

双阳极室甲烷微生物燃料电池同步脱氮除硫性能及微生物群落分析

何盼, 张超, 刘嘉欣, 白晋龙, 卢静, 侯彬*

中北大学环境与安全工程学院, 山西 太原 030051

何盼, 张超, 刘嘉欣, 白晋龙, 卢静, 侯彬. 双阳极室甲烷微生物燃料电池同步脱氮除硫性能及微生物群落分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1010-1022.

HE Pan, ZHANG Chao, LIU Jiabin, BAI Jinlong, LU Jing, HOU Bin. Simultaneous nitrogen and sulfur removal performance and microbial community changes of dual-anode chamber methane microbial fuel cells[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1010-1022.

摘要:【背景】甲烷厌氧氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)包含反硝化型甲烷厌氧氧化和硫酸盐还原型甲烷厌氧氧化。目前, 人们向水体中排放过量的含氮及含硫污染物, 引起了严重的环境污染和生态破坏。【目的】利用甲烷厌氧氧化微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)研究同步脱氮除硫耦合反应机理及反应过程中微生物的多样性信息。【方法】构建了3个微生物燃料电池(N-S-MFC、N-MFC、S-MFC), 以甲烷作为唯一碳源, 探究其同步脱氮除硫性能, 并采用16S rRNA基因高通量测序技术对微生物群落结构进行分析。【结果】N-S-MFC中硝酸盐和硫酸盐的去除率分别为90.91%和18.46%。阳极室中微生物的相对丰度提高, 与反硝化及硫酸盐还原菌相关的微生物大量富集, 如门水平上拟杆菌门(*Bacteroidota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和脱硫杆菌门(*Desulfobacterota*), 同时属水平上 *Methylobacterium*、*Methylorubrum*、*Methylocaldum*、*Methylomonas* 等常见的甲烷氧化菌增多。【结论】N-S-MFC促进了硝酸盐还原, 而对硫酸盐还原几乎无影响, 本研究为甲烷MFC在污水中同步脱氮除硫的应用提供理论依据。

关键词: 双阳极室微生物燃料电池; 甲烷厌氧氧化; 脱氮除硫; 16S rRNA基因高通量测序; 微生物多样性

资助项目: 国家自然科学基金(41977141, 21806147); 山西省自然科学基金(201801D121268)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41977141, 21806147) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province (201801D121268).

*Corresponding author. E-mail: houbin566@163.com

Received: 2022-09-13; Accepted: 2022-11-21; Published online: 2022-12-13

Simultaneous nitrogen and sulfur removal performance and microbial community changes of dual-anode chamber methane microbial fuel cells

HE Pan, ZHANG Chao, LIU Jiabin, BAI Jinlong, LU Jing, HOU Bin *

School of Environment and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, Shanxi, China

Abstract: [Background] Anaerobic oxidation of methane (AOM) includes denitrification-dependent anaerobic methane oxidation and sulfate reduction-dependent anaerobic methane oxidation. At present, the excessive discharge of nitrogen and sulfur pollutants into water causes serious environmental pollution and ecological damage. [Objective] We used the AOM-microbial fuel cell (MFC) to study the coupling reaction mechanism of simultaneous nitrogen and sulfur removal and the microbial diversity changes during the reaction. [Methods] We constructed three MFCs (N-S-MFC, N-MFC, and S-MFC) with methane as the sole carbon source to explore the simultaneous nitrogen and sulfur removal performance. The 16S rRNA gene high-throughput sequencing was employed to analyze the microbial community structure. [Results] The removal rates of nitrate and sulfate in N-S-MFC were 90.91% and 18.46%, respectively. The relative abundance of microorganisms in the anode chamber increased, and the microorganisms involved in denitrification and sulfate reduction were enriched. Specifically, the relative abundance of common methanotrophs including *Bacteroidota*, *Firmicutes* and *Desulfobacterota* at the phylum level and *Methylobacterium*, *Methylobacterium*, *Methylocaldums* and *Methylomonas* at the genus level was increased. [Conclusion] N-S-MFC promotes nitrate reduction while having little effect on sulfate reduction. This study provides a theoretical basis for the application of methane MFC in simultaneous nitrogen and sulfur removal from wastewater.

Keywords: dual-anode chamber microbial fuel cell; anaerobic oxidation of methane; nitrogen and sulfur removal; 16S rRNA gene high-throughput sequencing; microbial diversity

甲烷是自然界中一种重要的化石燃料, 对全球变暖的影响仅次于二氧化碳, 是全球第二大温室气体^[1]。甲烷厌氧氧化(anaerobic oxidation of methane, AOM)是减少大气中甲烷的一个重要途径^[2]。在自然界中, 根据电子受体类型的不同, AOM 过程主要分为以 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 为最终电子受体的反硝化型甲烷厌氧氧化(denitrification-dependent anaerobic methane oxidation, DAMO)、以 SO_4^{2-} 为最终电子受体的硫酸盐还原型甲烷

厌氧氧化(sulfate-reduction-dependent anaerobic methane oxidation, SAMO)和以 Fe^{3+} 、 Mn^{4+} 、 Cr^{6+} 等金属离子为最终电子受体的甲烷厌氧氧化(metal-dependent AOM, metal-AOM)^[3-4]。目前, 水体中氮元素及硫酸盐的含量随着人类的生产生活活动而不断增加, 其排放量远超过水体自净能力^[5], 导致水体富营养化及水体酸化严重。因此, DAMO 和 SAMO 是分解甲烷同时脱氮除硫的非常有效的途径。Xue 等^[6]研究了硫酸盐和

亚硝酸盐共同驱动的甲烷厌氧氧化转化, 结果表明当硫酸盐和亚硝酸盐共同作为电子受体时, 甲烷转化率和转化量均高于硫酸盐或亚硝酸盐单独作为电子受体。Cassarini 等^[7]研究了在生物滴滤池中以甲烷为电子受体去除硫代硫酸盐, 结果表明硫代硫酸盐首先被分解为硫酸盐和硫化物, 然后甲烷和硫酸盐发生 SAMO 反应, 同时富集了与硫酸盐还原菌相关的微生物, 促进了 SAMO 反应的进行, 硫酸盐的还原率达到 0.38 mmol/(L·d)。

微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)是利用微生物作为催化剂, 将有机或无机物中的化学能转化为电能的装置, 同时也是一种新型的生物污水处理技术^[8]。将 AOM 与 MFC 耦合, 不仅能够控制甲烷的温室效应, 还可以回收和提取电能, 对缓解全球能源危机起到一定的作用^[9]。

Ding 等^[10]首次以甲烷为燃料, 从 DAMO 细菌中单独分离 DAMO 古菌, 在 MFC 中运行 45 d 后峰值电压为 28 mV, 显示出一定的发电能力, 而且 DAMO 古菌比例由 26.96% 提高到 65.77%。Su 等^[11]为解决 DAMO 细菌在富集过程中生长缓慢的问题, 在 MFC 耦合颗粒污泥系统中添加甜菜碱生长因子, 当生长因子增加到 1.0 g/L 时, NO_3^- -N 平均去除率达到最大值 83.4%。Mcanulty 等^[12]在 MFC 系统中加入 *Methanosarcina acetivorans* 研究逆转甲烷生成途径, 实验结果表明甲烷被转化为乙酸盐供 *Geobacter sulphreducens* 等微生物利用。

由于甲烷的低溶解度和低传质系数, 关于 AOM-MFC 同步脱氮除硫的研究仍处于初始阶段, 相关的研究相对较少, 同步脱氮除硫之间的电子竞争关系及微生物种类和多样性还不明确。因此, 本研究利用 AOM-MFC 同步脱氮除硫构建了 3 个微生物燃料电池, 以甲烷为唯一

的电子供体, 研究 MFC 同步脱氮除硫的性能及微生物多样性信息, 以期 AOM-MFC 在污水脱氮除硫的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 MFCs 反应装置的搭建

实验装置由两个双室 MFC 和 1 个 3 室 MFC 组成, 如图 1 所示, 双室 MFC 阳极室和阴极室的有效容积均为 400 mL; 3 室 MFC 两侧为阳极室, 有效容积均为 400 mL, 中间为阴极室, 有效容积为 600 mL。阳极室和阴极室由质子交换膜(10 cm×10 cm)分隔开。在阳极室, 为提高甲烷的传质速率, 制备了“夹心型”气体扩散阳极(1.5 cm×5 cm×5 cm): 将防水透气布包裹在电极支架外部, 然后用环氧树脂胶将经过预处理的碳毡电极(5 cm×5 cm)粘在电极的两侧, 在其上方中心连接一个直径 6 mm 的细管, 方便甲烷气体的通入。采用同样预处理后的碳毡(7.5 cm×7.5 cm)作为阴极电极。用钛丝将阴、阳极电极相连接, 外接 1 000 Ω 电阻形成闭合回路。输出电压由数据采集卡每 30 s 采集一次, 并自动保存于电脑中。

1.2 MFCs 污泥接种和操作条件

实验接种的厌氧活性污泥取自山西娄烦正阳污水净化有限公司的厌氧池, 将取回的污泥置于密闭容器中厌氧密封保存。沉淀后去除上清液, 将 60 mL 沉淀后的活性污泥和 270 mL 无机介质培养基分别加入到阳极室, 阴极室加入 100 mL 沉淀后的活性污泥和 450 mL 无机介质培养基。MFC 的阴极室为好氧状态, 加入葡萄糖(0.5 g/L)作为微生物生长所需的碳源, 同时, 以溶解氧作为电子受体, 采用曝气系统持续曝气为阴极提供充足的溶解氧; 阳极室保持厌氧状态, 在污泥驯化期间, 向双室 MFC 阳极室分别加入硝酸盐(N-MFC)和硫酸盐(S-MFC),

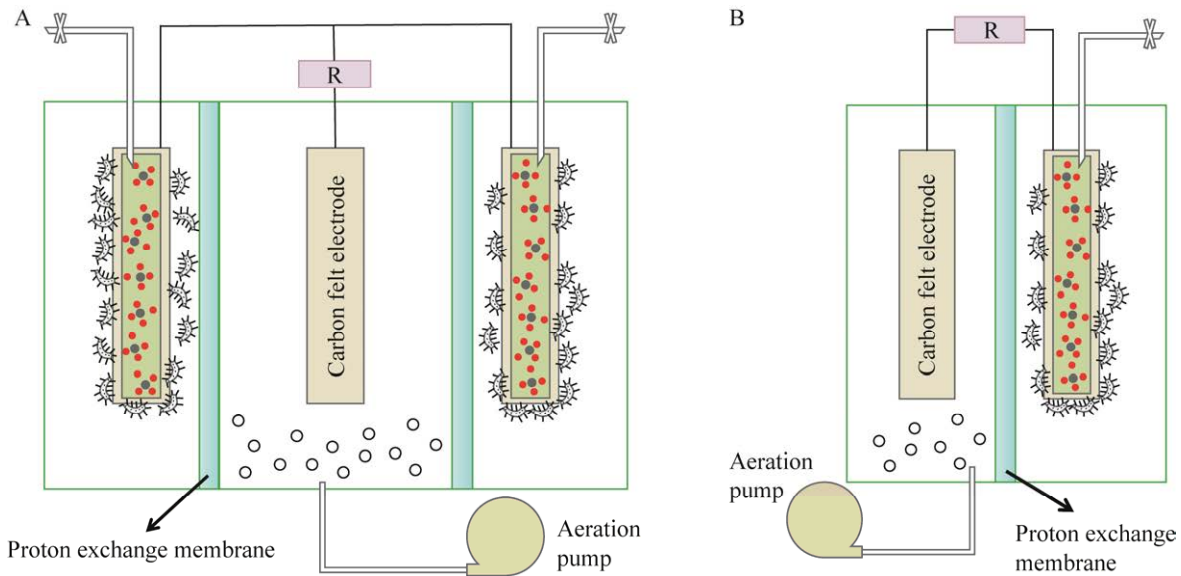


图 1 微生物燃料电池反应装置示意图 A: 双阳极室微生物燃料电池. B: 双室微生物燃料电池
Figure 1 Schematic diagram of MFCs reaction device. A: Dual anode chamber MFC. B: Dual chamber MFC.

3室MFC两侧阳极室也分别加入硝酸盐和硫酸盐(N-S-MFC)模拟人工废水,硝酸盐和硫酸盐的浓度分别为110 mg/L和1700 mg/L。所有溶液经高纯氩气(Ar)吹扫20 min以除去氧气,随后向阳极电极中通入纯甲烷气体,使其作为唯一的碳源供微生物生长,通过气体流量计将流量控制在5 mL/min,通入10 min。无机介质培养基主要包括: NH₄Cl 100 mg, NaH₂PO₄ 4538 mg, Na₂HPO₄ 8800 mg, KHCO₃ 500 mg, CaCl₂ 75.5 mg, MgSO₄·7H₂O 200 mg, 酸性微量元素溶液1 mL, 碱性微量元素溶液1 mL^[13], 蒸馏水1000 mL, 调节pH, 使进水的pH值保持在7.0左右。MFC启动后,在驯化期间,以10 d为一个周期,更换阳极室和阴极室无机介质培养基,每次更换培养基后用同样的方法去除氧气并通入甲烷气体,实验在室温下进行。

1.3 主要试剂和仪器

硝酸钠、硫酸钠、葡萄糖,阿拉丁试剂(上海)有限公司。质子交换膜,杜邦公司; TGuide

S96磁珠法土壤DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; PCR聚合酶,北京博美富鑫科技有限公司。气体流量计,杭州美控自动化技术有限公司; PCR仪, Applied Biosystems公司; 酶标仪,基因有限公司。紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.4 主要分析方法

为测定NO₃⁻、NO₂⁻、SO₄²⁻的浓度,取水样经0.22 μm滤膜过滤,检测方法依照国家环保总局编制的《水和废水监测分析方法》中的标准方法检测^[14]。NO₃⁻浓度采用氨基磺酸紫外分光光度法测量,NO₂⁻浓度采用N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测量,SO₄²⁻浓度采用铬酸钡分光光度法测量。

1.5 DNA的提取和高通量测序

1.5.1 微生物样品的采集

对采集的初始污泥和3室MFC的两侧阳极污泥进行取样,分别命名为M-I、M-N(模拟硝酸盐废水)、M-S(模拟硫酸盐废水),每个污泥

样品包括 3 个平行样。取适量样品于 5 mL 的离心管中, 8 000×g 离心 10 min, 弃去上清液, 收集沉淀于 2 mL 的离心管中, 置于-80 °C 环境下保存。

1.5.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

由北京百迈客生物科技有限公司对微生物群落进行 16S rRNA 基因高通量测序。采用 TGuide S96 磁珠法土壤 DNA 提取试剂盒提取 DNA。PCR 采用细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 作为扩增引物, PCR 反应体系和反应条件参考文献[15]。

2 结果与讨论

2.1 硝酸盐和硫酸盐的去除研究

三个 MFC 阳极中提供充足的甲烷气体, 探究其对硝酸盐和硫酸盐的去除性能, 实验结果如图 2 所示。由图 2A 可知, 经过 25 d 反应, N-S-MFC 中硝酸盐的去除率达到 90.91%, 出水浓度为 9.96 mg/L, 低于 10 mg/L, 达到生活饮用水卫生标准^[16]。然而 N-MFC 中硝酸盐去除率仅为 69.7%, 这是由于氮的氧化还原电位与氧的氧化还原电位比较接近, 阳极硝酸盐电子受体和阴极溶解氧电子受体之间存在激烈的竞争, 使甲烷分解产生的电子有一部分被传至阴极, 其余被硝酸盐利用, 同时产生了 10-13 mV 的电压(图 2B)。对于 N-S-MFC, 硝酸盐的去除率高主要归因于硫酸盐的协同作用。由于硫的氧化还原电位与氧的氧化还原电位相差较大, 所以阴极中溶解氧更容易得到硫酸盐阳极室中甲烷分解产生的电子。在硝酸盐阳极室中, 甲烷分解产生的电子几乎全部被硝酸盐利用, 仅有很少的电子被传至阴极, 因此硝酸盐的去除率高, 同时在硫酸盐阳极室的协同下产生的最

大电压为 180.76 mV。

根据图 2C 可知, 亚硝酸盐的积累量呈现出先增加后减少的趋势, 这是因为硝酸盐首先转化为亚硝酸盐, 而与亚硝酸盐还原相关的部分微生物需要一定的适应时间, 所以在反应开始的一段时间会出现亚硝酸盐的积累。其最大积累量为 11 mg/L, 不会对微生物的活性产生抑制。有研究报道, 高浓度的亚硝酸盐(即 30-50 mg/L)会对微生物的活性起到强烈的抑制作用^[17]。

从图 2D 可以看出, N-S-MFC 和 S-MFC 中硫酸盐的去除率分别为 18.46% 和 22.39%。在 N-S-MFC 中, 硝酸盐阳极室向阴极传递电子, 使硫酸盐阳极室传递至阴极的电子减少, 导致甲烷的分解量变少, 从而对硫酸盐的还原产生了一定的影响; 其次, 硫酸盐的去除率与硝酸盐的去除率相差较大, 这是因为与硝酸盐还原相关的微生物比与硫酸盐还原相关的微生物多。此外, 有研究发现大部分厌氧硫酸盐还原菌广泛分布在沉积物和海洋生态系统中, 在淡水中分布较少^[18]。然而在 S-MFC 中, 阴极得到的电子仅来自于单侧阳极, 所以硫酸盐的去除率略高, 同时产生的最大电压为 303.7 mV, 但是硫酸盐的去除率总体相差不大。

2.2 微生物多样性分析

为明确甲烷微生物燃料电池同步脱氮除硫的微生物多样性信息, 分别取 N-S-MFC 阳极室污泥和初始污泥经高通量测序进行分析。 α 多样性分析可以反映出样品中微生物的物种丰度和物种多样性。如表 1 所示, 3 个样品的 Coverage 指数分别为 99.90%、99.94% 和 99.92%, 表明该测试结果能够有效反映样品中微生物种类的真实信息。ACE 和 Chao1 指数表示微生物群落丰度, ACE 和 Chao1 值越大, 丰度越高; Shannon 和 Simpson 指数表示微生物群落多样性, Shannon 值越大, 而 Simpson 值越低, 表

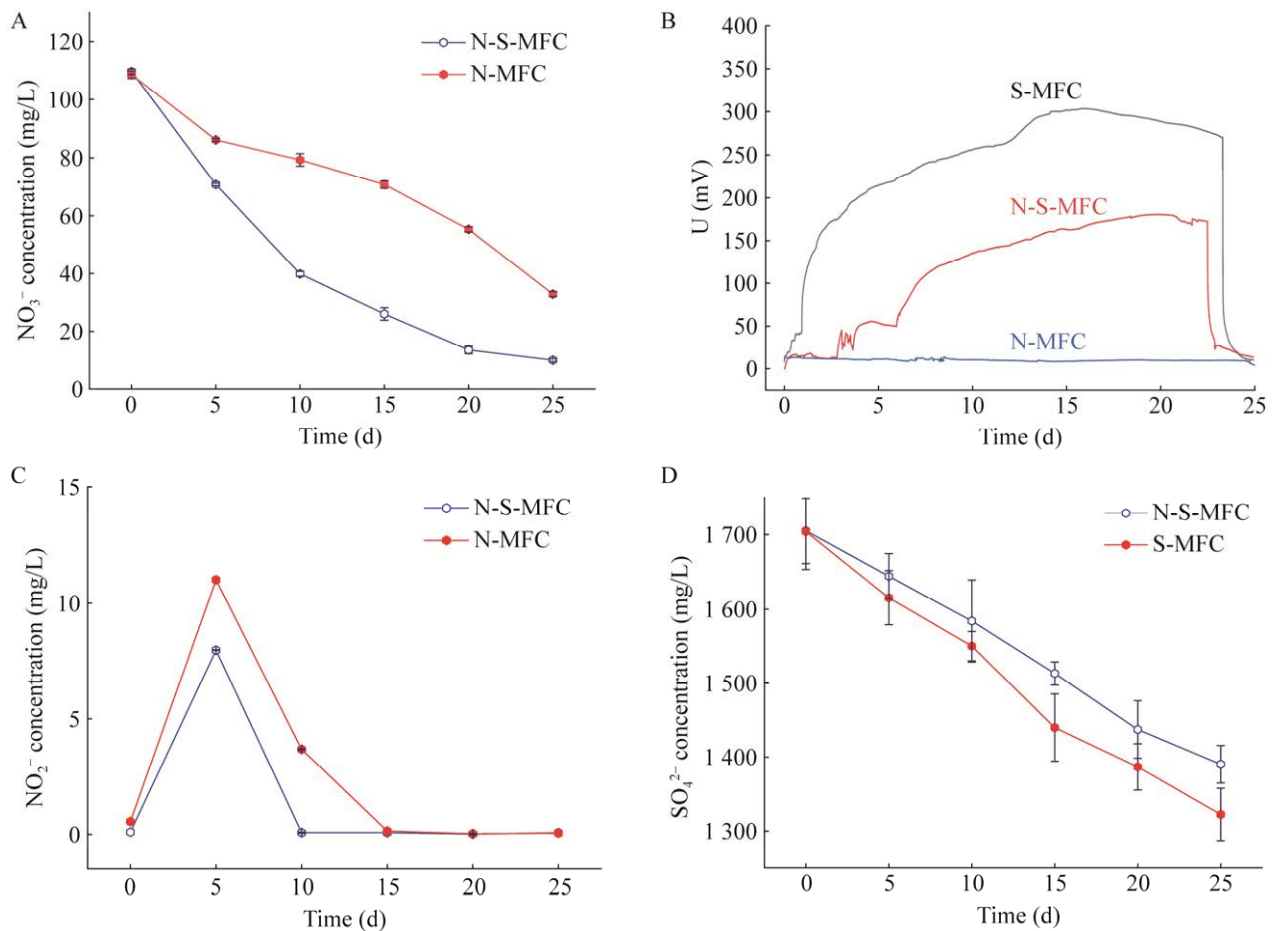


图2 MFCs 阳极脱氮除硫性能 A: 硝酸盐的去除. B: MFCs 成功启动后产电性能. C: 亚硝酸盐的积累量. D: 硫酸盐的去除

Figure 2 Nitrate and sulfate removal performance of MFCs anode. A: Removal of nitrate. B: Power generation performance after successful startup of MFCs. C: Accumulation of nitrite. D: Removal of sulfate.

表1 微生物样品 α 多样性指数分析

Table 1 Analysis of alpha diversity index of microbial samples

Sample	ACE index	Chao1 index	Simpson index	Shannon index	Coverage index
M-I	1 023.059	1 034.133	0.992 2	8.231 3	0.999 0
M-N	1 072.667	1 079.153	0.988 3	8.081 6	0.999 4
M-S	1 098.694	1 103.250	0.990 4	8.192 5	0.999 2

明微生物群落多样性越高^[19]。与 M-I 相比, M-N 和 M-S 的 ACE 和 Chao1 指数均有增加, ACE 指数增幅分别为 4.8%和 7.4%, Chao1 指数增幅分别为 4.35%和 6.68%,表明经驯化后微生物群落的丰度提高, 与脱氮除硫和甲烷氧化相关的

微生物得到富集^[20]; Shannon 和 Simpson 指数表明驯化后微生物群落多样性低于初始污泥的多样性。Sun 等^[21]研究指出, 细菌的单个基因组内存在基因的多样性, 采用 16S rRNA 基因测序得出的结果有一定的偏差。在本研究中,

驯化前后采用相同的方法进行微生物多样性测序,因此微生物相对多样性的变化情况具有一定的实际意义和参考价值。为了尽可能减少偏差,本研究选择 V3-V4 区域的扩增引物,减少对微生物多样性结果的影响。结果表明,在阳极厌氧条件下,MFC 驯化对微生物的菌群起到一定的选择作用,经驯化后的活性污泥逐渐向以甲烷为电子供体脱氮除硫功能菌群转变。

图 3 为微生物群落的稀释曲线,从图 3A 可以看出,3 个样品的稀释曲线最后都逐渐趋于平稳,表明样品测序数据合理,达到测试目的。对 3 个样品获得的有效序列数(reads)在 97.0%的相似度水平下进行聚类,获得分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)。如图 3B 所示,3 个样品共获得 1 125 个 OTU,其中有 938 个 OTU 重合,这表明 M-I、M-N 和 M-S 样品的组成中微生物种类的相似性较高。M-I 特有 14 个 OTU, M-N 和 M-S 特有的 OTU 分别为 6 和 10,经驯化后阳极微生物的种类变少,该结果与 α 多样性分析结果一致。此外,从图 3B 中可以看出, M-N 和 M-S 样品共有 101 个 OTU,远高于 M-I 和 M-N,以及 M-I 和 M-S 共有的数

目,这是因为有些微生物能够同时参与 DAMO 和 SAMO 反应^[6]。

2.3 双阳极 MFC 阳极微生物与初始污泥的群落结构和相对丰度分析

2.3.1 门水平上的种群结构分布

图 4 展示了微生物群落在门水平上的结构分布,在阳极室 M-N 和 M-S 中,变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirota*)为优势菌门。对比 M-I, *Proteobacteria* 的相对丰度分别下降了 9.8%和 11.1%;而 *Bacteroidota* 的相对丰度显著增加,所占比例分别为 22.4%和 19.6%。此外, *Nitrospirota* 和厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度也有所上升;而 *Acidobacteriota* 和放线菌门(*Actinobacteriota*)的丰度有略微的下降。在 M-S 中,相对丰度占比为 3.8%的 *Desulfobacterota* 出现了明显的增加。

Bacteroidota 和 *Proteobacteria* 在许多 MFC 研究中被报道为优势菌门^[22],而且被认为是最常见的反硝化菌门之一,许多反硝化细菌和甲烷氧化菌都属于这两个菌门^[23]。*Bacteroidota* 中

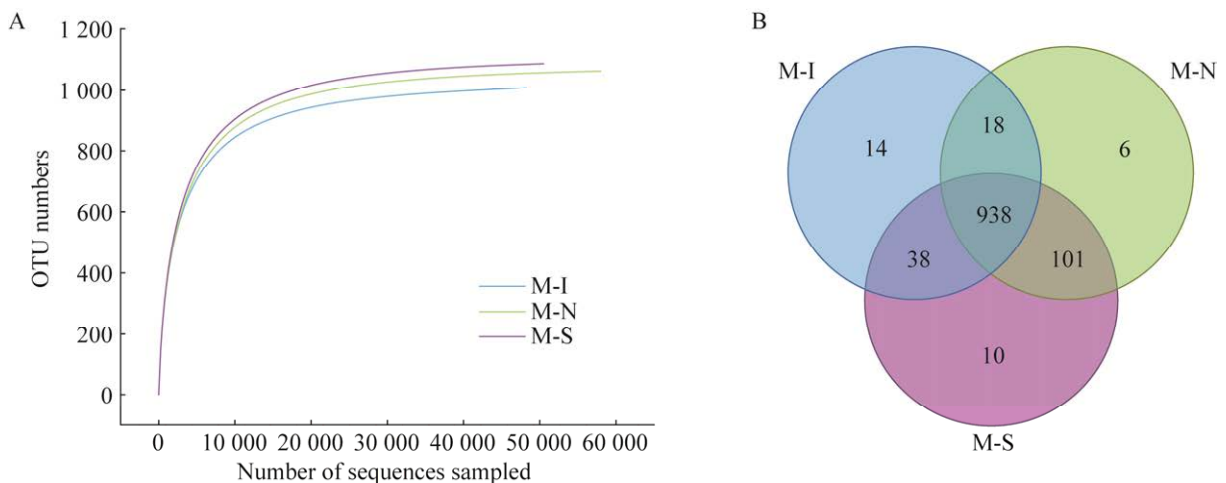


图 3 双阳极 MFC 阳极污泥和初始污泥微生物群落的稀释曲线图(A)和 OTU 分布的韦恩图(B)

Figure 3 Rarefaction curve (A) and Venn diagram of OTU distribution (B) of dual-anode MFC anode sludge and initial sludge microbial communities.

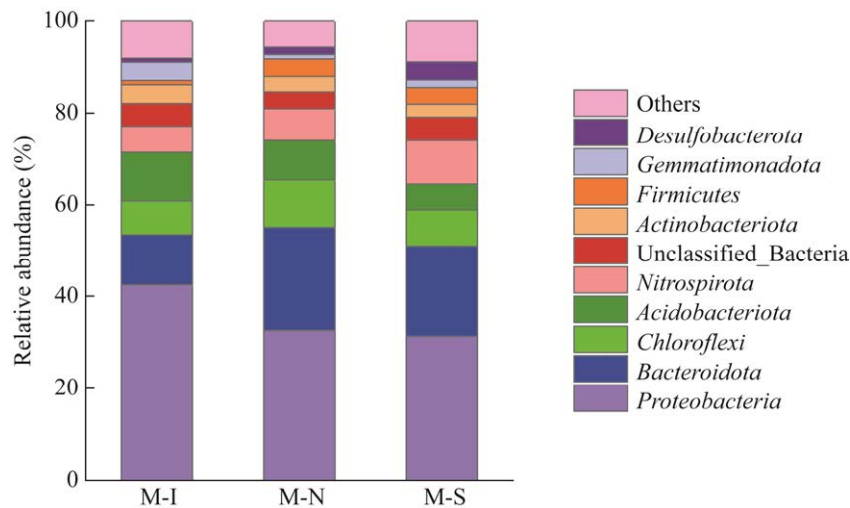


图 4 双阳极 MFC 阳极污泥和初始污泥微生物群落门水平上相对丰度占比

Figure 4 Relative abundance ratio at the phylum level of dual-anode MFC anode sludge and initial sludge microbial communities.

部分微生物具有厌氧特性, 可以与甲烷氧化菌耦合, 共同将甲烷转化为短链脂肪酸^[24]。结果表明, 在甲烷驱动驯化后, *Bacteroidota* 丰度明显增加, 对硝酸盐、硫酸盐的去除和甲烷的分解有促进作用。*Proteobacteria* 是一种电活性细菌, 参与电子向电极转移的过程。驯化后其相对丰度减少是由于反应过程中使用了大量的有机物, 导致电活性细菌可用碳源减少, 因此对 MFC 产电造成一定的影响^[25]。相关研究表明, *Firmicutes* 是一种高效的反硝化菌, 可以在厌氧条件下催化反硝化过程, 将复杂的有机物降解为简单的有机物, 在硫酸盐还原菌的作用下进行硫酸盐还原^[26]。经富集后 *Firmicutes* 相对丰度增加, 主要是由反硝化菌生长繁殖引起的, 对系统厌氧脱氮除硫具有积极作用^[23]。*Desulfobacterota* 为脱硫杆菌门, 有研究报道指出, 其有些菌属可以在厌氧条件下还原硫酸盐^[27]。此外, 硫酸盐还原菌中部分菌属与 AOM 相关联, 形成混合型聚合团, 共同分解甲烷和还原硫酸盐, 在此过程中将甲烷转化为二氧化碳, 将硫酸盐转化为硫化氢^[28]。脱硫杆菌门的富集与本研究中的

硫酸盐去除有密切的关系, 在系统中发挥扮演着重要的作用。

2.3.2 属水平上的种群结构分布

如图 5 所示, 在属水平上, M-I 中检测到的菌属主要包括硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)、unclassified_Bacteria、unclassified_Gemmatimonadaceae、unclassified_Saprospiraceae 和 *Denitratisoma*。与 M-I 相比, M-N 和 M-S 中食酸菌属(*Acidovorax*)的相对丰度显著增加, 所占比例分别达到了 6.7% 和 2.9%; 其次, *Nitrospira* 的相对丰度也有所增加, 在 M-N 和 M-S 中相对丰度最高, 分别为 6.9% 和 9.5%。此外, 在“Other”分类中检测到了甲烷氧化菌, 如 *Methylobacterium_Methylorubrum*、*Methylocaldum*、*Methylomonas*、*Methylotenera*、unclassified_Methylococcaceae、unclassified_Methylophilaceae 和 unclassified_Methylomonadaceae 等, 这对系统中甲烷的分解起着至关重要的作用。*Methylobacterium_Methylorubrum* 和 *Methylocaldum* 属于 I 型甲烷营养体, 对环境条件的改变有较强的适应能力, 在缺氧的条件下可将甲烷转化为中间产物或二

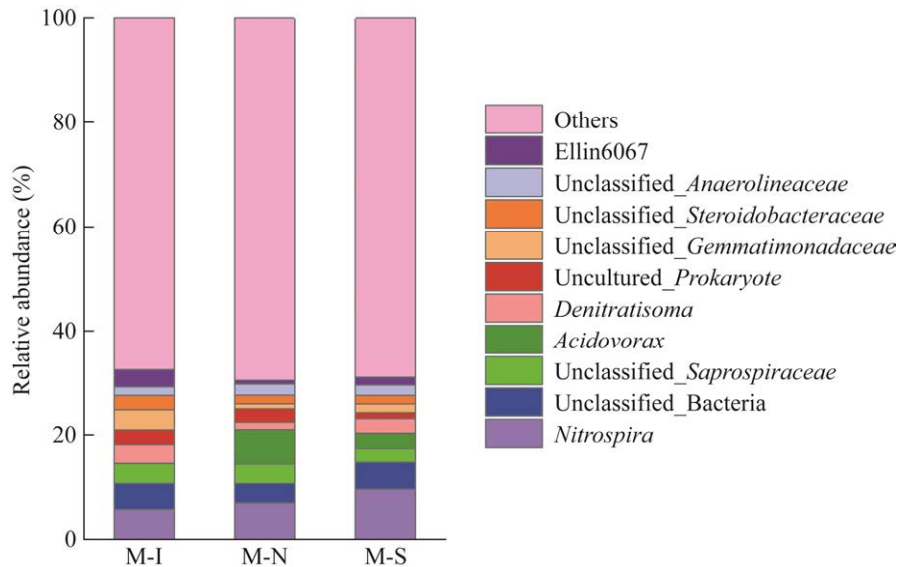


图5 双阳极MFC阳极污泥和初始污泥微生物群落属水平上相对丰度占比

Figure 5 Relative abundance ratio at the genus level of dual-anode MFC anode sludge and initial sludge microbial communities.

氧化碳^[29]。*Methylotenera* 和 unclassified_ *Methylophilaceae* 属于嗜甲基菌科，有研究表明，该菌与 unclassified_ *Methylococcaceae* 之间存在合作关系，unclassified_ *Methylococcaceae* 氧化甲烷代谢产生甲醇，unclassified_ *Methylophilaceae* 以硝酸盐作为电子受体，利用甲醇作为碳源氧化甲醇的同时进行反硝化反应，实现硝酸盐的去除^[30]。*Methylomonas* 和 unclassified_ *Methylomonadaceae* 属于甲基单胞菌科，能够以一种有利的方式将甲烷氧化与硝酸盐还原耦合起来，分解甲烷的同时进行脱氮^[31]。由此可见，硝酸盐和硫酸盐的去除与甲烷的分解密切相关，甲烷氧化菌发挥关键的作用。*Nitrospira* 是一类革兰氏阴性细菌，外形呈螺旋状，在低浓度溶解氧的条件下具有较强的代谢活性，在氮循环所需的亚硝酸盐氧化过程中发挥着重要作用^[32-35]。本研究过程中出现了亚硝酸盐的积累，为 *Nitrospira* 的生长提供了大量的氮源，因此，其相对丰度增加。*Acidovorax* 作为一种反硝化

细菌，在缺氧的条件下可以利用甲烷分解的中间产物(例如甲醇)作为生长所需的碳源^[36]，为反硝化过程提供电子，从而促进了阳极反硝化脱氮和反硝化除硫。表2为属水平上其他主要功能菌的代谢情况。

3 结论

在 N-S-MFC 中，硝酸盐和硫酸盐的去除率分别为 90.91%和 18.46%，比 N-MFC 中硝酸盐的去除率高，与 S-MFC 中硫酸盐的去除率相差不多，N-S-MFC 对硝酸盐还原有积极作用，而对硫酸盐还原几乎无影响。驯化后微生物的相对丰度提高、多样性减少，门水平上 *Bacteroidota* 和 *Proteobacteria* 以及属水平上 *Acidovorax* 对脱氮除硫和甲烷的分解起到关键作用，在属水平上检测到 *Methylobacterium_Methylorubrum*、*Methylocaldum*、*Methylomonas*、*Methylotenera* 等常见的甲烷氧化菌的富集，为 AOM-MFC 同步脱氮除硫提供了有利条件。

表 2 属水平上主要微生物的代谢功能

Table 2 Metabolic functions of major microorganisms at the genus level

微生物菌种	主要代谢功能	参考文献
Microbial species	Main metabolic functions	References
Unclassified_ <i>Saprosiraceae</i>	兼性厌氧菌, 对溶解氧的含量有一定要求, 降解有机物的同时可以利用硝酸盐作为电子受体进行反硝化脱氮 Fastigenative anaerobic bacteria, with certain requirements for dissolved oxygen content, can use nitrate as electron acceptor for denitrification while degrading organic matter	[37-40]
<i>Acidovorax</i>	部分菌种具有氢自养反硝化功能, 在缺氧的条件下利用有机物产生电子 Some species have hydrogen autotrophic denitrification function, and use organic matter to produce electrons under anoxic conditions	[41-43]
<i>Denitratisoma</i>	隶属于红环菌科, 是主要的异相反硝化菌, 利用好氧反硝化酶的作用进行反硝化 It belongs to the family <i>Erythrobacteriaceae</i> and is the main heterogeneous denitrifying bacteria, using the action of aerobic denitrifying enzymes for denitrification	[26,32,44-45]
Unclassified_ <i>Gemmatimonadaceae</i>	革兰氏阴性细菌, 参与氮的转化 Gram-negative bacteria, involved in the conversion of nitrogen	[46]
<i>Crenothrix</i>	隶属于 γ -变形菌纲, 在缺氧条件下催化甲烷氧化, 还原硝酸盐 It belongs to the <i>gammaproteobacteria</i> , which catalyzes the oxidation of methane and the reduction of nitrate under anoxic conditions	[47-48]
Unclassified_ <i>Anaerolineaceae</i>	隶属于绿弯菌门, 为革兰氏阴性细菌, 在严格的厌氧条件下生长, 参与反硝化过程中氮素的去除 Belonging to the phylum <i>Chloroflexi</i> . It is a Gram-negative bacterium that grows under strict anaerobic conditions and participates in the removal of nitrogen during denitrification	[49-50]
<i>Desulfomicrobium</i>	在同一环境中与反硝化菌共生, 参与硫酸盐还原过程, 将硫酸盐转化为硫化物 Symbiosis with denitrifying bacteria in the same environment, participating in the sulfate reduction process and converting sulfate to sulfide	[6,51]
<i>Desulfovibrio</i>	电活性细菌, 通过细胞色素 C 转移电子至电极表面 Electroactive bacteria, transferring electrons to the electrode surface via cytochrome C	[36,51]
<i>Thiobacillus</i>	硫自养反硝化菌属, 参与直接细胞外电子转移 Sulfur autotrophic denitrifying bacteria, involved in direct extracellular electron transfer	[52-53]

REFERENCES

- [1] ETTWIG KF, ZHU BL, SPETH D, KELTJENS JT, JETTEN MSM, KARTAL B. Archaea catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(45): 12792-12796.
- [2] CUI MM, MA AZ, QI HY, ZHUANG XL, ZHUANG GQ. Anaerobic oxidation of methane: an "active" microbial process[J]. MicrobiologyOpen, 2015, 4(1): 1-11.
- [3] 翟俊, 李媛媛, 何孟狄, 马宏璞, 戴元贵. 淡水系统中甲烷厌氧氧化古菌的研究进展[J]. 环境工程学报, 2019, 13(5): 1009-1020.
- ZHAI J, LI YY, HE MD, MA HP, DAI YG. Review on the research progress of archaeal anaerobic methanotrophs in freshwater system[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(5): 1009-1020 (in Chinese).
- [4] CALDWELL SL, LAIDLER JR, BREWER EA, EBERLY JO, SANDBORGH SC, COLWELL FS. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(18): 6791-6799.
- [5] HUANG HB, CHENG SA, LI FJ, MAO ZZ, LIN ZF, CEN KF. Enhancement of the denitrification activity by exoelectrogens in single-chamber air cathode microbial fuel cells[J]. Chemosphere, 2019, 225: 548-556.

- [6] XUE S, CHAI FG, LI L, WANG WW. Conversion and speculated pathway of methane anaerobic oxidation co-driven by nitrite and sulfate[J]. *Environmental Research*, 2022, 208: 112662.
- [7] CASSARINI C, RENE ER, BHATTARAI S, ESPOSITO G, LENS PNL. Anaerobic oxidation of methane coupled to thiosulfate reduction in a biotrickling filter[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 240: 214-222.
- [8] HOU B, ZHANG R, LIU XY, LI Y, LIU PX, LU J. Study of membrane fouling mechanism during the phenol degradation in microbial fuel cell and membrane bioreactor coupling system[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 338: 125504.
- [9] YU LP, YANG ZJ, HE QX, ZENG RJ, BAI YN, ZHOU SG. Novel gas diffusion cloth bioanodes for high-performance methane-powered microbial fuel cells[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(1): 530-538.
- [10] DING J, LU YZ, FU L, DING ZW, MU Y, CHENG SH, ZENG RJ. Decoupling of DAMO archaea from DAMO bacteria in a methane-driven microbial fuel cell[J]. *Water Research*, 2017, 110: 112-119.
- [11] SU CY, DENG QJ, CHEN ZP, LU XY, HUANG Z, GUAN X, CHEN ML. Denitrifying anaerobic methane oxidation process responses to the addition of growth factor betaine in the MFC-granular sludge coupling system: enhancing mechanism and metagenomic analysis[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 126139.
- [12] MCANULTY MJ, POOSARLA VG, KIM KY, JASSO-CHÁVEZ R, LOGAN BE, WOOD TK. Electricity from methane by reversing methanogenesis[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15419.
- [13] 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.
- [14] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2022.
Editorial Committee of Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods of State Environmental Protection Administration. *Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods*[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2022 (in Chinese).
- [15] CASTRO-GUTIERREZ VM, HASSARD F, MOIR JWB. Probe-based qPCR assay enables the rapid and specific detection of bacterial degrading genes for the pesticide metaldehyde in soil[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2022, 195: 106447.
- [16] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准: GB 5749—2022[S]. 北京: 中国标准出版社.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. *Sanitary Standard for Drinking Water: GB 5749—2022*[S]. Beijing: China Standard Press (in Chinese).
- [17] FU L, DING J, LU YZ, DING ZW, BAI YN, ZENG RJ. Hollow fiber membrane bioreactor affects microbial community and morphology of the DAMO and anammox co-culture system[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 232: 247-253.
- [18] KNITTEL K, BOETIUS A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 311-334.
- [19] WANG BJ, LU LL, ZHANG Y, FANG KY, AN D, LI HJ. Removal of bisphenol a by waste zero-valent iron regulating microbial community in sequencing batch biofilm reactor[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 753(37): 142073.
- [20] 席婧茹, 刘素琴, 李琳, 刘俊新. 硫酸盐还原型甲烷厌氧氧化菌群驯化及其群落特征[J]. *环境科学*, 2014, 35(12): 4602-4609.
XI JR, LIU SQ, LI L, LIU JX. Acclimatization and characteristics of microbial community in sulphate-dependent anaerobic methane oxidation[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(12): 4602-4609 (in Chinese).
- [21] SUN DL, JIANG X, WU QL, ZHOU NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969.
- [22] SOTRES A, CERRILLO M, VIÑAS M, BONMATÍ A. Nitrogen removal in a two-chambered microbial fuel cell: establishment of a nitrifying-denitrifying microbial community on an intermittent aerated cathode[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 284: 905-916.
- [23] CHEN D, WANG HY, YANG K, MA F. Performance and microbial communities in a combined bioelectrochemical and sulfur autotrophic denitrification system at low temperature[J]. *Chemosphere*, 2018, 193: 337-342.

- [24] BAI YN, ZHANG F, YU LP, ZHANG YL, WU Y, LAU TC, ZHAO HP, ZENG RJ. Acetate and electricity generation from methane in conductive fiber membrane-microbial fuel cells[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 804: 150147.
- [25] WANG Q, LV RY, RENE ER, QI XY, HAO Q, DU YD, ZHAO CC, XU F, KONG Q. Characterization of microbial community and resistance gene (*CzcA*) shifts in up-flow constructed wetlands-microbial fuel cell treating Zn(II) contaminated wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 302: 122867.
- [26] WANG HX, ZHANG ML, LÜ Q, XUE JB, YANG J, HAN XM. Effective co-treatment of synthetic acid mine drainage and domestic sewage using multi-unit passive treatment system supplemented with silage fermentation broth as carbon source[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 310: 114803.
- [27] WARD LM, BERTRAN E, JOHNSTON DT. Draft genome sequence of *Desulfovibrio sulfodismutans* ThAc01, a heterotrophic sulfur-disproportionating member of the *Desulfobacterota*[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, 9(13): e00202-e00220.
- [28] LI L, XUE S, XI JR. Anaerobic oxidation of methane coupled to sulfate reduction: consortium characteristics and application in co-removal of H₂S and methane[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2019, 76: 238-248.
- [29] CAO Q, LI XZ, XIE ZJ, LI CN, HUANG SY, ZHU BJ, LI D, LIU XF. Compartmentation of microbial communities in structure and function for methane oxidation coupled to nitrification-denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125761.
- [30] GRINSVEN SV, DAMSTÉ JSS, HARRISON J, POLERECKY L, VILLANUEVA L. Nitrate promotes the transfer of methane-derived carbon from the methanotroph *Methylobacter* sp. to the methylotroph *Methylotenera* sp. in eutrophic lake water[J]. *Limnology and Oceanography*, 2020, 66(3): 11648-11661.
- [31] 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.
- [32] 姚丽婷, 梁瑜海, 陈漫霞, 陈莉丹, 何坤桓, 余光伟. 高溶解氧条件下不同曝气量对短程硝化性能及微生物特征的影响[J]. *环境科学学报*, 2021, 41(8): 3258-3267.
- YAO LT, LIANG YH, CHEN MX, CHEN LD, HE KH, YU GW. Effects of aeration rates on the performance and microbial characteristics of partial nitrification under high dissolved oxygen condition[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(8): 3258-3267 (in Chinese).
- [33] 史文燕, 张健. 硝化杆菌(*Nitrobacte*)和硝化螺菌(*Nitrospira*)在脱氮系统中的研究进展[J]. *应用化工*, 2020, 49(10): 2581-2585.
- SHI WY, ZHANG J. Research progress of *Nitrobacter* and *Nitrospira* in the nitrogen removal system[J]. *Applied Chemical Industry*, 2020, 49(10): 2581-2585 (in Chinese).
- [34] ZHOU ZC, MENG H, GU WJ, LI J, DENG MC, GU JD. High-throughput sequencing reveals the main drivers of niche-differentiation of bacterial community in the surface sediments of the northern South China Sea[J]. *Marine Environmental Research*, 2022, 178: 105641.
- [35] YU X, CHEN H, LIU YF, YU LY, WANG K, XUE G. Iron scraps packing rapidly enhances nitrogen removal in an aerobic sludge system and the mechanism[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 856(Pt 1): 159081.
- [36] REN YP, LV Y, WANG Y, LI XF. Effect of heterotrophic anodic denitrification on anolyte pH control and bioelectricity generation enhancement of bufferless microbial fuel cells[J]. *Chemosphere*, 2020, 257: 127251.
- [37] LIANG BR, KANG F, YAO S, ZHANG K, WANG YZ, CHANG MD, LYU ZN, ZHU T. Exploration and verification of the feasibility of the sulfur-based autotrophic denitrification integrated biomass-based heterotrophic denitrification systems for wastewater treatment: from feasibility to application[J]. *Chemosphere*, 2022, 287(Pt 1): 131998.
- [38] dos SANTOS CED, COSTA RB, RABELO CABS, JÚNIOR ADNF, PERSINOTI GF, POZZI E, FORESTI E, DAMIANOVIC MHRZ. Hacking biofilm developed in a structured-bed reactor (SBRR) with integrated processes of nitrogen and organic matter removal[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(9): 1841-1851.
- [39] ZHANG M, GAO J, LIU QL, FAN YJ, ZHU CJ, LIU YZ, HE CD, WU J. Nitrite accumulation and microbial behavior by seeding denitrifying phosphorus removal sludge for partial denitrification (PD): the effect of COD/NO₃⁻ ratio[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124524.

- [40] CAO JS, ZHANG T, WU Y, SUN YQ, ZHANG YL, HUANG B, FU BM, YANG E, ZHANG Q, LUO JY. Correlations of nitrogen removal and core functional genera in full-scale wastewater treatment plants: influences of different treatment processes and influent characteristics[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122455.
- [41] 邵劲博, 荣懿, 刘星, 孙辉, 刘岳华, 金鹏康. 基于污水排放特性的陕南村镇污水处理厂优化运行与节能降耗研究[J]. *给水排水*, 2022, 48(8): 24-30. SHAO JB, RONG Y, LIU X, SUN H, LIU YH, JIN PK. Study on rural wastewater discharge characteristics and optimal operation of typical township wastewater treatment plants in southern Shaanxi[J]. *Water & Wastewater Engineering*, 2022, 48(8): 24-30 (in Chinese).
- [42] WANG LM, PANG QQ, ZHOU Y, PENG FQ, HE F, LI WX, XU B, CUI YB, ZHU X. Robust nitrate removal and bioenergy generation with elucidating functional microorganisms under carbon constraint in a novel multinode tidal constructed wetland coupled with microbial fuel cell[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123744.
- [43] PARK Y, PARK S, NGUYEN VK, YU J, TORRES CI, RITTMANN BE, LEE T. Complete nitrogen removal by simultaneous nitrification and denitrification in flat-panel air-cathode microbial fuel cells treating domestic wastewater[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 316: 673-679.
- [44] 周锋, 刘勇弟, 厉巍. 同步短程硝化-厌氧氨氧化-短程反硝化颗粒污泥培育过程及其性能[J]. *环境科学*, 2021, 42(10): 4864-4871. ZHOU F, LIU YD, LI W. Cultivation and performance analysis of simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification granular sludge[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(10): 4864-4871 (in Chinese).
- [45] 宋利国, 宋维星, 王宜东, 周衍平, 洪波, 季军远. 盐胁迫对间歇增氧垂直流人工湿地脱氮性能及微生物群落影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2022, 52(3): 106-116. SONG LG, SONG WX, WANG YD, ZHOU YP, HONG B, JI JY. Effects of salinity on nitrogen removal performance and microbial community of intermittent aeration vertical flow constructed wetland[J]. *Periodical of Ocean University of China (Natural Edition)*, 2022, 52(3): 106-116 (in Chinese).
- [46] ZENG TT, WANG LQ, ZHANG XL, SONG X, LI J, YANG JH, CHEN SB, ZHANG J. Characterization of microbial communities in wastewater treatment plants containing heavy metals located in chemical industrial zones[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(11): 6529.
- [47] OSWALD K, GRAF JS, LITTMANN S, TIENKEN D, BRAND A, WEHRLI B, MILUCKA J. *Crenothrix* are major methane consumers in stratified lakes[J]. *The ISME Journal Emultidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2017, 11(09): 2124-2140.
- [48] SU GY, ZOPFI J, NIEMANN H, LEHMANN MF. Multiple groups of methanotrophic bacteria mediate methane oxidation in anoxic lake sediments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 864630.
- [49] 张弘杰, 徐慧敏, 过梓桐, 何斐, 曾巾, 赵大勇. 水产养殖不同物种对水体和沉积物中细菌群落的影响[J]. *生态学报*, 2022, 42(8): 3254-3266. ZHANG HJ, XU HM, GUO ZX, HE F, ZENG J, ZHAO DY. Effects of different aquacultural species on planktonic and sedimental bacterial communities[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(8): 3254-3266 (in Chinese).
- [50] CHEN C, LI SQ, XU XQ, MA MM, MI TZ, ZHEN Z, YU ZG. Characterization of microbial communities in sediments of the South Yellow Sea[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(3): 846-864.
- [51] LI ZL, ZHU ZL, LIN XQ, CHEN F, LI X, LIANG B, HUANG C, ZHANG YM, SUN K, ZHOU AN, WANG AJ. Microbial fuel cell-upflow biofilter coupling system for deep denitrification and power recovery: efficiencies, bacterial succession and interactions[J]. *Environmental Research*, 2021, 196: 110331.
- [52] 刘永杰. 基于自养反硝化的沼气脱硫与废水脱氮同步处理技术研究[D]. 北京: 中国地质大学博士学位论文, 2019. LIU YJ. Study on simultaneous treatment technology of biogas desulfurization and wastewater denitrification based on autotrophic denitrification[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China University of Geosciences, 2019 (in Chinese).
- [53] ABADA B, BOUMERFEG S, HADDAD A, ETIENNE M. Electrochemical investigation of *Thiobacillus denitrificans* in a bacterial composite[J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2020, 167(13): 135502.