许少怡,逯慧杰.脱氮系统中全程硝化菌的基因组库构建及特性 [J]. 中国环境科学, 2025,45(8):4225-4234.
Xu S Y, Lu H J. Characteristics of complete ammonia oxidizing bacteria in nitrogen removal system by constructing metagenome database [J]. China Environmental Science, 2025,45(8):4225-4234.

脱氮系统中全程硝化菌的基因组库构建及特性

许少怡[1,2],逯慧杰[1*] (1.浙江大学环境与资源学院,浙江 杭州 310058；2.江苏省城镇供水安全保障中心,江苏 南京 210036)

摘要：通过构建全程硝化菌基因组库,定量分析城镇污水脱氮系统,饮用水处理系统等 56 个不同水处理系统中全程硝化菌基因组的丰度和多样性特性差异,结合统计分析分布影响因子,解析作用机制.结果表明,被调研的城镇污水脱氮系统中全程硝化菌在氨氧化群落占 8.2%~99.6%,在 *Nitrospira* 群落中占 1.4%~48.6%.系统发育分析表明城镇污水脱氮系统的全程硝化菌拼接基因组与 *Ca.Nitrospira nitrosa* 基因组系统发育距离较近,核苷酸相似度高于 94%,且群落均匀度高于饮用水处理系统,推测 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群对城镇污水脱氮系统具有特定的适应能力.相关性分析表明,pH 值和 COD 分别与全程硝化菌的分布显著正相关和负相关,且全程硝化菌在中低浓度 NH_4^+,高污泥停留时间,低溶解氧等环境下更易成为优势硝化菌.研究揭示了城镇污水脱氮系统中的优势全程硝化菌 *Ca.Nitrospira nitrosa* 及其分布影响因子.

关键词：城镇污水脱氮系统；全程硝化菌；*Ca.Nitrospira nitrosa*；宏基因组组装基因组；影响因子
中图分类号：X703 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)08-4225-10

Characteristics of complete ammonia oxidizing bacteria in nitrogen removal system by constructing metagenome database. XU Shao-yi[1,2], LU Hui-jie[1*] (1.College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China；2.Security Support Center for Urban Water Supply of Jiangsu Province, Nanjing 210036, China). *China Environmental Science*, 2025,45(8)：4225~4234

Abstract：By constructing feature metagenome database of complete ammonia oxidizing bacteria (CAOB), their abundance and diversity in 56water treatment systems, e.g., urban wastewater nitrogen systems and drinking water treatment systems, were quantitatively analysed. The significant influencing factors were determined by statistical analysis and the influential mechanism were analysed. It was revealed that CAOB were accounted for 8.2%~99.6% of the ammonia oxidation community and 1.4%~48.6% of the *Nitrospira* in the surveyed urban wastewater nitrogen removal systems. Phylogenetic analysis revealed that CAOB metagenome assembled genomes (MAGs) were associated with *Ca.Nitrospira nitrosa*, with ANI value higher than 94%. CAOB community were more homogeneity than those in drinking water treatment systems, speculating that *Ca.Nitrospira nitrosa* cluster were specific adaptable to urban wastewater nitrogen removal systems. According to correlation analysis, pH value was significantly positively while COD was significantly negatively correlated with the abundance and diversity of CAOB. They were more likely to be dominant nitrifiers in low NH_4^+, high sludge retention time, and low dissolved oxygen conditions. In conclusion, this study reveals that *Ca.Nitrospira nitrosa* cluster are dominant CAOB, and their distribution influencing factors in urban wastewater nitrogen removal systems.

Key words：urban wastewater nitrogen removal system；comammox bacteria；*Ca.Nitrospira nitrosa*；metagenome-assembled genomes；influencing factors

硝化微生物在城镇污水脱氮系统中发挥着重要作用,由于其低生长速率,对复杂污水环境敏感等特征[1],常成为污水脱氮过程的限速步骤,探究硝化微生物的群落生态学一直是污水脱氮领域的热点.2015 年,科学家通过分子生物学分析发现了可独立将 NH_4^+-N 氧化为 NO_3^--N 的全程硝化菌(CAOB),分别从水产养殖系统,饮用水处理系统中获得了 *Ca. Nitrospira nitrosa*, *Ca. Nitrospira nitrificans* 和 *Nitrospira* sp. Ga0074138 等 3 个宏基因组组装基因组(MAGs),其中奥地利科学家还通过富集分离得到了第一株 CAOB 纯菌 *Nitrospira inopinata*[2-5].CAOB 的发现扩大了对氮循环的认知,也为解析城镇污水脱氮系统中硝化菌群提供了新思路.

城镇污水脱氮系统中常观测到 NOB 丰度高于 AOB[6-7],与两类细菌的电子传递和能量转化规律不符.结合 CAOB 的系统发育分析,推测 *Nitrospira* 中可能包括了 CAOB,且承担了部分氨氧化功能.分子生物学上常以 *amo* 基因作为 CAOB 的特征分子标志物,与 AOA、AOB 进行区分[2, 8],然而 CAOB 与 NOB

收稿日期：2024-12-25
基金项目：浙江省领雁研发攻关计划资助(2022C03075)
* 责任作者, 研究员, luhuijie@zju.edu.cn

型 *Nitrospira* 由于系统发育的高度相似性,无法通过 16S rRNA 或功能基因进行区分,因此亟待寻找新方法区分 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira*.

与 AOB 和 NOB 相比,CAOB 氨亲和力较高(K_{m,NH_3}:3.4~9.7×10^{-4}mg N/L),亚硝酸盐亲和力范围较广(K_{m,NH_2^-}:0.11~6.3mg N/L),比生长速率较低(μ_{max}:0.15d^{-1}),生物得率较高(394.7mg 蛋白/mol NH_3),低氧适应性强等[3,9-10]. CAOB 无 N_2O 生物生成途径[11],可降低温室气体排放.因此,其在自然水体、土壤等低氨、低氧环境中易建立生态优势[12-14],且在减少温室气体排放上具有应用前景.然而,如何区分 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira*,以及其在城镇污水脱氮系统中的分布和功能特性仍待探索.

事实上,CAOB 在城镇污水脱氮系统中可被检出,其序列数在传统生物脱氮工艺,DEMON,水力旋流器等脱氮系统中占总测序数为 0.28%~0.64%,其中生物膜中最高可达 17%[15-16];深度处理系统中 CAOB 可成为主导氨氧化微生物,丰度占细菌群落的 19.4%[17].低氧反应器中 *Ca. Nitrospira nitrosa* 序列数占总序列的 4.52%[18].然而,当前研究多聚焦于 CAOB 的丰度特性,其在城镇污水脱氮系统中的菌群特征和功能特性仍有待深入挖掘.

通过构建 CAOB 基因组库等方式,分析了 CAOB 在氨氧化群落和亚硝酸盐氧化群落中的丰度特征,探究了其基因组多样性特性,比较分析了 56 个不同水处理工艺中 CAOB 的分布特征差异,解析影响其分布的环境因子,为后续城镇污水脱氮系统 CAOB 的应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

样品来自杭州,西安,南京等地的 9 座城镇污水处理厂,生化池末端泥水混合物采集后迅速运回实验室,样品 7000r/min 离心弃上清液后将污泥冷藏至−80℃冰箱中冷藏.污水处理厂运行参数及水质特征如表 1 所示.

表 1 采集样品的 9 座城镇污水处理厂的运行参数及水质特征

Table 1 Operating parameters and water qualities of the 9WWTPs where samples were collected

序号	工艺	温度(℃)	溶解氧 (mg/L)	pH 值	MLSS (mg/L)	进水 COD (mg/L)	出水 COD (mg/L)	进水 NH_4^+−N (mg/L)	出水 NH_4^+−N (mg/L)	出水 TN (mg/L)
X1	氧化沟	17	2.0	7	4390	266.3	18.4	20.8	0.5	10.4
X2	AAO	17	2.5	6.9	6809	252.6	18.5	36.0	0.1	9.4
X3	MBR	20	2.0	7.3	5934	332.0	26.0	30.8	0.3	8.9
X4	AAO	20	2.0	7.1	5500	332.0	26.0	30.8	0.3	8.9
X5	AAO	18	2.0	6.7	5500	259.4	22.6	30.5	0.3	9.3
X6	AAO	16	2.6	8.4	9200	106.2	10.1	22.6	0.5	10.3
X7	Bardenpho	18	2.0	7.5	6000	400.0	10.0	30.0	0.1	4.0
X8	AAO	18	1.8	7.2	5940	274.3	18.4	28.5	0.3	8.6
X9	AAO−AO	18	1.0	7.3	4138	245.9	15.7	26.4	0.1	7.5

注:序号X1−X9代表本研究采集的9座污水处理厂活性污泥样品.AAO,MBR,Bardenpho分别代表厌氧−好氧−缺氧生物脱氮除磷工艺,膜生物反应器,脱氮能源的前置反硝化工艺.

主要试剂包括:预混型 Taq 酶 Premix Taq,TB Green Premix Ex TaqTM II(Takara 公司),DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司),DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司).

主要仪器包括:Colibri 微量分光光度计(Titertek−Berthold 公司);Bio−Rad CFX Real−Time PCR 仪器(Hercules 公司);宏基因组测序(天津诺禾致源生物公司);其中文库制备 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina,测序平台 Illumina Novaseq 6000 平台;宏基因组数据分析,实验室数据分析平台(Ubuntu 20.04.6LTS).

1.2 DNA 提取与定量聚合酶链反应

使用DNA提取试剂盒从1.1节采集的污泥样品(X1−X9,3 个生物学重复)提取 DNA,并进行质检和浓度定量.通过定量聚合酶链反应(qPCR)定量基因丰度.引物和退火温度如下所示:总细菌 16S rRNA 基因 (338F/806R,53℃)[19],CAOB *amoA* 基因 (comamoA AF /comamoA SR,56℃)[20],AOB *amoA* 基因 (amoA−1F/amoA−2R,55℃)[21],AOA *amoA* 基因 (Arch−amoA−F/Arch−amoA−R,56℃)[22],*Nitrospira*

16S rRNA 基因 (Nspra675F/Nspra746R,64℃)[23], *Nitrobacter* 16S rRNA 基因(Nitro1198F/ Nitro1423R, 58℃)[24].qPCR 反应体系为 25μL,反应程序设置为:95℃解链 3min,设置 40 个循环,以 95℃ 30s,退火温度下 30s 和 72℃ 45s 为 1 个循环,在每个循环结束设置荧光信号采集,所有循环结束以后获得熔解曲线.

1.3　宏基因组分析

污泥样品 DNA 委托天津诺禾致源生物公司,通过 Illumina Novaseq 6000 平台(150−PE)进行双端测序.下机后数据通过实验室自建平台进行数据分析,原始序列通过 Trimmomatic v0.39 质控,Clean reads 质检合格后采用 Megahit v1.2.9 组装获得 final contigs, 通过 MetaWRAP v1.3.2 获得完整度>70%,污染率<10%的 MAGs,采用 dRep v3.2.2 以平均核苷酸相似度(ANI)<99%的原则对 MAGs 聚类并去冗余,通过 coverM v0.6.1(−genome 选项)定量非冗余集合中每个 MAGs 在不同样品中的丰度,采用 GTDB−Tk v1.6.0 确定 MAGs 的分类学特性,使用 OrthoANIu 工具计算基因组间的 ANI 值,通过 prokka v1.13.7, KEGG mapper,RAST 和 NCBI NR 数据库对 MAGs 的基因进行注释分析,得到功能基因注释结果,测序数据已上传至 NCBI 平台(PRJNA1196098).

1.4　宏基因组数据下载和分析

为分析不同水处理系统中的 CAOB 分布特征差异,本研究从 NCBI 数据库下载了 47 个水处理工艺的宏基因组数据,如表 2 所示,包括污水处理厂(WWTPs,简称 W)活性污泥数据(16 个),饮用水滤池(DWTPs,简称 D)生物膜数据(20 个)和短程硝化−厌氧氨氧化系统(PN/A,简称 P)污泥数据(11 个),通过宏基因组分析方法拼接得到 *Nitrospira* MAGs.首先通过 dRep v3.2.2 对所有 MAGs 进行去冗余,然后采用 UBCG v3.0 软件构建基于 *Nitrospira* MAGs 91 个单拷贝核心保守基因的基因组系统发育树,区分 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira,*通过 coverM 软件,分析定量不同样品中 *Nitrospira* MAGs 的丰度.

1.5　数据统计分析

通过 Past 3 计算微生物群落和环境因子间的相关性,利用 DistLM 计算不同环境因子对 CAOB 群落差异的解释度,通过 R v4.1.0 计算 α/β 多样性指数,进行主坐标分析(PCoA),通过 Mantel test 分析样品中的群落分布差异,并确定显著影响因素.

表 2　NCBI 下载的 47 个宏基因组数据

Table 2　47Metagenomic data downloaded from NCBI

编号	SAR	来源	编号	SAR	来源
W1	SRR6800319	BNR	D9	SRR5680087	慢砂滤池
W2	SRR6800322	BNR	D10	SRR5680088	快滤池
W3	SRR6800332	水力旋流器	D11	SRR5680089	活性炭滤池
W4	SRR6800333	水力旋流器	D12	SRR6797127	自来水样品
W5	SRR6837576	MBR	D13	SRR6797131	自来水样品
W6	SRR6837577	AOA	D14	SRR6797134	自来水样品
W7	SRR9827757	SND	D15	SRR6797136	自来水样品
W8	SRR9827758	Bardenpho	D16	SRR6797149	自来水样品
W9	SRR9827759	Bardenpho	D17	SRR6797150	自来水样品
W10	SRR9827760	IFAS	D18	SRR6797151	自来水样品
W11	SRR9827762	SBR	D19	SRR747868	石英砂滤池
W12	SRR9827767	MBR	D20	SRR850211	DWTP 出水
W13	SRR9827770	SND	P1	SRR6800323	PN/A
W14	SRR9827774	BNR	P2	SRR6800324	PN/A
W15	ERR1414274	AO	P3	SRR6800325	PN/A
W16	SRR5571009	AO	P4	SRR6800326	PN/A
D1	SRR13171205	石英砂滤池	P5	SRR6800327	PN/A
D2	SRR13171207	锰砂滤池	P6	SRR6800328	MBBR
D3	SRR13171209	石英砂滤池	P7	SRR6800329	PN/A
D4	SRR13171211	锰砂滤池	P8	SRR9827761	PN/A
D5	SRR13171213	锰砂滤池	P9	SRR9827763	PN/A
D6	SRR13171215	石英砂滤池	P10	SRR9827773	PN/A
D7	SRR13171217	锰砂滤池	P11	SRR8731048	PN/A
D8	SRR13171219	石英砂滤池			

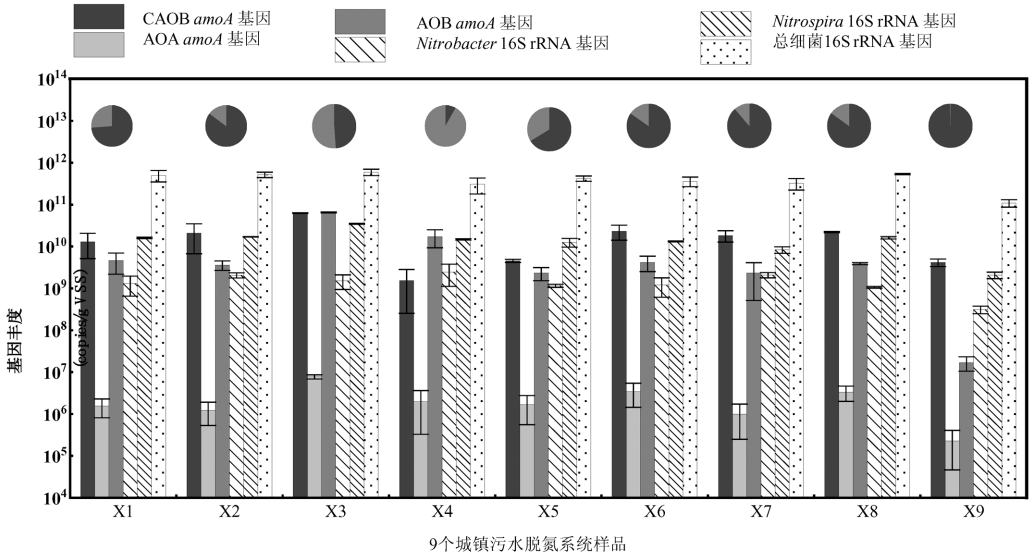
注:序号W,D,P分别代表NCBI数据库下载得到的污水处理厂,饮用水处理系统和短程硝化−厌氧氨氧化系统的宏基因组测序数据,BNR,AOA,IFAS,SBR,SND分别代表污水生物脱氮工艺,缺氧−好氧−缺氧工艺,一体式固定膜活性污泥工艺,序批式活性污泥工艺,同步硝化反硝化工艺.

2　结果与分析

2.1　城镇污水脱氮系统中 CAOB 的丰度和多样性

2.1.1　CAOB *amoA* 基因丰度特征　如图 1 所示,9 个城镇污水脱氮系统的氨氧化群落中,CAOB *amoA* 基因丰度为 1.5×10^{9}~6.2×10^{10}gene copies/gVSS.78% 的样品中 CAOB *amoA* 基因丰度高于 AOB *amoA* 基因,且普遍比 AOA 高 2~4 个数量级,可成为优势氨氧化微生物.X9 样品中 CAOB *amoA* 占总 *amoA* 基因的 99.6%,是该系统中丰度最高的氨氧化微生物.亚硝酸盐氧化群落中,*Nitrospira* 16S rRNA 基因丰度为 2.1×10^{9}~3.5×10^{10}gene copies/gVSS, *Nitrobacter* 16S rRNA 基因丰度为 1.1×10^{9}~3.1×10^{9}gene copies/gVSS.*Nitrospira* 丰度是 *Nitrobacter* 的 4−23 倍.考虑到 *Nitrospira* 实际上包括 NOB 型 *Nitrospira* 和

CAOB,且 CAOB *amoA* 基因丰度和 *Nitrospira* 16S rRNA 基因丰度处于同一数量级,无法通过 qPCR 进行比较分析,后续通过宏基因组学分析定量 NOB 型 *Nitrospira* 和 CAOB 丰度特征.



注：其中饼图代表CAOB *amoA*基因(深灰色)，AOA *amoA*基因(浅灰色)和AOB *amoA*(灰色)基因在总*amoA*基因丰度中的占比.

图 1 9 个城镇污水脱氮系统样品中总细菌, CAOB, AOA, AOB, *Nitrobacter*, *Nitrospira* 的特征基因丰度

Fig.1 Featured gene abundances of total bacteria, CAOB, AOA, AOB, *Nitrobacter* and *Nitrospira* in 9 urban wastewater nitrogen removal system samples

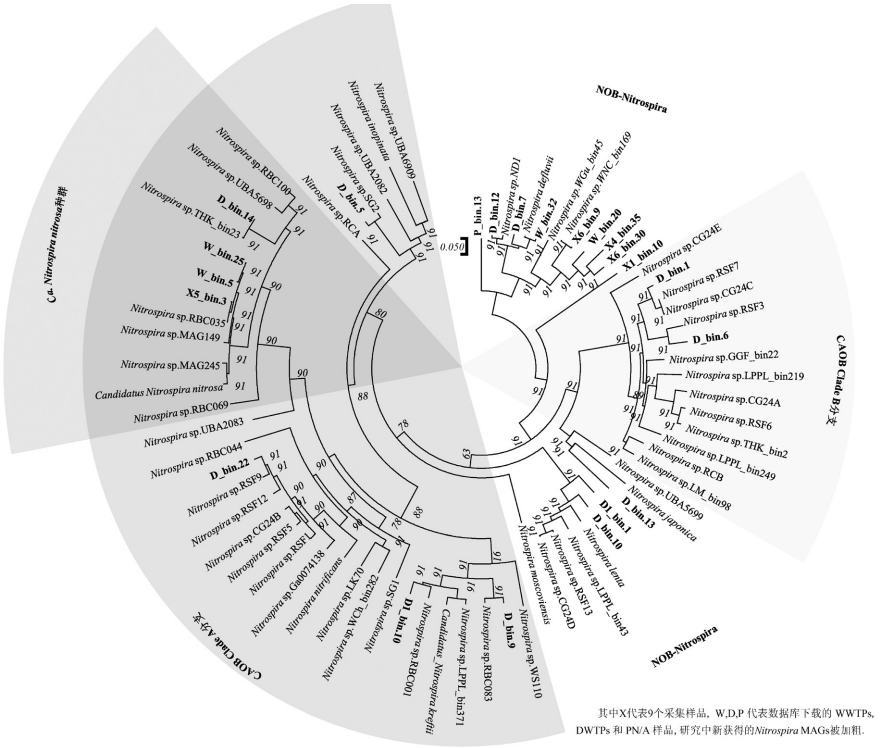


图 2 基于 UBCG 软件构建的 *Nitrospira* 基因组系统发育树

Fig.2 Phylogenomic tree of *Nitrospira* genomes by UBCG pipeline

2.1.2 CAOB 基因组库构建 从 NCBI 数据库下载了典型 *Nitrospira* MAGs,通过去冗余分析,获得了 53 个高质量的 *Nitrospira* MAGs,其中包括 42 个 CAOB MAGs 和 11 个 NOB 型 *Nitrospira* MAGs[25],以此作

为参考基因组,构建了 CAOB MAGs 系统发育树(图 2).此外,通过 9 个城镇污水脱氮系统数据的宏基因组分析,得到了 5 个高质量 *Nitrospira* MAGs;通过对 47 个水处理系统的宏基因组数据分析,得到了 17 个高质量 *Nitrospira* MAGs,通过丰度定量,多样性分析等方法比较分析不同水处理工艺中 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira* 的丰度和多样性特征差异.

2.1.3　CAOB 基因组丰度特征　系统发育分析表明,9 个城镇污水脱氮系统数据分析中获得 1 个 CAOB clade A MAGs(X5_bin3).47 个水处理系统宏基因组数据分析中,WWTPs 污泥中获得 2 个 CAOB clade A MAGs(W_bin.25,W_bin.5),DWTPs 生物膜中获得 7 个 CAOB MAGs,其中 5 个属于 clade A 分支,而 PN/A 工艺污泥数据未得到 CAOB MAGs.如图 2 所示,通过 UBCG 软件构建基于 *Nitrospira* MAGs 91 个单拷贝核心保守基因的系统发育树.结果表明,城镇污水脱氮系统中获得的 3 个 CAOB clade A MAGs(X5_bin3,W_bin.25,W_bin.5)与 *Ca.Nitrospira nitrosa* 系统发育距离较近(分支支持值≥90),通过计算发现上述 CAOB MAGs 与 *Ca.Nitrospira nitrosa* ANI 相似度为 94.3%~94.7%.另外,图 2 中与 *Ca.Nitrospira nitrosa* 系统发育距离较近(分支支持值≥90)的共有 11 个 MAGs,其中 *Nitrospira* sp.RBC069 与 *Ca.Nitrospira nitrosa* ANI 相似度最低,为 80.8%,*Nitrospira* sp.MAG245 相似度最高,为 95.6%.考虑到相似或同一物种基因组核苷酸相似度在 80%~100%之间[26],本研究将 *Ca.Nitrospira nitrosa* 及与其 ANI 相似度>80%的 11 个 MAGs 统一命名为 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群.

如图 3 所示,CAOB,NOB 型 *Nitrospira* 在微生物群落的相对丰度分别为 0.04%~1.46%和 1.4%~4.0%(图 3(a)),检出的 CAOB 均为 clade A 分支.*Nitrospira* 群落中,CAOB 占比在 1.4%~48.6%区间范围里,部分系统中丰度与 NOB 型 *Nitrospira* 接近.NCBI 下载的 16 个 WWTPs 数据中,CAOB 在 4 个样品中被检出,相对丰度为 0.6%~4.9%,在 *Nitrospira* 群落中的占比为 16.1%~93.9%,11 个 PN/A 系统样品中均未检出(图 3(b)).值得注意的是,被调研的 25 个传统城镇污水脱氮系统中,*Ca.Nitrospira nitrosa* 种群在总 CAOB 群落的相对丰度占比为 87%~100%,是被调研的污水脱氮系统中的主导 CAOB 种群,考虑到 CAOB MAGs 丰度占 *Nitrospira* 群落最高可达 93.9%,推测其可能在亚硝酸盐氧化过程中发挥重要作用.

NCBI 下载的 20 个 DWTPs 数据中,仅 3 个未被检出.检出的 17 个样品中,CAOB clade A 和 clade B 均相对丰度分别为 0.1%~29.1%和 0.5%~6.3%.与城镇污水脱氮系统的结果不同,DWTPs 中 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群仅在 9 个系统中被检出,仅 D5(锰砂滤池系统),D19(石英砂滤池系统)中 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群在总 CAOB 群落的相对丰度占比为 83%,60%,在其他样品中均低于 34%(图 3(b)).

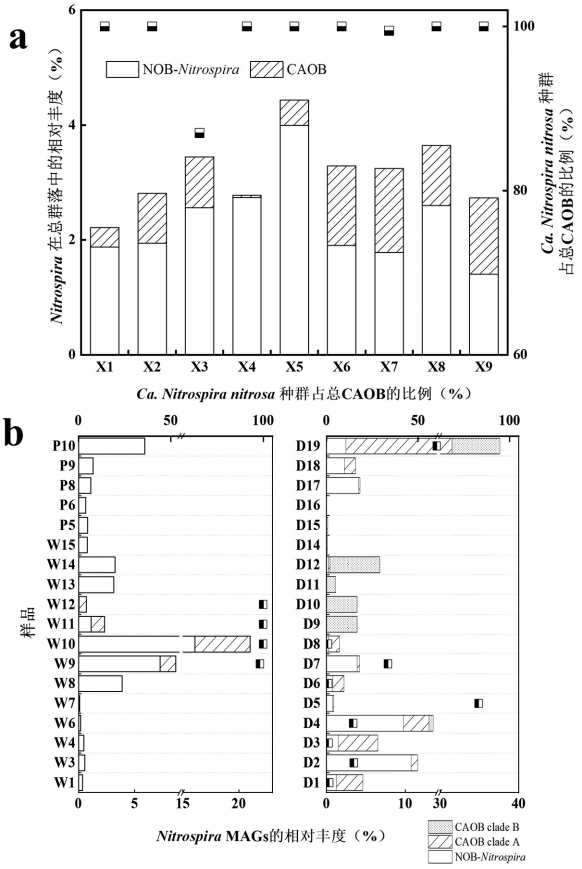


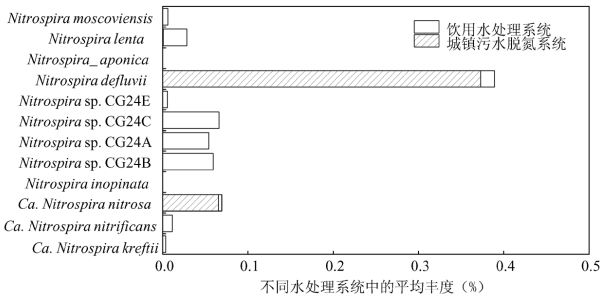
图 3　9 个城镇污水脱氮系统样品(a)和 NCBI 下载数据(b)中 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira* 在总群落中的平均相对丰度,以及 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群占总 CAOB 的比例

Fig.3　Average relative abundances of CAOB and NOB-*Nitrospira* in the total microbial community, and proportion of *Ca.Nitrospira nitrosa* cluster in total CAOB community in 9urban wastewater nitrogen removal system samples (a) and data downloaded from NCBI(b)

定量分析发现(图 4),被调研的 WWTPs 和 DWTPs 系统中,CAOB 纯培养物 *Nitrospira inopinata*

在所有样品中均未被检出,这可能是由于 *Nitrospira inopinata* 的原始生境特殊(俄罗斯某地 1200m 深石油勘探井生物膜),导致其在常规水处理系统中不常见.富集培养物 *Ca.Nitrospira nitrificans* 和 *Ca. Nitrospira kreftii* 平均丰度仅为 0.005%和 0.001%.

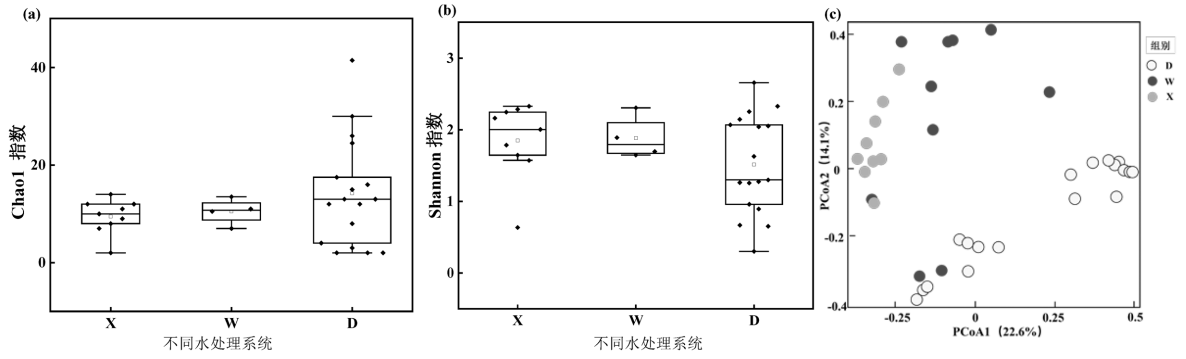
2.1.4 CAOB 多样性特征 以 DWTPs 进行对照,分析城镇污水脱氮系统中 CAOB MAGs 在 *Nitrospira* 群落中的多样性.如图 5(a−b)所示,两组城镇污水脱氮系统(X 和 W)中 α 多样性指数较为接近,推测污水脱氮系统中群落相似度较高.城镇污水脱氮系统和 DWTPs 系统的群落差异较大,被调研的城镇污水脱氮系统 CAOB chao1 指数(7~14)平均值低于 DWTPs(2~41.5),而 Shannon 指数(0.6~2.3)平均值高于 DWTPs(0.3~2.7),推测城镇污水脱氮系统中 CAOB 的菌群总数较低,但群落均匀度高于 DWTPs.



注：数据来源为本研究分析的宏基因组数据

图 4 城镇污水脱氮系统和饮用水系统中种水平 *Nitrospira* 的平均丰度

Fig.4 Average abundance of *Nitrospira* species in urban nitrogen removal systems and DWTPs



其中X代表9个采集样品, W,D,P 代表数据库下载的 WWTPs, DWTPs 和 PN/A 样品数据.

图 5 城镇污水脱氮系统和饮用水处理系统中(a)CAOB chao1 指数,(b)shannon 指数箱线图,以及(c)基于 Bray−Curtis 距离的 CAOB 群落分布 PCoA 图

Fig.5 Box plots of (a) chao 1index,(b) shannon index of CAOB and (c) PCoA plots of CAOB community based on Bray−Curtis distance in WWTPs and DWTPs.

PCoA 分析表明,第一,二坐标轴(PCoA1 和 PCoA2)对 CAOB 群落结构的解释度分别为 22.6%和 14.1%.城镇污水脱氮系统和 DWTPs 系统群落各自聚集,其中 DWTPs 形成 2 个聚类,推测与 clade A 和 clade B 分支组成差异有关(图 5(c)).

2.2 城镇污水脱氮系统中 CAOB 分布的影响因子

相关性分析发现,CAOB MAGs 的相对丰度,包括 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群和 CAOB clade A 分支,与出水 COD 显著负相关(P<0.01),与好氧区 pH 值显著正相关(表 3).CAOB 的多样性指数(Shannon, Simpson)与好氧区 pH 值显著正相关,其中 Simpson 指数还与出水 COD 显著负相关.Mantel 检验表明,不同样品中 CAOB 的菌群差异(β 多样性)与温度和出水 COD 显著正相关.DistLM 计算显示,出水 COD, pH 值,NH_4^+和 DO 对群落分布差异的解释度分别为 26.0%,14.7%,2.2%和 0.5%.

除上述因子外,深入分析检出 CAOB 的城镇污水脱氮系统时发现,AAO 及其改良工艺中,CAOB 在 *Nitrospira* 群落中的相对丰度为 1.4%~48.6%,MBR 等膜生物反应器中则为 23.4%~93.9%.IFAS 工艺(W10)中 CAOB 在总微生物群落的丰度为 4.9%,是所有检出系统中丰度最高.另外,由于 X3,X4 来自同一系统的 MBR 和 AAO 工艺,X3 中 CAOB 丰度为 X4 的 23 倍,推测高污泥停留时间是促进 CAOB 富集的重要因素.X9 中 CAOB *amoA* 基因占 *amoA* 基因的 99.6%, CAOB MAGs 占总 *Nitrospira* 的 48.6%,在 9 个调研的

城镇污水脱氮系统中比例均最高,对比理化因子和营养因子,X9 的低 DO(1mg/L)环境可能是淘汰其他硝化菌的潜在影响因素.不同 NH_4^+水平是城镇污水脱氮系统,DWTPs 和 PN/A 系统污泥中的 CAOB 差异的重要因素,本研究调研的 PN/A 系统以高浓度侧流废水处理系统(NH_4^+>400mg N/L)为主,而 DWTPs 中 NH_4^+浓度常低于 1.0mg N/L,有利于 CAOB clade B 生存,本研究的城镇污水脱氮系统中进水 NH_4^+浓度(20.8mg N/L~36.0mg N/L)可能促进了 CAOB clade A 中的 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群的生存.

表 3　9 个采集样品中 CAOB 分布的影响因子相关性分析

Table 3　Correlations between CAOB and influential factors in 9samples

影响因子	qPCR	MAGs 相对丰度		α 多样性			β 多样性
	amoA 基因丰度	*Ca.Nitrospira nitrosa* 种群	CAOB clade A	Shannon	Simpson	Chao1	Bray−Curtis
Temperature	−0.24	−0.34	−0.24	−0.05	−0.24	0.19	**0.42***
进水 COD	−0.02	−0.19	−0.12	0.19	0.06	0.29	−0.13
出水 COD	−0.13	**−0.86****	**−0.82****	−0.56	**−0.74***	−0.28	**0.36***
进水 NH_4^+	0.02	−0.28	−0.30	−0.14	−0.29	−0.13	−0.30
出水 NH_4^+	0.20	−0.50	−0.43	−0.24	−0.24	−0.08	−0.30
出水 TN	0.17	−0.44	−0.49	−0.41	−0.38	−0.39	−0.26
好氧区 DO	0.45	0.03	−0.05	−0.09	0.07	−0.10	−0.28
好氧区 pH 值	0.41	**0.73***	**0.80***	**0.79***	**0.81***	0.55	−0.16
好氧区 MLSS	**0.71***	0.50	0.46	0.53	0.59	0.32	−0.31

注: **表示P<0.01,* 表示P<0.05.

3　讨论

3.1　Ca.Nitrospira nitrosa 种群在城镇污水脱氮系统中的作用

研究表明,9 个城镇污水脱氮系统中 CAOB *amoA* 基因丰度为 1.5×10^9~6.2×10^{10}gene copies/gVSS,与以往研究一致[20,27].然而,基于功能基因的丰度定量可能存在引物简并性等问题[28],且考虑到无法以 16S rRNA 基因区分 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira*.本研究创新性地构建了基因组库区分 CAOB 和 NOB 型 *Nitrospira*,实现了 CAOB 在 *Nitrospira* 群落中的丰度定量.MBR 系统中 CAOB 占总 *Nitrospira* 的比例达 93.9%,可成为重要的亚硝酸盐氧化菌,且 CAOB 在微生物群落中的相对丰度最高可达 4.9%,高于他人报道的宏基因组结果[16].本研究 CAOB clade B 分支未在污水处理系统中检出,而在 DWTPs 中广泛存在,可能与环境适应性相关.事实上,CAOB clade B 分支首先在地下水体中发现,且从 DWTPs 中获得了完整度较高的 MAGs[2,29].CAOB clade B 基因组编码高亲和力的 MEP 型氨转运蛋白(μmol 级别)[8],更适合在寡营养生境,而非氨浓度较高的污水脱氮系统中生存.

宏基因组分析表明,城镇污水脱氮系统中 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群可成为优势硝化菌群.*Ca.Nitrospira nitrosa* 最初由荷兰科研团队以生物膜作为接种物,通过 SBR 反应器富集所得[4].随后,科学家通过运行低 DO,高 SRT 反应器,均获得了以 *Ca.Nitrospira nitrosa* 为主导的硝化菌群[18,30].生化段,三级处理段等也获得了与 *Ca.Nitrospira nitrosa* 相似度较高的基因草图[15,31].有研究人员通过稳定同位素核酸探针技术对含 CAOB 的污水处理厂样品进行培养,发现被标记的 CAOB 主要为 *Ca.Nitrospira nitrosa*[32],证实了 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群在污水系统中具有活性.群落多样性分析表明,城镇污水脱氮系统中 CAOB 的群落均匀度较高,而饮用水系统,土壤等系统中 CAOB 的丰富度更高(存在 clade A 和 clade B 分支).事实上,相关研究发现 CAOB 在以“种”进行分类时的多样性低于传统的 AOB(如 *Nitrosomonas* 等)和 NOB(如 *Nitrospira* lineage I 等),在不同的城镇污水脱氮系统均以 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群为主[33].这恰恰揭示了 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群可能对城镇污水脱氮系统具有特定的适应能力.

比较基因组发现,大部分 CAOB 具有单拷贝的 *amoA* 基因,而 *Ca.Nitrospira nitrosa* 存在双拷贝 *amoA* 基因.除此之外,*Ca.Nitrospira nitrosa* 编码 Rh

型氨转运系统(mmol/级别,存在于β−AOB 中)的基因,亲和力较低,转运容量大[8,34-35],有利于提高底物转运速率,促进其在城镇污水脱氮系统中生存.此外,*Ca.Nitrospira nitrosa* 存在适应复杂环境的多种功能,如编码具备降解尿素和代谢脂肪酸代谢的相关基因,可能具备代谢多样性,通过多种方式获得能量;具有 IV 型分泌系统(VirB/D),存在帮助微生物排出毒力因子的潜力;存 NhaR,OxyR 等转录调节因子,具备通过应激反应抵抗不良环境等潜力[18].

因此,*Ca.Nitrospira nitrosa* 种群是城镇污水脱氮系统中的重要硝化菌,其可能对污水脱氮系统具有特定的适应性,这可能得益于其特殊的代谢特征.未来可加快对 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群富集,深入探究其代谢动力学特性,从而为挖掘城镇污水脱氮系统中 CAOB 菌种资源,促进工艺节能降耗提供支持.

3.2 CAOB 的适宜生存环境

NH_4^+,COD 等营养因子是影响 CAOB 在城镇污水脱氮系统中分布的重要因素.CAOB 在低 NH_4^+环境中更易成为主导硝化菌,与 CAOB 的高氨亲和力具有一致性.已有的动力学结果表明,CAOB *Nitrospira inopinata* 和 *Ca.Nitrospira kreftii* 具有极高氨亲和力(K_{m,NH_3}=3.4~9.7×10^{-4}mg N/L)[3,36],然而这两种 CAOB 在城镇污水脱氮系统中丰度几乎为 0.目前 *Ca.Nitrospira nitrosa* 的动力学特征尚未被报道,考虑到城镇污水脱氮系统中 NH_4^+−N 浓度基本低于 45mg N/L,且研究发现 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群在城镇污水脱氮系统中广泛存在,推测 *Ca.Nitrospira nitrosa* 的氨亲和力可能比 *Nitrospira inopinata* 和 *Ca.Nitrospira kreftii* 低,可适应常规污水脱氮环境,这有待后续验证.以往的研究发现,某三级污水处理系统中 *Nitroapira RBC035*(属于 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群)的丰度随系统中 NH_4^+浓度降低而降低.与城镇污水脱氮系统不同,DWTPs 中的极低 NH_4^+浓度,更有利于 CAOB clade B 分支出现,前人研究发现 CAOB clade B 分支在无外加氮源的土壤环境中活性比 clade A 分支高[37-38].本研究还证实了高 NH_4^+浓度(NH_4^+>400mg N/L)的 PN/A 系统中不存在 CAOB,可能与游离氨抑制相关,事实上,8.9mg N/L 游离氨可显著抑制 CAOB 的代谢活性[39].

COD 对 CAOB 的影响较为复杂.本研究发现,CAOB 与出水 COD 显著负相关,且 COD 对群落差异的解释度最高.以往的研究发现 200mg/L 有机物会对硝化污泥活性产生显著抑制作用[40],原因可能是异养菌消耗有机物,同化 NH_4^+,且异养菌形成微生物团聚体,导致 NH_4^+底物浓度降低,传质阻力增大,硝化菌的生长受限[41].除此之外,酚类,氰化物等有机物及代谢中间产物具有毒性,抑制硝化菌活性[42].然而,硝化菌还存在基质代谢多样性,适当增加进水 COD 可使 NOB 最大生长速率增加 10.3%[41].考虑到 CAOB 对尿素,甲酸等有机物质均具备降解能力[43-46],且存在异养代谢潜力,可将乙酸转化为乙酰辅酶 A,提供额外的能源和碳源[47],推测 COD 可能具有部分促进作用.因此,COD 对 CAOB 分布影响可能是多重作用叠加的结果.

研究发现,pH 值与 CAOB 分布显著正相关.考虑到 9 个城镇污水脱氮系统生化池 pH 为中性偏碱环境(6.7~8.4),pH 值增加会提高城镇污水脱氮系统中实际代谢底物 NH_3 的浓度,提高底物代谢速度,促进 CAOB 生长.与以往的研究类似,本研究发现 MBR,IFAS 等膜系统中 CAOB 丰度和多样性较高[15].高污泥停留时间可提高 CAOB 在系统中的持留,结合 CAOB 的代谢多样性和高氨亲和力,通过加强多底物利用,可提高 CAOB 的生存优势[15-16].CAOB 在 0.06mg/L 的低 DO 环境下仍有氨氧化活性[11],通过控制 DO<1mg/L 可促进 CAOB 成为主导的氨氧化微生物[30].CAOB 通过还原性三羧酸循环固定 CO_2,其关键酶(如铁氧化还原蛋白等)对氧气敏感,编码的过氧化物酶等基因可增强氧化应激保护,这均有助于 CAOB 在低 DO 环境中的生存.

因此,城镇污水脱氮系统中,以 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群为优势的 CAOB,可能倾向于在中低氨浓度,低溶解氧,中性偏碱,长污泥停留时间等环境中生存. CAOB 的上述特性有助于其在低氧,低氨环境中实现硝化功能,与其他脱氮功能微生物合作脱氮,节约曝气能耗,降低温室气体排放,在低碳深度脱氮处理具有应用前景.然而,上述因素对 CAOB 分布的影响机制有待深入研究.

4 结论

4.1 城镇污水脱氮系统中 CAOB CAOB 是重要的硝化菌,在氨氧化群落(基于 *amoA* 基因)和 *Nitrospira* 群落(基于 MAGs)占比分别为 8.2%~99.6%,1.4%~

48.6%.

4.2　通过构建 CAOB 特征基因组库,识别出 *Ca.Nitrospira nitrosa* 种群是城镇污水脱氮系统中的优势 CAOB 功能菌群,且菌群多样性低于 DWTPs,推测其对城镇污水脱氮系统具有特定的适应能力.

4.3　通过相关性分析,发现 pH 值和 COD 分别与 CAOB 的分布显著正相关和负相关,其在中低 NH_4^+ 浓度下更易成为优势硝化菌,适应低氧、中性偏碱环境,且在 MBR,IFAS 等膜工艺中丰度较高,可能与其代谢多样性相关.

参考文献：

[1] Gujer W. Nitrification and me – A subjective review [J]. Water Research. 2010,44(1):1−19.

[2] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria [J]. Nature. 2015,528(7583):504−509.

[3] Kits K D, Sedlacek C J, Lebedeva E V, et al, Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle [J]. Nature. 2017, 549(7671):269−272.

[4] Van Kessel M A H J, Speth D R, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism [J]. Nature. 2015,528(7583): 555−559.

[5] Pinto A J, Marcus D N, Ijaz U Z, et al. Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*−like bacteria in a drinking water system [J]. mSphere, 2016,1(1):1−8.

[6] 曾　薇,张丽敏,王安其,等.污水处理系统中硝化菌的菌群结构和动态变化 [J]. 中国环境科学, 2015,35(11):3257−3265.
Zeng W, Zhang L M, Wang A Q, et al. Community structures and population dynamics of nitrifying bacteria in activated sludges of wastewater treatment [J]. China Environmental Science, 2015,35(11): 3257−3265.

[7] Ju F, Xia Y, Guo F, et al. Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants [J]. Environmental Microbiology. 2014,16(8):2421−2432.

[8] Palomo A, Pedersen A G, Fowler S J, et al. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira* [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2018,12(7):1779−1793.

[9] 许少怡,肖　锐,柴文波,等.全程硝化菌微生物学特性及在水处理领域的应用潜力 [J]. 微生物学报, 2020,61(2):315−332.
Xu S Y, Xiao R, Chai W B, et al. Microbial characteristics and application potential of complete ammonia oxidation bacteria in water treatment system [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021,61(2):315−332.

[10] Sakoula D, Koch H, Frank J, et al. Enrichment and physiological characterization of a novel comammox Nitrospira indicates ammonium inhibition of complete nitrification [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2021,15(4):1010−1024.

[11] Kits K D, Jung M Y, Vierheilig J, et al. Low yield and abiotic origin of N_2O formed by the complete nitrifier *Nitrospira inopinata* [J]. Nature Communications, 2019,10(1):1836.

[12] Pjevac P, Schauberger C, Poghosyan L, et al. *AmoA*−targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox *Nitrospira* in the environment [J]. Frontiers in Microbiology, 2017,8:1508.

[13] Hu J, Zhao Y, Yao X, et al. Dominance of comammox *Nitrospira* in soil nitrification [J]. Science of the Total Environment, 2021,780: 146558.

[14] Wang Y, Ma L, Mao Y, et al. Comammox in drinking water systems [J]. Water Research, 2017,116:332−341.

[15] Cotto I, Dai Z, Huo L, et al. Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of comammox bacteria in nitrogen removal systems [J]. Water Research, 2020,169:115268.

[16] Annavajhala M K, Kapoor V, Santo−Domingo J, et al. Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2018,5(2):110−116.

[17] Spasov E, Tsuji J M, Hug L A, et al. High functional diversity among *Nitrospira* populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2020.

[18] Camejo P Y, Santo Domingo J, McMahon K D, et al. Genome−enabled insights into the ecophysiology of the comammox bacterium "*Candidatus* Nitrospira nitrosa" [J]. mSystems, 2017,2(5):e00059.

[19] Dong W, Liu E, Yan C, et al. Impact of no tillage vs. conventional tillage on the soil bacterial community structure in a winter wheat cropping succession in northern China [J]. European Journal of Soil Biology, 2017,80:35−42.

[20] Wang M, Huang G, Zhao Z, et al. Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox *amoA* gene in full−scale wastewater treatment plants [J]. Bioresource Technology, 2018,270:580−587.

[21] Shu D, He Y, Yue H, et al. Microbial structures and community functions of anaerobic sludge in six full−scale wastewater treatment plants as revealed by 454high−throughput pyrosequencing [J]. Bioresource Technology, 2015,186:163−172.

[22] Marshall A, Phillips L, Longmore A, et al. Primer selection influences abundance estimates of ammonia oxidizing archaea in coastal marine sediments [J]. Marine Environmental Research, 2018,140:90−95.

[23] Attard E, Poly F, Commeaux C, et al. Shifts between *Nitrospira* and *Nitrobacter*−like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices [J]. Environmental Microbiology, 2010,12(2):315−26.

[24] Graham D W, Knapp C W, Van Vleck E S, et al. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2007,1:385.

[25] Palomo A, Dechesne A, and Smets B F. Genomic profiling of *Nitrospira* species reveals ecological success of comammox Nitrospira [J]. Microbiome, 2022,10:204.

[26] Jain C, Rodriguez R L A−O, Phillippy A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries [J]. Nature Communication, 2018,9:5114.

[27] Zheng M, Wang M, Zhao Z, et al. Transcriptional activity and

diversity of comammox bacteria as a previously overlooked ammonia oxidizing prokaryote in full-scale wastewater treatment plants [J]. Science of the Total Environment, 2019,656:717-722.

[28] 高复云.完全氨氧化菌的分子生态学研究进展 [J]. 应用生态学报, 2020,31(8):2831-2840.
Gao F Y, Li Y Y, Yao H Y. Research progress on primers and molecular ecology of comammox *Nitrospira* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020,31(8):2831-2840.

[29] Palomo A, Jane Fowler S, Gulay A, et al. Metagenomic analysis of rapid gravity sand filter microbial communities suggests novel physiology of Nitrospira spp [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2016,10(11):2569-2581.

[30] Roots P, Wang Y, Rosenthal A F, et al. Comammox *Nitrospira* are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor [J]. Water Research, 2019,157:396-405.

[31] Spasov E, Tsuji J M, Hug L A, et al. High functional diversity among *Nitrospira* populations that dominate rotating biological contactor microbial communities in a municipal wastewater treatment plant [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2020,14:1857-1872.

[32] 田志超.完全氨氧化菌在污水处理系统中的氨氧化活性研究 [D]. 北京:华北电力大学, 2022.
Tian Z C. Study on ammonia-oxidation activity of complete ammonia-oxidizing bacteria in wastewater treatment system [D]. Beijing: North China Electric Power University, 2022.

[33] Cotto I, Vilardi K J, Huo L, et al. Low diversity and microdiversity of comammox bacteria in wastewater systems suggest specific adaptations within the Ca. Nitrospira nitrosa cluster [J]. Water Research, 2023,229:119497.

[34] Lehtovirta Morley L E, Sayavedra Soto L A, Nicolas G, et al. Identifying potential mechanisms enabling acidophily in the ammonia oxidizing archaeon *" Candidatus Nitrosotalea devanaterra"* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016,82(9):2608.

[35] Weidinger K, Meyer O, Gilch S, et al. Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007,273(2):260-267.

[36] Sakoula D, Koch H, Frank J, et al. Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification [J]. International Society for Microbial Ecology Journal, 2020,15:1010–1024.

[37] Wang Z H, Cao Y Q, Zhu Barker X, et al. Comammox *Nitrospira* clade B contributes to nitrification in soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019,135:392-395.

[38] Xu S, Wang B, Li Y, et al. Ubiquity, diversity, and activity of comammox Nitrospira in agricultural soils [J]. Science of the Total Environment, 2020,706:135684.

[39] Shao Y H and Wu J H. Comammox *Nitrospira* species dominate in an efficient partial nitrification-anammox bioreactor for treating ammonium at low loadings [J]. Environmental Science & Technology, 2021,55(3):2087-2098.

[40] Gomez J, Mendez R, and Lema J M. Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000,87(3):189-202.

[41] Hanaki K, Wantawin C, and Ohgaki S. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor [J]. Water Research, 1990,24(3):289-296.

[42] Kim Y M, Park D, Lee D S, et al. Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008,152(3):915-921.

[43] Fowler S J, Palomo A, Dechesne A, et al. Comammox *Nitrospira* are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities [J]. Environmental Microbiology, 2018,20(3): 1002-1015.

[44] Schmidt I. Chemoorganoheterotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosomonas eutropha* [J]. Current Microbiology, 2009,59(2):130.

[45] Palatinszky M, Herbold C, Jehmlich N, et al. Cyanate as an energy source for nitrifiers [J]. Nature, 2015,524:105.

[46] Daims H, Lücker S, and Wagner M, A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria [J]. Trends in Microbiology, 2016,24(9):699-712.

[47] Xu S, Chai W, Xiao R, et al. Survival strategy of comammox bacteria in a wastewater nutrient removal system with sludge fermentation liquid as additional carbon source [J]. Science of the Total Environment. 2022,802:149862.

作者简介：许少怡(1995-),女,浙江天台人,工程师,博士,主要从事城镇排水与污水处理技术研究.发表论文 10 余篇.xushaoyi0406@163.com.