

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, doi:10.3969/j.issn.0253–4193.2020.02.003

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, doi:10.3969/j.issn.0253–4193.2020.02.003

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

谢成军^{1,2,3}, 宋国栋^{1,2*}, 刘素美^{1,2}, 唐继尧^{1,2,3}, 张桂玲^{1,2}

(1. 中国海洋大学 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室/海洋高等研究院, 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对于海洋氮循环起着至关重要的作用。基于¹⁵N 标记的培养技术是目前测定沉积物异化硝酸盐还原的主要手段。准确快速测定¹⁵N 标记的产物(²⁹N₂、³⁰N₂)是量化异化硝酸盐还原各个过程速率的关键。本研究自行组装膜进样质谱系统用于²⁹N₂和³⁰N₂的测定,对其测量条件进行了优化。结果表明,进样蠕动泵进样流速 0.80 mL/min,进样时间 3~3.5 min,恒温槽温度 20~25°C,同时铜还原炉温度在 300~600°C 的条件下,²⁹N₂/²⁸N₂和³⁰N₂/²⁸N₂的测试精密度分别可以控制在 0.1% 和 1% 以内,比较适合²⁹N₂和³⁰N₂的测定。利用自组装的膜进样质谱系统结合¹⁵N 标记的培养技术研究了青岛石老人沙滩沉积物中的异化硝酸盐还原过程。石老人沙滩沉积物不存在将硝酸盐完全还原为氮气好氧的反硝化。厌氧铵氧化、厌氧反硝化和异化硝酸盐还原为铵(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium, DNRA)的潜在速率(以湿沉积物 N 计)分别为(0.05±0.01) nmol/(cm³·h), (2.32±0.21) nmol/(cm³·h)和(1.02±0.15) nmol/(cm³·h)。厌氧反硝化是硝酸盐异化还原主要的贡献者,其比例接近 70%,其次是 DNRA,比例可达 30%,而厌氧铵氧化的贡献最低,仅为 1%。在 N₂ 产生过程中,主要贡献者是反硝化,厌氧铵氧化的贡献仅为 2%。

关键词: 膜进样质谱; 砂质沉积物; 反硝化; 厌氧铵氧化; 异化硝酸盐还原为铵

中图分类号: X52 文献标志码: A 文章编号: 0253-4193(2020)02-0022-08

1 引言

氮是浮游植物生长的必要元素,在一定程度上限制着海洋的初级生产。然而,人类活动已经显著影响到自然界原有的氮循环^[1],使得近岸海区遭受诸如富营养化、底层水体缺氧和酸化等一系列生态环境问题^[2-4]。边缘海沉积物是活性氮移除的主要场所,对于缓解近岸富营养化具有积极的意义^[5],同时对于评估全球海洋氮收支也至关重要^[6]。沉积物中的活性氮

移除主要依靠硝酸盐的异化还原过程实现,这些过程包括厌氧铵氧化和反硝化,在这两个过程中硝酸盐经过一系列异化还原最终以 N₂ 形式移除,在厌氧铵氧化过程中铵氮也被移除;同时,在沉积物中还存在异化硝酸盐还原为铵(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium, DNRA)的过程,该过程仅仅是将硝酸盐转化为铵盐,并未实现活性氮的移除^[7]。因此,准确量化边缘海沉积物中异化硝酸盐还原各个过程的速率,就成为准确评估海洋氮收支的关键所在。

收稿日期: 2019-04-05; 修订日期: 2019-05-30。

基金项目: 国家自然科学基金(41606093, U1806211); 国家重点研发计划(2016YFA0600902, 2016YFA0601302); 青岛海洋科学与技术试点国家海洋生态与环境科学功能实验室青年人才培养项目(LMEES-YTSP-2018-02-04); 泰山学者工程专项经费资助。

作者简介: 谢成军(1994—),男,重庆市忠县人,主要从事海洋生物地球化学研究。E-mail: 1763462648@qq.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

目前对于海洋沉积物异化硝酸盐还原速率的测量,大部分的数据来源于泥质沉积物的研究,硝酸盐在泥质沉积物间隙水中的获取依靠扩散的途径。而近期的研究表明,砂质沉积物可能也是反硝化过程进行的热点区域,在这些沉积物中,硝酸盐通过平流运输进入沉积物,在发生反硝化时可能仍然处于氧化环境,这种反硝化被称为好氧反硝化^[8-9]。而对于边缘海来说,大约50%~60%的区域被砂质沉积物覆盖,如果在这些砂质沉积物中能够发生好氧反硝化,则对于海洋氮循环的收支将会产生显著的影响^[10-11]。然而,好氧反硝化在砂质沉积物中是否普遍存在,目前的研究中还尚存争议。

目前常用的测定沉积物异化硝酸盐还原过程速率的方法是基于¹⁵N标记的技术^[12]。在这种技术中,¹⁵NO₃加入厌氧的沉积物中进行培养实验,然后在不同时间点取样,测定产物中²⁹N₂、³⁰N₂和¹⁵NH₄⁺,对于产物测试的仪器一般采用气相色谱-同位素比值质谱^[13-14]。该设备的成本在早期较高,这在一定程度上限制了该方法的推广。相对于同位素比值质谱,膜进样质谱是一种相对实惠且较为灵敏的一种小型质谱,已被国内外广泛应用于水体中多种气体的测定,如N₂、O₂和Ar等^[15-17];该设备与¹⁵N标记技术结合,不仅可以直接用来测定N₂/Ar从而直接计算N₂产生的通量,而且也可以用来测量²⁹N₂和³⁰N₂,以及可以转化为²⁹N₂和³⁰N₂的¹⁵N标记产物,具有快速、灵活、所需样品体积小等优点^[15, 18-19],已经被许多氮循环研究学者用于沉积物或者水体中的反硝化、厌氧氨氧化以及DNRA,甚至沉积物固氮、矿化和铵同化等过程的研究^[19-21]。国内的一些实验室已经配备了膜进样质谱,对于该设备的使用也有一定的介绍^[16-17, 21],但大都是直接采购的商品化设备,成本依然较高,而且大多数的报道都没有涉及到仪器使用条件的优化,或者原本膜进样质谱的专门用途不适合¹⁵N标记气体样品的测试,比如目前为走航用于水体的O₂/Ar测定的膜进样质谱,仪器自带的膜进样器扩散面积较大,需要200 mL/min左右的流速方能维持稳定的信号^[17],显然这并不适合小体积¹⁵N标记氮气样品的测试。为此,在本研究中,我们利用现有的四极杆质谱仪,自行加工了由渗透性的硅胶薄膜管组成的膜进样器,组装了一套膜进样质谱系统,测试并优化其性能,并利用该系统初步研究了青岛石老人沙滩沉积物中异化硝酸盐还原过程。

2 材料与方法

2.1 自组装膜进样质谱系统组成

图1展示了本研究自行组装的膜进样质谱系统。

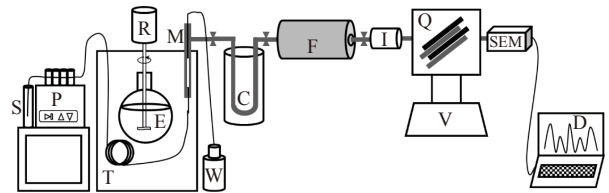


图1 自组装膜进样质谱系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of self-assembled membrane injection mass spectrometry system

从左到右的主要部件依次为:样品瓶(S),进样蠕动泵(P),恒温水浴槽(T),标准样品制作系统(R-E),膜进样器(M),废液回收瓶(W),冷阱(C),铜还原炉(F,内含一根装有还原铜丝的石英管),抽真空系统(V),离子源(I),四极杆质量分析器(Q),二次电子倍增检测器(SEM),数据处理系统(D)

The main components from left to right are: sample vial (S), injection peristaltic pump (P), constant temperature water bath (T), standard sample preparation system (R-E), membrane injector (M), waste recovery bottle (W), cold trap (C), copper reduction furnace (F, containing a quartz tube with reduced copper wire), vacuum system (V), Ion source (I), quadrupole mass analyzer (Q), secondary electron multiplier (SEM), data processing system (D)

该系统主要由以下部件构成:样品瓶(S),进样蠕动泵(P),恒温水浴槽(T),标准样品制作系统(R-E),膜进样器(M),冷阱(C),铜还原炉(F),离子源(I),四极杆质量分析器(Q,英国Hiden公司HPR40),二次电子倍增检测器(SEM)和数据处理系统(D)。其中样品瓶用于盛放样品,我们选用国内外常用的Exetainer瓶(6 mL或者12 mL,英国Labco公司)作为样品瓶;蠕动泵(Minipuls 2,法国Gilson公司)负责将样品平稳地泵入膜进样器,以便于将水样中的溶解气体进行分离。膜进样器由渗透性的硅胶薄膜管组成(外径0.9 mm,长度3 cm),其构造类似Kana等^[15]的膜进样器,该装置由作者在实验室自行加工而成。泵入膜进样器水样中的溶解的气体在膜外高真空的吸引下扩散至四极杆质谱系统管路中,高真空的获得由爱德华分子泵站实现,在测试时可维持 10^{-7} torr (1 torr=133.322 368 4 Pa)的真空度。为使水样中的气体能够均匀地透过硅胶半透膜,将膜进样器置于高精度(± 0.01 °C)恒温水浴槽中,以便于获得高精度的测试结果;此外,恒温水浴槽的另外一个功能是用来制取标准水样,即通过恒温搅拌水样使之与大气达到溶解平衡实现^[15, 21]。经膜进样器分离的气体(包含空气主要成分如N₂、O₂、Ar、CO₂、H₂O,以及¹⁵N加富培养实验所产生的¹⁵N-N₂、¹⁵N-N₂O等)进入液氮冷阱后被纯化,一些高沸点的分子(如H₂O、CO₂、N₂O以及一些有机分子)在此被冷冻;经纯化后的气体主要含有N₂(包含其同位素)、O₂和Ar,然后气体样品继续进入还原铜炉(内含装有还原

铜丝的石英管), 氧气分子与高温的铜丝反应被除去, 以降低 O_2 对测定 $^{30}N_2$ 的干扰^[22]。还原铜炉由石英玻璃管和可调温管式炉(温控范围: 室温至 $1\ 000\ ^\circ C$) 组装而成。随后气体样品进入电离室, 在此气体分子被高温钽化铌灯丝产生的高能电子流轰击而离子化, 不同质荷比 (m/z) 的离子被四极杆质量分析器分离后经二次电子倍增检测器检测, 然后经过信号收集系统记录信号传输到计算机进行处理。

在使用之前我们首先对自组装的膜进样质谱系统的性能进行优化测试, 这些测试包括系统的真空度, 蠕动泵的进样流速和进样时间, 进样时恒温槽的温度以及在测试 $^{29}N_2/^{28}N_2$ 和 $^{30}N_2/^{28}N_2$ 比值时是否受氧气影响。

2.2 蠕动泵进样流速和进样时间测试实验

利用 $20\ ^\circ C$ 下与空气饱和的纯水采用蠕动泵进样, 设定蠕动泵进样流速为 $0.40\ mL/min$, 进样时间分别设定为 $2\ min$ 、 $2.5\ min$ 、 $3\ min$ 、 $3.5\ min$ 和 $4\ min$, 分别测定 $^{28}N_2$ 、 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 的峰高值并计算对应的 $^{29}N_2/^{28}N_2$ 和 $^{30}N_2/^{28}N_2$ 的相对标准偏差, 然后再更改蠕动泵流速分别为 $0.53\ mL/min$ 、 $0.67\ mL/min$ 、 $0.80\ mL/min$ 、 $0.93\ mL/min$ 和 $1.07\ mL/min$, 测试上述峰高值和对应的气体同位素比值, 然后综合确定最佳的进样流速和进样时间。

2.3 进样温度测试

膜进样器对于水样中溶解气体的扩散受到温度的影响, 一般说来, 高温有利于扩散的进行, 而低温会降低扩散速率。然而, 温度并不是越高越好, 较高的温度对于测试的精密度会产生一定的影响。将膜进样器置于高精度恒温槽中, 分别利用 $10\ ^\circ C$ 、 $15\ ^\circ C$ 、 $20\ ^\circ C$ 、 $25\ ^\circ C$ 、 $30\ ^\circ C$ 和 $35\ ^\circ C$ 下与空气平衡的高纯水进样, 时间为 $3.5\ min$, 对比不同温度下 N_2 和 Ar 的峰高值并计算对应的 N_2/Ar 的相对标准偏差, 然后评估最佳的进样温度。

2.4 氧气的干扰实验

在测试系统中安装铜还原炉。利用管式炉的升温程序分别控制还原铜丝的温度从室温到 $800\ ^\circ C$ 变化, 以此来检测进入质谱系统的氧气信号值与常温下的比较, 并监测不同的加热温度下 $^{29}N_2/^{28}N_2$ 和 $^{30}N_2/^{28}N_2$ 的比值, 以此来验证在测试 $^{29}N_2/^{28}N_2$ 和 $^{30}N_2/^{28}N_2$ 时氧气是否存在干扰。

2.5 石老人砂质沉积物 ^{15}N 标记培养

为了探讨在砂质沉积物中的异化硝酸盐还原过程, 于 2017 年 3 月在青岛石老人沙滩 ($36^\circ 06' 04'' N$, $120^\circ 29' 12'' E$) 获取砂质沉积物进行 ^{15}N 标记的泥浆培养实验。样品采集后立即置于有冰袋的保温盒中带

回实验室, 然后进行有氧和厌氧条件的培养实验。对于厌氧培养, 首先将混匀后的砂质沉积物装入 3 个避光的气密性培养袋, 加入氦气除氧的海水, 原位温度预培养 $1\ d$, 以消除培养体系中残余的溶解氧和硝酸盐(包括亚硝酸盐)。预培养结束后, 分别向 3 个培养袋中加入不同的标记物质, 分别是: (1) $^{15}NH_4^+$, (2) $^{15}NH_4^+ + ^{14}NO_3^-$ 和 (3) $^{15}NO_3^-$, 混匀, 使标记物质最终的浓度均为 $100\ \mu mol/L$ 。然后原位温度下培养 $8\ h$, 分别在 $0\ h$ 、 $2\ h$ 、 $4\ h$ 、 $6\ h$ 和 $8\ h$ 利用注射器从培养袋中取样, 取样前用手将培养袋混合均匀, 待大颗粒物稍微沉降后, 利用注射器抽取袋内泥浆样品注入 1 个 $6\ mL$ Exetainer 瓶中, 然后加入 $0.1\ mL$ 饱和 $HgCl_2$ 用于终止微生物反应, 样品避光倒置保存用于 $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ 以及 $^{15}NH_4^+$ 的测定^[23]。对于有氧培养实验, 将混匀后的砂质沉积物装入避光的气密性培养袋, 然后加入原位底层海水, 并排出培养袋中的气泡, 向培养袋加入 $^{15}NO_3^-$ 使标记物质最终的浓度为 $100\ \mu mol/L$, 混匀, 原位温度下培养 $10\ h$, 分别在 $0\ h$ 、 $0.5\ h$ 、 $1\ h$ 、 $2\ h$ 、 $4\ h$ 、 $6\ h$ 、 $8\ h$ 和 $10\ h$ 利用注射器进行取样, 样品采集后分别转移至 2 个 $6\ mL$ Exetainer 瓶中, 其中一个加入溶解氧固定剂, 然后在 $24\ h$ 内用 Winkler 法滴定其溶解氧含量^[24]; 另外一个加入 $0.1\ mL$ 饱和 $HgCl_2$ 混匀加盖旋紧避光保存用于 $^{29}N_2$ 、 $^{30}N_2$ 和 $^{15}NH_4^+$ 的测定。 $^{29}N_2$ 与 $^{30}N_2$ 样品的测试采用前面优化好条件的膜进样质谱以直接进样测试; $^{15}NH_4^+$ 测试采用碱性次溴酸钠氧化法首先将 $^{15}NH_4^+$ 转化为 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$, 然后再使用上述膜进样质谱进行测定。样品中 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 浓度的计算公式采用与 Thamdrup 和 Dalsgaard^[25] 类似的公式计算,

$$\Delta^m N_2 = \left[\left(\frac{m N_2}{^{28}N_2} \right)_{t_i} - \left(\frac{m N_2}{^{28}N_2} \right)_{t_0} \right] \times ^{28}N_{2,t_i} / \alpha, \quad (1)$$

式中, $\Delta^m N_2$ 表示 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 的产生浓度; $\frac{m N_2}{^{28}N_2}$ 表示 $^{29}N_2/^{28}N_2$ 或者 $^{30}N_2/^{28}N_2$ 比值; t_0 与 t_i 分别表示培养实验的时间零点和取样时间点; $^{28}N_{2,t_i}$ 表示 t_i 时刻样品中 $^{28}N_2$ 的信号值; α 是转化因子, 即与空气饱和的水中溶解的 N_2 单位浓度在膜进样质谱上产生的信号值。 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 的产率采用各自的浓度与时间的线性回归斜率获得; $^{15}NH_4^+$ 的浓度由转化后测出的 $^{29}N_2$ 和 $^{30}N_2$ 的浓度返算而得^[19, 23], $^{15}NH_4^+$ 的产率由 $^{15}NH_4^+$ 浓度随时间的线性回归斜率获得。 ^{15}N 标记培养实验的产物随时间的变化采用单因素方差检验 (One-way ANOVA) 判断其随时间是否显著增加, 利用 Sigmaplot 软件完成。

3 结果与讨论

3.1 进样流速和进样时间对信号的影响

实验结果表明蠕动泵的进样流速和进样时间对

于本实验室组装的膜进样质谱系统的信号值均产生影响(图2)。进样时间从2.5 min到4.0 min,氮气的信号值均随着蠕动泵进样流速的增加而增加,在低泵速增加较快,在高泵速增加较为缓慢,在整个泵速范围内, $^{28}\text{N}_2$ 信号的响应值变化不超过20%,在进样流速0.80 mL/min以上,无论进样时间长短, $^{28}\text{N}_2$ 的信号值在 $\pm 2\%$ 波动。不同的进样时间在不同的蠕动泵进样流速下信号的响应值差别并不明显,说明2.5~4 min的进样时间都可以满足要求。 $^{29}\text{N}_2$ 与 $^{30}\text{N}_2$ 的信号值比 $^{28}\text{N}_2$ 的信号值低2~3个数量级,但均表现出与 $^{28}\text{N}_2$ 类似的变化特征(图略)。

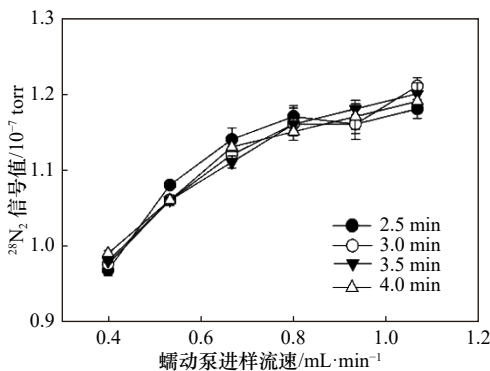


图2 蠕动泵进样流速与进样时间对 $^{28}\text{N}_2$ 信号值的影响
Fig. 2 Effect of peristaltic pump flow speed and injection time on the $^{28}\text{N}_2$ signal value

而对于 $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$,无论进样时间长短,在中间进样流速下波动性较小,尤其是在进样流速为0.67~0.80 mL/min,进样时间在3~3.5 min时, $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的精密度(以变异系数表示)可以控制在0.1%以内,0.93 mL/min以上的进样流速, $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的精密度较差,这可能与进样蠕动泵本身的波动有关。而对于 $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$,整体上其波动性要高于 $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$,进样时间在3 min以上,进样流速在0.80~0.93 mL/min时, $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的精密

度可以控制在1%以内(图3)。 $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 精密度与文献报道的结果比较一致^[26],这可能与 $^{30}\text{N}_2$ 容易受到 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ 的干扰有关,尽管通过增加铜还原炉可以降低 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ 对 $^{30}\text{N}_2$ 的干扰,但并不能消除;此外, $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的波动性还可能与四极杆质谱中离子源的使用年限有关,这在以往的研究中有所报道^[26],本实验所采用的离子源已经使用了2年之久,长时间的走航测试可能使得离子源在电离气体分子时出现一些波动,如果采用新的离子源效果可能会有所改善。综上,在本实验系统下所选用的进样流速为0.80 mL/min,进样时间为3 min时, $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的精密度分别可以控制在0.1%和1%以内。

3.2 温度对测试性能的影响

这里我们以 N_2 的信号值和 N_2/Ar 比值的变异系数为指标来探讨进样温度对测试性能的影响(图4)。进样温度为10℃时, N_2 的信号值表现最低,15℃时开始升高,之后到30℃略有降低,35℃时又略微升高。在20℃以上, N_2 信号值总体的波动在正负1%以内,差别不大。而对于 N_2/Ar 的精密度来说,在20~25℃时变异系数最小,可达0.05%以下,而在15℃以下和30℃以上波动性略大。这样,我们可以选择20~25℃的恒温水浴进行进样以保证测试比值最优的精密度。温度对于 N_2 信号值的影响可以从两个方面进行解释:一是温度对水中溶解气体透过半透膜扩散性能的影响;二是温度对气体溶解度的影响。二者的影响作用是相反的,对于前者,温度越高越有利于气体的扩散,而对于后者,温度越高,气体在水中的溶解度越小。这样在较低的温度下尽管气体的溶解度较大,但是扩散的影响可能占据主导地位导致 N_2 信号响应值较低,而在中间温度,二者的影响相互抵消,使得20~30℃之间 N_2 信号响应值变化不大,而温度进一步升高,尽管气体的溶解度较低,但温度的升高

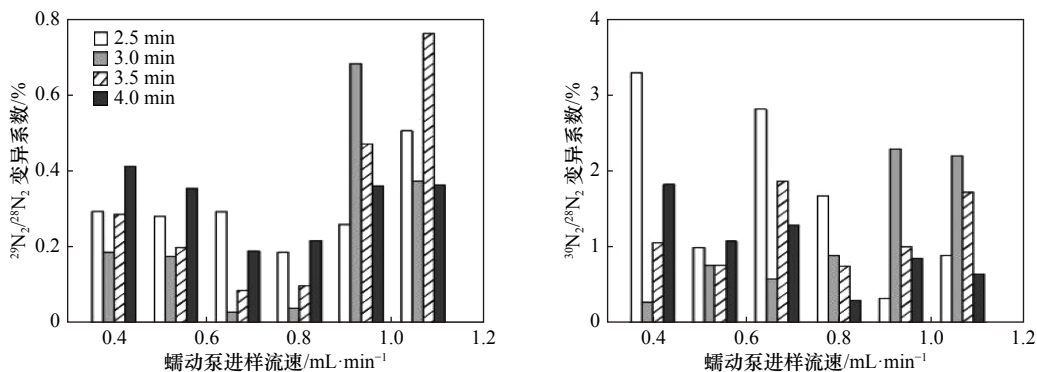


图3 蠕动泵进样流速和进样时间对 $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的影响
Fig. 3 Effect of peristaltic pump flow speed and injection time on $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$

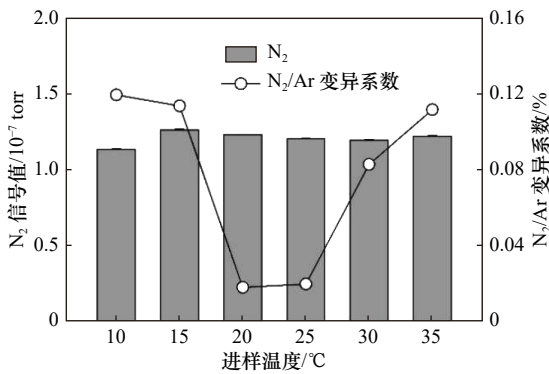


图4 不同进样温度下N₂的信号值和N₂/Ar的变异系数
Fig. 4 Signal value of N₂ and coefficient of variation of N₂/Ar at different temperatures

又导致扩散性能的提高使得透过硅胶半透膜的N₂量增加,仪器所检测到的N₂信号有所升高。

3.3 氧气对测试的影响

氧气对氮气同位素测试的影响如图5所示。随着铜还原炉从室温(25°C)逐渐升高至200°C,氧气被快速的除去,在300°C以上,氧气的去除效率达到并保持在99.9%以上,说明利用铜还原炉加热的方式可以有效地去除进样气体中的氧气,这与以往文献报道一致^[27]。对于氮气的3种同位素来说,铜还原炉从室温到800°C,²⁸N₂信号值基本保持不变,其波动仅为0.6%;²⁹N₂信号值从室温到600°C基本保持不变(变异系数CV=0.6%),而在700°C以上,²⁹N₂信号表现出略微的上升趋势;³⁰N₂信号值随着铜还原炉温度的升高,表现出逐渐下降的趋势,至300°C,³⁰N₂信号值降低至室温值的70%,至600°C,基本保持在70%左右,这说明氧气的去除有效地降低了离子源内因¹⁴N¹⁶O(质量数30)形成而对³⁰N₂检测产生的干扰(ANOVA, $P < 0.05$)。600°C以上,³⁰N₂信号值急剧升高,这可能是由于在高

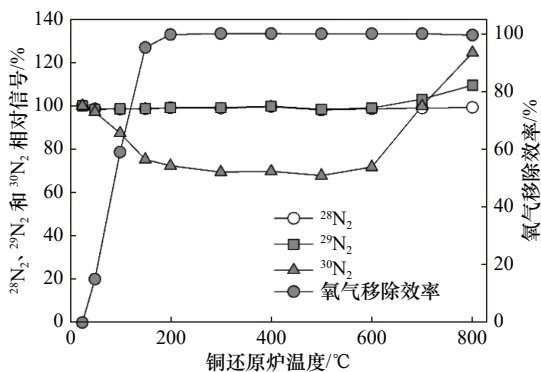


图5 铜还原炉温度对于氧气移除效率和N₂同位素测定信号的影响

Fig. 5 Effect of copper reduction furnace temperature on the oxygen removal efficiency and the signal of nitrogen isotope

温下原来与Cu反应生成的CuO发生少量分解,产生的氧气在离子源内与N结合生成NO之故,因此采用铜还原炉的最佳温度在本系统以300~600°C为佳。有报道指出,不同的四极杆质谱的离子源构成对于O₂干扰响应的程度也不一样^[22, 27-28],对于新组装或新购置的膜进样质谱如果用于¹⁵N标记的²⁹N₂和³⁰N₂的测量,我们建议进行氧气干扰实验以便确定合适的铜还原炉的使用温度。

3.4 石老人沙滩沉积物异化硝酸盐还原过程

对于厌氧条件下的培养实验来说,在添加¹⁵NH₄⁺的培养组,均未检测到显著的²⁹N₂或者³⁰N₂的产生(图6a, ANOVA, $P > 0.05$),说明培养体系经过预培养已消除体系内原有的NO₃⁻,而且没有其他能够在厌氧条件下氧化NH₄⁺的电子受体;添加¹⁵NH₄⁺+¹⁴NO₃⁻的培养组,检测到²⁹N₂显著产生(图6b, ANOVA, $P < 0.05$),而³⁰N₂并未显著产生(图6b, ANOVA, $P > 0.05$),说明厌氧铵氧化的存在;添加¹⁵NO₃⁻的培养组,均检测到²⁹N₂, ³⁰N₂和¹⁵NH₄⁺的显著产生(图6c和图6d, ANOVA, $P < 0.05$),说明在石老人砂质沉积物中存在厌氧的反硝化和DNRA。因此,在计算厌氧铵氧化、反硝化和DNRA的潜在速率时需要考虑到DNRA对前两者的影响,采用Song等^[29]的方法进行计算。石老人砂质沉积物厌氧铵氧化、厌氧反硝化和DNRA的潜在速率(以湿沉积物N计)分别为(0.05±0.01) nmol/(cm³·h)、(2.32±0.21) nmol/(cm³·h)和(1.02±0.15) nmol/(cm³·h)。显然,在硝酸盐异化还原过程中反硝化是主要的贡献者,其比例可以接近70%,其次是DNRA,比例可达30%,而厌氧铵氧化的贡献最低,仅为1%。在N₂产生过程中,主要贡献者是反硝化,贡献高达98%,厌氧铵氧化的贡献仅为2%。这与其他近岸海区的研究结果比较一致^[30]。

对于添加¹⁵NO₃⁻的有氧培养来说,随着培养时间的增加,溶解氧的浓度呈现逐渐降低的趋势(图7),但并未达到缺氧的状态,表明整个培养过程处于有氧状态。在整个有氧培养过程均未观察到显著的²⁹N₂或者³⁰N₂的产生(图7, ANOVA, $P > 0.05$),这表明对于石老人沙滩沉积物来说并不存在将硝酸盐完全还原为氮气好氧的反硝化,这与德国北部Wadden海沿岸的沉积物不同^[8],同样,在澳大利亚的沙滩也未见好氧反硝化的检出^[31]。这说明对于好氧反硝化来说,其在自然界中可能并不是普遍存在。

4 结论

本研究自行组装了膜进样质谱系统,并测试优化

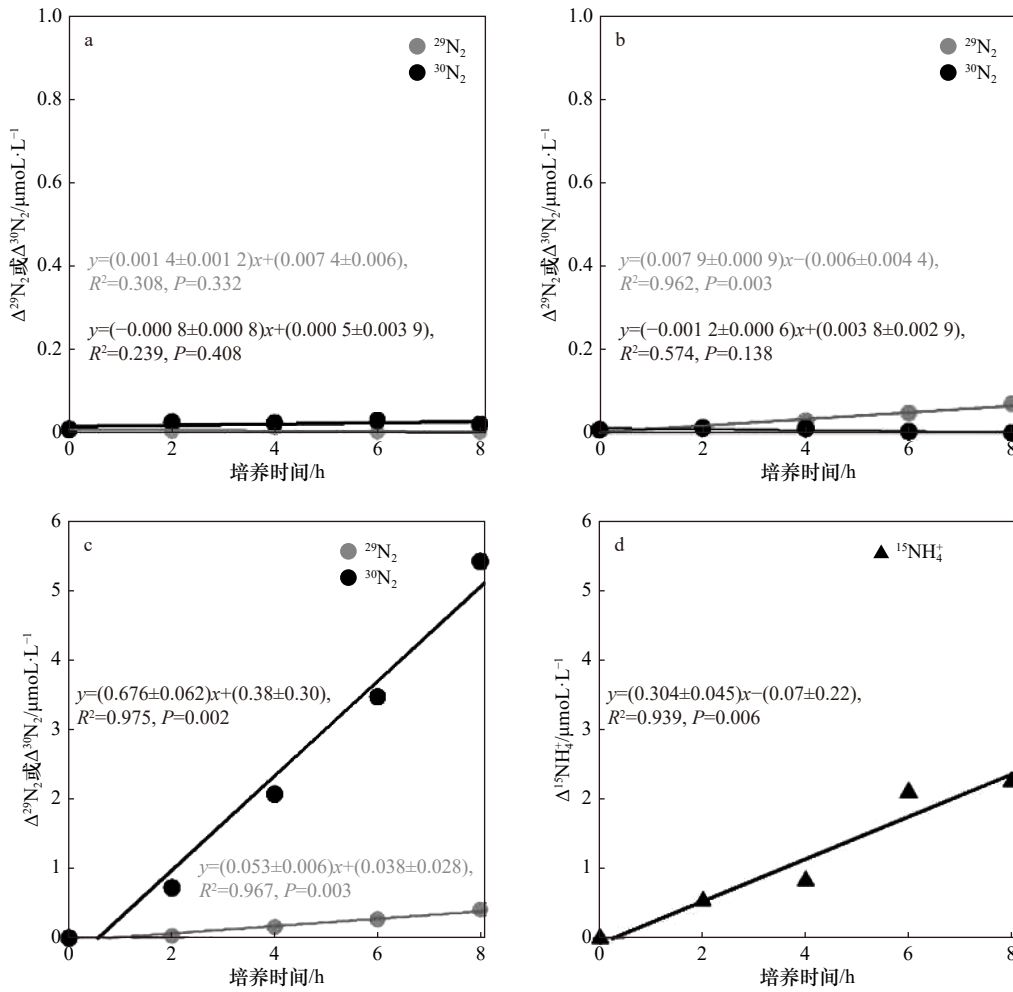


图6 厌氧条件下石老人沙滩沉积物添加 ^{15}N 培养体系中 $^{29}\text{N}_2$ 、 $^{30}\text{N}_2$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的变化

Fig. 6 Changes of $^{29}\text{N}_2$, $^{30}\text{N}_2$ and $^{15}\text{NH}_4^+$ in ^{15}N culture system of sediment in Shilaoren Beach under anaerobic conditions

a. 添加 $^{15}\text{NH}_4^+$, b. 添加 $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$, c. 添加 $^{15}\text{NO}_3^-$, d. 添加 $^{15}\text{NO}_3^-$

a. Added $^{15}\text{NH}_4^+$, b. added $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$, c. added $^{15}\text{NO}_3^-$, d. added $^{15}\text{NO}_3^-$

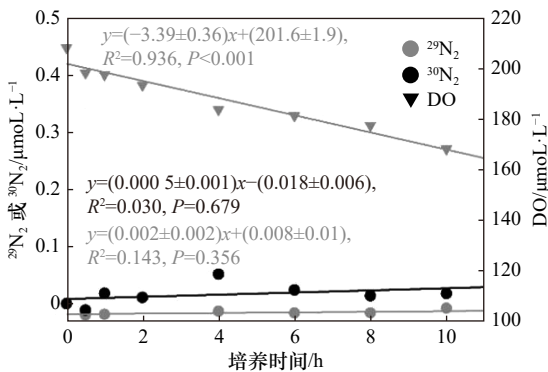


图7 有氧条件下石老人沙滩沉积物添加 $^{15}\text{NO}_3^-$ 培养体系中DO、 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的变化

Fig. 7 Changes of DO, $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$ in $^{15}\text{NO}_3^-$ culture system of sediment in Shilaoren Beach under aerobic conditions

了该系统的工作条件, 利用该系统结合 ^{15}N 标记技术测定了青岛石老人沙滩沉积物的异化硝酸盐还原过

程, 得到的认识如下:

(1) 利用自组装的膜进样质谱系统可以用来测定 ^{15}N 标记的 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$, 在常温下进样即可, 所需进样时间较短, 测量 $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ 的精密度分别可以控制在0.1%和1%以内, 仅需2 mL左右的样品即可实现一次测量, 非常适合 ^{15}N 标记的小体积样品的测量。

(2) 水样中溶解的氧气对于 $^{30}\text{N}_2$ 信号的测量有显著影响 (ANOVA, $P < 0.05$), 采用加热的铜还原炉可以有效地降低氧气的影响, 对于铜还原炉的最佳温度可以通过实验进行确定, 本组装系统以300~600℃为佳。

(3) 对于石老人沙滩沉积物来说同时存在着厌氧反硝化、厌氧铵氧化和DNRA, 而不存在将硝酸盐完全还原为氮气好氧的反硝化。厌氧铵氧化、厌氧反硝化和DNRA的潜在速率 (以湿沉积物N计) 分别为 $(0.05 \pm 0.01) \text{ nmol}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$, $(2.32 \pm 0.21) \text{ nmol}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$ 和 $(1.02 \pm 0.15) \text{ nmol}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$ 。厌氧反硝化是异化硝酸盐还原的主要过程, 其贡献比高达近70%, 其次是

DNRA, 贡献约 30%, 而厌氧氨氧化的贡献不足 1%; 在 N_2 移除过程中, 厌氧反硝化是主要的控制过程, 贡献高达 98%, 厌氧氨氧化的贡献仅为 2%。

致谢: 感谢海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室张海龙高级实验师和宁晓燕实验师在组装膜进样质谱系统管路选材方面给予的帮助和建议。感谢郑文静和秦川同学在四极杆质谱仪使用方面给予的帮助。

参考文献:

- [1] Gruber N, Galloway J N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 293–296.
- [2] Cai Weijun, Hu Xinping, Huang W J, et al. Acidification of subsurface coastal waters enhanced by eutrophication[J]. *Nature Geoscience*, 2011, 4(11): 766–770.
- [3] Seitzinger S P, Phillips L. Nitrogen stewardship in the Anthropocene[J]. *Science*, 2017, 357(6349): 350–351.
- [4] Breitburg D, Levin L A, Oschlies A, et al. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters[J]. *Science*, 2018, 359(6371): eaam7240.
- [5] Seitzinger S P. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance[J]. *Limnology and Oceanography*, 1988, 33: 702–724.
- [6] Codispoti L A. An oceanic fixed nitrogen sink exceeding 400 Tg N a⁻¹ vs the concept of homeostasis in the fixed-nitrogen inventory[J]. *Biogeosciences*, 2007, 4(2): 233–253.
- [7] Devol A H. Denitrification, anammox, and N_2 production in marine sediments[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7: 403–423.
- [8] Gao Hang, Schreiber F, Collins G, et al. Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(3): 417–426.
- [9] Marchant H K, Holtappels M, Lavik G, et al. Coupled nitrification-denitrification leads to extensive N loss in subtidal permeable sediments[J]. *Limnology and Oceanography*, 2016, 61(3): 1033–1048.
- [10] Huettel M, Berg P, Kostka J E. Benthic exchange and biogeochemical cycling in permeable sediments[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2014, 6: 23–51.
- [11] Sokoll S, Lavik G, Sommer S, et al. Extensive nitrogen loss from permeable sediments off North-West Africa[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2016, 121(4): 1144–1157.
- [12] Robertson E K, Bartoli M, Brüchert V, et al. Application of the isotope pairing technique in sediments: Use, challenges, and new directions[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2019, 17(2): 112–136.
- [13] Nielsen L P. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing[J]. *FEMS Microbiology Letter*, 1992, 86(4): 357–362.
- [14] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1312–1318.
- [15] Kana T M, Darkangelo C, Hunt M D, et al. Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N_2 , O_2 , and Ar in environmental water samples[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(23): 4166–4170.
- [16] 陈能汪, 吴杰忠, 段恒轶, 等. N_2 :Ar法直接测定水体反硝化产物溶解 N_2 [J]. *环境科学学报*, 2010, 30(12): 2479–2483.
Chen Nengwang, Wu Jiezhong, Duan Hengyi, et al. N_2 :Ar method for direct measurement of denitrification product (dissolved N_2) using membrane inlet mass spectrometry (MIMS)[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(12): 2479–2483.
- [17] 郑文静, 韩玉, 秦川, 等. 利用膜进样质谱连续走航测定表层海水 O_2 /Ar比值和 pCO_2 [J]. *海洋环境科学*, 2016, 35(4): 611–617.
Zheng Wenjing, Han Yu, Qin Chuan, et al. Continuous underway measurements of sea surface O_2 /Ar and pCO_2 by membrane inlet mass spectrometry[J]. *Marine Environmental Science*, 2016, 35(4): 611–617.
- [18] An S, Gardner W S, Kana T. Simultaneous measurement of denitrification and nitrogen fixation using isotope pairing with membrane inlet mass spectrometry analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(3): 1171–1178.
- [19] Yin Guoyu, Hou Lijun, Liu Min, et al. A novel membrane inlet mass spectrometer method to measure $^{15}NH_4^+$ for isotope-enrichment experiments in aquatic ecosystems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9555–9562.
- [20] Lin Xianbiao, Liu Min, Hou Lijun, et al. Nitrogen losses in sediments of the East China Sea: spatiotemporal variations, controlling factors, and environmental implications[J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2017, 122(10): 2699–2715.
- [21] 赵永强, 夏永秋, 李博伦, 等. 利用膜进样质谱同时测定河流沉积物反硝化和厌氧氨氧化[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(4): 794–802.
Zhao Yongqiang, Xia Yongqiu, Li Bolun, et al. Simultaneous determination of denitrification and anaerobic ammonium oxidation in river sediments using membrane inlet mass spectrometry[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(4): 794–802.
- [22] Eyre B D, Rysgaard S, Dalsgaard T, et al. Comparison of isotope pairing and N_2 :Ar methods for measuring sediment denitrification—assumption, modifications, and implications[J]. *Estuaries*, 2002, 25(6): 1077–1087.
- [23] Song G D, Liu S M, 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.
- [24] Song Guodong, Liu Sumei, Zhu Zhuoyi, et al. Sediment oxygen consumption and benthic organic carbon mineralization on the continental shelves of the East China Sea and the Yellow Sea[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2016, 124: 53–63.

- [25] Thamdrup B, Dalsgaard T. The fate of ammonium in anoxic manganese oxide-rich marine sediment[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64(24): 4157–4164.
- [26] Sgouridis F, Stott A, Ullah S. Application of the ^{15}N gas-flux method for measuring in situ N_2 and N_2O fluxes due to denitrification in natural and semi-natural terrestrial ecosystems and comparison with the acetylene inhibition technique[J]. *Biogeosciences*, 2016, 13(6): 1821–1835.
- [27] 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.
- [28] Kana T M, Weiss D L, Eyre B D, et al. Comment on “Comparison of isotope pairing and $\text{N}_2:\text{Ar}$ methods for measuring sediment denitrification” by B. D. Eyre, S. Rysgaard, T. Dalsgaard, and P. Bondo Christensen. 2002. *Estuaries* 25:1077–1087[J]. *Estuaries*, 2004, 27(1): 173–176.
- [29] Song G D, Liu S M, 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.
- [30] Nicholls J C, Trimmer M. Widespread occurrence of the anammox reaction in estuarine sediments[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2009, 55(2): 105–113.
- [31] Cook P L M, Kessler A J, Eyre B D. Does denitrification occur within porous carbonate sand grains?[J]. *Biogeosciences*, 2017, 14(18): 4061–4069.

Self-assembled membrane injection mass spectrometry system and its application on the study of dissimilatory nitrate reduction in sandy sediments

Xie Chengjun^{1,2,3}, Song Guodong^{1,2}, Liu Sumei^{1,2}, Tang Jiyao^{1,2,3}, Zhang Guiling^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education/Institute for Advanced Ocean Study, 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 processes in sediments play a crucial role in marine nitrogen cycle. The most popular method to determine the rates of different dissimilatory nitrate reduction processes is the ^{15}N labeled technique. Therefore, accurate and rapid determination the concentration of ^{15}N -labeled products, such as $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$, is the key to quantify the rate of each dissimilatory nitrate reduction process. In this study, we set up a membrane injection mass spectrometry (MIMS) and optimize the operating condition of the MIMS for the determination of $^{29}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2$. The optimization experiment results indicated that, when the peristaltic pump for sampling flow rate is 0.80 mL/min, the sampling time is 3~3.5 min, the thermostat water bath temperature is 20~25 °C, and the copper reduction furnace temperature is 300~600 °C, the precision (expressed in coefficient of variation) of the measured $^{29}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ and $^{30}\text{N}_2/^{28}\text{N}_2$ can be controlled less than 0.1% and 1%, respectively. We used the self-assembled MIMS and combined the ^{15}N labeling technique to study the dissimilatory nitrate reduction processes in the sandy sediment of the Shilaoren beach in Qingdao. There is no significant aerobic denitrification in the Shilaoren sand that can completely reduce nitrate to N_2 . The potential rates of anammox, anaerobic denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) are (0.05 ± 0.01) nmol/($\text{cm}^3\cdot\text{h}$), (2.32 ± 0.21) nmol/($\text{cm}^3\cdot\text{h}$) and (1.02 ± 0.15) nmol/($\text{cm}^3\cdot\text{h}$) (N, wet sed.), respectively. Anaerobic denitrification is the major contributor to nitrate dissimilatory reduction, with a ratio of nearly 70%, followed by DNRA, with a ratio of up to 30%, while anammox has the lowest contribution of only 1%. In the N_2 production, the main contributor is anaerobic denitrification, and the contribution of anammox is only 2%.

Key words: membrane injection mass spectrometry (MIMS); sandy sediment; denitrification; anammox; dissimilatory nitrate reduction to ammonium