

中空纤维膜生物反应器富集反硝化厌氧甲烷氧化菌群的研究

钱祝胜¹, 付亮², 丁静², 丁兆威¹, 曾建雄^{1,2}

(1. 中国科学技术大学地球和空间科学学院, 安徽合肥 230026; 2. 中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要:反硝化厌氧甲烷氧化(DAMO)过程可以由一种称为 *Methyloirabilis oxyfera* 的 DAMO 细菌在有或者没有 DAMO 古菌下完成. 已经报道的 DAMO 过程的菌群富集时间长(一般需要 7~18 月),且 DAMO 体系反硝化速率低. 利用中空纤维膜生物反应器(HFMB)提高甲烷的传质来试图实现快速启动 DAMO 反应,结果发现 HFMB 在不到 3 个月时间内就表现出 DAMO 反应,其反硝化速率达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 硝酸盐氮. 二代测序显示, HFMB 中微生物以 *Anaerolineaceae*, *Azospira*, CL500-3 占绝对优势,分别为 39.08%, 13.68% 和 11.54%,而 DAMO 细菌 (*Methyloirabilis*)和与厌氧甲烷氧化有关的古菌 *Methanosarcina* 分别占 0.02% 和 0.13%,因此推测在 HFMB 中 DAMO 过程是由一群新的菌群主导完成.

关键词:硝酸盐;厌氧甲烷氧化;中空纤维膜反应器;快速富集

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **doi:**10.3969/j.issn.0253-2778.2014.11.002

引用格式: Qian Zhusheng, Fu Liang, Ding Jing, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microbes in a hollow fiber membrane bioreactor[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2014,44(11):887-892.

钱祝胜,付亮,丁静,等. 中空纤维膜生物反应器富集反硝化厌氧甲烷氧化菌群的研究[J]. 中国科学技术大学学报,2014,44(11):887-892.

Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidation microbes in a hollow fiber membrane bioreactor

QIAN Zhusheng¹, FU Liang², DING Jing², DING Zhaowei¹, Raymond J Zeng^{1,2}

(1. School of Earth and Space Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: The process of denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) can be catalyzed by DAMO bacteria called *Methyloirabilis oxyfera* with or without the involvement of DAMO archaea. Enrichment of DAMO microbes often takes a long time (7~18 months) to show a faint denitrification function in reported DAMO process. This study aimed to fast enrich DAMO microbes in a hollow fiber membrane bioreactor (HFMB) as the special structure of hollow fiber can increase the mass transfer of methane. It is found that HFMB shows DAMO activity in a shorter period of time (<3 months) and the denitrification

收稿日期:2014-06-26;修回日期:2014-09-04

基金项目:国家自然科学基金(51178444)资助.

作者简介:钱祝胜,男,1986年生,硕士生.研究方向:反硝化甲烷厌氧氧化. E-mail: qzsh@mail.ustc.edu.cn

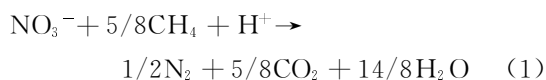
通讯作者:曾建雄,博士/教授. E-mail: rzeng@ustc.edu.cn

rate reaches $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \text{ NO}_3^- \text{-N}$. The next-generation DNA sequencing on the microbes in HFMB shows that *Anaerolineaceae*, *Azospira*, CL500-3 are dominant with 39.08%, 13.68% and 11.54% of the total microbes, respectively. Meanwhile, *Methylomirabilis* (DAMO bacteria) and *Methanosarcina* (DAMO archaea) are only 0.02% and 0.13%, respectively. It is speculated therefore that the DAMO process in HFMB may have been catalyzed by other microbes that are different from the known DAMO microbes.

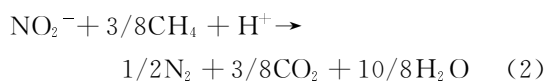
Key words: nitrate; denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO); hollow fiber membrane bioreactor; fast enrichment

0 引言

甲烷是一种燃料,在自然界主要以可燃冰的形式储存在海底,其储量是石油的 2 倍^[1-2];同时甲烷也是温室气体,其温室效应大概是二氧化碳的 25 倍^[3-4].海底甲烷的融释会加剧地球的温室效应,但 90%的融释甲烷在未遇到氧气前就被厌氧微生物引起的硫酸盐还原厌氧甲烷氧化过程(sulphate-reducing anaerobic methane oxidation, SAMO)氧化掉,参与该过程的微生物主要是甲烷厌氧氧化古菌和硫酸盐还原菌^[1-2,5].最近,Islas-Lima 等^[6]发现一种称之为 DAMO 的甲烷厌氧氧化耦合反硝化的过程式(1),



接着, Raghoebarsing 等^[7]发现 DAMO 过程是由 DAMO 古菌(10%) 和 *Methylomirabilis oxyfera* (*M. oxyfera*)(80%)共同完成的. Ettwig 等^[8]在以亚硝酸盐为底物的 DAMO 富集中发现, *M. oxyfera*可以在没有古菌的条件下单独完成 DAMO 过程式(2),



Hu 等^[9]则提出了古菌在硝酸盐为底物的 DAMO 中起到一定的作用. Haroon 等^[10]发现 DAMO 古菌主要是负责硝酸盐到亚硝酸盐的还原过程.

尽管 DAMO 过程在实验室条件下成功地观察到,但是该过程往往需要经过长时间的富集才能够启动.首先,由于该菌群对富集条件要求苛刻,因此倍增时间长,难以纯培养;其次,甲烷在水中溶解度低(298 K 溶解度为 $2.05 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)^[11].而在已报道的实验室研究中,甲烷是直接鼓吹到反应器中,由于甲烷的传质效率低,这种操作所消耗的能量较大,这也在一定程度上限制了对

DAMO 的研究.中空纤维膜可以增加甲烷的传质性能,附着在纤维膜上的微生物可以直接利用从纤维膜中传递过来的甲烷,从而避免甲烷在水中溶解度低的缺陷.实际上,中空纤维膜已经成功地应用于传递氢气进行反硝化过程^[12-14].

本研究中,我们试图用中空纤维膜生物反应器(hollow fiber membrane bioreactor, HFMB)快速富集 DAMO 菌群,并利用二代高通量测序分析反应器中参与 DAMO 过程的微生物组成.

1 材料与方法

1.1 HFMB 的结构和运行条件

图 1 表示 HFMB 系统装置示意图. HFMB 由有机玻璃制成的反应罐和内置中空纤维膜(PE 材料,孔径 $0.2 \sim 0.3 \mu\text{m}$,购自苏州汇龙膜技术发展有限公司)组成,总体积为 950 mL,顶空 200 mL,纤维膜总外表面积与反应器总体积之比为 103 m^{-1} .膜丝的一端是堵死的,甲烷气体由钢瓶出来直接接在进气口上,进气压力通过稳压阀控制在 0.15 MPa 左右,未反应和反应产生的气体通过排气口排出.反应器外部循环上接有在线 pH 计,用来在线检测 HFMB 内 pH 的变化,夹层是水浴保温层连接水浴锅(温度设置在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$).接种底泥采自长江流域苏州独墅湖($31^\circ 16' 37.66''\text{N}$, $120^\circ 43' 32.07''\text{E}$),过筛获取小于 $50 \mu\text{m}$ 的均匀泥浆,接种的挥发性悬浮固体(MLVSS)的浓度为 $2.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

HFMB 在开始阶段以序批式培养模式运行,1 个循环包括:进水 10~15 min、反应 10 d、排水 5~10 min,每次所更换的培养基是 HFMB 体积的 2/3.整个操作都在厌氧条件下完成,培养基参照 Ettwig 等^[8]的描述且灭菌处理,20 d 后微生物很好地附着在膜丝上, HFMB 中液相清澈. HFMB 运行至 80 d 时,用氩保气(Ar/CO_2 , 体积比 94:6)吹下微生物用于批次实验,同时将 HFMB 运行模式改成

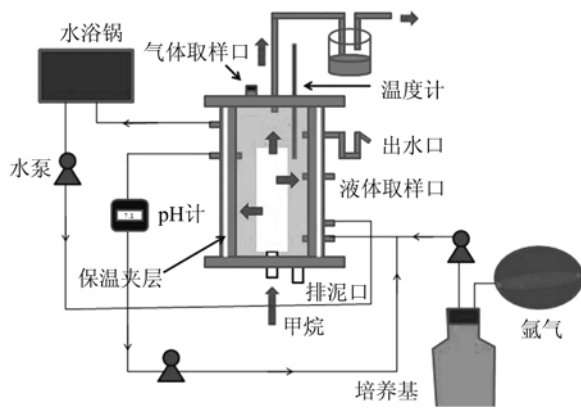


图 1 中空纤维膜生物反应器系统装置示意图
Fig. 1 Schematic drawing of HFMB system

连续流式继续运行. 整个实验中, pH 的变化幅度在 7.05~8.30 之间, 温度在 35 °C, 整个反应器都用双层铝箔纸包住以控制在黑暗的环境下.

1.2 批次实验

为了证明 HFMB 中的反硝化耦合甲烷厌氧氧化, 在第 80 d 的时候取反应器吹下的微生物于 60 mL 小瓶中培养, 生物量浓度 (MLVSS) 为 0.58 g · L⁻¹, 设置小瓶气液相比为 1 : 2. 批次实验分为对照组和实验组, 实验组中给甲烷而对照组不给甲烷, 提供的硝酸盐氮的初始浓度约为 30 mg · L⁻¹, 所用培养基与 HFMB 相同. 为了供应充足的甲烷和保持厌氧环境, 用氩保气 (Ar/CO₂ 94 : 6) 对小瓶曝气 25 min, 再用 CH₄-CO₂ 混合气体 (体积比 96 : 4) 继续曝气 15 min. 密封后再注入 3 mL 的甲烷气体来维持瓶子过压, 小瓶中甲烷初始含量约为 1.05 ~ 1.1 mmol. 用两层铝箔纸包住小瓶以确保小瓶处在黑暗

的环境, 最后将小瓶放在 35 °C 的摇床中进行培养, 每隔 2~3 d 取样并测量.

1.3 化学分析方法

氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐分析采用基于分光光度法的水质分析仪 (Aquakam 200, Thermo); MLVSS 的测定是先将样品在 105 °C 下干燥 24 h, 然后在 600 °C 下燃烧 2 h, 再根据标准计算方法^[15] 计算; 批次实验中甲烷的测定采用福立气相色谱 9790 (热导检测器, 80 °C), 气液相总甲烷的含量是依据顶空中甲烷的测定浓度和亨利定律计算溶解甲烷浓度求得^[16].

1.4 微生物学分析

HFMB 运行结束后, 总 DNA 提取使用 UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit 试剂盒 (MOBIO, 美国), DNA 质量、浓度和完整度由紫外微量分光光度计 (UV trace spectrophotometer) 和琼脂糖凝胶电泳检测. DNA 送去上海生工生物工程股份有限公司做二代测序. PCR 所用的引物融合 Miseq 测序平台的通用引物 (融合 F 引物: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG + BACODE + PRIME F (AAACTYAAADGAATTG ARGG); 融合 R 引物: CCTCTCTATGGGCAGTC GGTGAT + PRIME R (ACGGCGGTGWGTRC)). PCR 产物采用生工琼脂糖回收试剂盒 (cat: SK8131) 进行回收, 最后在 Roche 454 (GS FLX Titanium System) 平台进行测序. 测序数据首先通过 barcode 区分样品序列, 并对各样本序列做 QC (quality control), 接着去除非靶区域序列及嵌合体, 采用 RDP 数据库 (RDP classifier) 将序列进行物

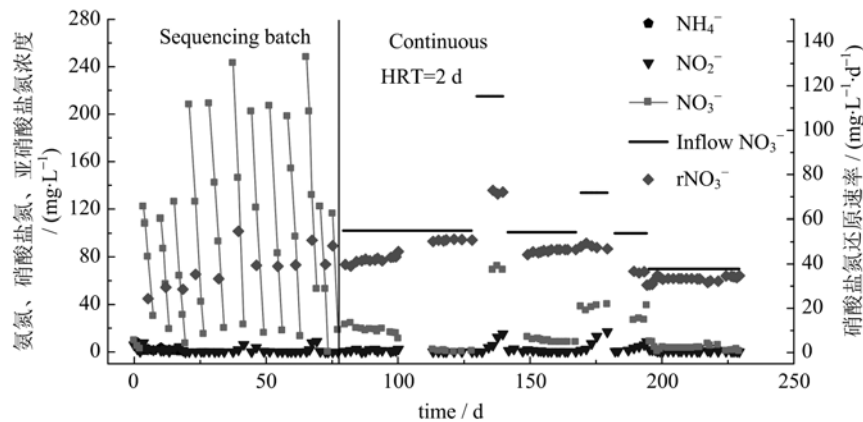


图 2 HFMB 运行中氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮的浓度和硝酸盐氮还原率的变化
Fig. 2 The profiles of the nitrate reduction rate, and the concentrations of ammonium, nitrite and nitrate during HFMB operation

种分类和丰度计算^[17-19].

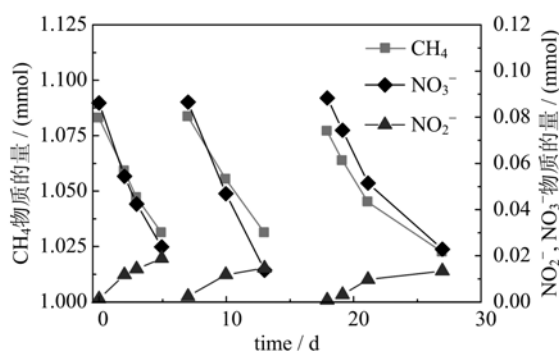
2 结果

2.1 HFMB 的运行结果

图 2 表示 HFMB 运行中氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐降解速率的变化. 第一次添加硝酸盐至硝酸盐氮初始浓度 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 硝酸盐氮还原速率就达到了 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 运行至 1 个月, 硝酸盐氮还原速率达到 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 运行至 50~75 d, 硝酸盐氮的还原速率达到 $40 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (没有明显的亚硝酸盐积累). 第 76 d, HFMB 的运行方式改为连续流方式进行 (进水硝酸盐氮浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 水力停留时间 (HRT) 为 2 d). 运行至 110 d, 硝酸盐氮还原速率恢复到约 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 在第 130 d 和第 170 d 时, 为了提高硝酸盐氮还原速率, 提高了进水硝酸盐的浓度, 可是结果导致了亚硝酸盐氮累积到 $17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (亚硝酸盐氮超过 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对微生物具有毒害作用), 硝酸盐氮还原速率从 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 降到 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 而后即使及时将 HFMB 中高亚硝酸盐培养基置换出来, 但亚硝酸盐抑制所导致的反硝化速率的下降是无法完全恢复的, 这也导致 200 d 后的硝酸盐氮还原速率只有 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

2.2 批次实验结果

批次实验对照组中硝酸盐的浓度几乎没有变化, 而实验组中 3 次批次实验都显示了硝酸盐和甲烷浓度的明显下降, 证实的确发生了 DAMO 过程 (图 3). 以 81~86 d 的数据为例, 线性回归计算求得, $7 \mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$ 甲烷氧化耦合了 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$



甲烷含量是气相和液相的总体含量
图 3 批次实验组中甲烷、硝酸盐和亚硝酸盐物质的量变化曲线

Fig. 3 The mass profiles of methane, nitrate and nitrite in the batch test

硝酸盐的还原, 同时积累了 $3.5 \mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$ 亚硝酸盐. 依据式(1)和式(2)的化学计量系数, 可从亚硝酸盐和硝酸盐的数据计算出甲烷的氧化速率为 $6.6 \mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$, 该数值相比测量值 ($7 \mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1}$) 高出 5.7%, 说明数据测量是比较精确的.

2.3 微生物组成

原始数据在 QC 之后得到 22 940 个序列, 平均序列长度为 454, 通过 Mothur 软件的 Pre. cluster 功能校正测序错误和 Uchime 功能去除序列中的嵌合体后, 最终得到 22 298 个序列. RDP classifier 分类如图 4 所示, HFMB 中的富集物在门 (phylum) 水平上占绝对优势的菌群是绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*), 分别为 43.72%, 18.18%, 14.95%; 其余是绿菌门 (*Chlorobi*, 4.19%)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*, 4.74%)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 3.73%), 脱铁杆菌门 (*Deferribacteres*, 2.26%), 而硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*) 和广古菌门 (*Euryarchaeota*) 分别只有 1.59% 和 0.13%. 如图 5 所示, 该富集物在属 (genus) 水平上以厌氧绳菌科 (*Anaerolineaceae*), *Azospira*, CL500-3 占有优势, 分别为 39.08%, 13.68%, 11.54%, 而 DAMO 细菌 (*M. oxyfera*) 和与厌氧甲烷氧化有关的古菌 (*Methanosarcina*) 仅占 0.02% 和 0.13%, 通过 Silva 数据库查询到这些微生物都是尚未纯培养的. 结合 phylum 分布和 Silva 数据库得到, 96% 的 *Chloroflexi* 是 *Anaerolineaceae*; 75% 的 *Proteobacteria* 是 *Azospira*, 25% 的 *Proteobacteria* 是 *Desulfurellaceae*; 70% 的 *Planctomycetes* 是 CL500-3, 30% 的 *Planctomycetes* 是 SM1A02.

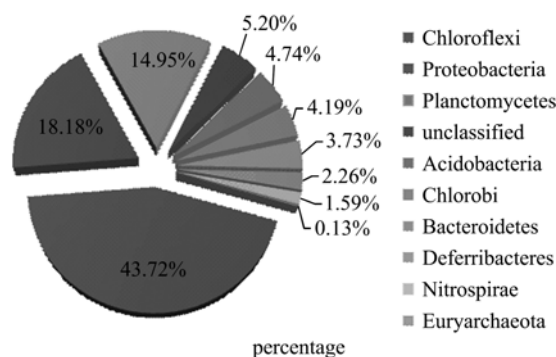


图 4 HFMB 中的微生物在 phylum 水平上的菌群分布
Fig. 4 Microbial distribution of the HFMB cultures at the phylum level

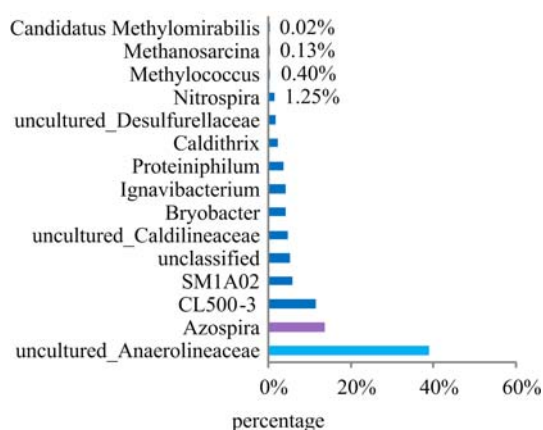


图 5 HFMB 中的微生物在 genus 水平上菌群分布

Fig. 5 Microbial distribution of the HFMB cultures in the genus level

3 讨论

本次研究结果显示, HFMB 在以甲烷为唯一外源电子供体的条件下, 在不到 3 个月的时间内就成功地富集到 DAMO 菌群, 反硝化速率达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 硝酸盐氮。相比之下, Ettwig 等^[20]以亚硝酸盐为底物的 DAMO 富集经过 18 个月才表现明显的活性, 亚硝酸盐氮还原速率不到 $10 \text{ mmol} \cdot \text{d}^{-1}$ (约 $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 液相体积 10 L)。Hu 等^[9]以硝酸盐为底物的 DAMO 富集用时 7 个月才表现出活性, 硝酸盐氮还原速率最高为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (约 $28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。这皆归功于 HFMB 的中空纤维膜: 一方面其为 DAMO 微生物提供载体, 使得反应器中的 DAMO 微生物全附着在中空纤维膜外表面; 另一方面其使附着在纤维膜外表面的 DAMO 微生物可以直接利用从纤维膜孔中传递过来的甲烷, 克服了传统反应器 DAMO 微生物悬浮在液体中而甲烷在水中溶解度低的缺陷, 从而增强了甲烷的传质性能。

当外加的硝酸盐过负载时就出现亚硝酸盐的积累。在第 140 d 亚硝酸盐氮累积到 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 硝酸盐氮还原速率从第 140 d 的 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 降到第 200 d 的 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (图 2), 这表明硝酸盐是经由亚硝酸盐还原成氮气的, 同时亚硝酸盐可能对 DAMO 菌群活性有抑制, 这和 Hu 等^[21]的研究结论相同。

二代测序结果显示, HFMB 富集的优势菌群为 *Anaerolineaceae*, *Azospira*, CL500-3 (这些都是尚未纯培养的微生物), 而 DAMO 细菌

(*Methyloirabilis*) 和与甲烷氧化有关的古菌 (*Methanosarcina*) 含量极少。已报道 DAMO 富集物因电子受体不同出现不同微生物, 以亚硝酸盐为电子受体时, DAMO 微生物以 *Methyloirabilis oxyfera* 为主要组成^[7,21], 以硝酸盐为电子受体时, DAMO 微生物以 DAMO-古菌和 *Methyloirabilis oxyfra* 为主要组成^[8-9], 这些微生物可以代谢 DAMO 过程是毋庸置疑的。这里基于批次实验的研究结果表明, 来自 HFMB 中的微生物是能够代谢过程 (1) 和 (2) (即 DAMO 过程) 的, 因此可以说 HFMB 中发生的 DAMO 过程很有可能是由一群不同于已有报道的新的微生物完成的, 至于其代谢机理仍然需要进一步研究。

4 结论

本研究通过 HFMB 的菌群富集快速启动了 DAMO 过程 (<3 个月), 且在一定程度上提高了反硝化速率 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 硝酸盐氮)。菌群分析发现, 已报道的 DAMO 菌群只占 HFMB 富集菌群的不到 1%, 预示可能有未报道的菌群能完成 DAMO 过程。

参考文献 (References)

- [1] Judd A G, Hovland M, Dimitrov L I, et al. The geological methane budget at continental margins and its influence on climate change[J]. *Geofluids*, 2002, 2(2): 109-126.
- [2] Niewöhner C, Hensen C, Kasten S, et al. Deep sulfate reduction completely mediated by anaerobic methane oxidation in sediments of the upwelling area off Namibia[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1998, 62(3): 455-464.
- [3] Cicerone R J, Oremland R S. Biogeochemical aspects of atmospheric methane [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1988, 2(4): 299-327.
- [4] Caldwell S L, Laidler J R, Brewer E A, et al. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms [J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(18): 6 791-6 799.
- [5] Reeburgh W S. Oceanic methane biogeochemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2): 486-513.
- [6] Islas-Lima S, Thalasso F, Gomez-Hernandez J. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification[J]. *Water Research*, 2004, 38 (1): 13-6.

- [7] Raghoebarsing A A, Pol A, van de Pas-Schoonen K T, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 918-921.
- [8] Ettwig K F, van Alen T, van de Pas-Schoonen K T, et al. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(11): 3 656-3 662.
- [9] Hu S, Zeng R J, Burow L C, et al. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(5):377-384.
- [10] Haroon M F, Hu S, Shi Y, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage [J]. *Nature*, 2013, 500 (7464): 567-570.
- [11] Stumm W, Morgan J. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- [12] Lee K, Rittmann B. A novel hollow-fibre membrane biofilm reactor for autohydrogenotrophicdenitrification of drinking water[J]. *Water Science and Technology*, 2000, 41(4/5): 219-226.
- [13] Lee K C, Rittmann B E. Applying a novel autohydrogenotrophic hollow-fiber membrane biofilm reactor for denitrification of drinking water[J]. *Water Research*, 2002, 36(8): 2 040-2 052.
- [14] Terada A, Kaku S, Matsumoto S, et al. Rapid autohydrogenotrophic denitrification by a membrane biofilm reactor equipped with a fibrous support around a gas-permeable membrane [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 31(1): 84-91.
- [15] Laguna A, Ouattara A, Gonzalez R, et al. A simple and low cost technique for determining the granulometry of upflow anaerobic sludge blanket reactor sludge [J]. *Water Science and Technology*, 1999, 40(8): 1-8.
- [16] Wilhelm E, Battino R, Wilcock R J. Low-pressure solubility of gases in liquid water [J]. *Chemical Reviews*, 1977, 77(2): 219-262.
- [17] Li S, Chou H H. LUCY2: An interactive DNA sequence quality trimming and vector removal tool[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(16): 2 865-2 866.
- [18] Cole J R, Chai B, Farris R J, et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: D169-D172; doi: 10. 1093/nar/gkl889.
- [19] McDonald D, Price M N, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea[J]. *The ISME Journal*, 2011, 6(3): 610-618.
- [20] Ettwig K F, Shima S, van de Pas-Schoonen K T, et al. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3 164-3 173.
- [21] Hu S, Zeng R J, Keller J, et al. Effect of nitrate and nitrite on the selection of microorganisms in the denitrifying anaerobic methane oxidation process[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3 (3): 315-319.