

DOI: 10.11766/trxb202106070299

郭茹, 温腾, 曹亚澄, 张金波. 反硝化细菌法测定土壤 NO_2^- - ^{15}N 丰度的方法优化[J]. 土壤学报, 2023, 60 (2): 535–545.

GUO Ru, WEN Teng, CAO Yacheng, ZHANG Jinbo. Optimization of Denitrifier Method for Determination of Soil NO_2^- - ^{15}N Abundance[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (2): 535–545.

反硝化细菌法测定土壤 NO_2^- - ^{15}N 丰度的方法优化*

郭茹¹, 温腾^{1, 2, 3, 4†}, 曹亚澄⁵, 张金波^{1, 2, 3, 4}

(1. 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023; 2. 江苏省地理环境演化国家重点实验室培育建设点, 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. 虚拟地理环境教育部重点实验室(南京师范大学), 南京 210023; 5. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘要: NO_2^- 是土壤中多个氮转化过程的关键中间产物, 具有浓度低、转化快的特点。反硝化细菌法与质谱技术相结合, 已广泛用于 NO_3^- 或 NO_2^- 的 ^{15}N 同位素分析。本文旨在优化现有 *Stenotrophomonas nitritireducens* 反硝化细菌法的培养和反应条件, 实现对土壤浸提液中 NO_2^- - ^{15}N 丰度的专一、快速、准确测定。结果表明, 使用种子液好氧摇培与单菌落微氧培养对 NO_2^- 样品的 ^{15}N 同位素测定无显著差异, 种子液可保证不同批次菌体的稳定性, 好氧培养可将培养时间从 7~8 d 缩短至 12~15 h。高纯 N_2 或 He 气吹扫 0.5 h 均能有效去除 O_2 和空白杂质氮, 但 N_2 吹扫成本更低。转移 N_2O 气体至干燥气瓶, 不影响测定结果的准确性和精密度, 还能延长样品保存时间, 减少碱蒸汽腐蚀仪器管路。使用处于对数生长期的菌体, 调节反应体系的菌体浓度 OD_{600} 值为 0.3~0.9, 可保证其反硝化效率, 减少不同批次菌体的差异。使用不超过 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KCl 浸提土壤, 既可保证提取效率, 也能减少对菌体活力的影响。优化后的方法不仅能准确测定不同类型土壤中 NO_2^- 的 ^{15}N 丰度, 对 5~20 nmol 自然丰度 NO_2^- 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值测量精度为 0.1‰~0.9‰, 且大部分 < 0.5‰, 还大幅简化了步骤、缩短了实验周期、节约了成本。

关键词: 反硝化细菌法; 亚硝酸盐; ^{15}N ; 土壤浸提液

中图分类号: S153 文献标志码: A

Optimization of Denitrifier Method for Determination of Soil NO_2^- - ^{15}N Abundance

GUO Ru¹, WEN Teng^{1, 2, 3, 4†}, CAO Yacheng⁵, ZHANG Jinbo^{1, 2, 3, 4}

(1. School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. State Key Laboratory Cultivation Base of Geographical Environment Evolution (Jiangsu Province), Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, China; 4. Key Laboratory of Virtual Geographic Environment (Nanjing Normal University), Ministry of Education, Nanjing 210023, China; 5. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: [Objective] NO_2^- is a key intermediate product of several nitrogen transformation processes in soil, with low concentration and fast transformation. The combination of denitrifier method and mass spectrometry technology has been widely

* 国家自然科学基金项目(41977084)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41977084)

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

作者简介: 郭茹(1997—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事土壤氮转化研究。E-mail: guoru08024@163.com

收稿日期: 2021-06-07; 收到修改稿日期: 2021-08-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-09-09

used in the ^{15}N isotope analysis of NO_3^- or NO_2^- in water. 【 Method 】 This paper aims to optimize the culture and reaction conditions of *Stenotrophomonas nitritireducens* denitrifier method, and to realize the specific, rapid and accurate determination of NO_2^- - ^{15}N abundance in soil extract. Thus, we will optimize the culture method and reaction conditions, and bacterial concentration of denitrifier method, then applied this method to the soil extract. 【 Result 】 There was no significant difference in the ^{15}N isotopic determination of NO_2^- samples between aerobic shaking with seed solution and microaerobic incubation of single colonies. The seed solution ensures the stability of different batches of bacteria and aerobic incubation reduces the incubation time from 7–8 days to 12–15 h. High purity N_2 or He purging for 0.5 h can effectively remove O_2 and blank nitrogen, but the cost of N_2 purging is lower. The transfer of N_2O gas to the dry gas cylinder did not affect the accuracy and precision of the determination results. However, it can prolong the sample preservation time and reduce alkali steam corrosion of the instrument pipeline. Also, using bacteria in logarithmic growth phase and adjusting the reaction system to an OD_{600} value of 0.3–0.9 will ensure their denitrification efficiency and reduce variation between batches. Using no more than $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl to extract the soil will ensure the extraction efficiency and reduce the impact on the viability of the bacteria. 【 Conclusion 】 The optimized method can accurately determine the ^{15}N abundance of NO_2^- in different types of soil with a measurement accuracy of $\delta^{15}\text{N}$ of 5–20 nmol and natural abundance value of NO_2^- between 0.1%–0.9%, with most values being less than 0.5. Also, the experimental period was greatly shortened, simplified steps and save cost.

Key words: Denitrifier method; Nitrite; ^{15}N ; Soil extract

土壤氮转化过程是生物地球化学循环的重要环节。土壤中的氮可分为有机态氮和无机态氮，不同形态的氮在生物和化学作用下可相互转化。在无机态氮中 NO_2^- 是自养硝化、异养硝化、反硝化等多个氮转化过程的关键中间产物^[1-3]，在土壤氮转化过程中不可忽视。 NO_2^- 作为一种独立存在的氮库，与气态氮的排放密切相关，其动态和大小直接影响 N_2O 和 NO 的排放^[4-5]。当 NO_2^- 的消耗速率小于产生速率时，会在土壤中累积，过量累积后进入水生生态系统会影响人类和其他生物健康，也会造成严重的环境问题。因此，将 NO_2^- 纳入生物地球化学模型，有助于进一步了解土壤氮转化过程中氮的损失和保留机制。

NO_2^- 在土壤中代谢迅速，浓度小于 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以 N 计)，常低至 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。土壤中的 NO_2^- 可来源于 NH_4^+ 库、 NO_3^- 库和有机氮库，通过自养硝化、异养硝化、反硝化和 DNRA 等过程转化为 NO_2^- ； NO_2^- 的消耗途径也涉及多个氮转化途径，包括硝化作用、反硝化作用、DNRA、厌氧氨氧化和化学反硝化过程^[6-7]。有研究发现，KCl 溶液提取酸性土壤无机态氮过程中，如未调节提取液 pH， NO_2^- 会发生快速、剧烈的化学反应，导致 NO_2^- 快速消耗的同时，也有明显的 NO_2^- 产生，但消耗速率明显高于产生速率^[8]。长期以来，受测定技术和研究方法的限

制， NO_2^- 同位素的组成难以准确测定。过去很长时间是通过氨基磺酸 ($\text{NH}_3\text{SO}_3\text{H}$) 去除 NO_2^- 后差减得到，误差很大^[9]。Steven 和 Laughlin^[10]首次以 NO_2^- 和 NH_2OH 产生 N_2O 为基础，实现了对 $0.5 \mu\text{mol}$ NO_2^- 和 $5 \mu\text{mol}$ NO_3^- 同位素组成的准确测定，但这一方法仅适用于标记样品，对自然丰度或低浓度标记样品测定误差较大；Silva 等^[11]提出离子交换法及封管燃烧法分析低丰度的样品，但只适用于淡水样品，不适用于土壤 KCl 提取液，且样品预处理繁琐、成本昂贵。McIlvin 和 Altabet^[12]、Isobe 等^[13]、Lachouani 等^[14]、Tu 等^[15]利用镉/氯化钒和叠氮化物两步还原法，分别测定水体或土壤浸提液中低浓度 NO_3^- 和 NO_2^- 同位素组成，但存在 N 同位素分馏、O 同位素与水交换现象，产生的 HN_3 为剧毒物质。Sigman 等^[16]和 Casiotti 等^[17]利用缺乏 N_2O 还原酶的反硝化细菌将 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 还原为 N_2O ，实现对水体/土壤浸提液中的极低浓度 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 同位素组成的测定，但是无法区分 NO_2^- 、 NO_3^- ，虽可用抗坏血酸分离 NO_2^- ，但操作步骤繁琐，且分离不完全^[18]。Böhlke 等^[19]首次利用两种反硝化菌 *Stenotrophomonas nitritireducens* 和 *Pseudomonas aureofaciens*，先专一还原 NO_2^- 为 N_2O ，再还原 NO_3^- 为 N_2O ，实现了同一水体样品中低浓度 NO_2^- 和 NO_3^- (5 nmol N) 同位素组成的准确测定，但是该方法操

作较繁琐,培养周期长,是否适合土壤浸提液还未可知。

反硝化细菌法采用缺乏 N_2O 还原酶活性的兼性反硝化细菌,将 NO_3^- 和 NO_2^- 还原为 N_2O ^[17],而不产生 N_2 。*P. aureofaciens* 和 *P. chlororaphis* 是被广泛使用的两种反硝化细菌,用于测定水体样品的 ^{15}N 丰度测定,如淡水、地下水、沉积物孔隙水等,但它们无法区分 NO_2^- 和 NO_3^- ,而 *S. nitritireducens* 菌能专一还原 NO_2^- ,不与 NO_3^- 反应,曾被用于构建专一测定 NO_2^- 的微生物电极^[20-21],Böhlke 等^[19]首次将其用于测定水体样品中的 NO_2^- 同位素组成。与水体样品相比,土壤浸提液成分复杂,具较强缓冲能力^[22],含有大量可溶性颗粒物^[23],而且不同类型的土壤样品差异大,在酸性土壤中 NO_2^- 极不稳定^[7]。土壤浸提液含大量 K^+ 、 Cl^- ,不但影响反硝化菌的转化能力,还存在杂质氮干扰测定^[23-26]。所以,当前的反硝化细菌反应体系是否适合不同类型的土壤浸提液还需进一步验证。反硝化细菌法中菌体的反硝化能力直接影响 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的转化率,为避免低转化率造成的同位素分馏,一般采用长时间厌氧/微氧培养(5~10 d)^[19, 26-27],培养过程中不同批次的菌体差异往往很大。但目前使用的 *S. nitritireducens*、*P. aureofaciens* 和 *P. chlororaphis* 均为兼性菌,能同时适应厌氧和好氧条件,好氧条件下菌体生长迅速,改为好氧培养能有效缩短培养时间,是否对测定结果有影响还需探讨。反硝化反应的中止通常使用 10 M NaOH,高浓度碱液产生的气体会腐蚀质谱仪器管路,中止后的样品需要在 2 d 内完成测定,对样品测定造成不便^[16, 28]。此外,与化学转化法相比,反硝化细菌法未被广泛采用的一个重要原因是,菌体培养过程存在诸多不稳定因素,直接影响测定结果的准确性^[27]。处于不同生长期的菌体,其反硝化能力差异很大,对测定结果影响显著;同一批次的菌种,菌体浓度差异也会影响反硝化转化能力;厌氧培养菌体生长极为缓慢,难以控制菌体生长时期;长时间的厌氧培养还存在染菌风险。因此,如何有效减少这些不稳定因素,也是亟需解决的技术难题。

本研究在 Böhlke 等^[19]的基础上,从缩短反硝化细菌的培养时间、提升菌体培养稳定性等入手,在培养方式、反应条件、保存方式上优化反硝化细菌法,结合土壤浸提液的特点旨在建立一套快速、准

确、稳定测定土壤浸提液中 NO_2^- 的 ^{15}N 丰度的反硝化细菌方法体系。同时,使用优化后的方法测定了酸性、中性和碱性土壤浸提液中 NO_2^- 的 ^{15}N 丰度。

1 材料与方法

1.1 反硝化细菌法操作步骤

本文所用菌种为 *Stenotrophomonas nitritireducens* (ATCC No. BAA-12),具体实验流程如下:2 管种子液解冻 15~30 min,无菌环境下接种至含 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,培养基成分为 TSB (tryptic soy broth) ($15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 KH_2PO_4 ($2.45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),放入摇床(常州普天仪器制造有限公司, HZQ X160, HZQ F160) 26°C 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 好氧培养 12~15 h。摇培好的菌液经 $9\ 800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,使用新鲜培养基重悬洗涤 3 遍,分装 4 mL 至 22.5 mL 的顶空样品瓶中,用丁基塞和旋口塑料盖密封后,使用高纯 N_2 (99.999%) 吹扫 30 min。设置空白对照,分为仅菌液空白对照、菌液+1 mL 超纯水/KCl 溶液空白,其余含菌液瓶中加入 1 mL $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品 (20 nmol NO_2^-),待反应至少 1 h 后取气。抽取顶空瓶内 12~14 mL 气体,注入含 1~2 片 NaOH 固体的 22.5 mL 真空瓶中,补充高纯 N_2 平衡压力,使用带微量气体预浓缩装置的同位素比值质谱仪 (PreCon-GasBench-IRMS, Delta V Plus, Thermo Fisher Scientific) 测定气体样品中的 N_2O 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值,即为 NO_2^- 的 ^{15}N 丰度。

1.2 细菌培养条件优化

本实验使用的 *S. nitritireducens* (ATCC No. BAA-12) 购自美国菌种保藏中心 (American type culture collection, USA)。将装有冻干粉的安瓿清洁后(75% 乙醇),无菌环境下吸取 0.2 mL 无菌水溶解至悬浮状,接种环接至 1~2 个 TSA (tryptic soy agar) 平板培养基,适宜温度培养 1~2 d,挑取单菌落转接培养第 2 代用作工作菌种保藏。

为保证不同批次菌体的稳定性、减少染菌风险、节约菌体前期生长培养时间,采用 Weigand 等^[27]方法制备大量种子液冻存,以备多次实验需要。具体过程:工作菌种挑单菌落转接到含 100 mL TSB 培养基 (tryptic soy broth) 的 500 mL 三角瓶内, 26°C 、

120 r·min⁻¹好氧摇培 21~22 h, 此时菌种处于对数生长末期和稳定期, 2 mL 无菌离心管内加入 500 μL 无菌 30%甘油和 500 μL 菌液, 摇匀后-80℃冰箱冻存。

(1) 接种方式的优化。对反硝化细菌 *S.nitritireducens* 的接种方式进行优化。在同批次内设置单菌落和种子液两种接种方式, 各设置 3 个重复。单菌落接种需先在 TSA (tryptic soy agar) 平板上培养 2~3 d, 待成熟后挑单菌落至含 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶内, 26℃、180 r·min⁻¹好氧摇培 12~15 h。种子液接种指从-80℃冰箱取出 2 管 1 mL 种子液, 4℃解冻后转接至含 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶内, 26℃、180 r·min⁻¹好氧摇培 12~15 h。使用实验室标样 Lab-1 作为样品, 比较两种接种方式对其 δ¹⁵N 值的影响。

(2) 培养方式的优化。在不同批次间设置微氧摇培和好氧摇培两种情况。微氧摇培参考 Böhlke 等^[19]的实验, 即取 2 管种子液加入含 100 mL 培养基的 120 mL 密封血清瓶中, 留部分顶空, 每天注入 1 mL O₂, 26℃、120 r·min⁻¹微氧摇培 4~5 d, 继而开展后续步骤。好氧摇培即取 2 管 1 mL 种子液接种至含 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶内, 瓶口覆盖 8 层纱布, 26℃、180 r·min⁻¹好氧摇培 12~15 h。使用实验室标样 Lab-1 作为样品, 比较两种培养方式对其 δ¹⁵N 值的影响。

(3) 反硝化细菌浓度优化。为考察反硝化细菌浓度对 NO₂⁻-¹⁵N 同位素测定的影响, 设立不同 OD₆₀₀ 值的菌体浓度, 对标记丰度的实验室标准样品 (KNO₂-A、KNO₂-B、KNO₂-C) 和自然丰度的国际标准样品 (RSIL-N7373、RSIL-N10219、RSIL-N23) 分别进行测定。菌体 OD₆₀₀ 值的测定方法如下: 使用紫外分光光度计调至波长 600 nm 进行测定, 选取杯差接近的比色皿, 以培养基作为空白对照并倒入菌液进行测定, 可测 3 次值取平均。其中, 第一批次菌体的 OD₆₀₀ 值分别为 0.42、0.67、0.78、1.18, 用于标记标准样品的测定; 第二批次菌体 OD₆₀₀ 值分别为 0.29、0.32、0.58、0.60、0.70、0.88、2.10, 用于自然丰度的国际标准样品测定。

1.3 反应条件优化

(1) 气体吹扫优化。反硝化细菌法需使用惰性气体吹扫创造厌氧环境, 去除残留空白 (NO₃⁻、NO₂⁻ 和 N₂O), 本文对高纯 He (99.999%)、高纯 N₂ (99.999%) 两种惰性气体吹扫进行比较。样品吹扫

时使用 5 号长针头作为进气针, 插入到液面以下, 5 号短针头作为出气针, 不插入液面。为比较吹扫后培养基中残留空白的量及空白量是否对样品 δ¹⁵N 值产生影响, 设置仅菌液 (无样品)、1 mL 超纯水+菌体、1 mL 标准样品 Lab-1+菌体, 每组 3 个重复, 吹扫后上质谱仪测定。

(2) 气体保存优化。设置转移气体和不转移气体两种气体保存方式, 各设置 3 个重复。转移气体处理需使用带锁帽的注射器从 22.5 mL 培养瓶顶空抽取约 12~14 mL 气体, 转移至预先抽真空的含 1~2 片 NaOH 固体的 22.5 mL 顶空瓶中, 补入 14 mL 高纯 He 保持正压状态。不转移气体处理是直接在含有样品和菌液的培养瓶中, 使用带双套针的进样装置连接培养瓶, 需当天在质谱仪上完成测样。

1.4 土壤浸提液 NO₂⁻ 的 ¹⁵N 同位素测定

(1) 不同浓度 KCl 对 NO₂⁻ 的 ¹⁵N 同位素测定的影响。土壤浸提液中含大量 K⁺、Cl⁻, 可能影响 NO₂⁻ 的 ¹⁵N 同位素比值分析。使用 0.1 mol·L⁻¹、0.5 mol·L⁻¹、1 mol·L⁻¹、2 mol·L⁻¹ 的 KCl 配制 Lab-1 标准样品, 溶液浓度为 20 μmol·L⁻¹, 反硝化细菌法过程采用优化后的流程。每个标准品设 4 个重复, 同时设置仅含菌体和 0.1、0.5、1、2 mol·L⁻¹ KCl 的空白对照以及配制的三个国际标准样品, 探究不同浓度 KCl 对反硝化细菌法的影响。

(2) 不同土地利用类型土壤中 NO₂⁻ 的 ¹⁵N 同位素测定。供试土壤为江西鹰潭森林土 (28°14'N, 117°13'E)、安徽安庆水稻土 (30°52'N, 117°05'E)、吉林长春水稻土 (43°88'N, 125°35'E)、广西壮族自治区桂林水稻土 (25°27'N, 110°29'E)、四川盐亭农田土 (31°23'N, 105°35'E), 土壤晾干、过 2 mm 筛存于 4℃冰箱。称取 20 g 干土, 1 mol·L⁻¹ KCl 以 5:1 (液:土) 提取, 250 r·min⁻¹ 振荡 30 min, 悬液静置 3~5 min 后过滤待用。本文使用的 KCl 均在马弗炉烘 450℃、48 h。此外, 在使用反硝化细菌法测定土壤浸提液 NO₂⁻ 之前, 先测定 NO₂⁻ 的浓度, 其浓度极低、几乎低于检测限, 因此在土壤浸提液中人为添加了 20 nmol NO₂⁻ 的 Lab-1 (理论丰度为-13.58‰)。在同批次内, 样品设置如下: 空白设置为菌液、1 mol·L⁻¹ KCl, 且使用 1 mol·L⁻¹ KCl 配制三个标准样品 RSIL-N7373、RSIL-N10219、RSIL-N23 进行校正, 并使用化学法进行验证。

1.5 样品溶液的配制

实验中所使用的同位素标样(表 1)有国际标准样品 RSIL-N7373、RSIL-N10219、RSIL-N23(The Reston Stable Isotope Laboratory),也有实验室日常工作标样(国药分析纯)Lab-1、 KNO_2 -A、 KNO_2 -B、 KNO_2 -C,在元素分析仪-同位素质谱联用仪测定后,用国际标准样品校准。反硝化法实验中,根据实验需要,所有标样均使用超纯水或 0.1 、 0.5 、 1 、 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 配制为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

表 1 本文使用的同位素标准样品

样品名称 ¹⁾	$\delta^{15}\text{N}$ 理论丰度 ²⁾	$\delta^{18}\text{O}$ 理论丰度 ³⁾
Sample ID	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Air}}/\text{‰}$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}/\text{‰}$
Lab-1	-13.58	/
RSIL-N7373	-79.6	+4.5
RSIL-N10219	+2.8	+88.5
RSIL-N23	+3.7	+11.4
KNO_2 -A	+112.38	/
KNO_2 -B	+165.00	/
KNO_2 -C	+422.17	/

注: 1) Lab-1 是本实验室配制的 NaNO_2 标准样品, RSIL 是购自 Reston Stable Isotope Laboratory 的 NaNO_2 标准样品, KNO_2 -A、 KNO_2 -B、 KNO_2 -C 是本实验室配制的三个不同 $\delta^{15}\text{N}$ 丰度的标准样品。2) $\delta^{15}\text{N}_{\text{Air}}$ 是相对于空气 N_2 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值。3) $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ 是相对于维也纳标准平均海洋水的 $\delta^{18}\text{O}$ 值。
Note: 1) Lab-1 is the standard sample of NaNO_2 prepared by our laboratory, RSIL is the standard sample of NaNO_2 purchased from Reston Stable Isotope Laboratory, and KNO_2 -A, KNO_2 -B and KNO_2 -C are three standard samples with different $\delta^{15}\text{N}$ abundance prepared by our laboratory. 2) $\delta^{15}\text{N}_{\text{Air}}$ is the $\delta^{15}\text{N}$ value relative to air N_2 . 3) $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ is the $\delta^{18}\text{O}$ value relative to the Vienna standard mean marine water.

1.6 数据处理与校正

本文中测定得到的 $\delta^{15}\text{N}$ 值均为相对于大气 N_2 的 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Air}}$, 其中 $\delta^{15}\text{N}$ 校正值为经国际标准品校正的值。文中数据处理采用 Origin 9、SPSS 19.0 统计分析, 并采用 t 检验和方差分析法来检验差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 培养条件的优化

2.1.1 接种方式的影响

分别使用单菌落、种子

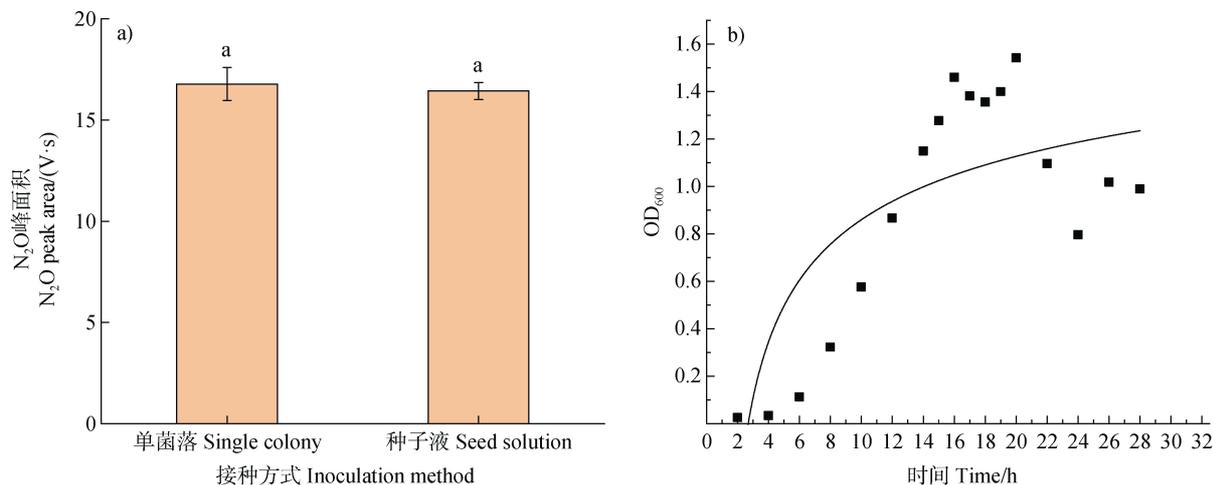
液两种接种方式培养 *S. nitritireducens*, 发现转化 NO_2^- 为 N_2O 的效率及其 $\delta^{15}\text{N}$ 值无明显差异, 但种子液培养时间短, 不同批次菌体浓度稳定、操作简便, 且可降低染菌风险。结果显示, 单菌落和种子液两种接种方式处理 Lab-1 标样后, 产生 N_2O 气体的 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ 44 峰面积分别为 $16.78 \text{ V}\cdot\text{s}$ 、 $16.44 \text{ V}\cdot\text{s}$ (图 1 a), 差异不显著 ($P>0.05$), 可见两种接种方式的转化效率相当。两种方式产生 N_2O 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值也无明显区别 ($P>0.05$), 分别为 -12.46‰ 、 -12.34‰ , 与 Lab-1 在元素分析仪-同位素质谱联用仪上的测定结果 (-13.58‰) 较一致, 种子液接种的 SD 值 (0.29‰) 略大于单菌落接种 (0.03‰), 与 Böhlke 等^[19]报道的 $0.2\text{‰}\sim 0.5\text{‰}$ 相吻合。在培养时间上, 种子液摇培 0.5 d 即可使用, 而单菌落法需先在平板上培养 1~2 d, 再转接至液体培养基摇培 2~5 d, 操作繁琐, 可能增加染菌风险。反硝化细菌的转化能力与菌体所处生长时期有关, 而种子液接种能提高菌体的可控性和稳定性, 减少不同批次间的菌种培养的差异。这一方法已被推荐用于 *P. aureofaciens* 和 *P. chlororaphis* 测定 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 的同位素组成^[23], 虽然所使用菌体不同, 但均能缩短实验周期、减少菌体培养不当产生的测定问题。

2.1.2 好氧培养的影响

微氧摇培和好氧摇培两种方式对 Lab-1 标样的 $\delta^{15}\text{N}$ 值测定结果无显著差异 ($P>0.05$), 分别为 $-12.34\text{‰}\pm 0.29\text{‰}$ 和 $-13.93\text{‰}\pm 0.14\text{‰}$, 好氧摇培下的 $\delta^{15}\text{N}$ 值更接近理论丰度且 SD 值更小。*S. nitritireducens* 是兼性菌, 好氧或厌氧条件均能生长, 在厌氧条件下能保证菌体的反硝化能力, 但菌体生长非常缓慢, 好氧条件下菌体长势更好, 在 4~16 h 能迅速到达对数生长期(图 1 b)。Böhlke 等^[19]采用 50 mL 密封瓶添加 35 mL 培养基或 160 mL 密封瓶添加 130 mL 培养基, 微氧培养菌体 2~5 d(需每天补入 O_2) 才能用于样品制备; 好氧培养无需使用密封瓶, 在 250 mL 三角瓶加入 100 mL 培养基, 以八层纱布和报纸封口, 摇培过夜 (12~15 h), 次日即可使用, 耗时更短, 操作更便捷。过去经常使用厌氧/微氧培养^[16-17]的方法, 是因为好氧培养难以激发菌体的反硝化能力, 在使用 *P. aureofaciens* 测定 NO_3^- 的同位素比值时, 发现培养环境中 O_2 含量过高, 虽然菌体生长迅速, 但较高的菌体浓度造成 NO_3^- 转化速率变慢, 反硝化产物以 NO 为主, N_2O

较少, 会发生同位素分馏^[26]。但对于兼性菌, 在好氧培养后, 通过一定时间吹扫高纯 N₂ 或 He 气体, 可以促使菌体适应厌氧生长环境, 激发反硝化能力, 还能有效去除培养液中的残留 NO₂⁻ 或 NO₃⁻。近期也

有报道对 *P. aureofaciens* 尝试好氧培养 24 h, 再通过长达 3 h 吹扫高纯 N₂, *P. aureofaciens* 能迅速转化 NO₃⁻ 为 N₂O, 反硝化能力不受影响, 无同位素分馏现象, 且大大缩短培养时间^[29]。



注: 图中相同字母表示无显著差异 ($P > 0.05$)。Note: The same letter in the graph indicates no significant difference ($P > 0.05$) .

图 1 培养条件的优化对测定样品的峰面积对比 (a) 及好氧摇培 *S. nitritireducens* 的生长曲线 (b)

Fig. 1 Optimization of culture conditions on the comparison of peak areas of measured samples (a) and growth curves of aerobic shake culture of *S. nitritireducens* (b)

2.2 反应条件的优化

2.2.1 气体吹扫的影响

反硝化细菌法测定 NO₂⁻ / NO₃⁻ 的同位素比值时, 需吹扫惰性气体建立厌氧环境, 同时去除培养基中残留的 NO₃⁻、NO₂⁻ 和 N₂O, 减少空白杂质对测定结果的影响^[16, 19]。通常选用高纯 N₂ 或 He 吹扫, 在 NO₃⁻ 的测定上曾比较过两种气体, 发现均可用于吹扫, 测定结果主要受吹扫时间长短影响^[25-27]。结果表明 He 和 N₂ 气体吹扫 0.5 h 对 Lab-1 标样的测定结果无显著差别 ($P > 0.05$), 分别为 $-12.37\% \pm 1.11\%$ 、 $-12.46\% \pm 0.03\%$, 与元素分析仪-同位素质谱联用仪的测定结果吻合。Böhlke 等^[19]使用高纯 He 吹扫 0.5 h, 在仅添加去离子水和菌液的空白对照中产生的 N₂O 为 0.05 ± 0.04 nmol, 实验使用高纯 N₂ 吹扫 0.5 h 后, 空白对照产生的 N₂O 峰面积 ≤ 0.5 V·s, 而 20 nmol NO₂⁻ 样品产生的峰面积 ≥ 16.5 V·s, 空白的峰面积不足 0.3%, 产生的 N₂O ≤ 0.07 nmol。但是, 在 *P. aureofaciens* 转化为 NO₃⁻ 时, 高纯 N₂ 吹扫 1.5 h 后, 空白占 40 nmol NO₃⁻ 样品的峰面积仍可达到 7.96%, 只有 3 h 或两次 1.5 h 吹扫后才能低于 1%^[29]。*P. aureofaciens* 和

S. nitritireducens 使用的培养基成分类似, 可能培养基中残留 NO₃⁻ 大于 NO₂⁻, 需要充分吹扫去除, 避免影响 NO₃⁻ 的测定, 而 *S. nitritireducens* 专一利用 NO₂⁻, 短时间吹扫即可。综上, 在 NO₂⁻ 测定上, 建议选择更为经济的高纯 N₂ 吹扫 0.5 h。

2.2.2 气体保存方式的影响

反硝化菌法测定 NO₃⁻ / NO₂⁻ 时, 在上机测定前需加入适量高浓度 NaOH 或 KOH (10 M) 中止反硝化反应, 灭活样品带入的其他反硝化菌, 防止 N₂O 被还原为 N₂, 并吸收培养时产生的 CO₂, 避免干扰 N₂O 的测定^[16, 19, 27]。为避免碱液进入质谱仪器, 进样时需额外添加消泡剂, 但碱蒸汽仍会随 N₂O 进入仪器腐蚀管路。本文发现直接转移 N₂O 气体至抽真空干燥气瓶和不转移, 对 Lab-1 样品中 NO₂⁻ 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值并无显著影响 ($P > 0.05$), 分别为 $-12.57\% \pm 0.05\%$ 、 $-12.34\% \pm 0.29\%$, 产生 N₂O 气体的 $m\cdot z^{-1}$ 44 峰面积分别为 9.57 V·s、16.44 V·s, 与不转移气体相比, 虽然转移气体后峰面积下降了约 1/2, 但其 $\delta^{15}\text{N}$ 值更接近样品理论丰度, SD 值仅为 0.05%。过去通常不采用气体转移的方式, 是由于 N₂O 气体可溶于水, 且顶空气体

无法完全转移,可能发生同位素分馏^[16, 19, 28, 30]。但 Morkved 等^[25]发现,反硝化细菌测定土壤样品的 NO_3^- 时,由于土壤中的 NO_3^- 浓度一般高于水体,在液体:顶空>1:5 的培养瓶中,室温下转移气体产生的误差 $\leq 0.09\%$,液体:顶空>1:11 时,误差 $\leq 0.05\%$,均与理论丰度吻合良好,而本实验中使用的培养瓶的液体:顶空=1:3.5,产生的误差仅为 0.05%,较不转移气体更接近样品理论丰度。事实上,在每批次的试验时均包括 2 个以上的标准品,标准品的操作与样品完全相同,即使有同位素分馏现象,也可通过标准品校正测定结果。本文中的不转移方式,并未使用 McIlvin 和 Casciotti^[28]的双套针优化装置,无法吹扫溶解于液体中的 N_2O ,因此测定结果精密度和准确度略差于转移气体的方式,但是转移气体的另一优点是,可以长时间稳定保存样品 6 个月,灵活安排样品测定。

2.3 菌体浓度的影响

反硝化反应时菌体浓度的高低可能影响测定结果。分别对不同 OD_{600} 值菌体进行两批次的实验结果显示(表 2),在第一批次中, OD_{600} 值变化范围为 0.4~1.2,对三个标记标准样品的测定并没有显著差异($P>0.05$),因标样 ^{15}N 丰度较高,测定值和理论值存在 5%~15% 的差异,但差异比例均不超过 5%,与理论值基本吻合,测定的精密度良好,标样 $\text{KNO}_2\text{-A}$ (112.38%) 的 SD 值为 0.1%~0.6%;标样 $\text{KNO}_2\text{-C}$ (422.17%) 的 SD 值为 2.3%~2.7%。在第二批次中, OD_{600} 值变化范围为 0.2~2.0,对三个国际标准品的测定结果中除 $\text{OD}_{600}=2.10$ 外,其余无明显差异($P>0.05$),尽管测定值与实际值仍有差异,但校正值与实际值基本一致,测定精密度好,RSIL-N7373 的 SD 为 0.09%~0.56%,RSIL-N10219 的 SD 仅为 0.04%~0.13%,RSIL-N23 的 SD 为 0.04%~0.31%。因此, $\text{OD}_{600}\leq 1.2$ 的菌体浓度,可准确测定标记样品和自然丰度样品的 NO_2^- - ^{15}N 值,考虑到分光光度计的测定准确性,建议使用 $\text{OD}_{600}=0.3\sim 0.9$ 的菌体浓度。

已有研究表明,反硝化细菌法测定 NO_3^- 时,菌体浓度对其反硝化能力有很大影响,过高或过低菌体浓度均可能造成转化不彻底,产生同位素分馏^[26-27, 30]。菌体浓度主要与菌体所处生长时期有关,也和浓缩、稀释等操作有关,可通过 OD_{600} 或

OD_{550} 值表示。Zhu 等^[26]和 Stock 等^[29]发现处于对数生长期的 *P. aureofaciens* ($\leq 5.6\times 10^8$ cells·mL⁻¹) 才能保证反硝化效率,保持稳定的 O 同位素交换,而稳定期或衰亡期的菌体生理代谢减缓,反硝化能力下降。Zhu 等^[26]还指出反应体系里 *P. aureofaciens* 菌体数量不宜过高,否则转化速率明显下降, O 同位素交换加剧,测定的精密度和准确度均降低。实验中 *S. nitritireducens* 摇培 12~15 h 后,菌体生长曲线显示进入对数生长期,菌体数量约为 5.4×10^6 cells·mL⁻¹,低于 10^8 cells·mL⁻¹。使用不同 OD_{600} 值的对数期菌体与样品进行反应的结果也显示,过高的菌体浓度 ($\text{OD}_{600}\geq 0.9$) 会造成转化效率下降,同位素分馏作用明显,影响测定结果。反应体系中的培养基仅为 4 mL,过高菌体浓度会造成菌体之间竞争营养、生长不良,反硝化能力相应下降。与菌体计数相比, OD_{600} 测定操作简便,也能反映菌体的浓度高低,在不同批次的菌体培养中维持相似的 OD_{600} ,还能保证批次间实验结果的稳定性。

2.4 土壤浸提液的优化

2.4.1 不同浓度 KCl 的影响 土壤浸提液中含有大量 K^+ 、 Cl^- ,可能影响反硝化菌体活力,分别测定了 0.1 mol·L⁻¹、0.5 mol·L⁻¹、1 mol·L⁻¹、2 mol·L⁻¹ KCl 配制的 Lab-1 标样的 $\delta^{15}\text{N}$ 值,发现除 2 mol·L⁻¹ KCl 明显低于理论丰度($P<0.05$),其余均与理论值相近,测定的精密度良好。有研究表明 KCl 中含有杂质氮会干扰 NO_3^- 的测定^[31],本文使用的 KCl 事先经 450℃ 高温灰化 48 h,可去除大部分 NO_2^- 杂质,因此 KCl 空白对照(菌液+KCl)与纯水空白对照(超纯水+菌液)产生的 N_2O m·z⁻¹44 峰面积相当,不超过样品峰面积的 0.5%。也有研究指出高盐体系会抑制 *P. aureofaciens* 菌体活性,降低 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 转化速率,产生同位素分馏, $\delta^{15}\text{N}$ 值明显降低,因此 KCl 浓度不宜超过 0.5 mol·L⁻¹,建议使用 0.25 mol·L⁻¹^[25-26,29]。但是,对 *S. nitritireducens*,与 0.1、0.5 mol·L⁻¹ KCl 相比,1 mol·L⁻¹ KCl 对其转化 NO_2^- 为 N_2O 是有一定抑制作用,产生的 N_2O 信号峰面积明显降低(图 2c),但 $\delta^{15}\text{N}$ 测定值却无显著差异。传统方法通常使用 2 mol·L⁻¹ KCl 或 1 mol·L⁻¹ CaCl_2 提取土壤中的无机氮,虽然有研究曾使用低至 0.01 mol·L⁻¹ 的 CaCl_2 提取农田土壤^[31],但过低的 KCl 浓度可能影响提取效率,不同类型土壤差异很大,适合的 KCl 浓度也

表 2 菌体 OD₆₀₀ 值对 NO₂⁻ 的 δ¹⁵N 测定值的影响Table 2 Influence of OD600 value of bacteria on the δ¹⁵N determination of NO₂⁻

20 μmol·L ⁻¹ NO ₂ ⁻ (第一批次 Set 1)									
菌体 OD ₆₀₀	KNO ₂ -A			KNO ₂ -B			KNO ₂ -C		
Cell OD ₆₀₀	δ ¹⁵ N/‰	SD	<i>n</i>	δ ¹⁵ N/‰	SD	<i>n</i>	δ ¹⁵ N/‰	SD	<i>n</i>
0.42	107.67	0.51	5	158.00	0.96	5	409.26	2.32	5
0.67	107.51	0.57	5	157.83	0.76	5	407.03	2.77	5
0.78	107.55	0.29	5	158.00	0.28	5	/	/	/
1.18	106.34	0.15	4	156.18	0.33	4	/	/	/
20 μmol·L ⁻¹ NO ₂ ⁻ (第二批次 Set 2)									
菌体 OD ₆₀₀	RSIL-N7373			RSIL-N10219			RSIL-N23		
Cell OD ₆₀₀	δ ¹⁵ N / ‰	SD	<i>n</i>	δ ¹⁵ N / ‰	SD	<i>n</i>	δ ¹⁵ N / ‰	SD	<i>n</i>
0.29	-74.26	0.37	3	2.37	0.04	3	3.72	0.16	3
0.32	-74.78	0.14	3	2.21	0.04	3	3.65	0.03	3
0.58	-74.36	0.09	3	2.23	0.12	3	3.59	0.00	3
0.60	-74.42	0.56	3	1.10	0.10	3	3.23	0.10	3
0.70	-74.26	0.11	3	2.04	0.13	3	3.34	0.12	3
0.88	-75.93	0.52	3	0.94	0.06	3	2.99	0.04	3
2.10	-42.85	3.13	3	-5.09	0.39	3	-4.51	0.16	3

注: KNO₂-A、KNO₂-B、KNO₂-C 均为本实验室配制的标记丰度溶液, δ¹⁵N 理论丰度值分别为 112.38‰、165.00‰、422.17‰; RSIL-N7373、RSIL-N10219、RSIL-N23 均为国际标准自然丰度样品溶液, δ¹⁵N 理论丰度值分别为 -79.6‰、2.8‰、3.7‰。“/”代表未使用 KNO₂-C 的样品。“SD”代表标准误差, “*n*”代表重复个数。Note: KNO₂-A、KNO₂-B、KNO₂-C are all labeled abundance solutions prepared by our laboratory. The theoretical abundance values of δ¹⁵N are 112.38‰, 165.00‰, and 422.17‰ respectively; RSIL-N7373, RSIL-N10219, RSIL-N23 are international standard natural abundance sample solutions, and the theoretical abundance values of δ¹⁵N are -79.6‰, 2.8‰, and 3.7‰ respectively. "/" represents a sample that does not use KNO₂-C. "SD" represents the standard deviation, and "*n*" represents the number of repeats.

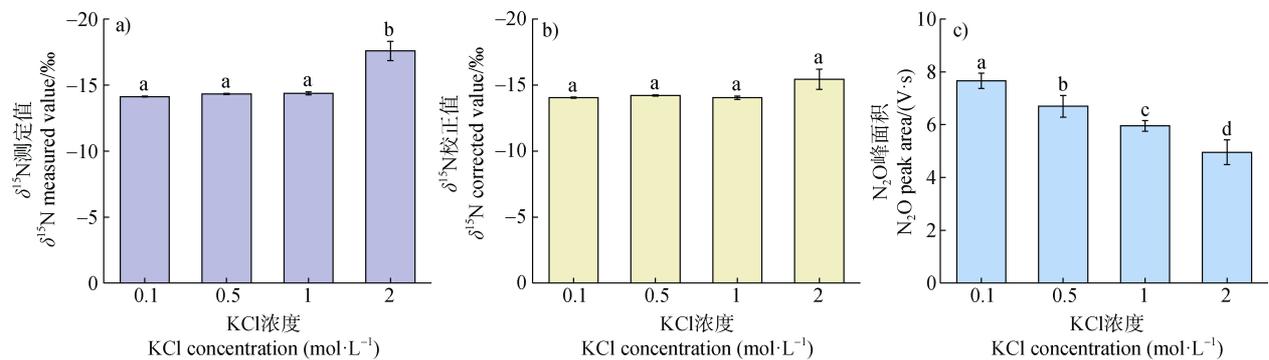
会有较大差异, 所以建议使用不低于 1 mol·L⁻¹ 的 KCl。对于 2 mol·L⁻¹ KCl 配制的 δ¹⁵N 测定值 (-17.58‰) 虽然明显低于理论值, 但在使用同浓度 KCl 配制的三个国际标准样品校正后, 校正值和理论值基本一致 (图 2b)。所以, 在实际测定中, 建议应使用和土壤样品同浓度的 KCl 配制标准样品, 同时设置仅含 KCl 和菌液的空白对照, 以此估算并校正 KCl 对测定结果的影响。

2.4.2 不同土地利用类型土壤浸提液的测定 使用上述优化后的反硝化细菌法反应体系, 测定不同 pH 的农田、水稻、森林土壤中 NO₂⁻ 的 ¹⁵N 丰度, 发现测定结果与化学转化法无明显差异 ($P>0.05$), 且反硝化细菌法的 SD 值基本小于化学转化法 (表 3)。

由于试验土壤中的 NO₂⁻ 浓度极低, 人为添加了 20 nmol NO₂⁻ (理论 ¹⁵N 丰度为 -13.58‰), 结果显示, 测定值均接近添加 NO₂⁻ 的理论丰度。本次供试土壤包括了碱性紫色土和酸性森林土、水稻土, 其中酸性土壤常有报道显示其 NO₂⁻ 较不稳定、难以测定, 但使用优化后的反硝化细菌反应体系得到的测定结果稳定、准确。

3 结论

本文针对 *S.nitritireducens* 能专一还原 NO₂⁻ 为 N₂O 这一特性, 在 Böhlke 等基础上从培养方式、反



注:图中相同字母表示无显著差异($P > 0.05$),不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。Note: The same letter in the graph indicates no significant difference ($P > 0.05$), different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图2 不同浓度 KCl (0.1, 0.5, 1, 2 mol·L⁻¹) 对样品 NO_2^- 的 $\delta^{15}\text{N}$ 测定值 (a)、 $\delta^{15}\text{N}$ 校正值 (b) 和转化产生 N_2O 峰面积 (c) 的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of KCl (0.1, 0.5, 1, 2 mol·L⁻¹) on the $\delta^{15}\text{N}$ determination (a), the $\delta^{15}\text{N}$ correction (b) and the converted N_2O peak area (c) of the sample NO_2^-

表3 不同土地利用类型土壤 NO_2^- 的 ^{15}N 丰度测定结果

Table 3 Results of ^{15}N abundance measurements for different types of land use soil NO_2^-

土地利用类型 Land use types	pH	$\delta^{15}\text{N}$ 校正值 Corrected values \pm SD/ %	
		反硝化细菌法 Denitrifier method	化学转化法 Chemical method
旱地 (四川盐亭) Agricultural soil (Yanting, Sichuan)	7.96	-13.46 \pm 0.28	-13.81 \pm 0.21
水田 (广西桂林) Rice soil (Guilin, Guangxi)	7.28	-14.06 \pm 0.04	-14.81 \pm 0.23
水田 (吉林长春) Rice soil (Changchun, Jilin)	6.23	-13.84 \pm 0.08	-14.11 \pm 0.38
水田 (安徽安庆) Rice soil (Anqing, Anhui)	5.23	-14.26 \pm 0.05	-13.44 \pm 0.57
林地 (江西鹰潭) Forest soil (Yingtang, Jiangxi)	4.40	-13.68 \pm 0.17	-12.78 \pm 0.41

注:人为添加了 20 nmol 的 NO_2^- (理论 ^{15}N 丰度为 -13.58‰), 土壤样品的 $\delta^{15}\text{N}$ 校正值为使用 RSIL-N7373、RSIL-N10219、RSIL-N23 三种国际标准品校正后的结果。Note: 20 nmol of NO_2^- was artificially added (theoretical ^{15}N abundance of -13.58‰) and the $\delta^{15}\text{N}$ calibration values for the soil samples were corrected using three international standards, RSIL-N7373, RSIL-N10219 and RSIL-N23.

应条件等方面进行优化,使其能实现对土壤浸提液中 NO_2^- 的 ^{15}N 丰度的快速、准确、稳定测定。优化后的菌体培养方式为种子液接种后,好氧摇培 12~15 h,即可获得处于对数生长期的菌体,调节反应体系中的菌体 OD_{600} 值为 0.3~0.9,可保证菌体反硝化能力稳定,减少不同批次间的差异,且实验周期

缩短为 1~1.5 d。反应结束后,转移气体至真空气瓶,不影响测定结果的准确性和精密性,还能延长样品保存时间,减少碱蒸汽腐蚀仪器管路。使用高纯 N_2 代替高纯 He 吹扫样品 0.5 h,既可节约成本,又能创造厌氧环境、去除杂质氮。使用不超过 1 mol·L⁻¹ 的 KCl 浸提土壤,保证提取效率的同时,

也能减少高盐对菌体活力的影响。对酸性、中性、碱性不同类型土壤,其 20 nmol NO₂⁻的 ¹⁵N 丰度测定 δ¹⁵N 值的精度为 0.1‰~0.9‰,测定结果准确可靠。

参考文献 (References)

- [1] Müller C, Clough T J. Advances in understanding nitrogen flows and transformations: Gaps and research pathways[J]. The Journal of Agricultural Science, 2014, 152 (S1) : 34—44.
- [2] Russow R, Stange C F, Neue H U. Role of nitrite and nitric oxide in the processes of nitrification and denitrification in soil: Results from ¹⁵N tracer experiments[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41 (4) : 785—795.
- [3] Rütting T, Müller C. Process-specific analysis of nitrite dynamics in a permanent grassland soil by using a Monte Carlo sampling technique[J]. European Journal of Soil Science, 2008, 59 (2) : 208—215.
- [4] Maharjan B, Venterea R T. Nitrite intensity explains N management effects on N₂O emissions in maize[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2013, 66: 229—238.
- [5] Su H, Cheng Y F, Oswald R, et al. Soil nitrite as a source of atmospheric HONO and OH radicals[J]. Science, 2011, 333 (6049) : 1616—1618.
- [6] Butterbach-Bahl K, Baggs E M, Dannenmann M, et al. Nitrous oxide emissions from soils: How well do we understand the processes and their controls?[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2013, 368(1621) : 20130122.
- [7] Yang F, Dai S Y, Zhang J B, et al. Nitrite transformations under acidic conditions in temperate and subtropical forest ecosystems[J]. Geoderma, 2018, 317: 47—55.
- [8] Dai S Y, Wen T, Cai Z C, et al. Dynamics of nitrite in acidic soil during extraction with potassium chloride studied using ¹⁵N tracing[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2020, 34 (9) : e8746.
- [9] Cao Y C, Zhong M, Gong H, et al. Determining ¹⁵N abundance in ammonium, nitrate and nitrite in soil by measuring nitrous oxide produced[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(1) : 113—119. [曹亚澄, 钟明, 龚华, 等. N₂O 产生法测定土壤无机态氮 ¹⁵N 丰度[J]. 土壤学报, 2013, 50 (1) : 113—119.]
- [10] Stevens R J, Laughlin R J. Determining nitrogen-15 in nitrite or nitrate by producing nitrous oxide[J]. Soil Science Society of America Journal, 1994, 58 (4) : 1108—1116.
- [11] Silva S R, Kendall C, Wilkison D H, et al. A new method for collection of nitrate from fresh water and the analysis of nitrogen and oxygen isotope ratios[J]. Journal of Hydrology, 2000, 228 (1/2) : 22—36.
- [12] McIlvin M R, Altabet M A. Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77 (17) : 5589—5595.
- [13] Isobe K, Koba K, Suwa Y, et al. Nitrite transformations in an N-saturated forest soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2012, 52: 61—63.
- [14] Lachouani P, Frank A H, Wanek W. A suite of sensitive chemical methods to determine the δ¹⁵N of ammonium, nitrate and total dissolved N in soil extracts[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010, 24 (24) : 3615—3623.
- [15] Tu Y, Fang Y T, Liu D W, et al. Modifications to the azide method for nitrate isotope analysis[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, 30 (10) : 1213—1222.
- [16] Sigman D M, Casciotti K L, Andreani 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.
- [17] Casciotti K L, Böhlke J K, McIlvin M R, et al. Oxygen isotopes in nitrite: Analysis, calibration, and equilibration[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79 (6) : 2427—2436.
- [18] Granger J, Sigman D M, Prokopenko M G, et al. A method for nitrite removal in nitrate N and O isotope analyses[J]. Limnology and Oceanography: Methods, 2006, 4 (7) : 205—212.
- [19] Böhlke J K, Smith R L, Hannon J E. Isotopic analysis of N and O in nitrite and nitrate by sequential selective bacterial reduction to N₂O[J]. Analytical Chemistry, 2007, 79 (15) : 5888—5895.
- [20] Finkmann W, Altendorf K, Stackebrandt E, et al. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50 (1) : 273—282.
- [21] Nielsen M, Larsen L H, Jetten M S M, et al. Bacterium-based NO₂⁻ biosensor for environmental applications[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70 (11) : 6551—6558.
- [22] Dai S Y, Wen T, Zhang J B, et al. Improving extraction method in determining NO₂⁻-N in acidic soil[J]. Soils, 2018, 50 (2) : 341—346. [戴沈艳, 温腾, 张金波, 等. 酸性土壤中亚硝态氮提取方法的改进[J]. 土壤, 2018, 50 (2) : 341—346.]
- [23] 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.
- [24] Bell M D, Sickman J O. Correcting for background nitrate contamination in KCl-extracted samples during isotopic analysis of oxygen and nitrogen by the denitrifier method[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2014, 28 (5): 520—526.
- [25] Mørkved P T, Dörsch P, Søvik 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.
- [26] Zhu J, Yu L, Bakken L R, et al. Controlled induction of denitrification in *Pseudomonas aureofaciens*: A simplified denitrifier method for dual isotope analysis in NO_3^- [J]. Science of the Total Environment, 2018, 633: 1370—1378.
- [27] Weigand M A, Foriel J, Barnett B, et al. Updates to instrumentation and protocols for isotopic analysis of nitrate by the denitrifier method[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, 30 (12): 1365—1383.
- [28] McIlvin M R, Casciotti K L. Technical updates to the bacterial method for nitrate isotopic analyses[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83 (5): 1850—1856.
- [29] Stock P, Roder S, Burghardt D. Further optimisation of the denitrifier method for the rapid ^{15}N and ^{18}O analysis of nitrate in natural water samples[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2021, 35 (1): e8931.
- [30] 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.
- [31] Well R, Flessa H, Lu X, et al. Isotopologue ratios of N_2O emitted from microcosms with NH_4^+ fertilized arable soils under conditions favoring nitrification[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40 (9): 2416—2426.

(责任编辑: 檀满枝)