

氨氧化细菌和氨氧化古菌在百花湖 沉积物中的垂直分布

梁 龙^{1,2}, 梁小兵¹

1. 中国科学院 地球化学研究所, 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; 2. 中国科学院大学, 北京 100039

摘 要:采用定量氨单加氧酶基因(amoA)的荧光定量 PCR(qPCR)方法,分析了氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)在百花湖沉积物中的垂直分布。以氨单加氧酶基因(amoA)数量来衡量氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA),结果表明:百花湖沉积物中 AOA 的 amoA 基因数量在 $1.74 \times 10^5 \sim 2.00 \times 10^6$ 拷贝/克沉积物(湿重)之间,且 22~30 cm 的各层沉积物中, AOA 的数量是 1~21 cm 各层沉积物的 2 倍左右;AOB 的 amoA 基因在百花湖沉积物中的数量随深度的增加变化不大,其拷贝数在 $6.10 \times 10^6 \sim 3.88 \times 10^7$ 拷贝/g 沉积物(湿重)之间;AOB 与 AOA 的 amoA 基因的比例在浅层沉积物和深层沉积物中存在一定的差异。这些结果表明 AOB 和 AOA 都参与百花湖沉积物中的氨氧化作用,从两类微生物的数量来看, AOB 是参与百花湖沉积物中氨氧化作用的主要微生物,而 AOA 对氨氧化作用的贡献则随着沉积物深度的增加而提高。

关 键 词:氨氧化细菌;氨氧化古菌;沉积物;荧光定量 PCR;百花湖

中图分类号:X703 文献标志码:A 文章编号:1007-2802(2014)02-0221-05 doi:10.3969/j.issn.1007-2802.2014.02.010

Vertical Distribution of Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) and Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) in the Sediments of Lake Baihua

LIANG Long^{1,2}, LIANG Xiao-bing¹

1. State Key Laboratory of Environment Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Science, Guiyang 550002, China; 2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China

Abstract: The vertical distributions of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) in the sediments of Lake Baihua were analyzed using the qPCR method. Abundances of AOA and AOB were analyzed in terms of the amoA gene copy number. The results showed that the numbers of AOA amoA gene were between $1.74 \times 10^5 \sim 2.00 \times 10^6$ copies/gram sediment (wet), with significant differences between in shallow and deep sediments. In contrast, the quantities of AOB amoA gene were $6.10 \times 10^6 \sim 3.88 \times 10^7$ copies/gram sediment (wet) with no obvious variation in sediment layers of different depths. The ratios of AOB and AOA such changed within different sediment layers. These results indicated that both AOB and AOA participated in the ammonia oxidizing processes in sediments of the Lake Baihua. We concluded that AOB is the primary ammonia oxidizing microorganism because of its high abundance, while AOA plays a more important role in deep than in shallow sediments of the Lake Baihua.

Key words: ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; sediment; quantitative PCR; Lake Baihua

由原核微生物参与完成的硝化作用是全球氮循环的重要环节,硝化作用过程也被广泛应用于农林、环境保护以及生物技术等领域。硝化作用主要包括

2 个过程,因而硝化微生物也相应的包括两大类:一类是将氨氧化成亚硝酸盐的微生物,即氨氧化微生物(ammonia-oxidizing microorganisms, AOM);另

收稿日期:2013-03-04 收到,04-08 改回

基金项目:环境地球化学国家重点实验室基金资助项目(SKLEG2013804;SKLEG2013402);贵州省科学基金资助项目(20092040);贵州省国际科技合作计划项目(黔科合外 G 字 20137046)

第一作者简介:梁龙(1988—),男,硕士研究生,研究方向:环境与生物地球化学。E-mail: liangzefeng1988@126.com

通讯作者:梁小兵(1963—),男,研究员,研究方向:环境与生物地球化学。E-mail: liangxiaobing@vip.skleg.cn.

一类是将亚硝酸盐氧化成硝酸盐的微生物,即亚硝酸盐氧化菌(nitrite oxidizing bacteria, NOB)。其中由氨氧化微生物催化完成的氨氧化阶段是硝化作用的限速阶段^[1~3],因此,氨氧化微生物在全球氮循环中的作用尤为重要。在之前的 100 多年内,氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria AOB)一直被认为是进行氨氧化的唯一微生物,但最近从环境中检测到的泉古菌 amo 基因^[4,5]说明氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea AOA)可能也参与了环境中的氨氧化作用。Könnek 等^[6]从热带海洋水族箱中的岩石基质分离到第一株氨氧化古菌(AOA)(*nitrosopumilis maritimus*),最近,Torre 等^[7]从热泉沉积物中分离培养得到一株嗜热氨氧化古菌(*candidatus nitrosocaldus yellowstonii*),Hatzenpichler 等^[8]从热泉中分离到一株中等嗜热氨氧化古菌(*candidatus nitrososphaera gargensis*)。这些已经培养的氨氧化古菌(AOA)具有将氨氧化成亚硝酸盐、固定无机碳的能力,且在有机碳存在条件下,其生长受到抑制^[9]。

在不同的环境中,氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)的数量比不一样。在一些土壤、河口沉积物、热泉沉积物以及海洋水生态环境中,AOA amoA 基因的数量高于 AOB amoA 基因的数量,甚至没有检测到 AOB 的 amoA 基因^[10~14]。这可能是由于这些环境中,氨浓度较低,或者环境条件比较极端造成的,因为相对于 AOB 来说,AOA 能适应氨浓度较低的环境,对酸碱度和温度的适应范围也较宽^[9]。但是,在一些环境样品中也发现细菌 amoA 基因的数量高于古菌 amoA 基因的数量,如在浮游水生植物的根际,AOB 的数量是 AOA 的 10 倍左右^[15];Santoro 等^[16]发现,在土壤含水土层的好氧盐水部分,AOB 的数量是 AOA 的 30 多倍。在氨浓度较高的环境,或者非极端的环境中,环境条件能够同时满足 AOB 和 AOA 的生长,由于菌种差异,AOB 的生长速率可能高于 AOA,从而造成这些环境中 AOB 的数量多于 AOA,Herrmann 等^[17]在模拟的河流环境中,也确实发现了 AOB 较于 AOA 表现出更好的生长能力。

Wuchter 等^[18]研究发现在海洋水体中,亚硝酸盐(NO_2^-)和硝酸盐(NO_3^-)的含量与 AOA 的数量成正相关的关系,这说明海洋环境中的氨氧化过程可能主要是由 AOA 参与完成的。然而在陆地环境中的情况却是相反的。很多研究发现土壤中的硝化作用速率是与 AOB 的数量成正比,而与 AOA 之间的关系并不明显^[19,20]。这说明不同的环境中,参与

氨氧化过程的主要微生物并不一样,而且,同一环境中,随着环境条件的改变,参与完成氨氧化过程的主要微生物也可能发生改变^[21]。

由于 AOA 和 AOB 生长慢,代时长,很多类群无法培养,采用传统的分离培养方法难以对其进行研究,然而,氨氧化细菌(AOB)具有较近的系统发育关系,因此特别适合采用 PCR 的方法分析他们的群落结构和多样性^[22]。amo 基因是微生物氨氧化过程中必须的基因,在氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)进行氨氧化的过程中,amo 基因编码的氨单加氧酶(ammonia monooxygenase amo)能够催化氨(NH_3)转化为羟胺(NH_2OH),进而由细胞色素 c 催化,将羟胺转化为亚硝酸盐。因此,amoA 基因常用于对氨氧化微生物进行定量的目的基因^[23]。

氨氧化作用对淡水湖泊、尤其是富营养湖泊中氮元素的循环具有重要意义。淡水湖泊沉积物中 AOA 和 AOB 数量分布和群落结构是认识氮形态转化和富营养化过程的重要方面。向燕等^[24]对沉积物中 AOA 和 AOB 群落结构进行了研究,但进一步的数量分布研究能进一步的认识硝化作用的空间变化规律。通过分子生物学的方法,研究 AOA 和 AOB 在贵阳百花湖($\text{N}26^\circ39' \text{E}106^\circ31'$)沉积物中的垂直分布,目的在于定量地认识 AOA 和 AOB 在淡水沉积物中的空间变化规律以及它们之间的丰度比例关系,从而为认识湖泊沉积物中氮循环过程及湖泊富营养变化规律提供微生物方面的依据。

1 实验方法

2012 年 9 月,从贵阳市百花湖中($\text{N}26^\circ39' \text{E}106^\circ31'$)采集不同深度的沉积物样品(1~30 cm),按 1 cm 的间隔分样。样品置于 4℃ 冰箱保存,用于提取 DNA。用土壤 DNA 提取试剂盒(E. Z. N. A. Soil DNA kit, OMEGA bio-tek, USA)提取沉积物总 DNA,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验提取情况,测定沉积物 DNA 在 260、280 nm 处的吸光值,检验 DNA 浓度和纯度。DNA 样品储存于零下 20℃ 的环境中,用于后续的 qPCR 分析。

AOA 和 AOB 的 amoA 基因的定量分析在 7500 real-time PCR 系统(Applied Biosystems by life technologiesTM, Singapore)上进行,该系统反应程序包括 3 个阶段:变性、退火和延伸。荧光染料为 RealMaster Mix SYBR Green 染料(TianGen Biotech, Beijing)。每个样品做 3 个平行实验,取算术平均值。

AOAamoA 基因的定量,以 AOAamo_F: 5'-

ATGGTCTGGCTAAGACGMTGTA-3'和 AOA_{amoA}; 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3' 作为引物。25 μL 反应体系包含 12.5 μL RealMaster Mix SYBR Green 染料,正向引物和反向引物各 1 μL,9.5 μL 去离子水,DNA 模板 1 μL。反应条件为:变性阶段:95℃持续 4 min;退火阶段:95℃持续 45 s,55℃持续 45 s,72℃持续 45s,循环次数 45 次;延伸阶段:72℃持续 10min。

AOB_{amoA} 基因的定量,以 AOB_{amoA}-1F; 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3' 和 AOB_{amoA}-2Ra; 5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3' 作为引物。25 μL 反应体系包含 12.5 μL RealMaster Mix SYBR Green 染料;正向引物和反向引物各 1 μL;9.5 μL 去离子水;DNA 模板 1 μL。反应条件为:变性阶段:95℃持续 4 min;退火阶段:95℃持续 60 s,55℃持续 45 s,72℃持续 60 s,循环次数 45 次;延伸阶段:72℃持续 10 min。

AOA 和 AOB 的 amoA 基因标准样品分别进行 10 倍系列稀释。与样品同时进行 PCR 反应,分别构建 AOA 和 AOB 的标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 AOA 数量的垂直分布

采用定量氨单加氧酶基因(amoA)的荧光定量

PCR 方法分析了百花湖不同深度沉积物的 AOA 丰度。以氨单加氧酶基因(amoA)数量来衡量氨氧化古菌(AOA)数量。结果表明,百花湖沉积物中 AOA 的 amoA 基因数量在 $1.74 \times 10^5 \sim 2.00 \times 10^6$ 拷贝/克沉积物(湿重)之间。这说明 AOA 在百花湖沉积物中的数量存在较大的差异。其中在 1~21 cm 的沉积物中, AOA 的数量变化不大,基本上都在 5.00×10^5 拷贝/克沉积物(湿重)左右,而在 22~30 cm 的沉积物中,部分层面中 AOA 数量增加 1.00×10^6 拷贝/克沉积物(湿重)以上(图 1)。造成这种变化的原因可能有 2 种:①由于百花湖深层沉积物(22~30 cm)的环境条件相对于浅层(1~21 cm)沉积物发生了利于 AOA 生存的变化。环境中的 pH 值、氧化还原电位、温度、有机物、盐度等物理化学因素以及其他微生物与氨氧化菌(AOA 和 AOB)的相互作用(如微生物之间的捕食作用)都会影响其在环境中生长繁殖^[6,16,25]。随着沉积物深度的增加,沉积物中的某些微生物数量由于理化因素的改变可能会减少,百花湖沉积物中 AOA 的数量可能正是由于这些微生物(如与 AOA 存在竞争、拮抗或捕食作用的微生物)的减少而增加。②由于 AOA 在百花湖沉积物中随深度而变化,其群落组成发生了变化。向燕等^[24]研究了太湖沉积物的 1~7 cm AOA 的群落结构垂直分布情况,发现 AOA 的群落结构没有显著

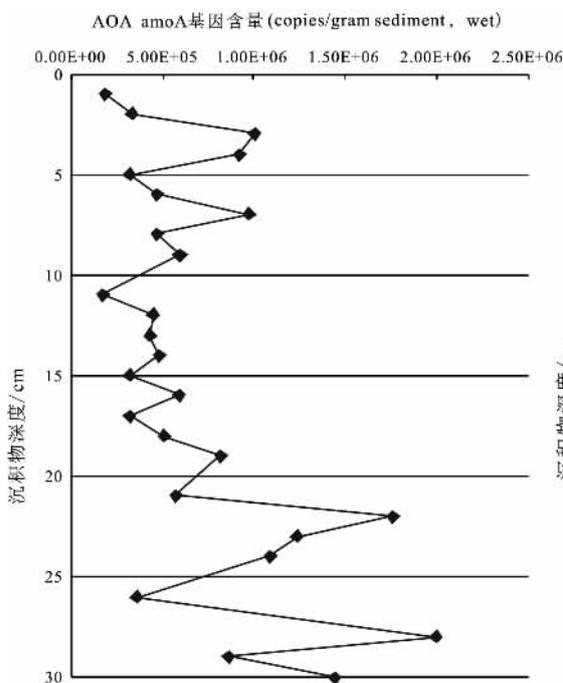


图 1 百花湖沉积物中 AOA amoA 基因含量的垂直分布

Fig. 1 Vertical distribution of AOA amoA gene in sediments of Lake Baihua

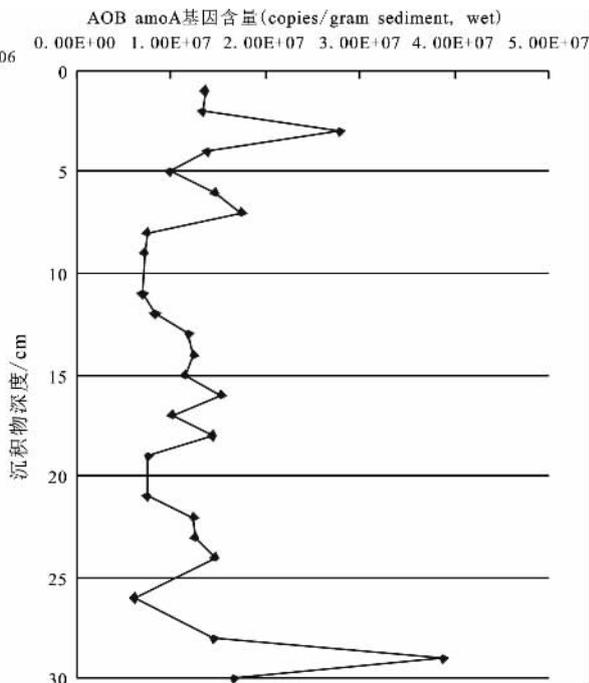


图 2 百花湖沉积物中 AOB amoA 基因含量的垂直分布

Fig. 2 Vertical distribution of AOB amoA gene in sediments of Lake Baihua

变化,本文研究发现百花湖 1~30 cm 沉积物中 AOA 数量在 1~21 cm 沉积物中 AOA 的数量变化不大,但在 22 cm 以后,AOA 的数量却有明显的变化,其原因可能是 22 cm 以后的沉积物中 AOA 的群落结构发生了变化,从而造成此段沉积物中 AOA 数量的增多。但是,1~21 cm 处 AOA 的数量变化不大并不能说明这一段沉积物中 AOA 的群落组成就没有变化,因此需要进一步对百花湖沉积物中 AOA 的群落结构和多样性进行分析,以更深入的了解其在沉积物中的垂直分布情况。

2.2 AOB 数量的垂直分布

以氨单加氧酶基因(amoa)数量来衡量氨氧化细菌(AOB)数量。沉积物中 AOB 丰度的垂直分布研究结果表明,AOB 丰度在 $6.10 \times 10^6 \sim 3.88 \times 10^7$ 拷贝/g 沉积物(湿重)之间,平均 1.33×10^7 拷贝/g 沉积物(湿重)AOB amoA 基因在百花湖沉积物中的数量随深度的增加变化不大(图 2),可能原因是:① AOB 的群落组成发生了变化,通过群落组成的改变使得 AOB 总的数量保持在基本稳定的状态,在其他的研究中也确实发现了淡水湖泊不同深度沉积物中 AOB 的优势菌种存在差异^[24];② 百花湖沉积物中对 AOB 具有生态作用的环境条件未发生改变或者改变程度并没有超出 AOB 的耐受范围,因而 AOB 的群落组成和数量变化不大。图 2 中 29 cm 处,AOB 的数量出现了一个峰值,其数值为 AOB 数量平均值的 3 倍左右。在此处出峰值的原因更可能是由 AOB 自身的群落组成发生变化,或者由 AOB 群落组成和环境条件同时变化引起的。

2.3 AOB 和 AOA 的数量比

对氨单加氧酶(amoa)基因的定量结果表明,在百花湖沉积物中 AOB 的数量远高于 AOA 的数量,在 1~4 cm 的沉积物中,AOB 与 AOA 的数量比呈明显下降趋势,5~18 cm 沉积物中这个比例基本稳定在 20~30,而 19 cm 以后比例则下降并稳定在 10 左右,但在 29 cm 处出现了一个峰值(图 3),从图 1 和图 2 可以判断,峰值的出现是由于 AOB 数量在此处的增加造成的,AOB 数量的增加则可能是由于环境条件或者 AOB 自身群落结构的变化而引起的。从 AOB 与 AOA 的数量来看,在百花湖沉积物中 AOB 是参与氨氧化作用的主要微生物,但随着沉积物深度的增加,AOA 对整体氨氧化作用的贡献会增加。很多对河口沉积物的研究都得到 AOA 的数量高于 AOB 的结论^[26,27]。一般地,河口沉积物中的盐度相对于淡水湖泊较高,因此这 2 种环境中 AOA 和 AOB 数量可能由于盐度的不同而出现

截然相反的现象。由此引出一个问题,是否所有的淡水湖泊中 AOB 的数量都会高于 AOA 的数量呢?这需要更多的淡水湖泊中 AOB 和 AOA 的数量进行研究来验证这个问题。

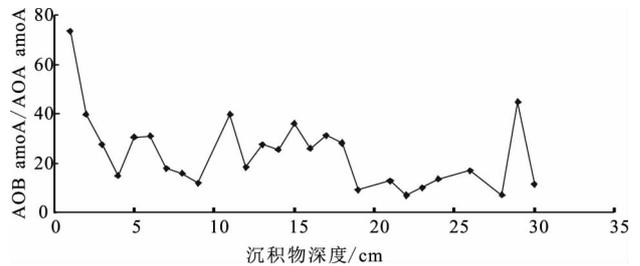


图 3 百花湖不同深度沉积物中 AOB 与 AOA amoA 基因含量比

Fig. 3 Ratio of AOB and AOA amoA gene in sediments of Lake Baihuo

3 结 论

(1) AOA 的数量在百花湖沉积物中存在比较明显的分层现象,其中深层沉积物(22~30 cm)是浅层沉积物(1~21 cm)的 2 倍左右。

(2) AOB 在百花湖沉积物各层的数量基本上变化不大,以氨单加氧酶基因(amoa)数量来衡量,平均值为 1.33×10^7 拷贝/g 沉积物(湿重)。但是在 8~12 cm 处出现了一个低峰,在这一段沉积物中,AOB 的数量 0.75×10^7 拷贝/g 沉积物(湿重)左右。

(3) 在百花湖沉积物中,AOB 的数量比 AOA 的数量多,且 AOB 与 AOA 在各层沉积物中的数量比也存在较明显的分层现象,在 1~4 cm,AOB 与 AOA amoA 基因的数量比值随深度增加急剧下降;在 5~18 cm,比值在基本稳定在 20~30 之间;在 19~30 cm,比值则稳定在 10 左右。

这些结果丰富了对百花湖沉积物中氨氧化菌群数量的认识,对于理解和研究富营养淡水湖泊的硝化作用过程及氮循环过程、认识湖泊生态系统功能具有一定的意义。但本文只是针对百花湖沉积物中 AOB 和 AOA 数量垂直分布进行了研究,进一步的研究应着重于沉积物中 AOB 和 AOA 的群落结构、多样性及其数量与沉积物中 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 的关系等方面,以更深入的了解百花湖沉积物中硝化作用过程。

参考文献 (References):

- [1] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55(1):485-529.

- [2] Hu Z, Chandran K, Grasso D, Smets B F. Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition[J]. Environ. Sci. Tech., 2003, 37(4):728-734.
- [3] Choi O, Hu Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria[J]. Environ. Sci. Tech., 2008, 42(12):4583-4588.
- [4] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, Halpern A L, Rusch D, Eisen J A, Wu D, Paulsen I, Nelson K E, Nelson W, Fouts D E, Levy S, Knap A H, Lomas M W, Neelson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y H, Smith H O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea[J]. Science, 2004, 304(5667): 66-74.
- [5] Treusch A H, Leininger S, Kletzin A, Schuster S C, Klenk H P, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(12): 1985-1995.
- [6] Könneke M, Bernhard A, Torre J de la, Walker C, Waterbury J, Stahl D. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. Nature, 2005, 437(7058):543-546.
- [7] DeLa Torre J R, Walker C B, Ingalls A E, Könneke M, Stahl D A. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(3): 810-818.
- [8] Hatzenpichler R, Lebedeva E V, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(6): 2134-2139.
- [9] Erguder T H, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea [J]. Fems Microbiology Reviews, 2009, 33(5):855-869.
- [10] Reigstad L J, Richter A, Daims H, Urich T, Schwark L, Schleper C. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka[J]. Fems Microbiology Ecology, 2008, 64(2):167-174.
- [11] Park S J, Park B J, Rhee S K. Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and amoA genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments[J]. Extremophiles, 2008, 12(4):605-615.
- [12] Beman J M, Roberts K J, Wegley L, Rohwer F, Francis C A. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(17): 5642-5647.
- [13] Adair K L, Schwartz E. Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA[J]. Microbial Ecology, 2008, 56(3): 420-426.
- [14] Leininger S, Urich T, Schlöter M, Schwark L, Qi J, Nicol G, Prosser J, Schuster S, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. Nature, 2006, 442(7104): 806-809.
- [15] Wei B, Yu X, Zhang S, Gu L. Comparison of the community structures of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizoplanes of floating aquatic macrophytes[J]. Microbiological Research, 2011, 166(6): 468-474.
- [16] Santoro A E, Francis C A, De Sieyes N R, Boehm A B. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(4): 1068-1079.
- [17] Herrmann M, Scheibe A, Avrahami S, Küsel K. Ammonium availability affects the ratio of ammonia-oxidizing bacteria to ammonia-oxidizing archaea in simulated creek ecosystems [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1896-1899.
- [18] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, Herfort L, Bleijswijk J van, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl G J, Middelburg J J, Schouten S, Sinninghe Damsté S. Archaeal nitrification in the ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(33): 12317-12322.
- [19] Jia Z, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [20] Di H J, Cameron K C, Shen J P, Winefield C S, O'Callaghan M, Bowatte S, He J Z. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils[J]. Nature Geosci., 2009, 2(9): 621-624.
- [21] Schauss K, Focks A, Leininger S, Kotzerke A, Heuer H, Thiele-Bruhn S, Sharma S, Wilke B M, Matthies M, Smalla K. Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils[J]. Environmental Microbiology, 2008, 11(2): 446-456.
- [22] 吴宇澄, 王建军, 吴庆龙. 基于引物的湖泊沉积物氨氧化细菌 PCR 扩增策略比较[J]. 环境科学, 2010, 31(9): 2178-2183.
- [23] You J, Das A, Dolan E M, Hu Z Q. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal [J]. Water Research, 2009, 43(7): 1801-1809.
- [24] 向燕, 吴宇, 方纤, 刘国锋, 刘正文, 吴庆龙. 太湖山湾沉积物中氨氧化原核生物的垂直分布与多样性[J]. 生态学报, 2010, 30(6):1423-1430.
- [25] Krümmel A, Harms H. Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria[J]. Archives of Microbiology, 1982, 133(1):50-54.
- [26] Cao H, Hong Y, Li M, Gu J D. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing prokaryotes in sediments from the coastal Pearl River estuary to the South China Sea[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100(4): 545-556.
- [27] Jin T, Zhang T, Ye L, Lee O O, Wong Y H, Qian P Y. Diversity and quantity of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in sediment of the Pearl River Estuary, China[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 1137-1145.