

赵永欣, 刘欣颐, 温腾, 张金波, 蔡祖聪, 戴沈艳. 悬挂扩散法测定土壤 ^{15}N 标记试验中 NO_3^- - ^{15}N 丰度的改进与优化[J]. 土壤学报, 2026,

ZHAO Yongxin, LIU Xinyi, WEN Teng, ZHANG Jinbo, CAI Zucong, DAI Shenyan. Improving and Optimizing the Suspended Diffusion Method for Determination of NO_3^- - ^{15}N Abundance in ^{15}N -Labeled Soil Extracts[J]. Acta Pedologica Sinica, 2026,

悬挂扩散法测定土壤 ^{15}N 标记试验中 NO_3^- - ^{15}N 丰度的改进与优化*

赵永欣^{1, 2}, 刘欣颐^{1, 2}, 温腾^{1, 2, 3}, 张金波^{1, 4}, 蔡祖聪^{1, 2, 3}, 戴沈艳^{1, 2, 3†}

(1. 气候系统预测与变化应对全国重点实验室(南京师范大学), 南京 210023; 2. 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023; 3. 江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心, 南京 210023; 4. 海南大学南繁学院, 海南三亚 572025)

摘要: ^{15}N 示踪法是量化土壤氮初级转化速率及研究土壤氮转化过程的关键方法。土壤中的 NO_3^- -N 与矿化、硝化、反硝化、硝态氮异化还原为铵等多种氮转化过程直接相关, 准确测定土壤样品中 NO_3^- - ^{15}N 丰度具有重要意义。悬挂扩散法操作简便、成本低, 是目前已知能在同一体系连续完成 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 分离转化的方法。但是, 由于残留的 NH_4^+ -N 及试剂等原因, 悬挂扩散法获得 NO_3^- -N 扩散的结果存在不可忽视的误差。本研究建立了快速去除残留高丰度 NH_4^+ - ^{15}N 的方法, 优化了酸吸收剂种类、MgO 及戴氏合金用量, 评估了悬挂扩散法测定标记 NO_3^- - ^{15}N 丰度的准确性。结果发现, (1) 氮气吹扫法去除残留 NH_4^+ - ^{15}N 的效果优于超声波振荡和传统的控制培养温度和时间法, 氮气吹扫 6 h 后可全部去除残留的高丰度 NH_4^+ - ^{15}N (10.32 atom%), 将扩散时间由大于等于 96 h 缩短至 54 h, 有效降低了试剂和土壤可溶性有机氮 (DON) 分解的干扰, NO_3^- -N 扩散后的测定值与理论值 (0.370 0 atom%) 差距小于 0.003 8 atom%; (2) 使用 1 mol·L⁻¹ 草酸作为酸吸收剂, 分别加入 0.1 g MgO 和 0.3 g 戴氏合金可完成 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 的扩散, 校正后的测定值与理论值差距小于 0.140 0 atom%; (3) 优化后的悬挂扩散法与化学转化法、反硝化细菌法测定的土壤标记 NO_3^- - ^{15}N 丰度无显著差异 ($P>0.05$)。本方法解决了悬挂扩散法中残留高丰度 NH_4^+ - ^{15}N 难以去除的问题, 显著提高 NO_3^- - ^{15}N 测定精度与准确度, 大幅缩减了同一样品中依次完成 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 转化所需时间, 为精准研究土壤氮转化过程提供了重要的技术支撑。

关键词: 悬挂扩散法; NO_3^- - ^{15}N ; NH_4^+ - ^{15}N 去除; ^{15}N 标记

中图分类号: S153.1

文献标志码: A

Improving and Optimizing the Suspended Diffusion Method for Determination of NO_3^- - ^{15}N Abundance in ^{15}N -Labeled Soil Extracts

ZHAO Yongxin^{1, 2}, LIU Xinyi^{1, 2}, WEN Teng^{1, 2, 3}, ZHANG Jinbo^{1, 4}, CAI Zucong^{1, 2, 3}, DAI Shenyan^{1, 2, 3†}

(1. State Key Laboratory of Climate System Prediction and Risk Management, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, China; 4. College of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

*国家重点研发计划项目(2023YFD1700804)资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2023YFD1700804)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: 09433@njnu.edu.cn

作者简介: 赵永欣(2001—), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事稳定同位素的新方法研究。E-mail: 3011960907@qq.com

收稿日期: 2026-01-07; 收到修改稿日期: 2026-06-11; 网络首发日期(www.cnki.net): 2026-06-11

Abstract: 【Objective】The ^{15}N tracing method is a key approach for quantifying gross soil nitrogen transformation rates and studying soil nitrogen transformation processes. Soil NO_3^- -N is involved in multiple key processes, including mineralization, nitrification, denitrification, and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA). Therefore, accurate determination of NO_3^- - ^{15}N abundance is of great importance for understanding soil nitrogen cycling. The suspended diffusion method is simple to operate and cost-effective, and enables sequential separation and conversion of NH_4^+ -N and NO_3^- -N within the same system. However, it is still unclear how residual NH_4^+ -N and reagent interferences introduce non-negligible errors in NO_3^- - ^{15}N determination using this method. 【Method】A rapid method was developed to remove residual high-abundance NH_4^+ - ^{15}N to minimize its interference with NO_3^- - ^{15}N diffusion. The type of acid absorbent and the amounts of MgO and Devarda's alloy were systematically optimized. The accuracy of the improved suspended diffusion method for determining labeled NO_3^- - ^{15}N abundance was rigorously evaluated. 【Result】The results revealed that: (1) The N_2 purging method was more effective in removing residual NH_4^+ - ^{15}N than ultrasonic agitation and the conventional incubation-based approach. After 6 h of N_2 purging, the residual high-abundance NH_4^+ - ^{15}N (10.32 atom%) was completely removed, reducing the required diffusion time from ≥ 96 h to 54 h. This optimization also minimized interference from reagents and soil dissolved organic nitrogen (DON) decomposition. Under these optimized conditions, the difference between the measured NO_3^- -N value and the theoretical value (0.370 0 atom%) was less than 0.003 8 atom%. (2) Using 1 mol·L $^{-1}$ oxalic acid as the acid absorbent, together with 0.1 g MgO and 0.3 g Devarda's alloy added, enabled the successful diffusion of both NH_4^+ -N and NO_3^- -N. After calibration, the difference between the measured value and the theoretical value was less than 0.140 0 atom%. (3) Also, there was no significant difference ($P>0.05$) in the determined soil labeled NO_3^- - ^{15}N abundance between the optimized suspended diffusion method and the chemical conversion method or the denitrifier method, indicating that the improved technique yields equally reliable results. 【Conclusion】The optimized suspended diffusion method effectively eliminates interference from residual high-abundance NH_4^+ - ^{15}N , significantly improving the precision and accuracy of NO_3^- - ^{15}N determination. It also substantially shortens the time required for sequential NH_4^+ -N and NO_3^- -N conversion within the same sample. This optimized diffusion method therefore provides important technical support for further research on soil nitrogen transformation processes and the global nitrogen cycle.

Key words: Suspended diffusion method; NO_3^- - ^{15}N ; NH_4^+ - ^{15}N removal; ^{15}N labeling

氮素是一种重要的生源要素, 充分认识土壤中的氮转化过程是协调粮食安全、生态环境安全和气候变化三重挑战的科学基础^[1], 深入研究土壤氮转化过程可科学评估土壤无机氮供应能力, 进而在农业生产中制定合理施肥策略, 促进作物对氮素的吸收, 提高氮肥利用效率, 推动农业可持续发展^[2-4]。 ^{15}N 稳定同位素示踪技术是研究土壤氮转化过程的重要方法, 通过 ^{15}N 标记实验, 对室内微宇宙、盆栽、大田等不同研究情境下的无机态氮 (NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N) 浓度和 ^{15}N 丰度的变化进行连续监测, 结合 ^{15}N 示踪模型 (如 Ntrace_{Basic}、Ntrace_{Plant} 等) 可准确计算矿化、硝化等多个氮转化过程的氮初级转化速率^[5], 其中, 高丰度 ^{15}N 标记物 (≥ 5.000 atom%) 的使用, 为准确区分不同试验处理中氮转化过程的差异提供了可能, 为深入研究土壤不同形态氮素的源和汇提供了技术支持^[6-7]。

土壤中不同形态的氮会相互转化, 并受多个氮转化过程的控制, 包括有机氮矿化、硝化、反硝化、硝态氮异化还原为铵 (DNRA) 和无机氮同化等, 土壤 NO_3^- -N 与上述多个氮转化过程直接相关, 准确测定土壤浸提液中 NO_3^- - ^{15}N 丰度对氮转化过程研究具有重要意义。目前主要有四种可用于土壤 NO_3^- - ^{15}N 丰度分析的前处理方法: 蒸馏法、化学转化法、反硝化细菌法和扩散法^[8]。蒸馏法所需样品量较大, 操作费时且易发生交叉污染^[9]。化学转化法和反硝化细菌法分别使用化学和生物试剂将 NO_3^- -N 转化为 N_2O , 通过稳定同位素质谱仪测定 N_2O 中 ^{15}N 丰度^[10]。化学转化法和反硝化细菌法灵敏度较高, 但是化学转化法所用的镀铜镉粒试剂价格昂贵且有剧毒, 易对实验人员造成人身伤害并污染环境, 反硝化细菌法涉及繁琐的样品吹扫步骤和菌种培养等微生物学操作, 对实验人员有极高的实验技能要求。自 Conway 和 Cooke^[11]及 Conway^[12]阐述了扩散法的基本原理和步骤以来, 扩散步骤在不断地改进。扩散法是在一个较小体积的密闭容器内, 加入 MgO 等碱性试剂, 将 NH_4^+ -N 转

化为气态 NH_3 ，使用加酸滤纸吸收 NH_3 ，完成 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散，再加入戴氏合金 (Devarda's alloy) 将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，更换滤纸片吸收新产生的 NH_3 可完成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散^[13]。使用元素分析仪-稳定同位素质谱联用仪 (EA-IRMS) 分别测定两次滤纸片的 ^{15}N 丰度，即测得 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 中 ^{15}N 的丰度。根据滤纸的种类不同，扩散法可分为扩散包法和悬挂扩散法。扩散包法通常使用的 Millipore 公司生产的聚四氟乙烯薄膜 (PTFE)，价格昂贵，且扩散包法前处理时间较长，仅完成前期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散就需 8 d 以上^[14-16]。悬挂扩散法使用的无灰级滤纸 (Whatman No. 42 Cat No. 1442-055) 价格低廉，操作也简单，可在 6~8 d 内依次完成 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散，避免因前处理时间过长导致土壤浸提液中可溶性有机氮 (DON) 转化为 NH_4^+ ，进而影响 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定^[15, 17]，非常适合需同时分离 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的土壤 ^{15}N 标记样品。

与更灵敏的化学转化法和反硝化细菌法相比，悬挂扩散法仍具有显著的优点：(1) 扩散是目前分离并测定 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度最直接有效的方法，悬挂扩散法在完成 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散后其反应体系可继续用于 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度的测定，即在同一样品中可依次完成 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 的前处理分析，而化学转化法和反硝化细菌法无法在同一体系完成对 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 的前处理；(2) 悬挂扩散法操作简单，无需气体转移、菌种保存和接种等繁琐步骤，所用耗材安全无毒且价格低廉；(3) 悬挂扩散法所需样品浓度一般大于 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，与土壤 ^{15}N 标记试验的样品浓度相近，因此，悬挂扩散法可直接利用土壤浸提液进行扩散处理，避免了使用化学转化法和反硝化细菌法时因样品溶液稀释而引起的误差；(4) 相较于化学转化法和反硝化细菌法产生的 N_2O 气体样品难以保存、易污染和测定时间长 (大于 20 min) 的缺点，悬挂扩散法前处理产物为滤纸片固体样品，更易保存，性质稳定且在 EA-IRMS 上测定时间通常小于 10 min。可见，悬挂扩散法操作简单，成本低，对环境友好，实验人员能较快学习并掌握，特别适用于普通实验室对土壤 ^{15}N 标记试验中无机氮 ($\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$) 样品进行前处理分析。

但是，悬挂扩散法很少用于 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 的前处理分析，主要原因是 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散后仍有部分残留难以彻底去除，特别是 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度高于 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度时，即使延长扩散时间至数天，残留的高丰度 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 仍会对 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定产生显著干扰^[9]。此外，与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散相比，完成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散所需试剂除了酸吸收剂、碱性试剂外，还需要一定量的戴氏合金将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，若还原不完全，易产生同位素分馏；同时，传统扩散法时间大于等于 144 h， MgO 、戴氏合金等试剂中杂质氮的析出，以及土壤溶液中 DON 等有机物的分解不可忽视^[15, 18-20]。实验人员通常选择将悬挂扩散法与化学转化法或反硝化细菌法组合，在不同体系内分别完成 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 的前处理分析，整个过程成本较高且费时费力，并非所有普通实验室均能完成相关实验操作。也有学者建议在悬挂扩散时分别测定 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 和 $(\text{NH}_4^++\text{NO}_3^-)\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度后，通过差减法得到 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度^[21]，但通常误差较大。可见，通过悬挂扩散法准确测定 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度存在一定技术难度，尤其在高 $^{15}\text{NH}_4^+$ 标记样品中更具挑战性。优化悬挂扩散法，解决 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 残留干扰，对精准解析土壤氮转化过程及其机理具有重要科学意义。

针对以上问题，本研究从以下几方面对悬挂扩散法进行了优化：(1) 建立快速去除残留高丰度 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 的方法，减小其对 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散的影响；(2) 优化酸吸收剂种类、 MgO 和戴氏合金的用量，减少外源杂质氮对 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散的影响；(3) 缩短 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散周期，以抑制内源性杂质氮的生成。最终，构建一套适用于土壤 ^{15}N 标记试验中 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 的扩散培养体系，为精准研究氮转化过程提供重要技术支撑。

1 材料与方法

1.1 酸吸收剂的优化试验

分别选用 $20\text{ }\mu\text{L}$ $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)、硼酸 (H_3BO_3) 和草酸 ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 作为酸吸收

剂, 配制氮浓度均为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10.32 atom%) 和 KNO_3 (0.370 0 atom%) 标记液, 先进行 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散, 去除残留的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 后再进行 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散, 其中, 扩散体系为 25 mL 溶液, MgO 和戴氏合金的用量均为 0.3 g, 扩散培养温度为 25°C , 比较 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度结果并选择最优酸吸收剂。扩散过程中试剂瓶放入摇床 (HZQ X160, 常州普天仪器制造有限公司, 江苏常州) 培养, 扩散结束使用 EA-IRMS (Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定滤纸片 ^{15}N 丰度。本试验 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 K^{15}NO_3 标准样均购自上海化工研究院。

1.2 MgO 用量的优化试验

在确定酸吸收剂种类的基础上优化 MgO 用量, 设置 0.1、0.2 和 0.3 g 三种处理。选用一种酸性土壤 (江西林地土壤 pH 4.43) 和一种中性土壤 (东北农田土壤 pH 7.14), 称取适量鲜土 (相当于 20 g 干土) 于 250 mL 三角瓶中, 加入 100 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液, 置于 25°C 摇床, 以 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 1 h 后过滤, 将土壤浸提液与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10.32 atom%) 标记液加入试剂瓶中, 保持溶液体系为 25 mL, 氮浓度为 $2 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中, 戴氏合金用量为 0.3 g, 扩散培养温度为 25°C , 扩散结束后测定 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度, 并在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散结束 (24 h)、残留 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除后 (72 h)、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散结束 (96 h) 测定扩散体系的 pH。其中, KCl 和 MgO 需提前在马弗炉中以 450°C 的高温分别灼烧 48 h 和 6 h, 以尽量去除杂质氮。

1.3 戴氏合金用量的优化试验

在确定酸吸收剂种类和 MgO 用量的基础上优化戴氏合金的用量, 分别设置 0.1、0.3 和 0.6 g 三种处理。配制氮浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ^{15}N 丰度为 0.370 0 atom%、5.000 atom% 和 10.16 atom% 的 KNO_3 标记液进行 24 h 的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散, 扩散培养温度为 25°C , 扩散结束后比较 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度的测定结果, 确定戴氏合金的用量。戴氏合金的用量确定后, 配制系列丰度 K^{15}NO_3 标记液 (氮浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 丰度为 0.366 3 atom%、0.370 0 atom%、0.400 0 atom%、0.500 0 atom%、1.000 atom%、2.000 atom%、3.000 atom%、4.000 atom%、5.000 atom%、6.000 atom%、7.000 atom%、8.000 atom%、9.000 atom%、10.16 atom%), 进行 24 h 的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散, 扩散培养温度为 25°C , EA-IRMS 测定 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度后绘制 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散的标准曲线。同时使用移液枪滴加相同氮量的系列丰度标记液至滤纸片上, 放入 96 孔板置于干燥器中干燥 24 h 以上, 锡杯包样后使用 EA-IRMS 测得样品峰面积 (Area all) 的信号值, 通过比较 Area all 的信号值计算氮的回收率。

1.4 残留高丰度 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 去除方法的优化

在确定最优酸吸收剂、 MgO 和戴氏合金用量后, 选用三种方法 (优化培养温度和时间、超声波振荡方法和 N_2 吹扫方法) 去除残留高丰度 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 。分别配制三组不同浓度、丰度的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 K^{15}NO_3 标记液, 对比残留 $\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 的去除效果。第一组氮浓度 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标记液 ($\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 5.040 atom%) 和 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KNO_3 标记液 ($\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.370 0 atom%); 第二组氮浓度 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标记液 ($\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 10.32 atom%) 和 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KNO_3 标记液 ($\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.370 0 atom%); 第三组氮浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标记液 ($\text{NH}_4^+\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 10.32 atom%) 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KNO_3 标记液 ($\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.370 0 atom%)。

1.4.1 优化酸吸收剂吸收残留 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的培养温度和时间试验 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散结束后, 取下两片圆形无灰级滤纸片, 替换为一片 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的定性滤纸片, 滴加 $40 \mu\text{L}$ $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酸吸收剂, 试剂瓶放入摇床以 $140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度振荡吸收残留的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。设置 25、35、45 和 60°C 4 个温度水平, 每个温度水平分别设置 24、48、60 和 72 h 4 个时间, 其中 60°C 增设 12 h 的时间处理, 在去除残留 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 后进行 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散, 测定 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度。

1.4.2 使用超声波振荡方法去除残留的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 试验 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 扩散结束后, 将试剂瓶敞口放置在超声波振荡器上 (40 kHz, KQ-800E, 昆山市超声仪器有限公司, 江苏昆山), 设置 1、2、3、4、5 和 6 h 6 个不同的振荡时间, 振荡去除残留的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 后进行 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 扩散, 测定 $\text{NO}_3^-\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度。

1.4.3 使用 N_2 吹扫方法去除残留的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 试验 使用三通接头 (EPE-4, 浙江亿日气动科技有限公司)、三通阀 (MF937, 南京铭安康电子科技有限公司)、橡胶软管、氮气气瓶、氮气分压阀、

试剂瓶搭建 N₂ 吹扫装置。在 NH₄⁺-N 扩散结束后, 将试剂瓶敞口放置, 将连接三通阀的橡胶软管置于试剂瓶内, 通入 N₂ 吹扫扩散体系内残留的 NH₄⁺-N, 调节气瓶的分压阀以控制 N₂ 流速, 保证气流的稳定性和气泡的均匀性。设置 1、2、3、4、5 和 6 h 6 个不同的吹扫时间, 吹扫去除残留的 NH₄⁺-N 后进行 NO₃⁻-N 扩散, 测定 NO₃⁻-¹⁵N 丰度。

1.5 优化的 NO₃⁻-¹⁵N 悬挂扩散方法在测定土壤高丰度 ¹⁵N 标记试验中的准确性验证

在选取最优酸吸收剂、MgO 用量、戴氏合金用量和去除残留高丰度 NH₄⁺-¹⁵N 的最佳方法后, 确定最优的 NO₃⁻-¹⁵N 悬挂扩散方法, 使用新方法对土壤高丰度 ¹⁵N 标记试验中土壤浸提液 NO₃⁻-¹⁵N 丰度进行前处理分析, 同时对比化学转化法和反硝化细菌法对样品溶液 NO₃⁻-¹⁵N 的前处理结果, 验证优化后 NO₃⁻-N 悬挂扩散方法的准确性。选用一种酸性土壤(江西林地土 pH 4.43)和一种中性土壤(东北农田土 pH 7.14), 称取适量鲜土(相当于 20 g 干土)于 250 mL 三角瓶中, 置于 25 °C 培养箱预培养 24 h 后加入 2 mL (NH₄)₂SO₄ 标记液(丰度 10.32 atom%), 氮量为 20 mg·kg⁻¹(以 N 计), 分别在培养 0.5 h 和 24 h 后破坏性取样, 在三角瓶中加入 100 mL 1 mol·L⁻¹ KCl 溶液, 置于 25 °C、250 r·min⁻¹ 的摇床振荡 1 h 后过滤, 使用优化的 NO₃⁻-N 悬挂扩散方法、化学转化法和反硝化细菌法对土壤浸提液中 NO₃⁻-¹⁵N 进行前处理, 并测定 ¹⁵N 丰度。

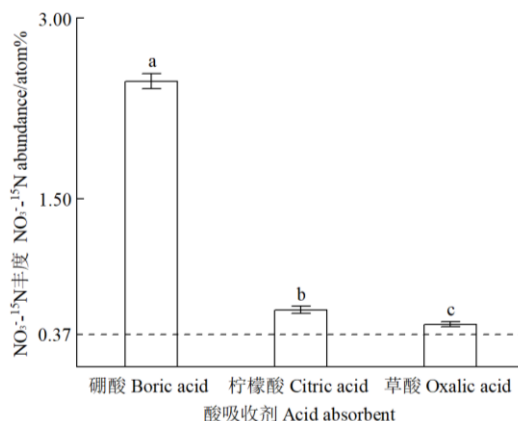
1.6 数据处理

每个试验中的不同处理均设置 3 个重复, 采用 Excel 2024 进行数据处理, 使用 SPSS 24.0 对试验数据进行单因素方差分析(ANOVA)检验差异显著性($P<0.05$), 采用 Origin 2025 绘图。

2 结果

2.1 酸吸收剂的优化

三种酸吸收剂柠檬酸(C₆H₈O₇)、硼酸(H₃BO₃)和草酸(H₂C₂O₄)均能吸收扩散体系产生的 NH₃, 但吸收能力存在明显差异(图 1)。H₃BO₃ 处理中 NO₃⁻-¹⁵N 丰度测定值远高于 0.370 0 atom%; C₆H₈O₇ 作为酸吸收剂时 NO₃⁻-¹⁵N 丰度测定值为 0.573 1 atom%; H₂C₂O₄ 作为酸吸收剂时, 在经过 NH₄⁺-N 扩散后再进行 NO₃⁻-N 扩散, NO₃⁻-¹⁵N 丰度的测定结果(0.453 3 atom%)最接近理论值, H₂C₂O₄ 作为酸吸收剂时效果最佳, 但 NO₃⁻-¹⁵N 的扩散结果仍高于理论值, 原因在于残留高丰度 NH₄⁺-¹⁵N (10.32 atom%) 的影响。



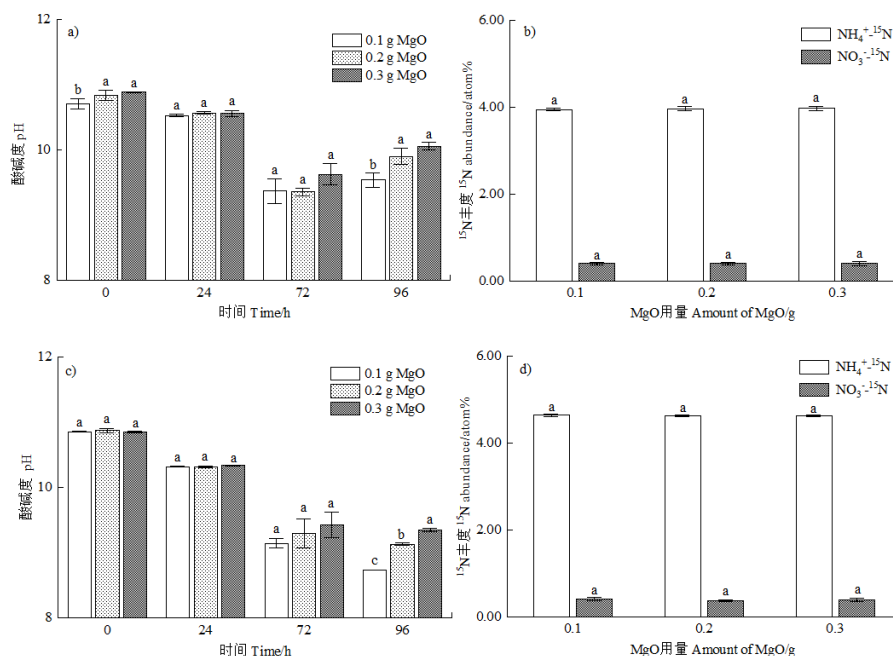
注: 虚线表示理论值 0.370 0 atom%, 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。Note: The dashed line represents the theoretical value of 0.370 0 atom%. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 1 使用不同酸吸收剂时 NO₃⁻-¹⁵N 扩散后测定的 ¹⁵N 丰度

Fig. 1 Measured ¹⁵N abundance of NO₃⁻-¹⁵N after diffusion using different acid absorbents

2.2 MgO 用量的优化

优化 MgO 的用量可减少杂质氮的干扰, 保证 ^{15}N 丰度测定结果的准确性。结果 (图 2) 表明, 在酸性土壤与中性土壤浸提液中加入 0.1 g MgO 即可保证整个扩散过程 (96 h) 中扩散体系的 pH 维持在 8.70 以上, 随着扩散时间延长, pH 略有下降, 但扩散溶液仍呈弱碱性; 不同 MgO 含量的处理中 $\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ 丰度均无显著差异 ($P > 0.05$)。减少 MgO 至 0.1 g 不仅可保证扩散过程顺利进行, 还能减少试剂中可能存在的外源杂质氮。



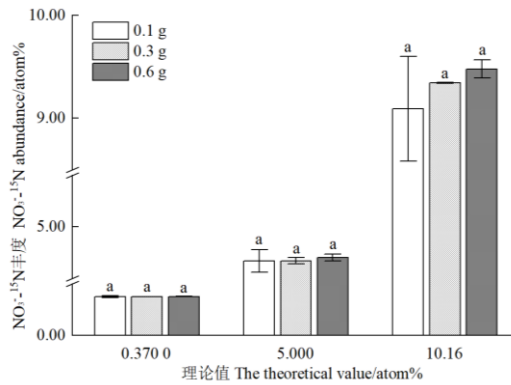
注: a)和 c)图中不同小写字母表示在同一时间 (0、24、72、96 h) 下, 不同 MgO 添加量处理的 pH 差异显著 ($P < 0.05$); b)和 d)图中相同小写字母表示 $\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ 丰度测定值或 $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ 丰度测定值无显著差异 ($P > 0.05$); 当误差值小于等于 0.01 时, 误差棒因过小而未在图中显示。Note: In figures a) and c), different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in pH values among different MgO addition treatments at the same time points (0, 24, 72, 96 h). In figures b) and d), the same lowercase letters indicate no significant difference ($P > 0.05$) in the measured $\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ abundances or in the measured $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ abundances. When the error value was ≤ 0.01 , the error bars were too small to be displayed in the figure.

图 2 土壤浸提液扩散过程中的 pH (a. 酸性土壤, c. 中性土壤) 和 $\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ 丰度 (b. 酸性土壤, d. 中性土壤)

Fig. 2 pH values (a. the acidic soil, c. the neutral soil) and ^{15}N abundance of $\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ and $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ (b. the acidic soil, d. the neutral soil) during the diffusion of soil extracts

2.3 戴氏合金用量的优化

在保证 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 还原完全的前提下, 优化戴氏合金的用量可有效减少杂质氮的干扰。结果 (图 3) 表明, 当 $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ 为 0.370 0 atom% 和 5.000 atom% 时, 三种戴氏合金用量的处理下 (0.1、0.3、0.6 g) $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 扩散后的测定值几乎无差异, 均接近理论值; 当 $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ 丰度提高至 10.16 atom% 时, 0.1 g 合金处理中的测定值为 9.091 atom%, 与理论值差距大于 1.000 atom%, 且标准差 (sd) 较大 (> 0.500 0 atom%), 而 0.3 g 和 0.6 g 合金处理的测定值分别为 9.344 atom% 和 9.478 atom%, 更接近理论值。过多的合金可能会促使土壤浸提液中一些有机物和含氧物质的分解^[20], 因此, 0.3 g 合金是 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 扩散的最优用量。配制系列丰度 K^{15}NO_3 标记液 (氮浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 丰度为 0.366 3 atom%、0.370 0 atom%、0.400 0 atom%、0.500 0 atom%、1.000 atom%、2.000 atom%、3.000 atom%、4.000 atom%、5.000 atom%、6.000 atom%、7.000 atom%、8.000 atom%、9.000 atom%、10.16 atom%) 进行 24 h $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 扩散后绘制的标准曲线, 测定值和理论值具有较好的线性关系 ($y = 1.078x - 0.0491$, $R^2 = 0.9998$), 表明使用悬挂扩散法可对溶液中 $\text{NO}_3^- - ^{15}\text{N}$ 丰度进行准确测定。



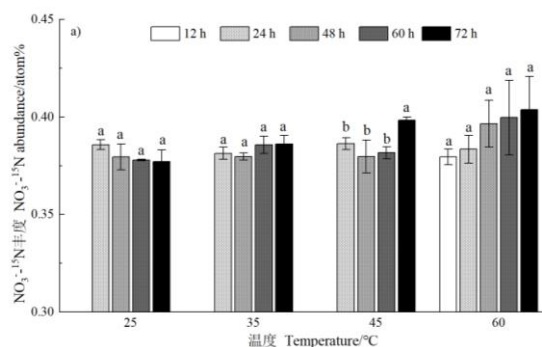
注：图中相同小写字母表示对于同一种理论丰度（0.370 0 atom%、5.000 atom%、10.16 atom%），不同合金添加量处理的 $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定值无显著差异（ $P > 0.05$ ）。Note: In the figure, identical lowercase letters denote no significant difference ($P > 0.05$) in the measured $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ abundance among treatments with different alloy addition amounts for the same theoretical abundance (0.370 0 atom%, 5.000 atom%, 10.16 atom%).

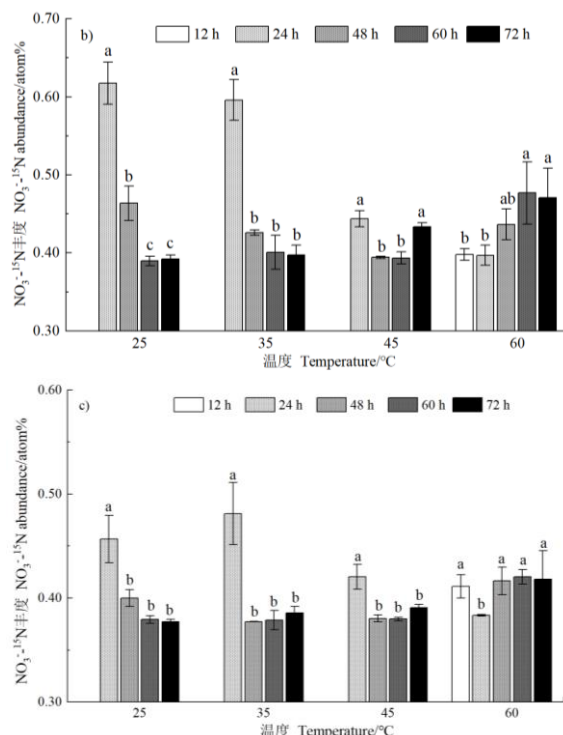
图3 使用0.1、0.3、0.6 g戴氏合金 $\text{NO}_3\text{-N}$ 扩散后 $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定值

Fig. 3 Measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ after diffusion of $\text{NO}_3\text{-N}$ using 0.1, 0.3, and 0.6 g of Devarda's alloy

2.4 去除残留高丰度 $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ 方法的优化

2.4.1 培养温度和时间 在 $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散结束后，一般使用酸吸收剂吸收残留 $\text{NH}_4\text{-N}$ ，温度和时间会影响残留 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除速度。结果（图4）表明，随着振荡时间的增加，残留高丰度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除效果普遍呈现出先增强后减弱的趋势，去除效果与 $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的浓度密切相关。当 $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 5.040 atom%， $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，25 °C，振荡 72 h 后，瓶内残留高丰度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除效果最佳， $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度的测定值为 0.377 1 atom%，接近理论值 0.370 0 atom%。当 $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度升至 10.32 atom%， $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，25 °C，振荡 60 h 去除效果最佳，但仍对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 扩散产生一定影响， $\text{NO}_3\text{-N}$ 中 ^{15}N 丰度测定值为 0.389 7 atom%，高于理论值 0.370 0 atom%。当 $\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 10.32 atom%， $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度分别为 2 和 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，25 °C 时振荡 72 h 和 35 °C 时振荡 48 h 后， $\text{NH}_4\text{-N}$ 的去除效果均达到最佳， $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 的测定值分别为 0.377 4 atom% 和 0.377 3 atom%，接近理论值 0.370 0 atom%。





注：图中不同小写字母表示在同一温度（25、35、45、60 °C）下，不同时间处理（12、24、48、60、72 h）去除残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定值差异显著（ $P < 0.05$ ）。a)图 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度为 5.040 atom%， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度为 0.370 0 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定值；b)图 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度为 10.32 atom%， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度为 0.370 0 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定值；c)图 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度为 10.32 atom%， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 的丰度为 0.370 0 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ， $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度为 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度测定值。Note: In the figure, different lowercase letters denote significant differences ($P < 0.05$) in the measured $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ abundance among different time treatments (12、24、48、60、72 h) for the same temperature (25、35、45、60 °C), following the removal of residual high-abundance $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$. Fig. a) shows the measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ under the conditions of 5.040 atom% for $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$, 0.370 0 atom% for $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$, and a concentration of $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for both $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ and $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$; Fig. b) shows the measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ under the conditions of 10.32 atom% for $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$, 0.370 0 atom% for $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$, and a concentration of $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for both $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ and $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$; Fig. c) shows the measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ under the conditions of 10.32 atom% for $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$, 0.370 0 atom% for $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$, and concentrations of $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ and $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$.

图 4 不同温度（25、35、45、60 °C）和不同时间（12、24、48、60、72 h）处理去除残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散测定的 ^{15}N 丰度

Fig. 4 Measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ after diffusion following removal of residual high abundance $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ under different temperatures (25, 35, 45, 60 °C) and different treatment durations (12, 24, 48, 60, 72 h)

2.4.2 超声波振荡方法 超声波振荡可快速去除反应体系中残留的 $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 。结果（图 5）显示，残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 的去除效果与超声波振荡时间密切相关，振荡时间越长，效果越好，去除效果也与 $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 的浓度有关。当 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 5.040 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，振荡 6 h 后扩散， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.374 6 atom%，与理论值 0.370 0 atom% 接近。当 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 10.32 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，振荡 6 h 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.410 7 atom%，去除效果并不理想。当 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 10.32 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 的浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 的浓度为 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，振荡 6 h 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.387 5 atom%，与理论值也有一定差距。

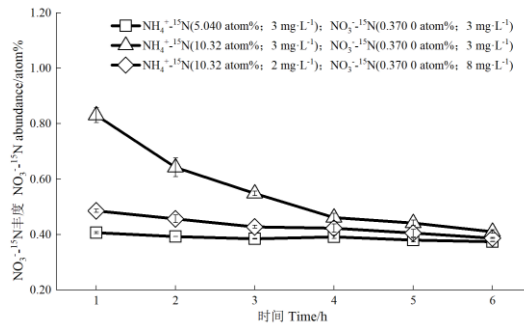


图 5 超声波振荡去除残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散测定的 ^{15}N 丰度

Fig. 5 Measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ after diffusion following removal of residual high abundance $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ by ultrasonic agitation

2.4.3 N_2 吹扫方法 N_2 吹扫亦能加快残留 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 的去除。结果（图 6）显示，去除效果与 N_2 吹扫时间密切相关，吹扫时间越长效果越好，去除效果仅与 $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 的浓度有关，不受 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度高低影响。当 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 5.040 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，吹扫 5 h 后扩散， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.374 1 atom%，延长吹扫时间至 6 h， $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度降至 0.373 3 atom%，已不受残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 的影响。当 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 10.32 atom%， $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度均为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时或 $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 浓度为 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时， N_2 吹扫 6 h 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度与理论值（0.370 0 atom%）的差距均小于 0.003 8 atom%，不受残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ 的影响。

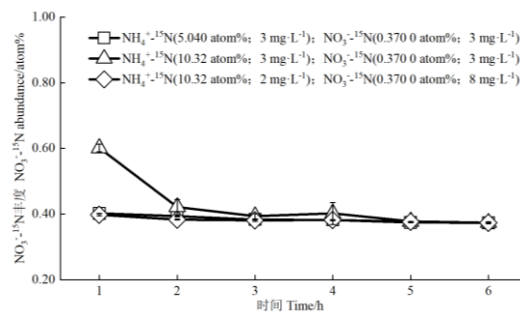


图 6 N_2 吹扫去除残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 扩散测定的 ^{15}N 丰度

Fig. 6 Measured ^{15}N abundance of $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ after diffusion following removal of residual high abundance $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ by N_2 purging

2.5 优化 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 悬挂扩散方法的准确性验证

为验证优化方法的准确性，选择土壤标记试验的样品，比较化学转化法、反硝化细菌法和两种优化的 $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ 悬挂扩散方法（ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡 72 h 和 N_2 吹扫 6 h 去除残留高丰度 $\text{NH}_4^{+}\text{-}^{15}\text{N}$ ，试剂均选用 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 、 0.1 g MgO 、 0.3 g 戴氏合金）测定 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度的差异。结果（表 1）表明，随着土壤培养时间的增加，土壤浸提液中 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度也随之增高，酸性土壤培养 0.5 h 后四种方法分别测得 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.372 2 atom%、0.374 3 atom%、0.374 8 atom%和 0.373 5 atom%，结果无显著差异（ $P>0.05$ ），培养 24 h 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.384 2 atom%、0.387 4 atom%、0.386 1 atom%和 0.383 6 atom%，结果同样无显著差异（ $P>0.05$ ）；中性土壤培养 0.5 h 后四种方法分别测得 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 0.406 9 atom%、0.409 2 atom%、0.410 6 atom%和 0.410 5 atom%，培养 24 h 后 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度为 2.544 atom%、2.539 atom%、2.542 atom%和 2.543 atom%，优化后的悬挂扩散方法与化学转化法和反硝化细菌法均无显著差异（ $P>0.05$ ），可准确测定土壤样品中的 $\text{NO}_3^{-}\text{-}^{15}\text{N}$ 丰度。

表 1 不同方法测定土壤高丰度 ^{15}N 标记试验中 NO_3^- - ^{15}N 丰度结果

Table 1 Results of NO_3^- - ^{15}N abundance determined by different methods in soil high abundance ^{15}N labeling experiments

土壤 Soil	培养时间 Time/h	不同方法测定 NO_3^- - ^{15}N 丰度 Determination of NO_3^- - ^{15}N abundance by different methods/atom%			
		25 °C/72 h	N_2 吹扫 N_2 purging	化学转化法 Chemical conversion method	反硝化细菌法 Denitrifier method
酸性土壤 Acidic soil	0.5	0.374 8±0.002 7a	0.373 5±0.001 2a	0.372 2±0.002 8a	0.374 3±0.004 8a
	24	0.386 1±0.002 6a	0.383 6±0.003 9a	0.384 2±0.001 2a	0.387 4±0.006 9a
中性土壤 Neutral soil	0.5	0.410 6±0.014 9a	0.410 5±0.007 4a	0.406 9±0.003 4a	0.409 2±0.033 2a
	24	2.542±0.024 2a	2.543±0.033 9a	2.544±0.014 2a	2.539±0.132 7a

注：图中同行相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。Note: In the figure, same lowercase letters denote no significant differences ($P>0.05$).

3 讨论

3.1 酸吸收剂种类、MgO 用量与戴氏合金用量的优化

悬挂扩散法基本步骤包括 NH_4^+ -N 扩散、残留 NH_4^+ -N 的去除和 NO_3^- -N 扩散^[13]，滤纸片上滴加的酸吸收剂可吸收这三个过程产生的 NH_3 。常用的酸吸收剂有硫酸 (H_2SO_4)、硫酸氢钾 (KHSO_4)、柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)、硼酸 (H_3BO_3) 和草酸 ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 等^[13]，其中 H_2SO_4 和 KHSO_4 具有一定的吸水性，在吸收 NH_3 的过程中会吸收一定的水分，当滤纸片上的水珠回滴时容易造成氮量的损失，且 H_2SO_4 具有较强的腐蚀性，滤纸片上过量的 H_2SO_4 会腐蚀锡杯和质谱仪的管路，对仪器造成一定的损害^[9, 13, 16]。因此，本研究比较了 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 、 H_3BO_3 和 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 这三种酸吸收 NH_3 的效果，结果发现， $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 吸收 NH_3 的效果最佳（图 1），这可能与 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 的 pK_a 值（1.3）较低，易于释放 H^+ 的特性有关^[14]。滤纸片上 20 μL 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 所收集的氮量足以满足 ^{15}N 同位素丰度准确测定的需求，40 μL 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 在一定条件下能够吸收残留的高丰度 NH_4^+ - ^{15}N ，同时在试验过程中观察发现，滴加 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 的滤纸片更容易干燥，因此， $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 可作为一种良好的酸吸收剂在扩散过程中使用。

扩散过程中需要加入 MgO、NaOH 和 Na_2CO_3 等碱性试剂调节样品溶液的 pH，促进 NH_3 的释放，其中，MgO 碱性温和，最为常用^[15]。在 MgO 用量的优化试验中，整个扩散过程至少进行了 96 h，因此，加入的 MgO 能否维持扩散过程中扩散体系的 pH 非常重要，特别是当样品溶液是具有较强 pH 缓冲能力的酸性土壤浸提液。同时，MgO 的量也不宜过多，pH 过高易导致溶液中 DON 和氨基酸等物质分解生成 NH_4^+ -N，影响样品 ^{15}N 丰度的测定结果^[20, 22-23]，此外，MgO 中的杂质氮也会影响扩散过程中 ^{15}N 丰度的测定，本研究在试验开始前先将所用的 MgO 在 450 °C 的高温下灼烧 6 h，尽可能去除了一部分的杂质氮^[13]。在以往的扩散试验中，MgO 的用量并未统一，通常添加的量为 0.2~0.4 g^[13, 24-25]。本研究中标记溶液、酸性土壤和中性土壤浸提液在进行扩散时，添加 0.1 g MgO 即可维持扩散过程的 pH 呈弱碱性 ($\text{pH}>8.70$)，并保证 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 中 ^{15}N 丰度测定的准确性（图 2）。

通常认为 NO_3^- -N 扩散的误差大于 NH_4^+ -N 扩散，原因之一可能是少量戴氏合金不能将 NO_3^- -N 完全还原为 NH_4^+ -N，而合金过量时除了本身含有的杂质外也会引起溶液中有有机物和其他含氧物质的还原性分解^[20]，从而增加杂质氮的含量，影响 ^{15}N 丰度的测定结果，此外，合金中的铝因其强还原性可与水反应生成 H_2 ，会阻碍 NH_3 的释放^[16]。Sigman 等^[15]建议高温灼烧戴氏合金以减少其中的杂质氮，但是与 MgO 不同，合金高温灼烧后会降低其对 NO_3^- -N 的还原能力，因此，探索合适的合金用量显然非常重要。以往戴氏合金的用量为 0.2~0.4 g^[13, 24-25]，本研究对于合金用量的研究发现，

随着 NO_3^- - ^{15}N 丰度的增加, 0.1 g 合金处理中高丰度 NO_3^- - ^{15}N (10.16 atom%) 的测定值误差增至 1.070 atom%, 且测定值的 sd 大于 0.3 g 和 0.6 g 合金处理 (图 3)。同时, 为避免合金过多而增加杂质氮, 本研究最终选择了 0.3 g 合金处理并制作标准曲线, 该曲线测定值和理论值具有非常好的线性关系 ($y = 1.078x - 0.0491$, $R^2 = 0.9998$), 通过 ^{15}N 理论值 = $a \times ^{15}\text{N}$ 测定值 + b 的直线方程, 将样品的测定值代入方程即可获得所测样品的校准值^[14]。三种合金处理中 NO_3^- -N 扩散的氮回收率均在 50%~70%, 并未达到 90% 以上 (回收率结果未显示), 但并不影响最终 NO_3^- -N 扩散的结果 (图 3)。在测定低氮浓度的样品, 特别是自然丰度样品时, 需要回收足够的氮量才能避免同位素分馏效应^[26], 在一定范围内, 氮的回收量与扩散时间呈正比, 延长扩散时间能有效提高氮的回收率^[17-19]。也有研究发现, 氮的回收率增加后, ^{15}N 丰度并无明显变化, 如 Stark 和 Hart^[19]证实, 扩散包法的氮回收率高于悬挂法扩散的氮回收率, 但是 ^{15}N 的丰度测定值在经过校正后并无明显的差异。

3.2 残留高丰度 NH_4^+ - ^{15}N 去除方法的优化

以往的研究发现, 同一扩散体系进行 NH_4^+ -N 扩散和 NO_3^- -N 扩散后, NO_3^- - ^{15}N 丰度有一定误差, 特别当 NH_4^+ - ^{15}N 丰度高于 NO_3^- - ^{15}N 时^[21]。酸吸收剂优化试验中, 丰度 10.32 atom% 的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.370 0 atom% 的 KNO_3 混合标记液 (氮浓度均为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行 NH_4^+ -N 扩散和 NO_3^- -N 扩散, NO_3^- - ^{15}N 丰度测定值为 0.453 3 atom%, 显然残留的高丰度 NH_4^+ -N 影响了 NO_3^- -N 扩散的结果 (图 1)。Jensen^[18]早在 1991 年就发现, 1.500 atom% 的 NH_4^+ - ^{15}N 即使仅有 0.2 μg 时, 也会对 50 μg 自然丰度 NO_3^- - ^{15}N 的分析造成 1% 的误差, 因此, 能否在 NO_3^- -N 扩散前去除残留的 NH_4^+ - ^{15}N , 特别是残留的高丰度 NH_4^+ - ^{15}N , 是提高 NO_3^- -N 扩散准确性的关键步骤。

研究表明, 在扩散过程中, 摇培较静置能更高效地加速 NH_3 挥发^[14, 27]。本研究调整了滤纸吸收残留 NH_4^+ -N 的摇培温度和时间。当 NH_4^+ - ^{15}N 丰度为 5.040 atom%, NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 浓度均为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡 72 h, 或者 NH_4^+ - ^{15}N 丰度为 10.32 atom%, NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 浓度分别为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡 72 h 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡 48 h 时, 残留高丰度 NH_4^+ -N 的去除效果最好, NO_3^- -N 扩散后的 ^{15}N 丰度测定值与理论值 0.370 0 atom% 相近 (图 4)。可见使用酸吸收剂吸收残留高丰度 NH_4^+ -N 的效果除了与摇培的温度和时间有关, 还与 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 的浓度紧密相关。适当升高温度和增加振荡时间, 可有效促进残留高丰度 NH_4^+ -N 的去除, 但随着温度 and 时间的不断增加, 对 NO_3^- -N 扩散的不利影响也在增加, 原因可能包含多方面, 比如, 高温会升高试剂瓶内的气压, 引起 NH_3 泄漏^[28], 当扩散温度超过 55 $^{\circ}\text{C}$, 瓶内产生的冷凝水也会吸收 NH_3 , 从而降低了酸吸收 NH_3 的能力^[29], 即降低了残留 NH_4^+ -N 的去除效果, 这与本研究中 60 $^{\circ}\text{C}$ 处理时, 随着时间的增加, NO_3^- -N 扩散后 ^{15}N 丰度明显高于其他温度处理的结果 (图 4) 相符。同时, 培养温度的增加促进了土壤浸提液中 DON 的分解^[15, 26, 28], 振荡时间的延长导致 DON 的分解总量增加, 增加的内源性杂质氮会影响 NO_3^- -N 扩散的结果, 因此, 应根据样品溶液的 ^{15}N 丰度和浓度等特点, 选择合适的去除残留 NH_4^+ -N 的振荡温度和时间。传统的摇培酸吸收法虽能有效去除残留 NH_4^+ - ^{15}N , 但所需时间较长, 为缩短去除时间, 本研究探索了超声波振荡、 N_2 吹扫两种快速去除残留高丰度 NH_4^+ - ^{15}N 的方法。超声波利用高频振动让液体产生空化气泡, 气泡爆破会产生强力微冲击, 促使残留 NH_4^+ - ^{15}N 在碱性环境中持续快速释放、逸散 NH_3 。 N_2 吹扫可将软管通入扩散样品溶液, 持续通入 N_2 以带走产生的 NH_3 。Stark 和 Hart^[19]曾建议敞口静置 5 d 以上以去除 NH_4^+ -N, 长时间敞口不但容易污染样品, 还降低了 NO_3^- -N 的回收率, 因此, 本研究的这两种敞口快速去除方法将处理时间控制在低于 6 h。

三种去除 NH_4^+ -N 的方法中, N_2 吹扫效果最佳, 在 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 浓度为 $2 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4^+ - ^{15}N 丰度为 5.040 atom% 和 10.32 atom% 时, N_2 吹扫 6 h 后, 残留高丰度 NH_4^+ -N 已全部去除, NO_3^- - ^{15}N 丰度均降至约 0.373 0 atom%, 与理论值一致 (图 6)。超声波在振荡 6 h 后可有效去除残留的 NH_4^+ -N (5.040 atom%) 对 NO_3^- -N (0.370 0 atom%) 扩散的影响 (图 5)。对比不同浓度 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 的扩散结果发现, 当 NH_4^+ -N 浓度低于 NO_3^- -N 的浓度时, 更利于残留 NH_4^+ -N 的去除, NO_3^- -N 扩散结果更准确 (图 4~图 6), 因此, 适当降低 NH_4^+ -N 的浓度, 或增加 NO_3^- -N 的浓度可提高 NO_3^- -N 扩散的准确性。综合考虑效率和可操作性, 对于去除高丰度 NH_4^+ - ^{15}N ($\geq 5.000 \text{ atom\%}$) 时, 更推荐

使用 N_2 吹扫方法, N_2 较易获得、价格低廉, 且不与样品溶液中的其他成分发生反应, 极大地缩短了该步骤所需的时间, NH_4^+-N 和 NO_3^--N 的扩散周期缩短至 54 h, 远低于传统方法 6 d 以上的周期。对于土壤溶液等复杂样品, 缩短扩散时间可有效避免时间过长导致的 DON 分解产生的杂质氮, 从而提高 $NO_3^--^{15}N$ 丰度测定的准确性。使用 N_2 吹扫时可依据样品数量、样品丰度、样品浓度等实际情况对装置进行调整, 如将三通接头换为五通接头, 能够一次性吹扫更多的样品, 也可根据瓶内的实际气泡大小来调整气流大小, 以达到最好的吹扫效果。

3.3 优化的悬挂扩散方法测定 $NO_3^--^{15}N$ 丰度准确性验证

pH 是控制土壤硝化的重要因素, pH 通过改变土壤基质可利用性和微生物活性影响自养硝化^[30], 且 pH 与自养硝化速率呈显著的正相关关系^[31], 因此, 酸性土壤的硝化速度普遍低于中性和碱性土壤。本研究选用了一种酸性土壤和一种中性土壤进行 ^{15}N 标记试验, 在土壤中加入高丰度($^{15}NH_4$)₂SO₄ (10.32 atom%) 标记液后, 随着硝化作用的发生, 部分 $NH_4^+-^{15}N$ 转化为 $NO_3^--^{15}N$, 土壤中 $NO_3^--^{15}N$ 丰度逐渐增加。因此, 选取 ^{15}N 标记试验开始后的 0.5 h 为取样时间, 此时土壤中 $NH_4^+-^{15}N$ 转化为 $NO_3^--^{15}N$ 的量最少, $NO_3^--^{15}N$ 丰度最低。使用优化后的 NO_3^--N 悬挂扩散法(包括 25 °C 振荡 72 h 及氮气吹扫 6 h 两种方法去除残留的高丰度 $NH_4^+-^{15}N$)对酸性土壤浸提液(培养 0.5 h)中 $NO_3^--^{15}N$ 进行扩散, ^{15}N 丰度分别为 0.374 8 atom% 和 0.373 5 atom%, 使用化学转化法和反硝化细菌法时 NO_3^--N 的丰度分别为 0.372 2 atom% 和 0.374 3 atom% (表 1), 表明优化后的 NO_3^--N 悬挂扩散法可应用于土壤高丰度 ^{15}N 标记实验, 能准确地测定 $NO_3^--^{15}N$ 丰度。相较于化学转化法和反硝化细菌法, 优化后的悬挂扩散法, 特别是使用 N_2 吹扫去除残留 NH_4^+-N 法操作步骤简单, 时间更短, 成本更低, 对环境友好, 并且实现了使用悬挂扩散法同时准确测定土壤溶液等复杂样品中 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 的 ^{15}N 丰度的目标, 为更深入研究土壤氮转化过程和地球氮循环提供重要的技术支持。

本方法适用于 ^{15}N 标记样品中浓度在 2~8 mg·L⁻¹ 的 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 的转化, 特别适用于高丰度 $NH_4^+-^{15}N$ (≥5.000 atom%) 的土壤标记样品。当 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 浓度过高时可将样品溶液稀释至适宜浓度范围, 当 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 浓度在 1~2 mg·L⁻¹ 时, 可增加扩散体积至 50 mL 完成转化^[28, 32]。低于 1 mg·L⁻¹ 的 NH_4^+-N 标记样品, 扩大样品体积可满足悬挂扩散法氮量的要求, 但测定值与理论值之间的误差会随样品丰度升高而明显增大^[33], 可采用扩散包法完成 NH_4^+-N 的扩散^[32], 低于 1 mg·L⁻¹ 的 NO_3^--N 标记样品则可选择化学转化法或反硝化细菌法完成转化。

4 结 论

本研究优化了悬挂扩散法所用的酸吸收剂种类、MgO 和戴氏合金的用量, 探讨了残留高丰度 $NH_4^+-^{15}N$ 的去除方法, 实现了在一份样品中同时准确完成 $NH_4^+-^{15}N$ 和 $NO_3^--^{15}N$ 的转化和测定。可根据样品的实际情况, 结合实验室条件选择合适的残留高丰度 $NH_4^+-^{15}N$ 的去除方法。推荐使用 N_2 吹扫方法, 不但能有效去除残留的高丰度 $NH_4^+-^{15}N$ (10.32 atom%), 同时, 极大地缩短整个扩散过程的时间(由大于等于 96 h 缩短至 54 h), 降低土壤溶液等复杂样品中各组分发生转化的风险, 优化的方法可为精准研究土壤氮转化过程提供重要的技术支撑。下一步尚需对高 DON 背景的土壤及野外复杂样品(如淋洗液、地下水)中 $NH_4^+-^{15}N$ 和 $NO_3^--^{15}N$ 的转化和测定进行进一步的探索研究。

参考文献 (References)

- [1] Zhang J B, Cai Z C, Meng L. Soil nitrogen transformation processes: New methods and insights[M]. Beijing: Science Press, 2025: 3. [张金波, 蔡祖聪, 孟磊. 土壤氮转化过程: 新方法与新认识[M]. 北京: 科学出版社, 2025: 3.]
- [2] Xie F P, Ren T, Cong R H, et al. Research on yield and environmentally friendly nitrogen fertilizer rate for winter oilseed rape[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025, 62(6): 1780-1791. [谢发萍, 任涛, 丛日环, 等. 基于冬油菜产量和环境友好的氮肥用量研究[J]. 土壤学报,

- [3] Xiao X, Wang L, Zhao L, et al. Spatiotemporal variations and driving factors of maize nitrogen fertilizer use efficiency in China over past 20 years[J]. *Soils*, 2026, 58(1): 49-57. [肖珣, 王璐, 赵琳, 等. 近 20 年中国玉米氮肥利用率的时空变化及驱动因素[J]. *土壤*, 2026, 58(1): 49-57.]
- [4] Qin J X, Wu M L, Wang X Y, et al. Effects of nitrogen fertilizer combined with cattle manure on soil aggregates and their microbial residue nitrogen in cotton field of arid area[J]. *Soils*, 2025, 57(5): 1034-1042. [秦金鑫, 吴茂林, 王昕悦, 等. 氮肥配施牛粪对干旱区棉田土壤团聚体及其微生物残体氮的影响[J]. *土壤*, 2025, 57(5): 1034-1042.]
- [5] Müller C, Rütting T, Kattge J, et al. Estimation of parameters in complex ^{15}N tracing models by Monte Carlo sampling[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(3): 715-726.
- [6] Zhu Q Y, Wang W J, Dai S Y, et al. Effects of the number of ^{15}N -injection needles on the estimation of gross N transformation rates using ^{15}N tracing tool including plant[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2024, 60(1): 47-51.
- [7] Dan X Q, He M Q, Wen Y H, et al. The size-variation of microplastics alters plant nitrogen uptake by regulating soil gross nitrogen transformation rates[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2025, 210: 109934.
- [8] Zhang J B, Wen T, Dai S Y, et al. Soil carbon and nitrogen stable isotope sample preparation techniques and mass spectrometry analysis[M]. Beijing: Science Press, 2022. [张金波, 温腾, 戴沈艳, 等. 土壤碳氮稳定同位素样品前处理技术与质谱分析[M]. 北京: 科学出版社, 2022.]
- [9] Brooks P D, Stark J M, McInteer B B, et al. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1989, 53(6): 1707-1711.
- [10] Mørkved P T, Dörsch P, Henriksen T M, et al. N_2O emissions and product ratios of nitrification and denitrification as affected by freezing and thawing[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(12): 3411-3420.
- [11] Conway E J, Cooke R. Ammonia formation in shed blood and a characteristic deaminase of the blood stream[J]. *Nature*, 1937, 139(3519): 627.
- [12] Conway E J. Micro-diffusion analysis and volumetric error[M]. 4th ed. London: Crosby Lockwood and Son, 1957.
- [13] Zhang P Y, Wen T, Zhang J B, et al. On improving the diffusion method for determination of $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ and $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ in soil extracts[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(4): 948-957. [张珮仪, 温腾, 张金波, 等. 扩散法测定土壤无机氮 ^{15}N 丰度方法优化研究[J]. *土壤学报*, 2017, 54(4): 948-957.]
- [14] Zhang P Y. Construction, perfection and application of isotope heterotopic method for tracing N_2O in soil[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2024. [张珮仪. 同位素异位法溯源土壤 N_2O 的方法构建、完善与应用[D]. 南京: 南京师范大学, 2024.]
- [15] Sigman D M, Altabet M A, Michener R, et al. Natural abundance-level measurement of the nitrogen isotopic composition of oceanic nitrate: An adaptation of the ammonia diffusion method[J]. *Marine Chemistry*, 1997, 57(3/4): 227-242.
- [16] Sun J F, Bai E, Dai W W, et al. Improvements of the diffusion method to measure inorganic nitrogen isotope of ^{15}N labeled soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(9): 2574-2580. [孙建飞, 白娥, 戴巍巍, 等. ^{15}N 标记土壤连续培养过程中扩散法测定无机氮同位素方法改进[J]. *生态学杂志*, 2014, 33(9): 2574-2580.]
- [17] Wen T, Cao Y C, Zhang P Y, et al. On progress in use of micro-diffusion method in $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ and $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ measurements[J]. *Soils*, 2016, 48(4): 634-640. [温腾, 曹亚澄, 张珮仪, 等. 微扩散法测定铵态氮、硝态氮的 ^{15}N 稳定同位素研究综述[J]. *土壤*, 2016, 48(4): 634-640.]
- [18] Jensen E S. Evaluation of automated analysis of ^{15}N and total N in plant material and soil[J]. *Plant and Soil*, 1991, 133(1): 83-92.
- [19] Stark J M, Hart S C. Diffusion technique for preparing salt solutions, Kjeldahl digests, and persulfate digests for nitrogen-15 analysis[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60(6): 1846-1855.
- [20] Biasi C, Jokinen S, Prommer J, et al. Challenges in measuring nitrogen isotope signatures in inorganic nitrogen forms: An interlaboratory comparison of three common measurement approaches[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2022, 36(22): e9370.
- [21] Saghir N S, Mungwari F P, Mulvaney R L, et al. Determination of nitrogen by microdiffusion in mason jars: II. Inorganic nitrogen-15 in soil extracts[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1993, 24(19/20): 2747-2763.

- [22] Matiatos I, Wassenaar L I, Monteiro L R, et al. Global patterns of nitrate isotope composition in rivers and adjacent aquifers reveal reactive nitrogen cascading[J]. *Communications Earth & Environment*, 2021, 2: 52.
- [23] Jäntti H, Leskinen E, Stange C F, et al. Measuring nitrification in sediments-comparison of two techniques and three $^{15}\text{NO}_3^-$ measurement methods[J]. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 2012, 48(2): 313-326.
- [24] Sebilio M, Mayer B, Grably M, et al. The use of the ‘ammonium diffusion’ method for $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ and $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ measurements: Comparison with other techniques[J]. *Environmental Chemistry*, 2004, 1(2): 99-103.
- [25] Mulvaney R L, Khan S A. Diffusion methods to determine different forms of nitrogen in soil hydrolysates[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2001, 65(4): 1284-1292.
- [26] Holmes R M, McClelland J W, Sigman D M, et al. Measuring $^{15}\text{N-NH}_4^+$ in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations[J]. *Marine Chemistry*, 1998, 60(3/4): 235-243.
- [27] Lachouani P, Frank A H, Wanek W. A suite of sensitive chemical methods to determine the $\delta^{15}\text{N}$ of ammonium, nitrate and total dissolved N in soil extracts[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, 24(24): 3615-3623.
- [28] Mulvaney R L, Khan S A, Stevens W B, et al. Improved diffusion methods for determination of inorganic nitrogen in soil extracts and water[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 24(4): 413-420.
- [29] Khan S A, Mulvaney R L, Mulvaney C S. Accelerated diffusion methods for inorganic-nitrogen analysis of soil extracts and water[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61(3): 936-942.
- [30] Zhao W, Zhang J B, Müller C, et al. Effects of pH and mineralisation on nitrification in a subtropical acid forest soil[J]. *Soil Research*, 2018, 56(3): 275-283.
- [31] Elrys A S, Wang J, Metwally M A S, et al. Global gross nitrification rates are dominantly driven by soil carbon-to-nitrogen stoichiometry and total nitrogen[J]. *Global Change Biology*, 2021, 27(24): 6512-6524.
- [32] You Z J, Ye P, Zhang S W, et al. Improved diffusion method for determination of natural abundance and low-concentration labeled $\text{NH}_4^+-^{15}\text{N}$ in soil extracts[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2026, 63(3): 905-916. [游志洁, 叶平, 张思苇, 等. 土壤浸提液中自然丰度和低浓度标记 $\text{NH}_4^+-^{15}\text{N}$ 测定方法优化[J]. *土壤学报*, 2026, 63(3): 905-916.]
- [33] Chen R R, Dittert K. Diffusion technique for ^{15}N and inorganic N analysis of low-N aqueous solutions and Kjeldahl digests[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(11): 1727-1734.

(责任编辑: 陈荣府)