

# $^{15}\text{N}$ 同位素稀释法测定土壤氮素总转化速率研究进展<sup>①</sup>

程 谊, 蔡祖聪, 张金波

(土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

**摘 要:** 同位素稀释法是测定土壤中 N 素总转化速率最重要的方法之一。自从上世纪 50 年代 Kirkham 和 Bartholomew 提出同位素稀释法的基本原理以后, 随着分析技术的长足发展, 一些更精确的分析和数值优化方法被广泛使用, N 转化概念模型已经日益完善, 使测定 N 的总转化速率成为现实, 对土壤 N 素循环机制的深入研究提供了可能性。然而,  $^{15}\text{N}$  标记方法研究土壤中 N 的总转化速率仍然存在较大的不确定因素。本文综述了  $^{15}\text{N}$  同位素稀释法测定土壤 N 素总转化速率的原理和计算方法, 以期推动同位素稀释法的研究和发展。

**关键词:**  $^{15}\text{N}$  的同位素稀释法; 氮总转化速率;  $^{15}\text{N}$  丰度; 分析方法; FLUAZ 模型

**中图分类号:** S153.6<sup>+</sup>1; S15

土壤中的 N 以有机 N、无机 N 等不同的形态存在。N 素各形态之间的转化速率控制各种形态的 N 在土壤中的含量变化。依据测定方法, 土壤 N 素转化速率可分为总转化速率 (gross transformation rate) 和净转化速率 (net transformation rate)。前者指土壤 N 从一种形态转化为另一种形态的实际转化率; 后者通过测定单位时间内被转化的 N 形态含量净下降或转化生成的 N 形态含量净增加量获得。由于一种 N 形态均有多种输入和输出途径, 所以, 在自然条件下土壤中各种形态 N 的净转化速率是控制其转化的多种途径的总转化速率的综合结果<sup>[1]</sup>。如, 在无植物生长、无渗漏和径流的实验室培养条件下,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的输入项主要是有机 N 的矿化, 输出项包括硝化、土壤微生物同化和氨挥发;  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的输入项为  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的硝化作用, 输出项包括反硝化和土壤微生物同化。所以, 测定土壤中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的含量变化只能反映所有输入和所有输出项的总速率的相对大小, 不能反映每一输入或输出项的真实速率; 只能计算出有机 N 净矿化、净硝化和净反硝化速率, 不能计算出总有机 N 矿化、总硝化和总反硝速率, 更不可能认识土壤微生物对无机 N 的同化速率<sup>[2]</sup>。当硝化作用速率与  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的生物同化速率相等时, 土壤中  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量保持常数, 净硝化速率为 0, 但这不等于土壤未进行硝化作用和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的同化作用。可见, 即使对于  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 直接测定其含量变化可以有效地指示它们的供应水平和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  淋溶及径流风险, 但是, 要阐明其含量变化的过程,

并进行针对性地调控, 必须认识其总转化速率。 $^{15}\text{N}$  的同位素稀释和富集技术已经被广泛的用于测定 N 总转化速率<sup>[2-4]</sup>。

## 1 同位素稀释法测定氮总转化速率的基本原理

同位素稀释法是测定土壤中 N 素总转化速率最重要的方法之一<sup>[1]</sup>。其基本原理是将某一形态的 N 库用  $^{15}\text{N}$  标记后, 当其他未标记 N 形态转化成为标记 N 形态时, 使该 N 库中的  $^{15}\text{N}$  丰度下降; 相反, 当标记 N 向其他形态转化时, 使转化生成的 N 库中  $^{15}\text{N}$  丰度提高。利用  $^{15}\text{N}$  的稀释和富集, 结合各形态 N 库的含量变化可以计算土壤 N 总转化速率。早在 1954 年 Kirkham 和 Bartholomew<sup>[5]</sup>将土壤 N 区分成有机 N 库和无机 N 库, 并假设① $^{15}\text{N}$  和  $^{14}\text{N}$  具有相同的被利用的机会, ②被同化了的标记  $^{15}\text{N}$  不再矿化, ③不发生 N 的气态损失, 如氨挥发和反硝化气体产物的损失。如果标记  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库 (图 1), 假定  $q$  为  $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  量,  $Q$  为  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  总量,  $A$  为  $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  的百分超 (即  $q/Q$ ),  $t$  为时间, 对于非稳定状态 (即: 输入速率  $F_i$  不等于输出速率  $F_o$ ), 有机 N 矿化释放  $\text{NH}_4^+$ , 稀释  $^{15}\text{N}$  的丰度, 但不改变  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库的  $^{15}\text{N}$  数量 ( $q$ ); 同时,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库中  $^{15}\text{N}$  和  $^{14}\text{N}$  按比例被硝化,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库中  $^{15}\text{N}$  总量减少, 即  $q$  值变小, 但  $\text{NH}_4^+$  输出本身并不降低  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库中  $^{15}\text{N}$  丰度。 $^{15}\text{N}$  量 ( $q$ ) 随着硝化作用输出速率  $F_o$  而变化的关系可以表示为<sup>[11]</sup>:

$$dq/dt = -F_o \cdot A(t) \quad (1)$$

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40621001) 和中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (ISSASIP0702) 资助。

\* 通讯作者 (zocai@issas.ac.cn)

作者简介: 程谊 (1983—), 男, 安徽绩溪人, 硕士研究生, 主要从事土壤温室气体排放研究。E-mail: ycheng@issas.ac.cn

$\text{NH}_4^+\text{-N}$  总量随时间的变化则为有机 N 矿化速率 ( $F_I$ ) 和  $\text{NH}_4^+$  硝化速率 ( $F_O$ ) 之差, 即:

$$dQ/dt = F_I - F_O \quad (2)$$

在任一时间  $t$ ,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库中  $^{15}\text{N}$  的量为该时间  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  总量  $Q(t)$  与该时间  $^{15}\text{N}$  百分超  $A(t)$  之积, 即:

$$q(t) = Q(t) \cdot A(t) \quad (3)$$

由此可以推导出:

$$dq/dt = Q(t) \cdot dA/dt + A(t) \cdot dQ/dt \quad (4)$$

整理上式并积分可以得到:

$$F_I = [(Q_1 - Q_2) \cdot \ln(A_1/A_2)] / [(t_2 - t_1) \cdot \ln(Q_1/Q_2)] \quad (5)$$

$$F_O = F_I - [(Q_2 - Q_1) / (t_2 - t_1)] \quad (6)$$

式中:  $Q_1$  和  $Q_2$  及  $A_1$  和  $A_2$  分别为时间  $t_1$  和  $t_2$  时,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  总量及相应的  $^{15}\text{N}$  百分超。当有机 N 矿化输入  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  速率 ( $F_I$ ) 与硝化作用输出  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  速率 ( $F_O$ ) 相等, 为  $F$  时, 土壤中  $\text{NH}_4^+$  浓度 ( $Q$ ) 为常数。此时,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库中  $^{15}\text{N}$  百分超随有机 N 矿化速率或硝化作用速率  $F$  的关系为<sup>[6]</sup>:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-(F/Q)t} \quad (7)$$

式中:  $A_0$  为时间  $t = 0$  时的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  百分超。对式 (7) 进行整理, 得到:

$$F_I = F_O = F = [\ln(A_0/A_t)] \cdot Q/t = [\ln(A_1/A_2)] \cdot Q/(t_2 - t_1) \quad (8)$$

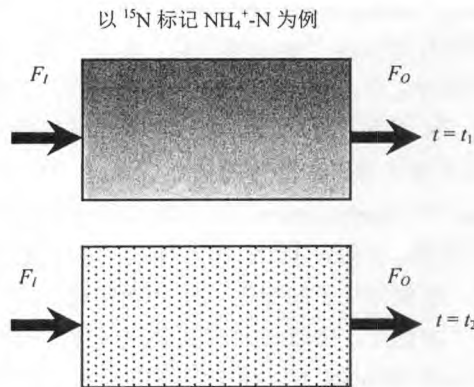


图 1 同位素稀释法模型 (引自 Di<sup>[11]</sup>)

Fig. 1 Conceptual model showing the influx ( $F_I$ ) and out-flux ( $F_O$ ) of mineral nutrients, diluting the isotopic tracer added to the mineral nutrient pool

该方法要求必须加入高的  $^{15}\text{N}$  量, 并尽量缩短试验时间以防止微生物同化的 N 又再矿化。通过引入新的分析方法, Kirkham 和 Bartholomew<sup>[7]</sup>在随后的工作中除去了后 2 个假设, 即被同化的标记 N 发生的再矿化过程, 并假设服从一级反应, 土壤中可能发生标记 N 的反硝化和氨挥发损失<sup>[7]</sup>。Kirkham 和 Bartholomew<sup>[5,7]</sup>提出的同位素稀释法的基本原理为利用  $^{15}\text{N}$  示踪技术测定 N 素总转化速率奠定了基础, 但

是他们的的方法存在一些缺点<sup>[8]</sup>:

(1) 只考虑了无机 N 库, 并没有区分  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。一些研究已经清楚地表明微生物优先利用  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ <sup>[9]</sup>, 所以在模型系统中把  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  分开考虑是非常必要的<sup>[10]</sup>。

(2) 有机态 N 库的性质被认为是均一的。实际上微生物同化的 N 量仅仅是微生物生物量 N 的一部分, 而微生物生物量 N 也仅是总有机态 N 的 3% ~ 10%<sup>[3,11]</sup>。

(3) 许多重要的 N 损失途径可能发生, 如氨挥发、反硝化或淋溶。尤其是在野外实验中, 这些过程极可能存在, 不能简单地根据土壤中矿质态 N 平衡推导 N 的微生物同化。

## 2 同位素稀释法研究氮总转化速率的分析方法

由于各个 N 库中的  $^{15}\text{N}$  丰度是不断变化的, 因此根据  $^{15}\text{N}$  丰度测定 N 的总转化速率是很复杂的。自从上世纪 50 年代 Kirkham 和 Bartholomew<sup>[5,8]</sup>的开创性工作以后, 分析技术有了长足的发展, 一些更精确的分析和数值方法已被广泛使用, N 转化概念模型已经更趋完善。

### 2.1 Blackburn<sup>[12]</sup>计算方法

Blackburn<sup>[12]</sup>在 Kirkham 和 Bartholomew<sup>[5,8]</sup>方法基础上考虑了  $^{15}\text{N}$  的自然丰度, 该方法可以用于加入低  $^{15}\text{N}$  量的研究。计算方法如下:

$$m = \frac{M_0 - M \log H_0 M / H M_0}{t \log M_0 / M}, c \neq m \quad (9)$$

$$c = \frac{M_0 - M \log H_0 / H}{t \log M_0 / M}, c \neq m \quad (10)$$

$$m = c = (M_0 / t) \log H_0 / H, c = m \quad (11)$$

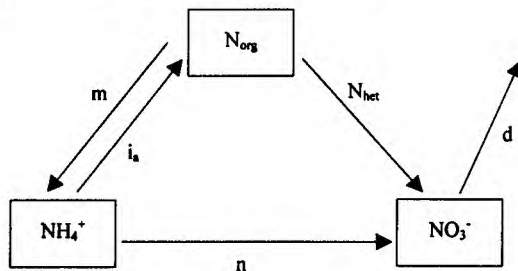
用  $M$  表示 N 的总含量 ( $^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$ );  $H$  为  $^{15}\text{N}$  百分超 (被标记库的  $^{15}\text{N}$  丰度与  $^{15}\text{N}$  自然丰度之差);  $m$  为总产生速率,  $c$  为总消耗速率。当净转化速率为 0 时 (此时  $m = c$  和  $M = M_0$ ), 应用方程 (11); 当净转化速率不为 0 时, 则用方程 (9) 和 (10)。

这些方程既可以用于  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , 也可用于标记  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  试验。在实验条件一致下, 在  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  双标记实验中, 当  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库被标记, 可以测定总矿化速率和总  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  消耗速率; 当  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  库被标记时, 可以测定总硝化速率和总  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  同化速率 (不考虑气体损失)。认为总  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  消耗速率减去总硝化速率就是总的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  同化速率。

### 2.2 数值分析方法

由于土壤中 N 的转化过程总是同时发生的，而且测定的 N 形态数少于需要计算的总转化速率参数个数，因此，仅仅采用算术分析方法计算各过程的总转化速率是很困难的，所以，数值分析方法越来越受到重视<sup>[4]</sup>。

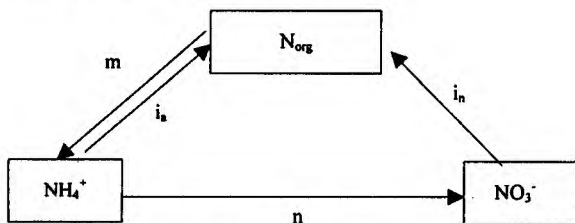
Myrold 和 Tiedje<sup>[3]</sup>第一次使用数值方法计算 N 的总转化速率，他们建立的数值模型主要包括了 N 的矿化 (m)，NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 同化 (i<sub>a</sub>)、硝化 (n) 和反硝化过程 (d)，忽略了 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的同化和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 异化还原成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (DNRA) 的过程 (图 2)。该模型采用非线性拟合方法，同时通过灵敏度分析来求算 N 的总转化速率。模拟结果表明零级和一级动力学方程都能够描述 N 的转化，但是一级动力学模型更为适合；矿化、硝化和同化速率得到了很好的拟合，而反硝化参数出现明显偏差，认为这可能是由于所用的实验条件下反硝化速率很低，以致测定时反硝化速率参数的变化不明显造成的。此外，该模型只包括了土壤中发生的部分 N 转化过程，也是导致偏差的一个原因。



N<sub>org</sub>: 有机态 N, m: N 的总矿化过程, i<sub>a</sub>: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 总同化过程, n: 总硝化过程, d: 总反硝化过程, N<sub>het</sub>: 异养硝化过程

图 2 Myrold 和 Tiedje<sup>[3]</sup>数值分析模型  
Fig. 2 Numerical solution of Myrold and Tiedje

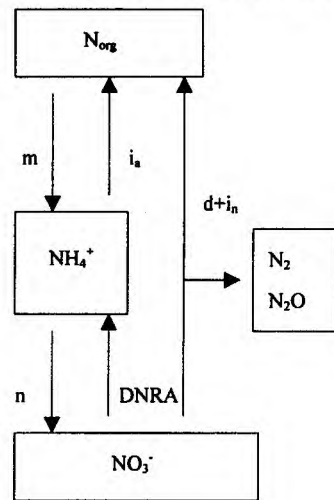
Wessel 和 Tietema<sup>[13]</sup>同时考虑了 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的同化，还有 N 的矿化和硝化过程，建立了新的模型 (图 3)。该数值方法使用计算机程序，用单一的非线性曲线拟合，使用最小的平方和作为判断标准，进行数值分析，测定 N 的总转化速率。



N<sub>org</sub>: 有机态 N, m: N 的总矿化过程, i<sub>a</sub>: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 总同化过程, n: 总硝化过程, i<sub>n</sub>: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 总同化过程

图 3 Wessel 和 Tietema<sup>[13]</sup>数值分析方法  
Fig. 3 Numerical solution of Wessel and Tietema

在 Wessel 和 Tietema<sup>[13]</sup>的数值模型基础上，Nishio 等<sup>[14]</sup>在模型中增加了 DNRA 转化过程 (图 4)。由于该模型的计算机程序不能区分反硝化 (d) 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的微生物同化 (i<sub>n</sub>) 作用，所以这两作用被视为一个整体，并且假定在多次取样期间这 5 个转化速率是恒定不变的。由于 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 库和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 库中的 <sup>15</sup>N 丰度随时间变化而变化，为了便于测定，该方法使用了所有时间间隔上 <sup>15</sup>N 丰度的平均值。结果表明，只要采样时间间隔足够短，该数值模型能够很好地分析复杂的 N 转变过程，得到很好的拟合效果。



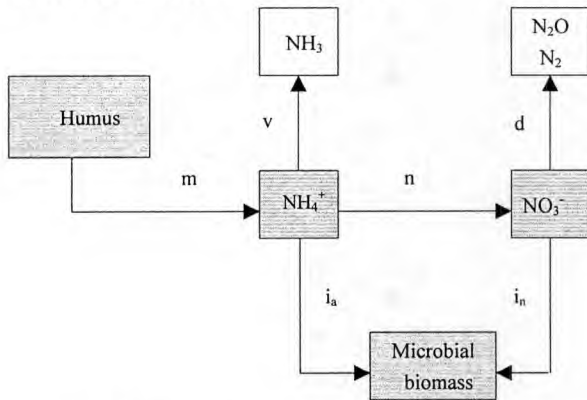
N<sub>org</sub>: 有机态 N, m: N 的总矿化过程, i<sub>a</sub>: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 总同化过程, n: 总硝化过程, d: 总反硝化过程, i<sub>n</sub>: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 总同化过程, DNRA: 硝酸盐异化还原为 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 过程

图 4 Nishio 等<sup>[14]</sup>数值分析方法  
Fig. 4 Numerical solution of Nishio et al

在总结前人研究成果的基础上，Mary 等<sup>[8]</sup>提出了土壤中 N 转化概念模型，并建立了被广泛引用的 FLUAZ 模型 (图 5)。采用 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 双标记方法，通过测定 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和有机 N 及其它们的 <sup>15</sup>N 百分超随时间的变化，应用 FLUAZ 模型可以计算出土壤中 6 种 N 总转化速率，即：有机 N 矿化速率 (m)、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 生物同化速率 (i<sub>a</sub>)、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 生物同化速率 (i<sub>n</sub>)、硝化作用速率 (n)、氨挥发速率 (v) 或反硝化作用速率 (d) 和标记后生物同化 N 的再矿化速率 (r)。

FLUAZ 模型已经被广泛用于测定 N 的总转化速率<sup>[15-17]</sup>。FLUAZ 模型结合了数值方法和非线性拟合方法，并考虑了 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的微生物同化和再矿化作用。模型使用 Haus-Marquardt 运算法则优化分析 N 的转化速率，采用平均加权误差 (MWE, mean weighed error) 作为模型运行的判定标准。MWE 代替

普遍使用的最小平方和作为优化判定标准有两方面的优势：①能够反映测定值的变异性；②使模型拟合标准化。该模型能够自动地改变初始值以保证得到 MWE 的最小值，从而有效地解决了由于人为初始值估计不准确引起的误差问题。Mary 等<sup>[8]</sup>的结果表明，运用 FLUAZ 模型测定土壤中 N 的总转化速率，实测值和模拟值之间有很好的—致性，并且证实了 MWE 值越小拟合的效果也越好。FLUAZ 模型具有以下优点：①在计算中它不要求近似值；②运用 MWE 作为优化判定标准，能够反映测定值的变异性；③能够同时测定模型中所有的转化速率并且提供了置信区间和参数间的相关矩阵；④通过灵敏度分析可以检查结果的精确性；⑤模型容易使用，运算迅速。



Humus: 腐殖质, Microbial biomass: 微生物生物量,  $m$ : N 的总矿化过程,  $i_a$ :  $\text{NH}_4^+$ -N 总同化过程,  $n$ : 总硝化过程,  $d$ : 总反硝化过程,  $i_n$ :  $\text{NO}_3^-$ -N 总同化过程,  $v$ : 氨挥发过程

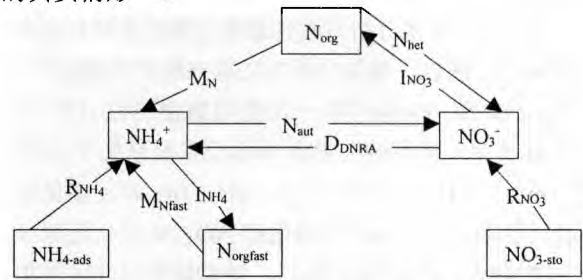
图 5 FLUAZ 模型<sup>[8]</sup>

Fig. 5 Compartmental system considered in FLUAZ model

在 FLUAZ 模型的基础上, Muller 等<sup>[4]</sup>提出新的概念模型 (Model B, 图 6)。在 Model B 中, 有机 N 被区分成易矿化态和难矿化态矿化, 硝化作用区分成自养硝化和异养硝化,  $\text{NO}_3^-$ -N 的转化包括了反硝化作用和  $\text{NO}_3^-$ -N 异化还原成  $\text{NH}_4^+$  (DNRA), 同时还考虑到了吸附态或肥料中无机 N 的释放速率, 计算的总转化速率参数达到 9 个。但是, Mary 等<sup>[8]</sup>认为 N 的转化速率被同时优化的个数不应该超过实测变量的个数, 否则会使系统中的模拟值过高和可能使优化导致错误的结果, Model B 中的 9 个参数不可能达到很好的优化和模拟效果。

为了提高计算结果的精确性, 最近, Muller 等<sup>[18]</sup>提出了用马尔柯夫链蒙特卡罗随机采样方法 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), 从而有效地避免了局域最小值问题, 确保模型运算过程中找到真正的全局最

小值。运用 MCMC 方法对过去文献中报道的实验数据进行重新计算, 结果更加反映土壤 N 素总转化速率的真实情形<sup>[19]</sup>。



$N_{org}$ : 有机态 N,  $\text{NH}_4\text{-ads}$ : 施用肥料后立即吸附  $\text{NH}_4^+$ -N 的 N 库,  $N_{orgfast}$ : 微生物生物量库,  $\text{NO}_3\text{-sto}$ : 施用肥料后立即存储的  $\text{NO}_3^-$ -N 的 N 库 (通过施 N 量和本底 N 量的差异可以测定),  $M_N$ : 有机态 N 总矿化过程,  $N_{aut}$ : 自养硝化过程,  $N_{het}$ : 异养硝化过程,  $I_{NO_3}$ :  $\text{NO}_3^-$ -N 的同化过程,  $R_{NH_4}$ : 吸附的  $\text{NH}_4^+$ -N 释放过程,  $M_{Nfast}$ : 微生物生物量的迅速矿化,  $I_{NH_4}$ :  $\text{NH}_4^+$ -N 的同化过程,  $D_{DNRA}$ : 硝酸盐异化还原为  $\text{NH}_4^+$ ,  $R_{NO_3}$ : 储存的  $\text{NO}_3^-$ -N 释放过程

图 6 Muller 等<sup>[4]</sup>提出新的概念模型 (Model B)

Fig. 6 Conceptual  $^{15}\text{N}$  tracing models of Muller et al.

### 2.3 算术分析方法和数值优化方法的比较

Smith 等<sup>[11]</sup>详细地比较了各种方法, 认为算术分析方法和数值优化方法各有利弊。算术分析方法适用于持续时间短的试验, 这样能够最大限度地减少已同化的  $^{15}\text{N}$  发生再矿化和 N 素转化速率变化引起的误差; 而数值优化方法更适用于持续时间长的试验。当试验周期超过 2 周时, 不考虑再矿化就会导致错误的结果; 当系统中发生了再矿化和硝化作用, 使用数值优化方法则会优于传统的算术分析方法<sup>[13,20]</sup>。算术分析方法的缺点在于: ①它不能评价参数的不确定性; ②它仅仅是利用被标记 N 库的总产生速率和总消耗速率进行计算, 不能准确地量化具体的转化过程 (如矿化速率和同化速率等), 例如, 该方法忽略被生物同化 N 的再矿化就会低估 N 的总转化速率<sup>[21]</sup>。Accoe 等<sup>[22]</sup>使用 FLUAZ 模型测定总 N 转化速率, 得到了很好的模拟效果, 但是随着培养时间的增加和取样时间间隔的延长, 模拟出现偏差。Herrmann 等<sup>[23]</sup>比较了 FLUAZ 模型和两种分析方法测得的 N 的总矿化速率, 结果表明它们测得的 N 的总矿化速率基本一致。与算术分析方法相比, 数值优化方法能够应用于研究更多的 N 的转化过程和更复杂的模型, 使 N 转化概念模型已经更趋完善<sup>[24]</sup>, 数值优化分析方法越来越受到重视<sup>[4]</sup>。

### 3 氮素总转化速率的研究进展与存在问题

随着分别测定土壤有机 N、 $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_3^-$ -N 的

$^{15}\text{N}$  丰度方法的建立和完善及数值分析方法的应用, 近年来采用  $^{15}\text{N}$  稀释法研究土壤 N 总转化速率的报道有不断增加的趋势。在国际上  $^{15}\text{N}$  稀释法已经被广泛地应用于土壤、沉积物中 N 总转化速率<sup>[25]</sup>及植被类型<sup>[26]</sup>、有机种植<sup>[27]</sup>、土壤所处的地形部位<sup>[28]</sup>、土壤有机质<sup>[29]</sup>及有机物质 C/N 比<sup>[30]</sup>、植物根系<sup>[31]</sup>等对土壤 N 总转化速率的影响。通过这些研究, 极大地提高了人们对土壤 N 循环规律及其影响因素的认识。至今,  $\text{NO}_3^-$ -N 异化还原为  $\text{NH}_4^+$  (DNRA) 过程尚不能用直接测定方法确定。Huygens 等<sup>[32]</sup>将 MCMC 方法应用于研究智利年降雨量达到 7000 mm 以上的森林土壤 N 的总转化速率, 发现该森林土壤中 DNRA 过程消耗的  $\text{NO}_3^-$ -N 占总消耗量的 99%, 从而使降雨量大、N 素不足的森林土壤有效地保持了 N 素。运用此方法, 应用 FLUAZ 模型或 MCMC 方法, 可以有效地区分土壤微生物同化无机 N 时对  $\text{NH}_4^+$ -N 或  $\text{NO}_3^-$ -N 的偏好<sup>[27]</sup>。测定土壤有机 N 总矿化速率、总硝化作用速率及总无机 N 总同化速率可以认识不同土壤保持无机 N 的能力大小<sup>[25]</sup>。

$^{15}\text{N}$  标记方法研究土壤中 N 的总转化速率仍然存在较大的不确定因素<sup>[1]</sup>。不能正确地应用  $^{15}\text{N}$  稀释法和合理地解释由此得出的结果, 可能得出误导性的结论<sup>[33]</sup>。在技术层面上, 主要问题是如何将  $^{15}\text{N}$  均匀地标记于土壤。标记  $^{15}\text{N}$  分布的不均匀性可能导致过高地估计总转化速率<sup>[34]</sup>。虽然 Davidson 等<sup>[35]</sup>早就提出了用多孔细针注射  $^{15}\text{N}$  标记物的方法, 且被广泛应用, 当对原状土进行标记时, 更难保证标记物在土壤中的均匀分布。另一个可能导致结果不能真实地反映土壤 N 素总转化速率的问题是标记物的加入可能改变土壤环境。 $^{15}\text{N}$  标记的  $\text{NH}_4^+$ -N 或  $\text{NO}_3^-$ -N 的加入, 增加了土壤中  $\text{NH}_4^+$ -N 或  $\text{NO}_3^-$ -N 的含量, 有可能促进硝化作用或反硝化作用。当以溶液态加入时, 将改变土壤的水分状况。当对原状土进行标记时, 即使采用 Davidson 等<sup>[35]</sup>的方法, 留下的针孔, 使土壤的通气性发生变化。这些都将改变土壤中 N 的总转化速率。进行野外试验时,  $^{15}\text{N}$  的损失, 如氨挥发、 $\text{NO}_3^-$ -N 淋溶等均可能影响研究结果。硝化作用强、 $\text{NH}_4^+$ -N 基质限制硝化速率的土壤, 这些问题更加突出,  $\text{NH}_4^+$ - $^{15}\text{N}$  的加入将可能极大地促进硝化作用。当硝化作用使  $\text{NH}_4^+$ - $^{15}\text{N}$  含量过低时, 测定误差增大。在这样的情形下, 需要加大  $\text{NH}_4^+$ - $^{15}\text{N}$  的量或缩短试验时间, 但是, 这样对硝化作用的促进作用可能更加显著。关于试验持续时间, Di 等<sup>[1]</sup>提出了 4 条建议, 以降低分析误差。Herrmann 等<sup>[23]</sup>提出了对硝化作用强的土壤用乙炔抑制硝化作用的

方法。此外, 由于土壤会吸附固定  $\text{NH}_4^+$ -N, 其中黏土矿物吸附固定  $\text{NH}_4^+$ -N 非常迅速。Davidson 等<sup>[35]</sup>发现草地土壤灭菌后, 在 15 min 之内土壤非生物吸附固定了 30% 以上的  $^{15}\text{NH}_4^+$ -N。所以, 不是加入的  $\text{NH}_4^+$ - $^{15}\text{N}$  都参与了 N 的生物转化, 因此使用同位素稀释法测定 N 的总转化速率时, 必须确定一个合理的初始取样时间 (同位素稀释法的 0 时值,  $t_0$ ) 来计算总转化速率。许多研究并没有设定初始取样时间, 他们的测定结果不能代表土壤 N 素转化的真实速率<sup>[35-37]</sup>。Davidson 等<sup>[35]</sup>发现, 当不设定初始取样时间时, 在森林  $\text{O}_2$  层土壤和草地矿物质土中测得的 N 总矿化速率分别偏高 7% 和 122%, 同时总硝化速率和 N 总消耗速率也是偏高的, 认为必须设定一个初始取样时间 ( $t_0$ ), 正确地估算初始  $^{14}\text{N}$  和  $^{15}\text{N}$  库数量是准确测定 N 总转化速率的关键。

目前关于土壤 N 总转化速率的研究主要还在于认识规律及其与影响因素的关系, N 总转化速率与 N 素供应、不同形态的 N 向环境的释放等关系的研究尚未见诸报道。虽然采用  $^{15}\text{N}$  标记方法研究 N 素转化、吸收、迁移、氮氧化物气体产生过程等的报道很多, 但是, 这些研究基本上还未与 N 的总转化速率联系起来。例如, 最近, Russow 等<sup>[38]</sup>用  $^{15}\text{N}$  标记方法研究硝化作用和反硝化作用对 NO 和  $\text{N}_2\text{O}$  的贡献, 但并未涉及 NO 和  $\text{N}_2\text{O}$  排放量与硝化和反硝化总速率之间的关系。

#### 参考文献:

- [1] Di HJ, Cameron KC, McLaren RG. Isotopic dilution methods to determine the gross transformation rates of nitrogen, phosphorus, and sulfur in soil: a review of the theory, methodologies, and limitations. *Australian Journal of Soil Research*, 2000, 38: 213-230
- [2] Tietema A, Wessel WW. Gross nitrogen transformation in the organic layer of acid forest ecosystems subjected to increased atmospheric nitrogen input. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24: 943-951
- [3] Myrold DD, Tiedje JM. Simultaneous estimation of several nitrogen cycle rates using  $^{15}\text{N}$ : theory and application. *Soil Biology & Biochemistry*, 1986, 18: 559-568
- [4] Muller C, Stevens RJ, Laughlin RJ. A  $^{15}\text{N}$  tracing model to analyse N transformations in old grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 619-632
- [5] Kirkham D, Bartholomew WV. Equations for following nutrient transformations in soil, utilizing tracer data. *Soil Science Society*

- of America Proceedings, 1954, 18: 33-44
- [6] Di HJ, Harrison R, Campbell AS. Assessment of methods for studying the dissolution of phosphate fertilizers of differing solubility in soil. I. An isotopic method *Fertiliser Research*, 1994, 38: 1-9
- [7] Kirkham D, Bartholomew WV. Equations for following nutrient transformations in soil, utilizing tracer data. II. *Soil Science Society of America Proceedings*, 1955, 18: 189-192
- [8] Mary B, Recous S, Robin D. A model for calculating nitrogen fluxes in soil using  $^{15}\text{N}$  tracing. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30: 1963-1979
- [9] Rice CW, Tiedje JM. Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 1989, 21: 597-602
- [10] Schimel J. Assumptions and errors in the  $^{15}\text{NH}_4^+$  pool dilution technique for measuring mineralization and immobilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28: 827-828
- [11] Smith CJ, Chalk PM, Crawford DM, Wood JT. Estimating gross nitrogen mineralization and immobilization rates in anaerobic and aerobic soil suspensions. *Soil Science Society of America Journal*, 1994, 58: 1652-1660
- [12] Blackburn TH. Method for measuring rates of  $\text{NH}_4^+$  turnover in anoxic marine sediments, using a  $^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+$  dilution technique. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 37: 760-765
- [13] Wessel WW, Tietema A. Calculating gross N transformation rates of  $^{15}\text{N}$  pool dilution experiments with acid forest litter: analytical and numerical approaches. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24: 931-942
- [14] Nishio T. Estimating nitrogen transformations rates in surface aerobic soil of a paddy field. *Soil Biology & Biochemistry*, 1994, 26: 1273-1280
- [15] Andersen MK, Jensen LS. Low soil temperature effects on short term gross N mineralisation-immobilisation turnover after incorporation of a green manure. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 511-521
- [16] Luxhøi J, Recous S, Fillery IR, Jensen LS. Comparison of  $^{15}\text{NH}_4^+$  pool dilution technique to measure gross N fluxes in a coarse textured soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 569-572
- [17] Flavel TC, Murphy DV, Lalor BM, Fillery IRP. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 1397-1400
- [18] Muller C, Rutting T, Kattge J, Laughlin RJ, Stevens RJ. Estimation of parameters in complex  $^{15}\text{N}$  tracing models by Monte Carlo sampling. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 715-726
- [19] Rutting T, Muller C.  $^{15}\text{N}$  tracing models with a Monte Carlo optimization procedure provide new insights on gross N transformations in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 2351-2361
- [20] Bjarnason S. Calculation of gross nitrogen immobilization and mineralization in soil. *Journal of Soil Science*, 1988, 39: 393-406
- [21] Tietema A, van Dam D. Calculating microbial carbon and nitrogen transformations in acid forest litter with  $^{15}\text{N}$  enrichment and dynamic simulation modelling. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28: 953-965
- [22] Accoe F, Boeckx P, Videla X, Pino I, Hofman G, Cleemput OV. Estimation of gross nitrogen transformations and nitrogen retention in grassland soils using FLUAZ. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69: 1967-1976
- [23] Herrmann AM, Witter E, Katterer T. Use of acetylene as a nitrification inhibitor to reduce biases in gross N transformation rates in a soil showing rapid disappearance of added ammonium. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 2390-2400
- [24] Nason GE, Myrold DD.  $^{15}\text{N}$  in soil research: appropriate application of rate estimation procedures. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 1991, 34: 427-441
- [25] Boeckx FAP, Videla X, Pino I, Hofman G, Van Cleemput O. Estimation of gross nitrogen transformations and nitrogen retention in grassland soils using FLUAZ. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69: 1967-1976
- [26] Burton J, Chen CR, Xu ZH, Ghadiri H. Gross nitrogen transformations in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 426-433
- [27] Burger M, Jackson LE. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 29-36
- [28] Corre MD, Schnabel RS, Stout W. Spatial and seasonal variations of gross nitrogen transformations and microbial biomass in a Northeastern US grassland. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34: 445-457
- [29] Holub SM, Lajtha K, Spears JDH, Toth JA, Crow SE, Caldwell BA, Papp M, Nagy PT. Organic matter manipulations have little effect on gross and net nitrogen transformations in two temperate forest mineral soils in the USA and central Europe. *Forest Ecology and Management*, 2005, 214: 320-330
- [30] Bengtsson G, Bengtson P, Mansson KF. Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a

- function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 143–154
- [31] Whalen JK, Bottomly PJ, Myrold DD. Short-term nitrogen transformations in bulk and root associated soils under ryegrass. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1937–1945
- [32] Huygens D, Rutting T, Boeckx P, Van Cleemput O, Godoy R, Muller C. Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 2448–2458
- [33] Murphy DV, Recous S, Stockdale EA, Fillery IRP, Jensen LS, Hatch DJ, Goulding KWT. Gross nitrogen fluxes in soil: theory, measurement and application of  $^{15}\text{N}$  pool dilution techniques. *Advances in Agronomy*, 2003, 79: 69–118
- [34] Watson CJ, Travers G, Kilpatrick DJ, Laidlaw AS, O'Riordan E. Overestimation of gross N transformation rates in grassland soils due to non-uniform exploitation of applied and native pools. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 2019–2030
- [35] Davidson EA, Hart SC, Shanks CA, Firestone MK. Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by N-15 isotopic pool dilution in intact soils cores. *Journal of Soil Science*, 1991, 42: 335–349
- [36] Murphy DV, Fillery IRP, Sparling GP. Method to label soil cores with  $^{15}\text{NH}_3$  gas as a prerequisite for  $^{15}\text{N}$  isotopic dilution and measurement of gross N mineralisation. *Soil Biology & Biochemistry*, 1997, 29: 1731–1741.
- [37] Murphy DV, Bhogal A, Shepherd M, Goulding KWT, Jarvis SC, Barraclough D, Gaunt JL. Comparison of  $^{15}\text{N}$  labeling methods to measure gross nitrogen mineralisation. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31: 2015–2024.
- [38] Russow R, Spott O, Stange CF. Evaluation of nitrate and ammonium as sources of NO and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from black earth soils (Haplic Chernozem) based on N-15 field experiments more options. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40: 380–390

## On Progress in Gross Nitrogen Transformation Using $^{15}\text{N}$ Isotopic Pool Dilution

CHENG Yi, CAI Zu-cong, ZHANG Jin-bo

(State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

**Abstract:** One of the important tools that have been used to study the rates of nutrient transformations in the soil is the isotopic dilution method to determine the gross rates of release into, or removal from, a mineral nutrient pool. Since Kirkham and Bartholomew first proposed the equations based on the use of tracer data to measure the nutrient transformations in the soil in the 1950's, several more accurately analytical and numerical solutions have been widely used with the development of analytical technique. The simulation of nitrogen transformation is close to the actual processes, which makes it possible to determine gross nitrogen transformation rates and to deeply study the nitrogen cycling in the soil. However, there are still several uncertain factors in  $^{15}\text{N}$  isotopic pool dilution technique, such as uniform distribution of  $^{15}\text{N}$ . The principle and estimated methods are introduced to calculate the gross nitrogen transformation rates using  $^{15}\text{N}$  isotopic pool dilution and to promote further the research of gross nitrogen transformation.

**Key words:**  $^{15}\text{N}$  isotopic pool dilution, Gross nitrogen transformation rates,  $^{15}\text{N}$  abundance, Analytical solutions, FLUAZ model