

$\delta^{13}\text{C}$ 方法在土壤有机质研究中的应用*

朱书法^{1,2} 刘丛强¹ 陶发祥¹

(1 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 $\delta^{13}\text{C}$ 方法是近年来用于土壤有机质动力学研究的一种新方法, 该方法除了具有 ^{14}C 标记法的优点外, 还具有无放射性, 可以提供长期的标记, 并能使所有的土壤有机质组分都能被均匀标记, 相对经济、在实验地采样后直接进行研究等特殊优点, 从而在土壤有机质及其组分的来源、周转和 C_3/C_4 植被的历史变化研究中得到广泛应用。随着该方法的迅速发展以及各种分析 $\delta^{13}\text{C}$ 值技术的不断改进, $\delta^{13}\text{C}$ 方法在研究土壤过程特别是土壤碳循环中显示出新的活力。为了推动 $\delta^{13}\text{C}$ 方法在国内土壤有机质研究中的应用, 本文对影响土壤有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值的因素、国内外近年来该方法在土壤有机质研究中的应用和 $\delta^{13}\text{C}$ 值的分析方法作了较全面的综述。

关键词 稳定碳同位素; 土壤有机质; $\delta^{13}\text{C}$ 值

中图分类号 S153.6⁺ 21

文献标识码 A

作为土壤重要组成部分和代表一个主要碳库的土壤有机质在生态系统中扮演了一个十分重要的角色。土壤有机质一方面对土壤生产能力产生显著影响, 另一方面, 由于农业活动而导致土壤有机质的加速分解, 土壤碳素损失, 使大气中的 CO_2 浓度增加, 从而对温室效应这一严重的全球环境问题做出了“贡献”^[1], 因此, 充分评估土壤有机质碳库的周转时间和大小对提高土壤生产能力、模拟全球碳循环动力学具有非常重要的意义。为了达到这一目的, 相对经济的研究方法—稳定碳同位素分析经常被研究者们所采用, 从而使稳定碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$) 分析方法在评估土壤有机质分解程度^[2~4]、土壤碳周转及研究 C_3/C_4 植被变化历史中得到日益广泛的应用^[5~8]。近年来, 随着 $\delta^{13}\text{C}$ 分析方法和技术的进步, 稳定碳同位素方法在土壤研究中的应用范围进一步扩大, 从而提高了人们对土壤生态系统机能的认识。

自然界中最为常见的碳同位素 ^{12}C 与 ^{13}C 是碳仅有的两种稳定同位素, 它们分别占自然界中碳素总量的98.89%与1.11%。稳定碳同位素比值 $\delta^{13}\text{C}$ 通常用样品的同位素比值相对于某一标准的同位素比

值的千分差表示: $\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$, 其中 $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, R_{standard} 是 PDB (Pee Dee Belemnite) 标准, $R_{\text{PDB}} = 0.0112372$ 。

1 影响土壤有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值的因素

1.1 地面植物种类的影响

植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与其最初如何在光合作用中固定 CO_2 密切相关, 由光合作用中 CO_2 的扩散、分解、羧化作用几个阶段碳同位素分馏的差异所决定。空气中 CO_2 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -7.7‰ , 由于形成 $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ 键比形成 $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$ 键需要较多的能量, 所以陆生植物在利用光能固定 CO_2 时排斥空气中的 $^{13}\text{CO}_2$, 但这种排斥程度是光合作用途径类型的函数^[9]。依据光合作用途径的不同, 所形成光合作用产物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低的程度各不相同。许多生长在温凉或湿润环境中的植物, 如森林植被、小麦、大豆、水稻等, 利用 C_3 戊糖磷酸化光合途径 (Calvin 循环), 它们光合作用产物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值下降较多, $\delta^{13}\text{C}$ 值平均为 $-27\text{‰} \pm 6\text{‰}$, 而对进行 Hatch-Slack 循环的 C_4 二羧酸光合途径植物, 如玉米、高粱、甘蔗等, 其光合作用产物的 $\delta^{13}\text{C}$

* 中国科学院重要方向项目 (KZCX3-SW-140) 与中国科学院知识创新工程项目 (KZCX2-105) 资助

作者简介: 朱书法 (1972~), 男, 汉族, 河南洛阳市人, 博士。研究方向生物地球化学, 目前主要从事土壤有机质的生物地球化学循环研究。E-mail: zhushufa@souhu.com

收稿日期: 2004-06-22; 收到修改稿日期: 2004-12-14

值下降较少,平均为 $-13\text{‰} \pm 2\text{‰}$ 。此外许多沙漠茎叶肥厚的植物则采用光合作用的景天酸代谢(Crasulacean acid metabolism, CAM)途径, CAM植物的 ^{13}C 亏损程度介于 C_3 和 C_4 植物之间,通常和 C_4 植物有相似的 $\delta^{13}\text{C}$ 区分度, $\delta^{13}\text{C}$ 值平均为 -17‰ 。光合途径是影响植物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的主要因素,此外,植物水利用系数、辐射度、海拔与纬度梯度和 Suess 效应(由于具有不同C同位素特征的化石燃料燃烧而引起的大气 CO_2 $\delta^{13}\text{C}$ 值的降低)等均可引起植物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化。

如果 C_3 和 C_4 植物生长在相同的气候条件下, $\delta^{13}\text{C}$ 值将有 $12\text{‰} \sim 14\text{‰}$ 的差值。由于 C_3 和 C_4 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值都有一定的范围,因此同一类植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间也必然有一定的差异,其中 C_3 植物之间 $\delta^{13}\text{C}$ 值的最大差异为 12‰ , C_4 植物为 4‰ 。对同种植物的不同组织或器官之间 $\delta^{13}\text{C}$ 值也有一些差异,Balesdent等观察到同一株玉米不同器官之间 $\delta^{13}\text{C}$ 值差异最高达 -2.6‰ (叶与种子胚乳之间),但这些差异与不同光合途径的差异相比要小的多。同时他们也发现在同一株玉米的茎或根的内部器官和皮层以及活的和死的叶之间 $\delta^{13}\text{C}$ 值没有差异^[10]。由于土壤有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值是 C_3 、 C_4 和CAM植物种类对群落净初级生产力相对贡献的综合结果,因此,如果地表植物组成保持稳定,则上层土壤(大约 $0 \sim 20\text{cm}$)有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与植物群落的 $\delta^{13}\text{C}$ 值相近似,且地面植物种类是制约土壤有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化的主要因素^[11]。

1.2 土壤有机质及其组分的影响

土壤有机质是土壤有机物质的主体,主要是微生物、小动植物的生命活动产物及由生物残体分解和合成的各种有机物质,包括非腐殖物质(占土壤有机质的 $20\% \sim 30\%$)和腐殖物质(是土壤有机质的主体,占 $70\% \sim 80\%$)。前者是已知有机化学结构的化合物,碳水化合物(纤维素、半纤维素、木质素和单糖)、含氮化合物(蛋白质、缩氨酸、氨基酸、氨基糖)、土壤脂类(脂肪、蜡、树脂)、有机磷和硫化物、色素及其他低分子量有机化合物均属此类。腐殖物质是经腐殖化作用形成的、具有特异性的、多相分布的类高分子化合物。腐殖物质可分为胡敏酸、富里酸和胡敏素。土壤有机质是各种化合物的非均匀混合物,它代表着一个从新鲜植物残体到彻底腐殖化物质的连续体,因此一般来说,土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与来源植物物料的 $\delta^{13}\text{C}$ 值十分接近,它的 $\delta^{13}\text{C}$ 值

仅较来源植物物料的 $\delta^{13}\text{C}$ 值有一个小的增加,幅度一般在 $0.5\text{‰} \sim 1.5\text{‰}$ 范围内。

图1给出了土壤有机质中单个组分 $\delta^{13}\text{C}$ 值与整体植物物料 $\delta^{13}\text{C}$ 值的差值,从图中可以看出,土壤有机质中纤维素与半纤维素、蛋白质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与整体植物物料的 $\delta^{13}\text{C}$ 值接近,木质素与脂类化合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值较低。Benner等观察到,在维管植物中,纤维素和半纤维素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值比植物物料的总体 $\delta^{13}\text{C}$ 值高出约 $1\text{‰} \sim 2\text{‰}$,木质素则比植物物料的总体 $\delta^{13}\text{C}$ 值低约 $2\text{‰} \sim 6\text{‰}$,比纤维素低 $4\text{‰} \sim 7\text{‰}$,与整体脂类相比,植物脂肪酸组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值有所降低,其程度随着植物种类而变化。如Ballentine等的研究表明,甘蔗中单个脂肪酸组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在 $-21.0\text{‰} \sim -25.4\text{‰}$ 范围内,比整体脂类降低了 $3\text{‰} \sim 7\text{‰}$ ^[21]。

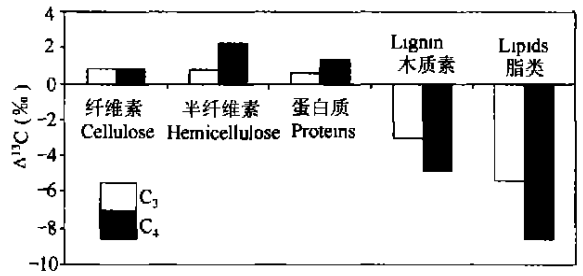


图1 土壤有机质中单个组分 $\delta^{13}\text{C}$ 值与整体植物物料 $\delta^{13}\text{C}$ 值的差值(引自文献[12~20], $-\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{单个组分}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{整体植物物料}}$)

Fig. 1 Difference in $\delta^{13}\text{C}$ values between individual component of soil organic matter and the bulk plant material (References [12~20], $-\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{individual component}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk plant material}}$)

与同一土壤的胡敏酸(HA)相比,富里酸(FA)的 $\delta^{13}\text{C}$ 值较高,且与植物物料的 $\delta^{13}\text{C}$ 值十分接近,这可能与FA含有较多的羧基和碳水化合物有关。窦森等对法国爱松省Boigneville实验地弱淋溶土的研究表明,土壤HA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值较相应全土有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值低 1‰ 左右,可能与HA中含有较多的脂类有关;HA热解产物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值高于热解残渣,相应HA的 $\delta^{13}\text{C}$ 值介于两者之间,说明热解产物含富 ^{13}C 的碳水化合物,而热解残渣可能含有亏 ^{13}C 的脂类化合物;而HA的KOH水解残渣的 $\delta^{13}\text{C}$ 值低于相应的HA,可能是水解去除了富 ^{13}C 的碳水化合物所致^[22];对中国黑土和棕壤的研究表明, $\delta^{13}\text{C}$ 值的顺序是,HA(相对分子质量 < 2000) $>$ HA(相对分子质量 > 2000)、Hu(胡敏素),因为相对分子质量 < 2000 的

HA 一般含有较多的碳水化合物, 相对分子质量 > 2000 的 HA 含脂类较多^[23]。而 Timothy 等对种植玉米(C_4 植物)的土壤研究则表明, 腐殖物质的三个组分中, Hu 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值最高, FA 次之, 而 HA 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值最低^[24]。

1.3 土壤颗粒与有机质密度的影响

土壤不同颗粒大小或有机质不同密度部分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值是各不相同的。与富含粘粒的部分相比, 粗粒部分通常含有较少的碳且 $\delta^{13}\text{C}$ 值总是偏低^[25]。如在热带稀树大草原(C_4 植物占多数)表层土壤中, 随着土壤颗粒的减小, 砂粒、粉粒和粘粒的 $\delta^{13}\text{C}$ 值依次增大, 增幅在 2‰~ 3‰ 之间, 这可能是由于细的矿物微粒对微生物代谢产物具有较强的稳定或保护能力, 而这些代谢产物通常具有较高的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。在未被砍伐的森林土壤中, 轻质部分(密度 < 1.7 g cm^{-3})的 $\delta^{13}\text{C}$ 值高于重质部分(密度 > 1.7 g cm^{-3}), 自由轻质部分又较吸着轻质部分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值要高^[26]。而 Roscoe 等对热带高草草原氧化土表层进行了密度分级, 并测定了各个部分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 却得出了相反的结果: 轻质部分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值比重质部分更接近于植物物料, 重质部分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值高于轻质部分, 吸着轻质部分又较自由轻质部分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值要高。这可能是由于微生物群落对不同密度部分的分解程度存在差异, 从而使碳素的分馏程度不同而造成的, 因为他们发现重质部分的 C:N 比低于自由轻质部分, 从而认为重质部分的分解程度大于轻质部分^[27]。

1.4 土壤深度的影响

长期保持同一植物群落的土壤, 其有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值通常随着深度的增加而升高, 且这种趋势与土壤的物理和化学状态无关。如 Balesdent 等对温带森林土壤研究后认为, 存在于土壤深部(20 cm 以下)的古老有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值比处于表层土壤(大约 0~ 20 cm)的新鲜有机质高 1‰~ 3‰^[28]。对非洲雨林、印度常绿森林的研究也得出了类似的结果^[29]。引起这种情况的原因可能是: 土壤中的异养微生物在分解底物进行呼吸时, 发生了碳同位素动力学分馏, 代谢产物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值高于底物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 在此后的腐殖化过程中, 亏损 ^{13}C 的有机化合物优先分解转化为胡敏酸与富里酸^[28]。其次, Van Bergen 等证明木质素是腐殖化表土的重要组分^[30], 与易于分解且富集 ^{13}C 的纤维素相比, 亏损 ^{13}C 的木质素则难于分解, 因此, 随着土壤有机质的分解, 木质素的相对比例逐渐升高, 表层土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值相应降低。另外, 自工业革命以来, 由于具有不同 C 同位素特

征的化石燃料燃烧而引起的大气 CO_2 $\delta^{13}\text{C}$ 值的降低即 Suess 效应, 也导致土壤深部的古老有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值高于地表的新鲜有机质。

2 $\delta^{13}\text{C}$ 方法在土壤有机质研究中的应用

$\delta^{13}\text{C}$ 分析在土壤有机质研究中的应用正日益成为一个强有力的工具, 以两个基本假设(一是土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值随着土壤深度的增加有 1‰~ 3‰ 的升高; 二是 C_3 与 C_4 植物物料中明显的同位素差异 ($\Delta^{13}\text{C} \text{ C}_3 - \text{C}_4$) 在分解过程中基本保持不变)为基础^[3,31], 它被用来表明土壤有机质的来源^[31], 研究土壤有机质及其组分的分解程度与周转^[2~5], 重现 C_3/C_4 植被的变化历史^[6~8]。近年来, 随着 $\delta^{13}\text{C}$ 分析方法和技术的进步, $\delta^{13}\text{C}$ 方法在示踪土壤过程, 特别是在研究土壤碳循环中显示出了新的活力。

2.1 表明土壤有机质的来源

由于土壤有机质代表着一个从新鲜植物残体到彻底腐殖质化物质的连续体, 一般来说, 土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与来源植物物料的 $\delta^{13}\text{C}$ 值十分接近, 因此可以根据植物的特征 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 就能判断出土壤有机质的来源^[32]。Schwartz 等对非洲刚果灰壤进行研究后认为, A_1 层土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与目前生长在它上面的大草原禾本科植物幼苗的 $\delta^{13}\text{C}$ 值相一致, 下层土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与森林土壤 A_1 层有机质及 B_{2h} 层植物根化石碎片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值相一致, 从而证实了灰壤有机质产生于森林植被, 灰壤剖面的形成先于热带大草原取代森林植被^[33]。

2.2 研究土壤有机质及其组分的周转

在土壤有机质及其组分的周转与分解动力学研究中, 最初采用实验室培育的方法, 研究有机物质的分解情况, 但室内的试验条件与田间实际情况相距较远, 不能完全说明土壤有机质的转化过程。人们开始在田间条件下进行研究, 所用的方法可分为非示踪法(塑料网袋法, 砂滤管法和尼龙袋法)和示踪法(放射性同位素标记示踪法, 天然同位素标记示踪法), 但用非示踪法测定较长时间内的 CO_2 释放量, 特别是当植物残体的加入量小于供试土壤有机质含量时, 分析误差较大, 且非示踪法只能研究土壤有机质总体的动态, 而不能深入研究其中各个组分的变化。放射性同位素标记示踪法克服了非示踪法的不足, 但实验周期较长, 且只能标记平均存留时间短的土壤有机质, 同时低能离子辐射会对人体健康造成

潜在危害, 从而使其在应用上受到了一定的限制。本文所阐述的 ^{13}C 天然同位素标记示踪法, 即 $\delta^{13}\text{C}$ 方法可以提供时间跨度从几年到几百年的标记, 并能使所有的土壤有机质都被标记, 包括平均存留时间十分长的有机质, 而且该方法使用的是天然标记的无危害的化合物。

与植物进行光合作用固定碳时同位素的原始分馏相比, 植物物料分解过程中的同位素分馏要小的多, 因此土壤有机质的同位素组成与来源植物物料的同位素组成非常相近, 当原始植被类型被新的具有不同碳同位素组成的植被类型所取代时, 就导致了土壤有机质 $\delta^{13}\text{C}$ 值改变, 根据单位时间内 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化程度, 就可以计算出土壤有机质的周转速度或比较不同土壤有机质组分更新的速度, 这就是用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法研究土壤有机质分解和周转的原理。Bernoux 对用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法研究土壤有机质周转的计算公式进行了详细的阐述^[5]。

$\delta^{13}\text{C}$ 方法主要用于研究长期条件下土壤有机质的周转, Hsieh 等研究了美国中西部大草原土壤有机质整体的周转情况, 计算出土壤有机质的周转时间为 853 a 和 2973 a^[34]。另一个在美国中西部的研究报导认为, 在草原上种植玉米大约 100 a 后, 草原来源的碳的比例仍不少于 50%, 草原碳被玉米碳代替主要发生在植物种类改变的初期 12 a, 这个时期草原碳的迅速矿化主要是因为其中存在着一个不稳定的碳库^[35]。

Gregorich 等发现土壤有机质的长期周转时间与其密度及粒度大小密切相关^[25], 用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法可以反映土壤不同颗粒大小或有机质不同密度部分的周转情况。朴河春等利用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法研究了贵州喀斯特地区林地变为玉米地后土壤轻质有机碳的动态变化, 结果表明林地轻质有机碳的 $\delta^{13}\text{C}$ 值明显低于重质, 而玉米地轻质碳 $\delta^{13}\text{C}$ 值大于重质碳, 说明植物残留物首先进入轻质碳组分^[36-38]。陈庆强等对比分析了华南亚热带山地土壤有机质稳定碳同位素特征, 表明粘粒对有机质赋存状态及其更新有直接影响, 粒度是制约土壤有机质动态的重要因子^[39]。热带稀树大草原(C_3 植物)转变为栽培牧地(C_4 植物) 23 a 后, 在 A_p 层、 AB_1 层和 B_{v2} 层, C_3 植物碳被 C_4 植物碳平均取代的百分数分别为 36%、34%和 19%, 取代量按下列顺序依次降低: 自由轻质部分 > 重质部分(砂粒、粉粒和粘粒) > 吸着轻质部分^[40]。从土壤有机质不同密度及粒度的周转来看, 一般轻质部分比重质部分具有较高的周转率^[26], 而大颗粒有机

质的转化速度比小颗粒要快。

$\delta^{13}\text{C}$ 方法也可用于对土壤有机质的短期动力学进行研究, Doane 采集了两个季节的玉米地土壤样品, 对两种耕作方式下土壤腐殖质三个组分的 $\delta^{13}\text{C}$ 值进行了分析, 结果表明, 土壤腐殖质处于动态的变化之中, 且对外部输入的有机质和环境条件的变化反应迅速明显, 腐殖质的三个组分在两种耕作方式下受到的影响各不相同, 证实了腐殖质的各个组分在土壤有机质的碳循环中可能扮演了不同的角色^[24]。近期, 我国学者窦森等应用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法对短期培养条件下土壤有机质的动态变化进行了积极的探索, 通过短期(720d)室内培养实验, 研究了玉米秸秆分解期间土壤中胡敏酸(HA)和富里酸(FA)数量随时间的动态变化规律, 结果显示, 培养初期, FA的形成速度大于HA, 随培养时间延长, FA转化为HA或相互转化, 原土有机质中, 两者也发生了相互转化, 但与新形成的HA、FA相比转化速度较慢。整个培养过程中, 不仅新加入的玉米秸秆, 而且原来土壤中固有的有机碳都随着培养时间延长而分解, 但后者分解速度较慢, 从而证明了用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法研究短期培养条件下新加入有机质在土壤中的分解动力学是可行的^[41]。

2.3 重现 C_3/C_4 植被的变化历史

$\delta^{13}\text{C}$ 方法提供了一个直接而强有力的工具来重现植被的变化历史。刘卫国等分析了黄土高原主要植物及现代土壤有机碳的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 对比了现代土壤和黄土—古土壤序列的有机碳同位素组成变化特征, 结果表明, 黄土高原现代植被以 C_3 植物为主, C_4 植物主要来自适宜在暖湿条件下生长的禾本科植物, 森林土壤的 $\delta^{13}\text{C}$ 值明显低于黄土原面的碳同位素组成, 现代土壤的碳同位素组成与现代植被的分布是一致的, 据此推断, 在相对暖湿的古土壤阶段 C_4 草本植物比例增加, 在相对干旱的黄土阶段灌木和 C_3 草本植物比例增加^[42]。Boutton 等利用土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值研究了大草原生态系统中草本(C_4 植物)—木本(C_3 植物)的变化情况, 结果表明, 在Texas南部的Rio大草原上, C_4 植物占绝对优势的热带稀树大草原大部分已经被一种亚热带多刺丛林(C_3 植物)所取代。在目前树木繁茂的景观要素下, 输入土壤中的有机质为典型的 C_3 植物, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值在-25‰~-28‰之间, 而土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值在-20‰~-15‰之间, 与土壤粗细粘粒相结合的有机碳的 $\delta^{13}\text{C}$ 值(-14‰~-18‰)偏高, 可能是这部

分碳具有较慢的周转速率,但却清楚地表明了 C_4 植物的草原曾经占据着这个位置^[8]。

2.4 示踪土壤过程

土壤过程(如土壤养分和碳循环)对维持陆地生态系统的机能十分重要,在土壤碳循环的研究中,稳定碳同位素分析能够用来鉴别哪一组土壤生物群体对某一特殊的土壤过程“负责”^[43]。土壤有机质通过矿化作用释放出的 CO_2 在全球碳循环中起着重要的作用,为了探讨土壤 CO_2 的来源,郑乐平分析了岩溶地区土壤 CO_2 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值,结果是土壤 CO_2 的稳定碳同位素组成存在季节变化,植被对土壤 CO_2 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有重要影响,大气 CO_2 对下部土壤 CO_2 具有较

大的贡献^[44]。土壤所释放的 CO_2 主要包括植物根部呼吸的释放量以及土壤有机质降解(土壤动物和微生物的代谢作用)的释放量两大部分,要予以区分较为困难,近期,已有学者成功的将稳定碳同位素方法应用于这一领域,Rochette 将总土壤的呼吸划分为根际呼吸和土壤呼吸两部分,并发现是以土壤呼吸为主,根际呼吸所占的比例较小,所观测到的最大值为 45% (8 月份)^[45]。

3 $\delta^{13}\text{C}$ 值的分析方法

$\delta^{13}\text{C}$ 值的测定通常采用表 1 所示的几种方法。

表 1 稳定碳同位素比值($\delta^{13}\text{C}$)分析方法

Table 1 Analytical techniques for $\delta^{13}\text{C}$

分析方法 Analytical method	分析对象 Analytical object	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	引用文献 Reference
同位素比质谱 Isotope ratio mass spectrometry (IRMS)	整体样品的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 $\delta^{13}\text{C}$ values in bulk samples	方法成熟,经济 Well established, cheap	样品需要量大 Large sample size required	[8] [27] [42]
气相色谱燃烧同位比质谱 Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-G-IRMS)	特定化合物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 $\delta^{13}\text{C}$ values in specific compounds	生物标志化合物的分析 Analysis of biomarkers	需样品制备 Sample preparation required	[30] [43]
激光融蚀同位素比质谱 Laser ablation isotope ratio mass spectrometry (LA-IRMS)	原位土壤薄剖面的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 $\delta^{13}\text{C}$ values of soil thin section in situ	原位分析 In situ analysis	需样品制备 Sample preparation required	[46]
稳定同位素探针 Stable isotope probing (SIP)	从未标记的 DNA(或 RNA)中分离 出 ^{13}C 标记的 DNA(或 RNA) Separate ^{13}C -labeled DNA or RNA from unlabeled DNA or RNA	活性微生物的鉴定 Identification of active microorganisms	方法需要 进一步改进 Further refinements needed	[47] [48] [49] [50]

测定整体样品 $\delta^{13}\text{C}$ 值的常规方法是同位素比质谱分析(IRMS),将自然风干的土壤样品碾磨过筛后加入过量 0.1mol L^{-1} 盐酸,反应 24 h 以去除其中含有的碳酸盐,洗涤至中性低温烘干,取一定量(通常需要含 C 1~2 mg 的样品量)烘干土样与 CuO 以 1:50 的比例装入石英管,同时加入铂丝作催化剂,抽真空密封后在 850°C 下反应 2 h,使样品中所有的碳都转化为 CO_2 ,然后采用低温蒸馏法提纯并分离出供质谱分析用的 CO_2 。

同位素比质谱分析主要采用天然丰度和标记两种不同的方法,在土壤有机质动力学的研究中,天然丰度法能够用来表明土壤有机质的来源^[31],研究土壤有机质及其组分的分解程度与周转^[2-5],确定植

物的根系分泌物^[51]、植物对土壤呼吸^[52]以及植物根对土壤碳贮库的贡献等^[53],同时它在土壤中型区系动物的饲养生态学和菌根对碳的积累等方面也得到了成功应用,如对两种弹尾虫进行实验后发现了它们对新鲜土壤有机质的摄食转化显示出“偏爱”^[54],而另一项研究表明,植物固定的碳能够在两种寄主植物的菌根真菌结构间相互转移,而在两种植物间却不能进行^[55]。天然丰度法的主要优势是能够对实验地采集的样品直接进行研究,唯一的局限是要求被研究的碳库之间 $\delta^{13}\text{C}$ 值应该具有足够的差异以便能够示踪碳的迁移。理论上除了较老的碳库外(周转时间大于一年),任何碳库都能通过 ^{13}C 标记的方法进行研究,借助于该方法人们对土壤微生物的

呼吸及其对有机质的利用、被植物吸收转化为土壤有机质的碳的归宿^[56]、土壤碳通量中菌根真菌菌丝所扮演的“角色”^[55]等土壤有机质动力学的重要问题进行了研究。

气相色谱燃烧同位比质谱分析(GG-G-IRMS)是常规同位素比质谱分析的改进,它主要与¹³C标记法结合使用,需要的样品量极少(仅需要含C几纳克的样品量),样品首先经气相色谱分离后在燃烧炉里定量转化为供质谱分析的CO₂,它能够在线测定生物标志化合物(如磷脂脂肪酸等)的 $\delta^{13}\text{C}$ 值,使对有机质碳同位素组成的研究达到了分子水平,在土壤有机质的动力学研究中,该方法的主要优点是能够将特定的土壤过程与特殊的土壤生物群体相互联系起来,从而鉴别出活性群体,如利用¹³C标记的CH₄培育森林土壤,然后分离出土壤中的脂类,GG-G-IRMS分析后的结果表明,由甲烷氧化细菌产生的特殊藿烷类化合物显著富集¹³C而简单藿烷类化合物则没有这种情况发生^[43]。

激光融蚀同位素比质谱分析(LA-IRMS)是另一个测定 $\delta^{13}\text{C}$ 值的方法,它利用高能量的聚焦激光束加热融解样品产生CO₂供质谱分析,空间分辨率高,从而可以在微观范围内进行根际碳的示踪。Bruneau等使用LA-IRMS对草原土壤剖面进行了分析,证实了在根际周围存在着新近合成的光合作用产物^[46]。

此外刚刚出现的稳定同位素探针(SIP)以¹³C标记过的DNA(或RNA)可以通过密度与未标记的DNA(或RNA)相互区别为应用基础,虽然其方法还不太成熟,但却是土壤有机质动力学研究中鉴定活性微生物及其碳源的强有力的工具^[47,48]。Radajewski等用SIP对¹³CH₃OH标记的森林土壤进行分析后发现,两种截然不同的土壤微生物—嗜酸菌和 α 蛋白细菌由于吸收了¹³C标记的底物而使它们的DNA中富集了¹³C,进一步的研究表明,嗜酸酵母是活性微生物,更为有趣的是氨氧化细菌可能利用了嗜酸酵母释放出的¹³CO₂也同时被标记,这意味着氨氧化细菌与嗜酸酵母之间存在紧密的营养联系^[49]。利用SIP对¹³CO₂标记的草原泥炭进行研究后发现土壤微生物的周转时间小于5d,大部分光合碳在几天内从植物—土壤系统中通过呼吸作用而分解,这些结果证实了光合碳通过土壤微生物以CO₂迅速转移到了大气中,同时也表明SIP的示踪方法在土壤碳循环的研究中具有很大的潜力^[50]。

4 结 语

经过十几年的发展, $\delta^{13}\text{C}$ 方法在表明土壤有机质的来源、研究土壤有机质及其组分的周转及重现C₃/C₄植被变化历史方面的应用逐渐趋于成熟,而土壤过程特别是土壤碳循环中对不同生物所扮演角色的认识则为 $\delta^{13}\text{C}$ 方法在土壤有机质研究中的应用提供了新的方向,因为光合有机碳向土壤中的输入以及后来土壤有机质的分解转化在很大程度上依赖于土壤生物的存在。随着时间的推移,基于稳定碳同位素的各种分析技术将得到不断改进,其分析能力也将逐步提高且更适宜于现场研究,特别是随着SIP方法的进一步发展,将有可能确定土壤有机质分解转化过程中某一种关键的土壤生物所应承担的“责任”,从而使人们对土壤生态系统过程和碳循环中土壤生物多样性角色的认识更加深入。

参 考 文 献

- [1] Fernandes E C M, Motavalli P P, Castilla C. Management control of soil organic matter dynamics in tropical land-use systems. *Geoderma*, 1997, 79: 49~ 67
- [2] Wedin D A, Tieszen L L, Dewey B. Carbon isotope dynamics during grass decomposition and soil organic matter formation. *Ecology*, 1995, 76: 1383~ 1392
- [3] Ehleringer J R, Buchmann N, Flanagan L B. Carbon isotope ratios in below ground carbon cycle processes. *Ecological Applications*, 2000, 10: 412~ 422
- [4] Connin S L, Feng X, Virginia R A. Isotopic discrimination during long-term decomposition in an arid land ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 41~ 51
- [5] Bernoux M, Cerri C C, Neill C. The use of stable carbon isotopes for estimating soil organic matter turnover rates. *Geoderma*, 1998, 82: 43~ 58
- [6] Pessenda L C R, Aravena R, Melfi A J. The use of carbon isotopes (¹³C, ¹⁴C) in soil to evaluate vegetation changes during the Holocene in central Brazil. *Radiocarbon*, 1996, 38: 191~ 201
- [7] Pessenda L C R, Valencia E P E, Camargo P B. Natural radiocarbon measurements in Brazilian soils developed on basic rocks. *Radiocarbon*, 1996, 38: 203~ 208
- [8] Boutton T W, Archer S R, Midwood A J. $\delta^{13}\text{C}$ values of soil organic carbon and their use in documenting vegetation change in a subtropical savanna ecosystem. *Geoderma*, 1998, 82: 5~ 41
- [9] Vogel J C. *Fractionation of the Carbon Isotopes during Photosynthesis*. New York: Springer-Verlag, 1980. 29
- [10] Balesdent J, Mariotti A, Guillet B. Natural ¹³C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19: 25~ 30

- [11] 沈承德, 易惟熙, 孙彦敏, 等. 鼎湖山森林土壤 ^{14}C 表观年龄及 $\delta^{13}\text{C}$ 分布特征. 第四纪研究, 2000, 20(4): 335~344. Shen C D, Yi W X, Sun Y M, *et al.* ^{14}C apparent ages and $\delta^{13}\text{C}$ distribution of forest soils in Dinghushan Natural Reserve (In Chinese). Quaternary Sciences, 2000, 20(4): 335~344
- [12] Lichtfouse E, Dou S, Giardin C. Unexpected ^{13}C -enrichment of organic components from wheat crop soils: Evidence for in situ origin of soil organic matter. Organic Geochemistry, 1995, 23: 865~868
- [13] Lichtfouse E, Berthier G, Houot S. Stable carbon isotope evidence for the microbial origin of C_{14} — C_{18} n-alkanoic acids in soils. Organic Geochemistry, 1995, 23: 849~852
- [14] Goni M A, Eglinton T I. Stable carbon isotopic analyses of lignin-derived CuO oxidation products by isotope ratio monitoring-gas chromatography-mass spectrometry (IRM-GG-MS). Organic Geochemistry, 1996, 24: 601~615
- [15] Lockheart M J, van Bergen P F, Evershed R P. Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter. Organic Geochemistry, 1997, 26: 137~153
- [16] O'Malley V P, Burke R A, Schlotzhauer W S. Using GG-MS/Combustion/IRMS to determine the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of individual hydrocarbons produced from the combustion of biomass materials-application to biomass burning. Organic Geochemistry, 1997, 27: 567~581
- [17] Ballentine D C, Macko S A, Turekian V C. Variability of stable carbon isotopic compositions in individual fatty acids from combustion of C_4 and C_3 plants: implications for biomass burning. Chemical Geology, 1998, 152: 151~161
- [18] Schweizer M, Fear J, Cadisch G. Isotopic (^{13}C) fractionation during plant residue decomposition and its implications for soil organic matter studies. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999, 13: 1284~1290
- [19] Wanek W, Heintel S, Richter A. Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001, 15: 1136~1140
- [20] West A G, Midgley J J, Bond W J. The evaluation of $\delta^{13}\text{C}$ isotopes of trees to determine past regeneration environments. Forest Ecology and Management, 2001, 147: 139~149
- [21] Ballentine D C, Macko S A, Turekian V C. Chemical and isotopic characterization of aerosols collected during sugar cane burning in South Africa. In: Joel Levine eds. Biomass Burning and Global Change, Volume I. Cambridge, MA: MIT Press, 1996. 460~465
- [22] 窦森, Lichtfouse E, Mariotti A. 土壤有机质的 $\delta^{13}\text{C}$ 研究. 见: 张继宏, 颜丽, 窦森主编. 农业持续发展的土壤培肥研究. 沈阳: 东北大学出版社, 1995. 116~119. Dou S, Lichtfouse E, Mariotti A. $\delta^{13}\text{C}$ research of soil organic matter. In: Zhang J H, Yan L, Dou S eds. Research of Soil Fertilization of Agriculture Sustainable Development (In Chinese). Shenyang: Northeastern University Press, 1995. 116~119
- [23] 窦森, Lichtfouse E, Mariotti A. C_3 和 C_4 植物条件下土壤 HA 的水解、热解和 GG-MS、 $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ 研究. 土壤通报, 1995, 26(6): 271~273. Dou S, Lichtfouse E, Mariotti A. Hydrolyze, pyrolysis and GG-MS, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ research of soil HA about C_3 and C_4 plants (In Chinese). Chinese Journal of Soil Science, 1995, 26(6): 271~273
- [24] Doane T A, Devereux O C, Horwath W R. Short-term soil carbon dynamics of humic fractions in low-input and organic cropping systems. Geoderma, 2003, 114: 319~331
- [25] Gregorich E G, Ellert B H, Monreal C M. Turnover of soil organic matter and storage of corn residue carbon estimated from natural ^{13}C abundance. Canadian Journal of Soil Science, 1995, 75: 161~167
- [26] Golchin A, Oades J M, Skjemstad J O. Structural and dynamic properties of soil organic matter as reflected by ^{13}C natural abundance, pyrolysis mass spectrometry and solid-state ^{13}C NMR spectroscopy in density fractions of an Oxisol under forest and pasture. Australian Journal of Soil Science, 1995, 33: 59~76
- [27] Roscoe R, Buuman P. Tillage effects on soil organic matter in density fractions of a Cerrado Oxisol. Soil and Tillage Research, 2003, 70: 107~119
- [28] Balesdent J, Girardin C, Mariotti A. Site-related $\delta^{13}\text{C}$ of tree leaves and soil organic matter in a temperate forest. Ecology, 1993, 74: 1713~1721
- [29] Mariotti A, Peterschmitt E. Forest savanna ecotone dynamics in India as revealed by carbon isotope ratios of soil organic matter. Oecologia, 1994, 97: 475~480
- [30] van Bergen P F, Bull I D, Poulton P R. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments-I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. Organic Geochemistry, 1997, 26: 117~135
- [31] Boutton T W, Yamasaki S I. Mass Spectrometry of Soils. New York: Marcel Dekker, 1996. 47~81
- [32] 朴河春, 刘启明, 余登利, 等. 用天然 ^{13}C 丰度法评估贵州茂兰喀斯特森林区玉米地土壤中有有机碳的来源. 生态学报, 2001, 21(3): 434~439. Piao H C, Liu Q M, Yu D L, *et al.* Origins of soil organic carbon with the method of natural ^{13}C abundance in maize fields (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(3): 434~439
- [33] Schwartz D, Mariotti A, Lanfranchi R. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios of soil organic matter as indicators of vegetation changes in the Congo. Geoderma, 1986, 39: 97~103
- [34] Hsieh Y P. Pool size and mean age of stable organic carbon in cropland. Soil Science Society of American Journal, 1992, 56: 460~464
- [35] Balesdent J, Wagner G H, Mariotti A. Soil organic matter turnover in long-term field experiments as revealed by carbon-13 natural abundance. Soil Science Society of American Journal, 1988, 52: 118~124
- [36] 朴河春, 余登利, 刘启明, 等. 林地变为玉米地后土壤轻质部分有机碳的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值的变化. 土壤与环境, 2000, 9(3): 218~222. Piao H C, Yu D L, Liu Q M, *et al.* Changes of natural ^{13}C abundance in light fraction in cleared Maolan karst forest soils converted to maize cropping (In Chinese). Soil and Environmental

- Sciences, 2000, 9(3):218~ 222
- [37] 刘启明, 王世杰, 朴河春, 等. 稳定碳同位素示踪农林生态转换系统中土壤有机质的含量变化. 环境科学, 2002, 23(3): 75~ 78. Liu Q M, Wang S J, Piao H C, *et al.* Soil organic matter changes of turnover ecosystems traced by stable carbon isotopes (In Chinese). Environmental Science, 2002, 23(3):75~ 78
- [38] 刘启明, 王世杰, 朴河春, 等. 稳定碳同位素示踪农林生态转换系统中土壤有机质的迁移和赋存规律. 环境科学, 2002, 23(4): 89~ 92. Liu Q M, Wang S J, Piao H C, *et al.* The dynamics rules of soil organic matter of turnover ecosystems traced by stable carbon isotopes (In Chinese). Environmental Science, 2002, 23(4): 89~ 92
- [39] 陈庆强, 沈承德, 彭少麟, 等. 华南亚热带山地土壤有机质更新特征及其影响因子. 生态学报, 2002, 22(9): 1446~ 1454. Chen Q Q, Shen C D, Peng S L, *et al.* Characteristics and controlling factors of soil organic matter turnover processes in the subtropical mountainous area, South China (In Chinese). Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(9): 1446~ 1454
- [40] Roscoe R, Buurman P, Velthorst E J. Soil organic matter dynamics in density and particle size fractions as revealed by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio in a Cerrado's oxisol. Geoderma, 2001, 104: 185~ 202
- [41] 窦森, 张晋京, 曹亚澄, 等. 用 $\delta^{13}\text{C}$ 方法研究玉米秸秆分解期间土壤有机质数量动态变化. 土壤学报, 2003, 40(3): 328~ 334. Dou S, Zhang J J, Cao Y C, *et al.* Study on dynamic change of soil organic matter during corn stalk decomposition by $\delta^{13}\text{C}$ method (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(3): 328~ 334
- [42] 刘卫国, 宁有丰, 安芷生, 等. 黄土高原现代土壤和古土壤有机碳同位素对植被的响应. 中国科学(D辑), 2002, 32(10): 830~ 836. Liu W G, Ning Y F, An Z S, *et al.* The respond to vegetation made by organic carbon isotope of modern soil and ancient soil of the Loess Plateau (In Chinese). Science in China (Series D), 2002, 32(10):830~ 836
- [43] Crossman Z M, McNamara N, Parekh N, *et al.* A new method for identifying the origins of simple and complex hopanoids in sedimentary materials using stable isotope labeling with $^{13}\text{CH}_4$ and compound specific stable isotope analyses. Organic Geochemistry, 2001, 32: 359~ 364
- [44] 郑乐平. 黔中岩溶地区土壤 CO_2 的稳定碳同位素组成研究. 中国科学(D辑), 1999, 29(6): 514~ 519. Zheng L P. Study on the composition of stable carbon isotope of soil CO_2 in the karst region of central section of Guizhou Province (In Chinese). Science in China (Series D), 1999, 29(6): 514~ 519
- [45] Rochette P, Flanagan L B, Gregorich E G. Separating soil respiration into plant and soil components using analyses of the natural abundance of carbon-13. Soil Science Society of American Journal, 1999, 63: 1207~ 1213
- [46] Bruneau P M C, Ostle N, Davidson D A, *et al.* Determination of rhizosphere ^{13}C pulse signals in soil thin sections by laser ablation isotope ratio mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002, 16: 2190~ 2194
- [47] Radajewski S, Ineson P, Nisha R, *et al.* Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature, 2000, 403: 646~ 649
- [48] Manefield M, Whiteley A S, Ostle N, *et al.* Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: An approach to associating microbial diversity with microbial community function. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002, 16: 2179~ 2183
- [49] Radajewski S, Webster G, Reay D S, *et al.* Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable isotope probing. Microbiology, 2002, 148: 2331~ 2342
- [50] Ostle N, Whiteley A S, Bailey M J, *et al.* Active microbial RNA turnover in a grassland soil estimated using a $^{13}\text{CO}_2$ spike. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35: 877~ 885
- [51] Qian J H, Doran J W. Available carbon released from crop roots during growth as determined by carbon-13 natural abundance. Soil Science Society of American Journal, 1996, 60: 828~ 831
- [52] Robinson D, Scrimgeour C M. The contribution of plant C to soil CO_2 measured using $\delta^{13}\text{C}$. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27: 1653~ 1656
- [53] Balesdent J, Balaban M. Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28: 1261~ 1263
- [54] Briones M J I, Ineson P, Sleep D. Use of delta ^{13}C to determine food selection in collembolan species. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31: 937~ 940
- [55] Fitter A H, Graves J D, Watkins N K, *et al.* Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. Functional Ecology, 1998, 12: 406~ 412
- [56] Ostle N, Ineson P, Benham D, *et al.* Carbon assimilation and turnover in grassland vegetation using an in situ $^{13}\text{CO}_2$ pulse labeling system. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2000, 14: 1345~ 1350

USE OF $\delta^{13}\text{C}$ METHOD IN STUDYING SOIL ORGANIC MATTER

Zhu Shufa^{1,2} Liu Congqiang¹ Tao Faxiang¹

(1 *State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China*)

(2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract The $\delta^{13}\text{C}$ method, which is a new technique for researching on soil organic matter (SOM) dynamics in recent years, possesses not only virtues of the radioactive ^{14}C labeling methods, but also some specific merits. For instance, it is non-radioactive and long-term in labeling, and is able to evenly and economically label all SOM fractions and be carried out directly on samples collected from an experimental site. So $\delta^{13}\text{C}$ method has been utilized extensively to study origin of SOM and its fractions, to quantify C turnover, and to investigate historical changes in C_3/C_4 vegetation. With the quick development of this method and continuous improvement of various analytical techniques of the $\delta^{13}\text{C}$ values, the $\delta^{13}\text{C}$ method displays a new vitality in studying soil processes, especially soil carbon cycling. In order to promote the application of the $\delta^{13}\text{C}$ method in researches at home, a comprehensive summary is made in this article of factors affecting $\delta^{13}\text{C}$ values of SOM, and applications of the method in researching on SOM at home and abroad and the $\delta^{13}\text{C}$ values analytical technique.

Key words Stable carbon isotope; Soil organic matter; $\delta^{13}\text{C}$ values