Investigating the Effects of Periphyton Biofilm on the Denitrification Process in Paddy Soil

Mohaddeseh Shirinzadeh[1], Hossein Ali Alikhani[2*], Hamid Reza Zare Guildehi[3], Zahra Karami[4], Mehran Gholami[5]

(Received: November, 2024 Accepted: September, 2025)

Abstract

Nitrogen is one of the most important nutritional elements required by rice plants, and its adequate supply will increase the final yield of the product. In recent years, the loss of chemical fertilizers in agriculture, including nitrogen fertilizers in rice fields, has reached its maximum. The periphyton biofilm formed on the surface of waterlogged paddy fields is known as the third phase between water and soil, primarily responsible for the cycle of nutrients in paddy fields. A research study was designed and conducted with 18 treatments in a completely randomized design to investigate the effects of natural and enriched periphyton with low-power and high-power denitrifiers as biological inhibitors, with or without rice husk biochar and grape seed powder as organic inhibitors, in controlling the process of nitrate regeneration in paddy fields. The research was carried out in the form of greenhouse cultivation of rice plants for 30 days. The results showed that the application of grape seed powder increased the total nitrogen and ammonium in the soil, as well as the total nitrogen, height and dry weight in the plant. The results related to the application of biochar indicated that this material was more successful than grape seed powder in increasing phosphorus and potassium in the soil and the accumulation of these two elements in plant tissue. On the other hand, the use of rice husk biochar decreased the ammonium amount and increased the nitrate amount in the soil, having a greater effect than grape seed powder in reducing nitrate reduction. According to the obtained results, the use of periphyton along with organic inhibitors in paddy fields can be used as a new solution to inhibit the nitrate reduction process and provide nutrients.

Key words: Ammonium, Rice, Biochar, Denitrification, Nitrogen

Shirinzadeh M., Alikhani H.A., Zare Guildehi H.R., Karami Z., Gholami M. 2025. Investigating the Effects of Periphyton Biofilm on the Denitrification Process in Paddy Soil. *Applied Soil Research*. 14(1): 1-16

1, 4 & 5. Ph. D. student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran
3. M.Sc. graduated, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, Iran
* Corresponding Author Email: halikhan@ut.ac.ir

بررسی اثرات بیوفیلم پریفایتون بر فرآیند دنیتریفیکاسیون در خاک شالیزار

محدثه شیرین‌زاده [۱]، حسینعلی علیخانی [۲*]، حمیدرضا زارع گیلدهی [۳]، زهرا کرمی [۴]، مهران غلامی [۵]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۳۱)

چکیده

عنصر نیتروژن از جمله مهم‌ترین عناصر غذایی مورد احتیاج گیاه برنج می‌باشد و تأمین اصولی آن موجب افزایش عملکرد نهایی محصول خواهد شد. در سال‌های اخیر، تلفات کودهای شیمیایی در کشاورزی از جمله کودهای نیتروژنی در شالیزارها به حداکثر رسیده است. بیوفیلم پریفایتون تشکیل‌شده بر سطح خاک‌های غرقاب اراضی شالیزاری به عنوان فاز سوم بین آب و خاک، مسئول اصلی چرخه عناصر غذایی در شالیزارها شناخته شده است. به همین منظور پژوهشی با هدف بررسی اثرات پریفایتون طبیعی و غنی‌شده با دنیتریفیکاتورهای کم‌توان و پرتوان به عنوان بازدارنده‌های زیستی با یا بدون بیوچار پوسته برنج و پودر هسته انگور به عنوان بازدارنده‌های آلی در کنترل فرآیند احیای نیترات در شالیزارها طراحی و با ۱۸ تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. تحقیق به صورت کشت گلخانه‌ای گیاه برنج و به مدت ۳۰ روز انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که کاربرد پودر هسته انگور موجب افزایش مقادیر نیتروژن کل و آمونیوم خاک و همچنین مقادیر نیتروژن کل، ارتفاع اندام هوایی و وزن ماده خشک در گیاه گردید. نتایج مرتبط با کاربرد بیوچار نشان داد که این ماده در افزایش میزان فسفر و پتاسیم خاک و همچنین انباشت این دو عنصر در بافت گیاهی موفق‌تر از پودر هسته انگور عمل کرد. از طرفی کاربرد بیوچار پوسته برنج موجب کاهش میزان آمونیوم و افزایش میزان نیترات در خاک گردید و همچنین تأثیر بیشتری نسبت به پودر هسته انگور در کاهش میزان احیای نیترات داشت. طبق نتایج به دست آمده، استفاده از پریفایتون به همراه بازدارنده‌های آلی در شالیزارها می‌تواند به عنوان راه‌حلی نوین جهت بازدارندگی فرآیند احیای نیترات و همچنین فراهمی عناصرغذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آمونیوم، برنج، بیوچار، نیترات‌زدایی، نیتروژن

شیرین‌زاده م.، علیخانی ح.ع.، زارع گیلدهی ح.ر.، کرمی ز.، غلامی م. ۱۴۰۴. بررسی اثرات بیوفیلم پریفایتون بر فرآیند دنیتریفیکاسیون در خاک شالیزار. تحقیقات کاربردی خاک. جلد۱۴، شماره۱. صفحه: ۱-۱۶

۱، ۴ و ۵- دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- فارغ‌التحصیل مقطع کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* پست الکترونیک: halikhan@ut.ac.ir

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین محصولات در تغذیه بشر است که تقریبا نیمی از جمعیت جهان از آن به عنوان غذای اصلی استفاده می‌کنند (Wei & Huangm, 2019). در بین تمام عناصر ضروری، نیتروژن نقش مهمی را در رشد برنج و ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای گیاه ایفا می‌کند (Miao *et al.*, 2023). نیتروژن در شالیزارها طی فرآیند احیای نیترات[1] به شکل گازی از دسترس گیاه خارج می‌شود و این موضوع توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Bouwman *et al.*, 2013).

در سال‌های اخیر گزارشات متعددی از بهبود وضعیت خاک و توانایی تأمین نیازهای تغذیه‌ای گیاهان به وسیله کاربرد کودهای زیستی کندرها منتشر شده است (Emami *et al.*, 2021). بیوفیلم پریفایتون[2]، به عنوان یک کود زیستی نوین در شالیزارها با قابلیت بافری عناصرغذایی باعث ایجاد خصوصیات محرک در رشد، عملکرد و حتی حیات گیاه برنج می‌شود (Beheshti *et al.*, 2022). پریفایتون از یک ماتریکس پیچیده پلی‌ساکاریدی با ریزجانداران فتواتوتروف (عمدتاً شامل جلبک‌های سبز میکروسکوپی، سیانوباکتری‌های تک‌سلولی و رشته‌ای و نیز دیاتومه‌ها) و انواع هتروتروف (قارچ‌ها، باکتری‌ها و پروتوزوئرها) تشکیل شده است (Huang *et al.*, 2018) که به تازگی به عنوان فاز سوم بین سطح خاک و ستون آب در شالیزارها توسط خاکشناسان مورد توجه قرار گرفته و ثابت شده که این بیوفیلم نقش مهمی را در فرآیندهای بازچرخش و تبادل عناصرغذایی از جمله کنترل و دخالت در چرخه‌های نیتروژن، فسفر و پتاسیم دارد. همچنین پریفایتون با جذب موادغذایی در ساختار خود، به عنوان مخزنی موقت برای عناصرغذایی به شمار می‌رود (Wu, 2016). ابولایطی و همکاران (Abulaiti *et al.*, 2023) طی پژوهشی که بر روی تنظیم فرآیند نیترات‌زدایی توسط بیوفیلم پریفایتون در مزارع برنج انجام دادند گزارش کردند که پریفایتون به عنوان مخزن موقت با آزادسازی پایدار نیتروژن موجب افزایش عملکرد برنج می‌گردد.

شالیزارها توانایی زیادی در انجام فرآیند احیای غیرجذبی نیترات دارند (Xiang *et al.*, 2023). پدیده احیای غیرجذبی نیترات معمولاً بین ۱/۵ تا ۵ میلی‌متری از ناحیه سطح ریشه (رایزوپلان) رخ می‌دهد (Zhu *et al.*, 2003). برخی محققان معتقدند لایه پریفایتون حتی در شرایط نوری با ایجاد محیط بی‌هوازی شرایط را برای احیای غیرجذبی نیترات فراهم می‌کند (Christensen *et al.*, 1990). تامپسون و همکاران (Thompson *et al.*, 2002) نشان دادند که پریفایتون با ایجاد شرایط محیطی، حضور میکروب‌های فراوان و غلظت بالای مواد غذایی، احیای نیترات را افزایش می‌دهد. شیا و همکاران (Xia et *al.*, 2018) نیز گزارش کردند که دنیتریفیکاسیون به عنوان یک مسیر اصلی تلفات نیتروژن در شالیزار باعث هدررفت بیش از ۳۵ درصد نیتروژن می‌شود. بنابراین در جهت جلوگیری از از وقوع فرآیند احیای نیترات می‌توان از بازدارنده‌ها و مهارکننده‌های زیستی استفاده کرد. یکی از مهارکننده‌های احیای نیترات، پروسیانیدین موجود در پودر هسته انگور[3] می‌باشد (Bardon *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2021). بیوچار پوسته برنج[4] نیز در پژوهش‌های دیگری به عنوان بازدارنده نیترات‌زدایی معرفی شده است (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). این پژوهش با هدف بررسی نقش پریفایتون در فرآیند احیای غیرجذبی نیترات و امکان کاهش تلفات نیترات از طریق کنترل جدایه‌های دنیتریفیکاتور در شالیزارها انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و طرح آزمایش

نمونه‌برداری از پریفایتون در بهار سال ۱۴۰۲ از شالیزارهای واقع در استان گیلان، شهرستان شفت، روستای گیلده با طول و عرض جغرافیایی 37°08'16.1"N 49°28'36.2"E توسط ابزار استریل انجام و نمونه‌ها تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تهران منتقل گردید. آزمایش انجام شده در شرایط گلخانه‌ای به صورت گلدانی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۸ تیمار آزمایشی و در سه تکرار به شرح جدول ۱ طراحی و اجرا گردید.

[1] Dissimilatory Nitrate Reduction
[2] Periphytic Biofilm
[3] Grape Seed Powder
[4] Rice Husk Biochar

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی مورداستفاده برای کشت گلخانه‌ای

Table 1. Experimental treatment used for greenhouse cultivation

Name of the treatment	Treatment code
Control	Blank
Bacteria with the highest nitrate reduction capacity	PDF
Bacteria with the lowest nitrate reduction capacity	WDF
Periphyton	P
Periphyton along with bacteria with the highest nitrate reduction capacity	P+PDF
Periphyton along with bacteria with the lowest nitrate-reducing ability	P+WDF
Grape seed powder	PRO
Bacteria with the highest nitrate reduction capacity combined with grape seed powder	PDF+ PRO
Bacteria with the lowest nitrate reduction capacity with grape seed powder	WDF+PRO
Periphyton with grape seed powder	P+PRO
Periphyton with bacteria with the highest nitrate reduction capacity and grape seed powder	P+PDF+PRO
Periphyton with bacteria with the lowest nitrate reduction capacity and grape seed powder	P+WDF+PRO
Rice husk biochar	BIO
Bacteria with the highest nitrate reduction capacity combined with rice husk biochar	PDF+BIO
Bacteria with the lowest nitrate reduction capacity combined with rice husk biochar	WDF+BIO
Periphyton with rice husk biochar	P+BIO
Periphyton with bacteria with the highest nitrate reduction capacity along with rice husk biochar	P+PDF+BIO
Periphyton with bacteria with the lowest nitrate reduction capacity and rice husk biochar	P+WDF+BIO

جداسازی دنیتریفیکاتورها از بیوفیلم پریفایتون و بررسی توان نیترات‌زدایی

به منظور کشت دنیتریفیکاتورهای موجود در بیوفیلم پریفایتون از محیط کشت آسپاراژین نیترات[1] استفاده شد (Ronald, 2004). جهت انجام آزمایش مربوط به ارزیابی توان نیترات‌زدایی، ۳۳ جدایه مستخرج از بیوفیلم پریفایتون پس از چندین بار خالص‌سازی به صورت جداگانه در محیط کشت مایع آسپاراژین نیترات حاوی ماده‌شیمیایی ۲ و ۴ دی نیتروفنل[2] (جهت جلوگیری از تبدیل نیترات به فرم-های گازی از طریق متوقف‌کردن فعالیت نیتریت‌رداکتاز[3]) کشت داده شدند (Ronald, 2004; Luque-Almagro *et al.*, 2006; Chow et al., 2007). بعد از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رشد کامل، سوسپانسیون حاوی محیط کشت و باکتری سانتریفیوژ شده و مقدار نیتریت تولیدشده در محلول رویی به روش رنگ‌سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۳ نانومتر ارزیابی گردید (Baird *et al.*, 2017). براساس مقدار نیتریت تولید شده، باکتری با بیشترین و کمترین توان نیترات‌زدایی بین جدایه‌ها مشخص شدند و به عنوان باکتری‌های منتخب در آزمون گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای

گلدان‌هایی با قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با ۲/۵ کیلوگرم از خاک شالیزار روستای گیلده که هواخشک شده شده بود پر شدند و به مدت ۲۰ روز در شرایط غرقاب به منظور برقراری تعادل بیوشیمیایی عناصر در خاک و ایجاد شرایط احیایی خاک قرار گرفتند. پس از انجام آزمون خاک، بر اساس مقادیر به‌دست آمده (جدول ۲)، میزان کمبود نیتروژن، فسفر و پتاسیم مطابق با نشریه توصیه کودی مؤسسه تحقیقات برنج گیلان تأمین شد (Mahmoud Soltani *et al.*, 2021).

[1] Asparagine Nitrate Medium
[2] 2,4-Dinitrophenol
[3] Nitrate Reductase Activity

جدول ۲- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک شالیزار مورد استفاده در آزمایش

Table 2- Physical and chemical characteristics of paddy soil used in the experiment

pH	EC	NH_4^+	NO_3^-	P	K	OM	TN	Soil Texture
-	($dS\ m^{-1}$)			($mg\ kg^{-1}$)		%		_
6.75	0.14	76.7	4.58	8.0	94.16	2.07	0.21	Silty Clay

pH: پی‌اچ، EC: قابلیت هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)، NH_4^+، NO_3^-، P و K: به‌ترتیب آمونیوم، نیترات، فسفر قابل جذب و پتاسیم قابل جذب (میلی‌گرم در کیلوگرم)، OM: ماده آلی (٪)، TN: نیتروژن کل (٪) و Soil Texture: بافت خاک هستند.

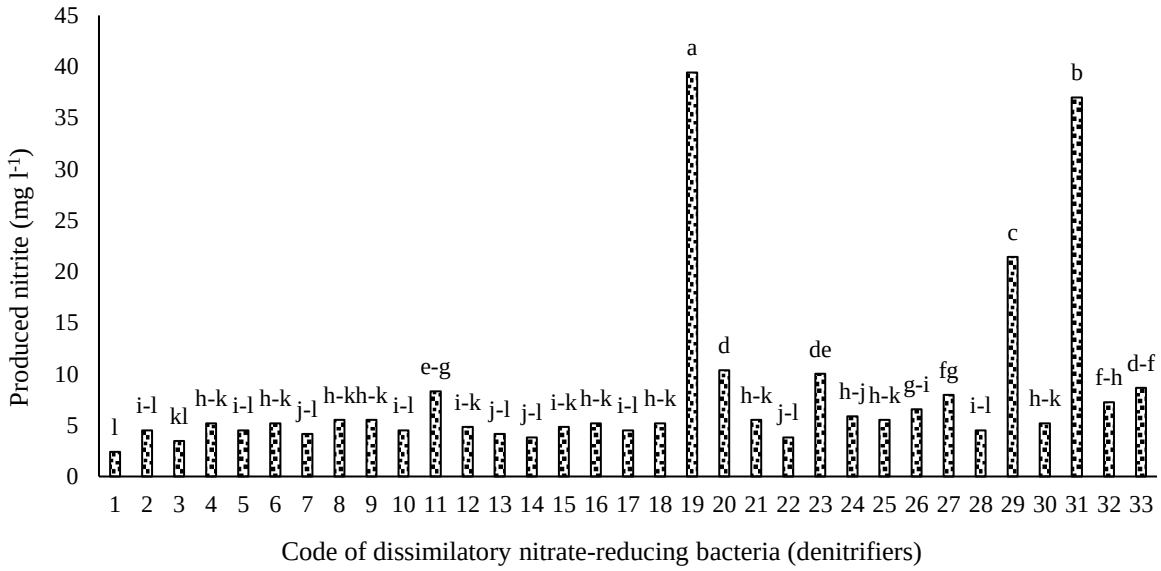
پیش از کاشت بذور برنج، پودر هسته انگور و بیوچار پوسته برنج به مقدار ۱ درصد (وزنی/وزنی) به تیمارهای موردنظر افزوده شدند و به طور کامل با خاک مخلوط گردیدند. سپس، بذرهای جوانه‌دار برنج رقم هاشمی به تعداد ۲۰ عدد در هر گلدان کشت شدند. ۱۰ روز پس از رشد گیاهچه‌ها (قبل از مرحله پنجه‌زنی)، عمل تنک‌کردن گیاهچه‌ها انجام گردید و در هر گلدان ۱۵ گیاهچه باقی ماند. جهت تهیه سوسپانسیون پریفایتون غنی‌شده با باکتری‌های منتخب، بیوفیلم پریفایتون که به مدت یک‌ماه در محیط کشت BBM[1] در دمای ۲۵°C در شرایط نوری تشکیل شده و به رشد کامل رسیده بود به مدت ۴۸ ساعت با باکتری‌های منتخب با بیشترین و کمترین توان نیتراتزدایی انکوباسیون شد تا توسط این باکتری‌ها غنی‌سازی گردد. پس از گذشت پنج روز از سوسپانسیون پریفایتون طبیعی و پریفایتون غنی‌شده با باکتری‌ها به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر به تیمارهای مربوطه افزوده شد (Lu *et al.*, 2017). گلدان‌ها تحت شرایط دما، نور و رطوبت مناسب به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. پس از پایان دوره، اندازه‌گیری‌های مربوط به گیاهچه‌ها شامل: ارتفاع، وزن خشک، میزان فسفر و پتاسیم به روش هضم خشک، نیتروژن به روش هضم تر در گیاه اندازه‌گیری شدند (Jones, 2001). آزمایش‌های مربوط به خاک همچون اندازه‌گیری EC، pH، نیتروژن کل، آمونیوم، نیترات، ماده‌آلی، فسفر و پتاسیم انجام گردید. همچنین به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتراتردااکتاز در نمونه‌های خاک مرطوب تحت شرایط غرقاب، پس از اتمام مدت انکوباسیون (۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C) نیتریت تولیدشده توسط کلریدپتاسیم استخراج و در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید (Abdelmagid & Tabatabai, 1987). تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی توان دنیتریفیکاتورها

در میان ۳۳ جدایه باکتری دنیتریفیکاتور استخراج شده از بیوفیلم پریفایتون، بیشترین و کمترین توان تولید نیتریت بین جدایه‌ها به ترتیب توسط جدایه شماره ۱۹ و جدایه شماره ۱ ثبت گردید (شکل ۱). این جدایه‌ها به عنوان باکتری‌های منتخب در آزمون گلخانه‌ای برگزیده شدند.

[1] Bold's Basal Medium



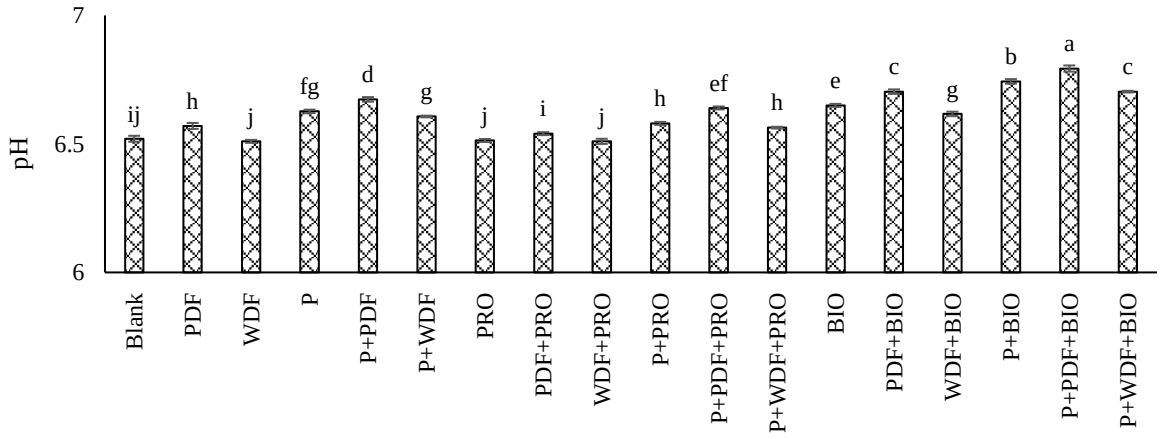
شکل ۱- مقایسه میانگین باکتری‌های احیاکننده نیترات (دنیتریفیکاتورها) با کمترین و بیشترین توان تولید نیتریت

Figure 1. Comparison of average dissimilatory nitrate-reducing bacteria (denitrifiers) with the lowest and highest nitrite production capacity

تغییرات pH و EC در خاک

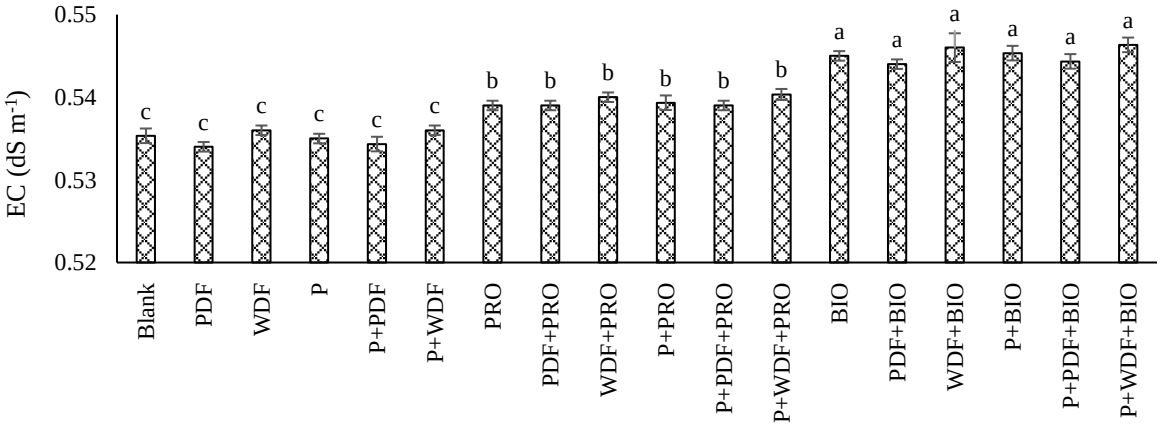
مقدار pH خاک در انتهای دوره رشد ۳۰ روزه در بیشتر تیمارها افزایش یافت. بیشترین افزایش pH خاک مربوط به تیمار P+PDF+BIO به میزان ۴/۱۴ درصد نسبت به تیمار شاهد بود (شکل ۲). وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2022) بیان داشتند که افزایش pH پس از افزودن بیوچار پوسته برنج به علت قلیائیت بالای این نوع بیوچار می‌باشد. بیوفیلم پریفایتون pH آب و خاک را به دلیل عمل فتوسنتز جمعیت اتوتروفیک ساکن در این بیوفیلم و بالا بردن سطح اکسیژن محلول در آب، افزایش می‌دهد اما با گذشت زمان به دلیل خاصیت بافری خاک تعادل در میزان pH خاک مجدداً برقرار می‌گردد (Alikhani *et al.*, 2023).

مقدار EC خاک پس از پایان دوره در تیمارهای حاوی بیوچار پوسته برنج و پودر هسته انگور افزایش یافت. تیمارهای حاوی بیوچار پوسته برنج مانند تیمار WDF+BIO و P+WDF+BIO موجب بیشترین افزایش در هدایت الکتریکی خاک هر دو به میزان ۲/۰۶ درصد نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۳). پارامتر EC نشان دهنده قدرت یونی محلول خاک می‌باشد (Abd El-Mageed *et al.*, 2021) و بیوچار از طریق مهار فرآیند احیای نیترات سبب حفظ نیترات خاک نسبت به تیمار شاهد می‌شود، بنابراین افزودن بیوچار منجر به افزایش EC خاک می‌گردد (Wang *et al.*, 2022). پودر هسته انگور یک پسماند آلی است و مانند سایر پسماندها و کودهای آلی دیگر می‌تواند از طریق بالابردن کاتیون‌ها و آنیون‌های مختلف، افزایش EC خاک را باعث شود (Kim & Park, 2024).



شکل ۲- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات pH خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 2. Effects of different treatments on soil pH changes after 30 days



شکل ۳- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات EC خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 3. Effects of different treatments on soil EC changes after 30 days

بررسی روند تغییرات عناصر غذایی در خاک

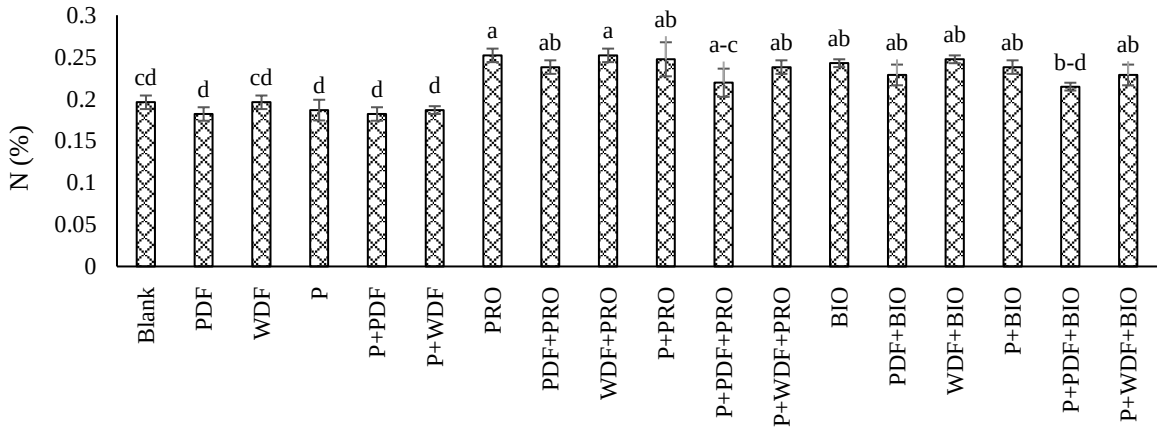
تغییرات نیتروژن کل، نیترات و آمونیوم

میزان نیتروژن کل خاک در اکثر تیمارهای حاوی بازدارنده-های مرتبط با احیای نیترات، پس از پایان دوره رشد ۳۰ روزه افزایش یافت. تیمارهای PRO و WDF+PRO باعث بیشترین درصد افزایش در نیتروژن کل خاک به میزان ۲۸/۵۷ درصد نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۴). بیوچار از طریق فراهمی بستر میکروبی جهت دسترسی عناصرغذایی باعث افزایش فراهمی زیستی نیتروژن در خاک می‌گردد (Luo *et al*., 2017). گزارش شده است که پروسیانیدین پودر هسته انگور به دلیل اثر مهارکنندگی بر روی فرآیند احیای نیترات و بهبود فرآیندهای غیرمتحرک شدن میکروبی نیترات و احیای نیترات به آمونیوم، منجر به افزایش حفظ نیتروژن در خاک شد (Ye et *al*., 2021).

آمونیوم خاک پس از دوره ۳۰ روزه رشد برنج در تیمارهای حاوی پودر هسته انگور افزایش و در تیمارهای حاوی بیوچار پوسته برنج کاهش یافت. بیشترین میزان افزایش آمونیوم خاک در تیمارهای P+PRO و P+PDF+PRO و P+WDF+PRO به ترتیب ۴۱/۰۶ و ۳۶/۲۷ و ۳۹/۰۴ درصد نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. در مقابل تیمارهای BIO و PDF+BIO و WDF+BIO موجب کاهش میزان آمونیوم خاک به ترتیب به میزان ۲۰/۶۵ و ۲۴/۶۹ و ۲۲/۶۷ درصد نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۵). سینگ و همکاران (Singh *et al*., 2018) اظهار کردند که در اثر

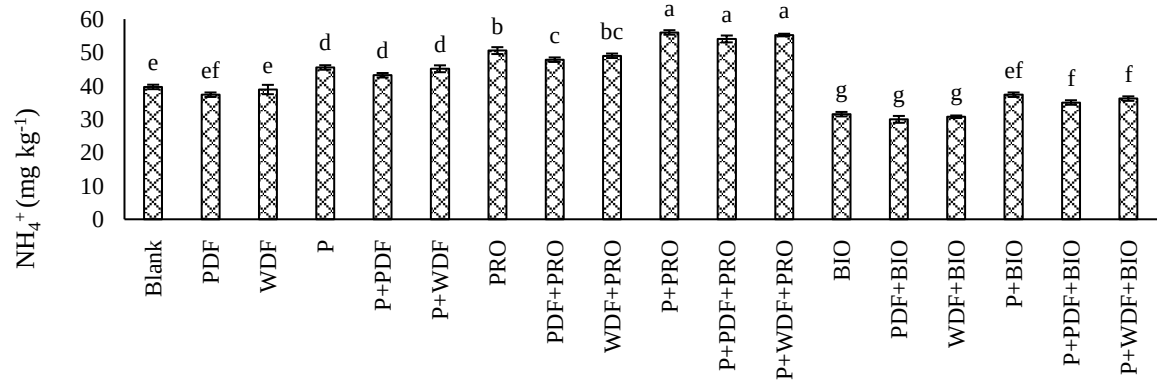
افزودن بیوچار پوسته برنج، غلظت آمونیوم تا ۳۵ روز پس از نشاکاری کاهش یافت که علت این امر جلوگیری از رشد میکروفلورهای درگیر در فرآیندهای معدنی شدن نیتروژن در خاک به واسطه افزودن بیوچار می‌باشد. طبق گزارشات، بیوچار پوسته برنج باعث جلوگیری از انجام فرآیند آمونیفیکاسیون گردید که این امر سطوح پایین آمونیوم در خاک را به دنبال داشت (DeLuca *et al.*, 2015). مطابق با پژوهش یه و همکاران (Ye *et al.*, 2021) غلظت آمونیوم تبادلی در اثر کاربرد پروسیانیدین به تدریج افزایش یافت. گزارش شده است که پریفایتون حاوی دیازوتروف‌های مهمی همچون انواع سیانوباکتری‌ها بوده که با انجام فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن میزان آمونیوم را در آب و خاک افزایش می‌دهد (Wu *et al.*, 2016).

مقدار نیترات موجود در خاک در تیمارهای حاوی بازدارنده‌های احیای نیترات افزایش یافت. بدین گونه تیمارهای BIO و WDF+BIO به ترتیب به مقدارهای ۶۳/۶۴ و ۶۱/۵۴ درصد باعث افزایش در میزان نیترات خاک نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۶). وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2022) گزارش کردند که افزایش معدنی شدن کربن آلی محلول در حضور بیوچار و محدودیت کربن قابل دسترس جهت انجام فرآیند احیای نیترات منجر به جلوگیری از احیای نیترات گردید.



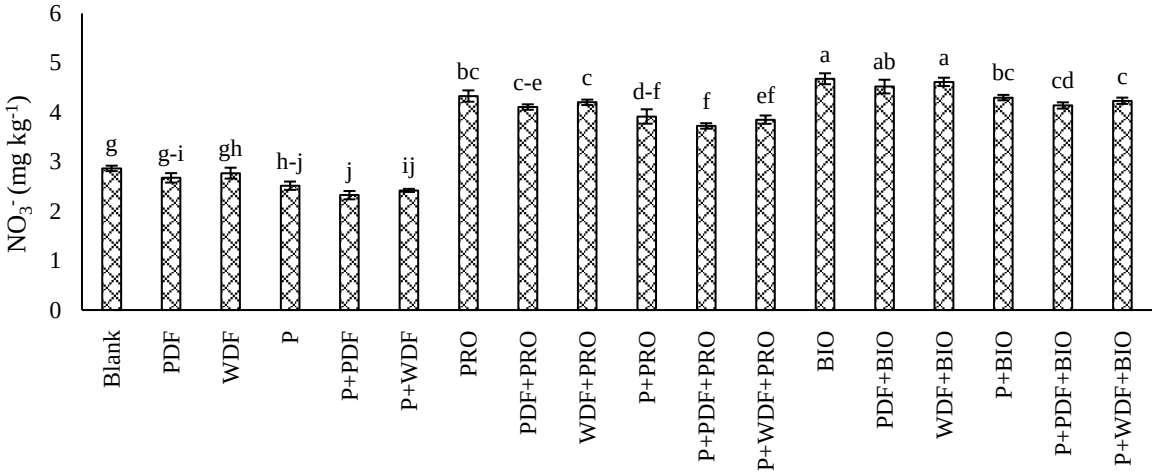
شکل ۴- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات نیتروژن کل خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 4. The effects of different treatments on the change process of total soil nitrogen after 30 days



شکل ۵- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات آمونیوم کل خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 5. The effects of different treatments on the change process of total soil ammonium after 30 days



شکل ۶- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات نیترات کل خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 6. The effects of different treatments on the change process of total soil nitrate after 30 days

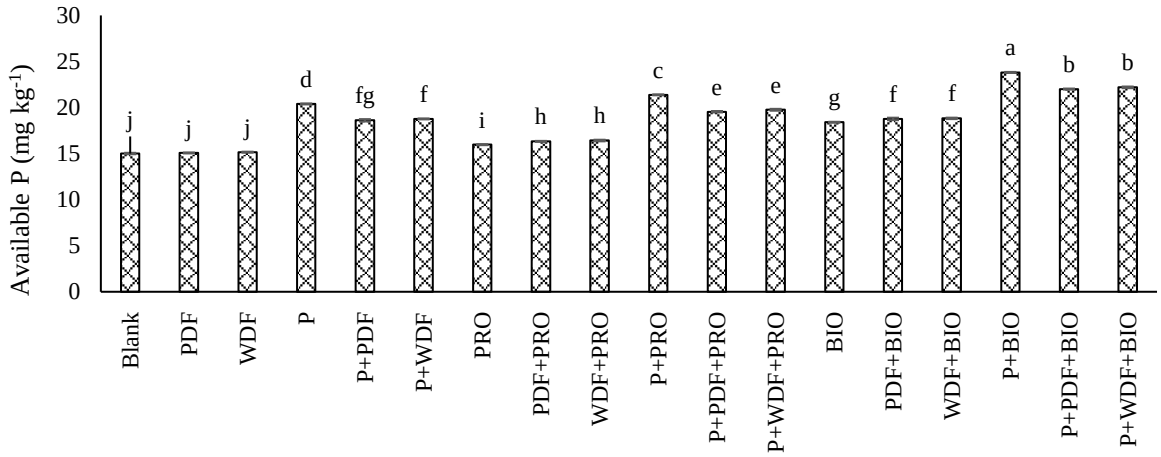
تغییرات فسفر و پتاسیم قابل جذب

بیشترین میزان فسفر قابل جذب خاک پس از دوره رشد ۳۰ روزه، در تیمار P+BIO به میزان ۵۸/۷۳ درصد نسبت به تیمار شاهد اندازه‌گیری شد (شکل ۷). بیوچار پوسته برنج منبع فسفر قابل دسترس زیستی بوده که می‌تواند به طور مستقیم وارد محلول خاک گردد (Oladele *et al.*, 2019). علیخانی و همکاران (Alikhani *et al.*, 2023) بیان کردند که پریفایتون از طریق افزایش موادآلی، فسفر قابل دسترس و فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک منجر به افزایش غلظت فسفر فراهم شد و حتی راندمان مصرف کود فسفری را افزایش داد. پریفایتون نوعی کنسرسیوم باکتریایی و قارچی بوده و به دلیل تنوع در تولید اسیدهای آلی قادر به انحلال بیشتر اشکال کم‌محلول فسفر می‌باشد (Beheshti *et al.*, 2021).

مقدار پتاسیم قابل جذب خاک پس از گذشت دوره ۳۰ روزه در تیمارهای P+BIO، P+PDF+BIO و P+WDF+BIO به ترتیب به میزان ۴۰/۱۳، ۳۹/۵۰ و ۳۹/۷۱ درصد افزایش یافت. (شکل ۸). یائو و همکاران (Yao *et al.*, 2012) اظهار کردند که نیروهای جاذبه الکترواستاتیک روی سطح ماتریکس خاک-بیوچار می‌تواند به حفظ پتاسیم تبادلی در خاک کمک کند. پودر هسته انگور به دلیل ماهیت آلی و منشأ گیاهی داشتن، حاوی مقادیری از پتاسیم در ساختار خود می‌باشد که در اثر فرآیند تجزیه زیستی در خاک می‌تواند موجبات افزایش پتاسیم محلول خاک را فراهم کند. باکتری‌ها و قارچ‌های موجود در بیوفیلم پریفایتون نیز قادر به تجزیه سیلیکات‌ها و آزادسازی پتاسیم و سایر عناصرغذایی هستند (Alikhani *et al.*, 2021).

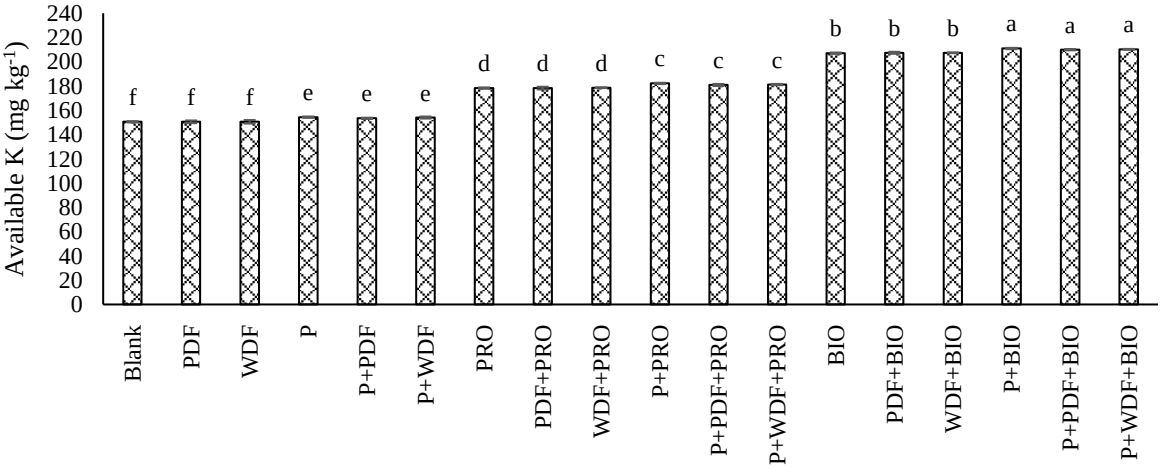
فعالیت آنزیم نیترات‌رداکتاز در خاک

فعالیت آنزیم نیترات‌رداکتاز خاک در تیمارهایی که حاوی بازدارنده‌های احیای نیترات بودند کاهش قابل‌توجهی را نشان دادند. تیمار BIO موجب بیشترین کاهش به میزان ۶۰/۱۹ درصد و پس از آن تیمار PRO باعث کاهش ۵۸/۸۰ درصدی در فعالیت آنزیم نیترات‌رداکتاز خاک نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل۹). افزودن بیوچار و به دنبال آن افزایش معدنی‌شدن کربن آلی محلول و کاهش کربن قابل دسترس جهت انجام فرآیند احیای نیترات موجب جلوگیری از احیای نیترات می‌گردد (Wang *et al.*, 2022). محققان بیان داشتند که در اثر افزودن عصاره هسته انگور، کاهش ۱۷/۳ درصدی در فعالیت آنزیم‌های دنیتریفیکاتوری در مقایسه با تیمار شاهد رخ داد (Hsiao *et al.*, 2024; Bardon *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2021). پریفایتون با ایجاد شرایط محیطی، حضور میکروب‌های فراوان و غلظت بالای مواد غذایی، منجر به افزایش احیای نیترات می‌گردد (Thompson *et al.*, 2002).



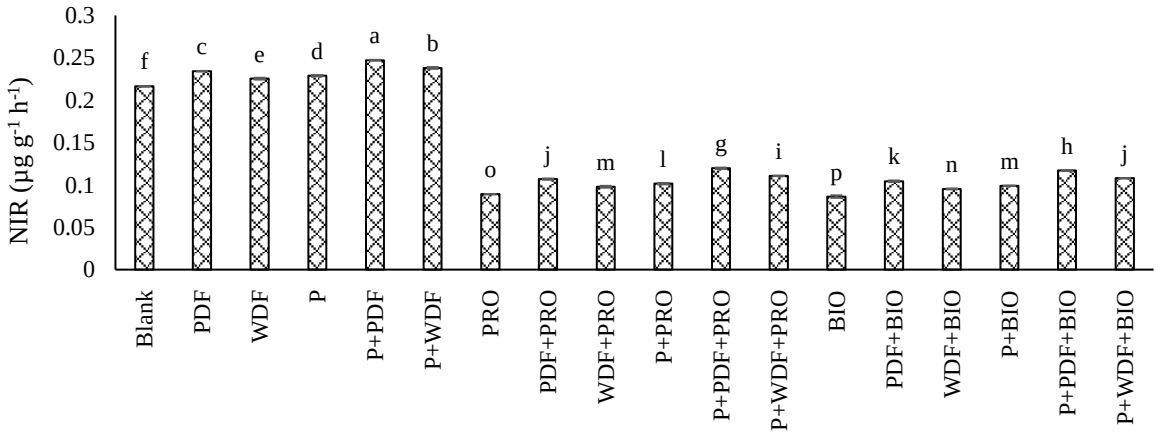
شکل ۷- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات فسفر قابل جذب خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 7. The effects of different treatments on the process of soil available phosphorus changes after 30 days



شکل ۸- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات پتاسیم قابل جذب خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 8. The effects of different treatments on the process of soil available potassium changes after 30 days



شکل ۹- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات فعالیت آنزیم نیترات‌ردااکتاز خاک پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 9. The effects of different treatments on the changes in nitrate-reductase activity of the soil after 30 days

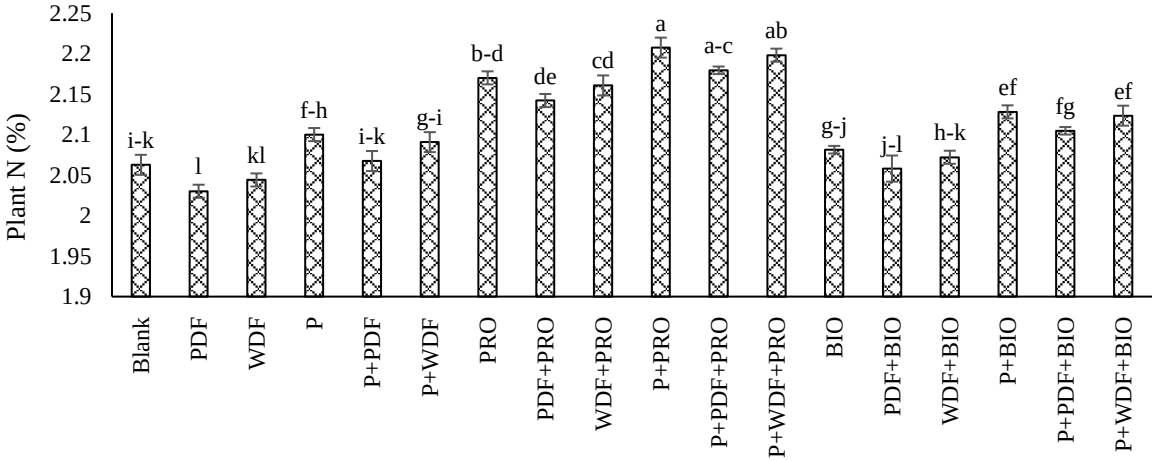
بررسی روند تغییرات عناصر غذایی در گیاهچه برنج

نیتروژن، فسفر و پتاسیم

میزان نیتروژن کل موجود در گیاه پس از پایان دوره ۳۰ روزه در تیمارهای حاوی پودر هسته انگور و تیمار P افزایش یافت. تیمارهای P+PRO و P+WDF+PRO به ترتیب باعث افزایش ۷/۲۸ و ۶/۸ درصدی در میزان نیتروژن گیاه نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۱۰). باردون و همکاران (Bardon *et al.*, 2017) نشان دادند که کاربرد پروسیانیدین باعث افزایش محتوای نیتروژن ریشه گیاه شد. در پژوهشی دیگر اثبات شد که غلظت آمونیوم تبادلی و نیترات در خاک شالیزاری تیمارشده با پروسیانیدین افزایش یافت (Ye *et al.*, 2021). از آنجایی که گیاه برنج نیتروژن آمونیومی را به فرم نیتراتی ترجیح می‌دهد، هر اندازه آمونیوم بیشتری در اختیار گیاه قرار گیرد گیاه راحت‌تر فرم آمونیومی موجود را جذب کرده و محتوای نیتروژنی گیاه افزایش خواهد یافت (Wang *et al.*, 1993; Duan *et al.*, 2007). بنابراین پودر هسته انگور به دلیل فراهمی بیشتر آمونیوم در خاک (شکل ۵)، نیتروژن بیشتری در اختیار گیاه قرار داده است.

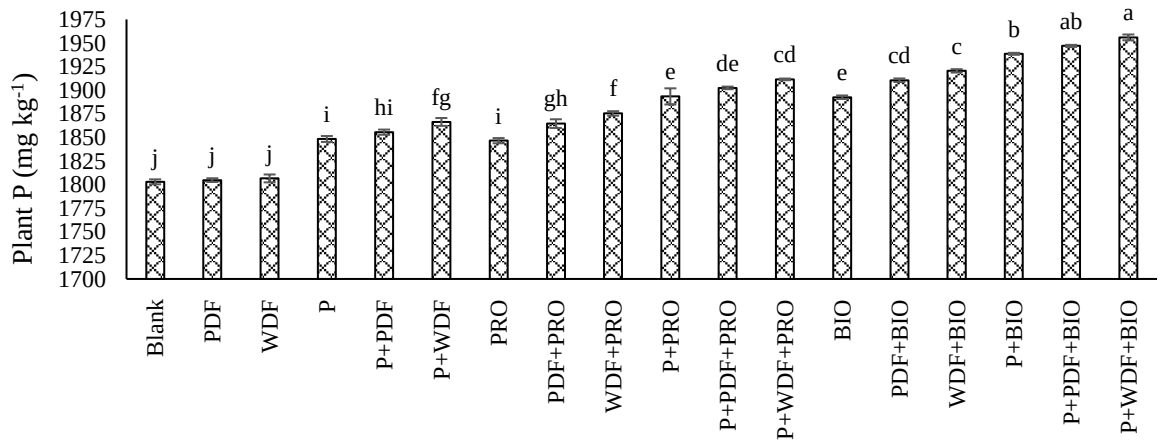
مقدار فسفر کل گیاهچه برنج پس از دوره رشد ۳۰ روزه در اکثر تیمارها افزایش یافت. تیمارهای P+WDF+BIO و P+PDF+BIO و P+BIO موجب بیشترین افزایش در مقدار فسفر کل گیاه به ترتیب به میزان ۸/۴۹، ۷/۹۹ و ۷/۵۲ درصد نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۱۱). پژوهش‌ها حاکی از آن است که افزودن بیوچار پوسته برنج (Luo *et al.*, 2017) و پودر هسته انگور (Bardon *et al.*, 2016; Kraus *et al.*, 2004) باعث افزایش فسفر خاک و جذب آن توسط گیاه می‌شود. بازدارنده‌های دنیتریفیکاسیون از طریق مهار احیای نیترات باعث افزایش نیترات خاک شده و به همین دلیل افزایش راندمان مصرف فسفر توسط گیاه را به دنبال خواهد داشت. بهشتی و همکاران (Beheshti *et al.*, 2022) اظهار نمودند که حضور پریفایتون موجب افزایش شاخص حیاتی بذر برنج، جوانه‌زنی بذر و فراهمی زیستی فسفر و سایر ریزمغذی‌ها جهت جذب و استفاده توسط گیاه می‌شود.

میزان پتاسیم کل در گیاه برنج پس از گذشت ۳۰ روز در اکثر تیمارها افزایش یافت. تیمارهای P+WDF+BIO و P+BIO موجب بیشترین افزایش در مقدار پتاسیم کل گیاه به میزان ۴/۵۰ و ۴/۲۹ درصد نسبت به تیمار شاهد گردیدند (شکل ۱۲). افزودن بیوچار به خاک (Oladele *et al.*, 2019) و پودر هسته انگور به عنوان ماده‌ای آلی (Bardon *et al.*, 2016) موجب افزوده شدن پتاسیم فراهم در خاک جهت برطرف نمودن نیاز پتاسیمی گیاه می‌شود. راداتز و همکاران (Raddatz *et al.*, 2020) گزارش کردند گیاهانی که در حضور نیترات رشد می‌کنند پتاسیم بیشتری را جذب و جمع‌آوری می‌کنند. انتظار می‌رود که بازدارنده‌های احیای نیترات از طریق افزایش میزان نیترات خاک موجب افزایش جذب پتاسیم توسط گیاه از خاک شوند.



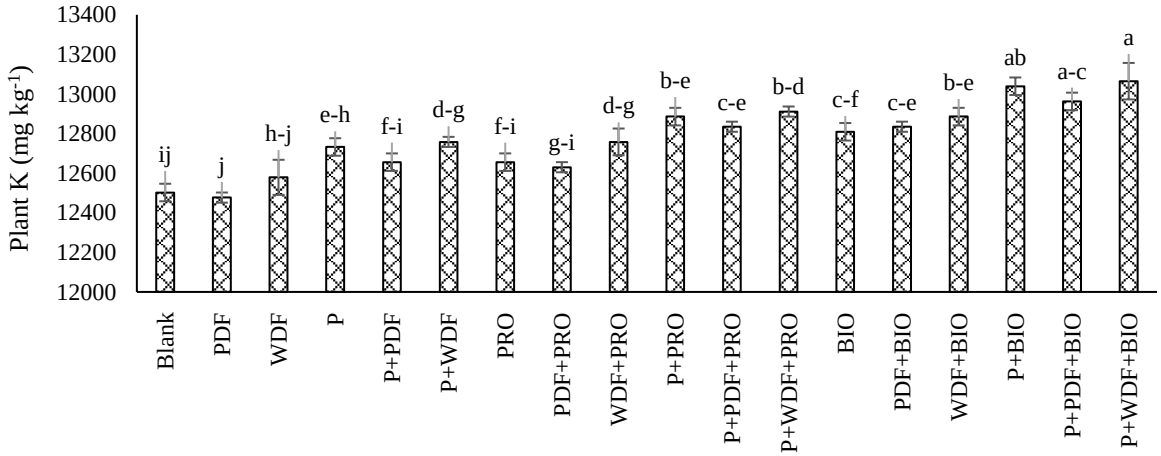
شکل ۱۰- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات نیتروژن کل گیاهچه برنج پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 10. The effects of different treatments on the process of changes in the total nitrogen of rice seedlings after 30 days



شکل ۱۱- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات فسفر کل گیاهچه برنج پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 11. The effects of different treatments on the changes in total phosphorus of rice seedlings after 30 days

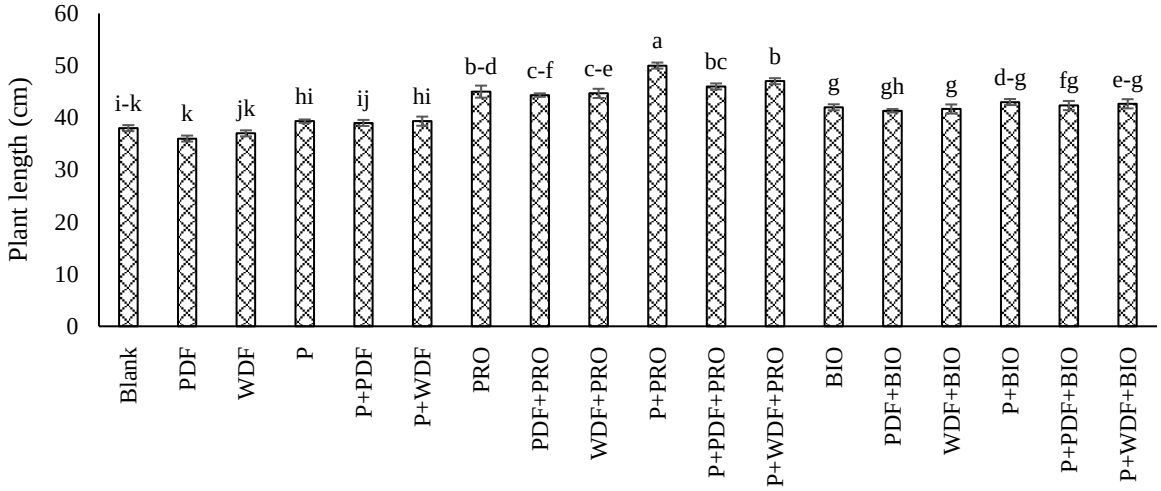


شکل ۱۲- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات پتاسیم کل گیاهچه برنج پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 12. The effects of different treatments on the potassium changes of the whole rice seedling after 30 days

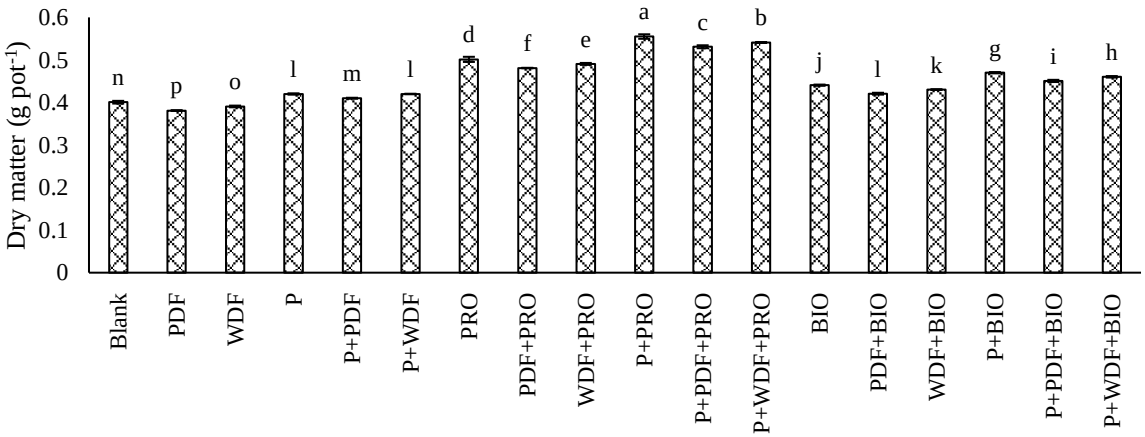
ارتفاع و وزن خشک گیاهچه‌های برنج

بیشترین مقدار ارتفاع و وزن خشک گیاهچه برنج در تیمار P+PRO مشاهده گردید که به میزان ۳۱/۵۸ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل‌های ۱۳ و ۱۴). مهار فرآیند احیای نیترات، فراهمی نیترات را در خاک افزایش داده تا گیاه بتواند از این نیترات جهت رشد خود استفاده کند (Galland *et al.*, 2019). از طرفی به دلیل ترجیح استفاده از آمونیوم توسط برنج و حفظ همزمان آمونیوم و نیترات خاک در تیمارهای حاوی پودر هسته انگور، نیتروژن بیشتری جهت رشد در اختیار گیاه برنج قرار گرفته است. مشخص شده است که پریفایتون بر جوانه‌زنی و رشد گیاه برنج در شالیزارها مؤثر می‌باشد (Wu *et al.*, 2018). محققان گزارش کرده‌اند که پروسیانیدین هسته انگور از طریق مهار احیای نیترات می‌تواند سبب افزایش نیترات قابل دسترس و غلظت آمونیوم تبادلی در خاک گردد (Ye *et al.*, 2021; Hsiao *et al.*, 2024). تأمین همزمان آمونیوم و نیترات برای رشد بهتر و پایدار گیاه برنج ضروری می‌باشد (Guillaumes Cullell & Villar Mir, 2004). بیشترین وزن خشک گیاهچه برنج پس از سپری شدن دوره رشد ۳۰ روزه در تیمار P+PRO به میزان ۳۸/۴۰ درصد نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. با افزایش میزان نیتروژن خاک، وزن خشک اندام هوایی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Fageria *et al.*, 2008).



شکل ۱۳- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات طولی گیاهچه برنج پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 13. The effects of different treatments on the trend of length changes of rice seedlings after 30 days



شکل ۱۴- اثرات تیمارهای مختلف بر روند تغییرات وزن خشک گیاهچه برنج پس از گذشت ۳۰ روز

Figure 14. The effects of different treatments on changes in dry weight of rice seedlings after 30 days

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با جداسازی دنیتریفیکاتورهای کم‌توان از بیوفیلم پریفایتون و غنی‌سازی پریفایتون اولیه با این میکروارگانیسم‌ها در کنار کاربرد بازدارنده‌های احیای نیترات موجبات نگهداشت اشکال مختلف نیتروژن در خاک را بیشتر از زمانی که بازدارنده‌ها به تنهایی مورداستفاده قرار می‌گیرند، فراهم می‌کند. علاوه بر این بیوفیلم پریفایتون به عنوان یک کود زیستی تغذیه‌کننده و کنترل‌کننده تلفات نیتروژن در کشت گیاه برنج عمل می‌کند و با دارا بودن طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان بهبوددهنده رشد و عملکرد گیاه برنج محسوب می‌شود. همچنین کاربرد بازدارنده‌های احیای نیترات نظیر بیوچار پوسته برنج و پودر هسته انگور در شالیزارها می‌توانند علاوه بر کنترل فرآیند دنیتریفیکاسیون، عناصرغذایی برای رشد گیاه برنج را نیز تأمین کنند و حاصلخیزی خاک شالیزارها را موجب شوند. پیشنهاد می‌گردد تحقیقات آینده طوری برنامه‌ریزی گردند تا با سطح‌بندی کود اوره، بیوچار پوسته برنج و پودر هسته انگور اثرات واقعی در اثر استفاده از بیوفیلم پریفایتون طبیعی و غنی‌شده محاسبه گردد. همچنین پیشنهاد می‌گردد از ارقام مختلف گیاه برنج در تحقیقی مشابه استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری انجام شده است. همچنین بدین وسیله از جناب آقای مهندس حسن شیرین‌زاده به خاطر همکاری در پیشبرد اهداف این پژوهش قدردانی می‌شود.

References

Abd El-Mageed, T. A., Abdelkhalik, A., Abd El-Mageed, S. A., & Semida, W. M. (2021). Co-composted poultry litter biochar enhanced soil quality and eggplant productivity under different irrigation regimes. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 21(3), 1917–1933.

Abdelmagid, H. M., & Tabatabai, M. A. (1987). Nitrate reductase activity of soils. Soil Biology and Biochemistry, 19(4), 421–427.

Abulaiti, A., She, D., Zhang, W., & Xia, Y. (2023). Regulation of denitrification/ammonia volatilization by periphyton in paddy fields and its promise in rice yield promotion. Journal of the Science of Food and Agriculture, 103(8), 4119–4130.

Alikhani, H. A., Beheshti, M., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Rahmani, H. A., & Noroozi, M. (2023). Phosphorus use management in paddy fields by enriching periphyton with its phosphate-solubilizing bacteria and fungi at the late stage of rice growth. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 23, 1–17.

Alikhani, H. A., Emami, S., & Etesami, H. (2021). Periphyton and its key role in paddy fields and environmental health. Iranian Journal of Soil and Water Research, 52(2), 451–467. (In Persian)

Baird, R., Rice, E. W., & Eaton, A. D. (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater (23rd ed.). American Public Health Association.

Bardon, C., Poly, F., El Zahar Haichar, F., Le Roux, X., Simon, L., Meiffren, G., Comte, G., Rouifed, S., & Piola, F. (2017). Biological denitrification inhibition (BDI) with procyanidins induces modification of root traits, growth and N status in Fallopia × bohemica. Soil Biology and Biochemistry, 107, 41–49.

Bardon, C., Poly, F., Piola, F., Pancton, M., Comte, G., Meiffren, G., & El Zahar Haichar, F. (2016). Mechanism of biological denitrification inhibition: Procyanidins induce an allosteric transition of the membrane-bound nitrate reductase through membrane alteration. FEMS Microbiology Ecology, 92(5), fiw034.

Beheshti, M., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Rahmani, H. A., & Noroozi, M. (2022). Enriching periphyton with phosphate-solubilizing microorganisms improves the growth and concentration of phosphorus and micronutrients of rice plant in calcareous paddy soil. Rhizosphere, 24, 100590.

Beheshti, M., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Rahmani, H. A., & Noroozi, M. (2021). Periphytic biofilm and rice rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria and fungi: A possible use for activating occluded P in periphytic biofilms in paddy fields. Rhizosphere, 19, 100395.

Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., Griffioen, J., Van Groenigen, J. W., Hefting, M. M., Oenema, O., Van Puijenbroek, P. J. T. M., Seitzinger, S., Slomp, C. P., & Stehfest, E. (2013). Global trends and uncertainties in terrestrial denitrification and N_2O emissions. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1621), 20130112.

Christensen, P. B., Nielsen, L. P., Sørensen, J., & Revsbech, N. P. (1990). Denitrification in nitrate-rich streams: Diurnal and seasonal variation related to benthic oxygen metabolism. Limnology and Oceanography, 35(3), 640–651.

DeLuca, T. H., Gundale, M. J., MacKenzie, M. D., & Jones, D. L. (2015). Biochar effects on soil nutrient transformations. In J. Lehmann & S. Joseph (Eds.), Biochar for environmental management (2nd ed., pp. 421–454). Routledge.

Duan, Y. H., Zhang, Y. L., Ye, L. T., Fan, X. R., Xu, G. H., & Shen, Q. R. (2007). Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. Annals of Botany, 99(6), 1153–1160.

Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaee, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motesharezadeh, B. (2021). Comparison of the effectiveness of plant growth-promoting bacteria and chemical fertilizers on improving growth and yield of wheat. Journal of Natural Environment, 73(2), 211–225. (In Persian)

Fageria, N. K., Santos, A. B., & Cutrim, V. A. (2008). Dry matter and yield of lowland rice genotypes as influenced by nitrogen fertilization. Journal of Plant Nutrition, 31(4), 788–795.

Galland, W., Piola, F., Burlet, A., Mathieu, C., Nardy, M., Poussineau, S., Blazère, L., Gervaix, J., Puijalon, S., Simon, L., & El Zahar Haichar, F. (2019). Biological denitrification inhibition (BDI) in the field: A strategy to improve plant nutrition and growth. Soil Biology and Biochemistry, 136, 107513.

Guillaumes Cullell, E., & Villar Mir, J. M. (2004). Effects of DMPP on the growth and chemical composition of ryegrass (Lolium perenne L.) raised on calcareous soil. Spanish Journal of Agricultural Research, 2(4), 588–596.

Hsiao, C. J., Frie, A., Mitchell, S., Venterea, R., & Griffis, T. (2024). Efficacy of grape seed procyanidins for inhibiting denitrification varies by source, soil texture, and cropping history. Applied Soil Ecology, 195, 105254.

Huang, W., Liu, X., Peng, W., Wu, L., Yano, S., Zhang, J., & Zhao, F. (2018). Periphyton and ecosystem metabolism as indicators of river ecosystem response to environmental flow restoration in a flow-reduced river. Ecological Indicators, 92, 394–401.

Jones, J. B., Jr. (2001). Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRC Press.

Kim, H. N., & Park, J. H. (2024). Monitoring of soil EC for the prediction of soil nutrient regime under different soil water and organic matter contents. Applied Biological Chemistry, 67(1), 1.

Kraus, T. E., Zasoski, R. J., Dahlgren, R. A., Horwath, W. R., & Preston, C. M. (2004). Carbon and nitrogen dynamics in a forest soil amended with purified tannins from different plant species. Soil Biology and Biochemistry, 36(2), 309–321.

Li, H., Meng, J., Liu, Z., Lan, Y., Yang, X., Huang, Y., He, T., & Chen, W. (2021). Effects of biochar on N_2O emission in denitrification pathway from paddy soil: A drying incubation study. Science of the Total Environment, 787, 147591.

Lu, H., Liu, J., Kerr, P. G., Shao, H., & Wu, Y. (2017). The effect of periphyton on seed germination and seedling growth of rice (Oryza sativa) in paddy area. Science of the Total Environment, 578, 74–80.

Luo, S., Wang, S., Tian, L., Li, S., Li, X., Shen, Y., & Tian, C. (2017). Long-term biochar application influences soil microbial community and its potential roles in semiarid farmland. Applied Soil Ecology, 117, 10–15.

Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Martínez-Luque, M. (2006). Interactions between nitrate assimilation and 2,4-dinitrophenol cometabolism in Rhodobacter capsulatus E1F1. Current Microbiology, 53, 37–42.

Mahmoud Soltani, S., Kavousi, M., Shokri Vahed, H., Razavipour, T., Babazadeh, S., Shakuri Katagiri, M., & Mohammadian, M. (2021). Rice nutrition. Rice Research Institute of Iran. (In Persian)

Miao, X., Miao, Y., Liu, Y., Tao, S., Zheng, H., Wang, J., Wang, W., & Tang, Q. (2023). Measurement of nitrogen content in rice plant using near infrared spectroscopy combined with different PLS algorithms. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 284, 121733.

Oladele, S. O., Adeyemo, A. J., & Awodun, M. A. (2019). Influence of rice husk biochar and inorganic fertilizer on soil nutrients availability and rain-fed rice yield in two contrasting soils. Geoderma, 336, 1–11.

Raddatz, N., Morales de los Ríos, L., Lindahl, M., Quintero, F. J., & Pardo, J. M. (2020). Coordinated transport of nitrate, potassium, and sodium. Frontiers in Plant Science, 11, 247.

Ronald, M. (2004). Handbook of microbiological media (Vol. 1). CRC Press.

Singh, C., Tiwari, S., Gupta, V. K., & Singh, J. S. (2018). The effect of rice husk biochar on soil nutrient status, microbial biomass and paddy productivity of nutrient-poor agricultural soils. Catena, 171, 485–493.

Thompson, F. L., Abreu, P. C., & Wasielesky, W. (2002). Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture, 203(3–4), 263–278.

Wang, C., Du, S., & Nishimura, O. (2022). Rice husk-derived biochar suppressed N_2O emission from acidic arable soil by inhibiting nitrate reduction. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 22(3), 3189–3199.

Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., & Glass, A. D. M. (1993). Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and subcellular distribution of 13NH4+. Plant Physiology, 103(4), 1249–1258.

Wei, X., & Huang, X. (2019). Origin, taxonomy, and phylogenetics of rice. In Rice (pp. 1–29). AACC International Press.

Wu, Y. (2016). Periphyton: Functions and application in environmental remediation. Elsevier.

Wu, Y., Liu, J., & Rene, E. R. (2018). Periphytic biofilms: A promising nutrient utilization regulator in wetlands. Bioresource Technology, 248, 44–48.

Wu, Y., Liu, J., Lu, H., Wu, C., & Kerr, P. (2016). Periphyton: An important regulator in optimizing soil phosphorus bioavailability in paddy fields. Environmental Science and Pollution Research, 23, 21377–21384.

Xia, Y., She, D., Zhang, W., Liu, Z., Wu, Y., & Yan, X. (2018). Improving denitrification models by including bacterial and periphytic biofilm in a shallow water–sediment system. Water Resources Research, 54(10), 8146–8159.

Xiang, H., Hong, Y., Wu, J., Wang, Y., Ye, F., Ye, J., Lu, J., & Long, A. (2023). Denitrification contributes to N_2O emission in paddy soils. Frontiers in Microbiology, 14, 1218207.

Yao, Y., Gao, B., Zhang, M., Inyang, M., & Zimmerman, A. R. (2012). Effect of biochar amendment on sorption and leaching of nitrate, ammonium, and phosphate in a sandy soil. Chemosphere, 89(11), 1467–1471.

Ye, M., Yin, C., Fan, X., Gao, Z., Chen, H., Tan, L., Chang, S. X., Zhao, Y., & Liang, Y. (2021). Procyanidin inhibited N_2O emissions from paddy soils by affecting nitrate reductase activity and nirS- and nirK-denitrifier populations. Biology and Fertility of Soils, 57, 935–947.

Zhu, J. G., Liu, G., Han, Y., Zhang, Y. L., & Xing, G. X. (2003). Nitrate distribution and denitrification in the saturated zone of paddy field under rice/wheat rotation. Chemosphere, 50(6), 725–732.