

徐春英, 李玉中, 李巧珍, 等. 土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素组成的反硝化细菌法测定[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(9):1829-1836.

XU Chun-ying, LI Yu-zhong, LI Qiao-zhen, et al. Determination of ^{15}N and ^{18}O isotope abundance in the extractable soil nitrate by the denitrifier method[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(9):1829-1836.

土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素组成的反硝化细菌法测定

徐春英, 李玉中*, 李巧珍, 毛丽丽, 林伟, 强晓晶, 郑欠

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所/农业部旱作节水农业重点开放实验室, 北京 100081)

摘要:本研究优化了采用反硝化细菌法同时测定土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素组成的方法。在已有研究结果的基础上,通过采用 5000~8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心、高纯氮气吹扫 1 h、减少加样量及改造仪器自动进样器等措施对已发表方法进行了优化。对国际标准样品 USGS34 的分析表明, 0.1~0.8 $\mu\text{g NO}_3\text{-N}$ 样品量即可以得到较稳定、准确的测定值和校正值; 同一时间内制备的硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 的 SD 介于 0.05‰~0.09‰ 之间, $\delta^{18}\text{O}$ 的 SD 介于 0.28‰~0.48‰ 之间; 在三个月之内 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测定值基本一致, 表明该方法具有较好的准确度、精密度和稳定性。通过研究浸提剂、保存条件以及加热对测定土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素组成的影响, 结果表明: 常用的去离子水、KCl、CaCl₂ 可能都含有微量的硝酸盐, 随着加样量增大, 浸提剂中含有的硝酸盐可能就会影响 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测定; 对于土壤硝酸盐的浸提液, 冷冻保存效果较好, 保证了土壤硝酸盐氮氧同位素的准确性和稳定性; 尽管加热对硝酸盐标准样品 USGS34 和 IAEA-NO₃ 的 $\delta^{15}\text{N}$ 没有显著影响, 但 $\delta^{18}\text{O}$ 显著升高, 说明加热易引起氧同位素分馏; 而土壤硝酸盐浸提液样品加热前后的 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的测定值没有显著变化, 因此为避免产生氧同位素分馏和节省测试时间, 建议同时测定土壤浸提液硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 时直接和反硝化细菌反应。应用本方法对不同肥料处理田间土壤浸提液硝酸盐的氮氧同位素组成进行了测定。

关键词:反硝化细菌法; 土壤浸提液; 硝酸盐; 氮氧同位素组成

中图分类号: S151.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)09-1829-08 doi:10.11654/jaes.2016-0551

Determination of ^{15}N and ^{18}O isotope abundance in the extractable soil nitrate by the denitrifier method

XU Chun-ying, LI Yu-zhong*, LI Qiao-zhen, MAO Li-li, LIN Wei, QIANG Xiao-jing, ZHENG Qian

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

Abstract: A method has been established for determining simultaneously ^{15}N and ^{18}O isotope abundance in the extractable soil nitrate using denitrifier bacteria. The method was optimized by using 5000~8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ centrifugal rotational speed, purging 1 h with high pure N_2 , reducing the amounts of samples and improving the autosampler based on the preliminary findings. Analysis of international standard of USGS34 showed that the method presented better accuracy, precision, and stability. The standard deviations (SD) of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ were 0.05‰~0.09‰ and 0.28‰~0.48‰ respectively in the same sample at the same time within 3 months. Additionally, the effects of some factors such as the extracting agents, storage condition and heating on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of soil nitrate were analyzed. The results showed that the extracted solution such as KCl or CaCl₂ had no effect on the determination of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ if sampling amount was small. Nevertheless, the significant difference would be found under bigger sampling amount with impure extracting agents. Moreover, the results also indicated that the cryopreservation method was better than the cold preservation for the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in the soil nitrate. Analysis of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ should

收稿日期: 2016-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(41301553, 41473004); 中央级公益性科研院所基本业务费专项资金; 中国农科院科技创新工程资助项目(农业水生产力与水环境创新团队)

作者简介: 徐春英(1978—), 女, 副研究员, 博士, 主要研究方向为农业水环境。E-mail: xuchunying@126.com

* 通信作者: 李玉中 E-mail: liyuzhong@caas.cn

be finished as soon as possible; on the other hand, the soil extracted solution should be cryopreserved. No significant effect of the heat treatment was observed for $\delta^{15}\text{N}$ values of USGS34 and IAEA- NO_3 . However, the raw $\delta^{18}\text{O}$ values showed that there were significant differences in heating, and this caused oxygen isotopic fractionation. But no significant differences were observed for $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in the extracted soil nitrate samples. Therefore, we suggested that the soil nitrate extracts can directly react with denitrifier in order to avoid the oxygen isotopic fractionation and save the test time. Based on these, ^{15}N and ^{18}O isotope abundance in the extractable soil nitrate under the different fertilizer fields were investigated by using this method.

Keywords: denitrifier method; soil extract; nitrate; ^{15}N and ^{18}O isotope abundance

我国农业生产中存在氮肥过量施用现象,这不仅造成氮肥利用率低,经济效益下降,而且长期过量施用氮肥会造成土壤氮素严重冗余^[1-3]。土壤氮素形成的硝态氮极易通过淋溶作用进入水体,造成地表水富营养化、地下水的硝酸盐含量超标^[4-8]及温室气体 N_2O 排放^[9]等问题。硝态氮是土壤氮循环及迁移转化过程的中心形态,已有研究表明硝态氮中的氮、氧同位素组成是识别其来源和主要氮循环过程的有用工具^[10-11]。

国内硝酸盐氮氧同位素组成的同时分析主要前处理方法为离子交换树脂法和反硝化细菌法。尽管离子交换树脂法是收集和富集 NO_3^- 的一个重要发展^[12],但是运用该方法分析硝酸盐氮氧同位素组成需要将样品富集、洗脱、中和过量的 Cl^- 、冷冻干燥等,操作步骤繁琐,费时费力;另外,需要用到离子交换树脂、滤膜、 Ag_2O 等耗材和试剂,前处理的费用很高,这也成为该方法使用的一个限制因子^[13]。反硝化细菌法是近几年硝酸盐氮氧同位素测试技术的重要进展,最早由美国普林斯顿大学的 Sigman 等^[14]提出用于海水和淡水的硝酸盐氮同位素自然丰度测定。该方法由自然存在的缺乏 N_2O 还原酶的反硝化细菌将水中 NO_3^- 转化为 N_2O ,再由质谱仪测定 N_2O 气体的氮氧同位素组成,从而得到硝酸盐的氮氧同位素组成^[14-15]。与离子交换树脂法相比,反硝化细菌法具有许多优点:(1)所需样品量低,该方法可同时分析浓度低至 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸盐氮氧同位素组成,同时也由于降低了样品量而降低了样品的空白,测试结果准确;(2)可在常温常压下进行,不受有机氮及其他离子的影响;(3)样品预处理简单,并且氮氧同位素可同时分析,分析时间明显缩短,测试成本也极大降低。反硝化细菌法的诸多优点,已成为目前国际上先进的硝酸盐氮氧同位素组成测试技术^[16-18]。

国外研究者已经应用反硝化细菌法对土壤浸提液的硝酸盐氮氧同位素进行测定^[19-21],并用于土壤硝酸盐溯源与氮转化过程研究^[21];相比而言,国内土壤中硝态氮氮氧同位素自然丰度运用较少,尤其是氧同位素应用更少,其主要原因是缺乏合适有效的分析方

法。尽管国内已经报道了反硝化细菌法测定水体硝酸盐氮氧同位素方法^[22-24],但是用于土壤浸提液硝酸盐氮氧同位素分析的相关文献较少。本文在前期研究结果^[23]的基础上进行了一些技术改进,使反硝化细菌法不但可以用于水体硝酸盐氮氧同位素的的同时测定,而且适于土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素的的同时测定。该方法的完善,有助于促进该方法在国内的推广和应用,从而加强土壤氮循环和迁移转化过程的研究。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

同位素比质谱仪 Delta^{plus} (Thermo-Finnigan, 美国),连接有 PreCon 痕量气体预浓缩装置 (Thermo, 美国),CTC-Combi PAL 自动进样器 (瑞士 CTC Analytics AG),高速离心机 (HITACHI, himac CR21G, High-Speed Refrigerated Centrifuge, 日本 HITACHI 公司),氮气吹扫仪 (美国 Organomation 公司),高压灭菌锅 (日本 SANYO 公司),流动注射分析仪 (Lachant QC8000, 美国 Lachant 公司)。

1.2 试剂

胰蛋白大豆琼脂培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (美国 BD 公司),试剂 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_3PO_4 、 KCl 、 KNO_3 (分析纯,国药集团化学试剂有限公司), CaCl_2 (分析纯,西陇化工股份有限公司)、 H_3PO_4 (优级纯,国药集团化学试剂有限公司),磺胺 (美国 Sigma 公司),N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐 (优级纯,国药集团化学试剂有限公司),国际同位素标准样品: USGS32、USGS34、USGS35 (购自美国 USGS),IAEA- NO_3 (购自 IAEA)。

1.3 溶液的配制

TSB-A 培养液 (含 NO_3^-): 30 g 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB), 1.0 g KNO_3 , 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.9 g K_3PO_4 , 1000 mL 去离子水,将 460~480 mL 分装到 500 mL 培养瓶中,高压灭菌 60 min 备用。

TSB-B 培养液 (无 NO_3^-): 30 g TSB, 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.9 g KH_2PO_4 , 2000 mL 去离子水,分装到 100 mL 的血清瓶中,高压灭菌 60 min 备用。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株的培养

选用缺乏 N_2O 还原酶活性的反硝化细菌,即致金色假单胞菌 *P.aureofaciens* (ATCC13985, *Pseudomonas aureofaciens* 购自美国农业部菌种保存中心),将该菌株接种并培养 7 d 待用。

1.4.2 土壤样品中 NO_3^- 的提取及测定

称取 10 g 新鲜土壤样品,加入 50 mL $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液,振荡 1 h,悬液静置 3~5 min 后过滤。取 15 mL 滤液上流动注射分析仪(Lachant QC8000)测定土壤硝态氮浓度。

1.4.3 样品中 NO_3^- 转化为 N_2O

将培养 7 d 的菌液在高速离心机 5000~8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下,18 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,倒出上层清液,剩余菌体用无 NO_3^- 的 TSB-B 培养液悬浮,并浓缩成 2 倍浓度的菌液,然后加入几滴止泡剂。吸取 2~3 mL 浓缩菌液注入容积为 20 mL 的钳口顶空瓶后,用高纯氮气(流速为 30~40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)吹扫 1~3 h,然后用气密性注射器将 0.4~3.5 μg 的 NO_3^- 样品注入顶空瓶充分混匀,为避免瓶内压力过高,加样体积一般小于 4 mL,最后将顶空瓶倒置放入恒温箱中 26 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。次日注入 0.15 mL 浓度为 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH,裂解细菌并终止反应,同时吸收产生的 CO_2 。

1.4.4 N_2O 氮氧同位素测定

采用 PreCon 痕量气体预浓缩装置、同位素质谱仪(IRMS, Delta^{plus})测定反硝化细菌反应产生的 N_2O 气体氮氧同位素,PreCon 配有 CTC-Combi PAL 自动进样器。载气为高纯氮气,流量为 50~60 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,参考标准气体为校正过的 99.9% N_2O 气体。通过 CTC-Combi PAL 自动进样器将顶空瓶中 N_2O 气体输送至 PreCon,经 PreCon 浓缩和捕集 N_2O 气体,最后由同位素质谱仪同时测定氮氧同位素组成。

1.4.5 氮氧同位素测试结果的校正

采用 USGS32、USGS34 和 USGS35 标准样品进行 $\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 和 $\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 的校正: $T=m \times M+b$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 采用 $\delta^{15}\text{N}_{\text{USGS34}}=-1.8\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{USGS32}}=+180\text{‰}$ (T, 真实值);

$\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 采用 $\delta^{18}\text{O}_{\text{USGS34/VSMOW}}=-27.9\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{USGS35/VSMOW}}=+57.5\text{‰}$ (T, 真实值);

氮同位素校正方程如下:

$$+180\text{‰}=m \times \delta^{15}\text{N}_{\text{USGS32-meas}}+b \quad (1)$$

$$-1.8\text{‰}=m \times \delta^{15}\text{N}_{\text{USGS34-meas}}+b \quad (2)$$

氧同位素校正方程如下:

$$-27.9\text{‰}=m \times \delta^{18}\text{O}_{\text{USGS34-meas}}+b \quad (3)$$

$$+57.5\text{‰}=m \times \delta^{18}\text{O}_{\text{USGS35-meas}}+b \quad (4)$$

根据以上标准样品的真实值(T)和测定值(M, meas),计算出 m 和 b,得到校正方程,根据测定值和校正方程计算出样品的真实值。

1.5 统计分析

所得数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 实验过程优化

2.1.1 离心转速

在初期的试验中^[23],采用 30 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的超高速离心,该步骤对于普通实验室较难操作,本实验中分别采用了 3000、5000、8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 20 min 进行菌液浓缩,对比各自上清液的 OD600 值发现,离心转速为 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时 OD600 值要显著高于 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (表 1),而 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 没有显著差异,这说明离心转速为 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时已经基本将所有的菌体离心沉淀,并且浓缩后菌量也满足后续试验要求,因此,菌液浓缩采用 5000~8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心均可,这对于普通实验室较易实现。

表 1 离心转速对菌液 OD600 值的影响

Table 1 Effect of centrifugal rotational speed on OD600 value for denitrifier bacterial solution

菌液 Denitrifier bacterial solution	OD600		
	3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	8000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$
1	0.264A	0.214B	0.215B
2	0.334A	0.292B	0.289B

注:不同大、小写字母分别表示差异达 1%与 5%显著水平。下同。

Note: Different capital and small letters meant significant difference at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same below.

2.1.2 吹扫时间

将浓缩菌液加入顶空样品瓶密闭后,不需采用价格昂贵的高纯氮气,而是采用相对较便宜的高纯氮气进行吹扫,设置流速为 30~40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 分别吹扫 20 min、40 min、1 h、2 h 和 3 h 后再加入标样 USGS34 进行氮氧同位素测定,比较发现 1 h 以上吹扫时间下标样 USGS34 的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 和 $\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 测定值没有显著差异(表 2),而与不吹扫、吹扫 20 min 和 40 min 下 $\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 和 $\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 值差异较大,尤其 $\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 差异显著,说明吹扫 1 h 即可以将菌液中的 N_2O 去除并保证

表2 不同吹扫时间对 USGS34 标样氮氧同位素实测值的影响($n=5$)

Table 2 Effect of purging time on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ measured values in USGS34 ($n=5$)

项目	吹扫时间 Purging time	面积 Area of m/z 44 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}$)/Vs	$\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$		$\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$	
			实测值 Raw values \pm SD/ $\%$	校正值 Corrected values \pm SD/ $\%$	实测值 Raw values \pm SD/ $\%$	校正值 Corrected values \pm SD/ $\%$
CK(菌液空白)	0	2.29	8.48 \pm 0.35		33.12 \pm 0.52	
	0	15.8	-0.31 \pm 0.21A		-19.75 \pm 0.58Aa	
	20 min	13.87	-0.38 \pm 0.29A		-23.14 \pm 0.39Bb	
	40 min	13.57	-1.08 \pm 0.17B		-23.93 \pm 0.39Bc	
	1 h	13.3	-2.35 \pm 0.06C		-23.83 \pm 0.32Bc	
	2 h	14.5	-2.32 \pm 0.13C		-23.69 \pm 0.29Bc	
STD-USGS34	3 h	15.1	-2.38 \pm 0.06C		-23.93 \pm 0.37Bc	

注:空白代表菌液加入到充盈高纯氮气的顶空瓶中。

Note:CK prepared with condensed bacterial cultures distributed into headspace vials filled with high pure N_2 .

了顶空瓶的厌氧环境。另外,从表2可以看出,菌液空白 m/z 44 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}$) 的面积为 2.29Vs,证明菌液中确实含有 N_2O 气体,加入 USGS34 标样后, $\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 和 $\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 也确实与吹扫后差异相当大,如果不吹扫或者吹扫时间不足,就会影响硝酸盐样品所产生的 N_2O 气体氮氧同位素的准确测定。因此,本研究建议吹扫时间至少要保证 1 h 以上。

2.1.3 自动进样系统的优化

在初期的试验中^[23],TraceGas 标准配置是 Gilson 自动进样器和容量为 12 mL 的样品瓶,但是该样品瓶不能直接作为反硝化细菌和样品的反应瓶,需要抽取 2 mL 反硝化产生的 N_2O 气体注入到预抽真空的 12 mL 样品瓶中才能进行测定。本研究改用连接 CTC-Combi PAL 自动进样器,通过设置仪器自动进样器参数及改造样品盘,采用 20 mL 的顶空钳口瓶进行反硝化反应,同时根据样品浓度加入 0.4~3.5 μg NO_3^- ,为避免瓶内产生过高的压力,加样体积应尽量小于 4 mL,这个加样量低于前期试验样品量^[23],更明显低于

传统离线方式同位素测试所需 6~20 μg NO_3^- 的样品量^[22]。这样采用 20 mL 的顶空钳口瓶可以反硝化反应后直接进样,无需将 N_2O 气体另外进行转移^[22-23],从而避免了因 N_2O 气体转移而可能产生的同位素分馏及实验误差。

2.1.4 进样量

为确定 PreCon 分析系统结合同位素质谱仪合适的进样量,本研究考察了不同进样量下标准样品 USGS34 的硝酸盐氮氧同位素值(表3)。从表3结果可以看出,在 0.1~0.8 μg NO_3^- -N 样品量之间,PreCon 预浓缩分析系统结合同位素质谱仪分析,测定结果没有显著性差异,均能得到较稳定、准确的测定值和校正值,比传统离线方式同位素测试所需 1.4~4.5 μg NO_3^- -N 的样品量要低很多^[14]。本研究推荐一般用量为 0.2~0.4 μg NO_3^- -N。

2.2 准确度、精密度、稳定性

表4对不同制备时间获得的 USGS34 的 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 实测值进行了比较。结果发现, $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值非常稳定,从 2014 年 9 月 12 日—2015 年 3 月 16 日测定的 ^{15}N 值非常接近,位于 -2.32‰~-2.39‰之间;而 $\delta^{18}\text{O}$ 测定值稳定性稍差一些,测定值位于 -23.96‰~-24.23‰之间,测定值之间也没有显著差异,以上结果表明,在 6 个月内反硝化细菌法同时测定硝酸盐的 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 是准确的、稳定的、可行的。同样从表4可

表4 不同制备时间 USGS34 氮氧同位素比值测定的准确度、精密度、稳定性($n=5$)

Table 4 Precision and stability of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in USGS34 under different date of sample preparation ($n=5$)

样品制备日期 Date of sample preparation	$\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$		$\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$	
	实测值 Raw values/ $\%$	SD/ $\%$	实测值 Raw values/ $\%$	SD/ $\%$
2014-09-12	-2.32	0.08	-23.96	0.40
2014-12-19	-2.39	0.05	-24.23	0.28
2015-03-16	-2.34	0.09	-24.06	0.48

表3 不同硝态氮进样量下 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值(USGS34)($n=5$)

Table 3 Raw values of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of USGS34 solution with different amount of NO_3^- -N ($n=5$)

标准样品 Nitrate standards	加样量 Amount of N/ μg	$\delta^{15}\text{N}/\%$			$\delta^{18}\text{O}/\%$		
		实测值 Raw values \pm SD/ $\%$	校正值 Corrected values \pm SD/ $\%$	真实值 True values \pm SD/ $\%$	实测值 Raw values \pm SD/ $\%$	校正值 Corrected values \pm SD/ $\%$	真实值 True values \pm SD/ $\%$
USGS34	0.1	-2.34 \pm 0.15	-1.85 \pm 0.15		-23.81 \pm 0.30	-27.87 \pm 0.33	
	0.2	-2.30 \pm 0.07	-1.81 \pm 0.08		-23.96 \pm 0.40	-27.65 \pm 0.42	
	0.4	-2.26 \pm 0.07	-1.75 \pm 0.08	-1.80 \pm 0.2	-23.98 \pm 0.25	-27.89 \pm 0.28	-27.9 \pm 0.6
	0.8	-2.36 \pm 0.04	-1.82 \pm 0.04		-24.01 \pm 0.31	-27.89 \pm 0.33	

可以看出,同一制备时间的5个平行样品之间 $\delta^{15}\text{N}$ 的SD介于0.05‰~0.09‰之间, $\delta^{18}\text{O}$ 的SD介于0.28‰~0.48‰之间,均低于USGS34给定的 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的标准偏差($\sigma\delta^{15}\text{N}\leq 0.2\text{‰}$, $\sigma\delta^{18}\text{O}\leq 0.6\text{‰}$),表明该方法的准确度、精密度、稳定性较好。

但是需要指出的是,不同样品制备时间测定的氮氧同位素值仍然有差异,这可能主要与不同批次反应菌株的差异有关^[15]。为减少此类误差,本研究建议尽量采用新活化或者转接代数较少的菌株进行反硝化反应。

2.3 浸提剂对土壤硝酸盐氮氧同位素值的影响

目前国内较多采用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 或者 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 溶液来浸提土壤中的硝酸盐,已有研究发现该两种浸提剂对土壤中硝酸盐的测定结果并无显著差异^[25]。由于不同生产厂商及不同批次的去离子水、KCl以及 CaCl_2 可能质量不同,难以保证研究人员采用的浸提剂和标准溶液的配制采用的试剂质量完全一致,因此,本研究比较了有代表性的去离子水(H_2O)、 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 及 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 作为样品加入反硝化菌液后产生的 N_2O 的丰度和面积,以此来探究浸提剂是否影响土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素值的测定(表5)。从表5可以看出,本研究所用的 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 中可以检测出微量硝酸盐,而去离子水(H_2O)和 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 中未检出硝酸盐。PreCon结合同位素质谱仪进一步检测反应产生的 N_2O 发现,无论是吹扫后的空白反硝化细菌菌液、去离子水(H_2O)还是 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 和 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 都能检测到一个 N_2O 峰, $^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ 的丰度空白最低,面积也是空白最小。在本实验室通常的0.15 mL的加样量下,各个处理之间丰度和面积没有显著差异,但是随

加样量增加一倍(0.30 mL), $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 产生 N_2O 的丰度和面积要显著高于其他处理,其他处理之间没有显著差异,这说明此次试验的浸提剂 CaCl_2 自身含有的硝酸盐可能会影响样品的测定,而本实验用KCl和 H_2O 中的硝酸盐对样品测定不会产生影响。

本研究同时考察了去离子水和 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 分别配制的标准样品USGS32、USGS34、USGS35、IAEA-NO3的反硝化细菌法测定的氮氧同位素值(表6),从表6可以看出,尽管各个标准样品氮氧同位素测定值存在差异,但是差异不显著($\alpha=0.05$)。这表明 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 浸提剂自身并不影响反硝化细菌的生长和浸提液中硝酸盐氮氧同位素组成的测定,这点与Mørkved等^[19]认为 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 通过改变反硝化效率而影响测定值的结果不同,但Rock等^[20]通过测定 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 浸提液中硝酸盐的氮氧同位素组成来进行土壤硝酸盐溯源,也并未指出浸提剂对反硝化效率的影响。

尽管如此,空白试验数据表明, H_2O 、 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 及 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 溶液的反硝化反应可能也都产生了微量 N_2O 气体(见表5, m/z 44面积),这说明

表6 水配制及KCl配制标准样品的测定值($n=5$)

Table 6 Raw $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of NO_3^- standards prepared with H_2O and KCl solution ($n=5$)

标准样品 Standards	$\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$		$\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$	
	实测值 Raw values SD/%		实测值 Raw values SD/%	
	H_2O	KCl	H_2O	KCl
USGS32	173.63±0.35	173.25±0.26	23.76±0.32	23.32±0.45
USGS34	-2.30±0.08	-2.34±0.10	-23.90±0.38	-23.89±0.26
USGS35	3.78±0.16	3.64±0.10	50.63±0.34	50.47±0.39
IAEA-NO3	4.38±0.06	4.53±0.13	21.43±0.18	21.33±0.18

表5 不同浸提剂对硝酸盐氮氧同位素比值测定的影响

Table 5 Effect of different extracting agents on $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of nitrate

样品 Samples	NO_3^- -N/mg·L ⁻¹	加样量 Volume of samples/mL	丰度 $^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ Amplitude of mass 44/mV		面积 Area of m/z 44 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}$)/Vs		数量 numbers/个
			平均值 Average	SD	平均值 Average	SD	
CK	—	—	20.75	5.188	0.093	0.023	4
H_2O	—	0.15	21	2.582	0.094	0.012	5
H_2O	—	0.3	23	4.082	0.102	0.018	5
$2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$	—	0.15	23.5	5.066	0.104	0.024	5
$2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$	—	0.3	24.25	1.708	0.112	0.009	5
$0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$	0.04	0.15	21.75A	2.062	0.098A	0.01	5
$0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$	0.04	0.3	37.75B	10.782	0.171B	0.049	5

注:CK为吹扫之后的空白菌液。

Note: CK means blank condensed bacterial cultures after purging with N_2 .

H₂O、KCl、CaCl₂ 可能都含有微量的硝酸盐, 这可能也是不同溶液的标准样品氮氧同位素测定值存在差异的原因。因此, 为了减少系统和测定误差, 一是建议购买纯度较高的浸提剂和去离子水, 二是建议土壤硝酸盐浸提液统一采用去离子水配制的标准溶液来校正, 且每一次测定都应采用标准样品重新做校正曲线。

2.4 保存条件对土壤中硝酸盐氮氧同位素值的影响

以 2 mol·L⁻¹ 的 KCl 溶液为浸提剂, 考查了保存条件对土壤中硝酸盐氮氧同位素测定值的影响。结果显示, 土壤浸提液的保存方式显著影响了土壤浸提液中硝酸盐的氮氧同位素值(表 7)。由表 7 可见, -18 °C 冷冻保存效果较好, 即使冷冻保存 30 d, 土壤浸提液硝酸盐的 δ¹⁵N 和 δ¹⁸O 实测值仍然与新鲜样品当日测定值相近, 没有显著差异。在 4 °C 冷藏条件下, 各土层硝酸盐的 δ¹⁵N 在冷藏 30 d 内均与新鲜样品当日测定值相近, 没有显著差异; 但是, 各层次土壤硝酸盐的 δ¹⁸O 在 10 d 之内没有显著变化, 在 20 d 和 30 d, 除 40~60 cm 土层外, 其余均显著低于新鲜样品当日测定值, δ¹⁸O 最大降低了 3.88‰, 变化非常大, 其比例范围为 19.27%~213%。由此可见, 土壤样品浸提后, 为保证其 δ¹⁵N 和 δ¹⁸O 的准确性和稳定性, 一方面应冷冻保存, 另一方面应尽快测定。

2.5 加热对土壤硝酸盐氮氧同位素组成测定的影响

土壤微生物组成复杂, 其浸提液可能含有土壤原生反硝化细菌及其 N₂O 还原酶, 从而干扰反硝化细菌还原 NO₃⁻ 产生 N₂O 的氮氧同位素测定。对此, Mørkved 等^[19]建议将土壤浸提液 80 °C 加热 1 h, 以消除土壤原生反硝化细菌对其硝酸盐氮同位素测定的干扰。为考

察加热对同时测定硝酸盐氮氧同位素的影响, 同时鉴于每个研究者的土壤浸提液含有的原生反硝化细菌不尽相同, 本研究比较了将 USGS34、IAEA-NO3 标准样品以及土壤样品加热与否的氮氧同位素测定值, 结果发现, δ¹⁵N 测定值没有显著差异(表 8), 表明加热与否对 δ¹⁵N 测定值没有显著影响, 这与 Mørkved 等^[19]的结果是一致的; 但是加热后标准样品的 δ¹⁸O 测定值要显著升高(表 8), 这说明加热可能促使标样 NO₃⁻ 的 O 与空气中 O₂ 的氧发生了交换, 导致反硝化作用产生的 N₂O 气体产生了同位素分馏, 而空气中的 δ¹⁸O-O₂ 为 23.5‰, 比 USGS34 (δ¹⁸O=-23.77‰) 及 IAEA-NO3 (δ¹⁸O=21.33‰) 中 δ¹⁸O 的实测值都要高, 所以加热过程可能导致标准样品的 O 与空气中的 O₂ 发生了交换, 使其 δ¹⁸O 测定值显著升高, 也说明了加热影响了标准样品 δ¹⁸O 的准确测定。与标准样品不同的是, 土壤样品加热之后 δ¹⁸O 测定值有的升高(表 8), 有的降低, 没有明显的规律性, 这说明不加热时土壤原生反

表 8 硝酸盐样品的氮氧同位素值(加热与否)

Table 8 δ¹⁵N and δ¹⁸O values in the nitrate samples (heating or not heating)

样品 Sample	δ ¹⁵ N _{nitrate} /‰		δ ¹⁸ O _{nitrate} /‰	
	不加热 No heating	加热 Heating	不加热 No heating	加热 Heating
USGS34	-2.28±0.09	-2.27±0.03	-23.77±0.37A	-22.94±0.14B
IAEA-NO3	4.35±0.05	4.41±0.06	21.33±0.18A	21.95±0.08B
S1	1.07±0.03	1.13±0.05	-3.56±0.10	-3.42±0.17
S2	-1.87±0.05	-1.95±0.08	-5.33±0.06	-5.28±0.06
S3	-1.82±0.07	-1.92±0.05	-5.55±0.25	-5.81±0.06

表 7 不同保存条件对不同土壤层次硝态氮氮氧同位素值的影响(n=4)

Table 7 Effect of preservation condition on δ¹⁵N and δ¹⁸O values of soil nitrate in different depth(n=4)

项目	土壤层次 Soil depth/cm	δ ¹⁵ N _{nitrate} /‰				δ ¹⁸ O _{nitrate} /‰			
		1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
冷藏条件 Cold preservation(4 °C)	0~20	3.64	3.74	3.51	3.43	-6.97A	-7.17A	-9.21B	-9.83B
	20~40	-0.95	-0.93	-0.94	-0.74	-1.82A	-1.93A	-3.12B	-5.70C
	40~60	-2.54	-2.44	-2.55	-2.61	-4.32A	-4.47A	-4.43A	-6.58B
	60~80	-3.41	-3.25	-3.38	-3.23	-5.5Aa	-5.63Aa	-6.25Ab	-6.56Bb
冷冻条件 Cryopreservation(-18 °C)	0~20	3.64	3.62	3.43	3.51	-6.97	-7.15	-6.82	-7.27
	20~40	-0.95	-0.81	-0.85	-0.83	-1.82	-2.05	-1.68	-2.08
	40~60	-2.54	-2.43	-2.39	-2.35	-4.32	-4.22	-4.68	-4.85
	60~80	-3.41	-3.53	-3.46	-3.35	-5.5	-5.25	-5.42	-5.36

注: 不同大、小写字母分别表示与取样当日(1 d)测试结果相比的差异达 1% 与 5% 显著水平。

Note: Different capital and small letters meant significant difference compared with δ¹⁵N and δ¹⁸O values of nitrate in soils detected at the first day at 0.01 and 0.05 level respectively.

硝化细菌可能产生一定作用,但是加热又会产生同位素的热交换,所以加热前后 $\delta^{18}\text{O}$ 测定值没有显著差异, $\delta^{15}\text{N}$ 测定值同样也没有显著差异。因此,为保证测定结果的准确性及节省测试时间,本研究建议对于土壤浸提液硝酸盐氮氧同位素的同时测定,浸提液可以直接和反硝化细菌反应,而无需加热,这也与Rock等^[20]直接采用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl土壤浸提液进行反硝化反应测定其硝酸盐氮氧同位素组成的方法是一致的。

2.6 实际样品测定

按照优化后的方法测定了不同肥料处理田间土壤浸提液硝酸盐的氮氧同位素组成,结果见表9。从表9可以看出,单施尿素田土壤硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $-3.26\pm 0.74\text{‰}$,农户施肥田(底肥为复合肥,追施尿素)土壤硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $-3.45\pm 1.04\text{‰}$,二者非常接近,而 $\delta^{18}\text{O}$ 明显不同,分别是 $-5.23\pm 1.03\text{‰}$, $3.96\pm 0.88\text{‰}$ 。农户施氮肥多为尿素,而尿素分解产生并释放的 NH_4^+ 进一步经过硝化作用产生硝酸盐,所以这两个处理的硝酸盐主要来源于肥料释放的 NH_4^+ ,其 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 结果也是位于Fenech等^[18]修正的硝酸盐来源的阈值范围,该结果与实际情况相符;与施尿素田和农户施肥田明显不同的是,有机肥田土壤硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $9.40\pm 1.54\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $1.48\pm 0.97\text{‰}$,这也位于有机肥来源的 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的阈值范围^[18],与农户施用有机肥的情况一致。

3 结论

本研究优化了已发表的反硝化细菌结合Trace-gas-同位素质谱仪测定硝酸盐氮氧同位素的方法,并应用PreCon-同位素质谱仪测定。该方法具有较好的准确度、精密度和稳定性,且仅需很小的样品量,并且在普通实验室即可完成前处理过程,具有很好的推广应用前景。实验用去离子水及浸提试剂大多也含有微量的硝酸盐,随加样量增多,有可能会影响浸提液中氮氧同位素的测定,因此建议购买纯度较高的浸提剂和去离子水,二是建议土壤硝酸盐浸提液统一采用去离子水配制的标准溶液来校正,且每一次测定都应采用标准样品重新做校正曲线。冷冻保存效果较好,

$\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值基本没有变化,因此土壤样品浸提后,一方面应冷冻保存,另一方面应尽快测定。加热对硝酸盐氮同位素测定没有显著影响,但会引起氧同位素的分馏,因此建议土壤浸提液直接和反硝化细菌进行反应来测定硝酸盐氮氧同位素组成。需要指出的是,反硝化细菌可以将土壤中硝酸盐(NO_3^-)和亚硝酸盐(NO_2^-)同时还原为 N_2O 气体,故测定结果实际为二者混合物的平均氮同位素组成,因此当亚硝酸盐同时存在时,可以预先从样品中除去。其方法是,加足够量的抗坏血酸使溶液的pH至3.5左右,抗坏血酸不与硝酸盐作用,而仅与亚硝酸盐选择性反应,使其转换为NO并被惰性气体氦气连续移走。抗坏血酸对反硝化细菌无毒,不影响后续硝酸盐的分析。因本研究土壤样品中未检测到亚硝酸盐,故省去该步骤。综上所述,反硝化细菌法适用于土壤浸提液中硝酸盐氮氧同位素组成的同时测定。

参考文献:

- [1] 巨晓棠,张福锁. 中国北方土壤硝态氮的累积及其对环境的影响[J]. 生态环境, 2003, 12(1): 24-28.
JU Xiao-tang, ZHANG Fu-suo. Nitrate accumulation and its implication to environment in North China[J]. *Ecology and Environment*, 2003, 12(1): 24-28.
- [2] Ju X T, Kou C L, Zhang F S, et al. Nitrogen balance and groundwater nitrate contamination: Comparison among three intensive cropping systems on the North China Plain[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143: 117-125.
- [3] 毕晓庆,山楠,杜连凤,等. 氮肥用量对设施滴灌栽培番茄产量品质及土壤硝态氮累积的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(11): 2246-2250.
BI Xiao-qing, SHAN Nan, DU Lian-feng, et al. Effects of Nitrogen rates on tomato yield and quality and soil nitrate accumulation under drip irrigation in solar greenhouse[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(11): 2246-2250.
- [4] Kol D C, Mayer B, Lee K S, et al. Land-use controls on sources and fate of nitrate in shallow groundwater of an agricultural area revealed by multiple environmental tracers[J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2010, 118(1/2): 62-78.
- [5] 王庆锁,孙东宝,郝卫平,等. 密云水库流域地下水硝态氮的分布及其影响因素[J]. 土壤学报, 2011, 48(1): 141-150.
WANG Qing-suo, SUN Dong-bao, HAO Wei-ping, et al. Nitrate concentration distribution in groundwater of the Miyun Reservoir Water-

表9 不同肥料处理田间土壤浸提液硝酸盐的氮氧同位素校正值

Table 9 Corrected $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of NO_3^- of soil extract samples in different fertilizer fields

土壤提取液样品 Soil extract samples	$\delta^{15}\text{N}_{\text{nitrate}}$ 校正值 Corrected values \pm SD/‰	$\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 校正值 Corrected values \pm SD/‰
有机肥田 Applied organic fertilizer field	9.40 \pm 1.54	1.48 \pm 0.97
施尿素田 Applied urea field	-3.26 \pm 0.74	-5.23 \pm 1.03
农户施肥田 Fertilized field as farmers	-3.45 \pm 1.04	3.96 \pm 0.88

- shed[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(1):141-150.
- [6] 徐春英, 李玉中, 李巧珍, 等. 山东潍坊地下水硝酸盐污染现状及 $\delta^{15}\text{N}$ 溯源[J]. *生态学报*, 2011, 31(21):6579-6587.
XU Chun-ying, LI Yu-zhong, LI Qiao-zhen, et al. Nitrate contamination and source tracing from NO_3^- - $\delta^{15}\text{N}$ in groundwater in Weifang, Shandong Province[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(21):6579-6587.
- [7] 刘兴权, 许晶玉, 江丽华, 等. 山东省种植区地下水硝酸盐污染空间变异及分布规律研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(6):1172-1179.
LIU Xing-quan, XU Jing-yu, JIANG Li-hua, et al. Spatial variability and distribution pattern of groundwater nitrate pollution in farming regions of Shandong Province, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6):1172-1179.
- [8] 张丽娟, 巨晓棠, 刘辰琛, 等. 北方设施蔬菜种植区地下水硝酸盐来源分析:以山东省惠民县为例[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(21):4427-4436.
ZHANG Li-juan, JU Xiao-tang, LIU Chen-chen, et al. A study on nitrate contamination of ground water sources in areas of protected vegetables-growing fields: A case study in Huimin County, Shandong Province [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(21):4427-4436.
- [9] Senbayram M, Chen R, Budai A, et al. N_2O emission and the $\text{N}_2\text{O}/(\text{N}_2\text{O} + \text{N}_2)$ product ratio of denitrification as controlled by available carbon substrates and nitrate concentrations[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2012, 147(15):4-12.
- [10] Rock L, Ellert B H, Mayer B. Tracing sources of soil nitrate using the dual isotopic composition of nitrate in 2 M KCl-extracts[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(12):2397-2405.
- [11] Kelley C J, Keller C K, Evans R D, et al. Nitrate-nitrogen and oxygen isotope ratios for identification of nitrate sources and dominant nitrogen cycle processes in a tile-drained dryland agricultural field[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57:731-738.
- [12] 贾小妨, 李玉中, 徐春英, 等. 氮、氧同位素与地下水中硝酸盐溯源研究进展[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(14):233-239.
JIA Xiao-fang, LI Yu-zhong, XU Chun-ying, et al. Research advanced in N, O isotope and sources of nitrate in groundwater[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(14):233-239.
- [13] 李玉中, 王利民, 徐春英, 等. 地下水硝酸盐污染治理研究[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2014:113-121.
LI Yu-zhong, WANG Li-min, XU Chun-ying, et al. Research on study of nitrate pollution in groundwater[M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press, 2014:113-121.
- [14] Sigman D M, Casciotti K L, Andrea M, et al. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(17):4145-4153.
- [15] Casciotti K L, Sigman D M, Hastings M G, et al. Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(19):4905-4912.
- [16] McIlvin M R, Casciotti K L. Technical updates to the bacterial method for nitrate isotopic analyses [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(5):1850-1856.
- [17] Révész K, Casciotti K L. Methods of the reston stable isotope laboratory [S]. U. S. Geological Survey, Reston, Virginia 2007, <http://www.usgs.gov/>.
- [18] Fenech C, Rock L, Nolan K, et al. The potential for a suite of isotope and chemical markers to differentiate sources of nitrate contamination: A review[J]. *Water Research*, 2012, 46(7):2023-2041.
- [19] Mørkved P T, Dörsch P, Sjøvik A K, et al. Simplified preparation for the $\delta^{15}\text{N}$ -analysis in soil NO_3^- by the denitrifier method[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(8):1907-1915.
- [20] Rock L, Ellert B H. Nitrogen-15 and oxygen-18 natural abundance of potassium chloride extractable soil nitrate using the denitrifier method[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71(2):355-361.
- [21] Minet E, Coxon C E, Goodhue R, et al. Evaluating the utility of ^{15}N and ^{18}O isotope abundance analyses to identify nitrate sources: A soil zone study[J]. *Water Research*, 2012, 46(12):3723-3736.
- [22] 张翠云, 张俊霞, 马琳娜, 等. 硝酸盐氮同位素反硝化细菌法测试技术的建立[J]. *核技术*, 2011, 34(3):237-240.
ZHANG Cui-yun, ZHANG Jin-xia, MA Lin-na, et al. A technique for measuring nitrogen isotopic composition of nitrate using the denitrifier method[J]. *Nuclear Techniques*, 2011, 34(3):237-240.
- [23] 徐春英, 李玉中, 郝卫平, 等. 反硝化细菌法结合痕量气体分析仪/同位素比质谱仪分析水体硝酸盐氮同位素组成[J]. *分析化学*, 2012, 40(9):1360-1365.
XU Chun-ying, LI Yu-zhong, HAO Wei-ping, et al. Analysis of nitrogen isotopic composition of nitrate in water by denitrifier method and trace-gas/isotope ratio mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(9):1360-1365.
- [24] 岳甫均, 李思亮, 刘丛强, 等. 利用反硝化细菌法测试水体硝酸盐氮氧同位素[J]. *生态学杂志*, 2012, 31(8):2152-2157.
YUE Fu-jun, LI Si-liang, LIU Cong-qiang, et al. Measurement of waters nitrate dual isotopes based on denitrifier method[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(8):2152-2157.
- [25] 陕红, 张庆忠, 张晓娟, 等. 保存、分析方法等因素对土壤中硝态氮测定的影响[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(12):1466-1471.
SHAN Hong, ZHANG Qing-zhong, ZHANG Xiao-juan, et al. Effect of preservation, analysis method on determination of nitrate in soils[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2013, 32(12):1466-1471.