



文章栏目：流域水环境整治与修复

DOI 10.12030/j.cjee.202304122 中图分类号 X505 文献标识码 A

闫玉清, 李立青, 马旭高. 生物滞留土壤质地与汇流比对微生物硝化、反硝化过程的影响[J]. 环境工程学报, 2023, 17(8): 2484-2493.
[YAN Yuqing, LI Liqing, MA Xugao. Effects of soil media texture and watershed area ratio on microbial nitrification and denitrification in established bioretention systems[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(8): 2484-2493.]

生物滞留土壤质地与汇流比对微生物硝化、反硝化过程的影响

闫玉清, 李立青[✉], 马旭高

中国地质大学(武汉)环境学院, 武汉 430074

摘要 生物滞留是工程设计的土壤-植物-微生物共同作用的系统, 可有效收集和处理城市地表径流。但是, 对城市地表径流氮污染去除变化范围大。由于缺乏直接定量生物滞留反硝化微生物丰度和活性以及工程设计的影响, 限制了提高氮去除的工程设计优化。我们在海绵城市建设试点常德选择了 15 个土壤基质质地和汇流比设计不同的生物滞留设施(湿式生物滞留和干式生物滞留), 通过采集土壤基质, 测定生物滞留土壤基质反硝化潜势(DEA)和硝化潜势(PN), 采用 qPCR 定量硝化基因(*amoA*)和反硝化基因(*narG*、*napA*、*nirS*、*nirK*、*norB*和*nosZ*)丰度, 研究生物滞留土壤质地与汇流比对微生物硝化与反硝化过程的影响。结果表明, 生物滞留土壤质地与汇流比对土壤基质微生物反硝化潜势与反硝化功能基因丰度具有重要的影响。土壤基质为粘壤土和高汇流比设计的湿式生物滞留微生物反硝化功能基因与反硝化潜势显著高于壤土基质与低汇流比的干式生物滞留。湿式和干式生物滞留 DEA 分别为 $2.47 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $0.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 总反硝化功能基因丰度分别为 $1.80 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.70 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 。土壤基质反硝化菌群与反硝化潜势随基质粘粒含量和汇流比升高而增加。滞水设计或处于饱和淹水状况明显可提高微生物反硝化功能。另外, 微生物反硝化功能基因丰度与反硝化潜势也与土壤基质中有机碳和 TN 呈明显正相关。通过改进生物滞留工程设计可增加反硝化作用并减少氮向受纳水体的输出。本研究结果可为提高城市地表径流氮污染去除效果提供工程案例参考。

关键词 城市地表径流; 生物滞留设施; 工程设计; 反硝化潜势; 反硝化功能基因

城市地表径流是受纳水体氮污染的主要来源, 耦合城市化水文效应是导致城市水体黑臭、富营养化与水生态受损的重要原因^[1]。为减轻城市化对流域水文、环境和水生态的负面影响, 新一代城市地表径流低影响开发措施应运而生(low impact development, LID)^[2]。生物滞留是 LID 的典型代表, 耦合土壤-植物-微生物作用收集、处理不透水地表产生的径流, 通过渗滤、蒸散发, 不仅能有效减少地表径流量, 而且具有去除污染物的功能^[3]。

2014 年以来, 为了解决快速城市化导致的雨洪及地表径流污染, 我国提出建设“海绵城市”的自然解决方案^[4]。全国已有 30 个城市开展并完成海绵城市建设试点, 以生物滞留设施为代表的海绵措施被推广应用。野外监测表明生物滞留能有效去除地表径流中磷、重金属、石油烃等污染物^[2], 但是对氮素去除变化范围很大^[5-7]。生物滞留对城市地表径流氮污染去除的不确定与多种形态氮素复杂的生物地球化学转化过程有关^[8]。带负电荷的 NO_3^- 和 NO_2^- 在土壤中易淋溶迁移, 很难滞留去除。相反, 其他形态氮, 如 PON 能被土壤物理截留, 但是随后在土壤基质好氧条件下发生矿

收稿日期: 2023-04-26; 录用日期: 2023-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41977155)

第一作者: 闫玉清(1998—), 女, 硕士研究生, yanyuqing413@163.com; 通信作者: 李立青(1977—), 男, 博士, 副教授, lilq@cug.edu.cn

化、氨化和硝化为 NO_3^- ，在后续降雨期淋溶输出^[9]。反硝化是微生物厌氧呼吸形式，通过多种酶(编码基因 *narG/napA*、*nirS/nirK*、*norB* 和 *nosZ*) 将 NO_3^- 逐步催化还原为惰性氮气，是从土壤或水体中永久去除 NO_3^- 的主要途径^[10]。

目前，生物滞留设计研究主要集中于优化植物种植、土壤基质组成、饱和区设计和添加碳源，增加对城市地表径流氮素的去除效率^[11-13]，但缺乏对建成生物滞留设施硝酸盐去除功能与反硝化功能菌群的研究。CHEN 等^[14] 和 MOGHADAM 等^[15] 都对单个已建生物滞留反硝化功能基因的研究表明，生物滞留表层基质中反硝化功能基因主要分布在植物根层 0~15 cm 或 0~20 cm，且土壤基质的淹水或饱和时间和有机碳含量影响反硝化菌群丰度。HUANG 等^[16] 在室内采用生物滞留模拟柱研究，发现种植植物根系可明显提高生物滞留土壤基质表层 (0~25 cm) 反硝化功能基因 *nirS* 和 *nosZ* 丰度，设置饱和区，特别是同时添加碳源(块)显著增加 *nirS* 和 *nosZ* 丰度，能明显提高硝酸盐的去除效率。因此，生物滞留土壤基质组成、种植植物以及进水负荷(汇流比)决定基质水分状况、水力停留时间及碳源的可利用性等，可能影响反硝化菌群丰度与活性，进而影响硝酸盐的去除作用。

本研究选择常德市 15 个土壤基质组成与汇流比不同的已建成生物滞留设施，测定土壤基质反硝化潜势与功能基因 (*narG/napA*、*nirS/nirK*、*norB* 和 *nosZ*) 丰度，研究并揭示生物滞留土壤质地与汇流比对微生物反硝化潜势与功能群组成的影响机制，以期为提高城市地表径流氮污染去除的工程设计提供参考。

1 材料与方法

1.1 生物滞留设施选择与样品采集

本研究中的生物滞留设施属于海绵城市试点常德海绵示范工程。常德市位于湖南省西北部，属亚热带季风湿润气候区。该市气候温暖、四季分明、雨量丰沛，年平均气温 16.7 °C，年降水量 1 200~1 900 mm，无霜期 272 d。常德市是首批 16 个海绵城市建设试点城市之一，试点区的面积为 36.1 km²。

通过收集海绵城市建设资料、走访设计工程师和现场调查，根据生物滞留土壤基质质地(测定)和设计汇流比(调查)，选择了 15 个生物滞留设施(图 1)。这 15 个生物滞留分为 2 类，分别为

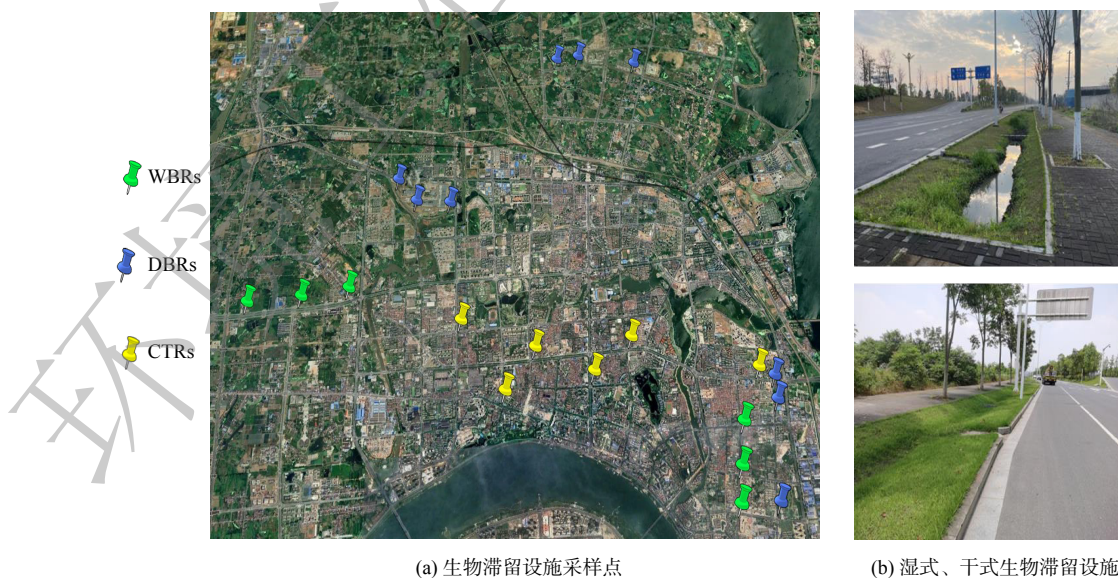


图 1 生物滞留设施采样点及设施实物图

Fig. 1 Location of the bioretention cells sampling sites and wet and dry bioretention cells

9个干式生物滞留设施 (dry bioretention cells, DBRs) 和 6个湿式生物滞留设施 (wet bioretention cells, WBRs) (表1)。这些生物滞留设施都是通过改造道路隔离带绿地建成, 以收集和处理道路附近区域地表径流。

干式、湿式生物滞留结构与种植层人工土壤质地的组成见图2。干式生物滞留设施表层种植层土壤为人工改良的壤土 (30~35 cm), 湿式生物滞留设施表层种植土壤为人工改良的粘壤土 (30~35 cm)。两类生物滞留设施的中间过度砂层 (10~15 cm) 相同, 底部均为砾石层 (30~60 cm)。砾石层中设置穿孔排水管 ($\Phi=10\sim15\text{ cm}$)。种植植物都为沟叶结缕草 (*Zoysia matrella*)。干式生物滞留设施种植层为壤土, 汇流比为 4~6, 收集的地表径流能很快入渗, 在两次降雨间隔期很少看到积水, 常保持干燥。而湿式生物滞留种植土壤为粘壤土, 汇流比均 >10 , 类似于湿地, 降雨后存在滞水, 其土壤层在较长时间内保持潮湿的状态。因此, 本研究可探究生物滞留土壤基质质地与水文状况对反硝化过程的影响。另外, 在未进行海绵设施改造的道路, 选择 6处隔离带绿地 (controls, CTRs)。这些未经改造的隔离带绿地不具有收集、处理地表径流的功能, 可作为干式、湿式生物滞留设施硝化、反硝化微生物过程研究的对照。

2022年6月, 于 24 h 之内对 9个干式生物滞留设施、6个湿式生物滞留设施和 6处道路隔离绿地采集土壤基质样品。对于每个生物滞留设施, 在进水前端、中部和溢流后端均匀分布 6个样点。考虑到结缕草根系主要分布在土壤 0~10 cm, 采用直径 2.5 cm 土钻采集表层 0~10 cm 的样品 6个, 将所有样品混合形成 1个土壤基质样品, 即每个生物滞留设施有 1个土壤基质样品。道路隔

表 1 湿式和干式生物滞留设施的人工种植土组成与汇流比
Table 1 Soil media texture and watershed area ratio in the wet and dry bioretention cells

设施类型	n	汇流比	土壤质地	种植植物	滞水情况
湿式生物滞留	6	>10	粘质壤土粘粒 $19.5\pm 1.6\%$, 砂粒 $13.0\pm 3.9\%$	沟叶结缕草	降雨期和间隔期存在滞水, 或保持湿润状态
干式生物滞留	9	4~6	壤土粘粒 $14.7\pm 0.5\%$, 砂粒 $26.2\pm 4.5\%$	沟叶结缕草	降雨期无明显滞水, 间隔期保持干燥状态
道路隔离带绿地	6	—	粘质壤土/壤土	沟叶结缕草	不收集、处理地表径流

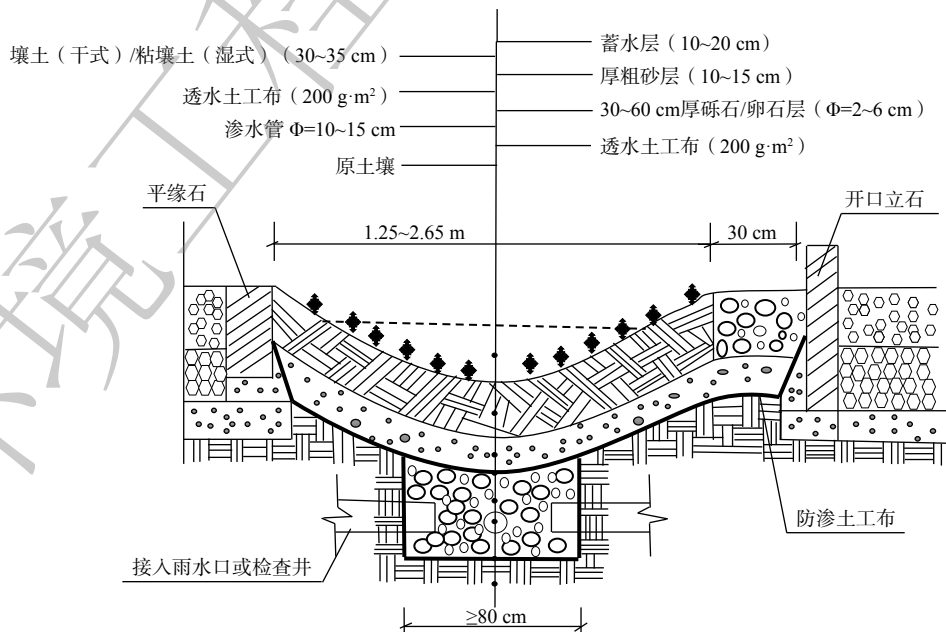


图 2 干式和湿式生物滞留结构与种植层人工土壤质地的组成
Fig. 2 Engineered structure and soil media texture in the dry and wet bioretention cells

离绿地同样采集 3 个土壤表层样品混合形成 1 个土壤样品 (0~10 cm)。采样期间或之前一周内未记录到降雨。采集的土壤基质样品储存在无菌自封袋，冷藏保存运输到实验室。一部分样品在实验室冷藏用于微生物反硝化潜势、硝化潜势测定等测定；另一部分样品分保存至 -80 °C 超低温冰箱，用于微生物硝化和反硝化功能基因定量。

1.2 土壤基质的微生物反硝化、硝化潜势的测定

采集的生物滞留土壤基质样品利用氯酸盐抑制法测定土壤基质的硝化潜势 (potential nitrification rate, PN)^[17]。取 5 g 新鲜过滤基质样品于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 硫酸铵缓冲溶液 (1 mmol·L⁻¹)，5 mL 氯酸钾溶液 (终质量浓度为 10 g·L⁻¹) (抑制亚硝酸盐的进一步反应)，室温黑暗培养 24 h，根据亚硝氮质量浓度的变化计算土壤硝化潜势 (mg·kg⁻¹·h⁻¹)。

采用室内乙炔抑制法测定反硝化潜势 (denitrification enzyme assays, DEA)^[17]。称取 5 g 新鲜过滤基质样品于 125 mL 体积的厌氧培养瓶中，添加 15 mL 培养液 (100 mg·L⁻¹NO₃⁻和 500 mg·L⁻¹葡萄糖)，密封、抽真空，N₂ 吹 2 次。向瓶内冲入 10 mL 乙炔气体 (C₂H₂)，抑制 N₂O 还原为 N₂。水平振荡 (25 °C, 180 r·min⁻¹) 120 min 采集气样。采用气相色谱 (GC, Agilent 7890A, ECD) 测定气样 N₂O。根据 N₂O 生成量计算 DEA (mg·kg⁻¹·h⁻¹)。

使用 pH 计按照水土比 5:1 (V/V) 的泥浆中测量土壤 pH。土壤含水率 (moisture content, MC) 通过在 105 °C 的烘箱中干燥 12 h 测定。土壤有机碳 (soil organic carbon, SOC) 采用浓硫酸-重铬酸钾消解法测定。土壤总氮 (TN) 用碱性过硫酸盐消解法测定。土壤中的 [NH₄⁺-N]、[NO₃⁻-N] 和 [NO₂⁻-N] 采用 1 mol·L⁻¹ KCl 浸提，离心后取上清液用纳氏试剂分光光度法测定 [NH₄⁺-N]，紫外分光光度法测定 [NO₃⁻-N]，分子吸收分光光度法测定 [NO₂⁻-N]。

1.3 土壤基质微生物硝化、反硝化功能基因定量

采用土壤 DNA 快速提取试剂盒 Fast DNA Spin Kit for Soil (MP bio, USA) 从土壤样品中提取 DNA。使用 NanoDrop 光度仪进行质量和总 DNA 浓度的测定。通过 SYBR Green I 染色法，使用 2 x SYBR qPCR Mix 试剂与 QuantStudio™ 3 实时荧光定量 PCR 仪，测定硝化功能基因 (*amoA*) 和反硝化功能基因 (*narG*、*napA*、*nirS*、*nirK*、*norB* 和 *nosZ*)，qPCR 引物和反应条件见表 2^[16,18]。反应体系为：正反向引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.2 μL，DNA 模板 (稀释 10 倍) 1 μL，2 x SYBR qPCR Mix 试剂 5 μL，无核酸酶纯净水补足溶液至 10 μL。每个实验样品平行测定 3 次，并设置空白对照，根据标准曲线

表 2 硝化功能基因和反硝化功能基因 qPCR 引物与反应条件

Table 2 Primer of nitrification and denitrification genes used for qPCR

微生物种群	基因	序列信息 (5'-3')	反应条件
硝化细菌	<i>amoA</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	95 °C, 30 s; 95 °C, 15 s, 50 个循环; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s
		<i>napA</i>	GTG ATG GAR GAA AAA TTC AA GAR CCG AAC ATG CCR AC
	<i>narG</i>	TAYGTSGGGCAGGARAACTG CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGT	95 °C, 3 min; 95 °C, 15 s, 45 个循环; 60 °C, 1 min; 72 °C, 30 s
反硝化细菌	<i>nirK</i>	ATYGGCGGVAYGGCGA GCCTCGATCAGRTRTGGTT	95 °C, 30 s; 95 °C, 10 s, 40 个循环; 65 °C, 30 s; 72 °C, 30 s
	<i>nirS</i>	AACGYSAAGGARACSGG GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA	95 °C, 30 s; 95 °C, 10 s, 40 个循环; 65 °C, 30 s; 72 °C, 30 s
	<i>norB</i>	GACAAGNNNTACGGTGGT GAANCCCANACNCCNGC	95 °C, 30 s; 95 °C, 10 s, 40 个循环; 50 °C, 30 s; 72 °C, 30 s
	<i>nosZ</i>	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG CGSACCTTSTTGCCSTYGC	95 °C, 30 s; 95 °C, 10 s, 40 个循环; 65 °C, 30 s; 72 °C, 30 s

计算各基因拷贝数。本研究中标准曲线的扩增效率为 90%~110%，相关性大于 0.99。

1.4 数据处理与分析

在 R 语言中“vegan” (<https://github.com/vegandevs/vegan>) 包中“RDA”功能进行冗余分析 (Redundancy analysis, RDA), 探究生物滞留土壤基质组成 (含砂量) 和汇流比以及环境因子 (SOC、TN、 $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ 、 $[\text{NO}_2^--\text{N}]$ 、MC、pH、 $[\text{NH}_4^+-\text{N}]$) 对硝化基因 (*amoA*) 和反硝化基因 (*narG*、*napA*、*nirS*、*nirK*、*norB* 和 *nosZ*) 的影响。在 Origin 中采用 Pearson 相关分析对微生物变量与理化变量之间的关系进行了线性回归分析。在 SPSS 中通过方差分析 (ANOVA) 和 Tukey's honest 显著性检验, 确定干式生物滞留 (DBRs) 和湿式生物滞留 (WBRs) 之间的具体差异, 分析不同生物滞留工程设计的影响。当 $P < 0.05$ 时, 所有效应均显著。

2 结果与分析

2.1 生物滞留设施土壤基质硝化、反硝化潜势特征

图 3 是湿式生物滞留 (WBRs)、干式生物滞留设施 (DBRs) 及隔离带绿地 (Controls) 硝化潜势 (PN) 和反硝化潜势 (DEA) 和比较。WBRs 中 PN 为 $0.45 \sim 1.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, DBRs 中 PN 为 $0.18 \sim 0.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, CTRs 中 PN 为 $0.00 \sim 0.13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。WBRs 的 PN 显著高于 DBRs 和 CTRs ($P < 0.001$), 但 DBRs 和 CTRs 的 PN 没有显著差异 ($P > 0.05$)。WBRs 中 DEA 为 $0.99 \sim 5.30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, DBRs 中 DEA 为 $0.02 \sim 0.53 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, CTRs 中 DEA 为 $0.00 \sim 0.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。WBRs 的 DEA 显著高于 DBRs 和 CTRs ($P < 0.001$), 而 DBRs 和 CTRs 的 DEA 没有显著差异 ($P > 0.05$)。

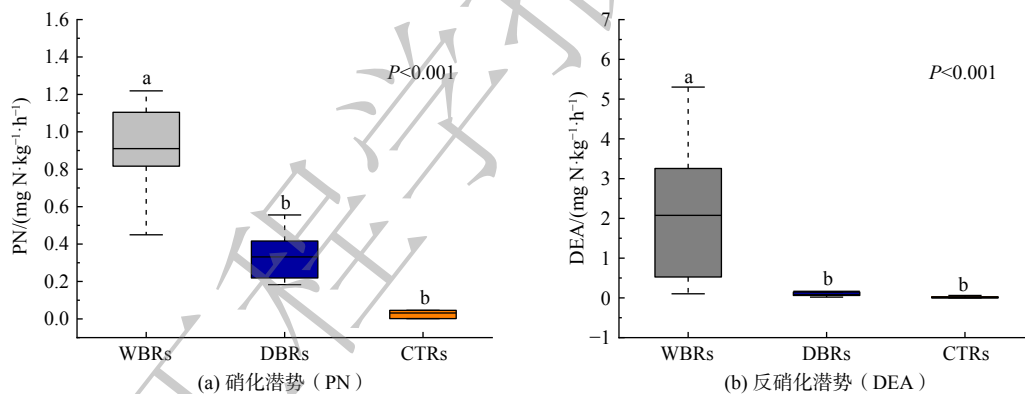


图 3 湿式生物滞留 (WBRs)、干式生物滞留 (DBRs) 和隔离带绿地 (CTRs) 土壤基质中硝化潜势 (PN) 和反硝化潜势 (DEA)

Fig. 3 Potential nitration rate (PN) and denitrification enzyme activity (DEA) in the wet/dry bioretention cells and road medians

表 3 是湿式生物滞留 (WBRs)、干式生物滞留设施 (DBRs) 及隔离带绿地 (CTRs) 土壤基质理化性质比较。WBRs 土壤基质含水率 ($37.4\% \pm 3.4\%$) 显著高于 DBRs ($17.18\% \pm 0.68\%$) 和 CTRs ($11.18\% \pm 3.08\%$) ($P < 0.001$)。WBRs 中 SOC 为 $33.12 \sim 51.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 显著高于 DBRs ($15.16 \sim 21.95 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.001$)。对 $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ 、 $[\text{NO}_2^--\text{N}]$ 、TN 也观察到相似模式。WBRs ($15.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 5.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 与 DBRs ($10.57 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 4.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ 显著高于 CTRs ($1.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 1.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.001$)。WBRs ($0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 $[\text{NO}_2^--\text{N}]$ 显著高于 DBRs ($0.004 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 CTRs ($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.01$)。WBRs ($2.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 0.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 TN 显著高于 DBRs ($1.11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 0.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 CTRs ($1.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \pm 0.81 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.05$)。但是 $[\text{NH}_4^+-\text{N}]$ 没有显著性差异, 所有位点的 pH 都接近中性, 没有显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3 湿式生物滞留 (WBRs)、干式生物滞留 (DBRs) 和隔离带绿地 (CTRs) 土壤基质理化性质比较

Table 3 Physical and chemical characteristics of the wet/dry bioretention cells and road medians

设备类型	<i>n</i>	pH	MC	SOC/(g·kg ⁻¹)	TN/(g·kg ⁻¹)	[NO ₂ ⁻ -N]/(g·kg ⁻¹)	[NO ₃ ⁻ -N]/(g·kg ⁻¹)	[NH ₄ ⁺ -N]/(g·kg ⁻¹)
湿式生物滞留	6	7.48±0.10	37.4 %±3.4% ^a	38.46±3.68 ^a	2.30±0.36 ^a	0.06±0.01 ^a	15.34±2.34 ^a	1.32±0.22
干式生物滞留	9	7.59±0.07	16.2 %±1.1% ^b	17.18±0.68 ^b	1.11±0.08 ^b	0.04±0.01 ^b	10.57±1.34 ^a	0.94±0.07
道路隔离绿地	6	7.59±0.11	15.7%±1.4% ^b	11.18±3.08 ^b	1.04±0.81 ^b	0.01±0.00 ^b	1.23±0.59 ^b	1.55±0.29

2.2 生物滞留设施土壤基质硝化、反硝化基因丰度特征

图 4 为湿式生物滞留 (WBRs)、干式生物滞留 (DBRs) 和隔离带绿地 (CTRs) 土壤中硝化 (*amoA*)、反硝化功能基因 (*narG/napA*、*nirK/nirS*、*norB* 和 *nosZ*) 丰度比较。表 4 为 WBRs、DBRs 和 CTRs 土壤中硝化、反硝化功能基因的方差分析。WBRs 土壤基质中反硝化基因 *narG*、*napA*、*nirS* 丰度显著高于 DBRs 和 CTRs，而 DBRs 和 CTRs 没有显著差异。*narG* 基因在 WBRs 土壤基质中平均密度为 (6.54×10⁷±1.05×10⁷) copies·g⁻¹，DBRs 中平均密度为 (3.16×10⁷±6.03×10⁶) copies·g⁻¹，CTRs 中平均密度为 (6.69×10⁶±5.95×10⁶) copies·g⁻¹。*napA* 基因在 WBRs 土壤基质中平均密度为 (3.12×10⁸±3.71×10⁷) copies·g⁻¹，DBRs 中平均密度为 (1.66×10⁸±2.33×10⁷) copies·g⁻¹，CTRs 中平均密度为 (7.35×10⁷±3.17×10⁷) copies·g⁻¹。WBRs 土壤基质中 *nosZ* 平均密度为 (1.26×10⁸±3.12×10⁷) copies·g⁻¹，与 DBRs ((7.99×10⁷±2.58×10⁷) copies·g⁻¹) 中密度没有显著差异，但显著高于 CTRs ((1.29×10⁷±3.50×10⁶) copies·g⁻¹)，而

表 4 湿式生物滞留、干式生物滞留及隔离带绿地土壤基质硝化、反硝化功能基因方差分析

Table 4 Analysis of Variance Results for nitrification and denitrification gene copies among the wet/dry bioretention cells and road medians

功能基因种类及项目	<i>p</i>	湿式生物滞留	干式生物滞留	道路隔离带
<i>amoA</i>	0.085	NA	NA	NA
<i>narG</i>	<0.01	a	b	b
<i>napA</i>	<0.01	a	b	b
<i>nirS</i>	<0.001	a	b	b
<i>nirK</i>	0.084	NA	NA	NA
<i>nosZ</i>	<0.01	a	ab	b
反硝化基因丰度和	<0.001	a	b	b

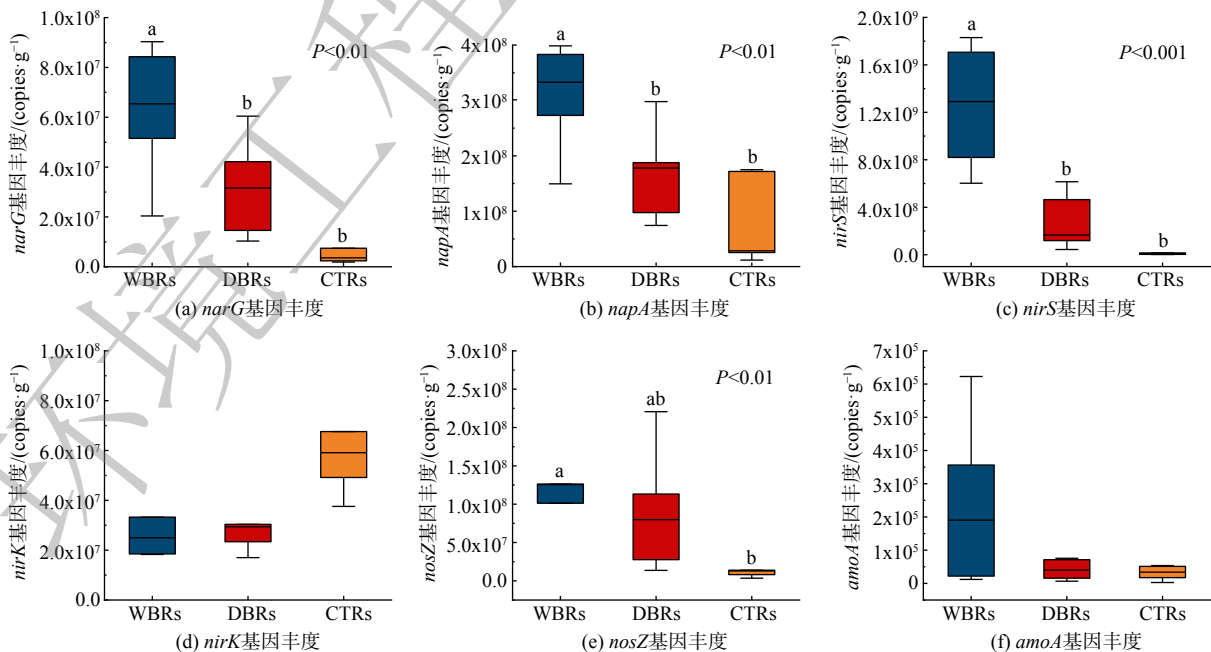


图 4 湿式生物滞留 (WBRs)、干式生物滞留 (DBRs) 及隔离带绿地 (CTRs) 土壤基质硝化、反硝化功能基因丰度

Fig. 4 Nitrification and denitrification gene copies in the wet/dry bioretention cells and road medians

DBRs 与 CTRs 无显著差异。*nirK* 与 *amoA* 基因在 WBRs、DBRs 和 CTRs 土壤基质中都没有显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 影响硝化、反硝化潜势与功能基因丰度的因子

表 5 为生物滞留设施硝化、反硝化功能基因丰度与土壤基质组成 (含砂量) 和汇流比, 以及环境因子的相关性分析。图 5 为 WBRs、DBRs 和 CTRs 土壤基质中基因丰度与土壤基质组成 (含砂量) 和汇流比以及环境因子的冗余度分析。生物滞留土壤基质硝化潜势 (PN) 与硝化功能基因 *amoA* ($r=0.59$, $P<0.05$) 呈正相关。生物滞留土壤基质反硝化潜势 (DEA) 与功能基因 *nirS* ($r=0.82$, $P<0.001$)、*narG* ($r=0.77$, $P<0.001$) 和 *napA* ($r=0.78$, $P<0.001$) 呈极显著正相关, 与 *nirK* ($r=0.65$, $P<0.05$) 和 *nosZ* ($r=0.59$, $P<0.05$) 呈正相关。

表 5 生物滞留硝化、反硝化功能基因丰度与土壤基质组成 (含砂量) 和汇流比以及环境因子的相关性分析
Table 5 Spearman's correlation coefficients between nitrification/denitrification gene copies and soil media texture /watershed area ratio and environmental controls in the bioretention cells

功能基因种类及项目	pH	MC	TN	NO ₂ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	SOC	汇流比	砂含量	DEA	PN
<i>narG</i>	-0.23	0.74**	0.82***	0.29	0.41	0.66**	0.74**	0.68*	-0.19	0.77***	0.59*
<i>napA</i>	-0.23	0.81***	0.83***	0.59*	0.49	0.69**	0.81***	0.72**	-0.16	0.78***	0.67**
<i>nirK</i>	-0.47	0.48	0.56*	0.30	0.61*	0.34	0.42	0.23	-0.22	0.65*	0.25
<i>nirS</i>	-0.37	0.79***	0.86***	0.52*	0.36	0.68**	0.88***	0.88***	-0.31	0.82***	0.79***
<i>nosZ</i>	-0.033	0.44	0.42	0.099	0.53*	0.11	0.34	0.31	-0.40	0.59*	0.22
<i>amoA</i>	-0.10	0.33	0.63*	0.35	-0.21	0.58*	0.63*	0.45	-0.15	0.45	0.59*
DEA	-0.48	0.87***	0.91***	0.52*	0.61*	0.67**	0.89***	0.81***	-0.51*	-	0.70**
PN	-0.33	0.74***	0.85***	0.67**	0.24	0.70**	0.88***	0.64**	-0.25	0.70**	-

注: *** $P<0.001$; ** $0.001<P<0.01$; * $0.01<P<0.05$; 数字代表Pearson相关系数 r 。

生物滞留土壤基质硝化潜势 (PN) 与土壤基质含水率 (MC)、有机碳 (SOC)、TN 和 [NO₃⁻-N] 呈极显著或显著正相关 ($P<0.01$)。生物滞留土壤基质反硝化潜势 (DEA) 和功能基因 *nirS* 与汇流比呈极显著正相关 ($P<0.001$)，反硝化功能基因 *napA* 和 *narG* 与汇流比呈显著相关 ($P<0.01$) 和相关 ($P<0.05$)。生物滞留土壤基质反硝化潜势与土壤基质砂含量呈负相关 ($r=-0.51$, $P<0.05$)。生物滞留土壤基质反硝化潜势和功能基因 (*nirS*、*narG*、*napA*) 与土壤基质含水率 (MC)、有机碳 (SOC)、TN 和 [NO₃⁻-N] 呈极显著或显著正相关 ($P<0.01$)。影响生物滞留微生物反硝化过程的工程设计变量为汇流比和土壤基质砂含量, 环境因子为 MC、TN、SOC。RDA 的前 2 个轴分别解释了数据总变异的 81.71% 和 0.78%, 共同解释了 82.49%。汇流比的单独解释量为 77.20%, 与反硝化功能基因丰度显著相关 ($F=64.5$, $P=0.002$), 是影响生物滞留土壤基质反硝化功能的主要因素。

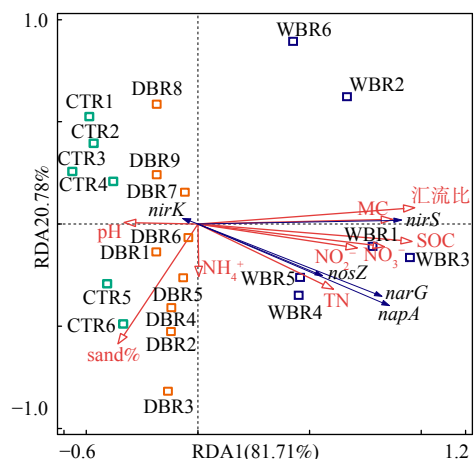


图 5 湿式、干式生物滞留和隔离带绿地土壤反硝化功能基因与土壤基质组成 (含砂量) 和汇流比以及环境因子的冗余度分析

Fig. 5 RDA analysis of the relationship between denitrification gene copies and soil media texture/watershed area ratio and environmental controls in the wet/dry bioretention cells and road medians

3 讨论

本研究的目标是研究城市地表径流控制措施生物滞留土壤质地、汇流比与环境因子(SOC、TN、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、MC、pH、NH₄⁺-N)对微生物硝化、反硝化过程的影响。采用了微生物反硝化酶活测试表征研究区或研究点潜在反硝化功能^[17]。尽管DEA不能代表现场微生物反硝化速率,但可用来比较不同点反硝化能力的差异。湿式生物滞留反硝化潜势明显高于干式生物滞留。反硝化是多种酶(编码基因*narG/napA*、*nirS/nirK*、*norB*和*nosZ*)将NO₃⁻逐步催化还原为惰性氮气的过程^[10]。上游还原反应可能影响下游反应能力,如土壤基质中*narG/napA*的丰度水平低,后续还原反应速率也可能降低。湿式生物滞留土壤基质中反硝化功能基因*narG/napA*和*nirS*都显著高于干式生物滞留,与反硝化潜势结果一致,并呈极显著正相关。相反*nirK*和*nosZ*在湿式和干式生物滞留土壤基质中没有明显差异。因此,*narG/napA*和*nirS*基因可作为生物滞留土壤基质反硝化生物标记分子。不同环境的反硝化过程中起主导作用的基因可能不同。LIGI等^[19]研究湿地中的反硝化功能基因发现*nirS*基因占主导地位,而刘妍霁等^[20]在钱江源国家森林公园研究亚热带森林土壤添加氮、磷对反硝化功能基因丰度影响,发现*nirK*基因丰度约为*nirS*基因的100倍。本研究中生物滞留设施,特别是湿式生物滞留土壤基质中*nirS*的丰度远大于*nirK*,起主导作用,而道路隔离带绿地则相反,这说明道路地表径流的输入使生物滞留设施的土壤基质与常处于饱和状态的湿地土壤更相似。

土壤基质为粘壤土和高汇流比设计的湿式生物滞留微生物反硝化功能基因(*narG/napA*和*nirS*)与反硝化潜势显著高于壤土基质与低汇流比的干式生物滞留。生物滞留土壤质地与汇流比对土壤基质微生物反硝化潜势与反硝化功能基因具有重要影响。生物滞留土壤基质反硝化菌群丰度与反硝化潜势随基质粘粒含量和汇流比升高而增加。生物滞留高汇流比的工程设计意味着收集、处理更大范围的地表径流,水力负荷高,同时增加了进水中有机质和TN负荷。土壤质地为粘质壤土(粘粒含量高)的湿式生物滞留一方面可有效过滤、截留和累积地表径流污染物,包括有机质和营养物,促进微生物反硝化^[21]。另外,粘粒含量高的土壤基质,渗透性弱,增加水力停留时间,易于形成缺氧环境,也是微生物反硝化潜势与反硝化功能基因高的主要原因,而砂含量高的土壤基质,渗透性强,水在重力作用下快速排出,微生物活性低^[22]。

生物滞留土壤基质反硝化功能基因丰度、反硝化潜势也与土壤基质含水率、有机碳和TN含量的正相关关系,这表明湿式生物滞留设施工程土壤能够维持高反硝化潜势。这主要是由于这些设施设计收集、处理含有机碳和氮的道路地表径流^[1]。BETTEZ等^[17]发现地表径流控制工程土壤基质的反硝化潜势与含水率、有机碳具有显著的正相关性。WALLER等^[23]也发现生物滞留设施土壤中*nirK*基因丰度和反硝化潜势与有机碳有较强的正相关性。以上结果均表明城市地表径流控制工程土壤或过滤介质中有机碳作为反硝化细菌的电子供体,是影响反硝化功能的关键因子。土壤含水率会通过影响基质中的氧气可利用性来影响微生物对氮素的转化^[24]。生物滞留工程土壤反硝化功能与含水率、有机碳和TN的这种相关性也与其他研究自然非工程土壤反硝化结果相似^[25]。

生物滞留过滤基质组成与质地是工程设计主要变量,不仅影响着对地表径流污染沉淀、过滤和吸附等物理、化学过程,而且通过影响有机质含量和水分变化状况,进而影响植物和微生物对污染吸收与转化过程,包括微生物反硝化^[10]。另外,进水水力负荷(汇流比)大小设计除了影响生物滞留截留、累积地表径流中有机质,也影响生物滞留过滤基质的水分状况,从而控制生物滞留微生物反硝化过程。本研究通过采集生物滞留表层0~10 cm过滤基质,捕集生物滞留过滤基质有机质含量和水分变化,进而比较生物滞留设施过滤基质微生物硝化和反硝化空间差异。CHEN等^[14]和MOGHADAM等^[15]都对单个已建生物滞留反硝化功能基因研究表明,生物滞留表层基质中反硝化功能基因主要分布在植物根层0~15 cm或0~20 cm,同基质有机质分布一致。WALLER等^[23]比较了23个生物滞留设施过滤基质深度、含砂量和植物多样性对微生物反硝化功能基因与反硝化潜势的影响表明,有机质含量高和植物根系主要分布层0~10 cm反硝化功能基因与反硝化潜势显著高于下层基质,0~10 cm过滤基质有机质含量和植物根系分布是影响生物滞留微生物反硝化过程空间差异的关键因素。因此,比较生物滞留设施过滤基质组成与汇流比对反硝化功能影响,采集有机质和含水量变化明显的表层0~10 cm过滤基质是可行的,也可降低研究测定成本。另外,研究区常德

市是第一批海绵城市建设试点, 据调查从生物滞留基质组成与汇流比具有明显差异角度, 选择了16个建成运行的生物滞留设施, 比较工程设计变量基质质地与汇流比对微生物反硝化过程的影响。同时, 选择了6处城市道路隔离带绿地, 这些绿地土壤是城市园林绿化用土壤, 与生物滞留设施过滤基质工程设计不同。另外, 道路隔离带绿地不具有收集、处理周围不透水地表径流功能, 故作为生物滞留设施反硝化功能研究的参照。以上结果表明, 无论是干式或湿式生物滞留反硝化功能基因与反硝化潜势都明显高于道路隔离带绿地, 城市地表径流控制措施生物滞留土壤基质与汇流比是影响微生物反硝化除氮的重要工程设计变量。未来还需要通过直接监测地表进、出水水质、过滤基质剖面微生物功能基因动态, 进一步建立生物滞留反硝化除氮与过滤基质组成与深度、水力负荷等工程设计变量关系, 以优化生物滞留工程设计提高对地表径流氮污染的去效率。

4 结论

1) 土壤基质为粘壤土和高汇流比设计的湿式生物滞留微生物反硝化功能基因与反硝化潜势显著高于壤土基质与低汇流比的干式生物滞留。湿式和干式生物滞留 DEA 分别为 $2.47 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $0.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 总反硝化功能基因丰度分别为 $1.80 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.70 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 。2) 生物滞留工程设计对土壤基质微生物反硝化潜势与反硝化功能基因具有重要的影响。土壤基质反硝化菌群与反硝化潜势随基质粘粒含量和汇流比升高而增加。微生物反硝化功能基因丰度与反硝化潜势也与土壤基质含水率、有机碳和 TN 呈明显正相关。3) 滞水设计或处于饱和淹水状况明显可提高生物反硝化功能。通过改进生物滞留工程设计可增加反硝化作用并减少氮向受纳水体的输出。

致谢 感谢常德德瀚工程咨询服务有限公司张雅琳女士在研究生物滞留设施选择和工程设计信息方面提供的支持与帮助!

参考文献

- [1] PAMURU S T, FORGIONE E, CROFT K, et al. Chemical characterization of urban stormwater: Traditional and emerging contaminants[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 813: 151887.
- [2] ECKART K, MCPHEE Z, BOLISETTI T. Performance and implementation of low impact development – A review[J]. *Science of The Total Environment*, 2017, 607-608: 151887.
- [3] DAVIS A P, HUNT W F, TRAVER R G, et al. Bioretention technology: Overview of current practice and future needs[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2009, 135(3): 109-117.
- [4] JIANG C B, LI J K, HU Y H, et al. Construction of water-soil-plant system for rainfall vertical connection in the concept of sponge city: A review[J]. *Journal of Hydrology*, 2022, 605: 127327.
- [5] JIANG C B, LI J K, LI H, et al. Low-impact development facilities for stormwater runoff treatment: Field monitoring and assessment in Xi'an area, China[J]. *Journal of Hydrology*, 2020, 585: 124803.
- [6] LOPEZ-PONNADA E V, LYNN T J, ERGAS S J, et al. Long-term field performance of a conventional and modified bioretention system for removing dissolved nitrogen species in stormwater runoff[J]. *Water Research*, 2020, 170: 115336.
- [7] LINTERN A, MCPHILLIPS L, WINFREY B, et al. Best management practices for diffuse nutrient pollution: Wicked problems across urban and agricultural watersheds[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(15): 9159-9174.
- [8] COLLINS K A, LAWRENCET J, STANDER E K, et al. Opportunities and challenges for managing nitrogen in urban stormwater: A review and synthesis[J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36(11): 1507-1519.
- [9] LI L Q, DAVIS A P. Urban stormwater runoff nitrogen composition and fate in bioretention systems[J]. *Environmental science & technology*, 2014, 48(6): 3403-3410.
- [10] BISWAL B, VIJAYARAGHAYAN K, ADAM M, et al. Biological nitrogen removal from stormwater in bioretention cells: a critical review[J]. *Critical reviews in biotechnology*, 2021: 1-23.
- [11] 李立青, 胡楠, 刘雨情, 等. 3种生物滞留设计对城市地表径流溶解性氮的去除作用[J]. *环境科学*, 2017, 38(5): 1881-1888.
- [12] LI L Q, YANG J M, DAVIS A P, et al. Dissolved inorganic nitrogen behavior and fate in bioretention systems: Role of vegetation and saturated zones[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2019, 145(11): 04019074.
- [13] KONG Z, MA H Y, SONG Y Q, et al. A long term study elucidates the relationship between media amendment and pollutant treatment in the stormwater bioretention system: Stability or efficiency[J]. *Water Research*, 2022, 225: 119124.
- [14] CHEN X L, PELTIER E, STURM B S M, et al. Nitrogen removal and nitrifying and denitrifying bacteria quantification in a stormwater bioretention system[J]. *Water research*, 2013, 47(4): 1691-1700.
- [15] MOGHADAM S V, JAFARZADEH A, MATT A, et al. Evaluation of nitrogen removal, functional gene abundance and microbial community structure in a stormwater detention basin[J]. *Journal of environmental management*, 2023, 325: 116669.
- [16] HUANG L Q, LUO J Y, LI L Q, et al. Unconventional microbial mechanisms for the key factors influencing inorganic nitrogen removal in stormwater bioretention columns[J]. *Water research*, 2021, 209: 117895.
- [17] BETTEZ N D, GROFFMAN P M. Denitrification potential in

- stormwater control structures and natural riparian zones in an urban landscape[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(20): 10909-10917.
- [18] GEETS J, COOMAN M D, WITTEBOLLE L, et al. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2007, 75(1): 211-221.
- [19] LIGI T, TRUU M, TRUU J, et al. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (*nirS*, *nirK*, and *nosZ*) abundances in a created riverine wetland complex[J]. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 47-55.
- [20] 刘妍霁, 刘子恺, 金圣圣, 等. 亚热带森林土壤氨氧化微生物和反硝化微生物功能基因丰度对氮磷输入响应[J]. *应用生态学报*, 2023, 34(3): 639-646.
- [21] SKOROBOGATOY A, HE J, CHU A, et al. The impact of media, plants and their interactions on bioretention performance: A review[J]. *Science* (责任编辑: 靳炜)
- [22] PALTA M M, EHRENFELD J G, GIMENEZ D, et al. Soil texture and water retention as spatial predictors of denitrification in urban wetlands[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 101: 237-250.
- [23] WALLER L J, EVANYLO G K, KROMETIS L H, et al. Engineered and environmental controls of microbial denitrification in established bioretention cells[J]. *Environmental science & technology*, 2018, 52(9): 5358-5366.
- [24] ATTARD E, RECOUS S, CHABBI A, et al. Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17: 1975-1989.
- [25] SEITZINGER S, HARRISON J K, BOHLKE J K, et al. Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis[J]. *Ecological Applications*, 2006, 16(6): 2064-2090.

Effects of soil media texture and watershed area ratio on microbial nitrification and denitrification in established bioretention systems

YAN Yuqing, LI Liqing*, MA Xugao

School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

*Corresponding author, E-mail: lilq@cug.edu.cn

Abstract Bioretention systems (BRs) are systems of interaction of soil, plants, and microorganisms, designed to intercept stormwater runoff and reduce loads of water and contaminants discharged to surface waters. However, nitrogen removal efficiency is highly variable, which may be related to the nitrogen complex biogeochemical process that occur within bioretention systems. The nitrogen performance cannot be enhanced by a lack of data directly quantifying the abundance or activity of denitrifying microorganisms in BRs and how they are controlled by engineered designs. Six wet and nine dry bioretention cells (WBRs and DBRs) of different engineered designs in Changde City, including soil media texture and watershed area ratio, were sampled to measure potential nitrification (PN) and denitrification enzyme activity (DEA). Nitrification gene (*amoA*) and denitrification genes (*narG*, *napA*, *nirS*, *nirK*, *norB* and *nosZ*) were also quantified by the quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Results showed that BRs design factors, including soil media texture and watershed area ratio, had the greatest effects on variation in denitrifier abundance and activity. Denitrifying populations and denitrification potential increased with soil media clay content and watershed area ratio. Denitrification potential was higher in the wet bioretention systems ($2.47 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) compared to dry bioretention systems ($0.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). The WBRs also had significantly greater total denitrification genes copies than the dry WBRs, 1.80×10^9 vs 5.70×10^8 copies $\cdot \text{g}^{-1}$, respectively. Furthermore, denitrifying populations and denitrification potential increased with soil organic carbon and nitrogen concentrations. These results suggest that soil media texture and watershed area ratio improvement still have great potential when building bioretention systems that can enhance denitrification and reduce nitrogen loading to receiving waters.

Keywords urban stormwater runoff; bioretention systems; engineered designs; denitrification potential; denitrification functional genes