

污水处理系统中硝化菌的菌群结构和动态变化

曾 薇^{1*}, 张丽敏¹, 王安其¹, 张 洁¹, 彭永臻¹, 段俊岭² (1.北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100124; 2.北京城市排水集团有限责任公司, 北京 100044)

摘要: 研究分析了 4 种不同工艺类型的城市污水处理厂中氨氧化细菌(AOB)和亚硝酸盐氧化细菌(NO₂-OB)的丰度及菌群结构. 实时定量 PCR 结果表明 4 种工艺中 AOB 菌群的丰度范围为 $8.56 \times 10^6 \sim 4.46 \times 10^7$ cells/gMLSS; NO₂-OB 菌群的丰度为 $3.37 \times 10^8 \sim 1.53 \times 10^9$ cells/gMLSS. 每个工艺中 *Nitrospira* 都是优势 NO₂-OB, 占 NO₂-OB 菌群的 88% 以上. A²O 工艺冬季 AOB 和 *Nitrospira* 丰度比夏季均有所降低, 这是导致冬季生物脱氮效果变差的主要原因. 基于 *amoA* 基因的系统发育分析结果显示所有的序列属于 *Nitrosomonas*, 其中 *Nitrosomonas oligotropha* cluster 占克隆文库的 60.1%, 是 AOB 种群中的优势属, *Nitrosomonas-like* cluster 和 *Nitrosomonas europaea* cluster 次之, 分别占克隆文库的 29.6% 和 9.1%. *N. europaea* cluster 只在 A²O 工艺中出现, 且在 A²O 工艺夏季污泥样品克隆文库中达到 44.7%. 低 DO 运行使 *N. europaea* cluster 成为优势 AOB 是 A²O 工艺夏季出现较高亚硝酸盐积累率的主要原因. 研究结果证实了城市污水处理厂中优势 AOB 和 NO₂-OB 分别为 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira*, 硝化菌群占总菌群的 1%~7%, 其丰度、相对含量和菌群结构是影响硝化效果的主要因素.

关键词: 氨氧化细菌(AOB); 亚硝酸盐氧化细菌(NO₂-OB); 城市污水处理厂(WWTPs); 实时定量 PCR (QPCR); *amoA* 基因

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2015)11-3257-09

Community structures and population dynamics of nitrifying bacteria in activated sludges of wastewater treatment plants. ZENG Wei^{1*}, ZHANG Li-min¹, WANG An-qi¹, ZHANG Jie¹, PENG Yong-zhen¹, DUAN Jun-ling² (1.College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 2.Beijing Drainage Group Limited Liability Company, Beijing 100044, China). *China Environment Science*, 2015,35(11): 3257~3265

Abstract: Community structures and population dynamics of nitrifying bacteria determine biological nitrogen removal from municipal wastewater. The population structures and dynamics of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in four full-scale wastewater treatment plants (WWTPs) were investigated in this study. Quantitative real-time PCR results showed that the abundance of AOB was in a range of $8.56 \times 10^6 \sim 4.46 \times 10^7$ cells/gMLSS, while NOB was varying in $3.37 \times 10^8 \sim 1.53 \times 10^9$ cells/gMLSS. In each process *Nitrospira* was the dominant species of NOB. *Nitrospira* abundance was obviously higher than *Nitrobacter*, accounting for 88% of total NOB. In the A²O process the abundances of AOB and *Nitrospira* in winter were less than those in summer, leading to decline of biological nitrogen removal. The phylogenetic analysis of AOB *amoA* genes indicated that all the sequences were affiliated with genera *Nitrosomonas*, among which *Nitrosomonas oligotropha* cluster was the dominant species, accounting for 60% of the clone libraries. The pre-dominant AOB were *Nitrosomonas-like* cluster and *Nitrosomonas europaea* cluster, accounting for 29.6% and 9.1% of the clone libraries, respectively. *N. europaea* cluster was only found in A²O process, and reached 44.7% of total AOB in summer sample, which was a main reason causing high nitrite accumulation during summer operation of A²O process. The outcomes verified that the dominant AOB and NOB in WWTPs was *Nitrosomonas* and *Nitrospira*, respectively. Nitrifying bacteria accounted for 1%~7% of total bacteria. The abundances, relative distributions and community structures of nitrifying bacteria significantly influence the performance of biological nitrogen removal.

Key words: ammonium oxidizing bacteria (AOB); nitrite oxidizing bacteria (NOB); wastewater treatment systems (WWTPs); real-time quantitative PCR (QPCR); *amoA* genes

收稿日期: 2015-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(51278007, 51578016); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0891)

* 责任作者, 教授, zengwei_1@263.net

生物脱氮已广泛应用于城市污水处理厂,硝化作用是生物脱氮的首要环节,其功能微生物包括将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的氨氧化细菌(AOB)和将 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的亚硝酸盐氧化细菌(NOB)^[1].AOB 菌群主要属于变形菌纲的 β -Proteobacteria和 γ -Proteobacteria两个亚纲^[2],其中 β 亚纲分为亚硝化单胞菌群(*Nitrosomonas*)和亚硝化螺菌属(*Nitrospira*).NOB 主要有硝化杆菌属(*Nitrobacter*)、硝化螺菌属(*Nitrospira*)、硝化刺菌属(*Nitrospina*)及硝化球菌属(*Nitrococcus*)^[3].硝化菌群的丰度和菌群结构直接影响污水处理厂的硝化效果.

近年来,不依赖于纯培养的分子生物学分析方法成为研究污水处理系统硝化菌群的主要技术^[4-6].已有研究证实绝大多数生物反应器里 *Nitrosomonas* 是 AOB 中的优势菌属,而 *Nitrospira* 只出现在个别反应器里^[2,7-8].对于 NOB 菌群,以前一直认为 *Nitrobacter* 是污水生物处理系统中亚硝酸盐氧化的主导者^[9].也有研究者认为自然环境中的 NOB 以 *Nitrobacter* 和 *Nitrospira* 类型为主,其中 *Nitrobacter* 是土壤中 NOB 的主导类型,而 *Nitrospira* 在污水生物处理系统中分布较为广泛^[10].后来的一些研究表明 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 均存在于城市污水处理厂^[11],但是发现 *Nitrospira* 在污水生物处理系统中更为常见且数量高于 *Nitrobacter*^[12].由此可见,城市污水处理系统中 NOB 的优势菌群因工艺类型和运行参数的不同而具有各自的特征.很多实际污水处理系统中的硝化细菌对环境因素以及工艺参数非常敏感,例如温度、DO、水力停留

时间(HRT)以及抑制剂等因素均可以影响硝化细菌的组成^[13-15].以往对硝化菌群的定量分析主要集中在 AOB 菌群的研究上^[16],关于 NOB 的定量分析,尤其是 NOB 的两个亚属 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 的定量研究非常有限.本研究通过对不同工艺的城市污水处理厂中 AOB、NOB 的定量分析,考察工艺类型及运行条件对 AOB 和 NOB(*Nitrospira* 和 *Nitrobacter*)丰度的影响.

基于 16S rRNA 和 *amoA* 基因的现代分子生物学方法为复杂环境中 AOB 的多样性以及菌群结构分析提供了有力的手段^[17-19].氨单加氧酶(Ammonia monooxygenase, AMO)是氨氧化菌所特有的一种胞内酶,由 *amoA*、*amoB* 和 *amoC* 3 个亚基组成,其中 *amoA* 的基因产物含有该酶的活性位点.很多学者对不同 AOB 菌株的 *amoA* 基因和 16S rRNA 基因进行测序和系统发育树分析后,发现大部分 AOB 在分别基于 *amoA* 基因和 16S rRNA 基因的系统发育树上的分类有着高度的相似性^[19-21],但 *amoA* 基因类引物的扩增特异性更强,对 AOB 菌群遗传差异的分辨能力更高^[18,22].本研究基于 *amoA* 基因建立系统发育树,能够将 AOB 菌群进行更为细致精确的分类.

本研究选择具有代表性的大型市政污水处理厂,分析不同工艺的城市污水处理厂活性污泥中 AOB 和 NOB 菌群结构和代谢活性的差异,揭示污水处理厂 AOB 和 NOB 菌群结构、丰度与工艺运行的相关性.

1 材料与方法

1.1 城市污水处理厂的活性污泥样品

表 1 4 个污水处理系统的进出水水质指标及运行参数

Table 1 Influent and effluent characteristics and operation parameters of four WWTPs

污水系统	工艺	流量 (10 ⁵ m ³ /d)	进水(mg/L)		出水(mg/L)				MLSS(mg/L)	SRT(d)	HRT(h)	DO(mg/L)
			COD	NH ₄ ⁺	COD	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻				
A	倒置 A ² O	39.7	457.3	41.2	35.3	0.72	25	0.03	5000±350	13	9.5	4±0.5
B	AO	27.5	457.3	41.2	35.3	3	25	0.03	4000±400	15	16.5	5±0.8
C	氧化沟	20	480	45	33.6	3.5	6.5	0.02	3500±370	10	6.6	2.7±0.3
D-S	A ² O	60	600	50	25	1.7	7	2.2	3000±240	14	10.7	1.8±0.3

实验所用的 5 个污泥样品均取自二沉池回流污泥,命名为: A、B、C、D-S(夏季样品)、

D-W(冬季样品).A、B、C、D-S 取样时间为夏季7月,D-W 为冬季2月份.A和B取自同一水厂不同工艺:A 是倒置 A²O 工艺,缺氧段位于前端,优先考虑脱氮效果,即:缺氧-厌氧-好氧方式运行;B 是 AO 工艺,采用缺氧-好氧技术;C 取自卡鲁赛尔氧化沟工艺;D-S 和 D-W 取自同一工艺的夏季和冬季,工艺为传统的 A²O 工艺,即厌氧-缺氧-好氧.各个工艺进出水水质指标及运行参数见表 1.

1.2 DNA 提取、PCR、克隆测序

用 1×PBS 清洗污泥样品 3 次,14000×g 离心

2min(离心机:MIKRO 22 R,德国 Hettich),去除上清液,置于-20℃保存.采用试剂盒(Fast DNA Spin kit for soil, MP, USA)对 DNA 进行提取,提取后的 DNA 通过 Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)测量核酸浓度及纯度.

PCR 反应采用试剂盒(Promega GoTaq Green Master Mix, USA),反应体系为 25μL: 12.5μL GoTaq Green Master Mix,1μL (10mmol/L)正向引物,1μL (10mmol/L)反向引物,0.5~2μL DNA 模板,一定量的 ddH₂O.PCR 程序见表 2.

表 2 PCR 扩增程序及特异性引物
Table 2 Specific primers and PCR programs

菌群及目的基因	引物	序列	扩增长度(bp)	PCR 程序	参考文献
AOB amoA gene	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	95℃,15min;45cycles	[18]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		(95℃,1min;54℃,1min;72℃,1min)	
<i>Nitrobacter</i> 16S rDNA	Nb1000F	TGCGACCGGTCATGG	394	95℃,10min;35cycles	[16]
	1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC		(95℃,1min;62℃,2min;72℃,2min)	
<i>Nitrospira</i> 16S rDNA	NSR1113F	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	165	95℃,10min;35cycles	[16]
	1264R	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG		(95℃,1min;60℃,1min;72℃,2min)	
Bacterial 16S rDNA	1055F	ATGGCTGTCGTGACGT	323	95℃,10min;45cycles	[23]
	1392R	ACGGGCGGTGTGTAC		(95℃,30s;50℃,1min;72℃,20s)	

amoA 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳 (Agarose MS-6,TaKaRa,Japan)检测,为单一的条带,切胶,用纯化试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0TaKaRa, Japan)进行纯化.纯化后的 DNA 用试剂盒(Zero Background TA Topoisomerase Cloning Kit, Clonesmarter, USA)进行连接转化,连接体系为 10μL,包括 1μL pCloneEZ-TOPO 载体,1μL 10×Enhancer, 0.5~8μLDNA,一定量的用 ddH₂O.连接反应完成后将产物加入到感受态细胞 DH5a(中美泰和,国产)中进行转化.每个样品随机挑出 50 个 *amoA* 基因的阳性克隆子进行测序,构建克隆文库.

1.3 克隆文库建立和系统发育分析

构建文库的序列通过 Mothur 软件按照 97%相似度进行 OTU 划分,将每个 OTU 的代表序列与 NCBI 数据库中利用 BLAST 下载的相似性最高最具代表性的菌株序列一起进行比对.采用 MEGA5.0 利用邻接法(Neighbor joining method)

进行系统发育分析,通过自举分析方法(Bootstrap)检验系统发育树各分支置信度,重复 1000 次.

1.4 实时定量 PCR (QPCR)

采用特异性引物对 AOB *amoA* 功能基因,隶属于 NOB 菌群的 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 以及全菌的 16S rRNA 进行 QPCR 扩增.反应在 Mx3005P 实时定量 PCR 扩增仪 (Agilent Technologies, American)上进行,采用试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq kit, TaKaRa, Japan)进行反应,体系为 25μL 包括 12.5μL 的 SYBR 缓冲液,正反向引物各 1μL (10mmol/L), 0.5μL ROX, DNA 模板 2μL,一定量的 ddH₂O.采用试剂盒 (MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0, TaKaRa, Japan)回收质粒.

标准曲线的建立:用 NanoDrop ND-1000 (Thermo, American)分光光度计测定回收质粒的浓度(MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0, TaKaRa, Japan).将纯化后的质粒以 10 倍的浓度

梯度稀释用作 QPCR 标准品.反应在 Mx3005P 实时定量 PCR 扩增仪 (Agilent Technologies, American)上进行,采用试剂盒(SYBR Premix Ex Taq kit, TaKaRa, Japan)进行反应,体系为 25μL.

1.5 登录号

本研究所测得的 AOB 序列上传至 GenBank 数据库,AOB 的序列登录号为 :KR018127–KR018368.

2 结果与讨论

2.1 AOB 与 NOB 的实时荧光定量 PCR 分析

AOB、NOB (*Nitrobacter* 和 *Nitrospira*) 和总菌的实时荧光定量 PCR 的标准曲线的效率都在 90%~110%之间,相关系数均大于 0.998,特异性和扩增效率都符合精确定量的要求.标准品分别如下 :AOB 为 $8.55\times10^1\sim8.55\times10^8$ 拷贝, *Nitrobacter* 为 $1.05\times10^2\sim1.05\times10^9$ 拷贝, *Nitrospira* 为 $1.31\times10^2\sim1.31\times10^9$ 拷贝,总菌为 $4.98\times10^1\sim4.98\times10^8$ 拷贝.

表 3 为 AOB 和 NOB 绝对定量和相对定量的结果.5 个污泥样品中总菌丰度在一个数量级

上,定量范围为 1.10×10^{10} (B)~ 9.27×10^{10} (D-S) cells/gMLSS.硝化菌群在总菌中的百分含量大约为 1%~7%.AOB 种群数量 AO 工艺(B)最低,为 8.56×10^6 cells/gMLSS,其它 4 个污泥样品在 $1.20\times10^7\sim4.46\times10^7$ cells/gMLSS 之间.倒置 A²O 工艺 (A 样品)AOB 占总菌比例最高为 0.3%,其他 3 个工艺在 0.02%~0.08%之间.结合表 1 的进出水水质指标可以看出倒置 A²O 工艺的出水氨氮浓度最低(0.72mg/L),硝化效果最好.因此,AOB 在总菌中的相对含量决定了水厂的硝化效果. *Nitrospira* 在 D-S 中丰度最高,达到了 1.53×10^9 cells/gMLSS,占总菌比例为 1.64%,在其他 3 个工艺中数量级均为 10^8 cells/gMLSS,占总菌比例为 1.36%~6.12%之间. *Nitrobacter* 除了在样品 D-S 中丰度为零外,其余在 $1.69\times10^7\sim6.78\times10^7$ cells/gMLSS 之间,占总菌比例为 0.15%~0.39%之间.D-W 中的总菌、AOB、*Nitrospira* 丰度较 D-S 均有所降低,但 *Nitrobacter* 却由 0 增加到 1.45×10^7 cells/gMLSS.冬季样品(D-W)中硝化菌群丰度和百分含量的降低可能是很多城市污水处理厂冬季脱氮效果变差的主要原因.

表 3 总菌、AOB 和 NOB 的实时定量结果
Table 3 QPCR results of bacteria, AOB and NOB

污泥 样品	16S 总菌 (cells/g VSS)	AOB		<i>Nitrospira</i>		<i>Nitrobacter</i>	
		细胞数 (cells/g VSS)	占总菌 比例(%)	细胞数 (cells/g VSS)	占总菌比例/占 NOB 比例(%)	细胞数 (cells/g VSS)	占总菌比例/占 NOB 比例(%)
A	$1.47\times10^{10}\pm1.51\times10^9$	$4.46\times10^7\pm2.56\times10^6$	0.30	$7.72\times10^8\pm4.76\times10^7$	5.26/93.06	$5.75\times10^7\pm3.83\times10^6$	0.39/6.94
B	$1.10\times10^{10}\pm1.26\times10^9$	$8.56\times10^6\pm4.03\times10^5$	0.08	$6.74\times10^8\pm3.81\times10^7$	6.12/97.55	$1.69\times10^7\pm1.21\times10^6$	0.15/2.45
C	$3.93\times10^{10}\pm4.17\times10^9$	$1.20\times10^7\pm1.08\times10^6$	0.03	$5.35\times10^8\pm2.67\times10^7$	1.36/88.76	$6.78\times10^7\pm4.02\times10^6$	0.17/11.24
D-S	$9.27\times10^{10}\pm6.28\times10^9$	$1.48\times10^7\pm1.37\times10^6$	0.02	$1.53\times10^9\pm1.72\times10^8$	1.64/100	0.00	0.00/0.00
D-W	$4.57\times10^{10}\pm5.02\times10^9$	$1.06\times10^7\pm5.97\times10^5$	0.02	$3.23\times10^8\pm1.32\times10^7$	0.71/95.7	$1.45\times10^7\pm2.28\times10^6$	0.03/4.3

本研究 AOB *amoA* 基因定量分析的数量级大致在 $10^7\sim10^8$ cells/gMLSS 之间,与已有的多数研究结果基本一致^[7,24-25],但略低于个别研究^[26-27].对 NOB 定量结果显示本研究中的城市污水处理系统中 *Nitrospira* 是 NOB 菌群中的优势菌属,丰度要比 *Nitrobacter* 高出一个数量级.关于 AOB 和 NOB 丰度,有的研究认为 AOB 和 NOB 在同一个数量级^[16],也有研究发现 AOB 丰

度比 NOB 低一个数量级^[28].从表 3 可以看出,本研究的水厂中 AOB 种群丰度要比 NOB (*Nitrobacter* 和 *Nitrospira*)低一个数量级.除了样品 D-S(A²O 工艺),其他工艺的 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 均存在,且相差一个数量级,只有样品 D-S 中 *Nitrobacter* 含量为 0.结合表 1 中 D-S 出水的 NO₃⁻和 NO₂⁻,计算出亚硝积累率为 24%,由此推断采用 A²O 工艺的 D 水厂在夏季可能出现

了短程硝化现象,并且在向短程硝化转化的过程中,*Nitrobacter* 先于 *Nitrospira* 被淘汰.结合表 1 的运行参数发现 D-S 的溶解氧要明显低于其他 3 个工艺,低溶解氧可能是造成短程硝化的原因之一.进入冬季,由于水温降低,短程硝化向全程硝化转化,*Nitrobacter* 又出现在 D-W 样品中.

2.2 基于 OTU 的 AOB 系统发育分析

5 个 *amoA* 基因克隆文库中共得到 242 条 *amoA* 序列,按照 97%的相似度划分为 21 个 OTUs.5 个污泥样品构建的 *amoA* 基因克隆文库的 Good 覆盖率、Chao1 丰富度估计、OTU 值与估计的 Chao1 值之比、香农指数见表 4. 5 个污泥样品的 *amoA* 基因的 OTU 分布如图 1 所示.

表 4 *amoA* 基因克隆文库的序列多样性及覆盖率

Table 4 Sequences diversity and Good coverage of *amoA* gene clone libraries

污泥样品	序列数	OTU 数	Good 覆盖率(%)	Chao1 丰富度估计	OTU /Chao1 比值	香农指数
A	47	4	92.98	4	1.00	1.00
B	50	3	94	3	1.00	0.67
C	49	3	93.88	4	0.75	0.20
D-S	47	10	74.47	11.2	0.89	2.16
D-W	49	6	87.76	7.5	0.8	1.08

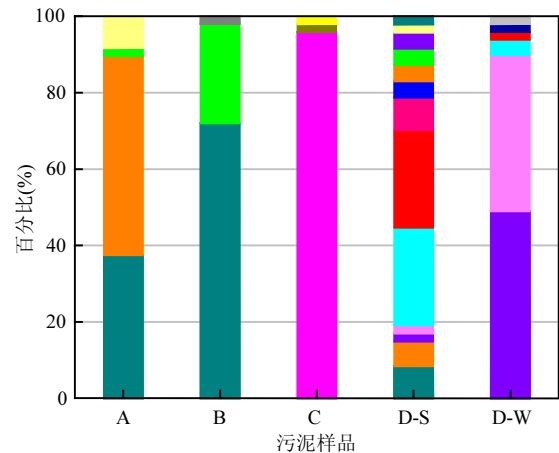
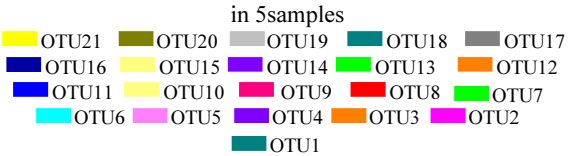


图 1 5 个污泥样品中 AOB *amoA* 基因的 OTU 分布

Fig.1 Relative distribution of OTUs based on *amoA* genes



如表 4 所示,Good 覆盖率最低的是 D-S 74.47%,但其 OTU 值与估计的 Chao1 值之比达到 89%.OTU 值与估计的 Chao1 值之比最低的是样品 C 75%,其 Good 覆盖率达到了 93.88%.这两组数据说明这 2 个 *amoA* 克隆文库可以代表 2 个污水处理厂 AOB 的群落组成.样品 A 和 B 的

Good 覆盖率均在 90%以上,OTU 值与估计的 Chao1 值之比均为 100%.与 D-S 比较,D-W 的 OTU 值与估计的 Chao1 值为 87.76%,明显高于 D-S(74.47%),数据可信度更高.高景峰等^[29]对 10 个污水处理系统中的 AOB 菌群进行研究,Good 覆盖率在 65.4%~100%之间,说明本研究建立的 *amoA* 克隆文库可以代表每个污水处理厂中 AOB 群落组成.表 4 计算了 5 个 *amoA* 基因克隆文库中的香农指数,根据表中结果发现 C 样品中 *amoA* 基因多样性要低于其他样品,香农指数只有 0.2.另外 4 个样品的香农指数在 0.67~2.16 之间,对比其他研究可说明本研究的 5 个样品的 AOB 群落多样性在正常范围之内^[24-25,29],其中 D-S 多样性最丰富.从图 1 和表 4 可以看出,样品 C 仅有 3 个 OTU,且有 2 个 OTU 各仅含有 1 条序列,意味着样品 C 中的 AOB 多样性最不丰富.虽然样品 A 和 B 所含 OTUs 数分别为 4 和 3,但从图 1 可以看出,每个样品所含序列较均匀的分布在各个 OTU,因此具有一定的生物多样性水平;样品 D-S 含有 10 个 OTUs,多样性水平最高,与表 4 的香农指数分析一致. D-W 共有 6 个 OTU,其中有 4 个 OTU 与 D-S 是重复覆盖的,说明虽然污水处理系统温度发生了变化,OTU 分布会有一定变化,但其优势 OTU 得以保留.

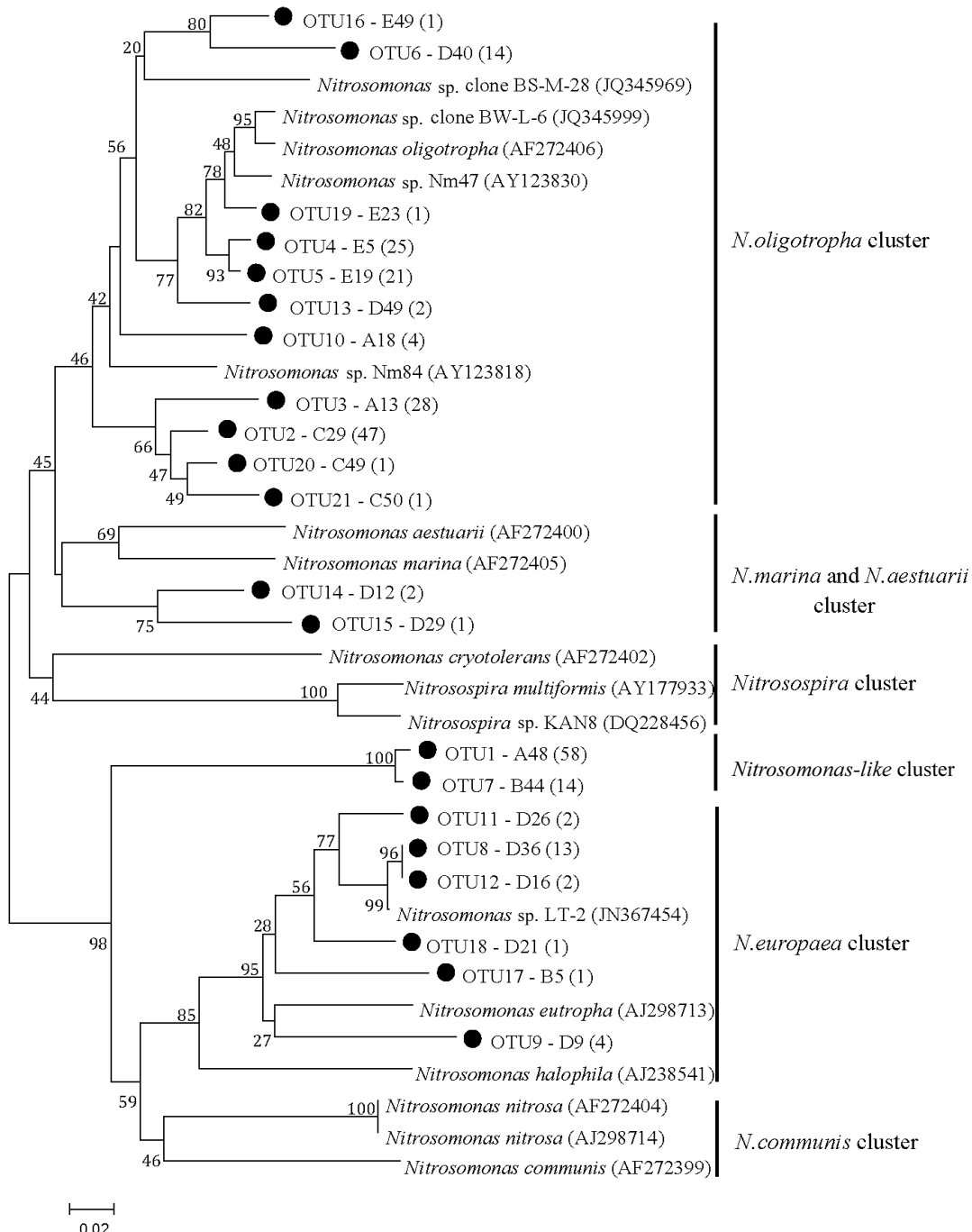


图 2 基于 *amoA* 基因的 AOB 系统发育树

Fig.2 NJ phylogenetic tree of AOB group based on *amoA* genes

利用 21 个 OTUs 中的代表序列建立的 NJ 系统发育树如图 2 所示.从图 2 可以看出有 11 个 OTU 属于 *N. oligotropha*,有 6 个 OTU 属于 *N. europaea* cluster,有 2 个 OTU 属于 *Nitrosomonas-like* cluster,有 2 个 OTU (仅包括 3 条序列)属于 *N. marina* 和 *N. aestuarii*.其中 OTU1、OTU2、OTU3 分别含有 58、47、28 条序列,是 AOB 菌群的优势 OTU,属于 *N. oligotropha* 和

Nitrosomonas-like cluster.

2.3 AOB 的系统发育树分析

5 个污泥样品中 AOB 种群分布以及相对含量如图 3 所示.基于 *amoA* 基因的系统发育分析结果(图 2)显示所有的序列属于 *Nitrosomonas*,没有发现 *Nitrosospira* cluster.AOB 的分布从多到少分别为:*N. oligotropha*、*Nitrosomonas-like* cluster、*N. europaea* cluster、*N. matina* and *N. aestuarii* cluster.其中 *Nitrosomonas oligotropha* cluster 和 *Nitrosomonas-like* cluster 是 AOB 种群中的两大优势菌群,分别占克隆文库的 60.08%和 29.63%,与已有研究结果一致^[2,30].从图 3 可以看出,除了样品 B 中 *N. oligotropha* cluster 仅为 2%,其余 4 个样品都含有 *N. oligotropha* cluster 且含量丰富.其中样品 C 所有的 AOB *amoA* 序列以及样品 D-W 中 97.96%的 AOB *amoA* 序列都属于 *N. oligotropha* cluster.其他 2 个样品中 *N. oligotropha* cluster 占克隆文库的比例在 40.43%~60.42%之间.*Nitrosomonas-like* cluster 分布在 3 个样品中,并且在样品 B 中所占比例达到 98%,在样品 A 和 D-S 中所占比例分别为 39.58%和 8.51%,在样品 C 和 D-W 中未检测到.*N. europaea* cluster 占克隆文库的 9.05%,只在采用 A²O 工艺的样品 D-S 和 D-W 中发现,这可能与该 A²O 工艺进水氨氮浓度相对较高有关.而且 *N. europaea* cluster 在夏冬两季样品中的百分含量发生明显的变化,D-S 中 *N. europaea* cluster 占 AOB 总量的 44.68%,是优势 AOB 菌属,但在 D-W 样品中降到了 2.04%.在其他 3 个工艺中并未检测到 *N. europaea* cluster.另外,在 D-S 样品中发现了少量的 *N. matina* 和 *N. aestuarii* cluster.

比较样品 D-S 和 D-W 的 AOB 群落结构,一个明显的变化特征是进入冬季后,原本处于优势的 *N. europaea* cluster 明显减少,而 *N. oligotropha* cluster 显著增多,达到 AOB 总量的 98%.因此,冬季水厂硝化效果变差的原因除了与硝化菌群丰度降低有关,还可能与上述 AOB 群落结构的变化有关.如前所述,样品 D-S 所在的污水处理厂夏季出现较高的亚硝酸盐积累率,这可能与夏季样品中 *N. europaea* cluster 的优势地位有关;冬季随着短

程现象的消失,*N. europaea* cluster 含量减少.有研究认为 *N. europaea* 有优先利用亚硝酸盐作为电子受体的能力^[30-31],经过低 DO 驯化的短程硝化活性污泥中以 *N. europaea* 为主^[32].从表 1 可以看出,4 种工艺中,D-S 样品所在的 A²O 工艺 DO 值最低,仅为 1.8mg/L,远低于其他 3 种工艺(3~6mg/L).而且只有 A²O 工艺(D-S 和 D-W)中出现了 *N. europaea*,并在样品 D-S 克隆文库中所占比例达到 44.69%.冬季短程硝化逐渐变为全程硝化,隶属于 NOB 的 *Nitrobacter* 重新出现,同时系统内 *N. europaea* cluster 大量消失,在样品 D-W 中仅占 AOB 总量的 2%.由此可以推测低 DO 运行使 *N. europaea* 成为优势 AOB 可能是 D-S 出现短程硝化的原因.

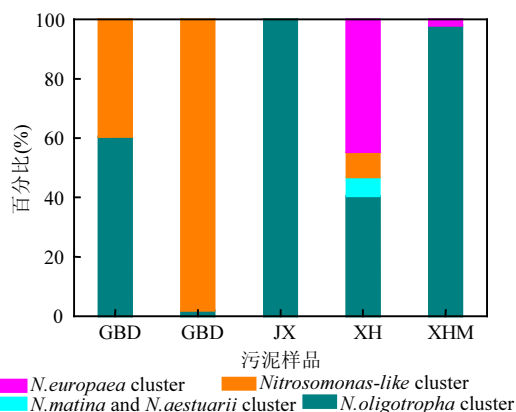


图3 5个污泥样品中 AOB 种群分布以及种群相对含量
Fig.3 Phylogenetic distribution and relative abundance of AOB groups in 5 samples

3 结论

3.1 本研究的城市污水处理厂活性污泥样品中优势 AOB 和 NOB 分别为 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira*.硝化菌群达到总菌群的 1%~7%,其丰度,尤其是 AOB 在总菌中的相对含量决定了系统的硝化效果.AOB 丰度比 NOB 丰度低一个数量级.NOB 菌群中的 *Nitrospira* 丰度比 *Nitrobacter* 丰度高一个数量级,是明显的优势 NOB.

3.2 本研究的活性污泥样品中的 AOB 全部隶

属于 *Nitrosomonas*, 其中 *N. oligotropha* cluster 是 AOB 中的优势菌属, 占克隆文库的 60%. *Nitrosomonas-like* cluster 次之, 占克隆文库的 30%. *N. europaea* cluster 只出现在 A²O 工艺中.

3.3 A²O 工艺冬季 AOB 和 *Nitrospira* 丰度的降低是导致冬季生物脱氮效果变差的原因. A²O 工艺夏季污泥样品中 *N. europaea* cluster 占该克隆文库的 44.7%, 是优势 AOB. 低 DO 运行使 *N. europaea* cluster 成为优势 AOB 是 A²O 工艺夏季出现较高亚硝酸盐积累率的主要原因.

参考文献:

- [1] Yin J, Xu W F. Ammonia biofiltration and community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in biofilters [J]. Bioresource Technology, 2009,100(17):3869–3876.
- [2] Purkhold U, Pommerening-röser A, Juretschko S. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. Applied Environmental Microbiology, 2000,66(12):5368–5382.
- [3] Orso S, Gouy M, Navarro E, et al. Molecular phylogenetic analysis of *Nitrobacter* spp. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994,44:83–86.
- [4] Ye L, Zhang T. Ammonia-oxidizing bacteria dominates over ammonia-oxidizing archaea in a saline nitrification reactor under low DO and high nitrogen loading [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011,108(11):2544–2552.
- [5] Limpiyakorn T, Sonthiphand P, Rongsayamanont C. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants [J]. Bioresource Technology, 2011,102(4):3694–3701.
- [6] Mußmann M, Brito I, Pitcher A. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(40):16771–16776.
- [7] Wells G F, Park H D, Yeung C H, et al. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(9):2310–2328.
- [8] Zhang T, Ye L, Tong A, et al. Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011,91(4):1215–1225.
- [9] Gieseke A, Bjerrum L, Wagner M. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm [J]. Environmental Microbiology, 2003,5(5):355–369.
- [10] Cébron A, Garnier J. *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France) [J]. Water Research, 2005,39(20):4979–4992.
- [11] Siripong S, Rittmann B E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants [J]. Water Research, 2007,41(5):1110–1120.
- [12] Robinson K G, Dionisi H M, Harms G. Molecular assessment of ammonia and nitrite-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge wastewater treatment plants [J]. Water Science and Technology, 2003,48(8):119–126.
- [13] Bollmann A, French E, Laanbroek H J. Isolation, cultivation, and characterization of ammonia-oxidizing bacteria and archaea adapted to low ammonium concentrations [J]. Methods Enzymol, 2011,486:55–88.
- [14] Geets J, Boon N, Verstraete W. Strategies of aerobic ammonia-oxidizing bacteria for coping with nutrient and oxygen fluctuations [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006,58:1–13.
- [15] Blackburne R, Yuan Z, Keller J. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor [J]. Biodegradation, 2008,19(2):303–312.
- [16] Wang F, Liu Y, Wang J H, et al. Influence of growth manner on nitrifying bacterial communities and nitrification kinetics in three lab-scale bioreactors [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012,39: 595–604.
- [17] Kowalchuk G A, Stenstra A W, Heilig G H. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands [J]. Environmental Microbiology, 2000,2(1):99–110.
- [18] Rotthauwe J, Witzel K, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997,63(12):4704–4712.
- [19] Nicolaisen M H, Ramsing N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J]. J Microbiol Methods, 2002, 50:189–203.
- [20] Purkhold U, Wagner M, Timmermann G. 16S rRNA and amoA based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: Extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003,53(5):1485–1494.
- [21] Aakra A, Utaker J, Nes I. Comparative phylogeny of the ammonia

- monooxygenase subunit and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205: 237–242.
- [22] Hoshino T, Noda N, Tsuneda S. Direct detection by in situ PCR of the amoA gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process [J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5261–5266.
- [23] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(2): 340–346.
- [24] Gao J, Luo X, Wu G, et al. Quantitative analyses of the composition and abundance of ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in eight full-scale biological wastewater treatment plants [J]. Bioresource Technology, 2013, 138: 285–296.
- [25] Bai Y, Sun Q, Wen D, et al. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 80(2): 323–330.
- [26] Limpiyakorn T, Sonthiphand P, Rongsayamanont C, et al. Abundance of amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(4): 3694–3701.
- [27] Kayee P, Sonthiphand P, Rongsayamanont C, et al. Archaeal amoA genes outnumber bacterial amoA genes in municipal wastewater treatment plants in Bangkok [J]. Microbial Ecology, 2011, 62(4): 776–788.
- [28] Zeng W, Bai X, Zhang L, et al. Population dynamics of nitrifying bacteria for nitrification achieved in Johannesburg (JHB) process treating municipal wastewater [J]. Bioresource Technology, 2014, 162: 30–37.
- [29] Gao J, Luo X, Wu GX, et al. Abundance and diversity based on amoA genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98: 3339–3354.
- [30] Bock E, Schmidt I, Stüven R, et al. Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor [J]. Arch. Microbiol, 1995, 163: 16–20.
- [31] Kuai L P, Verstraete W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification system [J]. Appl. Environ. Microbiol, 1998, 64(11): 4500–4506.
- [32] Park H D, Noguera D R. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge [J]. Water Res., 2004, 38: 3275–3286.

作者简介: 曾 薇(1974–), 女, 黑龙江省哈尔滨人, 教授, 博士, 主要从事污水生物处理研究. 发表论文 70 余篇.

《中国环境科学》2011~2014 年发表的论文中 20 篇入选“领跑者 5000”提名论文

《中国环境科学》2011~2014 年发表的论文中有 20 篇入选“精品期刊顶尖论文平台——领跑者 5000”提名论文。“领跑者 5000(F5000)”平台由中国科学技术信息研究所于 2013 年建设, 旨在集中展示中国精品科技期刊上发表的最高端的学术研究成果, 将与国际和国内重要检索系统链接, 扩大论文影响. 该平台将与汤森路透公司合作, 拟利用 WOK 国际检索系统平台, 与 SCI 数据库在同一平台内实现文献链接和国际引文检索, 在更大范围内向世界科技同行展示和推广中国最重要的科研成果. 提名论文均为 2011~2014 年在学科领域内被引率排名居前的论文. 本次环境学科共有 65 篇文章入选“领跑者 5000”提名论文.