

异养硝化作用的主要特点及其研究动向

林燕^{1,4}, 孔海南¹, 王茸影³, 李春杰¹, 严立², 何义亮¹

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. 温州大学生命与环境科学学院, 温州 325027; 3. 上海市普洛康裕药物研究院, 上海 201314; 4. 日本明星大学亚洲环境研究中心, 东京 191-8506)

摘要: 废水生物脱氮是目前水处理领域中关注和研究的热点, 在对自养硝化作用研究的同时, 对异养硝化作用及其菌属的研究已成为环境废水生物脱氮领域的热点问题, 同时对新型异养硝化作用的研究是对传统硝化理论的丰富与突破. 在综述大量文献及已有实验研究工作的基础上, 对异养硝化作用的主要特点(硝化作用主体、生长条件、硝化途径、作用酶系统以及分离方法等), 以及目前国内外研究现状进行了系统介绍, 并对异养硝化作用的研究方向进行了展望.

关键词: 生物处理; 脱氮; 硝化; 异养硝化

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3291-06

Characteristic and Prospects of Heterotrophic Nitrification

LIN Yan^{1,4}, KONG Hai-nan¹, WANG Rong-ying³, LI Chun-jie¹, YAN Li², HE Yi-liang¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. School of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325027, China; 3. Shanghai Apelo Pharmaceutical Research Institute, Shanghai 201314, China; 4. Asian Center for Environmental Research (ACER), Meisei University, Tokyo 191-8506, Japan)

Abstract: Nitrification is a key step in the global nitrogen cycle. Classically, nitrifying bacteria are chemoautotroph. Recently, bacteria that have the ability of heterotrophic nitrification have been intensively studied as potential microorganisms that may be used to overcome problems inherent in the conventional method. This review gives a broad overview of the current status of heterotrophic nitrification including the heterotrophic species which nitrify actively, optimal condition for nitrification, heterotrophic nitrification pathway, enzymatic system and isolation methods. Also, the promising prospects of heterotrophic nitrification are especially introduced.

Key words: biological treatment; nitrogen removal; nitrification; heterotrophic nitrification

近年来, 国内外学者对废水生物脱氮工程实践中揭示出的问题和现象进行了大量理论和试验研究, 力求进一步完善对氮素转化过程的认知, 并提出了一些突破传统理论的新认识^[1~3], 其中就包括异养硝化概念的提出. 相对于自养硝化菌而言, 虽然有的异养菌的分解效率较低, 但是由于它们环境中的数量以及生长速率上往往远大于自养菌, 因此在某些环境之中, 异养硝化作用的贡献可以与自养菌相当, 甚至超出. 另外, 由于部分异养菌还可以同时硝化和反硝化, 使得在水中的氨或亚硝酸在氧化后, 可以经脱氮作用, 以气体形式释放到大气中, 此种能力也能提供该菌种在环境废水处理中为消除氮污染服务的可能性^[4].

关于异养硝化作用, 虽然目前仍有很多机制未得到解释, 对一些现象的解释也不尽圆满, 但异养硝化作用的重要性日益受到关注. 本文在综述大量文献及实验和已有研究工作的基础上对异养硝化作用的主要特点及其研究现状进行了详尽介绍论述, 并对异养硝化作用的研究方向提出了看法.

1 异养硝化概念及其现象

异养硝化概念中认为氨氮不仅可以由自养菌来完成传统意义上的硝化过程, 某些异养菌也可以进行对氨氮的氧化作用^[5~7], 并且异养硝化作用的底物范围更广, 既可以是无机态氮也可以是有机态氮^[6~10], 甚至可以将有机氮直接氧化为硝酸盐氮, 而跨过有机氮分解为氨氮、再氧化为亚硝酸盐氮的过程^[11].

由此, 硝化概念可以再认识为, 微生物在好氧条件下将还原态氮氧化为亚硝酸盐氮或硝酸盐氮的过程, 其中作用的微生物既包含自养菌也包含异养菌; 还原态氮既包括无机态的氨氮也包括有机态氮.

2 异养硝化作用的主要特点

2.1 硝化作用主体及其生长条件

目前对异养硝化菌的研究中, 真菌被认为是数

收稿日期: 2007-11-26; 修订日期: 2008-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(20176027)

作者简介: 林燕(1976~), 女, 博士, 主要研究方向为废水生物处理,
E-mail: linyansjtu@gmail.com

量最大、效率最高的异养硝化菌,如青霉菌和香曲霉菌、轮枝菌等.此外,某些放线菌、细菌甚至藻类在自然界或实验室的纯培养中,也被确定为具有硝化能力的异养微生物.如反硝化假单胞菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginos*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、产碱杆菌、节杆菌、粪产碱菌(*Alcaligenes*

faecalis)、PB16 假单胞菌以及一些新发现的菌种(或属)等^[5].目前,有关异养硝化菌的研究大多是基于土壤方面展开的,而关于将异养硝化微生物用于废水脱氮方面则鲜有报道.表 1 总结了一些目前分离得到的较典型的异养硝化菌及其硝化条件.

2.2 异养硝化作用反应途径

表 1 典型的异养硝化菌
Table 1 Typical heterotrophic species which nitrify actively

细菌名称	硝化底物	积累产物	硝化条件	是否具有好氧反硝化能力
<i>Aerobacter aerogene</i> ^[16]	氨氮	二异羟肟酸	—	—
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC19718 ^[11]	氨氮	NO ₂ ⁻	32℃	是
<i>Alcaligenes faecalis</i> IFO14479 ^[17]	氨氮/有机氮	NO _x ⁻	20℃/pH7.0	是
<i>Alcaligenes faecalis</i> L1 ^[18]	氨氮	NO _x ⁻ 、羟胺	30℃	是
<i>Alcaligenes faecalis</i> No.4 ^[19]	氨氮	NO _x ⁻ 、羟胺	20 ~ 37℃	是
<i>Alcaligenes faecalis</i> strain TUD ^[20]	氨氮	NO _x ⁻ 、羟胺	30℃/pH8.0	是
<i>Arthrobacter globiformis</i> ^[16]	氨氮	羟胺	—	—
<i>Arthrobacter</i> sp. ^[16,21]	氨氮/肟	NO _x ⁻ 、羟胺/NO ₂ ⁻	28℃/pH7.0	—
<i>Aspergillus flarus</i> ^[16]	氨氮/脂肪硝基族化合物	异羟肟酸/NO ₃ ⁻	—	—
<i>Aspergillus parasiticus</i> ^[16]	氨氮	NO ₃ ⁻	—	—
<i>Aspergillus wentii</i> ^[16]	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	—	—
<i>Bacillus cereus</i> ^[22]	氨氮	NO ₃ ⁻	30℃/pH7.0	是
<i>Bacillus licheniformis</i> ^[22]	氨氮	NO ₃ ⁻	30℃/pH7.0	是
<i>Bacillus</i> sp. LY ^[23]	氨氮	NO _x ⁻ 、羟胺	35℃/pH8.0	是
<i>Bacillus subtilis</i> ^[22]	氨氮	NO ₃ ⁻	30℃/pH7.0	是
<i>Brevibacillus</i> sp. LY ^[23]	氨氮	NO _x ⁻ 、羟胺	35℃/pH8.0	是
<i>Chlorella</i> sp. ^[16]	氨氮	NO ₃ ⁻	—	—
<i>Flavobacterium</i> sp. ^[16]	芳香硝基族化合物	NO ₂ ⁻	—	—
<i>Mortierella pulchella</i> Linnem ^[24]	氨氮	NO ₂ ⁻	20℃/pH5.0 ~ 6.2	—
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer ^[24]	氨氮	NO ₂ ⁻	20℃/pH5.0 ~ 6.2	—
<i>Mycobacterium phlei</i> ^[16]	氨氮	二异羟肟酸	—	—
<i>Neurospora crassa</i> ^[16]	氨氮	三异羟肟酸	—	—
<i>Nocardia</i> sp. ^[16]	芳香硝基族化合物	NO ₂ ⁻	—	—
<i>Proteus</i> sp. ^[16]	羟胺	NO ₂ ⁻	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[16]	芳香硝基族化合物	NO ₂ ⁻	—	—
<i>Pseudomonas putida</i> ^[25]	氨氮	NO _x ⁻ 、羟胺	25℃/pH7.0	是
<i>Pseudomonas</i> strain M19 ^[26]	氨氮、有机氮	NO ₂ ⁻	室温	—
<i>Rhodococcus</i> sp. strain HN ^[7]	乙酰胺	NO ₂ ⁻	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. ^[16]	氨氮	异羟肟酸/三异羟肟酸	—	—
<i>Thiosphaera pantotropha</i> A2 ^[27]	氨氮	NO _x ⁻	37℃/pH8.0	是
<i>Ustilago sphaerogena</i> ^[16]	氨氮	三异羟肟酸	—	—

对异养硝化作用的反应途径,多以丙酮酸肟作为异养硝化菌的基质来进行研究,一般认为丙酮酸肟形成亚硝酸盐的途径可能存在无机或有机 2 种途径.无机途径是指丙酮酸肟先水解为羟胺和丙酮酸,羟胺再氧化为亚硝酸.有机途径指丙酮酸肟直接氧化生成亚硝酸.有学者提出,异养硝化菌株不同,丙酮酸肟的氧化机制也不相同.实验表明当起作用的

菌株为产碱杆菌属(*Alcaligenes*)时,丙酮酸肟直接在丙酮酸肟加双氧酶作用下生成亚硝酸^[12].

从现有的研究结果来看,与自养硝化微生物反应途径的不同之处首先在于异养硝化微生物可以利用很多基质,包括无机氮和有机氮:如铵、胺、酰胺、*N*-烷基羟胺、肟、氧肟酸及芳香硝基化合物等生成 NO₂⁻^[9],其中,丙酮酸肟及其它一些肟类几乎一度成

为异养硝化作用的标准底物来培养和分离异养硝化菌^[8],但因为异养微生物还可以利用其他种类的有机氮以及无机氮,异养硝化作用的底物及其代谢途径的研究至今仍无统一的认识^[10].

与自养硝化微生物作用相比异养硝化过程的产物也有所不同:自养氨氧化菌一般以羟胺为中间产物后产生亚硝酸盐氮,而异养硝化菌虽然也有研究证实可以羟胺为中间产物,但是其产物既可以是亚硝酸盐氮也可以是硝酸盐氮.本课题组在对分离得到的 *Bacillus* sp. LY 进行异养硝化途径的探索性实验研究中发现,以氨氮为单一氮源的条件下,异养硝化可以产生以 NO_3^- -N 为主的 NO_x^- -N,在研究其对氨的氧化过程中,观察到中间产物羟胺积累后浓度出现下降趋势,同时伴随着以 NO_3^- -N 为主的 NO_x^- -N 的积累,由此推测异养硝化过程所遵循的反应途径可能与自养硝化的反应途径类似,但是可以完成自养氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的共同作用,可以将氨氮转化为羟胺,随后产生 NO_x^- -N,这与有的研究者曾经提出的异养硝化作用代谢途径通式类似,如图 1 所示^[13].另外一些研究^[11]以 ^{15}N 同位素跟踪异养硝化的过程,发现异养菌对 NH_4^+ -N 没有作用,但是能将有机氮直接氧化为硝酸盐氮,而跨过有机氮分解为氨氮、再氧化为亚硝酸盐氮两步,如图 2 所示.

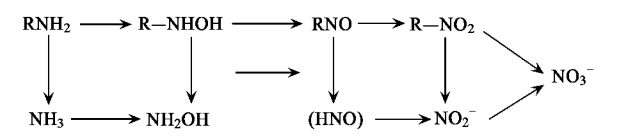


图 1 异养硝化作用的无机和有机途径

Fig.1 Comparison between the metabolisms in inorganic and organic pathway during heterotrophic nitrification

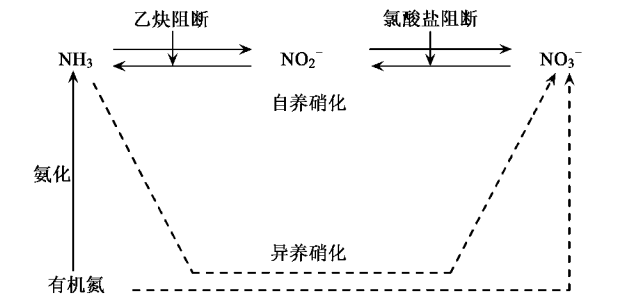


图 2 异养硝化与自养硝化不同途径的比较

Fig.2 Scheme for reaction during heterotrophic nitrification and autotrophic nitrification

与自养硝化菌不同还在于,大部分异养硝化菌

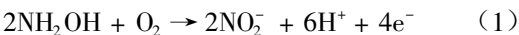
在低溶解氧或者较高有机碳浓度的环境下可以同时进行异养硝化或者好氧反硝化作用,有的过程伴随着氮气的释放,有的过程的气态氮产物却是氧化亚氮或一氧化二氮等^[14].异养硝化作用途径、产物的多样性和异养硝化、好氧反硝化的同时存在被认为是异养硝化微生物硝化作用产物(NO_2^- 和 NO_3^-)积累量偏低的原因.最后,目前为止的几乎所有研究显示,与自养硝化菌的很大不同还在于,异养硝化菌并不能从氨氧化过程获得能量,并且在异养硝化过程中往往会伴随着细菌的部分解体,因此,作为异养菌,异养硝化菌主要还是从对有机物的同化作用来合成菌体获得能量和摄取营养源,随后氧化系统中的剩余还原态氮^[6,15].

2.3 异养硝化作用酶系统

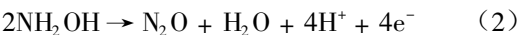
在自养硝化系统中,催化 NH_3 转化为 NH_2OH 的生化反应的酶是氨单加氧酶 (ammonium monooxygenase, AMO).近年来,有些异养硝化细菌也被发现含有 AMO 酶,这类菌种的 AMO 酶也被纯化出来.目前在异养细菌中, *Paracoccus denitrificans*、*Pseudomonas putida* 和 *Methylobacterium extorquens* 等菌株都已经成功分离出其中含有的 AMO,纯化后的异养 AMO 含有 2 个亚基,其分子量和自养菌中分离出的 AMO 的 2 个亚基 AMOA 和 AMOB 类似^[28].此外,纯化后得到的 AMO 在许多特性上和自养菌中分离的 AMO 相类似,例如会受到光、铜离子螯合物等所抑制;而和自养菌中纯化的 AMO 特性相异的地方,最明显的一点就在对乙炔的敏感度上,自养 AMO 对乙炔相当敏感,低浓度的乙炔便足以抑制其活性,而异养 AMO 在浓度 1 mmol 的乙炔中,仍不会受到抑制.

在异养硝化菌中的羟胺氧化还原酶(HAO)方面,有报道在一些 *Pseudomonas*、*Arthrobacter*、*Aeromonas* 及 *Alcaligenes* 属等菌种中可以纯化出来^[29,30].异养硝化菌兼具反硝化脱氮作用,有一部分便是 HAO 在好氧及厌氧条件下不同作用的结果,在好氧的情形下,硝化作用在 HAO 催化下将 NH_2OH 氧化成亚硝酸;而在厌氧的条件下, NH_2OH 在 HAO 的作用下则会产生 N_2O 气体^[29],以下为 2 种条件下的反应式.

好氧条件:



厌氧条件:



相对而言,自养细菌即使在缺氧的条件下, NH_2OH 在HAO的作用下仍可以氧化成亚硝酸。

本课题组考察了 amoA 及 amoB 功能基因在所分离的菌株*Bacillus* sp. LY及*Brevibacillus* sp. LY的存在可能性.实验中发现*Bacillus* sp. LY中很可能不存在 amoA 基因;而*Brevibacillus* sp. LY中很可能不存在 amoB 基因,另外经过BLAST发现:与*Bacillus* sp. LY以 amoA -1F及 amoA -2R为引物扩增出的基因序列相似性最高的是*Bacillus licheniformis* ORF2、ORF3、ORF4、 merR 和 merA 基因,但 merR 为Hg(II)的还原酶基因片段,并非现今所报道的 amoA 基因.与*Brevibacillus* sp. LY以 amoBMF 及 amoBMR 为引物扩增出的基因序列相似性最高的是*Cytophaga* sp. FIRDI-133-V546 chaperonin 60 (cpn60)基因,也与 amoB 基因所不同.据实验结果推测虽然所分离菌株的异养硝化途径与自养硝化过程相似,历经了氨转化至羟胺在产生亚硝酸盐,然后再进一步产生硝酸盐的过程,但其中起作用的功能基因并不一定相同,但异养硝化作用中关键的功能基因目前并不明晰,还有待进一步深入研究^[31].

2.4 异养硝化分离方法

相对自养硝化细菌而言,由于异养细菌的生长特性,若采用传统培养的技术,如特殊培养基筛选、菌种富集化以及菌种的纯化分离等方法较适合应用于异养硝化细菌的相关研究,但是,由于许多异养硝化菌的培养技术与自养硝化菌存在差异,异养硝化菌的种系发育和生态学意义并不特别清楚,如何做到大规模、低成本的提纯和以及扩大培养,使之能在实际应用中发挥作用,是一个非常重要的课题。

在分离方法上,Quastel^[32]以丙酮脒为唯一碳氮源,采用土柱渗滤进行选择富培养,获得了具有产生 NO_2^- 能力的异养硝化菌株,后来的研究者多采用相似的方法进行异养硝化活性菌株的分离.目前常用的培养基有:丙酮酸脒^[33]、乙酰脒^[6]及其它一些有机物如脒、吡啶^[34]等.这些方法的缺点是样品前处理比较繁琐,耗时费力,重复性差,分离的菌株单一且缺乏代表性。

彭光浩等^[35]对华北潮土中的异养硝化菌株进行了分离计数,实验中将待检样品涂布于牛肉浸膏-蛋白胨琼脂平板后,挑取单菌落至上述牛肉浸膏-蛋白胨琼脂平板继续划线纯化,经28℃培养10 d,格利斯试剂直接点滴到平板,进行硝化活性确认,并以不接菌的平板作空白对照.这种方法操作相对简便且所需时间较短,具较高实用性。

本课题组简化了实验操作步骤,从处理城市生活人工模拟污水系统中分离筛选并鉴定了具有硝化活性的2株异养细菌,该方法通过牛肉膏-蛋白胨琼脂平板分离,分离细菌挑取接入氨氧化能力鉴定液体培养基培养和格利斯试剂显色等步骤可从混合微生物系中分离筛选异养硝化细菌,该方法重复性好,分离菌株效果好,可靠性高,并具有准确性,而且降低了实验过程中试剂杂质对实验结果的干扰,从而使检出结果更加准确,并且应用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术,采用针对自养硝化细菌的特异探针针对分离出的异养硝化细菌进行了排除检验验证,从而使分离结果更可靠^[36]。

3 异养硝化作用的研究现状

生物脱氮是目前应用广泛,且经济效益较高的脱氮方法之一.随着异养硝化菌的发现,其在脱氮方面的一些特性引起了人们的关注.同时,许多异养硝化菌也是好氧反硝化菌,使得同时硝化反硝化得以实现.异养硝化菌的这些特性为开发设计新的脱氮工艺,提高脱氮效率,提供了新的理论补充。

早在19世纪末,异养硝化现象就在土壤的硝化过程中被发现,但有关这方面的报道一直较少.这主要是因为长期以来,人们一直认为自然界的硝化过程基本上由自养硝化菌完成的.自养硝化菌的硝化能力极强,就具体的硝化反应活性来说,一般认为异养生物要比自养生物低 $10^3 \sim 10^4$ 倍^[8],且异养硝化过程难以监测和确定,从而认为异养硝化在硝化过程中的重要性不大.随后,大量的实验表明酸性土壤(特别是酸性森林土壤)中主要的硝化作用承担者是异养微生物.对于这一现象的解释是,虽然单位生物量的异养菌氧化 NH_3 的速率较自养菌要慢2~3个数量级,但异养菌的生长速率快,对环境的适应性也强,因此其总体氧化 NH_3 的速率并不比自养菌慢,另外很多异养硝化菌所同时具有的好氧反硝化能力也是使异养硝化菌的硝化能力被低估的一个重要因素. Robertson等^[2]研究证明,作为异养微生物,*Thiosphaera pantotropha*的生长速率比自养微生物高得多,并指出自养菌*Nitrosomonas europaea*的 μ_{max} 为 $0.03 \sim 0.05 \text{ h}^{-1}$,而异养硝化菌*Thiosphaera pantotropha*的 μ_{max} 在某些生长条件下可高达 0.4 h^{-1} .这一理论为异养硝化作用在实际工程中的应用奠定了理论基础.至此,关于异养硝化菌的研究重新引起了众多研究者的兴趣。

近几十年来,研究者相继从活性污泥系统^[1]、旋转生物电流接触器(RBC)^[37]、氧化沟^[38]等不同类型的水处理系统中对异养硝化菌的脱氮效率进行了研究.大量实验表明,在加入了异养菌的系统具有更好耐冲击负荷能力,微生物的脱氮能力得以加强.目前发现的异养硝化菌存在的范围较广,对环境的适应能力也较强.如 Robertson 等^[39]从污水处理厂的反硝化单元分离出泛养硫球菌(*Thiosphaera patotropha*),该细菌可进行好氧反硝化,同时又是异养硝化细菌,从而成为了研究异养硝化细菌的代表性菌属. Brierley 等^[6]研究了英国一酸性森林土壤,并分离出了异养硝化菌.在国内,张光亚等^[7]从大棚土壤中分离到 1 株异养型硝化细菌株,命名为 *Rhodococcus* sp. HN, 该菌株能以乙酰胺为唯一碳源和氮源进行氨化作用和硝化作用并产生亚硝酸,以硝酸钠为氮源时能进行反硝化作用. Christine 等^[40]也在好氧生物膜系统中发现,氮是在低 DO($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)下,以 NO_2^- 为最终电子受体的同时硝化和好氧反硝化联合作用去除的,且起作用的为 *Thiosphaera patotropha* 等异养微生物.

本课题组前期工作中分离得到了 2 株异养硝化菌株 *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY, 并以葡萄糖作为有机碳源,氯化胺作为无机氮源,对其异养硝化性能进行了间歇试验验证,结果表明: *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 具明确的异养性,可以充分利用有机碳进行有氧呼吸,24 d 好氧培养后,对 COD 的去除率分别为 71.7% 和 52.6%;具有较强的硝化性,24 d 好氧培养后,对氨氮的转化率分别为 78.2% 和 51.2%,对 *Bacillus* sp. LY 进行的实验期间观察到最高的异养硝化速率为 $137.65 \text{ mg} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$;同时也表现出一定的好氧反硝化性,24 d 好氧培养期间, *Bacillus* sp. LY 及 *Brevibacillus* sp. LY 对 TN 的去除率分别为 69.2 % 和 35.6 %^[31].

除此之外,也有研究者从污泥、深海火山口、湖水中发现分离了异养硝化菌.这说明异养硝化菌存在的范围较广,对环境的适应能力也较强,这对实际工程应用极为有利.

4 展望

就微生物氮循环而言,异养硝化作用仅为部分微生物在特定的环境条件下的一个次要代谢途径,在常规的废水生物脱氮系统中占主要地位的仍然是自养硝化菌和异养反硝化作用.但是,异养硝化菌,尤其是具有同时好氧反硝化能力的异养硝化菌的发

现,为废水生物脱氮领域引入了全新的概念和思路.然而异养硝化菌的生物多样性使得对其硝化机制的研究变得异常困难,目前在异养硝化作用的研究进程上虽然取得了很大的进展,然而无论是异养硝化作用的途径假说和模型论证还是硝化作用关键酶的纯化工作都并没有得到学术界的一致认可.除此之外,仍需进一步研究和回答的问题还包括:对异养微生物硝化作用的生理学意义的解释;异养硝化作用的能量传递方式和关键控制步骤;另外,最为重要的是在机制研究的基础上,如何创造一个适于异养硝化菌生长繁衍的环境条件,如何有效地将异养硝化作用结合到废水生物脱氮领域,克服传统处理工艺在处理效率与经济使用两方面的矛盾,实现废水高效经济地脱氮也是一个亟须解决的关键问题.

参考文献:

- [1] Kshirsagar M, Gupta A B, Gupta S K. Aerobic denitrification studies on activated sludge mixed with *Thiosphaera pantotropha* [J]. Environ Tech, 1995, **16**: 35-43.
- [2] Robertson L A, Van Niel E W J, Torremans R A M. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. Appl Envir Microbiol, 1988, **54** (11): 2812-2818.
- [3] Kuai L, Verstratr W. Autotrophic denitrification with elemental sulphur in small-scale wastewater treatment facilities [J]. Environ Tech, 1999, **20**: 201-209.
- [4] 郑平. 环境微生物学 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2002. 167-168.
- [5] 温东辉, 唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用 [J]. 环境污染与防治, 2003, **25** (5): 283-285.
- [6] Brierley E D R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium [J]. Soil Biol Biochem, 2001, **33**: 1403-1409.
- [7] 张光亚, 陈美慈, 韩如阳, 等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析 [J]. 微生物学报, 2003, **43** (2): 156-161.
- [8] Geraats S G M, Hooijmans C M, van Niel E W J. The use of a metabolically structured model in the study of growth Nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha* [J]. Biotechnol Bioeng, 1990, **36**: 227-267.
- [9] Dostader K G, Alexander M. Nitrification by heterotrophic soil microorganisms [J]. Soil Sci Soc Amer Proc, 1966, **30**: 351-355.
- [10] Nishio T, Yoshikura T. Effects of organic acids on heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* OKK17 [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, **58**: 1574-1578.
- [11] Henning P, Kristie A D, Mary K F. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques [J]. Biogeochemistry, 1999, **44**: 135-150.
- [12] Castignetti D, Palutsis D. An examination of proton translocation and energy conservation during heterotrophic nitrification [J]. FEMS

- Microbiol Lett, 1990, **66**: 175-182.
- [13] Norton J M. Nitrification [A]. In: Sumner M E. Handbook of Soil Science [C]. Florida, USA: CRC Press, 2000. 160-175.
- [14] Papen H, von Berg R. A most probable number (MPN) method for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil [J]. Plant Soil, 1998, **199**: 123-130.
- [15] Lin Y, He Y L, Kong H N, *et al.* Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying bacteria in MBR [J]. J Environ Sci, 2005, **17** (4): 589-592.
- [16] Kuenen J G, Robertson L A. Combined nitrification-denitrification processes [J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, **15**: 109-117.
- [17] Kim J S, Kim S J, Lee B H. Effect of *Alcaligenes faecalis* on nitrous oxide emission and nitrogen removal in three phase fluidized bed process [J]. J Environ Sci Heal A, 2004, **39**(7): 1791-1804.
- [18] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4 and LI [J]. J Biosci Bioeng, 2007, **103**(1): 66-73.
- [19] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4 [J]. J Biosci Bioeng, 2005, **100**(2): 184-191.
- [20] Geneviève M, Daniel P. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture [J]. Can J Microbiol, 2000, **46**: 465-473.
- [21] Verstraete W, Alexander M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. [J]. J Bacteriol, 1972, **110**(3): 955-961.
- [22] Kim J K, Park K J, Cho K S, *et al.* Aerobic nitrification denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Bioresource Technol, 2005, **96**: 1897-1906.
- [23] 林燕, 孔海南, 何义亮, 等. 异养硝化细菌的分离及其硝化特性实验研究[J]. 环境科学, 2006, **27**(2): 324-328.
- [24] Johnsrud S C. Heterotrophic nitrification in acid forest soils [J]. Holartic Ecol, 1978, **1**: 27-30.
- [25] Daum M, Zimmer W, Papen H, *et al.* Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida* [J]. Curr Microbiol, 1998, **37**(4): 281-288.
- [26] Nemergut D R, Schmidt S K. Disruption of *narH*, *narJ*, and *moaE* inhibits heterotrophic nitrification in *Pseudomonas* strain M19 [J]. Appl Environ Microb, 2002, **12**: 6462-6465.
- [27] Gupta S K, Kshirsagar M. Quantitative estimation of 293 *Thiosphaera pantotropha* from aerobic mixed culture [J]. Water Res, 2000, **34**: 3765-3768.
- [28] Moir J W B, Crossman L C, Spiro S, *et al.* The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans* [J]. FEBS Lett, 1996, **387**: 71-74.
- [29] Richardson D J, Wehrfritz J M, Keech A, *et al.* The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Biochem Soc Transactions, 1998, **26**: 401-408.
- [30] Otte S, Schalk J, Kuenen J G, *et al.* Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, **51**: 255-261.
- [31] 林燕. 膜生物反应器中异养硝化细菌的分离及其硝化性能实验研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2005. 104-106.
- [32] Quastel, Mann. Study of the oxidation of various materials by soil bacteria without disturbing the soil column [J]. Nature (London), 1946, **166**: 940-942.
- [33] Dostader K G, Alexander M. Nitrification by heterotrophic soil microorganisms [J]. Soil Sci Am Proc, 1966, **30**: 351-355.
- [34] Uma B, Sandhya S. Pyridine degradation and heterocyclic nitrification by *Bacillus coagulans* [J]. Can J Microbiol, 1997, **43**(6): 595-598.
- [35] 彭光浩, 尹瑞龄, 张桂英. 分离鉴定纯化异养硝化微生物的方法[P]. 中国专利: 03118598.3, 2003-08-06.
- [36] 林燕, 何义亮, 孔海南. 分离筛选异养硝化细菌的方法[P]. 中国专利: CN100339487C, 2007-09-26.
- [37] Gupta S K, Raja S, Gupta A B. Simultaneous nitrification and denitrification in RBC [J]. Environ Technol, 1994, **15**: 143-150.
- [38] Kshirsagar M. Biological nitrification-denitrification of high strength nitrogenous wastewater by flocculating algal-bacterial system in oxidation ditch [D]. Bombay, India: CESE, Indian Institute of Technology, 1995. 35-38.
- [39] Robertson L A, Kuenen J G, Kleijntjens R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1985, **51**(4): 445.
- [40] Christine H, Sabinekunst. Simultaneous nitrification/denitrification/denitrification in an aerobic biofilm system [J]. Wat Sci Tech, 1998, **37**(4-5): 183-187.