

研究报告

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

柴风光¹ 卢培利^{1,2*} 李薇薇¹ 韩新宽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:【背景】反硝化厌氧甲烷氧化(Denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO)是以硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体以甲烷为电子供体的厌氧氧化过程,对认识全球碳氮循环、削减温室气体排放和开发废水脱氮新技术等方面具有重要意义。【目的】认识以硝酸盐和亚硝酸盐为电子受体的DAMO微生物富集过程和结果的差异性。【方法】在序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR)内接种混合物,分别以硝酸盐和亚硝酸盐为电子受体连续培养800 d,定期检测反应器基质浓度变化、计算转化速率;利用16S rRNA基因系统发育分析研究功能微生物的多样性,利用实时荧光定量PCR技术定量测定功能微生物。【结果】以亚硝酸盐为电子受体的1、3号反应器富集到了DAMO细菌,未检测到DAMO古菌;以硝酸盐为电子受体的2号反应器富集到了DAMO细菌和古菌的混合物;3个反应器的脱氮速率经过初始低速期、快速提升期,最终达到稳定,但2号快速提升期开始时间比1、3号晚了80 d左右,达到稳定的时间更长,稳定最大速率为1、3号的44.7%、40.3%。【结论】硝酸盐和亚硝酸盐对富集产物有决定性影响;以硝酸盐为电子受体富集得到的DAMO古菌和细菌协同体系可以长期稳定共存,DAMO古菌可能是协同体系中脱氮速率的限制性因素。

关键词: 反硝化甲烷氧化, 对比研究, 脱氮能力, 稳定运行

An experimental comparison of simultaneous enrichment of anaerobic methane oxidizing microorganisms using nitrate and nitrite

CHAI Feng-Guang¹ LU Pei-Li^{1,2*} LI Wei-Wei¹ HAN Xin-Kuan¹ 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: [Background] Denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) is an anaerobic oxidation process, in which nitrate/nitrite works as the electron acceptor, while methane works as the electron donor. DAMO has great significance to understand the global carbon and nitrogen cycle, reduce greenhouse gas emissions and develop new technologies for nitrogen removal from wastewater.

Foundation item: The Special Science and Engineering Interdisciplinary Key Project Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (CDJZR13245501)

*Corresponding author: Tel: 86-23-65105875; E-mail: lupl@cqu.edu.cn

Received: June 04, 2017; Accepted: September 01, 2017; Published online (www.cnki.net): September 07, 2017

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(CDJZR13245501)

*通信作者: Tel: 86-23-65105875; E-mail: lupl@cqu.edu.cn

收稿日期: 2017-06-04; 接受日期: 2017-09-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-09-07

[Objective] Feeding nitrate or nitrite as the electron acceptor, we investigated the differences on the performance of the denitrifying anaerobic methane oxidation reactors. **[Methods]** The SBR reactors in which nitrate/nitrite works as the electron acceptor were inoculated sludge mixture and then consecutively long-term incubation for 800 days, meanwhile we measured the nitrite and nitrate concentration in the reactors and calculated the conversion rate regularly. The abundance and diversity of functional microorganisms were investigated by 16S rRNA gene phylogenetic analysis. Then we analyzed the amount of the functional microorganisms by real-time fluorescence quantitative PCR technique. **[Results]** The DAMO bacteria were detected in the No. 1 reactor and No. 3 reactor which were fed with nitrite as the electron acceptor but the DAMO archaea was not detected. However in the No. 2 reactor which was fed with nitrite as the electron acceptor, the DAMO archaea and bacteria were detected simultaneously. The nitrogen removal rate of the three reactors kept a low value at the very beginning, then experienced a fast lifting phase and maintained a steady value at last. The time when nitrogen removal rate of No. 2 reactor started to increase rapidly was about 80 days later than No. 1 and No. 3 reactor. Its stable maximum rate is only 44.7% of No. 1 reactor and 40.3% of No. 3 reactor, spending more time reaching the stability. **[Conclusion]** The different substrate fed leads to the different results of enrichment. The DAMO archaea and bacterial synergistic system, which is enriched with nitrate as the electron acceptor, can coexist for a long time. DAMO archaea may be a limiting factor in the nitrogen removal rate in the synergistic system.

Keywords: Denitrifying anaerobic methane oxidation, Contrastive study, The capacity of nitrogen removal, Stable running

甲烷是仅次于 CO₂ 的第二大温室气体, 其温室效应是等摩尔 CO₂ 的 20–30 倍^[1]。全球每年的 CH₄ 产量是 300 Tg, 其中 60% 被微生物氧化^[2]。厌氧甲烷氧化 (Anaerobic methane oxidation, AMO) 转化了海洋甲烷的 90%^[3], 在陆地淡水生态系统甲烷排放的控制中也扮演了重要角色^[4-5]。硫酸盐首先被确认为厌氧甲烷氧化过程的电子受体^[6-8]。然而从热力学的角度, 硝态氮更具作为 AMO 电子受体的优势^[9]。并且, 由于淡水环境中硝态氮的普遍性, 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 (N_x-DAMO), 更具存在基础和普遍意义^[10-11]。

2006 年, N_x-DAMO 过程首次在实验室得到证实, 富集产物包括属于 NC10 门的细菌和归类介于甲烷丝状菌 (*Methanosaeta*) 和 ANME-II 之间的古菌, 古菌氧化甲烷同时还原硝酸盐为亚硝酸盐协同细菌氧化甲烷同时还原亚硝酸盐为氮气被认为是可能的机理^[12]。研究者继续富集, 古菌消失, NC10 门类细菌被证明能够独立完成甲烷厌氧氧化和亚硝酸盐还原^[13]。随后, 以富营养化沟渠沉积物为接种物同样富集到了 NC10 门细菌, 并被命名为

“*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”, 其反应机理可能是细菌还原 NO₂⁻ 为 NO, NO 通过歧化作用产生 N₂ 和 O₂, 3/4 的 O₂ 用来氧化 CH₄, 1/4 的 O₂ 参与其他代谢活动^[14-15]。目前, 以亚硝酸盐为基质, 该菌已经被广泛从污水厂污泥^[16]、湖泊底泥^[17]和沟渠沉积物^[18]中成功富集, 并被发现普遍存在于水库消落带^[19]、南海底泥^[20]、淡水湿地^[21]、泥炭地^[22]和河口沉积物^[23]等环境中。接种物、温度、pH 值、盐度以及反应器构型均影响 DAMO 菌的富集^[24-25], 有机质含量等对自然界中 DAMO 微生物群落结构有影响^[26]。将 n-DAMO 应用于废水处理的研究已经开展^[27]。Xie 等^[28]利用 DAMO 菌和 Anammox 的混合培养物达到了厌氧污泥消化液中氮的完全去除。相对于 n-DAMO 细菌, 最初存在于富集物中的古菌却被忽视。一种名为 “*Methanoperedens nitroreducens*” 的古菌被发现以硝酸盐为电子受体通过反向产甲烷机制氧化甲烷, 同时还原硝酸盐为亚硝酸^[29-30]。因此, DAMO 古菌需要与 DAMO 细菌或者 Anammox 细菌共生以去除其产生的亚硝酸盐。Ding 等^[31]采用电化学方法分离纯化了古菌, Qi 等^[32]也通过光学方法分离古菌, 为 DAMO 古菌

的研究提供了基础。

由于 DAMO 古菌生长速率更慢, 易受干扰, 富集更加困难, 目前单独富集的研究极少。但淡水环境中硝态氮主要以硝酸盐而非亚硝酸盐的形式存在, 古菌驱动的 N-DAMO 过程可能更具普遍意义。并且, 废水中硝酸盐反硝化缺乏碳源是普遍难题, 废水厌氧处理产生的甲烷部分溶解在水中^[33]导致温室气体排放和低效能源回收, N-DAMO 耦联了硝酸盐还原与甲烷氧化, 具有脱氮和温室气体减排双重效应, 且能够为 n-DAMO 提供亚硝酸盐来源。硝酸盐和亚硝酸盐被认为是 DAMO 细菌和古菌最主要的选择因子^[34], 但有研究提出 DAMO 细菌能够利用硝酸盐^[22], 基质对富集结果的影响仍需进一步开展同步富集对比调查。本研究分别以硝酸盐和亚硝酸盐为电子受体, 在其它因素完全相同的条件下同步富集 DAMO 功能微生物, 对比富集过程微生物菌群结构演化、基质转化速率变化和系统的稳定性, 揭示电子受体对 DAMO 微生物的选择作用及所形成的 DAMO 过程的差异性, 有助于古菌的富集培养研究, 进一步认识 n-DAMO 和 N-DAMO 过程及其功能微生物特性。

1 材料与方法

1.1 接种污泥与培养液

以人工景观湖底泥(60 mL)、城市污水处理厂污泥浓缩池厌氧污泥(400 mL)和稻田土(取表层泥以下 10 cm 处土样 450 mL)的混合物为接种物。取样后, 去除较大杂质物和有机物, 混合均匀后过 10 目筛; 在连续曝氮气(99.99%)的条件下用 0.9% 的 NaCl 溶液清洗 3 次, 进一步去除固体杂质和有机物。取处理好的接种物 3 份(380 mL/份, 含部分清洗液)分别接种到 3 个相同的 SBR 反应器, 添加合成废水至 1.5 L。合成废水的基质和微量元素组成参考文献^[35]。

1.2 反应器的运行与控制

本实验选用 3 套相同实验装置, 包括双层玻璃反应器、曝气系统、机械搅拌系统、恒温水浴系统。

反应器有效容积为 2.0 L, 分液相区 1.5 L 和气相区 0.5 L。3 个反应器分为两组, 1、3 号以亚硝酸盐为唯一电子受体, 富集期间投加 1.0–1.5 mmol/L 的亚硝酸钠贮存液维持亚硝态氮在 0.15–2.86 mmol/L 之间; 2 号反应器以硝酸盐为唯一电子受体, 投加 10.0 mmol/L 的硝酸钠贮存液维持硝态氮浓度不低于 2.0 mmol/L。根据反应速率每周检测 2–5 次硝态氮和亚硝态氮浓度。通过向反应器内曝入成分为 90% CH₄、5% N₂、5% CO₂ 的混合标准气提供甲烷, 每次曝气 10 min, 曝气速率约为 150 mL/min 左右, 反应器压力维持在 1.11×10⁵ Pa 左右, 反应器内甲烷分压控制在 0.81×10⁵–1.11×10⁵ Pa, 根据亨利定律, 反应器内溶解甲烷浓度在 1.14–1.43 mmol/L。SBR 反应器采用手动控制, 运行周期为进水—反应—沉淀—出水, 一个运行周期为 28 d, 每个周期末沉淀 4 h, 排上清液 500 mL, 用培养基补充至 1.5 L, 水力停留时间约为 90 d。

反应器通过水浴层外接恒温水浴锅控制恒温。pH 值通过在线 pH 计监测, 用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调节保持在 7.0–7.5。1、2 号反应器在 0–144 d 内运行温度为 22 °C, 第 144 天提高到 30 °C, 反应器 3 号全过程运行温度为 30 °C。两组反应器除基质外其他培养条件完全相同, 反应器同时启动, 富集培养期间保持严格厌氧状态。

1.3 主要仪器

气相色谱仪, 重庆川仪自动化股份有限公司; 总有机碳分析仪, SHIMADZU 公司; 定量 PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.4 分子生物学检测

对接种污泥和富集 280 d 时的培养物进行分子微生物学分析。用定量 PCR 仪分别对污泥中 *M. oxyfera* 细菌及 *M. nitroreducens* 古菌的丰度进行分析; 通过巢式 PCR、功能基因克隆、测序获得 *M. nitroreducens* 古菌的 16S rRNA 基因序列, 并构建系统进化树。*M. oxyfera* 细菌的引物采用 *qPIF* 和 *qPIR*, 古菌采用 345F、541R、20F 和 958R^[12,29,35]。

2 结果与分析

2.1 功能微生物种群结构

2.1.1 反应器中微生物的功能菌种组成

M. oxyfera 细菌采用 *qP1F* 和 *qP1R* 特异性引物扩增得到的 16S rRNA 基因片段长度为 220 bp, *M. nitroreducens* 古菌采用 345F 和 541R 特异性引物得到的 16S rRNA 基因片段长度为 216 bp, 随机挑选 35 个阳性克隆子, 测序, 构建系统进化树。结果表明两类反应器中 DAMO 功能微生物的组成明显不同: 外加基质为亚硝酸盐的 1、3 号反应器内 DAMO 细菌占支配地位, 未检测到 DAMO 古菌; 外加基质为硝酸盐的 2 号反应器 DAMO 古菌和细菌占支配地位。3 个反应器均富集到了 DAMO 微生物, 与

之前的报道一致。在进化树中, 所有序列都与之前报道高度相似。聚类分析表明, 1 号反应器内 DAMO 细菌(图 1) 28 条序列中 26 条聚在一起, 2 个聚成另一个集合, 与 Ettwig 等^[35]报道的 *M. oxyfera* 相似性达 99.1%; 以硝酸盐为基质的 2 号反应器内(图 2)培养物中 DAMO 细菌 31 条序列集中在一起, 与 Ettwig 等^[35]报道的 *M. oxyfera* 相似性达 98.7%; 3 号亚硝酸盐反应器(图 3)的 33 条序列都集中在一起, Ettwig 等^[35]报道的 *M. oxyfera* 相似性达 99.3%。古菌 16S rRNA 基因系统分析获得序列都集中一簇, 均归属于 ANME 类古菌, 所得序列主要分布在两个集群, 它们都和 Raghoebarsing 等^[12]报道的甲烷厌氧氧化古菌 ANME 表现出高度的相似性(98.8%) (图 4)。

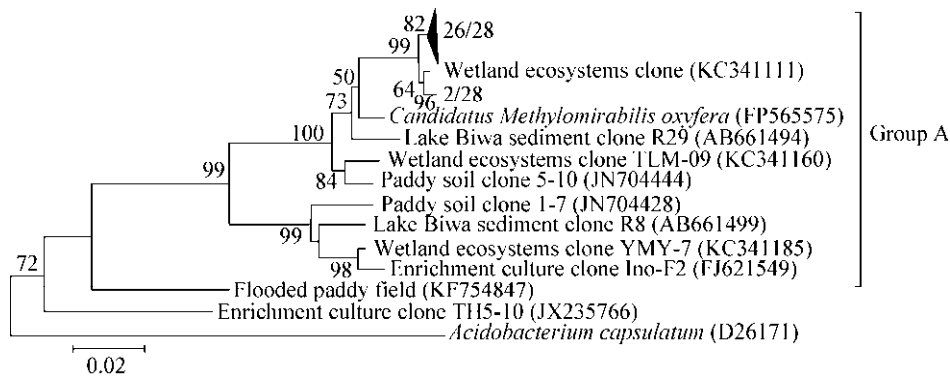


图 1 1 号反应器 *M. oxyfera* 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of *M. oxyfera* in No. 1 reactor

注: 每一结点表示分类学单元; 分支长度表示该分支进化过程中变化的度; 距离标尺表示序列之间差异的数字。

Note: Each node represents the taxonomic unit; The branch length indicates the extent of variation in the branch evolution; Distance figures indicate the difference between sequences.

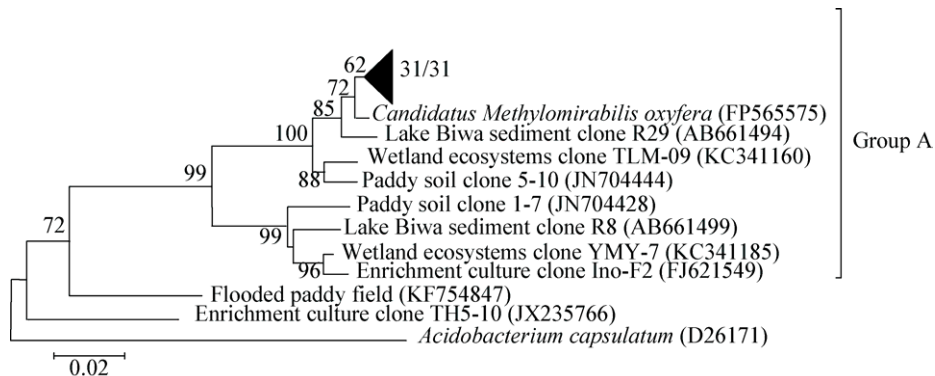


图 2 2 号反应器 *M. oxyfera* 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of *M. oxyfera* in No. 2 reactor

注: 每一结点表示分类学单元; 分支长度表示该分支进化过程中变化的程度; 距离标尺表示序列之间差异的数字。

Note: Each node represents the taxonomic unit; The branch length indicates the extent of variation in the branch evolution; Distance figures indicate the difference between sequences.

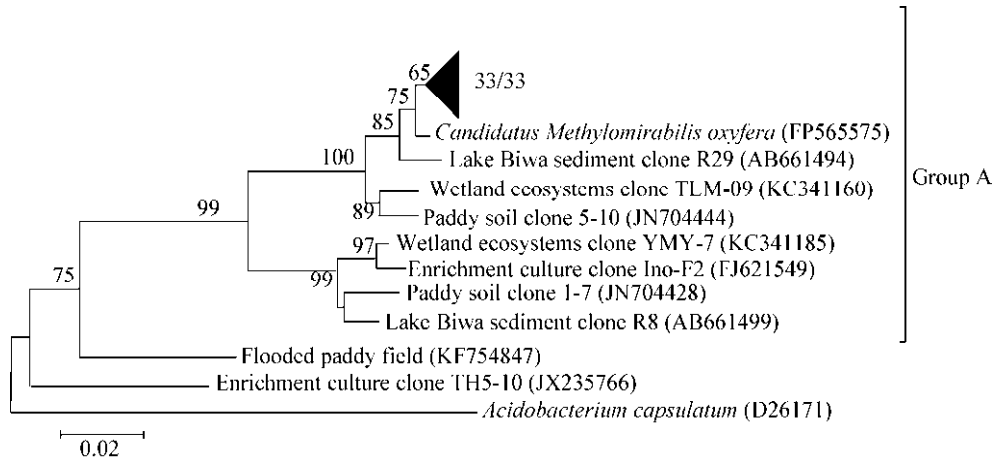


图 3 3号反应器 *M. oxyfera* 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of *M. oxyfera* in No. 3 reactor

注：每一结点表示分类学单元；分支长度表示该分支进化过程中变化的程度；距离标尺表示序列之间差异的数字。

Note: Each node represents the taxonomic unit; The branch length indicates the extent of variation in the branch evolution; Distance figures indicate the difference between sequences.

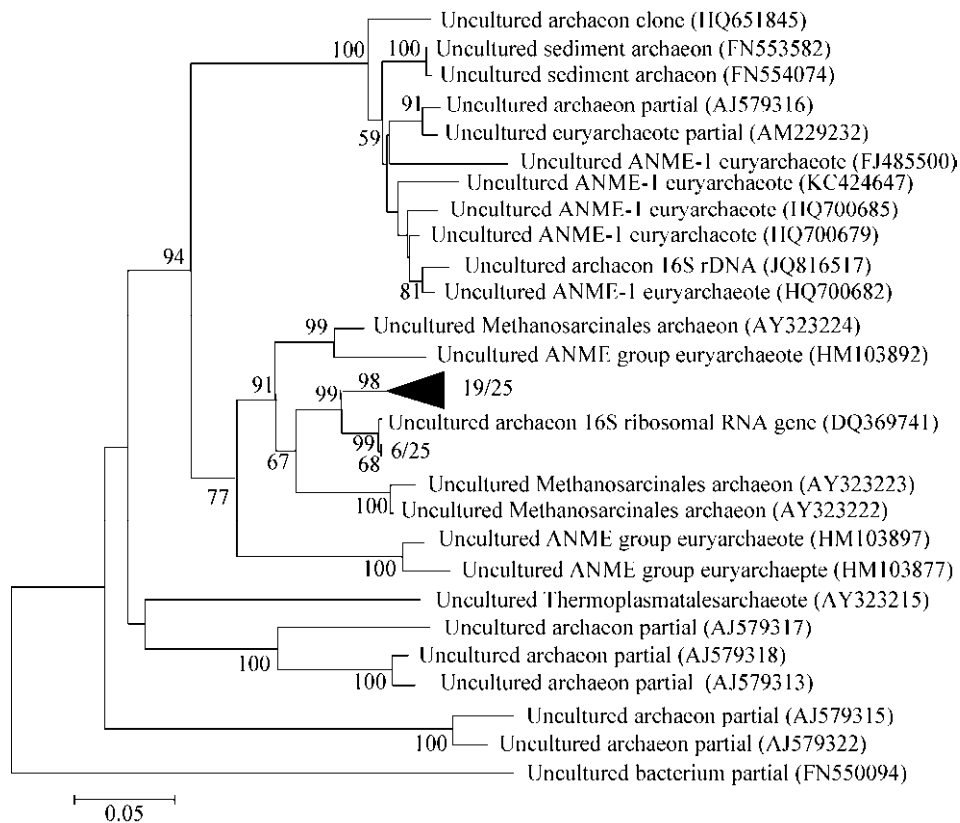


图 4 2号反应器 *M. nitroreducens* 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of *M. nitroreducens* in No. 2 reactor

注：每一结点表示分类学单元；分支长度表示该分支进化过程中变化的程度；距离标尺表示序列之间差异的数字。

Note: Each node represents the taxonomic unit; The branch length indicates the extent of variation in the branch evolution; Distance figures indicate the difference between sequences.

2.1.2 富集过程功能微生物定量分析结果

接种污泥与反应器中 *M. oxyfera* 种群丰度对比如图 5 所示。混合污泥接种物中 *M. oxyfera* 类细菌含量为 4.99×10^6 copies/g 干重, 但可能由于含量过低而没有检测到古菌。经过 280 d 的富集, 外加基质为亚硝酸盐的 1 号反应器内 *M. oxyfera* 类细菌含量为 $(1.89 \pm 0.11) \times 10^{10}$ copies/g 干重, 增长 3 787 倍, 3 号反应器内数量为 $(1.20 \pm 0.06) \times 10^{10}$ copies/g 干重, 增长 2 405 倍。外加基质为硝酸盐的 2 号反应器内 *M. oxyfera* 类的细菌含量为 $(4.43 \pm 0.15) \times 10^9$ copies/g 干重, 含量增长了 888 倍, 检测到的古菌含量为 4.65×10^9 copies/g 干重。分析结果表明, 在富集条件下 *M. oxyfera* 类细菌丰度增长显著, 并且可以获得较高数量的 DAMO 古菌。

2.2 基质转化速率

3 个富集反应器共运行了 800 d 左右, 富集过程硝态氮浓度及其转化速率的变化见图 6 和图 7。以亚硝酸盐为基质的 1 号和 3 号反应器经过大约 150 d 的低速率波动期后, 脱氮速率迅速提高最终维持在较高的稳定值, 分别达到 72.9 mg/(L·d) 和

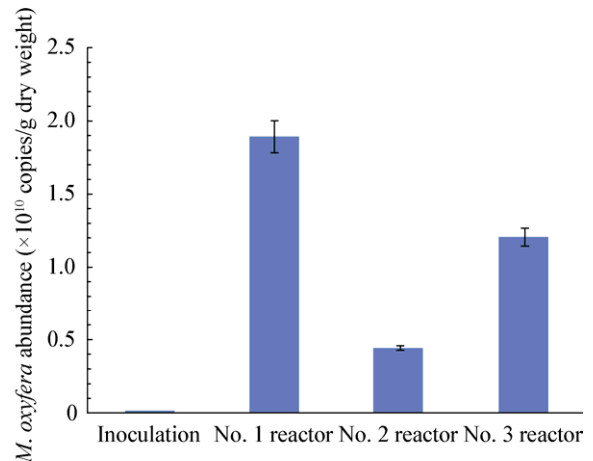


图 5 接种污泥与反应器中 *M. oxyfera* 种群丰度

Figure 5 The abundance of *M. oxyfera* in the inoculum and reactors

71.8 mg/(L·d)。但是, 以硝酸盐为基质的 2 号反应器的低速率波动期长达 230 d, 最大脱氮速率为 32.6 mg/(L·d), 分别是 1 号和 3 号反应器最大速率的 44.7% 和 40.3%。而且, 从速率开始提升到稳定值 1、3 号反应器用了 100 d 左右, 而 2 号反应器用了 170 d。连续培养 423 d 后反应器进行了排泥, DAMO 菌数量降低, 造成脱氮速率下降。3 号反应器随着培养时间增长, 微生物数量逐渐恢复脱氮速

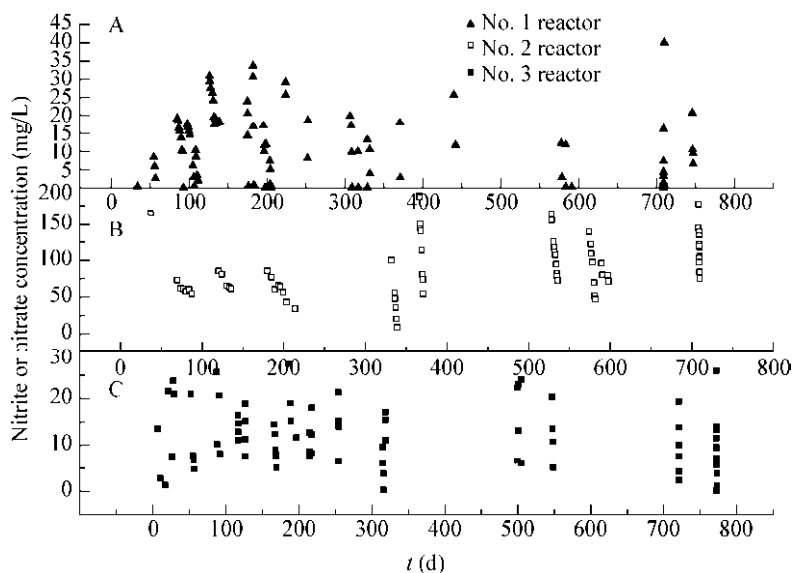


图 6 1、2、3 号反应器基质浓度

Figure 6 The concentration of substrate in No. 1, 2, 3 reactor

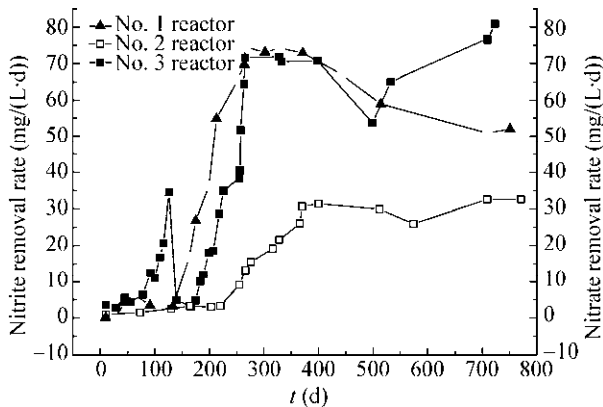


图7 1、2、3号反应器脱氮速率

Figure 7 The removal rate of nitrogen in No. 1, 2, 3 reactor

率重新稳定在较高值,最大达到了80.9 mg/(L·d)。但是1号反应器在746 d时水浴锅故障,反应器温度升至60℃,造成DAMO细菌部分死亡,脱氮速率并未完全恢复。古菌排泥后消耗速率波动比细菌反应器小。

另外,在0–144 d 1号反应器的培养温度为22℃,之后调整为30℃,3号反应器的培养温度始终维持在30℃。从图7中可以看出,初始时3号反应器的脱氮速率高于1号,表明温度可能对DAMO细菌的富集有影响。但调整到相同温度后经过长时间富集,两个反应器所达到的最大脱氮速率没有明显差异。

3 讨论与结论

本研究中的富集实验只有电子受体不同,通过对富集过程和结果的差异进行比较分析,能够进一步认识DAMO细菌和DAMO古菌的特性。首先,富集产物中功能微生物的组成不同,证实了电子受体硝酸盐和亚硝酸盐对DAMO古菌和DAMO细菌的决定性选择作用,这与2011年Hu等^[34]报道的对比结果相符。分子生物学分析表明,外加基质仅为硝酸盐的反应器富集到微生物优势菌为DAMO古菌和DAMO细菌,外加基质为亚硝酸盐的反应器富集到的微生物优势菌为DAMO细菌。表明DAMO细菌更喜好亚硝酸盐,而古菌对于硝酸盐的降解竞争力

大于细菌印证了Haroon等^[29]报道的DAMO古菌和DAMO细菌的混合培养物的协同体系中,DAMO古菌降解硝态氮为亚硝态氮,DAMO细菌进一步将亚硝态氮转变为氮气,与之前大多数报道的富集结论相一致^[12,14,16,18,21,24,29,35]。另外1、3号DAMO细菌反应器最高脱氮速率分别为72.9 mg/(L·d)和80.9 mg/(L·d)。2号DAMO古菌反应器,最高消耗速率为32.6 mg/(L·d)。Cai等^[36]认为DAMO菌的脱氮在5.6–135 mg/(L·d)时具备实际应用的可能,本研究的脱氮速率达到了较高值具有一定实际应用的潜力。其次,富集过程中脱氮速率的变化表明DAMO古菌更难富集培养。DAMO古菌反应器脱氮速率低速波动期比细菌反应器长80 d左右,并且速率提升更慢,比细菌反应器多耗时70 d,达到稳定后最高脱氮速率也仅为细菌反应器的40%左右,从微生物丰度来看富集物中1、3号反应器中DAMO细菌是2号反应器中DAMO古菌数量的3–4倍。

另一方面,极少有研究尝试以硝酸盐和甲烷为基质进行DAMO微生物的富集考察在该条件下微生物生态的演化过程。基于DAMO古菌以甲烷为电子供体只能将硝酸盐还原为亚硝酸盐的认识^[29],少数针对DAMO古菌的研究都是利用氨氮而形成DAMO古菌和Anammox细菌的共同体^[37]:DAMO古菌驱动厌氧甲烷氧化过程将硝酸盐还原为亚硝酸盐,Anammox细菌驱动厌氧氨氧化过程将前者产生的亚硝酸盐还原为氮气。研究已经在多种反应器中证实了这种互生关系,且在MBfR中最大脱氮速率能够达到1 kg N/(m³·d)^[28]。尽管DAMO细菌能够通过驱动厌氧甲烷氧化转化亚硝酸盐为氮气而与DAMO古菌形成类似的互生关系,但可能由于DAMO细菌相对于Anammox细菌更慢的生长速率和更不成熟的富集技术及其与DAMO古菌对甲烷的竞争关系等原因可能会导致这一互生体系更加难以形成且不稳定。但是,本研究在只有甲烷和硝酸盐的条件下,以湖泊沉积物和稻田土等混合物为接种物,富集得到了由DAMO古菌和DAMO细

菌组成的共同体。第 280 天的富集产物中, DAMO 古菌和 DAMO 细菌的含量分别为 4.65×10^9 、 $(4.43 \pm 0.15) \times 10^9$ copies/g 干重, 两者数量相当。在 800 d 左右的富集过程中, 该体系最大的硝酸盐转化速率达到 32.6 mg/(L·d), 且稳定运行了 450 d。尽管这一氮转化速率低于 Xie 等^[28]报道的 DAMO+Anammox 体系, 但证明了在甲烷和硝酸盐条件下, 不依靠 Anammox 过程, DAMO 古菌和 DAMO 细菌能够形成稳定的互生体系, 驱动硝酸盐型和亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化过程的耦合, 在把甲烷厌氧氧化为二氧化碳的同时, 把硝酸盐还原为氮气。其次, 研究发现本实验条件下 DAMO 古菌可能是混合培养物体系脱氮速率的限制性因素。经过 280 d 富集, 外加基质为亚硝酸盐的 1、3 号反应器富集物 DAMO 细菌数量的增长高于外加基质为硝酸盐的 2 号古菌反应器, 而且 800 d 的运行过程中 2 号反应器中未检测到亚硝酸盐的积累, 表明古菌细菌的协同体系中完全满足细菌的基质利用需求, 细菌生长受到限制, 亚硝酸盐得到了充分利用, 古菌对硝态氮的降解速率限制了协同体系的脱氮速率。

此外本研究发现, DAMO 菌的耐冲击性较差, 排泥操作使反应器速率下降 20% 以上, 短时停电可能造成其一周脱氮速率波动。因此进一步研究如何使反应器更加稳定、提升脱氮速率、提高繁殖能力具有重要意义。有研究者发现甲烷氧化古菌和硫酸盐还原菌、产甲烷细菌等互营养微生物能够通过细胞间间接电子传递代替中间产物进行电子传递, 可以增加生长速率, 与甲烷营养古菌共生的甲烷营养细菌的胞外细胞色素 c 能够使基因过度表达并形成“导线”与古菌细胞接触成为直接电子传递介质^[38], 因此对于相似度很高的 DAMO 菌进行导电性研究会有一定突破。

REFERENCES

- [1] Strous M, Jetten MSM. Anaerobic oxidation of methane and ammonium[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 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] Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, et al. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments[J]. Nature, 1999, 398(6730): 802-805
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Martens CS, Berner RA. Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments[J]. Science, 1974, 185(4157): 1167-1169
- [7] 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
- [8] Timmers PHA, Suarez-zuluaga DA, van Rossem M, et al. Anaerobic oxidation of methane associated with sulfate reduction in a natural freshwater gas source[J]. The ISME Journal, 2016, 10(6): 1400-1412
- [9] Krüger M, Meyerdierks A, Glöckner FO, et al. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically[J]. Nature, 2003, 426(6968): 878-881
- [10] 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
- [11] Geng DD, Lu PL, Li WW, et al. Nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation: review on status and perspectives[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 364-373 (in Chinese)
耿丹丹, 卢培利, 李薇薇, 等. 硝态氮还原型厌氧甲烷氧化的研究进展及展望[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 364-373
- [12] 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
- [13] Ettwig KF, Shima S, van de Pas-Schoonen KT, et al. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of *Archaea*[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3164-3173
- [14] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. Nature, 2010, 464(7288): 543-548
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Wang SH, Wu Q, Lei T, et al. Enrichment of denitrifying

- methanotrophic bacteria from Taihu sediments by a membrane biofilm bioreactor at ambient temperature[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(6): 5627-5634
- [18] 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
- [19] Wang RF, Han XK, Lu PL, et al. Co-occurrence and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing and anaerobic ammonium oxidizing bacteria in the water-level fluctuation zone of the three gorges reservoir, China[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2016, 25(12): 5456-5466
- [20] 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
- [21] 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
- [22] Zhu BL, van Dijk G, Fritz C, et al. 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
- [23] Yan PZ, Li MC, Wei GS, et al. Molecular fingerprint and dominant environmental factors of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in sediments from the Yellow River Estuary, China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137996
- [24] He ZF, Geng S, Shen LD, et al. The short- and long-term effects of environmental conditions on anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction[J]. *Water Research*, 2015, 68: 554-562
- [25] He ZF, Cai C, Shen LD, et al. Effect of inoculum sources on the enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 939-946
- [26] Liu Y, Zhang JX, Zhao L, et al. Aerobic and nitrite-dependent methane-oxidizing microorganisms in sediments of freshwater lakes on the Yunnan Plateau[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(5): 2371-2381
- [27] Wang DB, Wang YL, Liu YW, et al. Is denitrifying anaerobic methane oxidation-centered technologies a solution for the sustainable operation of wastewater treatment plants?[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 234: 456-465
- [28] 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
- [29] 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
- [30] Timmers PHA, Welte CU, Koehorst JJ, et al. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea[J]. *Archaea*, 2017, 2017: 1654237
- [31] Ding J, Lu YZ, Fu L, et al. Decoupling of DAMO Archaea from DAMO bacteria in a methane-driven microbial fuel cell[J]. *Water Research*, 2017, 110: 112-119
- [32] Qi XQ, Carberry DM, Cai C, et al. Optical sorting and cultivation of denitrifying anaerobic methane oxidation archaea[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(2): 934-942
- [33] Smith AL, Skerlos SJ, Raskin L. Psychrophilic anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater[J]. *Water Research*, 2013, 47(4): 1655-1665
- [34] Hu SH, 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
- [35] Ettwig KF, van Alen T, van de Pas-Schoonen KT, et al. Enrichment and molecular detection of denitrifying Methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662
- [36] 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
- [37] 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
- [38] Wegener G, Krukenberg V, Riedel D, et al. Intercellular wiring enables electron transfer between methanotrophic Archaea and bacteria[J]. *Nature*, 2015, 526(7574): 587-590