

稳定性同位素技术在土壤重要 有机组分循环转化研究中的应用^①

田秋香^{1,2}, 张威¹, 闫颖¹, 何红波^{1*}, 张旭东¹, 郑立臣¹

(1 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 土壤有机质包含多种不同结构的有机物质, 如碳水化合物(中性糖、氨基糖)、蛋白质(氨基酸)、木质素等, 这些组分在土壤中的保留时间从几天到几百万年, 在有机质循环过程中的积累和转化动态各有特征, 其作用和贡献也有所不同。由于有机质各组分本身在土壤中稳定存在, 只有利用同位素示踪技术才能定量研究有机质及其组分的循环动态。本文概述了利用稳定同位素示踪技术研究有机质中的一些重要组分的来源、可利用性和转化动态及其生物标识作用的进展情况, 从而深入了解土壤有机质循环转化动态及调控机制。

关键词: 稳定性同位素; 有机组分; 动态; 生物标识物; 土壤

中图分类号: O657; S153

有机质是土壤的重要组成部分, 其数量和质量反映和控制着基本(初级)生产力, 因而与土壤肥力、碳截获潜力和可持续利用能力密切相关。土壤有机质是由具有不同保留时间的组分形成的复杂系统, 这些组分因其化学组成、分解转化程度、植物与微生物来源的相对贡献不同而具有独特的动力学特征^[1-2]。因此把土壤有机质作为一个对象看待并不能准确地反映土壤有机质的变化^[3]。研究表明, 土壤有机质主要是由可识别的生物分子组成, 其中71%~79%是以碳水化合物、氨基化合物、脂类、酚类的结构形式存在的^[4]。这些具有特定结构的简单化合物的生物化学活性和周转特征不同, 在维持调节土壤有机质功能的贡献上存在差异^[5]。因而, 在分子水平上研究土壤有机质的组成及转化特征从而阐明土壤有机质的来源、转化、去向及截获和稳定机制已成为土壤学的热点之一, 是评价土壤生态系统固碳潜力的核心和关键^[6-7]。

1 同位素检测技术与土壤有机组分周转动态的研究方法

由于土壤有机组分稳定存在并不断更新, 仅关注土壤中各有机组分的数量变化并不能获得它们的动态

变化信息^[8-9]。利用同位素标记技术实现“新”“老”化合物的区分, 为探讨土壤有机组分的循环转化特征提供了技术保证^[10-11]。在稳定同位素技术中, 天然的¹³C技术主要根据C3和C4植物光合作用途径不同而产生的同位素分异, 通过计算C3和C4植物的贡献比率获得相关的碳周转信息, 从而研究植被动态演替过程(C3/C4)对生态系统碳动力学过程及重建的影响^[12-13]。在同位素标记技术中, 由于利用标记底物(或元素)新形成的组分含有重同位素而与土壤中原有物质区分开来, 从而可跟踪该元素在土壤中的去向及其在不同化合物中的保留。近年来, ¹³C、¹⁵N同位素技术已被广泛用于土壤碳、氮循环研究, 也成为探讨土壤有机组分来源和转化动态的有效手段。目前化合物中¹³C、¹⁵N的检测主要依靠色谱-质谱技术和色谱-燃烧-同位素比例质谱技术^[14-15], 通过同位素富集比例的测定实现不同化合物中同位素标记与非标记部分的区分^[16-17]。其中, 气相色谱-燃烧-同位素比例质谱技术(GC-C-IRMS)对近天然丰度的化合物检测灵敏度高, 在长期C3/C4植被演替过程中化合物的碳动力学研究中被广泛应用^[17-19]。但是, 在GC-C-IRMS测定过程中所产生同位素分馏作用会对

^①基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41071161), 中国科学院创新团队伙伴计划项目(KZCX2-YW-T06)和辽宁省博士科研启动基金项目(20091091)资助。

* 通讯作者 (hehongbo@iae.ac.cn)

作者简介: 田秋香(1987—), 女, 江西赣州人, 博士研究生, 主要从事土壤碳氮等养分循环转化方面的研究。E-mail: tqx07137@163.com

测定结果产生很大影响^[20]。同时, 由于衍生过程中引入了碳原子, 需要较为复杂的校正才能获得原化合物的同位素富集比例^[21]。相比之下, 液相色谱-燃烧-同位素比例质谱技术 (LC-C-IRMS) 在测定土壤有机组分同位素富集比例时更有优势。一方面, 待测化合物无需衍生就可直接进行测定, 不仅可以降低由衍生副产物及衍生试剂所带来的干扰, 也可直接获得化合物的同位素比例; 另一方面, 利用液相色谱可以检测无法气化或衍生后也难以气化的有机组分^[22-23]。尽管同位素比例质谱具有很高的灵敏度, 但是, 当化合物同位素丰度较高时, 同位素比例质谱检测的准确性下降, 同时还有可能导致仪器污染。在这种情况下, 常利用色谱-质谱技术, 通过化合物电离的方式获得离子碎片峰, 根据相应同位素峰强度的变化进行同位素比例测定^[21,24-25]。同时, 色谱-质谱方法可以检测到同位素原子在化合物分子内部的分布情况, 为分析化合物的来源及周转的生物化学过程提供了重要信息^[26]。

土壤有机组分中同位素富集程度的表示方法因不同测量方法和同位素丰度的高低而异。用 IRMS 方法测定低丰度的同位素样品时, 一般采用 δ 值来表示, 公式为:

$$\delta (\text{‰}) = (R_{\text{sq}}/R_{\text{st}} - 1) \times 1000 \quad (1)$$

式中, δ 表示样品的同位素比值相对于标准物质同位素比值的千分差。其中 R_{sq} 为样品的同位素比值, 即样品中重原子个数占轻原子个数的比例, R_{st} 为标准物质的同位素比值。碳同位素采用的标准物质为美国南卡罗来纳州白垩纪皮狄组层位中的拟箭石化石 (Pee Dee Belemnite, 即 PDB), $R_{(\text{PDB})} = (11\ 237.2 \pm 90) \times 10^{-6}$; 氮同位素则以空气中的氮气为标准, $R_{(\text{N}_2)} = (3\ 676.5 \pm 8.1) \times 10^{-6}$ 。根据不同组分的前处理及测量条件的差异, 可以在此公式的基础上进行一定的修正^[20-21]。

在利用色谱-质谱技术测量有机组分的同位素比例变化时, 一般使用原子百分超 (atom percentage excess, APE) 来评价, 计算公式如下^[27-28]:

$$\text{APE} = (Be - Bc) / [1 + (Be - Bc)] \times 100 \quad (2)$$

式中, Be 代表培养土样的同位素富集比例, $Be = A_{(M+n)} / A_{(M)}$, 表示为同位素取代的色谱峰 ($M+n$) 峰面积与母峰 (M) 峰面积的比值, n 为电离碎片中同位素取代数目; Bc 代表同一次测定中对照土样相应的同位素富集比例, 计算方法同上。若待测化合物有多个碎片峰, 将各碎片同位素比例进行加权平均后即为该化合物中同位素富集比例。

2 土壤有机组分周转动态的研究

2.1 中性单糖 (neutral sugar)

碳水化合物中碳含量占土壤有机碳的 3%~16%, 在耕作土壤中, 甚至可达 10%~20%^[2]。土壤碳水化合物由不同来源的多糖组成, 经过生物化学降解后形成各种结构的单糖, 成为土壤微生物代谢过程中主要的碳源和能源。土壤中的中性单糖主要包括 8 种, 其中葡萄糖 (glucose)、半乳糖 (galactose) 和甘露糖 (mannose) 为六碳糖, 岩藻糖 (fucose)、鼠李糖 (rhamnose) 为脱氧六碳糖, 核糖 (ribose)、木糖 (xylose) 和阿拉伯糖 (arabinose) 是五碳糖。土壤中的中性单糖数量以葡萄糖最多, 核糖最少, 其他各糖含量相当^[29]。

不同种类的中性糖被认为存在不同来源 (植物或微生物), 但是多年来这一假设缺乏有效验证。利用 ^{13}C 标记葡萄糖进行土壤样品培养后, 闫颖等发现半乳糖、甘露糖、岩藻糖和鼠李糖等六碳糖及脱氧六碳糖中产生明显的 ^{13}C 富集, 其中以半乳糖和甘露糖富集程度最高; 阿拉伯糖也发生了 ^{13}C 富集, 但富集程度很低; 在木糖中未检测到同位素的富集 (结果暂未发表)。这一结果表明, 土壤微生物来源的糖类主要包括半乳糖和甘露糖^[30-31]。木糖和阿拉伯糖是植物水解后的主要中性单糖类型^[32], 微生物虽然也合成少量的阿拉伯糖, 与植物来源的数量相比可以忽略不计^[33], 因此可以认为这两种糖主要来源于植物。因此, 利用六碳糖和五碳糖的比例可评价不同土壤有机质库中植物和微生物源碳水化合物的主导作用^[34], (半乳糖+甘露糖) / (阿拉伯糖+木糖) 比值小于 0.5 表明以植物来源的碳水化合物为主, 该比值大于 2 则表示以微生物来源的碳水化合物为主^[31]。

中性糖是微生物活动的重要能源和碳源, 但是利用同位素示踪技术发现, 不同种类的中性糖的可利用性存在显著差异, 因而各中性单糖在土壤中的保持和周转特征存在化合物特异性和时间依赖性。Derrien 等^[29]用 ^{13}C 标记的葡萄糖、纤维素等含碳化合物进行一年的培养实验后发现, 各单糖总量以及标记单糖的含量在培养前两周迅速变化, 在培养的后期基本稳定, 从而推断出这些组分周转时间是葡萄糖 (0.9 天) < 纤维素 (3.8 天) < 不稳定的代谢产物 (16 天) << 稳定的碳水化合物 (>>1 年)。利用 $^{13}\text{CO}_2$ 标记小麦后, 从根系分泌的标记葡萄糖可以迅速被分解, 保留时间为 20 h^[35], 表明土壤中葡萄糖具有高度可利用性。收

集以 C3、C4 植株为食的奶牛排泄物做为底物, 添加到以黑麦草 (*Lolium spp.*, C3 植物) 为优势种的草原土壤, 培养一天后阿拉伯糖和木糖含量显著降低, 得出阿拉伯糖和木糖的平均保留分别为 30 h 和 91 h^[16,36]。然而, 作物残体中不同中性糖的可利用性有所不同。Derrien 等^[29]用 ¹³C 标记的小麦秸秆施入土壤中培养两周后, 秸秆带入的 50% 阿拉伯糖被微生物降解, 而秸秆带入的木糖有近 80% 被分解转化, 表现为微生物对木糖的利用效率大于阿拉伯糖。培养实验中的单糖大多涉及游离的单糖和聚合度较低的多糖, 因此其生物活性很高, 在土壤中迅速发生转化。在样地研究中, 通过额外补充贫或富 ¹³C 的 CO₂ 气体实现对植物及其组分的标记, 再结合同位素的混合原理计算有机组分的周转, 结果显示土壤中阿拉伯糖的保留时间 10~25 年, 木糖 6~22 年, 半乳糖 8~24 年, 甘露糖 8~24 年, 葡萄糖 4~15 年, 岩藻糖 4~14 年, 鼠李糖 4~29 年^[34]。以 C3/C4 植被转变为基础, Freier 等^[17]建立了土壤有机质及其组分转化的对流-扩散-分解模型 (ADD 模型), 推测出阿拉伯糖和木糖的保留时间分别为 5~13 年、2~7 年。在长期的土壤腐殖化过程中, 由于单糖组分聚合生成稳定的多糖并参与腐殖质的形成, 土壤中中性糖的可利用性随着分解时间的增加不断下降, 保留时间则呈非线性增加。因而, 土壤中的糖类存在至少两个库, 即活性库 (保留时间大约为 2 周) 和稳定库 (在一年内变化不大)^[11,29]。利用同位素技术不仅可反映某一时期内特定条件下的周转信息, 当该种组分在土壤中的行为状态相对稳定后, 可估算有机组分在土壤中的保留时间。

2.2 氨基糖 (amino sugar) 的转化研究

土壤中氨基糖氮的含量占土壤氮含量的 5%~10%, 是一种具有较高稳定性的微生物来源物质^[37]。到目前为止, 已经能证明土壤里存在了 11 种氨基糖^[38-39], 其中有 4 种氨基糖已被定量化^[40], 它们是氨基葡萄糖 (GluN)、氨基半乳糖 (GalN)、氨基甘露糖 (ManN) 和胞壁酸 (Mur)。氨基葡萄糖是真菌细胞壁几丁质的单体, 虽然细菌和土壤无脊椎动物也产生氨基葡萄糖^[41-42], 但含量甚微, 因此土壤中的氨基葡萄糖主要由真菌产生。胞壁酸唯一来源于细菌, 是细菌中脂多糖和细胞壁中肽聚糖的组成成分^[41,43]。氨基半乳糖主要是由细菌合成的^[44], 但越来越多的研究表明真菌对土壤中氨基半乳糖量的贡献不可忽视。土壤里氨基甘露糖的来源还不清楚, 由于它在土壤中含量少, 对其的研究也不多。总体来说, 氨基糖是土壤微

生物细胞壁的组成物质, 并因其微生物异源性常作为分子标识物对土壤真菌和细菌的残体在土壤有机质的积累过程中起指示作用。

由于氨基糖具有一定稳定性, 土壤中氨基糖的数量主要反映了死亡微生物产生的残留, 因此, 仅根据氨基糖的含量并不能推论出土壤中细菌和真菌的实际生物量。但是, 利用同位素示踪技术, 氨基糖中同位素的富集则可表明微生物对底物的利用, 因而与微生物的活性及其对底物响应的动态直接相关。

Decock 等^[21]用 ¹³C 标记底物培养发现氨基糖可被迅速合成, 氨基葡萄糖的 $\delta^{13}\text{C}$ 值由培养初的 -15‰ 增加到 96.6‰, 表明添加可利用底物可迅速提高微生物活性。当以 ¹³C 标记的葡萄糖为底物时, 细菌来源的胞壁酸中的 ¹³C 富集比例要大于真菌来源的氨基葡萄糖^[20,26]; 然而, 当以 ¹³C 标记的谷子、叶片、根系 3 种不同底物进行培养时, 氨基葡萄糖的 ¹³C 富集程度大于胞壁酸^[21]。增加大气中 ¹³CO₂ 的量, 结果显示 ¹³CO₂ 被土壤中的微生物截获, 氨基葡萄糖和氨基半乳糖出现 ¹³C 的富集^[45]。由于土壤氨基糖具有微生物异源性, 特定氨基糖的动态可反映不同微生物群落对底物的响应。细菌容易利用活性较强的底物, 真菌则在利用低活性的和抗分解的组分时更具有优势^[46-48]。因此, 在复杂底物 (如玉米秸秆) 分解过程中, 细菌在底物分解初期占据优势; 随着培养的进行, 真菌群体转变为相对优势群体, 以利用逐渐增多的难降解组分^[49]。

利用同位素标记技术, 氨基糖自身的生物可利用性近年来被人们所认识, 从而可定量研究稳定微生物残留物的周转特征。在 4 种可被分离的葡萄糖中, 游离氨基葡萄糖是土壤可溶性有机氮和碳的重要组成部分^[50], 能够迅速被微生物利用或被植物根系吸收^[37], 在土壤总的半衰期只有 1~3 h^[50]。¹³C 标记的氨基葡萄糖在两种草地土壤剖面中的动态表明, 低浓度时游离氨基葡萄糖的转化速率与葡萄糖相似, 而高浓度时的微生物利用性则远小于葡萄糖。实际上, 在复杂的土壤基质中, 氨基糖大部分是以细胞壁残留物的形式存在, 同时受到土壤颗粒的物理和化学等保护作用, 不易被分解利用。当土壤碳氮受限时, 氨基糖才开始作为重要的碳源和氮源, 与其他难分解的有机组分相比, 微生物更容易利用这些细胞壁残留物满足生长需要^[51-52]。进一步利用同位素标记氨基糖的矿化研究表明, 新合成的氨基糖在活性库中保存, 易于被降解重新参与物质循环; 而“老”氨基糖在土壤中相对稳定, 组成土壤氨基糖的稳定库^[11]。和氨基葡萄糖相比, 胞壁酸

更容易结合在土壤活性有机质组分中, 在养分相对缺乏的环境下易降解并再次参与土壤养分循环^[53]。

2.3 蛋白质和氨基酸 (protein and amino acids) 的转化研究

土壤中蛋白质(氨基酸)是土壤有机碳氮的重要组成部分, 主要来源于土壤微生物、动植物以及代谢产物。Sowden^[54]将不同地区土壤水解性氨基酸的平均组成与当地藻类、细菌、真菌和酵母的氨基酸组成进行比较, 发现土壤氨基酸的组成与细菌最为相似, 由此推断土壤氨基酸主要为微生物利用动植物残体合成后的产物。同位素示踪技术的应用使氨基酸的来源、周转及可利用性研究得到很大的提高。

氨基酸是生命体的重要结构成分, 然而如何有效区分氨基酸的来源一直是一个难题。由于氨基酸在不同生命体代谢过程中经历不同程度的同位素分馏作用会导致¹³C富集程度的差异, 为此建立¹³C指纹图谱给氨基酸的溯源问题提供了思路^[55]。利用GC-C-IRMS技术, Larsen等^[55]分析了10种C3植物、13种真菌和10种细菌的氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 建立了不同生命体中各氨基酸¹³C指纹图谱。结果表明植物、真菌和细菌来源的氨基酸在 $\delta^{13}\text{C}$ 值上有显著差异, 特别是赖氨酸、亮氨酸和异亮氨酸, 据此建立的¹³C图谱能有效地判定氨基酸的来源。由于土壤中氨基酸来源复杂, 土壤氨基酸的溯源问题还处于起步阶段, 同位素技术的运用为这一领域的发展提供了新的技术动力。

Zhang等^[56]用外加活性碳源和¹⁵N-NH₄⁺研究标记氮向土壤氨基酸的转化, 培养实验发现第三周时各氨基酸中氮的原子百分超达到3%~13%, 不同氨基酸差异显著, 其中丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和谷氨酸中¹⁵N的富集比远远大于甘氨酸和精氨酸。氨基酸组分具有不同的周转速率, 可表明它们在土壤生物化学过程中的地位和作用的差异。同位素富集程度越大, 说明这些组分在土壤中的周转越快。以¹³C-葡萄糖为培养底物, 也发现土壤中¹³C标记氨基酸不断富集, 在第三周时其转化和更新可达8%~20%, 富集程度因氨基酸而异, 不同土壤类型上的结果也存在差异^[56-57]。

长期以来, 普遍认为土壤中有有机态氮只有经过矿化过程生成无机氮后才能被植物吸收利用。但近年来研究发现在营养缺乏的环境中, 植物利用的氮量大于土壤矿化、固持以及通过沉积等方式输入氮的总和, 推测土壤中存在可被植物直接利用的有机氮^[58]。这种假设利用¹³C和¹⁵N双标记的甘氨酸(Gly)同位素示

踪技术得到了验证。方法通过对植物根系组织中¹⁵N/¹³C的比值进行分析, 若该比例小于2:1, 则表明至少有部分Gly-¹⁵N在被矿化之前就已经被植物吸收。研究表明, 盐碱环境中的草本植物、北方落叶林和温带草原以及农田生态系统中的植被都能吸收具有完整结构的游离氨基酸分子以满足氮素需求^[58-62]。这一发现也对土壤氮素循环的机理——矿化-固持周转(MIT)^[63]提出挑战, 指出了低分子有机氮可被作物直接吸收利用的“直接途径”^[64-65]。

氨基酸作为有机碳氮化合物, 既可作为可利用氮源, 也是土壤可利用碳的重要形式。通过向土壤中加入¹⁴C标记的氨基酸随后测定释放的¹⁴CO₂量来研究土壤氨基酸的矿化, 结果表明游离氨基酸在土壤中能迅速转化, 半衰期只有2.3 h^[57], 约有34%的氨基酸-C以CO₂的形式呼吸掉, 67%被吸收利用进入新的细胞^[67]。David^[68]用¹⁵N标记的6种氨基酸(精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、甘氨酸、亮氨酸)研究它们在酸性森林土壤中的去向, 发现4 h后有7%~45%(平均18%)的氨基酸被矿化。培养实验还得出3种氨基酸在土壤中的矿化速率表现为赖氨酸<甘氨酸<谷氨酸^[67]。不同氨基酸的矿化速率大小主要取决于氨基酸在代谢循环中起的作用, 同时受到微生物同化作用以及土壤颗粒的物理吸附的影响^[61,68]。因而, 易于进入代谢循环的氨基酸更容易被分解利用, 与氨基酸自身碳氮比并无直接关系。

与游离氨基酸不同, 蛋白质氨基酸的矿化速率只有它的二十分之一^[69]。Gleixner等^[70]用水解GC法分析Boignville和Halle的样品¹³C丰度也表明土壤中蛋白质的保留时间是54年左右, 远远大于游离氨基酸在土壤中的周转时间。氨基酸矿化主要受到蛋白质的水解过程的限制, 从而降低了土壤中蛋白质氨基酸的可利用性^[69]。

2.4 木质素的转化研究

木质素(lignin)是植物衍生性组分, 在维管植物中是以木质纤维素的复合形式存在^[71]。木质素是三维的高分子聚合物, 由于存在芳香环结构及不可水解的C-O-C和C-C键, 对保持土壤有机碳的稳定性尤为重要^[72]。木质素可以用来指示进入土壤的植物残体被微生物分解和利用的情况以及植物来源有机物质在土壤中的积累和变化。木质素经CuO氧化产生单环酚, 这些单环酚具有苯酰基(H)、香草基(V)、丁香基(S)和肉桂基(C)的醛、酮和酸侧链分子^[73-75]。目前主要是以这些单体结构为标识物研究木质素在土壤中的动态,

例如用木质素各单体分子的总和 (V+S+C) 用来指示木质素的含量以及对土壤有机碳稳定性的贡献^[74]。微生物对木质素的分解程度则可通过香草基结构单元的酸醛比 (ac/al)_v 及丁香基结构单元的酸醛比 (ac/al)_s 来表达, 较高 (ac/al)_v 和 (ac/al)_s 比值说明苯丙烷单元侧链氧化增加, 微生物转化强度增大^[76]。但是, 由于木质素在土壤中稳定性较高, 只有利用同位素的标记技术, 才能定量研究木质素在土壤中的分解转化过程^[77]。

以植物残体形式进入土壤的木质素少部分发生矿化作用, 最终形成 CO₂ 释放; 而绝大部分剩余的木质素在土壤中经过生物化学过程, 转变为组成和结构比原来更为复杂的新有机化合物即腐殖质^[78]。Bahri 等^[79]用 ¹³C 标记的玉米植株进行 44 周的培养实验研究了木质素来源碳在农田土壤中的转化和去向。研究发现, 6.0% 的标记碳被分解矿化, 0.8% 存在于微生物量中, 0.1% 以溶解有机碳的形式存在, 而其余的 93% 则是以未分解的木质素聚合物形式存在于土壤中, 表明进入土壤的木质素对土壤有机质的稳定起到重要作用。

由于木质素是没有确定结构的高分子物质, 较难获得直接的同位素标记产物, 基于植物类型改变条件下天然丰度的变化, Bahri 等^[74]通过 C3/C4 植被转变研究木质素的周转时间问题, 发现木质素各个单体的周转速率有所不同。各个单体表现为香草基 (V) > 丁香基 (S) > 肉桂基 (C), 周转时间的变化范围从 7 年到 33 年 (平均是 18.2 年 ± 6.9 年) 不等, 推测木质素的周转时间是 7~17 年。在另一 C3/C4 植被转变系统中, Heim 等^[74,77,80]发现木质素在农田和草原土壤中保留时间最短可以达到 7 年, 整体来看木质素保留时间是 20~38 年。由于有机质及其组分的分解是非线性过程^[11]。新鲜木质素能迅速地被分解, 保留时间大约为 0.5 年^[81]。而受到保护的稳定库中的木质素的分解大大减慢, 每年周转速度只有 0.05^[74,82]。根据双库模型理论, 木质素的平均保留时间是 25 年^[79]。

3 结果与展望

土壤各不同组分在有机质积累和转化过程中的动态各有特征, 其作用和贡献也有所不同。稳定同位素技术的应用使土壤有机质组分的动态变化研究得到空前的发展, 然而在研究土壤有机组分长期的化学周转及稳定过程中还存在一定的不确定性。简单的同位素混合模型并不能准确地计算出这些专性物质的周转速度。这样在用 $\delta^{13}\text{C}$ 来计算组分转化的时候就要考虑时间上的关系, 标记的时间越长, 结果越准确。但目前绝大部分同位素标记实验都是在有限的时间内完成,

人工标记的培养实验一般是在数周或者数月之内就完成; FACE 试验的观测时间范围大概为十年到几十年^[34]; 而基于 C3/C4 植物转变的天然标记实验也只能回溯到一个世纪前^[83]。因此, 将同位素技术进一步扩展到土壤组分的时空特性的研究中, 同时结合放射性的共振成像、核磁共振、远红外傅里叶光谱的二维光谱、微细结构的 X 射线的吸收光谱, 才能对土壤有机质的转化和循环方向及限度研究取得重大突破。

参考文献:

- [1] Biederbeck VO, Janzen HH, Campbell CA, Zentner RP. Labile soil organic-matter as influenced by cropping practices in an arid environment. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26(12): 1 647-1 656
- [2] Guggenberger G, Christensen BT, Zech W. Land-use effects on the composition of organic-matter in particle-size separates of soil. I: Lignin and carbohydrate signature. *Eur. J. Soil Sci.*, 1994, 45(4): 449-458
- [3] Olk DC. A chemical fractionation for structure-function relations of soil organic matter in nutrient cycling. *Soil Science Society of America Journal*, 2006, 70(3): 1 013-1 022
- [4] Martens DA, Reedy TE, Lewis DT. Soil organic carbon content and composition of 130-year crop, pasture and forest land-use managements. *Glob. Change Biol.*, 2004, 10(1): 65-78
- [5] van Hees PAW, Johansson E, Jones DL. Dynamics of simple carbon compounds in two forest soils as revealed by soil solution concentrations and biodegradation kinetics. *Plant Soil*, 2008, 310(1/2): 11-23
- [6] Kaur T, Brar BS, Dhillon NS. Soil organic matter dynamics as affected by long-term use of organic and inorganic fertilizers under maize-wheat cropping system. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 2008, 81(1): 59-69
- [7] Pepper DA, Eliasson PE, McMurtrie RE, Corbeels M, Agren GI, Stromgren M, Linder S. Simulated mechanisms of soil n feedback on the forest CO₂ response. *Glob. Change Biol.*, 2007, 13(6): 1 265-1 281
- [8] 窦森, 张晋京. 用 $\delta^{13}\text{C}$ 值研究土壤有机质周转的方法及其评价. *吉林农业大学学报*, 2001, 23(2): 64-67
- [9] 庞学勇, 包维楷, 吴宁. 森林生态系统土壤可溶性有机质(碳) 影响因素研究进展. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(3): 390-398
- [10] Boschker HTS, Middelburg JJ. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2002, 40(2): 85-95
- [11] Amelung W, Brodowski S, Sandhage-Hofmann A, Bol R. Combining Biomarker with Stable Isotope Analyses for Assessing the Transformation and Turnover of Soil Organic Matter

- Advances in Agronomy, vol 100. San Diego: Elsevier Academic Press Inc., 2008: 155-250
- [12] Balesdent J, Mariotti A. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance // Boutton TW, Yamasaki SI. Mass Spectrometry of Soils. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996: 83-111
- [13] 寇太记, 朱建国, 谢祖彬, 刘钢, 曾青. 大气 CO_2 浓度升高和氮肥水平对麦田土壤有机碳更新的影响. 土壤学报, 2009, 46(3): 459-465
- [14] Girardin C, Rasse DP, Biron P, Ghashghaie J, Chenu C. A method for C-13-labeling of metabolic carbohydrates within french bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) for decomposition studies in soils. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009, 23(12): 1 792-1 800
- [15] 何红波, 张威, 解宏图, 侯松帽, 张旭东. 测定土壤氨基糖和氨基酸手性异构体中氮同位素比值的气相色谱/质谱方法. 土壤学报, 2009, 46(2): 289-298
- [16] Glaser B. Compound-specific stable-isotope ($\delta^{13}\text{C}$) analysis in soil science. J. Plant Nutr. Soil Sci., 2005, 168(5): 633-648
- [17] Freier KP, Glaser B, Zech W. Mathematical modeling of soil carbon turnover in natural podocarpus forest and eucalyptus plantation in Ethiopia using compound specific $\delta^{13}\text{C}$ analysis. Glob. Change Biol., 2010, 16(5): 1 487-1 502
- [18] Sauheitl L, Glaser B, Bol R. Short-term dynamics of slurry-derived plant and microbial sugars in a temperate grassland soil as assessed by compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses. Vienna, AUSTRIA, 2004: 1 437-1 446
- [19] 朱书法, 刘丛强, 陶发祥. $\delta^{13}\text{C}$ 方法在土壤有机质研究中的应用. 土壤学报, 2005, 42(3): 495-503
- [20] Glaser B, Gross S. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analysis of individual amino sugars - A tool to quantify timing and amount of soil microbial residue stabilization. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2005, 19(11): 1 409-1 416
- [21] Decock C, Deneff K, Bode S, Six J, Boeckx P. Critical assessment of the applicability of gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry to determine amino sugar dynamics in soil. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009, 23(8): 1 201-1 211
- [22] Morrison DJ, Taylor K, Preston T. Strong anion-exchange liquid chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry using a liquiface interface. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2010, 24(12): 1 755-1 762
- [23] McCullagh JSO, Juchelka D, Hedges REM. Analysis of amino acid C-13 abundance from human and faunal bone collagen using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2006, 20(18): 2 761-2 768
- [24] Hou S, He H, Zhang W, Xie H, Zhang X. Determination of soil amino acids by high performance liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometry derivatized with 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate. Talanta, 2009, 80(2): 440-447
- [25] Bode S, Deneff K, Boeckx P. Development and evaluation of a high-performance liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry methodology for $\delta^{13}\text{C}$ analyses of amino sugars in soil. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009, 23(16): 2 519-2 526
- [26] He HB, Xie HT, Zhang XD, Wang YH, Wu YY. A gas chromatographic/mass spectrometric method for tracing the microbial conversion of glucose into amino sugars in soil. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2005, 19(14): 1 993-1 998
- [27] He HB, Xie HT, Zhang XD. A novel GC/MS technique to assess N-15 and C-13 incorporation into soil amino sugars. Soil Biol. Biochem., 2006, 38(5): 1 083-1 091
- [28] Silvester WB, Parsons R, Watt PW. Direct measurement of release and assimilation of ammonium in the gunnera-nostoc symbiosis. New Phytol., 1996, 132: 617-625
- [29] Derrien D, Marol C, Balesdent J. Microbial biosyntheses of individual neutral sugars among sets of substrates and soils. Geoderma, 2007, 139(1/2): 190-198
- [30] Murayama S. Changes in the monosaccharide composition during the decomposition of straws under field conditions. Soil Sci. Plant Nutr., 1984, 30(3): 367-381
- [31] Oades JM. Soil organic-matter and structural stability-mechanisms and implications for management. Plant Soil, 1984, 76(1/3): 319-337
- [32] Cheshire MV. Origins and stability of soil polysaccharide. Journal of Soil Science, 1977, 28(1): 1-10
- [33] Oades JM, Wagner GH. Biosynthesis of sugars in soils incubated with C-14 glucose and C-14 dextran. Soil Science Society of America Proceedings, 1971, 35(6): 914
- [34] Bock M, Glaser B, Millar N. Sequestration and turnover of plant- and microbially derived sugars in a temperate grassland soil during 7 years exposed to elevated atmospheric pCO_2 . Glob. Change Biol., 2007, 13(2): 478-490
- [35] Derrien D, Marol C, Balesdent J. The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat. An approach by C-^{13} pulse-labelling and GC/C/IRMS. Plant Soil, 2004, 267(1/2): 243-253
- [36] Sauheitl L, Glaser B, Bol R. Short-term dynamics of slurry-derived plant and microbial sugars in a temperate grassland soil as assessed by compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2005, 19(11): 1 437-1 446
- [37] Stevenson FJ. Humus Chemistry. New York: Wiley, 1982:

- 172-194
- [38] Amelung W, Kimble JM, Samson-Liebig S, Follett RF. Restoration of microbial residues in soils of the conservation reserve program. *Soil Science Society of America Journal*, 2001, 65(6): 1 704-1 709
- [39] Stevenson FJ. Isolation and identification of amino-sugars in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 1983, 47(1): 61-65
- [40] Zhang XD, Amelung W. Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and galactosamine in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28(9): 1 201-1 206
- [41] Kenne LK, Lindburg B: Bacterial polysaccharides // Aspinall GO. The polysaccharides. New York: Academic Press, 1983: 287-365
- [42] Bird AF, McClure MA. Tylenchid (nematoda) egg-shell-structure, composition and permeability. *Parasitology*, 1976, 72(FEB): 19
- [43] Wilkinson SG. Composition and structure of bacterial lipopolysaccharides // Sutherland I. Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell. London: Academic Press, 1977: 97-174
- [44] Sowden FJ, Ivarson KC. Effects of temperature on changes in nitrogenous constituents of mixed forest litters during decomposition after inoculation with various microbial cultures. *Canadian Journal of Soil Science*, 1974, 54(4): 387-394
- [45] Miltner A, Richnow HH, Kopinke FD, Kastner M. Incorporation of carbon originating from CO₂ into different compounds of soil microbial biomass and soil organic matter. *Isot. Environ. Health Stud.*, 2005, 41(2): 135-140
- [46] Myers RT, Zak DR, White DC, Peacock A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 2001, 65(2): 359-367
- [47] Waldrop MP, Firestone MK. Microbial community utilization of recalcitrant and simple carbon compounds: Impact of oak-woodland plant communities. *Oecologia*, 2004, 138(2): 275-284
- [48] Paul EA, Clark FE. Methods for studying soil microorganisms. San Diego: Academic Press, 1996
- [49] 丁雪丽, 何红波, 白震, 解宏图, 张彬, 张旭东. 不同供氮水平对施用玉米秸秆后黑土氨基糖转化的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(9): 2 207-2 213
- [50] Roberts P, Bol R, Jones DL. Free amino sugar reactions in soil in relation to soil carbon and nitrogen cycling. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, 39(12): 3 081-3 092
- [51] Amelung W, Miltner A, Zhang X, Zech W. Fate of microbial residues during litter decomposition as affected by minerals. *Soil Sci.*, 2001, 166(9): 598-606
- [52] Engelking B, Flessa H, Joergensen RG. Shifts in amino sugar and ergosterol contents after addition of sucrose and cellulose to soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, 39(8): 2 111-2 118
- [53] Zhang X, Amelung W, Yuan Y, Samson-Liebig S, Brown L, Zech W. Land-use effects on amino sugars in particle size fractions of an Argiudoll. *Applied Soil Ecology*, 1999, 11(2/3): 271-275
- [54] Sowden FJ. Distribution of nitrogen in representative Canadian soils. *Canadian Journal of soil science*, 1977, 57(4): 445-456
- [55] Larsen T, Taylor DL, Leigh MB, O'Brien DM. Stable isotope fingerprinting: A novel method for identifying plant, fungal, or bacterial origins of amino acids. *Ecology*, 2009, 90(12): 3 526-3 535
- [56] Zhang XD, He HB, Amelung W. A GC/MS method for the assessment of N-15 and C-13 incorporation into soil amino acid enantiomers. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, 39(11): 2 785-2 796
- [57] Jones DL, Kemmitt SJ, Wright D, Cuttle SP, Bol R, Edwards AC. Rapid intrinsic rates of amino acid biodegradation in soils are unaffected by agricultural management strategy. *Soil Biol. Biochem.*, 2005, 37(7): 1 267-1 275
- [58] Nasholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Hogberg M, Hogberg P. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, 1998, 392(6679): 914-916
- [59] Henry HAL, Jeffries RL. Plant amino acid uptake, soluble N turnover and microbial N capture in soils of a grazed arctic salt marsh. *Journal of Ecology*, 2003, 91(4): 627-636
- [60] McFarland JW, Ruess RW, Kielland K, Doyle AP. Cycling dynamics of NH₄⁺ and amino acid nitrogen in soils of a deciduous boreal forest ecosystem. *Ecosystems*, 2002, 5(8): 775-788
- [61] Sauheitl L, Glaser B, Weigelt A. Uptake of intact amino acids by plants depends on soil amino acid concentrations. *Environ. Exp. Bot.*, 2009, 66(2): 145-152
- [62] Streeter TC, Bol R, Bardgett RD. Amino acids as a nitrogen source in temperate upland grasslands: The use of dual labelled (C-13, N-15) glycine to test for direct uptake by dominant grasses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14(15): 1 351-1 355
- [63] Jansson SL. Tracer studies on nitrogen transformations in soil with special attention to mineralization - immobilization relationships. *Sweden*, 1958, 24: 101-361
- [64] 何红波, 张旭东. 同位素稀释分析在土壤氮素循环利用研究中的应用. *土壤通报*, 2006, 37(3): 576-581
- [65] Barraclough D. The direct or mit route for nitrogen immobilization: A N-15 mirror image study with leucine and glycine. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29(1): 101-108
- [66] 张威. 土壤氨基酸和氨基糖聚合物的矿化过程研究(博士学位论文). 沈阳: 中国科学院沈阳应用生态研究所, 2008
- [67] Jones DL, Hodge A. Biodegradation kinetics and sorption

- reactions of three differently charged amino acids in soil and their effects on plant organic nitrogen availability. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, 31(9): 1 331-1 342
- [68] David ER. Effects of amino-acid chemistry and soil properties on the behavior of free amino acids in acidic forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2010, 42(10): 1 743-1 750
- [69] Jan MT, Roberts P, Tonheim SK, Jones DL. Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 2009, 41(11): 2 272-2 282
- [70] Gleixner G, Poirier N, Bol R, Balesdent J. Molecular dynamics of organic matter in a cultivated soil. Toulouse, France, 2000: 357-366
- [71] Hedges JI. Global biogeochemical cycles: Progress and problems. *Mar. Chem.*, 1992, 39(1/3): 67-93
- [72] Krull ES, Baldock JA, Skjemstad JO. Importance of mechanisms and processes of the stabilisation of soil organic matter for modelling carbon turnover. *Funct. Plant Biol.*, 2003, 30(2): 207-222
- [73] Hedges JI, Ertel JR. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation-products. *Anal. Chem.*, 1982, 54(2): 174-178
- [74] Bahri H, Dignac MF, Rumpel C, Rasse DP, Chenu C, Mariotti A. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biol. Biochem.*, 2006, 38(7): 1 977-1 988
- [75] 于灏, 吴莹, 张经, 姚庆祯, 朱卓毅. 长江流域植物和土壤的木质素特征. *环境科学学报*, 2007, 27(5): 817-823
- [76] Guggenberger G, Zech W. Composition and dynamics of dissolved carbohydrates and lignin-degradation products in 2 coniferous forests, ne bavaria, germany. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26(1): 19-27
- [77] Dignac MF, Bahri H, Rumpel C, Rasse DP, Bardoux G, Balesdent J, Girardin C, Chenu C, Mariotti A. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: An appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma*, 2005, 128(1/2): 3-17
- [78] 黄昌勇. 土壤学. 北京: 中国农业出版社, 2000: 39
- [79] Bahri H, Rasse DP, Rumpel C, Dignac MF, Bardoux G, Mariotti A. Lignin degradation during a laboratory incubation followed by C-13 isotope analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, 40(7): 1 916-1 922
- [80] Heim A, Schmidt MWI. Lignin turnover in arable soil and grassland analysed with two different labelling approaches. *Eur. J. Soil Sci.*, 2007, 58(3): 599-608
- [81] Rasse DP, Dignac MF, Bahri H, Rumpel C, Mariotti A, Chenu C. Lignin turnover in an agricultural field: From plant residues to soil-protected fractions. *Eur. J. Soil Sci.*, 2006, 57(4): 530-538
- [82] Amelung W, Zech W. Organic species in ped surface and core fractions along a climosequence in the prairie, North America. *Geoderma*, 1996, 74(3/4): 193-206
- [83] Lobe I, Bol R, Ludwig B, Du Preez CC, Amelung W. Savanna-derived organic matter remaining in arable soils of the South African highveld long-term mixed cropping: Evidence from C-13 and N-15 natural abundance. *Soil Biol. Biochem.*, 2005, 37(10): 1 898-1 909

The Application of Stable Isotope Techniques in Investigating Cycling of Soil Organic Components

TIAN Qiu-xiang^{1,2}, ZHANG Wei¹, YAN Ying¹, HE Hong-bo¹, ZHANG Xu-dong¹, ZHENG Li-chen¹

(1 Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Soil organic matter (SOM) comprises a vast range of different organic constituents with a mean residence time ranging from days to millennia. The individual components such as carbohydrates, protein and lignin play different roles in the accumulation and transformation of SOM, thus making different contributions to the cycling of soil carbon. Considering the stability of the components, isotope tracing technique is powerful to trace their dynamics in SOM turnover. A review was given in this paper on the origin, availability and transformation of some essential organic compounds in soil relied on stable isotope techniques. It would be helpful for a better understanding of the dynamics and mechanisms of SOM cycling.

Key words: Stable isotopes, Organic component, Dynamics, Biomarker, Soil