

异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能研究

何霞, 赵彬, 吕剑, 何义亮*, 靳强, 张文英

(上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要:研究了异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 的脱氮性能. 结果表明, *Bacillus* sp. LY 是 1 株具有脱氮能力的异养硝化细菌. 在 NH_4^+ -N 浓度分别为 40、80 和 120 mg/L 3 种情况下, 120 h 反应后, 氨氮的去除率分别是 100%、85.7%、73.7%, 总氮的去除率分别是 76.6%、53.4%、64.8%, 在菌液初始浓度相同的情况下, 随着 NH_4^+ -N 浓度的增加, 细菌的硝化速率以及脱氮速率呈现下降的趋势. 有机物浓度是影响 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能的重要因素, 低的有机物浓度会阻碍细菌脱氮性能的发挥, 中的有机物浓度会促进细菌脱氮性能的发挥, 使体系的脱氮效果达到最佳, 高的有机物浓度并不能再次提升细菌的脱氮性能. 在 *Bacillus* sp. LY 作用下, 有机氮经过氨化作用生成氨氮, 通过 2 条可能的途径转化为氮气. 1 条途径是氨氮先硝化生成亚硝酸盐与硝酸盐, 然后反硝化生成氮气. 另 1 条途径是氨氮被氧化生成羟胺, 然后脱氢生成氧化亚氮并进一步转化为氮气. 这些研究可为开发新型高效生物脱氮工艺提供参考.

关键词: 异养硝化; *Bacillus* sp. LY; 脱氮; 有机物浓度; 途径

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)06-1404-05

Nitrogen Removal by *Bacillus* sp. LY with Heterotrophic Nitrification Ability

HE Xia, ZHAO Bin, LÜ Jian, HE Yi-liang, JIN Qiang, ZHANG Wen-ying

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *Bacillus* sp. LY has the ability of nitrogen removal. Under the NH_4^+ -N load of 40, 80 and 120 mg/L, after 120 hours culture, the NH_4^+ -N removal rate finally was 100%, 85.7%, 73.7%, and the removal rate of TN finally was 76.6%, 53.4%, 64.8%. As the concentration of ammonium improved, the rate of nitrification and the nitrogen removal would decrease under the same concentration of *Bacillus* sp. LY at the beginning. The concentration of organic material played an important role in the nitrogen removal by *Bacillus* sp. LY. The low concentration of organic material inhibited the ability of nitrogen removal, and the middle concentration of organic material enhanced its ability of nitrogen removal and reached the optimum nitrogen removal condition, but the high concentration of organic material did not enhance its ability of nitrogen removal again. Organic nitrogen could be transformed to ammonium by *Bacillus* sp. LY, which was then transformed to N_2 through two possible pathways. One pathway was a nitrification process followed by a denitrification process. The other pathway was that ammonium was first oxidized to hydroxylamine, then dehydrogenized to N_2O and finally transformed to N_2 . All these results may contribute to the establishment of new biology process to remove nitrogen with high efficiency.

Key words: heterotrophic nitrification; *Bacillus* sp. LY; nitrogen removal; concentration of organic material; pathway

异养硝化是指异养微生物在好氧条件下将氨氮或是还原态有机态氮氧化到羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐的过程^[1,2]. 对于异养硝化机制的探讨主要集中在异养硝化过程中的关键酶和基因, 以及代谢途径这几个方面^[3]. 目前, 越来越多的研究围绕异养硝化在污水控制中的运用展开, 包括异养硝化在处理高负荷生活污水中的应用^[4], 异养硝化作用在生物去除水中营养物质系统中的重要性^[5~7], 以及异养硝化在处理高氮污水脱氮过程中的应用^[8,9]等. 而国内对于异养硝化的研究起步较晚, 相关的研究报道也较少. *Bacillus* sp. LY 是从膜生物反应器中分离出来的 1 株异养硝化细菌, 在对其硝化性能的研究中发现, 该菌有较高的 COD 和 TN 去除能力^[10]. 进一步的研究表明, *Bacillus* sp. LY 不同于传统的异养硝化细菌, 其可经过一系列生化反应, 将氨氮转化为氮气,

从而使细菌表现出一定的脱氮能力. 本实验对 *Bacillus* sp. LY 的脱氮性能进行了研究, 并结合了目前异养硝化代谢途径的研究, 探讨了 *Bacillus* sp. LY 脱氮的可能途径, 旨在为开发新型高效生物脱氮工艺提供参考.

1 材料与方法

1.1 异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY

试验细菌用甘油冷冻法^[11]保存, 使用前先扩繁培养, 培养基组成为 1 L 溶液中蛋白胨 10 g, 牛肉浸膏 10 g, NaCl 5 g, 磷酸盐缓冲液将 pH 调至 7~8. 扩

收稿日期: 2006-08-16; 修订日期: 2006-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(20676078)

作者简介: 何霞(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: hex@sjtu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: ylhe@sjtu.edu.cn

繁后的细菌采用高速离心机在3 000 r/min下离心 15 min 后加入反应液中,细菌在反应液中的浓度为 1 600 ~ 1 700mg/L.

1.2 *Bacillus* sp. LY 代谢无机氮源试验

本试验中代谢的无机氮源为氯化铵.实验在 500 mL 的锥形瓶中加入 250 mL 溶液,溶液中含有: $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 40 ~ 120 mg/L, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 1 000 ~ 4 000 mg/L, NaCl 1 g, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等微量元素,用 Na_2HPO_4 将溶液的 pH 值调至 7 ~ 8.灭菌后,加入扩繁后的细菌,在 30 ℃,140 r/min 水浴摇床中恒定培养.每天取样,样品经过离心分离后,取上清液分析 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、羟胺、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、TN 以及 TOC.

研究中还进行了氮气和氧化亚氮的检测试验.在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 溶液,溶液中含有: $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 80 mg/L, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 3 000 mg/L, NaCl 0.4 g, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等微量元素,用 Na_2HPO_4 将溶液的 pH 值调至 7 ~ 8.灭菌后,加入扩繁后的细菌.然后将导入高纯氧的气管插入液面下曝气,以求使细菌在足够氧的情况下反应,并同时排出瓶中的氮气.曝气 5 min 后立即用橡胶塞将锥形瓶口封住,再用封口胶将瓶口密封好,在 30 ℃,140 r/min 水浴摇床中恒定培养.在刚充气完毕,以及培养 120 h 后,取气体样品,通过气相色谱检测瓶中 N_2 和 O_2 的浓度.在充气后,分别在 48 h 和 72 h 取气体样品,检测瓶中 N_2O 的浓度.

1.3 *Bacillus* sp. LY 代谢有机氮源试验

本试验的有机氮源为蛋白胨.代谢蛋白胨的实验在 500 mL 锥形瓶中进行,锥形瓶中装有 250 mL 灭菌后的溶液,250 mL 溶液中有:蛋白胨 0.5 g, NaCl 1 g, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等微量元素,用 Na_2HPO_4 将溶液的 pH 值调至 7 ~ 8.将扩繁后的细菌分别加入各锥形瓶中,在 30 ℃,140 r/min 水浴摇床中恒定培养.每天取样,样品经过离心分离后,取上清液进行分析 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、TN、TOC.

1.4 分析方法

$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 采用纳氏试剂光度法^[12]; $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 采用酚二磺酸光度法^[12]; $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 采用 *N*-(1-萘基)-乙二胺光度法^[12]; 羟胺采用间接分光光度法^[13]; TN 和 TOC 采用总有机碳/总氮分析仪(型号 N/C3000ChD,德国耶拿分析仪器股份有限公司); N_2 和 O_2 的检测采用气相色谱(型号为 GC-14B,日本岛津),TCD 检测器,载气氩气(20 mL/min),分离柱为 CBP-1 柱(25 m×0.22 m×0.25 μm),进样量 100 μL,进样温度 100 ℃,

柱温 100 ℃,检测器温度 120 ℃,电流 65 mA. N_2O 由中国科学院南京土壤研究所测定,采用 HP-5890Ⅱ气相色谱仪,进样 1.67 mL,ECD 检测器,载氩气和甲烷的混合气体(30 mL/min),柱子 PorapakQ,柱温 85 ℃,进样温度 100 ℃,检测器温度 320 ℃.

2 结果与讨论

2.1 脱氮性能研究

在好氧条件下以葡萄糖为唯一碳源,氯化铵为唯一氮源进行脱氮性能的研究时,着重考察了 C/N = 15 时,反应体系中菌液初始浓度约为 260 mg/L(细胞干重), $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度分别为 40、80 和 120 mg/L 条件下,*Bacillus* sp. LY 的脱氮性能.在 120 h 的反应过程中,3 种浓度下细菌的最大菌液浓度分别是 1 013、1 326 和 1 409 mg/L.溶液中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 TN 的降解情况见图 1.

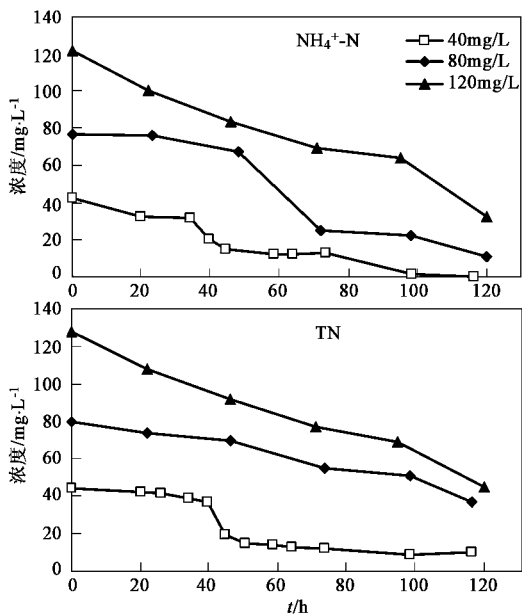


图 1 *Bacillus* sp. LY 代谢铵过程中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 TN 的变化
Fig.1 Changes in the concentration of $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ and TN during the metabolism of ammonium by *Bacillus* sp. LY

由图 1 可知,在 *Bacillus* sp. LY 的作用下,反应 120 h 后,溶液中的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 TN 都有大幅度地降低.当 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度为 40 mg/L 时,溶液中 TOC、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 与 TN 的去除率分别为 91.7%、100% 与 76.6%;当 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度提升到 80 mg/L 时,溶液中 TOC、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 与 TN 的去除率分别为 75.9%、85.7% 与 53.4%;当 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度提升到 120 mg/L 时,溶液中 TOC、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 与 TN 的去除率分别为 86.5%、

73.7% 与 64.8%。这说明在异养好氧条件下, *Bacillus* sp. LY 对不同浓度的氨氮都表现出了较高的氨氮和总氮的去除率, 细菌表现出了良好的异养脱氮性能; NH_4^+ -N 的浓度对 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能的影响较大, NH_4^+ -N 浓度较低时, 体系中 NH_4^+ -N 和 TN 被去除得较完全, 随着 NH_4^+ -N 浓度的升高, 细菌需要的反应时间越来越长。

根据图 1 中 NH_4^+ -N 和 TN 下降曲线的斜率可以计算出细菌在 3 个不同 NH_4^+ -N 浓度下的最大硝化和脱氮速率(表 1)。由表 1 可知, 在 120 h 内, 菌液初始浓度相同的情况下, 随着 NH_4^+ -N 浓度的增加, 细菌的硝化速率以及脱氮速率呈现下降的趋势。这可能是由于随着 NH_4^+ -N 浓度的增加, 细菌需要更长的适应时间来代谢增加的 NH_4^+ -N。

表 1 反应 120 h 中最大硝化、脱氮速率

Table 1 Maximum rate of nitrification and nitrogen removal during 120 h		
NH_4^+ -N 浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	最大硝化速率 / $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	最大脱氮速率 / $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$
40	2.1	1.5
80	1.8	1.0
120	1.3	0.9

2.2 有机物浓度对 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能的影响

Bacillus sp. LY 在代谢氮源的同时必须通过代谢碳源以获得能量, 体系中有有机物浓度将影响细菌的脱氮性能。为了考察有机物浓度对该菌株脱氮性能的影响, 试验中以葡萄糖为唯一碳源, 氯化铵为唯一氮源, 在低($\text{TOC} = 400 \text{ mg/L}$)、中($\text{TOC} = 800 \text{ mg/L}$)、高($\text{TOC} = 1\,600 \text{ mg/L}$) 3 种有机物浓度条件下, 探讨了不同 NH_4^+ -N 浓度处理对菌株异养脱氮的影响, 体系反应 120 h 后, 结果见表 2。

表 2 不同有机物浓度和不同 NH_4^+ -N 浓度下 NH_4^+ -N、TN 和 TOC 的去除率

Table 2 Removal efficiency of NH_4^+ -N, TN and TOC under different concentration of organic material and NH_4^+ -N					
有机物浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NH_4^+ -N 浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	C/N	NH_4^+ -N 去除率/%	TN 去除率/%	TOC 去除率/%
400	40	10	76.6	34.4	86.3
	80	5	46.3	31.3	89.6
	40	20	100	67.1	85.6
800	80	10	89.6	76.6	90.7
	120	6.7	73.4	56.0	92.9
	40	40	75.3	65.8	86.5
1 600	80	20	73.7	64.8	83.5
	120	13.3	77.4	56.7	82.1

由表 2 可以看出, 当体系在低有机物浓度($\text{TOC} = 400 \text{ mg/L}$)条件下时, 细菌对 NH_4^+ -N 的去除率不高, 对 TN 的去除率是 3 种有机物浓度下最低的; 当体系在中有机物浓度($\text{TOC} = 800 \text{ mg/L}$)条件下时, 细菌对 NH_4^+ -N 和 TN 的去除率都有显著的提高并且达到最佳; 当体系在高有机物浓度($\text{TOC} = 1\,600 \text{ mg/L}$)条件下时, 细菌对 NH_4^+ -N 和 TN 的去除率与中有机物浓度的去除率相比变化不大, 并没有随着有机物浓度的升高而升高。这表明, 低有机物浓度会阻碍细菌脱氮性能的发挥, 中有机物浓度会促进细菌脱氮性能的发挥, 使体系的脱氮效果达到最佳, 高的有机物浓度并不能再次提升细菌的脱氮性能。而在有机物浓度一定的情况下, 随着 NH_4^+ -N 浓度的升高, 细菌的脱氮性能有所降低, 这个变化在低有机物浓度的条件下尤为明显, 而在中、高有机物浓度的条件下变化相对较小。C/N 也会影响到菌株脱氮性能, 适中的 C/N 能够保证菌株具有较高的脱氮性能。以体系在中有机物浓度($\text{TOC} = 800 \text{ mg/L}$)条件下为例, C/N 为 10 时, 菌株获得了最大总氮去除率。

2.3 *Bacillus* sp. LY 代谢有机氮的研究

有机氮如蛋白质等通常也是废水中的一大类污染物, 为了考察细菌对有机氮的代谢去除效果, 笔者对菌株代谢蛋白胨进行了 21 d 的观察。在细菌培养 21 d 后, TN 由初始浓度 234.6 mg/L 下降到 161.6 mg/L , 去除率为 31.1%; TOC 由初始浓度 $1\,484.8 \text{ mg/L}$ 下降到 357.8 mg/L , 去除率为 75.9%。这说明, *Bacillus* sp. LY 可以直接利用有机氮中的碳与氮进行异养脱氮。

细菌在代谢蛋白胨的过程中, NH_4^+ -N 浓度经历 1 个先升高后降低的过程。在观察的前 6 d, 溶液中的 NH_4^+ -N 一直在上升, 由最初的 64.5 mg/L 上升到 6 d 后的 162.5 mg/L (图 2)。而 21 d 时, 溶液中 NH_4^+ -N 浓度则下降为 78.8 mg/L 。据此推测, 细菌对有机氮源的代谢是先通过氨化作用生成 NH_4^+ -N, 随后通过一系列转化, 最终完成异养脱氮的过程。

2.4 脱氮的可能途径

在研究 *Bacillus* sp. LY 代谢氯化铵的过程中, 对封闭体系里的气体成分(图 3、图 4)进行了检测。

由图 3 可以看出, 在 *Bacillus* sp. LY 的作用下, 封闭体系中不仅检出了 N_2O 气体, 而且其浓度也在变化, 72 h 的浓度高于 48 h 的浓度, 这证明了 N_2O 是细菌代谢过程中的中间产物。对反应体系中 N_2 和 O_2 浓度的检测如图 4 所示, 在刚充氧完毕时只检测

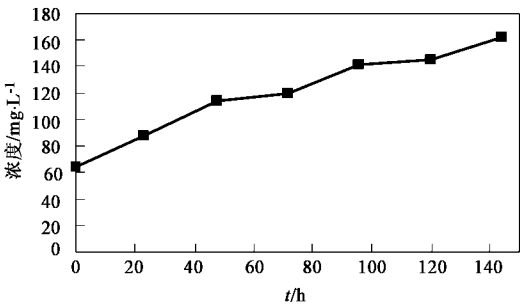


图2 *Bacillus* sp. LY 代谢蛋白胨过程中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的变化

Fig.2 Change in the concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ during the peptone degradation by *Bacillus* sp. LY

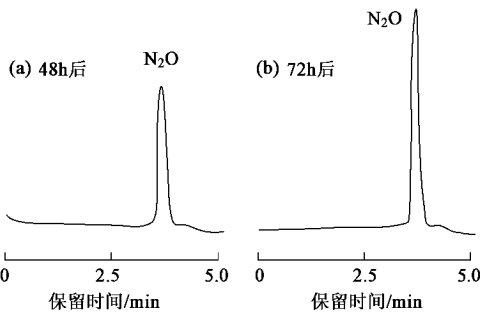


图3 反应 48 h 后和 72 h 后 N_2O 气相色谱图

Fig.3 N_2O Chromatograms of the gas samples at 48 hours and 72 hours

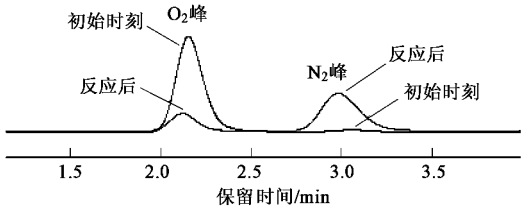


图4 反应初始和 5 d 后的气相样品的色谱图

Fig.4 Chromatograms of the gas samples at beginning and 5 days later

到 O_2 峰; 在 5 d 之后, 氧气峰出现了明显的降低, 而氮气峰明显升高. 这说明, 在 *Bacillus* sp. LY 的作用下, 一部分氨氮最终是以氮气的形式被脱除, 这也证明了 *Bacillus* sp. LY 是 1 株具备脱氮能力的异养硝化细菌.

Richardson 等^[14, 15]在对可以脱氮的异养硝化菌进行深入研究后, 对其脱氮途径做出了推测, 有 2 条可能的途径: ①细菌先经历 1 个硝化阶段, 随后反硝化脱氮; ②细菌将氨氮氧化化成羟胺后, 由羟胺直接氧化到氧化亚氮, 然后再转化成为氮气. 本试验也检测了 *Bacillus* sp. LY 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 初始浓度为 120 mg/L 条件下, 脱氮过程中溶液里的羟胺、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,

结果见图 5.

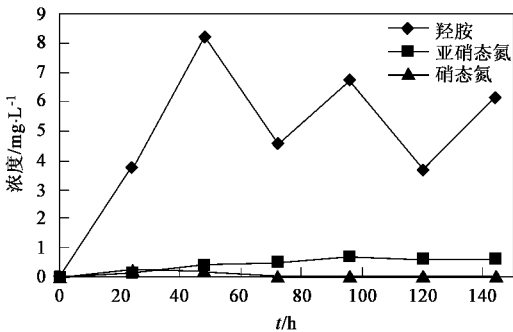


图5 *Bacillus* sp. LY 代谢铵过程中中间产物的变化

Fig.5 Changes in the concentration of intermediates during the metabolism of ammonium by *Bacillus* sp. LY

由图 5 可以看出, 羟胺、亚硝态氮和硝态氮都是氮代谢过程的中间产物, 羟胺的浓度较高, 并反复出现浓度升高降低的过程; 亚硝态氮的浓度相对于羟胺的浓度则低很多, 且并没有随着羟胺浓度的波动而产生波动, 反而是非常缓慢地升高; 硝态氮的浓度则更低, 在反应的后半段几乎检测不到. 为了进一步揭示 *Bacillus* sp. LY 的脱氮途径, 试验中还分别在以亚硝酸盐和硝酸盐为底物, 葡萄糖为碳源, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的初始浓度都为 20 mg/L 的情况下, 检测了细菌在代谢氮源的过程中出现的液相和气相产物. 在气相产物的检测中, 2 种情况下都检测到氧气的减少和氮气的增加, 结合图 5 的结果可以说明亚硝态氮和硝态氮都是脱氮过程中的中间产物, 细菌可能是通过 Richardson 的推测途径①将氮脱除的. 而液相产物的检测结果见图 6. 由图 6 可以看出, 随着亚硝酸盐或硝酸盐的下降, 羟胺的浓度出现了上升, 与图 5 中的羟胺不同, 图 5 中羟胺是硝化过程的中间产物, 而图 6 中的羟胺是由细菌的反硝化歧化作用(即同化反硝化)产生的; 当亚硝酸盐或硝酸盐被代谢完全后, 羟胺的浓度又出现了缓慢的下降, 这说明可能有一部分硝酸盐或亚硝酸盐会生成羟胺, 然后通过推测途径②的方式脱氮. 与氨氮代谢相似, 亚硝酸盐代谢过程中, 也伴随少量硝酸盐的产生[图 6(a)], 这一点充分证实了 Richardson 的假想途径中对硝酸盐生成途径的论述.

通过对 *Bacillus* sp. LY 氮代谢的研究, 笔者给出了 *Bacillus* sp. LY 脱氮的可能途径(图 7), 首先, 有机氮经过氨化作用, 生成氨氮. 随后, 氨氮通过 Richardson 等总结出的 2 条途径转化为氮气. 同时, 这 2 条途径相互补充, 硝酸盐或亚硝酸盐不仅可以

通过第 1 条途径反硝化生成氮气,而且可以先逆生成羟胺,然后通过第 2 条途径生成氮气.目前,这 2

种途径之间的相互关系尚无法很好地解释,有关研究也在继续深入过程中.

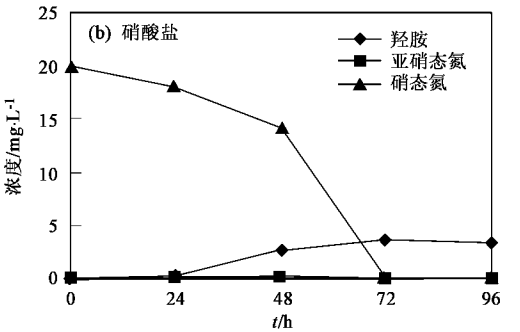
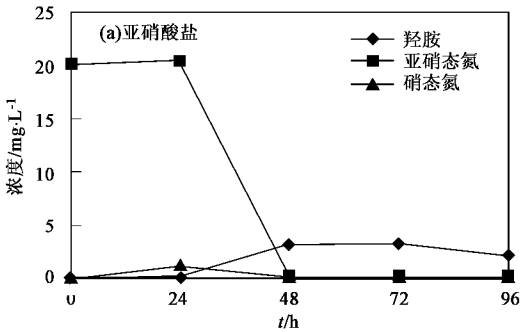


图 6 *Bacillus* sp. LY 以亚硝酸盐和硝酸盐为底物进行代谢时,溶液中液相产物的变化

Fig.6 Changes in the concentration of liquid intermediates during the metabolism of nitrite and nitrate by *Bacillus* sp. LY

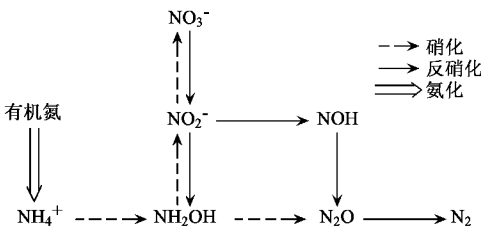


图 7 *Bacillus* sp. LY 可能的脱氮途径

Fig.7 Proposed pathway for nitrogen removal by *Bacillus* sp. LY

3 结论

(1) *Bacillus* sp. LY 在好氧的条件下,表现出了良好的异养脱氮性能,氨氮浓度、有机物浓度与 C/N 均会影响菌株的异养脱氮性能.有机物浓度保持不变,菌株脱氮能力随氨氮的浓度的升高而下降.有机碳源浓度过低或过高,均不利于菌种的脱氮.合适 C/N 利于菌株保持较高的脱氮性能.

(2) 在 *Bacillus* sp. LY 作用下,有机氮经过氨化作用,生成氨氮,通过 2 条可能的途径转化为氮气.1 条是氨氮先硝化生成亚硝酸盐与硝酸盐,然后反硝化生成氮气.另 1 条是氨氮被氧化生成羟胺,然后脱氢生成氧化亚氮并进一步转化为氮气.

参考文献:

[1] Papen H, Berg R V. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil [J]. Plant and Soil, 1998, **199**: 123 ~ 130.

[2] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, et al. New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, **27**: 481 ~ 492.

[3] 何霞,吕剑,何义亮,等. 异养硝化机理的研究进展[J]. 微生物学报,2006,**46**(5): 844 ~ 847.

[4] Gupta A B, Gupta S K. Simultaneous carbon and nitrogen removal

from high strength domestic wastewater in an aerobic RBC biofilm [J]. Water Research, 2001, **35**: 1714 ~ 1722.

[5] Helen X L, Glen T D, Peter F S, et al. Simultaneous biological nutrient removal: evaluation of autotrophic denitrification, heterotrophic nitrification, and biological phosphorus removal in full-scale systems [J]. Water Environment Research, 2003, **75**(2): 138 ~ 150.

[6] Steven W E, Drysdale G D, Bux F. Evaluation of nitrification by heterotrophic bacteria in biological nutrient removal processes [J]. South African Journal of Science, 2002, **98**(5 ~ 6): 222 ~ 224.

[7] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, **13**: 218 ~ 217.

[8] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* no.4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, **100**(2): 184 ~ 191.

[9] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Nitrification and denitrification in high-strength ammonium by *Alcaligenes faecalis* [J]. Biotechnology Letters, 2005, **27**: 773 ~ 778.

[10] 林燕,孔海南,何义亮,等. 异养硝化菌的分离及其硝化特性实验研究[J]. 环境科学,2006,**27**(2): 324 ~ 328.

[11] 郭淑清,田锋. 菌种的甘油冷冻保存法[J]. 山西医科大学学报,2000,**31**(4): 382 ~ 382.

[12] 国家环境环保总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社,2002.

[13] 杨明. 间接分光光度法测定盐酸羟胺[J]. 化学工业与工程, 1999, **16**(4): 233 ~ 235.

[14] Richardson D J, Wehrfritz J M, Keech A, et al. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Biochemical Society Transactions, 1998, **26**(3): 401 ~ 408.

[15] Richardson D J, Watmough N J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 1999, **3**: 207 ~ 219.