

复合垂直流湿地氨氧化菌种群结构及活性的空间分布

黄德锋, 李田*

(同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要:应用复合垂直流湿地净化富营养化景观水体, 测定了湿地系统不同空间层次的氨氧化菌(AOB)活性, 并采用 PCR-DGGE 技术考察了氨氧化菌种群多样性. 结果表明, 在复合垂直流湿地中, 由于植物根际效应、异养菌竞争、DO 浓度以及氨氮浓度等环境条件的综合作用, 氨氧化菌活性和种群多样性沿水流方向呈现出较为明显的空间分布差异. 下行池表层氨氧化菌活性最高, 为 $0.79 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ (以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 计, 下同). 从下行池表层到上行池底层, 氨氧化菌活性逐渐下降, 至上行池表层略有增加, 氨氧化菌活性为 $0.17 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$. 氨氧化菌多样性与活性的空间分布表现出大致相同的趋势, 下行池氨氧化菌多样性指数(平均为 1.92)高于上行池(平均为 1.65). 在复合垂直流湿地系统中, 多数菌种为寡营养类微生物, *Nitrosomonas* sp. 为优势菌种, 在湿地氨氮的去除过程中起着主导作用. 此外还检测到 *Uncultured beta proteobacterium*、*Comamonas* sp. 以及 *Nitrosomonas oligotropha* 等菌种. 在湿地不同位置, 不同湿地环境长期选择的结果, 使氨氧化菌种群结构表现出一定的空间演替变化.

关键词: DGGE; 人工湿地; 景观水体; 氨氧化菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)08-2160-06

Variation of Diversity and Activity of Ammonia-Oxidizing Bacteria Community in the Integrated Vertical-Flow Constructed Wetlands

HUANG De-feng, LI Tian

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The activity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in different layers of Integrated vertical-flow constructed wetlands (IVCW) treating eutrophic scenic water was measured, and the diversity and spatial distribution of AOB community structure in IVCW was investigated using PCR-DGGE. The results indicated that because of the integrated influence of competition of plant rhizodeposition, heterotrophic bacteria, DO and ammonia concentration, there were significant spatial differences in the activity and diversity of AOB along the flow direction of wetland. The activity of AOB was $0.79 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ (in $\text{NO}_3^- - \text{N}$, the same below) near the surface of down-flow system in IVCW. From the surface of down-flow system to up-flow system, the activity of AOB decreased gradually, and slightly increased to $0.17 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ near the surface of up-flow system. The spatial variation of diversity of AOB showed the similar change trend with the activity in IVCW and the diversity index in down-flow system (1.92) were higher than those in up-flow system (1.65). Most of AOB belong to oligotrophic bacterium in IVCW, and the population of ammonia-oxidizing bacteria showed a higher percentage of *Nitrosomonas*-like sequences from the wetland samples. *Uncultured beta proteobacterium*, *Comamonas* sp., *Nitrosomonas oligotropha* were also detected. The variation of the AOB community demonstrated spatial pattern in IVCW, which might be related to different wetland environment.

Key words: DGGE; constructed wetland; scenic water; ammonia-oxidizing bacteria

人工湿地作为一种新型污染水体生态处理技术, 由于具有良好的生态效益和经济效益, 可以构筑集观赏、娱乐、水质净化于一体的景观生态环境, 近年来在城市河湖等富营养化景观水的治理中逐渐得到应用.

在人工湿地净化富营养化景观水的过程中, 除磷主要依靠基质的吸附沉淀作用, 去除率高且相对稳定. 氮的去除主要依靠湿地系统微生物的硝化反硝化作用, 其中氨氧化菌(AOB)负责将氨态氮氧化为亚硝酸盐氮, 实现硝化过程中的速率限制步骤为亚硝化过程, 在氮的去除中发挥重要作用. 由于不同氨氧化菌种属间存在生理特性和生态功能上的差异, 其种群结构和活性容易受到 DO、pH、温度、氨氮

浓度等诸多因素影响, 进而影响系统出水水质^[1-4].

因此, 充分认识湿地系统中氨氧化菌种群结构及生物活性的空间分布, 是了解湿地系统微生物作用机制从而提高氮的净化效果的前提和基础. 由于氨氧化菌代谢缓慢, 对环境条件变化敏感, 采用传统方法很难进行纯种分离, 不能准确描述氨氧化菌种群结构和动态组成^[5]. 本研究应用复合垂直流湿地净化富营养化景观水, 采用 PCR-DGGE 技术分析了

收稿日期: 2007-08-24; 修订日期: 2007-10-20

基金项目: 上海市科委重点项目(05dz12006)

作者简介: 黄德锋(1978~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为污染水体生态修复技术, E-mail: huang5151029@126.com

* 通讯联系人, E-mail: tongjilitian@126.com

复合垂直流湿地系统氨氧化菌种群结构与活性的空间分布特征,通过分析氨氧化菌种群活性、多样性、以及优势种属的空间变化,探讨湿地系统中氨氧化菌群落演替过程,以期为复合垂直流湿地系统脱氮的优化控制策略奠定微生物学理论基础.

1 材料与方法

1.1 试验装置

复合垂直流人工湿地床由下行池(0.5 m×0.5

m×0.6 m)和上行池(0.5 m×0.5 m×0.5 m)2个池串连而成,底部连通,下行池和上行池分别装填粒径为3~5 mm的沸石和页岩作基质,以强化氮磷的去除效果.下行池表层铺设进水布水管,上行池表层铺设出水收集管.基质表层种植景观植物美人蕉,种植密度为8~10个块茎/m².

进水水质:进水取自同济大学校区呈明显富营养化的景观水池,进水水质(5个月的平均值)如表1所示.

表1 人工湿地进水水质

Table 1 Inflow water quality of the constructed wetland								
水质参数	pH	浊度/NTU	DO/mg·L ⁻¹	Chla/mg·m ⁻³	COD/mg·L ⁻¹	TN/mg·L ⁻¹	NH ₄ ⁺ -N/mg·L ⁻¹	TP/mg·L ⁻¹
平均值	8.1	29.4	2.39	28.9	36.8	4.65	2.25	0.38
标准差(SD)	0.15	3.93	0.43	5.23	4.24	0.67	0.29	0.02

1.2 样品采集

试验时人工湿地小试系统已连续运行1 a,系统比较稳定.试验期间系统在水力负荷为0.113 m³/(m²·d)条件下稳定运行,每周监测进出水水质,按照污水在湿地系统的流向,于2007年5月在下行池和上行池沿程取样,分别标记为S1(下行5~10 cm)、S2(下行20~25 cm)、S3(下行35~40 cm)、S4(上行35~40 cm)、S5(上行20~25 cm)、S6(上行5~10 cm),分别取水样和基质样品,考察复合垂直流湿地系统中水质的沿程变化情况(水质样品为1~6号),并分析氨氧化菌种群结构的演替变化.

1.3 复合流湿地各基质层氨氧化菌活性测定

对复合流湿地各取样口采集的样品,分别准确称取100 g混匀基质,置于250 mL三角瓶中,加入100 mL NH₄⁺培养液(氨氮浓度为25 mg/L),用脱脂棉塞住瓶口,在恒温振荡器中(25℃,150~160 r/min)振荡24 h,离心后过滤,测定滤液中的NO₃⁻-N浓度,用基质硝化作用产生的NO₃⁻-N的量表示氨氧化菌的活性[测定结果以单位质量(1 kg)烘干基质单位时间(1 h)内产生的NO₃⁻-N的量(mg)表示]^[6].

1.4 基质样品的预处理和微生物DNA的提取纯化

预处理:基质样品采集后,置于灭菌的三角瓶中,加入200 mL灭菌后的蒸馏水,超声波清洗10 min,采用恒温振荡器在120 r/min下振荡30 min,取悬浮液在8 000 r/min下离心10 min,弃去上清液,收集沉淀,保存于-70℃的冰箱中,用于DNA提取.

微生物DNA提取:采用3S柱环境样品抽提试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司)提取样品总DNA,提取到的总DNA用0.8%的琼脂糖凝胶电泳

检测.

1.5 PCR扩增

采用巢式PCR方法对样品的氨氧化菌进行扩增,第1轮PCR引物为β-Proteobacteria特异性引物CTO189f和CTO654r^[7],第2轮PCR引物为细菌16S rDNA V3可变区特异性引物GC-338 f和518 r^[8].50 μL的PCR反应体系组成如下:模板DNA100 ng;10×PCR buffer 5 μL;200 μmol/L的dNTP混合物(每种10 mmol/L)15 μL;正反引物各20 pmol;Taq酶2.5 U;无菌双蒸水补齐至50 μL.扩增条件:94℃预变性10 min;94℃变性45 s,56℃退火45 s(第1轮)和60℃退火45 s(第2轮),72℃延伸45 s,30个循环;72℃最终延伸10 min.反应在Mycycler(Bio-Rad, USA)PCR仪上进行,第1轮和第2轮PCR扩增片断长度分别为465 bp和250 bp左右,产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.6 DGGE凝胶电泳及片断序列测定

扩增后的第2轮PCR产物采用BIO-RAD公司Dcode system进行变性梯度凝胶电泳分析.采用8%的聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度范围为35%~60%.电泳条件:1×TAE电泳缓冲液先在60℃、200 V下运行10 min,再在150 V下运行4 h.电泳结束后,将凝胶采用EB染色.用Bio-Rad Quantity One 4.6.3软件进行图像处理及分析.

选取代表性条带进行PCR扩增,扩增引物对为不带GC夹的F338和R518,程序同上.扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检验后纯化,送上海英骏生物技术有限公司测序.测序结果输入NCBI网站,与数据库中已知序列比对,比对结果采用MEGA3.1软件绘制系统进化树.

1.7 PCR-DGGE 指纹图谱分析

微生物群落多样性指数采用 Shannon-Weaver 指数(H')表示,表达式为:

$$H' = - \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

(1)

式中, s 为每个样品的条带数目, n_i 为第 i 种的个体数, N 为种群中总的个体数, 个体数用波峰面积表示. H' 可反映种群内及种群之间的遗传多样性分布和差异. 根据 Bio-Rad Quantity One 4.6.3 条带检测结果, 分析湿地系统沿程各取样点的氨氧化菌多样性指数, 考察系统内部氨氧化菌种群多样性变化.

2 结果与讨论

2.1 湿地不同基质层氨氧化菌的活性

不同采样点基质生物膜上氨氧化菌的活性见图 1. 由图 1 可知, 复合垂直流人工湿地下行池表层(5 ~ 10 cm) 氨氧化菌活性最强, 达到 $0.79 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$, 沿水流方向, 氨氧化菌活性逐渐减弱, 在上行池底层最低, 为 $0.13 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$, 从上行池底层到表层, 氨氧化菌的活性有所增强, 上行池表层氨氧化菌活性为 $0.17 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$.

对复合垂直流湿地沿程各点取水样, 分析污染物浓度沿程变化情况, 以探讨湿地系统污染物浓度和环境条件的变化对氨氧化菌活性的影响, 结果如

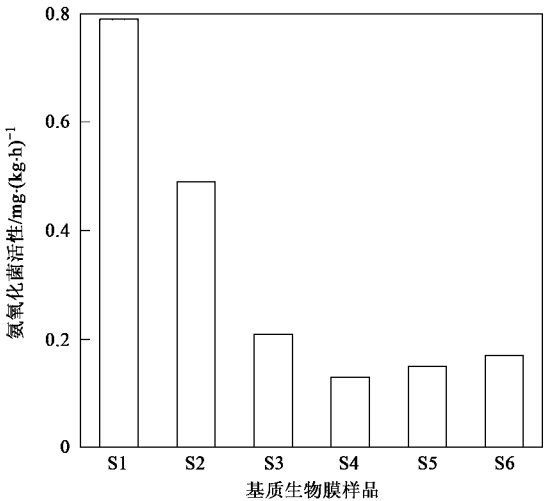


图 1 复合垂直流湿地各基质层氨氧化菌活性
Fig.1 Activity of AOB in different layers of IVCW

表 2 所示. 从中可以看出, 在复合流湿地下行池表层, 由于 DO 浓度和氨氮浓度较高, 氨氧化菌的活性最强. 沿水流方向, 污染物逐渐被降解, 水中氨氮含量和 DO 浓度逐渐降低, 在湿地系统内部由好氧状态逐渐转变为兼氧和厌氧状态, 氨氧化菌的活性受到抑制. 当水流到达上行池表层时, 由于植物根系供氧以及大气复氧作用, 致使氨氧化菌的活性得到一定的恢复.

表 2 复合垂直流湿地 DO、pH 以及污染物浓度的沿程变化/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Table 2 Changes of DO, pH and pollutants concentration in IVCW/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

水质参数	进水	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	出水
DO	1.84	1.66	0.97	0.32	0.18	0.23	0.27	0.26
pH	8.04	7.79	7.65	7.51	7.33	7.27	7.16	6.98
COD	35.2	21.6	15.4	13.2	9.8	9.6	8.2	7.0
TN	5.40	4.63	3.74	2.90	1.96	1.70	1.10	0.75
NH ₄ ⁺ -N	1.62	1.25	0.88	0.57	0.52	0.36	0.24	0.21
TP	0.39	0.32	0.26	0.23	0.13	0.09	0.06	0.04

2.2 微生物群落指纹图谱分析

复合垂直流人工湿地系统不同位置氨氧化菌 DGGE 分离图谱如图 2 所示. 从中可知, 湿地系统中的微生物多样性并不十分丰富, 主要是由于进水为富营养化景观水, 污染物浓度较低, 这种贫营养条件下生长的氨氧化菌群, 不可能形成复杂的微生物群落和丰富的细菌数量. 从不同位置样品的条带数目和亮度看, 由于氨氧化菌的营养水平和环境条件存在差异(见表 2), 各个样品优势条带的位置、亮度以及条带数目也表现出一定的空间多样性. 每个样品

都有 3 ~ 5 个较亮的条带出现, 表明在湿地的不同位置, 均存在一定数量的氨氧化菌优势种群. 各个样品中存在位置相同但亮度不同的条带(# 号所示), 说明存在种属相同但数量不同的氨氧化菌种属, 这些氨氧化菌对环境条件变化的适应能力较强, 在湿地系统中一直稳定存在, 在氨氮的氧化过程中发挥重要作用. 资料也表明, 氨氧化菌能在不同的环境条件下利用多种基质, 并与其它菌种之间存在协作和竞争的关系^[9]. 同时, 也有一些条带(& 号所示) 亮度减弱甚至消失, 某些条带(Δ 号所示) 仅在图谱的某个

位置出现,说明这些条带所代表的氨氧化菌种属对环境条件的变化敏感,仅在特定生态条件下存在,环境条件变化时,这类氨氧化菌逐渐由优势种群转变为非优势种群或消亡.

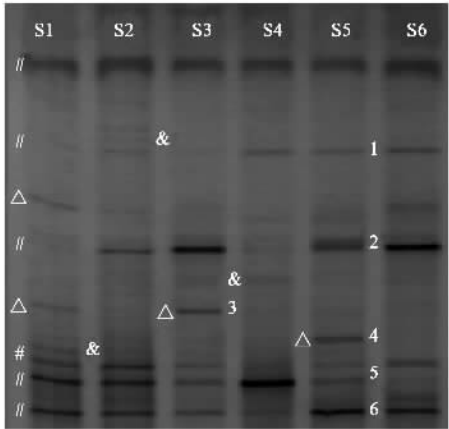


图2 复合垂直流湿地中 AOB 种群结构的 DGGE 图谱
Fig.2 DGGE fingerprints of AOB community in IVCW

2.3 微生物群落多样性指数分析

湿地系统中氨氧化菌种群多样性影响系统运行的稳定性. Ibekwe 等^[10]的研究表明,氨氧化菌种群多样性越好,系统运行越稳定,系统就更能适应冲击负荷变化,硝化、反硝化作用进行的越完全.采用 Shannon-Weaver 公式,计算得到基质样品多样性指数分布如图 3 所示.从中可知,由于 pH、DO 等环境条件的影响以及异养菌的竞争作用,限制了氨氧化菌的数量和活性,致使氨氧化菌种群多样性在复合垂直流湿地中呈现一定的空间差异.具体表现为:从湿地下行池到上行池,氨氧化菌多样性出现较为明显的变化,下行池氨氧化菌多样性指数(均值为 1.92)明显高于上行池(均值为 1.65),样品 S2 的氨氧化菌多样性指数最高(为 2.02),随着水力停留时间的延长,至上行池底部时氨氧化多样性降为 1.52,从上行流底部至上行流表层氨氧化菌的多样性又略有升高.

研究表明,不同种属的氨氧化菌在生长动力学、对底物和氧的亲合力、对底物的氧化速率以及对环境因子的敏感性都是不同的^[7,11].氨氧化菌是严格的好氧自养型细菌,当污水通过湿地系统时,有机物被降解,同时氧气被消耗.有机物浓度高时,异养菌和氨氧化菌竞争氨氮和氧气,异养菌占优势.当有机物浓度降低时,异养菌数量减少,氨氧化菌成为优势菌种.在湿地的上层,由于含有较高的溶解氧和氨氮,为氨氧化菌的生长提供了良好的生长条件,所以表层氨氧化菌多样性较好.由于在湿地系统的不同

位置,污染物浓度、DO 等环境条件的变化(见表 2)以及氨氧化菌和异养菌的竞争等协同作用,致使氨氧化菌种群结构在湿地中表现出一定的空间变化.

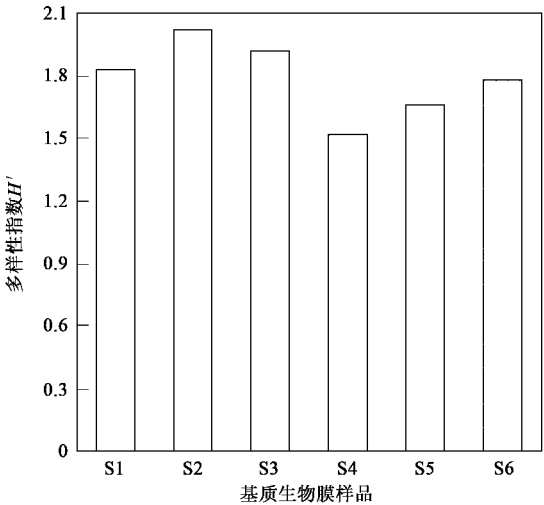


图3 复合垂直流湿地氨氧化菌种群多样性指数
Fig.3 Diversity index of AOB community in IVCW

由表 2 和图 3 可以看出,在湿地下行池表层(样品 S1),污染物和 DO 浓度较高,但样品 S1 的多样性指数却略低于 S2.这可能是由于在下行池表层,虽然 DO 浓度较高,但有机物对氨氧化菌种群的影响占据主要方面,较高的污染物浓度致使异养菌占有一定优势,与氨氧化菌竞争 DO 和营养物质,氨氧化菌的生长繁殖受到抑制,多样性下降.有学者通过研究也认为,DO 对氨氧化菌的种群结构影响不大,但对氨氧化菌的活性影响较大^[12,13].

值得注意的是,上行池表层氨氧化菌的多样性并不是最低,反而略高于中下层.这可能是由于表层植物根系比较密集,植物供氧、植物残体累积以及根际效应使表层微生物多样性较好,与文献^[14]的研究结论一致.

2.4 代表条带的回收测序和进化分析

将湿地微生物样品的 DGGE 图谱中优势条带(带 1~带 6,如图 2 所示)进行割胶测序,进行序列比对,并对序列比对结果作系统进化树,结果如图 4 所示.由图 4 可知,多数条带与 *Nitrosomonas* sp. 具有较高的相似性,说明在处理低浓度富营养化景观水的湿地中, *Nitrosomonas* sp. 是该生态系统的优势菌种,在氨氮的去除过程起着主导作用.资料^[15]也表明,许多废水处理系统中氨氧化作用主要由 β 亚纲的 *Nitrosomonas* sp. 完成.

由于湿地进水为富营养化景观水,氨氮浓度较

低,这种环境条件下生长的氨氧化菌多数属于对贫营养环境适应性较强的菌种.序列比对结果也表明,与各个条带具有较高相似性的菌种,多出现于氨氮浓度较低的水体中.如 Uncultured beta proteobacterium Ch6S、Uncultured beta proteobacterium Ba1.0 以及 Uncultured beta proteobacterium Ba0.25-2 均为在低氨氮浓度下培养获得的氨氧化菌^[16],而 Uncultured

ammonia-oxidizing bacterium clone LKD3、Beta proteobacterium HTCC349 以及 Uncultured bacterium DW_NsoE9-9 则在湖水、地下水以及城市给水系统等贫营养水环境中检测到,有些氨氧化菌与 *Nitrosomonas oligotropha* 有较高的同源性.研究表明 *Nitrosomonas oligotropha* 是氨氮浓度较低的淡水中的优势种,在贫营养环境中容易占优势^[17].

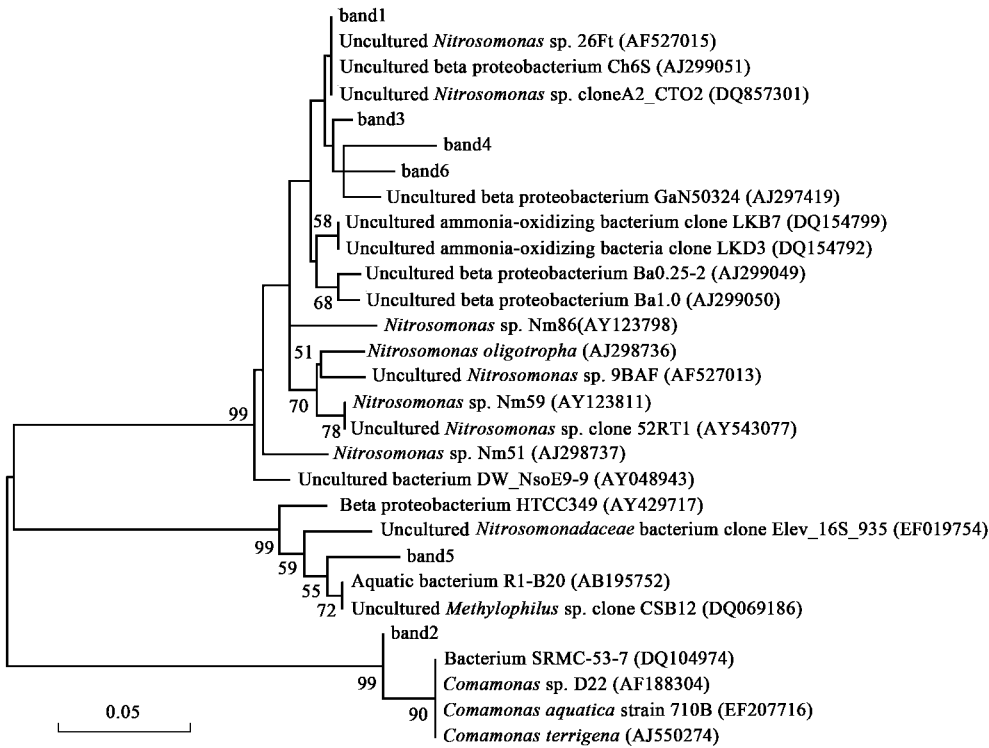


图 4 复合垂直流湿地中氨氧化菌的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing bacteria in IVCW

结合图 2 和图 4 可知,随着复合垂直流湿地系统中环境条件的和营养水平发生变化,氨氧化菌群的种群结构也出现一定的演替变化.由图 4 可知,在复合垂直流湿地下行池表层(样品 S1),检测到的菌种主要为 *Nitrosomonas* sp.,从下行池表层到上行池表层,沿水流方向,又有 *Comamonas* sp. 以及 *Nitrosomonas oligotropha* 等菌种出现,说明在复合垂直流湿地系统中,底物浓度、DO 浓度以及 pH 等环境条件的变化,对微生物的种群结构产生一定影响.沿水流方向出现不同的氨氧化菌种属,可能是不同的人工湿地环境对氨氧化菌种属长期选择的结果.由于进水污染物浓度较低,沿程变化梯度较小,所以氨氧化菌种群演替变化不是特别明显.

3 结论

(1)受异养菌的竞争、氨氮浓度以及 DO 浓度等

环境条件协同作用的影响,氨氧化菌的种群结构和活性在复合垂直流湿地系统中呈现一定的空间分布差异.

(2)氨氧化菌活性从下行池表层到上行池底层逐渐下降,至上行池表层略有增强.

(3)复合垂直流湿地中氨氧化菌种群多样性呈现一定的空间分布差异,下行池高于上行池.植物根系供氧、残体累积以及根际效应,在一定程度上提高了湿地表层氨氧化菌种群多样性.

(4)测序结果表明,在处理低浓度富营养化景观水的复合垂直流人工湿地中,多数菌种为寡营养类微生物, *Nitrosomonas* sp. 为优势菌种,在氨氮氧化过程中起着主导作用.沿水流方向,氨氧化菌种群组成出现一定的演替变化.

参考文献:

[1] Schramm A, Beer D D, Gieseke A, et al. Microenvironments and

- distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm[J]. *Environmental Microbiology*, 2000, **2**(6): 680-686.
- [2] Cébron A, Coci M, Garnier J, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower Seine River: Impact of Paris wastewater effluents[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(11): 6726-6737.
- [3] Park H D, Noguera D R. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge[J]. *Water Research*, 2004, **38**(14-15): 3275-3286.
- [4] Prinčič A, Mahne I, Megušar F, *et al.* Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(10): 3584-3590.
- [5] Siripong S, Rittmann B E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 2007, **41**: 1110-1120.
- [6] 丁晔, 韩志英, 吴坚阳, 等. 不同基质垂直流人工湿地对猪场污水季节性处理效果的研究[J]. *环境科学学报*, 2006, **26**(7): 1093-1100.
- [7] Kowalchuk G A, Stephen J R, Boer W D, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(4): 1489-1497.
- [8] Mobarry B K, Wagner M, Urbain V, *et al.* Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(6): 2156-2162.
- [9] 李小鹏, 张代均, 曹琳, 等. 氨氧化菌在污水生物处理中的作用[J]. *中国给水排水*, 2004, **20**(5): 24-27.
- [10] Ibekwe A M, Grieve C M, Lyon S R. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(9): 5060-5069.
- [11] Burrell P C, Phalen C M, Hovanec T A. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(12): 5791-5800.
- [12] Bodelier P L E, Libochant J A, Blom C W P M, *et al.* Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low oxygen or anoxic habitats[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(11): 4100-4107.
- [13] Bollmann A, Laanbroek H J. Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde estuary [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, **28**(3): 239-247.
- [14] Truu J, Nurk K, Juhanson J, *et al.* Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment [J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2005, **40**(6-7): 1191-1200.
- [15] Purkhold U, Röser A, Juretschko S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(12): 5368-5382.
- [16] Bollmann A, Laanbroek H J. Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **37**(3): 211-221.
- [17] Stehr G, Böttcher B, Dittberner P, *et al.* The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, **17**(3): 177-186.