



环境化学  
Environmental Chemistry  
ISSN 0254-6108, CN 11-1844/X

## 《环境化学》网络首发论文

题目：基于优化的同位素示踪法量化寡营养盐海域痕量氨氧化速率  
作者：张伟杰，万显会，徐敏，马玉，刘丽，祝依凡，高树基  
收稿日期：2024-01-30  
网络首发日期：2024-08-14  
引用格式：张伟杰，万显会，徐敏，马玉，刘丽，祝依凡，高树基. 基于优化的同位素示踪法量化寡营养盐海域痕量氨氧化速率[J/OL]. 环境化学.  
<https://link.cnki.net/urlid/11.1844.X.20240813.1244.016>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2024013001

张伟杰, 万显会, 徐敏, 等. 基于优化的同位素示踪法量化寡营养盐海域痕量氨氧化速率[J]. 环境化学, 2025, 44(6): 1-11.

ZHANG Weijie, WAN Xianhui, XU Min, et al. Quantification of ammonia oxidation rate in the oligotrophic ocean using an optimized isotope labeling method[J]. Environmental Chemistry, 2025, 44 (6): 1-11.

## 基于优化的同位素示踪法量化寡营养盐海域痕量氨氧化速率\*

张伟杰<sup>1,2</sup> 万显会<sup>3,4</sup> 徐敏<sup>3,4</sup> 马玉<sup>1,2</sup> 刘丽<sup>3,4</sup> 祝依凡<sup>3,4</sup> 高树基<sup>3,4</sup>\*\*(1. 自然资源部南海调查中心, 广州, 510300; 2. 自然资源部海洋环境探测技术与应用重点实验室, 广州, 510300;  
3. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门, 361102; 4. 厦门大学海洋与地球学院, 厦门, 361102)

**摘要** 氨氧化过程决定海洋氮素形态, 产生并释放温室气体氧化亚氮, 是海洋氮循环的核心路径之一. 准确测量海洋氨氧化速率, 是深入理解海洋氮循环动力过程的关键环节. 然而, 受限于海洋中总体低氨氮、低速率的特点, 极大限制海洋尤其是寡营养盐海域氨氧化速率的量化, 亟需采用高灵敏度和高精度的方法提高对于痕量氨氧化速率的探测能力. 本研究利用海水中低亚硝酸盐浓度的特点, 通过适量添加亚硝酸盐, 结合<sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>标记培养, 采用叠氮还原法测定培养前后 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的同位素比值 ( $\delta^{15}\text{N-NO}_2^-$ ) 增量来计算氨氧化速率, 大幅降低了氨氧化速率的检出限, 获得了夏季南海北部海水氨氧化速率垂直分布剖面. 水柱氨氧化速率为低于检出限至 133.524 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. 通过反硝化细菌法测定 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) 的  $\delta^{15}\text{N-NO}_x^-$  值来计算氨氧化速率对比实验发现两方法结果一致, 证实了本方法的可靠性. 相较于反硝化细菌法, 叠氮还原法测试氨氧化速率平均检出限 0.002 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 显著低于反硝化细菌法平均检出限 0.018 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 从而大幅提升了对于寡营养盐海域氨氧化速率的探测能力. 利用该方法更低检测限、且相较于细菌还原法更易于操作的特点, 有望提升对于寡营养盐海域氨氧化和氮循环的探测和认知.

**关键词** 南海, 氨氧化速率, 叠氮还原法, 反硝化细菌法.

**中图分类号** X-1; O6 **文献标识码** A

Quantification of ammonia oxidation rate in the oligotrophic ocean  
using an optimized isotope labeling methodZHANG Weijie<sup>1,2</sup> WAN Xianhui<sup>3,4</sup> XU Min<sup>3,4</sup> MA Yu<sup>1,2</sup>  
LIU Li<sup>3,4</sup> ZHU Yifan<sup>3,4</sup> GAO Shuji<sup>3,4</sup>\*\*

(1. South China Sea Marine Survey Center, Ministry of Natural Resources, Guangzhou, 510300, China; 2. Key Laboratory of Marine Environmental Survey Technology and Application, Ministry of Natural Resources, Guangzhou, 510300, China; 3. State Key Laboratory of Marine Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361102, China; 4. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen, 361102, China)

**Abstract** Ammonia oxidation determines the speciation of bioavailable nitrogen and contributes to nitrous oxide production, representing an essential pathway of the marine nitrogen cycle. Quantitative information on marine ammonia oxidation rate, thus, is of critical importance in understanding the marine nitrogen cycle. Unfortunately, our ability to quantify the ammonia oxidation rate is largely hindered by the low substrate concentration and low conversion rate, calling for the urgent need to develop new methods with higher sensitivity and precision to measure the low ammonia oxidation

2024年1月30日收稿(Received: January 30, 2024).

\* 国家自然科学基金(NSFC 91328207, U1305233, 2015CB954003)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (NSFC 91328207, U1305233, 2015CB954003).

\*\* 通信联系人 Corresponding author, E-mail: sjkao@xmu.edu.cn

rate. Using a refined  $^{14}\text{N}\text{-NO}_2^-$  carrier amendment and  $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  labeling method, we successfully obtained the ammonia oxidation rate in the whole water column of the South China Sea, with the rates varied from below the detection limit to  $133.524 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . The measured rates were comparable using azide reduction and denitrifier methods for the samples with high conversion rates. However, our optimized methods had higher sensitivity (i.e.,  $0.002 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  in our refined method compared to  $0.018 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  for the canonical denitrifier method), thus enabling the detection of the low ammonia oxidation rate in the mesopelagic depths of the oligotrophic ocean. In addition, the method used here is more convenient and cost-efficient than the denitrifier method, providing a step forward to measuring ammonia oxidation rate to better understand the global ocean's nitrogen cycle.

**Keywords** South China Sea, ammonia oxidation rate, azide reduction method, denitrifier method.

氮是重要的限制性营养盐,对海洋系统初级生产与全球气候均起到至关重要的作用.氮的化学形态多样,跨越8个氧化还原价态.各种形态氮素通过一系列过程来进行转化,其主要转化过程有:吸收过程、再矿化过程(氨化过程)、硝化过程、反硝化过程、厌氧氨氧化过程、固氮过程等,形成复杂的海洋氮循环网络.硝化作用是将氨氮( $\text{NH}_4^+$ )经过亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )转化为硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )的过程,链接还原态和氧化态的氮素,从而影响海洋中无机氮的形态与分布.同时,硝化过程伴随着海洋溶解氧(DO)的消耗<sup>[1]</sup>和质子的产生<sup>[2]</sup>,并释放氧化亚氮 $\text{N}_2\text{O}$ <sup>[3]</sup>,直接关乎海洋生态系统健康和全球气候.此外,由于 $\text{NH}_4^+$ 作为氮源的初级生产过程为再生生产力,而硝酸盐所支持的固碳则为新生产力<sup>[4]</sup>,硝化过程还直接影响对于海洋再生生产力和新生产力的评估<sup>[5]</sup>.因此,硝化过程是海洋氮循环核心路径,历来是海洋氮循环研究的重点与前沿内容.

氨氧化是硝化过程的第一步.传统测量氨氧化速率的方法主要有抑制剂法、同位素稀释法等.抑制剂法主要通过添加单独抑制亚硝酸盐氧化的抑制剂(例如氯酸盐,叠氮化物),然后设置时间序列测试 $\text{NO}_2^-$ 浓度随时间的变化,二者间的比值即为氨氧化速率<sup>[6]</sup>.该方法的优点是简单、易操作,无需复杂的预处理和复杂昂贵的仪器,是早期检测氨氧化的主要手段.然而,其缺陷同样明显,即检出限高,不适用速率较低的开阔大洋研究.氮同位素稀释法指添加 $^{15}\text{NO}_2^-$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ 后,由于氨氧化作用导致产物 $\text{NO}_2^-$ 和 $\text{NO}_3^-$ 的同位素值降低,通过测量前后同位素与浓度的变化可计算氨氧化速率<sup>[7]</sup>.此方法虽然在一定程度上提升了氨氧化速率的检测灵敏度,但仍不足以满足开阔大洋(亚)纳摩尔等级的氨氧化速率测试,仅适用于河口、近岸等氨氧化作用活跃的水体.自反硝化细菌法发明以来<sup>[8]</sup>,结合 $^{15}\text{NH}_4^+$ 同位素标记培养,通过测试产物 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- (\text{NO}_x^-)$ 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值方法,进一步提高了氨氧化速率的测试灵敏度和精度,大幅提升了对于海洋氨氧化速率的探测能力并迅速得以推广,成为当前海洋氨氧化速率测试的主流方法<sup>[9-11]</sup>.随着海洋氨氧化速率调查数据的累积,发现该方法仍不能量化海洋中深层极低的氨氧化速率,其原因主要在于海洋中深层较高的 $\text{NO}_3^-$ 浓度,使得培养过程中同位素的变异无法被有效探测,亟须发展更为灵敏的方法克服这一难题,以突破中深层海洋痕量氨氧化速率探测的困境.

本文利用中深层海洋中 $\text{NO}_2^-$ 的低浓度特点,通过添加适量的 $\text{NO}_2^-$ 作为载体,利用叠氮还原法选择性测试 $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$ 而非 $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_x^-$ ,从而进一步提高氨氧化速率的测试灵敏度.在南海海盆运用这一方法,并通过与细菌还原法比对,证实了该方法的可靠性,并获取了南海海盆中深层水柱的氨氧化剖面.该方法的发展有望显著提升对于极低氨氧化速率的测试能力,从而深化对于海洋氮循环的量化与理解.

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 航次与站位

本研究于2016年5月15日到6月7日搭载“东方红2号”,对夏季南海北部11个站位的营养盐参数和氨氧化速率进行了调查分析,调查站位分别为A3、A8、SEATS、K4、E6、E2、N3、N8、F6、D5、

D6(图 1). 其中, A3、E2、N8、D5 为叠氮还原法与反硝化细菌法测试氮氧化速率对比站位, K4 站位为时间序列站位, E2 站 75 m 层与 SEATS 站 75 m 层为底物动力学实验层位。

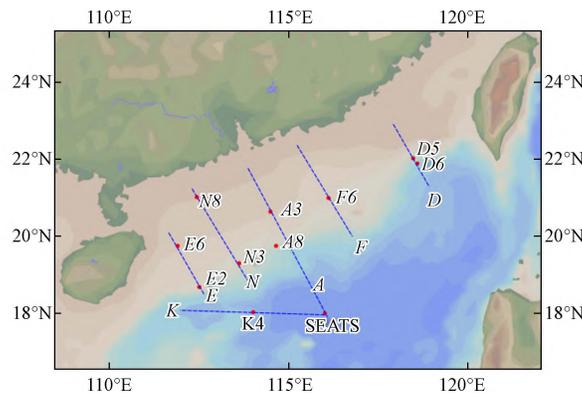


图 1 调查航次采样站位(大写字母表示断面名称)

Fig.1 Sampling stations in northern South China Sea cruise (capital letters indicate section name)

## 1.2 培养与样品收集

**样品采集:** 所有水样均采用 Seabird 911 CTD 和 Seabird 917 CTD 的 12 L Niskin 采水器采集到 4 L 氟化瓶中, 采样深度为常规采样深度(5 m、25 m、50 m、75 m、100 m、150 m、200 m...).

**常规加标实验:** 氟化瓶用海水润洗 3 次后, 采集 4 L 水样, 摇匀水样, 采用 30 mL 水样润洗高密度聚乙烯瓶(Nalgene, 体积 280 mL)3 次后, 采集平行样、取样至瓶颈处(约 264 mL), 叠氮还原法添加  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  和  $^{14}\text{N-NaNO}_2$  储备液使二者在培养样品中的浓度分别为  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 反硝化细菌法仅添加  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  使得最终浓度为  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . 加标后立即用针筒过滤器( $0.2 \mu\text{m}$  的聚醚砜膜)过滤以终止微生物活动, 采集 40 mL 培养液于 50 mL 离心管中, 记录此时间为 T0(培养起始时间). 剩余样品置于对应原位温度的培养箱中暗培养 12 h 左右, 暗培养原因是使得真光层样品避免光抑制的影响以及减少与浮游植物对  $\text{NH}_4^+$  的竞争<sup>[12]</sup>, 培养箱设置温度与样品原位温度相差不超过  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ . 所有过滤后的样品保存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱, 以便于保存与运输, 以及降低液体样品渗漏与沾污的风险, 冷冻样品保存直至到实验室进一步处理.

**底物动力学测试实验:** 在 E2 站与 SEATS 站的氮氧化速率极大值层 75 m 层通过添加不同浓度的  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  ( $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 进行米氏方程实验, 添加  $\text{Na}^{14}\text{NO}_2$  浓度仍为  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其余操作同上.

**时间序列培养实验:** K4 站位添加浓度与常规实验一致, 但在该站位采用了时间序列培养, 如 12、24、36 h 等, 用于验证培养时间设置的合理性.

## 1.3 样品分析

### 1.3.1 水文与营养盐

“营养盐均在航次中或采样后尽快完成测试, 避免在保存过程中出现沾污或变化. 常量  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  浓度采用德国 Bran+Luebbe 公司的营养盐连续自动分析仪 AA3 测定<sup>[6]</sup>,  $\text{NO}_2^-$  与  $\text{NO}_3^-$  检出限分别为  $40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  与  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 精密度分别为 1% ( $n=5$ ) 和 3% ( $n=5$ ); 痕量  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  采用流动注射长光程分光光度法测定(FIA-LWCC)<sup>[13]</sup>, 检出限均为  $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 精密度为 3.1% ( $n=5$ ). 痕量  $\text{NH}_4^+$  通过流动分析固相萃取荧光法测定<sup>[14]</sup>, 检出限为  $0.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 精密度为 3.5% ( $n=5$ ). 温度和盐度通过 Seabird 911 CTD 与 Seabird 917 CTD 的温度、盐度探头同步测量获得”.

### 1.3.2 同位素测试

1) 叠氮还原法: 在酸性条件下, 叠氮化钠会将  $\text{NO}_2^-$  完全转化为  $\text{N}_2\text{O}$  气体<sup>[15]</sup>, 测试产物  $\delta^{15}\text{N-N}_2\text{O}$  的值可知样品的  $\delta^{15}\text{N-NO}_2^-$ .  $\text{N}_2\text{O}$  经过多用途在线气体制备和导入系统和稳定同位素质谱仪联用(GB-IRMS)测定其同位素比值, N 含量检出限为  $2 \text{ nmol}$ , 精确度为 0.20%.

**标准曲线:** 采用  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$  (纯度 98%) 和  $\text{Na}^{14}\text{NO}_2$  (纯度 99%) 配制 4 组不同同位素的  $\text{NO}_2^-$  的  $\delta^{15}\text{N}$  溶液 (STD1—STD4), 然后使用  $\text{KNO}_3$  的国际标准与实验室标准通过反硝化细菌法标定 STD1—

STD4(表 1)的  $\delta^{15}\text{N}$ , 作为叠氮还原法测量  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  的标准. 为保证仪器状态稳定, 每隔 10—15 个样品插入一个标准样品进行质控, 要求同位素的偏差量小于 0.5%.

表 1  $\text{NO}_2^-$  的  $\delta^{15}\text{N}$  标准值

Table 1 The  $\delta^{15}\text{N}$   $\text{NO}_2^-$  of the in-house standards

配制方法 Standard reagent preparation method	标准样品编号 Standard sample name	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$
Na <sup>15</sup> NO <sub>2</sub> 与Na <sup>14</sup> NO <sub>2</sub> 按照 不同比例混合	STD-1	-52.30±0.23( <i>n</i> =2)
	STD-2	19.60±0.05( <i>n</i> =2)
	STD-3	129.55±0.02( <i>n</i> =2)
	STD-4	710.61±0.08( <i>n</i> =2)

*n*为重复次数. number of repetitions.

2) 反硝化细菌法: 反硝化细菌(*Pseudomonas aureofaciens*, ATCC13985)胞内缺少 N<sub>2</sub>O 还原酶, 无法将 N<sub>2</sub>O 还原为 N<sub>2</sub><sup>[8]</sup>, 通过测试产物  $\delta^{15}\text{N}\text{-N}_2\text{O}$  的值可获得样品的  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_x^-$ .

标准曲线:  $\text{NO}_x^-$  的  $\delta^{15}\text{N}$  标准曲线采用 KNO<sub>3</sub> 的国际标准 USGS34( $\delta^{15}\text{N}\text{‰}=1.80$ ), IAEA3( $\delta^{15}\text{N}\text{‰}=4.70$ ) 和 USGS32( $\delta^{15}\text{N}\text{‰}=180.00$ ) 以及实验室标准 A( $\delta^{15}\text{N}\text{‰}=13.80$ ).

#### 1.4 氨氧化速率计算

叠氮还原法计算氨氧化速率的算法见公式(1):

$$\text{Rate} = \frac{{}^{15}\text{C}_{\text{NO}_2^-}^{\text{T1}} - {}^{15}\text{C}_{\text{NO}_2^-}^{\text{T0}}}{{T1} - {T0}} \times \frac{{}^{14}\text{C}_{\text{NH}_4^+}^{\text{T0}}}{{}^{15}\text{C}_{\text{NH}_4^+}^{\text{T0}}} \quad (1)$$

${}^{15}\text{C}_{\text{NO}_2^-}^{\text{T0}}$  与  ${}^{15}\text{C}_{\text{NO}_2^-}^{\text{T1}}$  分别代表培养前后的  ${}^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$  的浓度,  $T_0$  与  $T_1$  代表培养前后的时间,  ${}^{14}\text{C}_{\text{NH}_4^+}^{\text{T0}}$  与  ${}^{15}\text{C}_{\text{NH}_4^+}^{\text{T0}}$  分别代表培养前海水本底  ${}^{14}\text{N}\text{-NH}_4^+$  浓度与加标的  ${}^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  浓度.

反硝化细菌法计算氨氧化速率的算法与叠氮还原法一致, 仅用细菌法测试的  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_x^-$  代替叠氮还原法测试的  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_2^-$ .

氨氧化过程对于底物添加的动力学响应应采用米氏方程拟合, 拟合算法见公式(2):

$$V = V_m \times \frac{S}{(K_m + S)} \quad (2)$$

其中  $V_m$  代表底物饱和时的反应速度,  $K_m$  代表反应速度达到  $0.5V_m$  时的底物浓度,  $V$  为反应速率,  $S$  为底物浓度( $\text{NH}_4^+$  浓度).

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 实验准确性验证

#### 2.1.1 准确度结果

叠氮还原法测试样品  $\delta^{15}\text{N}$  标准曲线斜率平均值为  $0.455 \pm 0.005$  ( $n=19$ ), 相关系数均大于 0.999, 相对标准偏差为 1.17%. 标准曲线斜率接近且略低于 0.5(叠氮化反应产物 N<sub>2</sub>O 中的两个 N 原子, 分别由 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 N<sub>3</sub><sup>-</sup> 提供, 因此在 N<sub>3</sub><sup>-</sup> 的氮同位素比值恒定时, 反应产生的 N<sub>2</sub>O 的  $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$  与 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的  $\delta^{15}\text{N}$  呈线性关系, 其相关曲线的理论斜率为 0.5), 与历史研究成果相一致<sup>[9,15-16]</sup>, 斜率偏低可能与试剂中含有微量 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 及试验用水中溶解的 N<sub>2</sub>O 有关<sup>[16]</sup>. 反硝化细菌法测试样品  $\delta^{15}\text{N}$  标准曲线斜率平均值为  $0.934 \pm 0.003$  ( $n=6$ ), 相关系数均为 1, 相对标准偏差为 0.29%. 本研究标曲斜率接近且略低于 1(反硝化细菌法反应产物 N<sub>2</sub>O 中的 N 原子均由 NO<sub>x</sub><sup>-</sup> 提供, 且转化完全, 因此 N<sub>2</sub>O 的  $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$  与 NO<sub>x</sub><sup>-</sup> 的  $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$  呈线性关系, 其相关曲线的理论斜率为 1), 与相关研究<sup>[17]</sup> 斜率 0.975—0.987 之间接近.

通过标准曲线良好的线性相关性, 以及每隔 10—15 个样品插入 1 个标准样品, 要求同位素的偏差量小于 0.5‰, 以监控测试期间仪器良好的稳定性和结果的重现性, 进而确保在测试期间仪器状态与测试方法稳定, 两方法均可以提供稳定、可靠的同位素测试结果.

### 2.1.2 测量精度比较

通过采用叠氮还原法对 STD1—STD4 测试  $\text{NO}_2^-$  的  $\delta^{15}\text{N}$ , 进样量为 10 nmol N, 重复测量 4 次得出的结果见表 2 所示. 采用反硝化细菌法对 USGS34、IAEA3 和 USGS32 以及实验室标准 A 测试  $\text{NO}_3^-$  的  $\delta^{15}\text{N}$ , 进样量为 10 nmol N, 重复测量 4 次得出的结果见表 2 所示.

表 2 叠氮还原法和反硝化细菌法测试实验室标准  $\delta^{15}\text{N}$  结果

Table 2 The results of measurement value  $\delta^{15}\text{N}$  determination by azide reduction method and denitrifiers method

	标准样品编号 Standard sample name	标准值/( $\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$ ) Laboratory value/standard value	测定值/( $\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$ ) Measurement value
叠氮还原法 Azide reduction method	STD1	-52.30	-54.01±0.05(n=4)
	STD2	19.60	19.82±0.12(n=4)
	STD3	129.55	131.20±0.12(n=4)
	STD4	710.61	709.65±0.60(n=4)
反硝化细菌法 Denitrifiers method	USGS34	-1.80	-1.98±0.05(n=4)
	IAEA3	4.70	4.83±0.15(n=4)
	A	13.80	14.10±0.12(n=4)
	USGS32	180.00	179.93±0.41(n=4)

$n$ 为重复次数.  $n$  is the number of repetitions.

STD1—STD4 的  $\delta^{15}\text{N}$  测量精度在 0.05‰—0.60‰之间, 平均值为 0.22‰, 此测量精度与历史研究<sup>[18]</sup> (0.03‰—1.10‰) 一致. 国际标准 USGS34、IAEA3 和 USGS32 以及实验室标准 A 的  $\delta^{15}\text{N}$  的测量精度在 0.05‰—0.41‰之间, 平均值为 0.18‰, 此测量精度与历史研究<sup>[15]</sup> (0.20‰—0.50‰) 一致. 两方法测定值与标准值参考值接近, 可满足分析需求, 且测量精度均较高.

### 2.1.3 $^{15}\text{NO}_2^-$ 增量随培养时间的变化

为评估在培养过程中矿化作用造成  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  的稀释, 从而对氨氧化速率造成潜在的低估, 本研究对 K4 站位全部层位开展时间序列实验(图 2). 结果显示, 在设定的培养时间内(最长达 40 h),  $^{15}\text{NO}_2^-$  浓度随培养时间总体呈现显著的线性增长关系, 表明矿化稀释效应对于本次实验的潜在影响很小. 因此, 其他非时间序列培养的层位, 采用 12 h 培养获取的氨氧化速率具有合理性和可靠性.

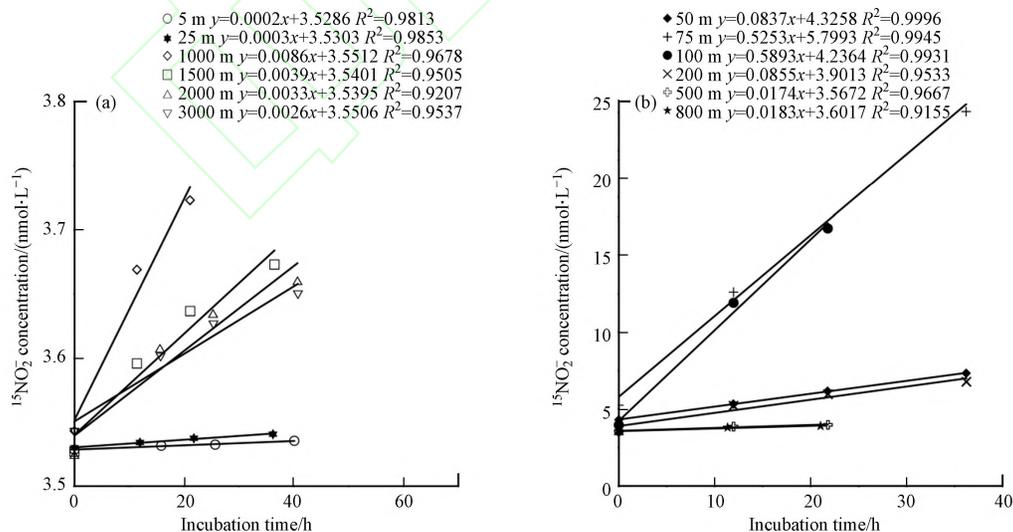


图 2 K4 站全部层位培养时间与  $^{15}\text{NO}_2^-$  的关系图

(a: 较低速率层位, b: 较高速率层位, 斜率代表氨氧化速率)

Fig.2 Increase of  $^{15}\text{N-NO}_2^-$  against incubation time in our time-course incubation at station K4

(a: low rate layer, b: high rate layer, ammonia oxidation rate was derived as the slope)

### 2.1.4 检出限比较

氨氧化速率的检出限取决于底物浓度、产物浓度以及产物同位素增量,因此每个层位的样品具有其各自的检出限. 本文拟采用以加标培养后的  $\delta^{15}\text{N}$  值增加量高于 T0 时刻的增加三倍以上的平均测量精度<sup>[19]</sup>, 按照此标准, 叠氮还原法需增加  $0.22 \times 3 = 0.66\%$ , 细菌法需增加  $0.18 \times 3 = 0.54\%$ , 检出限的大小与培养前加标  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  浓度/底物  $^{14}\text{N-NH}_4^+$  的比值以及氨氧化作用产物的浓度有关. 加标  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  浓度/底物  $^{14}\text{N-NH}_4^+$  的比值越大, 氨氧化作用产物的浓度越小, 则检出限越低. 检出限的计算结果见表 3.

表 3 叠氮还原法与反硝化细菌法测量氨氧化速率检出限对比

Table 3 Comparison of detection limits of ammonia oxidation rate measured by azide reduction method and denitrifiers method

站号 Site	深度/m Depth	叠氮还原法检出限 (nmol·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) Azide reduction detection limits	反硝化细菌法检出限 (nmol·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) Denitrifiers method detection limits	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /(μmol·L <sup>-1</sup> )	NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> /(μmol·L <sup>-1</sup> )
A3	75	0.008	0.020	1.123	3.50
	100	0.005	0.015	1.126	4.04
E2	25	<b>0.001</b>	—	<b>1.016</b>	<b>0.02</b>
	50	<b>0.001</b>	—	<b>1.012</b>	<b>0.03</b>
	100	0.0003	0.003	1.118	11.55
	150	<b>0.00005</b>	<b>0.0006</b>	1.026	13.43
	200	0.0003	0.005	1.016	17.98
	500	0.001	0.027	1.020	29.29
N8	15	<b>0.004</b>	—	<b>1.016</b>	<b>0.01</b>
	50	<b>0.009</b>	<b>0.005</b>	<b>1.597</b>	<b>1.00</b>
D5	25	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>1.013</b>	<b>0.94</b>
	50	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>	<b>1.014</b>	<b>1.01</b>
	75	0.006	0.008	1.175	1.97
	100	0.004	0.019	1.079	6.87
	150	0.006	0.047	1.031	10.31
	200	0.002	0.019	1.018	14.81
	300	0.003	0.044	1.019	21.49
	400	0.001	0.028	1.013	26.53
	480	0.002	0.048	1.013	28.08
	630	0.003	0.064	1.017	29.56
	750	0.005	0.120	1.010	32.34
	最小值	0.00005	0.0006		
	最大值	0.009	0.120		
	平均值	0.002	0.027		

1) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度为测定的天然浓度加人工添加的 1 μmol L<sup>-1</sup> <sup>14</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度. The NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration is the measured natural concentration plus the artificially added 1 μmol L<sup>-1</sup> <sup>14</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration;

2) 为便于对比, 叠氮还原法 E2 站位 25 m、50 m 层与 N8 站 15 m 层未计入最小值, 最大值与平均值. For the convenience of comparison, the minimum, maximum and average values were not included in the 25 m and 50 m of station E2 and 15 m of station N8 in the azide reduction method.

叠氮还原法测试检出限范围为 0.00005 — 0.009 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 平均值为 0.002 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. 此结果低于历史研究测试结果 0.001 — 0.034 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[20]</sup> 与 0.020 — 1.700 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[18]</sup>. 反硝化细菌法测试检出限范围为 0.0006 — 0.120 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 平均值为 0.027 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. 此结果低于历史研究测试结果 0.070 — 2.550 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[20]</sup> 与 0.010 — 0.510 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup><sup>[21]</sup>, 原因在于上述研究采用加标培养后增加两倍最大测量精度 2.00‰ 来计算检出限, 而本研究采用三倍平均测量精度 0.66‰ 与 0.54‰, 因而检出限更低. 本研究反硝化细菌法测试检出限范围与万显会<sup>[19]</sup> 采用反硝化细菌法计算硝化速率测

试检出限范围 0.040—0.160 nmol·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 在同一量级。

总体来看, 大部分站位层位叠氮还原法检出限低于反硝化细菌法检出限, 原因在于叠氮还原法检测产物 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度小于反硝化细菌法检测产物为 NO<sub>x</sub><sup>-</sup>. 在产物浓度相近区域(D5 站 25 m 层与 50 m 层, N8 站 50 m 层), 两方法检出限相近, 甚至反硝化细菌法检出限略低于叠氮还原法检出限. 其中 E2 站 150 m 层两方法检出限极低的原因是 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 浓度接近 0.7 nmol·L<sup>-1</sup> 检出限.

### 2.1.5 两种方法测试南海水柱氨氧化速率对比

相关研究曾设置叠氮还原法和反硝化细菌法测试氨氧化速率的比对实验, 但由于叠氮还原法没有添加 <sup>14</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 载体, 导致本底 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 小于 500 nmol·L<sup>-1</sup> 的样品, 受亚硝酸盐氧化作用的影响, 使得叠氮还原法结果比反硝化细菌法值明显偏小<sup>[20]</sup>. 本研究在全部培养层位的培养实验中, 添加了 1 μmol·L<sup>-1</sup> <sup>14</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 以消除亚硝酸盐氧化造成的潜在影响. 结果显示, 反硝化细菌法与叠氮还原法测量的氨氧化速率基本吻合, 斜率接近 1(表 4、图 3), 表明本研究的优化添加量, 可有效降低亚硝氧化作用的影响.

表 4 叠氮还原法与反硝化细菌法测量氨氧化速率对比

Table 4 Comparison of ammonia oxidation rate measured by azide reduction method and denitrifiers method

站位 Site	深度/m Depth	氨氧化速率-叠氮还原法/(nmol·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) Ammonia oxidation rate measured by azide reduction method	氨氧化速率-反硝化细菌法/(nmol·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) Ammonia oxidation rate measured by denitrifiers method
A3	75	73.364 ± 5.037(n=2)	67.600 ± 0.453(n=2)
	100	35.877 ± 2.493(n=2)	34.739 ± 0.959(n=2)
E2	25	ND	—
	50	0.023 ± 0.003(n=2)	—
	100	0.657 ± 0.132(n=2)	0.645 ± 0.055(n=2)
	150	0.010 ± 0.001(n=2)	0.010 ± 0(n=2)
	200	0.003 ± 0.002(n=2)	0.005 ± 0.001(n=2)
	500	ND	ND
N8	15	ND	—
	50	58.526 ± 0.647(n=2)	58.193 ± 1.187(n=2)
D5	25	0.007 ± 0.001(n=2)	ND
	50	0.310 ± 0.016(n=2)	0.236
	75	12.567 ± 0.429(n=2)	11.091
	100	13.802 ± 1.053(n=2)	12.254
	150	1.217 ± 0.023(n=2)	1.140
	200	0.047 ± 0.001(n=2)	0.045
	300	0.039 ± 0.0001(n=2)	ND
	400	0.003 ± 0.0005(n=2)	ND
	480	0.005 ± 0.0006(n=2)	ND
	630	ND	ND
750	ND	ND	

1) n 为重复次数. n is the number of repetitions. 2) ND, 未检出, not detected. “—”: 没有数据, No data.

然而, 在氨氧化速率较低而环境 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度较高的中深部水层, 例如 D5 站位的 300 m、400 m、480 m, 采用反硝化细菌法检测不到培养前后的 δ<sup>15</sup>N-NO<sub>x</sub><sup>-</sup> 的显著变化, 导致氨氧化速率低于检出限. 然而, 由于叠氮还原法仅测试 δ<sup>15</sup>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的变化, 其同位素的响应更为灵敏, 因而可获取氨氧化速率, 表明叠氮还原法在环境本底 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度较高时候具有优越性.

对 D5 站位进行水柱积分可以得到, 叠氮还原法水柱积分结果为 908.745 μmol·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, 反硝化细菌法水柱积分结果为 803.100 μmol·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>, 可见由于细菌还原法无法获取中深层低氨氧化速率, 造成了水柱

氨氧化速率的低估. 因此, 在全水柱采用低检出限的叠氮还原法可以更为完整地获取氨氧化的速率剖面.

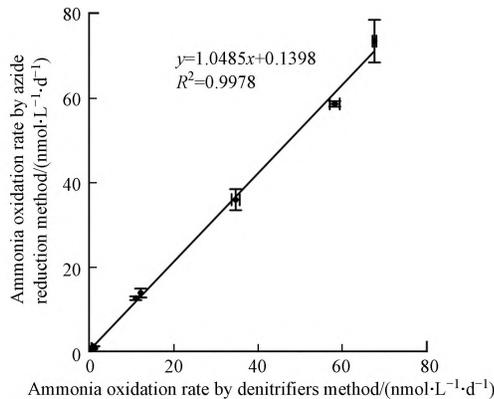


图3 叠氮还原法与反硝化细菌法测量氨氧化速率对比

Fig.3 Comparison of ammonia oxidation rate measured by azide reduction method and denitrifiers method

### 2.1.6 方法不确定性讨论

虽然本方法显著提高了海洋氨氧化速率测试的灵敏度, 但是在操作过程中由于人为添加 $^{14}\text{NO}_2^-$ , 不可避免在培养与测试过程中引起不确定性. 为此, 本研究在培养过程中采用同一瓶 $\text{NO}_2^-$ 储备液, 采用统一的培养体积和 $\text{NO}_2^-$ 添加体积, 以尽可能减少在甲板培养过程中造成的偏差. 对于同位素标记物 $^{15}\text{NH}_4^+$ , 采用同样的添加方法. 此外, 尽可能采用3个时间点或以上的时间序列培养和2个平行样重复培养. 在样品分析过程中, 同时测定了样品中实际 $\text{NO}_2^-$ 浓度和 $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_2^-$ , 并在全程中实施严格的质量控制, 确保同位素测定的准确度和精确度. 由此, 降低由于试剂添加等过程引起的不确定性, 获取可靠的结果.

## 2.2 叠氮还原法测试南海水柱氨氧化速率的分布与动力学特征

### 2.2.1 南海氨氧化底物动力学特征

通过在E2站与SEATS站的75 m层添加0、50、100、200、500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 并以 $^{15}\text{NH}_4^+$ 为横轴,  $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化速率为纵轴拟合米氏方程(图4), 得到E2站75 m的 $V_m$ 为 $19.370 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $K_m$ 为 $10.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图4a), SEATS站75 m的 $V_m$ 为 $5.705 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $K_m$ 为 $97.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图4b). 这一结果与徐敏等<sup>[22]</sup>在西太平洋 $K_m$ 值结果76—2112  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 刘丽等<sup>[23]</sup>在北太平洋西部副热带环流 $K_m$ 值8.0—43.6  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 等开阔大洋测定的 $K_m$ 值量级相当, 证明了开阔大洋环境氨氧化微生物对于底物极高的亲和力, 且E2站75 m层氨氧化生物对底物亲和力比SEATS站75 m层更高.

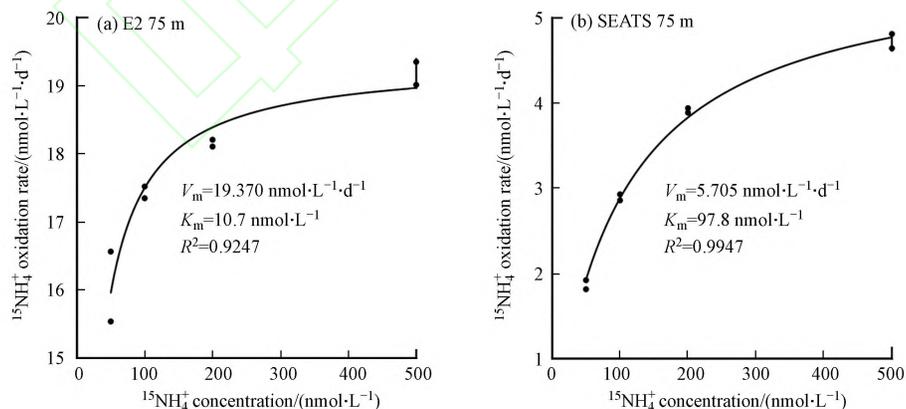


图4 E2站与SEATS站75 m氨氧化速率的米氏方程拟合

Fig.4 Substrate kinetic properties derived by Michaelis-Menten equation fits of ammonia oxidation rate at 75 m of station SEATS and station E2

### 2.2.2 南海氨氧化速率分布特征

通过使用这一优化的培养方法和叠氮还原法, 获得了夏季南海北部氨氧化速率数据, 氨氧化速率变化范围为未检出— $133.525 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ .

水平分布: 通过等密面混合模型计算发现南海北部上层的  $\text{NH}_4^+$  浓度和氨氧化速率与黑潮入侵份额显著相关, 吕宋海峡东部的寡营养盐、高浓度惰性 DON 黑潮海水入侵南海后 DON 被南海微生物降解, 加速了有机质矿化以及刺激了氨氧化作用<sup>[24]</sup>。

垂直分布: 首次获得南海北部全水柱的氨氧化速率剖面(图 5), 垂直分布表现为表层低, 在真光层底部 50—100 m 处出现速率极大值, 然后随深度增加速率呈现指数式下降。

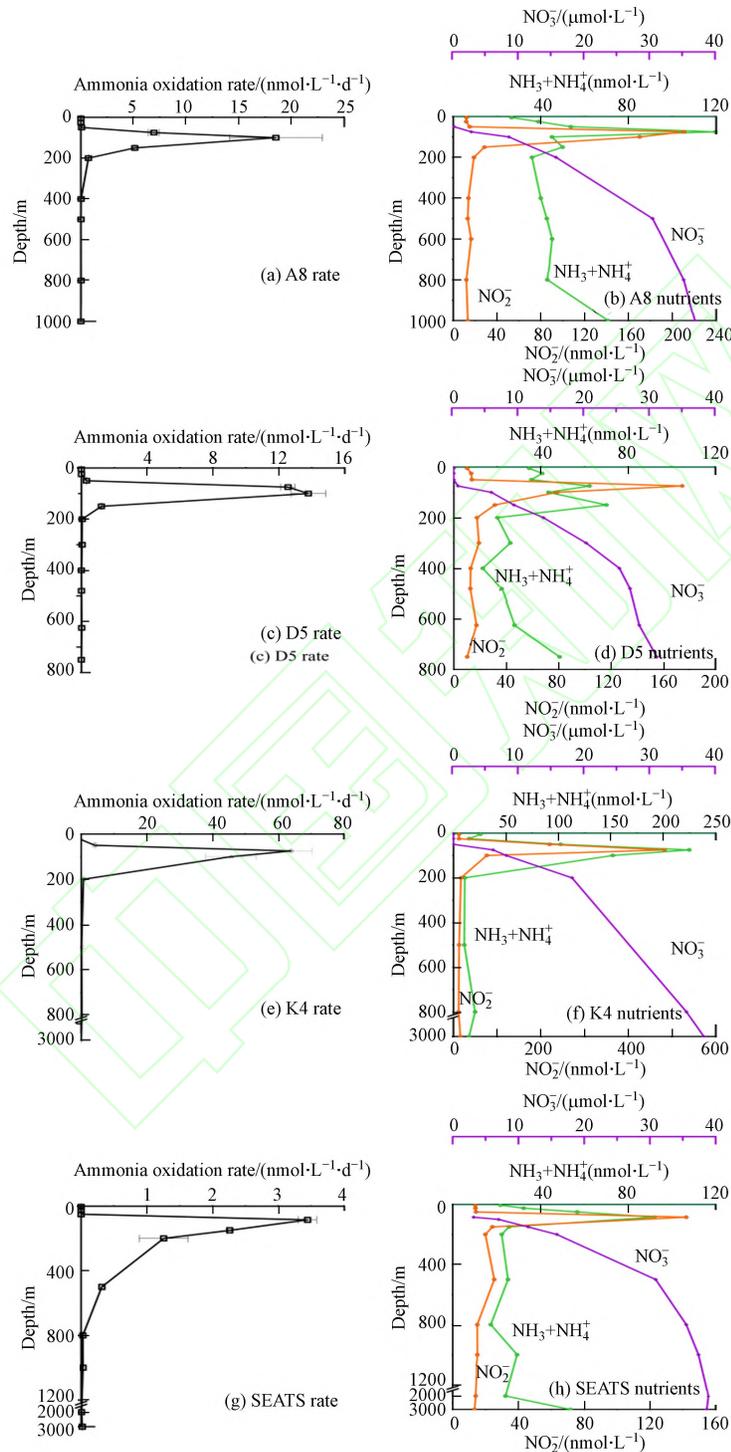


图 5 A8、D5、SEATS 和 K4 站氨氧化速率与营养盐的垂直分布  
(速率为平行样的平均值, 误差棒表示±标准偏差)

Fig.5 Vertical distribution of ammonia oxidation rate and nutrients at station A8、D5、SEATS and K4 station  
(The rate is the average of the parallel sample, and the error bar represents±standard deviation)

真光层上部氨氧化速率与  $\text{NH}_4^+$  浓度的关系表明, 尽管在暗培养和底物加富条件下, 仍然无法探测

到活跃的氨氧化速率,证明由于光抑制和浮游植物竞争,在真光层上部氨氧化微生物的分布较少<sup>[21, 25]</sup>. 铵极大值层与氨氧化速率极大值层的一致性以及测试站位铵盐浓度与氨氧化速率的相关性(图 6a,  $P < 0.001$ )与之前研究一致<sup>[26]</sup>,表明在真光层底部和真光层以深,氨氧化过程主要受控于底物供给. 另一方面,氨氧化速率极大值层与亚硝极大值层的一致性以及测试站位亚硝酸盐浓度与氨氧化速率的相关性(图 6b,  $P < 0.001$ )表明,氨氧化速率是亚硝极大值层产生和维持的关键过程<sup>[27]</sup>. 真光层以深,氨氧化速率主要受限于有机质供应指数递减导致矿化产生  $\text{NH}_4^+$  底物同步下降<sup>[28]</sup>,因此真光层以下的氨氧化速率拟合后符合马丁曲线(Martin Curve)<sup>[20, 29]</sup>. 上述结果有助于提升对于南海乃至寡营养海域的氨氧化垂直分布特点及其关键调控机理的认知.

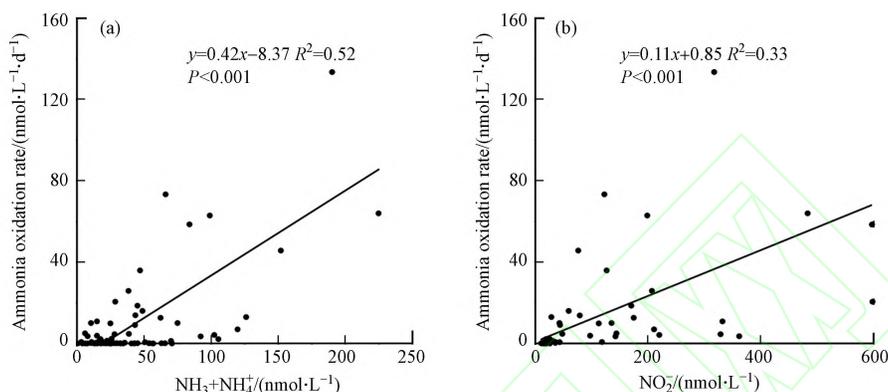


图 6 2016 夏季南海航次所有站位氨氧化速率与铵盐(a)、亚硝酸盐(b)的相关性

Fig.6 Correlation between ammonia oxidation rate and ammonium(a) and nitrite(b) at all stations during the 2016 South China Sea cruise

### 3 结论(Conclusion)

1) 通过优化的  $^{14}\text{N}\text{-NO}_2^-$  添加与  $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  同位素标记培养,结合叠氮还原法,首次获取南海北部海域全水柱氨氧化速率剖面,各站位变化范围为未检出— $133.525 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ .

2) 反硝化细菌法与叠氮还原法均具有良好的重现性与一致性,两方法测量精度均高,但产物浓度的干扰导致反硝化细菌法平均检出限低于叠氮还原法.

3) 通过水柱积分比较,叠氮还原法相对于反硝化细菌法更适用于开阔大洋全水柱剖面测试氨氧化速率.

4) 本研究建议,在研究河口与海湾等生物地球化学反应迅速、高生产力、高硝酸盐的海域,采用叠氮还原法与反硝化细菌法测试反硝化速率均可.但在开阔大洋低生产力,低速度的区域全水柱剖面采用叠氮还原法可获取更低速率更为精确的氨氧化速率,反硝化细菌法则在开阔大洋真光层更为适用.

#### 参考文献 (References)

- [ 1 ] HSIAO S S Y, HSU T C, LIU J W, et al. Nitrification and its oxygen consumption along the turbid Chang Jiang River plume[J]. *Biogeosciences*, 2014, 11(7): 2083-2098.
- [ 2 ] HU A Y, JIAO N Z, ZHANG C L. Community structure and function of planktonic crenarchaeota: Changes with depth in the South China Sea[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(3): 549-563.
- [ 3 ] JUNG M Y, WELL R, MIN D, et al. Isotopic signatures of  $\text{N}_2\text{O}$  produced by ammonia-oxidizing Archaea from soils[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 1115-1125.
- [ 4 ] DUGDALE R C, GOERING J J. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity1[J]. *Limnology and Oceanography*, 1967, 12(2): 196-206.
- [ 5 ] SHIOZAKI T, IJICHI M, ISOBE K, et al. Nitrification and its influence on biogeochemical cycles from the equatorial Pacific to the Arctic Ocean[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(9): 2184-2197.
- [ 6 ] DAI M, WANG L, GUO X, et al. Nitrification and inorganic nitrogen distribution in a large perturbed river/estuarine system: The Pearl River Estuary, China[J]. *Biogeosciences*, 2008, 5(5): 1227-1244.

- [ 7 ] CLARK D R, REES A P, JOINT I. A method for the determination of nitrification rates in oligotrophic marine seawater by gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Marine Chemistry*, 2007, 103(1/2): 84-96.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] 郑敏芳, 胡王江, 邱雨生, 等. Gasbench II-IRMS 升级 N<sub>2</sub>O 预富集装置测定海水硝酸盐的氮氧同位素 [J]. *应用海洋学学报*, 2017, 36(1): 135-142.  
ZHENG M F, HU W J, QIU Y S, et al. N<sub>2</sub>O preconcentration device upgraded for Gasbench II-IRMS analyzing N and O isotopes of seawater nitrate[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2017, 36(1): 135-142 (in Chinese).
- [10] PENG X F, FAWCETT S E, van OOSTENDE N, et al. Nitrogen uptake and nitrification in the subarctic North Atlantic Ocean[J]. *Limnology and Oceanography*, 2018, 63(4): 1462-1487.
- [11] 崔坤磊, 尹希杰, 李艳利, 等. 细菌反硝化法测试硝酸盐氮、氧同位素的研究与应用 [J]. *应用海洋学学报*, 2021, 40(4): 629-635.  
CUI K L, YIN X J, LI Y L, et al. Study and application of the isotopes N and O in nitrate determination by bacterial denitrification[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2021, 40(4): 629-635 (in Chinese).
- [12] EPPLEY R W, ROGERS J N, McCARTHY J J, et al. Light/dark periodicity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *coccolithus huxleyi* in n-limited chemostat culture I [J]. *Journal of Phycology*, 1971, 7(2): 150-154.
- [13] PATEY M D, RIJKENBERG M J A, STATHAM P J, et al. Determination of nitrate and phosphate in seawater at nanomolar concentrations[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(2): 169-182.
- [14] ZHU Y, YUAN D X, HUANG Y M, et al. A sensitive flow-batch system for on board determination of ultra-trace ammonium in seawater: Method development and shipboard application[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 794: 47-54.
- [15] 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.
- [16] 王曦, 曹亚澄, 韩勇, 等. 化学转化法测定水体中硝酸盐的氮氧同位素比值 [J]. *土壤学报*, 2015, 52(3): 558-566.  
WANG X, CAO Y C, HAN Y, et al. Determination of nitrogen and oxygen isotope ratio of nitrate in water with a chemical conversion method[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(3): 558-566 (in Chinese).
- [17] McILVIN M R, CASCIOTTI K L. Technical updates to the bacterial method for nitrate isotopic analyses[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(5): 1850-1856.
- [18] SANTORO A E, SAKAMOTO C M, SMITH J M, et al. Measurements of nitrite production in and around the primary nitrite maximum in the central California Current[J]. *Biogeosciences*, 2013, 10(11): 7395-7410.
- [19] WAN X S, SHENG H X, DAI M H, et al. Ambient nitrate switches the ammonium consumption pathway in the euphotic ocean[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 915.
- [20] PENG X F, FUCHSMAN C A, JAYAKUMAR A, et al. Ammonia and nitrite oxidation in the Eastern Tropical North Pacific[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2015, 29(12): 2034-2049.
- [21] PENG X F, FUCHSMAN C A, JAYAKUMAR A, et al. Revisiting nitrification in the Eastern Tropical South Pacific: A focus on controls[J]. *Journal of Geophysical Research (Oceans)*, 2016, 121(3): 1667-1684.
- [22] XU M N, LI X L, SHI D L, et al. Coupled effect of substrate and light on assimilation and oxidation of regenerated nitrogen in the euphotic ocean[J]. *Limnology and Oceanography*, 2019, 64(3): 1270-1283.
- [23] LIU L, CHEN M M, WAN X S, et al. Reduced nitrite accumulation at the primary nitrite maximum in the cyclonic eddies in the western North Pacific subtropical gyre[J]. *Science Advances*, 2023, 9(33): eade2078.
- [24] XU M N, ZHANG W J, ZHU Y F, et al. Enhanced ammonia oxidation caused by lateral kuroshio intrusion in the boundary zone of the northern South China Sea[J]. *Geophysical Research Letters*, 2018, 45(13): 6585-6593.
- [25] WARD B B. Nitrification in the ocean[M]//Nitrification. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014: 323-345.
- [26] SMITH J M, CHAVEZ F P, FRANCIS C A. Ammonium uptake by phytoplankton regulates nitrification in the sunlit ocean[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108173.
- [27] WAN X S, SHENG H X, DAI M H, et al. Phytoplankton-nitrifier interactions control the geographic distribution of nitrite in the upper ocean[J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2021, 35(11): e2021GB007072.
- [28] WARD B B, ZAFIRIOU O C. Nitrification and nitric oxide in the oxygen minimum of the eastern tropical North Pacific[J]. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers*, 1988, 35(7): 1127-1142.
- [29] MARTIN J H, KNAUER G A, KARL D M, et al. VERTEX: Carbon cycling in the northeast Pacific[J]. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers*, 1987, 34(2): 267-285.