

DOI:10.13232/j.cnki.jnju.2016.01.003

稳定同位素技术在环境水体氮的生物地球化学 循环研究中的应用

李荣富^{1,2}, 罗跃辉^{1,2}, 曾洪玉^{1,2}, 阮晓红^{1,2*}, 刘丛强^{3*}

(1. 南京大学表生地球化学教育部重点实验室, 南京, 210023; 2. 南京大学地球科学与工程学院
水科学系, 南京, 210023; 3. 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)

摘要: 氮的生物地球化学循环是地表环境中最复杂的物质循环之一。近年来, 稳定同位素技术在氮的生物地球化学循环研究中得到了广泛应用, 极大地丰富了人们对氮的来源、物理迁移及其生物地球化学循环等过程的认识, 完善了氮的生物地球化学循环理论体系。本文综述了在环境水体中应用稳定同位素示踪技术及统计模型, 将氮的溯源研究从定性识别拓展到定量解析; 应用稳定同位素分馏理论及同位素配对技术, 实现氮的生物地球化学循环转化途径的判别及其转化速率的定量解析; 重点提出应进一步开展不同转化途径、不同水体环境要素对氮同位素分馏特征的影响研究, 逐步完善环境水体氮循环同位素分馏理论体系, 为准确认识氮循环和加强水环境保护奠定科学基础。

关键词: 稳定同位素, 同位素分馏, 同位素配对技术, 源解析, 氮转化途径

中图分类号: X502

文献标识码: A

Review on applications of stable isotope techniques in studying biogeochemical cycle of nitrogen in environmental water

Li Rongfu^{1,2}, Luo Yuehui^{1,2}, Zeng Hongyu^{1,2}, Ruan Xiaohong^{1,2*}, Liu Congqiang^{3*}

(1. Department of Water Science, School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing, 210023, China; 2. MOE Key Laboratory of Surficial Geochemistry, Nanjing University, Nanjing, 210023, China; 3. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, 550002, China)

Abstract: The nitrogen cycle is one of the most complicated biogeochemical cycles in the aqueous environment. Stable isotope techniques have been widely applied in the studies of the biogeochemical cycle of nitrogen. These studies have greatly enriched our understanding of sources, migrations and biogeochemical cycles of nitrogen and established the theoretical system of the biogeochemical cycle of nitrogen. We review the present research of nitrogen sources which has been extended from the qualitative identification to the quantitative apportionment based on stable isotope tracing

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41230640), 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07204-003)

收稿日期: 2015-12-26

* 通讯联系人, E-mail: ruanxh@nju.edu.cn, liucongqiang@vip.skleg.cn

techniques and statistical methods, and the existing studies of the biogeochemical cycle of nitrogen from qualitative identification to the quantitative estimation of transformation processes through the isotope fractionation in the nitrogen cycle and the isotope pairing techniques. In the end, we propose that the further study should be focused on the impacts of various nitrogen transformation processes and various environmental factors on characteristics of isotope fractionation and continually perfect the theory of aqueous nitrogen isotope fractionation.

Key words: stable isotope, isotope fractionation, isotope pairing technique, source apportionment, nitrogen transformation

氮是组成地球生命的基本元素之一,对维持生命体的结构功能有重要意义.然而,随着人工合成氮肥的大量使用和固氮作物的大量种植,大量的氮进入地下水和地表水,导致进入湖泊和海洋中的氮元素大量增加,进而引起水生系统的富营养化、蓝藻爆发和水质恶化等严重的环境问题^[1].

地表环境中氮素形态众多,包括 NO_3^- (+V)、 NO_2 (+IV)、 NO_2^- (+III)、 NO (+II)、 N_2O (+I)、 N_2 (0)、 NH_4^+ (-III)以及大量含氮有机物等,不同氮素之间相互转化导致了地表氮循环过程极为复杂.环境中的氮素因其不同的来源、不同的迁移转化途径、不同的赋存形态而具有不同的同位素特征,这给利用稳定同位素技术研究氮的生物地球化学循环提供了可能.不同来源的氮素有不同的同位素值域范围,据此可识别环境中氮素的主要来源^[2].然而,由于不同氮源同位素值域存在重叠,且氮转化过程中同位素分馏效应复杂,导致利用稳定同位素识别氮源存在不确定性.在微生物驱动下的氮转化过程中,一般情况下微生物优先利用轻同位素分子^[3],使得底物富集重同位素,产生了动力学同位素分馏效应.不同的氮转化过程同位素分馏特征不同,据此也可识别氮转化途径.依据同位素分馏理论,进一步的借助于同位素添加方法可进行氮转换速率测定.同位素配对技术(IPT)^[4]作为最常用的同位素添加方法之一,在硝化、反硝化、厌氧氨氧化等氮转化速率研究中得到了广泛应用.

本文重点概述了稳定同位素技术在环境水体氮源的定性与定量判别、氮的转化途径识别与速率测定等方面的应用研究进展及存在的问题,并对应用研究的需求进行了展望.

1 基于稳定同位素示踪技术的氮溯源研究

1.1 氮源定性识别 稳定同位素技术于 20 世纪 30 年代起源于物理学,并于 40 年代应用于地质学研究.1972 年, Kohl *et al*^[5]首次利用 $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ 研究了化肥对伊利诺伊 Sangamon 河 NO_3^- 的贡献.此后,大量学者对不同氮源 $\delta^{15}\text{N}$ 值域进行了研究^[6]:铵氮化肥、硝氮化肥及尿素均由大气 N_2 通过工业固氮而来,其 $\delta^{15}\text{N}$ 值域为 $-6\text{‰} \sim +6\text{‰}$;大气氮沉降的氮素受大气中复杂的光化学反应控制且存在有汽车尾气(NO_x)等各种氮源贡献,其 $\delta^{15}\text{N}$ 值域为 $-13\text{‰} \sim +13\text{‰}$;人畜粪便与生活污水由于存放、处理及应用中氮挥发导致剩余 NH_4^+ 富集 ^{15}N ,进而转化为高 ^{15}N 的 NO_3^- ,其 $\delta^{15}\text{N}$ 值域分别为 $+5\text{‰} \sim +25\text{‰}$ 和 $+4\text{‰} \sim +19\text{‰}$;土壤氮素受矿化及硝化作用综合影响,其 $\delta^{15}\text{N}$ 值域为 $0\text{‰} \sim +8\text{‰}$.各

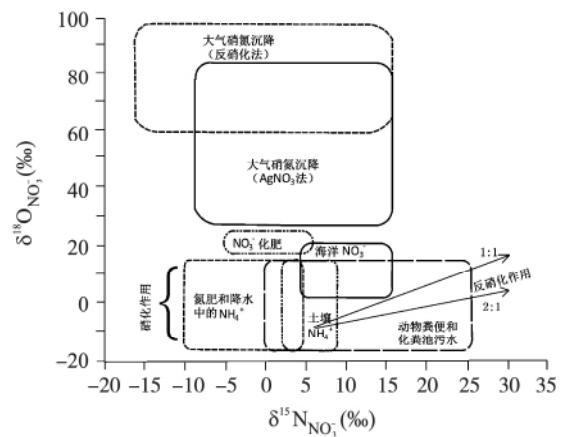


图 1 不同来源硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值范围^[9]

Fig. 1 Range of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of various potential nitrate sources

种氮源 $\delta^{15}\text{N}$ 值域如图 1 所示.

由于部分氮源的 $\delta^{15}\text{N}$ 值域存在重叠,且环境中氮素受到生物、化学和物理过程共同影响,在氮迁移、转化(氨挥发、氨氧化、反硝化作用等)过程中 $\delta^{15}\text{N}$ 发生分馏,导致氮源识别存在不确定性. 针对以上问题,1987 年 Amberger and Schmidt^[7] 研究发现, $\delta^{18}\text{O}$ 比 $\delta^{15}\text{N}$ 能更有效区分土壤微生物硝化作用产生的 NO_3^- 和大气沉降中的 NO_3^- , 其原因为受大气层中光化学作用影响,大气沉降 NO_3^- 通常表现出较高的 $\delta^{18}\text{O}$ (20‰~79‰),而实验室结果表明微生物硝化产生的 NO_3^- 有两个氧原子来自 H_2O ,一个来自大气中 O_2 (23.5‰)^[8],由此计算出土壤中由硝化作用产生的 NO_3^- 的 $\delta^{18}\text{O}$ 理论值为 0.8‰~5.8‰. 由于氧同位素分馏及同位素交换等影响,实际观测到的硝化作用产生的土壤 NO_3^- 中 $\delta^{18}\text{O}$ 比理论值高 5‰~10‰. Kendall *et al*^[9] 总结了多种潜在氮源的 $\delta^{18}\text{O}$ 值域,并对比了反硝化法和 AgNO_3 法两种测试方法对大气沉降中 $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3^-$ 的影响,结果如图 1 所示.

另外,利用 $\Delta^{17}\text{O}$ 可判别大气沉降和陆源 NO_3^- 的贡献. 大气沉降中 NO_3^- 受光化学作用的影响,氧同位素发生非质量相关分馏,其 $\Delta^{17}\text{O}$ ($=\delta^{17}\text{O}-0.52\delta^{18}\text{O}$) 表现出正异常. 陆源的 NO_3^- 主要来源于微生物硝化作用,氧同位素满足质量相关分馏 ($\Delta^{17}\text{O}=0$). 因此,根据二元混合模型式(1)可判别大气沉降和陆源 NO_3^-

的贡献.

$$\begin{aligned} (F_A \times \Delta^{17}\text{O}_A + F_N \times \Delta^{17}\text{O}_N) / (F_A + F_N) &= \Delta^{17}\text{O}_{\text{mix}} \\ F_A + F_N &= 1 \end{aligned} \quad (1)$$

式中, F_A 、 F_N 分别为大气沉降和陆源 NO_3^- 的贡献率, $\Delta^{17}\text{O}_A$ 、 $\Delta^{17}\text{O}_N$ 和 $\Delta^{17}\text{O}_{\text{mix}}$ 分别为大气沉降、陆源和混合后 NO_3^- 中 $\Delta^{17}\text{O}$.

根据上述原理,Michalski *et al*^[10] 首次测量了拉霍亚地区气溶胶 NO_3^- 中 $\Delta^{17}\text{O}$ 为 20.0‰~30.8‰,Morin *et al*^[11] 首次测量了北极大气沉降 NO_3^- 中 $\Delta^{17}\text{O}$ 为 29‰~35‰,Tsunogai *et al*^[12] 测得日本利尻岛湿沉降 NO_3^- 中 $\Delta^{17}\text{O}$ 为 20.8‰~34.5‰,Liu *et al*^[13] 测量黄河流域单个降水 NO_3^- 中 $\Delta^{17}\text{O}$ 为 23.6‰,并据此计算大气沉降对黄河 NO_3^- 的贡献率为 0~7‰.

相比于 $\Delta^{17}\text{O}$,利用 $\delta^{18}\text{O}$ 不仅可区分氮源类型,还可识别氮源的空间分布. 假设研究区地下水主要接受大气降水补给,且 NO_3^- 主要由发生降水地区土壤硝化作用产生,可根据地下水 NO_3^- 中 $\delta^{18}\text{O}$ 推算大气降水中 $\delta^{18}\text{O}$,并由此计算 NO_3^- 补给高程. 具体计算方法如式(2)所示.

$$\begin{aligned} \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} &= (3\delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{air}}) / 2 \\ alt_{\text{theoretical}} \delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}} &= a\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} + b \end{aligned} \quad (2)$$

式中, $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ 为大气降水氧同位素值, $\delta^{18}\text{O}_{\text{air}}$ 为空气中氧同位素值, $alt_{\text{theoretical}} \delta^{18}\text{O}_{\text{nitrate}}$ 为 NO_3^- 补给高程, a 、 b 为常数,一些研究区域的取值如表 1 所示.

表 1 国内外多个地区地下水补给高程参数表^[14-21]

Table 1 The parameters of groundwater recharging altitude of the domestic and international regions

研究区域	a (‰/100 m)	b	参考文献
Ganga, India	-0.19	-	Ramesh and Sarin ^[14] , 1992
Ganla river catchment, India	-0.15	-6.31	Bartarya <i>et al</i> ^[15] , 1995
Seti river, Nepal Himalaya	-0.18	-6.63	Garziones <i>et al</i> ^[16] , 2000
North America	-0.30	-	
Central& south America	-0.28	-	Poage and Chamberlain ^[17] , 2001
Europe	-0.25	-	
乌海, 中国	-0.39	2.99	侯俊琳等 ^[18] , 2013
川藏, 中国	-0.26	7.75	于津生等 ^[19] , 1980
太行山, 中国	-0.23	-7.69	黄平华等 ^[20] , 2012
北京, 中国	-0.24	-8.02	宋献方等 ^[21] , 2007

依据上述原理, Rogers *et al*^[22] 根据 Reunion Island 地下水 NO_3^- 中 $\delta^{18}\text{O}$, 推算当地 NO_3^- 来源中生活污水补给高程低于 600 m, 畜禽粪便补给高程为 600~1300 m. 由于该方法基于多种假设条件而成立, 若地下水并非来源于大气降水补给, NO_3^- 主要来源并非硝化作用的产物, 则利用上式进行硝酸盐补给高程识别研究会造成较大误差^[8].

1.2 氮溯源定量评估 根据不同氮源的氮、氧同位素值域虽然能识别氮的主要来源, 但无法确定不同氮源的贡献率. 因此, 2002 年 Phillips and Koch^[23] 提出了基于硝酸盐氮、氧稳定同位素质量均衡的混合模型, 可解析不超过三种氮源对硝酸盐的贡献. 基于氮氧同位素质量均衡的混合模型计算方法如式(3)所示.

$$\begin{aligned} \delta^{15}\text{N}_M &= f_1\delta^{15}\text{N}_1 + f_2\delta^{15}\text{N}_2 + f_3\delta^{15}\text{N}_3 \\ \delta^{18}\text{O}_M &= f_1\delta^{18}\text{O}_1 + f_2\delta^{18}\text{O}_2 + f_3\delta^{18}\text{O}_3 \quad (3) \\ f_1 + f_2 + f_3 &= 1 \end{aligned}$$

式中: $\delta^{15}\text{N}_M$ 、 $\delta^{18}\text{O}_M$ 为混合后硝酸盐氮、氧同位素值, 下标 1、2、3 分别代表三种来源的硝酸盐, f 为污染源的贡献率. 同时, 将模型中 $\delta^{15}\text{N}_M$ 和 $\delta^{18}\text{O}_M$ 改为 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$, 该模型还可用于有机氮源贡献计算.

Deutsch *et al*^[24] 利用上述质量均衡模型对 Mecklenburg-Vorpommern 流域小型河流中 NO_3^- 源贡献进行分析, 研究发现污水、地下水、大气沉降的 NO_3^- 贡献率分别为 86%、11% 和 3%. Phillips and Koch^[23] 基于 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 混合模型发现貂从三文鱼、瘦牛肉、牛脂三种不同食物摄取的氮的比例分别为 0.65、0.31、0.04.

由于环境中氮的来源往往多于三种, 质量均衡模型无法确定复杂氮源的贡献, 且没有考虑氮源同位素时空差异性, 同位素分馏效应, 在氮转化活跃区可能得出错误的溯源结论. 对此, 2008 年 Parnell *et al*^[25] 开发了基于 R 语言的稳定同位素分析模型 (Stable Isotope Analysis in R, SIAR), 可解析多种氮源对硝酸盐的贡献, 并在模型中考虑了氮源同位素时空差异性, 同位素分馏效应对氮源同位素的影响.

SIAR 模型基于贝叶斯方法计算氮源贡献率的基本原理是: 应用同位素质量守恒方程求得似然函数, 并假设氮源贡献率 P_k 的先验分布为狄利克雷分布^[25], 氮源同位素值 s_{jk} 、同位素分馏系数值 c_{jk} 、模型残差 ϵ_{jk} 先验分布为正态分布, 而后根据样本检测数据结合似然函数与先验分布, 利用马尔科夫蒙特卡洛 (MCMC) 方法计算 P_k 后验分布, 得到氮源的贡献率, 其基本方程如式(4)所示.

$$\begin{aligned} X_{ij} &= \sum_{k=1}^K P_k (S_{jk} + c_{jk}) + \epsilon_{ij} \\ s_{jk} &\sim N(\mu_{jk}, \omega_{jk}^2) \\ c_{jk} &\sim N(\lambda_{jk}, \tau_{jk}^2) \\ \epsilon_{jk} &\sim N(0, \sigma_{jk}^2) \end{aligned} \quad (4)$$

式中, X_{ij} 为混合水样 i 中 j 同位素值, P_k 为氮源 k 的贡献率, q_{jk} 为源 k 中 j 的浓度, s_{jk} 为源 k 中 j 的同位素值, c_{jk} 为 j 同位素分馏系数值, ϵ_{ij} 为残差. 若各个源的 j 元素浓度相同, 则 $P=r$.

Yang *et al*^[26] 和 Ding *et al*^[27] 分别利用 SIAR 模型研究了太湖流域合溪水库小流域和太滬河支流的硝酸盐污染的源贡献, 研究发现 12 月污水和粪便对合溪水库 NO_3^- 贡献为 52%, 5 月化肥贡献为 37%; 土壤硝化作用产物是太滬河支流 NO_3^- 主要来源, 丰、枯水期污水贡献率分别为 17.8% 和 22.4%. Xue *et al*^[28] 利用 SIAR 模型对比利时某地区地表水氮污染来源进行了研究, 发现生活污水、土壤有机氮、铵态氮肥、硝态氮肥和大气沉降的贡献率分别为 26%~40%、23%~25%、18%~23%、5%~18%、2%~8%; Marion *et al*^[29] 基于 SIAR 模型对匹兹堡 9 Miles 河段硝酸盐来源进行了研究, 发现基流条件下 94% 的硝酸盐来源于污水, 暴雨条件下大气沉降对硝酸盐的贡献率为 34%.

以上研究表明, $\Delta^{17}\text{O}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 同位素可有效识别大气沉降来源的 NO_3^- , 解决了大气沉降来源和陆源氮素 $\delta^{15}\text{N}$ 值域重叠的问题, 但是农业氮肥、土壤有机氮和粪便与污水来源的氮素

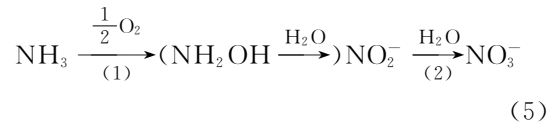
$\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值域仍存在重叠,目前仍然无法有效区分.结合其它同位素如 ^{11}B ^[30]、化学示踪剂如 Cl^- 浓度特征和 $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 比值特征^[31]、 Cl^-/Br^- 比值特征^[32]、有机质的核磁共振特性^[33]及其它化学标记物如生物制药^[34]等,可辅助氮源识别的校验.尽管SIAR模型提供了氮污染溯源定量解析的方法,但是对于模型中氮源同位素分馏系数这一重要参数还缺少可靠的理论研究值,目前一般采用经验值,这可能与原位同位素分馏特征不相符合,影响了溯源结果的可靠性.

2 基于稳定同位素示踪技术的氮转化途径的识别

2.1 氮循环途径定性判别

与重同位素相比,轻同位素具有较高的零位能,其形成的化学键键能较弱,可优先参与反应,导致同位素动力学非平衡分馏^[3].在动力学非平衡体系如挥发、硝化、反硝化以及离子交换等过程中,底物逐渐富集重同位素,使其同位素值升高.不同的转化过程,其同位素分馏特征不同.目前,对于氮循环过程中的硝化、反硝化、固氮、矿化、作物吸收等生物化学过程和氨挥发、水解、扩散等物理化学过程,其同位素分馏特征已有大量的研究成果;但是对于硝酸盐异化还原、厌氧氨氧化等氮转化过程,其同位素分馏效应目前尚不明确.

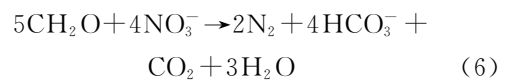
硝化反应过程可分为氨氧化和亚硝酸盐氧化反应两个阶段,反应过程如式(5)所示.硝化作用过程氮同位素分馏效应取决于第一阶段氨氧化过程,该过程微生物优先利用 ^{14}N ,使得剩余的铵盐中富集 ^{15}N ,同位素富集系数为 $-29\text{‰}\sim-12\text{‰}$ ^[35];第二阶段亚硝酸盐氧化反应属于快速反应,氮同位素分馏较小.当硝化作用单独存在时,土壤氨氮一般比硝氮更富集 $\delta^{15}\text{N}$.硝化作用引起的氮同位素分馏效应受反应条件的影响,如低浓度溶解氧以及过量的有机碳都会使氮同位素分馏效应增大^[36].当硝化反应完全进行,同位素分馏效应可忽略,近似认为硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 与原有的氨氮相同.



硝化作用方程和室内研究结果表明,硝酸盐氧原子1/3来源于空气中的 O_2 ,2/3来源于水^[7,9],与非硝化作用产生的硝酸盐相比,硝化作用生成的硝酸盐 $\delta^{18}\text{O}$ 值偏向水的 $\delta^{18}\text{O}$ 组成(自然环境中水的 $\delta^{18}\text{O}$ 在 $-15\text{‰}\sim-5\text{‰}$,大气中 $\delta^{18}\text{O}$ 为 $+23.5\text{‰}$).因此,可根据 $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3^-$ 判断 NO_3^- 是否为硝化反应产物.此外,根据瑞利分馏模型,通过研究底物浓度(NO_3^- 、 NH_4^+)与 $\delta^{15}\text{N}$ 的相关性来判别硝化反应是否发生^[37].

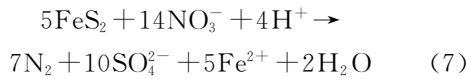
反硝化过程中,反硝化细菌优先利用 ^{14}N 和 ^{16}O ,导致残余 NO_3^- 中 ^{15}N 和 ^{18}O 富集.研究表明,反硝化作用过程 $\delta^{18}\text{O}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的比值通常介于 $1\sim 2:1$ ^[38].因此,硝酸盐氮、氧同位素比值也可作为识别反硝化作用的有效判据. *Panno et al.*^[39]基于硝酸盐 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的线性关系(2:1)证实了硝酸盐随河流和排水沟进入Mississippi河之前就已经发生了显著的反硝化作用.不同的功能微生物作用下的反硝化过程,其氮同位素及相关同位素的分馏效应不同. *Granger et al.*^[40]研究发现兼性厌氧脱氮菌产生的氮、氧同位素富集系数均为 $5\text{‰}\sim 25\text{‰}$,且残余硝酸盐 $\delta^{18}\text{O}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 比值为 $0.86\sim 1.02$,而光能异养脱氮菌引起的残余硝酸盐 $\delta^{18}\text{O}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 比值为 0.62 .

大部分反硝化细菌是异养菌,如脱氮小球菌、反硝化假单胞菌等.研究表明溶解氧小于 $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时异养反硝化便可进行^[41].异养反硝化过程中,硝酸盐作为电子受体接受有机物氧化释放的电子,还原为氮气,异养反硝化过程导致 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ 显著富集, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 显著贫化,反应原理如式(6):



也有少数反硝化细菌为自养菌,如脱氮硫杆菌,通过氧化硫或氢自养,自养反硝化过程导致 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ 显著富集, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}$ 显著贫化,反应原

理如式(7):



基于以上原理, Hosono *et al*^[42] 利用 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ 与 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}$ 之间的分馏特征, 区分了地下水异养反硝化和自养反硝化作用过程。

有研究表明, 其他氮转化过程如矿化作用、

硝酸盐淋滤以及植物吸收等过程不会造成显著的氮同位素分馏, 而无机氮同化过程中氮同位素分馏与氮的赋存形态有关, 硝氮、亚硝氮同化过程中 ^{15}N 同位素富集系数分别为 5.2‰ 和 0.9‰^[43]。Sun *et al*^[44] 系统总结了稳定同位素在碳、氮生物地球化学循环中的应用, 有关氮循环过程的同位素分馏系数统计见表 2。

表 2 氮循环过程中氮同位素分馏系数^[44]

Table 2 Fractionation factor for various processes in nitrogen cycles

氮循环过程	分馏系数(α)	氮循环过程	分馏系数(α)
矿化作用	≈ 1.000	$\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$ 水溶液	1.020~1.027
硝化作用	1.015~1.035	水溶液 NH_4^+ 、 NH_3 、 NO_3^- 扩散	≈ 1.000
反硝化作用	1.020~1.033	NH_4^+ 、 NO_3^- 固定	1.000~1.002
氮挥发	1.020~1.029	NH_4^+ 、 NO_3^- 植物吸收	≈ 1.000
固氮	0.998~1.002	NO_3^- 淋溶	≈ 1.000

2.2 氮循环过程定量研究 尽管利用同位素分馏特征能够识别氮转化途径, 但并不能反映氮转化的速率。通过添加人工标记的同位素, 测定含有特定同位素分子的产生速率, 可有效反映氮转化速率。其中, ^{15}N 同位素配对技术 (IPT) 作为最常用的同位素添加技术之一, 常用于测量反硝化与厌氧氨氧化作用速率。

传统的测量反硝化作用速率的方法主要有质量平衡法、乙炔抑制法、硝态氮损耗法、氮气通量法等^[4,45]。相对于传统的方法, 同位素配对技术因其以下优点得到了广泛应用: (1) 能够得到耦合硝化—反硝化作用速率^[46]; (2) 能够测量很低的反应速率^[45]; (3) 与其他技术结合能得到其他过程如硝酸盐异化还原 (DNRA) 等的速率信息^[47]。

Nielsen 提出了利用 IPT 测量反硝化作用的基本原理^[45], 主要过程为利用 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记培养柱中的上覆水, 当加入的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 与上覆水和沉积物表层中原有的 $^{14}\text{NO}_3^-$ 混合后, 其反硝化产物为三种氮气分子: $^{28}\text{N}_2$ ($^{14}\text{NO}_3^- + ^{14}\text{NO}_3^-$)、 $^{29}\text{N}_2$ ($^{14}\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$) 与 $^{30}\text{N}_2$ ($^{15}\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$), 通过测定 $^{29}\text{N}_2$ 与 $^{30}\text{N}_2$ 的产生速率 (r_{29} 与 r_{30}), 能计算沉积物中的反硝化作

用速率。其中, 沉积物中利用 $^{15}\text{NO}_3^-$ 发生的反硝化作用速率为:

$$D_{15} = p^{29}\text{N}_2 + 2 \cdot p^{30}\text{N}_2 \quad (8)$$

根据二项分布假设, 可得到利用未标记 $^{14}\text{NO}_3^-$ 发生反硝化作用的速率为:

$$D_{14} = D_{15} \cdot \frac{p^{29}\text{N}_2}{2 \cdot p^{30}\text{N}_2} \quad (9)$$

最终, 沉积物中发生的总反硝化作用速率为:

$$D^{\text{tot}} = D_{14} + D_{15} \quad (10)$$

以上计算须符合以下四点假设^[48]: (1) 加入的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 不会影响原位环境反硝化作用; (2) 利用上覆水中 NO_3^- 的反硝化作用速率随着上覆水 NO_3^- 浓度增加而线性增加; (3) 上覆水和沉积物 NO_3^- 还原区内, 标记态的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 与 $^{14}\text{NO}_3^-$ 混合均匀; (4) 沉积物—水界面能形成一个稳定的 NO_3^- 浓度梯度。

厌氧氨氧化作用指厌氧条件下, 微生物以 NO_2^- 为电子受体将 NH_4^+ 氧化为氮气的过程^[49]。2002 年, Thamdrup and Dalsgaard^[50] 进行了泥浆实验, 利用 IPT 研究了厌氧氨氧化对海洋沉积物中氮流失的贡献率, 其基本过程为: 对泥浆进行预培养以去除氧气和 NO_3^- , 然后分

别添加¹⁵NH₄⁺与¹⁵NH₄⁺+¹⁴NO₃⁻来鉴别是否存在氨氧化和厌氧氨氧化过程,进一步通过添加¹⁵NO₃⁻来计算厌氧氨氧化和反硝化作用速率.通过测量实验中分子量分别为 28、29 与 30 的氮气产生速率(P_{28} 、 P_{29} 与 P_{30}),并利用式(11)、(12)进行反硝化和厌氧氨氧化作用速率计算.

$$D_{tot} = p^{30} N_2 \times F_N^{-2} \quad (11)$$

$$A_{tot} = F_N^{-1} \times [p^{28} N_2 + 2 \times (1 - F_N^{-1}) \times p^{30} N_2] \quad (12)$$

其中, D_{tot} 表示总的反硝化作用速率, A_{tot} 表示总的厌氧氨氧化速率, F_N 表示NO₃⁻中¹⁵N的分数.

尽管泥浆实验能确定厌氧氨氧化作用是否存在及其潜在速率,但许多情况下,原位厌氧氨氧化反应速率更值得关注.同时,Trimmer *et al*^[51]指出,泥浆实验会低估厌氧氨氧化对氮气产生的贡献.因此,需要在更接近原位环境的柱实验中测量厌氧氨氧化速率. Risgaard-Petersen *et al*^[52]对传统的 IPT 进行了修正,提出了修正 IPT(r-IPT),如式(13)、(14)所示,进行原位厌氧氨氧化与反硝化速率计算.

$$p_{14} = 2r_{14} \cdot (p^{29} N_2 + p^{30} N_2 \cdot (1 - r_{14})) \quad (13)$$

$$p_{14} AAO = 2r_{14} \cdot (p^{29} N_2 - 2 \cdot r_{14} \cdot p^{30} N_2) \quad (14)$$

其中, p_{14} 表示总的¹⁴N-N₂产生量, $p_{14} AAO$ 表示由厌氧氨氧化产生的¹⁴N-N₂量, r_{14} 表示添加¹⁵NO₃⁻后NO₃⁻还原区中¹⁴NO₃⁻与¹⁵NO₃⁻的比值.

因此,r-IPT 最关键的参数是 r_{14} . Risgaard-Petersen *et al*^[52]建议利用泥浆实验或者添加不同¹⁵NO₃⁻浓度实验计算 r_{14} . 进一步地 Trimmer *et al*^[51]指出可以利用培养实验产生的 N₂O 同位素计算 r_{14} . 与 IPT 相比,应用 r-IPT 时需要额外的假设^[52]:(1)厌氧氨氧化作用受 NO₃⁻限制;(2)NO₃⁻还原区内,NO₃⁻与 NO₂⁻中¹⁵N摩尔分数相等;(3)硝化作用不受¹⁵NO₃⁻添加的影响;(4)如果利用 N₂O 同位素的产生速率来计算反硝化和厌氧氨氧化速率,还需假设反硝化作用是¹⁵N-N₂O的唯一来源,并且受上覆水 NO₃⁻的扩散过程限制^[53].

如何利用 IPT 在原位有效测量氮转化速率一直是一个难题.在研究区直接添加同位素能提供原位条件下最真实的氮转化速率信息,但由于成本和数据解译方法的限制,该方法的应用目前多局限于小尺度河流^[54]及地下水系统^[55].近年来,一种名为 push-pull 的实验装置能原位无破坏测量沉积物或土壤生物化学作用速率.相对于原位添加同位素方法, push-pull 实验适用于原位条件下不同深度土壤与沉积物中生物地球化学转化速率研究,缺点为不能反映河湖上覆水与沉积物间相互作用^[56].该方法主要过程为向研究区某一位置注入(push)添加了¹⁵NO₃⁻与惰性示踪物质(如 Br⁻和 Ar)的水溶液,培养一段时间后,在同一位置抽取(pull)沉积物或土壤中的溶液,通过分析溶液中的氮气同位素组成和化学元素浓度,来计算反硝化、厌氧氨氧化等氮转化速率. Koop-Jackobsen and Giblin^[57]利用该方法研究了新英格兰地区盐沼泽地沉积物植物根际区的反硝化作用,发现前期研究高估了这些地区的反硝化作用. Push-pull 实验在国外已广泛用于河岸带地下水、湿地沉积物和植物根际反硝化速率研究^[58],国内尚未见其应用研究报导.

3 存在问题与展望

目前,利用氮形态及其多元同位素和相应的统计模型,可进行环境水体中氮的主要来源甄别及定量解析.但是,由于氮在迁移转化过程中同位素分馏效应复杂,增加了溯源结果的不确定性.同时,由于硝态氮的相对稳定性和污染的持久传输性等特征,前人在其源解析方面做了大量工作.在定量源解析方面,虽然基于贝叶斯框架的 SIAR 模型能够弥补质量均衡混合模型求解的局限性,但是模型涉及的原位环境氮同位素分馏效应参数较难获取.有关氮循环过程中的硝化、反硝化、固氮、矿化、作物吸收等生物化学过程和氨挥发、水解、扩散等物理化学过程,其同位素分馏特征已有大量的研究成果.但是,对于硝酸盐异化还原、厌氧氨氧化等氮转化过程,其同位素分馏效应目前尚不明确.同时,

即使相同的氮循环转化途径,在不同的环境介质条件下,也会产生不同的氮同位素分馏效应,这给氮循环途径的识别带来了不确定性.因此,需要进一步开展不同转化途径、不同环境要素对氮同位素分馏特征的影响研究.

基于稳定同位素分馏理论及同位素配对技术,可进行氮转化途径识别与效应分析. IPT 技术已广泛应用于海洋、湖泊、河流、地下水等区域反硝化和厌氧氨氧化速率研究,并且开展了温度、盐度、藻类等因素对反硝化和厌氧氨氧化作用的影响研究.但依然存在一些问题:同位素添加技术假设条件过多,实际条件往往不满足;少有研究动态环境或原位环境要素下沉积物中发生的氮转化过程速率及与其他过程的耦合.因此,距离真实反映实际环境水体的氮循环速率及其效应的最终目标依然遥远.要在这些方面取得更大进步,这需要生物学和地球化学以及其它学科之间相互交叉,而且不但需要现有技术的沿用,新的实验与计算方法也需得到发展,尤其是要结合实验室和野外长期观测实验,这样方能更好地解析地表环境中的氮循环,为环境保护和可持续发展奠定坚实的科学基础.

参考文献

- [1] Chen Y. Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: Microcystis-domination in Lake Taihu, a large shallow lake in China. *Journal of Plankton Research*, 2003, 25(4): 445—453.
- [2] Panno S V, Hackley K C, Hwang H H, *et al.* Determination of the sources of nitrate contamination in karst springs using isotopic and chemical indicators. *Chemical Geology*, 2001, 179(1): 113—128.
- [3] Meckenstock R U, Morasch B, Griebler C, *et al.* Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2004, 75: 215—255.
- [4] Groffman P M, Altabet M A, Böhlke J K, *et al.* Methods for measuring denitrification: Diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2091—2122.
- [5] Kohl D H, Shearer G B, Commoner B. Fertilizer nitrogen: Contribution to nitrate in surface water in a corn belt watershed. *Science*, 1972, 174(4016): 1331—1334.
- [6] Xue D, Botte J, Baets B D, *et al.* Present limitations and future prospects of stable isotope methods for nitrate source identification in surface and groundwater. *Water Research*, 2009, 43(5): 1159—1170.
- [7] Amberger A, Schmidt H L. Natural isotope contents of nitrate as indicators for its origin. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1987, 51: 2699—2705.
- [8] Maye B, Bollwerk S M, Mansfeldt T, *et al.* The oxygen isotope composition of nitrate generated by nitrification in acid forest floors. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2001, 65: 2743—2756.
- [9] Kendall C, Euiott E M, Wankel S D. Tracing anthropogenic inputs of nitrogen to ecosystems. In: Michener R H, Lajtha K. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. The 2nd Edition. Blackwell, Oxford, 2008, 375—449.
- [10] Michalski G, Scott Z, Kabling M, *et al.* First measurements and modeling of $\Delta^{17}\text{O}$ in atmospheric nitrate. *Geophysical Research Letters*, 2003, 30(16). DOI: 10.1029/2003GL017015
- [11] Morin S, Savarino J, Bekki S, *et al.* Signature of Arctic surface ozone depletion events in the isotope anomaly ($\Delta^{17}\text{O}$) of atmospheric nitrate. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2007, 7: 1451—1469.
- [12] Tsunogai U, Komatsu D, Daita S, *et al.* Tracing the fate of atmospheric nitrate deposited onto a forest ecosystem in Eastern Asia using $\Delta^{17}\text{O}$. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2010, 10: 1809—1820.
- [13] Liu T, Wang F, Michalski G, *et al.* Using ^{15}N , ^{17}O , and ^{18}O to determine nitrate sources in the yellow river, China. *Environmental Science and Technology*, 2013, 47: 13412—13421.
- [14] Ramesh R, Sarin M M. Stable isotope study of the Ganga (Ganges) river system. *Journal of Hydrolo-*

- gy, 1992, 139(1): 49–62.
- [15] Bartarya S K, Bhattacharya S K, Ramesh R, *et al.* $\delta^{18}\text{O}$ and δD systematics in the surficial waters of the Gaula river catchment area, Kumaun Himalaya, India. *Journal of Hydrology*, 1995, 167(1): 369–379.
- [16] Garzione C N, Quade J, Decelles P G, *et al.* Predicting paleoelevation of Tibet and the Himalaya from $\delta^{18}\text{O}$ versus altitude gradients in meteoric water across the Nepal Himalaya. *Earth and Planetary Science Letters*, 2000, 185(2000): 215–229.
- [17] Poage M A, Chamberlain C P. Empirical relationships between elevation and the stable isotope composition of precipitation and surface waters: Considerations for studies of paleoelevation change. *American Journal of Science*, 2001, 301(1): 1–15.
- [18] 侯俊琳, 庄晓玲, 闫福贵等. 氢氧同位素在岩溶水成因分析中的应用——以乌海市千里山岩溶泉域为例. *西部资源*, 2013, 3: 84–86. (Hou J L, Zhuang X L, Yan F J, *et al.* The application of oxygen and hydrogen isotope in the origin of karst water: A case study of karst spring in Qianlishan, Wuhai. *Western Resources*, 2013, 3: 84–86.)
- [19] 于津生, 张鸿斌, 虞福基等. 西藏东部大气降水氧同位素组成特征. *地球化学*, 1980, 2: 113–121. (Yu J S, Zhang H B, Yu F J, *et al.* Oxygen isotopic composition of meteoric water in the eastern part of Xizang. *Chinese Journal of Geochemistry*, 1980, 2: 113–121.)
- [20] 黄平华, 陈建生, 宁超. 焦作矿区地下水中氢氧同位素分析. *煤炭学报*, 2012, 37(5): 770–775. (Huang P H, Chen J S, Ning C. The analysis of hydrogen and oxygen isotopes in the ground water of Jiaozuo mine area. *Journal of China Coal Society*, 2012, 37(5): 770–775.)
- [21] 宋献方, 刘相超, 夏军等. 基于环境同位素技术的怀沙河流域地表水和地下水转化关系研究. *中国科学*, 2007, 37(1): 102–110. (Song X F, Liu X C, Xia J, *et al.* The research of the transformation relation between surface water and groundwater in Huaisha River basin based on the environmental isotope technique. *Science in China*, 2007, 37(1): 102–110.)
- [22] Rogers K M, Nicolini E, Gauthier V. Identifying source and formation altitudes of nitrates in drinking water from Réunion Island, France, using a multi-isotopic approach. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2012, 138–139: 93–103.
- [23] Phillips D L, Koch P L. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia*, 2002, 130(1): 114–125.
- [24] Deutsch B, Mewes M, Liskow I, *et al.* Quantification of diffuse nitrate inputs into a small river system using stable isotopes of oxygen and nitrogen in nitrate. *Organic Geochemistry*, 2006, 37(10): 1333–1342.
- [25] Parnell A C, Inger R, Bearhop S, *et al.* Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation. *PLOS ONE*, 2010, 5(3). DOI:10.1371/journal.pone.0009672
- [26] Yang L, Han J, Xue J, *et al.* Nitrate source apportionment in a subtropical watershed using Bayesian model. *Science of the Total Environment*, 2013, 463–464(5): 340–347.
- [27] Ding J, Xi B, Gao R, *et al.* Identifying diffused nitrate sources in a stream in an agricultural field using a dual isotopic approach. *Science of the Total Environment*, 2014, 484(24): 10–18.
- [28] Xue D, Baets B D, Cleemput O V, *et al.* Use of a Bayesian isotope mixing model to estimate proportional contributions of multiple nitrate sources in surface water. *Environmental Pollution*, 2012, 161(1): 43–49.
- [29] Marion T, Emily M, Daniel J, *et al.* Quantification of nitrate sources to an urban stream using dual nitrate isotopes. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48: 10580–10587.
- [30] Ralph L. Combined use of ^{15}N and ^{18}O of nitrate and ^{11}B to evaluate nitrate contamination in groundwater. *Applied Geochemistry*, 2005, 20: 1626–1636.
- [31] Li S L, Liu C Q, Li J, *et al.* Assessment of the sources of nitrate in the Changjiang River, China using a nitrogen and oxygen isotopic approach.

- Environmental Science and Technology, 2010, 44(5):1573–1578.
- [32] Samantara M K, Padhi R K, Satpathy K K, *et al.* Groundwater nitrate contamination and use of Cl/Br ratio for source appointment. Environmental Monitoring and Assessment, 2015, 187 (2): 1–13.
- [33] 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. Water Research, 2012, 46 (7): 2023–2041.
- [34] Iqbal M Z, Krothe N C, Spalding R F. Nitrogen isotope indicators of seasonal source variability to groundwater. Environmental Geology, 1997, 32(3):210–218.
- [35] 丁京涛, 席北斗, 许其功等. 稳定同位素技术在地表水硝酸盐污染研究中的应用. 湖泊科学, 2013, 25(5):617–627. (Ding J T, Xi B D, Xu Q G, *et al.* Application of stable isotope on nitrate pollution researches in surface water. Journal of Lake Science, 2013, 25(5):617–627.)
- [36] 刘丛强. 生物地球化学过程与地表物质循环: 西南喀斯特土壤—植被系统生源要素循环. 科学出版社, 2009, 568–618. (Liu C Q. Biogeochemical processes and surface material cycles: the cycle of biogenic elements in the soil-vegetation system in the karst, Southwest of China. Science Publishing, 2009, 568–618.)
- [37] Bottcher J, Strebel O, Voerkelius S, *et al.* Using isotope fractionation of nitrate nitrogen and nitrate oxygen for evaluation of denitrification in a sandy aquifer (Amsterdam). Journal of Hydrology, 1990, 114:413–424.
- [38] Hosono T, Tokunaga T, Kagabu M, *et al.* The use of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$ tracers with an understanding of groundwater flow dynamics for evaluating the origins and attenuation mechanisms of nitrate pollution. Water Research, 2013, 47 (8): 2661–2675.
- [39] Panno S V, Hackley K C, Kelly W R, *et al.* Isotopic evidence of nitrate sources and denitrification in the Mississippi River, Illinois. Journal of Environmental Quality, 2006, 35 (2): 495–504.
- [40] Granger J, Sigman D M, Lehmann M F, *et al.* Nitrogen and oxygen isotope fractionation during dissimilatory nitrate reduction by denitrifying bacteria. Limnology and Oceanography, 2008, 53(6):2533–2545.
- [41] Rivett M O, Buss S R, Morgan P, *et al.* Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes. Water Research, 2008, 42:4215–32.
- [42] Hosono T, Tokunaga T, Tsushima A, *et al.* Combined use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{34}\text{S}$ tracers to study anaerobic bacterial processes in groundwater flow systems. Water Research, 2014, 54:284–296.
- [43] Waser N A D, Harrison P J, Nielsen B, *et al.* Nitrogen isotope fractionation during the uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium, and urea by a marine diatom. Limnology and Oceanography, 1998, 43(2):215–224.
- [44] Sun Z, Mou X, Li X, *et al.* Application of stable isotope techniques in studies of carbon and nitrogen biogeochemical cycles of ecosystem. Chinese Geographical Science, 2011, 21(2):129–148.
- [45] Nielsen L P. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. FEMS Microbiology Letters, 1992, 86(4):357–362.
- [46] 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. Analytical Chemistry, 2002, 74 (19):4905–4912.
- [47] Giblin A E, Weston N B, Banta G T, *et al.* The effects of salinity on nitrogen losses from an oligohaline estuarine sediment. Estuaries and Coasts, 2010, 33(5):1054–1068.
- [48] Steingruber S M, Friedrich J, Gächter R, *et al.* Measurement of denitrification in sediments with the ^{15}N isotope pairing technique. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9):3771–3778.
- [49] Strous M, Kuenen J G, Jetten M S M. Key physiology of an anaerobic ammonium oxidation. Applied

- and Environmental Microbiology, 1999, 65 (7): 3248—3250.
- [50] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (3): 1312—1318.
- [51] Trimmer M, Risgaard-Petersen N, Nicholls J C, *et al.* Direct measurement of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores. Marine Ecology Progress Series, 2006, 326: 37—47.
- [52] Risgaard-Petersen N, Nielsen L P, Rysgaard S, *et al.* Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification coexist. Limnology and Oceanography: Methods, 2003, 1(1): 63—73.
- [53] 罗绪强, 王世杰, 刘秀明. 稳定氮同位素在环境污染示踪中的应用进展. 矿物岩石地球化学通报, 2007, 26(3): 295—299. (Luo X Q, Wang S J, Liu X M. Advances in the research on stable nitrogen isotope for tracing environmental pollutions. Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry, 2007, 26(3): 295—299.)
- [54] Harvey J W, Böhlke J K, Voytek M A, *et al.* Hyporheic zone denitrification: Controls on effective reaction depth and contribution to whole-stream mass balance. Water Resources Research, 2013, 49(10): 6298—6316.
- [55] Smith R L, Böhlke J K, Song B, *et al.* Role of anaerobic ammonium oxidation (anammox) in nitrogen removal from a freshwater aquifer. Environmental Science and Technology, 2015, 49(20): 12169—12177.
- [56] Burgin A J, Hamilton S K, Gardner W S, *et al.* Nitrate reduction, denitrification, and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in wetland sediments. Methods in Biogeochemistry of Wetlands, 2013, 519—537.
- [57] Koop-Jakobsen K, Giblin A E. New approach for measuring denitrification in the rhizosphere of vegetated marsh sediments. Limnology and Oceanography: Methods, 2009, 7(9): 626—637.
- [58] Addy K, Kellogg D Q, Gold A J, *et al.* In situ push-pull method to determine ground water denitrification in riparian zones. Journal of Environmental Quality, 2002, 31(3): 1017—1024.