



铁元素促进了稻田周丛生物对铵态氮的富集

陶静¹, 孙朋飞^{1*}, 吴永红^{1,2*}

1. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008

2. 水利部秭归三峡水库生态系统观测研究站, 宜昌 443605

* 联系人, E-mail: pfsun@issas.ac.cn; yhwu@issas.ac.cn

2025-02-27 收稿, 2025-05-04 修回, 2025-06-09 接受, 2025-06-09 网络版发表

国家重点研发项目(2024YFD1701201)和国家自然科学基金(42177232, 41961144010)资助

摘要 微生物介导铁氧化还原耦合氮循环过程在土壤中十分普遍, 周丛生物作为稻田土水界面上的微生物聚集体, 能富集环境中的铁、氮等元素以满足自身生长代谢, 而目前仍不清楚周丛生物中的铁是否会影响其对氮的富集和转化. 因此, 本研究从化学和生物学角度解析了Fe(III)影响下的周丛生物氮周转情况. 研究结果表明, Fe(III)可通过三种途径促进周丛生物对NH₄⁺-N的积累: 1)表面铁氧化物为NH₄⁺提供了更多的吸附位点; 2)Fe(III)改变了周丛生物群落结构进而降低了氨氧化功能基因*amoA/B/C*的丰度从而抑制了周丛生物氨氧化过程; 3)增加异化硝酸盐还原产铵(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)的*nirB*基因、同化硝酸盐还原产铵(assimilatory nitrate reduction to ammonium, ANRA)的*nasA*基因丰度从而促进NO₃⁻-N的还原和NH₄⁺-N的产生. 本研究发现铁元素在减少周丛生物NO₃⁻-N流失的同时也降低了N₂O排放, 为利用周丛生物控制稻田氮流失, 调整施肥策略提供了新的见解.

关键词 氮富集, 铁氧化还原, 周丛生物, 氨氧化, 异化硝酸盐还原产铵

氮是植物生长和农业生产的关键元素, 为了满足现在农业生产系统中作物对氮素的生长需求, 施用氮肥成了提高生产的有效途径之一^[1]. 土壤中的氮循环与生态系统的生产力密不可分, 同时也受到外界条件变化的影响, 例如微生物、施肥、气候变化等^[2]. 微生物能有序参与几乎土壤中的整个氮循环过程, 简要概括为6大过程: 氮气的固定成铵(NH₄⁺)后被同化为有机氮(N₂→有机氮); 有机氮被分解, 释放出分子氨(氨化过程); 接着分子氨通过硝化反应被氧化为硝态氮(NH₄⁺→NO₂⁻→NO₃⁻); 硝态氮又通过反硝化反应重新变为二氮气体(NO₃⁻→NO₂⁻→NO→N₂O→N₂); 或者通过厌氧氨氧化转化为氮气(NO₂⁻+NH₄⁺→N₂)^[3]. 事实上, 外界环境对土壤氮周转的影响很大程度上也是对土壤微生物氮转化的影响, Yang等人^[4]通过宏基因组分析发

现气候变暖降低了氮循环微生物群落的多样性, 加剧了氮循环基因的相互竞争, 抑制了大多数氮循环途径, 尤其是同化硝酸盐还原和反硝化反应. 除了外界的影响因素外, 微生物在进行氮转化过程中所涉及的化学反应众多, 包括电子的得失、氧化还原、催化等, 在特定环境下种可变价态金属(Fe、As等)以及有机质, 能作为电子受体/供体耦合铵盐的氧化和硝酸盐的还原过程.

金属铁在土壤中含量高, 同时也是生物生长和生存的关键微量元素, 微生物介导Fe(II)的氧化耦合NO₃⁻还原过程已经在多种天然湿地、土壤沉积物中得到了报道^[5,6]. 近年研究表明, Fe(III)在生物地球化学循环中具有多重电子受体功能, 可介导氨氮通过生物氧化途径转化为亚硝酸盐、硝酸盐及分子态氮. 该创新性发现被学术界定义为铁氨氧化作用(feammox), 目前

引用格式: 陶静, 孙朋飞, 吴永红. 铁元素促进了稻田周丛生物对铵态氮的富集. 科学通报, 2025, 70: 4878–4890

Tao J, Sun P, Wu Y. Iron promotes periphytic biofilm accumulation of ammonia nitrogen in paddy ecosystems (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 4878–4890, doi: 10.1360/TB-2025-0180

已在湿地生态系统(包括水稻田基质、湖泊沉积层及沼泽地表层)中检测到该反应过程的存在证据^[7-9]。Fe在微生物介导的氮循环中发挥着重要的作用:在硝化培养基中添加适量的Fe(Ⅱ)(0.05~0.2 mg/L)能促进*Acinetobacter harbinensis*对氨氮的异养硝化作用,在Fe(Ⅱ)的添加量为0.1 mg/L时,*Acinetobacter harbinensis*对氨氮的硝化速率由未添加时的0.19 mg/(L·h)显著提升至0.5 mg L⁻¹ h⁻¹)^[10]。在污泥中加入Fe能促进反硝化菌*Thauera*、*Thermomonas*、*Rhodobacter*和*Hyphomicrobium*丰度的增加,同时增加AMO酶、NXR酶(硝化酶)、NAP和NIR酶(反硝化酶)的活性,实现了硝化反应和反硝化反应的同时进行^[11]。除了参与微生物的氮循环过程,稻田土壤中不同价态铁也能通过多种氧化还原过程介导氮的化学转化,例如Fe⁰和Fe(Ⅱ)可以还原NO₃⁻和NO₂⁻产生N₂O、N₂、NH₄⁺;NH₄⁺能被直接被高价铁(VI)氧化为N₂或者NO₃⁻^[12]。Fe(Ⅲ)在厌氧环境中对氮矿化或者铵产生作用已得到证实,水稻土或者沉积物中的NH₄⁺的产生与土壤有机质和Fe(Ⅲ)这两个重要因素有关^[13]。Zhang和Scherer^[14]的研究证实了NH₄⁺的扩散与土壤黏土颗粒上的Fe(Ⅲ)(氢)氧化物的还原溶解有关,淹水会增加Fe(Ⅲ)八面体的还原性和黏土矿物层内的负电荷,这两个特性会加速NH₄⁺扩散到黏土中,并被固定在稻田土壤中,有利于作物的吸收利用。

在自然界中,微生物多以聚集的形式体存在,微生物之间彼此作用,形成具有一定稳定性、适应性和特定功能的微生物生态系统,不同的微生物组合表现出由环境选择的相似的群落基因组成谱,这被称为微生物群落的功能冗余性^[15,16]。稻田周丛生物生长于稻田水土界面,由藻类、真菌、细菌、原生动物等多种自养、异养微生物组成的微生物聚集体,是一个微生物系统,不同微生物群落在周丛生物内达到动态平衡,不同微生物群落之间通过协调竞争充分利用环境中的营养成分^[17]。周丛生物中含有大量的孔隙和通道,为矿质吸附、络合、共沉降的养分提供存储空间,金属氧化物也成为周丛生物的重要组成部分,决定着周丛生物的地球化学反应活性^[18]。周丛生物通过自身生物化学特性,捕捉环境中的铁、锰、氮元素^[19,20],被捕捉的部分氮能够被吸附固定,剩余则在被自身的微生物吸收利用,通过固氮、硝化、反硝化、同化等过程,富集、释放出定量的氮,促进稻田生态系统中氮的循环,有研究表明周丛生物最多可以积累70 mg N/g(干重)^[21]。铁作为周丛生物中的主要氧化物,是否对周丛生物的氮

富集过程产生影响,我们尚未可知。本研究以揭示Fe(Ⅲ)对周丛生物氮富集过程的影响为目的,并从铁对周丛生物群落结构、氮循环功能基因以及氮代谢途径的影响的角度探究其影响机制。该研究为稻田土壤氮损失控制与农作物施肥管理,以及缓解氮素污染提供了新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 周丛生物Fe(Ⅲ)处理实验

用酒精消毒后的一次性刮刀刮取5 g新鲜周丛生物,经过3天避光厌氧的预培养,消耗自身的养分。将预处理过后周丛生物加入到200 mL浓度为10 mg/L的NH₄⁺(NH₄Cl)溶液中作为对照组(control check, CK),另外添加50 mg/L Fe³⁺(FeCl₃)作为实验组,其中,铁浓度的确定依据来自全国土壤和周丛生物中铁浓度的变化范围(12.4~50.6 g/kg)^[19],每组处理设有9个重复,实验在250 mL的锥形瓶中进行,采样时间为第1、4、8天,每组每次取3个平行样品。实验在温度为(25±1)°C的温室中进行,光暗时长为12/12 h,光照强度为2500 lux,在锥形瓶上方包裹一层有透气膜的封口膜,在与外界进行空气交换的同时减少溶液的挥发。

1.2 理化性质分析方法

采集实验过程中的周丛生物,按照液固比5:1加入25 mL, 2 mol/L KCl溶液,于25°C, 200 r/min下震荡2 h提取铵态氮和硝态氮,将提取液用定量水溶性滤纸过滤,通过流动分析仪(San++System, SAKLAR)测定浸提液中铵态氮的浓度,硝态氮浓度则采用氨基磺酸分光光度法测得^[22]。将提取过铵态氮和硝态氮的周丛生物继续添加20 mL DTPA混合液,于25°C, 200 r/min下震荡2 h提取周丛生物中的有效态铁^[23],将提取液用定量水溶性滤纸过滤后通过电感耦合等离子发射光谱仪(Avio 200, PerkinElmer)测得铁浓度,同时在实验过程中每日用手持式溶氧仪(DZB-712, 雷磁)测定溶液中的溶解氧(dissolved oxygen, DO)。取实验结束后的部分周丛生物在60°C下烘干至恒重,采用X射线光电子能谱仪(XPS, 牛津UltimMax 40)分析周丛生物的表面元素组成和化学价态变化。

1.3 ¹⁵N同位素示踪实验

为了进一步验证Fe(Ⅲ)对周丛生物氮循环(尤其是

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收和转化)步骤的影响,本研究设计了 ^{15}N 同位素示踪实验,实验设计同1.1,但为了区分硝化和反硝化过程的影响,实验中添加氨氧化抑制剂作为对照.联氨(N_2H_4)作为厌氧氨氧化过程的特征性代谢中间体,能够显著提升该反应的生物催化效率.然而在溶解氧存在的工况下,即使加入微量 N_2H_4 (10^{-6} mol/L级),也会对硝化作用的两大关键步骤(需氧氨氧化及亚硝酸盐氧化酶活性)产生显著抑制效应^[24],除 Fe(III) 添加外,另外设计存在1 mg/L N_2H_4 情况下 Fe(III) 对周丛生物氮循环的影响,每组处理设有3个重复,实验在250 mL的锥形瓶中进行,实验周期为8天,期间不添加任何营养物质.为了收集实验过程中的气体和保证实验的有氧条件(氧浓度为19.5%~23.5%),只在第一天和第二天为各实验组加上一个密闭的空气罩,用针筒和气袋收集实验过程中气体,转移至两批真空气瓶内,用同位素质谱仪MAT253(253型, Thermo Fisher Scientific)分别检测 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 和 $^{15}\text{N}_2$ 氮丰度,实验示意图如图1所示.第三天撤去空气罩,第八天收集周丛生物并通过宏基因组检测分析各组微生物群落和氮通路的变化情况.

1.4 周丛生物的宏基因组分析

在实验结束后,运用MN NucleoSpin 96 soil DNA提取试剂盒对周丛生物开展DNA提取工作^[25].待DNA提取完成,严格依照Illumina公司给出的宏基因组测序标

准方案推进后续操作,这一系列操作涵盖了样品质量检测、文库构建、文库质量检测以及文库测序等关键流程.当样品基因组DNA通过检测后,着手对DNA进行打断处理.随后,对片段化的DNA依次开展末端修复、在3'端添加A碱基、连接测序接头等操作.接着,对连接产物进行纯化与片段筛选,之后进行文库扩增,再对扩增产物加以纯化,最终构建出测序文库.待文库质量检测合格,利用Illumina测序仪开展测序工作.测序所得到的原始序列(raw reads)中存在部分低质量序列,为确保后续信息分析的质量,需对Raw reads进行过滤处理,从而得到可用于后续信息分析的Clean reads.借助软件MEGAHIT开展宏基因组组装工作,并过滤掉长度短于300 bp的contig序列.采用QUAST软件对组装结果进行全面评估.采用MetaGeneMark软件(http://exon.gatech.edu/meta_gmhmp.cgi, Version 3.26),并使用其默认参数来识别基因组中的编码区域.利用MMseqs2软件(<https://github.com/soedinglab/mmseqs2>, Version 12-113e3)去除冗余序列,将相似性阈值设定为95%,覆盖度阈值设定为90%.最后,将处理后的序列与常用数据库(如常见的KEGG、COG等)以及专性数据库进行比对注释^[26].

1.5 方法与分析

PLS-DA是基于部分最小二乘回归的扩展,用于降

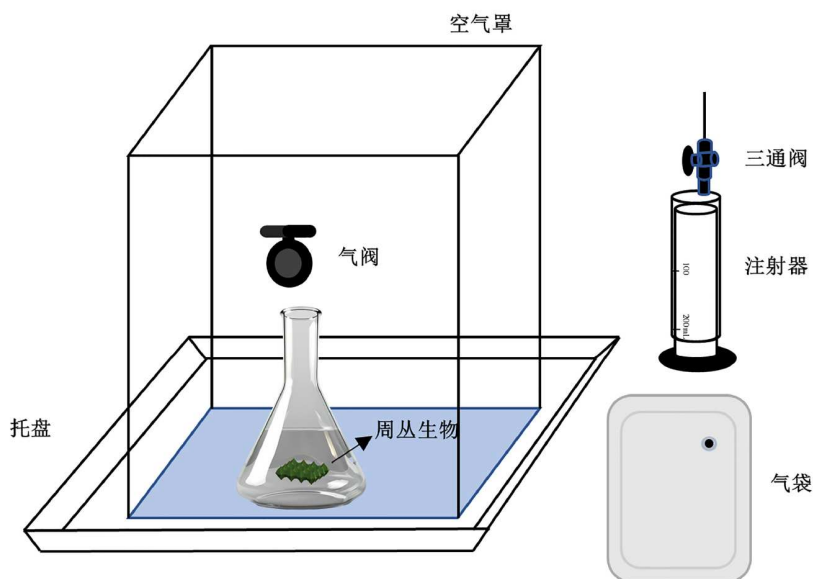


图1 (网络版彩色)采气装置示意图

Figure 1 (Color online) Gas production device diagram

维和分类, 我们使用R语言“ropls”包来实现(4.2.1版本). 关键差异微生物的筛选则采用随机森林模型, 通过R语言“randomForest”包计算实现. 我们使用Spearman相关矩阵($P < 0.05$)通过“spa”包, 利用R语言构建共现网络. 这种方法被广泛用于探究微生物OUT、功能基因之间的共现性相关性. 所有网络中的节点表示功能基因, 连接这些节点的连线表示功能基因之间的相关性^[27], 使用“igraph”包来计算网络属性. LSD差异分析用于比较多组间的均值比较, 通过R语言“agricolae”包实现, 使用Wilcoxon秩和检验评估两组间的差异显著性并通过“ggpubr”包实现. 所有的数据基于Excel表格汇总, 采气装置示意图由PPT绘制(锥形瓶素材来源“Cleanpng”), 部分图片通过R语言“ggplot2”包复现. XPS的数据由Avantage处理, 通过Origin复现.

2 结果分析

2.1 Fe(Ⅲ)对周丛生物的氮周转的影响

2.1.1 周丛生物中铵态氮、硝态氮以及铁浓度变化

实验过程中, 周丛生物中铵态氮、硝态氮以及可提取铁浓度的动态变化如图2所示. 数据显示, 无论是否添加外源Fe(Ⅲ), 周丛生物中都表现出对铁元素的基础富集能力, 这与其作为水土界面微生物聚集体的吸附特性和代谢需求相关. 值得注意的是, 图2(a)显示两组周丛生物中铵态氮浓度都随实验时长逐步增加, Fe(Ⅲ)添加组中铵态氮增幅达224.4%远高于CK组的85.1%; 相反, 硝态氮的浓度(图2(b))则逐步降低, CK中硝态氮浓度降低了53.7%, 而Fe(Ⅲ)添加组中硝态氮浓度降低了64.3%. 另外, 通过图2(c)可知, Fe(Ⅲ)添加组中可提取铁浓度随着培养时间呈现逐步降低趋势, 而CK组则维持相对稳定.

2.1.2 周丛生物表面生成铁氧化物

可提取态铁浓度降低则很有可能是形成了铁氧化物(Fe_2O_3 、 FeO 等)进而与周丛生物结合, 为了验证这一结果, 我们对实验结束后的CK和Fe(Ⅲ)处理下的周丛生物进行了XPS表征(如图3所示). 图3(a)显示了两组处理下整体谱图差异, 在CK处理中, 无明显Fe结合能峰生成, 而Fe(Ⅲ)处理下的Fe结合能峰明显, O 1s主要的结合能为531.3 eV, 归属于表面吸附氧(O_{surf})^[28], N 1s主要的结合能为398.58 eV, 表示可能存在表面 NH_4Cl , 图3(b)为Fe2p谱图, 根据Fe2p_{3/2}进行分峰拟合发现, 结合能709.12、709.18 eV处分别归属于Fe(Ⅱ)和Fe(Ⅲ), 占比

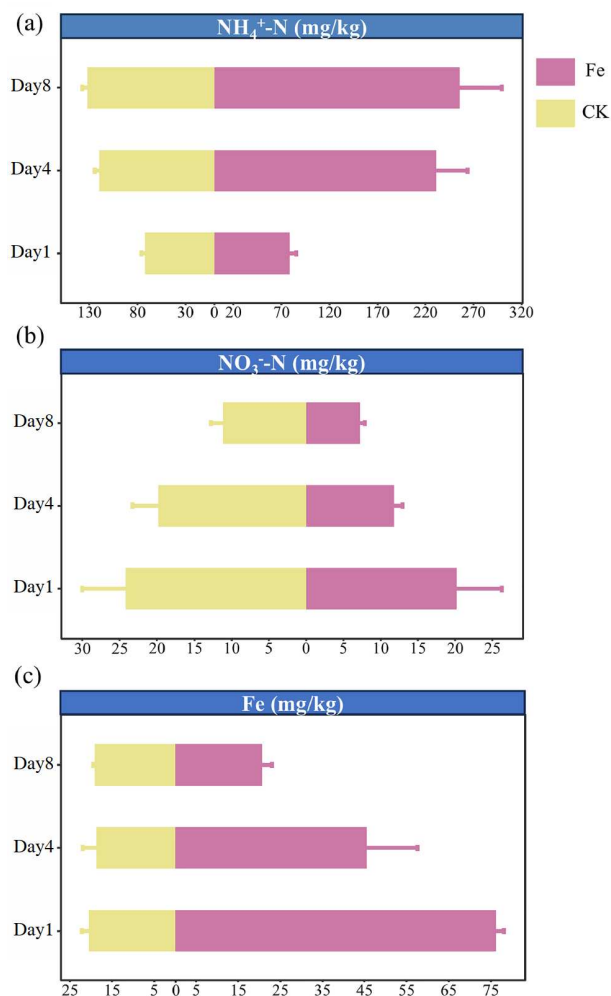


图2 (网络版彩色)CK和Fe(Ⅲ)组周丛生物可提取铵态氮(a)、硝态氮(b)以及铁浓度(c)变化情况

Figure 2 (Color online) Changes in the concentrations of ammonium nitrogen (a), nitrate nitrogen (b) and iron concentration (c) in the groups of CK and Fe(Ⅲ)

分别为25%和75%. 根据峰谱能查询对应的铁化学态可知, Fe主要在周丛生物表面形成 FeS_2 、 FeCl_3 、 Fe_2O_3 .

2.1.3 ^{15}N 同位素示踪结果

为了证实我们的猜想, 进一步分析Fe(Ⅲ)对周丛生物铵态氮消耗(硝化反应)过程的影响, 我们通过添加氨氧化抑制剂(C_2H_4)并结合 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 同位素示踪实验, 收集实验过程中的气体进行检测, 经检测收集的气体中只有 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 而不存在 $^{15}\text{N}_2$, 结合实验过程中DO的变化, 结果如图4所示. 在实验进行24 h后, Fe(Ⅲ)组相较于CK组, ^{15}N 丰度显著降低, 而添加了 N_2H_4 的实验组中几乎无 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 产生. 在48 h后, CK组 ^{15}N 丰度升高, Fe(Ⅲ)组也几乎无 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 产生.

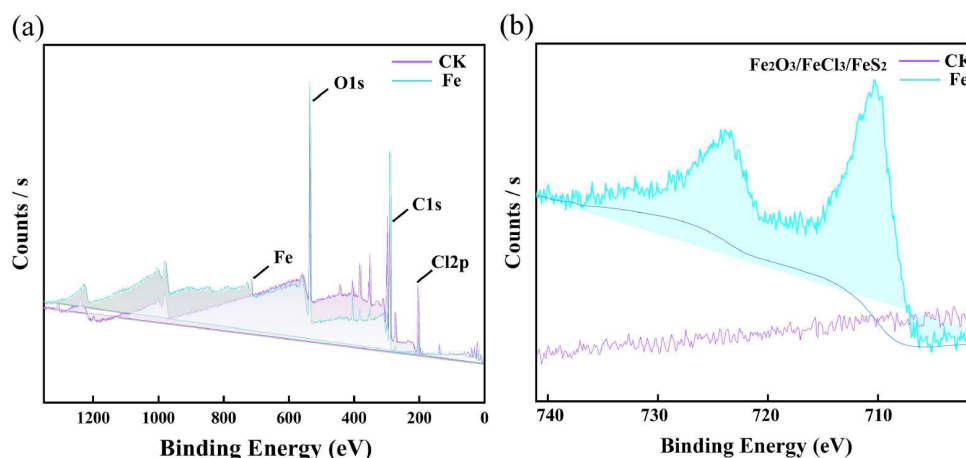


图 3 (网络版彩色)实验后不同处理组周丛生物的XPS图谱. (a) CK和Fe(Ⅲ)组周丛生物的XPS全图谱; (b) CK组和Fe(Ⅲ)组Fe2p3/2高分辨XPS图谱

Figure 3 (Color online) XPS spectra of periphytic biofilms in different treatment groups after the experiment. (a) Full XPS map of periphytic biofilms in groups of CK and Fe(Ⅲ); (b) high-resolution XPS spectra of Fe2p3/2 in group CK and group Fe(Ⅲ)

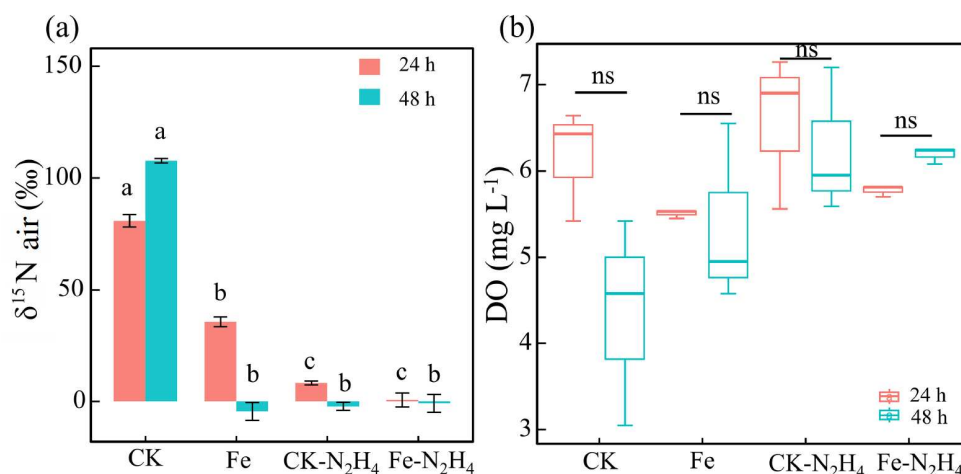


图 4 (网络版彩色) 同位素标记实验过程中各指标变化. (a) $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 同位素丰度, 字母标注为LSD差异显著性分析, 相同字母之间组间差异不显著($P>0.05$), 不同字母的组别之间差异显著($P<0.05$). (b) 溶液中溶解氧的变化趋势, 为秩和检验; ns, $P>0.05$

Figure 4 (Color online) Changes in various indicators during the isotope labeling experiment. (a) $^{15}\text{N}_2\text{O}$ isotope abundance. (a) is marked as LSD difference analysis, the same letters between groups mean no significant difference ($P>0.05$), while the different letters mean significant difference ($P<0.05$). (b) Trend of dissolved oxygen in solution. (b) is rank sum test; ns, $P>0.05$

2.2 周丛生物的群落结构的改变

进一步分析Fe(Ⅲ)对周丛生物群落结构影响, 我们通过偏最小二乘判别法(PLS-DA), 对CK、Fe(Ⅲ)、CK-N₂H₄、Fe-N₂H₄的微生物群落结构进行降维分析, 得分图如图5(a)所示, 四组在主成分(PC1)上存在显著分离, 表明周丛生物群落结构发生改变. 根据PLS-DA计算出的模型VIP(变量权重)值进一步筛选出重要微生

物(图5(b)), 其中伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)所占据的比重最大. 伯克霍尔德氏菌属在促进植物的抗病的同时还具有还原硝酸盐、产生嗜铁素促进微生物对Fe(Ⅲ)的吸收等功能^[29]. *Pseudomonas*菌属则能释放对铁具有高亲和力的铁载体, 并通过特定的外膜受体将其运输到细胞质中^[30], 同时它也是常见的好氧ANRA菌^[31]. 图5(c)是基于PLS-DA的功能基因降维分析, 其中Fe(Ⅲ)组的得分点分布与CK-N₂H₄组接近, 初步表明

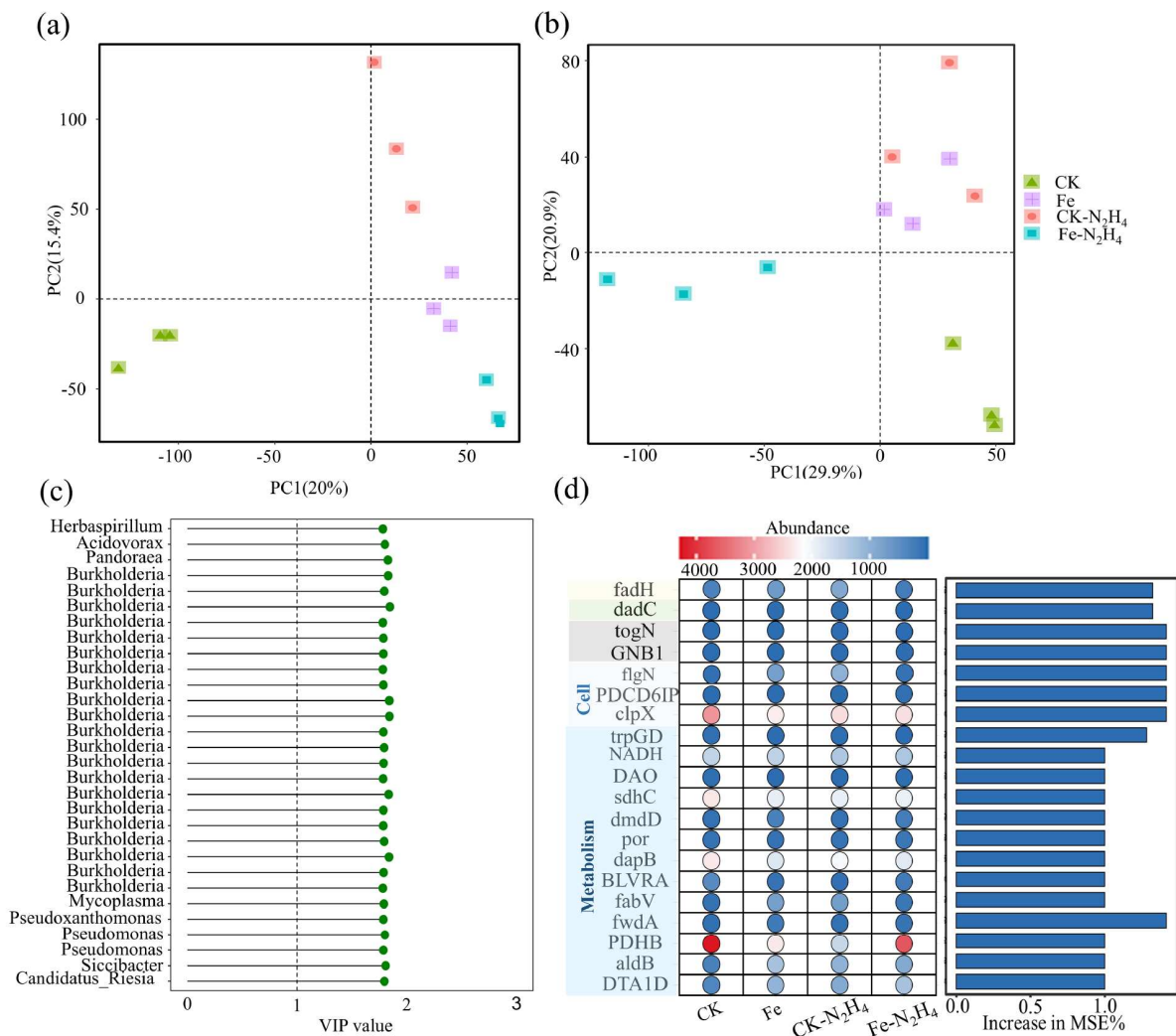


图 5 (网络版彩色)实验前后周丛生物物种变化情况. 基于宏基因序列的各组物种(a)和KEGG注释的蛋白差异(b)的PLS-DA分析; (c)是(a)中分析变量VIP值(VIP>1, 取前30), VIP值是将每个变量的权重与模型中所有的变量权重的标准差进行比较计算得到, 通常将VIP≥1作为能区分不同组的差异物; (d)是利用随机森林模型筛选出的显著差异功能基因(取前20)

Figure 5 (Color online) The variation in the species of microbes before and after the experiment. PLS-DA analysis of species (a) and protein differences (b) annotated by KEGG based on macro gene sequences; Figure (c) shows the VIP value of the analysis variable in (a)(VIP>1, take the first 30), the VIP value is calculated by comparing the weight of each variable with the standard deviation of the weights of all the variables in the model. Usually, VIP≥1 is regarded as a differentiator that can distinguish different group; Figure (d) Selection of significantly different functional genes by random forest analysis (top 20)

Fe(Ⅲ)的添加可能与N₂H₄组的微生物群落功能相近. 基于KEGG数据库的注释对四组实验的功能基因进行筛选发现, 在KEGG1级代谢通路中, 与新陈代谢相关的功能基因差异较大, 表明周丛生物在Fe(Ⅲ)和C₂H₄的作用下微生物代谢活动旺盛(图5(d)).

2.3 氮循环功能基因丰度变化

我们根据KEGG中氮循环通路和宏基因组结果筛

选出14个具有代表性的氮循环基因, 其丰度变化如图6所示. *narB*、*nirA*和*nasA*基因多用于表征同化硝酸盐还原作用(ANRA); *nirB*和*nrfA*基因多用于表征异化硝酸盐还原作用(DNRA); *nirK*、*norB*、*nosZ*和*narG*多用于表征反硝化反应, 其中*nirK*是反硝化反应的限速基因; *nifH*则为典型固氮基因; *amoA/B/C*和*hao*基因多用于表征硝化作用, *amo*基因为氨氧化酶编码基因, 根据宏基因组的分析结果, 并未在周丛生物中发现*hzs*和*hdh*基因

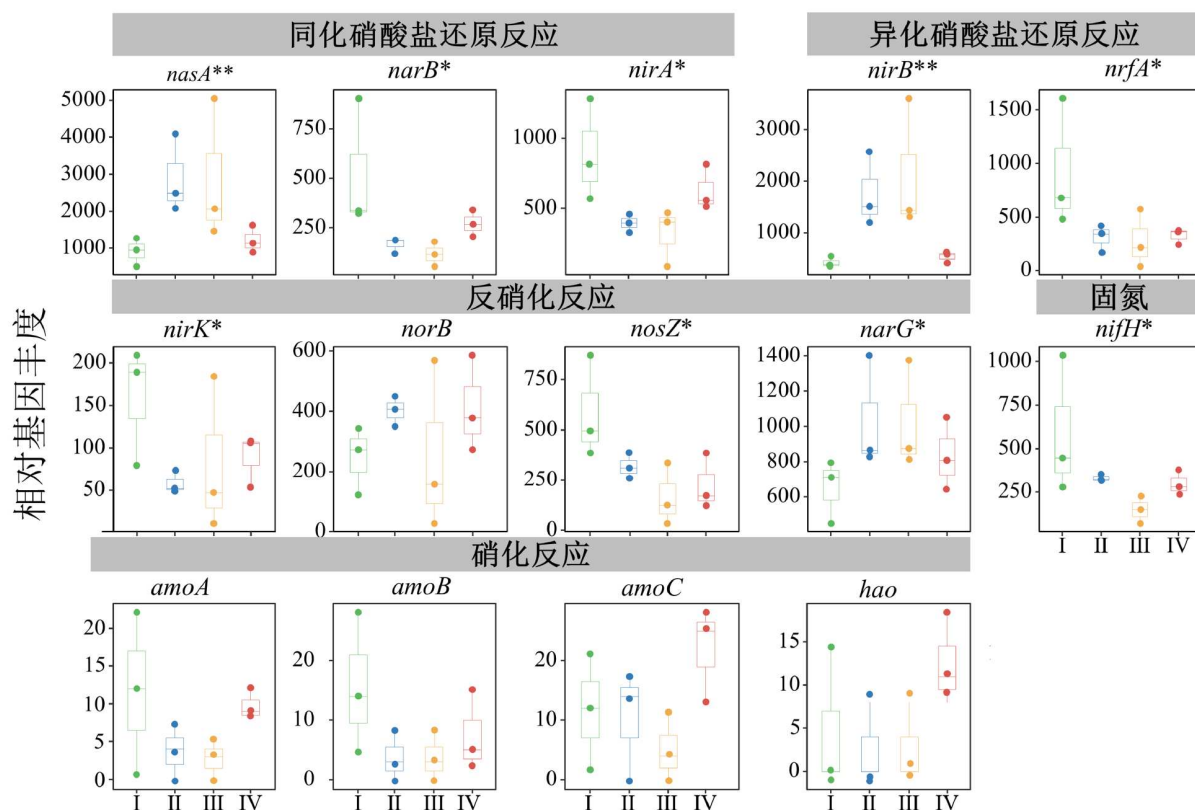


图 6 (网络版彩色)氮循环各过程相对基因丰度。I: CK; II: Fe; III: CK-N₂H₄; IV: Fe-N₂H₄。各组差异使用ANOVA检验: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$

Figure 6 (Color online) Gene abundance of each process of nitrogen cycle. I: CK; II: Fe; III: CK-N₂H₄; IV: Fe-N₂H₄. The differences among all groups were tested by ANOVA: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$

(厌氧氨氧化反应), 然而氨氧化菌中的 hao 基因和厌氧氨氧化菌中的 hdh 基因都是八面体血红素羟胺氧化还原酶的同系物, 因此 hao 有时被同时用于表征好养和厌氧细菌的氨氧化作用^[32]。在所有样品中, $nasA$ 和 $nirB$ 的基因添加Fe(III)后呈现最大丰度, 前者主要负责将NO₃⁻还原为NO₂⁻, 后者主要负责将NO₂⁻进一步还原为NH₄⁺。总体可以看出, Fe(III)添加与CK-N₂H₄的基因变化趋势除 $norB$ 外相似。固氮反应和硝化反应呈现出显著的下降, 而在反硝化反应中, 基因 $narG$ (NO₃⁻还原成NO₂⁻)的丰度升高。

2.4 铁-氮基因的网络分析

为了探究铁-氮循环功能基因之间的联系, 基于Garber汇总整理的铁有关的基因(289个)并结合宏基因组结果进行筛选可得78个铁循环的基因^[33], 其中分类包括含铁基因调控、铁储存、铁还原、铁获取-铁载体合成、铁获取-铁载体运输、铁获取-铁运输、铁获取-血红素运输、铁获取-血红素氧合酶。我们构建了四

组不同处理情况的线性网络(图7)。在四个不同处理的综合共现性网络中(图7(a)), 铁载体合成和铁载体运输基因占据了铁循环的主导地位, 与之关联密切的氮循环基因是DNRA和ANRA反应相关基因。对比剩下三组, CK和Fe(III)(图7(b))、CK和CK-N₂H₄(图7(c))以及CK和Fe-N₂H₄(图7(d))发现, 铁载体合成和铁载体运输基因都占据主要地位, 区别在于CK和Fe(III)、CK和CK-N₂H₄关联的氮循环基因为DNRA和ANRA, 而CK和Fe-N₂H₄关联的氮循环基因为反硝化和ANRA。以上结果再次验证了周丛生物铁载体的合成和运输与DNRA和ANRA密切相关。

3 讨论

3.1 Fe(III)影响周丛生物氮转化

我们通过有无Fe(III)对照试验初步验证了Fe(III)确实存在对周丛生物中氮周过程的影响, CK中铵态氮浓度的增加很有可能是对环境中铵态氮的富集, 而硝

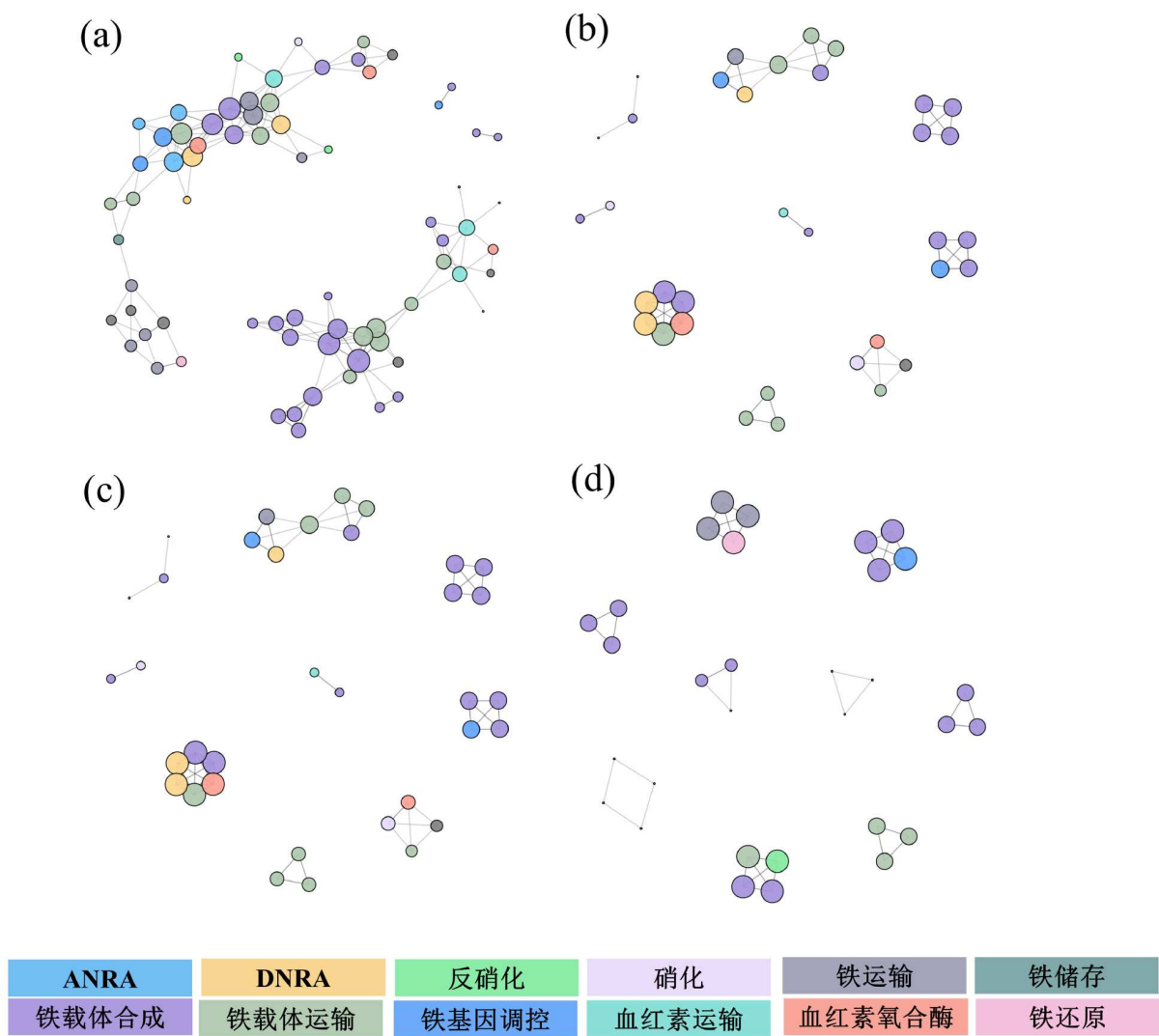


图 7 (网络版彩色)铁循环基因和氮循环基因的共现性网络分析. (a) 四组实验综合网络分析; (b) CK与Fe组的共现性网络分析; (c) CK组与CK-N₂H₄共现性网络分析; (d) CK组与Fe-N₂H₄共现性网络分析, 其中, 连接表示相关性强且显著($P<0.001$, $|r|>0.6$), 节点大小与节点度(与节点相连边的数量)成正比

Figure 7 (Color online) Co-occurrence network analysis of iron cycling genes and nitrogen cycling genes. (a) Comprehensive network analysis for the four groups of experiments; (b) the co-occurrence network analysis of CK and Fe groups; (c) analysis of co-occurrence network between CK group and CK-N₂H₄; (d) analysis of co-occurrence network between CK group and Fe-N₂H₄, the connection indicates a strong and significant correlation ($P<0.001$, $|r|>0.6$), and the node size is proportional to the node degree (the number of edges connected to the node)

态氮浓度降低则可能是自身的消耗利用速率小于产生速率; Fe(Ⅲ)添加的情况下, 硝态氮浓度降低显著且铵态氮的浓度提高显著, 表明可能不仅铵态氮的消耗过程受阻, 还有可能存在抑制硝态氮生成的过程. 因此, 本研究根据结果初步推测周丛生物中铵态氮和硝态氮浓度变化提出了四种可能, 即Fe(Ⅲ)促进周丛生物富集环境中的铵态氮; Fe(Ⅲ)促进周丛生物DNRA/ANRA过程, 即将硝态氮转化为铵态氮; Fe(Ⅲ)导致周

丛生物中氨氧化(硝态氮的产生)过程受阻; Fe(Ⅲ)促进了周丛生物的反硝化过程. XPS的结果初步表明铁确在周丛生物表面生成了铁氧化物且表面确也存在NH₄Cl, 解释了周丛生物中可提取态铁含量降低的主要原因, 同时生成的铁氧化物也有利于吸附环境中的铵态氮^[34]. 周丛生物因其独特的理化性质, 表面存在大量电荷, 能吸附环境中的各种离子, 还因其生物特性, 周丛生物中的微生物能利用环境中的氮转化为生物量,

降低了周围环境中的氮含量^[35],所以在CK组中,即使无Fe(Ⅲ)的添加,也存在 NH_4^+ -N含量升高的现象(图2)^[36],铁氧化物的存在更是促进了周丛生物对 NH_4^+ -N的吸附,有研究表明土壤中的铁氧化物可以吸附和共沉淀环境中的土壤有机碳从而促进土壤中有机碳积累^[37].

进一步验证Fe(Ⅲ)是否影响铵态氮生物合成/消耗过程,我们根据 ^{15}N 同位素示踪实验的结果可知, $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 发生了较为显著的变化.从当前已探明的土壤氮循环进程中能够生成 N_2O 的反应情况而言,主要包含不完全反硝化反应、氨氧化中间产物的分解、硝化耦合反硝化以及厌氧氨氧化等过程^[3].当下,越来越多的研究证据显示,尤其是在低氧环境条件下,氨氧化过程对 N_2O 生成的贡献或许远大于反硝化过程.另外,有相关研究明确指出,氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)是 N_2O 的主要产生者^[38].根据图4可知,CK组能产生 $^{15}\text{N}_2\text{O}$,而添加了 N_2H_4 的对照组几乎不产生 $^{15}\text{N}_2\text{O}$.根据DO变化结果来看,DO最低为3.05 mg/L,且各组DO的变化较小,推断周丛生物几乎不存在反硝化反应,所以排除了反硝化对硝态氮消耗的影响,证实氨氧化是周丛生物产生 N_2O 的主要来源. Fe(Ⅲ)的添加抑制了部分 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 的产生,表明Fe(Ⅲ)的添加很有可能是抑制了周丛生物氨氧化过程. N_2 作为反硝化反应的主要产物之一,却并未检测出,极有可能是周丛生物中 N_2O 还原酶活性(*nosZ*)被氧气抑制,进行的是不完全反硝化(即只将亚硝酸盐还原成一氧化二氮或将一氧化二氮还原成二氮气的过程)^[39].而厌氧氨氧化菌极易受到周围环境和亚硝酸盐浓度的影响,且周丛生物处于开放环境,亚硝酸盐又极易氧化为硝酸盐.因此稻田周丛生物很可能不具备厌氧氨氧化的功能,所以未能检出相应的*hzs*和*hdh*基因^[40].然而,以上实验并不能证实Fe(Ⅲ)对周丛生物中DNRA/ANRA的过程存在影响,因此本研究进一步分析了周丛生物宏基因组的结果.

3.2 铁参与调节周丛生物氮循环过程

宏基因组中微生物群落变化结果表明,Fe(Ⅲ)的加入不但改变了周丛生物的群落结构,而且影响了代谢相关的功能基因丰度(图5). *Burkholderia* spp. 和 *Pseudomonas* spp. 作为主要差异微生物菌属,其中*Burkholderia* spp. 不但能固氮且能将 NO_3^- 转化为 NO_2^- , Kim等人^[41]发现在微氧环境下群落中*Burkholderia* spp. 能表达出*nosZ*基因从而将 N_2O 转化为 N_2 ; *Pseudomonas* spp.

作为典型的反硝化菌,能将 NO_2^- 和 NO_3^- 转化为 N_2 ,更有研究发现*Pseudomonas stutzeri*菌属能在厌氧和好氧的条件下将 N_2O 同化还原为 NH_4^+ ^[42].铁是许多氧化还原酶的辅助因子,对包括细菌在内的生物生长代谢至关重要, *Pseudomonas* spp. 与其他大多数生物一样,需要铁元素才能生存,其含有的转运铁蛋白/乳铁蛋白具有转运血红素和铁的潜能,这是迄今为止已知的革兰氏阴性菌中唯一的铁分子转运系统,该系统主要由*PirA*和*PiuA*基因编码^[43,44].我们通过宏基因组的分析结果列举出了周丛生物中氮循环基因的丰度变化(图6),发现氨氧化基因丰度和*nirK*基因丰度降低是造成 N_2O 减少的主要原因.同时我们发现*nasA*基、*nirB*基因和*narG*基因丰度呈现显著增加趋势,表明周丛生物在铁的作用下极有可能将硝化反应产生的或周围环境中的 NO_3^- 先通过ANRA和反硝化的硝酸盐还原酶还原为 NO_2^- 后通过DNRA的亚硝酸盐还原酶还原为 NH_4^+ .很多有机物同时含有硝酸盐还原酶(NAR)和细胞周质硝酸还原酶(NAP),NAR发挥作用的场所主要是细胞质,它能够对硝酸盐进行还原.在这一还原进程中,NAR会促使质子穿越细胞膜,将其释放到细胞周质内.质子的这种跨膜转运形成了质子动力,而该质子动力能够直接推动能量守恒,维持细胞内的能量稳态.相反,NAP进行硝酸盐还原的位置是在细胞外,由于它的作用过程并不涉及质子的跨膜转运,所以不会产生因质子转运而形成的质子动力^[45],所以 NO_3^- 极有可能在周丛生物的细胞周质中通过各反应还原为 NH_4^+ 后被生物固定利用,与“接力反硝化”的过程类似,周丛生物中可能存在“接力DNRA/ANRA”过程^[46].

3.3 铁-氮相互作用

共现性网络分析进一步分析了铁-氮循环基因的相关性(图7).发现铁载体合成和铁载体运输基因与DNRA、ANRA和反硝化反应基因呈现出一定的关联性.初步推测是氮和铁的加入影响了周丛生物铁载体的运输和合成,因为氮、硫和氧可作为电子供体形成铁载体与Fe(Ⅲ)结合为六配位八面体配合物^[47]. Singh和Mishra^[48]发现将硝态氮作为唯一氮源时,藻青菌*Anabaena oryzae*会产生大量的铁载体,而用铵态氮或者谷氨酸作氮源时会导致铁载体产量降低.对于细菌*Pseudomonas fluorescens*来说,氨基酸的加入能产生了两种不同的结果^[49], Vindeitinho等人^[50]发现,8种氨基酸能刺激*Pseudomonas fluorescens*产生铁载体,而其他

研究却发现培养基中添加氨和L-精氨酸或L-谷氨酸、L-酪氨酸会抑制铁载体的产生,是因为L-谷氨酸、L-酪氨酸能阻断Pvds生产的生物合成途径,不同的菌属对于不同氮的形态有着不同的响应,但目前尚未有针对微生物群落整体响应的铁载体变化情况。铁载体对Fe(III)的亲合力比Fe(II)更高,当Fe(III)达到周至空间后在转运蛋白的帮助下进入细胞质,被还原为Fe(II)后从铁载体上解离,同时生成的Fe(II)又使基质中的电子供体增加,降低了NO₃⁻的电子得屏障,促进NO₃⁻向电子转移的更多途径即DNRA作用发展^[51],而同化硝酸盐还原酶位于细胞的细胞质中,这也进一步促进了ANRA的作用,这也使得即使在有机物不甚丰富的情况下,Fe(II)的存在也可以增加DNRA和ANRA细菌电子竞争的优势。正是由于铁的氧化还原性质,使得铁能作为电子受体/供体参与到微生物的氮循环中。区别于Feammox对铵态氮的去除,周丛生物中Fe很可能参与DNRA和ANRA的反应,实现铵态氮的高效累积和硝态氮的可持续转化。这一发现为稻田生态系统的氮管理提供了新视角—利用铁元素的氧化还原特性,定向

引导周丛生物中氮循环路径向“低流失、高保留”方向发展,对农业绿色生产与水体污染防控具有重要实践意义。而随着周丛生物后期的凋亡,其累积的氮又释放进入环境中,能够有效提高土壤肥力。但由于室内试验的局限性,无法对周丛生物氮累积结果进行长期监测,未来还应设立长期定位田间试验以验证结果的准确性。

4 结论

本研究从化学和生物学角度探究铁对周丛生物氮周转的影响,发现Fe(III)可促进周丛生物累积铵态氮。其中包含铁氧化物生成增强对铵态氮的吸附,周丛生物群落结构和功能基因丰度改变,抑制周丛生物的硝化和反硝化反应,加强ANRA和DNRA反应,其原因很可能是Fe(III)能够被铁载体运输至胞内形成Fe(II)作为电子供体参与硝态氮还原。该研究证实Fe(III)不仅促进周丛生物将NO₃⁻转化为NH₄⁺,而且降低了N₂O的排放,有利于减少稻田氮流失,减少氮肥施用的同时缓解温室效应。

参考文献

- 1 You L, Ros G H, Chen Y, et al. Optimized agricultural management reduces global cropland nitrogen losses to air and water. *Nat Food*, 2024, 5: 995–1004
- 2 Grzebisz W, Niewiadomska A. Nitrogen cycle in farming systems. *Agronomy*, 2024, 14: 89
- 3 Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 263–276
- 4 Yang J, Yu Q, Su W, et al. Metagenomics reveals elevated temperature causes nitrogen accumulation mainly by inhibiting nitrate reduction process in polluted water. *Sci Total Environ*, 2023, 882: 163631
- 5 Smolders A J P, Lucassen E C H E T, Bobbink R, et al. How nitrate leaching from agricultural lands provokes phosphate eutrophication in groundwater fed wetlands: the sulphur bridge. *Biogeochemistry*, 2010, 98: 1–7
- 6 Robertson E K, Roberts K L, Burdorf L D W, et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium coupled to Fe(II) oxidation in sediments of a periodically hypoxic estuary. *Limnol Oceanogr*, 2016, 61: 365–381
- 7 Wu L N, Yan Z B, Li J, et al. Research progress and application of ferric ammonia oxidation in environment system (in Chinese). *Sci Tech Eng*, 2020, 20: 14377–14384 [吴莉娜, 闫志斌, 李进, 等. 铁氨氧化在环境系统中的研究进展及其应用性探究. 科学技术与工程, 2020, 20: 14377–14384]
- 8 Ding B, Zhang H, Luo W, et al. Nitrogen loss through denitrification, anammox and Feammox in a paddy soil. *Sci Total Environ*, 2021, 773: 145601
- 9 Wang W, Ding B, Hu Y, et al. Evidence for the occurrence of Feammox coupled with nitrate-dependent Fe(II) oxidation in natural enrichment cultures. *Chemosphere*, 2022, 303: 134903
- 10 Zheng Z, Li W, Huang X, et al. Effect of trace elements and optimization of their composition for the nitrification of a heterotrophic nitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7T, at low temperature. *Ann Microbiol*, 2017, 67: 715–725
- 11 Chen H, Zhao X, Cheng Y, et al. Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic conditions. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 1404–1412
- 12 Liu H, Chen Z, Guan Y, et al. Role and application of iron in water treatment for nitrogen removal: a review. *Chemosphere*, 2018, 204: 51–62
- 13 Sahrawat K L, Narteh L T. A chemical index for predicting ammonium production in submerged rice soils. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 2003, 34: 1013–1021

- 14 Zhang Y, Scherer H W. Mechanisms of fixation and release of ammonium in paddy soils after flooding. *Biol Fertility Soils*, 2000, 31: 517–521
- 15 Louca S, Polz M F, Mazel F, et al. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nat Ecol Evol*, 2018, 2: 936–943
- 16 Sun P, Liu Y, Sun R, et al. Geographic imprint and ecological functions of the abiotic component of periphytic biofilms. *iMeta*, 2022, 1: e60
- 17 Sun P, Fan K, Jiang Y, et al. Accumulated temperature dictates the regional structural variation of prokaryotic periphyton at soil-water interface in paddy fields. *Water Res*, 2024, 265: 122259
- 18 Sun P, Silvano E, Chen Y, et al. Imbalanced intracellular nutrient stoichiometries drive the regional structural variation of microeukaryotic communities in paddy fields. *ISME Commun*, 2024, 4: ycae119
- 19 Tao J, Liu G, Xu Y, et al. Spatiotemporal patterns and mechanisms of periphytic biofilm-induced Fe accumulation in paddy fields. *ACS EST Eng*, 2025, 5: 158–166
- 20 Sun P, Gao M, Sun R, et al. Periphytic biofilms accumulate manganese, intercepting its emigration from paddy soil. *J Hazard Mater*, 2021, 411: 125172
- 21 Wu G P, Gao M N, Tang J, et al. Progress of researches on nitrogen and phosphorus removal by periphytic biofilm from non-point source wastewater (in Chinese). *J Ecol Rural Environ*, 2019, 35: 817–825 [吴国平, 高孟宁, 唐骏, 等. 自然生物膜对面源污水中氮磷去除的研究进展. *生态与农村环境学报*, 2019, 35: 817–825]
- 22 Stanford G, Smith S J. Nitrogen mineralization potentials of soils. *Soil Sci Soc Amer J*, 1972, 36: 465–472
- 23 Lindsay W L, Norvell W A. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci Soc Amer J*, 1978, 42: 421–428
- 24 Yao Z B, Cai Q, Zhang D J, et al. The enhancement of completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) by N_2H_4 addition. *Bioresource Tech*, 2013, 146: 591–596
- 25 Le Maréchal C, Fourour S, Ballan V, et al. Detection of *Clostridium botulinum* group III in environmental samples from farms by real-time PCR using four commercial DNA extraction kits. *BMC Res Notes*, 2018, 11: 441
- 26 Du J, Li M, Yuan Z, et al. A decision analysis model for KEGG pathway analysis. *BMC BioInf*, 2016, 17: 407
- 27 Ma B, Wang Y, Ye S, et al. Earth microbial co-occurrence network reveals interconnection pattern across microbiomes. *Microbiome*, 2020, 8: 82
- 28 Ilton E S, Post J E, Heaney P J, et al. XPS determination of Mn oxidation states in Mn (hydr)oxides. *Appl Surf Sci*, 2016, 366: 475–485
- 29 Ma B G, Wei X H, Meng X J, et al. Advancement in study on Burkholderia for plant disease biocontrol (in Chinese). *Agri Res Appl*, 2023, 36: 1–8 [马白鸽, 魏喜红, 孟祥佳, 等. 伯克霍尔德氏菌在植物病害生物防治中的研究进展. *农业研究与应用*, 2023, 36: 1–8]
- 30 Youard Z A, Wenner N, Reimann C. Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *BioMetals*, 2011, 24: 513–522
- 31 Cai X, Liu R, Cheng M, et al. Characterization of a novel *Pseudomonas mosselii* 9-1 capable of nitrate reduction to ammonium, ammonium assimilation, and denitrification in aerobic conditions. *J Water Process Eng*, 2023, 52: 103531
- 32 Yang Y, Pan J, Zhou Z, et al. Complex microbial nitrogen-cycling networks in three distinct anammox-inoculated wastewater treatment systems. *Water Res*, 2020, 168: 115142
- 33 Garber A I, Neelson K H, Okamoto A, et al. FeGenie: a comprehensive tool for the identification of iron genes and iron gene neighborhoods in genome and metagenome assemblies. *Front Microbiol*, 2020, 11: 37
- 34 Li D, Liu M H, Zhang R M, et al. Removal efficiency and mechanism of ammonia nitrogen in a low temperature groundwater purification process (in Chinese). *Environ Sci*, 2021, 42: 4826–4833 [李冬, 刘孟浩, 张瑞苗, 等. 低温地下水净化工艺中氨氮去除性能及机制. *环境科学*, 2021, 42: 4826–4833]
- 35 Shen Q, Ma L Y, Huang Y P, et al. Research progress about the effects of periphyton on paddy field ecosystem (in Chinese). *Northern Rice*, 2022, 52: 61–64 [申祺, 马凌云, 黄裕普, 等. 周丛生物在稻田生态系统中的作用研究进展. *北方水稻*, 2022, 52: 61–64]
- 36 Sun P, Chen Y, Liu J, et al. Periphytic biofilms function as a double-edged sword influencing nitrogen cycling in paddy fields. *Environ Microbiol*, 2022, 24: 6279–6289
- 37 Jia N, Li L, Guo H, et al. Important role of Fe oxides in global soil carbon stabilization and stocks. *Nat Commun*, 2024, 15: 10318
- 38 Zhu G, Wang X, Wang S, et al. Towards a more labor-saving way in microbial ammonium oxidation: a review on complete ammonia oxidation (comammox). *Sci Total Environ*, 2022, 829: 154590
- 39 Hallin S, Philippot L, Löffler F E, et al. Genomics and ecology of novel N_2O -reducing microorganisms. *Trends Microbiol*, 2018, 26: 43–55
- 40 Wu P, Chen J, Garlapati V K, et al. Novel insights into Anammox-based processes: a critical review. *Chem Eng J*, 2022, 444: 136534
- 41 Kim D D, Han H, Yun T, et al. Identification of *nosZ*-expressing microorganisms consuming trace N_2O in microaerobic chemostat consortia dominated by an uncultured *Burkholderiales*. *ISME J*, 2022, 16: 2087–2098
- 42 Desloover J, Roobroeck D, Heylen K, et al. Pathway of nitrous oxide consumption in isolated *Pseudomonas stutzeri* strains under anoxic and oxic conditions. *Environ Microbiol*, 2014, 16: 3143–3152
- 43 Luscher A, Moynié L, Auguste P S, et al. TonB-dependent receptor repertoire of *pseudomonas aeruginosa* for uptake of siderophore-drug conjugates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e00097-18

- 44 Reinhart A, Oglesby-Sherrouse A. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by distinct iron sources. [Genes](#), 2016, 7: 126
- 45 Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, et al. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. [J Bacteriol](#), 1999, 181: 6573–6584
- 46 Mei L J, Mao J, Yang L Z, et al. Successive denitrification by non-typical denitrifiers in soil (in Chinese). *Acta Pedol Sin*, 2004: 408–413 [梅丽娟 毛健, 杨林章, 等. 土壤中“接力反硝化”机制的部分证据. *土壤学报*, 2004, 41: 408–413]
- 47 Chen J, Guo Y, Lu Y, et al. Chemistry and biology of siderophores from marine microbes. [Mar Drugs](#), 2019, 17: 562
- 48 Singh A, Mishra A K. Influence of various levels of iron and other abiotic factors on siderophorogenesis in paddy field Cyanobacterium *Anabaena oryzae*. [Appl Biochem Biotechnol](#), 2015, 176: 372–386
- 49 Kisaalita W S, Slininger P J, Bothast R J. Defined media for optimal pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 1993, 39: 750–755
- 50 Vindeirinho J M, Soares H M V M, Soares E V. Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* through the manipulation of the culture medium composition. [Appl Biochem Biotechnol](#), 2021, 193: 607–618
- 51 Zhang X Y. Dominant factors of dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA) in activated sludge system: a comment. [AEP](#), 2018, 08: 95–105

Summary for “铁元素促进了稻田周丛生物对铵态氮的富集”

Iron promotes periphytic biofilm accumulation of ammonia nitrogen in paddy ecosystems

Jing Tao¹, Pengfei Sun^{1*} & Yonghong Wu^{1,2*}¹ Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China² Zigui Three Gorges Reservoir Ecosystem, Observation and Research Station of Ministry of Water Resources, Yichang 443605, China* Corresponding authors, E-mail: pfsun@issas.ac.cn; yhwu@issas.ac.cn

Microorganism-mediated iron redox processes that coupled tightly with nitrogen cycling are ubiquitous in soil environments, particularly in anaerobic-aerobic alternating zones such as paddy fields. As the typical microbial aggregates at the soil-water interface in paddy fields, periphytic biofilm maintains growth and metabolic activity by enriching and concentrating essential elements such as iron and nitrogen from the surroundings. However, the potential interaction between iron present in the periphytic biofilm and nitrogen turnover within these systems remains inadequately understood. This study specifically investigated how ferric iron [Fe(III)] influences nitrogen turnover in periphytic biofilm from the perspectives of abiotic and biotic.

The experimental findings revealed that Fe(III) significantly enhances the accumulation of ammonium nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) within periphytic through three primary mechanisms. First, Fe(III) generates the form of iron oxides that precipitate on periphytic biofilm surfaces, thereby offering additional physical adsorption sites capable of physically binding $\text{NH}_4^+\text{-N}$, effectively reducing $\text{NH}_4^+\text{-N}$ mobility and potential loss. Second, the presences of Fe(III) cause a shift in the microbial community structure within the periphytic biofilm. This shift selectively favors the proliferation of specific beneficial bacterial genera, such as *Burkholderia* pp. and *Pseudomonas* pp., which are known to participate in nitrogen-related metabolic pathways. Third, Fe(III) exerts a regulatory effect on functional genes involved in nitrogen transformations. Specifically, it was observed to suppress the abundance of ammonia-oxidizing functional genes (*amoA/B/C*), which are responsible for converting NH_4^+ to NO_2^- . At the same time, Fe(III) stimulates the abundance of genes such as *nirB*, involved in dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), and *nasA*, linked to assimilatory nitrate reduction to ammonium (ANRA). This dual regulatory effect effectively inhibits the oxidation and loss of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ while simultaneously promoting the biological conversion of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ back into $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Altogether, this research offers novel insights into how periphytic biofilms in paddy fields contribute to nitrogen retention and transformation. This finding provides a theoretical basis for optimizing fertilization practices and minimizing loss in flooded agricultural systems, supporting more sustainable nutrient management strategies.

nitrogen accumulation, iron redox, periphytic biofilm, amnoxidation, DNRAdoi: [10.1360/TB-2025-0180](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0180)