

基于同位素特征的华北平原菜地 N₂O 排放 监测中取样时间的探讨

房福力, 李玉中*

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】为了长期监测土壤释放 N₂O 的通量和同位素变化规律,了解产生 N₂O 的微生物过程,提高对 N₂O 排放量和排放系数估计的准确性,需要对 N₂O 的日变化规律做深入研究,以便获得具有代表性的取样时间点及密闭时间。【方法】采用田间原位试验对华北平原的茼蒿菜地进行了 N₂O 排放监测,选取 N₂O 排放高峰期即施肥灌溉后 5~6 d 为监测时间段,采用静态气体箱收集土壤释放的 N₂O 气体,结合气相色谱和质谱技术测定 N₂O 的含量及其同位素值($\delta^{15}\text{N}-\text{N}_2\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}-\text{N}_2\text{O}$ 和 SP)。试验设 2 种取样间隔,即 2 h 和 10 min,分别对 N₂O 日变化规律和密闭时间进行研究。【结果】1) 在茼蒿菜地 N₂O 排放高峰期内, N₂O 通量日变化范围为 34.65~131.45 $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$,最大和最小的通量分别发生在 13:00 和次日 5:00, 9:00 的 N₂O 通量为 83.66 $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$,与日通量平均值 82.81 $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 相接近。N₂O 通量产生日变化的原因与土壤温度有关,相关分析表明, N₂O 通量与地下 5 cm 处土壤温度呈显著正相关($R^2=0.82$, $P<0.01$),而与土壤充水孔隙度(WFPS)无显著相关性。2) 24 h 内, $\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}}-\text{N}_2\text{O}$ 和 $\delta^{18}\text{O}-\text{N}_2\text{O}$ 随着时间呈现先降低后增加的变化趋势,变化范围分别为 -31.22‰~-11.09‰和 -7.45‰~-0.68‰; SP 值随时间呈现先增加后降低的变化趋势,变化范围为 16.13‰~26.41‰。N₂O 各个同位素值随时间的变化表明产生 N₂O 的微生物过程随之变化,但 SP 值在 9:00~17:00 较稳定,变化范围为 23.26‰~26.21‰,极显著高于其他时刻($P<0.01$),表明硝化作用在这一时间段内对 N₂O 的产生起主导作用。3) 扣箱 40 min 后, N₂O 含量、 $\delta^{15}\text{N}-\text{N}_2\text{O}$ 和 SP 值都达到稳定状态,因此选取 40 min 作为单次观测 N₂O 含量和同位素变化的密闭时间。4) 24 h 内 N₂O 通量加权 SP 值为 22.54‰。根据前人总结的规律,本研究中 N₂O 主要由细菌硝化作用产生,且估计 60.92% 的 N₂O 来自于细菌硝化作用, 39.08% 的 N₂O 来自于反硝化作用。【结论】华北平原茼蒿菜地的 N₂O 通量和同位素值具有较大的日变化,综合 N₂O 通量和同位素值,建议选取 9:00 作为观测茼蒿菜地 N₂O 排放通量和同位素特征值变化规律的时点,建议静态气体箱密闭时间为 40 min。

关键词: N₂O 通量; $\delta^{15}\text{N}-\text{N}_2\text{O}$; $\delta^{18}\text{O}-\text{N}_2\text{O}$; SP; 日变化

中图分类号: S153.6⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1008-505X(2016)04-0978-10

Preliminary research on N₂O sampling time based on isotopomer signature measurement of vegetable fields in the North China Plain

FANG Fu-li, LI Yu-zhong*

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Objectives】 Emissions of N₂O from vegetable soils are extremely variable in time and therefore there are considerable uncertainties in calculating emission of N₂O flux and emission coefficients. It is thus important to investigate the optional sampling time and characteristic of diurnal pattern for N₂O. More insights into N₂O diurnal variation would also be helpful for long term monitoring of N₂O release and for understanding the associated microbiological mechanisms. 【Methods】 Field experiment in situ was conducted to study N₂O emission after urine

收稿日期: 2015-03-16 接受日期: 2015-06-14 网络出版日期: 2015-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(41473004); 国家科技支撑计划项目(2011BAD32B03); 国家自然科学基金项目(41301553); 中央级公益性科研院所基本业务费项目(BSRF201304)资助。

作者简介: 房福力(1985—), 男, 山东青岛人, 博士, 主要从事植物营养与环境研究。E-mail: fulifangfu@163.com

* 通信作者 E-mail: liyuzhong@caas.cn

amendment and subsequent irrigation for a lettuce production system in North China Plain in 2012. During periods of high N₂O fluxes in 5–6 days, N₂O emission was collected manually by a closed static flux chamber at two intervals, two hours for diurnal variation and 10 minutes for appropriate enclosure period. N₂O concentrations were measured by a gas chromatograph equipped with an electron capture detector (GC – ECD), and isotopomers such as $\delta^{15}\text{N} - \text{N}_2\text{O}$, $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$ and site preference (SP) (difference between the center and the end N atom of the N₂O asymmetric molecule) were analyzed and obtained by an elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometer (EA – IRMS) system. **[Results]** 1) During the period of high N₂O emission, there was a strong diurnal variation in N₂O fluxes ranging from 20.41 to 130.45 $\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, with the maximum and minimum values being observed at 1 pm in Apr. 27th and 5 am in Apr. 28th, respectively. Flux measured at 9 am could be used to represent the daily average of the whole day. The fluxes of N₂O emitted from the soil were correlated significantly ($R^2 = 0.82$, $P < 0.01$) with the soil temperature at 5 cm, varied markedly across time, but insignificantly with water filled-pore space (WFPS). 2) Diurnally, the values of $\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}} - \text{N}_2\text{O}$ and $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$ decreased first and then increased gradually with time while the values of SP had an opposite trend, suggesting that production processes of N₂O were associated with different microbial pathways. Conversely, the stable values of SP of N₂O from 9 am through 5 pm indicated that nitrification was the dominant pathway for N₂O production. 3) In measuring N₂O emission, appropriate enclosure period in the static chamber should be 40 minutes, which was long enough to allow detection of N₂O concentration, $\delta^{15}\text{N} - \text{N}_2\text{O}$ and SP and also short enough to avoid feedback of N₂O concentration and microbial pathway change. 4) The calculated emission-weighted site preference was 22.54‰. The N₂O emission in this study was dominantly produced from nitrification, contributing 60.9% of the daily totals of N₂O emission. **[Conclusions]** There were large diurnal variations of N₂O concentration and isotopomers from lettuce production system in North China Plain. Considering both values of N₂O flux and isotopomers, it was suggested that 9 am was an appropriate time to measure the flux and isotopomer signature of N₂O and that enclosure period for one sample event should be 40 minutes.

Key words: N₂O flux; $\delta^{15}\text{N} - \text{N}_2\text{O}$; $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$; SP; diurnal variation

菜地 N₂O 排放具有时间变异性,对评价 N₂O 排放总量和排放系数具有重要影响。研究 N₂O 同位素和通量日变化对了解 N₂O 微生物产生过程及减排政策的提出具有指导意义。国内研究多关注 N₂O 通量日变化动态^[1-7],很少关注 N₂O 同位素日变化动态。采用同位素对 N₂O 日变化规律的研究也多集中在草地^[8],湿地^[9]和农田^[10],在菜地上的研究却鲜有报道。

目前研究 N₂O 通量日变化动态主要采用自动或半自动连续取样箱取样^[11-19],这种取样方式具有许多优点,但同时也具有取样量大,影响土壤理化性质及植物生长等缺点^[14, 20-21],而这些缺点在监测 N₂O 同位素变化并以此为基础分析 N₂O 微生物来源时则会放大^[22]。通过气相色谱—静态气体箱技术对草地^[8]和农田作物^[10]的监测发现取样时间与土壤类型、气候及天气条件等各种因素有关,因此取样时间的不同会对结果产生影响。了解 N₂O 通量及同位素日变化规律,对提高 N₂O 排放量和排放

系数估计的准确性,提出有效的减排措施具有重要意义。

通过测定土壤释放的 N₂O 的氮氧同位素 ($\delta^{15}\text{N} - \text{N}_2\text{O}$ 和 $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$),可以探究 N₂O 产生来源及转化过程^[23-24]。对土壤释放 N₂O 的自然丰度的稳定同位素同分异构体(位置嗜值, Site preference, SP)进行研究发现,SP 可以作为一种更加先进且独立于 $\delta^{15}\text{N} - \text{N}_2\text{O}$ 和 $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$ 的工具,且不随硝化反应和反硝化反应底物同位素值(即 $\delta^{15}\text{N} - \text{NO}_3^-$ 和 $\delta^{15}\text{N} - \text{NH}_4^+$)的变化而变化,为了解 N₂O 的产生和消耗过程提供新的解释途径^[25-28]。

本研究通过测定施加尿素处理后菜地土壤释放 N₂O 的通量及其氮氧同位素值的日变化动态,确定监测 N₂O 通量和同位素特征的合适时间,为长期监测 N₂O 通量及同位素变化规律提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验区概况

试验在中国农业科学院农业环境与可持续发展

研究所顺义实验基地(东经 40°5'2", 北纬 116°55'19")进行,该基地位于华北平原北端,属于潮白河冲积扇下段,气候为典型的暖温带半湿润大陆性季风气候。年平均日照时数 2684 h,年平均气温 12.5℃,年平均降水量 623.5 mm,无霜期 195 d。供试土壤为潮褐土,土壤有机质含量 15.48 g/kg、全氮 0.37 g/kg、全磷 0.61 g/kg、全钾 20.42 g/kg、有效磷 12.69 mg/kg、速效钾 98.10 mg/kg、pH 8.38。

1.2 试验设计

试验于 2012 年 4 月 27 日至 28 日进行,为莠苣种植且施肥后第 5 d 和第 6 d。选择此时间的原因是根据本课题之前的研究结果发现,在施肥和灌溉后 4 到 7 d, N₂O 排放量较高且比较平稳,不仅能够代表整个生长期 N₂O 通量的变化,而且这一时期土壤环境较为稳定,产生 N₂O 的微生物过程不易发生较大的转变。以采样时间为变量,设定两种时间间隔,分别为 2 h 和 10 min,测定土壤释放 N₂O 的含量及同位素值,并计算 N₂O 的通量和 SP(位置嗜值, Site preference),分析 N₂O 通量和同位素特征值($\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}} - \text{N}_2\text{O}$, $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$ 和 SP)在 24 h 内的时间动态变化规律(2 h)和 1 h 内随扣箱后密闭时间(10 min)的变化规律,以确定具有代表性的取样时刻和密闭时间。供试肥料为尿素,施用量为 300 kg/hm²,施肥方式为局部施肥,其他肥料用量和灌溉量按照农户推荐标准。

1.3 样品采集与分析

N₂O 气体采样采用静态气体箱。取样间隔为两种:1)每 2 h 取一次样,扣箱 1 h 后取样,1 h 后打开箱体,一天取样 12 次。2)确定具有代表性的取样时候后,对于一次取样,从开始扣箱的时刻计时,分别在 0、10、20、30、40、50、60 min 取样。两种时间间隔每次取三瓶样品作为重复,取样量分别为 20、120、120 mL,用注射器抽取箱内气体,注入相应体积的真空玻璃瓶中,分别测定 N₂O 含量和 $\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}} - \text{N}_2\text{O}$ 和 $\delta^{15}\text{N}^{\alpha} - \text{N}_2\text{O}$ 。每次开箱后左右晃动箱体以置换箱内气体,在取气之前都要用注射器连接静态气体箱后来回抽动注射器以混匀箱中气体。土壤温度、空气温度通过站内气象站测定,箱内温度采用温度计测定。

N₂O 通量的测定采用气相色谱 GC system (Agilent7890A, Agilent, USA)测定,检测温度为 300℃,分离柱温度为 60℃,使用 Porapak 为填充物的分离柱分离和反吹 N₂O,反吹气流速为 25 mL/min。标准气体(N₂O, 367 nL/L)由国家标准物

质研究中心提供,载气为高纯 N₂(大于 99.99%), N₂O 进样量为 5~10 mL。

N₂O 通量计算公式为:

$$F = \frac{\Delta m}{A \times \Delta t} = \frac{m_2 - m_1}{A \times \Delta t} = \frac{c_2 \times V \times M_0 \times \frac{273}{273 + T_2} - c_1 \times V \times M_0 \times \frac{273}{273 + T_1}}{A \times 22.4 \times (t_2 - t_1)} \quad (1)$$

式中, F—气体排放通量,为单位时间单位面积土壤表面释放的 N₂O [$\mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$]; A—取样箱的底面积(m^2); V—取样箱的体积(m^3); T₁、T₂—分别为扣箱前和扣箱后箱体温度(℃); t₁、t₂—分别为扣箱和开箱时间(h); M₀—气体的摩尔质量(g/mol); m₁、m₂—分别为扣箱前和扣箱后箱内气体的质量(μg); c₁、c₂—分别为扣箱前和扣箱后箱内气体的体积浓度($\mu\text{L}/\text{L}$)。

N₂O 同位素比率采用痕量气体(Isotope Trace Gas, UK),用稳定同位素仪(Isoprime 100, UK)测定,具体方法参照^[25]。N₂O 同位素组成的 δ 表示方法为:

$$\delta^{15}\text{N} \text{ and } \delta^{18}\text{O}(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2)$$

式中, R = ¹⁵N/¹⁴N 和 ¹⁸O/¹⁶O,下标 sample 和 standard 分别表示样品和标准物。其中氮和氧的标准物分别为标准大气中的氮气(N₂-atm)和位于维也纳(Vienna)国际原子能组织同位素实验室配制的平均海洋水(standard mean ocean water, SMOW),即 V-SMOW。

除此之外,SP 和 $\delta^{15}\text{N}^{\beta}$ 来源于以下公式:

$$\text{SP} = \delta^{15}\text{N}^{\alpha} - \delta^{15}\text{N}^{\beta} \quad (3)$$

$$\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}} - \text{N}_2\text{O} = \frac{(\delta^{15}\text{N}^{\alpha} + \delta^{15}\text{N}^{\beta})}{2} \quad (4)$$

$\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}} - \text{N}_2\text{O}$ 、 $\delta^{15}\text{N}^{\alpha} - \text{N}_2\text{O}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 和 SP 的精度分别为 0.2‰、1‰、0.5‰ 和 1.3‰。

静态气体箱中的气体是空气和土壤释放出来的气体的混合物^[10],且服从公式

$$\delta_{\text{meas}} = \frac{(\delta_{\text{atm}}C_{\text{atm}} + \delta_{\text{SD}}C_{\text{SD}})}{C_{\text{meas}}} \quad (5)$$

式中, $\delta_{\text{meas}}C_{\text{meas}}$ 、 $\delta_{\text{atm}}C_{\text{atm}}$ 和 $\delta_{\text{SD}}C_{\text{SD}}$ 分别表示来自于测定的(measure),空气的(atmosphere)和土壤驱动排放(Soil-Derived)的 N₂O 的同位素特征值和含量。空气中 N₂O 含量, $\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}^{\alpha}$ 、 $\delta^{15}\text{N}^{\beta}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 和 SP 分别为 324 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、7.0‰、16.9‰、-1.8‰、

43.7‰和 18.7‰^[27]。C_{SD} 为静态气体箱中测定 N₂O 的含量(C_{meas})和空气中 N₂O(C_{atm})的差值。根据方程(5),当 C_{SD}/C_{atm} < 0.3 时误差增大,计算得来的同位素比率不适合使用^[29]。由于土壤释放的 N₂O 具有显著的时空变异性,为了表示土壤释放 N₂O 的同位素特征,本研究用通量加权平均值来表示整个生长季 N₂O 特征,公式为

$$\delta_{cw} = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i \times \delta_i)}{\sum_{i=1}^n c_i} \quad (6)$$

式中, c_i 和 δ_i 分别表示在 i 时刻测定的含量和同位素值; δ_{cw} 是某一天土壤释放 N₂O 的通量加权值,此时 $n=3$,即为重复数。

1.4 数据处理

试验数据用 Microsoft Excel 2010 软件进行处理;应用 SAS8.1 软件进行统计分析,采用相关分析法分析土壤水分、土壤温度、土壤 N₂O 通量、 $\delta^{15}\text{N}^{\text{bulk}} - \text{N}_2\text{O}$ 、 $\delta^{18}\text{O} - \text{N}_2\text{O}$ 和 SP 之间的相关性;LSD 法进行多重比较和显著性显验($P < 0.05$)。

2 结果与分析

地下 5 cm 处土壤温度和土壤充水孔隙度 (Water filled-pore space, WFPS) 日变化动态如图 1 所示。从图 1 可以看出,静态气体箱覆盖下 5 cm 深度土壤温度在 24 h 内的变化范围为 14.22 ~ 20.11℃,且随时间呈现单峰曲线变化,最高温度出现在 4 月 27 日 13:00 (20.11℃),最低温度出现在次日 5:00 (14.22℃),24 h 内平均温度为 16.97℃,日间温度较高,夜间温度较低。WFPS 变化范围为 49.45% ~ 53.45%,24 h 内随时间呈双峰曲线变化,分别在 4 月 27 日 13:00 和次日 3:00 达到峰值,峰值大小分别为 53.45% 和 53.05%,4 月 27 日 17:00 WFPS 最低(49.5%),然后随时间逐渐增大,直至次日 3:00 后又开始下降。

2.1 静态气体箱中 N₂O 含量和通量日变化动态

图 2 显示,扣箱 1 h 内, N₂O 含量随时间逐渐增加。24 h 之内,土壤排放 N₂O 通量变化范围在 34.65 ~ 131.45 μg/(m²·h) 之间,日变化呈单峰型,于 4 月 27 日 13:00 ~ 17:00 出现峰值,峰值均高于 120 μg/(m²·h),在 7:00 ~ 13:00 迅速增加,19:00 到次日 4:00 逐渐减小,形成这种日变化的原因有可能是 7:00 ~ 13:00 土壤升温较快,微生物活性随着土壤温度升高而增加,中午温度稳定

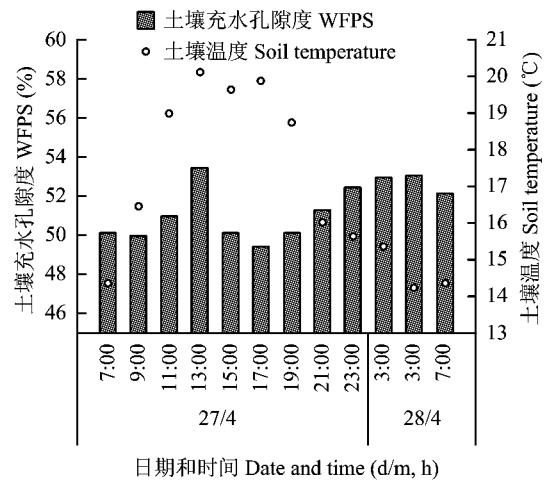


图 1 静态气体箱覆盖下土壤温度及土壤充水孔隙度日变化动态

Fig. 1 Diurnal temperature and water filled-pore space of soil under stable flux chamber

后微生物活性变化不大,夜间温度较低影响微生物的活性,产生 N₂O 的速率和总量降低。

N₂O 通量变化趋势与温度变化趋势相符合,都呈现先增加后降低的趋势(图 1)。相关分析显示,土壤 5 cm 深度温度与 N₂O 通量呈显著正相关($R^2 = 0.82, P < 0.01$),而 WFPS 与 N₂O 通量无显著相关性。结果表明,在 4 月 27 日 11:00 ~ 17:00, N₂O 含量和通量较高且变化稳定,显著高于其他时刻($P < 0.05$),这与 Skiba 等^[30]的研究结果相一致。但是也有其他结果显示, N₂O 的最高通量出现在晚间^[31-32],原因有可能是 N₂O 受到日温度波动^[33]和

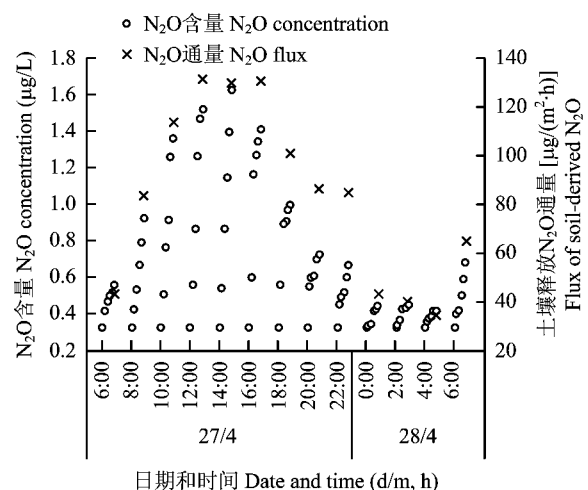


图 2 静态气体箱中土壤释放 N₂O 含量及相应通量随时间变化

Fig. 2 Change of N₂O concentrations and soil-derived flux of N₂O within the chamber headspace with time

N_2O 溶于水的溶解度变化的影响^[34]。

2.2 N_2O 含量和同位素特征值日变化动态

从表 1 可以看出, $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 和 $\delta^{18}O - N_2O$ 均随时间呈先降低后增加的趋势, 极值分别为 -31.22% 和 -7.45% , 并且分别出现在 4 月 27 日的 15:00 和 13:00, 且这两个时刻的 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 和 $\delta^{18}O - N_2O$ 均低于其他时刻 ($P < 0.05$)。 N_2O 在 11:00 ~ 17:00 之间具有较高通量, 与 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 和 $\delta^{18}O - N_2O$ 极值出现在同一时间区域内, 而且 N_2O 通量与 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 和 $\delta^{18}O - N_2O$ 呈极显著负相关 ($R^2 = -0.92$ 和 -0.89 , $P < 0.01$)。 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 的变化范围为 $-31.22\% \sim -11.09\%$, 通量加权平均值为 -23.61% , $\delta^{18}O - N_2O$ 的变化范

围为 $-7.45\% \sim -0.68\%$, 通量加权平均值为 -3.94% , 与文献中空气 N_2O 同位素范围不完全一致 ($\delta^{15}N^{bulk} - N_2O_{air}$ 为 $-20\% \sim 0\%$, $\delta^{18}O - N_2O_{air}$ 为 $30\% \sim 50\%$ ^[26, 40])。造成这种现象的原因有可能是施加尿素后给土壤提供了充足的氮 ($\delta^{15}N$ 为 $-10\% \sim 0\%$), 且施肥后灌溉提供了充足的氧 ($\delta^{18}O - H_2O = -0.5\%$, 2012 年 4 月 22 日取样), 为微生物提供了充足的原材料, 微生物在吸收利用氮和氧的时候发生同位素分馏或者发生氧交换, 优先利用较轻的同位素, 使产物 (N_2O) 富轻同位素而使底物富重同位素, 因此认为本试验条件下产生的 N_2O 主要受施肥和灌溉的影响。

表 1 华北平原菜地土壤 N_2O 通量及同位素日变化

Table 1 Temporal variation of flux and isotopomer ratios of N_2O in vegetable field in the North China Plain

时间 Time(d/m, h)	N_2O 通量 [$\mu g/(m^2 \cdot h)$]	$\delta^{15}N - N_2O$ (‰)	$\delta^{18}O - N_2O$ (‰)	SP (‰)
27/4, 7:00	43.15 ± 5.21 c	-15.32 ± 2.39 a	-0.68 ± 0.09 a	16.35 ± 1.35 b
27/4, 9:00	83.44 ± 10.72 b	-18.52 ± 1.44 ab	-1.79 ± 0.59 a	23.26 ± 3.22 a
27/4, 11:00	113.44 ± 7.91 a	-28.98 ± 3.72 b	-5.45 ± 1.45 bc	25.45 ± 2.29 a
27/4, 13:00	131.45 ± 13.63 a	-30.15 ± 4.62 c	-7.45 ± 2.51 c	26.41 ± 3.53 a
27/4, 15:00	129.64 ± 13.92 a	-31.22 ± 2.56 c	-6.34 ± 2.38 c	25.45 ± 3.49 a
27/4, 17:00	130.45 ± 9.91 a	-26.87 ± 5.41 b	-5.12 ± 2.15 bc	26.21 ± 2.28 a
27/4, 19:00	100.64 ± 10.18 ab	-25.41 ± 2.95 b	-3.24 ± 0.35 b	20.26 ± 2.31 b
27/4, 21:00	86.45 ± 6.03 b	-20.11 ± 3.76 ab	-1.45 ± 1.56 a	19.45 ± 1.77 b
27/4, 23:00	84.45 ± 7.19 b	-13.54 ± 2.78 a	-1.33 ± 0.38 a	17.64 ± 1.69 b
28/4, 1:00	43.12 ± 11.35 c	-11.24 ± 2.89 a	-0.98 ± 0.25 a	16.54 ± 2.54 b
28/4, 3:00	39.45 ± 6.42 c	-11.09 ± 3.01 a	-0.87 ± 0.62 a	15.64 ± 1.51 b
28/4, 5:00	34.64 ± 5.49 c	-12.97 ± 2.29 a	-0.77 ± 0.32 a	16.13 ± 1.39 b
28/4, 7:00	65.12 ± 3.16 c	-14.66 ± 2.24 a	-0.77 ± 0.46 a	16.31 ± 1.68 b
通量加权平均值 Mean value of fluxes-weighted	82.82	-23.61	-3.94	22.54

注(Note): 同列数据后不同字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant among treatments at the 5% level.

土壤释放出的 N_2O 其 $\delta^{18}O - N_2O$ 与 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 在 7:00 ~ 13:00 随时间呈下降趋势, 在 15:00 到次日 5:00 随时间逐渐增加。造成 7:00 ~ 13:00 $\delta^{18}O - N_2O$ 与 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 下降的原因有可能是温度与土壤水分的变化导致尿素水解速率发生变化, 进而影响硝化与反硝化细菌的活动。Kool 等^[41] 研究发现, 大约 85% 的 $\delta^{18}O - N_2O$ 来自于硝化和反硝化过程中与 H_2O 发生的氧交换, 而不是 NO_3^- 。尿素在水解后通过硝化作用产生 N_2O , 且在水解过程

中与水发生氧交换反应, 导致 $\delta^{18}O - N_2O$ 和 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 降低。如果 N_2O 完全来自微生物的硝化过程, 由尿素驱动产生的 $\delta^{18}O - N_2O$ 不会随着时间而改变, 因为尿素中的氧没有形成 N_2O 而以 CO_2 形式释放, $\delta^{18}O - N_2O$ 则不会出现较大的变化。而本研究中 $\delta^{18}O - N_2O$ 随着 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 的变化有相同的变化趋势且呈显著的正相关性 ($R^2 = 0.94$, $P < 0.01$), 说明还有其他过程影响着 N_2O 的排放。在湿地^[32] 和山地^[36] 等地方也发现 $\delta^{18}O - N_2O$ 与 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 呈显著的正相关性。

$N^{bulk} - N_2O$ 随着时间而逐渐增加,引起这种现象的原因有可能是发生了微生物的转化过程,例如硝化作用转化为反硝化作用,或者发生了 N_2O 还原过程。反硝化作用能够导致底物硝酸盐中富集重氧同位素,使得 N_2O 分子中 $\delta^{18}O/\delta^{15}N$ 恒定且为 0.5^[37]。在 15:00 到次日 5:00 $\delta^{18}O - N_2O$ 和 $\delta^{15}N^{bulk} - N_2O$ 随时间逐渐增加,说明有可能发生了反硝化作用或 N_2O 的还原过程,但是否发生后还需要结合 SP 进行分析。

2.3 扣箱后 1 h 内 N_2O 含量和同位素特征值变化动态

图 3 显示了从 4 月 27 日 9:00 开始扣箱一小时内 N_2O 含量及其同位素特征值随时间的变化动态。

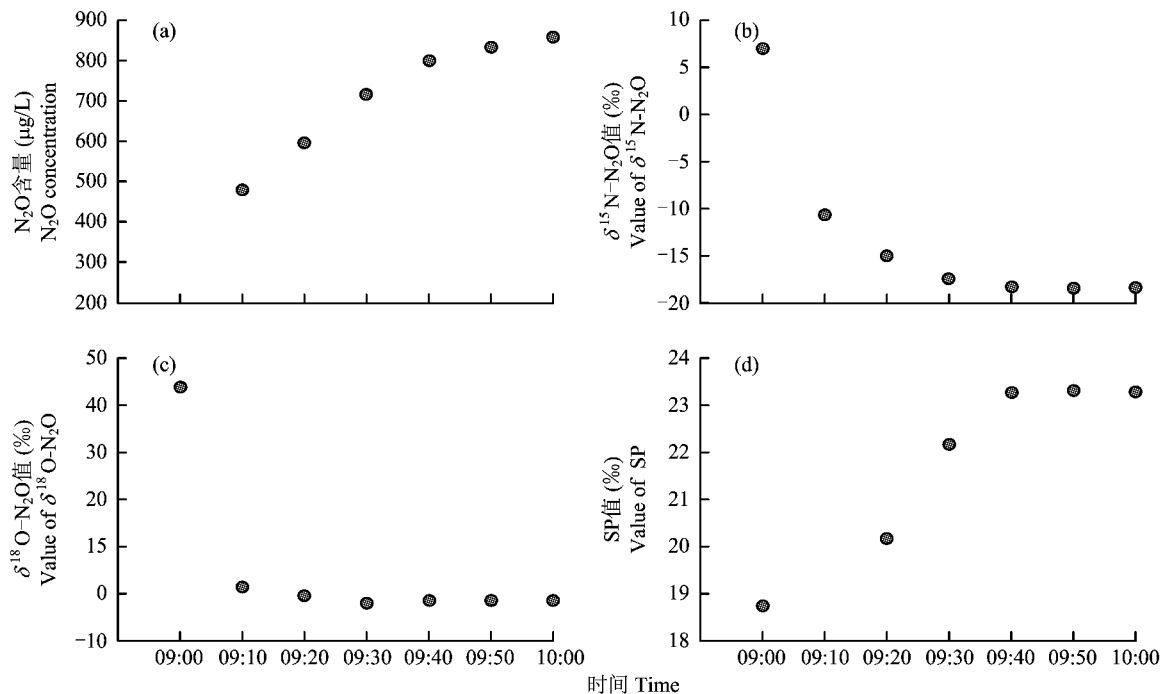


图 3 N_2O 含量、 $\delta^{15}N - N_2O$ 、 $\delta^{18}O - N_2O$ 和 SP 在扣箱 1 h 内的变化趋势

Fig.3 Changes in the concentration of N_2O , $\delta^{15}N - N_2O$, $\delta^{18}O - N_2O$ and SP within the headspace of flux chamber during 1h chamber closing

[注 (Note): 9:00 为扣箱 0 时,取空气值为样品,其含量为 $324 \mu\text{g/L}$ ^[39], $\delta^{15}N - N_2O$ 为 7‰ , $\delta^{18}O - N_2O$ 为 43.7‰ , SP 为 18.7‰ ^[26] Solid circles at time 9 am indicate previously reported values for the concentrations of N_2O ^[39], $\delta^{15}N - N_2O$, $\delta^{18}O - N_2O$ and SP of N_2O in the atmosphere were $324 \mu\text{g/L}$, 7‰ , 43.7‰ and 18.7‰ ^[26], respectively.]

3 讨论

3.1 根据通量和同位素变化选取监测时刻

由于 N_2O 通量日变化较大,为了方便进行长期观测,目前大部分研究都以某一时间段的通量代表全天的通量,并以此计算累计 N_2O 排放量和排放系

N_2O 含量随着扣箱时间的增加而逐渐增加(图 3a), $\delta^{15}N - N_2O$ 随时间逐渐下降(图 3b),两者都在扣箱后 40 min 时达到相对稳定的状态。 $\delta^{18}O - N_2O$ 在扣箱后 10 min 之内由 43.7‰ (空气值)迅速降低至 0.98‰ ,之后在 $-2.41\text{‰} \sim 0.98\text{‰}$ 范围内波动(图 3c)。SP 在扣箱后 20 ~ 40 min 内从 20.13‰ 迅速增加至 23.26‰ ,40 min 后也达到稳定(图 3d)。由于 0 ~ 10min 内由土壤释放的 N_2O 的含量低于空气 N_2O 含量的 30%, $\delta^{15}N^a - N_2O$ 测定误差很大,导致计算 SP 时误差也很大,根据 Ostrom 等^[29] 提出的观点,由此计算出的 SP 值不适合使用,因此图 3d 中 9:10 的 SP 值缺失。

数^[1,3,6-7]。本研究结果表明(表 1),在 11:00 至 17:00, N_2O 通量较高且基本保持稳定,但是采用此时间段任意一个值表示全天平均通量都会使对 N_2O 估计排放量偏高,如果用 9:00 的 N_2O 的通量 $83.66 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 表示全天通量平均值 $82.82 \mu\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ (表 1),则误差较小。但是问题在于不

同土壤环境条件和取样时间, N_2O 通量受各种因素影响, 如温度、土壤含水量及微生物过程, 而这些参数在一天之内也会随时间的变化而改变, 因此 N_2O 通量也会随之变化, 对于某一特定土壤和环境, 哪个时刻能够代表 N_2O 全天通量平均值也会不一样。

对于其他土壤和环境, 除非检测所有生长期的 N_2O 变化, 如果不对 N_2O 通量日变化动态做相应的研究就取某一时间的通量作为代表, N_2O 排放总量和排放系数就会出现误差。Velthof 等^[35]对施肥草原的研究表明, N_2O 日均变化的校正系数为 0.68 ~ 1.65 之间, 取决于开始测量的时间。同时还需要注意的是, 如果采用全天候连续测定 N_2O 的通量, 不按时揭开扣着的箱体有可能会改变箱体覆盖下土壤的理化性质进而影响硝化或反硝化过程, 或者影响箱体中的植物的生长。因此, 针对本试验地点和试验条件, 采用手动控制静态气体箱采样, 并用 9:00 测定的 N_2O 通量代表全天 N_2O 通量的平均值。

如果需要观测整个生长期内 N_2O 的同位素特征, 不可能观测全天 24 h 的变化动态, 主要有 3 个方面的原因: 一方面是当土壤释放出 N_2O 的含量与空气中 N_2O 的含量 ($324.5 \mu\text{g/L}$) 的比值低于 30% 时, 根据方程(5), 计算出 N_2O 气体的同位素特征值误差较大, 因此一天中土壤释放的 N_2O 含量低于空气 30% 时的值不能使用。另一方面, 根据 SP 判定的 N_2O 来源后发现, 一天中产生 N_2O 的微生物过程会发生转变, 当使用 N_2O 同位素特征值 ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{15}\text{N}$ 或 SP) 判别 N_2O 产生来源时就会面对取样时间选择的问题。第三是 N_2O 的同位素测定会耗用大量的成本。针对以上 3 个问题, 可以选择某一时刻观测的 N_2O 同位素特征值代表全天特征值作为解决方法, 这样既能减少误差, 又使样品具有代表性, 同时减少工作量和降低成本, 而选取哪个时刻观测的同位素特征值就显得尤为重要。就本试验来讲, 选取 9:00 ~ 17:00 之间任意时刻观测 N_2O 同位素特征值的变化规律都可以, 因为这一时间区域内 SP 较稳定, 说明产生 N_2O 的微生物过程较稳定, 且产生 N_2O 的含量较高, 计算土壤释放 N_2O 同位素特征值时不会出现误差。

结合通量和同位素值发现, 9:00 的 N_2O 通量可以代表全天通量的平均值, 而 9:00 ~ 17:00 的 N_2O 的 SP 较稳定, 可以作为观测 N_2O 同位素特征值的观测时间。综合考虑, 可以选用 9:00 作为观测 N_2O 日通量和同位素特征值变化的时刻。

3.2 单次取样密闭时间的选取

在选取 9:00 作为一天之内检测 N_2O 的时刻之后, 对 9:00 ~ 10:00 单次取样扣箱持续时间的测定发现(图 3), 在扣箱 1 h 之内, N_2O 含量, $\delta^{15}\text{N} - N_2O$ 和 SP 值在 40 min 内达到稳定, $\delta^{18}\text{O} - N_2O$ 在 1 h 内变化不大。根据同位素达到稳定的时间及其对取样量的需求, 推荐 40 min 作为扣箱持续时间以观测 N_2O 同位素特征的变化。扣箱后 N_2O 同位素的变化幅度与 N_2O 排放量的大小, 扣箱持续时间, 空气中 N_2O 同位素值与土壤释放 N_2O 同位素值的差异大小有关^[8]。本试验选取 40 min 作为扣箱持续时间仅仅作为一个案例进行研究, 并不能应用在所有土壤类型、施肥种类、环境条件下。但是对监测华北平原露天菜地施加尿素后 N_2O 同位素特征变化时具有指导意义。而且本次取样是在本课题之前研究的基础上, 结合他人的研究结果^[3, 39-42], 在 N_2O 排放高峰期内取样, 这样在相同肥料种类和气候环境条件下, N_2O 同位素特征值主要受 N_2O 排放量大小的影响。在之后观测 N_2O 同位素生长周期变化动态时, 不会出现因为 N_2O 排放量过大而导致 N_2O 又返回到土壤中, 导致反硝化作用利用 N_2O 而改变其同位素特征的现象。因此在本试验条件下选取扣箱后 40 min 作为观测 N_2O 同位素变化的时间是合理且有意义的。

3.3 采用 SP 区别 N_2O 来源

N_2O 通量变化趋势与温度变化趋势相符合(图 1)。相关分析显示, 土壤表层 5 cm 深度温度与 N_2O 通量呈显著正相关 ($R^2 = 0.82, P < 0.01$), 类似的结果在相关研究中也有报道^[9-10, 22, 33]。温度升高后导致土壤呼吸作用消耗的 O_2 增加, 创造厌氧环境, 导致反硝化作用的产生^[33]。根据这种解释, 产生 N_2O 的主要过程为反硝化作用。但是对硝态氮的监测表明(本文中未列出相关数据), 从 9:00 ~ 17:00 NO_3^- 呈增加趋势, 说明硝化作用也同时发生。而且此时土壤 WFPS 介于 35% ~ 60% 之间, 更适合硝化作用的进行^[43], 因此根据传统方法不能够确定哪一过程对 N_2O 的过程产生主导作用, 需要采用其他途径进行解释。

N_2O 分子是直线型结构 ($\text{N}^\beta - \text{N}^\alpha - \text{O}$), 其中一个氮原子与另一个氮原子相连, 而第二个氮原子又与氧原子相连。Yashida 等^[26, 28]和 Toyota 等^[27]将与氧原子相连的 N 位置称为 α 位, 远离 O 的那个 N 的位置称为 β 位, 并认为通过分析 N_2O 分子内的

¹⁵N分布(同位素异位体)特征可以更加准确地确定 N₂O 的形成机制。由微生物培养和纯化学反应获得的数据结果显示,SP 能区分两部分 N₂O,一部分为硝化细菌—反硝化作用和反硝化作用,统称反硝化作用(N₂O_D)产生的 N₂O,SP 为 0‰;另一部分由氨氧化细菌(AOB)参与的羟氨氧化作用,NH₄⁺ 氧化作用,真菌反硝化作用和非生物化学作用,由氨氧化古细菌(AOA)参与产生的 N₂O 过程,统称为硝化作用(N₂O_N)产生的 N₂O,SP 为 37‰。为了确定各生态系统中硝化作用和反硝化作用对 N₂O 排放量的贡献,纯培养试验中得到的 SP 值(N₂O_N 37‰ 和 N₂O_D 0‰)已经被用为同位素混合模型的参数^[10]。

假如 N₂O 完全来自于土壤硝化作用和反硝化作用,那么同位素混合模型^[46],

$$f_D = N_2O_D / N_2O_{total} \quad (7)$$

$$f_D = \frac{(SP_{total} - SP_N)}{(SP_D - SP_N)} \quad (8)$$

$$f_D = 1 - f_N \quad (9)$$

式中,SP_D 和 SP_N 表示纯培养试验中 N₂O_D 和 N₂O_N 得到的 SP 值(37‰ 和 0‰);SP_{total} 为环境样品的 N₂O_{total} 的位置嗜值,f_D 和 f_N 分别表示产生的 N₂O 来自反硝化作用和硝化作用的比例。

根据表 1 可得,SP 随着时间呈现先增加后降低的趋势,变化范围为 16.13‰~26.41‰,说明观测时间内产生 N₂O 的微生物过程发生了转变。SP 值的通量加权平均值为 22.54‰,根据方程(8),如果不考虑 N₂O 还原至 N₂ 的过程,粗略估计产生的 N₂O 含量 60.92% 由硝化作用产生,39.08% 由反硝化作用产生,说明硝化作用对 N₂O 的产生具有主导作用。前人研究结果认为,反硝化作用在草地和长期定位试验的农田里对 N₂O 的产生起主要作用^[9-10, 22, 44]。在 9:00~17:00,SP 平均值为 25.35‰,且变化比较稳定,说明这一时间产生 N₂O 的微生物过程没有发生改变,因此在这一时间段内选择监测时刻不会因为微生物发生剧烈变化而使结果产生误差。在这一时间段内,N₂O 通量之和占观测时间排放总量的 59.2%,单位时间内排放的 N₂O 的量较其他时刻要高。

使用 SP 进行 N₂O 同位素溯源时应该注意,N₂O 的扩散过程^[45]及 N₂O 还原过程^[29, 46]会导致 SP 增加。一般情况下,N₂O 扩散过程最高导致 SP 增加 1.6‰^[45],导致估计 N₂O 来源于微生物过程的比例时产生最高 5% 的偏差^[8],对结果的影响不大,而

N₂O 还原至 N₂ 过程会显著增加 SP,忽略这部分的影响甚至会导致相反的结论^[46]。通过 δ¹⁸O/δ¹⁵N 比值的变化可以评估 N₂O 还原过程对 SP 的影响^[10, 29, 46],其理论基础是通过生物细胞产生并释放到土壤中的 N₂O,以及从空气返回到土壤中的 N₂O 都会被微生物继续利用,通过还原作用使这部分 N₂O 的同位素发生改变。N₂O 还原过程产生的 N₂O 的 δ¹⁸O/δ¹⁵N 都落在斜率为 2.6 的直线上(直线 a)。由于同位素分馏效应,微生物优先利用轻同位素,因此释放的 N₂O 的 δ¹⁸O 和 δ¹⁵N 都低于空气,与空气中 δ¹⁸O - N₂O(43.7‰)和 δ¹⁵N - N₂O(7‰)组成的直线的斜率低于 1^[29](直线 b)。根据这个理论,测定样品的 δ¹⁸O 和 δ¹⁵N 一般会落在直线 a 和直线 b 之间,如果 δ¹⁸O 和 δ¹⁵N 组成的直线的斜率大于 1,则说明发生了 N₂O 还原作用,偏离得越大,还原程度越大,完全还原则接近 2.6,偏离程度的大小就是 N₂O 还原作用对 SP 影响的大小。本研究中 δ¹⁸O/δ¹⁵N 变化范围在 0.04~0.25 之间,表明并没有发生 N₂O 还原过程,也就不会因为还原作用改变 SP。因此本研究通过 SP 判定 N₂O 来源于硝化作用的比例是可靠的。

4 结论

1) 通过对莴苣菜地 N₂O 排放高峰期的研究发现,24 h 内 N₂O 通量变化范围为 34.65~131.45 μg/(m²·h),最大值和最小值分别发生在 13:00 和次日 5:00。用 9:00 的通量值 83.66 μg/(m²·h) 来表示全天通量平均值 82.81 μg/(m²·h),误差较小。

2) δ¹⁵N^{bulk} - N₂O 和 δ¹⁸O - N₂O 在 24 h 内的变化范围分别为 -31.22‰~-11.09‰和 -7.45‰~-0.68‰,且均随着时间的增加而呈先降低后增加的趋势,说明产生 N₂O 的过程发生了改变。SP 随着时间呈先增加后降低的趋势,在 9:00~17:00 内 N₂O 的 SP 比较稳定,变化范围为 23.26‰~26.21‰,极显著高于其他时刻(P < 0.01),由硝化作用占主导(SP 通量加权值为 25.35‰),在这一时间段内,N₂O 通量占一天排放总量的 57.8%。

3) 扣箱 40 min 后,N₂O 含量、δ¹⁵N - N₂O 和 SP 值达到稳定,因此选取 40 min 作为观测 N₂O 含量和同位素变化的密闭时间。

4) 4月27日至4月28日的24 h之内,SP 值的通量加权平均值为 22.54‰,根据国际上的相关研究结论,即细菌硝化作用产生 N₂O 的 SP 值为 37‰,

反硝化作用产生 N_2O 的 SP 值为 0%, 硝化作用对 N_2O 的产生起主导作用, 大约 60.92% 的 N_2O 由硝化作用产生, 39.08% 的 N_2O 由反硝化作用产生。

5) 在华北平原测定菜地 N_2O 气体通量和同位素特征值变化时, 选取 9:00 作为具有代表性的观测点, 选取 40 min 作为密闭时间比较适宜。

参考文献:

- [1] 李梓铭, 杜睿, 王亚玲, 等. 中国草地 N_2O 通量日变化观测对比研究[J]. 中国环境科学, 2012, 32(12): 2128–2133.
Li Z M, Du R, Wang Y L, *et al.* Comprison of diurnal variation of nitrous oxide fluxes from grassland of China [J]. China Environmental Science, 2012, 32(12): 2128–2133.
- [2] 叶欣, 李俊, 王迎红, 等. 华北平原典型农田土壤氧化亚氮的排放特征[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(6): 1186–1191.
Ye X, Li J, Wang Y H, *et al.* Characterization of emissions of nitrous oxide from soils of typical crop fields in North China Plain [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24(6): 1186–1191.
- [3] 邱炜红, 刘金山, 胡承孝, 等. 菜地系统土壤氧化亚氮排放的日变化[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(2): 210–213.
Qiu W H, Liu J S, Hu C X, *et al.* Daily change of nitrous oxide emission from vegetable system [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(2): 210–213.
- [4] Zhu J, Mulder J, Wu L P, *et al.* Spatial and temporal variability of N_2O emissions in a subtropical forest catchment in China [J]. Biogeosciences, 2013, 10(3): 1309–1321.
- [5] von der Heide C, Böttcher J, Deurer M, *et al.* Spatial and temporal variability of N_2O in the surface groundwater: a detailed analysis from a sandy aquifer in northern Germany [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2010, 87(1): 33–47.
- [6] Dinsmore K J, Skiba U M, Billett M F, *et al.* Spatial and temporal variability in CH_4 and N_2O fluxes from a Scottish ombrotrophic peatland: Implications for modelling and up-scaling [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(6): 1315–1323.
- [7] Williams D L, Ineson P, Coward P A. Temporal variations in nitrous oxide fluxes from urine-affected grassland [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(5): 779–788.
- [8] Ostrom N E, Sutka R, Ostrom P H, *et al.* Isotopologue data reveal bacterial denitrification as the primary source of N_2O during a high flux event following cultivation of a native temperate grassland [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(3): 499–506.
- [9] Bol R, Röckmann T, Blackwell M, *et al.* Influence of flooding on $\delta^{15}N$, $\delta^{18}O$, $1\delta^{15}N$ and $2\delta^{15}N$ signatures of N_2O released from estuarine soils – a laboratory experiment using tidal flooding chambers [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004, 18(14): 1561–1568.
- [10] Opdyke M R, Ostrom N E, Ostrom P H. Evidence for the predominance of denitrification as a source of N_2O in temperate agricultural soils based on isotopologue measurements [J]. Global Biogeochemical Cycles, 2009, 23(4): 272–277.
- [11] Mosier A R, Duxbury J M, Freney J R, *et al.* Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement and mitigation [J]. Plant and Soil, 1996, 181(1): 95–108.
- [12] 黄树辉, 吕军. 区分土壤中硝化与反硝化对 N_2O 产生贡献的方法 [J]. 农业工程学报, 2005, (S1): 48–51.
Huang S H, Lü J. Methods for the contributions of nitrification and denitrification to the production of nitrous oxide from soil [J]. Transactions of the CSAE, 2005, (S1): 48–51.
- [13] Conen F, Smith K A. A re-examination of closed flux chamber methods for the measurement of trace gas emissions from soils to the atmosphere [J]. European Journal of Soil Science, 1998, 49(4): 701–707.
- [14] Rochette P, Eriksen-Hamel N S. Chamber measurements of soil nitrous oxide flux: Are absolute values reliable? [J]. Soil Science Society of America Journal, 2008, 72(2): 331–342.
- [15] Smemo K A, Ostrom N E, Opdyke M R, *et al.* Improving process-based estimates of N_2O emissions from soil using temporally extensive chamber techniques and stable isotopes [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2011, 91(2): 145–154.
- [16] Cardenas L M, Thorman R, Ashlee N, *et al.* Quantifying annual N_2O emission fluxes from grazed grassland under a range of inorganic fertilizer nitrogen inputs [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2010, 136(3–4): 218–226.
- [17] Pennock D, Farrell R, Desjardins R, *et al.* Upscaling chamber-based measurements of N_2O emissions at snowmelt [J]. Canadian Journal of Soil Science, 2005, 85(1): 113–125.
- [18] Gaihre Y K, Wassmann R, Tirol-Padre A, *et al.* Seasonal assessment of greenhouse gas emissions from irrigated lowland rice fields under infrared warming [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2014, 184(1): 88–100.
- [19] Klein C A D, Shepherd M A, Weerden T J V D. Nitrous oxide emissions from grazed grasslands: interactions between the N cycle and climate change – a New Zealand case study [J]. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2014, 9–10: 131–139.
- [20] Denmead O T. Approaches to measuring fluxes of methane and nitrous oxide between landscapes and the atmosphere [J]. Plant and Soil, 2008, 309(1–2): 5–24.
- [21] Pedersen A R, Petersen S O, Schelde K A. Comprehensive approach to soil-atmosphere trace-gas flux estimation with static chambers [J]. European Journal of Soil Science, 2010, 61(6): 888–902.
- [22] Yamulki S, Toyoda S, Yoshida N, *et al.* Diurnal fluxes and the isotopomer ratios of N_2O in a temperate grassland following urine amendment [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001, 15(15): 1263–1269.
- [23] Firestone M K, Davidson E A. Microbiological basis of NO and N_2O production and consumption in soil. Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere [M]. New York: John Wiley & Sons, 1989, 7–21.

- [24] Michener R H, Lajtha K. Stable isotopes in ecology and environmental science[J]. *Journal of Animal Ecology*, 1994, 54 (2): 434–435.
- [25] Maeda K, Toyoda S, Shimojima R, *et al.* Source of nitrous oxide emissions during the cow manure composting process as revealed by isotopomer analysis of and amoA abundance in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1555–1562.
- [26] Yoshida N, Toyoda S. Constraining the atmospheric N₂O budget from intramolecular site preference in N₂O isotopomers [J]. *Nature*, 2000, 405 (6784): 330–334.
- [27] Toyoda S, Yoshida N. Determination of nitrogen isotopomers of nitrous oxide on a modified isotope ratio mass spectrometer[J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(20): 4711–4718.
- [28] Yoshida N. ¹⁵N-depleted N₂O as a product of nitrification[J]. *Nature*, 1988, 335(6190): 528–529.
- [29] Ostrom N E, Pitt A, Sutka R, *et al.* Isotopologue effects during N₂O reduction in soils and in pure cultures of denitrifiers [J]. *Journal of Geophysical Research – Biogeosciences*, 2007, 112 (G2): 346–358.
- [30] Skiba U, McTaggart I P, Smith K A, *et al.* Estimates of nitrous oxide emissions from soil in the UK[J]. *Energy Conversion and Management*, 1996, 37(6–8): 1303–1308.
- [31] Thomson P E, Parker J P, Arah J, *et al.* Automated soil monolith-flux chamber system for the study of trace gas fluxes [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61(5): 1323–1330.
- [32] Yamulki S, Wolf I, Bol R, *et al.* Effects of dung and urine amendments on the isotopic content of N₂O released from grasslands [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, 14(15): 1356–1360.
- [33] Rowlings D W, Grace P R, Kiese R, *et al.* Environmental factors controlling temporal and spatial variability in the soil-atmosphere exchange of CO₂, CH₄ and N₂O from an Australian subtropical rainforest [J]. *Global Change Biology*, 2012, 18 (2): 726–738.
- [34] Dobbie K E, Smith K A. Nitrous oxide emission factors for agricultural soils in Great Britain: the impact of soil water-filled pore space and other controlling variables [J]. *Global Change Biology*, 2003, 9(2): 204–218.
- [35] Velthof G L, van Groenigen J W, Gebauer G, *et al.* Temporal stability of spatial patterns of nitrous oxide fluxes from sloping grassland[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2000, 29(5): 1397–1407.
- [36] Gao B, Ju X, Su F, *et al.* Nitrous oxide and methane emissions from optimized and alternative cereal cropping systems on the North China Plain: a two-year field study [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 472: 112–124.
- [37] Wang Y, Hu C, Ming H, *et al.* Methane, carbon dioxide and nitrous oxide fluxes in soil profile under a winter wheat-summer maize rotation in the North China Plain [J]. *Plos One*, 2014, 9 (6): e98445.
- [38] Diao T, Xie L, Guo L, *et al.* Measurements of N₂O emissions from different vegetable fields on the North China Plain [J]. *Atmospheric Environment*, 2013, 72(2): 70–76.
- [39] Zhang Y, Liu J, Mu Y, *et al.* Nitrous oxide emissions from a maize field during two consecutive growing seasons in the North China Plain [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24 (1): 160–168.
- [40] Andrews T, Gregory J, Forster P, *et al.* Cloud adjustment and its role in CO radioactive forcing and climate sensitivity: a review [J]. *Surveys in Geophysics*, 2012, 33(3–4): 619–635.
- [41] Kool D M, Muller C, Wrage N, *et al.* Oxygen exchange between nitrogen oxides and H₂O can occur during nitrifier pathways [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(8): 1632–1641.
- [42] Dundee L, Hopkins D W. Different sensitivities to oxygen of nitrous oxide production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosolobus multififormis* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(11): 1563–1565.
- [43] Kendall C, Doctor D H, Young M B. 7.9 – Environmental isotope applications in hydrologic studies [A]. Turekian H D H K, *Treatise on Geochemistry (Second Edition)* [C]. Oxford: Elsevier, 2014. 273–327.
- [44] Bateman E J, Baggs E M. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 41(6): 379–388.
- [45] Bol R, Toyoda S, Yamulki S, *et al.* Dual isotope and isotopomer ratios of N₂O emitted from a temperate grassland soil after fertilizer application [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17(22): 2550–2556.
- [46] Well R, Flessa H, Xing L, *et al.* Isotopologue ratios of N₂O emitted from microcosms with NH₄⁺ fertilized arable soils under conditions favoring nitrification [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(9): 2416–2426.
- [47] Jinuntuya-Nortman M, Sutka R L, Ostrom P H, *et al.* Isotopologue fractionation during microbial reduction of N₂O within soil mesocosms as a function of water-filled pore space [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(9): 2273–2280.