



# 反硝化型厌氧甲烷氧化微生物的研究进展

秦 帆,盛光遥,李长鑫,汤明芳,何岸飞,姜 晶,丁 静  
(苏州科技大学环境科学与工程学院,江苏苏州 215009)

**[摘要]** 反硝化型厌氧甲烷氧化(DAMO)是以甲烷为电子供体、硝酸盐/亚硝酸盐为电子受体的生物化学过程,由 DAMO 古菌和 DAMO 细菌 2 种微生物催化完成。该过程不仅对生态系统中的甲烷消耗具有非常重要的贡献,还连接着碳氮元素之间的生物地球化学循环,在废水生物脱氮方面也具有一定的应用潜力,具有重要的研究意义。对近年来 DAMO 微生物的研究进展进行了梳理和讨论,着重阐述了有关 DAMO 微生物的代谢途径、富集影响因素(接种物、温度、甲烷传质/分压和反应器构型),以及在废水处理中的应用潜力等方面的内容。并在此基础上,针对 DAMO 古菌在碳氮循环中的贡献以及模拟 DAMO 过程的数学模型等未来可能的研究方向提出了展望,以期对 DAMO 微生物的环境功能研究及废水脱氮处理应用提供参考。

**[关键词]** 反硝化型厌氧甲烷氧化(DAMO);废水生物脱氮;生物地球化学循环;DAMO 古菌;DAMO 细菌

**[中图分类号]** X172;X703 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2022)10-0001-08

## Research progress of denitrifying anaerobic methane-oxidizing microorganisms

QIN Fan, SHENG Guangyao, LI Changxin, TANG Mingfang, HE Anfei, JIANG Jing, DING Jing  
(School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China)

**Abstract:** Denitrification anaerobic methane oxidation (DAMO) is a biochemical process with methane as the electron donor and nitrate/nitrite as the electron acceptor, which is catalyzed by DAMO archaea and DAMO bacteria. This process not only makes a very important contribution to methane consumption in the ecosystem, but also links the biogeochemical cycles of carbon and nitrogen. Besides, it also has potential value on biological nitrogen removal from wastewater, which has high research significance. The progresses of DAMO microorganisms in recent years were summarized and the progress of metabolic pathways, enrichment factors (inoculum, temperature, methane mass transfer/partial pressure and reactor configuration), and potential wastewater treatment applications of DAMO cultures were mainly illustrated. On this basis, the future possible directions for DAMO research were proposed, such as the contribution of DAMO archaea to the carbon and nitrogen cycling and the mathematical model of the DAMO process. It was aimed to provide reference for research on environmental function of DAMO microorganism and biological nitrogen removal from wastewater.

**Key words:** denitrifying anaerobic methane oxidation(DAMO); biological nitrogen removal of wastewater; biogeochemical cycle; DAMO archaea; DAMO bacteria

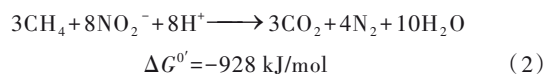
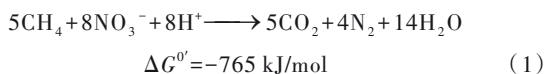
甲烷( $\text{CH}_4$ )是一种温室气体,其温室效应能力是 $\text{CO}_2$ 的 20~30 倍,对全球变暖的贡献率约为 22%<sup>[1]</sup>。自然环境中的甲烷主要来源于有机物的厌氧氧化,但大部分甲烷在到达大气圈之前已经通过微生物的好氧化和厌氧氧化过程被消耗。其中,厌氧甲烷氧化(AOM)过程可以结合多种电子受体,最早根据

地球化学质量平衡计算得出。硫酸盐是海洋环境中主要的电子受体之一<sup>[2-4]</sup>,硫酸盐型厌氧甲烷氧化(SAMO)是海洋环境中主要的甲烷汇。之后,AOM 也被发现可以以硝酸盐/亚硝酸盐<sup>[5]</sup>、铁(水铁矿)/锰(水钠锰矿)<sup>[6]</sup>和腐殖酸<sup>[7-8]</sup>作为电子受体。在淡水湿地中,AOM 每年约消耗  $2 \times 10^8$  t 甲烷,可减少 50% 以上

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(41807413);江苏省自然科学基金项目(BK20180967);江苏省“六大才高峰”团队项目(TD-JNHB-003);江苏省双创团队项目(2018-2017);江苏省“双创博士”

的潜在甲烷排放量<sup>[9]</sup>。因此,AOM是控制和调节淡水、海洋环境中甲烷循环和排放的关键过程。

在淡水环境中,硫酸盐浓度较低,且由于现代农业生产中氮肥的大量施用, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 成为淡水环境中AOM的主要电子受体。并且,反硝化型厌氧甲烷氧化(DAMO)过程已具备热力学与生物化学理论基础<sup>[10]</sup>,化学方程式表述如下:



但直到2006年,A. A. RAGHOEBARSING等<sup>[5]</sup>才通过富集培养发现了AOM耦合反硝化的实验证据,他们利用克隆测序和荧光原位杂交(FISH)技术在富集菌群中成功检测到了DAMO微生物。进一步地,当 $\text{NO}_3^-$ 作为电子受体时,DAMO古菌和DAMO细菌共同代谢催化DAMO反应;当 $\text{NO}_2^-$ 作为电子受体时,DAMO细菌则可单独催化DAMO过程<sup>[1]</sup>。Baolan HU等<sup>[11]</sup>研究发现,湿地环境中的亚硝酸盐型DAMO过程每年可消耗 $4.1 \times 10^9 \sim 6.1 \times 10^9 \text{ kg}$ 甲烷,约占湿地环境中甲烷汇的2%~6%。因此,DAMO对于充分了解地球上的甲烷循环以及量化甲烷汇具有重大意义。同时,随着全球范围内氮污染的加剧,以氮化合物作为电子受体的DAMO过程值得更深入的研究。

DAMO微生物虽然在自然生境中分布广泛,但生长速度缓慢,倍增时间在2周以上<sup>[12]</sup>,富集时间一般在5~16个月<sup>[13-15]</sup>,限制了对其研究的广泛开展。目前,关于DAMO微生物的代谢机理、富集影响因素以及工程应用潜力等问题尚未完全清晰。推进DAMO研究有利于更好地认识碳氮元素生物地球化学循环、理解自然生境中甲烷循环及其对大气温室效应的贡献,同时也有利于探索其在废水生物脱氮过程中应用的可能性<sup>[16]</sup>。笔者主要集中介绍和总结了DAMO微生物的代谢途径、微生物富集的影响因素,以及DAMO在废水脱氮中的应用前景,同时提出DAMO未来的研究方向,以期为DAMO微生物的环境功能研究及废水脱氮处理应用提供参考。

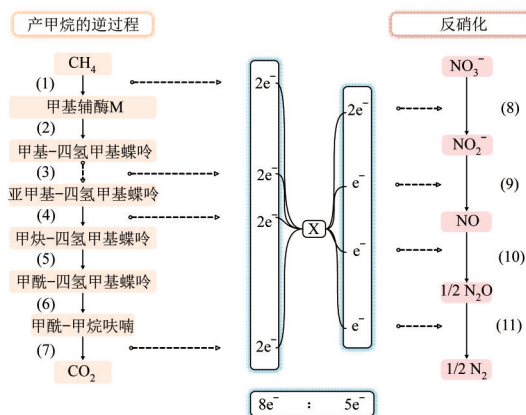
## 1 DAMO微生物的代谢途径

目前,关于DAMO微生物代谢途径的研究尚处于起步阶段<sup>[17]</sup>。DAMO过程主要涉及2类微生物:DAMO古菌和DAMO细菌。DAMO古菌主要通过耦

合“产甲烷的逆过程”(甲烷氧化)和硝酸盐还原来代谢甲烷,DAMO细菌则通过亚硝酸盐依赖型的“内部好氧”途径催化甲烷氧化<sup>[18]</sup>。

### 1.1 DAMO古菌厌氧氧化甲烷耦合硝酸盐还原途径

基于产甲烷过程所涉及的大部分酶促反应均可逆,S. HALLAM等<sup>[19]</sup>提出“产甲烷的逆过程”模型,并发现厌氧噬甲烷古菌(ANME)基因组中包含了产甲烷途径中除亚甲基四氢甲烷喋呤还原酶(Mer)基因(甲烷形成的关键基因)以外的所有功能基因。亚甲基四氢叶酸还原酶(MetF)基因与Mer结构类似,或许可以代替其功能促进AOM的发生<sup>[20]</sup>。DAMO古菌沿着甲烷产生的逆向过程进行甲烷氧化,氧化过程中释放的电子可用于硝酸盐还原。如图1所示<sup>[21]</sup>,甲烷在甲基辅酶M还原酶(Mcr)的作用下生成甲基辅酶M,再依次被甲基辅酶M转移酶(Mtr)和MetF(类似Mer)催化形成亚甲基-四氢甲基喋呤,然后经过一系列的酶促反应最终被转化为 $\text{CO}_2$ <sup>[21]</sup>。其中,Mcr起活化甲烷的作用,Mcr及其镍离子辅酶 $\text{F}_{430}$ 是表征“产甲烷的逆过程”的重要标记物<sup>[22]</sup>。由于DAMO古菌仅含有硝酸盐还原酶的编码基因,并不含有反硝化后续步骤的相关编码基因,因此DAMO古菌只能进行部分反硝化,并需要DAMO细菌的协同作用,进一步将生成的亚硝酸盐转化为氮气。



(1)甲基辅酶M还原酶(Mcr);(2)甲基辅酶M转移酶(Mtr);(3)亚甲基四氢叶酸还原酶(MetF);(4) $\text{F}_{420}$ 型还原酶;(5)亚甲基四氢甲基喋呤环化水解酶(Mch);(6)四氢甲基喋呤甲酰转移酶(Ftr);(7)甲酰基甲基喋呤脱氢酶(Fmd);(8)硝酸盐还原酶(Nar);(9)亚硝酸盐还原酶(Nir);(10)一氧化氮还原酶(Nor);(11)一氧化二氮还原酶(Nos);X—某种中间电子传递体。

图1 DAMO古菌“产甲烷的逆过程”耦合硝酸盐还原途径

Fig. 1 Pathway of DAMO archaea for reverse methanogenesis coupled with nitrate reduction

## 1.2 DAMO细菌“内部好氧”氧化甲烷耦合亚硝酸盐还原途径

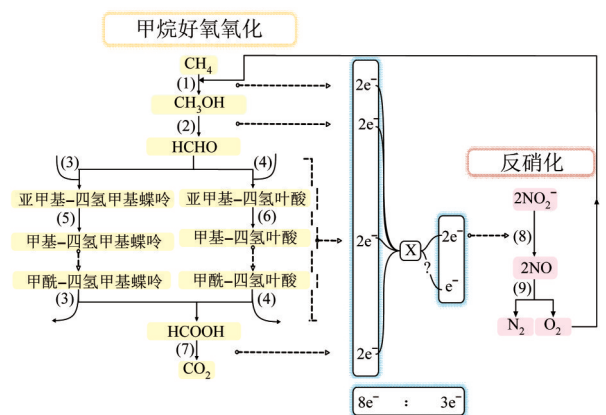
随着研究的深入, K. F. ETTWIG 等<sup>[23]</sup>发现, 反硝化厌氧甲烷氧化过程并非完全依赖于逆向产甲烷途径。他们将富集后的培养物(DAMO细菌80%, DAMO古菌10%)接种到新的生物反应器中, 并对其进行溴乙烷磺酸盐(BES)抑制实验。结果表明, DAMO活性并没有受到明显抑制。进一步的富集实验中, DAMO古菌逐渐消失, 而DAMO细菌活性却没有下降, 厌氧甲烷氧化速率仍保持在一个相对稳定的状态。这个现象的发现证实了DAMO细菌可以独立完成反硝化厌氧甲烷氧化过程。

K. F. ETTWIG 等<sup>[24]</sup>在后续的DAMO细菌富集研究中发现, 尽管体系中的氧浓度一直低于检出限(没有胞外氧), 但宏基因组测序结果却显示DAMO细菌含有甲烷好氧氧化的关键酶——颗粒性甲烷单加氧酶(pMMO)和末端呼吸氧化酶, 这意味着富集物内部有 $O_2$ 生成。他们因此提出了DAMO细菌的“内部好氧”亚硝酸盐依赖型甲烷厌氧氧化途径。同位素示踪实验表明, 甲烷氧化活性只有在亚硝酸盐存在的情况下才能被激发<sup>[24]</sup>。如图2<sup>[18]</sup>所示,  $NO_2^-$ 首先被亚硝酸盐还原酶还原为NO, 然后2分子NO在一种未知的一氧化氮歧化酶作用下, 被催化生成 $N_2$ 和 $O_2$ ; 75%生成的 $O_2$ 被用于甲烷氧化, 剩余25%的 $O_2$ 则被末端呼吸氧化酶消耗, 即用于正常的呼吸作用。甲烷在多种酶的作用下被氧化为甲醛(HCHO), 接着甲醛通过丝氨酸循环进入细胞合成代谢。同时, 甲醛在多种酶的作用下最终被氧化为 $CO_2$ 和 $H_2O$ 。DAMO细菌的这种“内部好氧”甲烷厌氧氧化途径具有重要的生物学意义, 说明地球上存在第4种生物产氧途径——绕过反硝化中间产物 $N_2O$ 直接将NO转化为 $N_2$ 和 $O_2$ , 即NO歧化酶取代了 $N_2O$ 还原酶, 与多种氧化酶共同催化NO产生 $O_2$ 。然而迄今为止, 反硝化过程中的一氧化氮歧化酶仍然未被发现。

## 2 DAMO微生物富集的影响因素

### 2.1 接种物

接种物对DAMO微生物的富集有重要影响。在DAMO微生物的首次成功富集工作中, 其接种物来源于荷兰特温特运河沉积物<sup>[5]</sup>, 取样处污泥的甲烷浓度高达0.8 mmol/L, 硝酸盐浓度为0.1 mmol/L, 适宜作为DAMO反应器的接种污泥。对照实验亦证明了这一点: 反硝化速率从无甲烷时的 $(5.5 \pm 0.5) \mu\text{mol/h}$ (以 $N_2$ 计)增至加入甲烷时的 $(21.5 \pm 2) \mu\text{mol/h}$ 。此后的研究中, DAMO微



(1)颗粒状甲烷单加氧酶(pMMO);(2)甲醇脱氢酶(MDH);(3)四氢氨基蝶呤;(4)四氢叶酸;(5)亚甲基四氢氨基蝶呤脱氢酶;(6)亚甲基四氢叶酸脱氢酶;(7)甲酸脱氢酶;(8)亚硝酸盐还原酶;(9)一氧化氮歧化酶;X—某种中间电子传递体。

图2 DAMO细菌“内部好氧”的亚硝酸盐依赖型甲烷厌氧氧化途径

Fig. 2 Pathway of DAMO bacteria for intra-aerobic nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane

生物接种物来源包括淡水河沉积物<sup>[13,25]</sup>、污水处理厂混合污泥<sup>[14,26]</sup>、淡水湖沉积物/厌氧污泥/活性污泥混合物<sup>[27]</sup>等(表1)。

Zhanfei HE 等<sup>[32]</sup>首次报道了以稻田土壤作为DAMO细菌接种物的研究, 并比较了产甲烷污泥、稻田土壤和淡水河沉积物对DAMO细菌富集的不同影响。研究发现, 反应器运行500 d后, 3种富集物中DAMO细菌的数量分别是接种时的73、646、290倍, 这意味着尽管3种接种物都能成功富集获得DAMO细菌, 但稻田土壤是最优选择。这是由于稻田土壤的厌氧土层中含有足够多的甲烷<sup>[33]</sup>、丰富的菌群结构和氮肥积累后过剩的含氮物质, 这些条件为DAMO微生物的生存提供了理想的生态位。尽管产甲烷污泥在厌氧消化过程中会产生大量甲烷, 但其含有的大量有机质使得反硝化细菌比生长缓慢的DAMO细菌具有更强的竞争优势, 因此富集培养效果弱于其他2种接种物。然而, 楼菊青等<sup>[34]</sup>的研究表明, 在相同氮源下, 以淡水河沉积物和稻田土壤为混合接种物的反应器, 其富集得到的DAMO古菌数量少于淡水河沉积物、污水厂活性污泥及厌氧消化污泥混合接种的反应器。因此, 活性污泥和厌氧消化污泥或许在DAMO古菌富集时具有一定的优势。

目前, 关于不同接种物对DAMO微生物富集影响机制的研究较为空缺。不同的接种物意味着不同原位环境下的理化性质和菌群结构有所不同。毫无

表1 不同 DAMO 富集培养物的比较

Table 1 Comparison of different DAMO culture enrichment

接种物	温度/℃	甲烷分压/kPa	反应器	富集物	参考文献
混合接种物:污水厂回流污泥、农田沟渠沉积物、造纸厂废水处理厌氧颗粒污泥	35±1	—	膜曝气膜生物反应器(MAMBR)	DAMO 细菌	[28]
混合接种物:产甲烷污泥、污水厂活性污泥	35	50~100	玻璃生物反应器	DAMO 细菌	[15]
淡水河沉积物	35±2	100	中空纤维膜生物膜反应器(HfMBR)	DAMO 细菌、DAMO 古菌、Anammox 细菌	[29]
淡水河沉积物	30±1	—	分步进水型序批式反应器(SFBRs)	DAMO 细菌	[12]
淡水河沉积物	30	—	玻璃生物反应器	DAMO 细菌	[23]
淡水河沉积物	30±1	20	序批式反应器(SBR)	DAMO 细菌	[30]
淡水河沉积物	25	—	序批式反应器(SBR)	DAMO 细菌、DAMO 古菌	[5]
淡水河沉积物	20~23	—	序批式反应器(SBR)	DAMO 细菌	[13]
稻田土壤	环境温度	300	膜生物膜反应器(MBR)	DAMO 细菌	[12]
混合接种物:污水处理厂消化污泥、二沉池污泥	20±1	—	浸没式膜生物反应器(SMBR)	DAMO 细菌	[26]
混合接种物:淡水湖沉积物、污水处理厂消化污泥及回流污泥	10~25	300	膜生物膜反应器(MBR)	DAMO 细菌、DAMO 古菌、Anammox 细菌	[31]
淡水湖沉积物	10~25	10~24	膜曝气生物反应器(MABR)	DAMO 细菌	[32]

疑问,当原始接种物中 DAMO 微生物的相对丰度越高,DAMO 反应器启动速率将越快,功能微生物的富集数量也会越多。因此,整合分析 DAMO 接种物来源的特性,并探索适宜 DAMO 微生物生存的接种源的相关规律,将有助于加快 DAMO 微生物的富集和应用。

## 2.2 温度

温度是调控生物生长和繁殖的关键环境因子。实验室首次获得 DAMO 菌群时的富集温度为 25℃<sup>[5]</sup>,K. F. ETTWIG 等<sup>[23,25]</sup>将此温度下间歇培养的富集物转移到 30℃下进行连续培养后,DAMO 古菌在富集物中逐渐消失,只剩下 DAMO 细菌。然而,温度并不是其中唯一被改变的条件,培养方式和培养基等条件也发生了变化。此后,DAMO 细菌的富集温度主要被控制在 35℃<sup>[15,28-29]</sup>和 30℃<sup>[13,23]</sup>(表 1)。Zhanfei HE 等研究了不同温度(15~45℃)对 DAMO 细菌的影响<sup>[35]</sup>,发现 DAMO 细菌的活性在 35℃下最高,表明 DAMO 细菌是嗜温性细菌。

在环境温度下富集 DAMO 微生物可为其在废水处理中的应用提供参考和依据,因此不少研究者评估了环境温度下 DAMO 微生物的富集过程<sup>[12-13,31-32]</sup>。Tao LIU 等<sup>[31]</sup>研究了低温对膜生物膜反应器(MBR)中 DAMO 微生物脱氮性能的影响,发现当温度从 25℃降至 10℃后,DAMO 细菌和 DAMO 古菌的相对丰度依然保持稳定(DAMO 细菌:7.9%~10.6%,DAMO 古菌:4.5%~7.3%)。低温时,细胞裂

解导致碳源增加,有利于 DAMO 微生物活性和脱氮效率的提高。同时,MBR 作为一种膜曝气与生物膜相结合的水处理技术,其纤维膜表面极易形成生物膜,为 DAMO 微生物的生长创造了相对稳定的环境。此类研究表明,即使在低温下,DAMO 微生物仍然可以维持较稳定的活性,在废水处理中具有广阔的应用前景。

DAMO 微生物的共富集研究目前较为缺乏。Shihu HU 等<sup>[27]</sup>研究了不同温度(22、35、45℃)对 DAMO 微生物的影响。其中,45℃反应器没有反硝化活性,高温导致了 DAMO 微生物的细胞组分失活<sup>[35-36]</sup>;22℃富集培养物中只含有 DAMO 细菌;35℃富集培养物中则同时检测到 DAMO 古菌和 DAMO 细菌。因此可以认为,温度较低时,DAMO 细菌处于优势,而 DAMO 古菌则更趋向于在较高温度下生存,对低温较为敏感<sup>[37]</sup>。但这与 Tao LIU 等<sup>[31]</sup>的研究结果相矛盾,这可能是因为 Shihu HU 等富集的 DAMO 古菌主要处于悬浮生长状态,低温下与 DAMO 细菌竞争时无法形成生物聚集体,从而不利于其生长。

总体而言,DAMO 细菌和 DAMO 古菌都属于嗜温性微生物,但在低温下也可以维持稳定的活性,因此在工程应用方面具有一定的潜力。目前关于环境温度对 DAMO 微生物的影响机制仍然有待进一步深入探究。

## 2.3 甲烷传质/分压

甲烷不仅是 DAMO 反应的电子供体,也是

DAMO 微生物的唯一碳源<sup>[38]</sup>。因此,甲烷是控制 DAMO 反应速率的重要变量。单独富集 DAMO 细菌时,甲烷分压可以低至 10~24 kPa<sup>[32]</sup>;而共富集 DAMO 细菌和 DAMO 古菌时,甲烷分压一般在 100~300 kPa<sup>[30]</sup>(表 1),甲烷分压过低可能会导致 DAMO 古菌在与 DAMO 细菌的竞争中失去优势。

甲烷传质阻力对 DAMO 细菌的影响最先受到研究者们的关注。何焱飞等<sup>[39]</sup>通过建立甲烷的三相传质模型研究了甲烷传质阻力对亚硝酸盐型 DAMO 反应的影响,并根据模型推导得出 DAMO 比活性与甲烷传质阻力成反比,降低甲烷传质阻力可以显著提高 DAMO 比活性。在 DAMO 反应中,甲烷须经气-液-菌三相传质后才能在微生物细胞内发生反应,三相中气膜的传质阻力可以忽略,细胞膜的传质阻力约为常数,而甲烷不易溶于水的特点使得液膜成为主要的传质阻力。液膜中甲烷的传质与反应器的搅拌速率有关,搅拌速率越大,液相传质阻力越小;但超过一定范围后,增加搅拌速率将不再提高 DAMO 比活性<sup>[39]</sup>。

随后,研究者们探究了甲烷分压对 DAMO 细菌和 DAMO 古菌活性的影响。Chen CAI 等<sup>[40-42]</sup>捕捉了甲烷分压调整后 DAMO 微生物活性的变化过程。在 24.3~122.6 kPa 范围内,随着甲烷分压的增加,DAMO 古菌的硝酸盐还原速率和 DAMO 细菌的亚硝酸盐还原速率分别增加了 58% 和 303%,说明甲烷分压是其活性增加的驱动因素;而当甲烷分压超过 122.6 kPa 后,甲烷不再是 DAMO 微生物活性的限制因素。同时,由于甲烷分压与甲烷溶解度呈线性关系且甲烷溶解度与温度呈线性关系,温度和甲烷溶解度同样会影响 DAMO 过程<sup>[43]</sup>。此外,通过添加表面活性剂和第二液相等方法也可以提高甲烷的液相溶解度系数<sup>[39]</sup>。

综上,通过一些方法可以在一定范围内提高 DAMO 微生物的甲烷利用效率。然而,甲烷分压对 DAMO 细菌和 DAMO 古菌之间相互竞争关系的影响还未得到深入研究。

## 2.4 反应器构型

反应器构型对气液传质速率和传质方式、微生物聚集物的颗粒大小和形态有着显著影响。序批式反应器(SBR)、序半连续式反应器(SFBR)和连续搅拌罐反应器(CSTR)适合培养生长缓慢的微生物,是

使用最早且最多的富集 DAMO 微生物的反应器<sup>[44]</sup>。然而,SFBR 在富集 DAMO 微生物时容易出现亚硝酸盐积累<sup>[15]</sup>,CSTR 可以很好地控制底物(亚硝酸盐)负荷,但微生物截留效率和气相传质效率均较低。

随后,Ying SHI 等<sup>[45]</sup>尝试使用中空纤维膜生物反应器(HfMBR)实现 DAMO 微生物和 Anammox 细菌的共富集,其反硝化速率最高为 190 mg/(L·d)(以 N 计),远高于已报道的其他 DAMO 的反硝化速率。在 HfMBR 中,微生物附着在纤维表面形成生物膜,甲烷通过中空纤维膜直接转移至 DAMO 微生物,传质过程缩短,提高了 DAMO 反应中的甲烷利用率<sup>[46]</sup>。

然而,HfMBR 也有缺点,如较长的启动时间<sup>[47]</sup>、高比表面积膜(可达 2 222 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup><sup>[45]</sup>)带来的高成本、富集物转培后脱氮性能迅速下降<sup>[46]</sup>等。因此,Wenbo NIE 等<sup>[28]</sup>开发了一种基于 MBR 改良的新型反应器——膜曝气膜生物反应器(MAMBR),该反应器采用膜曝气技术,不仅有透气性隔水致密膜进行高效甲烷输送,同时有超滤膜保持生物量浓度。MAMBR 首次实现了 7 个月快速富集获得高浓度 DAMO 菌群,其中 DAMO 古菌的相对丰度高达 40.87%。而且,MAMBR 的比表面积(20 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>)仅为 HfMBR 的 0.9%~4.1%,富集物接种方便,是目前应用比较理想的反应器。

随着科研工作者的不断研究和创新,各种反应器构型也在不断被优化,微生物燃料电池(MFC)与各类型反应器的耦合或许也是快速富集 DAMO 微生物、实现高效脱氮的一个新方向<sup>[48]</sup>。

## 3 DAMO 微生物的潜在应用

传统的生物脱氮技术主要通过硝化/反硝化过程去除废水中的氮化合物。然而,反硝化过程会产生温室气体 N<sub>2</sub>O,同时反硝化菌需要利用有机碳源作为电子供体。当废水中碳源有机物含量不足时就需要额外添加碳源(醇类、有机酸类),水处理成本增加,残余碳源还存在二次污染的风险。而废水经过厌氧处理后,出水中的溶解性甲烷可达到系统中甲烷总产生量的 40% 及以上<sup>[49]</sup>,同时污泥消化过程也会产生甲烷,二者均可作为 DAMO 反硝化的电子供体。因此,DAMO 过程相较传统脱氮过程可以节约大量能源和成本,并可解决碳源短缺和温室气体排放的问题,具有一定的应用前景。

DAMO 过程可与 SHARON 工艺联用来处理 C/N

较低的废水。SHARON工艺由于需要驯化氨氧化菌将氨氮硝化控制在亚硝酸盐阶段,对环境条件的要求比较严格。而联合工艺可放宽pH、温度等条件范围,即使硝化过程出现硝酸盐,DAMO古菌也可将其转化为亚硝酸盐,而后再被DAMO细菌进一步转化为 $N_2$ 。通常情况下,短程硝化反硝化由于难以维持稳定的亚硝酸盐状态,成功实例并不多,而DAMO-SHARON联合工艺则具有明显的应用优势。

此外,DAMO过程与Anammox联用也具有较好的应用前景。Anammox是区别于传统反硝化的另一种脱氮途径,其是在缺氧条件下,以氨为电子供体、亚硝酸盐为电子受体,生成 $N_2$ 和少量硝酸盐的过程。Anammox作为一种节能高效的废水处理方式,已被广泛研究并工程化应用<sup>[50]</sup>。Anammox菌对pH、溶解氧、温度等环境因子的要求几乎与DAMO微生物一致,因此很多研究者采集的环境样品中同时含有Anammox和DAMO微生物,将二者进行共富集后可同时去除 $CH_4$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$ 和 $NH_4^+$ 。进水中的 $NH_4^+$ 和部分 $NO_2^-$ 被Anammox菌转化为 $N_2$ 和少量 $NO_3^-$ ;生成的 $NO_3^-$ 和进水中的 $NO_3^-$ 被DAMO古菌转化为 $NO_2^-$ ,进而被DAMO细菌最终转化为 $N_2$ 。这种组合的脱氮方式具有低碳节能的优势且具有可行性,相比单一的Anammox工艺更加灵活,对进水氮负荷波动的耐受性更强,可去除过量的铵盐、硝酸盐和亚硝酸盐。另外,Zhaowei DING等<sup>[29]</sup>的研究发现,Anammox菌不仅可与DAMO微生物共存,甚至可以提高DAMO古菌的活性,这是由于Anammox菌与DAMO细菌同时消耗 $NO_2^-$ ,使 $NO_2^-$ 浓度维持在较低水平,有利于DAMO古菌更快地催化 $NO_3^-$ 还原。Baoli ZHU等<sup>[50]</sup>在2011年首次实现了DAMO与Anammox微生物的共富集,此后陆续有研究者成功富集并获得混合菌群。但即使接种物是富集菌群,反应器的启动时间也几乎都在半年以上,脱氮效率也低于传统脱氮工艺,因此需要提高功能菌群的富集速度和脱氮效率以促进联合工艺投入实际工程应用。

## 4 未来研究方向

### 4.1 DAMO古菌对碳氮循环的贡献

研究者们针对DAMO细菌在自然环境中的贡献及其在反应器中的过程机理开展了广泛研究,然而针对DAMO古菌的研究则较为匮乏。实际上,由于DAMO细菌仅能以 $NO_2^-$ 为电子受体催化甲烷氧化,而自然环

境中的氮污染物则更多以 $NO_3^-$ 的形式存在。因此,DAMO古菌对系统内甲烷消耗和氮去除的贡献也相当重要。目前,研究者们仅在安徽稻田、巢湖、长江口等地开展过DAMO古菌的环境调研工作,并未获得系统的DAMO古菌环境分布信息,且未评估过硝酸盐型DAMO过程对环境中碳氮循环的贡献。因此,需要对DAMO古菌开展更多的研究工作,并计算硝酸盐型DAMO反应中的氮气产生通量和甲烷氧化量,从而科学地评价其环境功能意义。

### 4.2 模型研究

数学模型早已被广泛应用于模拟和预测废水处理过程中的各项指标,但较少有研究者致力于构建DAMO过程的数学模型。建模需要有充分的实验数据,才能准确描述反应器中各物种之间的化学计量关系和动力学参数。DAMO模型可由多个方程描述,如用Michaelis-Menten方程描述酶促反应动力学,用Monod方程描述甲烷浓度与反硝化速率之间的关系。Xueming CHEN等<sup>[51]</sup>利用AQUASIM软件构建了生物膜多基质模型以预测反应器中的甲烷氧化量和氮转化量,H. S. LEE等<sup>[52]</sup>则建模探讨了反硝化动力学参数对DAMO反应的影响。然而,目前的DAMO模型都是基于膜生物膜反应器(MBR)开发的,未来研究者们可根据采用的反应器类型构建新的适用模型,并据此优化反应器构型和反应条件。

## 5 结语

DAMO微生物近年来被证实存在于各种自然环境中,其富集过程、催化功能和影响因素是目前的研究热点。但关于影响因素的研究大多较为局限,且很少对机理进行深入探讨。值得注意的是,探索不同影响因子下DAMO微生物的响应机制能够为其高效富集提供有力依据。同时,DAMO微生物作为自然环境中甲烷和氮素的有效转化系统,其对全球甲烷转化的贡献量至今尚未被系统准确评估。总之,目前此领域仍存在较多未知问题,亟待更多元、更深入的探索研究。

### 参考文献

- [1] ZHENG Yanling, HOU Lijun, CHEN Feiyang, et al. Denitrifying anaerobic methane oxidation in intertidal marsh soils: Occurrence and environmental significance[J]. *Geoderma*, 2020, 357: 113943.
- [2] BARNES R O, GOLDBERG E D. Methane production and consumption in anoxic marine sediments[J]. *Geology*, 1976, 4(5): 297.

- [3] REEBURGH W S. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments[J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 1976, 28(3): 337-344.
- [4] PANGANIBAN A T J, PATT T E, HART W, et al. Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 37(2): 303-309.
- [5] RAGHOEBARSING A A, POL A, VAN DE PAS-SCHOONEN K T, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 918-921.
- [6] BEAL E J, HOUSE C H, ORPHAN V J. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 184-187.
- [7] VALENZUELA E I, AVENDAÑO K A, BALAGURUSAMY N, et al. Electron shuttling mediated by humic substances fuels anaerobic methane oxidation and carbon burial in wetland sediments[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 2674-2684.
- [8] VALENZUELA E I, PRIETO-DAVÓ A, LÓPEZ-LOZANO N E, et al. Anaerobic methane oxidation driven by microbial reduction of natural organic matter in a tropical wetland[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): e00645-e00617.
- [9] SEGARRA K E A, SCHUBOTZ F, SAMARKIN V, et al. High rates of anaerobic methane oxidation in freshwater wetlands reduce potential atmospheric methane emissions[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7477.
- [10] 耿丹丹, 卢培利, 李微微, 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.  
GENG Dandan, LU Peili, LI Weiwei, et al. Nitrate/nitrite-dependent anaerobic methane oxidation: Review on status and perspectives[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 364-373.
- [11] HU Baolan, SHEN Lidong, LIAN Xu, 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.
- [12] WANG Jiaqi, HUA Miaolian, LI Yufen, et al. Achieving high nitrogen removal efficiency by optimizing nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process with growth factors[J]. *Water Research*, 2019, 161: 35-42.
- [13] KAMPMAN C, HENDRICKX T L G, LUESKEN F A, et al. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 227/228: 164-171.
- [14] LUESKEN F A, VAN ALEN T A, 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.
- [15] HU Shihu, ZENG R J, 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.
- [16] DING Zhaowei, DING Jing, FU Liang, et al. Simultaneous enrichment of denitrifying methanotrophs and Anammox bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24): 10211-10221.
- [17] DEAN J F, MIDDELBURG J J, RÖCKMANN T, et al. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world[J]. *Reviews of Geophysics*, 2018, 56(1): 207-250.
- [18] 袁梦冬, 朱静, 吴伟祥. 微生物厌氧甲烷氧化反硝化研究进展[J]. *微生物学报*, 2014, 54(2): 129-138.  
YUAN Mengdong, ZHU Jing, WU Weixiang. Research progress in microbial anaerobic methane oxidation coupled to denitrification: A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(2): 129-138.
- [19] HALLAM S J, PUTNAM N, PRESTON C M, et al. Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics[J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1457-1462.
- [20] ALAWI M, LIPSKI A, SANDERS T, et al. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(3): 256-264.
- [21] CHISTOSERDOVA L, VORHOLT J A, LIDSTROM M E. A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea[J]. *Genome Biology*, 2005, 6(2): 208.
- [22] FRIEDMANN H C, KLEIN A, THAUER R K. Structure and function of the nickel porphyrinoid, coenzyme F<sub>430</sub>, and of its enzyme, methyl coenzyme M reductase[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 87(3/4): 339-348.
- [23] ETTWIG K F, SHIMA S, VAN DE PAS-SCHOONEN K T, et al. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of archaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3164-3173.
- [24] ETTWIG K F, BUTLER M K, LE PASLIER D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [25] ETTWIG K F, VAN ALEN T, VAN DE PAS-SCHOONEN K T, et al. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 Phylum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3656-3662.
- [26] KAMPMAN C, TEMMINK H, HENDRICKX T L G, 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.
- [27] HU Shihu, ZENG R J, BUROW L C, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 377-384.
- [28] NIE Wenbo, XIE Guojun, DING Jie, et al. High performance nitrogen removal through integrating denitrifying anaerobic methane oxidation and Anammox: From enrichment to application[J]. *Environment International*, 2019, 132: 105107.
- [29] DING Zhaowei, LU Yongze, FU Liang, 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.
- [30] HE Zhanfei, CAI Chen, SHEN Lidong, 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.
- [31] LIU Tao, KHAI LIM Z, CHEN Hui, et al. Temperature-tolerated mainstream nitrogen removal by Anammox and nitrite/nitrate-dependent anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(5): 3012-3021.
- [32] 范秋香, 吴箐, 常佳丽, 等. 反硝化型甲烷厌氧氧化的研究进展[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(6): 1747-1754.
- FAN Qiuxiang, WU Qing, CHANG Jiali, et al. Research progress in denitrifying anaerobic methane oxidation[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(6): 1747-1754.
- [33] CONRAD R. The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5): 285-292.
- [34] 楼菊青, 王析镭, 杨东叶, 等. 不同接种物对富集反硝化型甲烷厌氧氧化微生物的影响[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(11): 4087-4095.
- LOU Juqing, WANG Xilei, YANG Dongye, et al. Effects of different inoculum on the enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) organisms[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(11): 4087-4095.
- [35] HE Zhanfei, CAI Chaoyang, WANG Jiaqi, et al. A novel denitrifying methanotroph of the NC10 Phylum and its microcolony[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32241.
- [36] HE Zhanfei, GENG Sha, SHEN Lidong, 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.
- [37] 沈李东. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化微生物生态学研究进展[J]. *土壤学报*, 2015, 52(4): 713-722.
- SHEN Lidong. A review of study on microbial ecology of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52(4): 713-722.
- [38] 陈健, 申屠佳丽, 殷峻, 等. 甲烷厌氧氧化及其微生物特性研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2018, 40(2): 222-229.
- CHEN Jian, SHENTU Jiali, YIN Jun, et al. Advances in anaerobic oxidation of methane and its microbial characteristics[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2018, 40(2): 222-229.
- [39] 何焜飞, 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.
- HE Zhanfei, CAI Chen, SHEN Lidong, et al. Establishing and verifying of model for methane mass transfer in DAMO process[J]. *CIESC Journal*, 2012, 63(6): 1836-1841.
- [40] CAI Chen, HU Shihu, CHEN Xueming, et al. Effect of methane partial pressure on the performance of a membrane biofilm reactor coupling methane-dependent denitrification and Anammox [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 639: 278-285.
- [41] LEE K C, RITTMANN B E. Applying a novel autohydrogenotrophic hollow-fiber membrane biofilm reactor for denitrification of drinking water[J]. *Water Research*, 2002, 36(8): 2040-2052.
- [42] NAUHAUS K, BOETIUS A, KRÜGER M, et al. In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(5): 296-305.
- [43] LIU Zehua, YIN Hua, DANG Zhi, et al. Dissolved methane: A hurdle for anaerobic treatment of municipal wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(2): 889-890.
- [44] HE Zhanfei, CAI Chen, GENG Sha, et al. Modelling a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process: Parameters identification and model evaluation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 315-320.
- [45] SHI Ying, HU Shihu, LOU Juqing, 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.
- [46] FU Liang, DING Jing, LU Yongze, et al. Hollow fiber membrane bioreactor affects microbial community and morphology of the DAMO and Anammox co-culture system[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 232: 247-253.
- [47] XIE Guojun, LIU Tao, CAI Chen, et al. Achieving high-level nitrogen removal in mainstream by coupling Anammox with denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor[J]. *Water Research*, 2018, 131: 196-204.
- [48] 姚彬. MFC耦合MAMBR运行特性及强化脱氮研究[D]. 南京: 东南大学, 2019.
- YAO Bin. Study on operation characteristics and enhanced nitrogen removal of MFC coupled MAMBR [D]. Nanjing: Southeast University, 2019.
- [49] SMITH A L, SKERLOS S J, RASKIN L. Psychrophilic anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater[J]. *Water Research*, 2013, 47(4): 1655-1665.
- [50] ZHU Baoli, SÁNCHEZ J, VAN ALLEN T A, et al. Combined anaerobic ammonium and methane oxidation for nitrogen and methane removal[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(6): 1822-1825.
- [51] CHEN Xueming, GUO Jianhua, SHI Ying, et al. Modeling of simultaneous anaerobic methane and ammonium oxidation in a membrane biofilm reactor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9540-9547.
- [52] LEE H S, TANG Youneng, RITTMANN B E, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to denitrification: Fundamentals, challenges, and potential[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2018, 48(19/20/21): 1067-1093.
- [作者简介] 秦帆(1997—), 硕士。E-mail: 1911022010@post.usts.edu.cn。通讯作者: 丁静, 副教授。E-mail: dingjing@usts.edu.cn。
- [收稿日期] 2022-06-30(修改稿)