

徐颢铭, 宋国栋, 刘素美, 等. 基于次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原测定沉积物¹⁵N 加富培养样品中的¹⁵NH₄⁺的方法探索[J]. 海洋学报, 2022, 44(1): 147-154, doi:10.12284/hyxb2022024

Xu Haoming, Song Guodong, Liu Sumei, et al. A sodium hypobromite oxidation-sulfamic acid reduction method for determination of ¹⁵NH₄⁺ in ¹⁵N enrichment sediment slurry incubation samples[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(1): 147-154, doi:10.12284/hyxb2022024

基于次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原测定沉积物¹⁵N 加富培养样品中的¹⁵NH₄⁺的方法探索

徐颢铭^{1,2,3}, 宋国栋^{1,2*}, 刘素美^{1,2}, 梁生康^{1,2}, 张桂玲^{1,2}

(1. 中国海洋大学 深海圈层与地球系统前沿科学中心/海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266100)

摘要: 沉积物中的异化硝酸盐还原过程是海洋中活性氮转化的关键过程之一。不同于反硝化和厌氧铵氧化, 异化硝酸盐还原为铵 (DNRA) 是将硝酸盐直接还原为铵, 而不是以氮气的形态移除, 这有可能会加重水体富营养化和缺氧。目前测定沉积物中异化硝酸盐还原过程的主要手段是¹⁵N 标记培养技术。为了准确评估 DNRA 的潜在速率, 首先要准确测定加富样品中的¹⁵NH₄⁺浓度。常用测定¹⁵NH₄⁺的方法为基于次溴酸钠-碘氧化膜进样的四极杆质谱法。然而此方法的分析物之一³⁰N₂ 在分析时容易存在两个问题而导致结果失真: 一是易受样品中 O₂ 干扰而导致³⁰N₂ 含量被显著高估; 二是³⁰N₂ 在检测器中平衡较慢从而导致测试时间较长且精密度较差。为解决上述问题, 本研究采用次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原的方法将¹⁵NH₄⁺转化为²⁹N₂ 后通过膜进样的四极杆质谱仪进行测定 (简称 Redox-MIMS 法)。结果表明, Redox-MIMS 法在氨基磺酸还原剂浓度为 80~100 mmol/L 时还原效率最好; 方法的检测限约为 0.5 μmol/L, 精密度为 0.8%, 工作曲线的线性范围可以达到 0~150 μmol/L。相对于次溴酸钠-碘氧化法, Redox-MIMS 法反应条件温和, 反应试剂相对易得, 产物为²⁹N₂, 有效解决了³⁰N₂ 分析的一系列问题, 并显著提高了测定效率 (2 min/样品)。分别采用 Redox-MIMS 法和次溴酸钠-碘氧化法测定莱州湾沉积物实际样品, 两种方法所测得的 DNRA 速率以及 DNRA 占异化硝酸盐还原的比例均无显著性差异, 证明 Redox-MIMS 法是一种准确、高效地测定¹⁵N 加富培养样品中¹⁵NH₄⁺的方法。

关键词: 沉积物; 氮循环; 异化硝酸盐还原为铵; 膜进样质谱; 次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原

中图分类号: P734.2⁴

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)01-0147-08

1 引言

沉积物中的异化硝酸盐还原过程是氮元素从海洋环境中移除和转化的主要途径之一, 主要包括反硝化 (Denitrification)、厌氧铵氧化 (Anammox) 和异化硝酸盐还原为铵 (Dissimilatory Nitrate Reduction to Am-

monium, DNRA) 3 种过程。不同于执行氮气移除的反硝化和厌氧铵氧化, DNRA 过程直接将硝酸盐还原为铵, 而不是以氮气的形式移除^[1-2], 氮元素将继续以化合态的形式存在于海洋环境中, 有可能进一步加重富营养化和缺氧等环境问题^[3]。近年来对于海洋沉积物中 DNRA 过程的关注呈现显著上升的趋势^[2, 4-6]。因

收稿日期: 2021-07-20; 修订日期: 2021-09-26。

基金项目: 国家自然科学基金 (42076035, U1806211, 41606093); 国家重点研发计划 (2016YFA0601302); 中国海洋大学中央高校基本科研业务 (202072002)。

作者简介: 徐颢铭 (1998—), 男, 辽宁省沈阳市人, 主要从事海洋生物地球化学研究。E-mail: richard980126@163.com

* 通信作者: 宋国栋, 男, 副教授, 主要从事海洋生物地球化学研究。E-mail: gsong@ouc.edu.cn

而有必要准确评估 DNRA 速率,从而更准确地评估海洋中氮的收支情况。

目前学术界广泛认可的用于 DNRA 速率测定的方法是基于 $^{15}\text{NO}_3^-$ 加富的受控培养,即向培养体系中加入一定量的 $^{15}\text{NO}_3^-$,在不同的时间点获取培养样品,检测样品中 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的含量,以 $^{15}\text{NH}_4^+$ 浓度随时间的增加速率计算 DNRA 的速率。因而准确测定 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的含量就成为量化 DNRA 速率的关键。在早期的方法中,一般需要通过蒸馏^[7]、扩散^[8]以及离子交换^[9]等手段将 NH_4^+ 先从体系中分离,再进一步将 NH_4^+ 盐烘干结晶后通过氧化或燃烧法转化为 N_2 后采用同位素比值质谱仪(IRMS)进行测定。这些方法一般不可避免地具有样品需求量大、操作繁琐、耗时耗力等缺点。Zhang 等^[10]首创了无需分离 NH_4^+ ,即采用次溴酸钠氧化-叠氮酸还原直接测定 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的分析方法。然而这种方法在将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 转化为 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 测定时采用了具有爆炸性的叠氮化钠和剧毒性的亚砷酸钠,且测试 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 需要使用成本较高的 IRMS,不太适合具有大量样品的 DNRA 速率研究,在一定程度上限定了该方法的适用范围^[11-12]。

由于 IRMS 设备使用成本较高,因而低成本的膜进样质谱仪(MIMS)在 ^{15}N 加富样品的测试中的使用逐渐广泛。Yin 等^[13]采用次溴酸钠-碘氧化法与膜进样质谱进行耦合(简记为 OX-MIMS 法),首先将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$,然后利用 MIMS 进行测定,该法因具有操作简单、分析效率较高等优点而得到广泛应用^[14-15]。笔者所在的实验室也装备了膜进样质谱仪并成功实现 ^{15}N 加富实验中基本参数的测定^[16]。在 ^{15}N 加富培养实验中, DNRA 产物 NH_4^+ 中 ^{15}N 丰度一般较高,因而采用 OX-MIMS 法处理产生的 $^{15}\text{N}_2$ 绝大部分为 $^{30}\text{N}_2$,而作为一种 MIMS 分析物, $^{30}\text{N}_2$ 具有许多难以避免的缺陷:(1)样品中 O_2 的干扰导致 $^{30}\text{N}_2$ 值被显著高估。尽管目前一些 MIMS 系统在膜进样器和质谱间加装铜还原炉以去除 O_2 干扰^[16],但仍会有部分残留 O_2 与 N_2 进入质谱后在离子源形成质量数同为 30 的 NO^+ 离子^[17],产生干扰信号。此外,不同 O_2 条件下 $^{30}\text{N}_2$ 产生的信号值会有一定的偏差并且波动较大^[18],据其计算的异化硝酸盐还原速率也会产生较大误差;(2) $^{30}\text{N}_2$ 质量数较大,在检测器中平衡的时间也更长,测试样品时所需时间较长,且精密度较差。另外, OX-MIMS 法使用的次溴酸钠-碘氧化剂的配制比较冗繁,其反应需要在低温条件下进行 1 周^[19],并且需要使用液溴这一购买、使用与保存流程繁琐的有毒试剂。因此,我们尝试采用一种新的方法避免产生

$^{30}\text{N}_2$,并尽可能不采用液溴这一试剂。

由于 OX-MIMS 法存在上述的系列问题,我们尝试开发一种不以 $^{30}\text{N}_2$ 为最终分析物的测试方法。Zhang 等^[10]的方法将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_2^-$,而氨基磺酸恰好可以快速地 $^{15}\text{NO}_2^-$ 还原为 $^{29}\text{N}_2$ ^[19-20]——一种非常适合 MIMS 的分析物。因此,本研究探索了一种次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原的测定沉积物 ^{15}N 加富样品中 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的方法(简记为 Redox-MIMS 法)并应用于莱州湾沉积物样品的 DNRA 潜在速率测定,为 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的分析方法提供了一种新的选择。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

^{15}N 同位素标记样品中 $^{15}\text{N}_2$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的测定采用自组装 MIMS,仪器具体结构可参考本课题组前期发表的成果^[6]; NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 等营养盐的测定使用 AA3 营养盐自动分析仪。

实验试剂包括经过 Elix 高纯水系统处理的高纯水、 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、氨基磺酸、NaOH、KBrO₃、KBr、KI、浓盐酸(36%)、Br₂,上述试剂均为分析纯。实验所用陈化海水于 2016 年采自南海海域,经过孔径为 0.4 μm 醋酸纤维滤膜过滤后避光陈化待用(NH_4^+ 的本底小于 0.2 μmol/L),主要用于本实验中 $^{15}\text{NH}_4^+$ 标准溶液配制。

$^{15}\text{NH}_4^+$ 储备溶液:称取 0.067 1 g 烘干后的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 固体溶于 100 mL 高纯水中得到 $^{15}\text{NH}_4^+$ 储备溶液(浓度为 10 mmol/L,以 N 计)。此储备溶液用陈化海水稀释后可配制一系列的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 标准溶液。

NaBrO-I₂氧化剂:NaBrO-I₂氧化剂的配制方法参考文献[6, 18]。

NaBrO 氧化剂:NaBrO 氧化剂的配制方法参考文献[10]。该试剂需要临用前配制。

氨基磺酸还原剂:称取 0.776 7 g 氨基磺酸,溶于 100 mL 1:1 HCl 溶液中,得到氨基磺酸还原剂(浓度为 80 mmol/L)。

2.2 实验方法

2.2.1 Redox-MIMS 法的操作流程

Redox-MIMS 法的操作流程如图 1b 所示:首先在 6 mL Exetainer 瓶中加入 1 mL 样品,加入 4 mL 高纯水稀释,再加入 0.5 mL NaBrO 氧化剂,氧化 30 min,将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_2^-$ 。然后加入 0.5 mL 氨基磺酸还原剂,将 $^{15}\text{NO}_2^-$ 还原为 $^{15}\text{N}_2$ 。立即盖紧瓶盖后,用 MIMS 进行测定。为防止原样品中异化硝酸盐还原过程产生的 $^{15}\text{NO}_2^-$ 对 $^{15}\text{NH}_4^+$ 测定的高估影响,测定 $^{15}\text{NO}_3^-$ 加富样品中的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 时需要将样品中的 $^{15}\text{NO}_2^-$ 扣除, $^{15}\text{NO}_2^-$ 的测定

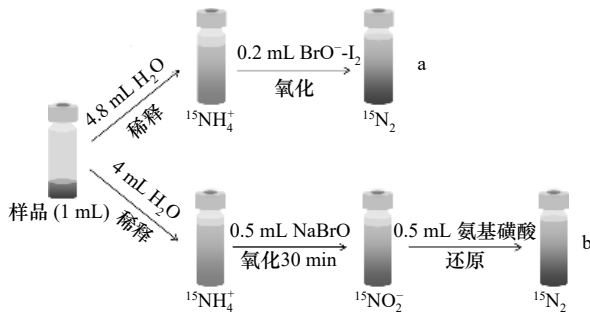


图1 OX-MIMS法(a)和Redox-MIMS法(b)的操作流程

Fig. 1 Procedures of OX-MIMS method (a) and Redox-MIMS method (b)

采用氨基磺酸还原法,将¹⁵NO₂⁻还原为¹⁵N₂后用MIMS测定^[21]。

为与目前常用的OX-MIMS法进行比较,所有的标准溶液和样品同时也采用了OX-MIMS法进行测定。OX-MIMS法的操作流程参考文献^[13]的方法,如图1a所示:在6 mL Exetainer瓶中加入1 mL样品,加入4.8 mL高纯水进行稀释后,加入0.2 mL NaBrO₂-I₂氧化剂,直接将¹⁵NH₄⁺氧化为¹⁵N₂。立即盖紧瓶盖后,用MIMS仪进行测定。

2.2.2 氨基磺酸还原剂的最佳浓度测试

为确定氨基磺酸还原剂的最佳浓度,本实验中配制了浓度分别为20 mmol/L、40 mmol/L、50 mmol/L、60 mmol/L、70 mmol/L、80 mmol/L、90 mmol/L、100 mmol/L的氨基磺酸还原剂,分别用Redox-MIMS法对浓度为0 μmol/L、10 μmol/L、25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L的¹⁵NH₄⁺标准溶液进行测定,并绘制标准曲线。各标准溶液同时用OX-MIMS法测定并绘制标准曲线以进行比较和计算反应相对回收率。相对回收率的计算为

$$R = \frac{S_{\text{Redox}}}{S_{\text{OX}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中, S_{Redox} 表示采用Redox-MIMS法测定的标准曲线的斜率; S_{OX} 表示采用OX-MIMS法测定的标准曲线的斜率。

2.2.3 样品的采集、培养以及DNRA潜在速率的计算

为进行实际样品的测试,于2020年8月在莱州湾附近海域的3个站点(H1-7、S5、H2-7)采取沉积物和底层水样品进行¹⁵N加富泥浆培养,采样站点如图2所示。沉积物样品用箱式采泥器采集后,取0~5 cm表层沉积物装入密封袋中,立刻放入冰箱冷藏保存,

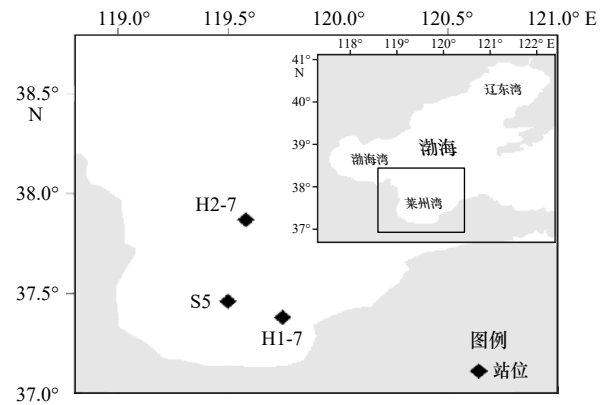


图2 沉积物采样站点

Fig. 2 Sediment sampling stations

24 h内带回陆地实验室进行实验;底层水样品用Niskin采水器采集并过滤后同样放入冰箱中冷藏保存。

样品带回实验室后进行厌氧条件下的¹⁵N加富泥浆培养。取部分混匀后的沉积物分别加入3个培养袋中,加入氩气除氧后的相同站位的底层水。排净培养袋中的空气后,在常温下进行24 h左右的预培养,除去体系中原有的O₂、NO₃⁻和NO₂⁻。预培养后用注射器分别向3个培养袋中加入3种不同的¹⁵N标记物:¹⁵NO₃⁻、¹⁵NH₄⁺、¹⁵NH₄⁺+¹⁴NO₃⁻,使体系中各个标记物浓度最终为100 μmol/L左右。各培养袋在常温下培养8 h,并分别在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h时取样。取样时首先将培养袋摇匀,用注射器取一定量泥浆样品,一部分直接转入提前加好0.1 mL HgCl₂饱和溶液的6 mL Exetainer瓶中,采用MIMS测定¹⁵N₂^[16];剩余部分转入50 mL离心管中,经过离心后取上清液,用0.2 μm孔径的滤膜过滤后转入另一离心管中冷冻保存,用于后续测定¹⁵NH₄⁺和营养盐,其中¹⁵NH₄⁺分别采用Redox-MIMS和OX-MIMS两种方法进行测定并进行比较。

¹⁵N₂的浓度计算采用文献^[16]的计算方法;¹⁵NH₄⁺的浓度采用测定出的¹⁵N₂浓度反算得到。¹⁵N₂和¹⁵NH₄⁺的产生速率由各自浓度随时间变化曲线的斜率表示。反硝化、厌氧氨氧化和DNRA速率的计算方法采用文献^[22]的计算公式。沉积物中的DNRA在所有硝酸盐异化还原过程中所占的比例(x_{DNRA})公式为

$$x_{\text{DNRA}} = \frac{V_{\text{DNRA}}}{(V_{\text{DNRA}} + V_{\text{D}} + V_{\text{A}})}, \quad (2)$$

式中, V_{D} 代表反硝化速率; V_{A} 代表厌氧氨氧化速率; V_{DNRA} 代表DNRA速率。本实验中方法线性范围的确定以及两种方法的比较等统计学检验均使用Sigmaplot软件完成。

3 结果与讨论

3.1 氨基磺酸还原剂的最佳浓度

如图 3 所示,当氨基磺酸的浓度达到 80~100 mmol/L 时, $^{15}\text{NH}_4^+$ 的相对回收率达到最高,为 $(93.5\pm 0.8)\%$ 。Redox-MIMS 法使用的次溴酸钠氧化剂相较于 OX-MIMS 法使用的次溴酸钠-碘是一种比较温和的试剂,氧化效率通常在 90%~97%^[10,12,23],与本文中的实验结果吻合。因此,后续实验中使用的氨基磺酸还原剂浓度均为 80 mmol/L。

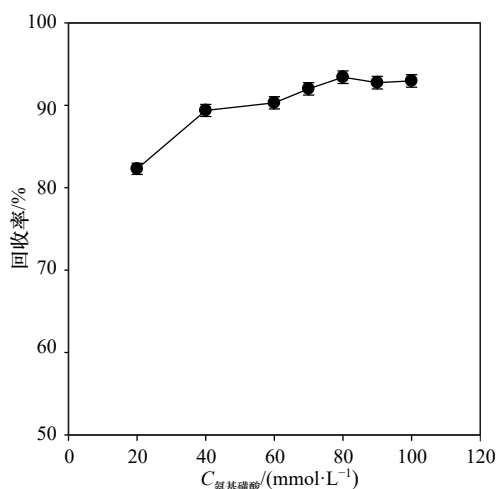


图 3 氨基磺酸最佳浓度测试
Fig. 3 Test for the optical concentration of sulfamic acid

3.2 Redox-MIMS 法的检测限、精密度和线性范围

实验同时对 3 组相同的标准溶液进行测定并绘制标准曲线,检测限采用 IUPAC 规定的标准方法进行计算,公式为

$$\text{LOD} = K S_b / m, \quad (3)$$

式中,LOD 表示检测限; K 为与置信浓度有关的常数(本实验中 K 为 3,置信度为 99.6%); S_b 为空白标准偏差; m 为标准曲线斜率。以标准曲线斜率的相对标准偏差(RSD)代表方法的精密度。

实验结果表明,Redox-MIMS 法的检测限为 $0.5 \mu\text{mol/L}$,精密度为 0.8%,在一定程度上本研究建立的 Redox-MIMS 法略显优势^[13]。如图 4 所示,当标准溶液系列最高浓度超过 $150 \mu\text{mol/L}$ 时,标准曲线的斜率发生显著性降低($p < 0.001$),因此该法的线性范围为 $0 \sim 150 \mu\text{mol/L}$,这与次溴酸钠氧化剂的氧化能力有关,按照本研究的操作流程,Exetainer 瓶内 $150 \mu\text{mol/L}$ 的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 标准溶液最终的浓度约为 $25 \mu\text{mol/L}$,这与次溴酸钠氧化剂的氧化能力的上限相吻合^[10,23],可以满足目前对于沉积物加富样品中 $^{15}\text{NH}_4^+$ 测定的要求。

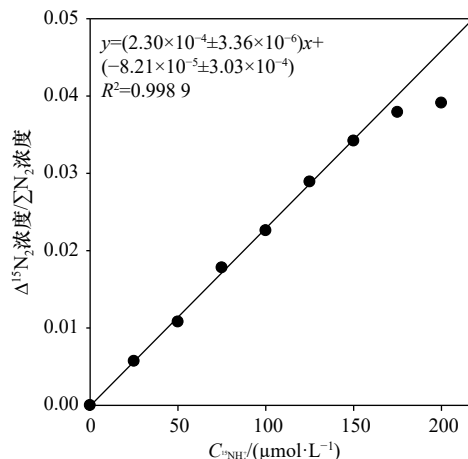


图 4 Redox-MIMS 法标准曲线的线性范围
Fig. 4 Linear range of standard curve using Redox-MIMS method

3.3 Redox-MIMS 法与 OX-MIMS 法的比较

为将 Redox-MIMS 法与目前广泛使用的 OX-MIMS 法进行比较,将同一组标准溶液采用上述两种方法测定并绘制工作曲线进行比较。实验结果显示,Redox-MIMS 法的工作曲线斜率相对较低,约为 OX-MIMS 法的 96%,这也与上文所述的实验结果相符,即与次溴酸钠氧化剂的氧化效率有关。

为计算两种方法产生的 $^{30}\text{N}_2$ 占 $^{15}\text{N}_2$ 的比例,我们分别对使用两种方法测定的标准溶液产生的 $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ 和 $^{15}\text{N}_2$ ($^{15}\text{N}_2 = ^{29}\text{N}_2 + 2 \times ^{30}\text{N}_2$) 对 $^{15}\text{NH}_4^+$ 浓度作图进行比较(图 5)。采用 OX-MIMS 法测定的标准溶液产生的 $^{15}\text{N}_2$ 几乎全部为 $^{30}\text{N}_2$,而采用 Redox-MIMS 法产生的几乎全部为 $^{29}\text{N}_2$ 。这说明 Redox-MIMS 法能够有效避免产生 $^{30}\text{N}_2$ 。另外,在实际测样中 $^{29}\text{N}_2$ 相对于 $^{30}\text{N}_2$ 能够更快的在检测器中达到平衡,在进样量更少的情况下 $^{29}\text{N}_2$ 的曲线也可以出现测定的峰值平台以完成定量分析。因此,采用 Redox-MIMS 法的测样时间在笔者所用的 MIMS 上被缩短至 2 min/样品(图 6),而一般采用 MIMS 进行 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 同时测定需要 3~5 min 的时间,由此可知,Redox-MIMS 法进一步提高了测样效率。

3.4 莱州湾沉积物的 DNRA 速率测定

莱州湾 3 个站位的沉积物中 ^{15}N 加富培养实验结果如图 7 所示。对于加富 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的实验组, $^{15}\text{N}_2$ 并没有显著增加(图 7b1 至图 7b3, $p > 0.05$),说明预培养已经将大部分的 O_2 和 NO_3^- 去除;对于加富 $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$ 的实验组,样品培养过程中 $^{29}\text{N}_2$ 随时间显著增加(图 7c1 至图 7c3, $p < 0.05$),说明各站位的沉积物中均发生厌氧铵氧化过程;对于加富 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的实验组,样品培养过程

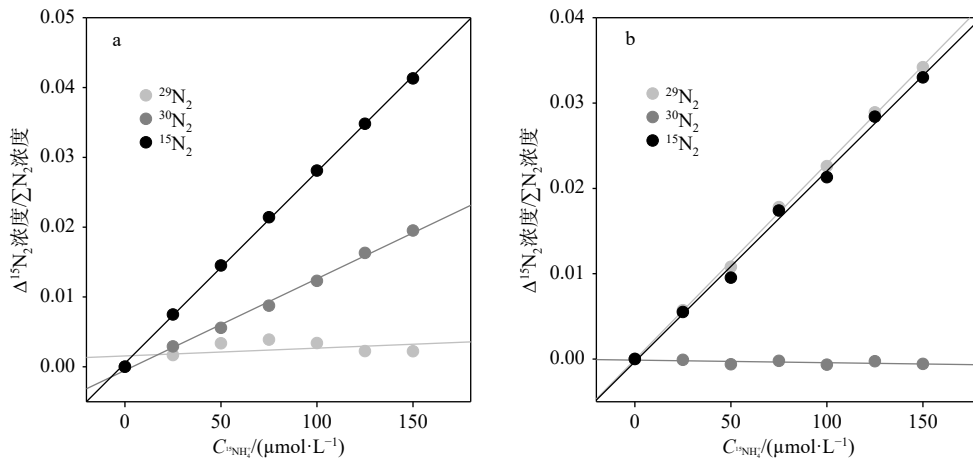


图5 OX-MIMS法(a)和Redox-MIMS法(b)测定产生²⁹N₂和³⁰N₂的比例

Fig. 5 Ratios of ²⁹N₂ and ³⁰N₂ produced using OX-MIMS method (a) and Redox-MIMS method (b)

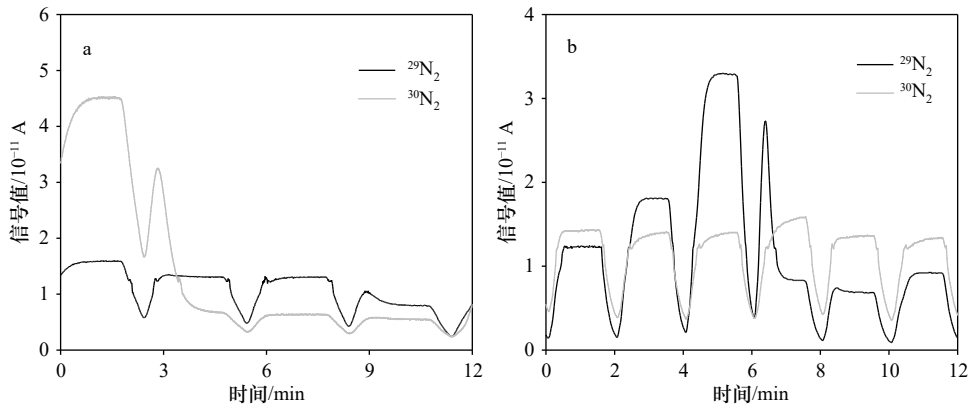
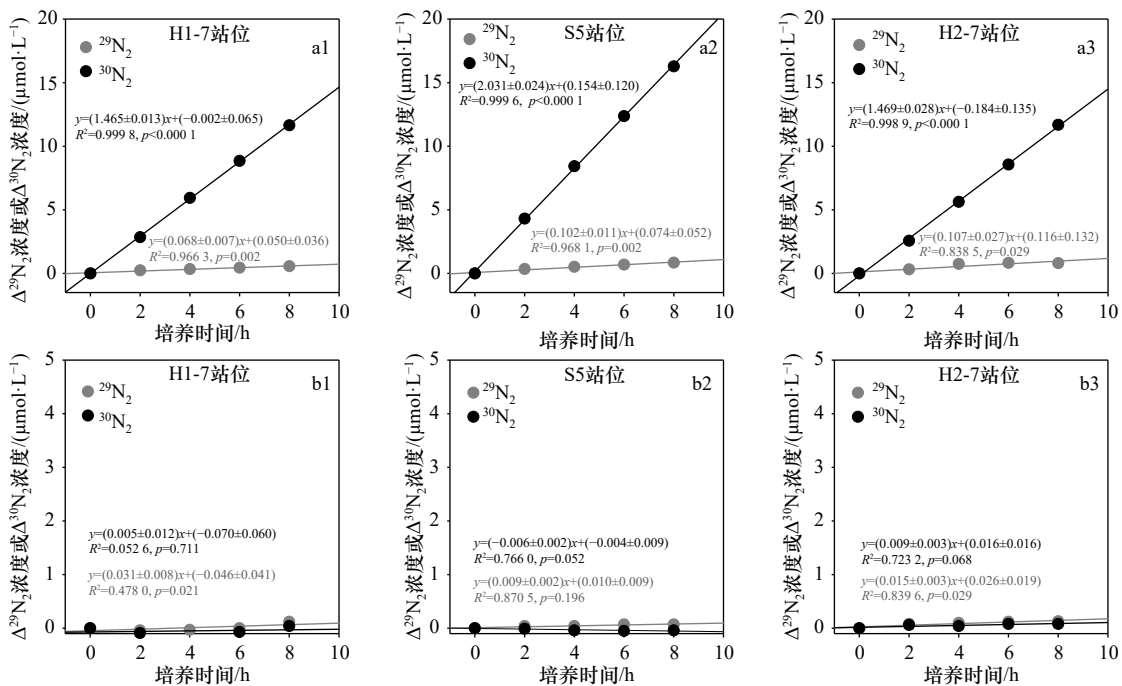


图6 OX-MIMS法(a)和Redox-MIMS法(b)测定的曲线

Fig. 6 Detection curve using OX-MIMS method (a) and Redox-MIMS method (b)



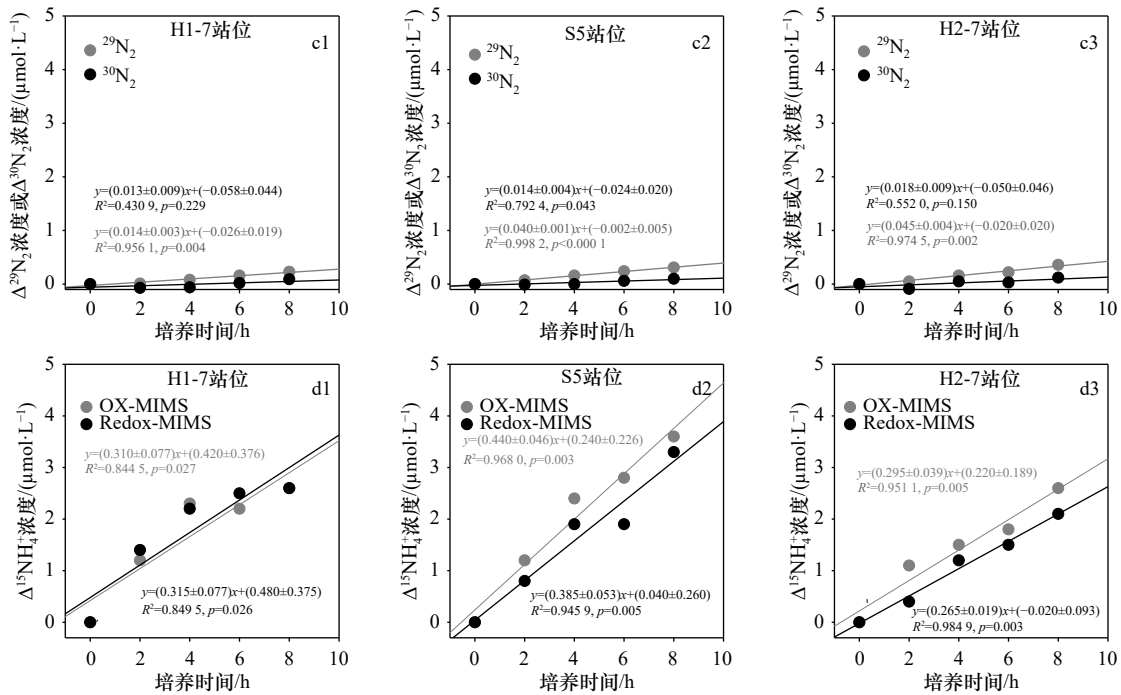


图 7 莱州湾 H1-7、S5、H2-7 站位沉积物不同¹⁵N 加富培养体系中¹⁵N₂ 和¹⁵NH₄⁺ 浓度随时间变化

Fig. 7 ¹⁵N₂ and ¹⁵NH₄⁺ concentration production with time changes in different ¹⁵N tracer enrichment incubation systems of sediments in stations H1-7, S5, H2-7 in the Laizhou Bay

a1-a3. 加富¹⁵NO₃⁻, 产生¹⁵N₂; b1-b3. 加富¹⁵NH₄⁺, 产生¹⁵N₂; c1-c3. 加富¹⁵NH₄⁺+¹⁴NO₃⁻, 产生¹⁵N₂; d1-d3. 加富¹⁵NO₃⁻, 产生¹⁵NH₄⁺
 a1-a3. ¹⁵NO₃⁻ enrichment with ¹⁵N₂ produced; b1-b3. ¹⁵NH₄⁺ enrichment with ¹⁵N₂ produced; c1-c3. ¹⁵NH₄⁺+¹⁴NO₃⁻ enrichment with ¹⁵N₂ produced;
 d1-d3. ¹⁵NO₃⁻ enrichment with ¹⁵NH₄⁺ produced

中³⁰N₂ 和¹⁵NH₄⁺均随时间显著增加(图 7a1 至图 7a3 和图 7d1 至图 7d3, $p < 0.05$), 说明各站位沉积物中均存在反硝化和 DNRA 过程。进一步采用文献 [22] 的方法计算 3 种异化硝酸盐还原速率(以 N 计)。结果表明(图 8), 莱州湾 3 个站位的沉积物中的异化硝酸盐还原过程均以反硝化为主, 占比为 88.5%~90.2%; 其次为 DNRA, 占比为 7.0%~9.5%; 厌氧氨氧化占比

最低, 为 0.4%~2.8%。

采用 Redox-MIMS 法和 OX-MIMS 法两种方法测得的 DNRA 速率(以 N 计)以及 DNRA 占异化硝酸盐还原的比例(x_{DNRA})并无显著性差异(图 9, $p > 0.05$)。说明 Redox-MIMS 法在对 OX-MIMS 进行优化的基础上, 同样适用于¹⁵N 加富沉积物泥浆培养样品中的¹⁵NH₄⁺的测定。

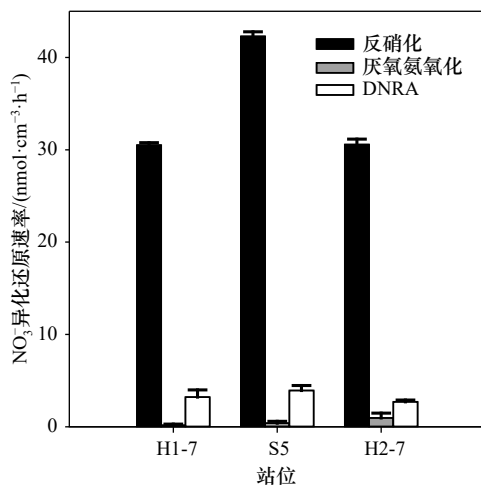


图 8 各站位异化硝酸盐还原速率占比情况
 Fig. 8 Proportion of each dissimilatory nitrate reduction process in different stations

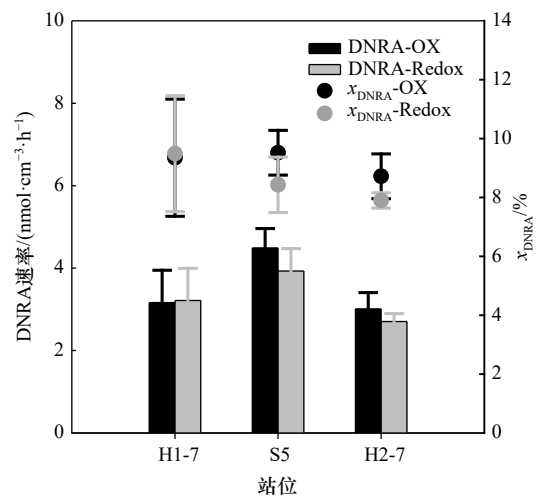


图 9 采用两种方法测定的 DNRA 潜在速率以及 x_{DNRA} 值
 Fig. 9 Determination results of DNRA potential rates and x_{DNRA} using two different methods

4 结论

本研究探索建立了一种次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原测定沉积物¹⁵N 加富样品中¹⁵NH₄⁺的新方法 (Redox-MIMS 法)。方法检测限为 0.5 μmol/L, 精密密度为 0.8%, 线性范围为 0~150 μmol/L。相对于目前广泛使用的 OX-MIMS 法, Redox-MIMS 法反应条件更加温和, 试剂相对易得, 并且产生的¹⁵N₂ 绝大部分为²⁹N₂, 有效避免了³⁰N₂ 带来的受 O₂ 影响、在检测器中平衡较慢且测试波动较大的一系列问题, 同时进一步显著提升了测定效率 (2 min/样品), 且具有样品消耗少 (1 mL)、操作简单等优点。本研究同时对莱州湾 3 个站位的沉积物样品进行了¹⁵N 加富培养, 证实莱州湾沉积物中同时存在反硝化、厌氧铵氧化以及

DNRA 3 种异化硝酸盐还原过程, 并且以反硝化过程为主导, DNRA 次之, 厌氧铵氧化最弱。通过两种不同方法测定¹⁵NH₄⁺并计算 DNRA 速率的对照实验结果表明, 采用 Redox-MIMS 法测定的 DNRA 潜在速率与采用 OX-MIMS 法测定的结果并无显著性差异, 说明 Redox-MIMS 法同样适用于¹⁵N 加富沉积物泥浆培养样品中的¹⁵NH₄⁺的测定, 有望未来在沉积物氮循环领域得到广泛应用。

致谢: 感谢海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室张国玲实验师在营养盐自动分析仪的使用方面提供的指导。感谢许泽浩同学在样品采集方面提供的帮助。感谢实验室罗畅同学在实验操作以及 MIMS 仪器使用方面的帮助和指导。

参考文献:

- [1] Tiedje J M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium[M]//Zehnder A J B. Biology of Anaerobic Microorganisms. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1988: 179–244.
- [2] Devol A H. Denitrification, anammox, and N₂ production in marine sediments[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7: 403–423.
- [3] Gardner W S, McCarthy M J, An S, et al. Nitrogen fixation and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) support nitrogen dynamics in Texas estuaries[J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51(1part2): 558–568.
- [4] Giblin A E, Tobias C R, Song B, et al. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems[J]. *Oceanography*, 2013, 26(3): 124–131.
- [5] Smith C J, Dong L F, John W, et al. Seasonal variation in denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonia process rates and corresponding key functional genes along an estuarine nitrate gradient[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 542.
- [6] Song Guodong, Liu Sumei, Marchant H, et al. Anammox, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in the East China Sea sediment[J]. *Biogeosciences*, 2013, 10(11): 6851–6864.
- [7] Freyer H D. Seasonal trends of NH₄⁺ and NO₃⁻ nitrogen isotope composition in rain collected at Jülich, Germany[J]. *Tellus*, 1978, 30(1): 83–92.
- [8] Holmes R M, McClelland J W, Sigman D M, et al. Measuring ¹⁵N-NH₄⁺ in marine, estuarine and fresh waters: an adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations[J]. *Marine Chemistry*, 1998, 60(3/4): 235–243.
- [9] Lehmann M F, Bernasconi S M, McKenzie J A. A method for the extraction of ammonium from freshwaters for nitrogen isotope analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(19): 4717–4721.
- [10] Zhang Lin, Altabet M A, Wu Taixing, et al. Sensitive measurement of NH₄⁺ ¹⁵N/¹⁴N (δ¹⁵NH₄⁺) at natural abundance levels in fresh and salt-waters[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(14): 5297–5303.
- [11] Felix J D, Elliott E M, Gish T J, et al. Characterizing the isotopic composition of atmospheric ammonia emission sources using passive samplers and a combined oxidation-bacterial denitrifier approach[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27(20): 2239–2246.
- [12] Liu Dongwei, Fang Yunting, Tu Ying, et al. Chemical method for nitrogen isotopic analysis of ammonium at natural abundance[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 3787–3792.
- [13] Yin Guoyu, Hou Lijun, Liu Min, et al. A novel membrane inlet mass spectrometer method to measure ¹⁵NH₄⁺ for isotope-enrichment experiments in aquatic ecosystems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9555–9562.
- [14] Deng Fengyu, Hou Lijun, Liu Min, et al. Dissimilatory nitrate reduction processes and associated contribution to nitrogen removal in sediments of the Yangtze Estuary[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2015, 120(8): 1521–1531.
- [15] Yin Guoyu, Hou Lijun, Liu Min, et al. DNRA in intertidal sediments of the Yangtze estuary[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2017, 122(8): 1988–1998.
- [16] 谢成军, 宋国栋, 刘素美, 等. 自组装膜进样质谱系统及其在砂质沉积物异化硝酸盐还原研究中的应用[J]. *海洋学报*, 2020, 42(2): 22–29.
Xie Chengjun, Song Guodong, Liu Sumei, et al. Self-assembled membrane injection mass spectrometry system and its application on the study of dissimilatory nitrate reduction in sandy sediments[J]. *Haiyang Xuebao*, 2020, 42(2): 22–29.
- [17] Jensen K M, Jensen M H, Cox R P. Membrane inlet mass spectrometric analysis of N-isotope labelling for aquatic denitrification studies[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 20(2): 101–109.
- [18] Lunstrum A, Aoki L R. Oxygen interference with membrane inlet mass spectrometry may overestimate denitrification rates calculated

- with the isotope pairing technique[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2016, 14(7): 425–431.
- [19] Warembourg F R. Nitrogen fixation in soil and plant systems[M]//Knowles R, Blackburn T H. Nitrogen Isotope Techniques. New York, NY: Academic Press, Inc. , 1993: 127–156.
- [20] Füssel J, Lam P, Lavik G, et al. Nitrite oxidation in the Namibian oxygen minimum zone[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1200–1209.
- [21] Granger J, Sigman D M. Removal of nitrite with sulfamic acid for nitrate N and O isotope analysis with the denitrifier method[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2009, 23(23): 3753–3762.
- [22] Song Guodong, Liu Sumei, Kuypers M M M, et al. Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox, denitrification, and dissimilatory nitrate reduction to ammonium coexist[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2016, 14(12): 801–815.
- [23] 高凤鸣, 张淑华, 汪心源, 等. 用次溴酸钠氧化法测定海水中氨氮的研究[J]. 海洋湖沼通报, 1980(4): 41–47.
Gao Fengming, Zhang Shuhua, Wang Xinyuan, et al. Study on the determination of ammonia-nitrogen in seawater with the sodium hypobromite oxidation method[J]. *Transactions of Oceanography and Limnology*, 1980(4): 41–47.

A sodium hypobromite oxidation-sulfamic acid reduction method for determination of $^{15}\text{NH}_4^+$ in ^{15}N enrichment sediment slurry incubation samples

Xu Haoming^{1,2,3}, Song Guodong^{1,2}, Liu Sumei^{1,2}, Liang Shengkang^{1,2}, Zhang Guiling^{1,2}

(1. *Frontiers Science Center for Deep Ocean Multispheres and Earth System/Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China*; 2. *Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China*; 3. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China*)

Abstract: Dissimilatory nitrate reduction in marine sediment is one of the key nitrogen loss processes in the ocean. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), unlike denitrification and anammox by which nitrate is reduced to N_2 and removed from the environment eventually, directly reduce nitrate to ammonium, could lead to eutrophication and water hypoxia afterwards. ^{15}N labeled technique is the main method to investigate dissimilatory nitrate reduction processes in sediments. Accurate determination of $^{15}\text{NH}_4^+$ in isotope enrichment samples is primarily required to evaluate the potential rate of DNRA. The commonly used method for the determination of $^{15}\text{NH}_4^+$ at present is the hypobromite iodine oxidation-membrane inlet quadrupole mass spectrometer determination method. However, $^{30}\text{N}_2$ as the final analyte of the method has two problems which lead to an analysis error: firstly, $^{30}\text{N}_2$ determined can be significantly overestimated due to the O_2 interference; secondly, the low equilibrium rate of $^{30}\text{N}_2$ in the detector could influence the precision of the method and low down the analysis speed. To solve the problems mentioned, a sodium hypobromite oxidation-sulfamic acid reduction method by which $^{15}\text{NH}_4^+$ is transformed to $^{29}\text{N}_2$ only and detected using membrane inlet quadrupole mass spectrometer afterwards (Redox-MIMS method) is reported in this article. The results indicate that the optical concentration of sulfamic acid is 80–100 mmol/L; the detection limit is 0.5 $\mu\text{mol/L}$ and the precision (RSD) is 0.8%; the dynamic range of standard curve is 0–150 $\mu\text{mol/L}$. Comparing with the hypobromite iodine oxidation method, the Redox-MIMS method not only has the advantages of mild reaction conditions and easily obtained reagents, the memory effect of $^{30}\text{N}_2$ in the detector can also be solved effectively for most of the produced $^{15}\text{N}_2$ is $^{29}\text{N}_2$ which improves detection efficiency (2 min per sample) meanwhile. Determination results of rates of DNRA and the contribution of DNRA to all dissimilatory nitrate reduction processes in the Laizhou Bay sediments using both hypobromite iodine oxidation and Redox-MIMS methods shows no significant difference. These make the Redox-MIMS method an accurate and high-efficient method for determination of $^{15}\text{NH}_4^+$ in isotope enrichment samples.

Key words: sediment; nitrogen cycling; dissimilatory nitrate reduction to ammonium; membrane inlet mass spectrometer; sodium hypobromite oxidation-sulfamic acid reduction