

硝态氮还原型厌氧甲烷氧化的研究进展及展望

耿丹丹¹ 卢培利^{1,2*} 李薇薇¹ 张代钧^{1,2}

(1. 重庆大学 资源及环境科学学院 重庆 400044)

(2. 重庆大学 煤矿灾害动力学与控制国家重点实验室 重庆 400044)

摘要: 以硝态氮为电子受体的甲烷厌氧氧化(Nx-damo)是近年被证实的微生物驱动的地球氮、碳循环机制,对于认识重要元素地球化学循环的微生物驱动机制和自然环境中甲烷的源与汇具有重大意义;在废水生物脱氮及其温室气体减排方面也具有潜在工程应用价值。从功能微生物富集及其影响因素、生理特性、生物代谢的可能机理等方面对 Nx-damo 的最新进展进行了梳理和讨论;评估了其应用于废水处理的潜力和优势;对未来的研究方向进行了展望,以期推动该领域更广泛的研究,并为其提供有价值的参考。

关键词: 反硝化, 厌氧甲烷氧化, 功能微生物, 废水生物脱氮, 温室气体

Nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation: review on status and perspectives

GENG Dan-Dan¹ LU Pei-Li^{1,2*} LI Wei-Wei¹ ZHANG Dai-Jun^{1,2}

(1. College of Resources and Environmental Science, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(2. State Key Laboratory of Coal Mine Disaster Dynamics and Control, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (Nx-damo) is a newly demonstrated microbiological pathway for C and N cycle. This finding is significant for not only the understanding of the mechanisms of microorganisms driven cycling of biogenic elements, but also the development of sustainable wastewater treatment technology focusing on nitrogen removal and mitigation of green-house gas release. In this paper, the current advances in Nx-damo, including the identification and natural distribution of responsible microorganisms, their enrichment and the effect factors, as well as the physiological property and metabolic pathways, were reviewed. Advantages and potentials of Nx-damo based wastewater treatment technology were evaluated. Finally, perspectives on expected research and development of Nx-damo were suggested from microbiological and engineering aspects. Purpose of this review is to provide valuable information to promote more research on this field.

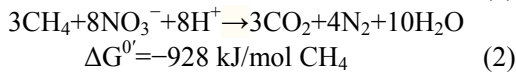
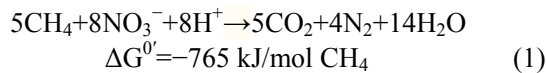
Keywords: Denitrification, Anaerobic methane oxidation, Responsible microorganisms, Biological nitrogen removal from wastewater, Green-house gas

基金项目: 中央高校基本科研业务费科研专项理工类跨学科重点项目(No. CDJZR13245501)

*通讯作者: Tel: 86-23-65105875; 信箱: lupl@cqu.edu.cn

收稿日期: 2014-05-26; 接受日期: 2014-08-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-11

甲烷的温室效应是等摩尔 CO_2 的 20–30 倍^[1]。全球甲烷年产生量大约为 300 Tg^[2], 其中 90% 在进入大气前可能被微生物厌氧氧化 (Anaerobic methane oxidation, AMO), 减缓了其对气候变暖的贡献^[3–4]。以硫酸盐为电子受体的 AMO (Sulphate-dependent anaerobic methane oxidation, SAMO) 于 2003 年得到证实^[5], 其对海洋中甲烷氧化的贡献在 75% 以上^[6]。由于淡水缺氧环境中的电子受体主要是硝态氮, 且从热力学和生物化学角度, 硝态氮比硫酸盐更适合作为甲烷氧化的电子受体^[7–13], 硝酸盐型 AMO (Nitrate dependent AMO, N-damo) 和亚硝酸盐型 AMO (Nitrite dependent AMO, n-damo), 统称硝态氮型 AMO (Nx-damo) 更具有存在基础^[14]。其化学方程式表述如下:



2006 年, Nx-damo 过程被首次证实。但 Nx-damo 微生物的世代周期更长(几周到 100 d 以上)^[15], 富集时间一般在 8–16 个月^[16–19], 且富集达到一定细胞密度后便停止^[20], 限制了研究的广泛开展。目前, 关于 Nx-damo 微生物的生理特性、代谢机理、自然分布及作用、影响富集的因素以及工程应用潜力等问题尚不清楚。然而, 推进该领域的研究有利于对 C、N 元素地球化学循环的认识, 理解自然生态系统甲烷排放及其对全球气候变暖的贡献^[21], 也能够为废水生物脱氮新技术的开发、解决碳源不足问题提供新途径^[22]。本文从功能微生物富集及其影响因素、生理特性、代谢机理等方面对 Nx-damo 的最新进展进行了梳理; 评估了其应用于废水处理的潜力和优势; 对未来的研究进行了展望, 以期推动该领域更广泛的研究并为其提供有价值的参考。

1 Nx-damo 功能微生物及其富集与分布

1.1 Nx-damo 功能微生物及其富集

研究者从 20 世纪 70 年代开始了富集 Nx-damo

微生物的尝试^[23–26], 但直到 2006 年和 2013 年才分获成功^[17,27]。2006 年, Raghoebarsing 等以运河底泥为接种物、以 $\text{CH}_4/\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 为基质成功富集 N-damo 功能微生物, 同位素标记证实古菌和细菌都参与了反应^[17]; 16S rRNA 的系统发育表明该细菌归属于非培养的、只能通过环境基因序列定义的新亚门——NC10 门细菌, 古菌在系统发育中的归类介于甲烷丝状菌 (*Methanosaeta*) 和 ANME-II 之间^[28]。根据细菌和古菌 16S rRNA 序列设计的 FISH 探针检测到了这 2 类功能微生物的存在, 其细胞数量比为 8:1, 且古菌处于细菌的包围之中。细菌呈细杆状、1 μm 长、0.3 μm 宽、DNA 聚集在细胞的中心; 古菌呈球形、聚集成 3–6 μm 的圆形; 对富集物的 MALDI-TOF 分析只发现了来自产甲烷菌、分子质量为 905 Da 的辅因子 F430, 没有发现与甲烷营养型古菌 ANME I 相关的分子质量为 951 Da 的辅因子 F430^[28]。随后继续富集 15 个月后, 古菌消失, 但反应活性并未降低^[28]。以富营养化的沟渠沉积物接种, 同样富集到 NC10 门细菌, 细胞呈 (0.8–1.0) $\mu\text{m} \times$ (0.3–0.5) μm 的杆状, 以单细胞或者聚合体的形式存在^[18]。这类细菌被命名为“*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”, 一种嗜温的(富集温度 25–30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0–8.0)、生长缓慢(倍增时间 1–2 周)的革兰氏阴性杆状菌, 长度 0.8–1.1 μm 、直径 0.25–0.50 μm ; 并获得了其全基因组和 pmoA 蛋白序列的系统发育(图 1); 基于 GC 含量和优势度的鉴定归类分析表明, 富集物的焦磷酸测序所得的宏基因组数据有 60% 与 *M. oxyfera* 相关^[29]。它代表了甲烷氧化菌中一种新类群, 与疣微菌门一起, 是目前发现唯一的非变形杆菌的甲烷氧化菌^[18]。2009 年, Hu 等以淡水湖沉积物、消化污泥、回流污泥的混合物为接种物, 以 $\text{CH}_4/\text{NO}_3^-$ 为基质在不同温度下富集得到 Nx-damo 微生物^[19]。2014 年, Kampman 等最新报道以污水处理厂污泥为唯一接种物, 以 $\text{CH}_4/\text{NO}_2^-$ 为基质, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时也能成功富集细菌 *M. oxyfera*^[30]。

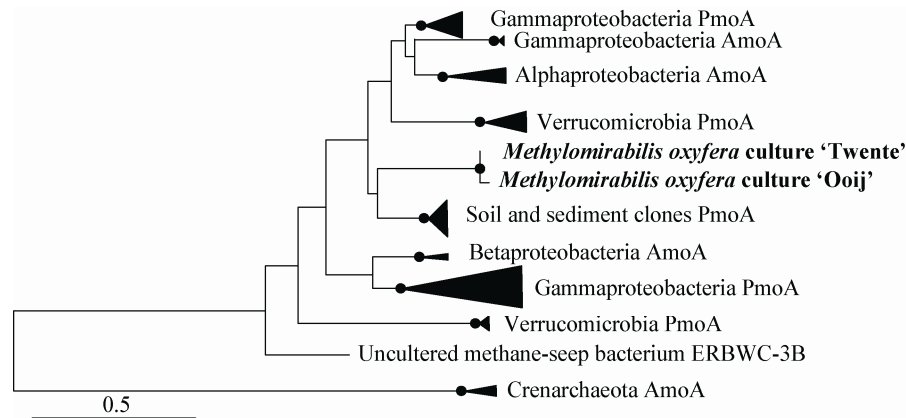


图1 “*M. oxyfera*” pmoA 蛋白系统发育^[29]

Figure 1 Phylogeny of “*M. oxyfera*” pmoA protein sequences^[29]

注：邻接树显示出富集培养物“Twente”和“Ooij”（粗体）相对于其他 pmoA 和 amoA 序列的位置。距离树通过 Dayhoff 矩阵计算，Bootstrapping 重复值为 100。通过邻接法，最小进化法，最大简约法和最大似然进化法这 4 种方法来构建进化树。Bootstrapping 结果总结在进化树上，实心圆代表在所有这 4 种方法中得到大于 70% 支持的分支点。定标线条代表每 100 个氨基酸中有 50 个氨基酸改变。

Note: Neighbour-Joining tree showing the position of enrichment cultures “Twente” and “Ooij” (in bold) relative to other pmoA and amoA sequences. The distance tree was computed with the Dayhoff matrix-based method, and bootstrapping of 100 replicates was performed with in the Neighbour-Joining, minimum-evolution, maximum-parsimony and maximum-likelihood evolutionary methods. Bootstrapping results are summarized on the tree, with filled circles representing branch points at which all four methods give greater than 70% support. The scale bar represents 50 amino-acid changes per 100 amino acids.

与上述结果不同，Haroon 等最近报道以 $\text{CH}_4/\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 为基质，富集到了 AMO 古菌 ANME-2d 和 Anammox 细菌的混培物，前者以 CH_4 为电子供体、以 NO_3^- 为电子受体驱动 N-damo 过程厌氧氧化甲烷并将硝酸盐还原为亚硝酸盐，后者利用 NH_4^+ 和生成的 NO_2^- 发生 Anammox 过程将 NO_2^- 还原为 N_2 。N-damo 与 Anammox 耦合的发现，初步揭示了古菌在 Nx-damo 过程中的作用^[27]。该古菌被命名为 *Methanoperedens nitroreducens*，归属于 *Methanoperedens* 科，是一种直径 1–3 μm 的不规则球菌，通常以类似八叠球菌的族群方式存在，中温 (22–35 $^{\circ}\text{C}$)、pH 7.0–8.0 条件下生长^[27]。其形态如图 2 所示。

1.2 Nx-damo 功能微生物富集的影响因素

目前公开报道的 Nx-damo 功能微生物实验室富集研究(表 1)，主要以 *M. oxyfera* 驱动的 n-damo 为主，尚未有针对富集影响因素和条件优化的专门研究。这里通过不同研究者富集条件和结果的对

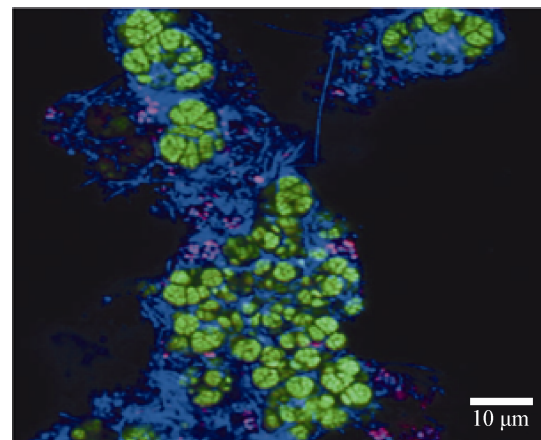


图2 原位荧光杂交下反应器微生物组成显微照片^[27]

Figure 2 Fluorescence *in situ* hybridization micrograph of the bioreactor community^[27]

注：高密度团体“*M. nitroreducens*”占主导数量(绿色)，少量为 *Kuenenia* 细胞(红紫色)和其他细菌(蓝色)。

Note: Showing the dominant “*M. nitroreducens*” population in large, dense clusters (green), smaller flanking *Kuenenia* cells (magenta) and other bacteria (blue).

表 1 Nx-damo 功能微生物富集							
Table 1 The reported enrichment cultures of Nx-damo							
接种物 Inoculum	氮素供给 N feeding	温度 Temperature (°C)	富集时间 Enriching time (d)	微生物组成		消耗速率 Conversion rate (mg NO _x ⁻ -N/ (L·d))	文献 Reference
				Composition (%)			
				细菌 Bacteria	古菌 Archaea		
Canal sediments	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	25	480	80	10	NO ₂ ⁻ : 14.98	[17]
Ditch sediments	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	30	270	70	0	NO ₂ ⁻ : 30.10	[18]
Mixed inoculum	NO ₃ ⁻	35	312	30	40	NO ₃ ⁻ : 28.00	[19]
	NO ₃ ⁻	22	260	15	0	NO ₃ ⁻ : 0.91	[19]
Canal sediments	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	30	270	70	0	NO ₂ ⁻ : 9.80	[28]
Wastewater sludge	NO ₂ ⁻	20±1	421	60–70	0	NO ₂ ⁻ : 36.00	[30]
Wastewater sludge	NO ₂ ⁻	20–23	315	60–70	0	NO ₂ ⁻ : 15.40	[36]
Ditch sediments	NO ₂ ⁻	30	730	70–80	0	NO ₂ ⁻ : 33.50, 37.80	[43]

比, 梳理出可能的影响因素, 以期为以后的富集提供参考。

1.2.1 电子受体: 电子受体 NO₃⁻ 和 NO₂⁻, 对 Nx-damo 微生物富集过程及其产物组成有重要影响。以 NO₂⁻ 为电子受体的 n-damo 的富集相对容易; 可能由于细菌更喜好亚硝酸盐, 富集产物为 *M. oxyfera* 细菌^[31], 而无古菌。但较高浓度的 NO₂⁻ 会对微生物产生抑制作用。研究发现高于 1 mmol/L 的 NO₂⁻ 对 n-damo 过程产生了不利影响^[31], 而同样浓度在其他富集实验中却没有造成 NO₂⁻ 还原速率的下降^[18,29]。动力学模拟得出的最佳 NO₂⁻ 浓度为 1.92 mmol/L^[32]。以 NO₃⁻ 为电子受体成功富集 N-damo 的公开报道更少, 富集更慢^[28] 且都存在 Anammox 细菌或 n-damo 细菌的协同作用。初步认识是古菌更喜好 NO₃⁻, 但需要其他机制来去除其产生的 NO₂⁻。但是, 甲烷厌氧氧化驱动硝酸盐的全程还原尚未见报道。已有工作中由于氨氮的存在促进了 Anammox 细菌的生长, 其相对于 n-damo 细菌的竞争优势可能限制了后者。古菌和 n-damo 细菌能否独立或协同完成 N-damo 过程尚不明确。

1.2.2 CH₄ 传质: 作为最重要的基质, 甲烷的低溶解度导致可利用甲烷量的限制可能是 Nx-damo 功能微生物富集的最重要的影响因素^[14,33-39]。通过降

低温度、提高气相甲烷压力^[33,40] 和增加搅拌速度^[35] 来增加 CH₄ 在液相中的浓度, 可以提高 AMO 活性。但有实验表明, 甲烷氧化速率与实验接种物中蛋白质含量一致, 高浓度甲烷并不会提高其氧化速率^[41]。且动力学模拟结果表明, 随着 CH₄ 溶液度的增加, n-damo 过程 NO₂⁻ 消耗速率逐渐趋于平稳, 常压下溶解的 CH₄ 浓度不是其限制因素^[32]。

1.2.3 温度: 现有富集温度集中在 30 °C 左右, 或者室温。不同温度下, 富集结果也有差异。尽管较高温度能够增加微生物活性, 但能明显降低甲烷溶解度^[14]。有研究表明温度大于 45 °C 时可能检测不到脱氮活性^[19], 而在 20 °C 低温下, 采用合适的反应条件也能获得较高的脱氮速率^[30]。因此, 在更宽的温度范围内综合考察这两种效应, 可能获得有利于加快 Nx-damo 过程的温度条件。此外, 温度对 Nx-damo 微生物活性的影响还有待探究。

1.2.4 生物量持留: 由于 Nx-damo 微生物生长缓慢, 减少富集过程的生物量流失很重要。SBR 反应器因其操作控制方便灵活而用于多数的 Nx-damo 微生物的富集, 但其悬浮生长模式可能导致生物量的流失^[42-43]。中空纤维膜反应器有利于甲烷传质和保持高生物持留量, 利用其开展的 Nx-damo 微生物的富集获得了 190 mg NO₃⁻-N/(L·d) 的反应速率, 是

目前报道的最高速率^[44]；而且内回流速率的提高将脱氮速率提高了 37%，表明水力学条件可能强化反应器效能。

1.2.5 接种物：虽然以污泥、稻田土、沉积物都富集到了 N-damo 微生物，但不同接种物本身所含的功能微生物的生物多样性和丰度在空间分布上有很大差异^[3,36-37,39,45]。很多研究表明，*M. oxyfera* 细菌富集得到的微生物可能只是 *M. oxyfera* 细菌的一个亚种，因此，选择具有合适生物多样性和生态位的接种物也能缩短富集时间。

1.2.6 溶解氧：尽管有研究报道 *M. oxyfera* 细菌通过 NO 歧化作用产生的氧气实现甲烷氧化是 n-damo 的机理；在氧气浓度波动、甚至短暂暴露在氧气中的好氧/厌氧界面也发现了 *M. oxyfera* 细菌^[46-47]，预示着 n-damo 的好氧过程本质和 O₂ 对其可能有利影响。然而，实验表明外加 2%或 8%的 O₂ 造成了 n-damo 过程 NO₂⁻和 CH₄ 转化速率瞬间降低，且计量关系明显偏离化学计量学理论值，微氧条件对 *M. oxyfera* 总体上具有不利影响^[48]。原因可能是 *M. oxyfera* 菌对氧气的产出和消耗是一个严格匹配的过程^[48]，也有可能是外加氧气浓度过大，导致对 *M. oxyfera* 的活性产生消极影响。

1.3 Nx-damo 功能微生物的多样性与分布

现有用于 *M. oxyfera* 细菌多样性和分布检测的分子生物学方法正在逐步增多和完善。16S rRNA 和 *pmoA* 基因分子生物标记被用于确认 NC10 门细菌有关 *M. oxyfera* 细菌的多样性检测。各种 PCR 技术也被用来确定 *M. oxyfera* 类似细菌的丰度。

根据实验室富集的 n-damo 功能微生物设计出的探针或引物促进了对自然环境中 *M. oxyfera* 细菌基因水平的直接检测，DGGE、实时 PCR 检测发现淡水深层湖泊底泥浅层^[45,49]和内陆浅水湖泊底泥^[39,50]中均含有相当数量的 n-damo 微生物，是最适合这种微生物生存的环境；最近研究表明受农业径流污染的淡水河流底泥含有更高多样性的 *M. oxyfera* 细菌^[39]，氨和有机物含量等环境因素也会影响 *M. oxyfera* 细菌的分布，*M. oxyfera* 菌可以适应动

态环境条件，长期施氮肥的稻田土也有 n-damo 菌的分布^[37]。通过同位素标记在含高浓度硝酸盐地下水渗透的泥炭土中检测到了 n-damo 过程，PCR 定量表明 NC10 细菌细胞数量最高点所在深度与甲烷、NO₃⁻过渡区一致。16S rRNA 和 *pmoA* 基因系统发育分析发现其功能微生物与 *M. oxyfera* 的同一性低于 96%和 90%，推测可能是另一种不同于 *M. oxyfera* 的 NC10 门细菌，实验室以此泥炭土接种也成功富集了该细菌^[38]。同时在多个污水处理厂污泥中也直接检测到了 *M. oxyfera* 细菌。ANME-2d 古菌的发现也展示了此类功能微生物潜在的多样性。

研究者分别以运河底泥^[17]、沟渠沉积物^[18]、污水处理厂污泥^[36]、湖泊底泥^[19]等为接种物成功富集 *M. oxyfera* 细菌间接表明了其分布情况，通过接种物与富集培养物中 NC10 细菌丰度的对比，发现成功富集的是 NC10 细菌中的一个亚种，该亚种占主导地位的菌群有更高的 n-damo 活性^[36]，而这种选择性物种富集的过程会造成生物多样性的减少。

由于方法的限制，这些微生物的环境分布和重要性还不能被完全理解。n-damo 过程是 NC10 门细菌的一种共性，还是只有 *M. oxyfera* 细菌才能驱动，当前研究尚不清楚。所有这些 AMO 都由目前发现的三类微生物驱动的可能性极小。与 Nx-damo 类似的 S-damo 就至少有 ANME-1、ANME-2 和 ANME-3 三类古菌参与^[51]。因此，随着工作的开展，发现新的 Nx-damo 功能微生物是完全有可能的。

2 Nx-damo 微生物菌群的作用机理

富集难度限制了对 Nx-damo 过程机理的研究，从最初认为在古菌和细菌协同作用下的反向产甲烷机理，到其后的细菌通过胞内产氧机制独自好氧氧化甲烷和还原亚硝酸盐，直到新近提出的古菌通过反向产甲烷机理独自完成甲烷氧化和硝酸盐至亚硝酸盐的还原。

2.1 细菌 *M. oxyfera* 胞内产氧好氧氧化甲烷机理

研究认为 *M. oxyfera* 细菌能够独立完成甲烷厌

氧化和亚硝酸盐还原。该细菌的蛋白质组学和转录组学使我们对甲烷和 NO_2^- 转换的中心路径进行推测, 全基因组显示出其明显的好氧甲烷氧化途径^[20]; 随后的同位素标记实验证实其将反硝化产生的 2 个 NO 分子通过歧化反应生成氮气和氧气, 其中 3/4 的 O_2 用于氧化甲烷(图 3); 进一步的检测发现 *M. oxyfera* 细菌细胞中存在还原硝酸盐、亚硝酸盐、 NO 的功能基因, 但没有发现编码 N_2O 还原酶的基因^[29,52]。Ettwig 等认为, 在没有氧气和光照的情况下, *M. oxyfera* 细菌可以将 NO 分解为 N_2 和 O_2 , 然后用生成的 O_2 通过甲烷单加氧酶的催化氧化甲烷获取能量^[52]。细菌内部有一种隐秘的需氧菌, 它通过周围的 NO_2^- 来获取氧气, 而不是从大气中获得^[47]。因此, 可以认为 n-damo 过程本质是甲烷好氧化。然而, 这一胞内产氧机理仍面临诸多挑战, 包括没有检测到催化 NO 歧化反应的酶^[52]、外加 2% 或 8% 的 O_2 降低了 *M. oxyfera* 细菌的活性及硝酸盐和亚硝酸盐还原酶基因表达等^[48]。一种可能的解释是 *M. oxyfera* 是一个缓慢生长和代谢的微生物, 电子传递系统能力很低, 过剩 O_2 不能使电子完全转移^[48]。

2.2 古菌 *M. nitroreducens* 的反向产甲烷机理

Haroon 等在氨与硝酸盐共存条件下富集得到

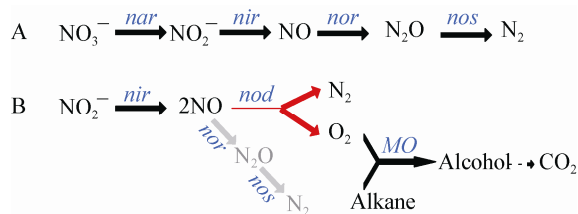


图3 公认的反硝化途径(A)和推测的 NO 歧化反应产 N_2 和 O_2 途径(B)^[52]

Figure 3 Pathways of canonical denitrification (A) and proposed N_2 and O_2 production by NO dismutation (B)^[52]

注: *nar*: 硝酸盐还原酶; *nir*: 亚硝酸盐还原酶; *nor*: NO 还原酶; *nos*: N_2O 还原酶; *nod*: NO 歧化酶; *MO*: 单加氧酶。

Note: *nar*: Nitrate reductase; *nir*: Nitritereductase; *nor*: Nitric oxide reductase; *nos*: Nitrous oxide reductase; *nod*: Nitric oxide dismutase; *MO*: Monooxygenase.

了古菌 ANME-2d 与 Anammox 细菌的共生物, FISH 和 16S rRNA 分析揭示其中古菌占 78%; 研究认为古菌驱动了 AMO 同时将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 并将其命名为 *M. nitroreducens*^[27]。宏基因组和单细胞基因组揭示 *M. nitroreducens* 基因组中包含完全的产甲烷途径所需的 *mcrABCDG* 和 *mer* 基因。完整的还原性乙酰辅酶 A 途径及其合成酶的存在表明 *M. nitroreducens* 可能像对 ANME-1 预计的那样能产生乙酸^[53-54]。宏转录显示甲烷氧化为二氧化碳所需的全部基因均高度表达; C^{13} 同位素标记实验证实投加的甲烷转化为 CO_2 。在古菌中没有发现除硝酸盐还原酶以外的反硝化酶。这些实验证实了 *M. nitroreducens* 的反向产甲烷机理及其对硝酸盐的部分还原(图 4)。进一步的同位素标记实验和分子生物学检测也证实了其中的 Anammox 细菌的协同作用^[27]。在氨存在的情况下, Anammox 菌和 *M. oxyfera* 细菌竞争 NO_2^- , 前者的竞争优势限制了后者的生长^[27], 因此无法得知古菌能否与 *M. oxyfera* 菌协同形成稳定的 N-damo 过程, 或者古菌是否能够独立完成 AMO 驱动硝酸盐完全还原。

3 Nx-damo 用于废水生物处理的潜力

废水生物脱氮缺乏碳源是普遍难题, 投加有机物可能带来经济负担和二次污染。同时, 实验证实大量甲烷溶解在厌氧生物处理出水中^[14,55]导致了温室气体排放^[56-58]和低效能源回收, 已经成为当前废水厌氧生物处理技术广泛应用的障碍^[14]。尽管相对于传统的硝化-反硝化工艺, Anammox 具有更低的能耗、更少的碳源需求和更低的污泥产量等优势^[56,59-61], 但是亚硝化的控制一直是个难题^[57]。Nx-damo 耦合了硝态氮还原与甲烷氧化, 基于这一原理的废水处理技术, 能够为生物脱氮提供经济、清洁的碳源; 同时能够有效利用溶解性甲烷产生更少的 N_2O ^[29], 减少废水处理过程温室气体排放, 并且减少 90% 污泥处理成本^[16]。

就目前的研究进展来看(表 2), Anammox 细菌比 *M. oxyfera* 细菌更容易富集, 在氨存在的条件下,

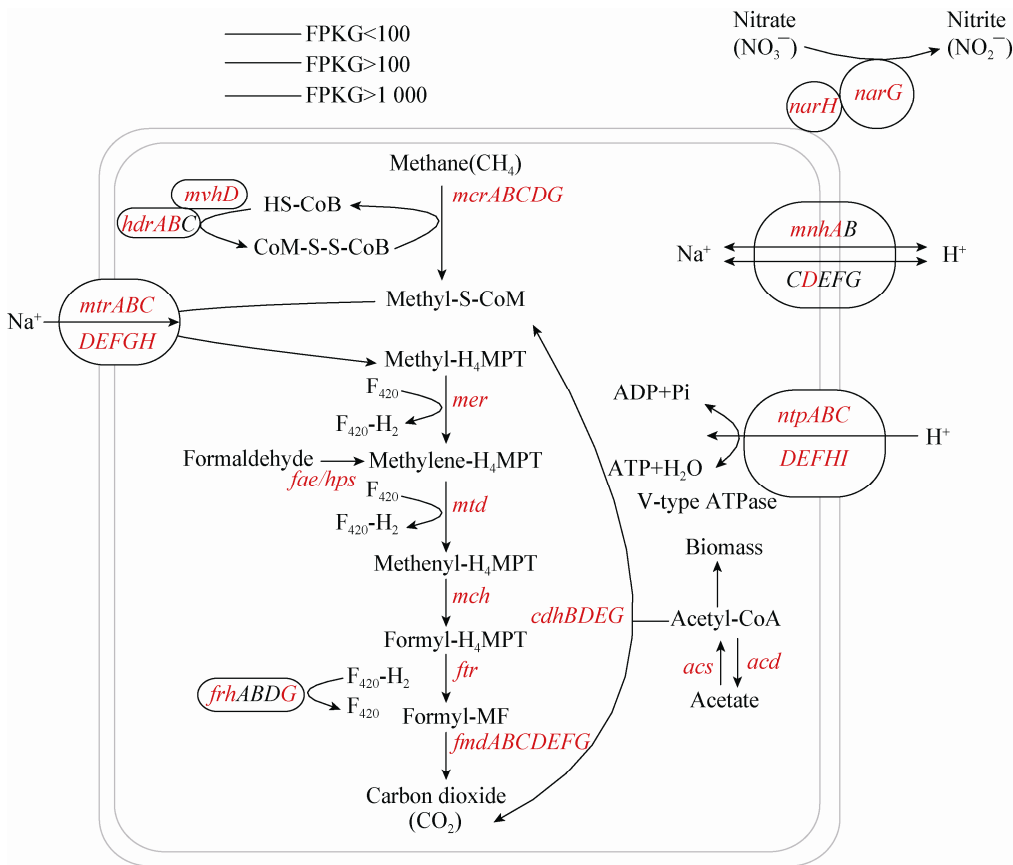


图 4 “*M. nitroreducens*”中重要的 C、N 转化过程^[27]

Figure 4 Key carbon and nitrogen transformations in “*M. nitroreducens*”^[27]

注：红色为高度表达基因，线条增粗意为基因表达值绝对增加。
Note: Highly expressed genes are shown in red, increasing line thickness indicates increasing absolute gene-expression values.

表 2 Nx-damo 与 Anammox 耦合							
Table 2 The reported enrichment cultures of combining Nx-damo and anammox							
N 素供应 N feeding	反应器类型 Reactor types	微生物组成 Composition (%)			速率 Rate (mg NO _x ⁻ -N/(L·d))	速率 Rate (mg NH ₄ ⁺ -N/(L·d))	文献 Reference
		N-damo 细菌 Bacteria	N-damo 古菌 Archaea	Anammox 细菌 Bacteria			
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	SBR	0	78	3	NO ₃ ⁻ : 13.39	10.11	[27]
NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺	SBR	50	0	50	NO ₂ ⁻ : 100	58.90	[42]
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Membrane biofilm reactor	20–30	20–30	20–30	NO ₃ ⁻ : 190	60.00	[44]
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	SBR	有	0	有	NO ₂ ⁻ : 175	117.60	[58]

能够与 *M. nitroreducens* 古菌协同, 更快地去除后者还原硝酸盐的产物亚硝酸盐; 而后者能够去除 Anammox 过程产生的硝酸盐, 实现甲烷厌氧氧化、硝酸盐还原和 Anammox 的耦合, 达到 *M. nitroreducens* 古菌的更快富集和获取更高的脱氮速率。在没有氨的条件下, *M. oxyfera* 细菌能够独立完成甲烷厌氧氧化和亚硝酸盐还原, 或者替代 Anammox 与 *M. nitroreducens* 古菌协同完成甲烷厌氧氧化和硝酸盐还原, 只是速率更慢。Anammox 细菌与 *M. oxyfera* 细菌已经被发现可以在自然生态系统共存^[21,37], 在实验室中共培养^[42,44,58]。因此, *M. nitroreducens* 古菌、*M. oxyfera* 细菌和 Anammox 细菌的协同, 能够处理任何三氮比例的废水。Kampman 等应用 N-damo 处理污泥消化 UASB 反应器出水, 亚硝酸盐最大消耗速率达到 37.8 mg N/(L·d)^[43]; 但可能由于污泥流失原因, 反应速度无法继续提高, 反而下降; 认为反硝化速率需要提高 10 倍以上才能考虑工程应用。但是, Luesken 等在 SBR 反应器内利用 N-damo 和 Anammox 耦合达到了 100 mg N/(L·d) 的亚硝酸盐转化速率^[42]; 本文作者参与的研究更是在中空纤维膜反应器内获得了 250 mg N/(L·d) 的总氮去除速率和 190 mg N/(L·d) 的硝酸盐转化速率^[44]。这些结果正逐步显示出 Nx-damo 应用于废水处理的可行性。

4 展望

C、N 循环是最基本的地球化学循环, 甲烷对全球变暖的贡献可能达到 20%^[29], 各类地球生态系统中甲烷的产生、转化机理及其排放规律是最重要的科学问题; 废水中有机物不足限制硝酸盐反硝化是普遍面临的问题; 废水厌氧处理过程甲烷的排放与控制也已经受到重视。因此, 对于硝酸盐型厌氧甲烷氧化的研究具有深远的科学意义和明显的应用前景。然而, 目前该领域的研究尚处于婴儿期, 需要更广泛和更深入的研究。

2012 年以前, 只有“NC10”门细菌中的 *M. oxyfera* 被确认为 n-damo 的功能微生物。2012 年另

一类“NC10”门细菌和 2013 年具有 N-damo 功能的 ANME-2d 古菌的发现展示了此类功能微生物潜在的多样性。Nx-damo 功能微生物的多样性、生理特性与代谢及更广泛的分布还需进一步研究证实。

当前的研究主要集中在 n-damo 细菌、n-damo 古菌和 Anammox 细菌的混合体系。古菌主导 n-damo 将硝酸盐还原为亚硝酸盐同时氧化甲烷、细菌主导 n-damo 将生成的亚硝酸盐还原为 N_2 同时氧化甲烷的演化路径仍需进一步调查。它们对甲烷的竞争、可能引起的亚硝酸盐积累等对这一共生体系的形成、稳定性的影响值得研究。尽管不排除 ANME-2d 或其他未知古菌具有独立完成硝酸盐全部反硝化的可能, 但在 ANME-2d 中未检测到除硝酸盐还原外的其他反硝化还原酶^[27]。相反, 在 *M. oxyfera* 细菌中存在硝酸盐还原基因^[29]。因此, 开展 NO_3^-/CH_4 条件下的相关研究, 可能形成关于 N-damo 功能微生物及其代谢特性和途径、微生物之间的协同或竞争关系等科学问题的新知识。

尽管将 *M. oxyfera* 和 Anammox 细菌耦合获得了 100–200 mg/(L·d) 的脱氮速率, 但 Anammox 的脱氮贡献达到 77%^[42,58]。在中空纤维膜反应器内获得 250 mg/(L·d) 的脱氮速率中也有一半来源于 Anammox^[44]。Anammox 发生的前提是有氨, 对于含硝酸盐而不含氨的地下水、地表水和污水处理厂出水的处理, 关键是要提高 Nx-damo 自身的效能。因此, 利用生物膜反应器或者有助于污泥颗粒化的 EGSB 反应器、辅以优化的运行参数, 有可能开发出基于 Nx-damo 原理的废水处理新技术。

参考文献

- [1] Strous M, Jetten MSM. Anaerobic oxidation of methane and ammonium[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 99-117
- [2] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 311-334
- [3] Gupta V, Smemo KA, Yavitt JB, et al. Stable isotopes reveal widespread anaerobic methane oxidation across latitude and peatland type[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(15): 8273-8279
- [4] Reeburgh SW. Oceanic methane biogeochemistry[J]. Chemical Reviews, 2007, 107(2): 486-513

- [5] Devol AH, Ahmed SI. Are high rates of sulphate reduction associated with anaerobic methane oxidation[J]. *Nature*, 1981, 291: 407-408
- [6] Reeburgh WS. "Soft spots" in the global methane budget[J]. *Microbial Growth on C1 Compounds*, 1996: 335-342
- [7] Krüger M, Meyerdieks A, Glöckner FO, et al. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically[J]. *Nature*, 2003, 426: 878-881
- [8] Hallam SJ, Putnam N, Preston CM. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics[J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1457-1462
- [9] Caldwell SL, Laidler JR, Brewer EA, et al. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(18): 6791-6799
- [10] Thauer RK, Shima S. Methane as fuel for anaerobic microorganisms[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125: 158-170
- [11] Strous M, Jetten MSM. Anaerobic oxidation of methane and ammonium[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 99-117
- [12] Shen LD, Hu BL, Zheng P. Progress in study on microorganisms responsible for anaerobic oxidation of methane[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(3): 619-628 (in Chinese)
沈李东, 胡宝兰, 郑平. 甲烷厌氧氧化微生物的研究进展[J]. *土壤学报*, 2011, 48(3): 619-628
- [13] Zhang MZ, Li L, Liu JX. The parth way and methanotroph of anaerobic methane oxidation driven by nitrate or sulfate[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 702-710 (in Chinese)
张梦竹, 李琳, 刘俊新. 硝酸盐和硫酸盐厌氧氧化甲烷途径及氧化菌群[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 702-710
- [14] Liu ZH, Yin H, Dang Z, et al. Dissolved methane: a hurdle for anaerobic treatment of municipal wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(2): 889-890
- [15] Kruger M, Wolters H, Gehre M, et al. Tracing the slow growth of anaerobic methane-oxidizing communities by (15)N-labelling techniques[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 63(3): 401-411
- [16] Shen LD, He ZF, Zhu Q, et al. Microbiology, ecology, and application of the nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 269-273
- [17] Raghoebarsing AA, Pol A, van de Pas-Schoonen KT, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440: 918-921
- [18] Ettwig KF, Alen Tv, Pas-Schoonen KTVd. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662
- [19] Hu S, Zeng RJ, Burow LC, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 377-384
- [20] Wu ML, Ettwig KF, Jetten MS, et al. A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium *Candidatus 'Methylomirabilis oxyfera'*[J]. *Biochemical Society transactions*, 2011, 39(1): 243-248
- [21] Zhu G, Jetten MSM, Kusch P. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(4): 1043-1055
- [22] Modina O, Fukushi K, Yamamoto K. Denitrification with methane as external carbon source[J]. *Water Research*, 2007, 41(12): 2726-2738
- [23] Mason I. Methane as a carbon source in biological denitrification[J]. *Journal Water Pollution Control Federation*, 1977, 49(5): 855-857
- [24] Islas-Limaa S, Thalassoa F, Gómez-Hernandezb J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification[J]. *Water Research*, 2004, 38(1): 13-16
- [25] Eisentraeger A, Klag P, Vansbotter B. Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor[J]. *Water Research*, 2001, 35(9): 2261-2267
- [26] Waki M, Suzuki K, Osada T, et al. Microbiological activities contributing to nitrogen removal with methane: effects of methyl fluoride and tungstate[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 94(3): 339-343
- [27] Haroon MF, Hu S, Shi Y, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 567-570
- [28] Ettwig KF, Shima S, Pas-Schoonen KTVd. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3164-3173
- [29] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548
- [30] Kampman C, Temmink H, Hendrickx TLG, et al. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria from municipal wastewater sludge in a membrane bioreactor at 20 °C[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 274: 428-435
- [31] Hu S, Zeng RJ, Keller J, et al. Effect of nitrate and nitrite on the selection of microorganisms in the denitrifying anaerobic methane oxidation process[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(3): 315-319
- [32] He Z, Cai C, Geng S, et al. Modeling a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process: parameters identification and model evaluation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 315-320
- [33] Duan Z, Mao S. A thermodynamic model for calculating methane solubility, density and gas phase composition of methane-bearing aqueous fluids from 273 to 523K and from 1 to 2 000 bar[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70(13): 3369-3386
- [34] Serra MCC, Pessoa FLP, Palavra AMF. Solubility of methane in water and in a medium for the cultivation of methanotrophs bacteria[J]. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2006, 38(12): 1629-1633
- [35] He ZF, Cai C, Shen LD, et al. Establishing and verifying of model for methane mass transfer in DAMO process[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2012, 63(6): 1836-1841 (in Chinese)
何焱飞, 琛蔡, 沈李东, 等. DAMO 过程中甲烷传质模型的建立与验证[J]. *化工学报*, 2012, 63(6): 1836-1841
- [36] 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
- [37] Wang Y, Zhu G, Harhangi HR, et al. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 336(2): 79-88
- [38] Zhu B, Dijk Gv, Fritz C. Anaerobic oxidization of methane in a minerotrophic peatland: enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8657-8665
- [39] Shen LD, Liu S, Zhu Q, et al. Distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in the sediments of the qiantang river[J]. *Microbial Ecology*, 2014,

- 67(2): 341-349
- [40] Zhang Y, Henriot JP, Bursens J, et al. Stimulation of *in vitro* anaerobic oxidation of methane rate in a continuous high-pressure bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9): 3132-3138
- [41] Rasigraf O, Vogt C, Richnow HH, et al. Carbon and hydrogen isotope fractionation during nitrite-dependent anaerobic methane oxidation by *Methyloirabilis oxyfera*[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2012, 89: 256-264
- [42] Luesken FA, Sanchez J, van Alen TA, et al. Simultaneous nitrite-dependent anaerobic methane and ammonium oxidation processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 77(19): 6802-6807
- [43] Kampman C, Hendrickx TL, Luesken FA, et al. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 227-228: 164-171
- [44] Shi Y, Hu S, Lou J, et al. Nitrogen removal from wastewater by coupling anammox and methane-dependent denitrification in a membrane biofilm reactor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(20): 11577-11583
- [45] Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, et al. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(4): 233-238
- [46] Thauer RK, Shima S. Biogeochemistry: Methane and microbes[J]. *Nature*, 2006, 440: 878-879
- [47] Oremland RS. NO connection with methane[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 500-501
- [48] Luesken FA, Wu ML, Op den Camp HJ, et al. Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*': kinetic and transcriptional analysis[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(4): 1024-1034
- [49] Deutzmann JS, Schink B. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, 77(13): 4429-4436
- [50] Zhu Q, Shen LD, Hu BL, et al. Molecular detection of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria in the sediment of West Lake, Hangzhou[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(5): 1321-1325 (in Chinese)
- 朱群, 沈李东, 胡宝兰, 等. 西湖底泥中的反硝化型甲烷厌氧氧化菌的分子生物学检测[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(5): 1321-1325
- [51] Knittel K, Lösekann T, Boetius A, et al. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2005, 71(1): 467-479
- [52] Ettwig KF, Speth DR, Reimann J, et al. Bacterial oxygen production in the dark[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 1-8
- [53] Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, et al. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(2): 422-439
- [54] Hallam SJ, Girguis PR, Preston CM, et al. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5483-5491
- [55] Smith AL, Skerlos SJ, Raskin L. Psychrophilic anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater[J]. *Water Research*, 2013, 47(4): 1655-1665
- [56] Li A, Sun G, Xu M. Recent patents on anammox process[J]. *Recent Patents on Engineering*, 2008, 2(3): 189-194
- [57] Than K, Ajit PA. Novel microbial nitrogen removal processes[J]. *Biotechnology Advances*, 2004, 22(7): 519-532
- [58] Zhu B, Sanchez J, van Alen TA, et al. Combined anaerobic ammonium and methane oxidation for nitrogen and methane removal[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(6): 1822-1825
- [59] Abma WR, Driessen W, Haarhuis R, et al. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and cost-effective separate treatment of industrial wastewater[J]. *Water Science and Technology*, 2010, 61(7): 1715-1722
- [60] Van der Star WR, Abma WR, Blommers D, et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam[J]. *Water Research*, 2007, 41(18): 4149-4163
- [61] Adriano J, David S, Jack E, et al. Full-scale nitrogen removal from digester liquid with partial nitrification and anammox in one SBR[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(14): 5301-5306