【专题：海绵城市 / Sponge City】

·特邀专题策划：刘建，任欣欣·

生物滞留池微生物种群的硝化反硝化功能研究

——以深圳市为例

李笑玥¹，秦华鹏¹，王凡²，银翼翔¹

1) 北京大学深圳研究生院环境与能源学院，城市人居环境科学与技术重点实验室，广东深圳 518055；

2) 中山大学大气科学学院，广东珠海 519082

摘要：生物滞留池是海绵城市建设中净化城市径流的重要设施，其中的微生物在径流氮处理中起到关键作用。为揭示生物滞留池氮去除机理，利用16S核糖体核糖核酸(ribosomal ribonucleic acid, rRNA)基因-Illumina MiSeq高通量测序技术和实时荧光定量方法，调查中国深圳市8个典型生物滞留池中总细菌的多样性与菌门水平分布，分析其中硝化与反硝化功能菌属的群落结构、功能基因丰度及其与环境因子的关系。结果表明：①生物滞留池的主要优势菌门为变形菌门、放线细菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、绿弯菌门和厚壁菌门，这些优势菌门的相对丰度占群落的93.49%~94.80%。②微生物群落中相对丰度最高的硝化功能菌是亚硝化单胞菌科和硝化螺旋菌属；相对丰度最高的反硝化功能菌是芽孢杆菌属，其次是赖氨酸芽孢杆菌属和假单胞菌属。③在不同生物滞留池中硝化和反硝化功能基因拷贝数表现出较大差异，其中，市政道路旁的生物滞留池采样点的硝化和反硝化功能基因丰度均呈现较高值。④生物滞留池中氮转化微生物的多样性及功能基因的丰度受体系结构、植被类型与污染负荷的综合作用，反硝化菌更容易受到环境因子的影响。本研究的微生物调查结果可为生物滞留池的氮去除功能的评估和提高提供思路。

关键词：海绵城市；环境科学；生物滞留池；高通量测序；硝化；反硝化；微生物群落结构；功能基因

中图分类号：X52

文献标志码：A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2021.01036

Nitrification and denitrification functions of microbial population in bioretention cells: a case study of Shenzhen

LI Xiaoyue¹, QIN Huapeng¹, WANG Fan², and YIN Yixiang¹

1) School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Key Laboratory for Urban Habitat Environmental Science and Technology, Shenzhen 518055, Guangdong Province, P. R. China

2) School of Atmospheric Sciences, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519082, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Bioretention cells are important facilities for purification of urban runoff in the sponge city construction, and the inside microorganisms play a key role in the treatment of runoff nitrogen. In order to reveal the mechanism of nitrogen removal in bioretention cells, 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene-Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology and real-time fluorescence quantification method are used to investigate the diversity and phylum-level distribution of total bacteria in 8 typical bioretention cells in Shenzhen, and analyze the community

Received: 2020-04-26; **Accepted:** 2020-06-18

Foundation: Shenzhen Basic Research Foundation (JCYJ20170818090113750); National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (41603073)

Corresponding author: Professor QIN Huapeng. E-mail: qinhp@pku.edu.cn

Citation: LI Xiaoyue, QIN Huapeng, WANG Fan, et al. Nitrification and denitrification functions of microbial population in bioretention cells: a case study of Shenzhen [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2021, 38(1): 36-44. (in Chinese)

structure, functional gene abundance of nitrifying and denitrifying functional microorganisms and their relationship with environmental factors. The results show that: ① The main predominant phyla in the bioretention cells are *Proteobacteria*, *Actinomycetes*, *Bacteroides*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, and *Firmicutes*. Their relative abundance accounts for 93.49%~94.80% of the community. ② The most abundant nitrifying bacteria in the microbial community are *Nitrosomonadaceae* and *Nitrospira*; the most abundant denitrifying bacteria are *Bacillus*, followed by *Lysinibacillus* and *Pseudomonas*. ③ The copy numbers of nitrification and denitrification functional genes in different bioretention cells show large differences, and the abundance of nitrification and denitrification functional genes in the samples of bioretention cells beside municipal roads all show higher values. ④ The diversity of nitrogen-converting microorganisms and the abundance of functional genes in bioretention cells are affected by the combined effects of system structure, vegetation type, and pollution load. Denitrifying bacteria are more susceptible to environmental factors. This study can provide ideas for the evaluation and improvement of the nitrogen removal function of bioretention cells.

Key words: sponge city; environmental science; bioretention cell; high-throughput sequencing; nitrification; denitrification; microbial community structure; functional gene

生物滞留池是利用工程土壤、微生物和植被的物理、化学和生物特性调控地表径流水质水量的绿色基础设施。生物滞留池作为海绵城市建设的核心设施之一,对径流污染物净化效果显著^[1]。但该设施对溶解态氮素污染物的处理效率存在较大波动,常出现硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)等氮素淋失的现象^[2-3]。主要原因是进入生物滞留池的部分径流氮素未能通过反硝化作用被永久去除,造成硝态氮在池内累积并随后续的降雨径流淋出^[4-5]。微生物对生物滞留池中氮去除起到重要作用,掌握微生物种群及其氮转化功能的特征,有助于揭示生物滞留池氮去除机理,并为评估和提高系统氮去除功能提供依据。

近年来,应用分子生物学手段,如实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)和16S核糖体核糖核酸(ribosomal ribonucleic acid, rRNA)基因高通量测序等,探索微生物功能群多样性及数量在土壤氮循环,成为评价生物滞留池硝化反硝化能力的切入点。在生物滞留设施中,氨氧化、硝化和反硝化反应需要微生物体内的特异性生物酶来催化,其中,部分关键酶的编码基因已被探明,例如,编码氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)氨单加氧酶的基因 *amoA-AOB*、编码氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)氨单加氧酶的基因 *amoA-AOA*、以及反硝化基因 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 等多种氮转化功能基因在环境样本的调查标记中十分普遍。WAN 等^[6-7]搭建模拟装置研究了微生物数量与生物滞留柱填料结构的关系,但该研究使用的装置中没有植物覆盖;MORSE 等^[8-10]在实验室建造结构相同的模拟装

置,讨论了生物滞留池中植物与微生物多样性的相互作用。CHEN 等^[11]采用 qPCR 的方法研究了美国堪萨斯州某个生物滞留系统土壤中的16S rRNA 基因以及4种硝化与反硝化基因的丰度,发现其功能基因丰度与深度、淹没时间正相关;WALLER 等^[12]调查了美国大西洋中部沿岸州(马里兰州、北卡罗来州和弗吉尼亚州)23个生物滞留池中2种反硝化功能基因丰度。后两项研究主要探讨了生物滞留池中的氮转化功能基因,缺乏对微生物种群多样性的分析。综合来看,目前对于生物滞留池中微生物的探究主要以实验室模拟为主,对实际运行条件下生物滞留池微生物多样性、群落结构与氮转化功能的研究较少,特别是缺乏属水平上氮转化功能菌的深入分析^[14]。

本研究以16S rRNA 基因作为标志基因构建基因文库,对深圳市已建成的代表性原位生物滞留池土壤填料中主要细菌的群落结构和多样性进行分析,结合 qPCR 对硝化和反硝化细菌的功能基因丰度进行研究,并通过冗余度分析等多变量统计分析方法研究硝化反硝化细菌的群落结构、丰度与环境因子之间的相关性,探讨不同生物滞留池采样点细菌群落结构的差异性,了解硝化与反硝化微生物对环境因子的响应机制,为生物滞留池系统中氮转化功能评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 采样点与样品

深圳作为中国海绵城市建设试点城市之一,生

物滞留池在深圳的海绵城市建设中应用较为普遍,本研究以深圳典型生物滞留设施为例开展研究. 研究区属亚热带海洋性气候,气候温和;年平均气温为 22.4 ℃, 平均年降雨量为 1 933.3 mm, 每年 4 ~ 9 月为雨季, 期间降雨量占全年降水的 85%. 本研究依据较成熟的海绵项目所属的主要用地类型进行

分类, 主要有公园绿地、市政道路、建筑小区和模拟实验体系 4 种, 每种类型选择 2 个设施, 共选取 8 处生物滞留池为研究对象. 设施结构由上到下依次为植被层、种植土层(本地土、河沙和腐殖质体积比约为 5:4:1)、砂层、土工布和砾石层, 但土壤深度及表面植被不尽相同, 见表 1.

表 1 生物滞留池采样点

Table 1 Sampling points of bioretention cells

编号	样点位置	用地类型	径流来源	表面植物特点	土壤深度/cm
A1	新城公园 1	公园绿地	公园步道雨水径流	栀子, 稀疏种植, 株高 25 ~ 30 cm	30
A2	新城公园 2	公园绿地	公园停车场附近雨水径流	栀子, 稀疏种植, 株高 25 ~ 30 cm	30
B1	公园路 1	市政道路	交通要道路面雨污	栀子, 稀疏种植, 株高 25 ~ 30 cm	30
B2	公园路 2	市政道路	人流稀少处路面雨污	栀子, 稀疏种植, 株高 25 ~ 30 cm	30
C1	产业园 生物滞留池 1	建筑小区	建筑屋面雨水	天门冬、木槿混种, 株高 20 ~ 60 cm	50
C2	产业园 生物滞留池 2	建筑小区	草沟及人行步道雨水径流	狼尾草、美人蕉混种, 株高 80 ~ 100 cm	50
D1	大学城 北大园区 1	实验体系 1	按深圳径流污染设置的人工径流	芦苇, 紧密种植, 株高约 60 cm	60
D2	大学城 北大园区 2	实验体系 2	按深圳径流污染设置的人工径流	芦苇, 紧密种植, 株高约 60 cm	60

采样时间集中在 2 月底至 3 月初(深圳市旱季), 各采样点雨前干旱时间均超过 2 周. 用手持式土壤取样器按梅花形进行 5 点取样, 取样深度为 0 ~ 15 cm(表层土壤), 每个样点取样 3 ~ 5 g. 将采取的新鲜土壤样本剔除小石子及落叶后进行混合, 封装于 15 mL 的离心管内, 存于 -20 ℃ 冰箱备用.

1.2 脱氧核糖核酸的提取

采用 MO-BIO PowerLyzer® PowerSoil® DNA—12855 试剂盒提取土壤样品微生物脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA), 每个样品均提取 3 次. 所获得的 DNA 均用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行验证, 用超微量紫外可见分光光度计(美国 Quawell Q5000)检测质量浓度是否达标, 同时依据光密度比值 $D(260)/D(280)$ 判断其纯度.

1.3 高通量测序及数据分析

本研究以广泛应用于原核生物分类研究中的 16S rRNA 基因作为标志基因, 对细菌 16S rRNA 基因 V3、V4 和 V5 区测序, 并对深圳市已建成的代表性生物滞留池土壤填料中主要细菌的群落结构和多样性进行分析. 针对 8 个雨水花园样地中提取的 8 个土壤样本, 首先利用通用引物扩增样本内微生

物的 16S rRNA 基因, 然后纯化 PCR 产物, 并上机测序. 以提取到的基因组 DNA 为模板, 选用表 2 所示通用引物.

表 2 16S rRNA 测序引物序列

Table 2 Primer sequences for 16S rRNA

扩增区域	引物序列(5'-3')
V3、V4 区	CCTACGRRBGCASCAGKVRVGAAT GGACTACNVGGGTWCTAATCC
V4、V5 区	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA CTTGTGCGGKCCCCGYCAATTC

PCR 反应条件为: 98 ℃ 预变性 3 min; 98 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 27 个循环; 72 ℃ 保温 5 min. 反应产物于 4 ℃ 保存. 采用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 符合扩增要求可直接用于后续分析.

委托深圳金唯智生物科技有限公司对样品进行 Illumina MiSeq 高通量测序. 对有效数据在 97% 水平上进行微生物操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类, 选取 OTUs 序列中排在第 1 位的序列为代表序列, 并比对 Silva 数据库进行物种注释. 通过对 OTUs 进行物种在门和属等分类学水平

上的群落结果统计分析,得出微生物群落结构组成.

1.4 qPCR 功能基因定量分析

采用 qPCR 方法分别对氮循环过程中相关的 5 种功能基因 *amoA-AOA*、*amoA-AOB*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 进行定量分析, qPCR 均采用 SYBR Green 法, 利用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA) 仪器测定分析.

2 结果与讨论

2.1 生物滞留池中门水平微生物特征分析

2.1.1 微生物多样性和丰富度分析

DNA 样本的多样性分析可以反映群落的微生物多样性和丰富度, 结果如表 3. 样本文库覆盖率均大于 98%, 说明测序结果对样本真实情况具有良好的代表性, 可代表样本的真实情况.

表 3 生物滞留池微生物多样性和丰富度
Table 3 Microbial diversity and richness
in samples of bioretention cells

采样点	测序数	多样性指数		丰富度指数		覆盖率/%
		Shannon	Simpson	Sobs	Chao1	
A1	44 298	5.165	0.009	365	369	99
A2	46 688	5.102	0.010	362	373	99
B1	45 058	4.986	0.012	360	368	99
B2	54 221	4.869	0.016	351	355	99
C1	29 854	4.865	0.057	1 875	2 630	98
C2	31 509	5.454	0.047	1 984	2 606	98
D1	43 392	5.550	0.030	1 962	2 552	98
D2	30 588	5.796	0.022	1 943	2 451	98

从多样性来看, 样本 A1、A2、C2、D1 和 D2 的 Shannon 指数高于样本 B1、B2 和 C1, 而样本 A1、A2、B1 和 B2 的 Simpson 指数低于样本 C1、C2、D1 和 D2. 一般而言, Shannon 指数越高或 Simpson 指数越低都代表多样性越高. 综合考虑这两个指数可知, 样本 A1 多样性最高, 即样本 A1 中的各物种均匀度较好; 样本 C1 群落多样性最低, 结合样本 C1 的丰富度指数呈现显著高的特点, 推测样本 C1 中可能存在某几种菌为绝对优势菌的情况. A、B 组样本的 Sobs 与 Chao1 值明显低于 C、D 组样本的, 表明在 A、B 组样本中物种的丰富度较 C、D 组更低, 这一差异可能与 A、B 组样本仅稀疏种植单一植物, 且总工程土壤厚度较浅有关.

选择 97% 相似度的 OTU, 计算不同随机抽样下

的 Alpha 多样性指数, 根据多样性指数 Sobs (表征实际观测到的物种数目), 制作曲线图 (图 1), 即为稀释曲线. 观察样本数据的稀释曲线趋向平坦, 说明测序数据量合理, 更多的数据量只会产生少量的新物种, 可初步判定本次测序结果合理可信.

图 1 相似度为 97% 的稀释曲线
Fig. 1 Dilution curve for microbial population
structure under 97% similarity

2.1.2 生物滞留池中门水平微生物组成差异分析

将相对丰度低于 0.5% 的门类都合并为 others, 得到门水平种群分类图, 8 个土壤样品在门水平上的细菌群落组成如图 2 所示. 由图 2 可见, 8 个样品中微生物群落结构组成总体相似, 但各种微生物

图 2 样品中门水平细菌 (丰度 > 0.5%) 的
群落结构及分布
Fig. 2 Bacterial community structure and distribution of
the samples at phylum level (abundance > 0.5%)

相对丰度略有差异,细菌群落结构在门分类水平上具有较高的多样性,经调查,样品 A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1 和 D2 中细菌门类检测结果分别为 37、37、38、35、34、36、34 和 35 个.

种群分类发现,本研究中 8 个生物滞留池表层土壤内,相对丰度 $>0.5\%$ 的细菌共有 10 个门. 其中,变形菌门 (Proteobacteria)、放线细菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 6 个门类是优势细菌菌门,其平均占比依次为 29.67%、21.53%、12.82%、12.73%、10.67% 和 3.91%,总和占群落的 93.49% ~ 94.80%. 变形菌门 (Proteobacteria) 在 8 个样本中丰度占比最大,样本 A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1 和 D2 的相对丰度分别为 28.69%、29.69%、25.48%、27.55%、33.22%、31.12%、30.70% 和 30.82%,故变形菌门 (Proteobacteria) 是优势菌门. 有研究发现,变形菌门在生物滞留池^[13-14]、人工湿地^[15-17]和草地^[18]的微生物氮磷去除中起到主要作用,其在生物滞留设施中相对丰度约为 25% ~ 68%^[7-10]. 另外,绿弯菌门 (Chloroflexi) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 对反硝化也有至关重要的作用^[16-17]. 研究发现,样本 D1、D2 (实验柱对照体系) 与样本 B1 (高污染道路生物滞留池) 中绿弯菌门 (Chloroflexi) 较其他生物滞留池更多,样本 C1 与 C2 (建筑小区生物滞留池) 中厚壁菌门 (Firmicutes) 的相对丰度相对与其他 6 个样本呈显著优势. ZUO 等^[10]的实验室模拟中,运行良好的实验柱中厚壁菌门 (Firmicutes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 的相对丰度波动范围分别为 5% ~ 20% 和 2% ~ 11%,本研究的结果亦在该范围中.

硝化螺菌门 (Nitrospirae) 是一类革兰氏阴性菌,其中的硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 细菌可将亚硝酸盐氧化成硝酸盐,是直接参与径流污染处理相关的菌群,硝化螺菌门在样品 A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1 和 D2 中的相对丰度分别为 0.77%、0.67%、1.27%、0.80%、1.26%、1.18%、1.38% 和 1.58%; 样品 D2 中硝化螺菌门的相对丰度最大,是样品 A1 和 A2 的 2 倍.

2.2 生物滞留池中属水平功能微生物差异分析

据文献 [19-21] 研究,硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) 与硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 的细菌都具有硝化功能;亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 和亚

硝化球菌属 (*Nitrosococcus*) 具有氨氧化功能;不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*)、罗思河小杆菌属 (*Rhodanobacter*)、热单胞菌属 (*Thermomonas*) 和克氏杆菌属 (*Klebsiella*) 等具有反硝化的作用,参与氮的转化. 因此,重点关注 8 个典型生物滞留池中相关功能菌属的总相对丰度 (图 3 和图 4). 调查不同样本中以上几种硝化与反硝化功能菌属的相对丰度,发现硝化细菌与反硝化细菌在不同样本中占比不同.

图 3 生物滞留池中硝化功能菌属的相对丰度

Fig. 3 The relative abundance of functional genera related with nitrifying in bioretention cells

如图 3, 在生物滞留池中检出的相对丰度大于 0.1% 的具有硝化相关作用的微生物主要分布在 5 个菌属中, 包括亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae)、硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)、亚硝化螺旋菌属 (*Nitrosospira*)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和硝化杆菌属 (*Nitrobacter*). 就硝化细菌的总量而言, 各生物滞留池样本相差不大, 其相对丰度占有菌总和的 2% 左右. 其中, 亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae) 属于 β -变形菌门 (β -proteobacteria), 硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 属于硝化螺菌门 (Nitrospirae).

对比各组样品中硝化菌的结构组成, 发现各组内的 2 个样本差别较小, 但组间表现出了明显区

别, A 组与 B 组的硝化种群结构相对一致, C 组与 D 组的种群结构相对一致. 在样本 A1、A2、B1 和 B2 中, 相对丰度最高 (分别为 1.27%、1.31%、1.70% 和 1.41%) 的硝化功能菌是亚硝化单胞菌科的细菌, 是可将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 氧化成 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的 AOB, 且在上述样本中, 具有氨氧化作用的 AOB 功能菌属总丰度大于氧化亚硝酸盐为硝酸盐的亚硝酸氧化菌 (nitrite oxidation bacteria, NOB); 而在样本 C1、C2、D1 和 D2 中, 情况刚好相反, 占有绝对优势的功能菌属是硝化螺旋菌属, 其丰度分别为 1.30%、1.18%、1.38% 和 1.58%. 由于本次取样时间为 2 月底至 3 月初, 比较生物滞留池 A 组和 B 组的结构可发现, 由于其具有更浅的工程土壤结构, 因此旱季保水性更差, 土壤结构具有更高的孔隙率, 将有利于好氧的氨氧化细菌生长; 而硝化螺旋菌 (*Nitrospira*) 的氮代谢方式则更多样, 在缺氧或厌氧的环境中能以氢气作为电子供体把硝酸盐还原为亚硝酸盐^[22-23], 使 *Nitrospira* 在样本 C1、C2、D1 和 D2 中的氮代谢竞争中占据巨大优势.

人工湿地是另一种处理非点源污染氮负荷的技术手段, 与生物滞留池在结构与功能方面存在一定的相似性, 比较对两者内部关键硝化反硝化菌属的研究结果^[24]可知, 亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas*) 在生物滞留池和人工湿地土壤中都是主要优势氨氧化细菌, 但是在人工湿地中, 亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*) 和亚硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 也是很常见的优势菌, 然而这些菌属在本次生物滞留池的研究中则完全没有发现. 可见生物滞留池与人工湿地等类似设施之间微生物结构可能存在差异.

就反硝化菌而言, 在生物滞留池中检出的相对丰度大于 0.1%, 具有反硝化相关作用的微生物主要分布在 9 个菌属中, 各样本中平均相对丰度最高的是芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 其次是赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*) 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 如图 4. 由于硝化与反硝化菌属在自然环境中通常不具有丰度优势, 以往研究较少. 吴潇^[7]的研究注意到, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 在生物滞留池的淹没区出现, 丰度约为 1.39%, 与本研究样本 C2 的丰度水平接近. 总体而言, 本研究的原位生物滞留池中反硝化生物种类较为丰富, 检出的 9 种反硝化菌属, 都是在表面流人工湿地中常见的反硝化功能菌属^[17,19].

样本 C1 和 C2 中的反硝化细菌群落的相对丰度占比明显高于其他样本, 均超过 7.5%, 是取自公

图 4 生物滞留池中反硝化功能菌属的相对丰度

Fig. 4 The relative abundance of functional genera related with denitrifying in bioretention cells

园和道路 4 个样点中反硝化细菌相对丰度的 3.3 ~ 5.1 倍. 样本 C1、C2、D1 和 D2 的生物滞留池都没有 50 ~ 60 cm 的工程土壤, 由于反硝化细菌多为厌氧菌, 更深的土壤层厚度与植物密集间种, 根系丛生带来的湿润土壤环境将有利于在土壤团粒中形成厌氧微环境, 因此, 具备以上特点的高台生物滞留池样本 C1 与下沉式生物滞留池样本 C2 中反硝化功能菌属的相对丰度更高. 样本 D1 和 D2 的生物滞留池虽然土壤深度较深, 但仅有芦苇一种植物, 据此推测, 生物滞留池种植植物的种类及方式 (单种或间种), 或将对反硝化细菌的相对丰度产生影响. 样本 B1 和 B2 中反硝化菌的相对丰度虽然较低, 但所检出的反硝化功能菌属的种类丰富度却优于样本 C1、C2、D1 和 D2, 这可能与样本 B1 和 B2 取自位于非机隔离带中的生物滞留池, 接收到的地表冲刷径流中污染物种类更为复杂有关.

2.3 生物滞留池中硝化反硝化功能基因分析

调查样品中表征硝化作用的 *amoA-AOA* 与 *amoA-AOB* 基因, 以及表征反硝化作用的 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因, 如图 5. 研究表明, 生物滞留池中硝化反硝化功能基因拷贝数在不同类型的生物滞留池中表现出明显的空间分异. 在市政道路类型的生物滞留池样点 (B 组) 中, 硝化功能基因丰度与反硝化功能基因丰度与其他样本相比具有显著差异, 显

著高于其他样本,特别是氨氧化细菌中的 *amoA* 基因丰度与其他样本中 *amoA* 基因丰度差异超过 10 倍. 样本 B1 与 B2 中功能基因的丰度表现出的特异性与其接受的径流污染物浓度较高有关. 同时, CHEN 等^[11] 在美国所调查的生物滞留池样本中,处在污水汇流区域、平均淹没时间较其他采样区域更长的位置所测到的反硝化基因 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 的丰度更高. 高污染浓度暴露的长期驯化,使得这些体系中氮转化基因片段的累积更高.

图5 生物滞留池表层土中硝化与反硝化功能基因拷贝数
Fig.5 Gene copy numbers in soil of sampling sites related with nitrifying and denitrifying in bioretention cells

另外,生物滞留池中监测到的氨氧化细菌 *amoA* 基因的平均拷贝数高于氨氧化古菌 *amoA* 基因. MORSE 等^[8,11] 的研究也表明,硝化功能基因 *amoA-AOB* 的丰度同常较其中的反硝化功能基因 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 的平均丰度低 1~3 个数量级,这与本研究的调查结果一致.

本研究中发现生物滞留池中 *amoA-AOB* 基因的丰度水平最高值约为 $8.5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ (每克风干土壤中目的基因的拷贝数),同时也与表面流人工湿地底泥中 *amoA-AOB* 基因的丰度水平相近,低值仅为 $5.9 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$,与中国典型温带草原和草甸草原的丰度水平类似. 对于反硝化基因丰度,生物滞留池中 *nosZ* 的丰度与中国草甸草原中 *nosZ* 的丰度比较

类似,较德国半自然草原的丰度更低^[18,24]. 故污染负荷较低的生物滞留池硝化反硝化基因的丰度水平更接近自然生境,如污染负荷较高,则有可能更接近人工湿地沉积物.

2.4 生物滞留池中微生物群落分布与环境因子相关性分析

本研究选取 NH_4^+-N 质量浓度、 NO_3^--N 质量浓度、总氮(total nitrogen, TN)质量浓度和土壤含水率作为环境因子,同时结合各样本微生物群落结构,选取相对丰度较高的前 30 种菌属作为样本,通过冗余度分析(redundancy analysis, RDA)研究功能菌属与环境因子的相关性^[20],结果见图 6.

图6 生物滞留池中环境因子与细菌群落结构的关系
Fig.6 Redundancy analyses for correlations between bacteria community structure and environmental factors

生物滞留池中 16S rRNA 基因的细菌群落分布与环境因子相关性的 RDA 分析如图 6. 坐标轴 RDA1 和 RDA2 总解释量为 75.39%, 相对高的解释量表明了环境因子对生物滞留池中总细菌群落分布影响的可靠性. 结果表明,总细菌菌群与生物滞留池表层土中 TN 浓度 ($P = 0.008$, $R^2 = 0.963$) 和 NH_4^+-N 浓度 ($P = 0.03$, $R^2 = 0.956$) 显著正相关;与 NO_3^--N 浓度和土壤含水率呈正相关性但弱相关. 解析物种丰度前 30 的菌属,发现其中受环境因子影响较大的几个菌属中 *Chryseobacterium*、*Paenibacillus*、*Bacillus* 和 *Pseudomonas* 等皆为反硝化菌. 故判断生物滞留池中反硝化菌更容易受到环境因子的影响.

3 结 论

本研究采用构建基因文库和实时荧光定量的方

法,在生物分子水平上对深圳市典型生物滞留设施的环境样本进行分析,调查了总细菌的多样性与门水平分布,分析了其中硝化反硝化功能菌属的群落结构、功能基因丰度及其与环境因子的关系.研究得出:

1) 生物滞留池中主要优势菌门有6种,根据相对丰度水平排序依次为变形菌门(Proteobacteria)、放线细菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和厚壁菌门(Firmicutes),其相对丰度占群落的93.49%~94.80%.其中,与氮转化密切相关的门属包括变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和厚壁菌门(Firmicutes).

2) 生物滞留池微生物群落中相对丰度最高的硝化功能菌是亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae (family)_uncultured)和硝化螺旋菌属(Nitrospira);相对丰度最高的反硝化功能菌是芽孢杆菌属(Bacillus),其次是赖氨酸芽孢杆菌属(Lysinibacillus)和假单胞菌属(Pseudomonas).

3) 生物滞留池中硝化反硝化功能基因拷贝数在不同类型的生物滞留池中表现出明显的空间分异.在市政道路类型的生物滞留池样点中硝化功能基因丰度与反硝化功能基因丰度呈现高值.

4) RDA分析也说明了污染负荷对反硝化功能基因分布的高解释性,生物滞留池中反硝化菌更容易受到环境因子的影响.

综合各生物滞留池样地特征分析,实际运行的生物滞留池中氮转化微生物的多样性及功能基因的丰度受到体系结构、植被类型与污染负荷的综合作用.植被层选择多种植物间种或密集种植,且设置相对较深的填料层,都能为其中的反硝化微生物提供更适宜的环境.本研究的微生物调查结果可为生物滞留池的氮去除功能评估和提高提供思路.

本研究也存在一些局限性,比如对8个实际运行的设施中微生物的调查没有覆盖深圳市生物滞留池设施的所有类型和运行条件,特别是没有对深圳干湿季分明的气候特征进行深入探究,未考虑季节差异等动态变化.下一步将对这些方面进行深入的研究.

基金项目:深圳市基础研究计划资助项目(JCYJ20170818090113750);国家自然科学基金青年基金资助项目(41603073)

作者简介:李笑玥(1994—),北京大学硕士研究生.研究方向:海绵城市建设的生态理论与方法. E-mail: 1701213693@pku.edu.cn

通讯作者:秦华鹏(1973—),北京大学教授、博士生导师.研究

方向:城市水环境与水资源. E-mail: qinhp@pku.edu.cn
引文:李笑玥,秦华鹏,王凡,等.生物滞留池微生物种群的反硝化功能研究——以深圳市为例[J].深圳大学学报理工版,2021,38(1):36-44.

参考文献 / References:

- [1] GREGORY H L, PAUS K H, NATARAJAN P, et al. Review of dissolved pollutants in urban storm water and their removal and fate in bioretention cells [J]. Journal of Environmental Engineering, 2015, 141(1): 04014050.
- [2] 陈 垚,程启洪,甘春娟,等.雨水生物滞留系统氮素过程研究现状与展望[J].环境工程,2018,36(7):11-16.
CHEN Yao, CHENG Qihong, GAN Chunjuan, et al. Research and prospect on processes of nitrogen removal in bioretention systems [J]. Environmental Engineering, 2018, 36(7): 11-16. (in Chinese)
- [3] 王书敏,何 强,徐 强,等.生物滞留系统去除地表径流中的氮素研究评述[J].水科学进展,2015,26(1):140-150.
WANG Shumin, HE Qiang, XU Qiang, et al. Summary of nitrogen removal in surface runoff by bioretention system [J]. Advances in Water Science, 2015, 26(1): 140-150. (in Chinese)
- [4] EMILY G P, FLETCHER T D, PERRAN L C, et al. Processes and drivers of nitrogen removal in stormwater biofiltration [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2014, 44(7): 796-846.
- [5] RYCEWICZ-BORECKI M, MCLEAN J E, DUPONT R R. Nitrogen and phosphorus mass balance, retention and uptake in six plant species grown in stormwater bioretention microcosms [J]. Ecological Engineering, 2017, 99: 409-416.
- [6] WAN Zhexi, LI Tian, SHI Zhenbao. A layered bioretention system for inhibiting nitrate and organic matters leaching [J]. Ecological Engineering, 2017, 107: 233-238.
- [7] 吴 潇.沙-土-粉煤灰基质雨水生物滞留池中氮磷去除特性及微生物多样性研究[D].南京:南京信息工程大学,2019.
WU Xiao. Research on nitrogen and phosphorus removal characteristics and microbial diversity of sand-soil-fly ash matrix in rainwater bioretention [D]. Nanjing: Nanjing University of Information Science & Technology, 2019. (in Chinese)
- [8] MORSE N, PAYNE E, HENRY R, et al. Plant-microbe interactions drive denitrification rates, dissolved Nitrogen removal, and the abundance of denitrification genes in stormwater control measures [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52 (16): 9320-9329.
- [9] 张宏胜.植物对雨水生物滞留池中氮磷去除及微生物多样性的影响[D].南京:南京信息工程大学,2019.

- ZHANG Hongsheng. Effects of plants on nitrogen and Phosphorus removal and microbial diversity in rainwater bioretention ponds [D]. Nanjing: Nanjing University of Information Science & Technology, 2019. (in Chinese)
- [10] ZUO Xiaojun, ZHANG Hongsheng, YU Jianghua. Microbial diversity for the improvement of nitrogen removal in stormwater bioretention cells with three aquatic plants [J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125626.
- [11] CHEN Xiaolu, PELTIER E, STURM B S, et al. Nitrogen removal and nitrifying and denitrifying bacteria quantification in a stormwater bioretention system [J]. *Water Research*, 2013, 47(4): 1691-1700.
- [12] 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.
- [13] 陈 垚, 程启洪, 郑 爽, 等. 干湿交替对生物滞留系统中氮素功能微生物群落的影响[J]. *微生物学报*, 2020, 60(3): 533-544.
- CHEN Yao, CHENG Qihong, ZHENG Shuang, et al. Effects of drying-rewetting alternating on nitrogen-related microbial functional communities in bioretention systems [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(3): 533-544. (in Chinese)
- [14] 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.
- LI Liqing, HU Nan, LIU Yuqing, et al. Effects of three bioretention configurations on dissolved nitrogen removal from urban stormwater [J]. *Environmental Science*, 2017, 38(5): 1881-1888. (in Chinese)
- [15] 王 林, 李 冰, 朱 健. 高通量测序技术在人工湿地微生物多样性研究中的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32(5): 10-15.
- WANG Lin, LI Bing, ZHU Jian. Review of high-throughput sequencing techniques on constructed wetland microbial diversity [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(5): 10-15. (in Chinese)
- [16] 李红梅, 陶高峰, 徐 凌, 等. 植物功能群多样性对人工湿地微生物生物量和营养滞留的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(6): 1365-1371.
- LI Hongmei, TAO Gaofeng, XU Ling, et al. Effects of plant functional group diversity on microbial biomass and nutrient retention in a constructed wetland [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2011, 17(6): 1365-1371. (in Chinese)
- [17] 王雨轩. 基于 Illumina 测序的不同植被状况人工湿地土壤脱氮细菌研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- WANG Yuxuan. Study on denitrifying bacteria of the soils in the constructed wetlands under different vegetation conditions based on illumina sequencing [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018. (in Chinese)
- [18] 钟 磊, 王一喆, 李 鸣. 草地硝化和反硝化微生物功能群研究进展[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(3): 128-133.
- ZHONG Lei, WANG Yizhe, LI Ming. Research progress of nitrifying and denitrifying microbial communities in grasslands [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(3): 128-133. (in Chinese)
- [19] 潘 傲, 张 智, 孙 磊, 等. 种植不同植物的表面流人工湿地净化效果和微生物群落差异分析[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(8): 1918-1929.
- PAN Ao, ZHANG Zhi, SUN Lei, et al. Purification effects and microbial community differences of the surface-flow constructed wetlands with different vegetation plantation [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2019, 13(8): 1918-1929. (in Chinese)
- [20] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [21] 孙 未. 生物滞留池淹没区处理地表径流脱氮效果与微生物学机理[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- SUN Wei. Nitrogen removal performance in stormwater runoff in saturated zones of bioretention and microbial mechanism [D]. Tianjin: Tianjin University, 2017. (in Chinese)
- [22] 鲁青原. 辽河三角洲滨海湿地微生物群落组成及其环境意义[D]. 北京: 中国地质大学(北京), 2016.
- LU Qingyuan. The microbial community structure in Liaohe Delta wetlands and its environmental significances [D]. Beijing: China University of Geosciences (Beijing), 2016. (in Chinese)
- [23] 邢丽贞, 程 成, 孔 进. 亚硝酸盐氧化菌及其生态位的研究进展[J]. *山东建筑大学学报*, 2019, 34(3): 62-67.
- XING Lizhen, CHENG Cheng, KONG Jin. Research progress of nitrite-oxidizing bacteria and their niches [J]. *Journal of Shandong Jianzhu University*, 2019, 34(3): 62-67. (in Chinese)
- [24] 陈 亮, 刘 锋, 肖润林, 等. 人工湿地氮去除关键功能微生物生态学研究进展[J]. *生态学报*, 2017, 37(18): 6265-6274.
- CHEN Liang, LIU Feng, XIAO Runlin, et al. Research advances in microbial ecology for N-removal in constructed wetlands [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(18): 6265-6274. (in Chinese)

【中文责编: 晨 兮; 英文责编: 之 聿】