

利用反硝化细菌法测试水体硝酸盐氮氧同位素*

岳甫均^{1,2} 李思亮^{1**} 刘丛强¹ 安宁¹ 蔡虹明^{1,2}

(¹中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; ²中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 反硝化细菌方法作为测试硝酸盐氮氧同位素组成的最新方法, 具有可测试低浓度水样、对样品无需特殊处理、不会交叉污染和需样量少等诸多优点而得到迅速发展。本研究率先在国内实验室利用反硝化细菌法成功测试了硝酸盐氮氧同位素组成, 将经过 5~10 d 培养的反硝化细菌 *Pseudomonas aureofaciens* 离心, 然后将菌液浓缩 5 倍, 再向顶空进样瓶注入 3 mL 菌液, 密封后利用高纯氮气吹扫 3 h 以上, 注入 50 nmol NO₃⁻ 水样经过夜培养灭活后, 使用 Trace Gas Pre-concentrator-Isoprime 测试 N₂O 同位素组成, 结果表明, 重现性和测试精度与国际上类似研究接近。该方法的建立对于国内开展河流及湖泊(水库)、降水等氮的生物地球化学循环将起到促进作用。

关键词 反硝化细菌法; 硝酸盐; 氮同位素; 氧同位素

中图分类号 X142 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)8-2152-06

Measurement of waters nitrate dual isotopes based on denitrifier method. YUE Fu-jun^{1,2}, LI Si-liang^{1**}, LIU Cong-qiang¹, AN Ning¹, CAI Hong-ming^{1,2} (¹State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(8): 2152-2157.

Abstract: Denitrifier method is a novel method for nitrogen and oxygen isotopic analysis of nitrate, which has many advantages, e. g., low nitrate water sample, simple pretreatment, no cross-contamination, and small volume water, and obtained rapid popularization. In this study, the method was first developed in China for nitrate isotopic measurement in our laboratory. The denitrifier (*Pseudomonas aureofaciens*) was grown in an amended medium of Tryptic Soy Broth. After 5-10 days culture, the cells were harvested and concentrated 5 folds, and split into 3 mL aliquots in 20 mL headspace vials. The vials were sealed and then purged for at least 3 h with high-purity N₂ to ensure anaerobic condition. A sample amount corresponding to 50 nmol of nitrate was added to the sample vials, and cultured overnight to allow the complete conversion of NO₃⁻ to N₂O. On the following day, 0.1-0.2 mL of 10 mol · L⁻¹ NaOH was injected into the vials to lyse the bacterium and to scrub any CO₂ gas. Simultaneous δ¹⁵N and δ¹⁸O analysis of the produced N₂O was carried out by using a Trace Gas Pre-concentrator unit coupled to an IRMS instrument. The measured data showed good reproducibility and precision, in close with the similar international studies. The establishment of this method would promote our studies in nitrogen biogeochemical cycle in rivers and lakes (reservoirs) and in precipitation.

Key words: denitrifier method; nitrate; nitrogen isotope; oxygen isotope.

水体中含氮化合物的高低影响着水质状况及水体营养水平, 一直倍受政府及学者的关注。如饮用水中过高的氮素可能会影响人体健康, 地表水中过

高氮素可能导致各种环境及生态问题(Stålnacke *et al.*, 1999; 刘丛强等, 2007; Kendall *et al.*, 2007), 识别氮素的来源对水体氮污染治理及水环境的管理都具有十分重要的意义。由于氮以多种价态、多种形态存在, 不同氮形态间的地球化学性质不同, 因此氮的同位素组成变化被用作研究氮来源和转化的理想工具。目前氮稳定同位素比值被广泛应用于各种水

* 中国科学院重要方向项目(KZCX2-EW-402) 和国家自然科学基金项目(41021062 和 41173021) 资助。

** 通讯作者 E-mail: E-mail: lisiliang@vip.skleg.cn

收稿日期: 2012-02-23 接受日期: 2012-05-28

环境中示踪无机氮(NO_3^- 、 NH_4^+ 等)来源迁移和转化研究(Liu *et al.* 2006; Kendall *et al.* 2007; 岳甫均等 2010; Li *et al.* 2010a 2010b)。但单独利用氮同位素组成辨别氮素来源及其迁移转化规律的应用受到一定限制。硝酸盐氧同位素的使用更好地弥补了单一同位素技术的不足(Liu *et al.* 2006; Kendall *et al.* 2007; Li *et al.* 2010a)。

水体硝态氮同位素的预处理及测试技术不断发展完善 20 世纪 90 年代以前,主要使用消解方式(Kjeldahl 法)作前处理来测试硝态氮同位素(Bremner & Edwards, 1965),也有利用达氏合金将硝态氮转化成铵态氮,再利用酸吸收铵生成铵盐,利用质谱仪测试氮同位素(扩散法, Sigman *et al.*, 1997)。20 世纪 90 年代以后,学者们开始利用阴离子树脂吸附硝酸盐,将水中硝酸盐浓缩,然后利用 Ag_2O 中和转化成硝酸银测试硝酸银氮氧同位素的离子树脂法(Silva *et al.*, 2000),但离子树脂法要求水样量大,前处理烦琐,成本较高,易受有机质影响,而且还不适用于高盐度水体(海水)。21 世纪初普林斯顿大学 Sigman 教授课题组开发了利用反硝化细菌测试硝酸盐氮同位素和氧同位素(Sigman *et al.*, 2001; Casciotti *et al.*, 2002),该方法较之前有了极大的改善,如测试所需 NO_3^- 的量较小,不受其他离子及有机质的干扰,测试结果准确等优点,使得该方法可以应用在氮循环中诸多方面,如在低浓度、高盐分的海洋中开展的氮循环,以及大气氮循环等(Hasting *et al.*, 2003 2004; Fang *et al.*, 2011)。目前这方面研究受到国内众多学者的关注(毛绪美等 2006; 张翠云等 2011),但还没有完全建立起来对硝酸盐氮氧同位素同时测试的方法。本研究在已有研究的基础上,结合实验室条件,利用 Trace Gas Pre-concentrator-Isoprime 仪器,在本实验室里建立了反硝化细菌法测试水体硝酸盐氮氧同位素,为更好地开展氮循环的研究,提供有利的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌种购置于美国菌种保藏中心(ATCC),中文名称为致金色假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens* ATCC 13985)。实验过程中使用的培养基为胰蛋白大豆肉汤(Tryptic soy broth, TSB)、胰蛋白大豆琼脂培养基(Tryptic soy agar, TSA)。其他药品: KNO_3 、 NH_4Cl 、 KH_2PO_4 、抑泡剂、NaOH 等。

1.2 实验原理

一般情况下完全的反硝化过程为: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$,每一过程都是在特定酶的作用下进行。而在该方法中使用的反硝化细菌 *Pseudomonas aureofaciens* 缺乏 N_2O 还原酶,因此无法将 N_2O 还原为 N_2 ,使得反硝化作用最终产物为 N_2O 。产物 N_2O 的氮氧同位素具有 NO_3^- 和 NO_2^- 中氮氧同位素的信息,自然水体中 NO_2^- 的含量较少,因此可以通过测试产物中的氮氧同位素组成来推断/计算水体硝酸盐同位素组成。对于这类无 N_2O 还原酶的反硝化细菌有致金色假单胞菌(*P. aureofaciens* ATCC 13985)、绿针假单胞菌(*P. chlororaphis* ATCC 43928)、肾棒状杆菌(*Corynebacterium nephridii* ATCC 11425)。这 3 株反硝化细菌都可以用于硝酸盐氮同位素的测试(Sigman *et al.*, 2001),对于氧同位素的测试,Casciotti 等(2002)发现,反硝化过程中这 3 株细菌与水中氧存在不同程度交换的现象,其中以致金色假单胞菌 *P. aureofaciens* 反硝化过程中交换百分数较低,可应用于氧同位素的测试。

1.3 实验条件

实验方法在已有研究(Sigman *et al.*, 2001; Casciotti *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2007; McIlvin & Casciotti, 2011)的基础上,根据实验室条件进行了更改,在所需 TSB/TSA 培养基中添加无机盐,使配制的培养基中无机盐的浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$, $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$, $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 。无硝酸盐的液体培养基为在原有 TSB 培养基中添加 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$, $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 。液体培养基一般在接种前 1 天晚上 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 50 min,第 2 天早上进行接种。无硝酸盐的液体培养基一般在离心当天 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min。

1.4 实验过程

菌种收到后用吸管吸取大约 $0.5 \sim 1.0 \text{ mL}$ 培养液,将菌球(干粉)混匀。在无菌条件下将菌球转移至液体培养基中,混合均匀,吸取悬浊液接种至其他液体培养基或斜面或平板中。培养 $1 \sim 2 \text{ d}$ 后将菌种接种至血清瓶中做实验用菌,培养瓶放于摇床中培养 $5 \sim 10 \text{ d}$ 。

在准备样品的当天离心菌液 10 min。将上清液倒出,使用无硝酸根的培养液将离心管内的菌球转移到同一离心管内,再次离心。向血清瓶中加入抑泡剂,然后使用无硝酸根的培养液将菌球充分打散,使菌液均一。然后吸取 3 mL 的菌液至 20 mL 顶空

瓶中,将铝盖压紧以保证顶空瓶的密封性。利用高纯氮气以 $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速吹扫至少 3 h (Mellvin & Casciotti 2011)。根据硝酸根含量使用气密性良好注射器,加入约 50 nmol NO_3^- 过夜培养,同一样品做 3 个平行样。第 2 天利用质谱仪测试前加入 $0.1 \sim 0.2 \text{ mL } 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,将细菌灭活同时固定生物作用中产生的 CO_2 。

1.5 测试方法

由于 Trace-Gas 本身无顶空进样系统,需做相应连接改进。在保证连接系统密闭性较好的情况下,将顶空瓶内产生的 N_2O 气体导出,在 He 气流的作用下分别经化学阱去除气流中的 H_2O 和 CO_2 ,利用 Trace Gas Pre-concentrator 自带的 PreCon 系统富集 N_2O 即从顶空瓶中导出反应气,随后经气相色谱 (GC) 分离柱,分离 N_2O ($m/z = 44$) 和 CO_2 ($m/z = 44$),经分离后的样品气进入质谱测试。从样品出峰图谱看 2 气体出峰时间相隔 $40 \sim 50 \text{ s}$,色谱分离柱分离效果较好。实验室现有的该测试仪器样品信号最高可达 20 nA ,仪器较为理想的测试信号在 10 nA 范围内。测定的同位素值分别与国际标准相对应:

$$\delta_{\text{样品}} = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}} - 1) \times 1000$$

式中 $R_{\text{样品}}$ 和 $R_{\text{标准}}$ 分别为样品和标准的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 或 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$,整个测试过程中,氮氧同位素需要校正。测量结果是样品相对于参考气的值,但参考气不作为样品的绝对参考,而是选择硝酸盐的国际标准物质。同样品进行相同操作,利用标准物质的测试结果进行校正。校正后 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的值分别以大气 N_2 和 SMOW 标准化。以上实验均在中国科学院地球化学所环境地球化学国家重点实验室内完成。

2 结果与分析

2.1 不同样品用量测试

有文献报道使用该方法分析低含量 NO_3^- 如 20 nmol (Sigman *et al.* 2001; Casciotti *et al.* 2002),也有采用 100 nmol 用量 (Xue *et al.* 2010),随着方法的完善目前可以分析 $1 \sim 10 \text{ nmol}$ (Mellvin & Casciotti 2011)。本研究设计了一个样品用量梯度进行测试,质谱测试结果如图 1 所示。在现有样品前处理的条件和同等测试参数条件下,50、80、100 nmol 样品用量所得出的同位素结果非常相近,10、20 nmol 结果显示有相对较高的氮氧同位素值。这可能是由于加入的样品量较少,测试结果受样品本底的影响

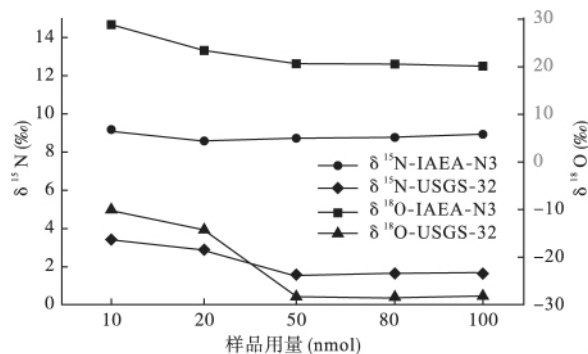


图 1 不同样品用量国际标准测试

Fig. 1 Isotopic values of international standard in different sample contents

较大。综合考虑样品浓度大小,仪器信号及测试稳定性等方面,50 nmol NO_3^- 样品较利于操作和计算。

2.2 标准测试

表 1 为 4 个国际标准的同位素组成推荐值 (Böhlke *et al.*, 2003),国际标准中除 USGS-35 为 NaNO_3 外,其他 3 个同位素标准都是 KNO_3 固体颗粒。分别将配制好的标准物质溶液注入瓶中,每样测试 5 次,测试结果误差见图 2 (数据未进行校正)。从测试结果看,测试样的 $\delta^{15}\text{N}$ 的标准偏差范围在 $0.11\text{‰} \sim 0.43\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 的标准偏差范围在 $0.24\text{‰} \sim 0.38\text{‰}$ 。标准物质测试结果重现性及测试精度均较好。

表 1 同位素标准值

Table 1 Isotopic standard values

标准	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	$\delta^{18}\text{O}(\text{‰})$	$\delta^{17}\text{O}(\text{‰})$
USGS-32	180	25.7	-
USGS-34	-1.8	-27.9	-14.8
USGS-35	2.7	57.5	51.5
IAEA-N3	4.7	25.6	13.2

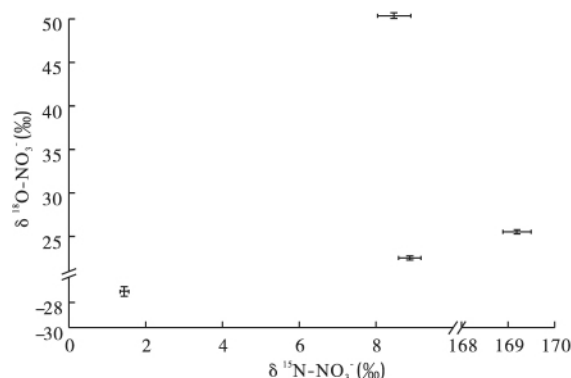


图 2 同位素标准测试结果误差线图 ($n=5$)

Fig. 2 Analysis error of isotopic values for international standard

2.3 不同批次标准及样品测试结果

不同时间及批次的样品, 由于反应菌株的差异, 在反硝化过程中可能会有差异, 因此需要在不同批次中加入国际标准对测试样品进行校正 (Sigman *et al.* 2001; Casciotti *et al.* 2002; Xue *et al.* 2010)。图3代表4个批次(每批次同一样品测试3次)的致金色假单胞菌测试国际标准氮同位素和氧同位素未校正测试结果。由测试结果可以看出, 仪器对不同批次细菌作用产生的 N_2O 气体氮氧同位素组成相互间有一定变化, 但变化较小如 $\delta^{15}N$ 变化 $< 0.5\%$, $\delta^{18}O$ 变化 $< 1.8\%$ 。存在较大差异的主要原因是同位素组成较高或较低的标准, 另外也跟不同批次同位素分馏效应、试剂本底以及氧同位素交换、数据未校正等因素有关。

由于反硝化过程中, 同位素分馏, 试剂本底以及氧同位素交换等因素的存在, 因此必须对测试结果进行校正。校正方法可以通过与样品经相同处理过程的国际同位素标准, 来校正因同位素分馏、试剂本底以及氧同位素交换等因素对测试结果的影响。

2.3.1 氮同位素数据校正 氮同位素在反硝化过程中如果可以完全转化, 转化过程中不会发生同位素交换现象, 因此只需对其进行本底校正。Sigman 等 (2001) 发现, 空白对不同同位素组成的样品差异

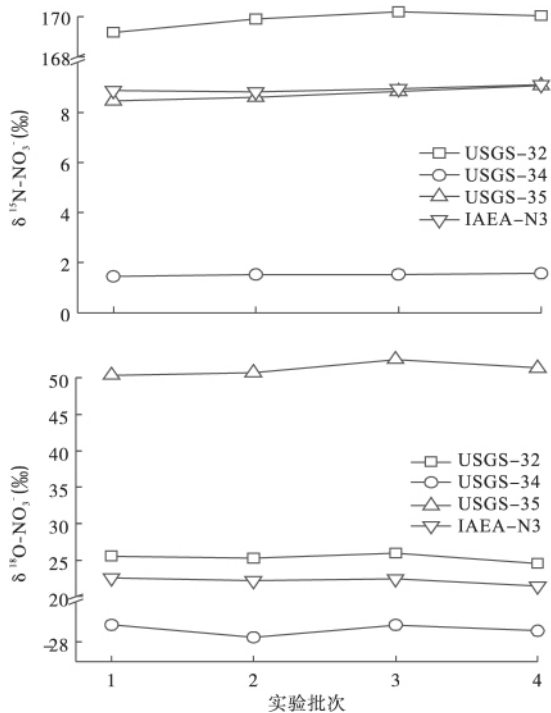


图3 不同批次氮、氧同位素测试结果对比 ($n=3$)
Fig. 3 $\delta^{15}N-NO_3^-$, $\delta^{18}O-NO_3^-$ measure values in different times

是很小的, 因为一般空白的量 < 0.5 nmol, 在样品中所占比例较小。其研究还发现, 在样品添加前, 如果仅吹扫 20 min, 试剂空白比较大, 吹扫 2 h 空白很大程度上降低, 可能原因是菌体会吸附 N_2O 气体, 为此我们进行 3 h 的吹扫, 尽量降低空白对样品的影响。

根据同位素质量平衡原理可得:

$$M = S + B \quad (1)$$

$$\delta^{15}N_M \times M = \delta^{15}N_S \times S + \delta^{15}N_B \times B \quad (2)$$

式中 M 为测试 N_2O 气体总量, S 为样品量, B 为空白量。 $\delta^{15}N_M$ 为测试 N_2O 气体氮同位素值, $\delta^{15}N_S$ 为样品真实氮同位素值, $\delta^{15}N_B$ 为空白的氮同位素值。对于同一批次, 在加样量相同情况下, M 、 S 和 B 相同。因此利用带有两国际标准的公式作差可得校正系数 S/M 。

$$S/M = (\delta^{15}N_{M-1} - \delta^{15}N_{M-2}) / (\delta^{15}N_{T-1} - \delta^{15}N_{T-2}) \quad (3)$$

由式 (3) 可看出, 校正系数可以通过 2 种已知同位素组成的标准物质测得。

样品氮同位素的测试结果是由 m/z 45 ($^{14}N^{15}N^{16}O$ 、 $^{15}N^{14}N^{16}O$ 、 $^{14}N^{14}N^{17}O$) 和 m/z 44 ($^{14}N^{15}N^{16}O$) 的比值同参比气计算而得。由于受非质量分馏的影响一些含氧化合物中富集 ^{17}O , 因此对氮同位素计算时可能会受 $^{14}N^{14}N^{17}O$ 影响比较大。USGS-35 是由智利阿塔卡马沙漠天然硝石纯化得到的, 由于受非质量分馏的影响富集 ^{17}O (表 1), 使得测试的氮同位素结果比真值要高。如对于高 $\delta^{18}O$ (60‰ ~ 80‰) 的雨水样品, 其 $\delta^{15}N$ 测试结果可能会比真实值要高出 1‰ ~ 2‰ (Sigman *et al.* 2001)。因此一般不使用 USGS-35 对样品氮同位素测试结果进行校正 (Coplen *et al.* 2004)。

2.3.2 氧同位素校正 氧同位素校正过程较复杂, 除受本底的影响外, 因在反硝化过程中 2 个 NO_3^- 离子才可以生成一个 N_2O 分子, 只有 1/6 的氧原子转化到被测气体中, 存在同位素分馏且有与水中氧同位素发生交换现象。Casciotti 等 (2002) 将 IAEA-N3 溶解于具有不同氧同位素的水中, 在相同条件下培养, 由水体 $\delta^{18}O$ 值与 IAEA-N3 的 $\delta^{18}O$ 值变化关系得出 *P. aureofaciens* 氧同位素交换小于 10%, 大多数低于 3%, 并且在同一批次的培养中这种同位素交换是恒定的。对于 $\delta^{18}O$ 为 20‰ 的样品, 如果假定交换比例为 5%, 实际交换比例为 2% 或 8% 的样品, 所产生的误差为 $\pm 0.6\%$ 。

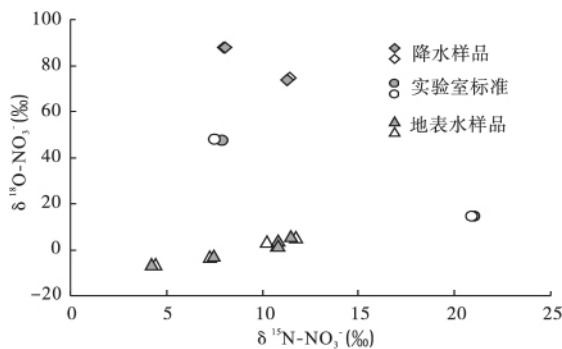


图4 批次水样及标准测试结果比较

Fig. 4 Corrected values for water samples and working reagents in two times

虽然较氮的同位素质量平衡公式略微复杂,但同样可以通过使用已知同位素组成的标准物质简化,Casciotti等(2002)对氧同位素校正做了详细表述,其中 M 、 S 同上, X 为硝酸盐中氧与水体氧交换比例。在保证加样量相同的条件下,可用下列公式进行计算:

$$M / (S \times (1 - X)) = (\delta^{18}\text{O}_{\text{T}-1} - \delta^{18}\text{O}_{\text{T}-2}) / (\delta^{18}\text{O}_{\text{M}-1} - \delta^{18}\text{O}_{\text{M}-2}) \quad (4)$$

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{T-sample}} = \delta^{18}\text{O}_{\text{T}-1} - (\delta^{18}\text{O}_{\text{M}-1} - \delta^{18}\text{O}_{\text{M-sample}}) \times M / (S \times (1 - X)) \quad (5)$$

综上所述,使用2种标准物质对结果进行校正,样品测试结果在所选2种标准物质取值范围内。本研究对实验室常用的工作标准和一些水样进行了2个不同批次测试,经校正后 $\delta^{15}\text{N}$ 同位素的取值范围是 $+4.2\text{‰} \sim +11.8\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 同位素的取值范围为 $-6.3\text{‰} \sim +87.9\text{‰}$,这也是大多数样品中的氮氧同位素取值范围。经校正后得到 $\delta^{15}\text{N}$ 同位素标准差在 $0.04\text{‰} \sim 0.45\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 同位素的标准差在 $0.03\text{‰} \sim 0.31\text{‰}$ 。从图4可见2个批次测试的相同样品结果重现性很好,表明上述的实验条件可以也满足大部分地表水样硝酸盐氮氧同位素分析要求。

3 结论

培养致金色假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens* ATCC 13985) 5~10 d后,建议离心浓缩5倍后注入含有50 nmol NO_3^- 水样,利用Pre-con系统浓缩富集,最后进入质谱仪测试,获得稳定的结果。本研究通过上述条件进行的样品及标准的测试结果表明标准偏差大多数好于 0.3‰ ,可满足地表水样分析要求。本实验为国内首次开展测试硝酸盐氮氧同位素组成的方法,对于不同水样和不同条件对测试结果

可能的影响还需要进一步的探讨。但可以明确的是,本实验中采取的培养条件、实验预处理过程及使用的分析系统是稳定可行的,可以满足测试要求。

参考文献

- 刘丛强. 2007. 生物地球化学过程与地表物质循环——西南喀斯特流域侵蚀与生源要素循环. 北京: 科学出版社.
- 毛绪美, 罗泽娇, 刘存富, 等. 2006. 细菌反硝化法同时分析天然水中硝酸盐氮、氧同位素组成研究. 地质科技情报, 25(5): 97-100.
- 张翠云, 张俊霞, 马琳娜, 等. 2011. 硝酸盐氮同位素反硝化细菌法测试技术的建立. 核技术, 34(3): 237-240.
- 岳甫均, 李军, 刘小龙, 等. 2010. 利用氮同位素技术探讨天津地表水氮污染. 生态学杂志, 29(7): 1403-1408.
- Beremner JM, Edwards AP. 1965. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. I. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Science Society of America Proceedings*, 29: 504-507.
- Böhlke JK, Mroczkowski S, Coplen TB. 2003. Oxygen isotopes in nitrate: New reference materials for ^{18}O : ^{17}O : ^{16}O measurements and observations on nitrate-water equilibration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17: 1835-1846.
- Casciotti KL, Sigman DM, Galanter HM, et al. 2002. Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method. *Analytical Chemistry*, 74: 4905-4912.
- Coplen TB, Böhlke JK, Casciotti KL. 2004. Using dual-bacterial denitrification to improve $\delta^{15}\text{N}$ determinations of nitrates containing mass-independent ^{17}O . *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 245-250.
- Fang YT, Koba K, Wang XM, et al. 2011. Anthropogenic imprints on nitrogen and oxygen isotopic composition of precipitation nitrate in a nitrogen-polluted city in southern China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11: 1313-1325.
- Hastings MG, Sigman DM, Lipschultz F. 2003. Isotopic evidence for source changes of nitrate in rain at Bermuda. *Journal of Geophysical Research*, 108: doi: 10.1029/2003JD003789.
- Hastings MG, Steig EJ, Sigman DM. 2004. Seasonal variations in N and O isotopes of nitrate in snow at Summit, Greenland: Implications for the study of nitrate in snow and ice cores. *Journal of Geophysical Research*, 109: D20306. doi: 10.1029/2004JD004991.
- Kaiser J, Hastings MG, Houlton BZ, et al. 2007. Triple oxygen isotope analysis of nitrate using the denitrifier method and thermal decomposition of N_2O . *Analytical Chemistry*, 79: 599-607.
- Kendall C, Elliott EM, Wankel SD. 2007. Tracing anthropogenic inputs of nitrogen to ecosystems // Michener R,

- Lajtha K ,eds. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science (2nd ed.) . Berlin: Blackwell Publishing.
- Li SL , Liu CQ , Lang YC , *et al.* 2010a. Tracing the sources of nitrate in karstic groundwater in Zunyi , Southwest China: A combined nitrogen isotope and water chemistry approach. *Environmental Earth Sciences* , **60**: 1415 – 1423.
- Li SL , Liu CQ , Li J , *et al.* 2010b. Assessment of the sources of nitrate in the Changjiang River , China: Using a nitrogen and oxygen isotopic approach. *Environmental Science and Technology* , **44**: 1573 – 1578.
- Liu CQ , Li SL , Lang YC , *et al.* 2006. Using ^{15}N and ^{18}O values to identify nitrate sources in karst ground water , Guiyang , Southwest China. *Environmental Science and Technology* , **40**: 6928 – 6933.
- Mellvin MR , Casciotti KL. 2011. Technical updates to the bacterial method for nitrate isotopic analyses. *Analytical Chemistry* , **83**: 1850 – 1856.
- Sigman DM , Altabet MA , Michener R , *et al.* 1997. Natural abundance-level measurement of the nitrogen isotopic composition of oceanic nitrate: An adaptation of the ammonia diffusion method. *Marine Chemistry* , **57**: 227 – 242.
- Sigman DM , Casciotti KL , Andreani M , *et al.* 2001. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Analytical Chemistry* , **73**: 4145 – 4153.
- Silva SR , Kendall C , Wilkison DH , *et al.* 2000. A new method for collection of nitrate from fresh water and the analysis of nitrogen and oxygen isotope ratios. *Journal of Hydrology* , **228**: 22 – 36.
- Stålnacke P , Grimvall A , Sundblad K , *et al.* 1999. Estimation of riverine loads of nitrogen and phosphorous to the Baltic Sea , 1970 – 1993. *Environmental Monitoring and Assessment* , **58**: 173 – 200.
- Xue DM , De Baets B , Vermeulen J , *et al.* 2010. Error assessment of nitrogen and oxygen isotope ratios of nitrate as determined via the bacterial denitrification method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , **24**: 1979 – 1984.
-
- 作者简介 岳甫均 ,男 ,1985 年生 ,博士研究生。主要从事河流地球化学和流域生物地球化学循环研究。E-mail: yuefujun@vip.skleg.cn
- 责任编辑 魏中青
-