



专论与综述

亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化及其功能微生物研究进展

赵维怡¹ 陈庆锋^{*1,2} 马春霞²

1 山东师范大学地理与环境学院 山东 济南 250000

2 山东省分析测试中心 山东 济南 250014

摘 要: 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化(Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation, N-DAMO)是耦合氮循环和碳循环的关键环节, 主要是由亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌(*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*)介导完成, 对于研究全球氮和碳元素的生物地球化学循环具有重要意义。本文首先总结了国内外 N-DAMO 的影响因素和在不同自然生态系统中的分布; 然后阐述了 N-DAMO 菌的生理生化特性及其富集培养优化实验和检测技术, 最后探讨了 N-DAMO 技术的应用现状。本综述不仅有助于揭示全球碳氮循环的耦合作用机制, 也为 N-DAMO 反应耦合其他厌氧生物处理过程应用到污水的除碳脱氮上提供了理论依据。

关键词: 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌反应, 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌, 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌技术, 富集培养优化

Nitrite-dependent anaerobic methane oxidation and microbial characteristics: a review

ZHAO Weiyi¹ CHEN Qingfeng^{*1,2} MA Chunxia²

1 College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250000, China

2 Shandong Analysis and Test Center, Jinan, Shandong 250014, China

Abstract: Nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (N-DAMO) is a key link that couples the nitrogen cycle and the carbon cycle. It is mediated by *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*. The discovery of the N-DAMO process has important implications for the study of the global carbon and nitrogen cycling. Through literature review, this article firstly summarized the influencing factors of N-DAMO reaction at home and abroad, N-DAMO reaction under different natural ecosystems. Then, it elaborated the functional structure, physiological and biochemical characteristics of N-DAMO bacteria, the enrichment and culture optimization of N-DAMO bacteria, and research techniques for N-DAMO reaction. Finally, the application research of N-DAMO was discussed. This article not only helps to reveal the coupling mechanism of global carbon and nitrogen cycles, but also provides a theoretical basis for N-DAMO reaction coupled with other anaerobic biological treatment processes to be applied to wastewater carbon and nitrogen removal.

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41877041, 42077051); Taishan Scholars Fund for Young Experts of Shandong Province (tsqn201812086)

***Corresponding author:** Tel: 86-531-82605317; E-mail: chensdcn@163.com

Received: 24-12-2020; **Accepted:** 12-03-2021; **Published online:** 29-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(41877041, 42077051); 山东省泰山学者青年专家经费(tsqn201812086)

***通信作者:** Tel: 0531-82605317; E-mail: chensdcn@163.com

收稿日期: 2020-12-24; **接受日期:** 2021-03-12; **网络首发日期:** 2021-03-29

Keywords: N-DAMO reaction, nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria, N-DAMO techniques, enrichment culture optimization

随着全球温室气体排放规模日益扩增,气候变暖已成为人类共同面临的严峻问题。在“十四五”发展规划中,我国也再次强调了降低碳排放强度的迫切需求,“降低碳排放强度,支持有条件的地方率先达到碳排放峰值,碳排放达峰后稳中有降”,体现了大国责任担当。自 1750 年至 2011 年,大气中二氧化碳(CO_2)和甲烷(CH_4)浓度分别增加了 40%和 150%,相比于 CO_2 ,减少大气中同等量的 CH_4 更有利于减缓温室效应^[1-2]。2016 年, Xu 等^[3]根据时空与数据表征需求,提出了一个未来陆地生态系统主要 CH_4 循环过程的机制模型(图 1)。研究表明,湿地是甲烷排放的重要源头^[4-7]。在黄河三角洲湿地中, Chen 等^[8]发现滨海湿地 CH_4 排放过程与人类活动有关并在 2018 年提出了一种滨海湿地 CH_4 循环模

式(图 2)^[9]。目前,国内外越来越多的研究学者开始重视 CH_4 对全球气候变化的影响研究。

研究表明,污水处理厂是重要的 CH_4 排放源,在污水处理过程中污染物的含碳化合物和含氮化合物会转化为 CH_4 、一氧化二氮(N_2O)和 CO_2 等温室气体^[10]。传统的污水脱氮处理技术有同时硝化反硝化工艺等, N-DAMO 过程也可通过将碳氮反应耦合,在缺氧条件下同时去除 CH_4 和氮素,而且不需要额外添加碳源^[11]。因此,对亚硝酸盐甲烷厌氧氧化(Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation, N-DAMO)反应及相关功能微生物的探究不仅有助于揭示全球碳氮循环的耦合作用机制和缓解 CH_4 带来的全球温室效应,也为 N-DAMO 反应耦合其他厌氧生物处理过程应用到污水的除碳脱氮上提供了理论依据。

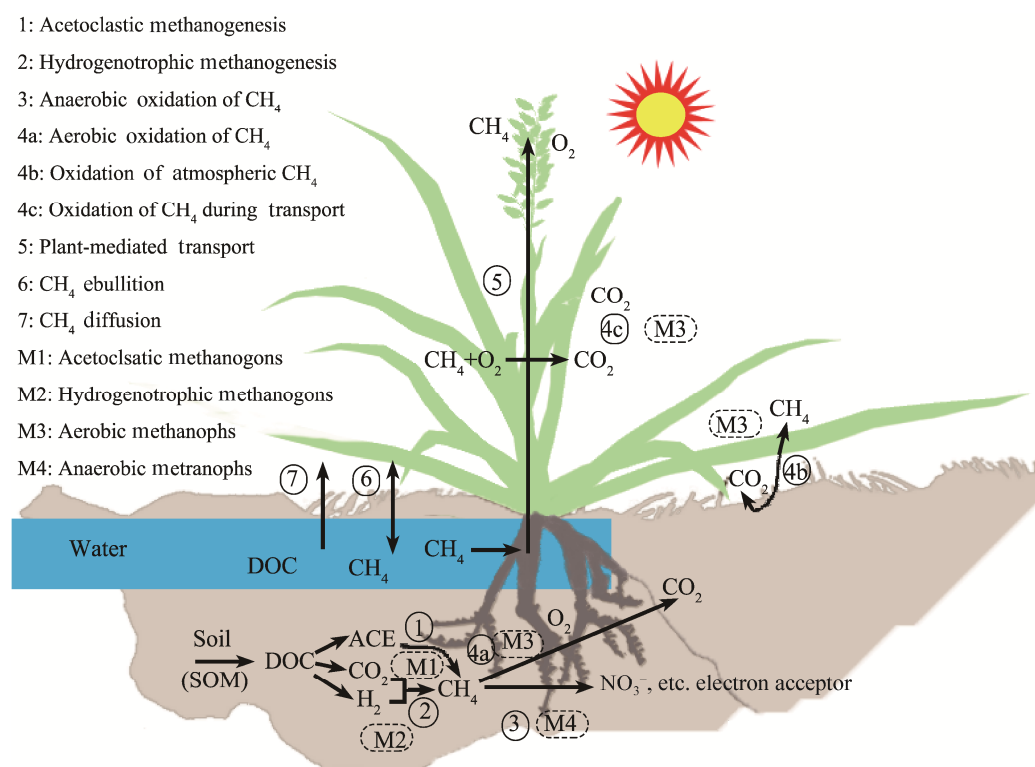
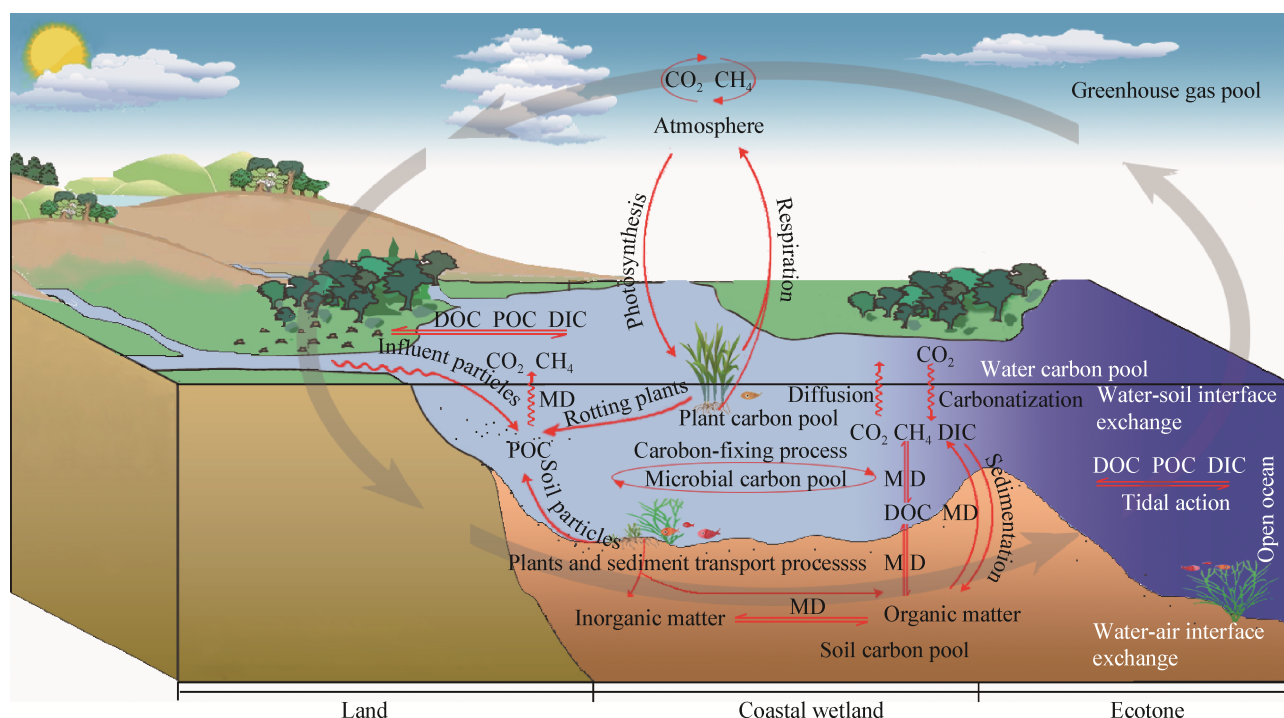


图 1 陆地生态系统主要 CH_4 循环过程的机制模型^[3]

Figure 1 Key features of future mechanistic CH_4 models with a full representation of primary CH_4 processes in the terrestrial ecosystems^[3]

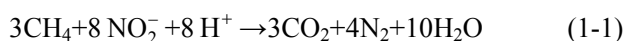
图2 滨海湿地碳循环路径^[9]Figure 2 Diagram depicting a carbon cycle pathway for coastal wetlands^[9]

Note: MD: Microbial degradation; POC: Particulate organic carbon; DIC: Dissolved inorganic carbon.

1 研究进展

1.1 N-DAMO 反应的发现

N-DAMO 反应是这些年来氮循环途径研究领域的新发现。2006 年荷兰科学家 Raghoebarsing 等^[12]通过 16 个月的富集培养,首次从富含 CH_4 和 NO_2^- -N 的底泥中富集出能进行 CH_4 厌氧氧化耦合反硝化过程的微生物群落,从而证实了 NO_2^- 作为电子受体的 CH_4 厌氧氧化反应的存在,并将该反应称之为 N-DAMO 反应,其反应方程式为:



由式(1-1)可知,反应以 CH_4 作为电子供体,以 NO_2^- 作为电子受体,在厌氧条件下,碳循环(CH_4 厌氧氧化反应)与氮循环(NO_2^- 还原反应)相互耦联。N-DAMO 菌利用 CH_4 作为其唯一的碳源^[13],通过生化作用,将 CH_4 氧化为 CO_2 ,将 NO_3^- -N 及 NO_2^- -N 还原为 N_2 ^[14]。

在随后的研究中,研究者们发现 N-DAMO 反应

广泛存在于自然环境中,如淡水湿地^[15-16]、水库^[16]、淡水湖泊^[17]、沙漠湖泊^[18]、水稻土^[15-16,19]、污水处理厂^[16,20]、潮间带沉积物^[21-22]、出海口^[23]、南海底泥^[24]以及咸水湖^[25]等生境中。然而截至目前,人们尚未探明海洋生态系统中 N-DAMO 的反应机理。

1.2 影响因素

研究表明, NO_3^- 及 NO_2^- 浓度、 CH_4 、温度、 O_2 浓度、盐度、pH 等因素在 N-DAMO 反应过程中发挥了重要的作用^[12,17,20,26-39]。

1.2.1 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度

N-DAMO 反应受 NO_3^- 及 NO_2^- 浓度的影响。当处于缺氧状态时, NO_3^- 通过反硝化还原生成 NO_2^- ,提高了 NO_2^- 浓度,为 N-DAMO 菌提供了基质 NO_2^- ,从而影响到 N-DAMO 反应过程。研究者们发现, N-DAMO 菌优先利用 NO_2^- ^[12]。因此,在厌氧沉积物或深层土壤中, NO_3^- 浓度往往决定了环境中 NO_2^- 浓度。Shen 等^[26-28]通过对淹水稻田、天然淡

水湿地、滨海湿地和湖泊 N-DAMO 菌分布和反应活性进行研究,发现自然环境中高浓度的 NO_3^- 对 N-DAMO 菌的活性有显著的促进作用,而且深海环境中的 NO_3^- 、 NO_2^- 可能是影响海洋沉积物中 N-DAMO 菌分布和反应活性的主要限制性环境因子,所以 NO_3^- 、 NO_2^- 对 N-DAMO 反应的影响仍需深入研究。

1.2.2 CH_4 分压

作为 N-DAMO 反应的电子供体和唯一能源, CH_4 与 N-DAMO 反应的发生有着直接的联系^[29-30]。赵荣等^[31]研究发现, CH_4 分压从 0 kPa 增加到 98 kPa, N-DAMO 过程反硝化速率上升趋势由快变缓, CH_4 分压为 49 kPa 时的反硝化速率相当于 98 kPa 时的 78%, 此时的 CH_4 分压也基本满足 N-DAMO 过程所需。因此,适当的 CH_4 分压可促进 N-DAMO 反应发生。

1.2.3 温度

在微生物的生长繁殖过程中,温度是重要的环境因子之一。Luesken 等^[20]研究了温度对于 N-DAMO 菌活性的影响,结果发现 30–35 °C 是 N-DAMO 菌生长的最适温度;何翀飞^[32]通过试验表明,在环境温度 15–45 °C 范围内, N-DAMO 菌在 35 °C 下活性更高;Kampman 等^[33]在进行低温废水处理联合 N-DAMO 过程时发现, N-DAMO 菌的最适生长温度与其最初的富集温度有关,当富集环境温度条件为 20–25 °C 和 25–30 °C 时,最适生长温度分别为 21 °C 和 30 °C;Hu 等^[34]研究发现,当环境温度达到 45 °C 时,并不能富集到具有一定活性的 N-DAMO 菌培养物,这可能是因为 N-DAMO 菌的某些酶在 45 °C 时失去活性,使细菌失去繁殖能力并死亡。现阶段的实验数据通过阿伦尼乌斯方程可描述为 35 °C 是 N-DAMO 菌的最适生长温度^[35]。

1.2.4 O_2 浓度

研究发现, N-DAMO 菌利用内产氧进行甲烷好氧化代谢,因此,环境中的 O_2 对于 N-DAMO 反应具有非常重要的作用^[29]。Hu 等^[34]分别在

50–60 cm 和 60–140 cm 深度的水稻土中发现 N-DAMO 菌的活性及其 N-DAMO 反应活性均高于浅层土壤^[36-37];Kojima 等^[17]在深层的湖泊沉积物中检测出了 N-DAMO 菌的功能基因,而在浅层湖泊沉积物中很难检测到。总体而言,在 O_2 浓度相对较低的环境中, N-DAMO 菌分布更广、反应活性更高。

1.2.5 盐度

现阶段仅有少数研究报道了海洋中 N-DAMO 反应过程。He 等^[35]向淡水环境培养的 N-DAMO 富集物添加 NaCl 模拟海洋环境(盐度为 20‰)培养 90 d 时,首次发现 N-DAMO 细菌仍具有一定的活性,表现出盐度适应性;耿莎^[38]研究发现,适合海洋 N-DAMO 菌生长的最佳盐度为 20.5‰。然而,目前国内外对于 N-DAMO 菌的耐盐机理仍未探明。

1.2.6 pH 值

环境 pH 是影响所有微生物生长的主要控制因素^[39]。Zhu 等^[40]通过实验发现, N-DAMO 菌富集物在 pH 值为 7.0–7.4 的条件下具有更高的活性,约是 pH 值为 6.0 时的 4 倍;何翀飞^[32]研究发现,在 pH 测试范围(6.0–9.0)内, N-DAMO 菌活性随 pH 值的增加,先增加后降低,由修正的安东尼奥方程描述,最优 pH 值约为 7.6。总体而言, N-DAMO 菌的最适 pH 为弱碱性。

1.3 N-DAMO 反应在自然生态系统中的分布

1.3.1 海洋生态系统

海洋生态系统是地球上巨大的 CH_4 库,每年 CH_4 的产生量约占全球 CH_4 总产量的 30%,但是海洋的 CH_4 排放量却很低,约占全球总排放量的 7%;这主要是由于在排放 CH_4 之前,微生物通过氧化作用将其分解^[41]。然而,对海洋环境中 N-DAMO 菌的特性和功能却鲜有报道。近些年,Shen 等^[21]和 Chen 等^[22,24]分别在潮间带沉积物和海洋沉积物中发现了 N-DAMO 菌的存在,但是在海洋深处是否存在 N-DAMO 反应仍需进一步研究。近些年,由于外源氮素不断汇入到海洋环境中, N-DAMO 反应在海洋生态系统中发挥的作用日益明显,未来海洋生态环境中的 N-DAMO 反应过程以及 N-DAMO 菌

的分布和特性即将成为重要的研究方向^[42]。

1.3.2 淡水生态系统

在厌氧环境下,只有当 NO_2^- 和 CH_4 同时存在时, N-DAMO 反应才能发生^[43]。淡水沉积物中充足的 NO_2^- 和 CH_4 , 以及长期水淹形成的良好厌氧环境, 共同构成了 N-DAMO 反应的有利条件。最早 Raghoebarsing 等^[12]在荷兰的一条运河里发现了 N-DAMO 菌; Hu 等^[34]从淡水湖沉积物中富集得到 N-DAMO 菌; 随后, Han 等^[16]在淡水水库中发现了 N-DAMO 菌。这些研究均为 N-DAMO 菌在淡水生态系统的分布提供了证据。

1.3.3 湿地生态系统

湿地生态系统有“地球之肾”“物种储藏库”等称号, 自然资源丰富, 在保护生态环境及维持生物多样性等方面发挥着重要作用^[44]。Li 等^[45]在黄河三角洲湿地中发现湿地植物增强了土壤微生物的多样性。动植物残体、植物根系分泌物以及其他代谢产物使湿地系统积累了丰富的有机质^[46]。由于土壤含水量大, 长期受到水体覆盖的厌氧条件下, 湿地系

统中产生了大量的 CH_4 ^[47]。近年来, 科学家们针对湿地生态系统中 N-DAMO 反应的研究最为广泛。Wang 等^[19]利用稳定同位素实验在深度为 30–70 cm 的水稻土中发现了丰富的 N-DAMO 菌; Han 等^[16]在富含有机质的水稻土和芦苇床中发现了 N-DAMO 菌; Hu 等^[15]研究了中国东南部 3 个不同淡水湿地(下渚湖湿地、西溪湿地、水稻土), 在 50–60 cm 和 90–100 cm 的深度土壤中发现了 N-DAMO 菌; Shen 等^[48]总结了沉积物或淹水湿地土壤中 N-DAMO 反应发生机理(图 3)。总体而言, N-DAMO 菌在湿地生态系统中分布广泛。

2 N-DAMO 功能微生物

2.1 生理生化性质

Ettwig 等^[29]发现了催化 N-DAMO 反应的微生物, 并将其命名为 *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (简称 *M. oxyfera*), 该类微生物属于 NC10 门。经过研究发现, NC10 门细菌可以根据功能基因分为 Group A、Group B、Group C、Group D 和 Group E 等 5 类微生物群, 其中, 在对 *M. oxyfera* 进行富

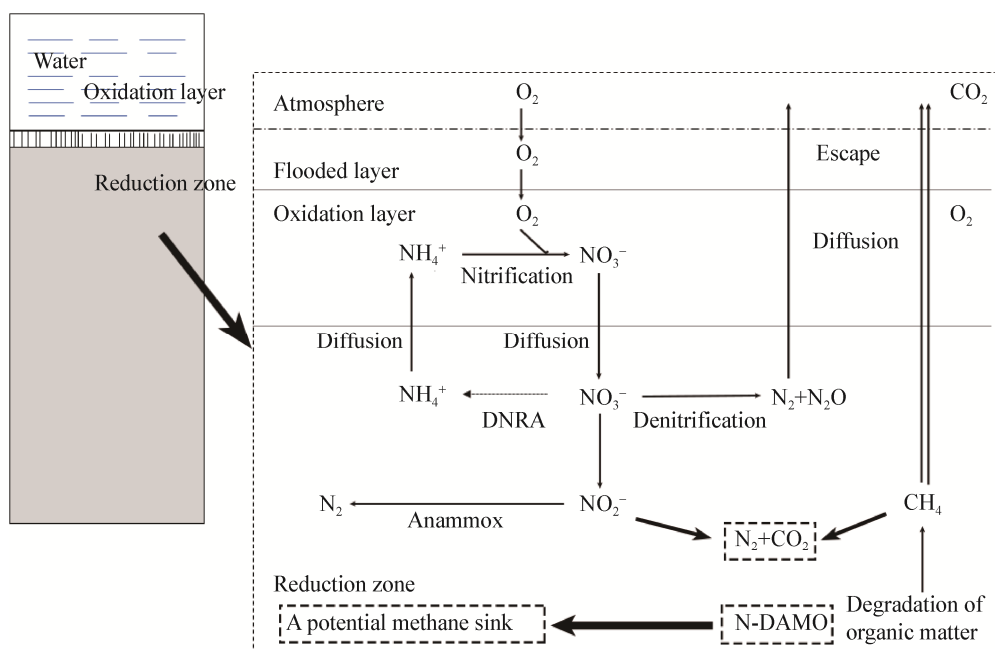


图 3 厌氧沉积物或淹水湿地土壤中 N-DAMO 反应发生机理^[48]

Figure 3 The occurrence of N-DAMO process in anoxic sediments/flooded wetland soils^[48]

集培养后只发现了 Group A 类型的存在, 而其他 Group 的功能尚不清楚^[49-50]。因此, 目前科学家认为 Group A 是介导 N-DAMO 反应发生的重要生物群。N-DAMO 菌属于革兰氏阴性菌, 经冷冻蚀刻后细胞结构呈多边形(图 4); 通过电镜观察发现, N-DAMO 菌没有细胞质内膜结构, 因此不能为颗粒状 CH_4 单加氧酶提供结合位点, 这与已经发现的 CH_4 氧化菌结构有明显的差异^[51]。

在 2012 年, Kool 等^[52]对 N-DAMO 菌脂质的构成特性进行了研究, 发现 N-DAMO 菌含有大量的脂肪酸 10-甲基十六烷酸, 约占总脂肪酸的 46%。同年, Zhu 等^[40]研究发现, N-DAMO 菌的丰度与脂肪酸 10-甲基十六烷酸的含量呈显著的正相关关系。因此, 脂肪酸 10-甲基十六烷酸可以作为 N-DAMO 菌分子生物学研究的标记物。

截至目前, 对于 N-DAMO 菌代谢机理的研究仍然较少。Wu 等^[53]认为 N-DAMO 菌的代谢具有 NO_2^- 还原和 CH_4 氧化 2 个不同的途径(图 5), 在 NO_2^- 还原途径方面: NO_2^- 首先被还原为 NO , 而后在酶的催化作用下生成 O_2 和 N_2 。生成的 $1/4 \text{O}_2$ 进

入呼吸链进行能量代谢循环, 其余的用于 CH_4 氧化; 与此同时, *M. oxyfera* 菌通过化学渗透作用为 NO_2^- 的还原提供能量; 在 CH_4 的氧化过程中, CH_4 被催化成甲醛, 后被转化成甲酸, 最后在甲酸脱氢酶 (Formate Dehydrogenase, FDH) 的催化下转化为 CO_2 , 进入卡尔文循环, 实现碳的固定。

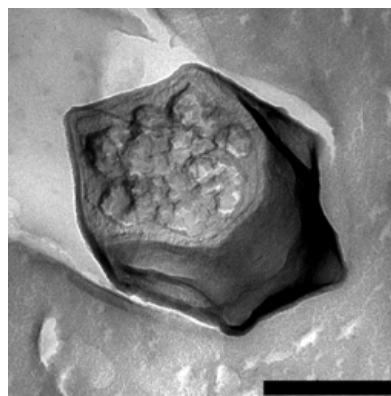


图 4 N-DAMO 细菌横向断截面的透射电镜照片

Figure 4 Transmission electron microscope image of N-DAMO bacterial cross section

注: 标尺, 200 nm

Note: Scale bars, 200 nm

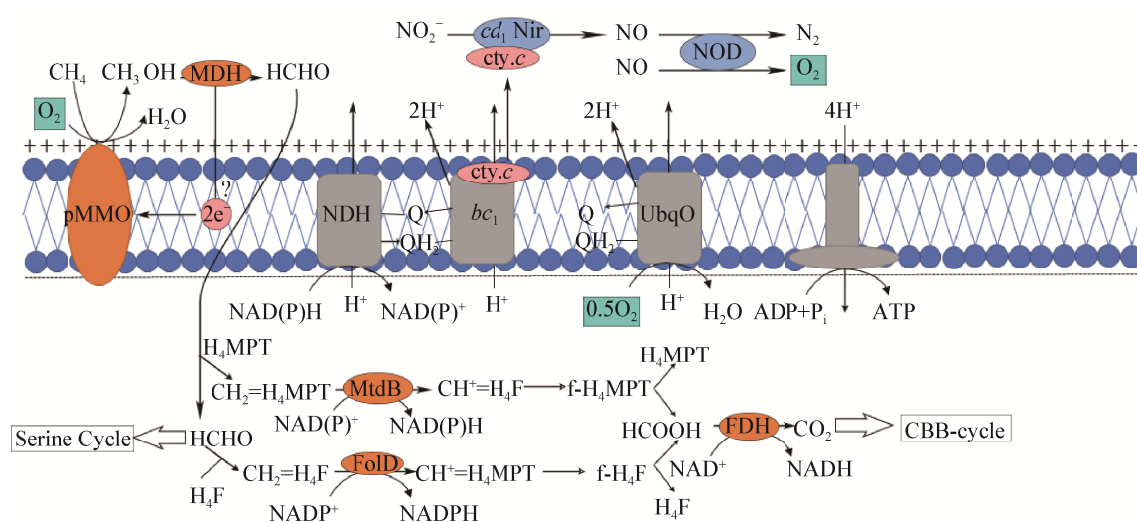


图 5 *M. oxyfera* 能量代谢途径示意图^[53]

Figure 5 Schematic diagram of *M. oxyfera* energy metabolic pathway^[53]

注: 蓝色区域为 NO_2^- 还原途径; 橙色区域为 CH_4 氧化途径

Note: The blue region is NO_2^- reduction pathway; The orange region is the CH_4 oxidation pathway

2.2 N-DAMO 菌富集培养及优化

目前研究者们以自然生境及人工生境等样品作为接种物进行富集培养, 已先后获得了多种 N-DAMO 菌富集培养物。已获得的 N-DAMO 富集接种物及培养条件见表 1。

N-DAMO 细菌生长缓慢(理想情况下, 该菌富集培养物需要 1 年以上的连续培养)且细胞活性低[CH₄转化率仅为 0.09–0.3 fmol CH₄/(day·cell), NO₂⁻转化速率仅为 4.5–8.8 μmol N/(L·g·h)], 难于进一步进行分离纯化、生理生化研究和工程应用^[38,54]。因此, 很多的研究者开始对 N-DAMO 菌的富集培养优化进行研究。现阶段, 研究者主要从接种物、营养条件、环境因子、反应器构型等方面进行了优化研究^[20,32,50,55-56]。

(1) 接种物的优化: He 等^[50]研究了不同接种物(厌氧产 CH₄ 颗粒污泥、农田水稻土及淡水河道底泥)对 N-DAMO 菌富集培养的影响, 发现农田水稻土比其他 2 种接种物富集得到的 N-DAMO 菌的数量高且 N-DAMO 反应的活性高。

(2) 营养条件的优化: 目前对 N-DAMO 菌营养条件优化的研究主要集中在基质浓度和微量元素。何焜飞^[32]通过拟合 Monod 方程曲线, 发现 N-DAMO 菌对 NO₂⁻的亲力和常数大约是 CH₄ 的 10 倍, 适合 N-DAMO 菌生长的 NO₂⁻ 浓度范围为 14–42 mg N/L, NO₂⁻ 最优浓度 26.88 mg N/L。在微

表 1 已获得 N-DAMO 富集接种物及培养条件

Table 1 Enrichment inoculants and culture conditions of N-DAMO in previous works

Inoculum	Medium	Mode of operation	Temperature (°C)	pH	Operating cycle (month)	References
Freshwater channel sediment	Artificial medium	SBR	25	7.0–7.5	16	[12]
Freshwater channel sediment	Artificial medium	SBR	30	6.9–7.5	7	[48]
Mixed inoculant	Artificial medium	SBR	22/35	7.0–7.5	10	[34]
Wastewater treatment sludge	Artificial medium	SBR	20–23	6.8–7.3	11	[20]
Peaty soil	Natural medium	SBR	25	6.0–6.2	21	[40]
Wastewater treatment sludge	Artificial medium	SFBR/MBR	20/30	6.5–8.0	36	[33]
Paddy soil	Natural medium	SBR	30	7.0–8.0	16	[50]
Methanogenic sludge	Natural medium	SBR	30	7.0–8.0	16	[50]
Littoral sediment	Natural medium and artificial medium	SBR	25	7.0–8.0	14	[23]

量元素方面, 提高培养基中 Cu (10 μmol/L)、Fe (20 μmol/L)等微量元素的浓度可增强 N-DAMO 活性, 促使 N-DAMO 细菌由原来的单一细胞形态转变为大而密实的团聚体形态, 加快富集速度^[55]。其他微量元素如钼、锌、锰、钴和镍等对 N-DAMO 菌的富集培养无明显促进作用^[32]。

(3) 环境因子的优化: He 等^[35]通过短期批次试验及长期富集培养淡水 N-DAMO 菌发现, N-DAMO 菌最适温度、pH 值和盐度分别为 35 °C、7.6 及 0‰。但 N-DAMO 菌在进行长期海水培养试验时, 在盐度为 20‰的条件下仍有活性^[53]; Luesken 等^[20]探讨了 O₂ 浓度(2%和 8%)对 N-DAMO 菌富集培养的影响, 发现 2 种不同的 O₂ 浓度对 N-DAMO 菌活性均有抑制作用; 在杭州湾近海岸沉积物中, Shen 等^[27]研究发现 N-DAMO 菌活性和群落结构与盐度呈显著负相关关系。

(4) 反应器构型的优化: Hu 等^[56]采用控制变量法探讨比较了序批式活性污泥反应器(Sequencing Batch Activated Sludge Reactor, SBR)、多级环流反应器(Multi-Stage Airlift Reactor, MSALR)、连续搅拌反应器(Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR)对 N-DAMO 菌富集培养的影响。研究结果表明, 利用 MSALR 反应器富集优化的 N-DAMO 菌的活性和数量要明显高于其他 2 种反应器构型。

综上所述, 已获得的 N-DAMO 富集优化培养条件如表 2 所示。

表 2 N-DAMO 富集优化培养条件

Table 2 The obtained N-DAMO enrichment optimized culture conditions

环境条件	优化	表现	参考文献
Environmental conditions	Optimize	Performance	References
接种物	水稻土	富集得到的 N-DAMO 菌的数量相对较高且	[50]
Inoculum	Paddy soil	N-DAMO 反应的活性高	
		The number of N-DAMO bacteria obtained by enrichment is relatively high and the activity of N-DAMO reaction is high too	
基质浓度	NO ₂ ⁻ 浓度 14–42 mg N/L, 最优浓度	N-DAMO 菌对 NO ₂ ⁻ 的亲合力常数大约是 CH ₄	[32]
Substrate concentration	26.88 mg N/L	亲合力常数的 10 倍	
	Nitrite concentration 14–42 mg N/L, the optimal concentration of 26.88 mg N/L	The affinity constant of N-DAMO bacteria to nitrite is approximately 10 times that of methane	
微量元素	Cu 10 μmol/L	N-DAMO 细菌由原来的单一细胞形态转变为	[55]
Microelement	Fe 20 μmol/L	大而密实的团聚体形态	
		N-DAMO bacteria had changed from the original single cell form to the large and dense aggregate form	
环境因子	Temperature 35 °C	N-DAMO 菌的活性和数量明显提高	[32,38]
Environmental factors	pH 7.6	The activity and quantity of N-DAMO bacteria were significantly increased	
	淡水 N-DAMO 菌盐度 0‰		
	N-DAMO bacteria in fresh water salinity 0‰		
	海水 N-DAMO 菌盐度 20.5‰		
	N-DAMO bacteria in sea water salinity 20.5‰		
反应器构型	MSALR 反应器	N-DAMO 菌的活性和数量要明显高于 SBR 反	[56]
Reactor configuration	MSALR reactor	应器、CSTR 反应器构型	
		The activity and quantity of N-DAMO bacteria were significantly higher than that of SBR reactor and CSTR reactor	

2.3 N-DAMO 菌的检测技术

近年来,基因探针检测法、PCR 检测法(如 16S rRNA)和荧光原位杂交等分子生物学方法具有特异性和灵敏性,是生物检测的有力工具。目前,针对 N-DAMO 反应的研究应用最广的是稳定性同位素活性示踪技术。Hu 等^[15]利用该技术证实了湿地生态系统中存在 N-DAMO 反应,同时证明了深层沉积物中 N-DAMO 菌的丰度明显高于浅层沉积物。

2009 年, Ettwig 等^[49]进行 NC10 细菌的 16S rRNA 基因实验时,使用引物对 qP2F/qP2R 进行定量分析; 2011 年, Luesken 等^[57]使用引物对 CMO 182/CMO 568 对部分 *pmoA* 基因进行扩增;2015 年, Zhu 等^[58]选取了我国境内不同环境下的 13 种湿地类型,基于 16S rRNA 和 *pmoA* 基因,通过巢式聚

合酶链反应研究了潜在 N-DAMO 菌的分布,发现在高温、低温、酸性和碱性的环境中,均能检测出 N-DAMO 菌的存在。但不同引物得到的嵌合体 and 错配序列比例显著不同,得到的物种组成也不同^[59]。这表明引物选择是十分重要的,因此需要不断革新检测技术。

生物标志物已与 FISH 实验相结合,成为识别厌氧 CH₄氧化存在的主要证据。Ettwig 等^[60]将 NC10 特异探针 S^{*}-DBACT-0193-a-A-18 及 S^{*}-DBACT-1027-a-A-18、通用古细菌探针 S-D-Arch-0915-a-A-20 和通用细菌探针 EUB I-III 和 V 的混合物杂交后,通过荧光显微镜捕捉到 N-DAMO 菌;赵荣等^[31]将 NC10 特异探针 S^{*}-DBACT-1027-a-A-18 和通用细菌探针 S-D-Bact-0338-a-A-18 杂交,并通过分析得

到了 N-DAMO 菌的影像。因此, 同位素荧光生物标记和基因探针技术在提高和拓宽人们对 CH_4 厌氧氧化程度和 N-DAMO 菌的认识方面发挥了重要作用。

3 N-DAMO 的应用研究

工业和生活产生的高含氮废水进入水体后, 容易导致水体中大量藻类繁殖并释放毒素, 使水体溶解氧降低, 造成水生动植物大量死亡, 严重影响人体健康^[61]。然而, 废水处理系统的运行成本和能源要求很高, 由此产生的气体(N_2O 、 NO 、 CH_4)还是温室气体的重要来源^[62-63]。据计算, 流式厌氧污泥床(Up-Flow Anaerobic Sludge Bed, UASB)反应器的出水仍含有 20 mg/L CH_4 ^[33], 如果从废水中回收厌氧条件下产生的 CH_4 会造成较大的经济负担, 因此可将 CH_4 视作能源进行资源化回收利用。2013 年, Kampman 等^[64]利用低温厌氧处理废水中含有的氮和溶解的 CH_4 , 提出了一种低温厌氧污水处理的新思路(图 6); 2017 年, Xie 等^[65]采用膜生物反应器, 利用 N-DAMO 与 Anammox 集成工艺同步去除 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 与 $\text{NO}_2^- - \text{N}$, 其去除速率分别达 $470 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$ 和 $560 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$, 总氮去除速率达 $1 \text{ kg}/(\text{L} \cdot \text{d})$, 而且

当进水 $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ 比为 1.125–1.32 时, 其脱氮效率接近 100%, 效果显著优于传统工艺; 2021 年, Chang 等^[66]发现添加硫化还原剂可增强 N-DAMO 反应活性, 而且反硝化速率在光照时增加最明显, 同时加入降硫剂和羟基磷灰石, 比对照组(不含添加剂)高 2.38 倍。

污水厂的日处理量非常大, 在进行污水脱氮处理时, 仅仅依靠这些反应器是远远不够的。目前在进行的长期和短期试验中, N-DAMO 菌活性易受环境因子影响^[32]。相较于其他微生物, N-DAMO 菌活性较低, 竞争能力弱, 难以长时间进行污水处理。因此, 如果要将 N-DAMO 菌应用于污水处理厂的脱碳除氮仍需要进行更深入的研究。

4 总结与展望

本文通过对 N-DAMO 的反应和 N-DAMO 菌的生物特性进行了阐述, 主要得到了以下结论:

(1) N-DAMO 反应主要受环境因子(NO_3^- 和 NO_2^- 浓度、 CH_4 分压、含盐量、 O_2 浓度、温度、pH)等因素的共同影响。其中温度、pH 以及盐度对 N-DAMO 过程的反应物影响较大。目前, 国内外研究者对 N-DAMO 的研究主要集中在淡水、湿

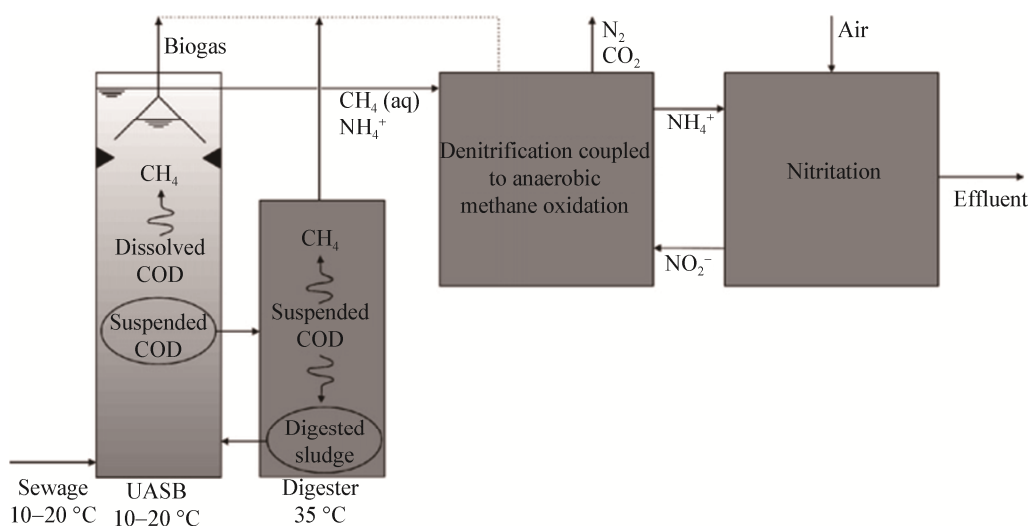


图 6 低温污水处理的新工艺

Figure 6 New concept for sewage treatment at low temperatures

地等自然生态系统,对海洋生态系统 N-DAMO 反应的研究仍受限于 N-DAMO 菌生长因子等因素。同时,N-DAMO 对滨海湿地碳氮循环的贡献及其碳氮耦合作用机制仍需深入研究。

(2) N-DAMO 功能微生物属于革兰氏阴性菌,能够通过内产氧机制解释耦合 NO_2^- 还原的厌氧 CH_4 氧化反应机理,但 N-DAMO 反应中相关酶(NO 歧化酶)尚未分离提纯。

(3) 目前,针对 N-DAMO 进行污水同步脱碳氮利用的有 N-DAMO 与 Anammox 集成工艺以及新发现的添加硫化还原剂等,但受微生物活性影响,该工艺在污水厂的大规模应用仍需进一步的研究。另外,截至目前尚未得到 N-DAMO 功能微生物的纯培养物,限制了 N-DAMO 菌的进一步分离纯化、生理生化研究和工程应用。

(4) 人工湿地作为一项生态污水处理技术,综合利用了动物、植物、微生物的协同净化作用,具有成本低、运行方式灵活、操作简便等优势。人工湿地能较好地维持厌氧状态,提供丰富的 NO_2^- ,基本满足 N-DAMO 菌的生长需求。然而对于 N-DAMO 菌在人工湿地缺氧条件下具体的作用机理并未深入研究,有待后续实验的展开。

综上,探究 N-DAMO 菌的生长因子和 N-DAMO 的反应活性不仅对了解全球变暖、温室气体(CH_4)的减排具有重要意义,也为 N-DAMO 反应耦合其他厌氧生物处理过程应用到污水的除碳脱氮上提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] Myhre G, Shindell D, Bréon F-M, Collins W, Fuglestedt J, Huang JP, Koch D, Lamarque J-F, Lee D, Mendoza B, et al. [A]/Stocker TF, Qin DH, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[M]. Cambridge, Cambridge University Press, 2013: 659-684
- [2] Kotelnikova S. Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface[J]. Earth-Science Reviews, 2002, 58(3/4): 367-395
- [3] Xu XF, Yuan FM, Hanson PJ, Wulfschlegel SD, Thornton PE, Riley WJ, Song X, Graham DE, Song CC, Tian HQ. Reviews and syntheses: four decades of modeling methane cycling in terrestrial ecosystems[J]. Biogeosciences, 2016, 13(12): 3735-3755
- [4] Li H, Dai SQ, Ouyang ZT, Xie X, Guo HQ, Gu CH, Xiao XM, Ge ZM, Peng CH, Zhao B. Multi-scale temporal variation of methane flux and its controls in a subtropical tidal salt marsh in Eastern China[J]. Biogeochemistry, 2018, 137(1/2): 163-179
- [5] Poindexter CM, Baldocchi DD, Matthes JH, Knox SH, Variano EA. The contribution of an overlooked transport process to a wetland's methane emissions[J]. Geophysical Research Letters, 2016, 43(12): 6276-6284
- [6] Li XF, Hou LJ, Liu M. Methane production potential and methanogens community in the sediments of the Yangtze Estuary[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(5): 1682-1690 (in Chinese)
- 李小飞, 侯立军, 刘敏. 长江口沉积物甲烷产生潜力与产甲烷菌群落特征[J]. 环境科学学报, 2019, 39(5): 1682-1690
- [7] Landman W. Climate change 2007: the physical science basis[J]. South African Geographical Journal, 2010, 92(1): 86-87
- [8] Chen QF, Ma JJ, Liu JH, Zhao CS, Liu W. Characteristics of greenhouse gas emission in the Yellow River Delta wetland[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 85: 646-651
- [9] Chen QF, Guo BB, Zhao CS, Xing BX. Characteristics of CH_4 and CO_2 emissions and influence of water and salinity in the Yellow River delta wetland, China[J]. Environmental Pollution, 2018, 239: 289-299
- [10] Lu JY. Carbon footprint and reduction potential of Chinese wastewater treatment sector[D]. Hefei: Master's Thesis of University of Science and Technology of China, 2019 (in Chinese)
- 陆家缘. 中国污水处理行业碳足迹与减排潜力分析[D]. 合肥: 中国科学技术大学硕士学位论文, 2019
- [11] Li JP, Lou JQ, Lv J. The effect of sulfate on nitrite-denitrifying anaerobic methane oxidation (nitrite-DAMO) process[J]. Science of the Total Environment, 2020, 731: 139160
- [12] Raghoebarsing AA, Pol A, Van De Pas-Schoonen KT, Smolders AJP, Ettwig KF, Rijpstra WIC, Schouten S, Damsté JSS, Op Den Camp HJM, Jetten MSM, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. Nature, 2006, 440(7086): 918-921
- [13] Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U, Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating

- anaerobic oxidation of methane[J]. *Nature*, 2000, 407(6804): 623-626
- [14] Islas-Lima S, Thalasso F, Gómez-Hernandez J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification[J]. *Water Research*, 2004, 38(1): 13-16
- [15] Hu BL, Shen LD, Lian X, Zhu Q, Liu S, Huang Q, He ZF, Geng S, Cheng DQ, Lou LP, et al. Evidence for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4495-4500
- [16] Han P, Gu JD. A newly designed degenerate PCR primer based on *pmoA* gene for detection of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria from different ecological niches[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10155-10162
- [17] Kojima H, Tsutsumi M, Ishikawa K, Iwata T, Mußmann M, Fukui M. 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
- [18] Zhang XW, Liu K, Li P, Jiao JJ, Dvornyk V, Gu JD. Molecular existence and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing (N-DAMO) bacteria in the lakes of badain of the Gobi desert[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2019, 36(6): 522-532
- [19] Wang Y, Zhu GB, Harhangi HR, Zhu BL, Jetten MSM, Yin CQ, Op Den Camp HJM. 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
- [20] Luesken FA, Alen TA, Biezen E, Frijters C, Toonen G, Kampman C, Hendrickx TLG, Zeeman G, Temmink H, Strous M, 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
- [21] Shen LD, Zhu Q, Liu S, Du P, Zeng JN, Cheng DQ, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Molecular evidence for nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in the Jiaojiang Estuary of the East Sea (China)[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 5029-5038
- [22] Chen J, Zhou ZC, Gu JD. Complex community of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria in coastal sediments of the Mai Po wetland by PCR amplification of both 16S rRNA and *pmoA* genes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1463-1473
- [23] Lin LA. Enrichment culture of anaerobic ammonium-oxidizing and nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria from mangrove sediments[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2018 (in Chinese)
- 林立安. 红树林湿地厌氧氨氧化(Anammox)和亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化(N-DAMO)微生物的富集培养[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2018
- [24] Chen J, Zhou ZC, Gu JD. Occurrence and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria in the sediments of the South China Sea revealed by amplification of both 16S rRNA and *pmoA* genes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5685-5696
- [25] Yang J, Jiang HC, Wu G, Hou WG, Sun YJ, Lai ZP, Dong HL. Co-occurrence of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing and anaerobic ammonia oxidizing bacteria in two Qinghai-Tibetan saline lakes[J]. *Frontiers of Earth Science*, 2012, 6(4): 383-391
- [26] Shen LD, Liu S, Huang Q, Lian X, He ZF, Geng S, Jin RC, He YF, Lou LP, Xu XY, et al. Evidence for the cooccurrence of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane oxidation processes in a flooded paddy field[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7611-7619
- [27] Shen LD, Hu BL, Liu S, Chai XP, He ZF, Ren HX, Liu Y, Geng S, Wang W, Tang JL, et al. Anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction can be a potential methane sink in coastal environments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 7171-7180
- [28] Shen LD, Huang Q, He ZF, Lian X, Liu S, He YF, Lou LP, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Vertical distribution of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in natural freshwater wetland soils[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 349-357
- [29] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, De Beer D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548
- [30] Chan OC, Claus P, Casper P, Ulrich A, Lueders T, Conrad R. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1139-1149
- [31] Zhao R, Zhu L, Wu Q, Chang JL, Shao LG, Liang P, Huang X. Effect of environmental factors on nitrite-dependent denitrifying anaerobic methane oxidation[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(1): 178-184 (in Chinese)
- 赵荣, 朱雷, 吴箐, 常佳丽, 邵林广, 梁鹏, 黄霞. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化过程影响因素研究[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(1): 178-184
- [32] He ZF. Culture condition optimization and ecological function of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
- 何崧飞. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化细菌培养条件优化及

其生态功能[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2016

- [33] Kampman C, Temmink H, Hendrickx TLG, Zeeman G, Buisman CJN. 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
- [34] Hu SH, Zeng RJ, Burow LC, Lant P, Keller J, Yuan ZG. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 377-384
- [35] He ZF, Geng S, Shen LD, Lou LP, Zheng P, Xu XH, Hu BL. The short- and long-term effects of environmental conditions on anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction[J]. *Water Research*, 2015, 68: 554-562
- [36] Hu Z, Ma R. Distribution and characteristic of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria by comparative analysis of wastewater treatment plants and agriculture fields in Northern China[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2766
- [37] Zhou LL, Wang Y, Long XE, Guo JH, Zhu GB. High abundance and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in a paddy field profile[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 360(1): 33-41
- [38] Geng S. Enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria and medium optimization[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2015 (in Chinese)
耿莎. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌富集培养及优化研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2015
- [39] Ghosh A, Ghosh Dastidar M, Sreekrishnan TR. Recent advances in bioremediation of heavy metals and metal complex dyes: review[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2016. DOI:10.1061/(asce)ee.1943-7870.0000965
- [40] Zhu BL, Van Dijk G, Fritz C, Smolders AJP, Pol A, Jetten MSM, Ettwig KF. Anaerobic oxidation of methane in a minerotrophic peatland: Enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8657-8665
- [41] Reeburgh WS. Oceanic methane biogeochemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2): 486-513
- [42] Thauer RK, Shima S. Methane and microbes[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 878-879
- [43] Meng WQ, Wu ZL, Wang ZL. Control factors and critical conditions between carbon sinking and sourcing of wetland ecosystem[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(Z2): 1359-1366 (in Chinese)
孟伟庆, 吴绽蕾, 王中良. 湿地生态系统碳汇与碳源过程的控制因子和临界条件[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(Z2): 1359-1366
- [44] Humbert S, Zopfi J, Tarnawski SE. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(5): 484-490
- [45] Li JY, Chen QF, Li Q, Zhao CS, Feng Y. Influence of plants and environmental variables on the diversity of soil microbial communities in the Yellow River Delta Wetland, China[J]. *Chemosphere*, 2021, 274: 129967
- [46] Chen SM, Wang N, Qin YF, Zhang HY. Study on spatial variability of SOM in estuary wetland, southeast China based on characteristic variables and SVRK[J]. *Soils*, 2020, 52(6): 1298-1305 (in Chinese)
陈思明, 王宁, 秦艳芳, 张红月. 基于特征变量与支持向量机回归克里格(SVRK)法的湿地土壤有机质空间变异特征分析[J]. *土壤*, 2020, 52(6): 1298-1305
- [47] Long Y, Jiang XJ, Guo QW, Li BX, Xie SG. Sediment nitrite-dependent methane-oxidizing microorganisms temporally and spatially shift in the Dongjiang River[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(1): 401-410
- [48] Shen LD, Wu HS, Gao ZQ. Distribution and environmental significance of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in natural ecosystems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 133-142
- [49] Ettwig KF, Van Alen T, Van De Pas-Schoonen KT, Jetten MSM, Strous M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662
- [50] He ZF, Cai C, Shen LD, Lou LP, Zheng P, Xu XH, Hu BL. Effect of inoculum sources on the enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 939-946
- [51] Wu ML, Van Teeseling MCF, Willems MJR, Van Donselaar EG, Klingl A, Rachel R, Geerts WJC, Jetten MSM, Strous M, Van Niftrik L. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph "*Candidatus* Methyloirabilis oxyfera", a novel polygon-shaped bacterium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 284-291
- [52] Kool DM, Zhu BL, Rijpstra WIC, Jetten MSM, Ettwig KF, Sinninghe Damsté JS. Rare branched fatty acids characterize the lipid composition of the intra-aerobic methane oxidizer "*Candidatus* Methyloirabilis oxyfera"[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8650-8656
- [53] Wu ML, Ettwig KF, Jetten MSM, Strous M, Keltjens JT, Van Niftrik L. A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium *Candidatus* 'Methyloirabilis oxyfera'[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(1): 243-248
- [54] Hua ML. Research on the optimization and influencing factors of enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2019 (in Chinese)
华森莲. 亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化细菌富集培养优化及

- 影响因素研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2019
- [55] He ZF, Geng S, Pan YW, Cai CY, Wang JQ, Wang LQ, Liu S, Zheng P, Xu XH, Hu BL. Improvement of the trace metal composition of medium for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria: iron (II) and copper (II) make a difference[J]. *Water Research*, 2015, 85: 235-243
- [56] Hu BL, He ZF, Geng S, Cai C, Lou LP, Zheng P, Xu XH. Cultivation of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria: impact of reactor configuration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(18): 7983-7991
- [57] Luesken FA, Zhu BL, Van Alen TA, Butler MK, Diaz MR, Song B, Op Den Camp HJM, Jetten MSM, Ettwig KF. pmoA primers for detection of anaerobic methanotrophs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3877-3880
- [58] Zhu GB, Zhou LL, Wang Y, Wang SY, Guo JH, Long XE, Sun XB, Jiang B, Hou QY, Jetten MSM, et al. Biogeographical distribution of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria in Chinese wetland ecosystems[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1): 128-138
- [59] Li SZ, Deng Y, Wang ZJ, Zhang ZJ, Kong X, Zhou WJ, Yi YY, Qu YY. Exploring the accuracy of amplicon-based internal transcribed spacer markers for a fungal community[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 170-184
- [60] Ettwig KF, Shima S, Van De Pas-Schoonen KT, Kahnt J, Medema MH, Op Den Camp HJM, Jetten MSM, Strous M. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3164-3173
- [61] Xia F, Ren LF. Application of novel improved anammox process in the treatment of ammonium-rich wastewater[J]. *Technology of Water Treatment*, 2020, 46(9): 19-23 (in Chinese)
- 夏凡, 任龙飞. 新型厌氧氨氧化工艺在高含氮废水处理中的应用[J]. *水处理技术*, 2020, 46(9): 19-23
- [62] Daelman MRJ, Van Voorthuizen EM, Van Dongen LGJM, Volcke EIP, Van Loosdrecht MCM. Methane and nitrous oxide emissions from municipal wastewater treatment: results from a long-term study[J]. *Water Science and Technology*, 2013, 67(10): 2350-2355
- [63] Delre A, Mønster J, Scheut C. Greenhouse gas emission quantification from wastewater treatment plants, using a tracer gas dispersion method[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 605/606: 258-268
- [64] Kampman C, Hendrickx TLG, Luesken FA, Van Alen TA, Op Den Camp HJM, Jetten MSM, Zeeman G, Buisman CJN, Temmink H. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 227/228: 164-171
- [65] Xie GJ, Cai C, Hu SH, Yuan ZG. Complete nitrogen removal from synthetic anaerobic sludge digestion liquor through integrating anammox and denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(2): 819-827
- [66] Chang JL, Wu Q, Liang P, Huang X. Enhancement of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation via *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 766: 144230