

汪彩华, 郑平, 唐崇俭, 等. 2011. 硝化污泥保藏特性的研究 [J]. 环境科学学报, 31(3): 560-566

Wang C H, Zheng P, Tang C J *et al.* 2011. Influence of storage on the characteristics of nitrifying sludge [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 31(3): 560-566

硝化污泥保藏特性的研究

汪彩华^{1,2}, 郑平^{1,*}, 唐崇俭¹, 陈建伟¹

1. 浙江大学环境工程系, 杭州 310029

2. 北京天地人环保科技有限公司, 北京 100176

收稿日期: 2010-06-15

修回日期: 2010-08-02

录用日期: 2010-08-26

摘要: 研究了不同保藏方法对硝化污泥硝化活性和相关性状的影响. 结果表明, 不同饥饿保藏条件下, 各种方法下的硝化活性均呈指数衰减, 自然环境、4℃、-20℃、-20℃加 15% 体积甘油方法下的活性衰减速率分别为 0.012 d^{-1} 、 0.021 d^{-1} 、 0.019 d^{-1} 、 0.013 d^{-1} , 半衰期分别为 1.71、1.09、1.22、1.62 个月. 保藏 5 个月后, 4 种方法下的硝化污泥活性保留率分别为 16.0%、13.6%、20.8%、20.4%, 菌体保留率分别为 41.5%、47.6%、52.2% 和 53.6%. 保藏过程对硝化细菌的 ATP 含量、血红素 c 含量、SV 值均产生影响. 随着保藏时间的延长, 低温下污泥中的丝状菌比例增加, 絮体结构更加紧密, 硝化污泥变黑速度减慢, 而自然环境中丝状菌消失, 絮体结构解体, 硝化污泥迅速变黑.

关键词: 硝化污泥; 保藏方法; 保藏特性

文章编号: 0253-2468(2011) 03-560-07

中图分类号: X703

文献标识码: A

Influence of storage on the characteristics of nitrifying sludge

WANG Caihua^{1,2}, ZHENG Ping^{1,*}, TANG Chongjian¹, CHEN Jianwei¹

1. Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029

2. Beijing TDR Environ-Tech Co., Ltd., Beijing 100176

Received 15 June 2010

received in revised form 2 August 2010

accepted 26 August 2010

Abstract The preservation characteristics of nitrifying sludge under different storage methods were investigated. Under starvation conditions in the natural environment compared to 4℃, -20℃ and -20℃ with 15% glycerol, the decay rate of nitrifying activity was 0.012 d^{-1} , 0.021 d^{-1} , 0.019 d^{-1} and 0.013 d^{-1} , and the half-life was 1.71, 1.09, 1.22 and 1.62 months respectively. After 5 months' storage, the remaining relative activity and relative biomass were 16.0%, 13.6%, 20.8%, 20.4% and 41.5%, 47.6%, 52.2%, 53.6%, respectively. During storage, the heme c and ATP contents declined and the SV also decreased with the decrease of activity. When storage time was extended at low temperature, filamentous bacteria dominated in the sludge, the biomass structure became integrated, and the nitrifying sludge changed to black gradually. Under natural conditions, filamentous bacteria decreased, the sludge structure became loose, and the nitrifying sludge turned black rapidly.

Keywords nitrifying sludge; storage methods; preservation characteristics

1 引言 (Introduction)

随着低碳高氮废水排放量的急剧增加, 传统生物脱氮工艺已无法满足实用要求, 研发新型生物脱氮技术势在必行. 短程硝化反硝化工艺是在此背景下应运而生的一种新型生物脱氮工艺, 不但可较传统硝化反硝化工艺节省 25% 的需氧量和 40% 的有机碳源 (郑平等, 2004), 而且可与厌氧氨氧化工艺

等组合, 开发其它新型生物脱氮工艺. 硝化细菌是短程硝化的承载者 (Park and Noguera 2007; Schramm *et al.*, 1996), 其数量和活性决定了硝化作用的潜力. 但是, 硝化细菌代时较长, 对氧气、pH、温度等环境条件较敏感, 导致硝化工艺的启动相对困难 (Okabe *et al.*, 1999). 随着废水生物脱氮工程的普及, 对高效硝化菌种的需求日益增大, 如何经济有效地扩增和保藏高效硝化菌种即成了人们关

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (863) (No. 2009AA06Z311, 21037001); 国家自然科学基金项目 (No. 30770039)

Supported by the High-Tech Research and Development Program of China (No. 2009AA06Z311) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30770039)

作者简介: 汪彩华 (1983—), 女, E-mail: wch031@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: pzhen@zju.edu.cn

Biography WANG Caihua (1983—), female, E-mail: wch031@163.com; * **Corresponding author**, E-mail: pzhen@zju.edu.cn

注的焦点.

硝化细菌属中温菌,低温可降低硝化细菌的代谢活性,常用于纯种保藏,然而有关混合菌种的低温保藏,迄今报道很少(Vlaeminck *et al.*, 2007; Laurin *et al.*, 2006; Vogelsang *et al.*, 1999).在废水处理工程上,混合菌种产出后,通常处于放任饥饿状态,因此探明饥饿情况下温度对硝化细菌活性的影响,将有助于硝化菌种的保藏和应用.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 试验材料

试验所用硝化污泥取自浙江某企业短程硝化池(总容积 2.5 m^3),该反应器采用模拟废水运行,并已在自然环境温度下稳定运行一年半,模拟废水成分详见参考文献(陈建伟, 2010).

2.2 保藏试验

硝化污泥用自来水洗涤三次后自然沉降滗水,在4个1L的玻璃瓶(R1、R2、R3、R4)中分装800 mL沉降滗水后的硝化污泥和100 mL模拟废水,使最终氨氮浓度为 5 mmol L^{-1} ,污泥浓度为 19.72 g L^{-1} (以SS计)、 13.48 g L^{-1} (以VSS计).模拟废水成分为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g L^{-1} , KHCO_3 2.0 g L^{-1} , KH_2PO_4 0.01 g L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0056 g L^{-1} ,微量元素I、II各 1 mL L^{-1} .4个玻璃瓶(R1、R2、R3、R4)用铝箔封口后采取不同的方法保藏,其中R1、R2、R3分别置于自然环境、 4°C 和 -20°C 下保藏,R4加入15%体积甘油后置于 -20°C 下保藏,每隔1个月取硝化污泥测定活性和其它相关指标.

2.3 活性测定

活性测定所用的模拟废水成分同上,氨氮浓度为 50 mg L^{-1} ,pH控制在7.7~7.8.每20 mL模拟废水中加入2.5 g湿硝化污泥后曝气2 min使溶解氧达到饱和,再在 30°C 下用溶解氧自动记录仪记录溶解氧的消耗情况,每隔2 s记录1次,直至溶解氧降为 0.5 mg L^{-1} .另设不加基质的对照试验,用同样的方法测定硝化污泥的耗氧速率.

2.4 测定项目与方法

SV、SS、VSS(总菌体量):标准法测定;活菌量:MPN法测定(郑平, 2005);COD: EVOVI ET99718 COD仪快速测定;pH: pH-9V型酸度计测定;DO: YSI 58型溶解氧仪测定(外接自动记录仪);硫化物:亚甲基蓝分光光度法测定;硫酸盐:铬酸钡分光

光度法测定.

ATP-荧光素酶法(姚槐应等, 2005; Thore and Lundin, 1983).取1 g湿硝化污泥于2 mL双蒸水中制成菌悬液,再于沸水浴中煮1 h的4.5 mL提取剂(20 mmol L^{-1} Tris, 2 mmol L^{-1} EDTA, pH 7.75)中加入0.5 mL菌悬液,共同煮10 min,冷却后于 $10000\text{ g } 4^\circ\text{C}$ 条件下离心4 min,取上清液待用. 25°C 下,向2 mL计数瓶中加入1 mL缓冲液(0.05 mol L^{-1} Tris-HA, 0.01 mol L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mmol L^{-1} EDTA, pH 7.75)后,再加入样品提取液、荧光素和荧光素酶,混合后立即于荧光分光光度计中测定发光值.

血红素:吡啶血红素分光光度法.取1 g湿硝化污泥悬浮于25 mL 10 mmol L^{-1} 、pH = 7.5的磷酸缓冲液中,再于800 W功率下超声破碎20 min,最后于 $15000\text{ g } 4^\circ\text{C}$ 条件下离心15 min,取上清液进行测定,测定方法详见文献(Berry, 1987).

扫描电镜观察:取适量混培物样品于2.5%戊二醛溶液中 4°C 固定过夜,经 0.1 mol L^{-1} pH = 7.0磷酸缓冲液洗涤扫描电镜观察:取适量混培物样品于2.5%戊二醛溶液中 4°C 固定过夜,经 0.1 mol L^{-1} pH = 7.0磷酸缓冲液洗涤3次后用1%锇酸溶液固定1~2 h,接着用 0.1 mol L^{-1} pH = 7.0磷酸缓冲液洗涤3次,再用梯度浓度乙醇(包括50%、70%、80%、90%和100%)进行脱水处理,脱水处理后的样品用1:1乙醇醋酸异戊酯处理30 min,用纯醋酸异戊酯处理1~2 h最后将样品置于临界点干燥,镀膜后用XL30型环境样品扫描电镜(荷兰Philips公司)观察结果.

3 结果 (Results)

3.1 不同保藏方法对硝化活性和总菌体量的影响

3.1.1 不同保藏方法对硝化活性的影响 硝化细菌属中温菌,降低温度会影响硝化细菌的代谢活性.不同温度下硝化细菌活性随保藏时间的变化情况如图1所示.从图1可以看出,在保藏过程中,硝化细菌活性呈指数衰减,活性衰减速率和半衰期见表1.与保藏前的硝化活性相比,在保藏的前3个月,R1、R2、R3、R4的硝化活性分别下降了70.8%、74.5%、70.3%、74.3%;在后续2个月中,4种保藏方法下的硝化活性衰减速率均趋缓,第5个月内4种保藏方法下的硝化活性仅分别比上个月下降0.7%、0.2%、2.4%、0.2%,硝化细菌的活性保留率

分别为 16 0%、13. 6%、20 8% 和 20 4% .

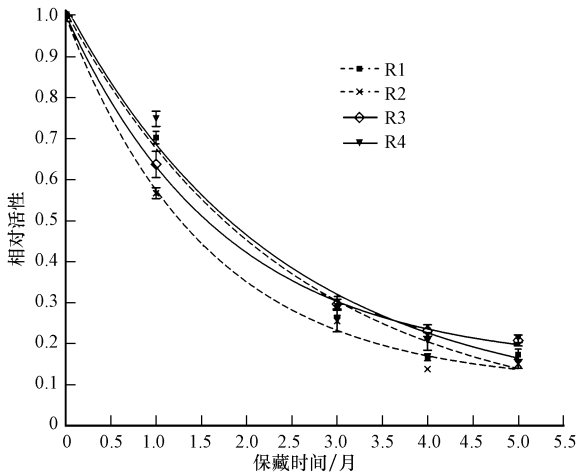


图 1 硝化活性随保藏时间的变化情况
Fig 1 Nitrifying bacteria activity during storage

表 1 不同保藏方法下硝化活性衰减速率和半衰期
Table 1 The decay rate and half-life of nitrifying bacteria activity under different preservation conditions

保藏方法	衰减速率 k /d ⁻¹	半衰期 /月	R^2
R1	0.013	1.71	0.9897
R2	0.021	1.09	0.9933
R3	0.019	1.22	0.9932
R4	0.014	1.62	0.9732

3 1 2 不同保藏方法对总菌体量的影响 保藏过程中, 4种方法下的总菌体量变化如图 2所示. 从图 2可以发现, 不同保藏方法间的菌体衰减情况也彼此不同. 在整个保藏期, R3和 R4几乎一直呈线性下降, R1和 R2则先线性下降后趋于稳定, 但从总体上看, R3和 R4的衰减速率始终小于 R1和 R2 与保藏前的总菌体量相比, 在保藏的前 4个月, R1、R2、R3、R4的总菌体量分别下降了 55. 9%、50. 1%、33. 5%、24. 3%; 第5个月内R1、R2的菌体量仅分

别比第 4个月下降 2. 6%、2. 3%, R3、R4的菌体量则分别比第 4个月下降 14. 3%、22. 1%. 保藏过程中, 菌体保留率一直为 R4 > R3 > R2 > R1, 表明低温有利于菌体保留.

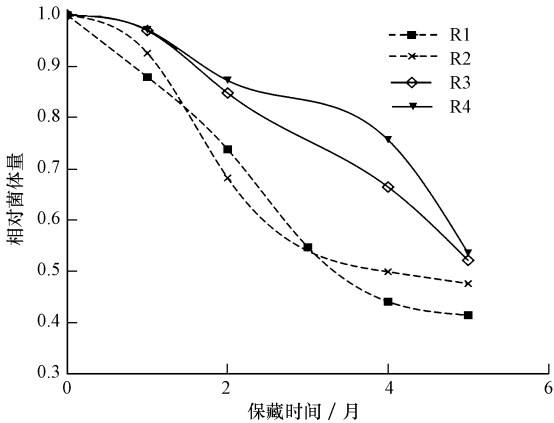


图 2 总菌体量随保藏时间的变化
Fig 2 The change of total biomass during preservation

3 2 不同保藏方法对硝化污泥性状的影响
3 2 1 不同保藏方法对生化性状的影响 血红素是硝化细菌中血红蛋白的重要辅基, ATP则是硝化细胞中重要的能量载体, 因此两者的含量可以反映硝化细菌的生理状况. 饥饿保藏时, 硝化污泥中血红素 c和 ATP含量保留率与时间的关系见表 2

从表 2可以看出, 饥饿保藏过程中, 各种方法下的硝化污泥血红素 c含量和 ATP含量均随硝化活性的下降而下降, 且两者的衰减速率均随硝化活性衰减速率的变化而变化, 但两者的总体衰减速率要小于硝化活性的总体衰减速率. 硝化污泥血红素 c含量和 ATP含量与硝化活性间的相关性表明, 硝化污泥血红素 c含量和 ATP含量均可用于定性的表示硝化污泥的硝化活性, 但两者与硝化活性间均不具有线性相关性, 这一现象也同时发现于本实验室的其它试验中.

表 2 保藏过程中硝化污泥血红素 c和 ATP含量保留率的变化
Table 2 The change of heme c and ATP during preservation

保藏时间 /月	血红素 c相对量				ATP相对量			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
0	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
2					76.3%	74.2%	82.0%	65.3%
3	-	81.9%	76.8%	95.7%				
4	-	60.1%	70.4%	91.5%	63.9%	51.2%	72.2%	57.1%
5	-	59.6%	61.1%	70.3%	52.1%	49.4%	62.4%	48.7%

注: R1硝化污泥保藏 3个月完全变黑, 其中的血红素 c无法测出.

3 2 2 不同保藏方法对物理性状的影响 污泥沉降性能是影响反应器中污泥停留效率的重要因素, 污泥沉降性能随保藏时间的变化情况如图 3 所示.

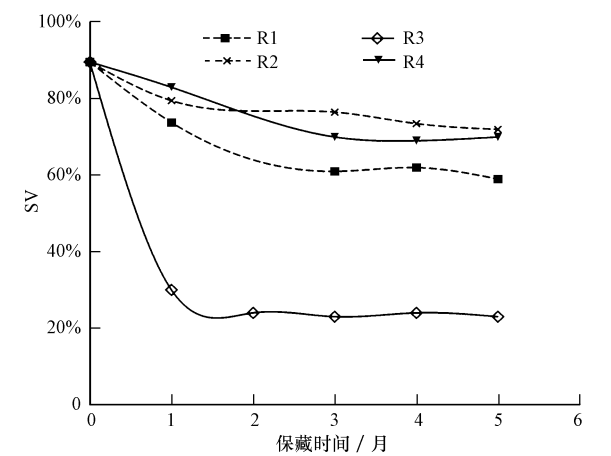


图 3 硝化污泥沉降性随保藏时间的变化
Fig 3 The change of SV during preservation

在保藏的前 2 个月, 各种保藏方法下的硝化污泥 SV 值均变小, 而保藏至 3 个月, 硝化污泥 SV 值均趋于稳定. 即使 - 20℃ 保藏下第 1 个月内的硝化污泥沉降性能变化很大, 后期同样趋于稳定.

3 2 3 不同保藏方法对形态结构的影响 保藏过程中, 硝化污泥颜色发生明显变化. 从图 4 可以看出, 在 - 20℃ 加有 15% 体积甘油的条件下, 硝化污泥颜色与保藏前没有区别, 但在自然环境温度下, 污泥颜色由下到上逐渐变黑, 且在自然环境温度下污泥颜色变化更快, 即硝化污泥变黑速度随温度的降低而降低. 测定硝化污泥中的硫化物含量发现, 污泥中的硫化物含量与颜色变化成正相关, 硫化物含量越高, 硝化污泥颜色越黑, 表明硝化污泥变黑的主要原因是缺氧条件下硫酸盐被还原为硫化物所致, 且低温可抑制硫化物的形成. 考察活性和颜色之间的关系发现, 硝化污泥活性与颜色之间没有直接关系, 说明难以用颜色变化来指示硝化活性的变化.

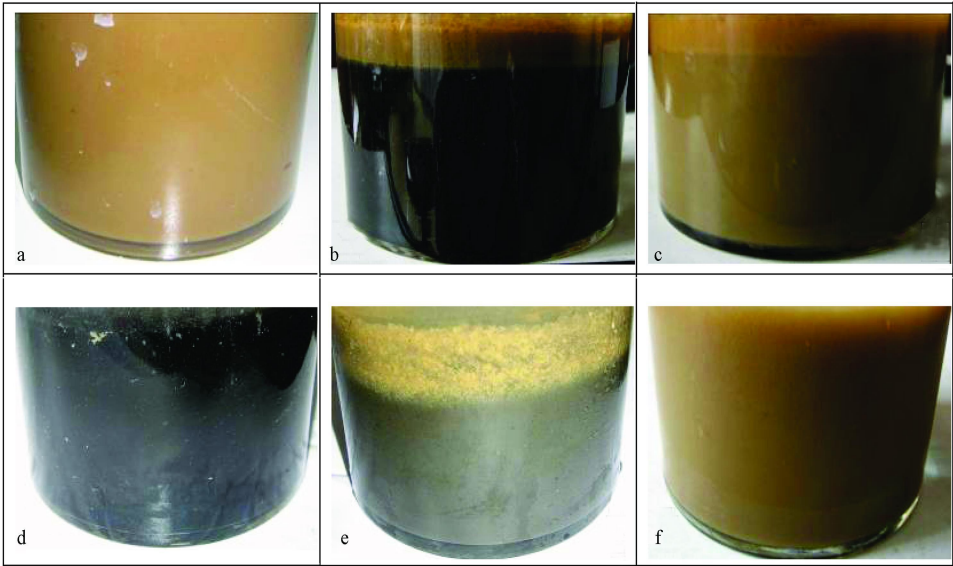


图 4 污泥颜色随保藏时间的变化 (a 保藏前颜色; b、c 分别为 R1 和 R2 保藏 2 个月后的颜色; d、e、f 分别为 R1、R2 和 R4 保藏 5 个月后的颜色)
Fig 4 The change of colour during storage period (a before preservation; b、c the colour of R1 and R2 after two months preservation; d、e、f the colour of R1, R2 and R4 after five months preservation)

从图 5 可以看出, 保藏前硝化污泥中以球菌占优, 仅存在少量的丝状菌; 而随饥饿时间的延长, 自然环境温度下硝化污泥中的丝状菌逐渐减少, 絮体结构逐渐变得松散 (图 5b), 至第 5 个月时丝状菌完全消失, 菌胶团失去明显的边界 (图 5c); 低温下, 随

着饥饿保藏时间的延长, 硝化污泥中丝状菌不仅没有减少反而增加, 但在不同保藏方法中絮体结构又有所不同, 4℃ 和 - 20℃ 下的絮体结构较保藏前更加紧密 (图 5d 和 5e), 而 - 20℃ 加有 15% 体积甘油下的絮体结构较保藏前则变得更松散 (图 5f).

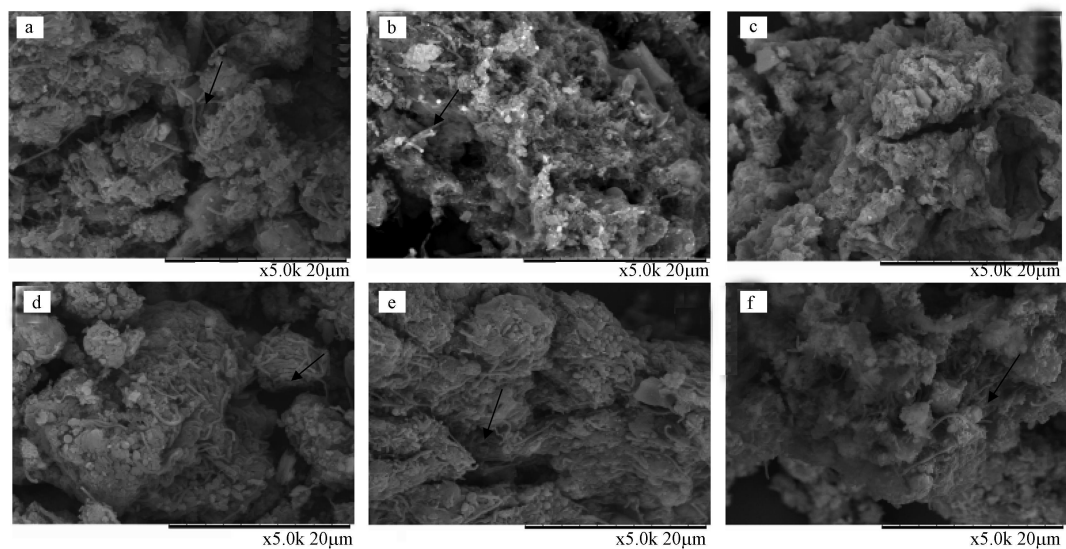


图 5 保藏过程中硝化污泥结构的电镜扫描照片 (a 保藏前; b、c 分别为 R1保藏 2个月和 5个月后的结构; d、e、f 分别为 R2、R3和 R4保藏 5个月后的结构)

Fig 5 The change of nitrifying sludge structure under SEM (a before preservation, b、c the structure of R1 after preservation for 2 and 5 months; d、e、f the structure of R2、R3 and R4 after preservation for 5 months)

4 讨论 (Discussion)

饥饿状态下, 温度对硝化污泥活性产生很大影响. 在所试的不同保藏方法中, 硝化污泥活性均呈指数衰减, 且保藏 4 个月后保留的硝化活性趋于稳定, 自然环境温度、4℃、- 20℃和 - 20℃加 15% 体积甘油方法下的硝化活性衰减速率分别为 0. 012 d⁻¹、0. 021 d⁻¹、0. 019 d⁻¹、0. 013 d⁻¹, 半衰期分别为 1. 71、1. 09、1. 22、1. 62 个月, 保藏 5 个月后, 不同保藏方法下的硝化活性保留率分别为 16. 0%、13. 6%、20. 8%和 20. 4%. 据报道, 在 4℃、- 20℃和 - 20℃加甘油的条件下, 反硝化污泥保藏 6 个月后的活性保留率分别为 30. 8%、40. 4%和 98. 1% (Laurin *et al* , 2006); 在自然环境温度下, *Nitrosomonas europaea* 和 *Nitrosomonas cryotolerans* 可分别饥饿保藏 2 个月和 10 周以上 (Wilhelm *et al* , 1998; Brian *et al* , 1988); 而据本实验室的研究, 普通活性污泥的硝化活性仅有本试验所用硝化污泥活性的 13. 5% (谢作辅等, 2009). 可见, 硝化污泥虽然难以长期保藏, 但仍有保藏的实际价值.

饥饿保藏 5 个月后, 所试各种保藏方法下的总菌体量保留率分别为 41. 5%、47. 6%、52. 2%和 53. 6%, 显著高于硝化污泥硝化活性保留率, 所以用总菌体量作为硝化活性评价指标会产生虚高现象. 硝化污泥大量保藏所需费用高, 综合考虑保留活性

和经济因素, 自然温度缺氧法是较为经济有效的保藏方法.

硝化污泥血红素 c 含量和 ATP 含量均可用于定性的表示硝化污泥的硝化活性. 保藏过程中, 各种方法下的硝化污泥血红素 c 含量和 ATP 含量均随硝化活性的下降而下降, 且两者的衰减速率均随硝化活性衰减速率的变化而变化, 但两者的总体衰减速率要小于硝化活性的总体衰减速率. 这是由于饥饿状态下硝化细菌通常会采用降低菌体的代谢活性 (Schmidt *et al* , 2004; Diab *et al* , 1992), 利用硝化细菌胞内的氨库 (Tappe *et al* , 1999), 利用死亡菌体或活菌胞外多聚物水解作用产氨 (试验过程中污泥上清液中的 SCOD 几乎不变且菌体荚膜变薄) 等对策来维持细胞的完整性, 而完整的细胞必定有维持能, 所以 ATP 衰减速率会小于硝化活性. 此外, 试验用硝化污泥中除了优势菌——硝化细菌外, 还含有反硝化菌和其它异养菌, ATP 作为所有活菌的能量载体, 也会对保藏过程中 ATP 的衰减速率产生影响. 不同保藏方法下, 硝化污泥血红素 c 的衰减速率小于硝化活性的衰减速率也是多方面原因引起的, 一是硝化细菌活性的降低主要是相关酶活降低引起的, 而血红素仅是血红蛋白的一个辅基, 在相关酶活降低甚至失活的条件下血红蛋白的辅基不会立即水解; 二是试验用硝化污泥中所含有的反硝化菌和其它异样菌中的某些菌种也含有血

红素 c (Breton and Berks 1994 Sildiqui and Wamecke-Eberz 1993 Zumft and Braun 1994), 从而导致血红素 c 和硝化活性间的衰减情况不完全同步。

保藏过程中, 不同保藏方法下的硝化污泥 SV 值均先下降后趋于稳定, 表明饥饿状态下, 各种保藏方法下的硝化污泥内菌群结构都大致经历了一个平衡-失稳-平衡的动态变化过程, 这是由于低温保藏下硝化污泥内丝状菌逐渐增加, 将菌胶团紧紧的包牢, 絮体结构变得更加密实; 而自然环境温度保藏下硝化污泥内丝状菌逐渐消失, 絮体结构慢慢解体, 最终形成稳定的菌胶团单体。

硝化污泥颜色变黑与硫化物含量成正相关性, 降低温度可减慢硫化物生成速度, 从而减缓污泥变黑速度, 但污泥颜色与硝化活性无直接关系, 所以难以用污泥颜色变化来指示硝化活性的变化。

5 结论 (Conclusions)

1) 硝化细菌不易保藏, 采用自然温度缺氧法保藏可收到较好的保藏效果。采用自然环境温度、4℃、-20℃、-20℃加 15% 体积甘油保藏 5 个月后, 硝化细菌活性保留率分别为 16.0%、13.6%、20.8%、20.4%, 菌体保留率分别为 41.5%、47.6%、52.2% 和 53.6%。综合考虑保藏效果和经济因素, 自然密闭保藏不失为一种有效的硝化污泥保藏方法。

2) 饥饿保藏中, 不同温度下的硝化细菌活性呈指数衰减。自然环境温度、4℃、-20℃和 -20℃加 15% 体积甘油方法下的硝化细菌活性衰减速率分别为 $0.012 d^{-1}$ 、 $0.021 d^{-1}$ 、 $0.019 d^{-1}$ 、 $0.013 d^{-1}$, 半衰期分别为 1.71、1.09、1.22、1.62 个月, 自然环境温度下缺氧保藏的衰减速率相对较慢。

3) 硝化污泥中 ATP 含量和血红素 c 含量均可定性的表示硝化污泥的硝化活性。饥饿保藏过程中, 各种方法下的硝化污泥 ATP 含量和血红素 c 含量均随硝化活性的降低而降低, 但两者的总体衰减速率均小于硝化活性的总体衰减速率。

4) 饥饿保藏中, 低温下污泥中的丝状菌比例增加, 絮体结构更加紧密, 自然环境温度下污泥中的丝状菌消失, 絮体结构解体, 导致各方法下的硝化污泥内菌群结构均经历了一个平衡-失稳-平衡的动态变化过程。低温可减慢硝化污泥颜色变黑速率, 但不能减慢硝化活性衰减速率, 硝化细菌颜色变化与硝化活性之间没有直接的相关性。

责任作者简介: 郑平 (1962—), 男, 教授, 博导, 主要从事废物生物处理与资源化, 环境微生物方面的教学研究。E-mail: pzheng@zju.edu.cn Tel: 0571-86971709。

参考文献 (References):

- Beny E A, Tumpower B L. 1987. Simultaneous determination of hemes a_b and c from pyridine hemochrome spectra [J]. *Analytical Biochemistry* 161 (1): 1-15
- Breton J, Berks B C. 1994. Characterization of the paramagnetic iron-containing redox centers of *Thiosphaera pantotropha* periplasmic nitrate reductase [J]. *FEBS Lett*, 345: 76-80
- Johnstone B H, Jones R D. 1988. Physiological effects of long-term energy-source deprivation on the survival of a marine chemolithotrophic ammonium-oxidizing bacterium [J]. *Marine Ecology Progress Series* 49: 295-303
- 陈建伟, 郑平, 丁爽, 等. 2010. 高效厌氧氨氧化颗粒污泥膨胀床 (EGSB) 工艺性能研究 [J]. *环境科学学报*, 30 (5): 947-953
- Chen J W, Zheng P, Ding S, *et al*. 2010. Performance of the Anammox process in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor with high load [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 30 (5): 947-953 (in Chinese)
- Diab S, Kochba M, Mires D, *et al*. 1992. Combined intensive-intensive (CIE) pond system. A, inorganic nitrogen transformations [J]. *Aquaculture* 101 (1/2): 33-39
- Laurin V, Labbe V, Juteau P, *et al*. 2006. Long-term storage conditions for carriers with denitrifying biomass of the fluidized methanofed denitrification reactor of the Montreal Biome and the impact on denitrifying activity and bacterial population [J]. *Water Research*, 40 (9): 1836-1840
- Okabe S, Satoh H, Watanabe Y. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 3182-3191
- Park H D, Noguera D R. 2007. Characterization of two ammonium-oxidizing bacteria isolated from reactors operated with low dissolved oxygen concentrations [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1401-1417
- Schmidt J, Look C, Bock E, *et al*. 2004. Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas* [J]. *Microbiology*, 150: 1405-1412
- Schramm A, Larsen L H, Revsbech N P, *et al*. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (12): 4641-4647
- Siddiqui R A, Wamecke-Eberz U. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate in *Alcaligenes eutrophus* H16 [J]. *Journal Bacteriology*, 175: 5867-5876
- Tappe W, Laverman A, Bohland M, *et al*. 1999. Maintenance energy demand and starvation recovery dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* cultivated in a retentostat with complete biomass retention [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 65

- (6): 2471-2477
- Thore A, Lundin A. 1983 Firefly luciferase ATP assay as a screening method for bacteriuria[J]. Journal of clinical microbiology, 17(2): 218-224
- Vlamink S E, Geets J, Vervaeke H, *et al*. 2007. Reactivation of aerobic and anaerobic ammonium oxidizers in OLAND biomass after long-term storage[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(6): 1376-1384
- Vogelsang C, Gollmbiewski K, Ostgaard K. 1999 Effect of preservation techniques on the regeneration of gel entrapped nitrifying sludge[J]. Water Research, 33(1): 164-168
- Wilhelm R, Aboliovich A, Nejdat A. 1998 Effect of long-term ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea* [J]. Journal of Biochemistry, 124: 811-815
- 谢作辅, 郑平, 唐崇俭, 等. 2009. 味精废水生物除碳脱氮动力学特性的研究[J]. 中国给水排水, 25(15): 60-66
- Xie Z F, Zheng P, Tang C J *et al*. 2009 Kinetic characteristics of biological nitrogen and carbon removal from monosodium glutamate wastewater[J]. China Water and Wastewater, 25(15): 60-66
- 姚槐应, 黄昌勇. 2005. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 北京: 科学出版社. 143-144
- Yao H Y, Huang C Y. 2005 Soil Microbial Ecology and Experimental Technology[M]. Beijing: Science Press. 143-144 (in Chinese)
- 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 2004 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京: 科学出版社. 61-71
- Zheng P, Xu X Y, Hu B L. 2004. Novel Theories and Technologies for Nitrogen Removal[M]. Beijing: Science Press. 61-71 (in Chinese)
- 郑平. 2005 环境微生物学实验指导[M]. 杭州: 浙江大学出版社. 40-89
- Zheng P. 2005 Laboratory Manual for Environmental Microbiology[M]. Hangzhou: Zhejiang University press. 40-89 (in Chinese)
- Zunft W G, Braun C. 1994. Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: Primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome bc complex[J]. European Journal Biochemistry, 219: 481-490