

碳氮比对水稻土壤硝酸盐异化还原途径功能细菌群落结构的影响

史明子, 姚怡彩, 张钰奇, 余科佳, 赵舒畅, 庞越阳, 张森, 周奕恺, 周旺, 王明道*

河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州

史明子, 姚怡彩, 张钰奇, 余科佳, 赵舒畅, 庞越阳, 张森, 周奕恺, 周旺, 王明道. 碳氮比对水稻土壤硝酸盐异化还原途径功能细菌群落结构的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(6): 2791-2809.

SHI Mingzi, YAO Yicai, ZHANG Yuqi, YU Kejia, ZHAO Shuchang, PANG Yueyang, ZHANG Sen, ZHOU Yikai, ZHOU Wang, WANG Mingdao. Effects of carbon-to-nitrogen ratio on the community structure of functional bacteria involved in dissimilatory nitrate reduction pathways in paddy soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(6): 2791-2809.

摘要: 【目的】探究碳氮比(carbon-to-nitrogen ratio, C/N)对水稻土壤硝酸盐异化还原途径的影响, 揭示微生物对反硝化作用(denitrification, DEN)与异化硝酸盐还原为铵作用(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)的调控机制, 为利用碳氮管理调控土壤氮素去向提供理论依据。【方法】开展室内模拟水稻土壤厌氧培养试验, 通过添加不同比例的 KNO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 调节土壤 C/N, 设置 2 个处理组(C/N=5:1、C/N=20:1)。通过测定 DEN 中间产物 N_2O 排放量与 DNRA 产物 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量, 初步明确 C/N 对 2 条还原途径的影响; 结合 16S rRNA 基因扩增子测序与生物信息学方法, 解析不同 C/N 下 DEN 与 DNRA 功能细菌群落结构差异。【结果】高 C/N 试验组(C/N=20:1)的 N_2O 累积排放量比低 C/N 试验组(C/N=5:1)降低 32.87%。同时, 高 C/N 促进 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 积累, C/N=20:1 试验组的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量比 C/N=5:1 试验组升高 276.61 mg/kg。此外, C/N 显著影响细菌群落结构, 高 C/N 提升了细菌群落的丰富度与多样性。同时, 高 C/N 促进了 DNRA 功能细菌(如厌氧黏细菌属、硝化螺菌属、黏球菌属)的多样性, 同时抑制了 DEN 功能细菌(如无色杆菌属、假单胞菌属)的丰度。网络分析进一步显示, 高 C/N 削弱了 DEN 功能细菌的种间互作, 降低其网络稳定性, 而有利于 DNRA 功能细菌形成更紧密、稳定的互作网络。【结论】C/N 是调控水稻土壤中 DEN 与 DNRA 竞争关系的关键环境因子。高 C/N 可显著降低 N_2O 排放, 促进 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 积累, 并重塑功能细菌的组成与种间互作模式, 抑制 DEN 功能细菌丰度, 强化 DNRA 功能细菌多样性。本研究为解析微生物驱动的土壤氮素保留机制提供了理论支撑, 也为通过碳氮调控开发

资助项目: 国家自然科学基金(42507344); 河南省高等学校重点科研项目计划(25B180009, 26B180004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42507344) and the Key Scientific Research Project of Higher Education Institutions of Henan Province (25B180009, 26B180004).

*Corresponding author. E-mail: wmdbio@126.com

Received: 2025-10-25; Accepted: 2025-12-11; Published online: 2026-01-05

新型施肥策略奠定了基础。

关键词：水稻土壤；反硝化作用；异化硝酸盐还原为铵作用；碳氮比；功能细菌

Effects of carbon-to-nitrogen ratio on the community structure of functional bacteria involved in dissimilatory nitrate reduction pathways in paddy soil

SHI Mingzi, YAO Yicai, ZHANG Yuqi, YU Kejia, ZHAO Shuchang, PANG Yueyang, ZHANG Sen, ZHOU Yikai, ZHOU Wang, WANG Mingdao*

College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of the carbon-to-nitrogen ratio (C/N) on dissimilatory nitrate reduction pathways in paddy soil and clarify the competition between microbially mediated denitrification (DEN) and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), thus providing a theoretical basis for managing nitrogen fate through C/N regulation. [Methods] An anaerobic incubation experiment was conducted with paddy soil. Soil C/N was adjusted by applying different ratios of potassium nitrate (KNO_3) and trisodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$). Two treatments C/N=5:1 and C/N=20:1 were established. The effects of C/N on nitrate reduction pathways were evaluated by measuring nitrous oxide (N_2O) emissions and ammonium nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) accumulation. The 16S rRNA gene sequencing and bioinformatic analysis were employed to analyze the bacterial community structure under different C/N, thereby revealing the underlying microbial regulatory mechanisms. [Results] The high C/N treatment (C/N=20:1) showed significantly lower cumulative N_2O release than the low C/N treatment (C/N=5:1), with the cumulative release being reduced by 32.87%. Furthermore, high C/N promoted $\text{NH}_4^+\text{-N}$ accumulation, resulting in an increase of 276.61 mg/kg in $\text{NH}_4^+\text{-N}$ accumulation compared with low C/N. Microbial analysis indicated that the C/N significantly influenced bacterial community structure, with higher C/N enhancing bacterial richness and diversity. In addition, high C/N increased the diversity of DNRA-associated bacteria (e.g., *Anaeromyxobacter*, *Nitrospira*, and *Myxococcus*), while suppressing the abundance of DEN-associated bacteria (e.g., *Achromobacter* and *Pseudomonas*). Network analysis further revealed that high C/N weakened the interspecific interactions among DEN-related bacteria, reducing the complexity and stability of their co-occurrence network, while promoting tighter and more stable interactions among DNRA-related bacteria. [Conclusion] The soil C/N was a key environmental factor governing the competition between DEN and DNRA in paddy soil. High C/N significantly reduced N_2O emissions, promoted $\text{NH}_4^+\text{-N}$ accumulation, reshaped the composition and interactions of functional bacteria (reducing the abundance of DEN-related bacteria and increasing the diversity of DNRA-related bacteria). This study provides theoretical support for understanding the microbially driven nitrogen retention

mechanisms in soil and lays a foundation for developing novel fertilization strategies through C/N regulation.

Keywords: paddy soil; denitrification; dissimilatory nitrate reduction to ammonium; carbon-to-nitrogen ratio; functional bacteria

土壤氮素流失目前已成为国内外农业可持续发展的关键瓶颈, 对其进行有效控制愈发迫切^[1-2]。在多种形态的氮素损失中硝态氮(nitrate nitrogen, NO_3^- -N)损失占比最高, 因此 NO_3^- -N 转化途径的调控对于土壤氮素的保留尤为重要。

异化硝酸盐还原是调控 NO_3^- -N 转化的关键节点, 直接决定 NO_3^- -N 在土壤中是损失还是保留, 其主要分支途径为反硝化作用(denitrification, DEN)和异化硝酸盐还原为铵作用(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)^[3]。DEN 会在微生物介导下将 NO_3^- -N 依次还原为亚硝态氮(nitrite nitrogen, NO_2^- -N)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、温室气体一氧化二氮(nitrous oxide, N_2O)及氮气(nitrogen, N_2)^[4-5]。DEN 通常可作为去除废水中富营养氮的理想工艺, 但在土壤体系中由于 DEN 将生物或工业上所固定的氮释放回大气中, 因而成为导致土壤氮损失的重要途径之一。作为异化硝酸盐还原的另一分支途径, DNRA 能够与 DEN 竞争电子受体和营养物质^[6-7]。DNRA 可将 NO_3^- -N 转化为铵态氮(ammonium nitrogen, NH_4^+ -N), 固持土壤氮素, 避免 NO_3^- -N 以 DEN 产物 N_2O 或 N_2 释放造成氮素损失^[8]。DNRA 终产物 NH_4^+ -N 可被作物从土壤中吸收利用^[9]。DNRA 与 DEN 通常在厌氧条件下进行, 稻田土壤在持续淹水条件下处于极端厌氧状态, 使 DNRA 与 DEN 过程较为活跃。因此, 异化硝酸盐还原作用中的 2 种分支途径对土壤氮素保留发挥着重要作用。

在异化硝酸盐还原分支途径中 DNRA 与 DEN 两者均以有机碳或无机碳作为碳源与电子供体, 以 NO_3^- -N 作为氮源与电子受体, 多数情况下存在此消彼长的关系^[10-12]。因此, 碳氮比(C/N)在 DNRA 与 DEN 竞争中发挥着重要作用,

并可能对稻田土壤异化硝酸盐还原分支途径的抉择具有一定的调控作用。C/N 作为一种限制性资源比值, 利用资源比值理论可以解释 DNRA 与 DEN 两者间的竞争作用, 即一个微生物类群在限制性资源 C/N 为某一值时表现为强竞争者, 而当限制性资源 C/N 改变时由于微生物的竞争能力不同, 组成群落的微生物类群也随之改变^[13-14]。有研究在实验室内培养来自海洋环境的混合菌群, 发现在 NO_3^- -N 限制的条件有利于 DNRA 过程, 而碳源供应不足时 DEN 占主导地位^[15-16]。此外, C/N 的影响在电化学系统处理 NO_3^- -N 废水的研究中也得到了证明^[17]。Jia 等^[14]通过数学建模结合生物能量学与动力学进一步证明并解释了不同有机碳与 NO_3^- -N 比率对 DNRA 与 DEN 之间竞争潜力的影响。然而, 目前在稻田土壤体系中针对 C/N 对异化硝酸盐还原分支途径抉择的影响缺乏充分证据。

DNRA 与 DEN 均由微生物介导, 大部分 DEN 微生物都属于异养细菌, 分布范围广泛, 大量出现在城市污水、泥土和堆肥环境中。自然界中最普遍的反硝化细菌属是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)等^[18]。随着对 DNRA 途径的挖掘与重视, 越来越多的菌株被证明具有将 NO_3^- -N 或 NO_2^- -N 还原成 NH_4^+ -N 的能力。研究发现在污水处理厂中 DNRA 细菌群落中硝化螺菌属(*Nitrospira*)丰度最高, 其次是厌氧黏细菌属(*Anaeromyxobacter*)和地发菌属(*Geothrix*)等^[19-20]。然而, 目前针对在错综复杂的土壤微生物群落网络关系中找到 DNRA 与 DEN 过程中目标微生物种类、丰度以及种间机制的深入研究还相对较少。因此, 探究土壤中 DNRA 与 DEN 途径的抉择因素、挖掘功能微生物、阐明微生物功能角色及其在异化

硝酸盐还原途径抉择中的作用机制是十分必要的。

本研究从微生物角度解析土壤 C/N 对水稻土壤异化硝酸盐还原途径的影响。通过向土壤中添加不同比例的柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7$)与硝酸钾(KNO_3)进行厌氧模拟培养试验,并利用 16S rRNA 基因扩增子测序揭示 C/N 对土壤细菌群落结构及 DEN 与 DNRA 功能细菌的影响,以期为促进 NO_3^- -N 向 NH_4^+ -N 转化并增强土壤氮素固持提供微生物学理论支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 水稻土壤样品采集

本研究所用水稻土采自河南省信阳市罗山县($34^{\circ}10'17''N$, $114^{\circ}23'54''E$)。该地区土壤属于罗山黄胶泥田,归为潴育水稻土亚类马肝泥田土属。此土种的母土为黄褐土,土壤剖面质地均匀,耕层质地较黏,自上而下依次为黏壤土至壤质黏土。该土壤水耕条件优良,水、肥、气、热协调配合;耕层以下土层保水保肥性能较强,潴育层氧化还原交替现象较为明显,养分含量丰富;土壤呈微酸性至中性。

在稻田淹水期,采用五点采样法采集 0–20 cm 深度的新鲜水稻土样品。样品采集后立即装入无菌塑料袋,与冰袋一同置于 $4^{\circ}C$ 低温条件下保存,并快速运输至实验室以备后续试验使用。该土壤的基本理化性质如表 1 所示。

表1 水稻土壤基本理化性质

Table 1 Basic physicochemical properties of soil

Item	Results
pH	5.28±0.00
C/N	11.25
Moisture content/%	53.55±0.10
Organic matter/%	1.93±0.08
Total nitrogen/(g/kg)	1.00±0.04
NH_4^+ -N/(mg/kg)	260.39±0.90
NO_3^- -N/(mg/kg)	50.08±0.87

1.2 不同 C/N 水稻土壤厌氧培养模拟试验

将采集的稻田土样品自然风干后过 20 目筛,称取 30 g,分别置于 42 个 100 mL 的血清瓶中,调节水土比为 1.25:1。为稳定水稻土壤环境,将装有土壤样品的血清瓶置于 $25^{\circ}C$ 淹水预培养 7 d,以开展后续不同 C/N 条件下的水稻土壤厌氧培养模拟试验。

本研究选取 KNO_3 与 $C_6H_5Na_3O_7$ 进行土壤 C/N 调节,相较于其他添加材料, KNO_3 与 $C_6H_5Na_3O_7$ 的优势主要体现在以下 3 个方面:(1) KNO_3 与 $C_6H_5Na_3O_7$ 中碳、氮元素含量明确,纯度高且用量可控,可通过精准计算确定施用量,从而降低 C/N 调节误差,确保本研究中土壤 C/N 调节的精准性;(2) KNO_3 与 $C_6H_5Na_3O_7$ 成分单一,分别提供有效氮与有机碳,无杂菌、难降解物质等额外成分,相较于秸秆、有机肥等天然材料可避免其性质复杂的问题,减少其他因素对 DEN 与 DNRA 过程的干扰;(3) KNO_3 与 $C_6H_5Na_3O_7$ 两者均为水溶性物质,施入土壤后可快速溶解,释放的碳、氮元素能被 DEN 与 DNRA 功能细菌直接利用。该特性与纯培养体系中二者作为碳氮源的应用逻辑一致,能更好地契合本研究中后续解析 DEN 与 DNRA 细菌群落特征的研究需求。

本研究以水稻初始 C/N=11.25:1 为基础,选择添加不同比例 KNO_3 与 $C_6H_5Na_3O_7$ 调节水稻土壤 C/N,共设置 2 组试验组(表 2)。每个试验组均设置 3 个试验重复。将调节 C/N 比后的水稻土壤样品在 $25^{\circ}C$ 下培养 28 d,培养过程中泥浆不受外界扰动,呈泥水静置分层状态。在培养

表2 不同水稻土壤C/N试验设置

Table 2 Experimental settings for C/N in different paddy soils

Experimental group	$C_6H_5Na_3O_7$	KNO_3	C/N
Low C/N experimental group	-	0.27 g	5:1
High C/N experimental group	1.05 g	-	20:1

第 0、1、3、7、14、21、28 天分别取样, 样品一部分保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增子测序; 另一部分风干用于土壤理化指标的测定, 每次采样消耗 6 个土壤培养瓶。

1.3 土壤基本理化指标的测定

土壤样品采集后测定其理化性质。采用烘干法测定土壤含水率(moisture content, MC)^[21-22]。采用高温外加热重铬酸钾滴定法测定土壤有机质^[21-22]。利用 pH 计测定土壤悬浊液的 pH 值^[21-22]。采用凯氏定氮法测定总氮^[21-22]。采用紫外分光光度法及纳氏试剂比色法分别测定土壤 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量^[21-22]。土壤厌氧培养过程中采用气体检测仪检测 N_2O 释放量并测定土壤 NH_4^+ -N。所有测定均设置 3 组重复以保证样品测定的准确性。

1.4 土壤 DNA 提取与 PCR 扩增

选择不同 C/N 试验组在培养第 1、7、14、28 天的水稻土壤样品进行细菌群落分析(由上海美吉生物医药科技有限公司完成), 每个时间点样品的细菌群落测定进行 3 次生物学重复。根据 FastDNA SPIN Kit (MP Bio 公司)说明书进行土壤微生物群落总基因组 DNA 抽提, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 的完整度, 使用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific 公司)测定 DNA 浓度和纯度。以上述提取的 DNA 为模板, 使用上游引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和下游引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增^[23]。PCR 反应体系(20 μL): 2 \times Pro Taq 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , DNA 模板 2 μL , 灭菌 ddH₂O 7.2 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 27 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。每个样本进行 3 个重复。将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收

PCR 产物, 并进行产物纯化。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测条带片段大小, 并用 QuantusTM Fluorometer (Promega 公司)对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit (Bioo Scientific 公司)对纯化后的 PCR 产物进行建库。

1.5 高通量测序数据分析

于 Illumina 公司的 PE300 平台进行测序。利用 fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.19.6)和 FLASH (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.11)对双端原始测序序列进行质控和拼接^[24-25]。基于 97% 的相似度, 利用 UPARSE (<http://drive5.com/uparse/>, version 11)对质控拼接后的序列进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类^[26-27]。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.13)比对 16S rRNA 基因数据库进行 OTU 物种分类与注释, 在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成^[28]。

1.6 数据统计分析

使用 Origin 2024 软件绘图, 对试验数据 N_2O 释放和 NH_4^+ -N 含量的分析结果进行可视化处理。16S rRNA 基因扩增子测序数据分析在美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)上进行。采用 mothur (<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>, version 1.30.2)计算 α 多样性指数^[29]。采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)及多重比较分析(least significant difference, LSD)进行 α 多样性的组间差异分析。基于 Bray-curtis 距离算法的非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)和相似性分析(analysis of similarities, Anosim)检验样本间细菌群落结构的相似性。利用 Origin 2024 绘制门水平群落组成的堆叠柱状图。通过 BRENDA 数据库(<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>)搜索 DEN 关键功能酶亚硝酸还原酶(NirS/NirK)与 DNRA 关键功能酶亚硝酸还原酶(NrfA)的 EC 编

号, 选择“Organisms”, 优先选择“Taxonomy”(分类学)标注到属水平的条目, 得到已报道含有 NirS/NirK 与 NrfA 酶的细菌物种, 结合文献检索, 分别以“Denitrification microbes 或反硝化细菌”与“DNRA microbes 或 DNRA 细菌”作为关键词在 Web of Science 和中国知网数据库进行检索, 将得到的细菌物种与本研究扩增子测序获得的属水平物种信息进行逐一匹配, 分别形成 DEN 与 DNRA 功能细菌属列表^[30-38]。利用 TBtools 的 Heatmap 工具分别绘制属水平 DEN 与 DNRA 功能细菌的丰度热图, 对行(细菌)数据进行 Z-score 标准化处理, 选用渐变色系(白-红)表示丰度从低到高的变化, 并对行(细菌)进行聚类, 增强可视化效果; 选择 DEN 与 DNRA 功能细菌相对丰度阈值 >0.001 的物种, 利用 IBM SPSS Statistics 27 中的 Correlate 工具分别分析 DEN 与 DNRA 物种的 Spearman 相关性, 设定相关性阈值 $|r|>0.6$ 且 $P<0.05$, 将相关性矩阵对角线数值设为 0, 消除物种相互作用中的自相关, 筛选出所有满足条件的物种对。根据有显著相关的物种对及属性, 制作边列表文件与节点属性列表文件, 借助 Cytoscape 软件构建并可视化不同处理下 DEN 物种、DNRA 物种间的共现网络图, 并使用 Cytoscape 中的 analyze network 功能及 Gephi 中的统计功能计算网络的 average number of neighbors、average path length、average clustering coefficient、modularity 等拓扑属性^[39]。

2 结果与分析

2.1 C/N 对 DEN 中间产物 N₂O 排放的影响

N₂O 是 DEN 过程的标志性中间产物, 其排放特征在一定程度上代表了 DEN 的强弱。本研究对各组反硝化过程中 N₂O 的释放及最终积累量进行了持续监测。结果显示, C/N 对 N₂O 的释放与积累产生显著影响(图 1)。从整体趋势来

看, 高 C/N 试验组 N₂O 释放量与积累量均显著低于低 C/N 试验组。高 C/N 试验组 N₂O 释放在培养第 3 天出现峰值, 为 2 638.46 mg/m³, 随后呈现快速下降的趋势。低 C/N 试验组 N₂O 释放在第 2 天出现第 1 次峰值, 为 3 667.75 mg/m³, 在培养第 7 天出现第 2 次峰值, 为 2 628.62 mg/m³, 随后下降(图 1A)。最终 N₂O 的累积释放量在高 C/N 试验组为 24 345.11 mg/m³, 相较于低 C/N 试验组(36 265.86 mg/m³)降低了 32.87% (图 1B)。上述结果表明, 高 C/N 减弱了 DEN 中间产物 N₂O 的释放与积累。

2.2 C/N 对 DNRA 产物 NH₄⁺-N 含量的影响

进一步, 测定低 C/N 试验组与高 C/N 试验组 DNRA 过程 NH₄⁺-N 含量。结果发现, C/N 升高促进土壤中 NH₄⁺-N 的积累量增加。在整个水稻土壤厌氧培养期间, 高 C/N 试验组 NH₄⁺-N 含量始终显著高于低 C/N 试验组。C/N=20:1 试验组最终 NH₄⁺-N 含量相较于 C/N=5:1 试验组升高了 276.61 mg/kg (图 2)。综合 2.1 节结果可知, 高 C/N 在降低 N₂O 释放的同时促进了 DNRA 产物 NH₄⁺-N 的保留。

2.3 不同 C/N 水稻土壤细菌 α 多样性

通过计算不同采样点的 α 多样性指数, 评估不同 C/N 试验组细菌群落的多样性。结果发现, 在整体水平上(综合所有采样时间点数据), 通过 ANOVA 方差分析和 LSD 分析, 高 C/N 试验组 Richness 指数显著高于低 C/N 试验组 ($P<0.05$) (图 3A), 表明在高 C/N 试验组观察到的物种(Observed OTUs)更多, 物种丰富度更高。Shannon 指数在高 C/N 试验组显著高于低 C/N 试验组 ($P<0.05$), 表明高 C/N 试验组中物种间个体分配的均匀性更高(图 3B)。Simpson 指数在高 C/N 组也显著高于低 C/N 组 ($P<0.05$), 说明高 C/N 试验组中细菌群落的优势物种较为突出, 少数物种占据较大比例(图 3C)。进一步按不同采样时间阶段拆分数据后发现, 在培养第 1 天,

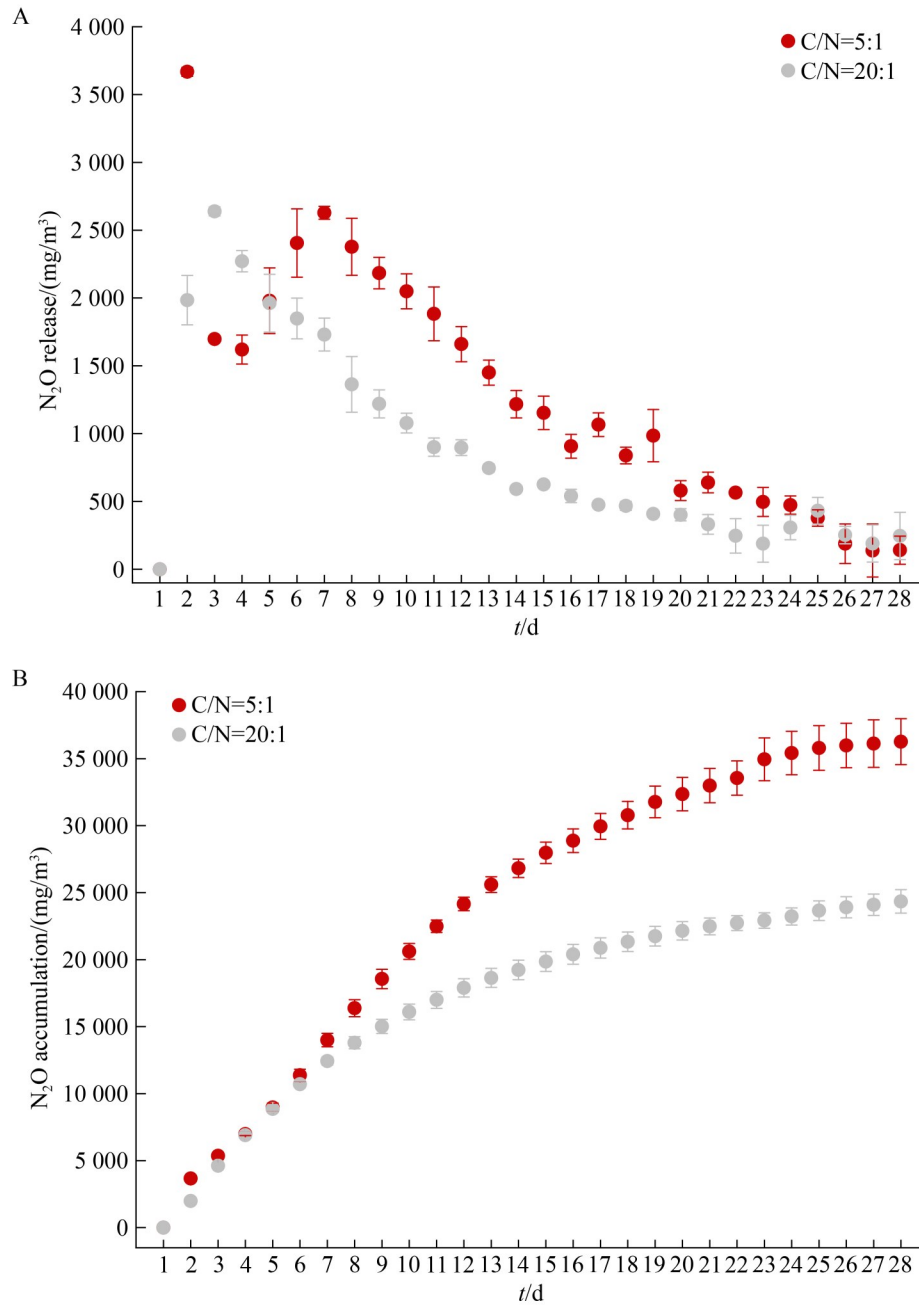


图1 不同C/N水稻土壤N₂O的排放

Figure 1 Emission of N₂O in different C/N paddy soils. A: N₂O release; B: N₂O accumulation.

低 C/N 试验组与高 C/N 试验组的 Richness 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数有显著差异 ($P < 0.05$), 但在其他时间阶段, 低 C/N 试验组与高 C/N 试验组 α 多样性指数均未达到统计学显著差异 ($P > 0.05$) (图 3D-3F)。综上所述, 高 C/N

比可提升水稻土壤细菌的物种丰富度(Richness 指数)、均匀度(Shannon 指数)及优势度(Simpson 指数), 且该提升作用主要体现在培养初期。

2.4 不同 C/N 水稻土壤细菌 β 多样性

NMDS 结果中 Stress 值为 0.098 8, 说明该

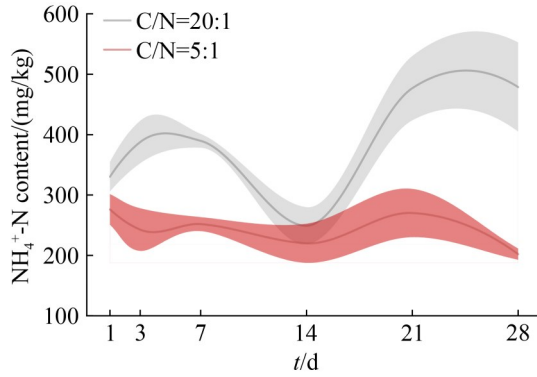


图2 不同C/N水稻土壤 NH_4^+ -N含量

Figure 2 The content of NH_4^+ -N in different paddy soils.

分析拟合效果较好(图 4A)。高 C/N 试验组与低 C/N 试验组的样本点在坐标平面上呈现明显聚类分离, 表明两组 C/N 条件下的细菌群落结构存在差异。此外, 低 C/N 试验组内各样本点分布紧密, 组间离散度低, 说明其群落结构稳定性较强, 受培养时间的扰动影响较小。与之相反, 高 C/N 试验组内样本点的空间分布较为分散, 组间离散度明显高于低 C/N 试验组, 表明其细菌群落结构受培养时间的调控作用更明显。结合 Anosim 分析结果显示(图 4B), $R>0$, $P<0.05$, 说明高 C/N 试验组与低 C/N 试验组细菌群落结构的组间差异大于组内差异, 且差异显著。上

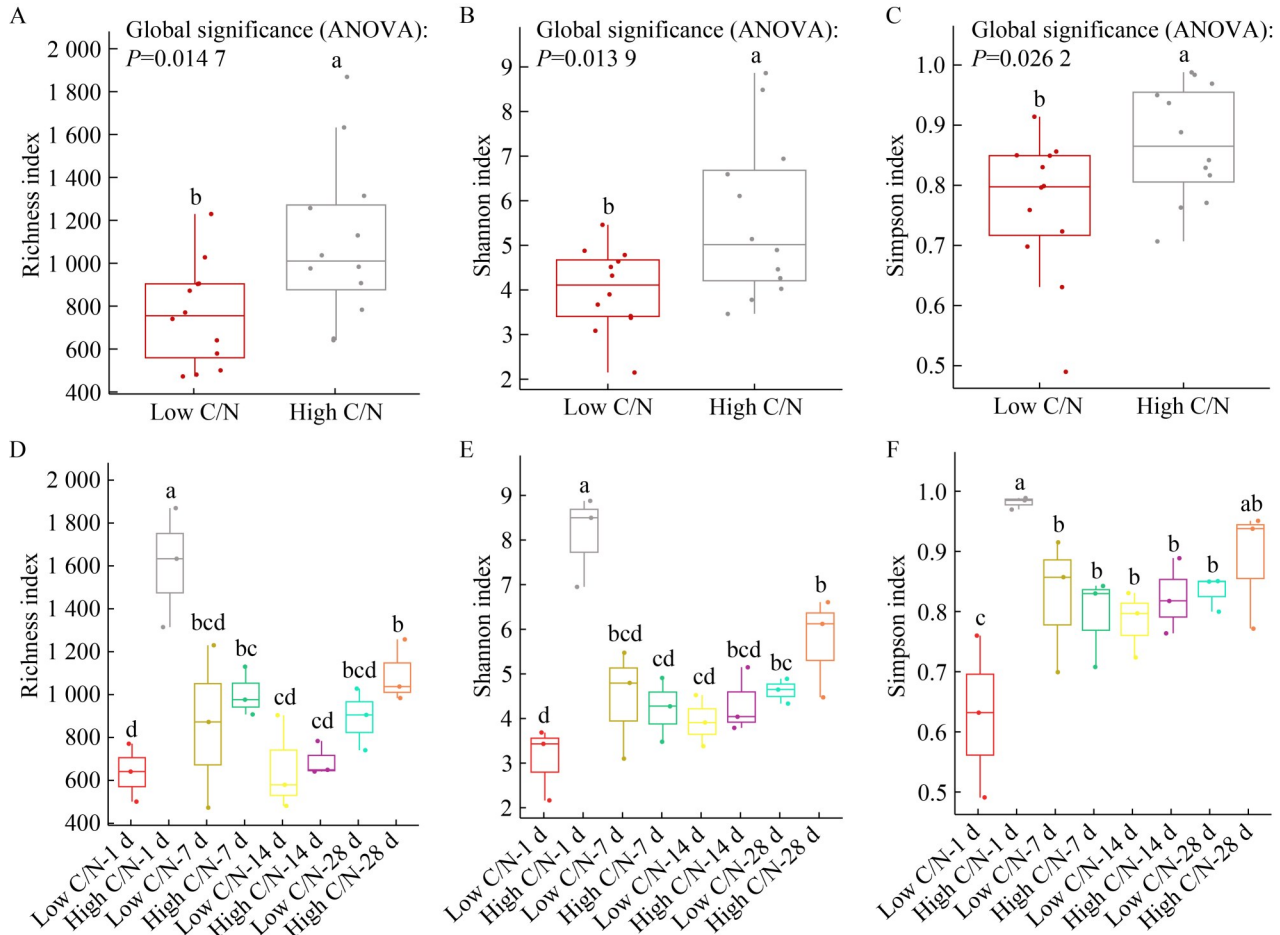


图3 不同C/N水稻土壤细菌 α 多样性指数

Figure 3 Bacterial alpha diversity index in different C/N paddy soils. A, B, and C were the overall data; D, E, and F were split data for different sampling times. Different lowercase letters indicated significant differences ($P<0.05$).

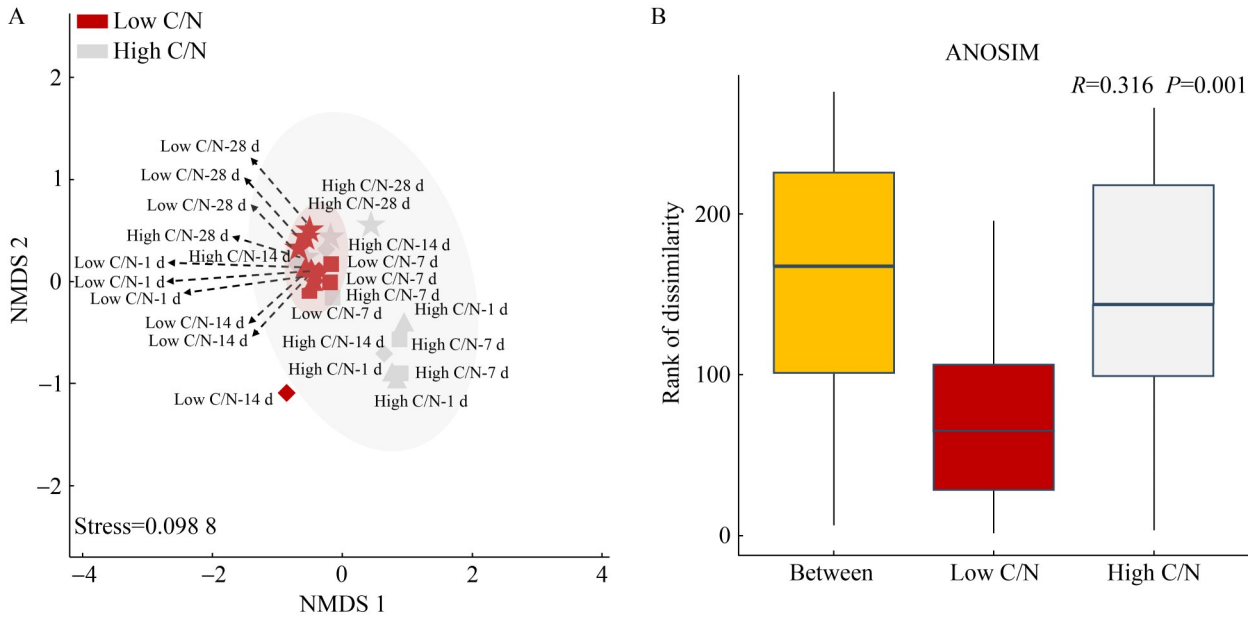


图4 不同C/N水稻土壤细菌群落结构分析

Figure 4 Analysis of bacterial community structure in paddy soil with different C/N ratios. A: NMDS analysis; B: Anosim analysis. Different points represent different paddy soil samples. Red indicated the low C/N experimental group, and gray indicated the high C/N experimental group. Circles represented the 0th day of incubation, triangles represented the 1st day of incubation, squares represented the 7th day of incubation, diamonds represented the 14th day of incubation, and pentagrams represented the 28th day of incubation. 90% confidence interval ellipse.

述结果表明，不同 C/N 对细菌群落结构的调控作用显著。

2.5 不同 C/N 水稻土壤细菌群落组成分析

不同 C/N 水稻土壤细菌群落组成结果表明，门水平优势细菌为假单胞菌门(*Pseudomonadota*) (图 5A)，其相对丰度受培养时间影响，在两处理组均在培养初期达到较高水平，分别为 81.35% 与 84.24% (图 5B)。随着培养时间的推移，*Pseudomonadota* 相对丰度在不同 C/N 试验组均呈现下降的一致趋势，在培养第 28 天时，其相对丰度在高 C/N 与低 C/N 试验组分别下降至 61.19% 与 72.59% (图 5B)。次要优势菌门为芽孢杆菌门(*Bacillota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*) 和栖热菌门(*Deinococcota*) (图 5A)。*Bacillota* 受 C/N 和培养时间的调控。在培养第 7 天，

Bacillota 相对丰度在低 C/N 试验组和高 C/N 试验组分别为 9.89% 和 13.26%，至培养第 28 天时，两组的 *Bacillota* 相对丰度均较前期提升，分别达到 17.57% (高 C/N 试验组) 与 11.27% (低 C/N 试验组) (图 5C)。上述结果表明 *Bacillota* 更偏好高 C/N 的土壤环境，且其相对丰度随培养时间推移呈上升趋势。*Bacteroidota* 在培养第 7 天时，低 C/N 试验组的相对丰度(8.69%)高于高 C/N 试验组(3.52%)；至培养第 14 天，两组的相对丰度出现反向变化，高 C/N 试验组升至 9.89%，低 C/N 试验组则降至 3.08%；培养第 28 天时，两组 *Bacteroidota* 相对丰度均较第 14 天明显提升，最终分别达到 13.61% (低 C/N 试验组) 与 17.57% (高 C/N 试验组) (图 5D)。*Deinococcota* 仅在低 C/N 中期(第 14 天)呈现显著特异性富集 ($P < 0.05$)，相对丰度为 15.44% (图 5E)。上述结

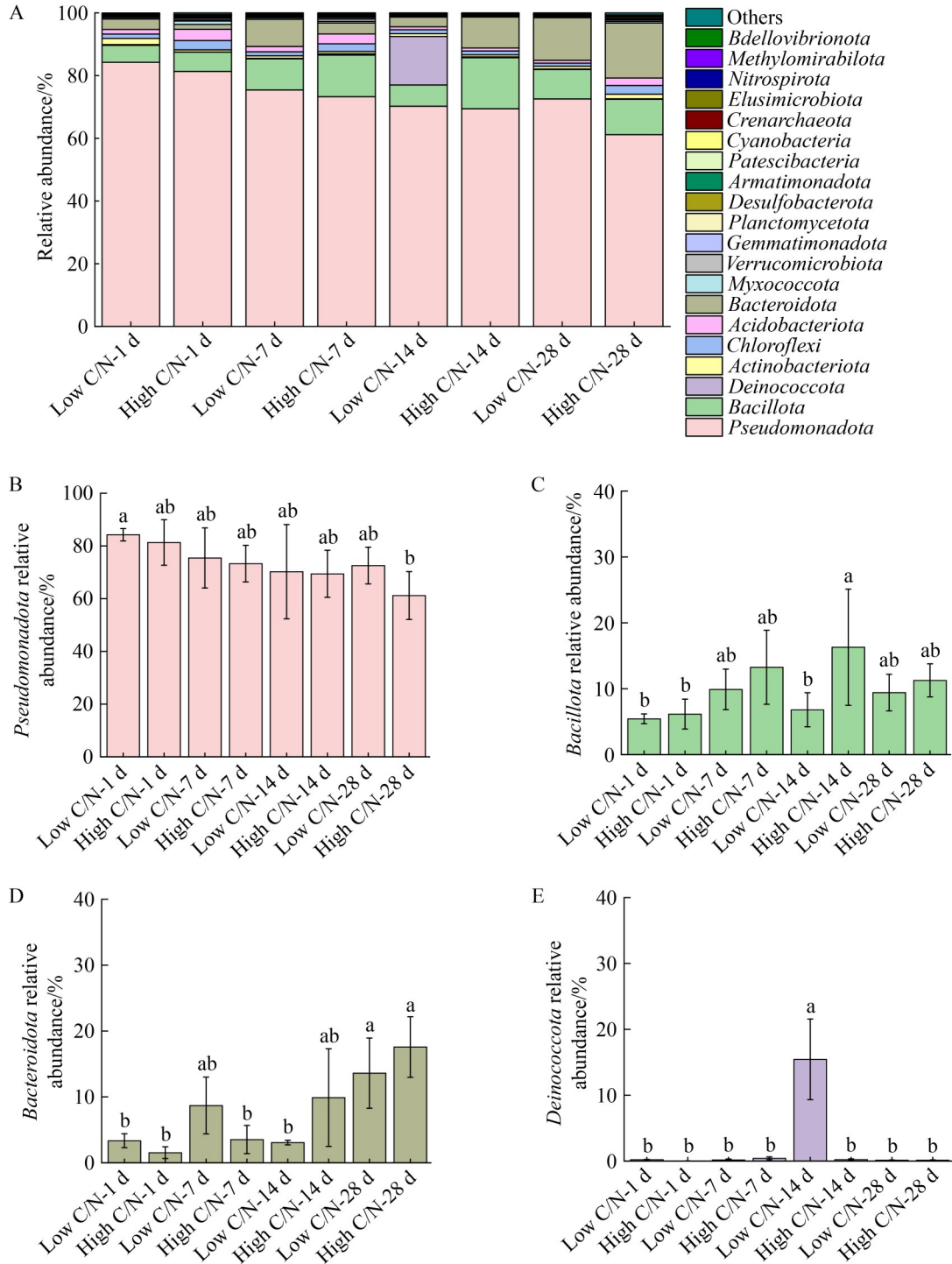


图5 不同C/N水稻土壤门水平细菌组成

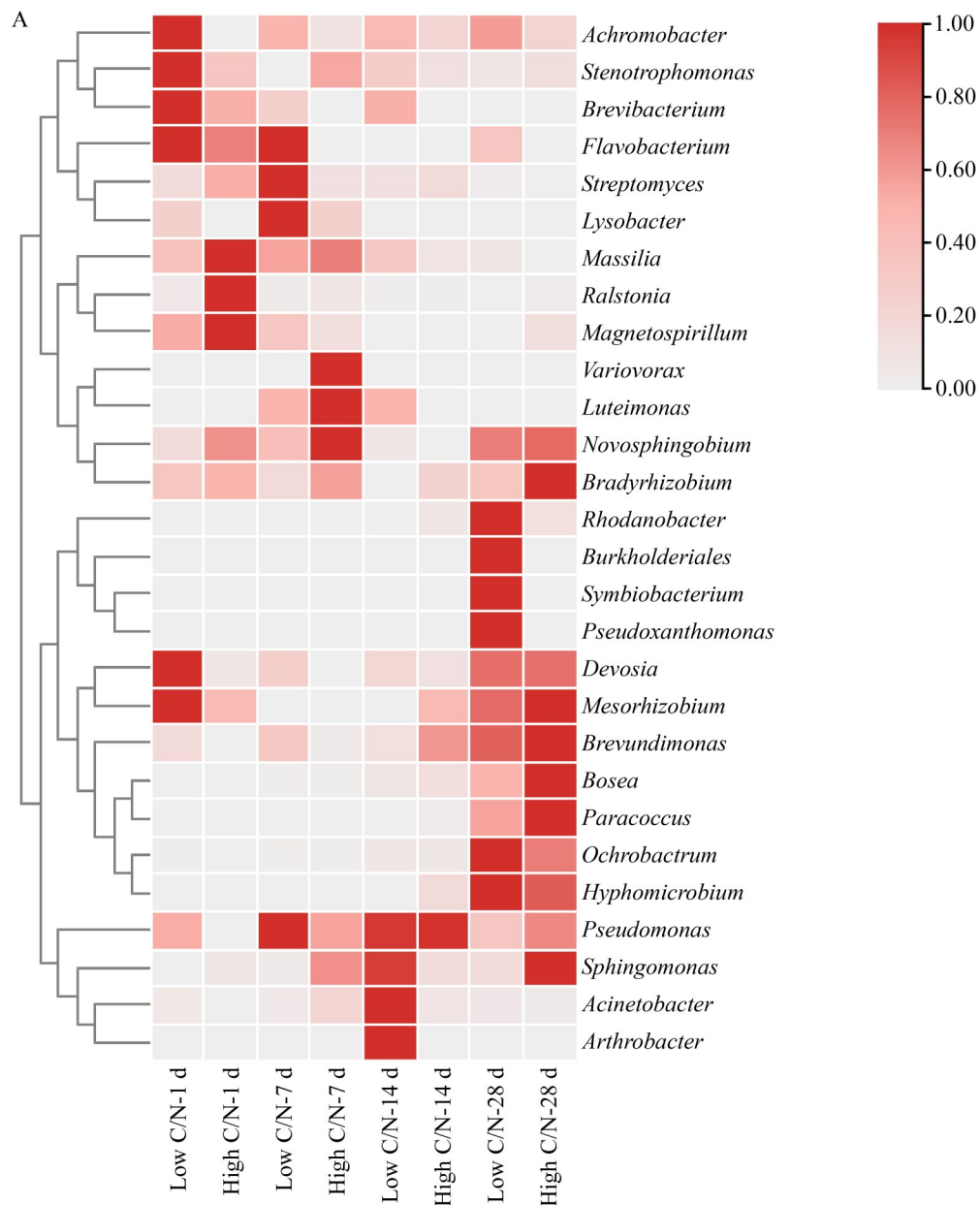
Figure 5 Bacterial community composition at the phylum level in paddy soils with different C/N. A: Stacked bar chart of the top 20 phylum level; B: Relative abundance of *Pseudomonadota*; C: Relative abundance of *Bacillota*; D: Relative abundance of *Bacteroidota*; E: Relative abundance of *Deinococcota*. Different lowercase letters indicated significant differences ($P < 0.05$).

果表明, C/N 和培养时间共同驱动了水稻土壤优势细菌群落的动态演变, 且不同门类对这 2 个因素的响应存在特异性。

2.6 不同 C/N 对 DEN 与 DNRA 功能细菌群落的影响

在属水平上, 本研究聚焦于探究不同 C/N 对 DEN 和 DNRA 功能细菌的影响。通过文献查阅与功能比对, DEN 功能细菌共匹配得到 28 个属, 相比之下, DNRA 功能细菌种类较少, 共

匹配得到 19 个属(图 6)。DEN 功能细菌群落的组成与丰度受 C/N 显著调控, 其主要类群来源于 *Pseudomonadota*。整体来看, 低 C/N 试验组的总 DEN 功能细菌相对丰度在整个培养周期内均高于高 C/N 试验组。具体而言, 在水稻土壤培养的第 1、7、14、28 天, 低 C/N 试验组的总 DEN 功能细菌相对丰度依次为 33.12%、23.97%、27.75%、23.17%; 而高 C/N 试验组同期的总丰度则更低, 分别为 6.02%、12.14%、17.50%、



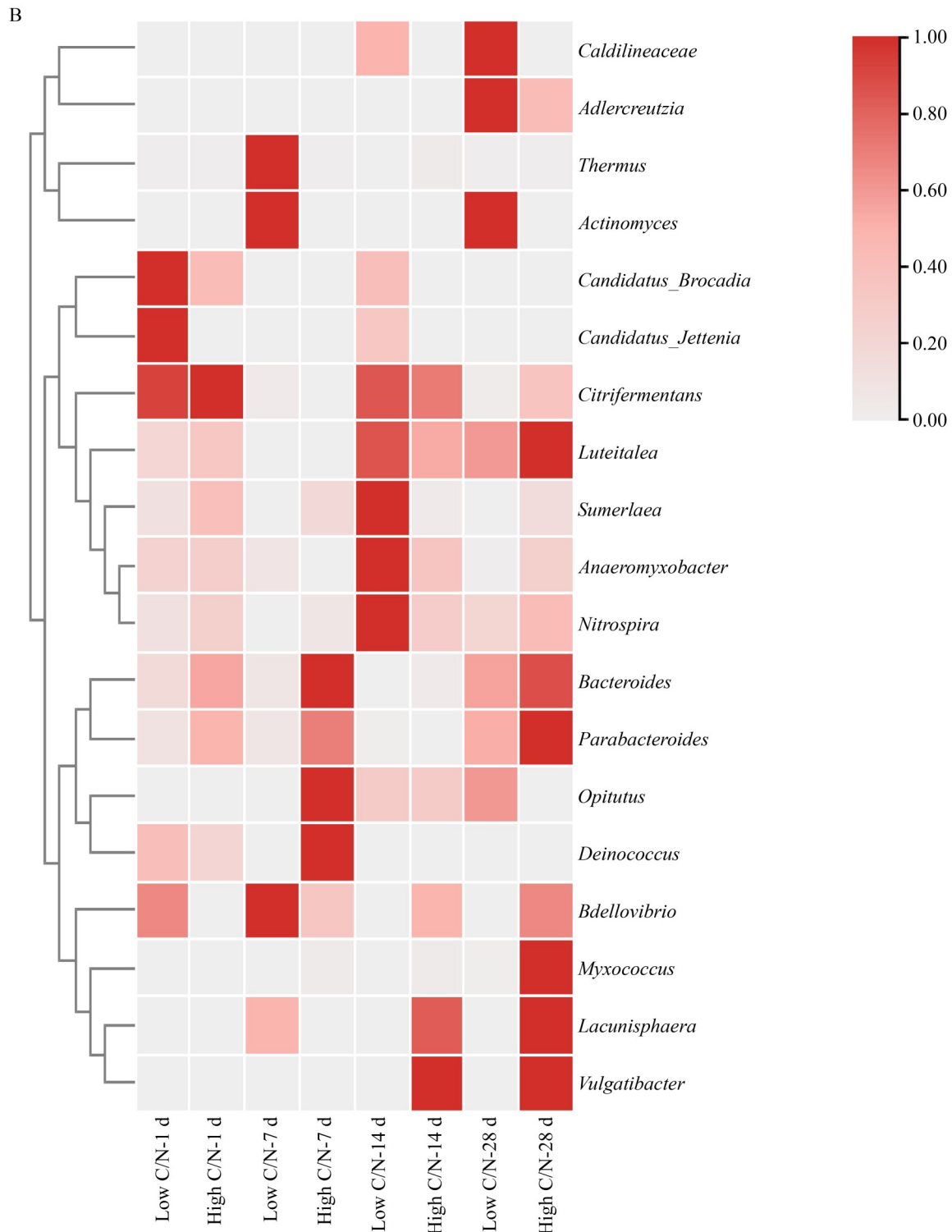


图6 不同C/N水稻土壤属水平细菌丰度热图

Figure 6 Heatmap of the abundance of bacteria at the genus level in paddy soils with different C/N. A: DEN functional bacteria; B: DNRA functional bacteria.

16.83%。在 DEN 功能细菌群落中无色杆菌属 (*Achromobacter*) 为核心优势物种, 且其丰度受 C/N 显著影响。在水稻土壤培养的第 1、7、14、28 天, 低 C/N 试验组的 *Achromobacter* 相对丰度依次为 26.06%、13.62%、12.60%、15.60%; 而高 C/N 试验组同期的该菌属丰度显著更低, 分别仅为 1.86%、3.94%、6.90%、7.27%。假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 是 DEN 功能细菌中的第二优势物种。培养周期内, 低 C/N 试验组的 *Pseudomonas* 相对丰度依次为 5.97%、9.40%、9.15%、4.64%; 高 C/N 试验组同期的该菌属丰度则分别为 2.21%、6.26%、9.31%、6.92%。此外, 寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 及黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等类群在低 C/N 试验组中的相对丰度也整体高于高 C/N 试验组, 成为该组 DEN 功能细菌群落中占据一定优势的辅助类群 (图 6A)。此外, C/N 对 DNRA 功能细菌群落组成的调控与 DEN 功能细菌群落相反, 高 C/N 试验组的 DNRA 功能细菌相对丰度与群落多样性均高于低 C/N 试验组 (图 6B)。从物种组成来看, 高 C/N 试验组的 DNRA 功能细菌呈现出明显的类群特异性。其中, 暖绳菌科 (*Caldilineaceae*) 与放线菌神经菌 (*Adlercreutzia*) 是该组特有的 DNRA 功能细菌, 在低 C/N 试验组中未检测到其存在。此外, 厌氧黏细菌属 (*Anaeromyxobacter*)、硝化螺菌属 (*Nitrospira*)、黏球菌属 (*Myxococcus*) 等在高 C/N 试验组中丰度较高, 共同构成了该

组的优势 DNRA 功能物种。

综上所述, C/N 调控了 DEN 与 DNRA 功能细菌群落, 高 C/N 促进了 DNRA 功能细菌丰度与多样性, 同时削弱了 DEN 功能细菌丰度与多样性。因此, 水稻土壤中的 C/N 可通过对这两类功能细菌群落的选择性调控, 进而影响土壤 DEN 与 DNRA 的氮素转化途径。

2.7 DEN 与 DNRA 功能细菌网络分析

细菌网络分析结果发现, DEN 与 DNRA 功能细菌的种间关系大多呈现正相关, 表明功能细菌种间关系多为“合作”关系, 且所有网络均呈现出“小世界”特性, 其特征为极高的 average clustering coefficient 和极短的 average path length (表 3)。此外, 不同 C/N 会影响 DEN 与 DNRA 功能细菌的网络结构特征。低 C/N 试验组中 DEN 功能细菌间的网络模型包含 21 个节点与 45 条边, 节点的 average number of neighbors 为 7.20 (图 7A, 表 3)。高 C/N 试验组的 DEN 功能细菌网络结构仅由 17 个节点与 24 条边构成, average number of neighbors 降至 3.60 (图 7B, 表 3)。反之, 在低 C/N 试验组中 DNRA 功能细菌间的网络关系更简单, 网络模型包含 12 个节点与 8 条边, average number of neighbors 为 1.33 (图 7C, 表 3)。高 C/N 试验组的 DNRA 功能细菌网络由 12 个节点与 13 条边构成, average number of neighbors 升至 3.20 (图 7D, 表 3)。上述结果表明, 高 C/N 会减少 DEN 功能细菌间的种间相互作用, 降低网络结构的稳定

表3 DEN与DNRA功能细菌共现网络拓扑参数

Table 3 Topological parameters of the co-occurrence network of DEN and DNRA functional bacteria

Networks	Number of nodes	Number of edges	Average number of neighbors	Average path length	Average clustering coefficient	Modularity	“Small world”
DEN functional bacteria under low C/N	21	45	7.200	1.214	0.922	0.347	Yes
DEN functional bacteria under high C/N	17	24	3.600	1.040	0.962	0.667	Yes
DNRA functional bacteria under low C/N	12	8	1.333	1.111	0.750	0.750	Yes
DNRA functional bacteria under high C/N	12	13	3.200	1.133	0.917	0.556	Yes

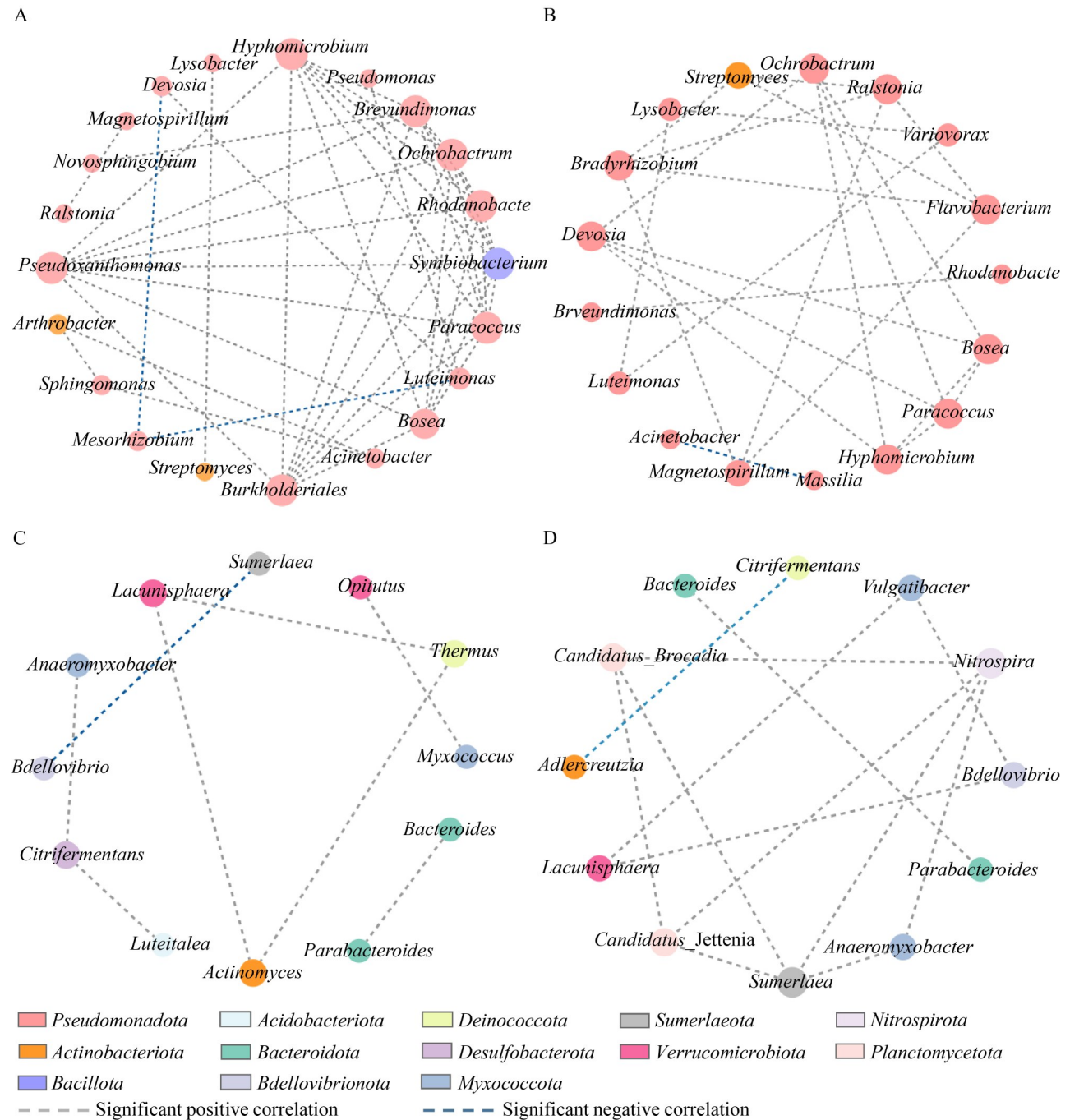


图7 细菌共现网络分析

Figure 7 Networks analysis of bacteria. A: Co-occurrence network of DEN functional bacteria under low C/N; B: Co-occurrence network of DEN functional bacteria under high C/N; C: Co-occurrence network of DNRA functional bacteria under low C/N; D: Co-occurrence network of DNRA functional bacteria under high C/N. In the network diagram, the node size was defined by the value of the genus-level connectivity centrality. The node color was used to distinguish the phylum level classification of species. The edge color indicated the type of interspecific interactions.

性, 而更有利于维持 DNRA 功能细菌间的相互作用关系, 形成更稳定的网络结构。

本研究发现, 低 C/N 试验组与高 C/N 试验组 DEN 功能细菌网络分析中的关键物种及度中心性 (degree) 值发生变化。在低 C/N 试验组中短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、副球菌属 (*Paracoccus*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)、红游动菌属 (*Rhodanobacter*)、生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*)、共生杆菌属 (*Symbiobacterium*)、假黄单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas*)、伯克霍尔德里氏菌目 (*Burkholderiales*) 的 degree 值均为 8, 是该网络模型中 degree 值最高的类群, 也是维持该网络结构的核心关键物种 (图 7A)。在高 C/N 试验组的 DEN 功能细菌网络关系中关键物种的 degree 值降低, 物种最高 degree 值仅为 4, 包括德沃斯氏菌属 (*Devosia*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*) 及博斯氏菌属 (*Bosea*)、短杆菌属 (*Brevibacterium*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、青枯菌属 (*Ralstonia*)、生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*)、副球菌属 (*Paracoccus*), 这些类群共同构成了高 C/N 环境下 DEN 功能细菌网络的核心节点 (图 7B)。然而, DNRA 功能细菌网络中关键物种在低 C/N 试验组与高 C/N 试验组中呈现的规律与 DEN 功能细菌相反。DNRA 功能细菌网络中关键物种的 degree 值在高 C/N 试验组更高。在高 C/N 试验组的 DNRA 功能细菌网络模型中最高 degree 值提升至 4, 达到该数值的物种为硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 与 *Sumerlaea*, 这 2 个类群是高 C/N 环境下维持 DNRA 功能细菌网络结构的核心节点 (图 7D)。在低 C/N 试验组的 DNRA 功能细菌网络模型中关键物种的最高 degree 值仅为 2, 网络核心节点的连接能力较弱 (图 7C)。上述结果表明, C/N 可以通过改变 DEN 与 DNRA 核心物种的 degree 值进而影响两类网络的连接强度与核心节点功能。

3 讨论与结论

3.1 C/N 定向调控水稻土壤 DEN 与 DNRA 途径

本研究初步明确在水稻土壤的复杂环境中 C/N 能够影响 DNRA 与 DEN 途径功能细菌群落结构。这一结果与 van den Berg 等^[15-16]在实验室纯培养 DNRA 与 DEN 功能微生物的研究中发现的 C/N 影响 DEN 与 DNRA 竞争的结论一致。Van den Berg 等^[15-16]研究表明 C/N 控制着微生物的代谢能力, DEN 与 DNRA 这 2 种功能微生物对 NO_3^- -N 的底物亲和力不同, DNRA 功能微生物对 NO_3^- -N 吸收的底物亲和力常数明显低于 DEN 功能微生物, 因此 DNRA 功能微生物对 NO_3^- -N 具有更高的亲和力, 在 C/N 高的条件下, DNRA 占据优势。本研究聚焦复杂的水稻土壤体系, 发现高 C/N 会改变 DEN 与 DNRA 细菌群落结构, 并削弱 DEN 功能菌群多样性与丰度, 导致 N_2O 释放降低, 同时更利于 DNRA 功能细菌占据生态位, 促进土壤 NH_4^+ -N 的保留。值得注意的是, 本研究虽基于模拟水稻土壤厌氧培养开展试验, 并明确了高 C/N 对促进 DEN 向 DNRA 转化的积极作用, 但在实际田间环境中由于土壤本身具有一定的 C/N, 土壤微生物在合成含氮细胞物质时需摄取适量氮素以维持代谢平衡。若为调控氮转化途径而过度提高 C/N 可能破坏土壤原有养分循环稳态, 进而影响水稻正常生长。因此, 在实际田间应用碳氮施肥调控土壤 C/N 时应结合水稻各生长阶段的养分需求规律及田间肥料施用策略, 调节幅度需控制在合理范围内。此外, 本研究主要从微生物角度探究 DEN 与 DNRA 功能, 在未来研究中应利用同位素技术明确 DEN 与 DNRA 速率, 为验证本研究结论、揭示氮循环关键过程提供直接证据。同时, 本研究为排除氮源种类及性质的复杂性对 DEN 与 DNRA 竞争的影响, 选择纯氮化合物 KNO_3 与纯碳化合物 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 进行试验, 但 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 价格昂贵, 未来可通过秸秆

还田、有机肥料施用等措施优化土壤 C/N，从而强化 DNRA 途径，实现土壤氮素高效利用。

3.2 C/N 重塑土壤细菌群落结构与多样性

高通量测序分析结果表明，C/N 重塑水稻土壤细菌群落结构与多样性。细菌 α 多样性结果发现，在整体数据维度及培养初期(1 d)，高 C/N 试验组水稻土壤物种丰富度(Richness 指数)、均匀度(Shannon 指数)及优势度(Simpson 指数)明显升高。杨胜香等^[40]研究发现，添加碳氮磷源改良剂同样可显著提升土壤细菌群落的 Chao1 指数与 ACE 指数。Tang 等^[41]的研究也指出，土壤碳、氮含量是驱动细菌群落变化的关键因素。本研究细菌 β 多样性分析结果显示，不同 C/N 条件下的细菌群落结构存在显著差异。同时，高 C/N 下的细菌群落对培养时间更为敏感。孙凯旋等^[42]的研究也发现，在实验室培养体系添加海洋来源的浓缩溶解有机质后，细菌群落组成发生明显改变，且细菌群落结构同样随培养时间发生演替。此外，本研究门水平的细菌群落组成结果揭示 *Pseudomonadota* 是水稻土壤核心优势菌门，这一结果与多数水稻根际土壤细菌群落组成分析结果一致。王晨龙等^[43]从 4 个不同区域采集水稻根际土壤样本，发现样本中细菌的优势菌门均为 *Pseudomonadota*。在本研究中，*Pseudomonadota* 在水稻土壤培养初期呈现高丰度，而随培养时间推移其丰度逐渐下降，可能是由于培养过程中碳源的持续消耗及其他微生物类群的竞争导致的。*Bacillota* 是本研究中细菌群落组成的次要优势菌门，其在高 C/N 环境下丰度提升，可能与其较强的碳水化合物降解能力相关。*Deinococcota* 仅在低 C/N 实验组中期有特异性富集，表明其可能依赖特定阶段的代谢产物生存。综上所述，C/N 通过对土壤细菌群落的多样性、结构及类群组成进行重塑，改变了细菌群落整体特征与功能潜力，这为

后续解析 C/N 调控 DEN 与 DNRA 途径提供了微生物学基础。

3.3 DEN 与 DNRA 功能菌群对 C/N 的响应机制

功能菌群是响应 C/N 调控 DEN 与 DNRA 的生物驱动因子。本研究解析发现，在低 C/N 环境下，*Achromobacter*、*Pseudomonas* 等 DEN 功能细菌呈现较高丰度。*Pseudomonas* 是典型的 DEN 菌^[44]。研究表明 *Pseudomonas* 富集可通过激活硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶等关键酶的表达强化 DEN^[45]。这一机制为本研究中低 C/N 环境下 DEN 过程产物 N_2O 释放量显著偏高的现象提供了生物学解释。高 C/N 下，*Caldilineaceae*、*Adlercreutzia*、*Anaeromyxobacter*、*Nitrospira* 和 *Myxococcus* 等 DNRA 功能细菌在本研究中呈现特异性富集，表明这些功能细菌对高 C/N 环境具有更强的适应性，进而推动氮素向铵态氮转化。DEN 功能细菌和 DNRA 功能细菌网络分析显示，物种之间普遍存在正相关关系，这表明 DEN 功能细菌之间及 DNRA 功能细菌内部均倾向于通过协同作用实现代谢功能。结果显示，在低 C/N 下 DEN 功能细菌网络相互作用关系更丰富，通过 *Brevundimonas*、*Paracoccus*、*Ochrobactrum*、*Hyphomicrobium* 等核心物种间的紧密协作增强了 DEN 代谢的稳定性。高 C/N 试验组的 DEN 功能细菌网络核心物种连接能力显著减弱，且核心类群虽包含与低 C/N 试验组相同的物种(如 *Hyphomicrobium*、*Paracoccus*)，但其 degree 值降低，说明高 C/N 环境导致 DEN 细菌网络的核心节点功能被削弱。反之，相较于低 C/N 试验组，高 C/N 试验组中 DNRA 功能细菌网络被稳定化，核心物种节点(如 *Nitrospira*)间的紧密协作增强了高 C/N 环境下 DNRA 代谢的稳定性。综上所述，本研究通过 16S rRNA 基因扩增子测序及生物信息学分析初步揭示了 DEN 与 DNRA

功能细菌菌群对 C/N 的响应；为深化这一发现，未来研究应分离、培养优势 DEN 与 DNRA 功能细菌，验证其氮转化功能，从而深入解析核心微生物驱动土壤氮素保留的机制，并为环境氮素管理提供优质的菌种资源。

作者贡献声明

史明子：研究构思与设计，论文撰写与修改，基金获取；姚怡彩：实验操作与数据分析；张钰奇：实验操作；余科佳：数据收集处理；赵舒畅：数据分析；庞越阳、张森：协助实验操作；周奕恺、周旺：执行调研；王明道：研究构思与设计，指导文章撰写与修改，基金获取。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Yin YL, Zhao RF, Yang Y, Meng QF, Ying H, Cassman KG, Cong WF, Tian XS, He K, Wang YC, Cui ZL, Chen XP, Zhang FS. A steady-state N balance approach for sustainable smallholder farming[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(39): e2106576118.
- [2] Gu BJ, Zhang XM, Lam SK, Yu YL, van Grinsven HJM, Zhang SH, Wang XX, Bodirsky BL, Wang ST, Duan JK, Ren CC, Bouwman L, de Vries W, Xu JM, Sutton MA, Chen DL. Cost-effective mitigation of nitrogen pollution from global croplands[J]. Nature, 2023, 613(7942): 77-84.
- [3] Sparacino-Watkins C, Stolz JF, Basu P. Nitrate and periplasmic nitrate reductases[J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(2): 676-706.
- [4] Woehle C, Roy AS, Glock N, Michels J, Wein T, Weissenbach J, Romero D, Hiebenthal C, Gorb SN, Schönfeld J, Dagan T. Denitrification in foraminifera has an ancient origin and is complemented by associated bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(25): e2200198119.
- [5] Mulholland PJ, Helton AM, Poole GC, Hall RO, Hamilton SK, Peterson BJ, Tank JL, Ashkenas LR, Cooper LW, Dahm CN, Dodds WK, Findlay SEG, Gregory SV, Grimm NB, Johnson SL, McDowell WH, Meyer JL, Valett HM, Webster JR, Arango CP, et al. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading[J]. Nature, 2008, 452(7184): 202-205.
- [6] Cheng Y, Elrys AS, Merwad AM, Zhang HM, Chen ZX, Zhang JB, Cai ZC, Müller C. Global patterns and drivers of soil dissimilatory nitrate reduction to ammonium[J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(6): 3791-3800.
- [7] Chutivisut P, Pungrasmi W, Powtongsook S. Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) activities in freshwater sludge and biofloc from Nile tilapia aquaculture systems[J]. Journal of Water and Environment Technology, 2014, 12(4): 347-356.
- [8] Wei ZJ, Senbayram M, Zhao X, Li CL, Jin K, Wu M, Rahman MM, Shan J, Yan XY. Biochar amendment alters the partitioning of nitrate reduction by significantly enhancing DNRA in a paddy field[J]. Biochar, 2022, 4: 44.
- [9] Xu GH, Fan XR, Miller AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 153-182.
- [10] 张新艳, 彭党聪, 万琼, 鞠凯, 王娜, 张岩. 活性污泥中硝酸盐异化还原成铵(DNRA)过程及其影响因素[J]. 环境保护前沿, 2018, 8(2): 95-105.
- [11] Zhang XY, Peng DC, Wan Q, Ju K, Wang N, Zhang Y. Dominant factors of dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA) in activated sludge system: a comment[J]. Advances in Environmental Protection, 2018, 8(2): 95-105 (in Chinese).
- [12] Koop-Jakobsen K, Giblin AE. The effect of increased nitrate loading on nitrate reduction *via* denitrification and DNRA in salt marsh sediments[J]. Limnology and Oceanography, 2010, 55(2): 789-802.
- [13] Kraft B, Tegetmeyer HE, Sharma R, Klotz MG, Ferdelman TG, Hettich RL, Geelhoed JS, Strous M. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration[J]. Science, 2014, 345(6197): 676-679.
- [14] Wang WG, Wang T, Liu QH, Wang H, Xue H, Zhang ZR, Wang YY. Biochar-mediated DNRA pathway of anammox bacteria under varying COD/N ratios[J]. Water Research, 2022, 212: 118100.
- [15] Jia MS, Winkler MKH, Volcke EIP. Elucidating the competition between heterotrophic denitrification and DNRA using the resource-ratio theory[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(21): 13953-13962.
- [16] Van den Berg EM, van Dongen U, Abbas B, van Loosdrecht MCM. Enrichment of DNRA bacteria in a continuous culture[J]. The ISME Journal, 2015, 9(10): 2153-2161.
- [17] Van den Berg EM, Boleij M, Kuenen JG, Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM. DNRA and denitrification coexist over a broad range of acetate/N-NO₃⁻ ratios, in a chemostat enrichment culture[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1842.
- [18] Wan YX, Huang ZL, Zhou LA, Li T, Liao CM, Yan XJ, Li N, Wang X. Bioelectrochemical ammoniation coupled

- with microbial electrolysis for nitrogen recovery from nitrate in wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(5): 3002-3011.
- [18] Lycus P, Lovise Bøthun K, Bergaust L, Peele Shapleigh J, Reier Bakken L, Frostegård Å. Phenotypic and genotypic richness of denitrifiers revealed by a novel isolation strategy[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(10): 2219-2232.
- [19] Wang SY, Liu CL, Wang XX, Yuan DD, Zhu GB. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in traditional municipal wastewater treatment plants in China: widespread but low contribution[J]. *Water Research*, 2020, 179: 115877.
- [20] Shi MZ, Zhao Y, Zhang A, Zhao MY, Zhai WH, Wei ZM, Song YY, Tang XF, He PP. Factoring distinct materials and nitrogen-related microbes into assessments of nitrogen pollution risks during composting[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124896.
- [21] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.
- [22] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 38-47.
- [23] Liu CS, Zhao DF, Ma WJ, Guo YD, Wang AJ, Wang QL, Lee DJ. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp.[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(3): 1421-1426.
- [24] Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [25] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [26] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [27] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(4): 846-849.
- [28] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [29] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [30] 成利军. 牛粪静态好氧堆肥中反硝化细菌群落结构的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
Cheng LJ. Community structure of denitrifying bacteria in static aerobic composting of dairy manure[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [31] 殷亚楠. 铜对畜禽粪便堆肥过程中微生物群落及抗性基因影响机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
Yin YN. Effect and mechanism of copper on microbial communities and resistance genes during aerobic composting of animal manure[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).
- [32] 杨雪琴, 连英丽, 颜庆云, 贺志理. 滨海湿地生态系统微生物驱动的氮循环研究进展[J]. *微生物学报*, 2018, 58(4): 633-648.
Yang XQ, Lian YL, Yan QY, He ZL. Microbially-driven nitrogen cycling in coastal ecosystems[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(4): 633-648 (in Chinese).
- [33] Xu MY, He ZL, Zhang Q, Liu J, Guo J, Sun GP, Zhou JZ. Responses of aromatic-degrading microbial communities to elevated nitrate in sediments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(20): 12422-12431.
- [34] Wang M, Wu J, Zhou T, Liang Y, Zheng LX, Sun YX. Effects of copper and florfenicol on nirS- and nirK-type denitrifier communities and related antibiotic resistance in vegetable soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213: 112011.
- [35] Bu CN, Wang Y, Ge CH, Ahmad HA, Gao BY, Ni SQ. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in the Yellow River Estuary: rates, abundance, and community diversity[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6830.
- [36] 皮艳霞, 左金龙, 李俊生, 冯晓娟, 王晓侠, 祝贵兵. 典型湿地沉积物中硝酸盐异化还原成铵的细菌群落结构的研究[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(6): 1816-1824.
Pi YX, Zuo JL, Li JS, Feng XJ, Wang XX, Zhu GB. Community composition of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) bacteria in wetland sediments[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(6): 1816-1824 (in Chinese).
- [37] Wang SY, Pi YX, Song YP, Jiang YY, Zhou LG, Liu WY, Zhu GB. Hotspot of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) process in freshwater sediments of riparian zones[J]. *Water Research*, 2020, 173: 115539.
- [38] Zhou LJ, Zhao BK, Lin YZ, Shao ZY, Zeng RJ, Shen YC, Zhang WY, Jian YX, Zhuang WQ. Identification of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) and denitrification in the dynamic cake layer of a full-scale anoxic dynamic membrane bioreactor for treating hotel laundry wastewater[J]. *Chemosphere*, 2022, 307: 136078.
- [39] Barberán A, Bates ST, Casamayor EO, Fierer N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 343-351.
- [40] 杨胜香, 李凤梅, 彭禧柱, 曹建兵, 高智席. 不同碳氮磷源改良剂对铅锌尾矿废弃地土壤微生物群落结构的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2019, 38(6): 1256-1264.
Yang SX, Li FM, Peng XZ, Cao JB, Gao ZX. Effects of amendments with different C/N/P ratios on the microbial community structure in Pb-Zn mine tailings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(6): 1256-1264 (in Chinese).

- [41] Tang S, Ma QX, Marsden KA, Chadwick DR, Luo Y, Kuzyakov Y, Wu LH, Jones DL. Microbial community succession in soil is mainly driven by carbon and nitrogen contents rather than phosphorus and sulphur contents[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2023, 180: 109019.
- [42] 孙凯旋, 辛宇, 刘吉文. 近岸微生物群落演替特征对浓缩溶解有机质添加的响应[J]. *微生物学报*, 2024, 64(12): 4561-4577.
Sun KX, Xin Y, Liu JW. Responses of coastal microbial communities to addition of concentrated dissolved organic matter[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(12): 4561-4577 (in Chinese).
- [43] 王晨龙, 闵杰, 梁睿, 谭熊宇, 王烁, 吾木提·艾山江. 水稻根际土壤微生物细菌群落组成及多样性分析[J]. *中国农学通报*, 2025, 41(4): 84-93.
Wang CL, Min J, Liang R, Tan XY, Wang S, Umut Hasan. Composition and diversity of microbial bacterial communities in paddy rice rhizosphere soil[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2025, 41(4): 84-93 (in Chinese).
- [44] 裴晗博, 王秀杰, 朱云鹏, 冯楷民, 孙志涛, 郭伟. 好氧反硝化菌 *Pseudomonas nitroreducens* PHB18 的鉴定及其脱氮特性[J]. *内蒙古工业大学学报(自然科学版)*, 2025, 44(3): 210-216.
Pei HB, Wang XJ, Zhu YP, Feng KM, Sun ZT, Guo W. Identification of the aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas nitroreducens* PHB18 and its characteristics of nitrogen removal[J]. *Journal of Inner Mongolia University of Technology (Natural Science Edition)*, 2025, 44(3): 210-216 (in Chinese).
- [45] 李卫芬, 郑佳佳, 张小平, 邓斌. 反硝化酶及其环境影响因子的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(1): 166-170.
Li WF, Zheng JJ, Zhang XP, Deng B. Progress in studies on denitrification enzymes and environmental impact factors[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 166-170 (in Chinese).