

污泥水富集硝化菌的群落结构及动力学参数研究

于莉芳, 陈青青, 杨晋, 彭党聪*

(西安建筑科技大学西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安 710055)

摘要:采用序批式反应器处理富含高氨氮的污泥水并培养富含硝化菌的活性污泥, 利用荧光原位杂交技术解析硝化菌的群落结构, 并分别测定了氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌的基质半饱和和常数、温度修正系数。结果表明, 污泥中氨氧化菌的含量(AOB/DAPI)为 $15.7\% \pm 3.7\%$, 优势菌属为 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis*; 亚硝酸盐氧化菌的含量(NO₂⁻/DAPI)为 $12.9\% \pm 3.2\%$, 优势菌属为 *Nitrobacter* spp.。氨氧化速率在 10~40℃ 之间的温度修正系数 τ_N 为 1.092, 亚硝酸盐氧化速率在 15~30℃ 之间的温度修正系数 τ_N 为 1.061, 氨氧化菌(以 NH₄⁺-N 计)和亚硝酸盐氧化菌(以 NO₂⁻-N 计)在 20℃ 的基质半饱和和常数 K_N 分别为 $(1.60 \pm 0.29) \text{ mg/L}$ 、 $(2.78 \pm 0.30) \text{ mg/L}$ 。

关键词: 污泥水; 硝化菌富集; 群落结构; 温度修正系数; 基质半饱和和常数

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-2035-05

Community Structure and Kinetics Characterization of Enriched Nitrifiers Cultivated with Reject Water

YU Li-fang, CHEN Qing-qing, YANG Jin, PENG Dang-cong

(Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology of Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: The community of nitrifiers cultivated with reject water were investigated by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) performed with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes, and the kinetic properties such as temperature correction factor τ_N and the half saturation coefficient K_N were also investigated. The results showed that the percentage of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) in the activated sludge was $15.7\% \pm 3.7\%$ and $12.9\% \pm 3.2\%$, *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* lineage were the dominant AOB, *Nitrobacter* spp. were the dominant NOB. The temperature correction factors of ammonium utilized rate (AUR) and nitrite utilized rate (NUR) were 1.092 and 1.061 respectively; the K_N of AOB and NOB were $(1.60 \pm 0.29) \text{ mg/L}$ (NH₄⁺-N), $(2.78 \pm 0.30) \text{ mg/L}$ (NO₂⁻-N) respectively.

Key words: reject water; nitrifiers accumulation; community structure; temperature correction factor; half saturation coefficient

由于硝化菌生长缓慢、对环境因子的变化比较敏感, 所以目前大多污水处理厂会面临硝化不完全这一困境, 而城市污水处理厂的剩余污泥在厌氧消化过程中会产生含有高温(30℃左右)、高氨氮、低C/N的污泥水(污泥水水量为污水处理厂进水量的1%~3%, 但是氮的负荷占总负荷的15%~25%^[1~3]), 我国目前已经建成或正在修建的城市污水处理厂均采用将其回流至进水口进行再处理的方法, 使得处理系统的实际氮负荷高于设计负荷。如果采用污泥水富集硝化菌并对城市污水处理系统进行生物添加, 就可以实现污泥水处理、降低氮负荷和增加活性污泥系统中硝化菌份额, 缩短硝化时间, 从而提高污水处理厂的硝化效率^[4]。

但是由于污泥水和一般城市污水水质存在较大的差异(温度和氮浓度差别较大), 所以利用污泥水培养出的硝化菌的群落结构及动力学特性(温度影响因子、基质半饱和和常数等)可能会存在较大差异,

而硝化菌添加会突然改变它们所处的温度和基质浓度条件, 温度骤降会导致细菌的生理学变化, 比如细胞膜流动性降低、细菌中酶的活性也存在适应性问题等^[5], 基质浓度的降低也会降低添加细菌中基质亲和力差(即半饱和和常数大)的一些细菌的硝化性能, 所以硝化菌的群落结构及动力学特性将决定着这些硝化菌在添加后能否在污水处理系统中存活并发挥其硝化功能。因此, 本研究利用荧光原位杂交技术对污泥水富集的硝化菌的群落结构进行分析, 同时, 分别对氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌在10~40℃之间的温度修正系数 τ_N 和20℃的基质半饱和和常数 K_N 进行测定。

收稿日期: 2008-07-30; 修订日期: 2008-10-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z335)

作者简介: 于莉芳(1981~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为废水生物处理, E-mail: yulifang81@163.com

* 通讯联系人, E-mail: dcpeng@xauat.edu.cn

1 材料与方法

1.1 反应器

反应器的有效容积为 5 L, 运行条件: 温度为 30℃, HRT 为 30 h, SRT 为 7 d. 每天循环 4 个周期, 每周期进水量为 1 L, 循环时间为 6 h, 其中包括: 进

水 2 min, 缺氧搅拌 48 min, 好氧曝气 250 min, 沉淀 45 min, 排水 5 min, 闲置 10 min.

反应器的接种污泥及污泥水均取自西安市邓家村污水处理厂. 在本实验进行前, 反应器已运行 2 a. 表 1 为实验期间的污泥水水质(平均浓度).

1.2 荧光原位杂交

表 1 污泥水的水质/mg•L⁻¹
Table 1 Reject water quality/mg•L⁻¹

水质指标	pH	碱度(以 CaCO ₃ 计)	SS	VSS	NH ₄ ⁺ -N	TKN	TCOD	SCOD	PO ₄ ³⁻ -P	TP
平均浓度	7.14	3034.7	2461	1385	625.9	812.3	1948.9	455.3	66.6	103.0

荧光原位杂交样品取样在反应器曝气停止前进行. 样品用 1 × PBS 缓冲溶液洗涤 3 次, 然后用 4% 的多聚甲醛固定 2 h, 再用 1 × PBS 缓冲溶液洗涤 3 次^[6]. 稀释后对样品进行超声处理(35 W 超声 5

min)^[7]. 细胞原位杂交采用荧光标记的 rRNA 探针由奥科生物公司合成, 实验中采用的探针序列及杂交条件见表 2, 其中氨氧化细菌采用 FAM 标记, 亚硝酸盐氧化细菌采用 HEX 标记.

表 2 荧光原位杂交所用的探针及对应杂交条件
Table 2 Probes used for FISH and the corresponding hybridization conditions

探针名称	探针序列(5' - 3')	专一性	浓度 ¹⁾ /%	文献
NSO1225	CGCCATGTATTACGTGTGA	Ammonia oxidizing beta-proteobacteria	35	[9]
Nsv443	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	Nitrosospira	30	[9]
Nmv	TCCTCAGAGACTACGCGG	Nitrosococcus mobilis	35	[10]
Ntspa662	GGAATTCCGCGCTCCTCT	Nitrospira	35	[11]
NIT3	CCTGGCTCCATGCTCCG	Nitrobacter	40	[12]
Ntcoc206	CGGTGCGAGCTTGCAAGC	Nitrococcus mobilis	10	[13]
Ntspn693	TTCCCAATATCAACGCATT	Nitrospina gracilis	20	[13]

1) 杂交缓冲溶液中甲酰胺的质量浓度

样品杂交后用封片剂封片, 并在荧光显微镜下观察(Olympus BX51, 1 000 ×). 硝化菌的定量是根据文献[8]中所描述的方法进行计数. 每个样品、每种探针随机采取 10 ~ 20 个视野进行分析.

本实验阶段共进行 2 次荧光原位杂交分析, 最终数据为 2 次实验平均值.

1.3 温度修正系数 τ_N 的测定

温度对氨氧化速率和亚硝酸盐氧化速率的影响是将反应器中取出的污泥在 5 min 内从 30℃ 升高或降低到 10、15、20、25、30、35 和 40℃, 然后在不同的温度条件下分别测定污泥的氨氧化速率和亚硝酸盐氧化速率, 温度影响因子 K_T 根据阿累尼乌斯方程模拟得出, 从而计算出温度修正系数 τ_N .

活性污泥的氨氧化速率、亚硝酸氧化速率的测定采用间歇实验法, 氨氧化速率检测氨氮消耗速率, 初始浓度在 80 mg/L 左右; 亚硝酸氧化速率检测亚硝酸盐氮的消耗速率初始浓度设定在 70 mg/L 左右. 速率测定过程中, pH 维持在 7.8 左右, DO 在 4 mg/L

以上.

1.4 基质半饱和常数 K_N 的测定

基质半饱和常数是不同初始浓度(0 ~ 80 mg/L)下的氨氧化速率和亚硝酸盐氧化速率, 然后根据 Monod 方程模拟得出. 速率测定过程中温度控制在 (20 ± 0.5)℃.

2 结果与讨论

2.1 硝化菌群落结构分析

Mobarry 等^[9]于 1996 年报道 NSO1225 探针涵盖了所有变形菌纲(Proteobacteria)β 亚纲中已测得的氨氧化细菌, 包括 Nitrosomonas、Nitrosococcus mobilis、Nitrosospira、Nitrosolobus、Nitrosovibrio. 所以实验中以 NSO1225 探针标记的细菌数量表示氨氧化细菌总数量. 亚硝酸盐氧化细菌的总数是以 Ntspa662、NIT3、Ntcoc206 和 Ntspn693 所标记的细菌数量的总和表示. 表 3 为污泥中各硝化菌占细菌总数(DAPI 染色)的比例.

由表 3 可以看出, *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* 为氨氧化菌的优势菌属, 占氨氧化细菌总数的 63%; 氨氧化螺旋菌属约占 19%. 亚硝酸盐氧化菌的优势菌属为 *Nitrobacter*, 占 NOB 的 64%; 硝酸螺旋菌属 *Nitrospira*, 占 NOB 的 35%; 硝酸球菌属 *Nitrococcus mobilis*, 占 NOB 的 1% 左右, 而硝酸刺菌属 *Nitrospina gracilis* (Ntspn693/DAPI) 在 2 次分析中均未检测到.

表 3 污泥中各类硝化菌的数量占细菌总数(DAPI)的百分比

Table 3 AOB and NOB populations in the sludge, percentage relative to DAPI

项目	硝化菌	占细菌总数的比例
AOB	<i>Nitrosococcus</i> (Nm _v)	9.86% (±2.1%)
	<i>Nitrospira</i> (N _{sp} 443)	2.94% (±2.7%)
	Total AOB (N _{so} 1225)	15.7% (±3.7%)
NOB	<i>Nitrobacter</i> (N _{IT} 3)	8.3% (±1.3%)
	<i>Nitrospira</i> (N _{spa} 662)	4.5% (±1.8%)
	<i>Nitrococcus</i> (N _{tcoc} 206)	0.2% (±0.1%)
	<i>Nitrospina</i> (N _{tspn} 693)	— ¹⁾
	Total NOB	12.9% (±3.2%)
AOB + NOB		28.6% (±6.9%)
AOB/NOB		1.22

1)未检测到信号

这些测定结果类似于 Salem 等^[14]的报道, BABE 工艺中污泥水富集的 AOB 和 NOB 的优势菌种分别为 *Nitrosococcus mobilis* 和 *Nitrobacter*.

由于 *Nitrosospira*、*Nitrospira* 具有相对较低的比增长速率, 但对基质的亲和力大, 对应的半饱和和常数 K_s 值较小, 属于生态学上的 K-Strategist, 在氨氮浓度较低的环境下, 具有竞争优势, 将成为优势菌群. 而 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis*、*Nitrobacter* 具有较高的比增长速率, 但对基质的亲和力小, 对应的半饱和和常数 K_s 值较高, 属于生态学上的 r-Strategist, 只有当氨氮浓度较高的环境下, 才能竞争为优势菌群^[15~18]. 实验中采用 SBR 法处理高氨氮的污泥水时所富集的硝化菌中, *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis* 和 *Nitrobacter* 分别为 AOB、NOB 的优势菌属, 与上述 K/r 假说相符. 但是同污水处理厂中污泥的硝化菌群落结构是存在一定差异, *Nitrosospira* 与 *Nitrosomonas* 在污水处理厂中共存^[19] 而 *Nitrospira* spp. 为污水处理厂活性污泥中 NOB 的优势菌属^[20]. 因此, 硝化菌富集过程中应增加基质亲和力较强的 *Nitrosospira* 与 *Nitrospira* spp. 的份额.

2.2 温度修正系数 τ_N

污泥水的温度一般比城市污水的温度高 10 ~ 20℃左右, 如果培养的硝化菌不能适应这种温度的骤降(cold-shock), 将迅速流失或者衰减.

图 1 和图 2 分别为氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌在 10 ~ 35℃之间测得的氨氧化速率和亚硝酸盐氧化速率. 氨氧化速率和亚硝酸盐氧化速率的温度影响因子 K_T 和温度修正系数 τ_N 可以根据 Arrhenius 方程模拟得出^[21]:

$$r = r_{20} \cdot e^{K_T(T-20)} = r_{20} \cdot \tau_N^{T-20}$$

由图 1 可以看出, 最大氨氧化速率在 35℃左右, 这与用 *Nitrosomonas* 纯菌研究得出的在 35℃左右取得最大活性相接近^[22]. 氨氧化速率的温度影响因子 K_T 为 0.087 7℃⁻¹, 温度修正系数 τ_N 为 1.092. 所得结果接近与文献中所报道的常规污水厂中硝化菌的温度校正系数 1.076 ~ 1.127^[21, 23]. 因此富集的氨氧化菌在温度适应性上与常规污水处理厂的氨氧化菌没有明显差异.

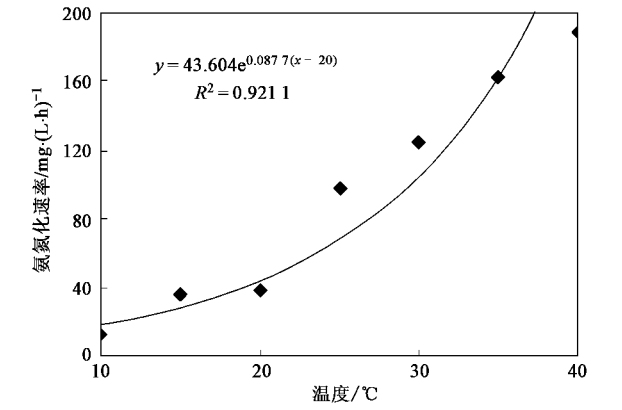


图 1 温度对氨氧化速率的影响
Fig.1 Effect of temperature on the AOR

由图 2 可以看出, 最大亚硝酸盐氧化速率在 30℃左右, 而亚硝酸盐氧化速率在 10℃和 35℃则明显低于根据阿累尼乌斯方程计算的理论值, 说明亚硝酸盐氧化细菌的活性 10℃和 35℃时已受到一定的抑制. 虽然污泥中亚硝酸盐氧化菌的优势菌属为 *Nitrobacter*, 但是最佳生长温度与 *Nitrobacter* 纯菌研究得出的在 38℃左右取得最大活性这一结果相差较大^[22], 而与 *Nitrospira* 的最佳生长温度 30 ~ 35℃比较接近^[15]. 亚硝酸盐氧化速率的温度影响因子 K_T 为 0.059 4℃⁻¹, 温度修正系数 τ_N 为 1.061, 与 *Nitrobacter* 的 1.057 和 *Nitrospira* 的温度修正系数 1.053 接近^[15]. 因此富集的亚硝酸盐氧化菌与常规污水处理厂的氨氧化菌在 15 ~ 30℃这一范围, 温度

适应性上没有明显差异。

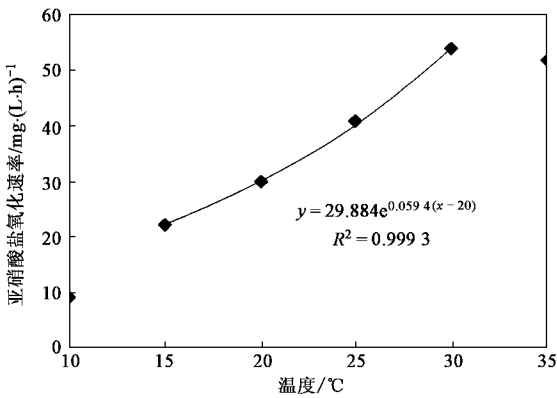


图 2 温度对亚硝酸盐氧化速率的影响
Fig.2 Effect of temperature on the NUR

此外,由氨氧化速率和亚硝酸氧化速率随温度的变化关系可以看出,利用污泥水进行硝化菌培养的最高温度不宜超过 30℃,否则有可能会降低亚硝酸盐氧化菌的富集效果,添加后会导致污水处理系统出现氨氧化速率和亚硝酸盐氧化速率不匹配,出水中亚硝酸盐浓度会增加.而对于温度过低的污水处理系统进行硝化菌添加强化硝化,添加的效率也会出现较大幅度的下降.

2.3 基质半饱和和常数 K_N

对于以氨氮为限制性基质的氨氧化反应,氨氧化速率可以用修正的 Monod 方程来表示:

$$r = r_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

式中,氨氧化速率的基质半饱和和常数以 $K_{\text{NH}_4^+ - \text{N}}$ 表示.

对于以亚硝酸盐为限制性基质的亚硝酸盐氧化反应,亚硝酸盐氧化速率与亚硝酸盐浓度也可有类似的关系,其基质半饱和和常数以 $K_{\text{NO}_2^- - \text{N}}$ 表示.

20℃时,污泥在不同初始浓度下的氨氮氧化速率见图 3,图中的曲线是根据 Monod 方程模拟得出.实验中测得的氨氧化菌的基质半饱和和常数 $K_{\text{NH}_4^+ - \text{N}}$ (以 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 计)为 $(1.60 \pm 0.29) \text{ mg/L}$,处在常规污水处理厂中氨氧化细菌在 20℃的基质半饱和和常数(以 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 计)为 0.2 ~ 3.6 mg/L 范围中^[22].虽然氨氧化菌的优势菌为 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis*,但是富集的硝化菌与 *Nitrosomonas europaea* 的基质半饱和和常数(以 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 计)26.6 mg/L 相差很大,而与 *Nitrosospira* 的基质半饱和和常数(以 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 计)1.96 mg/L 接近^[25].

图 4 为不同亚硝酸盐浓度下的亚硝酸盐氧化速

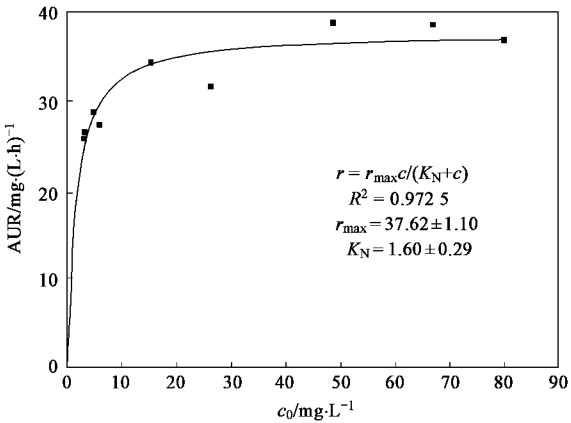


图 3 氨氧化菌基质半饱和和常数
Fig.3 Ammonia half-saturation constant of AOB

率.实验中测得亚硝酸盐氧化菌的基质半饱和和常数 $K_{\text{NO}_2^- - \text{N}}$ (以 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 计)为 $(2.78 \pm 0.30) \text{ mg/L}$.这个值处于 *Nitrobacter* 的基质半饱和和常数(以 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 计)7.0 mg/L 和 *Nitrospira* 的基质半饱和和常数(以 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 计)0.14 mg/L 之间^[26],因此,这些亚硝酸盐氧化菌在添加到污水处理系统后,很可能只有在基质浓度较高的情况下充分发挥其活性,可以有效地提高污水处理厂对抗冲击负荷能力,但是在基质浓度较低时,这些亚硝酸盐氧化菌中的 *Nitrobacter* spp. 则既可能随水流失或者在系统中迅速衰减.而对于大多数污水处理系统而言,生物处理系统中的亚硝酸盐氮浓度比较低,因此,在利用污泥水培养硝化菌的过程中,应尽量增加其中 *Nitrospira* spp. 的份额.

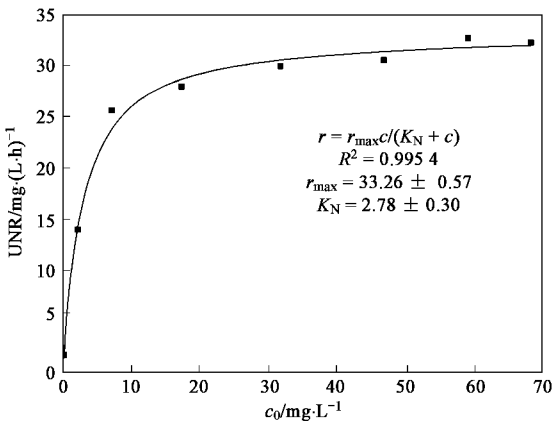


图 4 亚硝酸盐氧化菌基质半饱和和常数
Fig.4 Nitrite half-saturation constant of NOB

3 结论

(1) 在温度为 30℃, A/O 比为 1/5 的条件下,采用 SBR 法处理污泥水并培养的污泥中氨氧化菌的含量

(AOB/DAPI)为 $15.7\% \pm 3.7\%$, 氨氧化菌的优势菌属为 *Nitrosomonas europaea*-*Nitrosococcus mobilis*; 亚硝酸氧化菌的含量 (NOB/DAPI) 为 $14.9\% \pm 4.2\%$, 亚硝酸盐氧化菌的优势菌属为 *Nitrobacter* spp. .

(2) 氨氧化速率在 $10 \sim 40^\circ\text{C}$ 之间的温度修正系数 τ_N 为 1.092, 与一般文献中的值接近. 亚硝酸盐氧化速率在 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 之间的温度修正系数 τ_N 为 1.061. 因此, 富集的硝化菌在温度适应性上与常规污水处理厂中的硝化细菌无明显差异.

(3) 氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌在 20°C 的基质半饱和和常数 K_N 分别为 1.60 mg/L、2.78 mg/L. 从动力学角度考虑, 在利用污泥水来培养硝化菌时, 应尽量增加其中可以在低基质环境下能有利生长的 *Nitrosospira* 和 *Nitrospira* 的份额, 从而降低污水处理系统中出水氨氮和亚硝酸盐氮浓度.

参考文献:

- [1] Berends D, Salem S, van der Roest H, *et al.* Boosting nitrification with the BABE technology[J]. Wat Sci Tech, 2005, **52**(4): 63-70.
- [2] Gil K, Choi E. Nitrogen removal by recycle water nitrification as an attractive alternative for retrofit technologies in municipal wastewater treatment plants [J]. Wat Sci Tech, 2004, **49**(5-6): 39-46.
- [3] Head M, Melanie A, Oleszkiewicz J. Nitrifying bacteria addition into reactors operating near washout conditions for nitrification [J]. J Environ Eng Sci, 2005, **4**(4): 257-264.
- [4] 于莉芳, 王圣伟, 郭天赐, 等. 污泥水富集硝化菌和强化城市污水低污泥龄硝化[J]. 环境科学, 2008, **29**(2): 332-337.
- [5] Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Brock biology of microorganisms [M]. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- [6] Amann R I. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes [A]. In: Molecular Microbial Ecology Manual [C]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. 1-15.
- [7] Manser R, Gujer W, Siegrist H. Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems [J]. Wat Res, 2006, **40**(2): 2416-2426.
- [8] Manser R, Muche K, Gujer W, *et al.* A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge [J]. Wat Res, 2005, **39**(8): 1585-1593.
- [9] Mobarry B K, Wagner M. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**(6): 2156-2162.
- [10] Pommerening R A, Rath G, Koops H P. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas* [J]. Syst Appl Microbiol, 1996, **19**(3): 344-351.
- [11] Daims H, Nielsen J L, Nielsen P H, *et al.* In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(11): 5273-5284.
- [12] Wagner M, Rath G, Koops H P, *et al.* *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants [J]. Wat Sci Tech, 1996, **34**(1): 237-244.
- [13] Juretschko S. Mikrobielle populations struktur und-dynamik in einer nitrifizierenden /denitrifizierenden Belebtschlammanlage [D]. Germany: Technische Universitat München, 2000.
- [14] Salem S, Berends D, Heijnen J. Model-based evaluation of a new upgrading concept for N-removal [J]. Wat Sci Tech, 2002, **45**(6): 169-176.
- [15] Blackburne R, Vadivelu V M, Yuan Z, *et al.* Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter* [J]. Wat Res, 2007, **41**(14): 3033-3042.
- [16] Kim D, Kim S. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics [J]. Wat Res, 2006, **40**(3): 887-894.
- [17] Manser R, Gujer W, Siegrist H. Membrane bioreactor versus conventional activated sludge system: population dynamics of nitrifiers [J]. Wat Sci Technol, 2005, **52**(10/11): 417-425.
- [18] Schramm A, De Beer D, Gieseke A, *et al.* Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm [J]. Environ Microbiol, 2000, **2**(6): 680-686.
- [19] Coskuner G, Curtis T P. *In situ* characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* spp. [J]. J Appl Microbiol, 2002, **93**(3): 431-437.
- [20] Harms G, Layton A C, Dionisi H M, *et al.* Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant [J]. Environ Sci Technol, 2003, **37**(2): 343-351.
- [21] Downing A L, Hopwood A P. Some observations on the kinetics of nitrifying activated-sludge plants [J]. Schweizerische Zeitschrift Fur Hydrologie, 1964, **26**: 271-288.
- [22] Grunditz C, Dalhammar G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* [J]. Wat Res, 2001, **35**(2): 433-440.
- [23] Painter H A, Loveless J E. Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated sludge process [J]. Wat Res, 1983, **17**(3): 237-248.
- [24] Tchobanoglous G, Burton F L, Stensel H B. Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse [M]. Metcalf & Eddy, Inc. Irwin/McGraw-Hill. USA, 1991.
- [25] Taylor A E, Bottomley P J. Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* spp. AV in soils at different solution concentrations of ammonium [J]. Soil Biol Biochem, 2006, **38**(4): 828-836.
- [26] Schramm A, Beer D, Heuvel J C, *et al.* Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microelectrode [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **67**(9): 3690-3696.