

于健,杨敏,齐嵘,等. 2009. 城市污水处理系统中氨氧化细菌种群结构研究[J]. 环境科学学报, 29(3): 521 - 526

Yu J, Yang M, Qi R, et al. 2009. Community structures of ammonia-oxidizing bacteria in different municipal wastewater treatment systems[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(3): 521 - 526

城市污水处理系统中氨氧化细菌种群结构研究

于健^{1,2}, 杨敏^{1,2,*}, 齐嵘², 周军³, 张昱², 刘如钢²

1. 北京林业大学环境科学与工程学院, 北京 100083

2. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

3. 北京城市排水集团有限责任公司, 北京 100044

收稿日期: 2008-05-05 录用日期: 2009-01-16

摘要: 利用 PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳) 技术对北京 7 个城市污水厂中 10 个处理系统的氨氧化细菌 (AOB) 种群结构进行了调查研究, 发现城市污水厂的 AOB 种群多样性不高, 除了硝化效果不好的一个污水厂外, 其他 9 个污水处理系统中均检测到 AOB 的存在. 切胶测序结果表明主要属于 *Nitrosomonas oligotropha/aestuarii*-like cluster

关键词: 城市污水厂; 活性污泥; PCR-DGGE; 氨氧化细菌

文章编号: 0253-2468 (2009) 03-521-06 中图分类号: X171 文献标识码: A

Community structures of ammonia-oxidizing bacteria in different municipal wastewater treatment systems

YU Jian^{1,2}, YANG Min^{1,2,*}, QI Rong², ZHOU Jun³, ZHANG Yu², LIU Ruyin²

1. College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083

2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing 100085

3. Beijing Drainage Group Co. Ltd, Beijing 100044

Received 5 May 2008; accepted 16 January 2009

Abstract: PCR-DGGE was applied to investigate the community structures of Ammonia-oxidizing Bacteria (AOB) in ten treatment systems of seven different Municipal Wastewater Treatment Plants (MWTPs) in Beijing. The results indicated that in these MWTPs, except for one system which had poor nitrification performance, all of the systems had AOB. But the diversity of AOB was low, and the AOB phenotypes were mainly grouped into the *Nitrosomonas oligotropha/aestuarii*-like cluster

Keywords: MWTP; activated sludge; PCR-DGGE; AOB

1 引言 (Introduction)

耦合硝化和反硝化过程的生物脱氮是将城市污水中氨氮最终以氮气形式去除的主要途径, 其中, 将氨氮转化为亚硝酸盐的氨氧化是硝化的第一步, 也是关键的一步, 由一类专属性自养微生物——氨氧化细菌 (AOB) 完成. 一般来说, 在适当的条件下, 所有的好氧生物处理工艺都具有氨氧化能力. 因此, 氨氧化是一个在城市污水处理中普遍存在的生

物过程.

由于氨氧化在生物脱氮中的重要性, 污水处理系统中的 AOB 受到广泛关注. 过去依赖纯培养的研究表明, 主要的 AOB 是亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas* sp.). 但最近的分子生物学研究结果表明, 亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira* sp.) 和亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus* sp.) 也同样存在于污水处理系统中 (Limpiyakorn et al., 2004; Limpiyakorn et al., 2006). 利用荧光原位杂交 (Fluorescence in situ

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (No. 20521140076); 科技部国际科技合作项目 (No. 2006DFA91870)

Supported by the Key International Cooperative Project of NSFC (No. 20521140076) and the International Science and Technology Cooperative Project of MOST (No. 2006DFA91870)

作者简介: 于健 (1982—), 女, E-mail: joy_email@163.com; *通讯作者 (责任作者), E-mail: yangn@mail.rcees.ac.cn

Biography: YU Jian (1982—), female, E-mail: joy_email@163.com; *Corresponding author, E-mail: yangn@mail.rcees.ac.cn

hybridization, FISH)、PCR-DGGE及克隆等技术针对城市污水厂活性污泥的研究发现,进水氨氮浓度 (Lydmark *et al* , 2007; Ottawa *et al* , 2006)、污泥停留时间 (Solids retention time, SRT) (Hallin *et al* , 2005; Limpiyakom *et al* , 2005)、以及溶解氧 (Limpiyakom *et al* , 2005)等都是影响 AOB 群落结构的重要因子.然而,污水处理厂工艺多种多样,原水组成也因为来源不同而千差万别,至今为止,工艺和原水水质对污泥中的 AOB 群落结构的影响并不清楚.

本论文分别从原水组成和工艺类型的角度,利

用 PCR-DGGE技术比较了北京市 7座城市污水厂 10个污水处理系统中 AOB 的种群结构,以期为深入了解污水处理系统的种群结构信息和系统优化提供科学基础.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2 1 样品的采集

共调查了 7个城市污水厂的 10个处理系统,每个厂的工艺特点如表 1所示. 2007年 4月下旬,在每个系统的好氧反应池末端采集活性污泥样品.

表 1 10个污水处理系统的概况
Table 1 Description of 10 wastewater treatment systems in 7 MWTPs

污水厂	处理能力 / (m ³ ·d ⁻¹)	工艺类型	SRT/d	COD			氨氮		
				进水 / (mg·L ⁻¹)	出水 / (mg·L ⁻¹)	去除率	进水 / (mg·L ⁻¹)	出水 / (mg·L ⁻¹)	去除率
B	53000	AO:缺氧+好氧	4.2	547.9	54.8	90.0%	56.2	49.9	11.3%
F	44000	A ₂ O:厌氧+缺氧+好氧 好氧短为接触氧化	15.5	588.7	35.2	94.0%	66.9	16.2	75.8%
J	152000	OD:氧化沟	14.9	411.1	36.0	91.2%	52.6	3.3	93.8%
W	15000	SBR:序批式间歇反应器	32.0	-	40.4	-	-	0.5	-
X	615000	A ₂ O:厌氧+缺氧+好氧	16.7	393.6	52.6	86.6%	52.2	4.9	90.6%
Q1	228000	A ₂ O:缺氧+厌氧+好氧	7.5	574.0	71.2	87.6%	50.8	15.7	69.1%
Q2	229000	A ₂ O:厌氧+缺氧+好氧	12.8	574.0	50.4	91.2%	50.8	6.0	88.3%
G1	400000	A ₂ O:缺氧+厌氧+好氧	33.0	295.4	39.5	86.6%	63.7	24.0	62.4%
G2	140000	AO(无内): (缺氧+好氧) (无内回流)	-	295.4	-	-	63.7	-	-
G3	140000	AO(有内): (缺氧+好氧) (有内回流)	>10	295.4	-	-	63.7	-	-

2 2 PCR-DGGE测序

2 2 1 PCR-DGGE 采用巢式 PCR 的方法来准备 DGGE所需 DNA. 第一轮采用特异性引物扩增 16S rRNA,利用不带 GC clamp 的正向引物 CTO189fAB 和 CTO189fC分别与反向引物 CTO654r组成 2对引物 (Kowalchuk *et al* , 1997),并分别扩增. 扩增条件为:预变性 95 下 5min, 35个循环 (94 下 45s, 57 下 45s, 72 下 45s),最后 72 下延伸 10min; PCR反应液中另加入 800ng·μL⁻¹小牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA). 第二轮扩增采用带 GC clamp 的细菌通用引物 GC-341f和 534r (即 primer 3和 primer 2) (Muyzer *et al* , 1993),扩增条件为:预变性 95 下 4min, 20个循环 (94 下 30s, 61.5 下 40s开始每个循环降低 0.3 , 72 下 40s), 15个循环 (94 下 30s, 55 下 40s, 72 下 40s),最后 72 下延伸 10min. PCR 反应液中不加

BSA. 第二次的 PCR产物用于 DGGE分析. DGGE所用仪器为 DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad,美国),采用丙烯酰胺百分比浓度为 10%的胶,变性梯度范围为 30%~50% (下高上低),在 1×TAE电泳缓冲液中,60 条件下,先 25V 运行 20min,再 130V 运行 7h左右. DGGE所得图片用 Quantity One软件进行数据处理分析 (李红岩等, 2005).

2 2 2 切胶测序 拍照后手动切胶,用冻融法提出 DNA,利用引物 341f (不带 GC clamp,即 primer 1) (Muyzer *et al* , 1993)和 534r进行 PCR 扩增,并对扩增产物进行测序 (北京奥科生物技术有限责任公司). 最后将测序结果提交 NCBI 基因库进行 BLAST 比对,找到相似性最大的培养物序列,用 MEGA 3.1 (Kumar *et al* , 2004)软件对切胶序列进行系统发育分析.

3 结果 (Results)

3.1 图谱结果

不同污水处理系统活性污泥样品中 AOB 种群

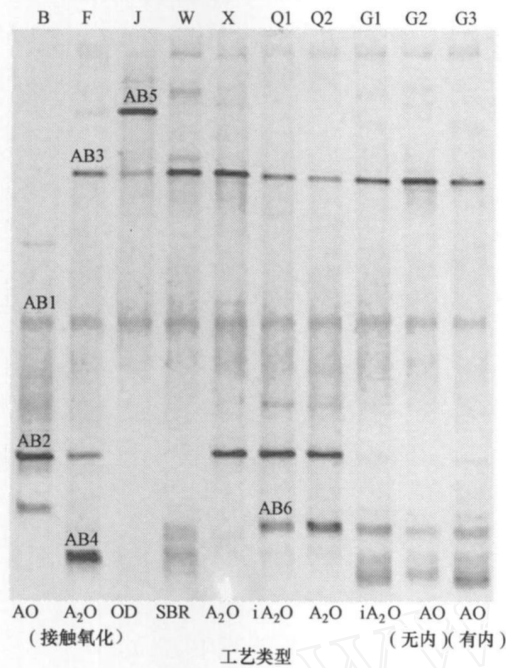


图 1 CTO189fAB-CTO654r 的 DGGE 结果
Fig. 1 DGGE result with CTO189fAB-CTO654r

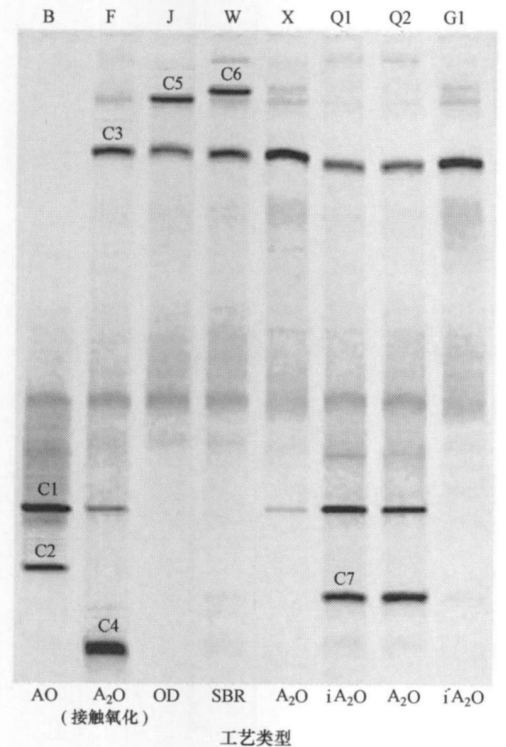


图 2 CTO189fC-CTO654r 的 DGGE 结果
Fig. 2 DGGE result with CTO189fC-CTO654r

结构的 DGGE分析结果如图 1 (接触氧化是 F 系统所包含的工艺;无内和有内分别指 G2和 G3系统无内回流和有内回流.可详见表 1)和图 2 所示.可以看出,利用 CTO189fAB 与 CTO654r CTO189fC 与 CTO654r这两对不同的引物得到了相似的 DGGE 图谱.图 3 为由图 1 的 DGGE电泳图得到的聚类分析结果.总体上来说,10个系统均出现 DGGE条带,但条带数均在 10以内,物种多样性不高.在图 1 中,多数样品有 AB1、AB3,部分样品有 AB2 条带,而 J 系统 (氧化沟)有一个明显的 AB5 在图 2 中,多数样品有 C3,部分样品有 C1 条带,而 B、F、J、W 和 Q 系统分别有一个明显的 C2、C4、C5、C6 和 C7 条带.图 3 表明, G1、G3 和 G2、W、F 和 J、X、B 和 Q1、Q2 分别构成 3 大组.

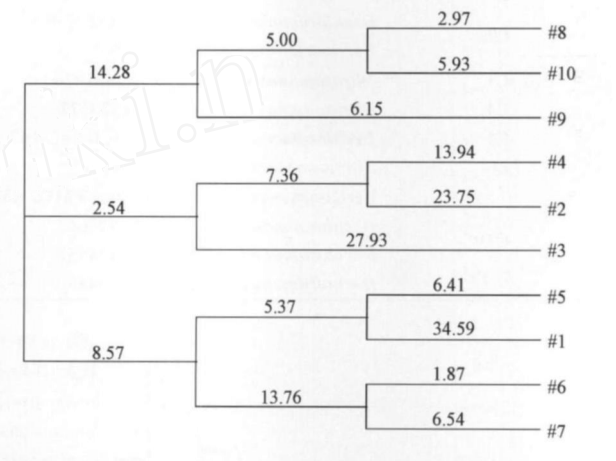


图 3 由图 1 的 DGGE结果得到的聚类分析图 (#1 ~ #10 分别是样品 B、F、J、W、X、Q1、Q2、G1、G2 和 G3)

Fig 3 Dendrogram generated by UPGMA cluster analysis comparison of DGGE patterns from Fig 1 (#1 ~ #10 show samples B, F, J, W, X, Q1, Q2, G1, G2 and G3, respectively)

3.2 序列结果

3.2.1 最大相似性结果 将条带 AB1 ~ AB6 和 C1 ~ C7 进行切胶测序,并提交基因库进行最大相似性比较,结果如表 2 所示.由表 2 可知,除了 AB1 的相似比例仅为 92% 外,其余条带与基因库中已知菌的相似比例均为 95% 以上.可以看出,只有 AB3、AB5、C3、C4、C6 等 5 个条带属于 AOB 中的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*),除了 B 厂外,其他各厂均有一定数量的条带属于 AOB 种属.其余条带的最大相似种属却为 β 亚变形菌纲的红环菌科 (*Rhodocyclaceae*).

3.2.2 系统发育树结果 利用 MEGA3.1 构建切胶测序序列的系统发育树,如图 4 所示.图中实心圆标记为条带 AB1 ~ AB6,空心圆标记为条带 C1 ~

表 2 DGGE条带的测序结果 (加粗的种属表明出现 2 次以上)

Table 2 Sequence analysis of bands exercised from DGGE gels (Genuses appearing more than twice are indicated in bold)			
条带名称	最大相似种属	相似性	样品来源
AB1	Perchlorate-reducing bacterium PR (AY265866)	92%	B / F / J / W / X / Q1 / Q2 / G1 / G2 / G3
AB2	<i>Dechloromonas</i> sp. RCB (AY032610)	98%	B / F / X / Q1 / Q2 / G1 / G2 / G3
	<i>Ferribacterium cda-1</i> (Y17060)		
AB3	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59 (AY123811)	97%	F / J / W / X / Q1 / Q2 / G1 / G2 / G3
AB4	<i>Dechloromonas</i> sp. EMB 269 (DQ413167)	100%	F / W / Q1 / Q2 / G1 / G2 / G3
	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> AS1 (EF016119)		
	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59 (AY123811)	95%	F / J
AB5	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is32 (AJ621027)		
	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is79A3 (AJ621026)		
	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> Nm45 (AJ298736)		
	<i>Nitrosomonas aestuarii</i> Nm36 (AJ298734)		
	Perchlorate-reducing bacterium PMC (AY265878)	98%	W / Q1 / Q2 / G1 / G2 / G3
AB6	<i>Dechloromonas</i> sp. HZ (AF479766)		
	<i>Dechloromonas</i> sp. PC1 (AY126452)		
	<i>Dechloromonas</i> sp. JM (AF323489)		
C1	<i>Dechloromonas</i> sp. RCB (AY032610)	98%	B / F / X / Q1 / Q2
	<i>Ferribacterium cda-1</i> (Y17060)		
C2	<i>Dechloromonas</i> sp. RCB (AY032610)	97%	B
	<i>Ferribacterium cda-1</i> (Y17060)		
C3	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is79A3 (AJ621026)	95%	F / J / W / X / Q1 / Q2 / G1
C4	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm59 (AY123811)	96%	F / W / Q1 / Q2
C5	<i>Dechloromonas</i> sp. EMB 269 (DQ413167)	100%	F / J / X / Q1 / Q2 / G1
C6	<i>Nitrosomonas</i> sp. D27 (U56626)	95%	W / X / Q1 / Q2 / G1
	Perchlorate-reducing bacterium PMC (AY265878)		
C7	<i>Dechloromonas</i> sp. HZ (AF479766)	98%	W / Q1 / Q2 / G1
	<i>Dechloromonas</i> sp. PC1 (AY126452)		
	<i>Dechloromonas</i> sp. JM (AF323489)		

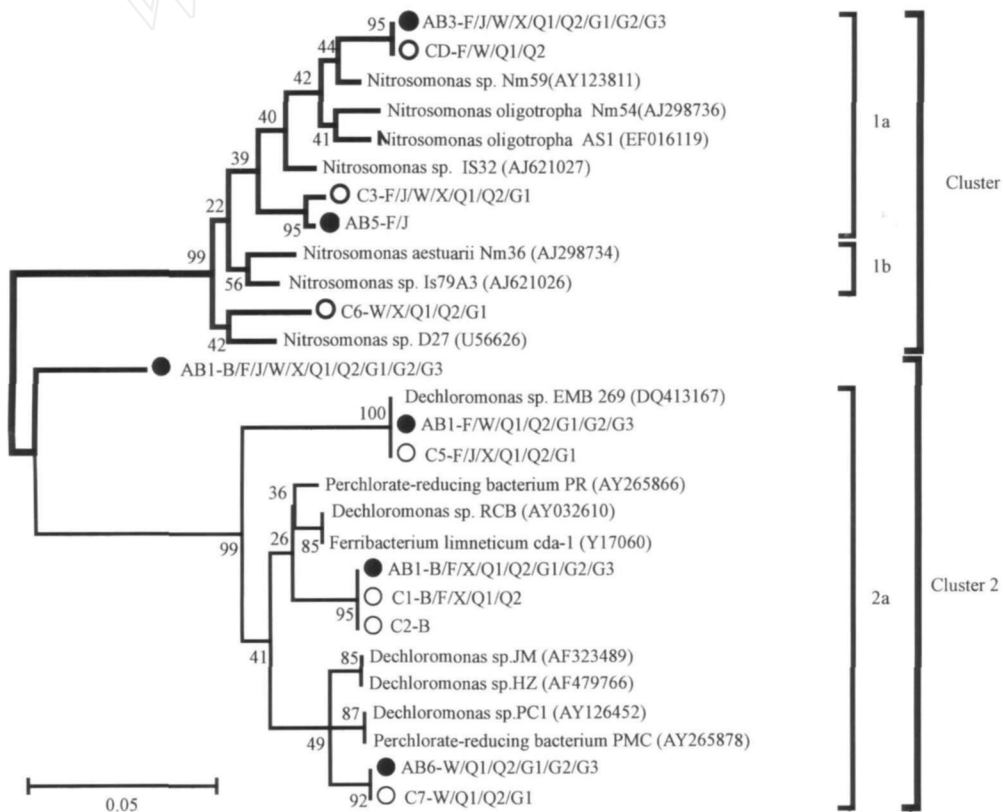


图 4 由 DGGE 测序结果建立的 16S rRNA 基因的系统发育树

Fig 4 Phylogenetic tree for 16S rRNA established with sequences from excised DGGE bands

C7.由图 4可知,两种 CTO引物得到的 DGGE结果非常类似,如 AB3和 C4,AB4和 C5,AB2、C1和 C2,AB6和 C7在系统发育树中都处于同一位置.这些条带主要分为两个 Cluster. Cluster 1是属于 *Nitrosomonas*的 AOB, Cluster 2为 *Dechloromonas*属 *Rhodocyclaceae*科的物种. Cluster 1中条带 AB3、C4、C3和 AB5属于 *Nitrosomonas oligotropha*-like cluster,即图 4中的 1a,其中 AB3和 C4与 *Nitrosomonas oligotropha*有很高的相似性,基本处于同一个 OTU; C3和 AB5与 *Nitrosomonas* sp. Is79A3相似性最高.条带 C6与 *Nitrosomonas* sp. D27最为相似,同时与 1b所代表的 *Nitrosomonas aestuarii*-like cluster的亲缘关系较近.

4 讨论 (Discussion)

4.1 图谱分析

从图 1和图 2可以看出,不同引物得到的 DGGE分析结果比较一致.尽管会出现一些特异性的条带,在 2个图中都能找到多数样品都拥有的条带,说明不同的污水处理系统在 AOB种群结构上相似性还是比较高的,也说明污水厂 AOB的多样性可能不高.

图 3表明,Q厂的 Q1和 Q2系统,G厂的 G1、G2和 G3系统都归在同一组里,说明对于同一污水处理厂即使工艺类型不同,AOB的种群结构仍然比较接近.处理系统的运行参数及运行水平不同,AOB种群结构也未发生根本变化.说明进水来源对于污水处理系统的 AOB种群结构有较大影响.同时,相同的工艺类型分布在不同污水处理厂时,如同为 AO工艺的 B、G2和 G3系统,同为 A_2O 工艺的 X和 Q2,同为倒置 A_2O 工艺的 Q1和 G1分散在不同的组里,说明工艺类型对于 AOB的种群结构影响不大. O'tawa等在对动物养殖废水 AOB种群的研究中发现,原废水氨氮浓度的高低对活性污泥中 AOB的种类存在一定的影响,在浓度高时以 *Nitrosomonas europaea-eutropha* cluster为主,在浓度低时以 *Nitrosomonas ureae-oligotropha marina* cluster为主 (O'tawa et al, 2006).而在本研究中,各污水厂的进水氨氮浓度应该没有显著差异,不应该成为影响 AOB相似性的关键因子.到底什么是最主要的影响因素有待于进一步的研究.

4.2 序列分析

由图 1、图 2和表 2可知,与条带 AB3和 C3具

有最大相似性的 *Nitrosomonas* sp. Nm59和 *Nitrosomonas* sp. Is79A3两种菌(图 4,表 2)普遍存在于北京市的污水处理厂中,同时与活性污泥的氨氧化功能密不可分.有报道称 *Nitrosomonas* sp. Nm59是从污水处理厂中分离培养出来的 (Purkhold et al, 2003).此外, *Nitrosomonas oligotropha* AS1来自污水, *Nitrosomonas oligotropha* Nm45和 *Nitrosomonas* sp. D27来自土壤 (Aakra et al, 2001; Bruns Mary Ann et al, 1999), *Nitrosomonas aestuarii* Nm36来自海洋 (Aakra et al, 2001),而这些种属与本研究的目标有着很大亲缘关系(图 4,表 2),说明城市污水处理厂中的 AOB可能主要来自周边环境.近几年的研究中还发现,具有氨氧化功能的微生物除了细菌以外,还有古菌 (Konneke et al, 2005; Park et al, 2006),今后需要关注氨氧化古菌 (Ammonia-Oxidizing Archaea)在污水处理厂中的存在与贡献.

4.3 引物的影响

表 2的比对结果中出现一半以上非 AOB物种. Cebion等在对塞纳河下游 AOB的研究中也发现了类似情况,由 CTO引物所得出的序列中有大量非 AOB结果,这种情况在污水处理厂的样品尤其明显 (Cebion et al, 2004). Purkhold等在通过对各种 AOB引物的对比研究中发现,对于 AOB在 DNA分子水平上的研究,还没有完美的引物既可以扩增出全部的 β 亚变形菌纲 AOB,又可以完全排除非 AOB物种 (Purkhold et al, 2000).因此,结果中有些条带很可能与 AOB并不相关,它们只是与 AOB亲缘关系很近的其它物种.

图 4中,条带 AB3和 C4,AB4和 C5,AB2、C1和 C2,AB6和 C7,各组间序列相似性 $\geq 97\%$,每一组可作为一个 OTU,说明污水处理厂活性污泥中的 AOB种类较少,这与图谱分析的结果是一致的.同时,从图 1和图 2中可以明显看出:AB3与 C4、AB4与 C5、AB2和与 C2,这 3组条带处于不同位置,理论上应属于不同种的细菌,但结果显示为同一种.这种情况主要是由于 DGGE本身的特点造成的.由于兼并引物、异源双链核酸分子的形成或多重异类 rRNA 操纵子的原因等 (Cebion et al, 2004),由 DGGE所产生的条带数量不能精确地反映出一个环境样品中不同序列的数量.一个 DGGE条带可能是几个物种的组合,也可能一个物种产生几个条带.

5 结论 (Conclusions)

1)除 B厂没有检测出 AOB外,其余各厂都有

一定的 AOB 分布,但总体上 DGGE 条带数量少,污水处理厂中 AOB 的多样性较低.对 DGGE 条带测序结果表明,主要 AOB 集中在 *Nitrosomonas oligotropha/aestuarii*-like cluster

2)工艺类型对于 AOB 种群结构的影响不是非常明显.

3)CTO 引物特异性不强,用于 AOB 分析存在一定的问题.今后在方法学上有待于进一步完善.

责任作者简介:杨敏(1964—),男,研究员,博士,主要从事环境微生物与环境水质学研究.

参考文献 (References):

- Aakra A, Utaker J B., Pommerening-Roser A, *et al* 2001. Detailed phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 2021—2030
- Bruns M A, Stephen J R., Kowalchuk G A, *et al* 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils [J]. *Appl Environ Microbiol*, 65(7): 2994—3000
- Cebon A, Coci M, Gamier J, *et al* 2004. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: impact of Paris wastewater effluents [J]. *Appl Environ Microbiol*, 70(11): 6726—6737
- Hallin S, Lydmark P, Kokalj S, *et al* 2005. Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 629—640
- Konneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, *et al* 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. *Nature*, 437(22): 543—546
- Kowalchuk G A, Stephen J R, de Boer W, *et al* 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β Subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient Gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 63(4): 1489—1497
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 5(2): 150—163
- 李红岩. 2005. 膜生物反应器与传统活性污泥两硝化系统的性能与生物群落结构研究 [D]. 北京:中国科学院研究生院, 60—61; 65
- Li H Y. 2005. Study on nitrification performance and microbial community structure in a submerged membrane bioreactor and a conventional activated sludge system [D]. Beijing: Graduate School, Chinese Academy of Sciences, 60—61; 65 (in Chinese)
- Limpiyakom T, Kurisu F, Yagi O. 2006. Development and application of real-time PCR for quantification of specific ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of sewage treatment systems [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 1004—1013
- Limpiyakom T, Shinohara Y, Kurisu F, *et al* 2004. Distribution of ammonia-oxidizing bacteria in sewage activated sludge: analysis based on 16S rDNA sequence [J]. *Water Science and Technology*, 50(8): 9—14
- Limpiyakom T, Shinohara Y, Kurisu F, *et al* 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2): 205—217
- Lydmark P, Almstrand R, Samuelsson K, *et al* 2007. Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant [J]. *Environ Microbiol*, 9(9): 2220—2233
- Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 59(3): 695—700
- Otawa K, Asano R, Ohba Y, *et al* 2006. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment [J]. *Environ Microbiol*, 8(11): 1985—1996
- Park H D, Wells G F, Bae H, *et al* 2006. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors [J]. *Appl Environ Microbiol*, 72(8): 5643—5647
- Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, *et al* 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. *Appl Environ Microbiol*, 66(12): 5368—5382
- Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, *et al* 2003. 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1485—1494