、微生物活动的驱动者以及矿质转化的调节者, 对于土壤功能的发挥起着关键作用。早在19世纪初, 德国土壤学者Döbereiner^[1]和Sprengel^[2]就提出“humic acids”概念。有学者利用碱提取和酸沉淀的方法将土壤有机质分成富里酸、胡敏酸以及高度缩合、惰性的胡敏素等不同组分^[3,4]。随后, 基于不同类型植物残体的培养研究, 发现木质素分解与腐殖酸积累显著相关, 由此提出了腐殖质的木质素形成理论, 认为土壤有机质主要来自于植物残体^[5,6]。1994年, Stevenson^[7]总结了腐殖质的定义, 指出腐殖质是未指明、转化的、深色、不均匀、无定形的高分子物质, 成为几十年来土壤学及相关学科对腐殖质分子结构认识的主流观点。腐殖质形成过程和木质素来源理论, 近年来得到了¹³C核磁共振(¹³C-nuclear magnetic resonance, ¹³C-NMR)和高分辨质谱证据的支持。

现代分析技术的进步有力推动了土壤有机质的研究。21世纪初, Lehmann等人^[8]和Myneni等人^[9]利用扫描透射X射线显微技术对土壤有机质原位分析, 发现土壤有机质分子组成复杂, 在纳米尺度上存在异质性, 暗示土壤中可能并不存在所谓的“腐殖质”大分子。此外, 扫描电子显微镜在土壤颗粒表面观察到大量微生物残体^[10], ¹H核磁共振也指出腐殖质主要由微生物来源的生物分子组成^[11,12]。基于这些实验证据, Lehmann和Kleber^[13]提出了土壤有机质连续体(soil continuum model, SCM)的概念模型。他们认为土壤有机质只存在连续分解的过程, 有机质的稳定不受分子结构控制, 而受矿物吸附、团聚作用的影响^[12-14]。这一学说向传统腐殖质理论发起了挑战, 认为碱提取的土壤芳香化合物可能是人为操作产物^[15]。这一观点的提出促使人们重新审视土壤有机质的来源和结构, 对土壤有机质本质的认识也逐渐从笼统的腐殖质大分子向明确的植物、微生物残体过渡(图1)。

土壤有机质既是土壤质量和健康的关键指标, 又是温室气体的重要来源。作为地球陆地生态系统最重要的碳源和碳汇, 土壤有机质的性质、组成、来源和稳定性一直受到持续关注, 但关于有机质的来源和分子量仍存在很大的争议^[25-28]。近年来, 土壤有机质研究不断涌现出新理论、新方法, 对传统土壤学的认知提出了巨大的挑战。我们需要仔细总结土壤



渠晨晨 博士, 华中农业大学博士后。主要研究土壤矿物-微生物-有机质复合界面有机碳和重金属的固定机制。



黄巧云 博士, 华中农业大学教授。主要研究土壤矿物-微生物界面反应及其环境效应, 土壤组分互作界面碳、氮等生源要素及污染元素的生物地球化学行为, 重金属污染土壤修复等。

有机质的研究现状, 明确土壤有机质的来源和结构, 重新思考和认识土壤有机质的本质。厘清土壤有机质研究存在的争议, 是进一步阐明其形成过程, 揭示稳定机制, 进行定量模拟, 制定合理管理方法和增加碳封存的关键。因此, 本文在回顾腐殖质理论建立及发展历史的基础上, 梳理土壤有机质理论的演变、有机质分子组成和结构的最新实验证据, 提出未来土壤有机质研究的重点方向和内容, 以推动土壤有机质研究的深入。

1 传统土壤腐殖质理论及其新证据

传统的土壤有机质理论认为, 动植物残体分解过程中形成的小分子物质, 能够在酶或矿物作用下缩合, 形成聚合程度更高的高分子化合物—腐殖质。土壤中小分子有机化合物的聚合过程主要受真菌的驱动, 在胞外酶催化下形成酚自由基和醌, 进一步与其他酚类及氨基酸类物质中的NH₂⁻和SH⁻

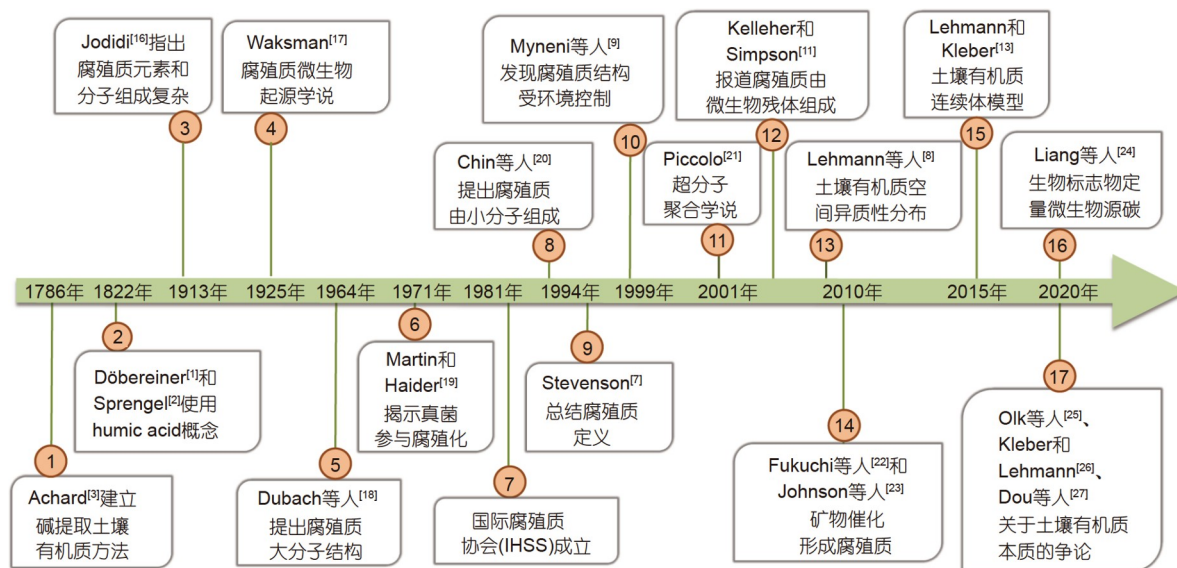


图1 (网络版彩色)土壤有机质研究的历史演变
Figure 1 (Color online) Research history of soil organic matter

通过亲核反应聚合,或通过氢键与醌类物质结合形成更稳定的芳香结构含氮化合物^[19,29]。酚氧化酶、漆酶、苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶等参与的反应可能形成了腐殖质的前驱物,这些前驱物与植物源残体的结构截然不同^[30]。聚酮合成酶可进一步催化土壤可溶性小分子形成多酮类聚合物,目前已知明确结构的多酮类聚合物多达100000个^[31]。此外,土壤黏粒矿物,尤其是铁、锰等金属氧化物,也可通过催化亲核加成反应或形成自由基,促进有机分子的聚合^[22,23,32-34]。这些反应可能是土壤腐殖质形成的重要潜在机制。

基于¹³C-NMR的研究提供了更多土壤腐殖质的证据。将传统碱和酸分离得到的富里酸、胡敏酸和胡敏素重新混合,¹³C-NMR分析发现混合产物与未处理的土壤有机碳结构相同,证明了传统的碱浸提方法不会改变土壤有机碳的官能团组成,表明土壤腐殖质并非提取过程人为造成的产物^[35]。对丹麦3种不同类型土壤28种腐殖质的元素组成及液态¹³C-NMR的分析发现,氨基酸和糖类物质普遍存在于自然土壤中。这一证据支持了木质素残体-氨基酸共价键结合形成土壤腐殖质的反应模型^[36]。此外,利用¹³C-NMR发现土壤腐殖质中存在大量的芳基酮、非质子化烷基和丰富的羧基碳,这些结构与未分解的生物残体存在显著的区别^[37]。上述结果表明,植物、微生物残体的分解产物可进一步参与腐殖化过程。

高分辨离子回旋共振质谱(Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-ICR-MS)可以直接提供腐殖质分子的化学多样性信息。研究发现,土壤胡敏酸中脂类和稠合芳烃类物质的比例高于可溶性有机质(dissolved organic matter, DOM);而随腐殖化程度的增加,腐殖质中木质素类物质含量降低^[38,39]。进一步对不同水分条件土壤中的胡敏酸

分析,发现它们都由木质素类、含羧基的脂环族类与缩合芳香族3种主要分子组成,分别占质谱识别分子数的38%、41%和26%^[40,41]。这些丰富的木质素和缩合芳香结构证明木质素与腐殖质存在密切的关联^[42]。此外,对西班牙35个土壤中有机分子丰度、有机碳含量的偏回归分析发现,土壤有机碳累积与木质素衍生物及不饱和脂类物质含量显著正相关^[43]。这些研究从有机质分子组成的角度支持了腐殖质的木质素起源学说。

2 土壤有机质来源的争议

长期以来,土壤学家认为,土壤有机质是由植物残体在土壤微生物的分解、合成作用下形成,微生物推动着植物来源的有机质在土壤中的循环和转化。基于土壤微生物生物量碳仅占土壤总有机碳的5%以下,过去主流的观点普遍认为,植物来源的有机质主导了土壤碳库的组成^[44]。但是,土壤有机质的来源一直存在很大的不确定性。早在1925年,Waksman^[17]就指出了土壤腐殖质的微生物来源本质。近年来,越来越多的研究显示,微生物对土壤有机质积累的作用和贡献被极大地低估^[45,46]。吸收马尔科夫链计算表明,土壤微生物残体的有机碳储量可高达活体有机碳的40倍^[44]。利用氨基糖生物标志物计算发现,温带地区草地、农田和林地土壤微生物源碳占土壤总有机碳的比例分别为62%、56%和33%^[24]。最近,对60多个土壤总氨基糖的数据总结发现,微生物源碳在大团聚体中较多,占总有机碳的47.2%,而在粉黏粒中为38.6%^[47]。Miltner等人^[10]利用扫描电子显微镜,在土壤颗粒表面原位观察到大量微生物残体碳的存在。这些研究明确了土壤有机质的微生物来源,认为微生物残体是土壤有机质积

累的主要驱动因素。

此外,从分子结构的角度,NMR实验证据支持了土壤有机质大部分直接来源于微生物残体的观点。早在1981年,基于固相 ^{13}C -NMR分析土壤有机碳的结果显示,土壤有机质分子以烷基碳为主,而传统认为含量丰富的芳香碳仅占土壤总有机碳的15%~37%,对传统腐殖质芳香结构的认识提出了挑战^[48]。随后,利用 ^1H -NMR的研究发现,土壤可提取腐殖质中微生物来源组分的贡献可达50%以上,同时土壤中高于80%的氮来源于微生物^[11,12]。综合多相NMR(CMP-NMR)对原位状态下土壤固液界面有机质分布的分析发现,土壤有机质主要由降解的生物大分子组成,脂和糖类的极性端暴露在水界面,而木质素和微生物残体位于有机质层的内部^[49]。此外,越来越多研究证明,土壤腐殖质并不是稳定不变的,而是受到土壤生物等因素的调控。例如, ^{13}C -NMR结合分子混合模型计算,发现大陆尺度土壤有机碳的分子组成差异较大,存在植物木质素与微生物蛋白类物质的权衡关系,受到土壤微生物群落组成的调控^[50]。农业生态系统中,肥料施用通过促进土壤微生物活动降低了腐殖质中芳香类物质的含量^[51]。这些研究表明,腐殖质不是稳定、均一的有机分子,其结构和组成是土壤微生物选择性的产物。

3 土壤有机质是大分子还是小分子

分子量及空间聚集形式是土壤有机质的一个重要性质,在一定程度上决定了有机质的移动性和生物稳定性。分子量也是反映土壤有机质本质的重要指标。腐殖化理论认为,土壤有机质通过共价键聚合,形成大分子物质。一般认为有机质分子量大于5000道尔顿(Da)的为高分子。早期以蛋白和多糖为标样,利用葡聚糖凝胶色谱分析发现,土壤80%的胡敏酸分子量在5000~10000 Da之间^[18,52]。而河流胡敏酸中分子量在5000~10000 Da之间的占27%~48%,分子量大于200000 Da的占25%~51%^[53]。利用超滤分离技术,发现黑钙土胡敏酸中只有20%的有机质可以透过5000 Da的滤膜^[54]。以聚苯乙烯磺酸钠为标样,利用高效液相-体积排阻色谱(high performance size-exclusion chromatography, HP-SEC)分析发现,日本不同类型土壤胡敏酸的重均分子量在3160~28200 Da之间^[55,56]。类似地,利用折射率检测器分析水稻土、泥炭和沉积物中的胡敏酸,获得重均分子量范围为5899~15533 Da^[57]。这些结果表明,腐殖质分子量分布范围较宽,且受环境条件影响巨大。近年来,逐渐意识到色谱分离方法在评估腐殖酸分子量上的局限性,这一方法测定的分子量被称为表观分子量。

然而,一些实验证据显示,土壤腐殖酸可能主要由小分子组成。Zeile^[58]和Fuchs等人^[59]通过测定沸点和扩散系数,较早指出土壤腐殖酸的分子量为1400~1650 Da。在中性pH条件下,利用聚苯乙烯磺酸钠为标样,高效液相-体积排阻色谱分析得到Aldrich胡敏酸的重均分子量为4100 Da^[20]。而向腐殖质中添加乙酸则破坏了分子间的氢键,增加了小分子物质的

分布,表明腐殖质大分子是由小分子物质通过疏水力和氢键等弱相互作用团聚而成^[21]。Myneni等人^[9]利用原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)及X射线扫描透射显微原位观测技术发现,腐殖质的聚集状态受pH及离子强度控制,腐殖酸尺寸随pH和离子强度的增加显著减小,推测腐殖质可能是由较小有机分子聚合而成的产物。同样,利用扫描电子显微镜发现,土壤胡敏酸的聚集度随pH升高而降低,尺寸变小^[60]。此外,借助X射线扫描透射显微技术,在50 nm空间分辨率原位观测土壤颗粒表面有机碳的结构及分布,发现土壤有机碳空间分布具有极大的异质性,这从土壤有机质的原位表征方面进一步向土壤腐殖质大分子理论发起了挑战^[8,61]。可见,越来越多的证据支撑了土壤有机质主要由小分子聚合而成,同时存在较大的空间异质性(图2)。

为了解释小分子团聚现象,有学者提出了“超分子”聚集学说^[21,62],认为腐殖质大分子是由有机小分子片段通过氢键和疏水相互作用自组装聚集而成。这一理论很好地解释了腐殖质结构随pH/离子强度等条件变化,腐殖质中存在氨基酸片段,以及质谱分析胡敏酸获得大量低分子量物质的现象^[63,64]。近年来,随着氢键理论的发展,逐渐认识到有机分子之间可能存在不同强度的氢键,它们可形成强度接近于共价键的稳定结构^[65~67]。基于有机质小分子理论,SPARC's和线性自由能模型计算发现,有机质官能团特性与实验分析结果符合^[68]。这些实验证据及研究结果为土壤腐殖质是由小分子聚合而成的假说提供了强有力的支撑。这些不同的有机质理论将对应截然不同的土壤管理方法和目标(表1)。

4 土壤有机质研究的技术瓶颈

土壤有机质的主体部分是与矿物结合的有机无机复合体,过去对土壤有机质的研究大多基于化学分离提取。常用提取方法中,水仅能提取土壤中不到1%的有机碳^[69]。而碱溶液是应用最多且最有效的提取方法,可提取土壤中超过50%的有机质^[25]。但是提取过程中氧气会与有机质反应,改变土

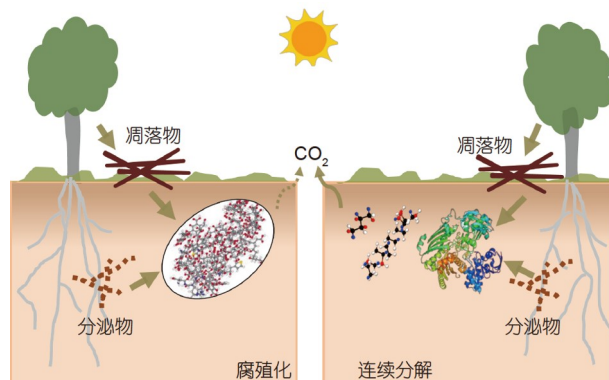


图2 土壤有机质周转的腐殖化和连续体模型

Figure 2 The humification and continuum decomposition models of soil organic matter

表 1 不同有机质理论下的土壤管理方法和目标

Table 1 Methods and objectives of management strategies under different soil organic matter theories

腐殖质理论		有机质连续体模型
稳定机制	分子抗性	矿物表面吸附及团聚
土壤呼吸	不利于有机碳积累; 提高腐殖化程度, 降低异养呼吸速率	恒定的土壤呼吸是维持生态系统服务功能的基础
升温	分子抗性决定有机质温度敏感性	酶效率和土壤环境变化影响碳周转
降水	缺氧导致腐殖化降低	限制微生物呼吸及碳利用
氮沉降	腐殖化程度增加	影响有机质周转复杂的生化过程
维持土壤健康	增加腐殖质含量	持续输入微生物可利用有机质

壤有机质的结构^[26,70]. 为了避免碱性条件下的不利反应, 中性焦磷酸盐溶液也常用来提取土壤有机质, 提取效率约为土壤总有机质的10%~15%^[71,72]. 高浓度尿素可进一步破坏分子间氢键, 与碱溶液配合, 可使有机质的提取效率增加约10%^[73]. 此外, 有机溶剂如二甲基亚砷、甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺等溶解腐殖质的能力与碱溶液相当, 也被用来提取土壤有机质^[74,75]. 但是由于有机试剂各自独特的介电常数和偶极矩, 导致它们对有机质组分的提取具有偏好性(表2). 例如, 丙酮主要溶解土壤中的脂肪烃组分^[76]. 可见, 单一试剂不足以充分提取土壤有机质, 可能需要应用多种方法的联合, 提高土壤有机碳的提取效率.

氨基糖生物标志物和高分辨质谱是目前评估土壤有机质来源的主要手段. 通过氨基糖标志物法计算获得的土壤微生物来源碳可占总有机碳的33%~62%^[47,77]. 而利用质谱则发现土壤胡敏酸主要由木质素类、含羧基的脂环族类与缩合芳香族3种主要分子组成, 分别占质谱识别分子数的38%、41%和26%, 证明胡敏酸可能主要是植物来源^[41]. 这两种方法的分歧说明, 单一的手段可能不足以准确评估土壤有机质来源. 生物标志物法存在转化系数不准确、提取效率低等问题; 质谱方法存在提取效率低、分析不完全的问题. 此外, 质

谱数据解析也可能存在误差, 与仅使用碳、氢、氧、氮元素组成相比, 在分子式中添加硫元素可以使指定峰的数量增加17%, 而磷元素的添加进一步增加了11%的分配峰^[42]. 多种标志物与高分辨质谱结合的方法, 将能最大程度解析土壤有机质的组成及来源.

化学提取破坏了有机质的空间结构, 而对土壤颗粒直接表征能获得有机质组成及分布的原位信息(图3). 利用综合多相NMR, Simpson课题组^[49]分析了土壤固液界面有机质的空间结构, 并提出了立体的分子排列模型. 然而, 这一技术仅能获取土壤颗粒垂直方向上有机质分布的平均信息. 扫描透射X射线显微结合近边结构(scanning transmission X-ray microscopy near-edge X-ray absorption fine structure, STXM-NEXAFS)展示了土壤层状硅酸盐矿物、铁铝氧化物、Ca等矿质组分与有机分子在数十纳米空间分辨下的分布规律^[78]. 结果发现, 草地土壤中铁氧化物和层状硅酸盐矿物对有机碳固定起着同等重要的作用, 而Ca与有机碳分布的相关性最强^[79]. NanoSIMS具有相似的空间分辨率, 结合同位素示踪可进一步区分土壤表面新鲜输入的碳、氮等元素^[80]. 该技术发现淋溶土中被有机碳覆盖的矿物表面低于19%, 来源于秸秆的新碳优先固定在矿物-有机复合体上^[81], 而土壤中新形成

表 2 常用土壤有机质提取剂及其优缺点^{a)}

Table 2 The commonly used extractants for soil organic matter

	$K_r^{b)}$	EF ^{c)}	$pK_{HB}^{d)}$	$\delta_h^{e)}$	优点	缺点
水	78.5	144.4	-	0	温和、方便	效率低
NaOH	-	-	-	-	方便、效率极高	破坏有机质结构
焦磷酸钠	-	-	-	-	温和、效率高	灰分含量高
尿素	-	-	-	-	温和、提高效率	与有机质结合
甲酰胺	109.5	369.0	-	9.3	温和、效率高	提取特定组分
二甲基亚砷	46.6	209.2	2.53	5.0	温和、效率高	提取特定组分
吡啶	12.4	-	1.88	2.9	温和、效率高	与有机质结合
乙醇	24.3	40.8	-	9.5	温和、方便	效率低
丙酮	20.7	59.6	1.18	3.4	温和	提取特定组分

a) “-”表示未获得数据; b) 相对介电常数; c) 静电因子; d) 氢键受体系数; e) 氢键参数

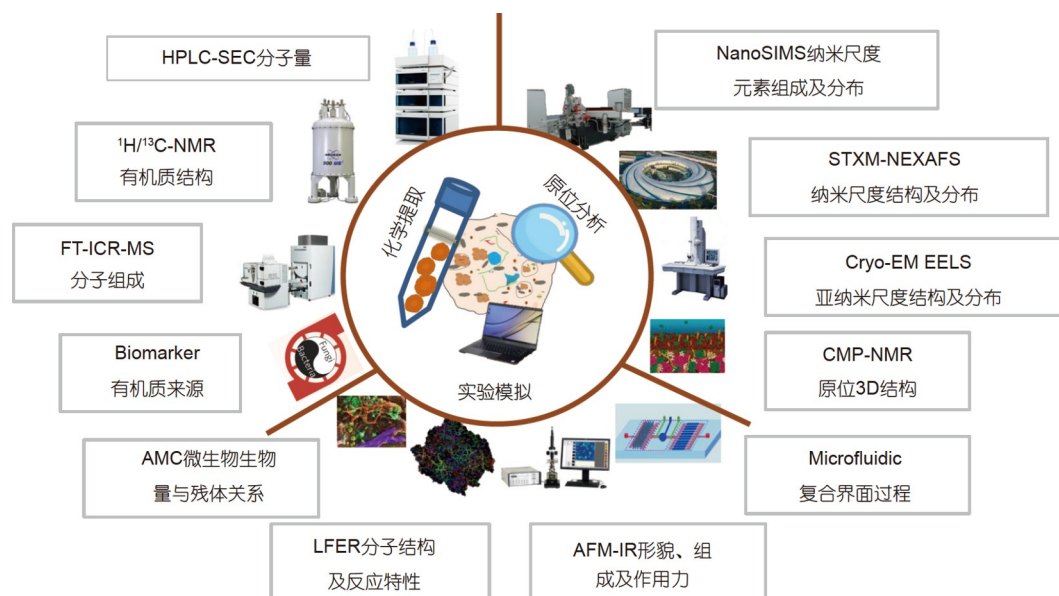


图3 土壤有机质的研究方法。HPLC-SEC, 液相-体积排阻色谱; FT-ICR-MS, 离子回旋共振质谱; AMC, 吸收马尔可夫链; LFER, 线性自由能模型; AFM-IR, 原子力显微镜红外光谱仪; CMP-NMR, 综合多相核磁共振; STXM-NEXAFS, 扫描透射X射线显微及近边结构; Cryo-EM EELS, 冷冻电子显微镜-电子能量损失谱; NanoSIMS, 纳米二次离子质谱

Figure 3 The research techniques of soil organic matter. HPLC-SEC, high-performance liquid chromatography-size-exclusion chromatography; FT-ICR-MS, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; AMC, absorbing Markov chain; LFER, linear free energy relationship; AFM-IR, atomic force microscopy-based infrared spectroscopy; CMP-NMR, comprehensive multiphase nuclear magnetic resonance; STXM-NEXAFS, scanning transmission X-ray microscopy near-edge X-ray absorption fine structure; Cryo-EM EELS, cryogenic electron microscopy with electron energy loss spectroscopy; NanoSIMS, nano-scale secondary ions mass spectrometry

的含氮化合物则优先与矿物结合^[82]。但是, 这些技术的空间分辨率仍然有限, 不能获取有机质单分子的信息; 此外, 受机时限制, 也没有广泛应用于土壤有机质的研究。未来发展具备高空间及化学分辨的原位表征技术, 或者不同技术手段的联用, 可进一步深入揭示土壤有机质分子的结合机制。

土壤是多相多组分的复杂体系, 有机质的分解和转化过程大多在各种土壤界面进行, 如酶多以固定的形式存在于固体颗粒表面, 土壤活性矿物可能改变酶参与的表面生物化学反应速率及方向。然而, 目前酶促反应、微生物合成作用的研究大多来自简单的混合悬液体系^[83-85]。忽视矿物-有机界面物理化学作用、单纯考察生物化学作用并不能完全代表真实的土壤有机质形成过程。另一方面, 土壤矿物和土壤化学家逐渐关注到活性矿物对有机质周转的催化作用, 尤其是铁锰金属氧化物在有机质聚合及降解中起着重要的作用^[33]。在土壤环境中, 这些活性矿物与微生物共存, 它们一方面可以帮助微生物降解有机质; 另一方面可能通过细胞毒害抑制微生物活性^[86-88]。矿物-有机质-微生物界面反应原位观测技术平台的缺乏, 限制了土壤多组分耦合体系有机碳形成及积累机制的研究。

5 总结与展望

人类面临越来越严峻的全球气候变化的挑战, 未来世界

各国将持续关注温室效应、碳排放等相关议题。中国要在2060年实现碳中和目标, 土壤应当在碳汇功能中发挥更大的作用, 增加土壤有机碳封存, 减少土壤碳排放尤为重要。近年来, 研究发现, 植物残体的积累、微生物体内分解和合成、土壤酶对有机质的胞外修饰、活性矿物催化聚合和分解等过程共同推动了土壤有机质的周转。然而, 当前土壤有机质的来源、结构和稳定性等重大科学问题仍未得到充分解决。土壤有机质, 尤其是难以提取部分有机质的分子量大小仍不清楚; 植物、微生物等不同来源有机质在土壤中的相对比例有待量化; 土壤生物、非生物过程对有机质形成和稳定的贡献还不明确; 原位条件下有机质的时空分布特征及其稳定性还缺乏实验证据。因此, 针对上述问题, 需要更进一步加强土壤有机质相关的研究。

随着更多新技术、新方法的出现和发展, 土壤有机质形成及稳定机制的研究方兴未艾。针对土壤有机质本质的重大科学问题, 亟须攻坚克难, 澄清认识, 解决争议, 未来应加强以下几个方面的研究。

(1) 改进和完善土壤有机质提取方法。质谱和核磁共振等有机质结构与分子组成分析, 都需要对土壤有机质进行纯化, 因此提高有机质的提取效率是开展相关研究的前提条件。针对有机质提取效率低的问题, 可通过不同类型提取剂的联合使用, 提高土壤有机质提取效率^[4,89]。土壤矿物的固定作用极

大限制了常用溶剂的提取效率,而氢氟酸预处理可以解除矿物束缚,提高土壤中角质和软木质等成分的提取量^[90]。近年来发展的“腐殖质组学”方法通过酸洗、有机萃取、脂键和醚键断裂等反应,或利用多种极性不同的溶剂连续提取,均可提高土壤有机质的提取和质谱识别效率^[91,92]。未来应进一步探索联合超声、加热等物理手段,利用不同溶剂和靶向分解等化学措施,充分提高土壤有机质的分离效率。土壤有机质高效提取结合高分辨质谱,有望最终揭示土壤有机质分子量及分子组成。

(2) 多方法联合解析土壤有机质分子量及聚合方式。当前土壤有机质分子量的数据多来自于高效液相-体积排阻色谱,由于缺乏合适的标样和标准分析方法,导致结果存在很大的不确定性。未来应联合多种分析技术,综合评估土壤有机质的分子量分布。原子力显微镜已经用来研究不同溶液条件下腐殖质的形貌,而利用其力曲线拉伸功能,结合蠕虫状链、自由连接链等模型分析,有望揭示有机分子的链长和分子结构;与红外光谱联合,可进一步获得土壤颗粒表面有机质的化学组成和对应的物理构型。此外,质谱可提供待测化合物的质量信息,结合电喷雾等软电离技术,可获取土壤有机质分子离子峰的准确质量^[63]。目前这一技术还缺乏标准的分析方法,亟待考察极性/非极性物质电离效率、碎片离子和加合物等对分析结果的影响,建立土壤有机质分子量质谱分析手段。

(3) 量化植物、微生物残体等对土壤有机质积累的贡献。目前土壤有机质来源的定量分析主要根据土壤氨基糖和木质素酚含量,结合植物、细菌和真菌体内相应物质的比例,按照简单的换算系数获得。标志物的提取效率、不同类型生物分子周转时间的差异,以及土壤微生物群落组成均会影响结果的准确性。未来,一方面需要加强现有生物标志物方法的研究,通过提高标志物的提取效率、明确不同类型生物分子的周转速率,以获取准确的转化系数,提高方法的可靠性。另一方面,需要通过氨基糖、木质素酚、脂类、蛋白、DNA和中性糖等多种标志物同步分析,生物标志物-质谱技术联合表征,在尽可能查清不同类型有机分子来源的条件下,综合

研判、准确评估土壤有机质微生物、植物等不同来源的相对贡献。同时,在不同生态系统和尺度下,利用生物标志物、宏基因组等研究手段,量化不同类型土壤生物,如微生物、病毒、土壤动物及其互作网络在有机质转化、积累中的作用和贡献。最终破解土壤有机质植物与微生物起源之争。

(4) 发展高空间及化学分辨原位表征技术。近年来对土壤有机质的新认知很大一部分来源于空间分辨50 nm左右的扫描透射X射线显微及近边结构技术。这一技术可以获得土壤颗粒中植物、微生物残体、黑炭等不同类型的有机质的斑块状分布特征,但是仍不能回答单分子尺度下矿物表面有机质吸附的结构,以及有机-有机分子之间的聚合机制。原子力-红外、冷冻电子显微镜-电子能量损失谱技术可在亚纳米、纳米空间分辨下同时采集形貌和矿物-有机质组成的化学信息^[93,94]。目前这些原位分析方法的应用还较少,尤其缺乏原位条件下土壤矿物表面有机碳结构及分布的实验研究。这些原位显微技术的应用有望进一步揭示土壤有机质的空间分布及化学结构。

(5) 加强土壤组分互作耦合界面有机质动态过程研究。土壤有机质的积累是在植物、微生物、矿物多种因素共同作用下完成的。尤其是氧化还原界面上,活性铁、锰氧化铁的催化作用,自由基对有机质的分解和聚合有着不可忽视的影响。仅通过对土壤有机质及有机-矿物复合体的表征,并不能很好地回答有机质形成过程及不同因子对有机碳积累的贡献。未来应重点考察活性矿物-微生物多组分界面互作对有机碳合成、分解以及生物-非生物聚合等过程的影响。发展多组分互作界面实时观测技术,如微流控和土壤芯片技术^[95,96],揭示土壤活性矿物-有机质-微生物耦合界面有机质的分解及固定机制。

(6) 持续推进土壤有机质模型与模拟研究。基于最新土壤有机质分子组成及分布的信息,开展有机分子结构模型、转化模型、降解和积累模型等的研究。特别是在有机质周转模型中吸收土壤生物参数,如微生物群落结构、功能基因、微生物生物量与残体,完善以往以土壤性质和气候因子为主的地球系统模型。

致谢 感谢美国俄勒冈州立大学Markus Kleber教授对文中部分观点的有益讨论。感谢国家自然科学基金(41830756, 42007014)资助。

推荐阅读文献

- 1 Döbereiner J W. Zur pneumatischen Chemie. III. Zur pneumatischen Phytochemie. Jena, Germany. 1822. 64–74
- 2 Sprengel C. About plant humus, humic acids and salts of humic acids. Arch Gesamte Naturl, 1826, 8: 145–220
- 3 Achard F. Chemische untersuchung des torfs. Crell Chem Ann, 1786, 2: 391–403
- 4 Pan G X, Ding Y J, Chen S T, et al. Exploring the nature of soil organic matter from humic substances isolation to SOMics of molecular assemblage (in Chinese). Adv Earth Sci, 2019, 34: 451–470 [潘根兴, 丁元君, 陈硕桐, 等. 从土壤腐殖质分组到分子有机质组学认识土壤有机质本质. 地球科学进展, 2019, 34: 451–470]
- 5 Gortner R A. The organic matter of the soil. Soil Sci, 1916, 2: 539–548

- 6 Page H J. Studies on the carbon and nitrogen cycles in the soil. V. The origin of the humic matter of the soil. *J Agric Sci*, 1932, 22: 291–296
- 7 Stevenson F J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. 2nd ed. New York: Wiley, 1994
- 8 Lehmann J, Solomon D, Kinyangi J, et al. Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. *Nat Geosci*, 2008, 1: 238–242
- 9 Myneni S C B, Brown J T, Martinez G A, et al. Imaging of humic substance macromolecular structures in water and soils. *Science*, 1999, 286: 1335–1337
- 10 Miltner A, Bombach P, Schmidt-Brücken B, et al. Som genesis: Microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry*, 2012, 111: 41–55
- 11 Kelleher B P, Simpson A J. Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 4605–4611
- 12 Simpson A J, Simpson M J, Smith E, et al. Microbially derived inputs to soil organic matter: Are current estimates too low? *Environ Sci Technol*, 2007, 41: 8070–8076
- 13 Lehmann J, Kleber M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 2015, 528: 60–68
- 14 Dungait J A J, Hopkins D W, Gregory A S, et al. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. *Glob Change Biol*, 2012, 18: 1781–1796
- 15 Kleber M, Johnson M G. Advances in understanding the molecular structure of soil organic matter: Implications for interactions in the environment. *Adv Agron*, 2010, 106: 77–142
- 16 Jodidi S L. The chemistry of humus, with special reference to the relation of humus to the soil and to the plant. *J Frankl Inst*, 1913, 176: 565–573
- 17 Waksman S A. What is humus? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1925, 11: 463–468
- 18 Dubach P, Mehta N C, Jakab T, et al. Chemical investigations on soil humic substances. *Geochim Cosmochim Acta*, 1964, 28: 1567–1578
- 19 Martin J P, Haider K. Microbial activity in relation to soil humus formation. *Soil Sci*, 1971, 111: 54–63
- 20 Chin Y P, Aiken G, O'Loughlin E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ Sci Technol*, 1994, 28: 1853–1858
- 21 Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci*, 2001, 166: 810–832
- 22 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 Mol Struct*, 2010, 982: 181–186
- 23 Johnson K, Purvis G, Lopez-Capel E, et al. Towards a mechanistic understanding of carbon stabilization in manganese oxides. *Nat Commun*, 2015, 6: 7628
- 24 Liang C, Amelung W, Lehmann J, et al. Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter. *Glob Change Biol*, 2019, 25: 3578–3590
- 25 Olk D C, Bloom P R, Perdue E M, et al. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters. *J Environ Qual*, 2019, 48: 217–232
- 26 Kleber M, Lehmann J. Humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems. *J Environ Qual*, 2019, 48: 207–216
- 27 Dou S, Shan J, Song X, et al. Are humic substances soil microbial residues or unique synthesized compounds? A perspective on their distinctiveness. *Pedosphere*, 2020, 30: 159–167
- 28 Sherrod L A, Vigil M F, Stewart C E. Do fulvic, humic, and humin carbon fractions represent meaningful biological, physical, and chemical carbon pools? *J Environ Qual*, 2019, 48: 1587–1593
- 29 Martin J P, Parsa A A, Haider K. Influence of intimate association with humic polymers on biodegradation of [¹⁴C]labeled organic substrates in soil. *Soil Biol Biochem*, 1978, 10: 483–486
- 30 De Nobili M, Bravo C, Chen Y. The spontaneous secondary synthesis of soil organic matter components: A critical examination of the soil continuum model theory. *Appl Soil Ecol*, 2020, 154: 103655
- 31 Schnitzer M, Monreal C M. Chapter three—*Quo vadis* soil organic matter research? A biological link to the chemistry of humification. *Adv Agron*, 2011, 113: 143–217
- 32 Chen Y M, Tsao T M, Liu C C, et al. Polymerization of catechin catalyzed by Mn-, Fe- and Al-oxides. *Colloids Surf B-Biointerfaces*, 2010, 81: 217–223
- 33 Kleber M, Bourg I C, Coward E K, et al. Dynamic interactions at the mineral-organic matter interface. *Nat Rev Earth Environ*, 2021, 2: 402–421
- 34 Zou J, Huang J, Yue D, et al. Roles of oxygen and Mn (IV) oxide in abiotic formation of humic substances by oxidative polymerization of polyphenol and amino acid. *Chem Eng J*, 2020, 393: 124734
- 35 Hatcher P G, Waggoner D C, Chen H. Evidence for the existence of humic acids in peat soils based on solid-state ¹³C NMR. *J Environ Qual*, 2019, 48: 1571–1577
- 36 Albers C N, Banta G T, Jacobsen O S, et al. Characterization and structural modelling of humic substances in field soil displaying significant differences from previously proposed structures. *Eur J Soil Sci*, 2008, 59: 693–705
- 37 Cao X, Schmidt-Rohr K. Abundant nonprotonated aromatic and oxygen-bonded carbons make humic substances distinct from biopolymers.

- [Environ Sci Technol Lett](#), 2018, 5: 476–480
- 38 Ikeya K, Sleighter R L, Hatcher P G, et al. Characterization of the chemical composition of soil humic acids using fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. [Geochim Cosmochim Acta](#), 2015, 153: 169–182
- 39 Ohno T, He Z, Sleighter R L, et al. Ultrahigh resolution mass spectrometry and indicator species analysis to identify marker components of soil- and plant biomass-derived organic matter fractions. [Environ Sci Technol](#), 2010, 44: 8594–8600
- 40 DiDonato N, Chen H, Waggoner D, et al. Potential origin and formation for molecular components of humic acids in soils. [Geochim Cosmochim Acta](#), 2016, 178: 210–222
- 41 DiDonato N, Hatcher P G. Alicyclic carboxylic acids in soil humic acid as detected with ultrahigh resolution mass spectrometry and multi-dimensional NMR. [Org Geochem](#), 2017, 112: 33–46
- 42 Ohno T, Ohno P E. Influence of heteroatom pre-selection on the molecular formula assignment of soil organic matter components determined by ultrahigh resolution mass spectrometry. [Anal Bioanal Chem](#), 2013, 405: 3299–3306
- 43 Jiménez-González M A, Almendros G, Waggoner D C, et al. Assessment of the molecular composition of humic acid as an indicator of soil carbon levels by ultra-high-resolution mass spectrometric analysis. [Org Geochem](#), 2020, 143: 104012
- 44 Liang C, Cheng G, Wixon D L, et al. An absorbing markov chain approach to understanding the microbial role in soil carbon stabilization. [Biogeochemistry](#), 2011, 106: 303–309
- 45 Liang C, Schimel J P, Jastrow J D. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. [Nat Microbiol](#), 2017, 2: 17105
- 46 Zhu X, Jackson R D, DeLucia E H, et al. The soil microbial carbon pump: From conceptual insights to empirical assessments. [Glob Change Biol](#), 2020, 26: 6032–6039
- 47 Angst G, Mueller K E, Nierop K G J, et al. Plant- or microbial-derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter. [Soil Biol Biochem](#), 2021, 156: 108189
- 48 Wilson M A, Pugmire R J, Zilm K W, et al. Cross-polarization ^{13}C -NMR spectroscopy with ‘magic angle’ spinning characterizes organic matter in whole soils. [Nature](#), 1981, 294: 648–650
- 49 Masoom H, Courtier-Murias D, Farooq H, et al. Soil organic matter in its native state: Unravelling the most complex biomaterial on earth. [Environ Sci Technol](#), 2016, 50: 1670–1680
- 50 Hall S J, Ye C, Weintraub S R, et al. Molecular trade-offs in soil organic carbon composition at continental scale. [Nat Geosci](#), 2020, 13: 687–692
- 51 Xu J, Zhao B, Li Z, et al. Demonstration of chemical distinction among soil humic fractions using quantitative solid-state ^{13}C NMR. [J Agric Food Chem](#), 2019, 67: 8107–8118
- 52 Zavarzina A G, Demin V V, Nifant'eva T I, et al. Extraction of humic acids and their fractions in poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems. [Anal Chim Acta](#), 2002, 452: 95–103
- 53 Kemp A L W, Wong H K T. Molecular-weight distribution of humic substances from lakes ontario and erie sediments. [Chem Geol](#), 1974, 14: 15–22
- 54 Richard C, Coelho C, Guyot G, et al. Fluorescence properties of the 5 kDa molecular size fractions of a soil humic acid. [Geoderma](#), 2011, 163: 24–29
- 55 Asakawa D, Iimura Y, Kiyota T, et al. Molecular size fractionation of soil humic acids using preparative high performance size-exclusion chromatography. [J Chromatogr A](#), 2011, 1218: 6448–6453
- 56 Asakawa D, Kiyota T, Yanagi Y, et al. Optimization of conditions for high-performance size-exclusion chromatography of different soil humic acids. [Anal Sci](#), 2008, 24: 607–613
- 57 Song J, Huang W, Peng P, et al. Humic acid molecular weight estimation by high-performance size-exclusion chromatography with ultraviolet absorbance detection and refractive index detection. [Soil Sci Soc Am J](#), 2010, 74: 2013–2020
- 58 Zeile K. Zur Kenntnis der huminsäuren. [Kolloid-Zeitschrift](#), 1935, 72: 211–212
- 59 Fuchs W, Bängent F, Stengel D W. Über die beziehungen zwischen huminsäure und lignin. [Brennstoff-Chem](#), 1928, 9: 298–302
- 60 Chen Y, Schnitzer M. Scanning electron microscopy of a humic acid and of a fulvic acid and its metal and clay complexes. [Soil Sci Soc Am J](#), 1976, 40: 682–686
- 61 Heymann K, Lehmann J, Solomon D, et al. Can functional group composition of alkaline isolates from black carbon-rich soils be identified on a sub-100 nm scale? [Geoderma](#), 2014, 235–236: 163–169
- 62 Sutton R, Sposito G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. [Environ Sci Technol](#), 2005, 39: 9009–9015
- 63 Peuravuori J, Bursáková P, Pihlaja K. ESI-MS analyses of lake dissolved organic matter in light of supramolecular assembly. [Anal Bioanal Chem](#), 2007, 389: 1559–1568
- 64 Trubetskoj O A, Richard C, Voyard G, et al. Molecular size distribution of fluorophores in aquatic natural organic matter: Application of hpsec with multi-wavelength absorption and fluorescence detection following LPSEC-page fractionation. [Environ Sci Technol](#), 2018, 52: 5287–5295
- 65 Dereka B, Yu Q, Lewis N H C, et al. Crossover from hydrogen to chemical bonding. [Science](#), 2021, 371: 160–164

- 66 Wells M J M. Supramolecular answers to the organic matter controversy. *J Environ Qual*, 2019, 48: 1644–1651
- 67 Wells M J M, Stretz H A. Supramolecular architectures of natural organic matter. *Sci Total Environ*, 2019, 671: 1125–1133
- 68 Liang Y, Ding Y, Wang P, et al. Molecular characteristics, proton dissociation properties, and metal binding properties of soil organic matter: A theoretical study. *Sci Total Environ*, 2019, 656: 521–530
- 69 Guo Z, Wang Y, Wan Z, et al. Soil dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: Global budget, spatial distribution and controls. *Glob Ecol Biogeogr*, 2020, 29: 2159–2175
- 70 Zavarzina A G, Kravchenko E G, Konstantinov A I, et al. Comparison of the properties of humic acids extracted from soils by alkali in the presence and absence of oxygen. *Eurasian Soil Sci*, 2019, 52: 880–891
- 71 Bremner J M, Lees H. Studies on soil organic matter: Part II. The extraction of organic matter from soil by neutral reagents. *J Agric Sci*, 1949, 39: 274–279
- 72 De Nobili M. Comment on “humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems”, by Kleber and Lehmann (2019). *J Environ Qual*, 2019, 48: 787–789
- 73 Song G, Novotny E H, Simpson A J, et al. Sequential exhaustive extraction of a mollisol soil, and characterizations of humic components, including humin, by solid and solution state NMR. *Eur J Soil Sci*, 2008, 59: 505–516
- 74 Hayes M H B. Solvent systems for the isolation of organic components from soils. *Soil Sci Soc Am J*, 2006, 70: 986–994
- 75 Hayes M H B. Soil organic matter extraction, fractionation, structure and effects on soil structure. In: Chen Y, Avnimelech Y, eds. *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Dordrecht: Springer, 1986. 183–208
- 76 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. *Eur J Soil Sci*, 2000, 51: 583–594
- 77 Liang C, Kästner M, Joergensen R G. Microbial necromass on the rise: The growing focus on its role in soil organic matter development. *Soil Biol Biochem*, 2020, 150: 108000
- 78 Solomon D, Lehmann J, Harden J, et al. Micro- and nano-environments of carbon sequestration: Multi-element STXM-NEXAFS spectromicroscopy assessment of microbial carbon and mineral associations. *Chem Geol*, 2012, 329: 53–73
- 79 Chen C, Dynes J J, Wang J, et al. Soft X-ray spectromicroscopy study of mineral-organic matter associations in pasture soil clay fractions. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 6678–6686
- 80 Li Q, Du H, Chen W, et al. Aging shapes the distribution of copper in soil aggregate size fractions. *Environ Pollut*, 2018, 233: 569–576
- 81 Vogel C, Mueller C W, Höschen C, et al. Submicron structures provide preferential spots for carbon and nitrogen sequestration in soils. *Nat Commun*, 2014, 5: 2947
- 82 Kopittke P M, Hernandez-Soriano M C, Dalal R C, et al. Nitrogen-rich microbial products provide new organo-mineral associations for the stabilization of soil organic matter. *Glob Change Biol*, 2018, 24: 1762–1770
- 83 Fox B G, Thorn R M S, Anesio A M, et al. The *in situ* bacterial production of fluorescent organic Matter; an investigation at a species level. *Water Res*, 2017, 125: 350–359
- 84 Lian J, Zheng X, Zhuo X, et al. Microbial transformation of distinct exogenous substrates into analogous composition of recalcitrant dissolved organic matter. *Environ Microbiol*, 2021, 23: 2389–2403
- 85 Zavarzina A G. Heterophase synthesis of humic acids in soils by immobilized phenol oxidases. In: Shukla G, Varma A, eds. *Soil Enzymology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. 187–205
- 86 Du H Y, Yu G H, Sun F S, et al. Iron minerals inhibit the growth of *Pseudomonas brassicacearum* J12 via a free-radical mechanism: Implications for soil carbon storage. *Biogeosciences*, 2019, 16: 1433–1445
- 87 Qu C, Qian S, Chen L, et al. Size-dependent bacterial toxicity of hematite particles. *Environ Sci Technol*, 2019, 53: 8147–8156
- 88 Chi Z L, Yu G H. Nanozyme-mediated elemental biogeochemical cycling and environmental effects. *Sci China Earth Sci*, 2021, 64: 1015–1025 [池志瀨, 余光辉. 矿物纳米酶介导的元素生物地球化学循环及环境效应. *中国科学: 地球科学*, 2021, 51: 1203–1213]
- 89 Nebbioso A, Piccolo A. Basis of a humeomics science: Chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 1187–1199
- 90 Lin L H, Simpson M J. Enhanced extractability of cutin- and suberin-derived organic matter with demineralization implies physical protection over chemical recalcitrance in soil. *Org Geochem*, 2016, 97: 111–121
- 91 Drosos M, Nebbioso A, Mazzei P, et al. A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Sci Total Environ*, 2017, 586: 807–816
- 92 Tfaily M M, Chu R K, Toyoda J, et al. Sequential extraction protocol for organic matter from soils and sediments using high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2017, 972: 54–61
- 93 Otter L M, Förster M W, Belousova E, et al. Nanoscale chemical imaging by photo-induced force microscopy: Technical aspects and application to the geosciences. *Geostand Geoanal Res*, 2021, 45: 5–27

- 94 Possinger A R, Zachman M J, Enders A, et al. Organo-organic and organo-mineral interfaces in soil at the nanometer scale. [Nat Commun](#), 2020, 11: 6103
- 95 Pucetaite M, Ohlsson P, Persson P, et al. Shining new light into soil systems: Spectroscopy in microfluidic soil chips reveals microbial biogeochemistry. [Soil Biol Biochem](#), 2021, 153: 108078
- 96 Yang J Q, Zhang X, Bourg I C, et al. 4D imaging reveals mechanisms of clay-carbon protection and release. [Nat Commun](#), 2021, 12: 622

Summary for “重新认识土壤有机质”

Revisit soil organic matter

Chenchen Qu, Wenyan Ren, Xiuxiu Li, Peng Cai, Wenli Chen & Qiaoyun Huang^{*}

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

^{*} Corresponding author, E-mail: qyhuang@mail.hzau.edu.cn

The accurate and comprehensive understanding of the molecular composition, source, and stabilization mechanism of soil organic matter (SOM) is vital for soil management and the preservation of organic carbon. Currently, a series of key scientific issues concerning the formation and stabilization of SOM is highly contentious. This review summarized the advances in the sources and molecular structure of SOM, and presented a systematic analysis of the different views, conflicts, and problems concerning soil humic substances in the past decades. The traditional view of soil science believes that SOMs are mainly composed of humic substances which are macromolecular compounds and are derived from plant and animal residues through a series of mineralization and humification processes. Soil enzymes and minerals, including phenol oxidase, laccase, peroxidase, iron oxide, manganese oxide, promote the polymerization of organic molecules through additive nucleophilic reactions and free radical catalyzation. ¹³C-NMR and FT-ICR-MS analyses supported the existence of humic substances in soils based on the structure and the molecular composition of SOM.

However, with the application of biomarker analysis, high-resolution mass spectrometry, spatial resolution spectroscopy, and other advanced techniques, there is an emergence of new perspectives on the source and the structure of SOM. HPLC-SEC showed the average molecular weight of Aldrich humic acid was significantly smaller than previously thought and the aggregation of humic substances was affected by acetic acid, pH and ionic strength. These evidences suggest that humic substances are aggregates of small organic compounds with a molecular weight of hundreds to thousands of Daltons, rather than macromolecules of tens to hundreds of thousands of Daltons. Furthermore, *in situ* observation of soil particles by STXM revealed significant heterogeneity of SOM at 50 nm spatial resolution. In terms of the origin of SOM, model calculations and biomarker analysis have indicated that microbial necromass is the major constituent of SOM which accounts for ~33%–62% of SOM in different ecosystems. Collectively, microbial residues may contribute predominantly to the SOM pool and traditional concept “humification” may not occur in the soil.

These new findings are contrary to the traditional theory of soil chemistry and soil biochemistry and subvert our understanding of SOM. Therefore, it is imperative to perform further in-depth studies to fill the knowledge gaps regarding the sources, formation processes, and molecular structures of humus. However, further intensive investigations on SOM are restricted by the lack of efficient and reliable extraction procedures. In addition, the conversion coefficients from biomarker to necromass are not accurate and mass spectrometry could not provide a comprehensive analysis on the whole organic molecules in the soil. The studies on enzymatic reactions and microbial synthesis were mainly performed in simple suspension systems, which could not simulate the complex soil matrix. Consequently, future studies are needed to improve the efficiency and accuracy of the extraction and analysis of SOM and to develop a real-time study platform for the interfacial reactions among minerals, organic matters and microorganisms. Meanwhile, *in situ* characterization techniques and modeling should be employed and combined to clarify the sources and the underlying mechanisms of SOM stabilization at molecular level.

carbon neutral, carbon fixation, molecular composition, molecular weight, humification

doi: [10.1360/TB-2021-0704](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0704)