



专论与综述

基于甲烷氧化菌的脱氮技术研究进展

杨娅男 李彦澄* 李江 吴攀 吕杨

贵州大学资源与环境工程学院 贵州 贵阳 550025

摘要: 甲烷氧化菌利用甲烷作为唯一碳源和能源, 在氧化甲烷的过程中能有效地实现脱氮, 该过程分为好氧甲烷氧化耦合反硝化(aerobic methane oxidation coupled to denitrification, AME-D)和厌氧甲烷氧化耦合反硝化(anaerobic methane oxidation coupled to denitrification, ANME-D), 在碳循环和氮循环的研究中具有重要意义。本文通过总结近年来有关甲烷氧化菌的分类与分布, 阐述 AME-D 和 ANME-D 的基本原理、影响因素和应用情况, 提出相应的研究方向, 以期对甲烷氧化菌在污水脱氮中的应用提供参考。

关键词: 甲烷氧化菌, 好氧甲烷氧化耦合反硝化, 厌氧甲烷氧化耦合反硝化, 脱氮

Advances of methanotrophs-based denitrification technology researches

YANG Ya-Nan LI Yan-Cheng* LI Jiang WU Pan LV Yang

College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: Methanotrophs can use methane as the only carbon source and energy source to effectively remove nitrogen in the oxidation, which can be divided into aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) and anaerobic methane oxidation coupled to denitrification (ANME-D), and thus, they are of vital significance in the researches of carbon and nitrogen cycles. In this paper, after summarizing the classification and distribution of methanotrophs in recent years, the basic principles, influencing factors and application of AME-D and ANME-D are then expounded, and in the end, the related future trend is analyzed and proposed, in an attempt to make a slightest contribution to the studies of methanotrophs-based applications in wastewater denitrification.

Keywords: Methanotrophs, AME-D, ANME-D, Denitrification

城市工业的加速发展导致城镇污水排放量日益增大, 污水经过传统工艺处理后出水中仍含有大量的氮污染物, 过量氮的排放会引起水体富营养化, 破坏生态环境。传统污水处理工艺出水碳氮比

(C/N)比较低, 无法满足异养反硝化脱氮所需的碳源, 从而排放无法达标, 需采用外加碳源的方式, 常用的碳源有甲醇、葡萄糖和乙酸钠等^[1], 外加碳源会导致处理成本高、经济效益差和资源浪费等问

Foundation items: Science and Technology Plan Project of Guizhou Province ([2019] 3009); National Key Research and Development Program of China (2016YFC0400702-4)

*Corresponding author: E-mail: ycli3@gzu.edu.cn

Received: 11-08-2019; **Accepted:** 21-10-2019; **Published online:** 24-10-2019

基金项目: 贵州省科技计划(黔科合重大专项字[2019]3009); 国家重点研发计划(2016YFC0400702-4)

*通信作者: E-mail: ycli3@gzu.edu.cn

收稿日期: 2019-08-11; **接受日期:** 2019-10-21; **网络首发日期:** 2019-10-24

题,当进水水质波动时,容易造成碳源投加不准确,进而影响出水水质的现象。

甲烷的结构稳定,在自然界中分布广,温室效应是 CO₂ 的 25 倍^[2],污水处理的厌氧段、污泥消化、湖泊和自然湿地等会产生大量甲烷气体,若管理得当,可被认为是一种有价值的燃料和潜在的能源或碳源。甲烷氧化菌^[3]是一种独特的革兰氏阴性菌,能利用甲烷作为唯一的碳源和能源物质,在碳循环和氮循环中起重要作用。甲烷氧化菌广泛地分布于自然环境中,包括好氧和厌氧环境,比如污水处理厂污泥^[4]、煤矿坑^[5]、土壤^[6]、深海沉积物^[7]和垃圾填埋场土壤^[8]等。大部分已知的甲烷氧化菌的生长环境 pH 为 5.0–8.0,温度为 20–30 °C,同时也存在耐低温(<15 °C)、耐热(>40 °C)、耐酸性(<5.0)、耐碱性(>9.0)的甲烷氧化菌^[9]。研究发现甲烷氧化菌在氧化甲烷的过程中能有效实现氮污染物的去除,该过程分别为好氧甲烷氧化耦合反硝化(aerobic methane oxidation coupled to denitrification, AME-D)^[1]和厌氧甲烷氧化耦合反硝化(anaerobic methane oxidation coupled to denitrification, ANME-D)^[2]。本文重要介绍 AME-D 和 ANME-D 两种脱氮技术、影响因素和应用情况,提出相应的研究方向,以期对甲烷氧化菌在污水脱氮中的应用提供参考价值。

1 甲烷氧化菌

甲烷的氧化过程最早被 Kaserer 发现于 1905 年^[10],随后 1906 年 Sohngen 分离出第一株甲烷氧化菌 *Pseudomonas (Bacillus) methanica*^[11],直到 20 世纪 70 年代,Whittenbury 等分离鉴定出近百种甲烷氧化菌^[12],形成了甲烷氧化菌分类学的基本框架。Malashenko^[13]和 Trotsenko^[14]分别于 1976 年补充了部分甲烷氧化菌,后来, Bowman 等在 1993 年对甲烷氧化菌的分类进行了修正^[15],并于 1995 年进一步明确了甲基球菌科(*Methylococcaceae*)的分类学位置^[16]。截至目前,不断有学者发现新的甲烷氧化菌,如 Dedysh 等^[17]于 2005 年分离培养出第一株兼性甲烷氧化菌 *Methylocella silvestris*

BL2。Pol 等^[18]于 2007 年分离出一株能在 pH<1.0 的条件下生存的甲烷氧化菌 *Acidimethylosilex fumarolicum* SolV。Islam 等^[19]于 2008 年在 55 °C 和 pH 3.5 的条件下获得一株耐热耐酸的甲烷氧化菌 *Methyloacida kamchatkensis* Kam1。Vorobev 等^[20]于 2011 年在 pH<4.0 的环境中分离出了 3 株类似属于 *Methylocella* 的甲烷氧化菌 AR4 T、SOP9 和 LAY,它们均只产生可溶性甲烷单加氧酶(soluble methane monooxygenase, sMMO)。Kits 等^[21]于 2015 年发现了具有脱氮功能的属于 *Methylomonas denitrificans* 的甲烷氧化菌 FJG1。

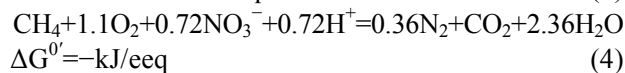
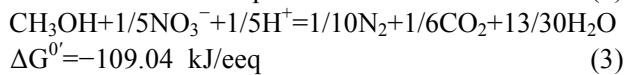
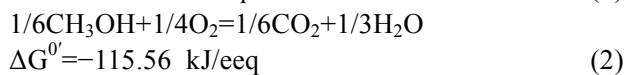
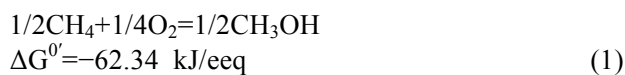
随着新的甲烷氧化菌的不断发现,其数量和种类也在不断地增加。根据氧气是否作为电子受体,将甲烷氧化菌分为好氧菌和厌氧菌。根据微生物的代谢方式、细胞形态、胞质内膜构造、休眠阶段的类型和生理特征等,将好氧甲烷氧化菌(aerobic methane oxidation, AME)分为 3 类^[22]: Group I (*Gammaproteobacteria*)、Group II (*Alphaproteobacteria*)和 Group III (*Verrucomicrobia*)。厌氧甲烷氧化菌仅隶属于 NC10 门。目前厌氧甲烷氧化古菌(ANME)分为 3 类^[23]: ANME-1、ANME-2 和 ANME-3。ANME-2 又可以分为 ANME-2a、ANME-2b、ANME-2c 和 ANME-2d 这 4 类^[24]。

甲烷氧化菌在氧化甲烷的同时能有效脱氮,并能实现甲烷的资源化利用,减少对环境的污染。甲烷氧化菌脱氮分为 AME-D^[1]和 ANME-D^[2]。甲烷氧化菌利用甲烷单加氧酶(methane monooxygenase, MMO)催化甲烷转化为甲醇,再被甲醇脱氢酶氧化生成甲醛,最后该菌通过丝氨酸途径、核酮糖单磷酸途径或 CBB 循环(calvin-benson-bassham cycle)将甲醛转化为细胞物质,这一系列的中间代谢产物被反硝化菌利用进行脱氮^[25]。该反应中的关键酶 MMO 分为两种:存在于细胞质中的 sMMO 和存在于细胞膜中的颗粒型甲烷单加氧酶(particulate methane monooxygenase, pMMO)。

2 好氧甲烷氧化耦合反硝化(AME-D)

2.1 AME-D 基本原理

好氧甲烷氧化菌最早在 1906 年被发现^[11], 20 世纪 70 年代, Harremoes 等为了使污水厂污泥厌氧发酵产生的沼气和垃圾填埋场产生的填埋气有效利用, 将甲烷作为反硝化的气体碳源应用到污水处理中, 首次发现了 AME-D 的现象^[26]。之后甲烷作为反硝化碳源的潜力被不断发现。但是, 截至目前, 由于微生物群落的生理和分类学的复杂性, AME-D 的机制仍然是模糊的。根据热力学定律, AME-D 的化学方程式可以表述为^[1]:



目前, 对 AME-D 过程有两种解释: 一是 AME 和反硝化菌的协同代谢作用脱氮^[27]; 另一种是 AME 单独完成甲烷氧化和部分反硝化作用, 最终产物为氮气^[28]。

(1) 协同脱氮: 大多数 AME-D 过程被认为是 AME 与反硝化菌协同作用的结果。AME 氧化甲烷会产生中间产物, 如甲醇、乙酸盐、柠檬酸盐等, 反硝化菌能够利用 AME 释放的可溶性有机中间产物作为电子供体来去除 NO_3^- 或 NO_2^- 。Rhee 等于 1978 年^[29]分离得到一株 *Methylomona* 属的好氧甲烷氧化菌和一株非甲基营养型的反硝化菌, 并且这两株菌之间的重要中间产物为柠檬酸盐, 首次证实好氧条件下甲烷氧化菌和反硝化菌协同作用完成脱氮。在另一项研究中, Mechsner 等^[30]在甲烷和氧气存在的条件下, 混合培养了一株 I 型好氧甲烷氧化菌 *Methylococcus capsulatus* 和一株甲醇型反硝化菌, 观察到低水平的甲醇产生、 NO_3^- 的消耗和 N_2 的积累, 表明反硝化菌与好氧甲烷氧化菌通过中间产物甲醇发生协同作用。李彦澄等^[31]通过高通

量测序得到系统中起主要作用的甲烷氧化菌 *Methylocaldum* 和反硝化菌 *Denitratisoma*、*Hydrogenophaga* 协同脱氮。

(2) AME 单独脱氮: 通过基因组测序和转录分析技术, 获得了更多 AME 存在部分反硝化潜能的基因组证据, 相关研究发现, AME 中存在 *nirS*、*nirK*、*norB* 等能参与脱氮过程的基因, 但至今没有发现一株具有全部反硝化功能基因的 AME^[27-28]。由于 AME 体内的反硝化功能基因广泛分布, 其在高硝态氮或亚硝态氮的环境中具有生存优势^[28]。Kits 等研究发现^[21], 在 NO_3^- 作为电子受体的低氧条件下培养细菌时, 脱氮基因(*narG*、*nirK*、*norB* 和 *norC*)的转录水平在脱氮甲基杆菌 FJG1 中显著升高, 因此, 观察到细菌将 NO_3^- 还原与甲烷氧化偶联并产生 N_2O 终产物。此外, NO_3^- 还原也可以通过好氧甲烷氧化菌与一个或两个反硝化基因的协同进行, 在德国 Dagow 湖的底泥中也观察到好氧甲烷氧化菌之间可能存在协同硝酸盐呼吸的脱氮作用^[27]。

2.2 AME-D 影响因素

研究表明 AME-D 工艺的关键在于影响因素的控制, 包括温度、pH、甲烷浓度、溶解氧(dissolved oxygen, DO)和 Cu^{2+} 浓度等, 其中, DO 和 Cu^{2+} 浓度是主要的影响因素。

(1) DO: DO 是最重要的影响因素, 当停止供应氧气时, 好氧甲烷氧化菌无法氧化甲烷, 从而未能释放出作为反硝化电子供体的中间产物, 反硝化作用就会终止^[32]。Thalasso 等^[32] (1997)证实了 AME-D 过程对氧气的需求, 随着氧分压增大, 硝酸盐的去除率逐渐增加, 当氧分压达到 46 mbar 左右后, 硝酸盐的去除率呈下降趋势; 然而当分压达 166 mbar 时, 硝酸盐的去除率上升并达到最大值。相比于较高的氧分压, 较低氧分压下总氮的去除是通过反硝化作用而不是同化作用进行的, 这表明低氧分压时甲烷的有效利用率高。除了氧分压的研究, Modin 等^[33]采用不同供氧方式对开发的 3 种 MBfR 结构进行实验, 结果表明, 随着 DO 的增加,

反硝化速率会降低。相反地,刘晶静^[34]以渗滤液沉积物为接种物,在微好氧条件下利用血清瓶批次试验进行富集培养,反应器配水 DO 升高会促进反硝化速率提高,这一现象可能是由于污泥中存在好氧反硝化微生物。同样的微氧条件下,周祥玉等^[43]以污水处理厂厌氧污泥为接种物,进行以 AME-D 过程为主的 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 还原, NO_3^- 和 NO_2^- 的去除率分别为 3.69 mg/(L·d) 和 18.04 mg/(L·d) (以 N 计),但反硝化去除率较低。马若潺等^[35]对低氧环境中好氧甲烷氧化菌的甲烷氧化活性和种群结构等进行了综述,氧浓度不仅影响其活性和种群结构,不同 DO 浓度下有不同的代谢途径。

(2) Cu^{2+} : Cu^{2+} 也是影响 AME-D 的一个因素, Cu^{2+} 浓度影响好氧甲烷氧化菌中存在的 2 种 MMO, 即 sMMO 和 pMMO 的表达。 Cu^{2+} 浓度高时 (>2.5 $\mu\text{mol/g}$) pMMO 得到表达,反之,低 Cu^{2+} 浓度时 sMMO 被表达^[36]; Graham 等^[37]发现 Cu^{2+} 浓度会影响培养物中甲烷氧化菌菌群的种类,从而产生不同的甲烷氧化活性。van Der Ha 等^[38]试验得到适量 Cu^{2+} (0.64 mg/L) 的添加可以促进 pMMO 的表达,提高甲烷氧化的活性,从而促进反硝化脱氮。

邓永翠等^[39]综述了不同自然湿地中好氧甲烷氧化菌的生理生态特征和群落多样性,并对未来甲烷氧化菌的发展进行了展望。在此基础上,宋现晖等^[40]在冬季利用序批式深床人工湿地进行试验,得到温度对脱氮的影响,在 8–10 °C 条件下 2 级序批式深床人工湿地系统总氮(total nitrogen, TN)去除率达到 78.7%。沈炫旭^[41]取不同湿地基质通过反应器模拟富集培养, DO、温度和有机质含量都会对湿地氮的去除产生影响。

2.3 AME-D 应用情况

Thalasso 等^[32]于 1997 年采用 AME-D 工艺,在间歇反应器中获得了 0.6 g NO_3^- -N/(VSS·d) 的明显 NO_3^- 去除率。反硝化脱氮量占废水中 NO_3^- 总脱氮量的 5%–75%。Rajapakse 等^[42]利用气水逆流生物滤池进行试验,进水硝氮浓度控制在 7–10 mg NO_3^- -N/L 时,反硝化率为 91.2%,获得了

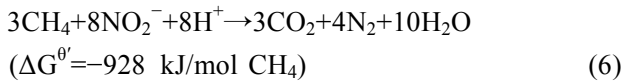
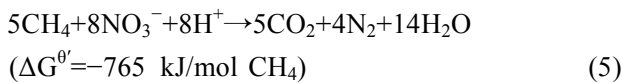
良好的反硝化效果。在地下水存在间接反硝化作用(甲烷和氧气同时存在)。其他研究人员也得到了类似的结果。这些研究都是在传统的活性污泥系统基础上,直接供应甲烷和氧气进行的^[43]。上述试验甲烷和空气都以曝气的形式向液相中逸出,为了使甲烷得到充分的利用, Waki 等^[44]使用一种分割式的生物反应器,用挡板将 CH_4 和 O_2 的进气端和出气端分开,使 CH_4 和 O_2 在气相中分隔而在液相中混合, CH_4 的出气端可回收较高纯度的甲烷气,可进行燃烧或发电等再利用。较新的发现是利用膜生物反应器(membrane biofilm reactor, MBfR),通过膜腔直接提供气体底物(如 CH_4 、 O_2),提高微生物之间的传质效率,以去除废水中的化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、总氮和其他污染物。Modin 等^[33]报道了该体系中较低的 C/N 比为 2.8–4.0,并且 Sun 等^[45]取得了较高反硝化效率,反硝化率稳定达到 97%,最大硝酸盐去除率在 1.55–1.78 mg/(g·d)。李彦澄等^[31]采用气体循环序批式生物膜反应器(gas circulation sequencing bath biofilm reactor, gcSBBR)构建 AME-D 系统,在氮负荷为 0.075 kg/($\text{m}^3\cdot\text{d}$) 时,反硝化速率为 74.25 mg/(L·d),其中硝酸盐去除率达到 98.93%。

3 厌氧甲烷氧化耦合反硝化(ANME-D)

3.1 ANME-D 基本原理

厌氧甲烷氧化菌的细胞倍增时间长,生长缓慢。目前发现唯一能够利用甲烷为电子供体、以硝酸盐为电子受体进行厌氧甲烷氧化的古菌^[2]是归属于 ANME-2d 的 *Candidatus Methanoperedens nitroreducens*。已知的厌氧甲烷氧化过程根据其不同电子受体类型主要分为 3 种:(1) 硫酸盐型(sulphate-dependent anaerobic methane oxidation, SAMO)^[46];(2) 硝酸盐型或亚硝酸盐型(denitrification dependent anaerobic methane oxidation, DAMO);(3) 铁、锰依赖型^[47]。隶属于 ANME-D 过程的为硝酸盐型或亚硝酸盐型。根据热力学定律,ANME-D 的化学方程式可以表述

为^[48]:



Islas-Lima 等^[49]首次在实验室条件下证实了 ANME-D 过程的存在, 但缺乏分析反应器中微生物菌群的研究, 缺少数据和机理研究的支撑。直到 21 世纪, Raghoebarsing 等^[50]首次证实了 ANME-D 的存在, 利用序批式反应器, 以淡水沟渠污泥为接种物, 经过 16 个月的培养成功获得了厌氧甲烷氧化 (denitrification dependent anaerobic methane oxidation, DAMO) 细菌, 将该过程命名为亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化 (N-DAMO), 并推测该反应是通过 ANME 古菌逆向产甲烷, 以甲烷为电子供体转移给反硝化菌还原硝酸盐或亚硝酸盐, 实现碳氮同步去除。但随着之后的深入研究发现, Ettwig 等^[23]通过在 DAMO 微生物富集实验中加入一种产甲烷菌抑制剂(溴乙基磺酸钠), 古菌数量逐渐减少, 证实 ANME-D 是一种生化机制进行的, 不是逆向产甲烷的作用, 也不需要古菌的配合物, 进一步确定是由一种 NC10 门细菌 *M. oxyfera* 独立完成的以 NO_2^- 为电子受体的 ANME-D 过程, 并解释了 DAMO 微生物的代谢过程。

3.2 ANME-D 影响因素

在 ANME-D 工艺中, 温度、甲烷、电子受体和氧气等影响因素会对该工艺产生很大的影响。

(1) 温度。Raghoebarsing 等^[50]首次富集培养在 25 °C 下发现了 DAMO 古菌, 但其比例只占 10%; 深入研究发现当温度从 25 °C 升到 30 °C 时, DAMO 古菌消失。然而, Hu 等^[24]对混合物富集培养, 研究 22、35、45 °C 温度对 ANME-D 的影响, 发现 22 °C 时仅存在 DAMO 细菌, 35 °C 时同时发现了 DAMO 细菌和 DAMO 古菌, 而 45 °C 时无 DAMO 微生物存在; 22 °C 和 35 °C 的两组反应器在培养 350 d 后反硝化效率为 0.11 mmol/(L·d) 和 2.0 mmol/(L·d)。因此, 温度对 ANME-D 过程及

DAMO 微生物富集是一个复杂的因素, 还有待更深入的探究。

(2) 电子受体。硝酸盐(NO_3^-)和亚硝酸盐(NO_2^-)都是 ANME-D 过程中的电子受体, 但研究发现 NO_2^- 更适合做 ANME-D 的电子受体。Hu 等^[24]总结了成功富集 DAMO 微生物的研究并分析了其组成与基质类型有关, 研究发现 NO_2^- 和 NO_3^- 作为电子受体条件下, 以 NO_2^- 为基质的富集培养物中古菌数量逐渐减少, 100 d 后直接消失, 最后仅存在 *M. oxyfera* 细菌, 而以 NO_3^- 为基质的富集培养物中仍存在细菌和古菌, 这表明 DAMO 微生物对不同电子受体有选择性, 这也印证了 Raghoebarsing 等^[50]研究认为 NO_2^- 是更优于 NO_3^- 的电子受体, 推测古菌只起到将 NO_3^- 转化为 NO_2^- 的作用, 而细菌则以 NO_2^- 为电子受体进行 ANME-D。而 Yarbrough 等^[51]研究发现 NO_2^- 对一般微生物生长具有一定的抑制作用, 过高的 NO_2^- 浓度会对细菌的生长有一定的抑制作用, 因此推测古菌可能需要细菌去除 NO_3^- 以避免 NO_2^- 对其自身生长的毒性, NO_2^- 更适应于 *M. oxyfera* 细菌生长, 还有待进一步研究证实^[24]。在此基础上, 何焜飞等^[52]利用 Monod 方程研究得到存在一个最佳的 NO_2^- 初始浓度 (1.92 mmol/L), 浓度过低会抑制 DAMO 微生物生长, 过高则会对细菌产生毒性。楼菊青等^[53]利用不同接种物进行 DAMO 微生物的富集培养, 探究接种物对微生物的影响, 研究得到 NO_3^- 对 DAMO 古菌具有重要的作用, 而 NO_2^- 对 DAMO 细菌富集有较大的影响。柴风光等^[54]研究 NO_3^- 和 NO_2^- 对富集产物的影响, 以 NO_2^- 为电子受体时得到的富集产物只有 N-DAMO 古菌, 而以 NO_3^- 为电子受体时其富集产物则由 N-DAMO 细菌和古菌共同组成。

(3) CH_4 。CH₄ 作为 DAMO 唯一的碳源和能源^[23], 决定了 ANME-D 脱氮效率和其功能微生物的活性, 但 CH₄ 在水中溶解度很低。何焜飞等^[52]发现了 CH₄ 分压和搅拌速率会影响 CH₄ 在水中的溶解度, 即 CH₄ 在水中的传质效率。赵荣等^[55]富集培养 N-DAMO 微生物, 研究 CH₄ 分压对 N-DAMO

过程脱氮速率的影响,结果表明,当 CH_4 分压在 0–98 kPa 内, N-DAMO 脱氮速率与 CH_4 成正比;在 0–49 kPa 范围内,脱氮速率增长较快;但在 49–98 kPa 范围内时,脱氮速率增长减缓。

(4) O_2 。Ettwig 等^[23]研究表明 DAMO 代谢过程中会进行“胞内产氧”,从而氧化甲烷。Luesken 等^[56]探究了 O_2 对 *M. oxyfera* 细菌的影响,研究发现外界的 O_2 会对 DAMO 过程有抑制作用,在 2% 和 8% O_2 占比的环境中, CH_4 和 NO_2^- 的转化率下降,且 NO_2^- 去除率为厌氧条件下的 43% 和 19%。之后研究发现在夏季时,比利时 Dendrestone 湖水体中 DO 浓度较低, DAMO 会占据主导地位,且途径都以 DAMO 为主^[57]。

3.3 ANME-D 应用情况

Wu 等^[58]利用免疫荧光定位技术对 *M. oxyfera* 细菌的甲烷氧化机理进行研究,发现甲烷氧化过程中 *M. oxyfera* 细菌里同时存在关键酶 pMMO 和 NO_2^- 还原酶(NirS),进一步证实 *M. oxyfera* 细菌单独完成了 DAMO 过程,但催化 NO 生成 N_2 和 O_2 过程的歧化酶至今未找到。许多研究者经过一系列的试验后,发现在不同的环境中均能检测到 DAMO 微生物的存在,例如污水处理厂污泥^[59]、泥炭地土壤^[60]、农田水稻土壤^[61]、淡水湖泊沉积物^[62]、淡水河道沉积物^[63]等。近年来,为了将 ANME-D 应用到实际工程中,研究人员设计了不同类型的人工反应器,通过单独接种或混合接种上述沉积物进行长时间的富集培养,获得 DAMO 产物后进行废水脱氮实验,目前成功的培养富集方式有 DAMO 细菌、DAMO 细菌与古菌混合、DAMO 与厌氧氨氧化微生物(anammox)混合^[49,59,64–66]。Kampman 等^[67]利用污水厂活性污泥在 MBR 反应器中 20 °C 条件下富集培养 DAMO 细菌 200–300 d 后,污水脱氮效率为 36 mg/(L·d)。Bhattacharjee 等^[68]在 SBR 反应器中 35 °C 条件下利用河道沉积物富集培养 DAMO 细菌 100 d 后,脱氮效率为 40.3 mg/(L·d)。考虑到实际污水中存在 NH_4^+ , Shi

等^[65]提出利用 DAMO 和 anammox 功能菌共同作用脱氮。Ding 等^[69]利用 MBR 反应器接种河道沉积物富集培养 100–200 d (32–37 °C)后得到 DAMO-anammox 联合富集微生物并且脱氮效率为 174 mg/(L·d)。Cai 等^[70]建立微孔膜曝气膜反应器(membrane biofilm reactor, MBfR),联合富集了 DAMO 功能菌和 anammox 细菌,不断增加 NO_3^- 和 NH_4^+ 负荷,反应 453 d 后硝酸盐去除率达到了 684 ± 10 mg-N/(L·d),为迄今为止关于 DAMO 反应器报道中最高硝酸盐去除率。Xie 等^[71]利用膜生物反应器对厌氧污泥消化液进行 DAMO 和 anammox 工艺处理, NO_2^- 和氨氮实现同时去除,去除率分别为 560 mg/(L·d)和 470 mg/(L·d)。TN 去除率达 1 kg/(L·d)。

4 结语与展望

甲烷氧化菌能利用甲烷为碳源和能源,并能实现甲烷氧化和反硝化的耦合,是一种具有脱氮应用潜力的微生物,尤其针对低 C/N 的含氮污水。本文总结了近年来有关甲烷氧化菌的分类与分布,并阐述了 AME-D 和 ANME-D 的基本原理、影响因素和应用情况。然而这两种类型并未实现工程化应用,在 AME-D 过程中存在甲烷传质效率、微生物生长速率和反应器类型等问题突出,而在 ANME-D 过程中存在 DAMO 功能菌富集时间长、生长速度慢和作用机理不明等问题。为了明确 AME-D 和 ANME-D 的作用机理和促进 AME-D 和 ANME-D 的应用,可从以下几方面进行深入研究:(1) 针对多种自然环境下的 ANME-D 微生物的高精度原位观测,明确 ANME-D 微生物的多样性分布,为实验研究合理选择接种污泥提供依据;(2) 进一步开展 AME-D 和 ANME-D 过程中的不同影响因素研究,确定高效脱氮的控制参数,为其实际应用提供参考;(3) 结合现有分子生物学技术和蛋白质分析技术,明确 AME-D 和 ANME-D 的作用机理;(4) 结合理论研究开发经济可行的工程解决方案,提高该技术应用的可行性。

REFERENCES

- [1] Zhu J, Wang Q, Yuan MD, et al. Microbiology and potential applications of aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) process: a review[J]. *Water Research*, 2016, 90: 203-215
- [2] Haroon MF, Hu SH, Shi Y, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 567-570
- [3] Naqvi SWA, Lam P, Narvenkar G, et al. Methane stimulates massive nitrogen loss from freshwater reservoirs in India[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1265
- [4] Ho A, Vlaeminck SE, Ettwig KF, et al. Revisiting methanotrophic communities in sewage treatment plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(8): 2841-2846
- [5] Han B, Chen Y, Abell G, et al. Diversity and activity of Methanotrophs in alkaline soil from a Chinese coal mine[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 196-207
- [6] Belkhef S, Labadie K, Cruaud C, et al. Complete genome sequence of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* TK 0001 isolated from soil in Poland[J]. *Genome Announcements*, 2018, 6(8): e00018-18
- [7] Ruff SE, Felden J, Gruber-Vodicka HR, et al. *In situ* development of a methanotrophic microbiome in deep-sea sediments[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(1): 197-213
- [8] Wise MG, McArthur JV, Shimkets LJ. Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 4887-4897
- [9] Stanley SH, Prior SD, Leak DJ, et al. Copper stress underlies the fundamental change in intracellular location of methane mono-oxygenase in methane-oxidizing organisms: studies in batch and continuous cultures[J]. *Biotechnology Letters*, 1983, 5(7): 487-492
- [10] Kaserer H. Über die oxydation des wasserstoffes und des methane durch mikroorganismen[J]. *Zentrabl Landw Versuchsw in Osterreich*, 1905, 8: 789-792
- [11] Sohngen NL. Über bakterien welche methan ab kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen[J]. *Zentrabl Bakteriol Parazitenk (Infektionster)*, 1906, 15: 513-517
- [12] Whittenbury R, Phillips K C, Wilkinson J F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria[J]. *Journal of General Microbiology*, 1970, 61(2): 205-218
- [13] Malashenko, Yu R. Isolation and characterization of new species (thermophilic and thermotolerant ones) of methane-utilizers[A]//Schlegel HG, Gottschalk G, Pfennig N. Symposium on Microbial Production and Utilization of Gases (H₂, CH₄, CO)[M]. Göttingen: Akademie der Wissenschaften, 1976: 293-300
- [14] Trotsenko YA. Isolation and characterization of obligate methanotrophic bacteria[A]//Schlegel HG, Gottschalk G, Pfennig N. Symposium on Microbial Production and Utilization of Gases (H₂, CH₄, CO)[M]. Göttingen: Akademie der Wissenschaften, 1976: 329-336
- [15] Bowman JP, Sly LI, Nichols PD, et al. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43(4): 735-753
- [16] Bowman JP, Sly LI, Stackebrandt E. The phylogenetic position of the family *Methylococcaceae*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(1): 182-185
- [17] Dedysh SN, Knief C, Dunfield PF. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4665-4670
- [18] Pol A, Heijmans K, Harhangi HR, et al. Methanotrophy below pH 1 by a new verrucomicrobia species[J]. *Nature*, 2007, 450(7171): 874-878
- [19] Islam T, Jensen S, Reigstad LJ, et al. Methane oxidation at 55 °C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(1): 300-304
- [20] Vorobev AV, Baani M, Doronina NV, et al. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(10): 2456-2463
- [21] Kits KD, Klotz MG, Stein LY. Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the Gammaproteobacterium *Methylomonas denitrificans*, sp. nov. type strain FJG1[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(9): 3219-3232
- [22] Kalyuzhnaya MG, Puri AW, Lidstrom ME. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 142-152
- [23] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548
- [24] Hu SH, Zeng RJ, Burow LC, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 377-384
- [25] Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, et al. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane[J]. *Nature*, 2000, 407(6804): 623-626
- [26] Harremoës P, Christensen MH. Denitrification with methane (denitrification med methane)[J]. *Vand*, 1971, 1: 7-11
- [27] Dumont MG, Pommerenke B, Casper P. Using stable isotope probing to obtain a targeted metatranscriptome of aerobic methanotrophs in lake sediment[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(5): 757-764
- [28] Stein LY, Klotz MG. Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(6): 1826-1831
- [29] Rhee GY, Fuhs GW. Wastewater denitrification with

- one-carbon compounds as energy source[J]. Journal (Water Pollution Control Federation), 1978, 50(9): 2111-2119
- [30] Mechsner KL, Hamer G. Denitrification by methanotrophic/methylotrophic bacterial associations in aquatic environments[A]//Golterman HL. Denitrification in the Nitrogen Cycle[M]. Boston, MA: Springer, 1985: 257-271
- [31] Li YC, Yang YN, Liu DP, et al. Denitrification efficiency and microbial community research in an aerobic methanotroph-based system[J/OL]. China Environmental Science: 1-8 [2019-08-18]. <http://doi.org/10.19674/j.cnki.issn1000-6923.20190807.001> (in Chinese)
李彦澄, 杨娅男, 刘邓平, 等. 基于好氧甲烷氧化菌的反硝化效能及微生物群落研究[J/OL]. 中国环境科学: 1-8 [2019-08-18]. <https://doi.org/10.19674/j.cnki.issn1000-6923.20190807.001>
- [32] Thalasso F, Vallecillo A, García-Encina P, et al. The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification[J]. Water Research, 1997, 31(1): 55-60
- [33] Modin O, Fukushi K, Nakajima F, et al. Nitrate removal and biofilm characteristics in methanotrophic membrane biofilm reactors with various gas supply regimes[J]. Water Research, 2010, 44(1): 85-96
- [34] Liu JJ. Microbiological mechanism of methane oxidation coupled to denitrification based on leachate sediment[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2012 (in Chinese)
刘晶静. 基于渗滤液沉积物的甲烷氧化反硝化耦合微生物学机理研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2012
- [35] Ma RC, Wei XM, He R. Mechanism of hypoxia-tolerance and community structure of aerobic methanotrophs in O₂-limited environments: a review[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(6): 2047-2054 (in Chinese)
马若潺, 魏晓梦, 何若. 低氧生境中好氧甲烷氧化菌的缺氧耐受机理及种群结构研究进展[J]. 应用生态学报, 2017, 28(6): 2047-2054.
- [36] Wu ML, Ettwig KF, Jetten MSM, 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
- [37] Graham DW, Chaudhary JA, Hanson RS, et al. Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism, continuous-flow reactors[J]. Microbial Ecology, 1993, 25(1): 1-17
- [38] van Der Ha D, Hoefman S, Boeckx P, et al. Copper enhances the activity and salt resistance of mixed methane-oxidizing communities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6): 2355-2363
- [39] Deng YC, Che RX, Wu YB, et al. A review of the physiological and ecological characteristics of methanotrophs and methanotrophic community diversity in the natural wetlands[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(14): 4579-4591 (in Chinese)
邓永翠, 车荣晓, 吴伊波, 等. 好氧甲烷氧化菌生理生态特征及其在自然湿地中的群落多样性研究进展[J]. 生态学报, 2015, 35(14): 4579-4591
- [40] Song XH, Li YC, Zhou J. On efficiency of deep sequence constructed wetlands in winter[J]. Journal of Safety and Environment, 2017, 17(1): 273-276 (in Chinese)
宋现晖, 李彦澄, 周健. 序批式深床人工湿地冬季处理效能[J]. 安全与环境学报, 2017, 17(1): 273-276
- [41] Shen XX. Study on nitrogen conversion and methane oxidation under anoxic condition in constructed wetland[D]. Ji'nan: Master's Thesis of Shandong University, 2018 (in Chinese)
沈炫旭. 人工湿地缺氧条件下氮转化及好氧甲烷氧化的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2018
- [42] Rajapakse JP, Scutt JE. Denitrification with natural gas and various new growth media[J]. Water Research, 1999, 33(18): 3723-3734
- [43] Zhou XY, Zhao YF, Li D, et al. Experimental study on denitrification using methane as carbon source under microaerobic condition[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(5): 1704-1710 (in Chinese)
周祥玉, 赵云飞, 李东, 等. 微氧条件下以甲烷为碳源的反硝化实验研究[J]. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1704-1710
- [44] Waki M, Yokoyama H, Ogino A, et al. Nitrogen removal from purified swine wastewater using biogas by semi-partitioned reactor[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5335-5340
- [45] Sun FY, Dong WY, Shao MF, et al. Aerobic methane oxidation coupled to denitrification in a membrane biofilm reactor: treatment performance and the effect of oxygen ventilation[J]. Bioresource Technology, 2013, 145: 2-9
- [46] 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
- [47] Norði KÁ, Thamdrup B, Schubert CJ. Anaerobic oxidation of methane in an iron-rich Danish freshwater lake sediment[J]. Limnology and Oceanography, 2013, 58(2): 546-554
- [48] Shen LD, Hu BL, Zheng P, et al. 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, 等. 甲烷厌氧氧化微生物的研究进展[J]. 土壤学报, 2011, 48(3): 619-628
- [49] Islas-Lima S, Thalasso F, Gómez-Hernández J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification[J]. Water Research, 2004, 38(1): 13-16
- [50] Raghoebarsing AA, Pol A, van de Pas-Schoonen KT, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. Nature, 2006, 440(7086): 918-921

- [51] Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG. Bacterial inhibitory effects of nitrite: inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(4): 831-834
- [52] He ZF, Cai C, Shen LD, et al. Establishing and verifying of model for methane mass transfer in DAMO process[J]. *CIESC Journal*, 2012, 63(6): 1836-1841 (in Chinese)
何焱飞, 蔡琛, 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
- [53] Lou JQ, Li JP, Wang XL. Effect mechanism of ammonia on denitrifying anaerobic methane oxidation bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(8): 3036-3044 (in Chinese)
楼菊青, 李佳萍, 王析镭. 氨氮对反硝化型甲烷厌氧氧化细菌的影响机理研究[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(8): 3036-3044
- [54] Chai FG, Lu PL, Li WW, et al. An experimental comparison of simultaneous enrichment of anaerobic methane oxidizing microorganisms using nitrate and nitrite[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(4): 762-770 (in Chinese)
柴风光, 卢培利, 李薇薇, 等. 利用硝酸盐和亚硝酸盐同步富集厌氧甲烷氧化微生物的比较实验[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(4): 762-770
- [55] Zhao R, Zhu L, Wu Q, et al. 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, 等. 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
- [56] Luesken FA, Wu ML, Op Den Camp HJM, et al. Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*': kinetic and transcriptional analysis[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(4): 1024-1034
- [57] Roland FAE, Darchambeau F, Morana C, et al. Emission and oxidation of methane in a meromictic, eutrophic and temperate lake (Dendre, Belgium)[J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 756-764
- [58] Wu ML, van Alen TA, van Donselaar EG, et al. Co-localization of particulate methane monooxygenase and *cd₁* nitrite reductase in the denitrifying methanotroph '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*'[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334(1): 49-56
- [59] Luesken FA, Sánchez J, van Alen TA, et al. Simultaneous nitrite-dependent anaerobic methane and ammonium oxidation processes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 6802-6807
- [60] Zhu BL, van Dijk G, Fritz C, et al. 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
- [61] Hu BL, Shen LD, Lian X, 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
- [62] 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
- [63] 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
- [64] Hu SH, Zeng RJ, Haroon MF, et al. A laboratory investigation of interactions between denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) and anammox processes in anoxic environments[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8706
- [65] Shi Y, Hu SH, Lou JQ, 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
- [66] Winkler MKH, Ettwig KF, Vannecke TPW, et al. Modelling simultaneous anaerobic methane and ammonium removal in a granular sludge reactor[J]. *Water Research*, 2015, 73: 323-331
- [67] 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
- [68] Bhattacharjee AS, Motlagh AM, Jetten MSM, et al. Methane dependent denitrification- from ecosystem to laboratory-scale enrichment for engineering applications[J]. *Water Research*, 2016, 99: 244-252
- [69] Ding ZW, Lu YZ, Fu L, et al. Simultaneous enrichment of denitrifying anaerobic methane-oxidizing microorganisms and anammox bacteria in a hollow-fiber membrane biofilm reactor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(1): 437-446
- [70] Cai C, Hu SH, Guo JH, et al. Nitrate reduction by denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms can reach a practically useful rate[J]. *Water Research*, 2015, 87: 211-217
- [71] Xie GJ, Cai C, Hu SH, et al. 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