

# 应用 $^{15}\text{N}$ 稀释法测定土壤氮素初级转化速率的一些关键技术<sup>①</sup>

王 敬<sup>1</sup>, 张金波<sup>1,2,3,4\*</sup>, 蔡祖聪<sup>1,2,3,4</sup>

(1 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023; 2 虚拟地理环境教育部重点实验室(南京师范大学), 南京 210023; 3 江苏省地理环境演化国家重点实验室培育建设点, 南京 210023; 4 江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心, 南京 210023)

**摘 要:** 本文综合评述了应用  $^{15}\text{N}$  库稀释法测定土壤氮素初级转化速率的一些关键技术, 即  $^{15}\text{N}$  标记土壤氮库的方法、 $^{15}\text{N}$  的加入量、丰度和标记物种类的选择, 以及初始取样时间的确定。只有合理地运用这些关键技术, 才能更准确地测定土壤氮素初级转化速率, 进而更真实地表征土壤氮素的实际周转状况。

**关键词:**  $^{15}\text{N}$  稀释法;  $^{15}\text{N}$  均匀分布;  $^{15}\text{N}$  加入量;  $^{15}\text{N}$  丰度

**中图分类号:** S154.1

自 20 世纪 50 年代 Kirkham 和 Bartholomew<sup>[1]</sup> 提出  $^{15}\text{N}$  稀释法测定土壤氮素初级转化速率以来, 随着计算机分析技术的发展, 一些数值模型被广泛用来测定氮素初级转化速率, 使得氮转化概念模型更加接近于真实过程。然而, 运用  $^{15}\text{N}$  标记土壤氮库的方法来研究土壤中氮初级转化速率仍然存在较大的不确定因素。该法有 3 个重要假设:  $^{15}\text{N}$  和  $^{14}\text{N}$  具有相同的被微生物利用的机会;  $^{15}\text{N}$  均匀地标记于土壤;  $^{15}\text{N}$  和本底  $^{14}\text{N}$  的平衡<sup>[2]</sup>。在实际操作中只有尽量满足这 3 个假设, 才能更准确地测定土壤氮初级转化速率。本文综合评述了应用  $^{15}\text{N}$  库稀释法测定土壤氮素初级转化速率的一些关键技术, 即  $^{15}\text{N}$  标记土壤氮库的方法、 $^{15}\text{N}$  的加入量、丰度和标记物种类的选择, 以及初始取样时间的确定, 以期推动对土壤氮素初级转化速率的研究。

## 1 $^{15}\text{N}$ 标记土壤氮库的方法

如何将  $^{15}\text{N}$  均匀地标记于土壤氮库是应用同位素稀释法测定土壤氮素初级转化速率的主要技术问题<sup>[2]</sup>。 $^{15}\text{N}$  的不均匀分布会使测定的初级转化速率高于真实值<sup>[3]</sup>。目前把  $^{15}\text{N}$  标记到土壤氮库中可行的方法有 3 种: 溶液混合方法(加入  $^{15}\text{N}$  标记的  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  或  $\text{NO}_3^--\text{N}$  溶液到土壤中); 气室方法(将  $^{15}\text{N}$  标记的气体,  $\text{NH}_3$  或  $\text{NO}$ , 注射到培养容器上部气体空间

中)或气体注射方法(将  $^{15}\text{N}$  标记气体直接注入到土壤中); 干粉末方法(加入  $^{15}\text{N}$  标记的铵盐或者硝酸盐与惰性粉末的混合物)。

### 1.1 溶液混合方法

在室内培养条件下, 通常是在土壤中加入  $^{15}\text{N}$  标记的盐类溶液, 调节土壤达到最佳的含水量<sup>[4–6]</sup>。虽然该方法能够尽可能地保证  $^{15}\text{N}$  的均匀分布, 但是会改变土壤的水分状况及其他土壤条件, 进而影响微生物的活性, 导致测定的初级转化速率偏离真实值<sup>[7–8]</sup>。研究表明, 以表层少于 2 cm 深度的土壤为研究对象, 把适量的  $^{15}\text{N}$  标记溶液均匀地滴到土壤表面,  $^{15}\text{N}$  能够在土壤均匀分布<sup>[9–11]</sup>, 这种方法可以减少因  $^{15}\text{N}$  标记溶液加入引起的土壤水分状况及其他土壤条件改变, 进而减少对土壤微生物活性的影响<sup>[12]</sup>。当对原状土进行标记时, 用注射器把  $^{15}\text{N}$  标记溶液注入到原状土柱中能够最小限度地改变土壤环境, 从而准确测得原位氮素初级转化速率<sup>[13–15]</sup>, 然而每个土柱要多孔注射才能使  $^{15}\text{N}$  均匀分布, 这样留下的针孔, 亦会使土壤的通气性发生变化<sup>[14,16]</sup>。

许多研究已经表明, 以溶液形式把  $^{15}\text{N}$  加入到土壤中会高估氮的初级转化速率<sup>[9,13–14,17–18]</sup>, 主要原因在于改变了土壤水分状况, 提高了微生物的活性, 因此含水量较低的土壤不适合使用溶液混合方法<sup>[13,19]</sup>。Davidson 等<sup>[13]</sup>也报道, 当土壤水势高于  $-1.5\text{MPa}$  时,

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41330744), 江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划项目(KYZZ15\_0218)和江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD, 164320H116)资助。

\* 通讯作者(zhangjinbo@njnu.edu.cn)

作者简介: 王敬(1988—), 女, 河南新乡人, 博士研究生, 主要从事土壤氮素转化研究。E-mail: jwangcxx@126.com

使用该方法是不可取的。Sparling 等<sup>[14]</sup>认为质地黏重的土壤不适合使用该方法。因此,溶液混合方法必须限制在质地不黏重且湿润的土壤,这样测定的氮素初级转化速率才能真实反映原位情况。当然,在室内培养中由于不是很注重氮初级转化速率的实际大小,并且只是通过  $^{15}\text{N}$  库稀释技术进一步理解各个处理间氮素转化的不同, $^{15}\text{N}$  标记溶液仍然有很广泛的应用范围<sup>[20-22]</sup>。总体而言,无论是室内培养,还是野外原位试验,加入  $^{15}\text{N}$  标记液的体积范围应既能保证  $^{15}\text{N}$  的均匀分布,又能避免对土壤造成更多的扰动。在室内培养中,可以用滴管、移液管和移液枪逐滴加入的方式,尽量使溶液均匀分布在土壤表层;在原位土柱试验中,可以使用注射器多孔注射的方法。

### 1.2 气体注射方法或气室方法

早在 1995 年,Stark 和 Firestone<sup>[19]</sup>就发现把土壤暴露于  $^{15}\text{NH}_3$  也可以标记土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库,且不会改变土壤的水分状况,但是他们并没有解决如何把低浓度的  $^{15}\text{NH}_3$  均匀地标记于土壤中这一难题。Murphy 等<sup>[18]</sup>首次使用了多针孔注射  $^{15}\text{NH}_3$  气体的气体注射方法,并证实该方法能够均匀地标记  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库,且避免了对土壤的扰动,尤其是不改变土壤的含水量。该方法适用于原位测定质地黏重土壤的氮素初级转化速率<sup>[23]</sup>。气体注射方法被广泛应用于标记土壤氮库,测定土壤氮素初级转化速率<sup>[24-25]</sup>,如 Osler 等<sup>[24]</sup>用气体注射方法成功验证了氮初级转化速率与螨虫群落结构之间的关系。

此外,气室方法也是用含  $^{15}\text{N}$  的气体标记土壤氮库的一种方法,就是将  $^{15}\text{N}$  标记的气体( $\text{NH}_3$  或  $\text{NO}$ ),注射到培养容器上部气体空间中,用  $^{15}\text{NO}$  标记土壤  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  库<sup>[19]</sup>,用  $^{15}\text{NH}_3$  标记  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库<sup>[12]</sup>。这种方法比气体注射法简单,但是气体扩散到土柱中是一个被动的过程,因而存在  $^{15}\text{N}$  能否均匀分布的问题。Murphy 等<sup>[12]</sup>发现与气体注射方法和溶液混合方法相比,气室方法低估了氮的初级矿化速率。

### 1.3 干粉末方法

Willison 等<sup>[26]</sup>提出了一种新的标记方法,用硅粉和  $^{15}\text{N}$  标记的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  混合物干粉末标记土壤  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  库,测定土壤的初级硝化速率。该方法尤其适用于氮是限制因素的土壤,因为在此类土壤中加水很可能提高微生物活性和矿化能力,从而增加有效态氮的数量。与干粉末方法相比,溶液混合方法能够使初级总硝化速率提高 13%~155%(平均 84%)。

### 1.4 各种标记方法比较

Luxhoi 等<sup>[27]</sup>在比较了不同标记方法测定粗质地

土壤氮初级转化速率后,发现溶液混合方法和气体注射方法测定的氮初级矿化速率很接近,表明了标记方法不同不影响土壤中  $\text{NH}_4^+$  的产生。但是,溶液混合方法测得的微生物同化速率是气体注射方法的两倍,其可能原因是由于溶液混合方法使  $^{15}\text{N}$  分布更均匀,有利于微生物对氮的利用。Murphy 等<sup>[12]</sup>对不同质地土壤研究发现溶液混合方法和气体注射方法测得的氮初级矿化速率和初级  $\text{NH}_4^+$  消耗速率相似,而气室方法测定的氮初级矿化速率和  $\text{NH}_4^+$  消耗速率是最低的。但是目前还没有关于土壤水分不同对气体注射方法和溶液混合方法测定土壤氮初级转化速率的影响研究。如果溶液混合方法带入的溶液会刺激土壤的微生物活性,进而显著改变土壤氮初级转化速率,那么气体注射方法就可以代替溶液混合方法测定氮初级转化速率。总体而言,由于液体比气体更容易定量,比固体粉末容易扩散,因此溶液混合方法是  $^{15}\text{N}$  标记首选的方法。然而,土壤中加入水溶液会刺激微生物活性,改变氮初级转化速率,从这方面看气体注射方法和干粉末方法也有它们各自的优势<sup>[2]</sup>。

## 2 $^{15}\text{N}$ 的加入量、丰度和标记物种类

### 2.1 $^{15}\text{N}$ 加入量

应用  $^{15}\text{N}$  同位素稀释法测定土壤氮初级转化速率的另一个重要条件,是被标记氮库浓度和丰度既要发生明显的变化,又不能下降过快,从而保证仪器对氮浓度和丰度的准确测定。同时,如果加入的氮量过多又会明显改变土壤氮素转化速率,使测定结果偏离实际情况。因此, $^{15}\text{N}$  的使用量和丰度也是一个重要的技术问题。

$^{15}\text{N}$  的加入量取决于土壤中被标记氮库的浓度。Tietema 和 Wessel<sup>[28]</sup>认为加入的  $^{15}\text{N}$  量不应超过土样中初始无机氮库( $\text{NH}_4^+\text{-N}+\text{NO}_3^-\text{-N}$ )的 5%。像森林土壤和一些牧草地土壤,它们的初始  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库含量比较高,需加入的  $^{15}\text{N}$  标记液应是高丰度的且浓度应为初始无机氮库( $\text{NH}_4^+\text{-N}+\text{NO}_3^-\text{-N}$ )的 5%~25%<sup>[29]</sup>。然而,许多耕作土壤的本底  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库含量比较低( $\text{N}<2\text{mg/kg}$ ),且  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  库的周转非常迅速,常常在 2 天之内<sup>[12,23]</sup>,因此在耕作土壤中,为了满足仪器测定所需要的丰度范围,应用  $^{15}\text{N}$  量为 1~10 mg/kg ( $^{15}\text{N}$  丰度 > 10%)<sup>[10,12,30]</sup>。事实上,目前对加入  $^{15}\text{N}$  量及丰度的选择随意性很大,其准则是在满足同位素质谱仪对浓度和丰度的测定要求下,尽可能地选择高丰度低浓度的  $^{15}\text{N}$  加入方法。当土壤中氮含量相对较高,甚至接近或处于基质饱和状态时,可加入高浓度的  $^{15}\text{N}$  标

记,有利于 $^{15}\text{N}$ 的均匀混合;反之,对于硝化作用和反硝化作用速率受基质控制的土壤,加入氮有可能促进硝化作用或反硝化作用,应加入低量的 $^{15}\text{N}$ 标记,尽量减少对氮转化速率的影响<sup>[6]</sup>。Watson等<sup>[3]</sup>用溶液混合法将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 溶液均匀滴到土壤表面,设置两个处理的氮加入量分别为 $\text{N}2$ 和 $15\text{ mg/kg}$ ( $^{15}\text{N}$ 丰度99.8%),发现与 $2\text{ mg/kg}$ 的加入量处理相比, $15\text{ mg/kg}$ 的加入量处理的初级矿化速率较低,而初级硝化速率相对较高。然而,Luxhøi等<sup>[31]</sup>采用溶液混合方法分别在土壤中加入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$   $1\text{ mg/kg}$ ( $^{15}\text{N}$ 丰度99.8%)  $5\text{ mg/kg}$ ( $^{15}\text{N}$ 丰度18.9%)和 $10\text{ mg/kg}$ ( $^{15}\text{N}$ 丰度9.4%),培养了 $24\text{ h}$ ,结果表明3种处理间的氮初级转化速率没有显著的差异。总体而言,施用 $^{15}\text{N}$ 的量应尽可能得少,避免发生因加入底物而产生的激发效应,但是又要保证样品中有足够的氮量满足同位素质谱仪测定 $^{15}\text{N}$ 丰度的要求。已有学者采用在样品前处理的最后步骤——浓缩之前加入未标记的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 或者 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的方法,满足同位素质谱仪测定 $^{15}\text{N}$ 丰度时对氮量的需求<sup>[32]</sup>。

## 2.2 $^{15}\text{N}$ 丰度

对于 $^{15}\text{N}$ 丰度的选择没有绝对的界限,已报道的文献中所用 $^{15}\text{N}$ 丰度从 $2\%\sim 99\%$ 各不相同。选择 $^{15}\text{N}$ 丰度有3个相对的原则:

1) 标记氮库的浓度。如果所标记氮库的浓度较大,需要使用高丰度的标记氮化合物,以保证标记氮库有较高的 $^{15}\text{N}$ 丰度。特别是在野外原位试验中要求尽可能反映土壤中氮的实际转化速率,则加入标记氮浓度要尽量低,而标记氮的 $^{15}\text{N}$ 丰度要足够得高。

2) 土壤氮转化速率。当供试土壤氮转化速率比较快时,加入的 $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 或 $^{15}\text{NO}_3^-\text{-N}$ 就会很快分别被有机氮矿化产生的 $^{14}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $^{14}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 硝化产生的 $^{14}\text{NO}_3^-\text{-N}$ 所稀释,导致 $^{15}\text{N}$ 丰度快速降低,以致同位素丰度接近氮素自然丰度,所以对氮转化速率较快的土壤应该选择高丰度的 $^{15}\text{N}$ ,其加入量也稍微高一些。

3) 经济原则。丰度越高的 $^{15}\text{N}$ 同位素化合物,价格越高,所以费用也是昂贵的。 $1\text{ g}$ 丰度为99.9%的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的价格是10%  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 价格的几倍。所以在满足试验要求条件下,尽量选择低丰度的 $^{15}\text{N}$ 同位素化合物,以节约经费。

## 2.3 $^{15}\text{N}$ 标记物种类的选择

早期测定土壤氮素初级转化速率常用分析计算方法,近年来关于数值优化方法测定土壤氮初级转化速率的报道明显增加,常用的如Mary等<sup>[33]</sup>开发的FLUAZ模型和Müller等<sup>[34]</sup>开发的基于蒙特卡洛优化

计算方法的氮转化模型<sup>[35]</sup>。分析计算方法和数值优化方法对 $^{15}\text{N}$ 标记物种类的选择以及培养时间长短都有各自的要求。分析计算方法中标记 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 库常用 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,也有些学者使用 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 。标记 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 库常用 $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ,这样选择的目的是为了 avoid 发生底物激发效应,从而达到准确测定氮初级矿化和硝化速率的要求。当 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标记 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 库时, $^{15}\text{NH}_4^+$ 不是土壤矿化过程的底物,因此不会高估初级矿化速率,但是因其加入的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 是初级 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消耗过程的底物,因而不可避免地高估初级 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消耗速率;当 $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ 标记 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 库时, $^{15}\text{NO}_3^-$ 亦不是土壤硝化过程的底物,不会影响对初级硝化速率的测定<sup>[36]</sup>。可见,分析计算方法中使用 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 和 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 作为标记物是不合适的。与此相反,数值优化方法则大多使用 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 和 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 作为标记物,因其具有强大的计算机分析能力,可以尽可能减少底物所带来的激发效应。从严格意义上说数值优化方法并不是 $^{15}\text{N}$ 稀释法,而是 $^{15}\text{N}$ 示踪法<sup>[36]</sup>。

此外, $^{15}\text{N}$ 标记物种类的选择与土壤施肥与否密切相关。对于长期施氮肥的农田土壤,如果反映的是施氮肥对土壤氮素初级转化速率的影响,那么 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 库的标记可以选择 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 或者 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ,因为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 加入对硝化的激发作用就是研究的目的之一;对于森林土壤,因为其基本上不施肥,氮输入量较少,都来自于大气氮沉降以及凋落物分解,因此 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 库的标记物以 $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ 最佳,同样地,当农田土壤不施肥期间, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 库的标记物选择不施肥的森林土壤一致,避免 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 加入激发硝化过程,不能代表土壤实际的氮转化状态。

## 3 初始取样时间

由于土壤会发生非生物固定 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,其中黏土矿物固定 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 非常迅速,可以固定加入的 $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的10%以上<sup>[37-38]</sup>。Davidson等<sup>[13]</sup>发现草地土壤灭菌后,在 $15\text{ min}$ 之内土壤非生物固定了30%以上的 $^{15}\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。所以,不是加入的 $^{15}\text{N}$ 都参与了氮的生物转化,此外外源 $^{15}\text{N}$ 与土壤 $^{14}\text{N}$ 的平衡也需要一定的时间,因此使用同位素稀释法测定氮的初级转化速率时,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, $t_0$ )来计算初级转化速率。许多研究并没有设定初始取样时间,因此他们的测定结果不能代表土壤真实的氮素转化速率<sup>[12-13,18,39]</sup>。

Murphy等<sup>[18]</sup>把初始取样时间( $t_0$ )定为 $^{15}\text{N}$ 标记后 $2\text{ h}$ ,这样有足够的时间发生 $^{15}\text{N}$ 的非生物固定和外源 $^{15}\text{N}$ 与土壤本底 $^{14}\text{N}$ 的平衡。不同的土壤所需的

时间不同,所以初始取样时间( $t_0$ )是可变的,在粗质地土壤中加入  $^{15}\text{N}$  后的 1、2 和 4 h 取样,所测得的氮初级矿化速率没有显著的区别。在黏粒含量高且团聚体多的土壤中,为了提高  $^{15}\text{N}$  分布的均匀性,常常要在 24 h 后进行初始取样<sup>[12,18]</sup>。Willison 等<sup>[26]</sup>发现使用硅粉- $^{15}\text{N}$  标记的  $\text{NO}_3^-$  混合物测定初级硝化速率,外源  $^{15}\text{N}$  与土壤  $^{14}\text{N}$  达到平衡需要 48 h。可见,初始取样时间一般在标记物加入后 0.25 ~ 24 h 比较适宜。

#### 4 小结

同位素稀释法是测定土壤中营养元素初级转化速率最重要的方法之一,已经被广泛地用来测定土壤氮的初级转化速率,然而, $^{15}\text{N}$  标记方法研究土壤中氮的初级转化速率仍然存在较大的不确定因素。如何将  $^{15}\text{N}$  均匀地标记于土壤中仍然是一个亟待解决的问题,此外,加入的  $^{15}\text{N}$  会影响土壤的理化性质和微生物活性,这些都是目前该方法面临的难题,不克服这些问题就会使测得的氮初级转化速率偏离真实值。所以,在采用该方法研究土壤氮初级转化速率时,需要依据土壤性质确定合适的标记方法、氮用量、 $^{15}\text{N}$  丰度、氮化合物种类和合适的初始取样时间,这样才能更准确地测定土壤初级转化速率,进而更真实地表征土壤氮素的实际周转状况。

#### 参考文献:

- [1] Kirkham D, Bartholomew W V. Equations for following nutrient transformations in soil, utilizing tracer data[J]. Soil Science Society of America Proceedings, 1954, 18: 33-34
- [2] Murphy D V, Recous S, Stockdale E A, Fillery I R P, et al. Gross nitrogen fluxes in soil: theory, measurement and application of  $^{15}\text{N}$  pool dilution techniques[J]. Advances in Agronomy, 2003, 79: 69-118
- [3] Watson C J, Travers G, Kilpatrick D J, et al. Overestimation of gross N transformation rates in grassland soils due to non-uniform exploitation of applied and native pools[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32: 2 019-2 030
- [4] Myrold D D, Tiedje J M. Simultaneous estimation of several nitrogen cycle rates using  $^{15}\text{N}$ : theory and application[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1986, 18: 559-568
- [5] Bjarnason S. Calculation of gross nitrogen immobilization and mineralization in soil[J]. Journal of Soil Science, 1988, 39: 393-406
- [6] Hart S C, Nason G, Myrold D D, et al. Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: the carbon connection[J]. Ecology, 1994, 75: 880-891
- [7] Cabrera M L, Kissel D E. Potentially mineralizable nitrogen in disturbed and undisturbed soil samples[J]. Soil Science Society of America Journal, 1988, 52: 1 010-1 015
- [8] Sierra J. Relationship between mineral N content and N mineralization rate in disturbed and undisturbed soil samples incubated underfield and laboratory conditions[J]. Australian Journal of Soil Research, 1992, 30: 477-492
- [9] Barraclough D, Puri G. The use of  $^{15}\text{N}$  pool dilution and enrichment to separate the heterotrophic and autotrophic pathways of nitrification[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27: 17-22
- [10] Willison T W, Baker J C, Murphy D V. Methane fluxes and nitrogen dynamics from a drained fenland peat[J]. Biol. Fert. Soils, 1998, 27: 279-283
- [11] Burton J, Chen C R, Xu Z H, et al. Gross nitrogen transformations in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39: 426-433
- [12] Murphy D V, Bhogal A, Shepherd M, et al. Comparison of  $^{15}\text{N}$  labeling methods to measure gross nitrogen mineralization[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1999, 31: 2 015-2 024
- [13] Davidson E A, Hart S C, Shanks C A, et al. Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by N-15 isotopic pool dilution in intact soils cores[J]. Journal of Soil Science, 1991, 42: 335-349
- [14] Sparling G P, Murphy D V, Thompson R B, et al. Short-term net N mineralization from plant residues and gross and net N mineralization from soil organic matter after rewetting of a seasonally dry soil[J]. Australian Journal of Soil Research, 1995, 33: 961-973
- [15] Haughn B A, Matson L A, Pennock D J. Land use effects on gross nitrogen mineralization, nitrification, and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions in ephemeral wetlands[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38: 3 398-3 406
- [16] Monaghan R. Errors in estimates of gross rates of nitrogen mineralization due to non-uniform distribution of the  $^{15}\text{N}$  label[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1995, 27: 855-859
- [17] Nishio T, Fujimoto T. Mineralization of soil organic nitrogen in upland fields as determined by a  $^{15}\text{NH}_4^+$  pool dilution technique, and absorption of nitrogen by maize[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1989, 21: 661-665
- [18] Murphy D V, Fillery I R P, Sparling G P. 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[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1997, 29: 1 731-1 741
- [19] Stark J M, Firestone M K. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 218-221
- [20] Gibbs P, Barraclough D. Gross mineralization of nitrogen during the decomposition of leaf protein I (ribulose 1, 5-diphosphate carboxylase) in the presence or absence of sucrose[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30: 1 821-1 827
- [21] Tlustos P, Willison T W, Baker J C, et al. Short-term effects of nitrogen on methane oxidation in soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 1998, 28: 64-70
- [22] Mendum T A, Sockett R E, Hirsch P R. Use of molecular and isotope techniques to monitor the response of autotrophic

- ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class Proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 4 155–4 162
- [23] Murphy D V, Fillery I R P, Sparling G P. Seasonal fluctuations in gross N mineralisation, ammonium consumption and microbial biomass in a Western Australian soil under different land use[J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1998, 49: 523–535
- [24] Osler G H R, Recous S, Fillery I R P, et al. Correlation between mite community structure and gross N fluxes[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 191–194
- [25] Herron P M, Stark J M, Holt C, et al. Microbial growth efficiencies across a soil moisture gradient assessed using  $^{13}\text{C}$ -acetic acid vapor and  $^{15}\text{N}$ -ammonia gas[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 6: 1 262–1 269
- [26] Willison T W, Baker J C, Murphy D V, et al. Comparison of a wet and dry  $^{15}\text{N}$  isotopic dilution technique as a short-term nitrification assay[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30: 661–663
- [27] Luxhøi J, Recous S, Fillery I R P, et al. Comparison of  $^{15}\text{NH}_4^+$  pool dilution technique to measure gross N fluxes in a coarse textured soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 569–572
- [28] Tietema A, Wessel W W. Gross nitrogen transformation in the organic layer of acid forest ecosystems subjected to increased atmospheric nitrogen input[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24: 943–951
- [29] Wessel W W, Tietema A. Calculating gross N transformation rates of  $^{15}\text{N}$  pool dilution experiments with acid forest litter: analytical and numerical approaches[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24: 931–942
- [30] Recous S, Aita C, Mary B. In situ changes in gross N transformations in bare soil after addition of straw[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31: 119–133
- [31] Luxhøi J, Nielsen N E, Jensen L S. Influence of  $^{15}\text{NH}_4^+$  application on gross N turnover rates in soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 603–606
- [32] Davidson E A, Matson P A, Brooks P D. Nitrous oxide emission controls and inorganic nitrogen dynamics in fertilized tropical agricultural soils[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60: 1 145–1 152
- [33] Mary B, Recous S, Robin D. A model for calculating nitrogen fluxes in soil using  $^{15}\text{N}$  tracing[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30: 1 963–1 979
- [34] Muller C, Rütting T, Muller C, et al. A  $^{15}\text{N}$  tracing model to analyse N transformations in old grassland soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 619–632
- [35] 程谊, 蔡祖聪, 张金波.  $^{15}\text{N}$  同位素稀释法测定土壤氮素总转化速率研究进展[J]. *土壤*, 2009, 41(2): 165–171
- [36] Hart S C, Stark J M, Davidson E A, et al. Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification[M]//Methods of soil analysis part 2: microbiological and biochemical properties. Madison, USA: Soil Science Society of America, 1994: 985–1 018
- [37] Drury C F, Voroney R P, Beauchamp E G. Availability of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  to microorganisms and the soil internal N cycle[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1991, 23: 165–169
- [38] Trehan S. Immobilization of  $^{15}\text{NH}_4^+$  in three soils by chemical and biological processes[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28: 1 021–1 027
- [39] Stockdale E A, Davies M G, Koch M, et al. Assessment of the problems associated with measuring gross mineralization rates in soil cores[C]//Neetesonand J J, Hassink J Nitrogen mineralisation in agricultural soils Netherlands: Institute for Soil Fertility Research, 1994: 95–110

## Several Key Techniques in Calculating Gross N Transformation Rates by $^{15}\text{N}$ Dilution Methods

WANG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Jinbo<sup>1,2,3,4\*</sup>, CAI Zucong<sup>1,2,3,4</sup>

(1 School of Geography Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2 Key Laboratory of Virtual Geographic Environment Ministry of Education (Nanjing Normal University), Nanjing 210023, China; 3 State Key Laboratory Cultivation Base of Geographical Environment Evolution (Jiangsu Province), Nanjing 210023, China; 4 Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Several key techniques in calculating gross N transformation rates by  $^{15}\text{N}$  dilution methods were reviewed in this paper. Such techniques include methods of applying  $^{15}\text{N}$  to soil, amount, enrichment and types of  $^{15}\text{N}$  addition, and initial sampling time. Only when these techniques were applied reasonably under particular conditions,  $^{15}\text{N}$  dilution methods could be successfully to quantify gross N transformation rates and to understand the fundamental processes that regulate individual microbial N pathways.

**Key words:**  $^{15}\text{N}$  dilution methods; Uniform distribution of  $^{15}\text{N}$ ; Amount of  $^{15}\text{N}$  addition; Enrichment of  $^{15}\text{N}$