

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
 54 (2) :129 - 138; 4 February 2014  
 ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
 http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
 doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.002

## 微生物厌氧甲烷氧化反硝化研究进展

袁梦冬, 朱静, 吴伟祥\*

浙江大学环境与资源学院, 环境保护研究所, 浙江 杭州 310058

**摘要:** 厌氧甲烷氧化反硝化过程 (Denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO) 以甲烷为电子供体进行反硝化作用, 在实现废水脱氮处理的同时, 可有效削减温室气体甲烷的排放, 从而减缓全球温室效应。相关机制研究集中在逆向产甲烷途径耦合反硝化和亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化 (nitrite-dependent anaerobic methane oxidation, n-damo) 两个方面。鉴于厌氧甲烷氧化反硝化过程对全球碳氮物质循环的重要意义, 本文对近年来厌氧甲烷氧化反硝化过程的研究进展进行了概述, 着重阐述了有关厌氧甲烷氧化反硝化微生物富集培养物, 特别是含 *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (*M. oxyfera*) 富集培养物的微生物特性、甲烷氧化反硝化的机理以及影响因子。在此基础上, 探讨了厌氧甲烷氧化反硝化过程未来的研究方向和工业化应用前景。

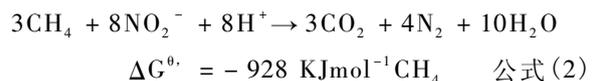
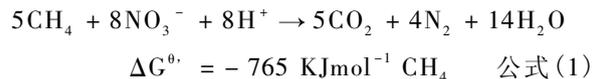
**关键词:** 厌氧甲烷氧化反硝化 (DAMO), 亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化 (n-damo), *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*, 内部好氧, 微生物机制

中图分类号: X172, X52 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 02-0129-10

近年来, 由于工业和农业废水的超标排放, 我国地表水体氮素含量不断升高, 水体富营养化事件频频发生, 严重威胁人畜饮用水安全。厌氧和好氧处理相结合的工艺是目前我国工业和农业废水处理常用的技术。然而此类技术的应用, 尤其是在中小型废水处理厂, 往往导致厌氧段温室气体甲烷<sup>[1-2]</sup>难以有效资源化利用而大量无序排放、好氧段处理出水 C/N 低、反硝化深度脱氮处理碳源不足、出水难以达标等一系列环境与经济问题。

根据化学反应热力学可以预测, 厌氧条件下  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  可以作为甲烷氧化过程的电子受体<sup>[3]</sup> (如式 1 和式 2 所示)。2006 年 Raghoebarsing 等首次得到厌氧甲烷氧化反硝化富集物<sup>[4]</sup>, 证实了自然

界中存在厌氧甲烷氧化反硝化过程及其在废水处理中应用的可行性。该过程在对低 C/N 废水脱氮处理上具有明显优势。首先, 厌氧甲烷氧化反硝化过程可以利用厌氧段无法完全回收的甲烷对废水进行脱氮处理, 实现了甲烷的资源化利用, 并可有效减缓甲烷排放引发的温室效应; 其次, 该过程可以以甲烷为外加碳源对好氧段低 C/N 出水进行氮素的深度脱除, 进一步降低出水含氮量。



厌氧甲烷氧化反硝化过程以甲烷为电子供体,

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项项目 (201303091); 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2012ZX07101012, 2008ZX07101-006)

\* 通信作者。Tel: +86-571-86956884; E-mail: weixiang@zju.edu.cn

作者简介: 袁梦冬 (1988-), 女, 山东泰安人, 博士研究生, 主要从事畜禽养殖废水脱氮处理的研究。E-mail: yuan1988\_10@126.com

收稿日期: 2013-06-01; 修回日期: 2013-07-08

进行氮素的脱除反应<sup>[5-6]</sup>。作为碳氮循环的重要桥梁,其发现对加深全球碳氮循环的理解亦具有重要的意义。鉴于此,本文简要总结了近年来国内外微生物厌氧甲烷氧化反硝化过程机理的研究进展,阐述了相关微生物富集培养物的组成以及代表性微生物 *M. oxyfera* 的微生物学特性,并探讨厌氧甲烷氧化反硝化过程未来的研究方向和工业化应用前景。

## 1 微生物厌氧甲烷氧化反硝化的发生机理

目前有关微生物厌氧甲烷氧化反硝化过程机理的研究尚处于起步阶段。由于缺乏足够的厌氧甲烷氧化反硝化微生物富集培养物,其机理研究较为滞后。已提出的有关该过程发生的微生物学机理主要有两种:一种是 Raghoebarsing 等人于 2006 年提出的逆向产甲烷途径耦合反硝化作用,即古菌经逆向产甲烷途径氧化甲烷后提供电子给细菌完成反硝化作用<sup>[4]</sup>;另一种是新型内部好氧的亚硝酸盐依赖型

厌氧甲烷氧化机理<sup>[3,7]</sup>,2010 年由 Ettwig 提出。

### 1.1 逆向产甲烷耦合反硝化途径

逆向产甲烷途径 (Reverse methanogenesis)<sup>[8-11]</sup> 是最早提出的厌氧甲烷氧化发生过程的假说,由厌氧甲烷氧化古菌完成。由于产甲烷过程所涉及的大部分酶促反应均可逆,该理论依据提示存在逆向产甲烷的途径。Zehnder 等<sup>[12]</sup> 通过同位素试验发现,厌氧条件下产甲烷菌可在产甲烷的同时氧化少量的甲烷并生成甲醇、甲酸和 CO<sub>2</sub> 等中间产物。Hallam 等<sup>[13]</sup> 利用全基因组鸟枪法和 Fosmid 文库法分析了厌氧甲烷氧化古菌富集物 (Eel River),从分子生物学角度证实了厌氧甲烷氧化古菌中含有除编码亚甲基-H<sub>4</sub>MPT 还原酶的功能基因之外的所有产甲烷基因,并提出了相关逆向产甲烷理论的模型:该途径经过甲烷活化,以及一系列脱氢酶的作用,最终被氧化为 CO<sub>2</sub> (图 1)<sup>[14-15]</sup>。由于甲烷很稳定,该途径中以甲烷的活化过程最难发生,甲基辅酶 M 还原酶 (methyl-coenzyme M reductase, MCR) 在该途径中起到活化甲烷的作用,编码 MCR 的 *mcrA* 基因以及检

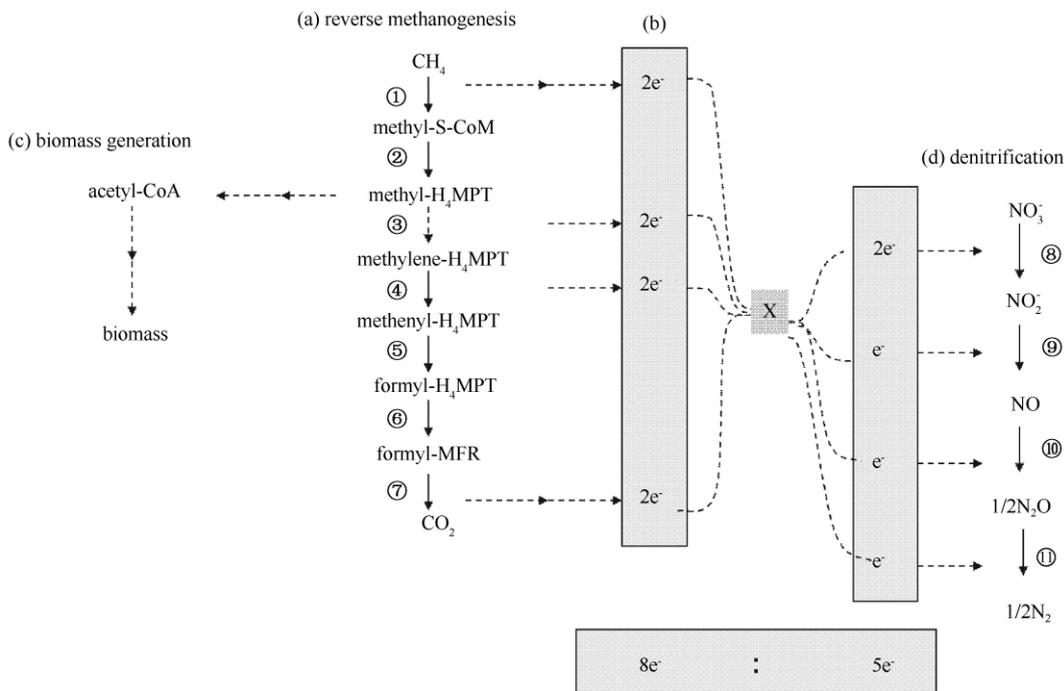


图 1. Chistoserdova L 等提出的逆向产甲烷耦合反硝化途径<sup>[14]</sup>

Figure 1. Pathway for reverse methanogenesis (a) coupled to denitrification (d) proposed by Chistoserdova L et al. ①-11 perform the enzymes in this process: ① Methyl-CoM reductase-like protein (MCR); ② Methyl-H<sub>4</sub>MPT: coenzyme M (CoM) methyl-transferase (Mtr); ③ Methylene-H<sub>4</sub>MPT (Mer); ④ F420-dependent methylene - H<sub>4</sub>MPT dehydrogenase (Mtd); ⑤ Methenyl-H<sub>4</sub>MPT cyclohydrolase (Mch); ⑥ Formyl-MFR: H<sub>4</sub>MPT formyltransferase (Ftr); ⑦ Formyl-MFR dehydrogenase (Fmd); ⑧ Nitrate reductase (Nar); ⑨ Nitrite reductase (Nir); ⑩ Nitric oxide reductase (Nor); ⑪ Nitrous oxide reductase (Nos). Reverse methanogenesis is thought to be connected to denitrification through an unknown intermediate (X); e<sup>-</sup> represents an electron.

测 MCR 存在的镍辅因子  $F_{430}$ , 即成为表征逆向产甲烷过程的重要标记物<sup>[8,13]</sup>。

2006 年, Raghoebarsing 等<sup>[4]</sup> 首次利用同位素示踪试验发现, 厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物在进行厌氧甲烷氧化反硝化过程中生成了甲醇或乙酸盐等物质, 该过程涉及到逆向产甲烷过程的部分中间产物, 推测其厌氧甲烷氧化过程极有可能是通过逆向产甲烷过程完成的。分子生物学和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, MALDI-TOF) 结果分析表明厌氧甲烷氧化富集培养物中存在 *mcrA* 基因序列和  $F_{430}$ , 同样支持逆向产甲烷途径<sup>[16]</sup>。据此, Raghoebarsing 等推测, 厌氧甲烷氧化反硝化过程由厌氧甲烷氧化古菌和反硝化细菌共同作用完成, 甲烷在厌氧甲烷氧化古菌的作用下经逆向产甲烷途径转化为  $CO_2$ , 生成的甲醇和乙酸盐等中间产物及释放出的电子提供给反硝化细菌还原  $NO_2^-$  和  $NO_3^-$ , 最终完成反硝化过程。

## 1.2 内部好氧的亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化机理

随着研究的深入, Ettwig 等发现逆向产甲烷途径耦合反硝化过程无法完全解释厌氧甲烷氧化反硝化过程。首先, 通过向厌氧甲烷氧化反硝化微生物富集培养物 (其中古菌 10%, 细菌 80%) 中添加产甲烷菌抑制剂——溴乙烷磺酸 (bromoethane sulfonate, BES) 试验发现, 添加 20 mmol/L BES 时, 富集培养物的厌氧甲烷氧化速率并没有受到影响<sup>[16]</sup>, 但以相同剂量的 BES 处理甲烷八叠球菌 (一种典型的产甲烷菌) 时, 厌氧甲烷氧化过程则被明显抑制。据此推测厌氧甲烷氧化反硝化过程并不完全依赖于逆向产甲烷过程。在此基础上通过进一步的富集试验发现后期厌氧甲烷氧化反硝化微生物富集培养物中  $F_{430}$  和古菌逐渐消失, 而厌氧甲烷氧化速率却保持相对稳定状态。这一现象的发现不仅证实了厌氧甲烷氧化反硝化过程不需要古菌参与, 而且明确表明了逆向产甲烷途径无法完全解释厌氧甲烷氧化反硝化过程。

因此, Ettwig 等认为厌氧甲烷氧化反硝化过程可以由细菌 (*M. oxyfera*) 独立完成, 提出了一种内部好氧的亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化机理<sup>[3]</sup> (Intra-aerobic metabolism of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation):  $NO_2^-$  首先被亚硝酸盐

还原酶还原为 NO, 经过一种未知 NO 歧化酶的作用将 2 分子 NO 催化生成  $N_2$  和  $O_2$ , 生成的  $O_2$  一部分用于甲烷氧化, 甲烷经甲烷单加氧酶 (pMMO) 氧化为甲醇, 后经一系列脱氢酶的作用, 最终被氧化为  $CO_2$ , 剩余  $O_2$  用于正常的呼吸作用 (图 2)。随后通过基因组学、转录组学以及蛋白质组学的研究进一步发现, *M. oxyfera* 富集物中不存在 *mcrA* 基因, 因而排除了厌氧甲烷氧化反硝化过程通过逆向产甲烷途径耦合反硝化进行的可能性; 甲烷氧化过程方面, *M. oxyfera* 富集物转录、翻译和表达了好氧甲烷氧化过程所需要的所有酶, 因此可以推测该富集物内部存在完整的好氧甲烷氧化过程。与此同时, 研究还发现 *M. oxyfera* 富集物中缺乏传统反硝化过程中催化  $N_2O$  生成  $N_2$  的氧化亚氮还原酶, 然而  $NO_2^-$  最终还是可以被完全还原为  $N_2$ 。

2010 年, Ettwig 等又通过同位素示踪技术验证了该途径<sup>[3]</sup>。结果发现, 甲烷的氧化活性只有在  $NO_2^-$  存在的情况下才能被激发, 该途径必须通过反硝化过程后进行甲烷氧化; 实验过程中未检出传统反硝化过程的中间产物  $N_2O$ , 表明该途径中的 NO 并未转换为  $N_2O$ 。尽管实验过程中  $O_2$  的生成量一直低于检出限<sup>[17]</sup>, 然而好氧甲烷氧化关键酶 pMMO 酶以及 4 种末端呼吸氧化酶 (2 种细胞色素 c 氧化酶、乙醇酸氧化酶和抗氧化物交替氧化酶) 的发现, 从侧面佐证了 *M. oxyfera* 富集物内部确实有  $O_2$  生成<sup>[18]</sup>, 因此推测存在一种未知的一氧化氮歧化酶将 NO 转化为  $N_2$  和  $O_2$ 。

内部好氧的亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化途径不仅较好地解释了仅有细菌存在情况下的厌氧甲烷氧化反硝化过程机理, 同时也发现了地球上存在着第四种生物产氧途径<sup>[19]</sup>。然而由于一氧化氮歧化酶至今尚未检出, 因此, 该假说仍需进一步研究得以证实。

## 2 厌氧甲烷氧化反硝化微生物及其特性

自 2006 年 Raghoebarsing 等首次报导了相关厌氧甲烷氧化反硝化的微生物富集培养物以来<sup>[4]</sup>, 研究者又相继在泥炭地土壤<sup>[20]</sup>、水稻土<sup>[21]</sup>、湖泊底泥<sup>[22]</sup> 及污水处理厂污泥<sup>[23]</sup> 中检测到厌氧甲烷氧化反硝化现象的存在。目前, 有关厌氧甲烷氧化反硝

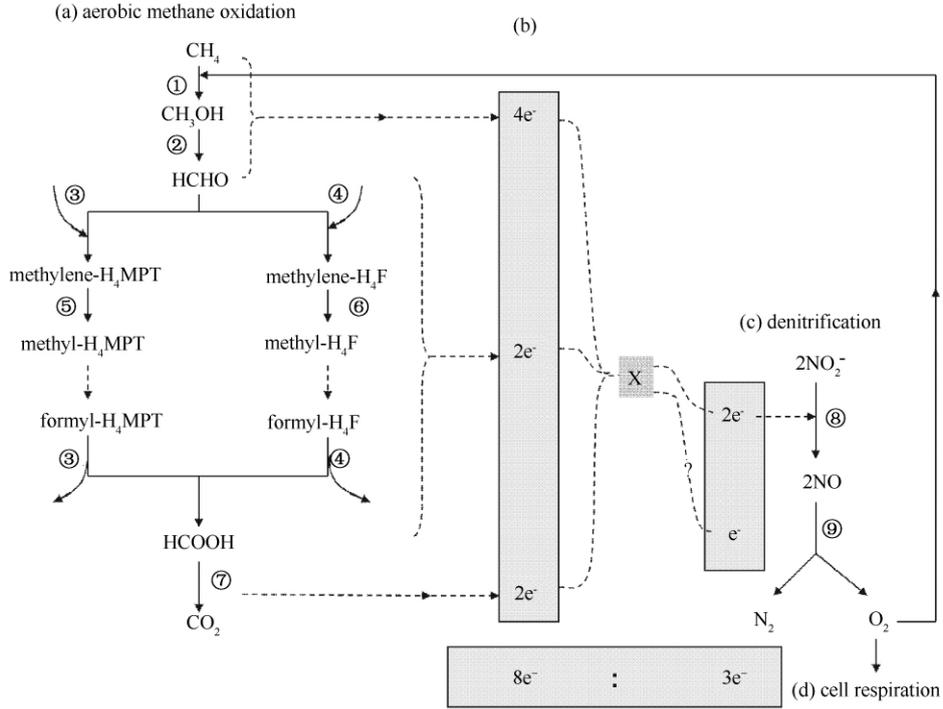


图 2. Ettwig 等提出的内部好氧的亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化途径<sup>[7]</sup>

Figure 2. Intra-aerobic metabolism of the nitrite-dependent (c) methane-oxidation (a) proposed by Ettwig et al. ① - ⑨ perform the enzymes and intermediate in this process: ① Particulate methane mono-oxygenase (pMMO); ② Methanol dehydrogenase (MDH); ③ Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT); ④ Tetrahydrofolate (H<sub>4</sub>F); ⑤ Methylene-H<sub>4</sub>MPT dehydrogenase (MtdB); ⑥ Methylene-H<sub>4</sub>F dehydrogenase (FolD); ⑦ Formate dehydrogenase (FDH); ⑧ Nitrite reductase (Nir); ⑨ Nitric oxide dismutase (Nod). These two parts are thought to be connected through an unknown intermediate (X); e<sup>-</sup> represents an electron.

化微生物的研究主要集中在富集培养物的微生物组成,特别是富集培养物中 *M. oxyfera* 的微生物特性以及富集培养物的脱氮性能等方面。

## 2.1 厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物的微生物组成

目前有文献记录的仅有 8 种厌氧甲烷氧化反硝化微生物富集物<sup>[3-4,16,20,23-24,26]</sup> (表 1),分析富集培

养物种类相对较少的主要原因有两点:一是满足该过程发生的环境主要是底泥中的好氧/缺氧界面,采样相对较困难;二是进行厌氧甲烷氧化反硝化过程的菌群生长非常缓慢,倍增时间约 1-2 周,因而造成实验室富集培养的难度<sup>[27]</sup>。近年来,已报导的厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物按其组成可分为古菌和细菌共存以及仅为细菌的富集培养物。

表 1. 厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物及其反硝化速率<sup>[28]</sup>

Table 1. The reported enrichment cultures of anaerobic oxidation of methane coupled to denitrification

inoculum	T/°C	composition/%		conversion rate/ [nmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / (mg protein·min)]	reference
		bacteria	archaea		
canal sediment (Twentekanaal)	25	80	10 <sup>a</sup>	6.2	[4]
canal sediment (Twentekanaal)	30	70	0	3.7	[16]
canal sediment (Ooijpolder)	30	70	0	3.4 - 5.6	[24]
mixed inoculum <sup>1</sup>	22	15 <sup>b</sup>	0	/	[25]
mixed inoculum <sup>1</sup>	35	30 <sup>b</sup>	40 <sup>a</sup>	2.5	[25]
wastewater sludge	20 - 23	60 - 70	/	0.9	[23]
canal sediment (Ooijpolder)	30	70 - 80	/	/	[26]
minerotrophic peatland	25	80	0	1.06	[20]

<sup>1</sup> Mixed inoculums including sediment from a freshwater lake, anaerobic digester sludge, and returned activated sludge from a sewage treatment plant. <sup>a</sup> Anaerobic methanotrophic archaea (ANME). <sup>b</sup> The bacteria of NC10 phylum.

**2.1.1 古菌和细菌共存的富集培养物:** 2006年, Raghoebarsing 等以灌溉管中的底泥 (Twentekanaal, Netherlands) 为菌源, 在厌氧反应器中通过以甲烷为唯一碳源, 以  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  为电子受体成功富集到第一种厌氧甲烷氧化反硝化微生物富集培养物<sup>[4]</sup>, 经过 16 个月的富集, 富集培养物中细菌和厌氧甲烷氧化古菌的比例约为 80% 和 10%。2009 年, Hu 等以淡水湖底泥沉积物、厌氧消化污泥和污水处理厂回流污泥的混合物为原料, 在 35℃ 条件下成功培养出厌氧甲烷氧化反硝化过程的富集培养物, 富集物中 NC10 门细菌和古菌分别占到 30% 和 40%<sup>[25]</sup>。

基因文库和 FISH 实验结果表明两种富集培养物均由一种不可培养的细菌和一种厌氧甲烷氧化古菌所组成, 其中细菌属于 NC10 门, 厌氧甲烷氧化古菌与产甲烷古菌 *Methanosaeta* 和 *Methanosarcina* 具有较高的亲缘性。<sup>13</sup>C 甲烷的标记试验证实富集培养物中细菌和古菌均在厌氧甲烷氧化反硝化过程中起到了一定的作用, 推测其厌氧甲烷氧化反硝化过程可能是通过逆向产甲烷耦合反硝化过程完成。两种富集培养物的最高反硝化速率分别为 6.2 nmol  $\text{NO}_2^-$  / (mg protein · min) 和 2.5 nmol  $\text{NO}_2^-$  / (mg protein · min)。

**2.1.2 纯细菌富集培养物:** 2008 年, Ettwig 等经过长达 19 个月的富集, 发现最终富集培养物仅存在细菌, 但对甲烷和  $\text{NO}_2^-$  的转换速率却没有产生任何影响。通过基因组学发现<sup>[16]</sup>, 隶属于 NC10 门的 “*Candidatus Methyloirabilis Oxyfera*” 在该富集培养物中所占比例高达 70% - 80%<sup>[3]</sup>。

之后, 又有多项研究得到了纯细菌厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物。2009 年, Hu 等以淡水湖底泥沉积物、厌氧消化污泥和污水处理厂回流污泥的混合物为原料<sup>[25]</sup>, Ettwig 等以灌溉管中的底泥 (Ooijpolder, Netherland) 为原料<sup>[16]</sup>, Luesken 等以污水处理厂污泥为原料富集得到的厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物均不含古菌<sup>[23]</sup>。

同时, 新型非 *M. oxyfera* 的 NC10 门细菌亦被成功富集并证实可以进行完整的厌氧甲烷氧化反硝化过程。Zhu 等以矿养型的泥炭地土壤为原料富集得到的厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物中不含古菌。通过对富集培养物中细菌的 *pmoA* 基因序列进行检测, 分析证实该富集培养物物主要由一种不同于 *M. oxyfera* 的 NC10 门细菌组成, 该细菌在富集培养物

中的比例高达 80%<sup>[20]</sup>。鉴于此, 厌氧甲烷氧化反硝化过程是 *M. oxyfera* 特有的特征还是 NC10 门细菌的共有特性有待于进一步研究。

## 2.2 *M. oxyfera* 的微生物特性

有关 *M. oxyfera* 的微生物特性的研究主要集中在形态学特性, 细胞、亚细胞特性, 生理生化特性和分子生物学特性等方面。

*M. oxyfera* 是一种革兰氏阴性菌 ( $G^-$ ), 具有一个非典型的多角形细胞结构。细胞直径约为 0.25 - 0.5  $\mu\text{m}$ , 细胞长度约为 0.8 - 1.1  $\mu\text{m}$ <sup>[16]</sup>。扫描电镜和透射电镜结果均显示该菌细胞具有与维持细胞结构稳定性有密切关系的表面蛋白。另外, 研究中发现 *M. oxyfera* 中不含提供 pMMO 结合位点的胞质内膜 (ICMs), 这与其它具有厌氧甲烷氧化功能的古菌结构不一致<sup>[29]</sup>。

*M. oxyfera* 细菌生长缓慢, 倍增时间约为 1 - 2 周<sup>[24]</sup>, 反硝化速率不高。现有研究中 *M. oxyfera* 的最高反硝化效率仅为 6.2 nmol  $\text{NO}_2^-$  / (mg protein · min) (表 1)<sup>[4]</sup>。尽管如此, 当生长环境中的甲烷浓度低至 0.6  $\mu\text{mol/L}$  时, *M. oxyfera* 细菌仍可利用甲烷完成厌氧甲烷氧化反硝化过程<sup>[4]</sup>。

*M. oxyfera* 具有特殊的脂肪酸组成。现阶段脂质分析已逐渐被应用于微生物群落组成的研究中<sup>[24, 30 - 31]</sup>, 特定的脂质作为生物标记物已经成功用于硫酸盐型甲烷厌氧氧化过程的研究<sup>[32]</sup>。因此 Kool 等研究了 *M. oxyfera* 富集物中脂质的组成以寻找适合作为 *M. oxyfera* 生物标记物的脂肪酸, 结果发现, 占 *M. oxyfera* 脂肪酸 10% 量的 10MeC<sub>16:1 $\Delta$ 7</sub> 之前从未在其它甲烷氧化菌中发现<sup>[33]</sup>; 而 10MeC<sub>16:0</sub> 在所有脂肪酸中占主导地位, 比例约为 46%。

分子生物学方面, *M. oxyfera* 具有特殊的 *pmoA* 基因序列。*pmoA* 基因用于编码好氧甲烷氧化过程中的关键酶 pMMO。目前已存在通用 *pmoA* 基因引物用于该基因的检测<sup>[34 - 36]</sup>。然而该 *pmoA* 基因通用引物却无法检测出 *M. oxyfera* 细菌的存在, 推测 *M. oxyfera* 的 *pmoA* 基因具有一定的特异性。Luesken 的研究证实 *M. oxyfera* 与其它甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因序列存在一定的差异<sup>[31]</sup>, *pmoA* 基因的通用反向引物与 *M. oxyfera* 中 *pmoA* 基因序列存在错配。此外, 基因组学研究表明 *M. oxyfera* 细菌具有与其特殊的细胞结构有关的编码类骨骼成分的基因<sup>[37]</sup>。

### 3 影响厌氧甲烷氧化反硝化过程的因素

环境因子对厌氧甲烷氧化反硝化过程具有一定的影响,主要体现在对富集培养物中古菌和细菌的组成比例、生长情况的影响,进而影响甲烷氧化活性和脱氮性能。目前确定的对厌氧甲烷氧化反硝化过程产生影响的主要因子有温度、电子受体以及环境中  $O_2$  浓度。

#### 3.1 温度

Hu 等研究了不同温度对厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物中微生物组成和脱氮效率的影响。通过设置 45、35 和 22℃ 3 个不同温度的反应器,在富集底物、甲烷浓度、 $NO_2^-$  和  $NO_3^-$  浓度均一致条件下,Hu 等共富集得到 2 种微生物富集培养物(其中 45℃ 反应器中经 40 d 富集后反硝化现象消失,富集失败)。经过 16S rRNA 基因克隆文库和 FISH 分析,22℃ 反应器中富集培养物 A 只能检测到细菌的存在,而 35℃ 反应器中得到的富集培养物 B 由厌氧甲烷氧化古菌和细菌共同组成。基因分析结果表明富集培养物 A 和富集培养物 B 中的细菌同源性高达 99%,两者和 NC10 门细菌的相似度达到 98%<sup>[25]</sup>。

研究过程中同时发现,3 个不同温度反应器厌氧甲烷氧化反硝化速率存在显著性的差异。首先,富集开始的前 40 天 3 个反应器均经历了一个有机物的消耗过程,反硝化速率一直低于 0.3 mmol  $NO_3^-$  N/(L·d)。直到 220 d 左右富集培养物 B 的反硝化速率突然升高,至 312 d 达到最大值 2.0 mmol  $NO_3^-$  N/(L·d),而富集培养物 A 的反硝化速率则一直保持在 0.11  $NO_3^-$  N mmol/(L·d) 左右<sup>[25]</sup>。

#### 3.2 电子受体

尽管  $NO_2^-$  和  $NO_3^-$  均可作为厌氧甲烷氧化过程的电子受体,但研究证实  $NO_2^-$  比  $NO_3^-$  更适合作为厌氧甲烷氧化的电子受体。Hu 等<sup>[38]</sup> 研究发现不同的电子受体( $NO_2^-$  和  $NO_3^-$ ) 组成可以影响富集培养物中细菌和古菌组成比例,从而进一步影响厌氧甲烷氧化反硝化过程以及脱氮效率。

将细菌和古菌组成的厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物分为 B1 和 B2 两份,分别加入  $NO_2^-$  或

$NO_3^-$ , 其中加入  $NO_3^-$  的富集培养物 B1 中微生物群落稳定不变,仍由古菌和细菌共同组成。相反,在加入  $NO_2^-$  后富集培养物 B2 中古菌数量逐渐减少,直到 100 d 后消失,富集培养物 B2 最后仅有细菌存在。与此同时,富集培养物 B2 对  $NO_2^-$  的降解率迅速提高,每克可挥发性颗粒物(VSS)对  $NO_2^-$  的降解率由原来的 1.1 mmol  $NO_2^-$  N/d 升高到 7.3 mmol  $NO_2^-$  N/d,富集培养物 B1 对  $NO_2^-$  的去除效果则没有明显变化,始终维持在 0.56 mmol  $NO_2^-$  N/d。

该研究得到不同电子受体对富集培养物中微生物组成具有明显影响的结果,也进一步证实了 Raghoebarsing 提出的相较于  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  是更优的电子受体的结论。然而,研究过程中也发现过高负荷的  $NO_2^-$  (>1 mmol  $NO_2^-$  N/L) 对细菌的生长具有一定的抑制作用,此结论与前人的研究不一致<sup>[4]</sup>,需要进一步试验确认。

通过对比不同微生物菌群组成的厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物对  $NO_2^-$  和  $NO_3^-$  的去除效果,可以看出:由细菌和古菌共同组成的富集培养物对  $NO_3^-$  的去除效果远远高于仅由细菌组成的富集培养物;然而对  $NO_2^-$  的去除效果则相反。据此推断出富集培养物中古菌只起到将  $NO_3^-$  转化为  $NO_2^-$  的作用,而细菌则是以  $NO_2^-$  为电子受体完成厌氧甲烷氧化反硝化过程。由于  $NO_2^-$  对一般微生物生长具有一定的抑制作用<sup>[39]</sup>,因此可以推测,古菌可能需要依赖细菌去除  $NO_2^-$  以避免  $NO_2^-$  对其自身生长的毒性,这就可以解释古菌存在的环境中必须有 *M. oxyfera* 细菌存在,而 *M. oxyfera* 细菌可以在以  $NO_2^-$  为电子受体的环境中单独存在的现象,但该推测还有待于进一步试验予以证实<sup>[25]</sup>。

#### 3.3 $O_2$

尽管 Ettwig 等假设的新型厌氧甲烷氧化反硝化过程中甲烷氧化是一个好氧过程,但 Luesken 等研究表明外界  $O_2$  的存在会对厌氧甲烷氧化反硝化过程产生抑制作用<sup>[40]</sup>。当环境中  $O_2$  浓度为 2% 或 8% 时,经过 24 h 环境暴露培养,对 *M. oxyfera* 的 cDNA 序列分析表明大多数编码好氧甲烷氧化过程的基因、反硝化过程中 NO 还原酶 NorZ2 以及大多数已知的功能基因均被抑制,但抑制机理尚不清楚。与 NO 还原酶基因被抑制的现象一致,环境中  $O_2$  浓度为 2% 和 8% 时, $NO_2^-$  N 的去除率仅为厌氧条件

下的 43% 和 19%。另外, *M. oxyfera* 对好氧/厌氧交替环境的适应性也有待于进一步研究<sup>[40]</sup>。

## 4 结论和展望

厌氧甲烷氧化反硝化过程近年来被证实广泛存在于各种环境中。尽管现有研究已获得了许多相关的微生物富集培养物, 并提出了相对较为合理的机制解释。然而, 目前对厌氧甲烷氧化反硝化富集培养物微生物方面的研究还停留在分离培养和生理生化特性初步探究阶段, 主要微生物如“*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”细菌尚未得到高效的纯培养物。富集初期的厌氧甲烷氧化反硝化机理以及相关功能微生物种群需要进一步确定。内部好氧的亚硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化途径虽已基本证实, 然而该假设机制中转化 NO 生成 N<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 的关键歧化酶至今尚未找到, O<sub>2</sub> 的生成也一直低于检出限, 目前仍缺乏证实假设机制成立的直接证据。此外, 有关富集培养物中高效微生物的筛选和环境因子对厌氧甲烷氧化反硝化过程的影响等均有待于进一步研究。

除厌氧甲烷氧化反硝化过程, 厌氧条件下甲烷氧化过程大多集中在以 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 为电子受体的研究。从热力学角度分析, Fe<sup>3+</sup>、MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 和 HAsO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 也能作为甲烷氧化的电子受体<sup>[41]</sup>, 它们同时也是污染水体中普遍存在的重金属和非金属强氧化离子, 若这些离子的还原均可与甲烷氧化耦合, 对污染水体的治理和达标排放具有重要的意义。厌氧甲烷氧化反硝化过程与其它新型脱氮途径如厌氧氨氧化 (Anammox) 耦合脱氮过程也是目前研究的一个热点。有研究证实厌氧甲烷氧化反硝化和厌氧氨氧化过程可以耦合实现脱氮。然而, 该过程中两种菌群的竞争、环境中 O<sub>2</sub> 的存在、电子受体的种类组成以及脱氮效率也需要进一步探索。

实际应用方面, 厌氧甲烷氧化反硝化的发现为新工艺的设计和发展提供契机。然而富集培养物和细菌倍增时间长是该过程工程化应用的主要限制因素。下一步研究可以在富集过程中加入营养物质, 调整温度和 O<sub>2</sub> 浓度, 寻找合适的接种污泥和接种物等方式缩短 *M. oxyfera* 的富集培养时间; 利用反应器, 如序批式反应器 (SBR) 和膜生物反应器 (MBR) 提高污泥滞留、减少生物量流失; 改进现有反应器,

通过设置中空纤维生物膜等方法延长甲烷和污水的滞留时间, 增大接触面积, 使甲烷在反应器中循环利用提高甲烷利用率, 从而提升反应器的脱氮性能。另外利用与电化学相结合的方法提高 *M. oxyfera* 富集和脱氮效能研究也有待于进一步开展。总之, 甲烷作为城市污水反硝化脱氮的新型碳源, 具有来源广泛、廉价无毒、储备充足、溶解度低不会引起出水 COD 增加的优点, 与甲醇、乙酸等碳源相比具有明显的优势。尽管厌氧甲烷氧化反硝化工艺大规模推广应用还有一定的难度, 但是该工艺研发及应用具有广阔的前景, 值得进行深入研究。

## 参考文献

- [1] IPCC. Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2007.
- [2] Shen L, Hu B, Zheng P. Research progress on microorganism of anaerobic methane oxidation. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48: 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. *土壤学报*, 2011, 48: 619-628.
- [3] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels HJ, van Alen T, Luesken F, Wu ML, van de Pas-Schoonen KT, Op den Camp HJ, Janssen-Megens EM, Francoijs KJ, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten MS, Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 2010, 464 (7288): 543-548.
- [4] Raghoebarsing AA, Pol A, van de Pas-Schoonen KT, Smolders AJ, Ettwig KF, Rijpstra WI, Schouten S, Damste JS, Op den Camp HJ, Jetten MS, Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 2006, 440 (7086): 918-921.
- [5] Murray JW, Grundmanis V, Smethie WM. Interstitial water chemistry in the sediments of Saanich inlet. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1978, 7 (42): 1011-1026.
- [6] Reeburgh WS. Anaerobic methane oxidation: rate depth distributions in Skan Bay sediments. *Earth and Planetary Science Letters*, 1980, 3 (47): 345-352.
- [7] Wu ML, Ettwig KF, Jetten MS, Strous M, Keltjens JT, van Niftrik L. A new intra-aerobic metabolism in the

- nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium 'Candidatus *Methylomirabilis oxyfera*'. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39 (1) : 243-248.
- [8] Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gleseke A, Amann R, Jorgensen BB, Witte U, Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature Letters*, 2000, 5: 623-626.
- [9] Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG, Delong EF. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediment. *Nature Letters*, 1999, 398: 802-805.
- [10] Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 2001, 293 (5529) : 484-487.
- [11] Pancost RD, Sinninghe Damste JS, de Lint S, van der Maarel MJEC, Gottschal JC. Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (3) : 1126-1132.
- [12] Zehnder AJ, Brock TD. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1979, 137 (1) : 420-431.
- [13] Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, Detter JC, Rokhsar D, Richardson PM, DeLong EF. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 2004, 305 (5689) : 1457-1462.
- [14] Chistoserdova L, Vorholt JA, Lidstrom ME. A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biology*, 2005, 6: 208.
- [15] Han B, Su T, Li X, Xing X. Research progresses of methanotrophs and methane monooxygenases. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24: 1511-1519. (in Chinese)  
韩冰, 苏涛, 李信, 邢新会. 甲烷氧化菌及甲烷单加氧酶的研究进展. *生物工程学报*, 2008, 24: 1511-1519.
- [16] Ettwig KF, Shima S, van de Pas-Schoonen KT, Kahnt J, Medema MH, Op den Camp HJ, Jetten MS, Strous M. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (11) : 3164-3173.
- [17] Wu ML, van Alen TA, van Donselaar EG, Strous M, Jetten MS, van Niftrik L. Co-localization of particulate methane monooxygenase and *cd1* nitrite reductase in the denitrifying methanotroph 'Candidatus *Methylomirabilis oxyfera*'. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334 (1) : 49-56.
- [18] Wu ML, de Vries S, van Alen TA, Butler MK, Op den Camp HJ, Keltjens JT, Jetten MS, Strous M. Physiological role of the respiratory quinol oxidase in the anaerobic nitrite-reducing methanotroph 'Candidatus *Methylomirabilis oxyfera*'. *Microbiology*, 2011, 157 (3) : 890-898.
- [19] Ettwig KF, Speth DR, Reimann J, Wu ML, Jetten MS, Keltjens JT. Bacterial oxygen production in the dark. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 273.
- [20] Zhu B, van Dijk G, Fritz C, Smolders AJ, Pol A, Jetten MS, Ettwig KF. Anaerobic oxidation of methane in a minerotrophic peatland: enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (24) : 8657-8665.
- [21] Wang Y, Zhu G, Harhangi HR, Zhu B, Jetten MS, Yin C, Op den Camp HJ. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 336 (2) : 79-88.
- [22] 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35 (4) : 233-238.
- [23] Luesken FA, van Alen TA, van der Biezen E, Frijters C, Toonen G, Kampman C, Hendrickx TL, Zeeman G, Temmink H, Strous M, Op den Camp HJ, Jetten MS. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 92 (4) : 845-854.
- [24] Ettwig KF, van Alen T, van de Pas-Schoonen KT, Jetten MS, Strous M. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (11) : 3656-3662.
- [25] Hu S, Zeng RJ, Burow LC, Lant P, Keller J, Yuan Z. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1 (5) : 377-384.
- [26] Kampman C, Hendrickx TL, Luesken FA, van Alen TA, Op den Camp HJ, Jetten MS, Zeeman G, Buisman CJ, Temmink H. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature

- anaerobic sewage treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 227-228: 164-171.
- [27] Strous M, Kuenen JG, Fuerst JA, Wagner M, Jetten MSM. The anammox case – A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81: 693-702.
- [28] Shen LD, He ZF, Zhu Q, Chen DQ, Lou LP, Xu XY, Zheng P, Hu BL. Microbiology, ecology, and application of the nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 269.
- [29] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60 (2): 439-471.
- [30] Deutzmann JS, Schink B. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (13): 4429-4436.
- [31] Luesken FA, Zhu B, van Alen TA, Butler MK, Diaz MR, Song B, Op den Camp HJ, Jetten MS, Ettwig KF. *pmoA* Primers for detection of anaerobic methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (11): 3877-3880.
- [32] Freeman KH, Hayes JM, Trendel JM, Albrecht P. Evidence from carbon isotope measurements for diverse origins of sedimentary hydrocarbons. *Nature Letters*, 1990, 343: 254-256.
- [33] Kool DM, Zhu B, Rijpstra WI, Jetten MS, Ettwig KF, Sinninghe Damste JS. Rare branched fatty acids characterize the lipid composition of the intra-aerobic methane oxidizer “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (24): 8650-8656.
- [34] Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC. Evidence that participate methane monoxygenase and ammonia monoxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 132: 203-208.
- [35] Kip N, van Winden JF, Pan Y, Bodrossy L, Reichart GJ, Smolders AJP, Jetten MSM, Sinninghe Damste JS, Op den Camp HJM. Global prevalence of methane oxidation by symbiotic bacteria in peat-moss ecosystems. *Nature Geoscience Letters*, 2010, 3: 617-621.
- [36] Kolb S, Knief C, Stubner S, Conrad R. Quantitative Detection of Methanotrophs in Soil by Novel *pmoA* – Targeted Real-Time PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (5): 2423-2429.
- [37] Wu ML, van Teeseling MC, Willems MJ, van Donselaar EG, Klingl A, Rachel R, Geerts WJ, Jetten MS, Strous M, van Niftrik L. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*,” a novel polygon-shaped bacterium. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (2): 284-291.
- [38] Hu S, Zeng RJ, Keller J, Lant PA, Yuan Z. Effect of nitrate and nitrite on the selection of microorganisms in the denitrifying anaerobic methane oxidation process. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3 (3): 315-319.
- [39] Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG. Bacterial inhibitory effects of nitrite: Inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39 (4): 831-834.
- [40] Luesken FA, Wu ML, Op den Camp HJ, Keltjens JT, Stunnenberg H, Francoijs KJ, Strous M, Jetten MS. Effect of oxygen on the anaerobic methanotroph ‘*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*’: kinetic and transcriptional analysis. *Environmental Microbiology*, 2012, 14 (4): 1024-1034.
- [41] Samantha BJ. Microbiology: A piece of the methane puzzle. *Nature*, 2012, 22: 538-539.

# Research progress in microbial anaerobic methane oxidation coupled to denitrification—A review

Mengdong Yuan, Jing Zhu, Weixiang Wu\*

Institute of Environmental Science and Technology, College of Environmental & Resource Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

**Abstract:** The process of denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO), which uses methane as electron donor for denitrification, can achieve nitrogen remove of wastewater and simultaneously reduce the emission of methane. The research of DAMO mechanism focuses on two pathways –the reverse methanogenesis coupled denitrification and the nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (n-damo). Considering that DAMO process makes a significant contribution to global carbon and nitrogen cycling, our review summarizes the progresses of DAMO in recent years and focuses on the enrichment culture of microorganism, especially the microbiological characteristic of enrichment containing *M. oxyfera*. The microbiological mechanisms and parameters of the process are also reviewed. On this basis, some practical problems and prospects in the engineering application of the process are also discussed.

**Keywords:** anaerobic methane oxidation coupled to denitrification, nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (n-damo), Candidatus *Methyloirabilis oxyfera*, intra-aerobic, mechanism

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Special Program for Public Sector (Agriculture) Research (201303091) and by the Key Special Program for the Pollution Control and Treatment of Water Bodies (2012ZX07101012, 2008ZX07101-006)

\* Corresponding author. Tel: +86-571-86956884; E-mail: weixiang@zju.edu.cn

Received: 1 June 2013/Revised: 8 July 2013

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。