

OLAND 生物脱氮系统运行及其硝化菌群的分子生物学检测^{*}

张丹 徐慧 刘耀平 张颖 陈冠雄^{**} van Cleemput Oswald¹ Verstraete Willy²

(中国科学院应用生态研究所 陆地生态过程重点实验室 沈阳 110016)

(根特大学农业与应用生物技术学院¹ 应用分析物理化学实验室;² 微生物生态技术实验室 比利时根特 9000)

摘要 采用两阶段限氧自养硝化-反硝化生物脱氮系统(oxygen-limited autotrophic nitrification and denitrification system, 以下简称 OLAND)处理高氨氮、低 COD 的废水. 应用内浸式多聚醚砜中空膜, 实现了污泥的完全截留, 阻止了生物量的大量洗脱, 并通过控制溶氧在 $0.1 \sim 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ 之间, 实现了硝化阶段出水中氨氮与亚硝态氮浓度的比例达到最适值 $[1 : (1.2 \pm 0.2)]$, 从而为第二阶段的厌氧氨氧化提供理想的进水, 进而获得较高的脱氮率. 同时应用荧光原位杂交技术对硝化阶段不同时期硝化菌群的变化进行分子生物学检测, 揭示了随溶氧浓度的降低, 氨氧化菌的数量基本保持恒定、亚硝酸氧化菌的数量略有减少的变化规律, 并且发现, 在两阶段限氧自养硝化-反硝化生物脱氮系统中氨氮的氧化主要是由 *Nitrosomonas* sp. 完成, 亚硝酸的氧化主要由 *Nitrobacter* sp. 完成. 图 4 表 2 参 22

关键词 限氧自养硝化-反硝化; 硝化污泥脱水液; 荧光原位杂交分子生物学检测; 生物脱氮

CLC X172

PERFORMANCE AND MOLECULAR MONITORING OF NITRIFYING BACTERIA IN NITRIFICATION STAGE OF OLAND SYSTEM^{*}

ZHANG Dan^{**}, XU Hui, LIU Yaoping, ZHANG Ying, CHEN Guanxiong^{**},
van Cleemput Oswald¹ & Verstraete Willy²

(Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(¹Laboratory of Applied Physical Chemistry, ²Laboratory of Microbial Ecology and Technology, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Gent Coupure Link 653, B-9000, Belgium)

Abstract A two-stage oxygen-limited autotrophic nitrification and denitrification (OLAND) system was applied for the treatment of sludge digester liquor with a high ammonium concentration and a low chemical oxygen demand (COD). A steady ratio of ammonium and nitrite $[1 : (1.2 \pm 0.2)]$ from the effluent in the first stage (nitrification stage) was attained by controlling the dissolved oxygen in the range of $0.1 \sim 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, and the retention of biomass was achieved in the system with the immersed polyethersulfone membrane. Performance of nitrification stage was focused in this study, and a molecular technology—fluorescence *In situ* hybridization (FISH) was applied to analyze the shift of microbial community in this stage. It is showed that the amount of ammonium oxidizers was stable and nitrite oxidizers decreased a little bit with the drop of dissolved oxygen. At the same time, it was found that *Nitrosomonas* was the dominant bacteria of ammonium oxidizers which oxidize ammonium to nitrite, *Nitrobacter* is the dominant of nitrite oxidizers which oxidize nitrite to nitrate. Fig 4, Tab 2, Ref 22

Keywords oxygen-limited autotrophic nitrification and denitrification (OLAND); sludge digester liquor; fluorescence *In situ* hybridization (FISH); nitrogen removal

CLC X172

水体氮污染日益严重, 已严重威胁到我们赖以生存的生态环境, 开发经济有效的生物脱氮技术已成为国内外的研究热点^[1,2]. 生物脱氮过程包括硝化和反硝化作用两部分, 其中硝化作用又分为两个阶段, H_4^+ 氧化成 NO_2^- 阶段和 NO_2^- 进一步氧化成 NO_3^- 阶段. 硝化作用是由两类不同的好氧自养菌完成的, 第一阶段起主要作用的是氨氧化菌和亚硝酸氧化菌, 其中氨氧化菌主要包括 *Nitrosomonas*, *Nitrospira* 和 *Nitrosococcus* 三种; 亚硝酸氧化菌主要包括 *Nitrobacter* 和 *Nitrospira*. 反硝化

作用主要是由异氧菌在厌氧条件下, 以有机碳源作为电子供体, 将 NO_3^- 通过 NO_2^- 还原为氮气的过程^[3]. 另外, 硝化-反硝化生物脱氮可以通过两种途径实现, 一种是亚硝酸盐途径: 即 $\text{H}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$, 另一种是硝酸盐途径: $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$. 其中亚硝酸盐途径在硝化阶段可以减少 25% 的需氧量, 在反硝化阶段可以减少 40% 有机碳源的加入, 这种生物脱氮途径非常适用于处理高氨氮、低 COD 的废水^[4]. 典型的高氨氮、低 COD 的废水主要有: 消化污泥脱水液、垃圾渗滤液和一些工业废水, 但是在这种情况下, 为了获得氮的有效去除还需额外加入一定的有机碳源(如甲醇).

最近几年, 通过亚硝酸氧化生物脱氮途径, 而不需要加入有机碳源的生物脱氮反应过程被开发出来, 即硝化-厌氧氨氧

收稿日期: 2002-12-12 接受日期: 2003-02-18

^{*} 中国-比利时国际合作课题(BIL00/03) Supported by the foundation of Cina-Belgium international cooperation (No. BIL00/03)

^{**} 通讯作者 Corresponding author (E-mail: gxchen39@hotmail.com)

化作用(反应途径分两阶段:基于这种自养脱氮的概念,随后不断涌现出几种新的生物脱氮系统,如:一体化完全自养脱氮系统(completely autotrophic nitrogen removal over nitrite,简称 CANON)、全程自养硝化-反硝化生物脱氮系统(deammonification)、限氧自养硝化-反硝化生物脱氮系统(oxygen-limited autotrophic nitrification and denitrification system,简称 OLAND)、SHARON-ANAMMOX 悬浮系统(single reactor system for high rate ammonia removal over nitrite-anaerobic ammonium oxidation 简称 SHARON-ANAM-MOX)^[6-9]。在硝化-厌氧氨氧化的自养脱氮过程中,只有一半的 NH_4^+ 被氧化,所以硝化过程可节省 62.5% 的耗氧量,同时,由于在厌氧氨氧化过程中, H_4^+ 被氧化,所以硝化过程可节省 62.5% 的耗氧量,同时,由于在厌氧氨氧化过程中, NH_4^+ 作为 NO_2^- 还原的电子供体,所以完全节省了有机碳源的加入。由此可见,在自养脱氮过程中,硝化阶段亚硝酸盐的稳定积累是整个脱氮过程的关键。在 SHARON 工艺中,亚硝酸的积累是通过高温洗脱亚硝酸氧化菌和缩短污泥停留时间来实现的^[10]。而还有人采用限氧、氨的抑制^[11-13]等工艺条件来洗脱亚硝酸氧化菌,来实现亚硝酸的积累。但由于细菌的适应性,氨的抑制难以实现比较稳定的亚硝酸积累^[14]。

本文基于这种自养脱氮的概念,采用两阶段限氧自养硝化-反硝化生物脱氮系统,在第一阶段通过控制溶解氧的浓度,实现了亚硝酸盐的稳定积累^[15],从而节省了 62.5% 的耗氧量,为第二阶段的厌氧氨氧化提供了理想的进水。同时采用荧光原位杂交技术^[16]对限氧过程中硝化菌群的组成情况进行了分子生物学检测,考查了两大类硝化菌群的组成随溶氧降低的变化情况。

1 材料与方法

1.1 两阶段悬浮式膜生物脱氮系统的设计

系统主体由两只体积为 2 L 的圆柱状特制玻璃反应器组成,有效运行体积为 1.5 L,反应器配备了曝气和搅拌系统,温度控制系统,pH 传感器即酸碱反馈控制系统,反应器构造示意图见图 1。

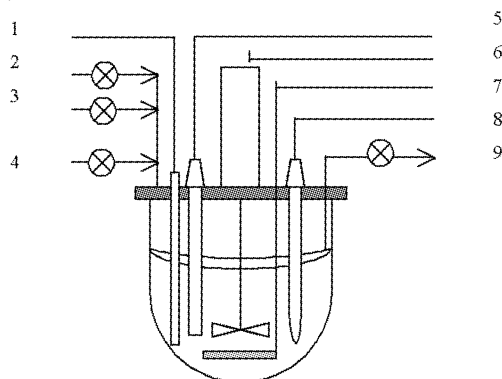


图 1 硝化阶段反应器构造图

Fig 1 Configuration of membrane-assisted bioreactor (MBR)

1. Temperature sensor; 2. Influent; 3. Acid addition; 4. Base addition; 5. Dissolved oxygen probe; 6. Stirrer; 7. Air sparger; 8. pH probe; 9. Effluent with under-pressure pump connected to immersed hollow fibre microfiltration membranes.

1.2 反应器接种污泥和废水组成

硝化阶段反应器采用比利时 Avecom 公司生产的完全硝化污泥(ammonium binding inoculum liquid, 以下简称为 ABIL)作为接种污泥。前三个月采用合成废水作为进水驯化接种污泥,并达到出水氨氮和亚硝态氮浓度比例趋于稳定。合成废水的组成: $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) = 1\,000\text{ mg L}^{-1}$ (NH_4HCO_3)、 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) = 20\text{ mg L}^{-1}$ (KH_2PO_4)、 2 mL L^{-1} 微量元素液。当反应器出水稳定后,采用来自污水处理厂的污水-硝化污泥脱水液作为进水,进水的组成: $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) = (1\,028 \pm 90)\text{ mg L}^{-1}$ 、 $\rho(\text{COD}) = (550 \pm 50)\text{ mg L}^{-1}$ 、 $\rho(\text{BOD}) = (190 \pm 10)\text{ mg L}^{-1}$ 。

1.3 反应器主要参数测定方法

温度、溶氧、pH 值等反应参数由温度传感器、溶氧电极和 pH 电极测定,并由反应器控制面板自动记录。 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 和 COD 采用分光光度法测定^[16]。

1.4 反应器硝化菌群的分子生物学检测

1.4.1 细菌活性的鉴定 从反应器中取新鲜样品 10 mL,加入等体积的细菌死活鉴定试剂(绿色荧光核酸染色剂-SYTO 9 和红色核酸染色剂),在荧光原位杂交之前,鉴定污泥中细菌的活性。

1.4.2 样品的固定 定期从 OLAND 系统第一阶段生物膜反应器中采集活性污泥适量,立即以新鲜配制的 4% 多聚甲醛溶液固定,再以磷酸盐缓冲液洗脱两次,悬浮于等体积的磷酸盐缓冲液与 100% 乙醇的混合液中,储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

1.4.3 特异性探针和荧光染料的选用 本研究采用的寡聚核苷酸探针有: NSO-190^[17] (β -蛋白菌纲的特异性探针,氨氧化菌属于 β -蛋白菌纲); NSM156^[17] (*Nitrosomonas* sp. 的特异性探针, *Nitrosomonas* sp. 是氨氧化菌的主要类别之一); NIT-3^[18] (*Nitrobacter* sp. 的特异性探针, *Nitrobacter* sp. 是亚硝酸氧化菌的主要类别之一); Ntspa0662^[19] (*Nitrospira* sp. 的特异性探针, *Nitrospira* sp. 是亚硝酸氧化菌的主要类别之一),探针分别用相应的荧光染料(-Cy3, -Cy5, -FLUOS)标记。

1.4.4 荧光原位杂交^[20] 取固定后的样品 2~10 mL 均匀点于特制的载玻片上,于 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下干燥,使样品固定在载玻片上,然后分别在 50%、80% 和 100% 的乙醇中各脱水 3 min,自然干燥。

在进行杂交之前,配制新鲜的杂交缓冲液(根据本研究中所使用的探针,含有相应浓度的氯化钠和甲酰胺),取 9 mL 含有相应浓度的氯化钠和甲酰胺的杂交缓冲液与 1 mL 荧光染料标记的探针混合(与荧光染料 Cy3 和 Cy5 结合的探针在杂交缓冲液中的浓度为 20 ng mL^{-1} ,而与荧光染料 Fluos 结合的探针在杂交缓冲液中的浓度为 50 ng mL^{-1}),点样于已固定在载玻片的样品上。然后在杂交炉中于 $46\text{ }^\circ\text{C}$ 杂交 1.5~3 h。在进行杂交的同时,准备洗脱缓冲液(含有相应浓度的氯化钠),并于 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴。杂交结束后,用洗脱缓冲液洗脱载玻片,除去未杂交的探针和杂交缓冲液,并在 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下温育 10 min,然后用冷的蒸馏水冲洗载玻片,充分除去未杂交的探针和杂交缓冲液,尽量减少背景值。

1.4.5 显微镜观察及数据处理 样品采用标准的荧光显微镜观察,配有敏感的数字彩色 CCD 相机,与 PC 机相连获得数字图像,图像采用 Microimage 4.0 软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 两阶段悬浮式膜生物脱氮系统的硝化阶段的运行

2.1.1 实验用原水成分分析 来自比利时安特卫浦污水处理厂的消化污泥脱水液,经滤纸过滤除去颗粒状杂质后作为进水,其基本指标见表1。

表1 比利时安特卫浦污水处理厂消化污泥脱水液成分

Tab 1 Composition of sludge digester liquor from Antwerp wastewater treatment plant

pH	总氨氮 $\rho(\text{TAN}^*)/\text{mg L}^{-1}$	$\rho(\text{COD})/\text{mg L}^{-1}$	$\rho(\text{NO}_2^- \text{N})/\text{mg L}^{-1}$	$\rho(\text{NO}_3^- \text{N})/\text{mg L}^{-1}$
8.0	955	644	0	0.7

* TAN: total ammonium nitrogen

结果表明,氨氮含量远远超过欧洲氨氮排放标准 $\rho(\text{N}) = 10 \text{ mg L}^{-1}$ [21]。

2.1.2 两阶段悬浮式膜生物脱氮系统硝化阶段的运行 两阶段悬浮式膜生物脱氮系统是由限氧硝化膜生物反应器 (MBR1) 和厌氧反硝化膜生物反应器 (MBR2) 相耦合,用来处理高氨氮、低化学需氧量的废水。第一阶段反应运行参数见表2。硝化阶段采用限氧控制,通气量从 1600 mL/min 下降到 15 mL/min ,从启动到实现稳定的出水运行40多天后,在 MBR1 中成功控制了出水中的氨氮和亚硝态氮的比例 $[1 : (1.2 \pm 0.2)]$ [22],从而阻止了亚硝酸盐的进一步转化 [14],为第二阶段厌氧氨氧化提供了理想的进水,保证了整个系统连续稳定地运行。运行结果见图3。

表2 硝化阶段反应运行参数

Tab 2 Parameters of nitrification stage of OLAND system

V/L	水力停留时间 $t(\text{HRT})/\text{d}$	污泥停留时间 $t(\text{SRT})/\text{d}$	$\theta/^\circ\text{C}$	pH	溶解氧 $\rho/\text{mg L}^{-1}$
1.5	1	∞	25	7.90	<0.1

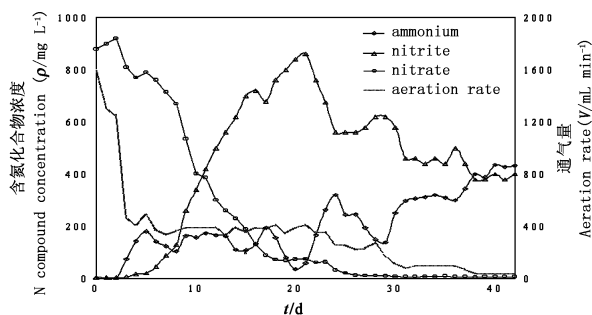


图2 两阶段悬浮式膜生物脱氮系统硝化阶段运行情况

Fig 2 Performance of nitrification stage of two stages suspended system

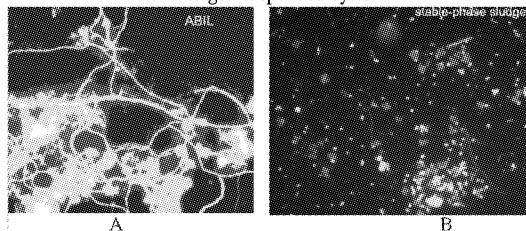


图3 硝化阶段启动初期和稳定后期微生物种群变化情况

Fig 3 Microbial community of nitrification stage in the early and late stage

A. ABIL-接种污泥; B. 稳定期污泥[氨氮和亚硝态氮的出水比例达到 $1 : (1.2 \pm 0.2)$] A. ABIL-inoculum sludge; B. Steady stage sludge

由图2可见,启动初期,充分曝气,氨氮基本全部被氧化成硝酸盐,随后逐渐降低溶解氧的浓度,系统运行到 d 5,开始有亚硝酸盐产生,硝酸盐浓度逐渐降低,反应器运行到 d 24,氨氮浓度突然升高,亚硝态氮浓度降低,直到反应器运行到 d 42 左右,基本实现氨氮与亚硝态氮稳定的出水比例,而几乎没有硝酸盐的产生。

2.2 硝化阶段微生物种群组成

2.2.1 不同时期的菌群分布 取硝化阶段初期接种污泥和稳定期污泥的新鲜样品,固定后经细菌死活鉴定试剂处理,通过荧光显微镜观察。由图3可见,硝化阶段从启动初期到出水稳定后期,种群的形态和结构发生了很大变化,启动初期,硝化菌群主要以菌胶团的形式存在,并通过丝状真菌彼此紧密相连,而出水稳定期,硝化菌群大多分散成单个的细胞,并多以棒状和球状菌的形态存在。由此可见,反应初期和稳定后期,反应器中微生物种群的分布发生了很大的变化。

2.2.2 限氧阶段硝化菌群组成变化 分别在硝化阶段的三个时期(d 1, d 13 和 d 42)从反应器中收集新鲜污泥样品,固定后,用相应的特异荧光探针 (NSO-190, NSM156, NIT-3 和 Ntspa0662) 进行杂交。根据荧光原位杂交的显微镜图片 (本文未列出),用 Microimage digital analysis software 进行分析,得到了不同时期的硝化菌群的分布和组成情况 (图4)。

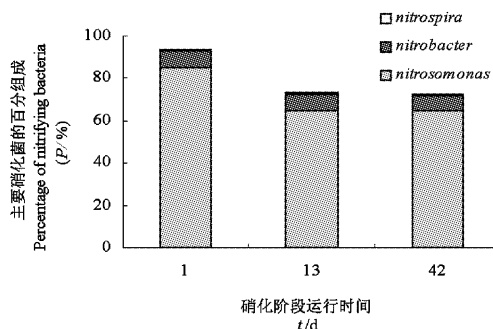


图4 硝化阶段从启动到稳定运行不同阶段微生物种群组成变化评估

Fig 4 Estimation of shifts of microbial community during different periods since nitrification started-up

荧光原位杂交的数字统计分析结果表明 (如图4),在硝化阶段,随着溶解氧的不断降低,氨氧化菌的数量基本稳定在70% (占反应器中细菌总量的比例) 左右,且硝化阶段主要的氨氧化菌为 *Nitrosomonas* sp. 亚硝氧化菌的数量随溶氧的降低有减少的趋势,但并不明显。主要的亚硝氧化菌为 *Nitrobacter* sp. 和 *Nitrospira* sp. 它们的数量分别占细菌总量的10%~12%和0.5%~1%。但由硝化过程动力学参数可知,随溶氧的降低,亚硝酸盐浓度逐渐增加,氨氮浓度逐渐降低,最后二者基本趋于平衡,而硝酸盐浓度也逐渐降低直至 $\rho(\text{NO}_3^- \text{N}) = 0.7 \text{ mg L}^{-1}$,由此可以推断,氨的氧化过程不是由一种菌单独作用完成的,而是由两种或几种菌协同作用的结果。而在亚硝酸盐的氧化过程中起主要作用的菌是 *Nitrobacter* sp., 随溶氧的降低亚硝氧化菌的活性有所降低,可能是由于高氨氮或低溶氧的抑制作用,所以导致进一步氧化成硝酸盐的过程受到抑制。硝化阶段从启动到亚硝酸盐的稳定积累的不同时期,氨氧化菌群 (*Nitrosomonas*) 是硝化阶段的主要菌群,比例高达80%以上,而亚硝氧化菌

群比例大大低于氨氧化菌群,其中主要起亚硝酸氧化作用,并在数量上占优势的亚硝酸氧化菌是 *Nitrobacter*, 而另外一种亚硝酸氧化菌 *Nitrospira* 只在启动初期检测到,反应稳定阶段基本检测不到。

3 结论

两阶段限氧自养硝化-反硝化生物脱氮系统(OLAND)的硝化阶段通过成功地控制溶氧在 $0.1 \sim 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ 之间,使出水氨氮与亚硝态氮之间的浓度比例达到了最适态 $[1 : (1.2 \pm 0.2)]$,实现了亚硝酸盐的稳定积累,从而为第二阶段的厌氧氨氧化提供了理想的进水,进而获得了高达 90% 的脱氮率。用荧光原位杂交技术检测硝化阶段不同时期硝化菌群的变化,揭示了硝化菌群随溶氧浓度降低的变化规律:随着溶解氧浓度的逐渐降低,氨氧化菌的数量基本稳定在 70% 左右,而亚硝酸氧化菌的数量略有降低,从 13% 降低到 10.5%,但并不明显,而且硝化阶段起主要作用的氨氧化菌为 *Nitrosomonas* sp. 亚硝酸氧化菌为 *Nitrobacter* sp. 总之,对不同时期微生物菌群的变化和组成规律的检测,有助于更好的解释微生物种群变化与化学反应参数之间的内在关系,为以后进一步优化硝化阶段的脱氮工艺及反应器模型的设计奠定了微生物学基础。

References

- Kuai L, Verstraete W. Ammonium removal by the oxygen limited autotrophic nitrification denitrification (OLAND) system. *Appl & Environ Microbiol*, 1998, **64**(11): 4500 ~ 4506
- Zhou SQ (周少奇), Zhou JL (周吉林). The advances in investigation of new technologies on biological nitrogen removal. *Tech & Equip Environ Pollut Cont* (环境污染治理技术与设备), 2000, **1**(6): 11 ~ 19
- Focht DD, Verstraete W. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv Microb Ecol*, 1977, **1**: 135 ~ 142
- Voets JP, vanstaen H, Verstraete W. Removal of nitrogen from highly nitrogenous wastewaters. *J Water Pollut Con F*, 1975, **47**: 394 ~ 398
- Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen UGJM, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **22**: 421 ~ 437
- Hao X, Heijnen JJ, Loosdrecht MCM. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **77**: 266 ~ 277
- Helmer C, Tromm C. Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Wat Sci Tech*, 2001, **43**(1): 311 ~ 320
- Pynaert K, Wyffels S, Sprengers R, Boeckx P, Van Cleemput O, Verstraete W. Oxygen-limited nitrogen removal in a lab-scale rotating biological contactor treating an ammonium-rich wastewater. *Wat Sci Tech*, 2002, **45**(10): 357 ~ 363
- Van Dongen U, Jetten MSM, Van Loosdrecht M. The Sharon-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Wat Sci Tech*, 2001, **44**: 153 ~ 160
- Hellinga C, Schellen AAJC, Mulder JW, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Wat Sci Tech*, 1998, **37**(9): 135 ~ 142
- Garrido JM, van Benthum WAJ, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **53**: 168 ~ 178
- Joo S-H, Kim D-J, Yoo I-K, Park K, Cha G-C. Partial nitrification in an upflow biological aerated filter by O_2 limitation. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 937 ~ 940
- Bernet N, Dangcong P, Delgenes JP, Moletta R. Nitrification at low oxygen concentration in a biofilm reactor. *J Environ Eng-Asce*, 2001, **127**: 266 ~ 271
- Wyffels S, Boeckx P. Sustained nitrite accumulation in a membrane-assisted bioreactor (MBR) for the treatment of ammonium rich wastewater. *J Chem Technol & Biotechnol*, 2003, **78**: 412 ~ 419
- Lipski A, Friedrich U, Altendorf K. Application of rRNA-targeted oligonucleotide probes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 40 ~ 57
- Hach. Procedures for Chemical Analysis, in DR/2010 Spectrophotometer Handbook. Loveland USA: Hach Company, 2000. 465 ~ 469, 487 ~ 489, 511 ~ 515
- Bruce K, Mobarry M, Wagner M. Phylogenetic Probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl & Environ Microbiol*, 1996, **62**(6): 2156 ~ 2162
- Wagner M, Gabriele R. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Tech*, 1996, **34**(1-2): 237 ~ 244
- Timothy A, Hovanec L, Taylor T. *Nitrospira*-Like Bacteria Associated with Nitrite Oxidation in Freshwater Aquaria. *Appl & Environ Microbiol*, 1998, **64**(1): 258 ~ 264
- Rudolf I, Amann I. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol Microb Ecol Manual*. the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. 1 ~ 15
- Jetten MSM, Schmid M, Schmidt I, Wubben M, et al. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Rev Environ Sci & Biotech*, 2002, **1**: 51 ~ 63
- Jetten MSM, Wagner M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *Current Opinion Biotechnol*, 2001, **12**: 283 ~ 288