

硝化菌篩選與氨之生物處理

郭令錚 經營組

lckuo@mail.tlri.gov.tw

一、中文摘要

篩選自養豬廢水之異營性硝化菌 I-06 (*Sphingopyxis* spp.) 及 I-09 (*Delftia tsuruhatensis*) 皆為革蘭氏陰性菌，具有觸酶陽性及運動性，不具氧化酶，在好氣環境下會生長，厭氣環境下則無法生長。此二株異營性硝化菌經銨代謝試驗，確定具有對氨(銨)氮之硝化能力。I-06 及 I-09 可生長溫度範圍很廣，從 15°C~37°C 皆能生長，25°C 以上培養時則生長速率約略相同，兩株菌約在培養後 8-10 天達最大菌數。兩株硝化菌在液態菌劑中以 I-06 之保存性較差，經保存 30 週後其菌數之殘存量分別為 56.35% (4°C) 及 31.87% (25°C)，而 I-09 之保存性則較佳，經保存 30 週後其菌數之殘存量分別為 60.70% (4°C) 及 55.42% (25°C)，尤其是以在 25°C 保存條件下 I-09 之保存性明顯優於 I-06。選用顆粒活性炭或碳化粗糠作為固態菌劑之擔體，兩者皆能表現良好之生長性狀。兩株硝化菌在固態菌劑中之保存性皆相似，經保存 26 週後其菌數之殘存量 I-06 為 74.47% (4°C) 及 51.40% (25°C)，而 I-09 之菌數殘存量為 75.66% (4°C) 及 53.46% (25°C)。在氨氮的變化部分，在測試 10 天後於生長培養基中之氨氮去除率分別為 I-06 的 11.48%，I-09 的 55.62%。在化學合成培養基中之氨氮去除率分別為 I-06 的 33.85%，I-09 的 62.99% 顯示菌株 I-06 及 I-09 在提供簡單營養源(化學合成培養基)時較提供複雜營養源(生長培養基)者之氨氮去除率為高，尤其以菌株 I-06 之結果尤為明顯。在硝酸氮及亞硝酸氮的變化部分，菌株 I-06 在硝化期間之蓄積量很低，只有在化學合成培養基中有少許蓄積；菌株 I-09 在硝化期間有較高的硝酸氮及亞硝酸氮蓄積量

關鍵詞：硝化菌(Nitrobacter)、硝化作用(Nitrification)、氨氣(Ammonia)

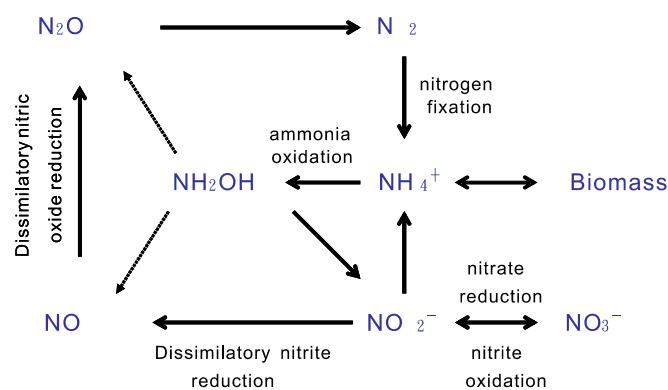
二、前言

惡臭氣味本屬於民眾嗅覺感受不愉快之主觀判斷，畜殖場(或堆肥場)常因惡臭問題受到鄰近居民抗議及檢舉，而根據「空氣污染防制法施行細則」之規定會受到很重的罰則，情節重大者甚至得勒令歇業，因此畜殖場惡臭的防治技術就有日益迫切的需要。

雖然國內已有多年除臭技術的探討，無論從改進飼料營養成分、飼料中添加除臭劑(酵素、微生物)、改良畜舍設計減少逸散、改善飼養管理、噴撒除臭劑、開發除臭反應槽(理化吸附、生物轉化)或研發除臭微生物等，均尚未有一確切之結論與成效。畜殖場有超過百種以上的惡臭相關化學物質被分析出來，其多為畜禽糞尿經微生物代謝之終產物或中間物，包括揮

發性脂肪酸、醇類、酚類、酮類、氨(胺)類、硫化物、硫醇類和含氮雜環化合物等(羅等, 1995), 其中以氨氣、三甲基胺、硫化氫及臭氣(如 indole、skatole)等為造成惡臭問題的主要指標氣體(吳, 1990), 而這些物質部份可藉由以微生物轉換作用(如硝化作用、脫硝作用、氧化還原反應...)的方式加以降低或去除(蘇等, 1998; Cho *et. al.*, 1991; Nakada and Ohta, 1997; Ohta, 1996)。

有關以微生物去除臭味物質有被廣泛的研究; 微生物對氨(銨)氮的去除包含了硝化作用(nitrification)與脫硝作用(denitrification)(Ward and Carlucci, 1985; Prosser, 1989; McCaig *et. al.*, 1994; Zumft, 1997; Ye and Thomas, 2001)。硝化作用是氨(銨)氧化成亞硝酸再氧化成硝酸的過程(如圖 1 所示), 此類微生物包含有 *Nitrosomonas* spp., *Nitrobacter* spp. 等自營性氮氧化菌(Bock *et. al.*, 1995; Schmidt and Bock, 1997)及 *Alcaligenes faecalis*(Papen, *et. al.*, 1989; Otte *et al.*, 1999)、*Arthrobacter* spp (Prosser, 1989; Richardson *et al.*, 1998)、*Paracoccus denitrificans* (Moir, *et. al.*, 1996)、等異營性硝化菌。脫硝作用是將硝酸鹽或亞硝酸鹽轉換成氮氧化物或氮氣逸散至大氣中, 此為脫硝菌主要的作用(Zumft, 1997), 如 *Pseudomonas stutzeri*. (Korner, 1993), *Pseudomonas denitrificans*、*Thiobacillus denitrificans* (Knowles, 1982)等。其他亦有部分真菌(如 *Aspergillus* 菌屬)及細菌(如 *Alcaligenes* spp.、*Arthrobacter* spp.、*Thiosphaera pantotropha* 菌屬)皆可以行異營性的硝化-脫硝作用(Castignetti and Hollocher, 1982; Robertson *et. al.*, 1988; Prosser, 1989; Robertson and Kuenen, 1990; Kuenen and Robertson, 1994; Honda *et. al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1998; Otte *et al.*, 1999)。



Microbial nitrogen cycle

(Ye and Thomas, 2001)

圖 1. 微生物性氮循環 (Microbial Nitrogen Cycles)。

三、試驗材料與方法

(一)供試菌株：使用篩選自養豬廢水之硝化菌 I -06 (*Sphingopyxis* spp.)、I -09 (*Delftia tsuruhatensis*)及對照用菌株 *Arthrobacter oxydans*

(BCRC 11573)。

(二)培養基：R2A medium、BCRC 529 medium、BCRC 66 medium、chemical synthesize medium。

(三)各種無機氮含量之分析使用 Merck Ltd. 之 NOVA Mobile Analysis Spectroquant® test kit：

1. Ammonium test (measuring range 5-150mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$)；
2. Nitrate test (measuring range 0.1-25mg/L $\text{NO}_3^-\text{-N}$)；
3. Nitrite test (measuring range 0.002-1.00mg/L $\text{NO}_2^-\text{-N}$)。

(四) 試驗方法：

1. 菌種活化：

測試菌株 I -06 (*Sphingopyxis* spp.)、I -09 (*Delftia tsuruhatensis*)分別接種於 R2A medium、BCRC 529 medium 中 (接菌量 1% v/v)，對照菌株 *Arthrobacter oxydans* (BCRC 11573)接種於 BCRC 66 medium，在 26°C 下培養 7 天，使用前連續活化兩次。

2. 測試菌株最適生長溫度之測試：

將活化後之測試菌株 I -06 (*Sphingopyxis* spp.)、I -09 (*Delftia tsuruhatensis*)分別接種於 R2A medium (I -06)及 BCRC 529 medium (I -09)中 (接菌量 1% v/v)，於 15°C、20°C、25°C、30°C、37°C 之溫度下培養，每 2 天取樣測定其生菌數，並繪製其在各培養溫度下之生長曲線。

3. 液態菌劑之試製：

將活化後之測試菌株進行擴大培養，擴大培養後之菌液經離心(4500×g)後取其沉澱之菌體部分，再將取得之菌體重新懸浮於新配置之培養基中成為濃縮菌液 (約 100 倍濃縮)，再添加等量甘油貯存於 4°C 及 25°C 下保存。每隔兩週測試菌株之存活情形。

4. 固態菌劑之試製：

將活化後之測試菌株接種在含 R2A medium (I -06)及 BCRC 529 medium (I -09)之顆粒活性碳及炭化粗糠中(液態培養基與固態擔體以 1:2 比例混合後置於血清瓶中滅菌)，菌種接種量為 10% v/v，接菌後於 30°C 下培養 10 天，每 2 天取樣測定其生菌數；培養完成後貯存於 4°C 及 25°C 下保存，每隔兩週測試菌株之存活情形。

5. 硝化活性之測定

測試菌硝化活性之測定除以各供試菌之生長培養基作為測試用培養基，另外亦使用醋酸鈉 (CH_3COONa)為碳源、硫酸銨 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]為氮源的化學合成培養基，氮的起始濃度約為 100 mg/l，而後置於 26°C 的恆溫培養箱中培養。每隔 1 天測試各種無機氮含量 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$)及菌株之存活情形。

各種無機氮含量之分析使用 Merck Ltd.之 NOVA Mobile Analysis Spectroquant® test kit 測定，樣品經離心 (4500×g)後以原液或以定量瓶稀

釋至適當倍數，取所需之樣品體積與呈色試劑於試管中充份混合，待反應後移至石英管中以 NOVA 60 Spectroquant® photometer 測定各種無機氮之濃度。

四、結果與討論

本研究所使用之菌種為分離自養豬場廢水之異營性硝化菌，編號分別為 I -06 及 I -09 兩株，經由 16s rDNA 部份序列分析、脂肪酸鑑定系統分析及 Biolog 鑑定系統分析等鑑定確認菌株 I -06 為 *Sphingopyxis* spp.，菌株 I -09 為 *Delftia tsuruhatensis*。此二株異營性硝化菌皆為革蘭氏陰性菌，具有觸酶陽性及運動性，不具氧化酶，在好氣環境下會生長，厭氣環境下則無法生長。此二株異營性硝化菌使用含硫酸銨之培養基培養，並以修飾過之 Griess-Ilosvay reagents 為測定方法，進行分離菌種之銨代謝測定銨代謝試驗，在培養基中加入重氮化試劑 (diazotizing reagent) 及聯結試劑 (coupling reagent) 後顏色馬上變成粉紅色，代表培養液中含有亞硝酸氮 (NO_2^- -N) 成分，即菌種具有對氮 (銨) 氮之硝化能力。

測試硝化菌株 I -06 及 I -09 之最適生長溫度，其結果如圖 2 所示，此二株菌之生長溫度範圍很廣，從 15°C ~ 37°C 皆能生長，培養溫度愈高則生長愈快，超過 40°C 則生長停止。較低溫度培養 (15 - 20°C) 時以 I -09 之生長相對較差， 25°C 以上培養時則生長速率約略相同，兩株菌約在培養後 8-10 天達最大菌數。

將擴大培養之菌液經離心 ($4500\times g$) 後取其沉澱之菌體部分，再將取得之菌體重新懸浮於新配置之培養基中成為濃縮菌液 (約 100 倍濃縮)，再添加等量體積之甘油，即成試製之濃縮液態菌劑。將此濃縮液態菌劑分別貯存於 4°C 及 25°C 下進行保存性試驗，其結果如圖 3 所示。兩株硝化菌在液態菌劑中以 I -06 之保存性較差，經保存 30 週後其菌數之殘存量分別為 56.35% (4°C) 及 31.87% (25°C)，而 I -09 之保存性則較佳，經保存 30 週後其菌數之殘存量分別為 60.70% (4°C) 及 55.42% (25°C)，尤其是以在 25°C 保存條件下 I -09 之保存性明顯優於 I -06。

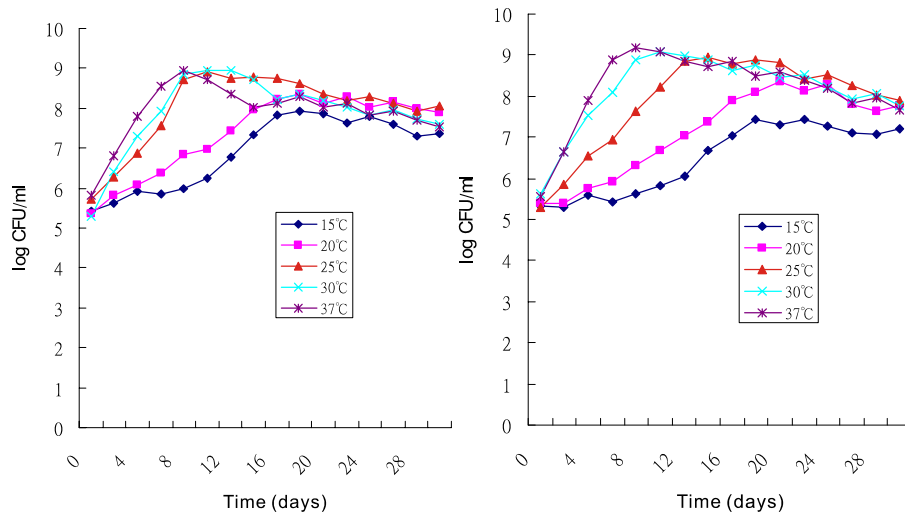


圖 2. 測試菌株 I -06 (*Sphingopyxis* spp.)及 I -09 (*Delftia tsuruhatensi*) 在不同培養溫度下生長之情形。

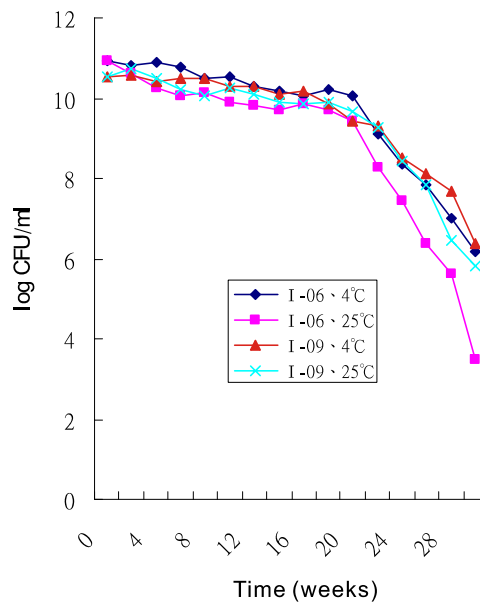


圖 3. 試製液態菌劑保存期間生菌數之變化。

將測試菌接種在含生長培養基之顆粒活性碳及碳化粗糠擔體中，經 30°C 下培養 10 天即成試製之固態菌劑。此二株菌在固態擔體中之生長情形如圖 4 所示。結果顯示二株菌在固態擔體中與在液態培養基中之生長情形是相似的，且不論使用顆粒活性碳或碳化粗糠作為固態擔體，其生長情形亦是相似的。將此固態菌劑分別貯存於 4°C 及 25°C 下進行保存性試驗，其結果如圖 5 所示。兩株硝化菌在固態菌劑中之保存性皆相似，經保存 26 週後其菌數之殘存量 I -06 為 74.47% (4°C) 及 51.40% (25°C)，而 I -09 之菌數殘存量為 75.66% (4°C) 及 53.46% (25°C)。

將硝化菌株 I -06 及 I -09 培養於含硫酸銨之生長培養基及以醋酸鈉為碳源，硫酸銨為氮源之化學合成培養基中，並測定培養基中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 NO_3

NH_4^+ -N、及 NO_2^- -N 等無機氮含量，以了解菌株在不同培養基中對於氨氮之硝化速率及亞硝酸氮、硝酸氮等中間產物之累積情形，試驗中並以 *Arthrobacter oxydans* (BCRC 11573) 作為對照菌株，其結果如圖 6 所示。

在氨氮的變化部分，在測試 10 天後於生長培養基中之氨氮去除率分別為 I-06 的 11.48%，I-09 的 55.62% 及 *Arthrobacter oxydans* 的 62.55%，在化學合成培養基中之氨氮去除率分別為 I-06 的 33.85%，I-09 的 62.99% 及 *Arthrobacter oxydans* 的 63.18%，顯示菌株 I-06 及 I-09 在提供簡單營養源(化學合成培養基)時較提供複雜營養源(生長培養基)者之氨氮去除率為高，尤其以菌株 I-06 之結果尤為明顯。另外菌株 I-09 之氨氮去除率略低於對照菌株 *Arthrobacter oxydans*。文獻中指出不同種類之有機碳源會影響微生物對硝酸鹽及亞硝酸鹽之硝化-脫硝速率 (Narkis *et al.*, 1979; Bilanovic *et al.*, 1999)。Constantin and Fick (1997) 分別以乙酸及乙醇做為碳源，發現使用乙酸碳源之比硝化-脫硝速率高於使用乙醇碳源者，故使用不同種類之碳源會使速率相異。Hallin and Pell (1998) 指出簡單有機物比複雜者為更佳之供氮質，故愈簡單之有機物會使硝化-脫硝速率愈高。

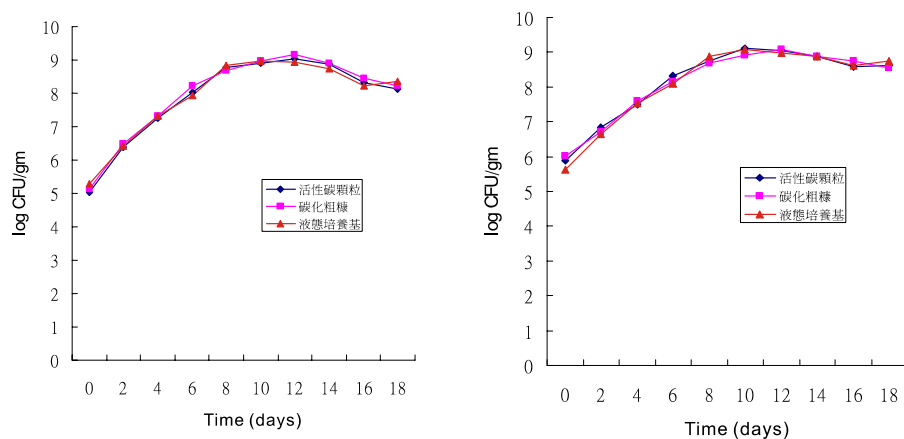


圖 4. 測試菌株 I-06 及 I-09 在固態基質中生長之情形。

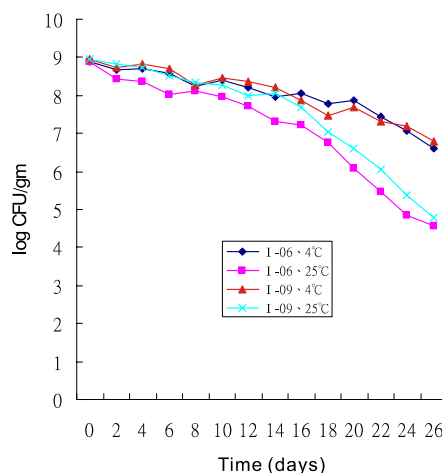


圖 5. 試製固態菌劑保存期間生菌數之變化。

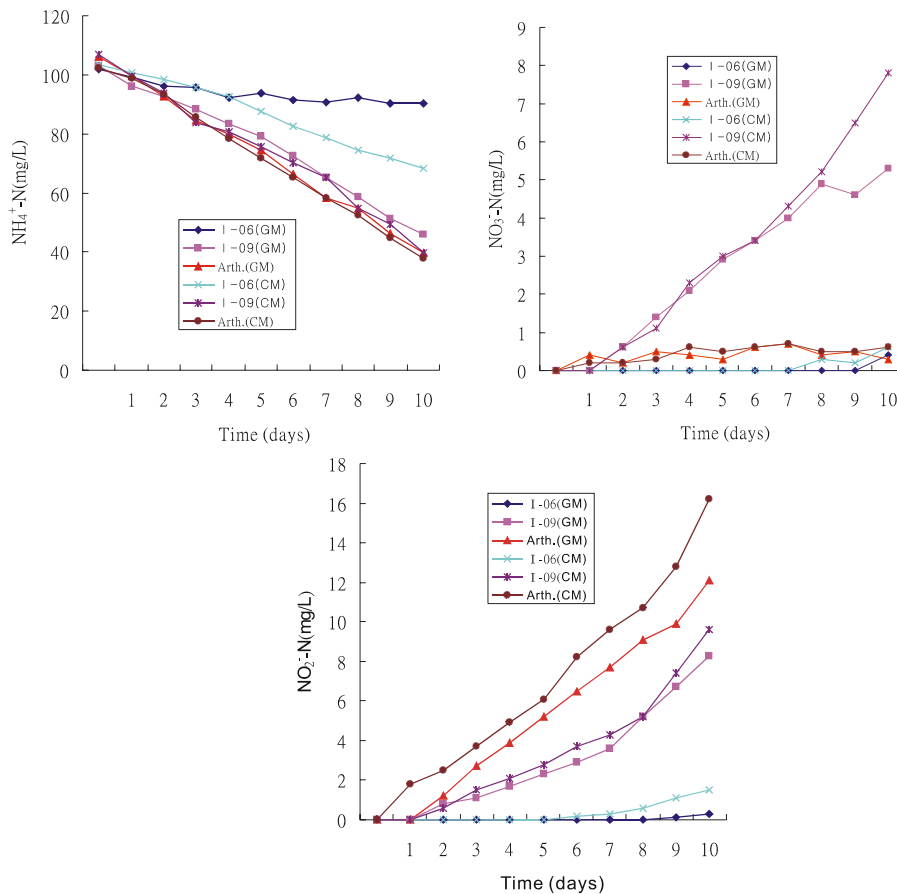


圖 6. 測試菌株於硝化試驗期間氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝酸氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$)及亞硝酸氮 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$)之變化情形。

註： GM= growth medium；CM= chemical synthesize medium

在硝酸氮及亞硝酸氮的變化部分，菌株 I-06 在硝化期間之蓄積量很低，只有在化學合成培養基中有少許蓄積；菌株 I-09 在硝化期間有較高的硝酸氮及亞硝酸氮蓄積量；對照菌株 *Arthrobacter oxydans* 則是只有較高的亞硝酸氮蓄積量，硝酸氮的蓄積量很低，與文獻中指出 *Arthrobacter oxydans* 在硝化過程中主要產物為亞硝酸氮及有機氮 (Chung *et al.*1997)之結果相符。

在硝化率試驗期間測試菌生菌數之變化如圖 7 所示，三株硝化菌之生菌數隨著培養時間延長而增加，但以培養於生長培養基者增加的菌數明顯高於培養在化學合成培養基者，其原因可能是化學合成培養基中只有簡單的碳源及氮源，並無法提供生長時充足之營養源。

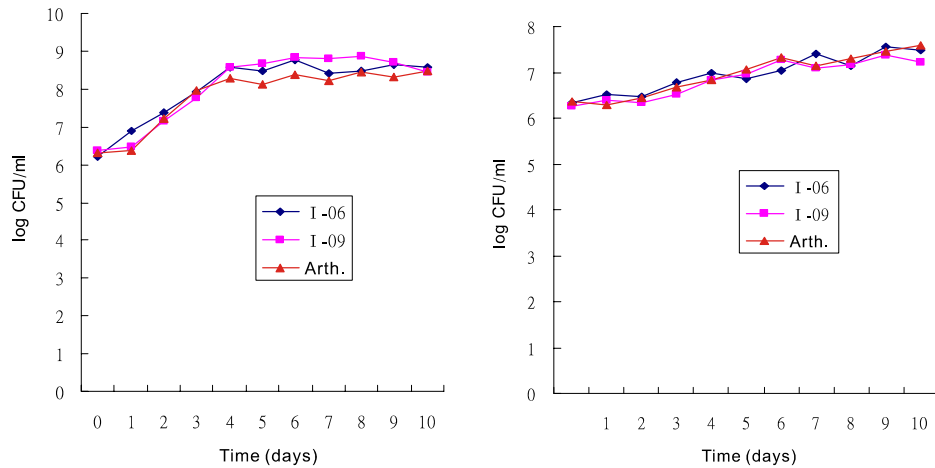


圖 7. 硝化試驗期間生菌數於生長培養基(左)及化學合成培養基(右)中之變化情形。

五、結論與建議

1. 篩選自養豬廢水之異營性硝化菌 I-06 (*Sphingopyxis* spp.) 及 I-09 (*Delftia tsuruhatensis*) 之可生長溫度範圍很廣，從 15°C ~ 37°C 皆能生長，適合在臺灣地區終年之平均氣溫下生長。
2. 本研究不論選用顆粒活性炭或碳化粗糠作為固態菌劑之擔體，硝化菌 I-06 及 I-09 皆能表現良好之生長性狀。
3. 硝化菌 I-06 及 I-09 試製之液態菌劑，經長時間保存後其存活率明顯低於固態菌劑，但因其製作過程中有濃縮之步驟，故其最終之生菌數仍高於固態菌劑。因液態菌劑具有操做方便容易生產，體積小易保存及使用方便等特點，往後應朝改良保存劑以提高存活率的方向開發。
4. 菌株 I-06 之氨氮去除率遠低於 I-09，但在提供簡單營養源 (化學合成培養基) 時較提供複雜營養源 (生長培養基) 者之氨氮去除率為高，尤其以菌株 I-06 之結果尤為明顯。而菌株 I-06 在硝化期間之蓄積量很低，只有在化學合成培養基中有少許蓄積，菌株 I-09 則在硝化期間有較高的硝酸氮及亞硝酸氮蓄積量，其兩者之間相異點是否具有互補性是今後所需探討的課題。

六、參考文獻

- 行政院環境保護署。1998。水污染防治法規。行政院環境保護署環境保護人員訓練所編印。
- 行政院環境保護署。1998。空氣污染防治法規。行政院環境保護署環境保護人員訓練所編印。
- 吳宗正。1990。畜產廢棄物臭味偵測與管制。中華生質能源學會會誌 9(3-4)：114-124。
- 羅中恆、劉惠群、吳繼芳、郭偉明。1995。豬場空氣中臭味污染物質的特

- 性研究。中華農學會報 172:139-153。
- 蘇忠楨、劉惠群、吳繼芳。1998。豬舍主要臭氣成分之生物處理研究。中華農學會報 184: 67-81。
- Aarnink, A. J. A., and M. J. M. Wagemans. 1997. Ammonia vitalization and dust concentration as affected by ventilation systems in houses for fattening pigs. Transactions of the ASAE. 40(4):1161-1170.
- Bilanovic, D., Battistoni, P., Cecchi, F., Pavan, P., Mata-alvarez, J. 1999. Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. Wat. Res. 33 (15): 3311-3320.
- Bock, E., I. Schmidt. R. Stuvén. and D. Zart. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol. 163:16-20.
- Castignetti, D., and T. C. Hollocher. 1982. Nitrogen redox metabolism of a heterotrophic nitrifying-denitrifying *Alcaligenes sp.* from soil. Appl. Environ. Microbiol. 44(4): 923-928.
- Cadenhead, P., and K. L. Sublette. 1990. Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus*. Biotechnol. Bioeng. 35:1150-1154.
- Constantin, H., Fick, M. 1997. Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. Wat. Res. 31 (3):583-589.
- Chung, Y. C., Huang, Chihpin, and C. P. Tseng. 1996. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. J. Biotechnol. 52:31-38.
- Chung, Y. C., Huang, Chihpin, and C. P. Tseng. 1997. Biotreatment of ammonia from air by an immobilized *Arthrobacter oxydans* CH8 biofilter. Biotechnol. Prog. 13(6):794-798.
- Cho, K. S., Hirai, M., and Shoda, M. 1991. Removal of dimethyl disulfide by the peat seeded with night soil sludge. J. of Fermentation Bioengineering 71(4):289-291.
- Cho, K. S., Zhang, L., Hirai, M., and Shoda, M. 1991. Removal characteristics of hydrogen sulfide and methanethiol by *Thiobacillus spp.* Isolated from peat in biological deodorization. J. of Fermentation Bioengineering 71(1):44-49.
- Cho, K. S., Hirai, M., and Shoda, M. 1992. Degradation of hydrogen sulfide by *Xanthomonas sp.* Strain DY44 isolated from peat. Appl. Environ. Microbiol. 58:1183-1189.
- Gamble, T. N., M. R. Betlach and J. M. Tiedje. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Appl. Environ. Microbiol. 33: 926-939.
- Hallin, S., Pell, M. 1998. Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge. Wat. Res. 32 (1): 13-18.
- Hartung, E., T. Jungbluth and W. Buscher. 2001. Reduction of ammonia and odor emissions from a piggery with biofilters. Transactions of the ASAE.

- 44(1):113-118.
- Hirano, T., H. Kurosawa, K. Nakamura, and Y. Amano. 1996. Simultaneous removal of hydrogen sulfide and trimethylamine by a bacterial deodorant. *J. Ferment. Bioeng.* 81(4): 337-342.
- Honna, T. and T. Akino. 1998. Isolation and characterization of a hydrogen sulfide-removing bacterium, *Pseudomonas sp.* Strain DO-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62(9):1684-1687.
- Honda, N., M. Hiria, T. Ano, and M. Shoda. 1998. Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Biochem. Lett.* 20:703-705.
- Kuenen, J. G., and L. A. Robertson. 1994. Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 109-117.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46(1): 43-70.
- Lim, T. T., A. J. Heber, J. Q. Ni, L. Sutton and D. T. Kelly. 2001. Characteristics and emission rates of odor from commercial nurseries. *Transactions of the ASAE.* 44(5):1275-1282.
- Maghirang, R. G., M. C. Puma, Y. Liu and P. Clark. 1997. Dust concentrations and particle size distribution in an enclosed swine nursery. *Transactions of the ASAE.* 40():749-754.
- McCaig, A. E., T. M. Embley, and J. I. Prosser. 1994. Molecular analysis enrichment cultures of marine oxidizers. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:363-368.
- Moir, J. W.B., L. C. Crossman, S. Spiro, and D. J. Richardson. 1996. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters* 387: 71-74.
- Nakada, Y., and Ohta, Y. 1997. Hydrogen sulfide removal by a deodorant bacterium *Bacillus sp.*BN53-1. *Hakko Kougaku Kaishi.* 75(6): 425-431
- Korner, H. 1993. Anaerobic expression of nitric oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 159:410-416
- Ohta, Y., and H. Sato. 1985. An artificial medium for deodorant microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 49(4):1195-1196.
- Ohta, Y. 1996. Characteristics of deodorant microorganisms. *Hakko Kougaku Kaishi.* 54(8): 561-563.
- Otte, S., J. Schalk, J. G. Kuenen, and S. M. Jetten. 1999. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. 51: 255-261.
- Panthier, J. J., H. G. Diem, and Y. Dommergues. 1979. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 11:443-445.
- Page, A. L., R. H. Miller, D. R. Keeney. 1982. "Method of Soil Analysis" part 2, Chemical and Microbiological Properties. pp. 1027-1042, 1071-1092.
- Papen, H., R. von Berg, I. Hinkel, B. Thoene, and H. Rennenberg. 1989. Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂-, NO₃-, N₂O, and

- NO production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8): 2068-2072.
- Predicala, B. Z., R. G. Maghirang, S. B. Jerez, J. E. Urban and R. D. Goodband. 2001. Dust and bioaerosol concentration in two swine-finishing building in Kansas. *Transactions of the ASAE.* 44(5):1291-1298.
- Prosser, J. I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 30:125-181.
- Richardson, D. J., J. M. Wehrfritz, A. Keech, L. C. Crossman, M. D. Roldan, H. J. Sears, C. S. Butler, A. Reilly, J. W. B. Moir, B. C. Berks, S. J. Ferguson, A. J. Thomson, and S. Spiro. 1998. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochem. Soc. Transactions.* 26:401-408.
- Robertson, L. A., and J. G. Kuenen. 1983. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2847-2855.
- Robertson, L. A., Ed W. J. van Niel, Rob A. M. Torremans, and J. G. Kuenen. 1988. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(11):2812-2818.
- Robertson, L. A., and J. G. Kuenen. 1989. Ecological and physiological aspects of aerobic denitrification and heterotrophic nitrification. *Japan. Scient. Soc.* pp.219-223.
- Robertson, L. A., and J. G. Kuenen. 1990. Combined heterotrophic nitrification and denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *57:139-152.*
- Schmidt, E. L. and Belser, L. W. 1982. Nitrifying bacteria. In "Methods of Soil Analysis". Part 2. Chemical and Microbiological Properties (Klute, A. and Page, A. L., eds), vol. 2, pp. 1027-1042.
- Schmidt, I., and E. Bock. 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.* 167:106-111.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (Ed). 1989. *Molecular Cloning.* 2nd ed. CSH Laboratory Press., New York.
- Tanji, Y., Kanagawa, T., and Mikami, E. 1989. Removal of dimethyl sulfide, methyl mercaptan and hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thioparus* TK-m. *J. Ferment. Bioeng.* 67(4): 280-285.
- Tiedje, J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In *Biology of Anaerobic Microorganism.* pp. 170-244.
- Ward, B. B., and A. F. Carlucci. 1985. Maring ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria:serological diversity determined by immunofluorescent in culture and in environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 194-201.
- Ye, R. W. and S. M. Thomas. 2001. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology.* 4: 307-312.
- Yun, S. I., and Ohta, Y. 1996. Some physiological properties of microorganisms

- capable of deodorizing farm animal feces. *Bioresource Technology*. 60: 21-26.
- Yun, S. I., and Ohta, Y. 1998. Removal of gaseous n-valeric acid in the air by *Rhodoccus sp.* B261 immobilized onto ceramic beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 343-348.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* 61(4):533-616.