



## 从典型硝化细菌到全程氨氧化微生物：发现及研究进展

徐建宇<sup>1,2</sup> 毛艳萍<sup>\*1,2</sup>

1 深圳大学化学与环境工程学院 广东 深圳 518060

2 深圳大学深圳市环境化学与生态修复重点实验室 广东 深圳 518060

**摘要：**生物硝化过程在全球氮循环中起关键性作用，被认为由氨氮氧化成亚硝酸盐和亚硝酸盐氧化成硝酸盐两个步骤组成，分别由氨氧化微生物(Ammonia oxidizing microorganisms, AOM)和硝化细菌(Nitrite oxidizing bacteria, NOB)催化完成。AOM 包括氨氧化细菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB)和氨氧化古菌(Ammonia oxidizing archaea, AOA)，AOB 与 AOA 分布广泛，两者的相对丰度和氨氮浓度密切相关。2015 年底，3 个硝化螺菌属(*Nitrospira*)谱系 II 的 NOB 被证实含有 AOM 的特征功能酶，包括氨单加氧酶(AMO)和羟胺脱氢酶(HAO)，并证明 NOB 同时具有氨氧化和亚硝酸盐氧化的能力，命名为全程氨氧化微生物(Complete ammonia oxidizer, Comammox)。根据 AMO 的  $\alpha$  亚基基因 *amoA* 的相似性将 Comammox 分为两大分支 clade A 和 clade B。它们广泛分布于自然环境和人工系统，包括土壤(稻田、森林)、淡水(湿地、河流、湖泊沉积物、蓄水层)、污水处理厂和自来水厂等。本文综述了 Comammox 的发现及其最新的研究进展，并展望了 Comammox 作为氮循环关键功能菌群的研究方向和应用前景。

**关键词：**全程氨氧化微生物，硝化螺菌属，氨氧化微生物，硝化细菌

## From canonical nitrite oxidizing bacteria to complete ammonia oxidizer: discovery and advances

XU Jian-Yu<sup>1,2</sup> MAO Yan-Ping<sup>\*1,2</sup>

1 College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

2 Shenzhen Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecological Remediation, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

**Abstract:** Biological nitrification plays a key role in the global nitrogen cycle, which is considered to consist of two serial steps of ammonia oxidation to nitrite biocatalyzed by ammonia oxidizing microorganisms (AOM) and nitrite to nitrate biocatalyzed by nitrite oxidizing bacteria (NOB). AOM

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (51608329); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030313315); Shenzhen Science & Technology Projects (JCYJ20160520165135743, JCYJ20170412171918012, ZDSYS201606061530079); Research Start-up Projects of Shenzhen University (827-000223, 2016008)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-755-26558094; E-mail: maoy@szu.edu.cn

**Received:** 14-03-2018; **Accepted:** 04-06-2018; **Published online:** 25-06-2018

**基金项目：**国家自然科学基金(51608329)；广东省自然科学基金(2017A030313315)；深圳市科技计划项目(JCYJ20160520165135743, JCYJ20170412171918012, ZDSYS201606061530079)；深圳大学科研启动项目(827-000223, 2016008)

**\*通信作者：** Tel: 0755-26558094; E-mail: maoy@szu.edu.cn

**收稿日期：** 2018-03-14; **接受日期：** 2018-06-04; **网络首发日期：** 2018-06-25

include ammonia oxidizing bacteria (AOB) and ammonia oxidizing archaea (AOA), which are widely spread with relative abundances closely related to the concentration of ammonia. In 2015, three bacteria belonging to *Nitrospira* lineage II with NOB-specific functional genes were identified to carry AOM-specific functional enzymes including ammonia monooxygenase (AMO) and hydroxylamine oxidoreductase (HAO), and proved their capacity to completely oxidize ammonia to nitrate. They have been named complete ammonia oxidizer (Comammox). Comammox could be subdivided into two branches of clade A and clade B based on the sequence discrepancy of ammonia monooxygenase subunit alpha (*amoA*), which have been widely found in natural and engineered environments such as soil (paddy soil, forest), fresh water (wetland, river, lake sediments, aquifers), wastewater and drinking water treatment plants. This paper introduces the discovery and distribution of Comammox, focuses on reviewing the research development on Comammox and prospects its research and application as a significant functional group of nitrogen cycle.

**Keywords:** Complete ammonia oxidizer (Comammox), *Nitrospira*, Ammonia oxidizing microorganisms (AOM), Nitrite oxidizing bacteria (NOB)

生物硝化过程(即通过微生物将氨氮氧化成硝酸盐)是地球氮循环的核心组成部分,被认为分两个步骤并由两类细菌分别催化完成<sup>[1-2]</sup>。如图1所示,步骤一是氨氧化过程,即氨氧化细菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB)将氨氮氧化成亚硝酸盐( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ ),重要的催化酶为氨单加氧酶(Ammonia monooxygenase, AMO)和羟胺脱氢酶(Hydroxylamine dehydrogenase, HAO),AOB主要包括亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas* spp.)和亚硝化螺菌属(*Nitrospira* spp.)等;步骤二则是亚硝酸盐氧化过程( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ),即硝化细菌(Nitrite oxidizing bacteria, NOB)把亚硝酸盐氧化成硝酸盐,重要的催化酶是亚硝酸盐氧化还原酶(Nitrite oxidoreductase, NXR),NOB主要包括硝化螺菌属(*Nitrospira* spp.)和硝化菌属(*Nitrobacter* spp.)

等<sup>[1,3-4]</sup>。两步硝化理论认为AOB与NOB紧密配合,共同完成氨氮氧化成硝酸盐的过程<sup>[5-6]</sup>,这是Winogradsky在1890年提出的观点,并且得到学术界的一致认可。

## 1 典型氨氧化和硝化菌群

一百多年以来AOB被认为是唯一的氨氧化微生物(Ammonia oxidizing microorganisms, AOM),它们分布广泛,在淡水<sup>[7]</sup>、土壤<sup>[8]</sup>、饮用水处理厂<sup>[9]</sup>和污水处理厂<sup>[10]</sup>等环境均被检出。如表1所示,AOB属于变形菌门(*Proteobacteria*)的Beta亚门(*Betaproteobacteria*)和Gamma亚门(*Gammaproteobacteria*),分别称为Beta-AOB和Gamma-AOB<sup>[3,11]</sup>。Beta-AOB包括亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和

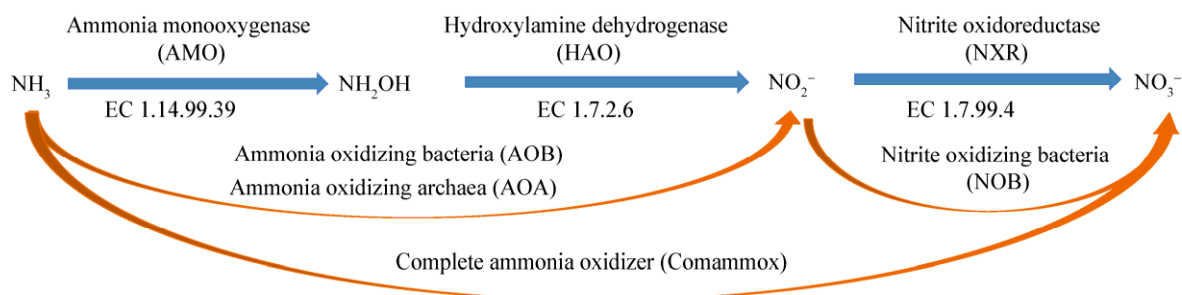


图1 生物硝化过程中主要的功能微生物和酶

Figure 1 Key functional microorganisms and enzymes in biological nitrification

表 1 典型氨氧化和硝化菌群的主要类型

Table 1 The main types of canonical ammonia oxidizing microorganisms and nitrite oxidizing bacteria

微生物 Microorganism	门 Phylum	属 Genus	参考文献 References
AOB	<i>Betaproteobacteria</i> (Beta-AOB)	<i>Nitrosococcus</i> <i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrospira</i>	[3]
	<i>Gammaproteobacteria</i> (Gamma-AOB)	<i>Nitrosococcus</i>	[3,11]
AOA	<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrososphaera</i>	[3,11,18]
		<i>Nitrosopumilus</i>	
		<i>Nitrosotalea</i>	
		<i>Nitrosocaldus</i>	
		<i>Nitrososphaera</i>	
AOA (Thermophilic)	<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii</i>	[22]
		<i>Candidatus Nitrosocaldus islandicus</i>	[23]
NOB	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Nitrobacter</i>	[29]
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Nitrotoga</i>	[29]
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Nitrococcus</i>	
	<i>Chloroflexi</i>	<i>Nitrolancea</i>	
	<i>Nitrospinae</i>	<i>Nitrospina</i>	
	<i>Nitrospirae</i>	<i>Candidatus Nitromarima</i> <i>Nitrospira</i> lineage I–VI and others <i>Nitrospira</i>	

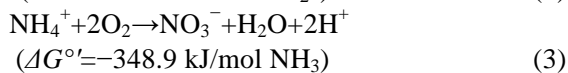
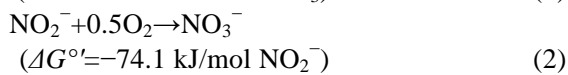
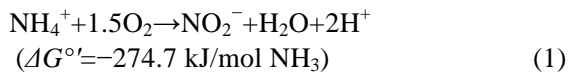
亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)<sup>[3]</sup>, Gamma-AOB 则包括亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)<sup>[3,11]</sup>。直到 2005 年, 在海洋中第一次发现了属于泉古菌门(*Crenarchaeota*) 的氨氧化古菌 (*Ammonia oxidizing archaea*, AOA)——*Nitrosopumilus maritimus*<sup>[12]</sup>, 后被重新划分到奇古菌门(*Thaumarchaeota*)<sup>[13]</sup>, 作为另外一种 AOM, 它的发现拓展了学术界对于氨氧化过程的认识, 同时它在环境中的分布及其对地球氮循环的贡献是学术界的研究热点之一<sup>[6,14]</sup>。与 AOB 相似, AOA 的分布也十分广泛, 包括淡水<sup>[15]</sup>、土壤<sup>[16]</sup>、污水处理厂<sup>[17]</sup>等自然环境和人工系统。如表 1 所示, AOA 主要属于奇古菌门(*Thaumarchaeota*)<sup>[18]</sup>, 包括 *Nitrososphaera*、*Nitrosopumilus*、*Nitrosotalea*、*Nitrosocaldus*、*Nitrososphaera* 5 个属<sup>[3,11]</sup>。迄今为止已报道的 AOA 多属于中温古菌, 最佳生长温度低于 50 °C<sup>[19-21]</sup>。此外, 科学家还陆续发现了来自 *Nitrosocaldus* 属的嗜热 AOA, 其中 *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* 是能够

在 74 °C 生长的好氧氨氧化自养泉古菌<sup>[22]</sup>; *Candidatus Nitrosocaldus islandicus* 是最近报道的从冰岛一个 73 °C 热温泉生物膜上富集的 AOA<sup>[23]</sup>, 其氨氧化活性的温度范围为 50–70 °C<sup>[23]</sup>。大量的研究表明 AOB 和 AOA 相对丰度与氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) 浓度密切相关<sup>[24-28]</sup>。

与氨氧化过程相比, 由于大多数生态系统不积累亚硝酸盐, 亚硝酸盐氧化过程受到较少的关注, 同时, 催化亚硝酸盐氧化过程的主要功能菌 NOB 是专性化能自养细菌, 被认为生理功能有限, 发现新的生理生化性能的可能性较小, 因此对于 NOB 的研究落后于 AOM<sup>[29]</sup>。目前已发现的 NOB 包括 4 个细菌门中的 7 个属(表 1), 分别属于变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、*Nitrospinae* 和硝化螺菌门(*Nitrospirae*)。其中来自硝化螺菌门的硝化螺菌属(*Nitrospira*)多样性最高, 至少含有 6 个系统发育谱系, 分别是 Lineage I–VI 和其他 *Nitrospira*<sup>[29]</sup>。

## 2 全程氨氧化微生物的发现

典型的 AOM 和 NOB 并非近缘微生物, 它们不具备同时氧化氨氮和亚硝酸盐的能力, 由于两个步骤的分离, AOM 与 NOB 紧密结合协作完成整个硝化过程, 因此经常在生境中观察到 AOM 与 NOB 的共聚体<sup>[30]</sup>。然而, 全程氨氧化的标准热力学自由能变( $\Delta G^\circ = -348.9$  kJ/mol  $\text{NH}_3$ )比单独的氨氧化( $\Delta G^\circ = -274.7$  kJ/mol  $\text{NH}_3$ )或亚硝酸盐氧化( $\Delta G^\circ = -74.1$  kJ/mol  $\text{NO}_2^-$ )产生的能量更多[见反应式(1)–(3)]<sup>[30]</sup>。从动力学理论角度来看, 相较于分步硝化, 独立完成氨氧化和亚硝酸盐氧化过程的全程氨氧化微生物(Complete ammonia oxidizer, Comammox)在多数环境中应具有更大优势, 且适宜在产率较高而生长速率较低的条件生长<sup>[5]</sup>。该理论为 Comammox 的存在和发现提供了依据。



从反应式(1)、(2)可知, 利用氧气作为电子受体时, 理论上 AOM 转化每单位氮释放的能量比 NOB 多 2 倍, 这意味着该条件下 AOM/NOB 的数量比大约是 2<sup>[31–34]</sup>, 同步反硝化利用亚硝酸盐作为电子受体引起 NOB 反应底物变少, 导致 AOM/NOB 比值大于 2, 因此把 AOM/NOB 的比值大于 1 看成一个结论<sup>[35–36]</sup>。然而, 在某些环境样本中检测到 *Nitrospira* 的丰度很高, 超过同一样本中已知的 AOM 丰度<sup>[37–38]</sup>。采用两步硝化理论不能完全解释这种现象, 从另外的角度说明环境中 Comammox 存在的可能性。

直到 2015 年底, 这个持续一个多世纪的被人们广泛接受的两步硝化理论受到了挑战。Daims 等<sup>[30]</sup>和 van Kessel 等<sup>[39]</sup>分别发现和报道了 3 个属于 *Nitrospira* 的细菌(分别是 *Candidatus Nitrospira inopinata*、*Candidatus Nitrospira nitrosa* 和 *Candidatus Nitrospira nitrificans*), 并证实了它们都具有全程

氨氧化的能力, 即一类微生物可以完成氨氮氧化成硝酸盐的过程, 统称为 Comammox。Comammox 的发现使人们对氮循环过程有了一个全新的认识。

Daims 等<sup>[30]</sup>从俄罗斯北高加索地区 Aushiger 的一个 1 200 m 深的石油勘探井中的热水管壁上采集生物膜, 于 46 °C 含铵无机介质下培养并富集适温型 AOM, 获得能够将氨氮氧化成硝酸盐的微生物群落(ENR4)。ENR4 包含一种形态像 *Nitrospira* spp. 的生物菌群, 同时也包含一种杆状菌群, 但在群落中没有发现形态像已知 AOM 的微生物菌群。此外, 针对硝化细菌特异性 rRNA 靶向探针的荧光原位杂交(Fluorescent *in situ* hybridization, FISH)实验证明 ENR4 仅包含 *Nitrospira* 属硝化菌, 杆状菌群是无氨氧化能力的 *Betaproteobacterium*。采用 PCR 技术在 ENR4 群落中没有检测到任何已知 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因或 16S rRNA 基因。为了进一步探究 ENR4 的情况, 研究者提取其 DNA 并进行宏基因组测序, 根据宏基因组测序结果的相对覆盖度计算, *Nitrospira* 在 ENR4 中占整个菌群的 68%–80%, 其次是 *Betaproteobacterium* 占比 18%–29%, 其余两种微生物的占比总和不到 2%。进一步培养 ENR4, 使之继续富集并命名为 ENR6 菌群。ENR6 菌群仍具有把氨氮完全氧化成硝酸盐的能力, 且只含有 *Nitrospira* (60%)和 *Betaproteobacterium* (40%)。为了验证 *Nitrospira* 群落是否具有全程氨氧化的能力, 研究者分别从 ENR4 和 ENR6 的宏基因组序列中重建完整的 *Nitrospira* 基因组, 发现从 2 个富集菌群获得的 *Nitrospira* 基因组是相同的, 该菌株被命名为 *Candidatus Nitrospira inopinata*。*Ca. N. inopinata* 具有亚硝酸盐氧化的关键酶——亚硝酸盐氧化还原酶(NXR), 其基因组包含编码 NXR 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基(即 *nxA* 和 *nxB* 基因), 与其他典型 *Nitrospira* 基因组携带 2–5 个同源拷贝的 *nxA* 和 *nxB* 基因所不同, *Ca. N. inopinata* 只携带这些基因的一个拷贝。更值得关注的是, *Ca. N. inopinata* 还具有氨氧化的特征酶 AMO 和 HAO, 但它们的 *amoA* 基

因与典型 AOM 的 *amoA* 基因不同, 因此在利用 PCR 技术初筛 ENR4 的 *amoA* 基因时未被检出。*Ca. N. inopinata* 同时具有氨氧化和亚硝酸盐氧化的特征基因, 充分表明其具有全程氨氧化潜能。此外, ENR4 的其他 3 种细菌的基因组中没有携带典型的硝化基因, 表明这 3 种共存的微生物是利用由自养微生物 *Nitrospira* 产生的有机底物作为能量的异养微生物。基于 16S rRNA 基因序列系统发育分析表明, *Ca. N. inopinata* 属于 *Nitrospira* 属广泛分布的谱系 II。谱系 II 中的其他可培养的 *Nitrospira* 菌株是 *N. moscoviensis*、*N. lanta* 和 *N. japonica*, 但它们是典型的 NOB, 不携带氨氧化的基因<sup>[30]</sup>。

与此同时, van Kessel 等<sup>[39]</sup>从循环水产养殖系统连接的滴滤池的厌氧隔间中采集样(出水的氨氮浓度小于 100  $\mu\text{mol/L}$ ), 通过搭建生物反应器, 在低氧条件下( $\leq 3.1 \mu\text{mol/L O}_2$ )供应低浓度的氨氮、亚硝酸盐和硝酸盐来富集与氮循环相关的微生物。在 12 个月内富集到能有效去除培养基中氨氮和亚硝酸盐的微生物群落, FISH 检测结果显示 *Brocadia* 属的厌氧氨氧化微生物占整个微生物群落的 45%, 而 *Nitrospira* 属的硝化细菌大约占 15%, 并和 *Brocadia* 属的微生物紧密结合, 二者都依靠亚硝酸盐来生长。为了探究 *Nitrospira* 在微生物群落中的功能, 对富集培养的微生物群落提取 DNA 并进行测序, 从中得到 2 个高质量的 *Nitrospira* 物种基因组草图。这 2 个菌株基因组的平均核苷酸相似性(ANI)为 75%, 说明是不同的物种(*Nitrospira* sp.1 和 sp.2)。它们都携带用于氨氧化的全套 AMO 和 HAO 基因, 以及亚硝酸盐氧化所必需的 NXR 基因, 表明 *Nitrospira* sp.1 和 sp.2 具有将氨完全氧化成硝酸盐的潜力。此外, 这 2 个 *Nitrospira* 微生物的 *amoA* 基因也与典型 AOM 的 *amoA* 基因不同。在 NCBI nr 数据库中搜索与 2 个 *Nitrospira* 微生物的 *amoA* 基因相似程度高的基因, 发现其与典型细菌的 *amoA* 基因的相似度较低, 在系统发育上属于不同分支。有趣的是, *Nitrospira* sp.2 的 *amoA* 与 *Crenothrix polyspora* 中

的所谓“特殊”甲烷单加氧酶(PMO)的  $\alpha$  亚基(*pmoA*)具有 97%–98% 的相似性, *Nitrospira* sp.1 的两个 *amoA* 拷贝与 *Crenothrix* 的 *pmoA* 相似性较低(90%–91%)。证明这种特殊的 *amoA* 基因之前就被发现, 只是错误地分配到与 PMO 相关的基因谱系中。*Nitrospira* sp.1 编码 3 个独立的 *amoC* 基因, 其中 1 个 *amoC* 与第 2 个 *amoA* 形成一个基因簇, 它们之间有 97.7% 的氨基酸相似性。*Nitrospira* sp.2 缺少第 2 个 *amoA*, 但携带另外 4 个 *amoC* 和第 2 个 *haoA* 基因。此外, 在它们的亚硝酸盐氧化的相关基因中, *Nitrospira* sp.2 携带 4 个几乎相同的( $>99\%$  氨基酸相似性) NXR 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基(*nxrAB*), *Nitrospira* sp.1 携带 2 个编码相同的 *nxB*, 以及两个氨基酸相似性仅为 89.6% 的 *nxA*。Daims 等<sup>[30]</sup>描述的 *Ca. N. inopinata* 和 van Kessel 等<sup>[39]</sup>描述的 2 个物种之间的 ANI 值为 70.3%–71.6%, 表明它们 3 个是不同的微生物。基于 16S rRNA 基因的系统发育分析证明, 这 2 种具有全程氨氧化能力的微生物也属于 *Nitrospira* 属谱系 II, 分别被命名为 *Candidatus Nitrospira nitrosa* 和 *Candidatus Nitrospira nitrificans*<sup>[39]</sup>。

Comammox 的发现不仅拓展了人们对于生物硝化过程的认识, 同时引发了学术界一系列深入的思考和进一步研究, 包括 Comammox 的多样性和生境的探究、生理生化特性研究以及它与其他氮循环功能菌群的相互关系等。

### 3 全程氨氧化微生物的分布

为了揭示 Comammox 在不同生境中的分布以及多样性, 研究者在公共数据库中挖掘与 Comammox 的 *amoA* 基因相似的序列, 根据 *amoA* 基因的相似性将 Comammox 分为两大分支 clade A 和 clade B (表 2), 它们来自不同的环境样本, 包括土壤(稻田、森林等)<sup>[30,39]</sup>、淡水环境(湿地、河床、湖泊沉积物、蓄水层)<sup>[30]</sup>、污水处理厂<sup>[39]</sup>和自来水厂生物膜<sup>[30,40]</sup>等, 但至今尚未在海洋环境中找到 Comammox 存在的依据<sup>[30]</sup>。Comammox

表 2 全程氨氧化微生物的分类和分布举例

Table 2 Distribution of some comammox clades

分支 Clade	国家 Country	环境 Environment	GenBank 登录号 GenBank accession No.	参考文献 References
clade A	芬兰 Finland	饮用水配水管道生物膜 Pipe biofilm, drinking water distribution system	AJ564440	[41]
	荷兰 Netherlands	Lieshout 污水处理厂 Waste water treatment plant Lieshout	AEJ33966.2	[42]
	日本 Japan	稻田土壤 Rice paddy soil	AB222896	[43]
	意大利 Italy	Selant Apulia 地下水 Groundwater, Apulia, Swlant	DQ984193	[44]
	美国 America	东部蛇河平原含水层地下水 Groundwater, Eastern Snake River Plain Aquifer	DQ008369	[45]
clade B	荷兰 Netherlands	Ewijkse Waard 地区河泛滥平原土壤 River floodplain soil, Ewijkse Waard	CAZ27655; CAZ27656	[46]
	德国 Germany	Gleysol 地区湿地土壤 Gleysol wetland soil	AJ868245	[47]
	俄罗斯 Russia	Irtysk 河泛滥平原土壤 River floodplain soil, Irtysk River	AGS41496	[48]

对氨氮具有较高亲和性，且适合在低氨氮环境下生存的特点与 AOA 的生理特性类似，而 AOA 首先是在海洋生境中被发现，所以海洋中是否存在 Comammox 是个未来值得探讨的课题。

### 3.1 饮用水供水系统

Comammox 适合在氨氮浓度较低的环境中生长，我国的供水标准规定自来水中氨氮的限值是 0.5 mg/L，因此自来水生产系统和供水管道很可能是 Comammox 的理想生境之一。在发现 Comammox 之前，以 *Nitrospira* 为主的 NOB 广泛分布于饮用水处理厂的设备和给水配水系统的管道中<sup>[49-51]</sup>。Pinto 等<sup>[52]</sup>从饮用水处理厂的生物活性过滤装置上采集生物膜，通过宏基因组学手段，获得一个 *Nitrospira* 属的 NOB 基因组，该基因组具有氨氧化过程催化酶 AMO 和 HAO 的全套特征基因，表明其具有潜在的全程氨氧化能力。

Wang 等<sup>[2]</sup>为了探究饮用水配水系统中 Comammox 的分布情况，利用宏基因组学方法筛查了来自全球若干个饮用水水源地、自来水处理厂和配水管道的 12 个生物膜样本中的 *amoA* 基因，结果表明来自新加坡和斯坦福样本中的 AOB *amoA* 序列是 Comammox *amoA* 序列的 3.4-3.5 倍，

但来自澳门自来水厂、河南自来水厂石英砂过滤器、海南自来水配水管道以及香港自来水配水管道的 4 个样本中 Comammox *amoA* 序列的丰度远高于 AOA 和 AOB 的 *amoA* 序列，达到 2-5 倍<sup>[2]</sup>，仅从河南自来水厂石英砂过滤器样本中就鉴定出 4 311 条类 Comammox *amoA* 序列。由此推测，在自来水处理系统中 Comammox 对于硝化作用可能有较大的贡献。

### 3.2 地下水快速砂滤系统

地下水中营养物含量较低，也被认为是 Comammox 适宜生长的环境之一。Fowler 等<sup>[53]</sup>采集 12 个地下水快速砂滤系统(Rapid sand filters, RSF)的生物膜样本来探究 Comammox 的存在情况。基于细菌 16S rRNA 基因的 qPCR 结果显示：NOB 的数量占据整个微生物菌群的 24%-59%，其中 *Nitrospira* spp. 是主要的 NOB，平均占整个微生物菌群的 34%，同时 *nxB* 基因的测序结果表明它们多属于 *Nitrospira* 谱系 II。作者对比 16S rRNA 基因和 *nxB* 基因的测序结果，认为基于这两个基因对 Comammox 的分类是粗糙的，因为 Comammox 的 16S rRNA 基因和 *nxB* 与非 Comammox 的相应基因具有很高的相似性。通过提

高相似性阈值与 Comammox 的参考库作比对来评判样本是否存在 Comammox, 结果发现 Comammox 占据 *Nitrospira* 丰度的最小比例是 78% (根据 16S rRNA 基因比对) 和 28% (根据 *nxrB* 基因比对), 基于 *nxrB* 基因计算丰度的方法是保守的, 可能具有较大误差。此外, 发现基于 16S rRNA 基因评估的数据和通过 *Nitrospira amoA* 引物的 qPCR 数据结果一致, 结果表明, Comammox 在 *Nitrospira* 菌群中占据较高比例, 因此推测在地下水生境中 Comammox 对硝化反应的贡献较大。对 *amoA* 基因的测序结果显示, Comammox clade B 的丰度比 clade A 更高, 占了大约 75%<sup>[53]</sup>。

同样地, Palomo 等<sup>[54]</sup>从一个地下水 RSF 的不同位置采集 6 个生物膜样本, 经宏基因组测序, 获得 14 个几乎完整的基因组。通过代谢功能表征发现样本中 *Nitrospira* 的丰度很高, 其中一个基因组携带全程氨氧化的基因。系统发育分析表明该样本包含的 Comammox 基因未能归类到先前已报道的 *Nitrospira* 谱系 I 和 II<sup>[30,39]</sup> 中, 由此研究者预测该样本包含的 Comammox 可能属于某个 *Nitrospira* 的新谱系, 这也表明环境中还有待发掘属于其他新谱系的 Comammox。

### 3.3 淡水循环水产养殖系统

循环水产养殖系统 (Recirculating aquaculture systems, RAS) 主要利用微生物的新陈代谢去除水中过量的氮, 避免累积的氨氮与亚硝酸盐使水生生物中毒。在生物硝化过滤器的生物膜上, *Nitrospira* spp. 是十分常见的 NOB 菌属<sup>[55]</sup>, 而 Comammox 恰恰是属于该菌属。为了探明 RAS 中是否存在 Comammox, Bartelme 等<sup>[55]</sup> 研究一个已经运行超过 15 年的淡水循环水产养殖系统的流动砂滤生物膜, 对生物滤池中不同深度和时间点的样本进行 16S rRNA 基因测序, 结果表明非硝化细菌约占总细菌群落的 92%, *Nitrosomonas* 属的氨氧化细菌在整个细菌群落所占比例小于 1%, *Nitrospira* 属硝化细菌占细菌群落的 2%–5%。随后对硝化细菌进行标记基因扩增和 TA 克隆测序, 结果显示样

本中含有两个属于 *Nitrospira* 但系统发育分化不同的 *nxrB* 序列进化支, 两者的基因仅有 85%–86% 的核苷酸相似性, 这些 *Nitrospira* spp. 随后被证实具有全程氨氧化的能力。通过对样品进行 *amoA* 和 *nxrB* 基因的 qPCR 测定, 发现 Comammox 的丰度比 AOA 和 AOB 的丰度都高, 由此推测在此生境下的硝化反应中 Comammox 可能比典型的 AOM 具有更高的贡献程度。

### 3.4 大气颗粒物

大气中的营养物质含量较低, 其中的颗粒物可能是 Comammox 的另一个栖息地。然而, 相对于水环境, 对大气中尤其是 PM<sub>2.5</sub> 中的 Comammox 的研究较少。Gao 等<sup>[3]</sup> 收集京津冀某些特大城市的 PM<sub>2.5</sub> 样本, 采用对靶基因扩增引物的 TA 克隆测序和 qPCR 等方法来研究 PM<sub>2.5</sub> 中 Comammox 的存在情况, 结果显示测得的序列与 *Ca. N. inopinata* 的序列有 100% 的相似性, 证明 PM<sub>2.5</sub> 中存在 Comammox。同时采用 qPCR 对样本中 *Ca. N. inopinata* 的 *amoA* 基因进行定量, 其丰度范围为  $(2.71 \times 10^3 \pm 2.62 \times 10^3) - (7.35 \times 10^2 \pm 4.53 \times 10^1)$  个细胞/m<sup>3</sup> 空气。与 AOA 和 AOB 的丰度相比, *Ca. N. inopinata* 的丰度较低, AOA 和 AOB 与 *Ca. N. inopinata* 比例范围分别为 2.58–116.57 和 1.40–6.46。以上结果说明 Comammox 存在于大气颗粒物中, 但丰度较低, 其对硝化贡献度有待进一步探究。但值得注意的是, 只选取一种引物来鉴定 Comammox 的丰度的结果比实际情况偏低, 因为可能存在其他无法用此引物扩增的 Comammox。

### 3.5 污水处理厂

污水处理厂的活性污泥含有多种功能菌群, 包括异养有机降解细菌、AOM、NOB、反硝化细菌和聚磷菌等, 它们对污水处理效果起到关键作用。污水处理厂好氧反应器中的生物膜经常暴露于具有梯度的氧浓度和氨氮浓度下, 这也很可能为 Comammox 的生长提供了适宜的环境。Chao 等<sup>[56]</sup> 为了探索污水厂中脱氮细菌的新型功能基因, 从香港污水处理厂的好氧反应器中收集活性污泥和

生物膜样本,进行宏基因组和 16S rRNA 基因高通量测序。通过数据分析在样本中发现两种 Comammox *amoA* 基因,它们与已报道的全程氨氧化菌 *Ca. N. inopinata* 的 *amoA* 基因的相似性水平分别为 91%和 90%,由序列覆盖度计算分析显示它们在整个微生物群落的丰度低于 0.1%,基本说明污水厂环境中存在 Comammox,但其丰度低,对脱氮过程的贡献较小。

此外, Gonzalez-Martinez 等<sup>[57]</sup>对污水厂的 6 个活性污泥系统和 3 个自养脱氮系统采集的样本进行 454 焦磷酸测序,通过系统发育分析表明,生物反应器中发现的几种 *Nitrospira* 序列是 Comammox。Pjevac 等<sup>[40]</sup>使用设计的 PCR 引物对污水厂活性污泥微生物进行 Comammox *amoA* 基因的 qPCR 定量,结果显示 Comammox *amoA* 拷贝数占总体的 *amoA* 拷贝数的 14%–34%,从基因分析上表明 Comammox 对污水厂的硝化过程可能有一定的贡献。同样地, Annavaiahala 等<sup>[58]</sup>在 6 座不同的污水处理厂的生物脱氮处理装置的主管和支管的污水中采集 16 个样本,通过宏基因分析发现样本中都有 Comammox 的存在,且 Comammox 占菌群的比例为 0.28%–0.64%,以上报道皆表明污水处理厂存在着 Comammox,但总体来说相对丰度较低,对硝化过程的贡献可能不大。后续工作应该探索实验室规模下 Comammox 的富集方法,进一步加深对其热力学、生物动力学等参数的理解。摸索 Comammox 适宜生长的工程条件,搭建有关 Comammox 的生物反应器,将 Comammox 的功能与反应器操作参数联系起来,并最终量化生物脱氮系统中 Comammox 对生物硝化的贡献,为现有水处理厂脱氮系统的诊断和新型脱氮工艺的设计奠定理论基础。

#### 4 全程氨氧化微生物的分子生物学检测

Comammox 携带负责氨氧化的 AMO 和 HAO,同时还携带亚硝酸盐氧化必需的 NXR,其中 *amoA* 是 AMO 的标记基因, *nxB* 是 NXR 常用的标记基因。现已报道的 Comammox 微生物属于 *Nitrospira* 谱系 I 和 II<sup>[30,39,52,54]</sup>,这个谱系也包括典型的只具

有亚硝酸盐氧化能力的 NOB<sup>[40]</sup>。基于 16S rRNA 或者 *nxB* 基因的系统发育分析表明已知的 Comammox 在 *Nitrospira* 谱系 II 中没有形成单支,它们与典型的 NOB 散布在一起<sup>[40]</sup>,因此无法通过 16S rRNA 或 *nxB* 基因的系统发育分析来推断 *Nitrospira* 微生物是否属于 Comammox 或典型的 NOB<sup>[40]</sup>。但它们的 *amoA* 基因与典型的 AOM 的 *amoA* 基因不同<sup>[37,46]</sup>,可以通过设计 Comammox *amoA* 基因的特异性引物来筛查样本中 Comammox 的存在情况。

Fowler 等<sup>[53]</sup>设计 *amoA* 引物(Ntsp-*amoA* 162F 和 Ntsp-*amoA* 359R)来检测地下水快速砂滤系统(RSF)样本中的 Comammox,这对引物可以同时扩增 Comammox clade A 和 clade B 的 *amoA* 基因; Bartelme 等<sup>[55]</sup>为了筛查循环水产养殖系统样本中 Comammox 的存在情况,设计双端引物(pmoA-189b-F 和 Com-*amoA*\_1\_R)扩增样本中的 *amoA* 基因,但该引物仅能够检测到 Comammox clade A 的 *amoA* 基因的序列片段,并且不能用于 Comammox clade B 的 *amoA* 基因的扩增; Pjevac 等<sup>[40]</sup>设计了扩增 Comammox *amoA* 基因的 PCR 引物来验证多种环境中 Comammox 的分布情况,它可以覆盖目前数据库中所发现的 95%的 Comammox clade A 和 92%的 clade B 的 *amoA* 基因序列(表 3)。

未来随着新型 Comammox 的不断涌现,新的针对 Comammox 特征基因的 PCR 扩增引物和生物探针也将不断被设计和推广,为后续 Comammox 的快速鉴别提供有效的技术手段。

#### 5 全程氨氧化微生物的硝化动力学研究

尽管相关文献已经报道 Comammox 在自然和人工系统环境中分布广泛<sup>[30,39]</sup>,但其对生态系统中硝化作用的潜在贡献研究甚少。Daims 等<sup>[30]</sup>已经富集到包含 *Ca. N. inopinata* (约占总菌群的 60%) 和 *Betaproteobacterium* (约占总菌群的 40%) 的混合菌群,并通过纯化培养 *Ca. N. inopinata* 来研究其生理特性<sup>[59]</sup>。培养的 *Ca. N. inopinata* 能够符合化学计量比 1:2 来消耗  $\text{NH}_3$  和  $\text{O}_2$ , 最终把  $\text{NH}_3$  氧化



表 3 针对 Comammox *amoA* 特征基因的 PCR 扩增引物Table 3 The PCR primer sets for amplifying comammox *amoA*-genes

分支 Clade	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	目标片段长度 Amplicon size (bp)	覆盖度 Coverage	参考文献 References
clade A&B	Ntsp-amoA 162F Ntsp-amoA 359R	GGATTTCTGGNTSGATTGGA WAGTTNGACCACCASTACCA			[53]
clade A	pmoA-189b-F Com_amoA_1_R	GGNGACTGG GAC TTYTGG CGAGATCAT GGTGCTGTGAC	520		[55]
clade A	comaA-244F comaA-659R	TAYAAAYTGGGTSAAAYTA ARATCATSGTGCTRTG	415	93/98 (95%)	[40]
clade B	comaB-244F comaB-659R	TAYTTCTGGACRTTYTA ARATCCARACDGTGTG	415	188/228 (83%)	[40]
clade A	comaA-244f_a comaA-244f_b comaA-244f_c comaA-244f_d comaA-244f_e comaA-244f_f comaA-659r_a comaA-659r_b comaA-659r_c comaA-659r_d comaA-659r_e comaA-659r_f	TACAAC TGGGTGAACTA TATAACTGGGTGAACTA TACAATTGGGTGAACTA TACAAC TGGGTCAACTA TACAAC TGGGTCAATTA TATAACTGGGTCAATTA AGATCATGGTGCTATG AAATCATGGTGCTATG AGATCATGGTGCTGTG AAATCATGGTGCTGTG AGATCATCGTGCTGTG AAATCATCGTGCTGTG	415	93/98 (95%)	[40]
clade B	comaB-244f_a comaB-244f_b comaB-244f_c comaB-244f_d comaB-244f_e comaB-244f_f comaB-659r_a comaB-659r_b comaB-659r_c comaB-659r_d comaB-659r_e comaB-659r_f	TAYTTCTGGACGTTCTA TAYTTCTGGACATTCTA TACTTCTGGACTTTCTA TAYTTCTGGACGTTTTA TAYTTCTGGACATTTTA TACTTCTGGACCTTCTA ARATCCAGACGGTGTG ARATCCAAACGGTGTG ARATCCAGACAGTGTG ARATCCAAACAGTGTG AGATCCAGACTGTGTG AGATCCAAACAGTGTG	415	209/228 (92%)	[40]

成  $\text{NO}_3^-$ , 并且在反应中可观察到瞬时积累  $\text{NO}_2^-$  的现象, 经过实验分析, 它在 37 °C 具有最高的氧化效率。通过计算, *Ca. N. inopinata* 在总氨氮浓度低至 5  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大总氨氮氧化速率 ( $V_{\text{max}}$ ), 其平均  $V_{\text{max}}$  为 14.8  $\mu\text{mol N}/(\text{mg 蛋白}\cdot\text{h})$ , 且遵循米门(Michaelis-Menten)动力学模型, 平均表观半饱和常数  $K_{\text{m(app)}}=0.84 \mu\text{mol/L}$  总氨。此表观半饱和常数  $K_{\text{m(app)}}$ 比已报道的非海洋环境氨氧化微生物(AOA 和 AOB)的  $K_{\text{m(app)}}$ 更低, 表明其在贫营养环境具有更高的适应性。*Ca. N. inopinata* 的亚硝酸盐氧化过程也遵循 Michaelis-Menten 动力学模型, 并且通过实验发现, 在高浓度(>2 mmol/L

$\text{NO}_2^-$ )下  $\text{O}_2$  消耗达到最大速率。值得注意的是,  $\text{NO}_2^-$ 的平均表观半饱和常数  $K_{\text{m(app)}}(449.2 \mu\text{mol/L NO}_2^-)$ 与典型的亚硝酸盐氧化 *Nitrospira*<sup>[60]</sup>的平均表观半饱和常数  $K_{\text{m(app)}}(9-27 \mu\text{mol/L NO}_2^-)$ 的比值高达 50:1, 因此 Comammox 对亚硝酸盐的亲合力较低。Comammox 对氨氧化具有高亲和力, 同时对亚硝酸盐氧化具有低亲和力的实验结果与上文提及的全程氨氧化实验过程中观察到亚硝酸盐的瞬间积累现象相吻合。从理论上来说, Comammox 在氧化每摩尔氨氮时比非 Comammox 具有更高的生长产率, 这是因为它们较长的代谢途径提供了由亚硝酸盐氧化产生的额外的 ATP。通过实验测

定也证明了 *Ca. N. inopinata* 在氧化每摩尔氨氮时, 比 AOA 释放更多的能量, 已经报道的 AOB 释放的能量甚至低于 AOA<sup>[61]</sup>。*Ca. N. inopinata* 具有高产率、高底物亲和力和相对较低的最大氧化速率的特征表明了其适应在高度寡营养条件下慢生长的生态位点, 这也为后续拓展 Comammox 在人工强化系统中的应用指明了方向。

## 6 结论和展望

生物硝化过程作为全球氮循环的核心组成部分, 通常被认为是由 AOM 和 NOB 分两步催化完成。2015 年全程氨氧化微生物(Comammox)的发现, 使传统的两步生物硝化理论受到质疑, 进一步升华研究者对氨氧化和亚硝酸盐氧化过程的理解。全程氨氧化微生物的发现大大拓展了学术界对于氮循环的认识, 需要重新筛查硝化菌群的微生物结构以评估它们对氮循环的贡献。现有研究报道 Comammox 适合生长在氨氮浓度较低的环境, 同时对 *amoA* 基因的筛查发现其广泛分布于自然环境和人工系统, 包括陆地土壤、河流湖泊、污水处理厂和饮用水供水系统等。根据 Comammox 适宜生长的环境, 本文综述了饮用水供水系统、地下水快速砂滤系统、淡水循环水产养殖系统、大气颗粒物以及污水处理厂 5 种不同生境下 Comammox 的多样性以及丰度情况。

随着现代生物学技术的不断发展, 基于特定基因的 PCR 及 qPCR 技术、TA 克隆技术、16S rRNA 基因高通量测序技术、宏基因组学等技术已经应用到对 Comammox 的研究当中, 对不同生境中的 Comammox 的基因组序列、生理特征、分布范围以及 Comammox 所占菌群丰度均有报道, 但仍有一些问题亟待解决, 包括: (1) Comammox 对地球氮循环过程的相对贡献程度及其与典型 AOM 和 NOB 的代谢网络关系还不是非常明确; (2) 目前已经报道的 Comammox 微生物仅属于 *Nitrospira* 谱系 I 和 II<sup>[30,39,52,54]</sup>, 但在地下水的快速过滤系统的生物膜上发现了可能属于 *Nitrospira* 新谱系的

Comammox<sup>[54]</sup>, 而其他 *Nitrospira* 谱系甚至其他 NOB 或 AOM 是否也含有 Comammox 需要进一步探讨; (3) 目前已经富集培养的 Comammox 的基因组不仅含有全套全程氨氧化的功能基因, 同时也含有其他的功能基因<sup>[30,39]</sup>, 虽然通过实验已经证明其具有全程氨氧化的能力, 但全套氨氧化基因是否能单独表达, 还是需要与其他基因共表达尚未清楚。宏基因组学从基因层面证明了 Comammox 的全程氨氧化潜力, 后续还需借助转录组学、蛋白质组学、代谢组学等多组学手段继续探究其生理生化特性。此外, 由于 Comammox 适应低氨氮的生存环境以及产率高而生长率低的生理生化特性, 使它有望用于微污染水体的生物脱氮过程。近年来随着地表水水质的不断下降, 水源地水质也受到不同程度的污染, 利用 Comammox 作为功能微生物开发新型的微污染水体脱氮工艺, 或将成为未来的一个研究方向。

## REFERENCES

- [1] Nunes-Alves C. Do it yourself nitrification[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(2): 61
- [2] Wang YL, Ma LP, Mao YP, et al. Comammox in drinking water systems[J]. *Water Research*, 2017, 116: 332-341
- [3] Gao JF, Fan XY, Pan KL, et al. Diversity, abundance and activity of ammonia-oxidizing microorganisms in fine particulate matter[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38785
- [4] Tatari K, Musovic S, Gulay A, et al. Density and distribution of nitrifying guilds in rapid sand filters for drinking water production: dominance of *Nitrospira* spp.[J]. *Water Research*, 2017, 127: 239-248
- [5] Costa E, Pérez J, Kreft JU. Why is metabolic labour divided in nitrification?[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 213-219
- [6] Hu HW, He JZ. Comammox — a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(12): 2709-2717
- [7] Wu L, Qin HY, Zhu MY, et al. Distribution characteristics and controlling factors of nitrifying microorganisms in freshwater and sediment of eutrophic zones in Lake Taihu in autumn[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2017, 29(6): 1312-1323 (in Chinese)  
吴玲, 秦红益, 朱梦圆, 等. 太湖富营养化湖区秋季水体和沉积物中硝化微生物分布特征及控制因素[J]. *湖泊科学*, 2017, 29(6): 1312-1323
- [8] Bi QF, Chen QH, Yang XR, et al. Effects of combined application of nitrogen fertilizer and biochar on the nitrification and ammonia oxidizers in an intensive vegetable soil[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 198
- [9] Liu HY, Zhu LY, Tian XH, et al. Seasonal variation of bacterial

- community in biological aerated filter for ammonia removal in drinking water treatment[J]. *Water Research*, 2017, 123: 668-677
- [10] Kurt H, Çelik MÖ, Kumru M, et al. The existence and role of ammonia-oxidizing archaea in full-scale wastewater treatment plants[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2017, 97: 133-140
- [11] Bock E, Wagner M. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source[A]//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. *The Prokaryotes*[M]. New York: Springer, 2006: 457-495
- [12] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 543-546
- [13] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, et al. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 245-252
- [14] Monteiro M, Sêneca J, Magalhães C. The history of aerobic ammonia oxidizers: from the first discoveries to today[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(7): 537-547
- [15] Hou J, Song CL, Cao XY, et al. Shifts between ammonia-oxidizing bacteria and archaea in relation to nitrification potential across trophic gradients in two large Chinese lakes (Lake Taihu and Lake Chaohu)[J]. *Water Research*, 2013, 47(7): 2285-2296
- [16] Xue C, Zhang X, Zhu C, et al. Quantitative and compositional responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to long-term field fertilization[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28981
- [17] Chen HY, Jin WB, Liang ZY, et al. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in a biological aerated filter process[J]. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(6): 405-416
- [18] Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. AmoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 525-539
- [19] Jung MY, Park SJ, Kim SJ, et al. A mesophilic, autotrophic, ammonia-oxidizing archaeon of Thaumarchaeal Group I.1a cultivated from a deep oligotrophic soil horizon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(12): 3645-3655
- [20] Lebedeva EV, Hatzenpichler R, Pelletier E, et al. Enrichment and genome sequence of the group I.1a ammonia-oxidizing archaeon "*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*" representing a clade globally distributed in thermal habitats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80835
- [21] Palatinszky M, Herbold C, Jehmlich N, et al. Cyanate as an energy source for nitrifiers[J]. *Nature*, 2015, 524(7563): 105-108
- [22] de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, et al. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(3): 810-818
- [23] Daebeler A, Herbold CW, Vierheilig J, et al. Cultivation and genomic analysis of "*Candidatus Nitrosocaldus islandicus*", an obligately thermophilic, ammonia-oxidizing Thaumarchaeon from a hot spring biofilm in Graendalur Valley, Iceland[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 193
- [24] Wang SY, Wang Y, Feng XJ, et al. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(2): 779-787
- [25] Hu BL, Liu S, Wang W, et al. pH-dominated niche segregation of ammonia-oxidising microorganisms in Chinese agricultural soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(1): 290-299
- [26] Zhang LM, Hu HW, Shen JP, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1032-1045
- [27] Hu HW, Macdonald CA, Trivedi P, et al. Water addition regulates the metabolic activity of ammonia oxidizers responding to environmental perturbations in dry subhumid ecosystems[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(2): 444-461
- [28] Muema EK, Cadisch G, Röhl C, et al. Response of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to biochemical quality of organic inputs combined with mineral nitrogen fertilizer in an arable soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95: 128-139
- [29] Daims H, Lückner S, Wagner M. A new perspective on microbes formerly known as Nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699-712
- [30] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504-509
- [31] Aleem MIH. Generation of reducing power in chemosynthesis. II. Energy-linked reduction of pyridine nucleotides in the chemoautotroph, *Nitrosomonas europaea*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1966, 113(2): 216-224
- [32] Ferguson SJ. Is a proton-pumping cytochrome oxidase essential for energy conservation in *Nitrobacter*?[J]. *FEBS Letters*, 1982, 146(2): 239-243
- [33] Hagopian DS, Riley JG. A closer look at the bacteriology of nitrification[J]. *Aquacultural Engineering*, 1998, 18(4): 223-244
- [34] Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ, et al. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1997, 71(1/2): 59-67
- [35] He TX, Li ZL, Yang S. Research progress in aerobic denitrifier and its removing mechanism of nitrite[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2015, 15(1): 174-180 (in Chinese)  
何腾霞, 李振轮, 杨珊. 好氧反硝化细菌及其去除亚硝酸盐的作用机理研究进展[J]. *过程工程学报*, 2015, 15(1): 174-180
- [36] Qiao S, Liu XJ, Zhou JT. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification in biological denitrification[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2014, 14(2): 128-135 (in Chinese)  
乔森, 刘雪洁, 周集体. 异养硝化-好氧反硝化在生物脱氮方面的研究进展[J]. *安全与环境学报*, 2014, 14(2): 128-135
- [37] Abujabrah IS, Doyle RB, Bound SA, et al. Assessment of bacterial community composition, methanotrophic and nitrogen-cycling bacteria in three soils with different biochar application rates[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(1): 148-158
- [38] Zeng W, Zhang LM, Wang AQ, et al. Community structures and population dynamics of nitrifying bacteria in activated sludges of wastewater treatment plants[J]. *China Environmental Science*, 2015, 35(11): 3257-3265 (in Chinese)  
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
- [39] van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015,

- 528(7583): 555-559
- [40] Pjevac P, Schaubberger 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
- [41] Lipponen MTT, Martikainen PJ, Vasara RE, et al. Occurrence of nitrifiers and diversity of ammonia-oxidizing bacteria in developing drinking water biofilms[J]. *Water Research*, 2004, 38(20): 4424-4434
- [42] Luesken FA, van Alen TA, van der Biezen E, et al. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(4): 845-854
- [43] Jia ZJ, Kikuchi H, Watanabe T, et al. Molecular identification of methane oxidizing bacteria in a Japanese rice field soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2007, 44(1): 121-130
- [44] Vigliotta G, Nutricati E, Carata E, et al. *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic  $\gamma$ -proteobacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3556-3565
- [45] Erwin DP, Erickson IK, Delwiche ME, et al. Diversity of oxygenase genes from methane- and ammonia-oxidizing bacteria in the Eastern Snake River Plain aquifer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 2016-2025
- [46] Steenbergh AK, Meima MM, Kamst M, et al. Biphasic kinetics of a methanotrophic community is a combination of growth and increased activity per cell[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71(1): 12-22
- [47] Knief C, Kolb S, Bodelier PLE, et al. The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(2): 321-333
- [48] Belova SE, Oshkin IY, Glagolev MV, et al. Methanotrophic bacteria in cold seeps of the floodplains of northern rivers[J]. *Microbiology*, 2013, 82(6): 743-750
- [49] Oh S, Hammes F, Liu WT. Metagenomic characterization of biofilter microbial communities in a full-scale drinking water treatment plant[J]. *Water Research*, 2018, 128: 278-285
- [50] Gülay A, Musovic S, Albrechtsen HJ, et al. Ecological patterns, diversity and core taxa of microbial communities in groundwater-fed rapid gravity filters[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(9): 2209-2222
- [51] Wang H, Proctor CR, Edwards MA, et al. Microbial community response to chlorine conversion in a chloraminated drinking water distribution system[J]. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(18): 10624-10633
- [52] Pinto AJ, Marcus DN, Ijaz UZ, et al. Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system[J]. *mSphere*, 2016, 1(1): e00054-15
- [53] Fowler SJ, 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
- [54] Palomo A, Jane FS, Gülay A, et al. Metagenomic analysis of rapid gravity sand filter microbial communities suggests novel physiology of *Nitrospira* spp.[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(11): 2569-2581
- [55] Bartelme RP, McLellan SL, Newton RJ. Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox *Nitrospira*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 101
- [56] Chao YQ, Mao YP, Yu K, et al. Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomic approach[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 8225-8237
- [57] Gonzalez-Martinez A, Rodriguez-Sanchez A, van Loosdrecht MCM, et al. Detection of comammox bacteria in full-scale wastewater treatment bioreactors using tag-454-pyrosequencing[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(24): 25501-25511
- [58] Annajhala MK, Kapoor V, Santo-Domingo J, et al. Comammox functionality identified in diverse engineered biological wastewater treatment systems[J]. *Environmental Science and Technology Letters*, 2018, 5(2): 110-116
- [59] Kits KD, Sedlacek CJ, Lebedeva EV, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle[J]. *Nature*, 2017, 549(7671): 269-272
- [60] Nowka B, Daims H, Spieck E. Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: nitrite availability as a key factor in niche differentiation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(2): 745-753
- [61] Könneke M, Schubert DM, Brown PC, et al. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO<sub>2</sub> fixation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(22): 8239-8244