

CO₂ 红外分析仪在土壤有机碳矿化中的测试与应用研究^①

吴庆标, 王效科, 任玉芬

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 以 LICOR-6262 红外分析仪为测定土壤有机碳矿化的主体, 改进附加密闭气路系统, 着重探讨了密闭气路系统假定的平衡时间和测试环境温度等对测定结果的影响。结果表明: ①密闭气路系统假定的平衡时间长短对测试结果的影响较大, 且随着假定平衡时间的延长, 测试结果呈不同程度的降低; ②土壤样品的测试环境温度对土壤呼吸测定结果影响较大。相对测试要求的环境温度 (25℃) 而言, 较低温度 (20℃) 对测定结果的降低影响达到显著水平 ($P < 0.05$), 而较高温度 (30℃) 对其的增加影响不显著 ($P > 0.05$)。

关键词: 土壤有机碳矿化; 密闭气路系统; 系统测试

中图分类号: S153.6

全球土壤 C 库约为 2500 Gt (包括土壤有机 C 约 1500 Gt 和土壤非有机 C 950 Gt), 是大气层 C 库的 3.3 倍和全球生物体 C 库的 4.5 倍^[1]。土壤有机 C 的固定 (sequestration) 和矿化 (mineralization) 对全球大气 CO₂ 浓度调节有着重要的作用, 既可能起 C 源的作用, 也可能起 C 汇的作用。因而, 研究土壤有机 C 的矿化 (释放) 成为研究全球变化的热点问题之一。

除了培养温度和水分控制外, 测试方法和测试过程/环境条件是影响土壤有机 C 矿化测定结果和预测结果精确度的一个重要方面。目前, 国内外研究土壤有机 C 分解矿化 (或土壤呼吸) 存在多种方法, 包括: 碱液吸收法^[2-6]、碱石灰法^[7-8]、气象色谱法^[9-12]、红外气体分析法^[13-20]等。然而, 各种方法的测定原理和优缺点明显不同, 其适用性也不同。其中, 碱液吸收法和碱石灰法适用于测定 1~2 天内土壤 CO₂ 的总释放量, 然后推算土壤有机 C 在 1~2 天内的总矿化量。气象色谱法是每隔一定时间 (通常是每分钟) 抽取和补充密闭容器中一定体积的气体, 根据气象色谱仪器上检测密闭容器中不断增加的 CO₂ 浓度与时间变化建立的线性关系来计算有机 C 的矿化, 但样本量偏少 (5~6 个), 回归相关性低 (r 约为 0.90)^[10]。CO₂ 红外气体分析法在一定程度上克服了碱液吸收法、碱石灰法和气象色谱法的不足, 实现了动态观测。其原理与

气象色谱法接近, 也是通过建立气路系统内 CO₂ 浓度变化和时间的线性关系来计算有机 C 的矿化, 但其样本量大, 相关性高 (R^2 一般 > 0.98), 且只是需要设计一个密闭或开放的气路系统。然而, 红外气体分析仪对开发的气路系统要求比较严格, 仪器检测探头对气体的流动速度和进出气体的压力差变化等比较敏感。此外, 气体的流动速度 (风吹)、测定时的环境温度、CO₂ 浓度在密闭系统内不断增加等对测定时的土壤微生物活动有影响, 也对土壤 CO₂ 气体向上扩散有一定影响^[18]。

针对利用 CO₂ 红外气体分析仪测定土壤有机 C 矿化/土壤呼吸的适用性, 国外研究多集中在以下几个方面: 开发系统的平衡时间; 气体流速和压力差等对仪器检测读数波动的影响; 风吹波动和密闭箱界面波动等对测定结果的影响^[17-18]。本文主要从改进的密闭气路系统出发, 着重探讨两个方面的内容: ①改进系统的平衡时间和读数稳定性; ②测试时的平衡时间、测试环境温度等对测定结果的影响。

1 材料与方法

1.1 测定系统的构成

土壤有机 C 矿化的测定系统主体是 CO₂ 红外气体分析仪 (LICOR-6262), 其系统构成和密闭气路系统走向如图 1 所示, 组件包括: LICOR-6262

^①基金项目: 中国科学院创新工程重大项目 (KZCX1-Sw-01-17)、国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2002CB412503) 资助。

作者简介: 吴庆标 (1977—), 男, 广西玉林人, 博士研究生, 主要从事陆地生态系统碳循环研究。E-mail: wuqb2003@yahoo.com.cn

红外分析仪、计算机、换气泵、250 ml 棕色培养瓶、1 L 玻璃缓冲瓶、水浴保温装置、干燥管、滤网(0.1 μm)、通气胶管(内径 4 mm)等, 密闭气路系统的总体积约为 1940 ml (扣除 250 ml 培养瓶内 100 g 土壤所占的体积)。其中, 250 ml 培养瓶和 1 L 玻璃缓冲瓶的瓶口分别采用 5 号和 6 号橡皮塞盖严, 通气

胶管贯穿 5 号和 6 号橡皮塞, 其长短如图 1 所示, 其出气端往橡皮塞下端伸出 2 cm (向瓶内方向)。250 ml 培养瓶内部的进气管端头采用四壁打孔喷射型, 并把培养瓶的回流胶管顶端堵住, 减少回流气体对土壤样品的直接吹动。此外, 采用水浴保温(约 20 L 水)与空调控温相结合的办法, 保证测试环境

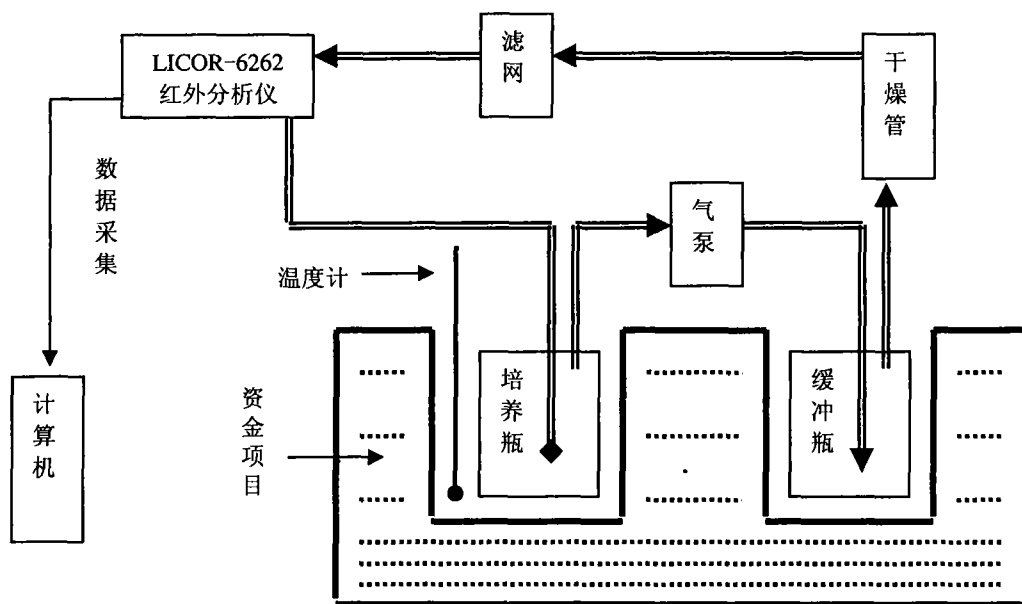


图 1 LICOR-6262 红外分析仪与附加的密闭气路系统

Fig. 1 The LICOR-6262 analyzer and its closed gas system

温度的相对稳定。气泵的换气速度控制在 0.5 ~ 2 L/min 之间。由于测定当时的室内外气温在 29 ~ 33 $^{\circ}\text{C}$, 测试环境温度(20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$)主要是通过调节水浴装置温度和室内空调温度来实现。

1.2 土壤样品培养与测试

供测试用的土壤采自内蒙古呼伦贝尔。为便于进行土壤有机 C 矿化速率的差异比较, 本文随机采用了不同土壤类型和不同培养天数的土壤, 包括暗棕壤(A, 已培养 25 天)、棕色针叶林土(B, 已培养了 2 天; C, 培养的第 1 天)、栗钙土(D, 已培养 3 天)、风沙土(E, 培养 1 天)等, 土壤经风干和过 2 mm 筛。称 100 g 土壤样品至 250 ml 棕色培养瓶, 水分调控在饱和持水率的 60% 左右, 每个样品 3 个重复。在瓶口加盖一个带通气孔的 5 号橡皮塞(孔径 2 ~ 3 mm)。培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。A、B、C、D、E 的土壤有机 C 含量分别为: 33.2、48.7、59.8、19.8、18.1 g/kg; 其土壤全 N 含量分别为: 2.625、3.867、4.333、2.034、1.333 g/kg。

在测定前的 1 ~ 2 h, 先移掉培养瓶的 5 号带孔橡皮塞并继续培养, 尽可能降低培养瓶内的 CO₂ 浓度和土壤孔隙中的 CO₂ 浓度。在测定前还需要通风换气把密闭气路和瓶内的 CO₂ 浓度降低到与大气中 CO₂ 的浓度接近, 且密闭气路系统和培养瓶内的浓度也应接近(相差不应超过 30 $\mu\text{mol/mol}$)。

1.3 数据统计方法

为了直观表示, 本文的测试结果仅用密闭气路系统内(约 1940 ml) CO₂ 浓度增量($\Delta\mu\text{mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$)表示。为表示系统“假定”的平衡时间长短对测定结果的影响, 对每个样品测定 8 min, 然后分别截取不同时间段的数据进行线性拟合, 包括 T₁₃、T₂₃、T₃₃、T₄₃、T₅₃。其中, T₁₃ 表示从开始计时(0 s)到 1 min 止为“假定”的系统平衡时间, 紧接着取后面 3 min 的时间和 CO₂ 浓度求得气路系统 CO₂ 浓度增量($\Delta\mu\text{mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$), T₂₃ 表示从开始计时(0 s)到 2 min 止为“假定”的系统平衡时间, 紧接着取后面 3 min 的时间和浓度求得气路系统 CO₂ 浓度增

量, 依此类推。通过系统 CO_2 浓度增量 ($\Delta\mu\text{mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$)、密闭气路系统体积、培养土壤烘干重量等就可以推算一定重量的土壤在特定时间段的有机 C 矿化量 ($\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)。

数据显著性差异检验采用 SPSS 软件的单因素方差分析法 (LSD 检验)。

2 结果与分析

2.1 系统平衡时间和读数稳定性

CO_2 红外气体分析仪的平衡时间和气泵在工作时的读数稳定性是衡量一个密闭气路系统好坏的两个主要指标。本改进的系统多数在 2 min 内实现整个密闭气路系统 CO_2 浓度的平衡稳定, 且在稳定时 (气泵在工作) 的读数波动较小, 变异在 $\pm 0.4 \mu\text{mol}/\text{mol}$ 以内, 如图 2 所示 (NO.1, NO.2, NO.3 代表 3 次不同 CO_2 平衡的操作过程)。其实, 250 ml 培养瓶和 1 L 缓冲瓶及两个瓶内的出气端胶管长度控制 (2 cm) 都起到了缓冲作用, 把换气泵抽/送气体引起的气体压力波动和气体涡旋效应尽量控制在两个玻璃瓶内, 从而降低了压力波动和气流波动对 CO_2 红外气体分析仪内部检测器的影响。

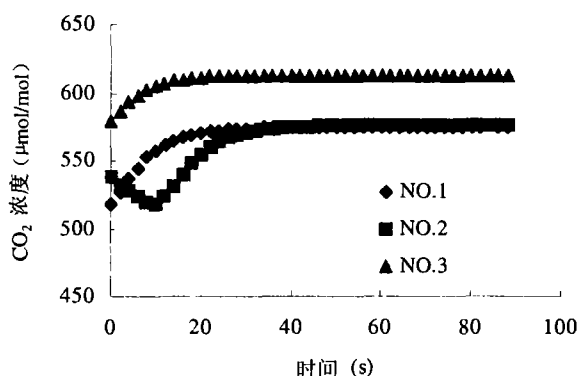


图 2 密闭气路系统 CO_2 浓度平衡所需的时间

Fig. 2 Time for the closed gas system to reach equilibrium in CO_2 concentration

2.2 平衡时间对结果的影响

土壤样品呼吸越强, 测定时密闭气路系统中 CO_2 浓度增加得越快, 如果系统内 CO_2 浓度超过 $700 \mu\text{mol}/\text{mol}$, 则可能对土壤微生物呼吸产生抑制作用。土壤样品测定时间愈长, 这种抑制效应也愈大。然而, 每个测定样品所需平衡时间无法准确知道, 这就意味着测定结果计算涉及到每个样品的平衡时间和测定时间长短问题。图 3 中的 T_{13} 、 T_{23} 、 T_{33} 、 T_{43} 、 T_{53} 分别表示“假定”平衡时间 (1、2、3、

4、5 min) 和所取时间段 (3 min) 对不同测试样品结果 (系统 CO_2 浓度增量, ($\Delta\mu\text{mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$)) 的影响。随着“假定”平衡时间的延长, 不同样品的测定结果都呈现不同程度的下降趋势。总体而言, T_{13} 的结果和 T_{23} 的结果之间下降较大, 可能与培养瓶内土壤空隙中原有的高浓度 CO_2 缓慢扩散有关, 这一缓慢扩散过程可能在不同的土壤样品中不一样。 T_{23} 和后面的几个时间段 (T_{33} 、 T_{43} 、 T_{53}) 的结果也有差别, 可能与回流气体吹送对土壤微生物活性的影响有关, 也可能与培养瓶内的风吹和气体波动阻碍了土壤 CO_2 气体向上扩散和释放等过程有关^[18]。

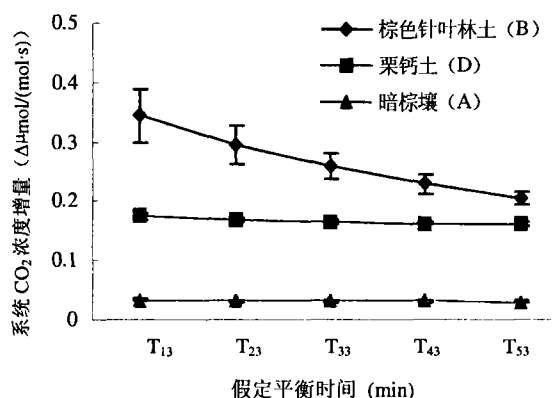


图 3 假定的平衡时间对测试结果的影响

Fig. 3 Effect of assumed balancing time on testing results

2.3 测试环境温度对结果的影响

土壤微生物对测试环境的温度变化相当敏感。尽管土壤样品的培养温度都为 25°C , 但改变测试环境温度对结果影响较大, 并随着“假定”平衡时间差异而不同 (图 4)。以培养 25 天的暗棕壤样品 (A) 为例, 以 25°C 的测定结果为参考, 较低温度 (20°C)

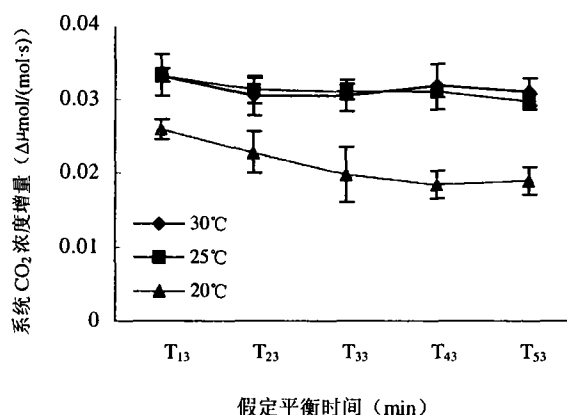


图 4 测试环境温度对测试结果的影响

Fig. 4 Effect of environmental temperature on testing results

对测定结果影响较大, 差异显著 ($P < 0.05$), 且随着假定平衡时间的延长, 结果降低得更多, 标准偏差变异也大。相反, 由于湿润土壤样品的热容量大, 较高温度 (30 °C) 在开始的前 5 min 对测定结果影响不大, 但随着时间推移, 样品瓶内土壤温度略有上升 (可至 27 °C), 土壤呼吸作用加强, 测定结果略有增加, 还抵消了测试结果原有的递减趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。因此, 测试环境温度应尽量与培养温度接近。

2.4 测定结果重复性检验

密闭气路系统改进后的效果必须经过测定结果的重复性和可靠性来检验。土壤加水培养后 16 h 内的有机 C 矿化增减变化剧烈, 数据变异系数大, 是土壤有机 C 矿化测定的难点之一。为了检验该密闭气路系统测定结果的重复性和可靠性, 本文利用该系统进行了这段时间的动态观测 (每 2 h 观测 1 次, 测试环境温度为 25 °C, 每个样品测定 5 min, 前 2 min 为平衡时间)。由图 5 可见, 该系统能较好反映两个土壤类型的呼吸差异及同一样品随时间推移的微小变化, 且测定结果重复性好, 标准偏差小, 误差基本控制在 5% 以内。

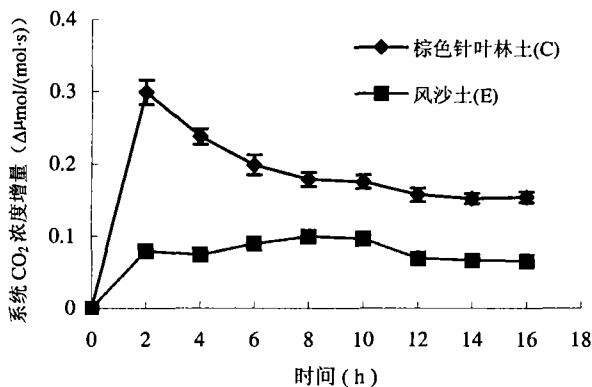


图 5 土壤 CO₂ 释放随培养时间的变化趋势

Fig. 5 Variation of soil CO₂ flux with duration of incubation at 25 °C temperature

3 结论与建议

不同的土壤, 其土壤有机 C 矿化速率存在差别, 但差别程度大小的比较主要依赖于测试方法的可靠性和灵敏度。如果测试方法本身的系统误差较大, 则无法反映土壤有机 C 矿化的微小差异, 或需要更多的重复来克服实验本身的误差。到目前为止, 尚无一种实验方法能确保土壤有机 C 矿化速率测定的实验误差控制在 2% 以内。本文改进的密

闭气路系统在大多数情况下也只能把实验误差控制在 5% 以内, 适宜的检测范围为 0.01 ~ 0.60 $\Delta \mu mol/(mol \cdot s)$, 即基本能满足 100 g 土壤或 2 ~ 3 g 凋落物的培养测定要求。此外, 本改进系统基本克服了气体压力差和气流涡旋对仪器检测的影响, 且在 2 min 内基本实现密闭气路系统的 CO₂ 浓度平衡, 把每个样品测试时间缩短到 5 min。然而, 许多的不确定性因素制约了该系统往实验误差更小的方向迈进, 包括测定前的通风换气时间、测试环境温度、假定平衡时间、气泵换气速度、回流气体对土壤 CO₂ 气体向上扩散的影响、CO₂ 浓度增加对土壤微生物活性的影响等^[17-18]。平衡时间对测试结果的影响较大, 且随着“假定”平衡时间的延长, 结果呈不同程度的降低 (图 3)。同样, 测试环境温度对测定结果有一定影响。以 25 °C 为参照, 较低温度 (20 °C) 对测定结果的降低影响存在显著差异 ($P < 0.05$), 而较高温度 (30 °C) 对测定结果的增加影响不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

鉴于测试环境温度对土壤有机 C 矿化速率测定结果有较大的影响, 建议测试环境的温度尽可能与培养样品的温度接近。在测定前, 还需要通风换气, 使密闭气路系统和样品瓶内的 CO₂ 浓度大体与大气 CO₂ 浓度接近, 即 500 $\mu mol/mol$ 左右。此外, 土壤空隙中原有的高浓度 CO₂ 扩散需要一定时间, 最好在测定前的 1 ~ 2 h 把培养瓶的橡胶瓶塞或其他封口材料移走, 让其自由扩散一段时间。在测定过程中, 需要经常检查气路的密闭性和读数的稳定性, 密闭气路系统的平衡时间一般以 2 ~ 3 min 为宜。平衡时间长短对测定结果存在一定的影响, 且结果随着平衡时间延长而降低, 其机理尚未完全弄清, 需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] Lal R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 2004, 304: 1623-1627
- [2] Franzluebbers AJ. Potential C and N mineralization and microbial biomass from intact and increasingly disturbed soils of varying texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1083-1090
- [3] Martens DA. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 361-369
- [4] 苏永中, 赵哈林, 张钢合, 赵学勇. 不同退化沙地土壤

- 碳的矿化潜力. 生态学报, 2004, 24 (2): 372-378
- [5] 吴建国, 张小全, 徐德应. 六盘山林区几种土地利用方式对土壤有机碳矿化影响比较. 植物生态学报, 2004, 28 (4): 530-538
- [6] 吴建国, 徐德应. 土地利用变化对土壤有机碳的影响—理论、方法和实践. 北京: 中国林业出版社, 2004
- [7] Lytle DE, Cronan CS. Comparative soil CO₂, evolution, litter decay, and root dynamics in clearcut and uncut spruce-fir forest. *Forest Ecology and Management*, 1998, 103: 121-128
- [8] Lee KH, Jose S. Soil respiration, fine root production, and microbial biomass in cottonwood and loblolly pine plantations along a nitrogen fertilization gradient. *Forest Ecology and Management*, 2003, 185: 263-273
- [9] Kelliher FM, Ross DJ, Law BE, Baldocchi DD, Rodda NJ. Limitations to carbon mineralization in litter and mineral soil of young and old ponderosa pine forests. *Forest Ecology and Management*, 2004, 191: 201-213
- [10] Keller JK, Bridgham SD, Chapin CT, Iversen CM. Limited effects of six years of fertilization on carbon mineralization dynamics in a Minnesota fen. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 1197-1204
- [11] Mikha MM, Rice CW, Milliken GA. Carbon and nitrogen mineralization as affected by drying and wetting cycles. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 339-347
- [12] 杨兰芳, 蔡祖聪. 玉米生长中的土壤呼吸及其受氮肥施用的影响. 土壤学报, 2005, 42 (1): 9-15
- [13] Buchmann N. Biotic and abiotic factors controlling soil respiration rates in *Picea abies* stands. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1625-1635
- [14] Stenger R, Barkle GF, Burgess CP. Mineralization and immobilization of C and N from dairy farm effluent (DFE) and glucose plus ammonium chloride solution in three grassland topsoils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1037-1048
- [15] Frank AB, Liebig MA, Hanson JD. Soil carbon dioxide fluxes in northern semiarid grasslands. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34: 1235-1241
- [16] Lou Yunsheng, Li Zhongpei, Zhang Taolin, Liang Yongchao. CO₂ emissions from subtropical arable soils of China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1835-1842
- [17] Subke JA, Inglema I, Peressotti A, Delle Vedove G, Cotrufo MF. A new technique to measure soil CO₂ efflux at constant CO₂ concentration. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1013-1015
- [18] Takle, ES, Massman WJ, Brandle JR, Schmidt RA, Zhou Xinhua, Litvina IV, Garcia R, Doyle G, Rice CW. Influence of high-frequency ambient pressure pumping on carbon dioxide efflux from soil. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2004, 124: 193-206
- [19] 罗辑, 杨忠, 杨清伟. 贡嘎山东坡峨眉冷杉林区土壤 CO₂ 排放. 土壤学报, 2000, 37 (3): 402-409
- [20] 牟守国, 温带阔叶林、针叶林和针阔混交林土壤呼吸的比较研究. 土壤学报, 2004, 41 (1): 564-570

Application of CO₂ Infrared Analyzer to Measurement of Mineralization of Soil Organic Carbon

WU Qing-biao, WANG Xiao-ke, REN Yu-fen

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: The LICOR-6262 analyzer was used as the mainbody in combination with a modified closed gas system, to explore effect of assumed balancing time and environmental temperature on results of the measurement. Results of the exploration showed ①balancing time of the closed gas system had significant effect on results of the measurement. With the time prolonged, the testing results decreased in value to a varying extent. ②environmental temperature also influenced testing results significantly. Compared with the required environmental temperature, 25℃, a low temperature (20℃) significantly affected the testing results ($P < 0.05$), but a high temperature (30℃) did not ($P > 0.05$).

Key word: Mineralization of soil organic carbon, Closed gas system, Systematical testing