



文章栏目: 水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202005194

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

薛怡亭, 安法财, 石天晶, 等. 反硝化型厌氧甲烷氧化微生物的富集与影响因素分析[J]. 环境工程学报, 2021, 15(2): 599-608.

XUE Yiting, AN Facai, SHI Tianjing, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microbial and its influence factors analysis[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(2): 599-608.

反硝化型厌氧甲烷氧化微生物的富集与影响因素分析

薛怡亭, 安法财, 石天晶, 党岩, 孙德智*

北京林业大学, 水体污染源控制技术北京市重点实验室, 污染水体源控制与生态修复技术北京市高等学校工程研究中心, 北京 100083

第一作者: 薛怡亭(1989—), 女, 博士研究生。研究方向: 生态环境污染机制与修复技术。E-mail: 625851936@qq.com

*通信作者: 孙德智(1960—), 男, 博士, 教授。研究方向: 水体污染控制技术。E-mail: sdzlab@126.com

摘要 采用含有不同氮源的 SBR 进行为期 220 d 的反硝化型厌氧甲烷氧化 (DAMO) 微生物富集, 研究单一氮源和多氮源对 DAMO 富集的影响, 并用高通量测序对含有不同氮源的反应器内微生物群落结构进行了分析。结果表明, 单一氮源 (NO_3^-) 和多氮源 (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) 为进水的反应器硝氮降低速率分别为 $0.3 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ 和 $2.8 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, 这说明多氮源比单一氮源更适合富集 DAMO 微生物。微生物群落结构分析结果表明, 多氮源反应器中厌氧氨氧化细菌和 DAMO 古菌相对丰度 (0.56% 和 0.03%) 比单一氮源反应器中更高 (0.3% 和 0.02%)。采用厌氧小瓶实验对工艺参数优化, 结果确定 DAMO 反应的最适 pH 为 6~7; 最适温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 当甲烷分压大于 75 kPa 时, DAMO 反应速率不再受甲烷分压的限制。

关键词 反硝化型厌氧甲烷氧化; 微生物富集培养; 群落结构; 影响因素

厌氧甲烷氧化过程根据电子受体不同通常可分为 3 类: 一是硫酸盐还原型厌氧甲烷氧化 (sulphate-dependent anaerobic methane oxidation, SAMO)^[1]; 二是反硝化型厌氧甲烷氧化 (denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO)^[2-4]; 三是金属氧化物 (铁、锰依赖型)^[5-6] 和重金属盐类 (重铬酸盐、钒酸盐型)^[7-8] 厌氧甲烷氧化。反硝化型厌氧甲烷氧化 (DAMO) 工艺是近年来发现的一种新型脱氮工艺, 其以 CH_4 为电子供体, NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体实现反硝化脱氮^[9-11]。RAGHOEBARSING 等^[12] 从荷兰运河沉积物中富集培养出反硝化型厌氧甲烷氧化微生物群落, 检测到甲烷、亚硝酸盐和硝酸盐的同时消耗以及氮气的排放。通过进一步研究证明, 所消耗的亚硝酸盐和硝酸盐与所产生的氮气量相当, 首次证实厌氧甲烷氧化与反硝化作用的存在。有研究^[13-14] 发现, DAMO 富集体系中通常包含以 NO_2^- 为氮源的 NC10 门细菌和以 NO_3^- 为氮源的 DAMO 古菌存在。通过 DAMO 古菌和 DAMO 细菌的配合, 可实现废水中氮素的去除。由于 DAMO 过程不产生 N_2O , 可以直接利用甲烷, 减少温室气体的排放, 且避免了反硝化过程中外加碳源引起的二次污染, 同时实现废水中 NO_3^- 和 NO_2^- 的有效脱除等优点, 近几年引起了研究者的广泛关注^[15]。

收稿日期: 2020-05-25; 录用日期: 2020-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51978053)

但 DAMO 微生物存在代谢活性低、倍增时间长、富集培养困难、易受环境影响等问题^[16-19]。由于 DAMO 细菌缺少普通好氧甲烷氧化菌具有的细胞内膜，pMMO 酶是好氧甲烷氧化代谢的关键酶，多存在于细胞内膜上，而 DAMO 细菌仅有胞质膜可供 pMMO 酶结合，大大限制了 DAMO 细菌细胞内部的甲烷氧化代谢过程，使得 DAMO 细菌代谢活性降低，无法更好的与 DAMO 古菌配合完成整个反硝化过程^[20-21]。此外，由于 DAMO 微生物对环境要求严格，2% 的氧气就会抑制 DAMO 过程，且甲烷作为 DAMO 的唯一电子供体，其在水中溶解度低，限制了甲烷传质效率，影响了 DAMO 的富集。LI 等^[22]以硝酸盐为底物进行为期 600 d 的 DAMO 培养时，测序结果显示仍没有 DAMO 古菌的存在。赵荣等^[23]对亚硝酸盐依赖型 DAMO 微生物活性影响因素进行了研究，确定了最佳温度为 35 °C，最佳 pH 为 7.5，以及最适亚硝酸盐初始浓度为 2.4~3.42 mmol·L⁻¹，但目前几乎没有针对硝酸盐依赖型 DAMO 微生物活性影响因素方面的研究。基于此，本研究采用不同氮源反应器进行了硝酸盐依赖型 DAMO 功能微生物的富集，得到 DAMO 功能菌；采用厌氧小瓶序批式实验，探索了其最佳运行环境，优化工艺参数；通过高通量测序手段分析了微生物群落结构的变化，探究了其反应机理，实现了 DAMO 功能微生物的富集与影响因素的优化。

1 材料与方法

1.1 富集装置与方法

由于 DAMO 过程最有可能发生在甲烷和氮源丰富的厌氧或缺氧环境中^[24]，为提高富集成功率，本研究接种污泥来自于北京市海棠花溪河道底泥，北京市小红门再生水厂回流污泥，延庆水稻田土和延庆池塘底泥，培养液成分与 ETTWIG 培养时一致^[25]。

实验采用 SBR 进行富集，装置如图 1 所示。反应器为玻璃材质，采用双层结构，夹层为水浴间，起恒温保温作用。反应器内径为 15 cm、高为 30 cm，内部有效体积为 4.0 L，分为液相区 (3.0 L) 和顶部气相区 (1.0 L)。进样口和取样口处设置橡胶塞，防止环境中氧气进入反应器。富集期间保持严格厌氧，溶解氧浓度低于检出限。通过底部磁力搅拌器混合培养液，通过下部进气口通入甲烷，采用循环水浴保持温度恒定在 35 °C，采用 HCl 或 KOH 溶液调节反应器 pH 保持在 7.0~7.5。

由于 DAMO 微生物倍增时间长且富集时间久，为防止大量微生物流失，反应器氮源通过高浓度氮浓缩液的方式在加料口补充，以减少进出水导致的生物量流失。SBR 运行周期包括进水-反应-沉淀-排水，一个运行周期为 30 d，每个月最后一天停止搅拌使反应器沉淀 4 h，排去反应器内 1/2 水，补充培养液至 3 L，继续正常运行。每 5 d 对反应器中甲烷更新一次，保证甲烷充足。每周取水样 2~3 次，持续监测反应器中 NH₄⁺、NO₂⁻ 和 NO₃⁻ 浓度的变化。

富集培养分为 2 个阶段，在阶段 1 中首先采用硝态氮为氮源进行 DAMO 古菌的富集，在反应器运行稳定后，再进行不同氮源的反应器富集效果对比 (阶段 2)。阶段 1 中的具体方法为：采用 SBR 对原始泥样进行为期 80 d 的初期培养，加入新鲜培养液，氮源仅为 NO₃⁻，投加 NO₃⁻ 浓缩液使反应器中 NO₃⁻ 浓度在 50~110 mg·L⁻¹，持续监测 NO₃⁻ 浓度，计算转化速率，当 NO₃⁻ 消耗殆尽时，再补充 NO₃⁻ 浓缩液，保证底物不受限。阶段 2 的具体方法为：平行启动 2 组 SBR，在 SBR-1 和 SBR-2 反应

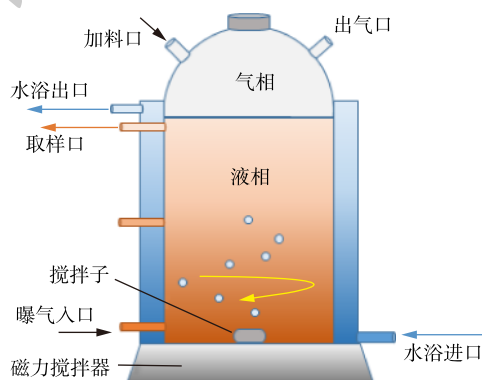


图 1 SBR 装置图

Fig. 1 Diagram of SBR

器中分别接种 500 mL 的初期富集培养物，加入培养液到 3 L 混合均匀。SBR-1 加入氮源仅为 NO_3^- (30~50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，SBR-2 加入氮源为 NO_3^- (40~70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 NH_4^+ (30~70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 NO_2^- (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，持续监测 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 浓度，当底物消耗殆尽时，再补充氮浓缩液，保证底物不受限。研究不同氮源反应器 DAMO 功能菌富集效果的影响。

1.2 DAMO 影响因素实验方法

采用有效体积 150 mL 的透明血清瓶进行实验，加入 20 mL 活性较高的 SBR-2 中富集 220 d 的培养物与 100 mL 新鲜培养液，用高纯氮气 (99.999%) 向液相中曝气 10 min，橡胶塞密封，维持瓶中厌氧环境。采用排液法向瓶内充 99.99% 的甲烷 40 mL，为避免多氮源体系中反应复杂对 DAMO 活性影响研究产生干扰，血清瓶中只加硝态氮，硝态氮初始浓度 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，进行避光、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温振荡培养，待体系稳定后进行影响因素实验。

本研究设置 3 个影响因素实验 (表 1)，包括 pH、温度与甲烷分压。每组实验设置 3 个平行，甲烷分压通过调节顶空甲烷与氮气比例设置，pH 通过加入 HCl 和 KOH 溶液调节。

1.3 分析测试方法

硝态氮、亚硝态氮、氨氮采用分光光度法进行测定 (DR6000, HACH)，MLVSS 采用重量法进行计算。甲烷总量为气相甲烷与液相甲烷之和，气相甲烷采用 Techcomp 公司 GC7900 气相色谱仪和 FID 检测器 (美国安捷伦科技公司) 进行检测，液相中甲烷浓度按照式 (1) 进行计算。

$$X_s = X_a (V_a + bV_s) / V_s \quad (1)$$

式中： X_s 为溶液中甲烷浓度； X_a 为摇晃后顶空甲烷浓度； V_a 为顶空体积，mL； b 为甲烷液气分配系数，25 $^{\circ}\text{C}$ 时取 0.03； V_s 为溶液体积，mL。

1.4 微生物分析方法

在 SBR-1 和 SBR-2 反应器运行结束后，取 2 个反应器中适量样品进行 DNA 提取。DNA 提取及纯化过程参照北京艾德莱生物科技有限公司 DNA 快速提取试剂盒说明书进行，将提取并纯化的 DNA 样品委托北京美吉生物医药科技有限公司进行第二代高通量测序。采用表 2 所示引物进行 PCR 扩增。高通量测序在 Illumina HiSeq 2000 平台 (Illumina, San Diego, USA) 上进行。相似度 97% 以上的序列合并为一个操作分类单位 (OTU)。根据 OTU 聚类，进行各分类学水平上的群落结构与组成分析。

2 结果与讨论

2.1 DAMO 功能微生物的富集

图 2(a) 表示在阶段 1 (0~80 d) 的 SBR 中 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 浓度随时间的变化。由图 2(a) 可知，外加氮源仅为 NO_3^- ，当 NO_3^- 浓度低于 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，补充 NO_3^- 保证基质不受限，在整个培养初期， NO_2^- 浓度在 0~5.06 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，未发生 NO_2^- 积累，氨氮浓度持续缓慢升高，通过换水的方式控制，分析氨氮的产生主要由于大量微生物细胞死亡裂解所致。

根据图 2(b) 对培养初期 SBR 中硝态氮降解速率进行了分析，可以看出，硝态氮降解速率可明显分为 3 个阶段。0~17 d 时反应器 NO_3^- 降解速率较低，且呈逐渐下降趋势，从 45 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 降至

表 1 DAMO 影响因素实验设置

Table 1 Experimental setting of influential factors on DAMO

分组	pH	温度/ $^{\circ}\text{C}$	甲烷分压/kPa
实验1	5.0、6.0、7.0、8.0	35	100
实验2	7.0	25、30、35、40	100
实验3	7.0	35	25、50、75、100

表 2 高通量测序选用的引物序列

Table 2 Primer sequences for high throughput sequencing

微生物	引物名称	序列(5'~3')
细菌	341b4_F	CTAYGRRBGCWGCAG
	806_R	GGACTACNNGGGTATCTAAT
古菌	524F10extF	TGYCAGCCGCCGCGGTAA
	Arch958RmodR	YCCGGCGTTGAVTCCAATT

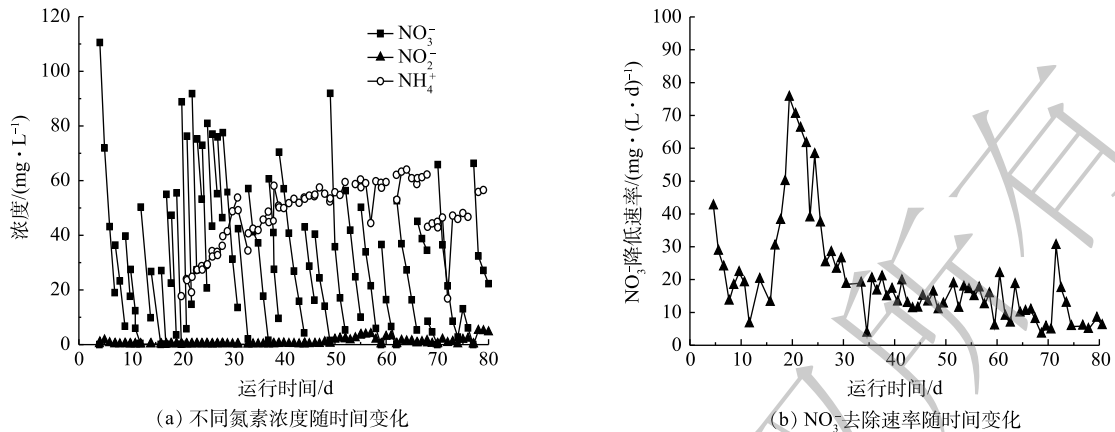


图2 培养初期(0~80 d)反应器运行效果

Fig. 2 Enrichment effect of the reactor during 0~80 days

11 mg·(L·d)⁻¹, 此时初始接种物中残留有机碳为反硝化过程提供碳源。17~30 d时NO₃降解速率呈现先升高后降低的趋势, 由11 mg·(L·d)⁻¹逐步升高至79 mg·(L·d)⁻¹再降低至20 mg·(L·d)⁻¹。前期上升的原因为, 反应器进入内源代谢阶段, 微生物利用自身贮藏物质和酶等来取得营养物质, 此时大量细胞裂解死亡产生的碳源为反硝化提供电子供体, 硝氮降低速率逐渐上升; 后期下降的原因为, 反应器内残余的除甲烷外的碳源被不断消耗而得不到补充, 内源反硝化活性不断降低, 硝氮降低速率逐渐下降。31~80 d反应器NO₃降低速率逐渐趋于稳定, 基本保持在5 mg·(L·d)⁻¹到30 mg·(L·d)⁻¹, 反应器进入漫长的停滞期。此外, 在第40天和第80天分别测定CH₄消耗速率与NO₃消耗速率之比, 用来表示DAMO对NO₃转化的贡献占比。40 d时CH₄/NO₃消耗计量比为0.06, 80 d时CH₄/NO₃消耗计量比为0.18, 虽然仍未达到DAMO理论计量比0.625, 但比值升高表明DAMO过程对NO₃降解的贡献占比缓慢升高。

为提高富集成功率, 在初期培养后分别采用含有不同氮源的SBR反应器对DAMO微生物进行培养, SBR-1氮源为NO₃⁻, SBR-2氮源为NO₂⁻、NO₃⁻、NH₄⁺, 反应器运行方式同初期富集方式。图3(a)与图3(b)分别表示SBR-1和SBR-2反应器中NO₂⁻、NO₃⁻、NH₄⁺浓度随时间变化过程。由图3(a)可知, SBR-1中NO₂⁻浓度始终在6.3 mg·L⁻¹以下, 未发生NO₂⁻积累, 氨氮浓度持续到第113天时开始下降, 直到第140天时降为0 mg·L⁻¹, 此后再未出现氨氮的积累, 这表明微生物死亡率下降, 由细胞裂解产生的氨氮不再出现, 反应器内源反硝化阶段结束。

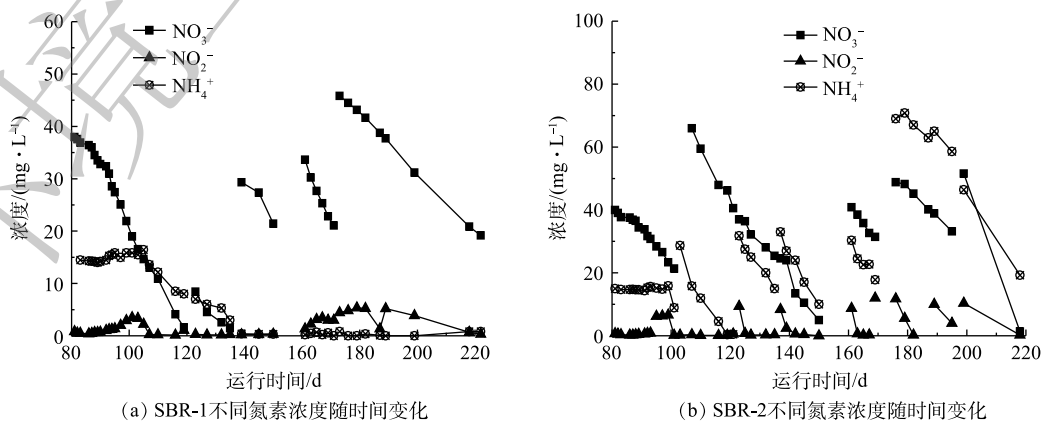


图3 SBR-1和SBR-2中不同氮素浓度的变化

Fig. 3 Variations of concentration of different nitrogen species in SBR-1 and SBR-2

对 SBR-1 和 SBR-2 反应器中硝态氮转化速率进行分析, 结果如图 4(a) 与图 4(b) 所示。富集结束时 SBR-1 硝氮降低速率为 $0.3 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, SBR-2 硝氮降低速率为 $2.8 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ 。虽然反硝化速率有所波动, 但从 80~220 d 的平均值也可以看出, SBR-1 硝氮降低速率平均值为 $0.90 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, SBR-2 硝氮降低速率平均值为 $1.38 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, 所以多氮源相比于单一氮源的反应器更有助于 DAMO 古菌的富集。其主要原因可能是, 在多氮源反应器中除了硝氮外, 还添加了氨氮与亚硝氮, 在厌氧环境下培养出部分 anammox 细菌, anammox 细菌对 NO_2^- 的亲数和常数要低于 DAMO 细菌, 对 NO_2^- 的竞争能力更强, 限制了 DAMO 细菌的大量繁殖, 从而促进 DAMO 古菌对甲烷的利用, 有利于 DAMO 古菌的富集。所以 Anammox-DAMO 系统联合作用有助于 DAMO 古菌的富集培养, 从而提高硝氮转化速率。这与 FU 等^[26]的研究结果一致, 他们发现, 在添加不同氮源时 DAMO 功能菌的富集培养过程中, 当采用 NO_2^- 、 NO_3^- 、 NH_4^+ 为氮源时硝氮转化速率最快。前期有研究^[12, 27-28]表明, DAMO 微生物富集时间在 300~600 d 时反硝化速率为 $0.18 \sim 2 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, 本实验在 220 d 时就达到了 $2.8 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, 有效缩短了培养时间。

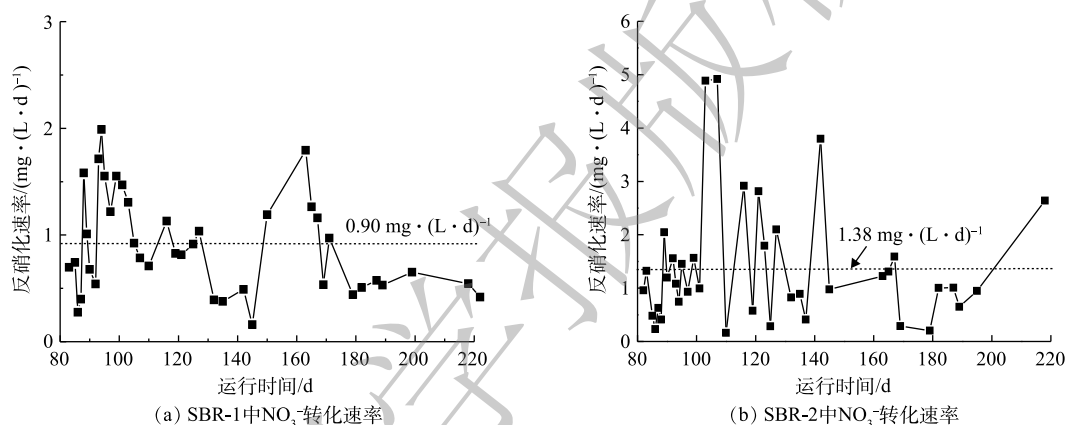


图 4 SBR-1 和 SBR-2 中 NO_3^- 转化速率

Fig. 4 NO_3^- conversion rate in SBR-1 and SBR-2

由表 3 可知, SBR-1 和 SBR-2 反应器在富集末期存在明显的 CH_4 消耗, 这说明在 2 个反应器中均存在 DAMO 过程。此外 2 个反应器中实际 $\text{CH}_4/\text{NO}_3^-$ 消耗计量比均小于理论 DAMO 计量比值, 引起这一偏差的原因, 可能是由于系统中存在有机残留物 (如微生物代谢产物等) 时的异养反硝化作用所导致的。

表 3 SBR-1 和 SBR-2 反应器 CH_4 消耗

Table 3 Methane consumption in SBR-1 and SBR-2

反应器	反应时间/h	甲烷消耗量/mol	NO_3^- 消耗量/mol	$\text{CH}_4/\text{NO}_3^-$ 消耗计量比	理论 DAMO 计量比
SBR-1	117	$1.909 2 \times 10^{-4}$	$3.471 4 \times 10^{-4}$	0.550	0.625
SBR-2	117	$2.398 9 \times 10^{-3}$	$4.817 1 \times 10^{-3}$	0.498	

2.2 DAMO 功能微生物群落结构分析

1) 不同氮源反应器微生物多样性差异分析。富集结束后对 SBR-1 和 SBR-2 中的微生物进行了群落结构分析 (表 4)。shannon、simpson 指数反映群里多样性, simpson 指数越大, 说明群落多样性越低, shannon 值越大, 说明群落多样性越高, chao、ace 指数反映群落丰富度, 值越大, 群落丰富度越高^[29]。综合 SBR-1 和 SBR-2 反应器中古菌多样性指数可以看出, SBR-2 比 SBR-1 中古菌的多样性更高, 丰富度更高。而从细菌群落多样性指数可以看出, SBR-1 比 SBR-2 多样性更高, 但 SBR-2

丰富度更高。所以多氮源富集培养 DAMO 比仅用硝氮培养 DAMO 的反应器群落结构更加丰富，微生物多样性更高。

2) 不同氮源反应器微生物群落结构分析。对 2 个反应器中细菌群落与古菌群落结构差异进行了详细解析。对细菌门水平分析发现，SBR-1 中丰度前 5 的门及其占比分别为 *Proteobacteria* (23.12%)>*Patescibacteria* (17.83%)>*Chloroflexi* (14.55%)>*Actinobacteria* (11.88%)>*Acidobacteria* (9.72%)。SBR-2 中丰度前 5 的门及其占比分别为 *Patescibacteria* (27.29%)>*Chloroflexi* (16.06%)>*Proteobacteria* (15.30%)>*Actinobacteria* (11.11%)>*Bacteroidetes* (6.91%)。需特别注意的是，2 个反应器中均含有少量的 NC10 门细菌，其中 SBR-1 中 NC10 占 0.16%，SBR-2 中 NC10 占 0.1%，NC10 门细菌是典型的亚硝酸盐依赖型甲烷厌氧氧化反硝化细菌^[30]，其主要利用 NO₂ 为电子受体，甲烷为电子供体，在厌氧环境下进行反硝化型甲烷厌氧氧化，从而达到废水中溶解甲烷与 NO₂ 的同步去除。

根据图 5，对不同氮源 SBR 中细菌在目和属水平上进行分析，发现 *Candidatus_Nomurabacteria* 目在 SBR-1 和 SBR-2 中占比分别为 6.54% 和 3.38%，其通常大量参与氮、硫和铁循环的自养类群，与溶解氧负相关。此外，在 SBR-1 和 SBR-2 中均发现厌氧氨氧化细菌，SBR-1 中厌氧氨氧化菌占 0.30%，SBR-2 中厌氧氨氧化菌占 0.56%。具体共有 3 种厌氧氨氧化菌属：*Candidatus_Brocadia* 在 SBR-1 中占 0.29%，在 SBR-2 中占 0.24%；*Candidatus_Kuenenia* 在 SBR-1 中未发现，在 SBR-2 中占 0.29%；*Candidatus_Anammoximicrobium* 在 SBR-1 中占 0.01%，在 SBR-2 中 0.03%。可见，在 SBR-2 中厌氧氨氧化细菌的相对丰度大于 SBR-1 中。虽然 SBR-1 的微生物培养时并未外加氨氮与亚硝氮，但大量细胞裂解死亡产生的氨氮为厌氧氨氧化菌的存在提供条件，且亚硝氮的存在很可能是由于 DAMO 古菌将 NO₃ 还原为 NO₂，所以从侧面证实 DAMO 古菌存在的可能。

对含有不同氮源 SBR 中古菌门水平群落结构分析可知，SBR-1 和 SBR-2 中前 5 类主要的门种类一致。其中，广古菌门 *Euryarchaeota* 在 SBR-1 和 SBR-2 中丰度均为最高，占比分别是 82% 和 80%，它通常包含了古菌中的大多数种类，包括产甲烷菌、在极高盐浓度下生活的盐杆菌、一些超嗜热的好氧和厌氧菌等。其他古菌占比依次为奇古菌门 *Thaumarchaeota* (SBR-1 中占 8.0%，SBR-2 中占 6.2%)、泉古菌门 *Crenarchaeota* (SBR-1 中占 5.7%，SBR-2 中占 3.7%) 和纳古菌门 *Nanoarchaeaeota*

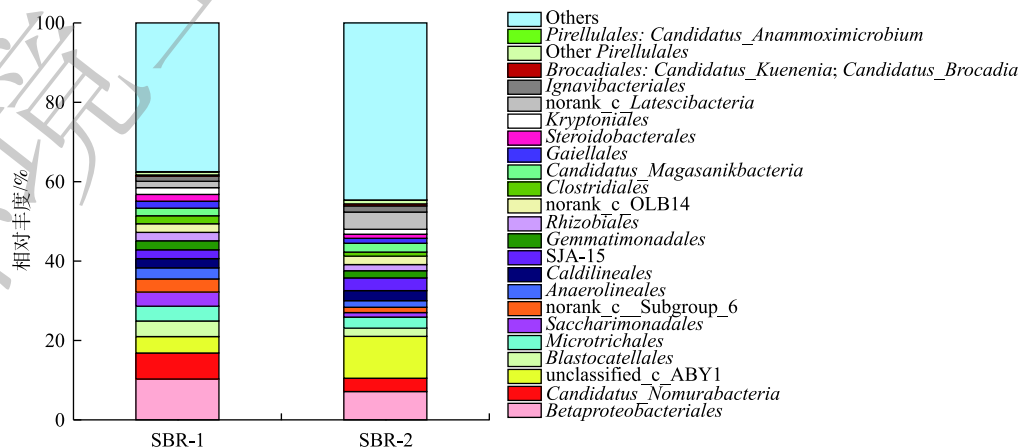


图 5 不同氮源 SBR 中细菌群落结构分析

Fig. 5 Relative abundance distributions of bacteria community in SBR-1 and SBR-2

(SBR-1 中占 0%，SBR-2 中占 6.7%)。

由图 6 可知，对含不同氮源 SBR 中的古菌属水平进行分析发现，SBR-1 中丰度前 5 的属及其占比分别为：甲烷杆菌属 *Methanobacterium* (49.76%)>甲烷短杆菌 *Methanobrevibacter* (10.04%)>甲烷八叠球菌 *Methanosarcina* (9.76%)>*Methanomassiliicoccus* (2.42%)>*Rice_Cluster_I* (2.26%)。SBR-2 中丰度前 5 的属及其占比分别为：甲烷杆菌属 *Methanobacterium* (40.99%)>甲烷八叠球菌 *Methanosarcina* (11.93%)>甲烷短杆菌 *Methanobrevibacter* (10.85%)>*Methanomassiliicoccus* (2.70%)>甲烷鬃毛菌 *Methanosaeta* (2.20%)，

可见，2 个反应器中主要微生物均为产甲烷古菌，同时，均发现能够进行硝酸盐依赖型厌氧甲烷氧化反硝化 (DAMO) 的古菌 *Candidatus_Methanoperedens*，分别在 SBR-1 中占 0.02%，SBR-2 中占 0.03%。可见，DAMO 古菌相对丰度在多氮源的 SBR-2 反应器中占比略高于单一氮源的 SBR-1 反应器。结合之前微生物细菌的比较分析，可发现，厌氧氨氧化细菌较多时 DAMO 古菌丰度更高，分析原因主要由于厌氧氨氧化细菌可限制 DAMO 细菌的增殖，减少其对甲烷的竞争，从而促进 DAMO 古菌对甲烷的利用，有利于 DAMO 古菌的富集，所以多氮源反应器中厌氧氨氧化细菌的增殖有助有 DAMO 古菌的富集。

2.3 DAMO 活性影响因素分析

1) pH 对 DAMO 活性的影响。不同 pH 条件下的 DAMO 过程中的反硝化速率如图 7 所示。当 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 时，对应的 7 d 内平均反硝化速率分别为 0.222、0.296、0.292、0.178 $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ 。说明当 pH 为 6.0 时，反硝化速率最大，而 pH 为 7.0 时，反硝化速率略低于 pH 为 6.0 时。这也说明，当 pH 在 6~7 时 DAMO 活性最强，pH 过高或过低均会抑制 DAMO 活性。目前已报道的 DAMO 微生物富集培养适合的 pH 多在 6~8^[31]，ZHU 等^[32]的研究认为，当 pH 为 7.4 时 DAMO 反应活性最强，而 HE 等^[33]研究表明，最适 pH 为 7.6，在低于 7.6 时 DAMO 活性就会受到抑制。

2) 温度对 DAMO 活性的影响。理论上，由于温度越低，甲烷在水中的溶解度越高，反应器中可利用的甲烷越多，反应性运行效能越好，但过低的温度会抑制反应器中微生物的活性，所以研究温度对 DAMO 反应的影响至关重要。图 8 显示了不同温度梯度下 DAMO 过程反硝化速率变化，可见，在当温度为 25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 时，对应的 7 d 内平均反硝化速率分别为 0.085、0.151、0.292、0.147 $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ 。

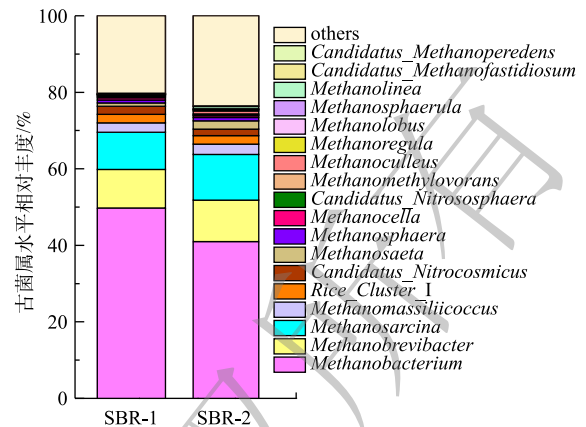


图 6 不同氮源 SBR 中古菌属水平分析

Fig. 6 Relative abundance distributions of archaea at the genus level in SBR-1 and SBR-2

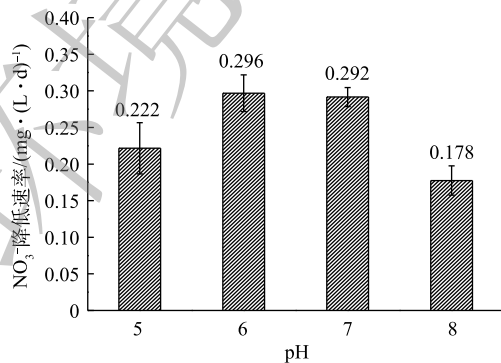


图 7 pH 对 DAMO 活性的影响

Fig. 7 Effect of pH on DAMO

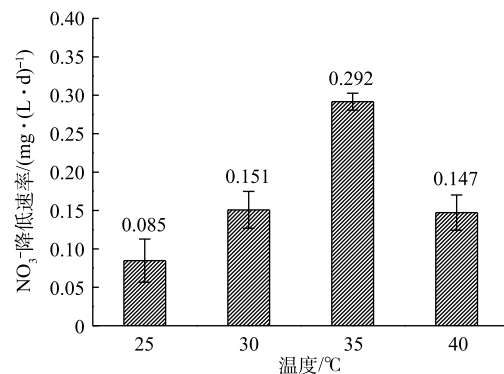


图 8 温度对 DAMO 活性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on DAMO

0.292 和 0.147 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。所以, 温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 反硝化速率最大, DAMO 活性最强。何焜飞^[34] 经过短期与长期不同温度的 DAMO 微生物培养也表明最适温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。而最新研究^[35] 表明, 当长期运行时, MBfR 温度从逐步从 25 $^{\circ}\text{C}$ 降低到 10 $^{\circ}\text{C}$ 仍能获得较好的 DAMO 活性, 氮去除速率为 0.13 $\text{kg}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$, 所以, 长期运行时温度对反应器的影响还需进一步探究。

3) 甲烷分压对 DAMO 活性的影响。由于甲烷是 DAMO 过程的唯一碳源, 而甲烷在水中的溶解度低限制了 DAMO 微生物的培养。在本研究中, 当设置甲烷分压为 25、50、75、100 kPa 时, 如图 9 所示, 对应的 7 d 内相对反硝化速率分别为 0.261、0.267、0.299、0.300 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。可见, 甲烷分压越高, 反硝化速率越高; 当甲烷分压在 75~100 kPa 时的反硝化速率高于甲烷分压为 25~50 kPa 的实验组。上述结果说明, 较高的甲烷分压对 DAMO 功能有利。但甲烷分压为 75 kPa 和 100 kPa 时的 2 个实验组之间差别不明显, 说明当甲烷分压大于 75 kPa 时, 不再是 DAMO 功能的限制因素。赵荣等^[23] 的研究表明, 甲烷分压在 49 kPa 以上即可满足 DAMO 细菌的富集培养。何焜飞等^[36] 通过建立甲烷传质模型表明, 当甲烷分压为 25.33 kPa 时, 不再是 DAMO 活性限制因素, 并且提高搅拌速度有助于提高甲烷传质。

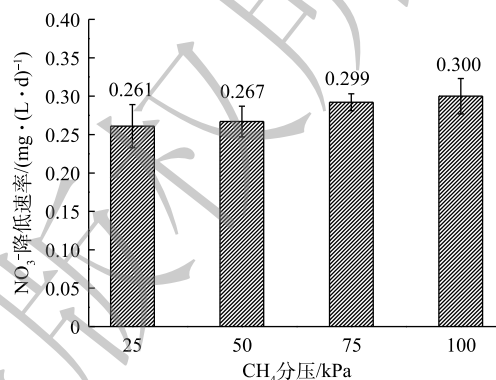


图9 甲烷分压对 DAMO 活性的影响

Fig. 9 Effect of partial pressure of methane on DAMO

3 结论

1) 单一氮源 (NO_3^-) 的 SBR-1 反应器和多氮源 (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) 的 SBR-2 反应器富集末期硝氮降低速率分别为 0.3 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 和 2.8 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$, 这说明多氮源比单一氮源更适合富集 DAMO 微生物。

2) SBR-2 反应器中厌氧氨氧化细菌和 DAMO 古菌相对丰度 (0.56% 和 0.03%) 比 SBR-1 中更高 (0.3% 和 0.02%)。厌氧氨氧化细菌的增殖有助于 DAMO 古菌的富集。

3) 根据工艺参数优化结果确定, DAMO 反应最适 pH 为 6~7、最适温度为 35 $^{\circ}\text{C}$; 当甲烷分压大于 75 kPa 时, DAMO 反应速率不再受甲烷分压的限制。

参考文献

- [1] SARA L, CALDWELL, JAMES R, et al. Anaerobic oxidation of methane: Mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(18): 6791-6799.
- [2] REN Y, NGO H H, GUO W, et al. New perspectives on microbial communities and biological nitrogen removal processes in wastewater treatment systems[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 297: 122491.
- [3] WANG D, WANG Y, LIU Y, 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.
- [4] 翟俊, 李媛媛, 何孟狄, 等. 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.
- [5] CAI C, LEU A, XIE G, et al. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(8): 1929-1939.
- [6] LEU A, CAI C, MCILROY S, et al. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the Methanoperedenaceae[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(4): 1030-1041.

- [7] HE C, ZHANG B, YAN W, et al. Enhanced microbial chromate reduction using hydrogen and methane as joint electron donors[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 395: 122684.
- [8] ZHANG B, JIANG Y, ZUO K, et al. Microbial vanadate and nitrate reductions coupled with anaerobic methane oxidation in groundwater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 382: 121228.
- [9] XIE G, CAI C, HU S, 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.
- [10] ALLEGUE T, ARIAS A, FERNANDEZ N, et al. Enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria in a membrane bioreactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 347: 721-730.
- [11] ETTWIG K F, BUTLER M K, LE P D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [12] RAGHOEBARSING A A, POL A, KT V D P S, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 918-921.
- [13] 蔡朝阳, 何翊飞, 胡宝兰. 甲烷氧化菌分类及代谢途径研究进展[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2016, 42(3): 273-281.
- [14] 陈颖. 厌氧甲烷氧化微生物代谢分子机制及其潜在参与矿物形成机理的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [15] 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.
- [16] HU B, SHEN L, ZHENG P, et al. Distribution and diversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in the sediments of the Qiantang River[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(5): 540-547.
- [17] HU B, SHEN L, 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.
- [18] SHEN L, WU H, GAO Z, et al. Presence of diverse *Candidatus Methyloirabilis oxyfera*-like bacteria of NC10 phylum in agricultural soils[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1552-1560.
- [19] SHEN L, WU H, LIU X, et al. Cooccurrence and potential role of nitrite- and nitrate-dependent methanotrophs in freshwater marsh sediments[J]. *Water Research*, 2017, 123: 162-172.
- [20] WU M, VAN A, VAN D, et al. Co-localization of particulate methane monooxygenase and *cd1* nitrite reductase in the denitrifying methanotroph '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*'[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334(1): 49-56.
- [21] WU M, VAN T, WILLEMS M J R, et al. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph "*Candidatus methyloirabilis oxyfera*," a novel polygon-shaped bacterium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 284-291.
- [22] LI W, LU P, CHAI F, et al. Long-term nitrate removal through methane-dependent denitrification microorganisms in sequencing batch reactors fed with only nitrate and methane[J]. *AMB Express*, 2018, 8: 108.
- [23] 赵荣, 朱雷, 吴箐, 等. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化过程影响因素研究[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(1): 178-184.
- [24] DING J, FU L, DING Z, et al. Environmental evaluation of coexistence of denitrifying anaerobic methane-oxidizing archaea and bacteria in a paddy field[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(1): 439-446.
- [25] ETTWIG K F, VAN A T A, DE P K V, 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] FU L, DING J, LU Y, et al. Nitrogen source effects on the denitrifying anaerobic methane oxidation culture and anaerobic

- ammonium oxidation bacteria enrichment process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3895-3906.
- [27] HU S, 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] 耿莎. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化菌富集培养及优化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [29] 薛怡亭. MBR深度处理垃圾焚烧渗沥液的效能与膜污染控制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
- [30] 吴箐. 反硝化型甲烷厌氧氧化的功能菌群富集及过程强化研究[D]. 北京: 清华大学, 2018.
- [31] ZHU G, ZHOU L, WANG Y, et al. Biogeographical distribution of denitrifying anaerobic methane oxidizing bacteria in Chinese wetland ecosystems[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1): 128-138.
- [32] ZHU B, DIJK G, FRITZ C, et al. Anaerobic oxidation of methane in a minerotrophic peatland: Enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8657-8665.
- [33] HE Z, GENG S, PAN Y, et al. Improvement of the trace metal composition of medium for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria: Iron (II) and copper (II) make a difference[J]. *Water Research*, 2015, 85(15): 235-243.
- [34] 何翥飞. 亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化细菌培养条件优化及其生态功能[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [35] LIU T, LIM Z, CHEN H, 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.
- [36] 何翥飞, 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.

(本文编辑: 曲娜, 张利田, 郑晓梅)

Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microbial and its influence factors analysis

XUE Yiting, AN Facai, SHI Tianjing, DANG Yan, SUN Dezhi*

Engineering Research Center for Water Pollution Source Control and Eco-Remediation, Beijing Key Laboratory for Source Control Technology of Water Pollution, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

*Corresponding author, E-mail: sdzlab@126.com

Abstract In this study, different nitrogen sources was used to enrich the denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) microbial in SBR for 220 days and the influences of single nitrogen source and multiple nitrogen source on DAMO enrichment were investigated. Microbial community structure in the different SBRs was analyzed by high-throughput sequencing. The experimental results showed that the final nitrate removal rates in the SBRs with a single nitrogen source (NO_3^-) and a multi-nitrogen source (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) were $0.3 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ and $2.8 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, respectively, indicating that multi-nitrogen source were more suitable for DAMO enrichment than single nitrogen source. High-throughput sequencing results showed that the relative abundances of anammox bacteria and DAMO archaea in the SBR with a multi-nitrogen source (0.56%, 0.03%) were higher than those in the SBR with a single nitrogen source (0.3%, 0.02%), respectively. The anaerobic vial test was used to optimize the process parameters, the optimal pH and temperature of DAMO reaction were 6~7 and 35°C , respectively. When the partial pressure of methane increased to 75 kPa, the DAMO reaction rate was no longer restricted by the partial pressure of methane.

Keywords denitrifying anaerobic methane oxidation; microbial enrichment; microbial community structure; influence factors