

海北高寒草甸土壤微生物反硝化 气体损失的分析及应用*

I. 气相色谱法分析土壤反硝化产生的N₂O

刘晓达 杜伊光 师治贤

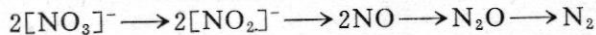
(中国科学院西北高原生物研究所)

摘 要

本文研究了用气相色谱法测定土壤微生物反硝化作用强度的方法。对同一土壤柱反硝化产生的N₂O的分析表明其变异系数小于17.8%。该方法操作简便,分离速度快,检测灵敏度高,进样量小,为研究反硝化作用提供了一可靠手段。

关键词: 气相色谱法; 反硝化; 氧化亚氮

反硝化是生态系统中氮素循环的一个重要组成部分。Berjernick 等 (1910)、Suzuki (1912) (转引自 Sahrawat 等, 1986) 早就报道了N₂O是在厌氧的培养物与土壤由细菌产生的一种气体成分。1954年 Wijler 等 (转引自 Sahrawat 等, 1986) 用N¹⁵-KNO₃ 标记法研究了土壤反硝化的气体产物, 证明反硝化过程中放出N₂O、N₂、NO。现在已经确信反硝化涉及几个酶反应与化学反应, 其转化顺序如下:



由于如下的原因, 这一过程显得具有重要的意义 (Averill 等, 1982; Sahrawat 等, 1986): ①这一过程造成植物生长的营养物的损失, 大约30%的肥料氮经由反硝化而损失。②反硝化作用的一种产物是N₂O。它随着人类活动的增加 (如肥料的施用等) 而增加, 导致臭氧层的破坏及大气温度上升, 给人类带来潜在的威胁。③反硝化过程用于工厂废水处理, 使氮的浓度在废水排放前降低。④反硝化过程的关键中间产物是亚硝酸根离子, 易于同仲胺反应生成致癌的亚硝胺。因此测定N₂O从土壤中的释放量, 不仅对研究海北定位站生态系统氮素循环和气体损失有重要意义, 而且对草场退化等都有重要的现实意义。

* 中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站基金资助项目。

本文1990年8月27日收到。

由于 Balderston 等 (1976) 发现乙炔可以阻断土壤微生物反硝化过程中 N_2O 到 N_2 的转化, 因此 N_2O 含量的测定被用作反硝化氮损失的直接量度。目前, 已有多种方法用于 N_2O 气体的分析, 如气相色谱法 (Kasper 等, 1980; Mosier 等, 1980; Parkin 等, 1984)、顶空气相色谱法 (Byrne 等, 1986)、以及质谱法测定 ^{15}N 标记的 N_2 、 N_2O (Mullaney 等, 1984) 等。色谱固定相主要采用 Chromsorb 及 Porapak 系列 (Thompson, 1977; Kasper 等, 1980; Mosier 等, 1980; Parkin 等, 1984; Byrne 等, 1986)。由于质谱法所需的仪器设备不易得, 而顶空法主要用于溶液中溶解的气体的分析, 与一般的气相色谱法相比需要顶空装置, 采用土柱气体循环既可使土壤结构保持不变, 又能对土壤微生物反硝化进行动态观测。用气相色谱法, 我们研究了反硝化作用产生的 N_2O 在国产固定相上的分离; 用电子捕获检测器, N_2O 的最小检测量为 $0.4\text{ppm}(W/W)$ 。采用建立的方法对海北高寒草甸生态系统不同土壤类型的反硝化作用进行了研究。

一、实验部分

(一) 仪器及分析条件

气相色谱仪: Pye 104 (英国, Pye-Unicam 公司)

色谱柱: 均为不锈钢柱, $2\text{米} \times 2\text{毫米}$ (GDX-102) $1.36\text{米} \times 2\text{毫米}$ (402担体),
 $1.5\text{米} \times 2\text{毫米}$ (TDX-01)

固定相: GDX-102、TDX-01, 60—80目 (天津试剂二厂)

载气: 高纯 N_2 ; 流速: 60毫升/分

气体定量管: 500微升

检测器: 电子捕获检测器 (ECD)

温度: 350°C

标准气体: N_2O 、99.5%; CO_2 、99.99% (北京分析仪器厂)

B-1 蠕动泵 (上海环球物化仪器厂)

(二) 土壤样品及处理方法

土壤样品采自中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站, 分为高山草甸土及高山灌丛草甸土两种类型。

用取土钻取在自然状态下的土壤柱于一塑料管中, 塑料管两端用橡皮塞堵上, 带回实验室后经乙炔阻断处理, 在 37°C 恒温培养 24 小时。分析时, 使其先与 B-1 蠕动泵、气体定量管连接成一密闭循环系统, 土柱气体循环后用气体定量管直接进样分析。

(三) 定性分析

采用标准样品对照保留时间定性和反硝化气体产物中加入 N_2O 、 C_2H_2 、 CO_2 气体及 H_2O 的方法定性, 其分离谱图见图 1A、B。

(四) 定量分析

采用外标法定量, 控制气体压力及注射一定量的标准气体 (Thompson, 1977), 配

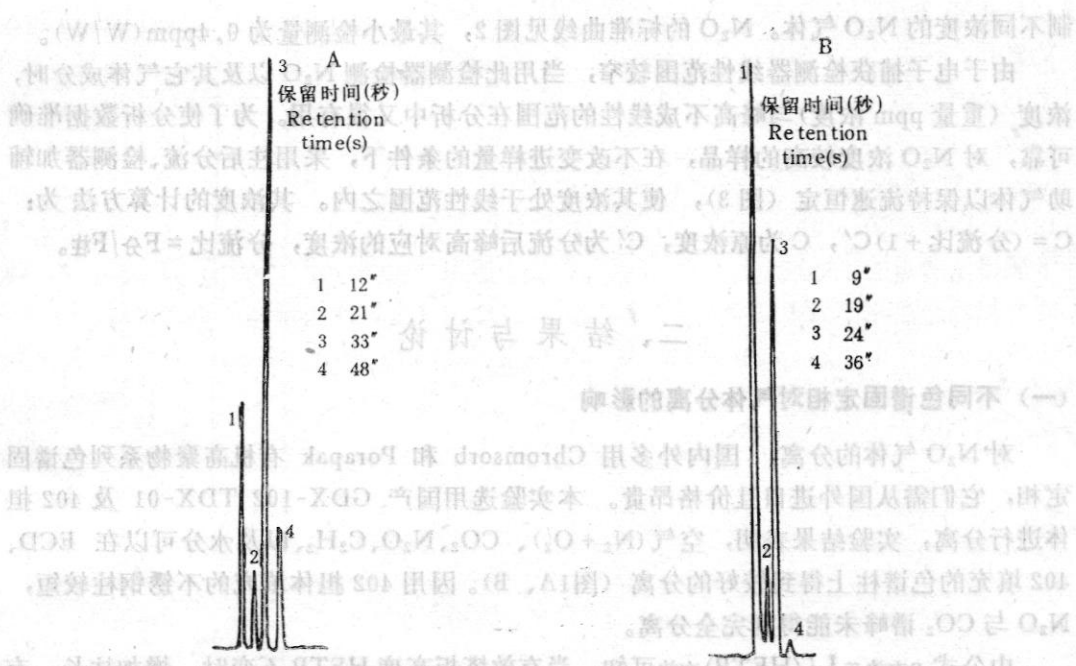


图1 标准气体混合物色谱图
Fig.1 Chromatogram of standard gas mixture

1. 空气(Air); 2. CO₂; 3. N₂O; 4. C₂H₂.
柱长(Column length): 2m×2mm(GDX-102)(A);
1.36m×2mm(402 carrier) (B)
柱温(Column temperature): 35°C (A), 30°C (B)
检测器(Detector): ECD, 150°C, 150 微秒(μs).

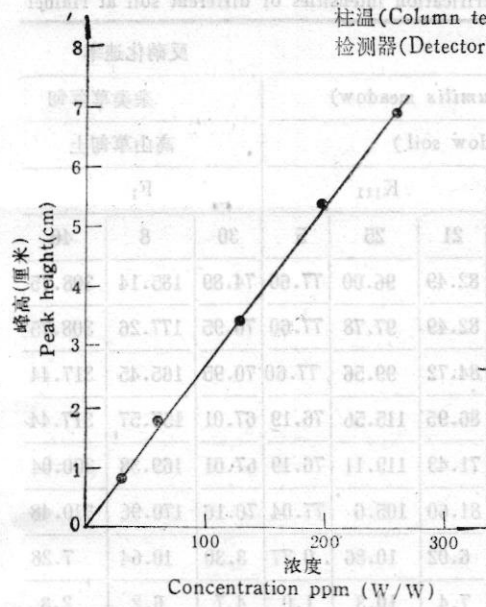


图2 N₂O 的标准曲线
Fig.2 The standard concentration curve of N₂O

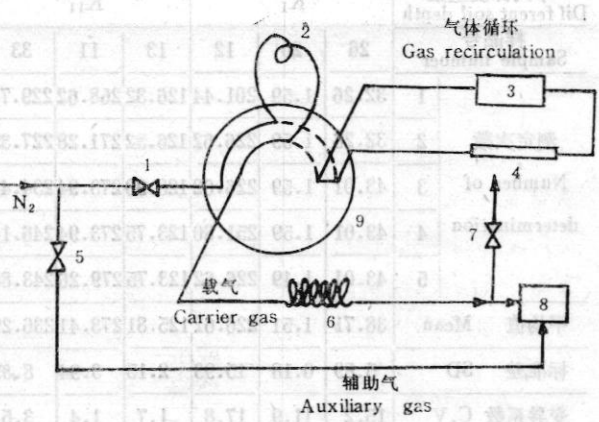


图3 气相色谱分离 N₂O 示意图
Fig.3 Illustrative diagram of N₂O separated by GC 1.5.
气体流量调节阀(Adjusted valve); 2. 气体定量管(Sampling loop); 3. 蠕动泵(Peristaltic pump); 4. 土壤柱(Soil core); 6. 气相色谱柱(GC column); 7. 分流阀(Splitting valve); 8. 检测器(Detector(ECD)); 9. 六通阀. 虚线为定量管内充样时的气体流路 (Six-Port valve, dotted line showed the gas flow circuit when sampling)

制不同浓度的 N₂O 气体。N₂O 的标准曲线见图 2，其最小检测量为 0.4ppm(W/W)。

由于电子捕获检测器线性范围较窄，当用此检测器检测 N₂O 以及其它气体成分时，浓度（重量 ppm 浓度）与峰高不成线性的范围在分析中又很有用。为了使分析数据准确可靠，对 N₂O 浓度较高的样品，在不改变进样量的条件下，采用柱后分流、检测器加辅助气体以保持流速恒定（图 3），使其浓度处于线性范围之内。其浓度的计算方法为： $C = (\text{分流比} + 1)C'$ ，C 为原浓度，C' 为分流后峰高对应的浓度，分流比 = F_分/F_柱。

二、结果与讨论

(一) 不同色谱固定相对气体分离的影响

对 N₂O 气体的分离，国内外多用 Chromsorb 和 Porapak 有机高聚物系列色谱固定相，它们需从国外进口且价格昂贵。本实验选用国产 GDX-102 TDX-01 及 402 担体进行分离，实验结果表明，空气(N₂ + O₂)、CO₂、N₂O、C₂H₂、以及水分可以在 ECD、402 填充的色谱柱上得到较好的分离（图1A、B）。因用 402 担体填充的不锈钢柱较短，N₂O 与 CO₂ 谱峰未能得到完全分离。

由公式 $n_{\text{有效}} = L / (\text{HETP})_{\text{有效}}$ 可知，当有效塔板高度 HETP 不变时，增加柱长，有效塔板数即柱效成正比例增加，当柱长为 2 米时，柱效提高 1.47 倍，完全能将 N₂O 与

表 1 8 月份海北高寒草甸不同土壤反硝

Table 1 Denitrification intensities of different soil at Haihei

植被类型 Vegetation type		矮蒿草草甸 (Kobresia humilis meadow)									反硝化速率 杂类草草甸		
土壤类型 Soil type		高山草甸土 (Alpine meadow soil)									高山草甸土		
不同深度土壤 Different soil depth		K _I			K _{II}			K _{III}			F _I		
样品号 Sample number		26	20	12	13	11	33	21	25	5	30	8	40
测定次数 Number of determination	1	32.26	1.59	201.44	126.32	268.62	229.74	82.49	96.00	77.60	74.89	185.14	308.75
	2	32.26	1.59	226.62	126.32	271.28	227.39	82.49	97.78	77.60	70.95	177.26	308.75
	3	43.01	1.59	226.62	128.90	273.94	234.42	84.72	99.56	77.60	70.95	165.45	317.44
	4	43.01	1.59	251.80	123.75	273.94	246.14	86.95	115.56	76.19	67.01	157.57	317.44
	5	43.01	1.19	226.62	123.75	279.26	243.80	71.43	119.11	76.19	67.01	169.38	300.04
平均值	Mean	38.71	1.51	226.62	125.81	273.41	236.29	81.60	105.6	77.04	70.16	170.96	310.48
标准差	SD	5.89	0.18	15.93	2.15	3.94	8.35	6.02	10.86	0.77	3.30	10.64	7.28
变异系数	C.V	15.2	11.9	17.8	1.7	1.4	3.5	7.4	10.3	1.0	4.7	6.2	2.3
空间变异性 Spatial Variability	平均值 Mean	88.94			211.84			88.08			183.87		
	标准差 SD	102.5			65.09			14.57			102.24		
	变异系数 C.V.	115.2			30.7			16.5			55.6		

注：土壤深度：表层 I，0—15 厘米，中层 II，15—30 厘米，下层 III，30—45 厘米

Note: Soil depth; top layer I. 0—15cm, middle layer II. 15—30cm, lower layer III. 30—45cm.

其它气体成分分离开来，而这也可以从 GDX-102 与 402 担体性质的一致得到确认（陈为通等，1980）。用 TDX-01 填充的色谱柱分离这几种气体组分时，因吸附较强，需要在较高温度下操作（200°C），同时各组分峰拖尾，不适用于此目的。与 TDX-01 相比，GDX-102、402 担体填充的色谱柱可以在接近室温的条件下（35°C、30°C）对各气体组分进行分离，我们选用 GDX-102 固定相作为色谱柱填料进行 N₂O 气体的定量分析。

(二) 检测条件的选择

电子捕获检测器的灵敏度与检测器温度有明显的依赖关系，已有数据表明（Wentworth 等，1973；Kasper 等，1980），ECD 在 400°C 时对 N₂O 的响应为 20°C 时的 1 000 倍，且检测器在高温下操作对检测器本身清洁也有好处。实验结果表明随检测器温度升高、检测器对 N₂O 的响应同时增大，因此检测器使用温度选择为 350°C。检测器的脉冲间隔对 N₂O 的灵敏度也有很大影响，实验结果表明 ECD 在 50 微秒下对 N₂O 的灵敏度比在 500 微秒下的灵敏度高约 1—2 个数量级，在 350°C、50 微秒的操作条件下 ECD 对 N₂O 有最高的灵敏度。

(三) 样品中高浓度 N₂O 含量的定量分析

ECD 线性范围较窄，有的样品气体中 N₂O 含量较高又处于非线性范围，为了能够

化作用的强弱 (N₂O 的测定, ppm)

alpine meadow in August (Determination of N₂O ppm)

(Denitrification rate) (ng N ₂ O-Ng ⁻¹ day ⁻¹)														
(Forbs meadow)						金露梅灌丛 (<i>Dasiphora fruticosa</i> bush)								
(Alpine meadow soil)						高山灌丛草甸土 (Alpine scrubby meadow soil)								
F _{II}			F _{III}			D _I			D _{II}			D _{III}		
31	37	45	17	35	32	24	2	10	1	29	49	53	27	59
512.95	79.19	262.95	19.74	19.38	7.77	2.24	17.20	5.25	17.80	47.02	45.27	2.96	16.46	15.14
505.82	81.17	256.38	19.74	19.38	7.77	2.24	15.29	4.5	17.80	49.71	45.27	4.15	15.09	13.77
509.39	86.16	245.42	19.74	19.38	7.77	1.49	15.29	6.0	16.31	48.36	41.49	2.96	15.09	15.14
512.95	81.17	254.19	19.74	19.38	7.77	2.24	15.29	5.25	16.31	53.73	40.24	3.53	13.72	16.52
505.82	81.17	258.57	21.25	21.32	9.32	2.24	13.38	6.0	14.83	45.67	40.24	2.96	15.09	16.52
509.39	81.17	255.50	20.04	19.77	8.08	2.09	15.29	5.4	16.61	48.90	42.50	3.32	15.09	15.42
3.57	2.60	6.50	0.68	0.87	0.69	0.34	1.35	0.63	1.24	3.09	2.58	0.53	0.97	1.15
0.7	3.2	2.5	3.4	4.3	8.6	16.1	8.8	11.6	7.5	6.3	6.1	16.1	6.4	7.5
282.22			15.96			7.59			36.00			11.27		
181.8			5.81			5.86			14.62			5.89		
64.4			36.4			77.2			40.6			52.2		

在线性范围内检测而无需取循环气体另行稀释,对柱前分流与柱后分流的效果进行了比较。柱前分流会引起色谱峰扩展,给峰法定量带来困难;因色谱柱气阻较大,为使载气流量保持在60毫升/分,则分流流量=60×分流比(毫升/分),气体用量非常大。柱后分流然后再给检测器加辅助气(N₂),使检测器出口气体流量保持恒定,则能大大减小谱峰扩展效应,同时气体用量小于60毫升/分,实验表明这一方法能较好地适应样品中N₂O浓度范围大这一要求,亦即在不改变分析条件的情况下扩大了检测器的线性范围。

(四) 分析方法的精密度的及在土壤微生物反硝化作用的研究中的应用

将土样经乙炔阻断培养24小时后,用气体定量管进样分析。由表1可见,单个土壤柱连续测定的变异系数范围为1.0—17.8%;但从同一个地点采得的3个土壤柱之间的变异性较大,变异系数范围为16.6—115.2%,其中K₁的变异系数最大。这一方法的精密密度与文献数据一致(Parkin,等1984),由于变异性高,因此在研究农田等的反硝化作用时需要分析较多的样品。由实验结果可知,不同植被类型土壤其反硝化速率各不相同,高山草甸土中微生物反硝化速率明显大于高山灌丛草甸土;在不同深度的土壤中反硝化作用也不相同,以中层最高,这与各层土壤中反硝化的底物浓度及厌氧环境都密切相关。

三、结 论

1. 本方法分析土壤微生物反硝化作用中产生的N₂O,操作简便、快速、重复性好,为研究反硝化作用机理提供了一种可靠测试手段。
2. 该法灵敏度高、取样量小,可多次进样而不影响样品组成。
3. 土壤的结构基本保持不变,所得结果能够比较真实地反映土壤自然状态下的反硝化作用强度。
4. 可以处理许多样品,研究农田等反硝化的空间与时间变异性。

参 考 文 献

- 陈为通、沙逸仙、常理文, 1980. 气相色谱手册, 科学出版社。
- Averill, B. A. and Tiedje, J. M., 1982, The Chemical Mechanism of Microbial Denitrification, *FEBS Letters*, 138(1): 8—12.
- Balderston, W. L., Sherr, B. and Payne, W. J., 1976: Blockage by Acetylene of Nitrous Oxide Reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:504—508.
- Byrne, M. D. and Nicholas, D. J. D., 1986, Multiple-Phase Equilibration Headspace Analysis for The Determination of NO and N During Bacterial Denitrification, *Anal. Biochem.*, 154: 470—475.
- Kasper, H. F. and Tiedje, J. M., 1980, Response of Electron Capture Detector to H₂, O₂, N₂, CO₂, NO, N₂O. *J. Chromatogr.* 193: 142—147.
- Mosier, A. R. and Mack, J., 1980, Gas Chromatographic System for Precise, Rapid Analysis of Nitrous Oxide, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 1121—1123.
- Mulvaney, R. L., 1984, Determination of ¹⁵N-labelled Nitrogen and Nitrous Oxide with Triple-collector Mass Spectrometers, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48: 690—692.
- Mulvaney, R. L. and Kurtz, L. T., 1984, Evolution of Dinitrogen and Nitrous Oxide From Nitrogen-15 Fertilized Soil Cores Subjected to Wetting and Drying Cycles, *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 48: 596—602.
- Parkin, T. B., Kasper, H. F., Sexstone, A. J. and Tiedje, J. M., 1984, A Gas-flow Soil Core Method to Measure Field Denitrification Rates *Soil Biol. Biochem.*, 16(4): 323—330.
- Parkin, T. B. and Tiedje, J. M., 1984, Application of a Soil Core Method to Investigate the Effect of Oxygen concentration on Denitrification, *Soil Biol. Biochem.*, 16(4): 331—334.

- Sahrawat, K. L. and Keeney, D. R., 1986, Nitrous Oxide Emission from Soils. in "Advances in Soil Science" (Stewart, B. A., ed.), Springer-Verlag New York Inc.
- Thompson, B., 1977, Fundamentals of Gas Analysis by Gas Chromatography. Varian Associates, Inc.
- Wentworth, W. E., and Freeman, R. R., 1973, Measurement of Atmospheric Nitrous Oxide Using an Electron Capture Detector in conjunction with Gas Chromatography, *J. Chromatogr.* 79:332—324.

ANALYSIS AND APPLICATION OF GAS LOSS DUE TO DENITRIFICATION IN SOIL AT HAIBEI ALPINE MEADOW

I. ANALYSIS OF N₂O IN SOIL DENITRIFICATION BY GAS CHROMATOGRAPHY

Liu Xiaoda, Du Yiguang and Shi Zhixian

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining)

A method was developed for the measurement of intensities of soil denitrification. Soil samples were got by a soil auger. A peristaltic pump, a soil core and a sample loop of gas chromatograph were linked together and gas was recirculated by the peristaltic pump. Acetylene was added for the measurement of denitrification in the soil core. N₂O and other components in the gas mixture can be separated on the GDX-102 column (2m × 2mm). Postcolumn splitting was adopted to extend the linear range of ECD and this also diluted the concentration of N₂O. Coefficients of variation for repeated measurements on the same soil core were usually less than 17.8%. This method is easy to operate and the rapidity of separation, high sensitivity and small sample introduction are also well suited the study of soil denitrification.

Key words: Gas Chromatography; Denitrification; Nitrous Oxide