



Y2270131

反硝化型甲烷厌氧氧化微生物的富集培养研究



论文作者签名: 蔡琛

指导教师签名: 胡宝兰

论文评阅人 1: 闵航 教授 浙江大学生命科学学院

评阅人 2: 黄武 教授级高工 浙江省农业生态与能源办公室

评阅人 3: 楼莉萍 副教授 浙江大学环境与资源学院

答辩委员会主席: 郑平 教授 浙江大学环境与资源学院

委员 1: 张春龙 教授 美国休斯顿大学环境科学系

委员 2: 田光明 研究员 浙江大学环境与资源学院

委员 3: 胡勤海 副教授 浙江大学环境与资源学院

委员 4: 胡宝兰 副教授 浙江大学环境与资源学院

答辩日期: 2013.03.08

**Research on enrichment of denitrifying anaerobic methane  
oxidizing microorganisms**



Author's signature: Cai Chen

Supervisor's signature: Hu Baolan

External Reviewers: Professor MIN Hang

Professorate senior engineer HUANG Wu

Associate professor LOU Liping

Examining Committee Chairperson:

Professor ZHENG Ping

Examining Committee Members:

Professor ZHANG Chunlong

Professor TIAN Guangming

Associate professor HU Qin Hai

Associate professor HU Baolan

Date of oral defence: March 8, 2013

## 浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：蔡琛 签字日期：2013 年 3 月 13 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：蔡琛 导师签名：胡宝兰

签字日期：2013 年 3 月 13 日

签字日期：2013 年 3 月 13 日

## 致 谢

就像所有有结局的故事一样，在我书写的浙大往事中，也该写到结束这一页了。此刻我是理性的，仅为自己在这里走过的两年半历程划上一个休止符。

这本硕士毕业论文记录了我初入科研大门历经的种种，从孕育到诞生，过程虽然艰辛，结果却让人释然。它的完成得到了许多人的帮助。

走入 286 室，感谢我的导师胡宝兰副教授。您是我科研起步阶段的领路人，从课题设计、实验开展、结果分析、论文写作等各个方面，都得到了您的悉心指导，在此道一声感谢。您对学生成绩的认可，错误的纠正，迷途的引导以及失败的宽容，都体现了身为人师的责任与担当。与导师两年多的相处，让我从一个被动求学的学生变成一个有所悟的科研参与者，这细微的成长将会成为我求学路上的宝贵财富。

走入 284 室，感谢环境生物技术实验室的郑平教授，您是一位谦和与敬业的学者与老师。您在学习室、实验室、办公室、食堂甚至路边与学生交流、攀谈的场景，让人看到了您的随和，而您长明的办公室灯光、深夜的电子邮件以及恒温室汗流浹背的身影，又让人看到了您孜孜不倦的敬业心。耳濡目染，言传身教，您的言行给了我积极的影响。

来到 275 室，环境生物技术实验室的兄弟姐妹，今天来跟你们道别。陈婷婷、季军远、楼菊青、沈李东、张吉强、丁爽、张萌、陆慧峰、刘帅、谢作甫、邢雅娟、王兰、张红陶、何鹏飞、厉巍、陈慧、王茹、耿莎、Abbas，不管相处的时间长短，感谢大家一路的相伴，有你们，一路走来并不孤单。感谢已毕业的蔡靖、陈小光、唐崇俭、陈建伟、胡安辉等师兄师姐，你们让我看到了选择不同的道路也可以有同样的精彩。

最后是我踏出校门的时刻了，感谢父母的无微不至，兄、嫂的体贴入微以及女友的支持鼓励，成长虽然会带点疲惫与遗憾，你们的包容却让我倍感安宁。

合上书本，我告诉自己脚踏实地，理想弥足珍贵，要让自己去搏一回；离别浙大，轻轻地对所有的相识道一声，珍重！再见！

蔡 琛

2013 初春于紫金港启真湖畔

---

## 序言

本论文的完成得到了

国家自然科学基金(No.51108408)

浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划

(No.2011R401174)

资助

谨此致谢!

---

## 摘要

反硝化型甲烷厌氧氧化(Denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO)是一种新发现的微生物反应,催化该过程的微生物——NC10 门细菌,能够耦联甲烷的厌氧氧化和  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  的还原。DAMO 过程连接了碳素循环和氮素循环,丰富了生物地球化学循环途径;NC10 门细菌形态特殊,并且具有独特的代谢途径,扩充了微生物学内容;DAMO 作用能同时去除甲烷与  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  两种污染物,是环境工程领域新型除碳脱氮工艺开发的理想选择。然而,NC10 门细菌生长极其缓慢,要获得 DAMO 富集培养物十分困难。接种物、培养基和反应器构型是微生物富集培养的三个关键因素,本论文分别从这三个方面入手,对 DAMO 微生物的富集培养进行了优化研究,主要结论如下:

1)比较了不同接种物富集培养 DAMO 微生物的差异,明确了 DAMO 微生物富集培养的最优接种物。

①测试了厌氧产甲烷颗粒污泥、农田水稻土壤和淡水河道沉积物作为接种物的可行性,比较了富集培养过程中 NC10 门细菌数量的变化和 DAMO 活性的差异,其中富集结束时 NC10 门细菌的数量分别较接种物增加了 63 倍、2909 倍和 198 倍,获得的富集培养物的 DAMO 活性分别为  $0.06 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $0.15 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,表明了三种接种物经富集均可获得 DAMO 富集培养物,均适宜作为 DAMO 微生物富集培养的接种物,扩大了 DAMO 接种物的来源,为 DAMO 富集培养物的获得提供了新的选择。

②首次利用农田水稻土壤作为接种物成功获得了 DAMO 富集培养物,活性实验及分子生物学分析结果均表明农田水稻土壤是三者中最优接种物。

2)比较了天然培养基与人工培养基在 DAMO 微生物富集培养效果上的差异,得出了 DAMO 微生物富集培养的最优培养基。

①比较了天然培养基与人工培养基富集培养 DAMO 微生物的差异,获得的富集培养物的 DAMO 活性分别为  $0.02 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,人工培养基是天然培养基的 5.5 倍;NC10 门细菌的数量分别为  $1.01\times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil)和  $2.01\times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil),后者是前者的两倍,从而表明了以农田水稻土壤作为接种物,人工培养基较天然培养基的富集培养效果更好。



②采用农田水稻土壤作为接种物,以人工培养基培养成功富集到了以 group B 的 NC10 细菌为主导的 DAMO 富集培养物,首次证明了归属于 group B 的 NC10 细菌同样具有 DAMO 活性。

3)比较了不同构型反应器富集培养 DAMO 微生物的能力,得出了 DAMO 微生物富集培养的最优反应器构型。

①比较了三种不同构型的反应器,即磁搅气升式反应器(Magnetic stirred air lift reactor, MSALR)、生物膜反应器(Biofilm reactor, BR)和序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR)富集培养 DAMO 微生物的差异。经过近一个月的富集培养,三者的容积氮去除速率分别提高了 827.10%、302.92%和 154.09%, DAMO 活性分别为  $0.52 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $0.23 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.26 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,表明了三种构型装置均具有提高 DAMO 活性的功能,均能够作为 DAMO 微生物的富集培养装置。

②MSALR 具有最高的容积氮去除速率和最大的 DAMO 活性,因此是三者中最优的富集培养 DAMO 微生物的反应装置。

③从甲烷传质和微生物滞留能力两种因素考虑,前者是 DAMO 微生物富集培养过程中更为关键的限制因素。

**关键词:** 反硝化型甲烷厌氧氧化(DAMO); 富集培养; 接种物; 培养基; 反应器构型

## ABSTRACT

Denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) is a newly discovered microbial reaction which catalyzed by NC10 bacteria. Several aspects makes the research on the DAMO process and relevant microorganisms meaningful. First, the DAMO process is a new pathway of biogeochemistry for its link of carbon and nitrogen cycles. Second, the finding of NC10 bacteria expands the knowledge of microbiology for its unique physiological and biochemical properties. Third, the DAMO process offers option to develop new wastewater treatment technology for its simultaneous removal of methane and nitrate/nitrite. However, the extremely slow growth rate of DAMO microorganisms seriously limited to get the enrichment culture. In consideration of this bottleneck, we investigated the influence of three key factors, inoculum, medium and reactor configuration, on the enrichment of DAMO microorganisms. The major conclusions are as follows:

1) The differences to enrich DAMO microorganisms using three distinct inocula were compared and the optimal inoculum was obtained.

① The feasibility of the three inocula, methanogenic granular sludge, paddy soil and freshwater river sediment, to enrich NC10 bacteria was verified, and the differences of NC10 bacteria numbers and specific DAMO activities among the cultures were compared. The NC10 bacteria numbers in these three cultures were 63, 2909 and 198 times higher than that in the inocula, respectively. Specific DAMO activities of the three cultures were  $0.06 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $0.15 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively. These results revealed that the three inocula were all suitable for the enrichment of DAMO microorganisms, which provided more choices to select DAMO inocula.

② It was first proved the feasibility of paddy soil for the enrichment of DAMO culture, and the paddy soil was proved the best inoculum in these three inocula.

2) The cultivation effects of the cultures enriched using natural medium and artificial medium were compared and the optimal medium was obtained.

① The differences of DAMO microorganisms enrichment using natural medium and artificial medium were tested. Specific DAMO activities of these two cultures were  $0.02 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively. The NC10 bacteria numbers were  $1.01\times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry weight) and  $2.01\times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry weight). These results indicated that better enrichment effect could be achieved with artificial medium.

② NC10 bacteria belonging to group B were successfully enriched using paddy soil as inoculum with artificial medium. This is the first evidence to confirm NC10 bacteria belonging to group B are capable of catalyzing the DAMO process.

3) The ability of the reactors with different configurations to enrich DAMO microorganisms were compared, and the reactor with optimal configuration was obtained.

① The differences of enrichment process and the DAMO cultures using reactors with different configurations were compared. The volume nitrogen removal rate of the three reactors (Magnetic stirred air lift reactor, MSALR; Biofilm reactor, BR; Sequencing batch reactor, SBR) at last obtained an increase of 827.10%, 302.92% and 154.09% compared to that in the initial period, respectively. Specific DAMO activities of the enrichment cultures were  $0.52 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $0.23 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $0.26 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectively. These results showed that the three reactors with different configurations were all proper to enrich DAMO microorganisms.

② The culture in MSALR contains the highest volume nitrogen removal rate and specific DAMO activities among the three cultures, which demonstrated that MSALR is the best reactor to enrich DAMO microorganisms.

③ The transfer of methane is more important than the retention of biomass during the enrichment period.

**Keywords:** denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO); enrichment; inoculum; medium; reactor configuration

## 目录

致谢 .....	I
摘要 .....	V
ABSTRACT .....	VII
<b>第一章 文献综述 .....</b>	<b>1</b>
引言 .....	1
1.1 SAMO 研究进展 .....	2
1.1.1 SAMO 过程的研究历史 .....	2
1.1.2 SAMO 发生机理 .....	3
1.1.3 参与 SAMO 过程的微生物 .....	7
1.1.4 目前存在的问题 .....	9
1.2 DAMO 研究进展 .....	9
1.2.1 DAMO 过程的研究历史 .....	9
1.2.2 DAMO 发生机理 .....	10
1.2.3 DAMO 参与微生物 .....	12
1.2.4 DAMO 富集培养物 .....	13
1.3 本课题研究的意义与内容 .....	14
1.3.1 研究意义 .....	14
1.3.2 研究内容 .....	16
1.3.3 技术路线 .....	1
<b>第二章 不同接种物富集培养 DAMO 微生物的比较研究 .....</b>	<b>19</b>
引言 .....	19
2.1 材料与方法 .....	19
2.1.1 接种物 .....	19
2.1.2 培养基 .....	20
2.1.3 富集培养 .....	20
2.1.4 活性测试 .....	21

2.1.5 DNA 抽提与 PCR 扩增 .....	21
2.1.6 克隆与测序 .....	22
2.1.7 16S rRNA 基因与 <i>pmoA</i> 基因系统发育分析 .....	22
2.1.8 实时荧光定量 PCR(qPCR) .....	23
2.1.9 荧光原位杂交(FISH) .....	23
2.1.10 分析方法 .....	24
2.2 结果 .....	24
2.2.1 NC10 门细菌的富集 .....	24
2.2.2 富集培养物 DAMO 活性测试 .....	26
2.2.3 16S rRNA 基因与 <i>pmoA</i> 基因系统发育分析 .....	26
2.2.4 定量分析 .....	28
2.2.5 FISH .....	29
2.3 讨论 .....	29
2.4 结论 .....	32
<b>第三章 不同培养基对 DAMO 微生物富集培养的比较研究 .....</b>	<b>33</b>
引言 .....	33
3.1 材料与方法 .....	33
3.1.1 接种物 .....	33
3.1.2 培养基 .....	34
3.1.3 富集培养 .....	34
3.1.4 活性测试 .....	34
3.1.5 DNA 抽提与 PCR 扩增 .....	34
3.1.6 克隆与测序 .....	35
3.1.7 16S rRNA 基因与 <i>pmoA</i> 基因系统发育分析 .....	35
3.1.8 qPCR .....	35
3.1.9 FISH .....	35
3.1.10 分析方法 .....	35
3.2 结果 .....	35
3.2.1 富集培养 .....	35

3.2.2 活性测试.....	36
3.2.3 16S rRNA 基因和 <i>pmoA</i> 基因系统发育分析.....	37
3.2.4 qPCR.....	39
3.2.5 FISH.....	39
3.3 讨论.....	40
3.4 结论.....	42
<b>第四章 不同构型反应器富集培养 DAMO 微生物的比较研究.....</b>	<b>43</b>
引言.....	43
4.1 材料与方法.....	43
4.1.1 接种物.....	43
4.1.2 实验装置.....	44
4.1.3 培养基.....	45
4.1.4 DAMO 活性测试.....	45
4.1.5 DNA 抽提与 PCR 扩增.....	45
4.1.6 克隆与测序.....	45
4.1.7 NC10 门细菌数量分析.....	46
4.1.8 16S rRNA 基因和 <i>pmoA</i> 基因系统发育分析.....	46
4.1.9 FISH.....	46
4.1.10 分析方法.....	46
4.2 结果.....	46
4.2.1 反应器容积氮去除情况.....	46
4.2.2 DAMO 活性.....	47
4.2.3 NC10 门细菌数量.....	49
4.2.4 16S rRNA 基因与 <i>pmoA</i> 基因系统发育分析.....	49
4.2.5 FISH.....	51
4.3 讨论.....	51
4.4 结论.....	53
<b>第五章 结论与展望.....</b>	<b>55</b>

---

5.1 主要结论 .....	55
5.2 创新点 .....	56
5.3 建议和展望 .....	56
<b>参考文献 .....</b>	<b>57</b>
<b>个人简历 .....</b>	<b>67</b>
<b>硕士阶段取得的科研成果 .....</b>	<b>68</b>

## 第一章 文献综述

### 引言

甲烷是无色无味最简单的碳氢化合物，它是人类生活中不可或缺的燃料(天然气中甲烷的含量占 87%)。但同时，甲烷还是一种强效的温室气体，它所造成的温室效应在最近 20 多年内达到了二氧化碳的 100 倍(Shindell et al., 2009)，其产生的辐射效应占地球人为辐射效应总量的 30%(IPCC, 2008)。工业社会发展以来，地球大气中的甲烷含量逐渐增加，从最初的 715 ppbv 增加到目前的 1770 ppbv(Conrad, 2009)，以致甲烷对于地球温室效应的贡献日益明显。因此，了解地球上甲烷的源与汇，完善甲烷循环的途径，对于理解甲烷在地球上的形成与转化，提出控制甲烷排放的对策，缓解日趋严重的温室效应具有十分重要的意义。

微生物在地球甲烷循环中扮演着重要的角色。据统计，全球每年甲烷产生总量的 85%及消耗总量的 60%来自于微生物的参与(Knittel, 2009)。产甲烷作用由产甲烷古菌完成，而甲烷氧化根据是否有氧气的参与而分为甲烷好氧化作用与甲烷厌氧氧化作用(Anaerobic oxidation of methane, AOM)，前者由甲烷好氧化化细菌完成，后者由 AOM 微生物(包括古菌与细菌)完成。

AOM 作用是缓解甲烷排放的重要一环。理论上来说，AOM 作用可以耦联多种电子受体(图 1.1)。已报道微生物可以利用 AOM 作用产生的电子还原如  $\text{SO}_4^{2-}$ (Nauhaus et al., 2002)、 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (Raghoebarsing et al., 2006)、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{4+}$ (Beal et al., 2009)等多种电子受体。目前对于微生物 AOM 作用的研究多集中于  $\text{SO}_4^{2-}$ 型 AOM(Sulfate-dependent anaerobic methane oxidation, SAMO)。据悉，海洋中每年产生的甲烷超过 90%通过 SAMO 作用消耗(Hinrichs et al., 2002; Reeburgh, 2007)，可见 AOM 对控制甲烷排放的重要性。反硝化型 AOM(Denitrifying anaerobic methane oxidation, DAMO)是耦联  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 还原的 AOM 作用，目前对于该过程的研究尚处于初级阶段。

下面就 SAMO 作用和 DAMO 作用的研究历史，作用机理及参与微生物等内容做一综述。



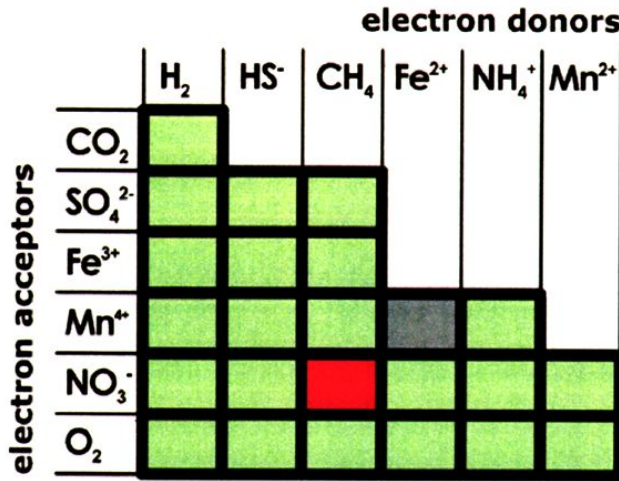


图 1.1 微生物参与的生物地球化学循环

(绿色代表目前已知的微生物主导的元素循环过程，灰色代表目前未知但热力学上可行的过程，红色代表 DAMO 过程。有修改)(Raghoebarsing, 2006)

Figure 1.1 Microbial biogeochemical cycles

(Green represents the element cycles that are known and grey represents the element cycles that are still unknown. The DAMO process is indicated in red.)

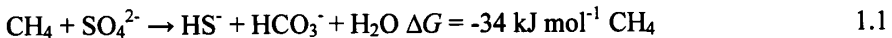
## 1.1 SAMO 研究进展

### 1.1.1 SAMO 过程的研究历史

上世纪 70 年代，人们通过对海洋环境的地球化学研究发现，海洋深层沉积物中的甲烷在厌氧条件下扩散至  $\text{SO}_4^{2-}$  丰富的区域即消失(Martens & Berner, 1974; Barnes & Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976)，拉开了 AOM 研究的序幕。随后，Zehnder 和 Brock 通过实验室研究提出了一种“合作理论”，即一种微生物催化了甲烷的氧化，而产生的电子则通过另一种微生物消纳(Zehnder & Brock, 1979)。Iversen 和 Jørgensen 利用放射性同位素示踪实验观察到了甲烷氧化与  $\text{SO}_4^{2-}$  还原同时发生的现象(Iversen & Jørgensen, 1985)。至 20 世纪 90 年代中期，Hoehler 等通过野外考察与实验室培养提出了 AOM 过程可能由甲烷厌氧氧化古菌(Anaerobic methanotrophic archaea, ANME; groups ANME-1, -2, -3)和  $\text{SO}_4^{2-}$  还原细菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)共同完成(Hoehler et al., 1994)。之后的研究发现，

在一些海洋环境以及一些实验室获得的富集培养物中,均存在 ANME 与 SRB 共存的现象,进一步验证了该假设(Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2001; Michaelis et al., 2002)。

然而,另一些研究人员对 SRB 在 SAMO 过程中的作用提出了质疑。首先, SAMO 过程产生的能量非常少(等式 1.1),原位 AOM 作用释放的吉布斯自由能( $\Delta G$ )仅为 -10 至 -40 kJ mol<sup>-1</sup>(Kruger et al., 2003)。因此,许多微生物学家认为如此低的能量供给难以维持 ANME 和 SRB 共同生存(Knittel et al., 2009)。其次,有研究发现在一些特殊海洋环境中, ANME 可以不依赖 SRB 单独存在(Orphan et al., 2002; Orcutt et al., 2005; Treude et al., 2005; Wankel et al., 2012)。截至目前,与 SAMO 相关的微生物还未能分离,与之相关的争论仍在继续。



除海洋环境外,其他生态系统中 SAMO 过程的研究寥寥无几,目前已发现 SAMO 现象的其他生境仅包括水稻田(Murase et al., 1994),垃圾填埋场(Grossman et al., 2002),富营养化湖泊(Eller et al., 2005)和泥炭地湿地(Smemo et al., 2007)。

### 1.1.2 SAMO 发生机理

虽然对 SAMO 的研究已有几十年,但该过程发生的机理仍不清楚。在几十年的研究过程中,人们相继提出了几个假设,即反向产甲烷理论、产乙酸理论和甲基化理论。

#### 1) 反向产甲烷理论

反向产甲烷理论是目前人们研究最多的 SAMO 发生机理。所谓反向产甲烷,即 ANME 氧化甲烷的起始步骤是产甲烷最后一步的逆反应(Zehnder & Brock, 1979; Hoehler et al., 1994),通过氧化甲烷,ANME 将电子通过某种中间产物传递给 SRB,最终实现  $\text{SO}_4^{2-}$  的还原。支持该假设的研究者认为, SAMO 作用与产甲烷作用存在着紧密的联系,即 SAMO 作用往往伴随着产甲烷作用的发生而发生(Zehnder & Brock, 1979; Hoehler et al., 1994)。

Zehnder 和 Brock 通过放射性同位素示踪实验证实了产甲烷古菌与 AOM 作用的关系。他们对九株产甲烷古菌研究发现,在厌氧环境中,这些微生物均能在产甲烷的同时氧化小部分的甲烷。<sup>14</sup>C 同位素标记实验表明观察到的 AOM 作用可能涉及了产甲烷作用特有的中间产物,如甲醇、醋酸等,表明产甲烷古菌参与

了甲烷的氧化过程(Zehnder & Brock, 1979)。Hoehler 等通过对美国加利福尼亚北部 Cape Lookout 海湾缺氧沉积物中甲烷氧化速率及  $\text{CO}_2$  还原速率进行季节性调查后发现, 尽管不同季节甲烷氧化的速率存在一定的差异, 但甲烷氧化作用均发生于含  $\text{SO}_4^{2-}$  的缺氧沉积物中(Hoehler et al., 1994)。通过对沉积物中产甲烷古菌的专性抑制实验发现, 产甲烷古菌功能被抑制的同时甲烷氧化作用也被部分抑制, 该实验也证明了产甲烷古菌很可能参与了甲烷的氧化。同时, 通过向沉积物中添加  $\text{SO}_4^{2-}$  发现甲烷氧化作用进一步加强, 意味着 SRB 同样参与了甲烷的氧化过程。据此, Hoehler 等提出了以下假设: 产甲烷古菌将甲烷氧化, 同时以水作为电子受体产生中间产物  $\text{H}_2$ , SRB 利用  $\text{H}_2$  将  $\text{SO}_4^{2-}$  还原(Hoehler et al., 1994)。在墨西哥湾(Orcutt et al., 2005)及黑海(Treude et al., 2007)的缺氧沉积物中同样发现了产甲烷作用与 AOM 作用共存的现象, 证明了这些微生物可能同时参与了这两种生物过程。

反向产甲烷作用的第一步是甲烷的活化(碳氢键的断裂)。ANME 中含有甲基辅酶 M 还原酶(Methyl-coenzyme M reductase, MCR)的同系物, 而 MCR 是产甲烷作用的关键酶, 因此, 这种 MCR 同系物可能是催化甲烷氧化的关键酶(Hallam et al., 2004; Shima & Thauer, 2005)。Hallam 等首次对含 ANME 的沉积物中的 *mcrA* 基因(编码 MCR  $\alpha$  亚基的基因)进行了检测, 发现了新的 *mcrA* 基因型(Hallam et al., 2003)。Krüger 等从黑海沉积物中纯化了含镍化合物的蛋白, 这种镍化合物与  $\text{F}_{430}$ (MCR 的镍辅因子)具有相同的吸收光谱, 但是前者的分子量(951Da)要大于后者(905Da)(Krüger et al., 2003)。这种含镍蛋白与 MCR 具有相似的序列结构且含量很高, 可能对 AOM 的进行发挥了重要作用。随后, 这种修饰的  $\text{F}_{430}$  结构得到确认, 称为 172-甲硫基- $\text{F}_{430}$ (Mayr et al., 2008)。Scheller 等分离出了 MCR 并首次通过实验证明了 MCR 具有将甲烷转化为甲基辅酶 M 的能力, 有力地支持了反向产甲烷理论(Scheller et al., 2010)。

Hallam 等利用环境基因组技术分析了深海沉积物中的 ANME, 发现几乎所有与产甲烷作用相关的基因均存在于 ANME 中, 但唯独缺失亚甲基-四氢甲烷蝶呤还原酶(Methylene-tetrahydromethanopterin ( $\text{H}_4\text{MPT}$ ) reductase, MER)的编码基因, 而 MER 执行了产甲烷作用的其中一步(Hallam et al., 2004)。据此, Chistoserdova 等提出了基于反向产甲烷理论的 AOM 机理模型(图

1.2)(Chistoserdova et al., 2005)。他们预测反向产甲烷步骤③是由 MER 或者是与之功能相似的酶催化的。反向产甲烷过程中产生的电子(步骤①③④⑦)通过某种未知中间产物 X 传递给 SRB，从而实现  $SO_4^{2-}$  的还原(Chistoserdova et al., 2005)。

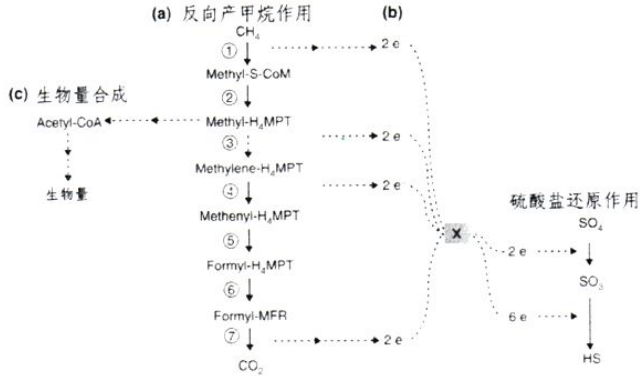


图 1.2 基于反向产甲烷理论的 AOM 模型

(a:反向产甲烷过程; b:  $SO_4^{2-}$ 还原; c:微生物生长)(Chistoserdova et al., 2005)

Figure 1.2 Proposed AOM model based on reverse methanogenesis

(a: reverse methanogenesis; b: sulfate reduction; c: biomass generation)

## 2)产乙酸理论

针对之前研究中存在的与反向产甲烷理论矛盾的或者不能解释的现象，有学者提出了不同的见解，他们认为 ANME 可能利用甲烷和  $CO_2$  产生了乙酸，随后乙酸被 SRB 利用，即乙酸是 AOM 过程中的中间产物，起到了电子传递的作用 (Zehnder & Brock, 1980; Hoehler et al., 1994)。随后，Valentine 和 Reeburgh 又提出了一种新的理论(Valentine & Reeburgh, 2000)。该理论假设 ANME 利用两分子甲烷产生乙酸和  $H_2$ ，而这两种中间产物又被 SRB 利用。采用该理论计算出的 SAMO 释放的自由能是反向产甲烷的两倍，从而使 ANME 和 SRB 能在反应过程中获取更多的能量；其次，该理论涉及了 ANME 与 SRB 之间的碳传递，从而解释了部分 SRB 脂质存在  $^{13}C$  亏损的现象(Thiel et al., 1999; Hinrichs et al., 2000; Pancost et al., 2000)。

## 3)甲基化理论

Moran 等根据之前的研究成果以及自己的实验结果提出了一种全新的理论，称为甲基化理论(Moran et al., 2008)。该理论认为甲基硫是 SAMO 作用的中间产物，这种物质由 ANME 通过甲烷的氧化和  $CO_2$  的还原产生，并最终被 SRB 所利

用。

如图 1.3 所示, 甲烷在与辅酶 M(Coenzyme M, CoM)结合的过程中释放电子用于 ATP 的合成,  $\text{CO}_2$  则通过类似于微生物产甲烷作用的方式得到还原, 其还原所需的电子来自于甲烷和 CO 的氧化(Moran et al., 2008)。这两个过程产生了同一种产物  $\text{CH}_3\text{-CoM}$ , 通过与硫化物的作用, CoM 重新生成并继续用于甲烷的活化和  $\text{CO}_2$  的还原, 而产生的甲基硫则能够被 SRB 利用还原  $\text{SO}_4^{2-}$ 。

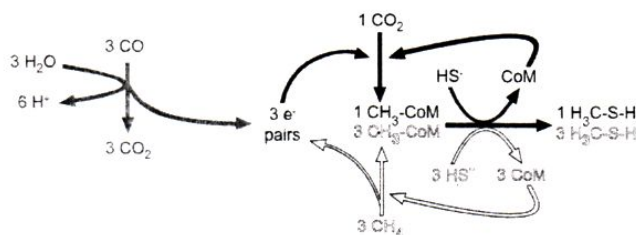


图 1.3 甲基化理论模型(Moran et al., 2008)

Figure 1.3 Proposed AOM model based on methylogenesis

#### 4)以零价硫( $\text{S}^0$ )作为中间产物的 SAMO 新机制

最近, Milucka 等发现了 SAMO 作用的新机制, 该机制完全不同于之前假设的 SAMO 作用是由 ANME 和 SRB 协同完成的, 而是由 ANME 独自完成(Milucka et al., 2012)。

Milucka 等利用取自地中海 Isis 泥火山的沉积物进行了八年的富集培养, 获得了高纯度的 AOM 富集培养物(ANME 和 SRB 占总菌数的 95%)(Milucka et al., 2012)。通过酶联荧光原位杂交(Catalysed reporter deposition fluorescence in situ hybridization, CARD-FISH)、纳米二次离子质谱(Nanometer-Scale Secondary Ion Mass Spectrometry, NanoSIMS)、免疫标记、同位素检测和透射电镜等一系列地球化学、分子生物学和微生物学手段, 发现 ANME 具有耦联甲烷氧化和  $\text{SO}_4^{2-}$  还原的能力(图 1.4)。

在之前提出的 SAMO 假设中, 甲烷与  $\text{SO}_4^{2-}$  分别由 ANME 和 SRB 进行代谢, 而 Milucka 等认为, ANME 同时参与了甲烷的氧化和  $\text{SO}_4^{2-}$  的还原(Milucka et al., 2012)。如图 1.4 所示, ANME 通过将甲烷氧化成  $\text{CO}_2$  获得电子, 并将电子用于  $\text{SO}_4^{2-}$  的还原, 在细胞内生成中间产物  $\text{S}^0$ 。ANME 将  $\text{S}^0$  排出胞外并与硫化物反应形成二硫化物(图 1.4)。此外, 此前被认为具有  $\text{SO}_4^{2-}$  还原能力的 SRB, 其功能亦重新进行了定位, 这种细菌能够将 ANME 分泌的二硫化物通过歧化作用生成



$\text{SO}_4^{2-}$ 和硫化物(Milucka et al., 2012)。这一发现对于 AOM 的研究具有很大的贡献, 首先, SAMO 作用是由 ANME 单独完成的生物过程, 而不是此前认为的由 ANME 与 SRB 协同作用完成的, 意味着 SRB 在 SAMO 作用中是非必须的; 其次, 被认为是还原  $\text{SO}_4^{2-}$  的 SRB, 发现其具有歧化二硫化物生成  $\text{SO}_4^{2-}$  的能力, 因此它与 ANME 还是存在十分密切的关系。

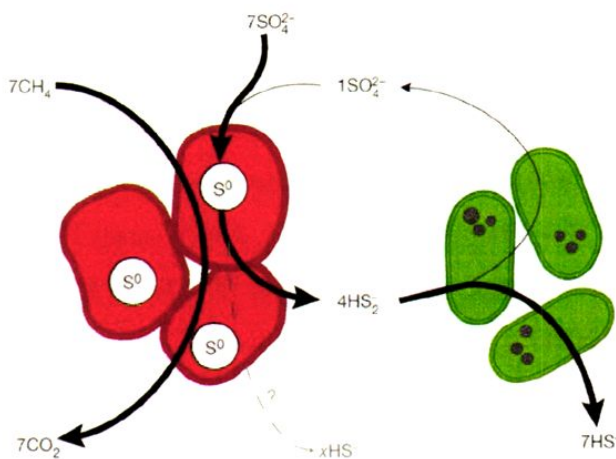


图 1.4 以零价硫为中间产物的 SAMO 作用修正模型(Milucka et al., 2012)

Figure 1.4 Revised model of SAMO involved zero-valent as key intermediate

该机制的发现为 AOM 领域提出了更多需要深入研究的问题(Joye, 2012)。首先, ANME 中缺少  $\text{SO}_4^{2-}$  还原所需要的特异性酶, 因此, 找到这种特异性的酶或其编码基因是对该机制的有力证明。对此, Milucka 等提出了甲酰-甲烷呋喃脱氢酶很有可能是催化  $\text{SO}_4^{2-}$  还原所需要的特异性酶, 因为它的氧化还原电位极低 (-530mv), 因此 ANME 的还原能力在某种程度上要强于 SRB(Milucka et al., 2012)。其次, 催化这种新的 SAMO 作用的微生物是 ANME 中的一簇(ANME-2), 因此, 其他 ANME(ANME-1 和 ANME-3)是否具有单独催化 SAMO 作用的能力还有待进一步研究。此外, 由细菌催化的二硫化物歧化作用存在的广泛性还有待更多的调查研究。

### 1.1.3 参与 SAMO 过程的微生物

如前所述, 无论是自然生境还是实验室培养, 大多数情况下 ANME 与 SRB 共同存在, 两者关系密切。

## 1) ANME

迄今, 对于 ANME 种群多样性的鉴定主要基于基因层面(16S rRNA 和 *mcrA* 基因)和脂质层面(Knittel & Boetius, 2009)。

目前在许多不同的海洋环境中均发现了具有 AOM 功能的 ANME, 然而它们在进化上的亲缘关系却很远。通过 ANME 16S rRNA 基因系统发育分析, 可将 ANME 分为三簇, 即 ANME-1、ANME-2 和 ANME-3, 其中 ANME-1 与 Methanosarcinales 和 Methanomicrobiales 存在一定的亲缘关系(Orphan et al., 2002; Knittel et al., 2005; Conrad., 2009), ANME-2 属于 Methanosarcinales(Orphan et al., 2001; Conrad., 2009), 而 ANME-3 则与 Methanosarcinales 的 *Methanococoides* 和 *Methanolobus* 存在亲缘关系(Lösekan et al., 2007; Conrad., 2009)。这三簇 ANME 之间的系统发育关系很远, 序列相似度仅为 75-92%, 甚至 ANME-2 还可分为三个亚簇, 即 ANME-2a、ANME-2b 和 ANME-2c(图 1.5a)。这些归属于不同目或科的 ANME 具有极为相似的生理特性, 暗示了它们可能广泛分布于自然界中。

许多研究将 *mcrA* 基因作为 ANME 的特异性功能基因标记物, 用于 ANME 的鉴定。从功能基因角度进行系统发育分析亦可发现, ANME1-3 的亲缘关系十分疏远(图 1.5b)。

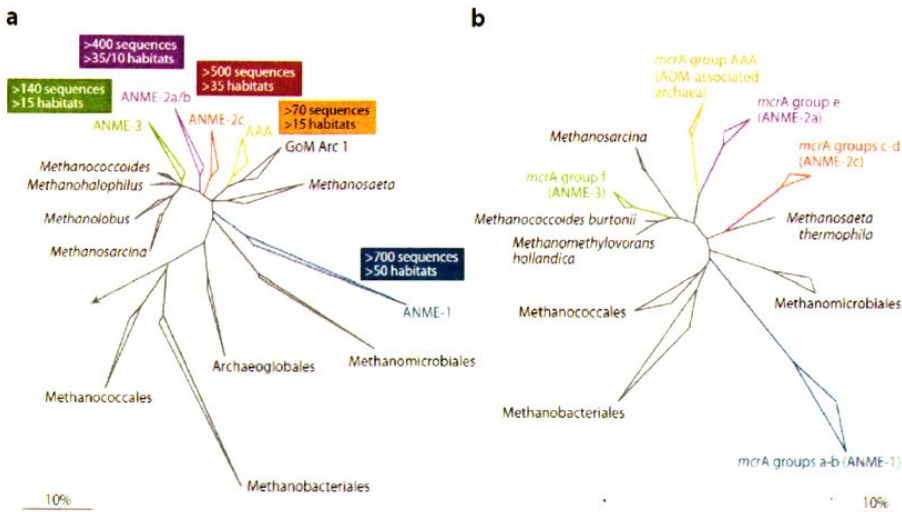


图 1.5 基于 16S rRNA 基因(a)和 *mcrA* 基因(b)的 ANME 系统发育树(Knittel & Boetius, 2009)

Figure 1.5 Phylogenetic trees of ANME based on 16S rRNA gene sequences (a) and *mcrA* gene sequences (b)

## 2)SRB

SRB 种类丰富, 常常与 ANME 共存。比如归属于 Deltaproteobacteria 的 *Desulfosarcina/Desulfococcus*(DSS)通常与 ANME-1 和 ANME-2 共存(Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2001; Michaelis et al., 2002; Orphan et al., 2002; Knittel et al., 2003; Knittel et al., 2005), 并且形成细胞团聚体。*Desulfobulbus* 通常与 ANME-3 共存。但 SRB 与 ANME 的共存模式也呈多样化, 如在某些生境发现有 DSS 与 ANME-3 共存的现象, 在 Eel River Basin 的沉积物中发现了 *Desulfobulbus* 与 ANME-2c 以及 DSS 与 ANME-2c 共存的现象(Pernthaler et al., 2008)。

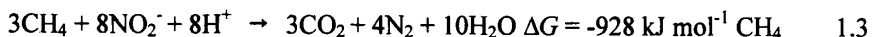
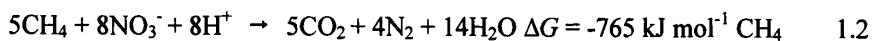
### 1.1.4 目前存在的问题

虽然从 SAMO 研究之初至今已有几十年, 但人们对该过程的了解仍然有限。主要存在的问题包括以下几点: 1)作用机理仍不完全明晰; 2)甲烷氧化速率的影响因素尚不明确; 3)相关微生物无法分离(Alperin & Hoehler, 2010)。分离获得催化 SAMO 过程的微生物并探明作用机理, 将是今后研究的主要方向。

## 1.2 DAMO 研究进展

### 1.2.1 DAMO 过程的研究历史

DAMO 是以  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  作为电子受体的 AOM 反应(式 1.2 和 1.3)。上世纪 70 年代, 就有学者试图分离或者富集具有 AOM 耦联反硝化功能的微生物, 但均以失败告终(Davies et al., 1973; Mason et al., 1977)。此后很长时间内, 人们一直未找到 AOM 耦联反硝化作用的充足证据。直至 1991 年, Smith 等利用原位自然梯度示踪实验发现了一受污染地下水环境中存在 AOM 耦联反硝化的现象(Smith et al., 1991)。



2004 年, Islas-Lima 等在实验室条件下利用甲烷与  $\text{NO}_3^-$  对反硝化污泥进行富集培养, 观察到了甲烷和  $\text{NO}_3^-$  同时消耗的现象, 当停止添加  $\text{NO}_3^-$  时, 甲烷的消耗也立即停止(Islas-Lima et al., 2004)。然而, 该研究缺乏对富集培养物中微生物



相的分析,因而无法确认催化该过程的微生物种类,并不能有力证明 DAMO 现象的发生(沈李东等,2011)。2006年,荷兰研究人员 Raghoebarsing 等采用受农田氮素污染的淡水河道沉积物作为接种物,经过16个月的培养,获得了具有 DAMO 功能的富集培养物(Raghoebarsing et al., 2006)。16S rRNA 基因检测发现该富集培养物存在细菌和古菌,其中占主导的细菌是一种归属于 NC10 门的细菌,古菌则仅包含一种归属于 Methanosarcinales 的古菌。对该富集培养物进一步富集发现,这种归属于 NC10 门的细菌(以下简称 NC10 门细菌)主导了 DAMO 过程,而古菌对于 DAMO 作用是非必须的(Ettwig et al., 2008)。

另一组来自澳大利亚的研究人员 Hu 等利用淡水湖泊沉积物、厌氧消化污泥和回流污泥的混合物作为接种物进行培养,在不同温度条件下,分别获得了两种不同的 DAMO 富集培养物。在低温条件下(22℃),富集培养物仅由 NC10 门细菌组成,而在高温条件下(35℃),富集培养物由 NC10 门细菌和古菌共同组成(Hu et al., 2009)。不同的电子受体同样对 DAMO 富集培养物的微生物组成有影响,以  $\text{NO}_2^-$  作为电子受体,富集培养物仅由 NC10 门细菌组成,而以  $\text{NO}_3^-$  作为电子受体的条件下富集培养物由 NC10 门细菌和古菌共同组成(Hu et al., 2011)。

## 1.2.2 DAMO 发生机理

### 1) NC10 门细菌的 DAMO 催化机理

Ettwig 等对 NC10 门细菌催化 DAMO 的机理进行了研究,他们以两种高纯度的 DAMO 富集培养物作为样品,完成了其中 NC10 门细菌的全基因组测序,并将该菌命名为“*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*” (*M. oxyfera*)(Ettwig et al., 2010)。

通过对 *M. oxyfera* 细菌全基因组序列分析发现, *M. oxyfera* 细菌并不具备催化完整反硝化过程所需的所有基因,缺少编码  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的基因。但 *M. oxyfera* 细菌能够完成反硝化过程并生成  $\text{N}_2$ , 那么 *M. oxyfera* 细菌必然存在一种未知酶能够催化某种中间产物生成  $\text{N}_2$ 。此外,作为一种厌氧微生物, *M. oxyfera* 细菌却拥有完整的编码好氧甲烷氧化酶的所有基因。通过同位素标记实验, Ettwig 等发现 *M. oxyfera* 细菌能够自己产生氧气,并将一部分氧气用于甲烷的氧化(Ettwig et al., 2010)。根据以上实验结果, Ettwig 等提出了 *M. oxyfera* 细菌催化 DAMO 过

程的理论模型(图 1.6)。他们认为 *M. oxyfera* 细菌的细胞内存在某种未知的 NO 歧化酶, 这种酶能够将 NO 歧化生成氧气, 从而完成甲烷的好氧氧化。该理论较为圆满地解释了 *M. oxyfera* 细菌催化 DAMO 过程的机理(Ettwig et al., 2010)。

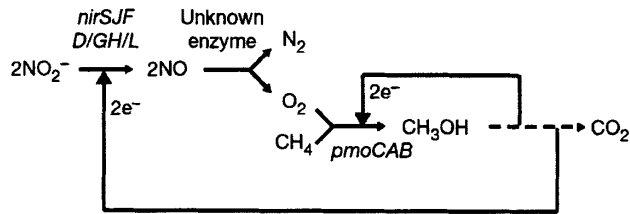


图 1.6 *M. oxyfera* 细菌催化 DAMO 机制模型(Ettwig et al., 2010)

Figure 1.6 The DAMO pathway of *M. oxyfera*

Wu 等发现 *M. oxyfera* 细菌中存在四组终端呼吸氧化酶基因并都进行了转录, 进一步研究发现其中一组基因的氧化酶进行了翻译(Wu et al., 2011)。因此, Wu 等认为 *M. oxyfera* 细菌产生的氧气除了用于甲烷的氧化之外, 还参与了细胞的呼吸过程(Wu et al., 2011a)。此后, Wu 等通过免疫金标记实验, 发现催化甲烷氧化和反硝化过程的两种关键酶甲烷单加氧酶(pMMO)和  $\text{NO}_2^-$  还原酶(NirS)共同存在于 *M. oxyfera* 细菌的细胞内, 进一步证明了 DAMO 过程是由 *M. oxyfera* 细菌单独完成的(Wu et al., 2012)。

## 2) 有古菌参与的 DAMO 催化机理

目前对于古菌是否参与了 DAMO 过程仍有存疑, 但从不多的研究结果显示古菌很有可能参与了 DAMO 过程。

一种观点认为古菌可能与 NC10 门细菌协同完成 DAMO 过程。目前, 共有三篇论文报道了 DAMO 富集培养物中细菌与古菌共存的情况(Raghoebarsing et al., 2006; Hu et al., 2009; Hu et al., 2011), 并且三者古菌的 16S rRNA 基因序列相似度很高(98.2%), 意味着参与 DAMO 过程的很可能是这种归属于 Methanosarcinales 的古菌。这三种古菌与细菌共存的富集培养物都有一个共同的特点, 即都具有消耗  $\text{NO}_3^-$  的能力。如前所述, Hu 等的实验表明不同的电子受体 ( $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$ ) 对 DAMO 富集培养物的微生物菌群具有选择性, 因此他们推测古菌对于  $\text{NO}_3^-$  的竞争能力要强于细菌, 而细菌对  $\text{NO}_2^-$  的竞争能力要强于古菌, 即古菌的作用可能是将  $\text{NO}_3^-$  转化为  $\text{NO}_2^-$  (Hu et al., 2011)。另一种观点认为这种古菌可能是一种新的产甲烷古菌, 它利用 NC10 细菌的代谢中间产物或其他有机物

进行生存(Wu et al., 2011b), 但目前并没有研究证实此观点。

### 1.2.3 DAMO 参与微生物

已报道的研究结果显示, DAMO 富集培养物中通常以 NC10 门细菌占主导, 仅在少数 DAMO 富集培养物中, 存在归属于 Methanosarcinales 的古菌。

Ettwig 等将已知的归属于 NC10 门的基因序列进行了 16S rRNA 基因系统发育分析, 将所有序列分为四组, 即 group A、group B、group C 和 group D(Ettwig et al., 2009)。采用目前的引物(表 1.1)获得的 NC10 门细菌序列均归属于 group A 和 group B, 其中所有 DAMO 富集培养物中的 NC10 门细菌均归属于 group A(Raghoebarsing et al., 2006; Ettwig et al., 2009; Hu et al., 2009; Luesken et al., 2011a; Kampman et al., 2012; Zhu et al., 2012), 而接种物和环境样品中的 NC10 门细菌则归属于 group A 和 group B(Ettwig et al., 2009; Deutzmann & Schink, 2011; Luesken et al., 2011a; Kampman et al., 2012; Kojima et al., 2012; Wang et al., 2012)。因此, 可以认为归属于 group A 的 NC10 门细菌具有催化 DAMO 过程的能力, 而归属于 group B 的 NC10 门细菌是否具有该能力还不得而知。

NC10 门细菌具有特殊的甲烷好氧化途径。pMMO 作为催化甲烷好氧氧化的关键酶, 编码其  $\alpha$  亚基的 *pmoA* 基因具有高度的保守性(Hakemian & Rosenzweig, 2007), 并作为功能标记物广泛用于环境中的甲烷氧化微生物的检测(McDonald et al., 2008)。Luesken 等设计并提出了用于检测 NC10 门细菌 *pmoA* 基因的引物对(Luesken et al., 2011b)。Wang 等采用该引物对农田水稻土壤检测发现, 只有归属于 group A 的 NC10 门细菌能够被检测到, 而归属于 group B 的 NC10 门细菌则无法检测到(Wang et al., 2012)。Deutzmann 和 Schink 采用自主设计的 *pmoA* 引物对一寡营养湖泊沉积物检测发现了同样的现象。这些现象进一步验证了归属于 group A 的 NC10 门细菌具有催化 DAMO 的能力(Deutzmann & Schink, 2011)。但是目前获得的 NC10 门细菌序列较少, 依此设计的引物不能覆盖所有具有 DAMO 功能的 NC10 门细菌(Wang et al., 2012), 有待进一步优化。

最近, Kool 等通过对多种 DAMO 富集培养物中微生物的脂质成分分析, 发现了两种 NC10 门细菌所特有的脂质成分 10MeC<sub>16:0</sub> 和 10MeC<sub>16:1 $\Delta$ 7</sub>, 并将之作为 NC10 门细菌特有的生物标记物(Kool et al., 2012)。Zhu 等利用 qPCR 和脂质分析

技术对泥炭地 NC10 门细菌的研究发现, NC10 门细菌的数量与其特异性脂质的数量呈正相关, 表明这两种脂质成分可以作为 NC10 门细菌的生物标记物(Zhu et al., 2012)。

表 1.1 DAMO 微生物 PCR 扩增采用引物

Table 1.1 The primers used to amplify genes of DAMO microorganisms

引物名称	序列(5'-3')	特异性	参考文献
202F	GACCAAAGGGGGCGAGCG	16S rRNA 基因	Ettwig et al., 2009
1043R	TCTCCACGCTCCCTTGCG	16S rRNA 基因	Ettwig et al., 2009
qP1F	GGGCTTGACATCCCACGAACCTG	16S rRNA 基因	Ettwig et al., 2009
qP1R	CGCCTTCCTCCAGCTTGACGC	16S rRNA 基因	Ettwig et al., 2009
qP2F	GGGGAAGTCCAGCGTCAAG	16S rRNA 基因	Ettwig et al., 2009
qP2R	CTCAGCGACTTCGAGTACAG	16S rRNA 基因	Ettwig et al., 2009
A189_b	GGNGACTGGGACTTYTGG	<i>pmoA</i> 基因	Luesken et al., 2011b
cmo682	AAAYCCGGCRAAGAACGA	<i>pmoA</i> 基因	Luesken et al., 2011b
cmo182	TCACGTTGACGCCGATCC	<i>pmoA</i> 基因	Luesken et al., 2011b
cmo568	GCACATACCCATCCCCATC	<i>pmoA</i> 基因	Luesken et al., 2011b

### 1.2.4 DAMO 富集培养物

目前对于 DAMO 过程的研究尚处于起步阶段, 获得的 DAMO 富集培养物不多(表 1.2)。目前用于 DAMO 微生物富集培养的接种物多局限于淡水沉积物和活性污泥, 来源比较有限, 采用的培养基多为人工配制的培养基, 采用的培养方式多为序批式培养。

表 1.2 不同 DAMO 富集培养物的比较

Table 1.2 Comparison of the DAMO cultures

接种物	培养基	富集方式	微生物组成	反应速率 rNO <sub>2</sub> (mmol L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	参考文献
淡水河道 沉积物	人工培养基	序批式	细菌 80% 古菌 10%	1.07	Raghoebarsing et al., 2006
Raghoebarsing 富集培养物	人工培养基	连续式	细菌 70%	0.7	Ettwig et al., 2008
淡水河道 沉积物	人工培养基	连续式	细菌 70%	2.15	Ettwig et al., 2009

湖泊沉积物、 消化污泥和回 流污泥混合物	人工培养基	序批式 (22°C)	细菌 15%	N/A <sup>a</sup>	Hu et al., 2009
湖泊沉积物、 消化污泥和回 流污泥混合物	人工培养基	序批式 (35°C)	细菌 30% 古菌 40%	1.73	Hu et al., 2009
Hu 富集 培养物	人工培养基	序批式(添 加 NO <sub>2</sub> )	细菌 70%	0.3	Hu et al., 2010
Hu 富集 培养物	人工培养基	序批式(添 加 NO <sub>3</sub> )	细菌 30% 古菌 50%	N/A	Hu et al., 2010
活性污泥	人工培养基	序批式	细菌 60-70%	1.1	Luesken et al., 2011
淡水河道 沉积物	人工培养基	序批式	细菌 70-80%	2.39	Kampman et al., 2012
淡水河道 沉积物	人工培养基/ 污水好氧处 理出水	序批式	细菌 70-80%	2.7	Kampman et al., 2012
泥炭地 深层土壤	泥炭地 表层水	序批式	细菌 80%	1.0	Zhu et al., 2012

a: N/A 表示文献中未提及

### 1.3 本课题研究的意义与内容

#### 1.3.1 研究意义

工业社会的发展导致的全球气候变暖已成为全世界面临的重大环境问题,而甲烷作为第二号温室气体,它对该问题的影响举足轻重。另一方面,目前我国的水体污染已从有机物污染为主转变为氮磷污染为主,并已导致严重的水体富营养化,含氮废水的高效处理刻不容缓。DAMO 过程的发现为甲烷的减排与氮素污染的处理提供了新的思路 and 选择。而获得 DAMO 富集培养物则能够使 DAMO 过程及相关微生物的研究顺利开展。

首先, DAMO 富集培养物的获得使人们认识到一种具有耦联 AOM 与反硝化的微生物确实存在。NC10 门细菌参与的 DAMO 过程连接了碳素与氮素循环(图 1.7),因此,它的发现在微生物学与生物地球化学循环领域均具有重要意义。

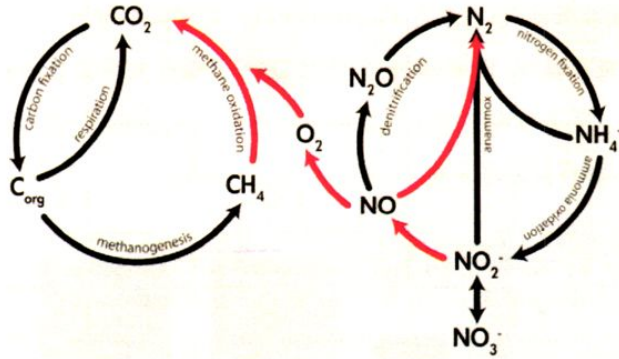


图 1.7 NC10 门细菌参与的生物碳氮循环(红色标注的为 DAMO 过程)(Ettwig et al., 2010b)

Figure 1.7 Carbon and nitrogen cycles catalyzed by NC10 bacteria

其次，基于 DAMO 富集培养物而进行的 NC10 门细菌的细胞生物学和生物化学特性(Wu et al., 2011a; Wu et al., 2011b; Wu et al., 2012a; Wu et al., 2012b)、基因组和代谢途径(Ettwig et al., 2010)、富集培养特性(Ettwig et al., 2008; Ettwig et al., 2009; Hu et al., 2009; Hu et al., 2010)等方面的系统研究，不仅充实了微生物学内容，同时对这种独特的微生物的研究很可能开辟出一个全新的微生物研究领域。

第三，从环境工程的角度考虑，DAMO 过程及其微生物的研究为新型废水处理工艺的开发和应用打下基础。DAMO 作用可实现甲烷与  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  两种污染物的同时去除，因此其在环境工程领域中具有重要的应用价值。

Luesken 等首先采用污水处理厂的活性污泥成功获得了 DAMO 富集培养物，从而表明了原位大量获得工程化应用所需富集物的可能性(Luesken et al., 2011)。Kampman 等提出了将 DAMO 应用于低温厌氧消化出水的处理(图 1.8)(Kampman et al., 2012)。该工艺可在低温条件下实现厌氧消化工艺出水中溶解态甲烷与氨氮的同时去除，一方面可以缓解甲烷扩散造成的温室效应，另一方面摆脱了传统的脱氮工艺需要添加额外电子供体的限制，降低了运营成本。此外，还有学者提出了将 DAMO 过程与厌氧氨氧化(Anaerobic ammonium oxidation, Anammox)过程相结合进行废水处理的设想(Luesken et al., 2011; Zhu et al., 2011)。他们在实验室条件下成功获得了 NC10 门细菌和 Anammox 细菌共存的富集培养物，为这种新工艺的开发打下了基础。

如上所述，无论是对 NC10 门细菌生理生化特性的研究还是与 DAMO 相关的废水处理工艺的开发，均需要以 DAMO 富集培养物为基础。然而研究表明，

NC10 门细菌生长缓慢(倍增时间大约 1-2 周),对培养环境要求严格,导致 DAMO 富集培养物难以获得。因此,本研究针对 DAMO 微生物富集培养的接种物来源、培养基组成、反应器构型等三个关键因素进行了实验优化,以期快速、高效获得 DAMO 微生物的富集培养物。

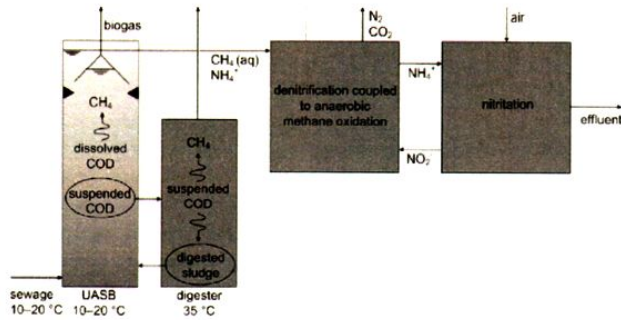


图 1.8 新型 DAMO 废水处理工艺(Kampman et al., 2012)

Figure 1.8 New concept of DAMO wastewater treatment process

### 1.3.2 研究内容

本课题的研究内容主要包括: 1)考察不同接种物富集 DAMO 微生物的可行性, 通过比较筛选出最优接种物。2)考察不同培养基富集 DAMO 微生物的可行性, 通过比较选出优质培养基。3)考察不同构型反应器富集 DAMO 微生物的效果, 选出较优的反应器。

### 1.3.3 技术路线

本课题的技术路线如图 1.9 所示。



图 1.9 本课题采取的技术路线图  
Figure 1.9 The outline of this research



---

## 第二章 不同接种物富集培养 DAMO 微生物的比较研究

### 引言

之前有研究表明, NC10 门细菌生长十分缓慢, 因而要获得 DAMO 富集培养物十分困难。目前, 获得的 DAMO 富集培养物十分有限(表 1.2)。然而, 要探明 DAMO 反应的机理及参与的微生物类群, 需要大量的富集培养物。而接种物的来源对于快速获得不同的富集培养物是非常关键的, 并且对 DAMO 工艺的推广应用也具有重要的意义。目前, DAMO 接种物主要来自于淡水沉积物, 污水处理厂活性污泥, 淡水沉积物、厌氧活性污泥和回流污泥三者的混合物以及泥炭地深层土壤(Raghoebarsing et al., 2006; Ettwig et al., 2009; Hu et al., 2009; Luesken et al., 2011; Kampman et al., 2012; Zhu et al., 2012), 接种物来源有限。

DAMO 过程发生的基本要素是厌氧环境中甲烷和  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  共存。废水厌氧生物处理过程会产生大量甲烷, 且处理后的出水中往往会含有一定量的硝态氮, 因此厌氧生物处理工艺中的产甲烷颗粒污泥可能是 DAMO 的适宜接种物。农田水稻土壤是公认的大气甲烷的主要排放源, 另外由于氮肥的大量施用, 往往造成土壤中氮素过剩, 有部分会以硝态氮的形式存在, 因而水稻土也是 DAMO 发生的有利生境。淡水河道沉积物具有厌氧/缺氧/有氧交界面, 许多河道由于受氮素污染, 底泥中含有一定量的  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$ , 同时底泥中有机质的厌氧分解过程会释放出大量的甲烷气体, 因此淡水河道底泥也是发生 DAMO 的良好生境。

本实验分别采用厌氧产甲烷颗粒污泥、农田水稻土壤和淡水河道沉积物作为接种物进行 DAMO 功能微生物的富集, 以获得不同的 DAMO 富集培养物, 同时利用分子生物学技术监测富集过程中的菌群变化, 以考察三种接种物富集 DAMO 功能微生物的可行性, 筛选出合适的接种物, 以扩大接种物的来源。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 接种物

厌氧产甲烷颗粒污泥(取自实验室高效产甲烷颗粒污泥装置)、农田水稻土壤

(取自某长期施肥水稻田, 取样深度为表层以下 5-10 cm)和淡水河道沉积物(取自某淡水河道, 取样深度为沉积物以下 0-20 cm)。三种接种物的基本理化指标如表 2.1 所示。三种接种物中均存在一定量的  $\text{NO}_x^-$ -N, 而厌氧产甲烷颗粒污泥和淡水河道底泥中的  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度要比农田水稻土壤高一个数量级。

表 2.1 三种接种物的基本理化性质

Table 2.1 Basic characteristics of the three inocula

接种物	pH	$\text{NH}_4^+$ -N (mg/Kg)	$\text{NO}_2^-$ -N (mg/Kg)	$\text{NO}_3^-$ -N (mg/Kg)
厌氧产甲烷颗粒污泥	7.42	308.17	1.98	19.76
农田水稻土壤	6.64	49.63	0.64	12.19
淡水河道底泥	7.36	323.06	1.00	31.88

### 2.1.2 培养基

采用天然地表水(pH 7.2-7.3,  $\text{NO}_3^-$ 浓度为  $3.64 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ , 氨和  $\text{NO}_2^-$ 浓度均低于检测限)添加适量的  $\text{NO}_2^-$ 作为培养基进行 DAMO 微生物的富集培养。在 500 天的富集过程中, 进水  $\text{NO}_2^-$ 的浓度从  $7 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  提升至  $21 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 值维持在 7.0-7.2, 气相中甲烷的体积浓度维持在气相浓度的 20%左右。

### 2.1.3 富集培养

采用相同的 SBR 进行三种接种物的富集培养(图 2.1)。每个装置总容积为 2.5 L, 接种量为 0.5 L, 添加培养液至 2.0 L, 气相体积为 0.5 L。三个富集装置在  $30^\circ\text{C}$  恒温运行。SBR 以 72 h 为一个运行周期, 包括 0.5 h 进水期, 70 h 反应期, 1 h 沉淀期, 0.5 h 排水期。在进水期, 加入培养基, 同时持续向 SBR 中通入氩气, 以保持装置内部的厌氧环境, 维持体系的 pH 稳定。进水结束后, 停止通气, 用 100 mL 的甲烷(纯度为 99.9%)置换富集装置中相同体积的氩气。在排水期, 每个 SBR 中排出 1 L 上清液, 此时, 气相连接气袋, 防止空气进入。进水期补充等量新鲜培养基。富集培养分为三个阶段, 富集阶段初期(0-180 天), 进水  $\text{NO}_2^-$ 浓度控制在  $7 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ , 初始的 100 天还添加了  $28 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NO}_3^-$ , 以去除接种物中的有机质, 100 天后停止添加  $\text{NO}_3^-$ ; 富集阶段中期(181-400 天), 进水  $\text{NO}_2^-$ 浓度提升至  $14 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 富集阶段后期(401-500 天), 进水  $\text{NO}_2^-$ 浓度提升至  $21 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

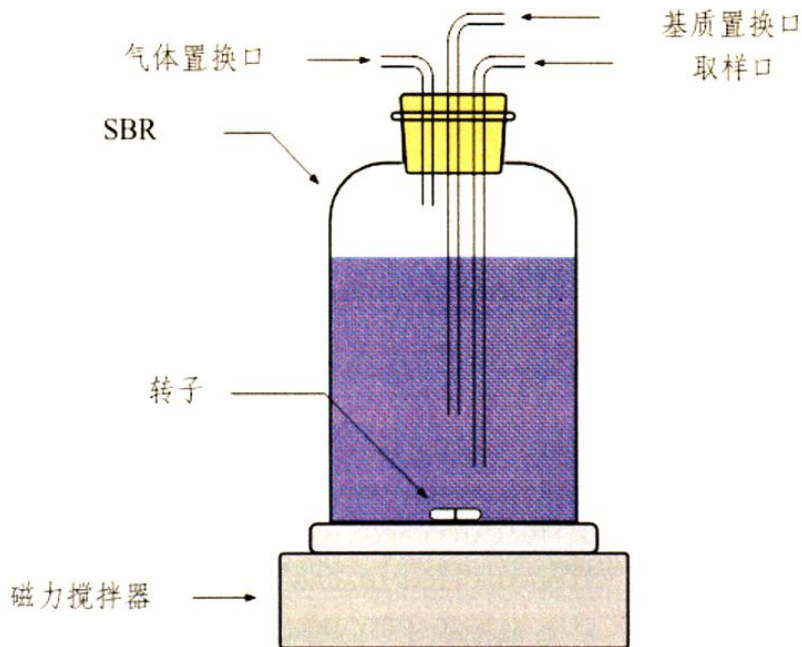


图 2.1 富集 DAMO 微生物的 SBR 装置

Figure 2.1 The SBR for enrichment of DAMO microorganisms

#### 2.1.4 活性测试

采用分批实验测定三种富集培养物 R1、R2、R3 的 DAMO 活性。取三种富集培养物并用不含  $\text{NO}_2^-$  的培养基冲洗 3 次，随后各取 10mL 富集培养物转移至 72 mL 血清瓶。添加培养基( $\text{NO}_2^-$  浓度  $2.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.2)至 50 mL。每个血清瓶中分别通氩气 15 min，以维持血清瓶内的厌氧环境。再向血清瓶中加入纯度为 99.9% 的甲烷，使气相甲烷浓度控制在 4.5% 左右。每个样品设置三个平行和一个对照组，对照组血清瓶中不添加  $\text{NO}_2^-$ 。血清瓶置于恒温摇床中培养，培养温度控制在  $30^\circ\text{C}$ ，振荡速度为 100 rpm，培养时间为 10 h。在培养过程中，每隔 2 h 取样测定气相甲烷浓度与液相  $\text{NO}_2^-$  浓度，确定 DAMO 反应的活性并推算其化学计量关系。

#### 2.1.5 DNA 抽提与 PCR 扩增

定期取培养物离心后在  $-20^\circ\text{C}$  冻存。分别称取三种富集培养物各 0.25 g，采用

Power Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)进行 DNA 抽提。采用巢式 PCR 分别对三种富集培养物中 NC10 门细菌的 16S rRNA 基因和 *pmoA* 基因进行扩增。本实验所使用的引物(表 2.2)及 PCR 反应条件参考 Luesken 等文献(Luesken et al., 2011b; Luesken et al., 2011c)。所有 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 2.2 PCR 实验所用引物

Table 2.2 The primers used in PCR amplification

引物名称	引物序列(5'-3')	参考文献
202F	GACCAAAGGGGCGAGCG	Ettwig et al.,2009
1545R	CAKAAAGGAGGTGATCC	Juretschko et al., 1998
qP1F	GGGCTTGACATCCCACGAACCTG	Ettwig et al., 2009
qP2R	CTCAGCGACTTCGAGTACAG	Ettwig et al., 2009
A189_b	GGNGACTGGGACTTYTGG	Luesken et al., 2011
cmo682	AAAYCCGGCRAAGAACGA	Luesken et al., 2011b
cmo182	TCACGTTGACCCGATCC	Luesken et al., 2011b
cmo568	GCACATACCCATCCCCATC	Luesken et al., 2011b

### 2.1.6 克隆与测序

PCR 产物的克隆操作按试剂盒说明进行, 将 PCR 产物连接到 pMD<sup>®</sup>19-T 载体上(TaKaRa, Bio Inc., Shiga, Japan), 将导入载体的大肠杆菌在 SOC 体系中振荡培养 1 h, 随后将菌液涂布于含氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、5-溴-4 氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside, X-Gal)与异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)的 LB 平板培养基中培养(37℃培养 16 h)。通过蓝白斑筛选挑取白色菌落, 并用菌液 PCR 法验证插入片段(Hu et al., 2012)。每个样品挑选约 20 个克隆送华大基因公司测序。

### 2.1.7 16S rRNA 基因与 *pmoA* 基因系统发育分析

采用 MEGA 4.0 软件(Tamura et al., 2007)对所获得的序列进行系统发育分析。序列采用 Clustal W 算法进行对齐, 最后采用邻接(Neighbor-Joining)法构建系统发育树, 采用 p-distance 计算, 并对构建的树进行 Bootstrap 分析(1000 个样本)。

采用 DOTUR 软件(Schloss & Handelsman, 2005)对 NC10 门细菌的 16S rRNA 基因和 *pmoA* 基因进行分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)分析, 将相似度大于 97% 的 16S rRNA 基因序列和相似度大于 93% 的 *pmoA* 基因序列归为一个 OTU(Luke & Frenzel, 2011), 此外, 利用公式  $C=[1-(n_1/N)] \times 100\%$  进行克隆库覆盖率的计算。其中  $n_1$  为一条序列独占一个 OTU 的序列数量,  $N$  为一个克隆库中总的序列数。

### 2.1.8 实时荧光定量 PCR(qPCR)

本实验选取 NC10 门细菌 16S rRNA 基因特异性引物 qP1F/qP1R 作为定量测试的引物。采用 iCycler iQ5 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad, California, USA)进行实验, qPCR 反应条件见文献(Ettwig et al., 2009)。PCR 扩增反应的特异性分析与标准曲线的建立如前所述(Hu et al., 2012)。样品的基因拷贝数通过样品 Threshold Cycle(Ct)值计算获得。

### 2.1.9 荧光原位杂交(FISH)

定期对 R1、R2、R3 进行取样、固定和杂交。

固定: 从每个反应器中现取培养物 1 mL, 离心弃上清液并用磷酸缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)溶解。取 0.5 mL 样品加入多聚甲醛固定液中, 置于冰上 3 h。离心并再次用 PBS 冲洗, 最后用 PBS 与乙醇的混合液(1:1)溶解, 并置于 -20°C 条件下保存。

杂交: 取固定好的样品的悬浊液 10  $\mu\text{L}$  滴加至载玻片上, 并在 46°C 条件下晾干。同时, 配制 40% 甲酰胺浓度的杂交液, 并保存于室温下等待使用。将干燥后的载玻片依次置于 50, 80 和 100 % 的酒精溶液中脱水, 每个浓度脱水 3 分钟。脱水结束后风干片刻。同时配制浓度为 5  $\text{pmoL} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的探针混合液, 采用探针为 S\*-DBACT-1027-a-A-18, 杂交 NC10 门细菌(Raghoebarsing et al., 2006), EUB I-III 混合探针, 杂交细菌(Daims et al., 1999)。每个样品滴加 10  $\mu\text{L}$  杂交液和 1  $\mu\text{L}$  探针混合液, 并用枪头小心将探针混合液与杂交液适度混匀。准备杂交离心管 (50 mL), 在每个管中添加一张折叠好的滤纸, 分别将剩余的杂交液均匀倾倒至滤纸上。将载玻片迅速放入离心管后, 将杂交管水平置于已在 46°C 下稳定运行的杂

交炉中, 在 46 °C 条件下杂交 1.5 h。杂交的同时, 配制洗涤液并在通过水浴预热至 48 °C。杂交完毕后, 取出载玻片并分别用少量洗涤液进行洗涤。随后, 将载玻片置于洗涤液中, 并在 48 °C 条件下洗涤 20 分钟。洗涤完毕后取出载玻片, 分别用蒸馏水小心冲洗几次, 随后置于 46 °C 杂交炉中干燥。将干燥后的玻片置于黑暗中保存。

FISH 图像拍摄采用双光子激光共聚焦显微镜 (Zeiss, LSM710 NLO, Germany)。

### 2.1.10 分析方法

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度与 VSS 均采用 APHA 标准方法进行测定 (APHA, 1998), 甲烷采用 Agilent 6890 系列气相色谱 (Agilent, USA) 进行测定。

## 2.2 结果

### 2.2.1 NC10 门细菌的富集

SBR 反应器以 72 h 为一个运行周期, 每个运行周期均控制初始甲烷气相浓度为 20%, 以保证一个运行周期内甲烷供给充足。由于在整个富集培养过程中甲烷的供给是过量的, 因此富集培养过程中的 DAMO 活性以  $\text{NO}_2^-$  的还原活性 (nitrite reducing activity) 作为指标。富集培养过程中, 三个反应器  $\text{NO}_2^-$  的消耗情况如图 2.2 所示。

富集初期 (0-180 天), 控制进水中的  $\text{NO}_2^-$  浓度在较低水平 ( $7 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并在前 100 天的进水中添加  $28 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NO}_3^-$ , 以强化微生物的反硝化作用, 加速有机物的消耗。0-100 天, R1 的  $\text{NO}_3^-$  平均还原活性为  $6.45 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 出水  $\text{NO}_3^-$  浓度接近于零, 而 R2、R3 的  $\text{NO}_3^-$  的还原活性在前 40 天时与 R1 相当, 分别达到了  $5.35 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $5.12 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 此后 R2、R3 的  $\text{NO}_3^-$  的还原活性逐渐下降, 至 100 天时进水与出水  $\text{NO}_3^-$  浓度基本持平, 表明两者的反硝化活动已经基本停止, 至此停止向三个反应器中添加  $\text{NO}_3^-$ 。0-100 天, R1 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性比较稳定, 平均还原活性为  $1.54 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 而 R2、R3 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性出现上下波动, 平均还原活性分别为  $1.14 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $1.34 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。100-180 天,

R1 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性与前 100 天相当, 平均还原活性为  $1.45 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 而 R2 与 R3 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性逐渐下降, 平均还原活性分别降至  $0.76 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $1.02 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 表明在此期间反硝化活性逐渐减弱。富集阶段初期(0-180 天), 虽然添加了足量的甲烷, 但从三种富集培养物对  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  的消耗情况来看, 三个反应器中发生的生物反应以反硝化作用为主(图 2.2), 并未显现明显的 DAMO 活性。

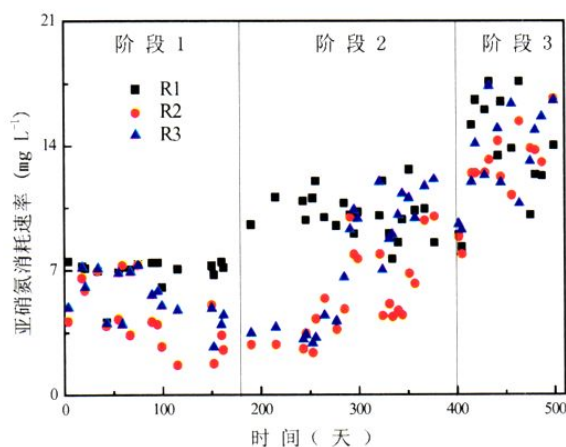


图 2.2 富集培养过程中 R1、R2、R3 对  $\text{NO}_2^-$  的消耗情况

Figure 2.2 The  $\text{NO}_2^-$ -N consumption of cultures R1, R2 and R3 during the enrichment period

富集阶段中期(181-400 天), 进水  $\text{NO}_2^-$  浓度提升至  $14 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。R1 对进水  $\text{NO}_2^-$  浓度的变化响应迅速,  $\text{NO}_2^-$  还原活性随即提高, 平均还原活性达到了  $1.78 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。而在进水  $\text{NO}_2^-$  浓度提升后大约 100 天左右的时间段内(181-280 天), R2、R3 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性一直维持在低水平, 分别为  $0.66 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $0.63 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。富集 280 天之后, R2 和 R3 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性有了比较显著的提升, 平均还原活性分别达到了  $1.44 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $2.07 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 2.2)。在此阶段, R1 中仍存在部分反硝化作用, 而 R2、R3 的反硝化作用逐步削弱, DAMO 作用逐步增强。

富集阶段后期(401-500 天), 进水  $\text{NO}_2^-$  浓度提升至  $21 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ , R1、R2、R3 的  $\text{NO}_2^-$  平均还原活性进一步上升, 分别达到了  $2.76 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $2.69 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  和  $2.81 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。此阶段三者中的反硝化作用已基本消失, DAMO 活性明显。



## 2.2.2 富集培养物 DAMO 活性测试

在富集培养 500 天之后,采用分批实验测定三种富集培养物的 DAMO 活性。结果显示,三种富集物 R1、R2 和 R3 均能够同时利用甲烷与  $\text{NO}_2^-$ , 其基质摩尔消耗比( $\text{CH}_4:\text{NO}_2^-$ -N)分别为 3:6、3:7.5 和 3:8, 均接近于理论比 3:8。三者的最大比活性分别为  $0.06 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $0.15 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ (图 2.3)。该结果显示,在三种富集培养物中,R2 具有最高的 DAMO 活性。

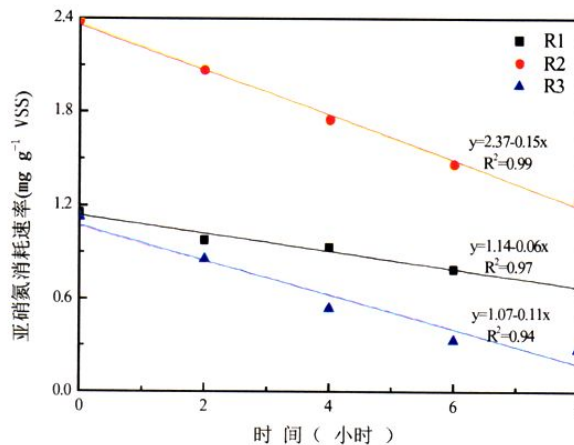


图 2.3 R1、R2、R3 分批活性测试 DAMO 比活性

Figure 2.3 DAMO activity of cultures R1, R2 and R3

## 2.2.3 16S rRNA 基因与 *pmoA* 基因系统发育分析

在富集培养的各个阶段,采用 NC10 门细菌特异性引物 qP1F/qP2R 对三种富集培养物 R1、R2、R3 的 16S rRNA 基因进行扩增,分别构建克隆文库并分析其中 NC10 门细菌的菌群组成。16S rRNA 基因系统发育分析表明,三种富集培养物中获得的序列都集中于一簇,均只含有 1 个 OTU,三者彼此之间的序列相似度达到了 99.1%-100.0%,并且均归属于 NC10 门的 group A (Ettwig et al., 2009)(图 2.4a)。与三种富集培养物 R1、R2、R3 NC10 门细菌序列相似度最近的富集培养物中获得的克隆来自以活性污泥(污水处理厂 Lieshout)作为接种物得到的 DAMO 富集培养物,相似度分别达到了 97.1%-97.6%, 97.1%-97.8%, 97.1%-97.6%, 与 *M. oxyfera* 的相似度则分别达到了 96.7%-97.2%, 96.7%-97.4%, 96.7%-97.2%。

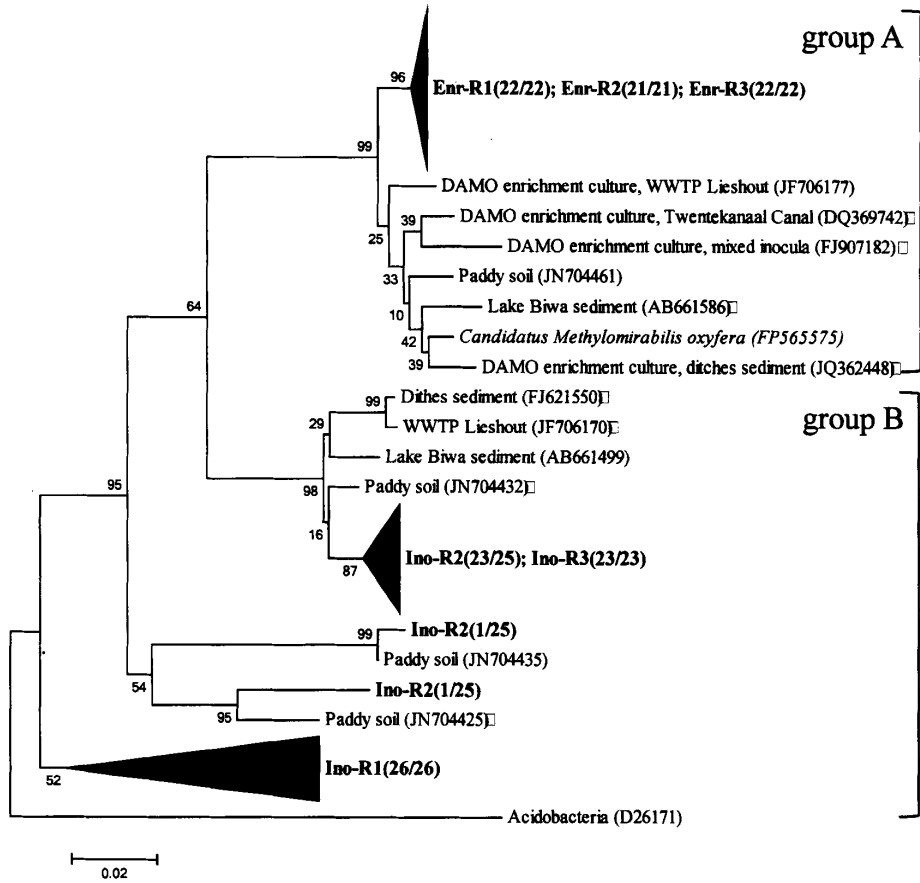


图 2.4a 富集培养物中 DAMO 功能微生物与已知的 NC10 门细菌 16S rRNA 系统发育树  
 Figure 2.4a Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences recovered from cultures R1, R2 and R3 with *Acidobacteria* as the outgroup. The tree was calculated using the neighbour-joining method and the p-distance correction. Bootstrap values were 1000 replicates, and the scale bar represents 2% of sequence divergence.

采用 *pmoA* 基因的特异性引物对 cmo182 和 cmo568 对 R1、R2、R3 的 *pmoA* 基因进行扩增，对获得的 *pmoA* 基因序列进行系统发育分析发现所获得的 *pmoA* 基因序列均集中于一簇(图 2.4b)。以 7% 的 cutoff 进行计算(Luke & Frenzel, 2011)，三者的 OTU 数量均为 3。R1、R2、R3 中得到的 *pmoA* 基因序列与已报道的 NC10 门细菌与厌氧氨氧化菌共培物(Zhu et al., 2011)中得到的 NC10 门细菌序列最接近，相似度分别达到了 85.5%-89.5%，85.6%-91.2%，85.1%-90.5%，与 *M. oxyfera* 的序列相似度则分别达到了 85.6%-88.4%，85.8%-89.7%，85.1%-89.7%。

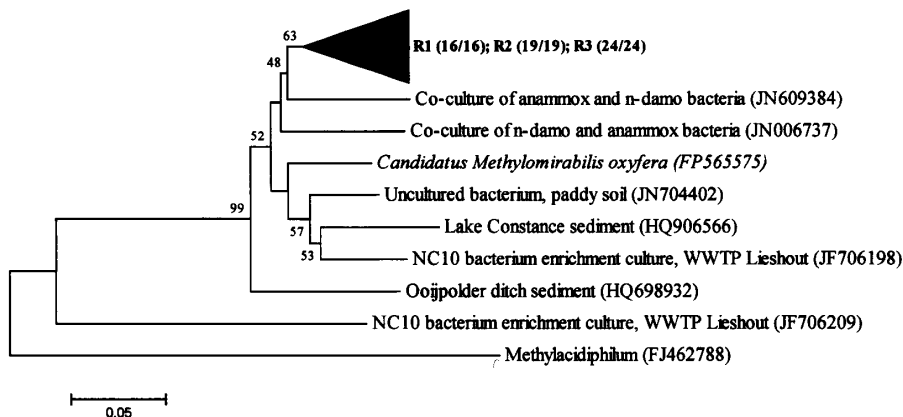


图 2.4b 富集培养物中 DAMO 功能微生物与已知的 NC10 门细菌 *pmoA* 系统发育树  
 Figure 2.4b Phylogenetic tree of the *pmoA* gene sequences recovered from cultures R1, R2 and R3 with *Methylophilum* as the outgroup. The tree was calculated using the neighbour-joining method and the p-distance correction. Bootstrap values were 1000 replicates, and the scale bar represents 5% of sequence divergence.

### 2.2.4 定量分析

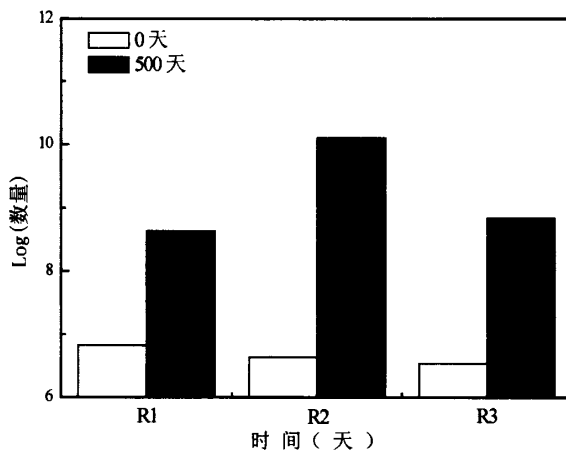


图 2.5 富集培养初期(0 天)与富集培养末期(500 天)富集培养物 R1、R2、R3 中 NC10 门细菌数量变化情况

Figure 2.5 Abundance of 16S rRNA genes of NC10 bacteria in culture R1, R2 and R3 from initial period to final period.

对接种物与富集培养物进行定量 PCR 检测。如图 2.5 所示, 三种接种物中均存在一定数量的 NC10 门细菌, 分别达到了  $6.76 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil),  $4.33 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil) 和  $3.44 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil), 数量基本相同。经过 500 天的富集培养, R1、R2、R3 中的 NC10 门细菌的数量分别增长至  $4.32 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil)、 $1.26 \times 10^{10}$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil) 和  $6.86 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil), 分别增加了 63 倍、2909 倍和 198 倍, 其中 R2 的 NC10 门细菌数量增长最明显。

### 2.2.5 FISH

采用 FISH 技术对获得的三种富集培养物中 NC10 门细菌的存在情况进行检测。采用 DAMO 特异性探针 S<sup>\*</sup>-DBACT-1027-a-A-18 探针(红色)与细菌探针 EUB338 I-III 探针(蓝色)同步杂交, NC10 门细菌显粉红色。结果显示, 三种富集培养物 R1、R2、R3 中 NC10 门细菌的分布均较为集中, NC10 门细菌的数量较其他细菌均占有优势, 其占总细菌的比例均高于 50%(图 2.6)。

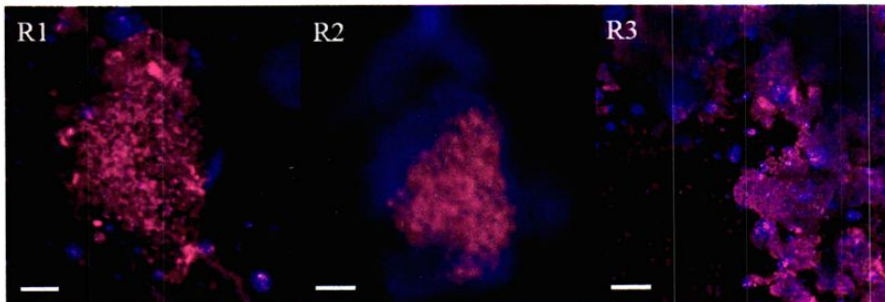


图 2.6 富集培养 500 天后 R1、R2、R3 的 FISH 图。采用细菌通用探针 EUB I-III(深蓝色)和 NC10 门细菌特异性探针 S<sup>\*</sup>-DBACT-1027-a-A-18 (Cy3)(红色)对微生物进行杂交。NC10 门细菌被两种探针共同杂交而呈现粉红色。标尺: 10 $\mu$ m

Figure 2.6 FISH of biomass from cultures R1, R2 and R3 after 500 days enrichment. The cells were hybridized with probe S<sup>\*</sup>-DBACT-1027-a-A-18 (Cy3) (red) specific for NC10 bacteria; a mixture of probes EUB I-III (dark blue), which detected nearly all eubacteria. NC10 bacteria appear pink due to double hybridization with the specific (red) and general (dark blue) probes.

## 2.3 讨论

目前, DAMO 富集培养的接种物仅限于淡水沉积物(Raghoebarsing et al.,

2006; Ettwig et al., 2009; Kampman et al., 2012), 活性污泥(Luesken et al., 2011), 淡水湖泊沉积物、活性污泥和回流污泥的混合物(Hu et al., 2009)和泥炭地深层土壤(Zhu et al., 2012)。本实验分别采用厌氧产甲烷颗粒污泥、农田水稻土壤和淡水河道沉积物成功富集了具有明显 DAMO 活性的三种富集培养物 R1、R2 和 R3。

富集阶段初期(0-180 天), 三种富集培养物 R1、R2、R3 的  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  还原活性都较强。前期研究表明, 采用淡水沉积物和厌氧污泥作为接种物, 在富集阶段初期, 均会出现反硝化现象(Ettwig et al., 2009; Hu et al., 2009; Luesken et al., 2011b)。分析可能有以下两点原因: 首先, 在此期间观察到了厌氧产甲烷颗粒污泥的大量解体, 污泥颜色由黑转黄, 形成絮体, 表明厌氧颗粒污泥中的微生物因对环境的不适应导致其死亡, 它们的细胞物质为反硝化细菌提供了充足的电子供体; 农田水稻土壤与淡水河道底泥本身所含的有机物质以及在富集培养过程中部分微生物因死亡而释放出的细胞物质均可作为电子受体被反硝化细菌利用。其次, 有研究表明, 在氨浓度受限的情况下, 厌氧氨氧化细菌对基质  $\text{NO}_2^-$  的竞争能力要强于 NC10 门细菌(Luesken et al., 2011a; Zhu et al., 2011); 而在有机物存在的条件下, 反硝化细菌在与厌氧氨氧化细菌竞争共同的基质  $\text{NO}_2^-$  时竞争能力更强(Ahn et al., 2004; Dong & Tollner, 2003), 前者的细胞生长速率可达后者的 100 倍以上(Kumar & Lin, 2010)。因此, 推测存在有机物时反硝化细菌在与 NC10 门细菌竞争共同基质  $\text{NO}_2^-$  时更具竞争力。基于以上分析, 推测三个反应器中发生的主要反应是反硝化作用。整个富集阶段初期, 进水  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  基本被 R1 消耗完毕, 而 R2、R3 的  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  还原活性则逐渐下降, 分析可能是由于其中的有机物在此期间逐渐被消耗殆尽所致。到富集培养初期结束之后, R2、R3 的反硝化作用逐渐降到一个很低的水平。

富集阶段中期(181-400 天), R1 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性随进水浓度的提升而上升, 从整个富集初期它对  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  的还原活性一直很高的情况来看, 此阶段 R1 依然存在反硝化作用。在富集中期的前 100 天左右, R2、R3 的  $\text{NO}_2^-$  还原活性并未随进水浓度的提升而立即升高, 始终维持在较低水平。Ettwig 等与 Hu 等在富集过程中也遇到了同样的现象, 停滞期分别达到了 80 天(Ettwig et al., 2009)和 180 天(Hu et al., 2009)。这可能是由两方面原因造成的, 一方面 R2、R3 的反硝化活性基本不存在, 此时的  $\text{NO}_2^-$  消耗应是 DAMO 作用所致, 即两者已显现微弱的

DAMO 活性。但此时 R2 和 R3 的 DAMO 活性较弱,对基质浓度的抗冲击能力较差,对于进水浓度的提升需要一段时间的适应期。在经历 100 余天的停滞期直至富集阶段后期(401-500 天),R2、R3 的  $\text{NO}_2^-$ -N 消耗速率显著提高。Ettwig 等 (Ettwig et al., 2009)在活性提高阶段对 NC10 门细菌的数量进行了监测,发现 NC10 门细菌数量与  $\text{NO}_2^-$ 还原活性呈很好的正相关性,意味着 NC10 门细菌的数量在此期间迅速增长,使 DAMO 活性显著提升。

对富集培养物 R1、R2、R3 的活性测试结果显示,三者的基质摩尔消耗比( $\text{CH}_4$ : $\text{NO}_2^-$ -N)分别为 3:6、3:7.5 和 3:8,均接近于理论比 3:8(Raghoebarsing et al., 2006),进一步证实了富集阶段后期三个反应器中主要发生的是 DAMO 反应。根据化学计量比,R1 与 R2 的甲烷消耗量偏高,与其他研究者发现的现象相似(Hu et al., 2009; Kampman et al., 2012),Hu 等推测可能是由于微生物对甲烷的同化作用所致(Hu et al., 2009)。

16S rRNA 系统发育分析显示,三种富集培养物中所有获得的 NC10 门细菌序列均归属于 group A,与之前的研究结果一致:group A 的 NC10 门细菌是主导 DAMO 反应的主力军(Ettwig et al., 2009; Luesken et al., 2011)。利用现有的 16S rRNA 引物对环境样品检测后发现,检测到的 NC10 门细菌不仅有归属于 group A,还有部分归属于 group B(Deutzmann & Schink, 2011; Ettwig et al., 2009; Luesken et al., 2011b),表明环境样品中 NC10 门细菌的种群多样性要高于 DAMO 富集培养物。富集培养物与环境样品中 NC10 门细菌种群多样性的差异说明人工富集条件为归属于 group A 的 NC10 门细菌的生长创造了非常理想的条件,而其他 NC10 门细菌则由于不能适应这种环境而遭到淘汰。在本实验条件下,三种富集培养物 R1、R2、R3 均能够检测到 NC10 门细菌,三者序列各自都只归属于 1 个 OTU 中,三者彼此之间序列相似度均高于 99%,而与 *M. oxyfera* 的序列相似度最高仅在 97%左右。同样,对 *pmoA* 基因的系统发育分析显示,三种富集培养物中得到的 *pmoA* 基因序列都集中于一簇,与 *M. oxyfera* 的序列相似度最高仅为 90%左右。一般情况下甲烷氧化菌物种鉴定以 97%的 16S rRNA 基因和 93%的 *pmoA* 基因相似度为标准(Luke & Frenzel, 2011),那么本实验中很有可能富集到了一簇新的 NC10 门细菌。

本实验三种接种物中 NC10 门细菌 16S rRNA 基因拷贝数分别为  $6.76 \times 10^6$

copies·g<sup>-1</sup> (dry soil),  $4.33 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil)<sup>1</sup> 和  $3.44 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil), 这与 Kojima 等在 Biwa 湖表层沉积物中测得的 NC10 门细菌数量相近(Kojima et al., 2012)。Ettwig 等发现随着 DAMO 活性的增加, NC10 门细菌数量也增加(Ettwig et al., 2009)。本实验在 500 天富集培养后, R1、R2、R3 中的 NC10 门细菌的数量分别达到了  $4.32 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil)、 $1.26 \times 10^{10}$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil) 和  $6.86 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil), 在数量上 R2>R3>R1, 与三者的最大比活性一致, 证实了在本实验条件下, 三种接种物中农田水稻土壤是最优接种物。FISH 结果显示, R1、R2、R3 中 NC10 门细菌占总细菌数量的比例都超过了 50%, 意味着 NC10 门细菌在三种富集物中占据主导。NC10 门细菌聚集成簇, 这种现象在其他的 DAMO 富集物以及硝化与厌氧氨氧化的富集物中均有出现, 推测可能有助于避免细胞代谢中间产物因被动扩散出细胞膜而流失(Schmid et al., 2000)。

综合本实验的结果, 水稻土壤是最优接种物, 这可能是由于水稻土壤特殊的物理特性及丰富的微生物类群决定的(Liesack et al., 2000)。在水稻土壤的厌氧土层中, 产甲烷菌会利用土壤中的有机物质产生大量甲烷, 同时由于氮肥的大量施用, 往往造成水稻田中的氮素过剩, 在硝化细菌的作用下, 有部分氮素会以硝态氮的形式存在并转移至缺氧土层, 这两种物质的存在及缺氧条件为 DAMO 功能微生物的生存提供了非常理想的生态位。而在工程废水处理领域, 厌氧产甲烷颗粒污泥是一种大宗来源物质, 在本实验中, 利用它成功富集获得了 DAMO 培养物证明了厌氧污泥作为 DAMO 接种物是可行的, 通过进一步优化富集条件, 使之能快速获得高活性的 DAMO 富集培养物, 厌氧产甲烷颗粒污泥将会成为一种非常具有潜力的 DAMO 接种物。

## 2.4 结论

本研究采用厌氧产甲烷颗粒污泥、农田水稻土壤、淡水河道沉积物作为接种物成功获得了具有 DAMO 活性的富集培养物, 首次证实了利用农田水稻土壤作为接种物进行 DAMO 功能微生物富集是可行的, 为 DAMO 富集培养物的获得提供了新的选择。综合活性实验及分子生物学分析结果表明农田水稻土壤是最优接种物。

## 第三章 不同培养基对 DAMO 微生物富集培养的比较研究

### 引言

培养基是微生物富集培养的关键因素,它不仅为微生物的生长提供基质和必要的生长因子,并且为微生物提供适宜的生存环境。

用于微生物富集的培养基可分为天然培养基和人工培养基。人工培养基性质稳定,如 Anammox 细菌的富集就多采用人工培养基。然而另一些研究显示,采用天然培养基对某些接种物进行富集培养具有人工培养基达不到的效果。如在 Anammox 细菌的富集培养研究中, van de Vossenberg 等利用红海海水配制的天然培养基对红海海底沉积物进行培养,富集到了两种新的 Anammox 细菌,而采用人工模拟海水作为培养基则导致富集的失败(van de Vossenberg et al., 2008)。此外, Nakajima 等与 Hu 等分别利用海水(Nakajima et al., 2008)与地表水(Hu et al., 2011a)配制的培养基成功富集到了新的 Anammox 细菌。这些研究表明了天然培养基可能具有某些人工培养基缺乏的物质,可以培养获得不同于人工培养富集培养的微生物。

如表 1.2 所示,目前 DAMO 微生物的富集培养多采用人工培养基。因此,为考察采用天然培养基在 DAMO 微生物富集培养上是否存在优势,本章采用农田水稻土壤(在第二章中已被证明是最优的接种物)作为接种物,分别用天然培养基和人工培养基进行富集培养,同时结合分子生物学技术,对富集培养物的 DAMO 比活性、NC10 门细菌菌群组成、数量等进行比较,以此选出优质的培养基,为实现 DAMO 细菌的高效富集与筛选新的 DAMO 细菌提供指导。

### 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 接种物

接种物为第二章 2.1.1 中所述的农田水稻土壤。



### 3.1.2 培养基

本实验采用的天然培养基如第二章 2.1.2 中所述。采用的人工培养基参考 Ettwig 等 (Ettwig et al., 2009)。其中每升培养基中含  $\text{KHCO}_3$  1g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g;  $\text{NaNO}_2$  0.0345 至 0.069 g ( $7\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$  至  $14\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 酸性微量元素溶液 0.5 mL; 碱性微量元素溶液 0.2 mL。每升酸性微量元素溶液含  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.085 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.068 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.12 g;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 g;  $\text{CuSO}_4$  0.32 g;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.095 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.014 g。每升碱性微量元素溶液含  $\text{SeO}_2$  0.067 g;  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.050 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.242 g。

### 3.1.3 富集培养

在两个相同的 2.5 L SBR 中分别接种等量(0.5 L)接种物, 分别添加天然培养基与人工培养基至 2.0 L。每个 SBR 周期为 72 h, 包括 0.5 h 的进水期, 70 h 的培养期, 1 h 的沉淀期, 0.5 h 的排水期。在进水期, 加入培养基, 同时持续向装置中通入氩气, 以保持装置内部的厌氧环境。进水结束后, 停止通入氩气, 将 100 mL 的甲烷(纯度为 99.9%)注入富集装置中替换相同体积的氩气。在排水期, 每个富集装置中排出 1 L 上清液, 并在进水期中补充等量新鲜培养基。两个反应器均在  $30^\circ\text{C}$  条件下运行, 通过磁力搅拌使反应体系混合均匀。在整个富集过程中, 进水  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  的浓度从  $7\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$  提升至  $14\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值维持在 7.0-7.2 之间, 甲烷体积浓度维持在气相浓度的 20% 左右。在富集前 100 天的时间内, 两种培养基中均添加  $28\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NO}_3^-$ , 100 天后停止添加。

### 3.1.4 活性测试

方法参见第二章 2.1.4。

### 3.1.5 DNA 抽提与 PCR 扩增

方法参见第二章 2.1.5。

### 3.1.6 克隆与测序

方法参见第二章 2.1.6。

### 3.1.7 16S rRNA 基因与 *pmoA* 基因系统发育分析

方法参见第二章 2.1.7。

### 3.1.8 qPCR

方法参见第二章 2.1.8。

### 3.1.9 FISH

方法参见第二章 2.1.9。

### 3.1.10 分析方法

方法参见第二章 2.1.10。

## 3.2 结果

### 3.2.1 富集培养

本实验采用天然培养基与人工培养基进行 380 天的富集培养, 获得了两种富集培养物 S1 与 S2。如图 3.1 所示, 在整个富集阶段 S1 与 S2 亚硝氮消耗水平的差异呈现出两个不同的阶段。在第一阶段(0-180 天), 两个反应器中反硝化作用占据主导。进水亚硝氮的浓度基本控制在  $7 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ , 同时进水中还添加了  $28 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  的硝氮。S1 与 S2 对硝氮的消耗水平均较高, 至 100 天, S1 与 S2 对硝氮消耗水平明显下降, 反硝化作用逐渐减弱, 此时进水中停止添加硝氮。S1 与 S2 对亚硝氮均有一定的消耗, 但两者的消耗速率不稳定, 存在不同程度的波动, 两者之间的亚硝氮消耗水平并不存在明显的差异。在第二阶段(181-380 天), 进水中亚硝氮浓度提升至  $14 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此阶段 S1 与 S2 的亚硝氮消耗速率均不同程度提升, 波动趋缓。在 181-320 天的时间段内, 可观察到 S2 的亚硝氮消耗速

率已高于 S1, 并且在这一时期两者的亚硝氮消耗速率差一直维持在  $0.85 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  左右。320 天之后, S2 的亚硝氮消耗水平有了明显的提升, 而 S1 的亚硝氮消耗水平提升不明显, 两者的差距进一步拉开, 在 320-380 天的时间段内, 两者的平均亚硝氮消耗速率差在  $2.86 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$  左右。

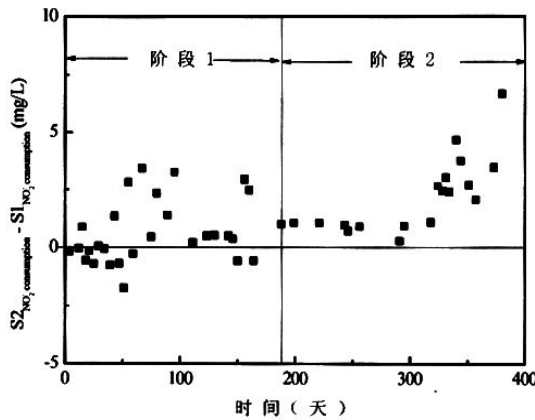


图 3.1 富集过程中 S2 与 S1  $\text{NO}_2\text{-N}$  消耗速率差

Figure 3.1 Different  $\text{NO}_2\text{-N}$  consumption rate between S1 and S2 during the enrichment period

### 3.2.2 活性测试

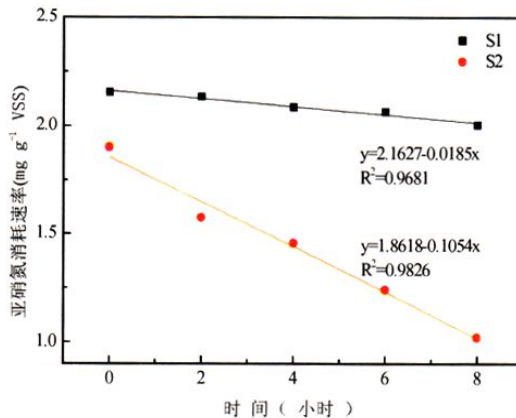


图 3.2 S1 和 S2 分批活性测试 DAMO 比活性

Figure 3.2 DAMO activity of S1 and S2 after 380 days enrichment

在富集培养 380 天之后, 对 S1 与 S2 的 DAMO 活性进行测试。活性实验表

明, S1 与 S2 的基质消耗摩尔比( $\text{CH}_4:\text{NO}_2^-$ )分别为 3.24:8 和 2.96:8, 均接近理论比 3:8, 表明了 DAMO 过程均存在于两种富集培养物中。S1 与 S2 的最大比活性分别为  $0.02 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ (图 3.2), 后者的最大比活性是前者的 5.5 倍。

### 3.2.3 16S rRNA 基因和 *pmoA* 基因系统发育分析

为了检测两种富集培养物 S1 与 S2 中 NC10 门细菌的种类, 在活性测试的同一时期, 采用巢式 PCR 对 S1 与 S2 抽提出的 DNA 进行扩增, 对获得的 PCR 产物进行克隆。两个样品分别选取了 22 与 23 个克隆进行测序, 通过在 NCBI 数据库(The National Center for Biotechnology Information)中进行序列比对分析发现, 所有的序列均归属于 NC10 门。系统发育分析表明, 两者中获得的序列分别形成了两簇, 两者各自序列间的相似度非常高, S1 的序列相似度为 98.7-100%, S2 的序列相似度为 97.6-100%, 而两者之间的序列相似度则只有 89.3-91.3%。

Ettwig 等将 NC10 门分为 group A 与 group B(Ettwig et al., 2009), 截至目前富集培养物获得的 NC10 细菌均归属于 group A, 因此, 一般认为归属于 group A 的 NC10 细菌具有 DAMO 功能, 而归属于 group B 的 NC10 细菌则不具备此功能。本实验 S1 中获得的序列均归属于 group A(图 3.3a), 与已知序列 *M. oxyfera* 的相似度达到了 96.3-97.0%, 而与这簇序列相似度最高的序列(DQ837241)源自一处原始的滨海含水层, 序列相似度达到了 96.9-97.6%。有趣的是, S2 中获得的序列均归属于 group B(图 3.3a), 与 *M. oxyfera* 的相似度仅为 91.5-92.4%, 与其序列相似度最高的序列(JN704439)来自于中国南方的农田水稻土, 序列相似度达到了 97.4-98.0%。这个结果与之前研究的推测有相左之处, 本实验中在 DAMO 富集培养物 S2 中检测到的是归属于 group B 而非 group A 的 NC10 细菌, 并且 S2 的 DAMO 活性较 S1 要高出数倍。

以 7%的 cutoff 进行计算(Luke & Frenzel, 2011), S1 与 S2 的 *pmoA* 基因序列均只含 1 个 OUT(图 3.3b)。S1 与 S2 中得到的 *pmoA* 基因序列与 *M. oxyfera* 的 *pmoA* 基因的相似度分别仅为 85.9%-86.6%和 86.1%-86.6%, 而与这簇序列相似度最高的序列(JF706203)来自于采用活性污泥培养获得的 DAMO 富集物, 序列相似度分别为 86.3%-88.4%和 87.9%-88.4%。

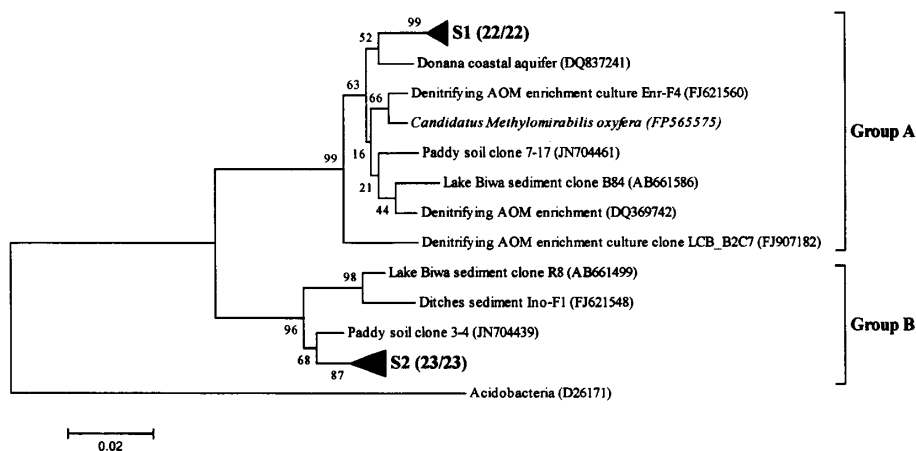


图 3.3a S1 和 S2 中 DAMO 功能微生物与已知的 DAMO 微生物 16S rRNA 序列系统发育树  
 Figure 3.3a Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences recovered from cultures S1 and S2 with Acidobacteria as the outgroup. The tree was calculated using the neighbour-joining method and the p-distance correction. Bootstrap values were 1000 replicates, and the scale bar represents 2% of sequence divergence.

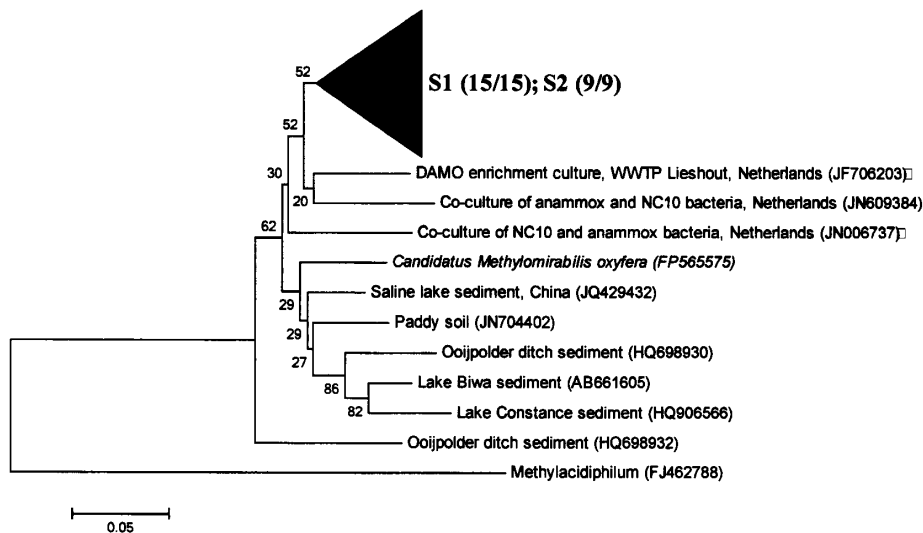


图 3.3b S1 和 S2 中 DAMO 功能微生物与已知的 DAMO 微生物 *pmoA* 序列系统发育树  
 Figure 3.3b Phylogenetic tree of the *pmoA* gene sequences recovered from cultures S1 and S2 with Methyloacidiphilum as the outgroup. The tree was calculated using the neighbour-joining method and the p-distance correction. Bootstrap values were 1000 replicates, and the scale bar represents 50% of sequence divergence.

### 3.2.4 qPCR

富集培养初期与末期时 S1 与 S2 中的 NC10 门细菌数量通过 16S rRNA 基因的拷贝数进行定量, 定量 PCR 的条件与所采用的引物均参考 Ettwig 等所描述 (Ettwig et al., 2009)。接种物与富集 380 天后 S1 与 S2 中 DAMO 菌的数量变化情况如图 3.4 所示。通过富集, 两者中 DAMO 菌的数量均有所增加, S1 中的 DAMO 菌数量从  $1.59 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil) 增加到  $1.01 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil), S2 中的 DAMO 菌数量从  $1.59 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil) 增加到  $2.01 \times 10^8$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil)。富集培养结束时, S2 中 DAMO 菌的数量是 S1 的 2 倍, 这与两者表现出的 DAMO 比活性相匹配。

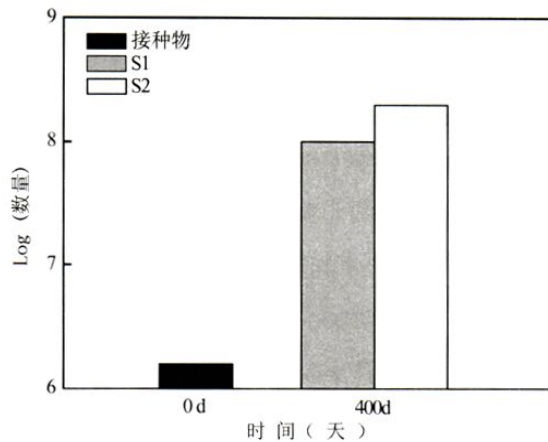


图 3.4 富集培养初期(0 天)与富集培养末期(380 天)富集培养物 S1 和 S2 中 NC10 门细菌数量变化情况

Figure 3.4 Numbers of 16S rRNA genes of NC10 bacteria in culture S1 and S2 from initial period to final period.

### 3.2.5 FISH

FISH 结果显示, 富集培养物 S1 中成功检测到了 NC10 门细菌(粉红), 并且数量在富集培养物中占据主导。而采用同样的探针, S2 中并没有检测到 NC10 门细菌的特征荧光信号(图 3.5)。结合系统发育分析结果, 受制于 NC10 细菌特异性探针的局限性(只能杂交归属于 group A 的 NC10 门细菌), 致使归属于 group B

的 NC10 门细菌无法与之杂交。

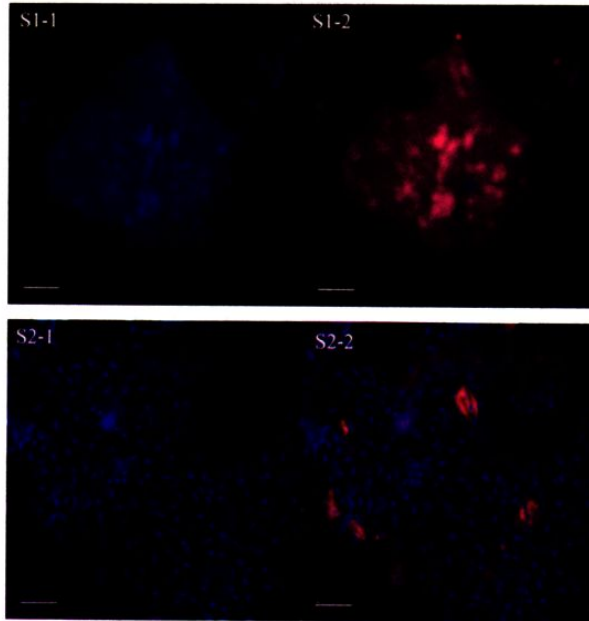


图 3.5 富集培养 280 天后 S1 和 S2 的 FISH 图。S1-1 和 S2-1 显示了 S1 和 S2 中的细菌被 EUB I-III 杂交，S1-2 显示了细菌被 NC10 门细菌特异性探针所杂交，S2-2 显示了细菌不能被 NC10 门细菌特异性探针杂交。标尺：10 $\mu$ m

Figure 3.5 FISH of biomass from cultures S1 and S2 after 380 days enrichment. The cells were hybridized with probe S<sup>\*</sup>-DBACT-1027-a-A-18 (Cy3) (red) specific for NC10 bacteria (group A); a mixture of probes EUB I-III (dark blue), which detected nearly all eubacteria. NC10 bacteria (group A) appear pink due to double hybridization with the specific (red) and general (dark blue) probes. Scal bar: 10 $\mu$ m

### 3.3 讨论

前期研究已表明归属于 group A 的 NC10 门细菌具有 DAMO 活性(Ettwig et al., 2009), 但对于归属于 group B 的 NC10 门细菌是否具有 DAMO 活性则不得而知。本实验利用农田水稻土作为接种物, 采用人工培养基进行培养, 首次成功获得了归属于 group B 的 NC10 门细菌占主导的 DAMO 富集培养物 S2, 首次证实了归属于 group B 的 NC10 门细菌同样具有 DAMO 活性。

本实验之所以能够成功富集到归属于 group B 的 NC10 门细菌占主导的

DAMO 富集培养物, 主要归结于所采用的接种物与选择的培养基。本论文第二章已经证实了农田水稻土壤是一种优质的 DAMO 接种物。系统发育分析发现, 该接种物中的 NC10 门细菌原始数量较多(达到了  $10^6$  copies·g<sup>-1</sup> (dry soil)), 并且所获序列均归属于 group B, 因此, 接种物的这种特性为富集获得以归属于 group B 的 NC10 门细菌为主导的 DAMO 富集培养物创造了良好条件。另一方面, 培养基对 DAMO 微生物的富集可能具有一定的选择性。

从本实验结果可以看出, S2 的 DAMO 活性要高于 S1。从接种物中 NC10 门细菌的组成来看, 检测到的均为归属于 group B 的 NC10 门细菌, 表明接种物中归属于 group A 的 NC10 门细菌数量非常少, 以致难以检测到。这表明了接种物中归属于 group B 的 NC10 门细菌的数量要远远高于归属于 group A 的 NC10 门细菌, 因此通过相同时间的富集, 所获得的富集培养物 S1 和 S2 中 NC10 门细菌的数量也存在差异, 这一差异可能是导致两者 DAMO 活性差异的主要原因。

其次, 有报道显示, 假设一个 NC10 门细菌细胞中含一个 16S rRNA 基因拷贝, 那么归属于 group A 的 NC10 门细菌细胞的活性为  $0.09 \text{ fmol CH}_4 \text{ d}^{-1}$  (Ettwig et al., 2009), 虽然目前并没有报道表明归属于 group B 的 NC10 门细菌细胞的活性, 但从本实验结果推算出, 单个 group B 的细胞的 DAMO 活性是 group A 细胞的 2.76 倍, 两种微生物其单个细胞 DAMO 活性上存在差异。这种差异应该也是造成两种富集培养物 DAMO 活性差异的原因。

第三, 之前有研究显示, 采用天然培养基富集 Anammox 细菌较采用人工培养基所需要的时间要长(Hu et al., 2011a)。人工培养基具有明确的配方, 各种元素成分稳定, 而本实验所采用的天然培养基取自某淡水河道, 由于受天气、温度等自然因素的影响, 一年四季该水体中元素的成分会存在一定的差异, 体系的不稳定可能对富集培养产生一定的影响; 其次, 与人工培养基相比, 天然培养基的某些成分如重碳酸盐、镁、钙、磷以及一些微量元素的浓度均较低, 这些元素中的一种或几种成分可能会成为富集培养的限制因素(van de Vossenberg et al., 2008)。

Zhu 等采用泥炭地原位表层水作为培养基成功获得了一种新的 NC10 门细菌 (Zhu et al., 2012), 这表明了原位水体可能含有某些特殊的目标微生物必须的生长因子, 能够促成目标微生物的富集。因此后续的研究可进一步扩大接种物的选取范围, 同时采用原位水体配制培养基, 可能会富集到更多新的 NC10 门细菌。



### 3.4 结论

本实验证实了采用天然培养基与人工培养基均能够从农田水稻土壤中成功富集到 NC10 门菌, 而从 DAMO 活性与 NC10 门数量角度证明了人工培养基较天然培养基更适合作为 NC10 门菌富集培养的培养基。本实验成功富集到了 group B 的 NC10 细菌为主导的 DAMO 富集培养物, 证明了归属于 group B 的 NC10 细菌同样具有 DAMO 活性, 拓展了人们对具有 DAMO 功能的 NC10 细菌的认知。

## 第四章 不同构型反应器富集培养 DAMO 微生物的比较研究

### 引言

DAMO 微生物富集困难,富集培养物活性不高一直是困扰 DAMO 研究的一个难题。除接种物和培养基之外,还有一些过程因素是富集培养过程中的关键。

首先,甲烷的传质对 DAMO 微生物的富集十分关键。甲烷是 NC10 门细菌生长所需要的基质,因此要使 NC10 门细菌正常生长,必须提供足够的可供其利用的甲烷。但甲烷是一种水溶性极差的气体,溶解态甲烷不足将会导致 DAMO 微生物的正常生长得不到保障。鉴于此,甲烷的传质可能是 NC10 门细菌富集培养的受限因素(何焜飞等, 2012)。

其次,富集培养过程中生物量的流失会对富集培养物的 DAMO 活性产生影响。有研究表明,DAMO 微生物富集培养过程中流失的生物量同样具有 DAMO 活性(Luesken et al., 2011)。Kampman 等在 DAMO 微生物的富集培养过程中发现流失的生物量占到了生物总量的 41-48%(Kampman et al., 2012),这可能会导致反应器内 DAMO 活性的严重削弱。以上两项对 DAMO 微生物的富集研究均采用了 SBR,这就表明了传统的依靠沉淀滞留生物量的方式并非十分有效。因此,强化富集过程中生物量的滞留应能有助于富集培养物 DAMO 活性的提高。

本实验基于以上分析分别设计了两种构型的反应器:1)磁搅气升式反应器(Magnetic stirred air lift reactor, MSALR),意在通过甲烷曝气的方式强化其从气相到液相的传质;2)生物膜反应器(Biofilm reactor, BR),通过生物填料的挂膜作用提高反应器的生物量滞留能力。通过 MSALR、BR 与传统的 SBR 反应器在富集效果(基质去除速率、DAMO 活性, NC10 门细菌数量等)上的比较,筛选出较优的反应器构型。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 接种物

本实验接种物为第一章中三种富集培养物的混合物。

### 4.1.2 实验装置

本实验分别采用 MSALR、BR 和 SBR 进行 NC10 门细菌的富集(图 4.1)。三个反应器总体积均为 1 L(接种量为 0.3 L, 液相体积为 0.9 L)。三个反应器均以 24 h 为一个时间操作单元, 其中反应期为 22 h, 静置期为 1.5 h, 进水、排水期为 0.5 h, 每个周期置换的水量为 0.45 L, 水力停留时间为 48 h。三者均在 30℃ 条件下运行。

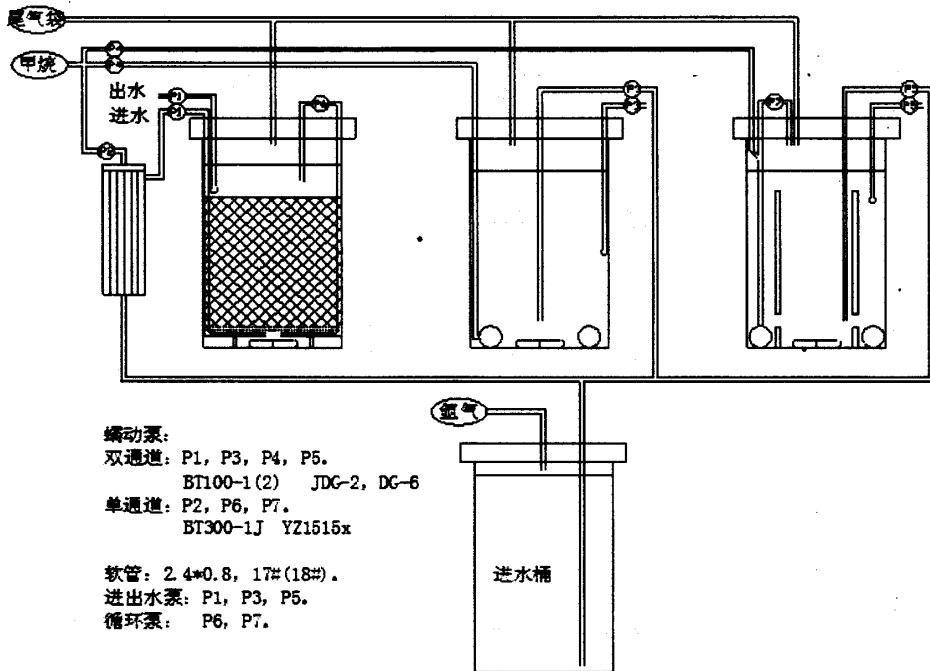


图 4.1 MSALR、BR 和 SBR 装置连接运行示意图

Figure 4.1 Schematic diagram of MSALR, BR and SBR

MSALR 和 BR 以 SBR 为基本构型构建, 三者的特点如表 4.1 所示。其中 MSALR 在采用底部连续通气的方式实现甲烷的连续供给和循环, 曝气速率为  $0.69 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 尾气通过气袋收集, 同时通过气体和磁力搅拌实现反应器内部的全混合状态, 反应期结束时停止曝气; BR 内部放置了生物填料, 可通过微生物挂膜和沉淀两种方式实现生物量的持留。三者的气相体积均为 0.1 L, 其中 MSALR 通过连续曝气方式提供甲烷, 而 BR 和 SBR 则通过气体置换向反应器内提供甲烷, 置换的甲烷气体体积为 100 mL, 使气相中甲烷的体积浓度达到 100%。

表 4.1 MSALR、BR 和 SBR 装置构型(运行)特点

Table 4.1 The operating properties of MSALR, BR and SBR

反应器	类型	运行方式	进气(甲烷)方式	是否添加填料
MSALR	全混	续批	底部持续通入	否
BR	全混	续批	瞬时注入	是
SBR	全混	续批	瞬时注入	否

### 4.1.3 培养基

本实验采用的培养基同第三章 3.1.2 中的人工培养基, 该培养基广泛用于 DAMO 微生物的富集, 同时在本论文第三章研究中被认为是一种优质的培养基。富集培养阶段持续近 40 天, 其中前 14 天进水  $\text{NO}_2^-$  浓度为  $70 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ , 14d 之后, 进水  $\text{NO}_2^-$  浓度提升至  $98 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 4.1.4 DAMO 活性测试

MSALR、BR 和 SBR 中富集物的甲烷氧化活性通过  $^{13}\text{CH}_4$  的消耗速率确定。分别取三个反应器中的富集物各 10 mL 置于 72 mL 血清瓶中, 添加不含  $\text{NO}_2^-$  的培养基至 50 mL, 利用氩气除氧 10 min 后, 用硅胶塞密封, 并在  $30^\circ\text{C}$ , 150 rpm 条件下培养 24 h, 以使残留的基质充分消耗。向血清瓶中加入基质( $^{13}\text{CH}_4$  和  $\text{NO}_2^-$ ) 使  $^{13}\text{CH}_4$  气相浓度控制在 4.5%,  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度为  $7 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 10 h 的培养过程中, 每隔 2 h(包括 0 h)取气样 10  $\mu\text{L}$  分析  $^{13}\text{CH}_4$  浓度, 同时取水样 1 mL 分析  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度。每个反应器设置两个平行和两个对照组, 一个对照组中不添加  $\text{NO}_2^-$ , 另一个不添加  $^{13}\text{CH}_4$ 。

### 4.1.5 DNA 抽提与 PCR 扩增

方法同第二章 2.1.5。

### 4.1.6 克隆与测序

方法同第二章 2.1.6。

#### 4.1.7 NC10 门细菌数量分析

方法同第二章 2.1.8。

#### 4.1.8 16S rRNA 基因和 *pmoA* 基因系统发育分析

方法同第二章 2.1.7。

#### 4.1.9 FISH

方法参见第二章 2.1.9。

#### 4.1.10 分析方法

方法同第二章 2.1.10。

### 4.2 结果

#### 4.2.1 反应器容积氮去除情况

将第二章实验获得的富集培养物 R1、R2 和 R3 三者的混合物作为接种物分别接种于 MSALR、BR 和 SBR 中，考察三种不同构型反应器富集 DAMO 微生物的效果。以三个反应器中进水  $\text{NO}_2^-$  浓度的变化为标准，可将此富集培养过程分为两个阶段(图 4.2)。

第一阶段(Phage 1)持续 14 天，此阶段中进水  $\text{NO}_2^-$  浓度为  $70 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此阶段，MSALR 的容积氮去除率经历了快速增长到持续稳定的过程。1-5 天，MSALR 的容积氮去除率从初始的  $5.24 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$  增长到了  $31.70 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。6-14 天，容积氮去除率不再明显增加，基本稳定在  $30.00 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$  左右，平均容积氮去除率为  $29.87 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。在第一阶段，BR 的容积氮去除率经历了波动上升的过程，容积氮去除率从初始的  $4.80 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$  增长到了  $10.00 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ ，平均容积氮去除率为  $10.02 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。第一阶段中 SBR 的容积氮去除率稳定上升，容积氮去除率从初始的  $4.16 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$  增长到了  $7.20 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ ，上升幅度不如前两者大，平均容积氮去除率为  $5.92 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。

第二阶段(Phage 2)持续 23 天，此阶段中进水  $\text{NO}_2^-$  浓度提升至  $98 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在此阶段，MSALR 的容积氮去除率进一步得到了较为明显的提升。15-30 天，MSALR 的平均容积氮去除率达到了  $42.23 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ ，较第一阶段有了进一步提高。但此时期内容积氮去除率不稳定，存在较大的波动。31-37 天，MSALR 的容积氮去除率保持了稳定，平均容积氮去除率达到了  $48.16 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。

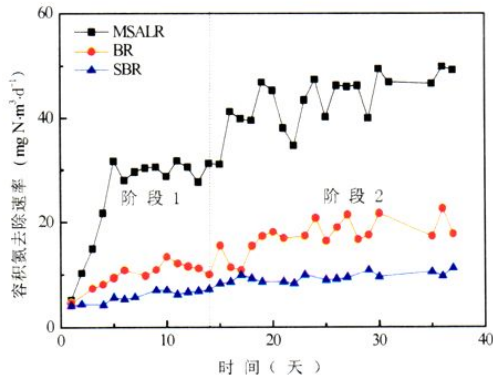


图 4.2 MSALR、BR 和 SBR  $\text{NO}_2\text{-N}$  容积去除率

Figure 4.2 The volumetric nitrogen removal rate of MSALR, BR and SBR during enrichment period

与第一阶段类似，BR 的容积氮去除率在第二阶段同样经历了波动上升的过程，容积氮去除率从  $10.00 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$  增长到了  $17.85 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ ，平均容积氮去除率为  $17.44 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。第二阶段，SBR 的容积氮去除率继续稳定小幅上升，容积氮去除率从  $7.20 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$  增长到了  $11.37 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ ，平均容积氮去除率为  $9.34 \text{ mgN}\cdot\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ 。

综上，经过近 40 天的富集培养，三种富集培养物的容积氮去除速率均有不同程度的提高，采用 MSALR 培养的富集物容积氮去除速率的提高程度较 BR 和 SBR 明显。

#### 4.2.2 DAMO 活性

反应器培养结束后，分别测定三个装置中富集培养物的 DAMO 活性。以  $^{13}\text{CH}_4$  的消耗考察各富集物的甲烷氧化能力。如图 4.3 所示，经过 10 h 的振荡培养，三种富集培养物均消耗了一定量的  $^{13}\text{CH}_4$ 。MSALR、BR 和 SBR 中富集物的 DAMO 活性分别为  $0.22 \text{ mgCH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ， $0.10 \text{ mgCH}_4\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11$

$\text{mgCH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{h}^{-1}$ , 前者的 DAMO 活性要明显高于后两者。

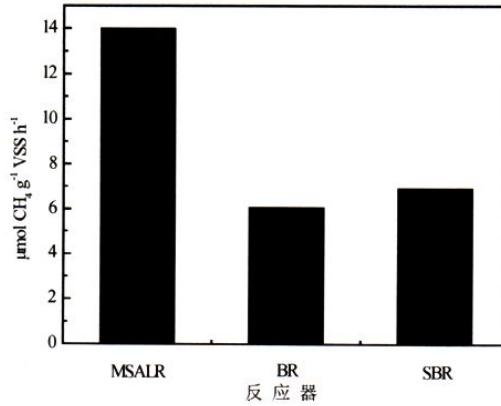


图 4.3 MSALR、BR 和 SBR 富集培养物的  $^{13}\text{CH}_4$  消耗情况

Figure 4.3  $^{13}\text{CH}_4$  consumption comparison among MSALR, BR and SBR

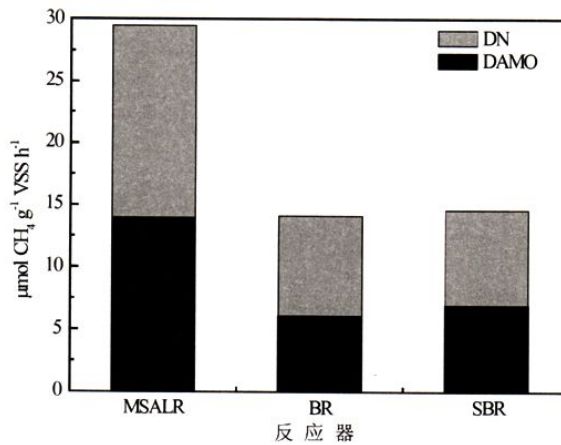


图 4.4 MSALR、BR 和 SBR 富集培养物的  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  消耗情况(DN 指反硝化作用)

Figure 4.4  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  consumption of MSALR, BR and SBR (DN represents denitrification.)

如图 4.4 所示, 分批活性测试还发现, 三种富集培养物中均存在不同程度的反硝化作用。黑色部分显示了各反应器中富集培养物中的 DAMO 作用对  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  消耗的贡献水平, 消耗速率分别为  $0.52 \text{ mgN} \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $0.23 \text{ mgN} \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{h}^{-1}$  和  $0.26 \text{ mgN} \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{h}^{-1}$ 。灰色部分显示出反应器内还出现了一定的反硝化作用。

### 4.2.3 NC10 门细菌数量

采用 qPCR 技术对三个反应器接种物及富集培养物中 NC10 门细菌的数量进行了检测。如图 4.5 所示, 接种物中 NC10 门细菌的拷贝数为  $6.64 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil), MSALR、BR 和 SBR 富集培养物中 NC10 门细菌的拷贝数分别达到了  $2.10 \times 10^9 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil),  $1.71 \times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil) 和  $6.64 \times 10^7 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil)。MSALR 的 NC10 门细菌拷贝数要明显高于 BR 和 SBR, 其与三者之间的 DAMO 活性基本能够匹配。

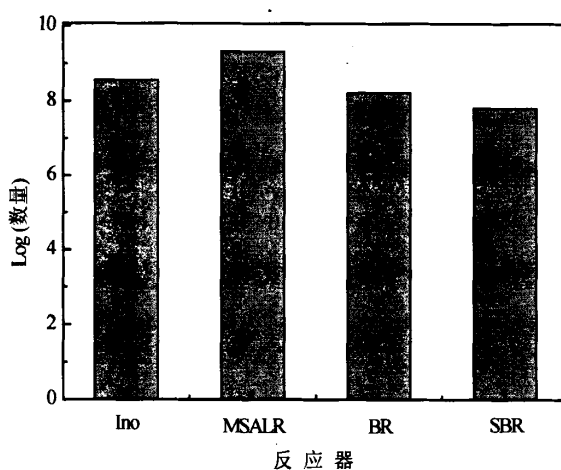


图 4.5 接种物与 MSALR、BR、SBR 富集培养物中 NC10 门细菌的数量

Figure 4.5 Abundance of 16S rRNA genes of NC10 bacteria in inocula and culture R1, R2, R3

### 4.2.4 16S rRNA 基因与 *pmoA* 基因系统发育分析

分别对接种物和 MSALR、BR 和 SBR 中富集培养物的 NC10 门细菌的 16S rRNA 基因进行系统发育分析。结果表明, 经过一个多月的富集培养, 三个反应器中的 NC10 门细菌和接种物中的 NC10 门细菌均集中于一簇, 并且均归属于 group A(图 4.6a)。然而, 三种富集培养物彼此之间的序列相似度为 96.5%-99.8%, 表明了其中的 NC10 门细菌种群还是发生了一定的变化。此外, 与获得的 NC10 门细菌序列相似度最高的序列来自于杭州西湖沉积物(JX532016), 接种物与其序列相似度为 97.4%-99.3%, 三种富集培养物与其序列相似度分别为 97.2%-99.3%,



96.5%-98.0%和 97.0%-97.2%。接种物和三种富集物与 *M. oxyfera* 的序列相似度则分别为 97.0%-97.8%，96.5%-97.6%，96.7%-97.8%和 97.4%-97.8%。

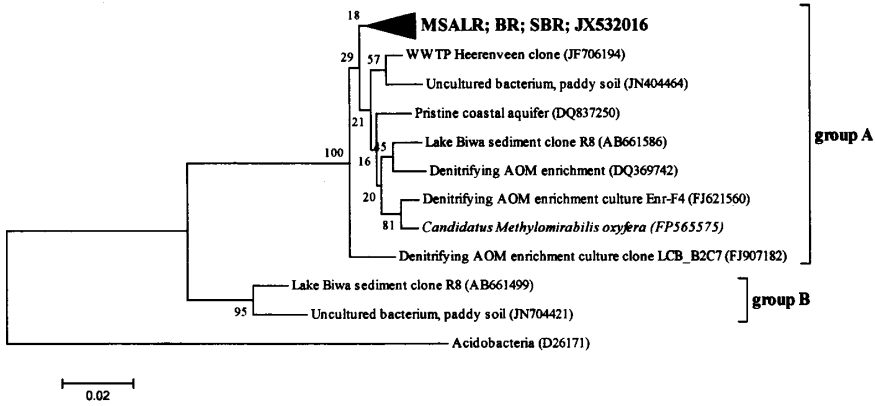


图 4.6a 富集培养物中 DAMO 功能微生物与已知的 NC10 门细菌 16S rRNA 系统发育树

Figure 4.6a Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences recovered from cultures in MSALR, BR and SBR with Acidobacteria as the outgroup. The tree was calculated using the neighbour-joining method and the p-distance correction. Bootstrap values were 1000 replicates, and the scale bar represents 2% of sequence divergence.

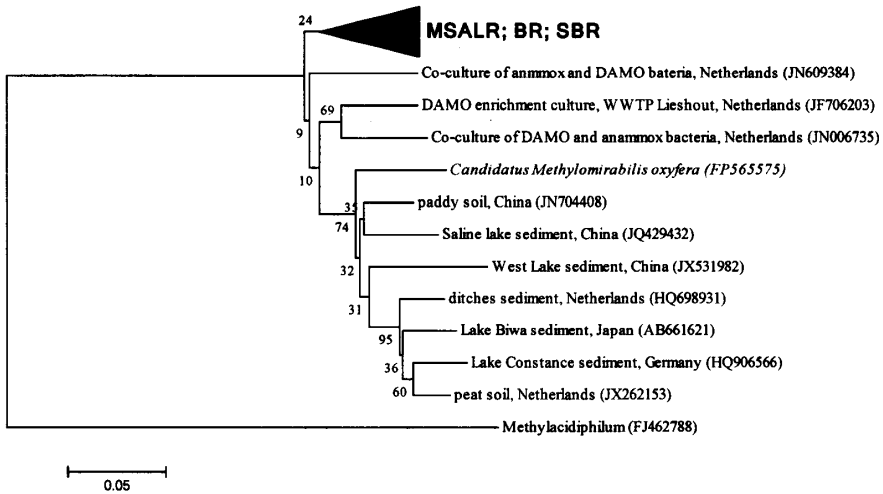


图 4.6b 富集培养物中 DAMO 功能微生物与已知的 NC10 门细菌 *pmoA* 系统发育树

Figure 4.6b Phylogenetic tree of the *pmoA* gene sequences recovered from cultures in MSALR, BR and SBR with Methyloirabilis as the outgroup. The tree was calculated using the neighbour-joining method and the p-distance correction. Bootstrap values were 1000 replicates, and the scale bar represents 5% of sequence divergence.

对三种富集培养物中 NC10 门细菌 *pmoA* 基因的系统发育分析发现, 它们均集中于一簇, 并且与其他研究获得的 *pmoA* 基因的相似度很低(低于 92%), 三者与其相似度最高的 *pmoA* 基因来自于 *anmmox* 与 NC10 门细菌共存的混培物, 序列相似度仅为 86.6%-91.5%, 86.6%-90.0%, 86.6%-91.0%。与 *M. oxyfera* 的序列相似度则分别为 85.1-90.2%, 85.6%-88.7%, 85.1%-91.0%。

#### 4.2.5 FISH

FISH 结果显示, NC10 门细菌(蓝紫色)在 MSALR、BR 和 SBR 的富集培养物中均占据主导, 并且 NC10 门细菌的分布均呈现出非常明显的团聚特征(图 4.7)。

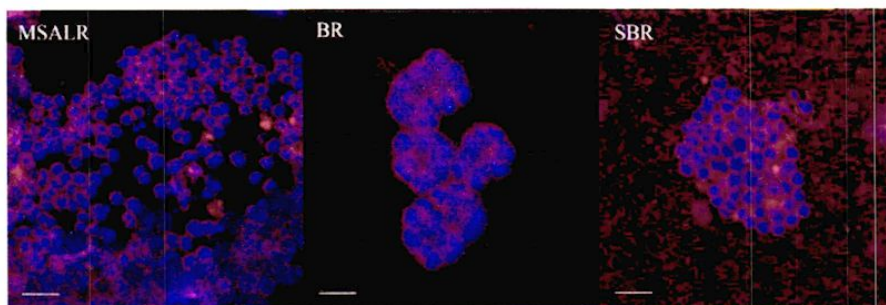


图 4.7 MSALR、BR 和 SBR 富集培养物的 FISH 图。采用细菌通用探针 EUB I-III(深蓝色)和 NC10 门细菌特异性探针 S<sup>\*</sup>-DBACT-1027-a-A-18 (Cy3)(红色)对微生物进行杂交。NC10 门细菌被两种探针共同杂交而呈现紫色。标尺: 10 $\mu$ m

Figure 4.7 FISH of biomass from MSALR, BR and SBR. The cells were hybridized with probe S<sup>\*</sup>-DBACT-1027-a-A-18 (Cy3) (red) specific for NC10 bacteria; a mixture of probes EUB I-III (dark blue), which detected nearly all eubacteria. NC10 bacteria appear purple due to double hybridization with the specific (red) and general (dark blue) probes.

### 4.3 讨论

除接种物和培养基外, DAMO 微生物富集培养过程中还发现甲烷的传质(何翥飞等, 2012)和生物量的流失(Luesken et al., 2011; Kampam et al., 2012)是 DAMO 微生物富集培养两个关键的影响因素。对此, 本实验在传统 SBR 反应器构型的基础上分别设计了 MSALR 和 BR 两种反应器, 前者在运行过程中持续通入甲烷, 强化甲烷的传质, 使 DAMO 微生物能够更充分地获得甲烷完成 DAMO

过程,后者通过在反应器内部添加填料,强化微生物的持留能力,避免过多的生物量的流失。

采用 MSALR、BR 和 SBR 反应器富集培养近 40 天之后,三个反应器的容积氮去除率均有不同程度的提升,MSALR 容积氮去除率的提升幅度最大,较最初提升了 827.10%,BR 次之,较最初提高了 302.92%,而 SBR 仅提高了 154.09%。这表明通过增强甲烷传质及生物量持留均有利于反应器容积氮去除率的提升,通过提升的幅度比较,甲烷传质对于容积氮去除速率的贡献要大于生物量的持留。

同位素分批活性实验表明,MSALR 中的富集培养物具有最高的 DAMO 活性,此结果与 MSALR 容积氮去除率最高相匹配,进一步表明了 MSALR 在 DAMO 微生物的富集培养上具有更好的效果。而从 BR 和 SBR 中富集培养物的 DAMO 活性比对发现,两者的 DAMO 活性差异不明显,而两个反应器的容积氮去除速率存在较为明显的差异,那么 BR 容积氮去除速率比 SBR 高的部分很有可能是其他微生物如反硝化菌的贡献所致。

通过对三种富集培养物的 NC10 门细菌数量的检测发现,MSALR 中的 NC10 门细菌数量最高,这与其最高的容积氮去除率和最高的 DAMO 活性相一致,这些结果共同印证了甲烷传质是 NC10 门细菌生长以及 DAMO 活性提高的关键因素。BR 与 SBR 中 NC10 门细菌的数量要比 MSALR 低 1-2 个数量级,BR 中的 NC10 门细菌数量比 SBR 要高一个数量级,这可能是由于 BR 的生物量持留能力强于 SBR 所致。

16S rRNA 和 *pmoA* 基因系统发育分析表明,三种反应器中获得的 NC10 门细菌的序列相似度与已知 NC10 门细菌的序列相似度的差异均较大,因此富集得到的 NC10 门细菌可能是一种新的菌种。

通过分批实验发现三种富集培养物均存在反硝化现象。此现象表明反应器容积氮去除率的提高并非完全来自于 DAMO 作用的贡献,其中一部分是反硝化作用所致。反应器进水中并未添加有机物,因此反硝化作用所利用的有机物应该来自于反应器内部。在三个反应器的运行过程中发现,三者的出水中均有一定的浊度,检测发现其中含有一定量的多糖与蛋白(胞外多聚物的组成成分),因此,这些有机物质的存在可能是反硝化作用发生的诱因。这些有机物的产生可能有以下几种来源。第一,这些有机物可能来自于非目标微生物因缺乏基质而导致的死亡

裂解(Strous et al., 1997); 第二, 这些有机物可能是反应器内微生物的分泌物。对此, 可通过后续进一步的研究加以确证。

如第二章中所述, 反硝化细菌与 NC10 门细菌存在竞争关系(对  $\text{NO}_2^-$  的竞争), 而反硝化细菌的竞争能力很可能优于 NC10 门细菌。因此, 有必要进一步研究同一体系内反硝化细菌和 NC10 门细菌的竞争关系, 通过一些措施遏制反硝化细菌的生长, 如在基质中添加反硝化菌的抑制剂(Toh et al., 2002), 从而使 DAMO 活性获得进一步的提高。

#### 4.4 结论

1) 三种不同构型的反应装置 MSALR、BR 和 SBR 均具有提高 DAMO 活性的功能, 均能够作为 DAMO 微生物的富集培养装置。经过近一个月的富集培养, 三者的容积氮去除速率分别提高了 827.10%、302.92% 和 154.09%, DAMO 活性分别为  $0.52 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $0.23 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.26 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ;

2) MSALR 具有最高的容积氮去除速率和最大的 DAMO 活性, 因此是三者中最优的富集培养 DAMO 微生物的反应装置。

3) 从甲烷传质和微生物滞留能力两种因素考虑, 前者是 DAMO 微生物富集培养过程中更为关键的限制因素。

---

## 第五章 结论与展望

### 5.1 主要结论

本论文对 DAMO 微生物的富集培养进行了研究, 主要结论如下:

1) 比较了不同接种物富集培养 DAMO 微生物的差异, 得出了 DAMO 富集培养的最优接种物。

①测试了厌氧产甲烷颗粒污泥、农田水稻土壤和淡水河道沉积物作为接种物的可行性, 比较了富集培养过程中 NC10 门细菌数量的变化和 DAMO 活性的差异, 其中富集结束时 NC10 门细菌的数量分别较接种物增加了 63 倍、2909 倍和 198 倍, 获得的富集培养物的 DAMO 活性分别为  $0.06 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $0.15 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ , 表明了三种接种物均适宜作为 DAMO 微生物富集培养的接种物, 扩大了 DAMO 接种物的来源, 为 DAMO 富集培养物的获得提供了新的选择。

②首次利用农田水稻土壤作为接种物成功获得了 DAMO 富集培养物, 活性实验及分子生物学分析结果均表明农田水稻土壤是三者中最优接种物。

2) 比较了天然培养基与人工培养基培养在 DAMO 微生物富集培养效果上的差异, 得出了 DAMO 富集培养的最优培养基。

①比较了天然培养基与人工培养基富集培养 DAMO 微生物的差异, 获得的富集培养物的 DAMO 活性分别为  $0.02 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ , 人工培养基是天然培养基的 5.5 倍; NC10 门细菌的数量分别为  $1.01\times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil) 和  $2.01\times 10^8 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry soil), 后者是前者的两倍, 从而表明了以农田水稻土壤作为接种物, 人工培养基较天然培养基的富集培养效果更好。

②采用农田水稻土壤作为接种物, 以人工培养基培养成功富集到了以 group B 的 NC10 细菌为主导的 DAMO 富集培养物, 首次证明了归属于 group B 的 NC10 细菌同样具有 DAMO 活性。

3) 比较了不同构型反应器富集培养 DAMO 微生物的能力, 得出了 DAMO 富集培养的最优反应器构型。

①比较了三种不同构型的反应器 MSALR、BR 和 SBR 富集培养 DAMO 微生物的差异。经过近一个月的富集培养, 三者的容积氮去除速率分别提高了

827.10%、302.92%和 154.09%，DAMO 活性分别为  $0.52 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ， $0.23 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $0.26 \text{ mgN}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}\cdot\text{h}^{-1}$ ，表明了三种构型装置均具有提高 DAMO 活性的功能，均能够作为 DAMO 微生物的富集培养装置。

②MSALR 具有最高的容积氮去除速率和最大的 DAMO 活性，因此是三者中最优的富集培养 DAMO 微生物的反应装置。

③从甲烷传质和微生物滞留能力两种因素考虑，前者是 DAMO 微生物富集培养过程中更为关键的限制因素。

## 5.2 创新点

1)首次证明了农田水稻土壤适宜作为 DAMO 微生物富集培养的接种物，扩大了 DAMO 接种物的来源，拓展了人们对 DAMO 微生物生境的了解；

2)采用天然培养基成功获得了 DAMO 富集培养物，扩大了 DAMO 微生物培养基来源，并且首次证明了归属于 group B 的 NC10 门细菌具有 DAMO 功能，扩大了 DAMO 微生物的种类与范围；

3)首次证明了甲烷的传质是 DAMO 微生物富集培养的关键因素。

## 5.3 建议和展望

1)本研究获得的富集培养物的 DAMO 活性均偏低，推测氧气有可能是其中的关键影响因素，后续实验有必要研究不同溶解氧的含量对 DAMO 微生物富集培养的影响。

2)本研究表明获得的 DAMO 富集培养物中存在一定的反硝化作用， $\text{NO}_2^-$  是 DAMO 微生物与反硝化微生物都需要的基质，因此两者存在一定的竞争关系。后续研究有必要研究 DAMO 微生物与反硝化微生物相互之间的关系，以期提出更好的 DAMO 微生物富集策略。

## 参考文献

- Ahn, Y.H., Hwang, I.S., Min, K.S. 2004. ANAMMOX and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. *Water Sci Technol*, 49(5-6), 145-153.
- Alperin, M., Hoehler, T. 2010. Biogeochemistry. The ongoing mystery of sea-floor methane. *Science*, 329(5989), 288-289.
- APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. United Book Press, USA.
- Barnes, R.O., Goldberg, E.D. 1976. Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology*, 4, 297-300.
- Beal, E.J., House, C.H., Orphan, V.J. 2009. Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 325(5937), 184-187.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Witte, U., Pfannkuche, O. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623-626.
- Chistoserdova, L., Vorholt, J.A., Lidstrom, M.E. 2005. A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biol*, 6(2), 208.
- Conrad, R. 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep*, 1(5), 285-292.
- Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434-444.
- Davies, T.R. 1973. Isolation of bacteria capable of utilizing methane as a hydrogen donor in the process of denitrification. *Water Res*, 7(4), 575-579.
- Deutzmann, J.S., Schink, B. 2011. Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake. *Appl Environ Microbiol*,



- 77(13), 4429-4436.
- Dong, X., Tollner, E.W. 2003. Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure. *Bioresour Technol*, 86(2), 139-145.
- Eller, G., Kanel, L., Kruger, M. 2005. Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plussee. *Appl Environ Microbiol*, 71(12), 8925-8928.
- Ettwig, K.F. 2010a. Nitrite-dependent methane oxidation. PHD thesis.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S., Strous, M. 2010b. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543-548.
- Ettwig, K.F., Shima, S., van de Pas-Schoonen, K.T., Kahnt, J., Medema, M.H., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Strous, M. 2008. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environ Microbiol*, 10(11), 3164-3173.
- Ettwig, K.F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S., Strous, M. 2009. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl Environ Microbiol*, 75(11), 3656-3662.
- Grossman, E.L., Cifuentes, L.A., Cozzarelli, I.M. 2002. Anaerobic methane oxidation in a landfill-leachate plume. *Environ Sci Technol*, 36(11), 2436-2442.
- Hakemian, A.S., Rosenzweig, A.C. 2007. The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem*, 76, 223-241.
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., DeLong, E.F. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol*, 69(9), 5483-5491.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., DeLong, E.F. 2004. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 305(5689), 1457-1462.

- Hinrichs, K.U., Boetius, A. In *Ocean Margin Systems*; Wefer, G., Billett, D., Hebbeln, D., Jørgensen, B. B., Schluter, M., van Weering, T., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 2002; pp 457-477.
- Hinrichs, K.U., Summons, R. E., Orphan, V., Sylva, S. P., Hayes, J. M. 2000. Molecular and isotopic analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Org Geochem*, 31(12), 1685-1701.
- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B., Martens, C.S. 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Glob. Biogeochem Cycles*, 8, 451-464.
- Hu, B., Rush, D., van der Biezen, E., Zheng, P., van Mullekom, M., Schouten, S., Sinninghe Damste, J.S., Smolders, A.J., Jetten, M.S., Kartal, B. 2011a. New anaerobic, ammonium-oxidizing community enriched from peat soil. *Appl Environ Microbiol*, 77(3), 966-971.
- Hu, B., Shen, L., Du, P., Zheng, P., Xu, X., Zeng, J. 2012. The influence of intense chemical pollution on the community composition, diversity and abundance of anammox bacteria in the Jiaojiang Estuary (China). *PLoS One*, 7(3), e33826.
- Hu, S., Zeng, R.J., Burow, L.C., Lant, P., Keller, J., Yuan, Z. 2009. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. *Environ Microbiol Rep*, 1(5), 377-384.
- Hu, S., Zeng, R.J., Keller, J., Lant, P., Yuan Z. 2011b. Effect of nitrate and nitrite on the selection of microorganisms in the denitrifying anaerobic methane oxidation process. *Environ Microbiol Rep*, 3(3), 315-319.
- Islas-Lima, S., Thalasso, F., Gomez-Hernandez, J. 2004. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Res*, 38(1), 13-16.
- Iversen, N., Jørgensen, B.B. 1985. Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnol Oceanogr*, 30, 944-955.
- Joye, S.B. 2012. Microbiology: A piece of the methane puzzle. *Nature*, 491(7425), 538-539.

- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Roser, A., Koops, H.P., Wagner, M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol*, 64(8), 3042-3051.
- Kampman, C., Hendrickx, T.L., Luesken, F.A., van Alen, T.A., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Zeeman, G., Buisman, C.J., Temmink, H. 2012. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. *J Hazard Mater*, 227-228, 164-171.
- Knittel, K., Boetius, A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol*, 63, 311-334.
- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O., Linke, P., Amann, R. 2003. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiol J*, 20, 269-294.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., Amann, R. 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 467-479.
- Kojima, H., Tsutsumi, M., Ishikawa, K., Iwata, T., Mußmann, M., Fukui, M. 2012. Distribution of putative denitrifying methane oxidizing bacteria in sediment of a freshwater lake, Lake Biwa. *Syst Appl Microbiol*, 35(4), 233-238.
- Kool, D.M., Zhu, B., Rijpstra, W.I., Jetten, M.S., Ettwig, K.F., Sinninghe Damste, J.S. 2012. Rare Branched Fatty Acids Characterize the Lipid Composition of the Intra-Aerobic Methane Oxidizer "*Candidatus Methylospirillum oxyfera*". *Appl Environ Microbiol*, 78(24), 8650-8656.
- Kruger, M., Meyerdierks, A., Glockner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, J., Bocher, R., Thauer, R.K., Shima, S. 2003. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 426(6968), 878-881.

- Kumar, M., Lin, J.G. 2010. Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal--Strategies and issues. *J Hazard Mater*, 178(1-3), 1-9.
- Liesack, W., Schnell, S., Revsbech, N.P. 2000. Microbiology of flooded rice paddies. *Fems Microbiol Rev*, 24(5), 625-645.
- Lösekan, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., Amann, R. 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol*, 73(10), 3348-3362.
- Luesken, F.A., Sanchez, J., van Alen, T.A., Sanabria, J., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Kartal, B. 2011a. Simultaneous nitrite-dependent anaerobic methane and ammonium oxidation processes. *Appl Environ Microbiol*, 77(19), 6802-6807.
- Luesken, F.A., van Alen, T.A., van der Biezen, E., Frijters, C., Toonen, G., Kampman, C., Hendrickx, T.L., Zeeman, G., Temmink, H., Strous, M., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S. 2011b. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92(4), 845-854.
- Luesken, F.A., Zhu, B., van Alen, T.A., Butler, M.K., Diaz, M.R., Song, B., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Ettwig, K.F. 2011c. *PmoA* Primers for detection of anaerobic methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*, 77(11), 3877-3880.
- Luke, C., Frenzel, P. 2011. Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies. *Appl Environ Microbiol*, 77(17), 6305-6309.
- Martens, C.S., Berner, R.A. 1974. Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science*, 185(4157), 1167-1169.
- Mason, I. 1977. Methane as a carbon source in biological denitrification. *Jour Water Poll Control Fed*, 49, 855-857.
- Mayr, S., Latkoczy, C., Kruger, M., Gunther, D., Shima, S., Thauer, R.K., Widdel, F., Jaun, B. 2008. Structure of an F430 variant from archaea associated with anaerobic oxidation of methane. *J Am Chem Soc*, 130(32), 10758-10767.
- McDonald, I.R., Bodrossy, L., Chen, Y., Murrell, J.C. 2008. Molecular ecology

- techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*, 74(5), 1305-1315.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., Knittel, K., Gieseke, A., Peterknecht, K., Pape, T., Boetius, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Widdel, F., Peckmann, J., Pimenov, N.V., Gulin, M.B. 2002. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, 297(5583), 1013-1015.
- Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I., Wagner, M., Widdel, F., Kuypers, M.M. 2012. Zero-valent sulphur is a key intermediate in marine methane oxidation. *Nature*, 491(7425), 541-546.
- Moran, J.J., Beal, E.J., Vrentas, J.M., Orphan, V.J., Freeman, K.H., House, C.H. 2008. Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol*, 10(1), 162-173.
- Murase, J., and M. Kimura. 1994. Methane production and its fate in paddy fields. 6. Anaerobic oxidation of methane in plow layer soil. *Soil Sci Plant Nutr*, 40, 505-514.
- Nakajima, J., Sakka, M., Kimura, T., Furukawa, K., Sakka, K. 2008. Enrichment of anammox bacteria from marine environment for the construction of a bioremediation reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77(5), 1159-1166.
- Nauhaus, K., Boetius, A., Kruger, M., Widdel, F. 2002. In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ Microbiol*, 4(5), 296-305.
- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., Joye, S. B. 2005. Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochim Cosmochim. Acta*, 69 (17), 4267-4281.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F. 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 293(5529), 484-487.

- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., DeLong, E.F. 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7663-7668.
- Pancost, R.D., Sinninghe Damste, J.S., de Lint, S., van der Maarel, M.J., Gottschal, J.C. 2000. Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. The Medinaut Shipboard Scientific Party. *Appl Environ Microbiol*, 66(3), 1126-1132.
- Pernthaler, A., Dekas, A.E., Brown, C.T., Goffredi, S.K., Embaye, T., Orphan, V.J. 2008. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(19), 7052-7057.
- Raghoebarsing, A.A. 2006. New directions in microbial methane oxidation. PHD thesis.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I., Schouten, S., Damste, J.S., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Strous, M. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440(7086), 918-921.
- Rappe, M.S., Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*, 57, 369-394.
- Reeburgh, W.S. 1976. Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth Planet Sci Lett*, 28, 337-344.
- Reeburgh, W.S. 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev*, 107(2), 486-513.
- Reitner, J., Peckmann, J., Blumenberg, M., Michaelis, W., Reimer, A., Thiel, V. 2005. Concretionary methane seep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaeogeogr Palaeoclimatol*, 227, 18-30.
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R.K., Jaun, B. 2010. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 465(7298), 606-608.

- Schloss, P.D., Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol*, 71(3), 1501-1506.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Schleifer, K.H., Wagner, M. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol*, 23(1), 93-106.
- Shima, S., Thauer, R.K. 2005. Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Curr Opin Microbiol*, 8(6), 643-648.
- Shindell, D.T., Faluvegi, G., Koch, D.M., Schmidt, G.A., Unger, N., Bauer, S.E. 2009. Improved attribution of climate forcing to emissions. *Science*, 326(5953), 716-718.
- Smemo, K. A., Yavitt J. B. 2007. Evidence for anaerobic CH<sub>4</sub> oxidation in freshwater peatlands. *Geomicrobiol J*, 24,583-597.
- Smith, R.L., Howes, B.L., Garabedian, S.P. 1991. In situ measurement of methane oxidation in groundwater by using natural-gradient tracer tests. *Appl Environ Microbiol*, 57(7), 1997-2004.
- Sollo, F.W., Jr., Mueller, H.F., Larson, T.E. 1976. Denitrification of wastewater effluents with methane. *Jour Water Poll Control Fed*, 48 (7), 1840-1842.
- Strous, M., Gerven, E.V., Zheng, P., J. Kuenen, G., Jetten, M.S.M. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Res*, 31(8), 1955-1962.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24(8), 1596-1599.
- Thiel, V., Peckmann, J., Seifert, R., Wehrung, P., Reitner, J., Michaelis, W. 1999. Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting-occurrence and ecology. *Geochim Cosmochim Acta*, 63,

- 3959-3966.
- Toh, S.K., Webb, R.I., Ashbolt, N.J. 2002. Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microb Ecol*, 43(1), 154-167.
- Treude, T., Krüger, M., Boetius, A., and Jørgensen, B.B. 2005. Environmental control on anaerobic oxidation of methane in the gassy sediments of Eckernförde Bay (German Baltic). *Limnol Oceanogr*, 50, 1771-1786.
- Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C.H., Boetius, A. 2007. Consumption of methane and CO<sub>2</sub> by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea. *Appl Environ Microbiol*, 73(7), 2271-2283.
- Valentine, D.L., Reeburgh, W.S. 2000. New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environ Microbiol*, 2(5), 477-484.
- van de Vossenberg, J., Rattray, J.E., Geerts, W., Kartal, B., van Niftrik, L., van Donselaar, E.G., Sinninghe Damste, J.S., Strous, M., Jetten, M.S. 2008. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. *Environ Microbiol*, 10(11), 3120-3129.
- Wang, Y., Zhu, G., Harhangi, H.R., Zhu, B., Jetten, M.S., Yin, C., Op den Camp, H.J. 2012. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil. *Fems Microbiol Lett*, 336(2), 79-88.
- Wankel, S.D., Adams, M.M., Johnston, D.T., Hansel, C.M., Joye, S.B., Girguis, P.R. 2012. Anaerobic methane oxidation in metalliferous hydrothermal sediments: influence on carbon flux and decoupling from sulfate reduction. *Environ Microbiol*, 14(10), 2726-2740.
- Wu, M.L., de Vries, S., van Alen, T.A., Butler, M.K., Op den Camp, H.J., Keltjens, J.T., Jetten, M.S., Strous, M. 2011a. Physiological role of the respiratory quinol oxidase in the anaerobic nitrite-reducing methanotroph '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*'. *Microbiology*, 157(Pt 3), 890-898.
- Wu, M.L., Ettwig, K.F., Jetten, M.S., Strous, M., Keltjens, J.T., van Niftrik, L. 2011b. A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic



- methane-oxidizing bacterium '*Candidatus Methylomirabilis oxyfera*'. *Biochem Soc Trans*, 39(1), 243-248.
- Wu, M.L., van Alen, T.A., van Donselaar, E.G., Strous, M., Jetten, M.S., van Niftrik, L. 2012. Co-localization of particulate methane monooxygenase and cd(1) nitrite reductase in the denitrifying methanotroph '*Candidatus Methylomirabilis oxyfera*'. *Fems Microbiol Lett*, 334, 49-56.
- Wu, M.L., van Teeseling, M.C., Willems, M.J., van Donselaar, E.G., Klingl, A., Rachel, R., Geerts, W.J., Jetten, M.S., Strous, M., van Niftrik, L. 2012b. Ultrastructure of the denitrifying methanotroph '*Candidatus Methylomirabilis oxyfera*', a novel polygon-shaped bacterium. *J Bacteriol*, 194(2), 284-291.
- Zehnder, A.J., Brock, T.D. 1980. Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Appl Environ Microbiol*, 39(1), 194-204.
- Zehnder, A.J., Brock, T.D. 1979. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol*, 137(1), 420-432.
- Zhu, B., Sanchez, J., van Alen, T.A., Sanabria, J., Jetten, M.S., Ettwig, K.F., Kartal, B. 2011. Combined anaerobic ammonium and methane oxidation for nitrogen and methane removal. *Biochem Soc Trans*, 39(6), 1822-1825.
- Zhu, B., van Dijk, G., Fritz, C., Smolders, A.J., Pol, A., Jetten, M.S., Ettwig, K.F. 2012. Anaerobic oxidization of methane in a minerotrophic peatland: enrichment of nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 78(24), 8657-8665.
- 何鹏飞, 蔡琛, 沈李东, 徐向阳, 郑平, 胡宝兰. 2012. DAMO 过程中甲烷传质模型的建立与验证. *化工学报*, 63(6), 1836-1841.
- 沈李东, 胡宝兰, 郑平. 2011. 甲烷厌氧氧化微生物的研究进展. *土壤学报*, 48(3), 619-628.

## 个人简历

蔡琛，男，浙江临安人。2010年6月毕业于中南大学冶金科学与工程学院环境工程专业，2010年9月至今就读于浙江大学环境与资源学院环境工程专业，研究方向为反硝化型甲烷厌氧氧化。硕士期间参与了国家自然科学基金项目1项，主持完成浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目1项。

## 硕士阶段取得的科研成果

### 论文

1. 何鹏飞, **蔡琛**, 沈李东, 徐向阳, 郑平, 胡宝兰\*. 2012. DAMO 过程中甲烷传质模型的建立与验证. *化工学报*, 63(6), 1836-1841. (EI 收录)
2. Hu Bao-lan, Shen Li-dong, Liu Shuai, **Cai Chen**, Chen Ting-ting, Boran Kartal, Harry R. Harhangi, Huub J.M. Op den Camp, Lou Li-ping, Xu Xiang-yang, Zheng Ping\*, Mike S.M. Jetten\*. 2013. Enrichment of an anammox bacterial community from a flooded paddy soil. *Environmental Microbiology Reports*. Accepted. (SCI, IF=3.232)
3. Hu Bao-lan, Shen Li-dong, Zheng Ping, Hu An-hui, Chen Ting-ting, **Cai Chen**, Liu Shuai, Lou Li-ping\*. 2012. Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in the sediments of the Qiantang River. *Environmental Microbiology Reports*, 4(5), 540-547. (SCI, IF=3.232)
4. **Cai Chen**, He Zhan-fei, Shen Li-dong, Lou Li-ping, Zheng Ping, Hu Bao-lan\*. 2013. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microorganisms with different media. *Journal of Hazardous Materials*. Submitted. (SCI, IF=4.173)
5. Hu Bao-lan, **Cai Chen**, Shen Li-dong, He Zhan-fei, Zheng Ping, Lou Li-ping\*. 2013. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microorganisms from three distinct inocula. *Bioresource Technology*. Submitted. (SCI, IF=4.980)
6. He Zhan-fei, **Cai Chen**, Geng Sha, Lou Li-ping, Xu Xiang-yang, Zheng Ping, Hu Bao-lan\*. 2013. A concise model of the nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process associated the heterotrophic bacteria. *Chemical Engineering Journal*. Under review. (SCI, IF=3.461)
7. Hu Bao-lan, Shen Li-dong, Zhu Qun, Liu Shuai, Li Xiao-yu, **Cai Chen**, He Zhan-fei, Chen Dong-qing, Xu Xiang-yang, Zheng Ping, Lou Li-ping\*. 2013. Distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria in the sediments of the Qiantang River. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Submitted. (SCI, IF=3.425)

8. Zhang Ji-qiang, Zheng Ping\*, Xing Ya-juan, Zhang Meng, Li Wei, Xie Zuo-fu, Cai Jing, **Cai Chen**, Ghulam Abbas. 2013. Performance and mechanism of an anodic denitrification microbial fuel cell with multifunction. *Biosensors and Bioelectronics*.

Under review. (SCI, IF=5.602)

9. 张吉强, 郑平\*, 张萌, 厉巍, 陈慧, **蔡琛**, 谢作甫. 2013. 反硝化微生物燃料电池脱氮产电性能及其机理的研究. *化工学报*. 提交. (EI 收录)

10. **蔡琛**, 何焜飞, 沈李东, 刘帅, 郑平, 徐向阳, 胡宝兰\*. 2011. 不同来源接种物富集 DAMO 微生物的比较研究. *第十四次全国环境微生物学术研讨会*. 中国厦门.

11. 何焜飞, **蔡琛**, 沈李东, 徐向阳, 郑平, 胡宝兰\*. 2011. 甲烷对 DAMO 微生物富集培养的影响研究. *第六届全国环境化学大会*. 中国上海.

## 专利

1. 胡宝兰, **蔡琛**, 沈李东, 郑平, 刘帅, 叶天强. 一种基于自动化控制的反硝化型甲烷厌氧氧化菌富集系统. *实用新型专利*, 专利号: ZL201120030805.2.

2. 胡宝兰, 何焜飞, **蔡琛**, 沈李东, 楼莉萍, 郑平, 刘帅. 外置式甲烷无泡曝气生物膜反硝化型甲烷厌氧氧化菌富集装置及方法. *发明专利*, 专利号: ZL201110443608.8.

3. 胡宝兰, 何焜飞, **蔡琛**, 沈李东, 楼莉萍, 郑平, 刘帅. 一种基于自动化控制的浆降式持气内循环反硝化型甲烷厌氧氧化反应器. *实用新型专利*, 专利号: ZL201120424351.7.

4. 胡宝兰, 何焜飞, **蔡琛**, 沈李东, 楼莉萍, 郑平, 刘帅. 外置式甲烷无泡曝气生物膜反硝化型甲烷厌氧氧化菌富集装置. *实用新型专利*, 专利号: ZL201120553744.8.

5. 胡宝兰, 沈李东, 叶天强, 郑平, **蔡琛**, 刘帅. 一种好氧/厌氧一体化沼气安全生物脱硫装置. *实用新型专利*, 专利号: ZL201020513151.4.

6. 胡宝兰, 沈李东, 叶天强, 郑平, 陆慧峰, 陈小光, **蔡琛**. 甲烷、硫化氢和氧气含量检测的沼气脱硫自动化控制系统及方法. *发明专利*, 专利号:

ZL201010256140.7.

7. 胡宝兰, 沈李东, 叶天强, 郑平, 陆慧峰, 陈小光, 蔡琛. 甲烷、硫化氢和氧气含量检测的沼气脱硫自动化控制系统. 实用新型专利, 专利号: ZL201020295573.9.

8. 胡宝兰, 沈李东, 叶天强, 郑平, 陆慧峰, 陈小光, 蔡琛. 一种一体式沼气生物脱硫装置. 实用新型专利, 专利号: ZL201020289228.4.