

(8) 16S rDNA 解析によるアンモニア酸化細菌の多様性評価

Diversity of Ammonia-oxidizing Bacteria Based on 16S rDNA Sequence Analysis

金田一智規\*、伊藤司\*、岡部聡\*、渡辺義公\*

Tomonori KINDAICHI\*, Tsukasa ITO\*, Satoshi OKABE\*, Yoshimasa WATANABE\*

**ABSTRACT;** We investigated the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in different environments based on 16S ribosomal DNA (rDNA) sequence analysis with the specific primer set. The sequence analysis revealed that the *Nitrosomonas oligotropha*-like AOB were the dominant in low-ammonium environments such as river and drinking water treatment systems. In contrast, the *Nitrosomonas europaea*-like AOB were the dominant in high-ammonium environments in which the concentration of ammonium is more than 1000 mg-N/L. In medium-ammonium environments, the coexistence of the distinct AOB related to the *Nitrosomonas europaea*-, *Nitrosomonas oligotropha*-, and *Nitrosospira* sp.-like clusters were found, indicating a high phylogenetic diversity. These observations support the hypothesis that *Nitrosomonas europaea* is r-strategist, whereas *Nitrosospira* sp. is K-strategist, indicating that *Nitrosomonas europaea* can outcompete the *Nitrosospira* sp. at high ammonium concentration. These results provide insight into the type of AOB responsible for nitrification in different engineered systems, which should help direct future studies aimed at characterizing relevant AOB growth.

**KEYWORDS;** ammonia-oxidizing bacteria, phylogenetic diversity, 16S rDNA sequence analysis, dominant species, ammonium concentration, nitrification

1. はじめに

廃水中の窒素除去は閉鎖性水域の富栄養化防止や放流先における硝酸塩濃度の規制強化の観点から重要な課題であり、処理プロセスの更なる効率化が求められている。窒素除去プロセスとしては嫌気-好気法や生物膜法といった生物学的窒素除去プロセスが一般的である。生物学的窒素除去は、アンモニア性窒素から亜硝酸性窒素または硝酸性窒素への生物学的酸化（硝化）と酸化態の窒素から窒素ガスへの還元（脱窒）を組み合わせて行われている。生物学的窒素除去における律速段階は一般に硝化反応、特にアンモニア酸化反応であるといわれている。硝化反応を担う化学合成独立栄養細菌のアンモニア酸化細菌は *Proteobacteria* の  $\beta$ -subclass に属する *Nitrosomonas*、*Nitrosospira* の2属と、*Proteobacteria* の  $\gamma$ -subclass に属する *Nitrosococcus* の1属が確認されている<sup>1)</sup>。これらのアンモニア酸化細菌は増殖速度が遅く、pHや温度変化などの外的環境要因に影響を受けやすいために安定的な硝化反応の維持が困難となっている。特に硝化細菌の個体数や微生物群集構造が変化していないにも関わらず硝化活性が悪化するケースがみられ、環境条件によって硝化細菌の活性が変化することが示唆されている。したがって、多様な自然環境下や廃水処理プロセス内では、それぞれの環境条件に適したアンモニア酸化細菌が優占種となり、硝化反応を担っていると考えられる。アンモニア酸化細菌の優占種およびその多様性と生息環境との関係に関する知見は少なく、廃水処理プラントの制御

\*北海道大学大学院工学研究科 都市環境工学専攻

(Dept. of Urban Environ. Eng., Graduate school of Eng., Hokkaido University.)

や効率化を図るためには、アンモニア酸化細菌の生理生態と環境要因に関するデータを蓄積することが重要となる。しかしながら、従来の単離・培養に基づく解析ではアンモニア酸化細菌の優占種および多様性を評価することは困難であるため、環境要因とアンモニア酸化細菌の多様性および優占種との関係は十分に解明されていない。

そこで本研究では、16S rDNA クローン解析を用いて、様々な廃水処理施設から採取した微生物集塊におけるアンモニア酸化細菌の優占種を決定し、環境要因の違いによるアンモニア酸化細菌の優占種および多様性を比較検討することを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 サンプル

本研究ではアンモニア性窒素濃度を高濃度の含む養豚場排水処理施設の曝気槽内汚泥やアンモニア性窒素が低濃度である河川水にわたる 10 地点からサンプリングした。表 1 に採取地点およびアンモニア性窒素濃度を示す。養豚場排水処理施設の pH を除くと各サンプルの pH はほぼ 7 付近であった。

表 1 各サンプルの採取地点およびアンモニア性窒素濃度

| 採取した場所    |          | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N<br>(mg/L) | pH  |
|-----------|----------|-------------------------------------------|-----|
| 養豚場排水処理施設 | 曝気槽      | 1299.5                                    | 8.3 |
|           | 処理後放流水   | 1163.9                                    | 8.5 |
| し尿処理場     | 第1曝気槽    | 21.8                                      | 7.0 |
|           | 第4曝気槽    | 10.6                                      | 6.7 |
| 都市下水処理場   | 流入原水     | 15.8                                      | 7.5 |
|           | 活性汚泥     | 9.8                                       | 6.9 |
| 水族館砂濾過層   | 海水・水温27℃ | 8.7                                       | 7.7 |
|           | 海水・水温11℃ | 5.4                                       | 7.0 |
| 浄水場       | 生物活性炭塔   | 0.7                                       | 7.3 |
| 河川        | 札幌市新川    | 0.6                                       | 7.5 |

### 2.2 16S rDNA クローン解析

DNA の抽出は Teske ら<sup>2)</sup>の方法に準拠した。養豚場排水処理施設の曝気槽、し尿処理場および都市下水処理場のサンプルについては 1 g から抽出し、残りのサンプルについては 10,000 × g で 15 分の遠心分離の後、沈殿物を DNA 抽出に用いた。また、水族館砂濾過槽および河川サンプルについては、Fast DNA SPIN Kit (BIO101) を用いて同様に遠心分離後、500 mg の沈殿物から DNA 抽出を行った。

16S rDNA の PCR 増幅には *β-Proteobacteria* に属するアンモニア酸化細菌に特異的なプライマーセット CTO189f と CTO654r を用いた<sup>3)</sup>。PCR 増幅後、1% アガロースを用い、目的断片が増幅されていることを確認した。

PCR 増幅断片 (V3 可変領域を含む 465 bp) は Wizard PCR Minipreps DNA purification system (promega) を用いて精製した後、pGEM-T vector cloning system (promega) でライゲーションを行った。その後、コンピテントセル JM109 (promega) を用いてトランスフォーメーションした。ライゲーションの正否はブルーホワイトトセレクションによって行い、ランダムに採取したコロニーを LB 培地で培養した後、Wizard Plus Minipreps DNA purification system (promega) によってプラスミドを回収した。回収されたプラスミドは自動塩基配列解

析装置 (SQ5500, Hitachi) により塩基配列を決定した。シーケンシングプライマーは、M13f または M13r を用いた。

プライマー-CTO による増幅断片の配列は全て解析に用いた。得られた塩基配列は BLAST search<sup>4)</sup> によってホモロジーサーチを行った。分子系統解析では、CLUSTAL W パッケージ<sup>5)</sup> によってアラインメントを行い、Neighbor-joining 法<sup>6)</sup> によって系統樹を作成した。系統樹のトポロジーの確かさは、100 回のブーストラップ解析によって検証した。

Purkhold ら<sup>7)</sup> は 16S rDNA とアンモニアモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子 (*amoA*) の塩基配列からアンモニア酸化細菌を系統的に 5 つのクラスターに分類しているが、本研究では *Nitrosomonas oligotropha* を中心とする cluster-1、*Nitrosomonas europaea* を中心とする cluster-2、*Nitrospira* sp. を中心とする cluster-3、CTO プライマーで増幅されたアンモニア酸化細菌以外の  $\beta$ -Proteobacteria を cluster-4 とし、系統的に 4 つのグループに分類し、検出されたクローンと比較した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 高濃度アンモニア性窒素サンプルの解析

アンモニア性窒素を高濃度 (1000 mg-N/L 以上) に含む養豚場廃水処理施設の曝気槽から検出されたクローンの系統樹を図 1 に示す。解析した 20 クローンの全てが *Nitrosomonas europaea* を中心とする cluster-2 に属し、検出されたクローンは全て *Nitrosomonas* sp. clone74 と近縁であった。この Cluster-2 のなかで *Nitrosomonas*

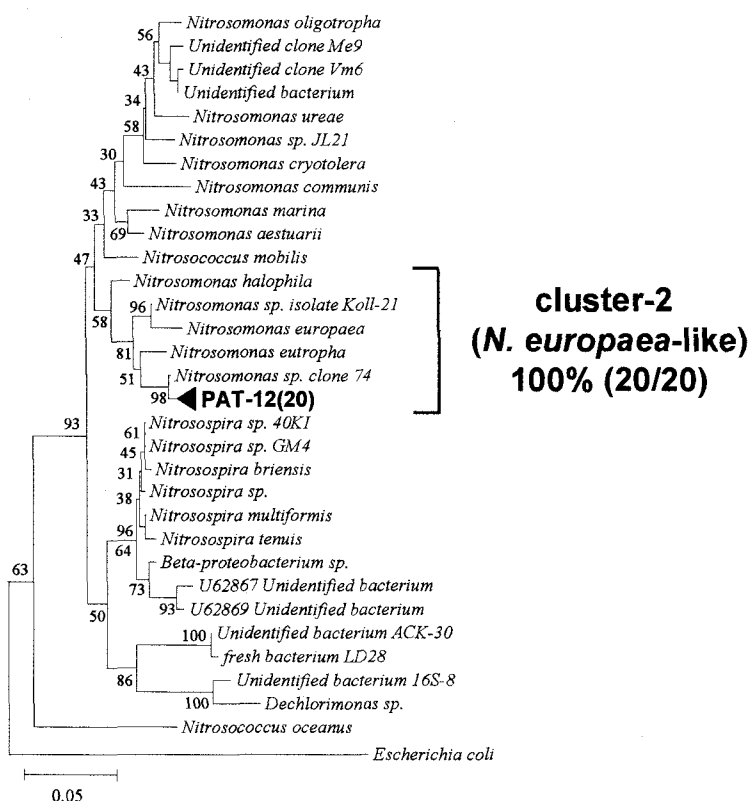


図 1 養豚場廃水処理施設の曝気槽から検出されたクローンの系統樹

sp. clone74 以外に近縁なクローンは検出されず、アンモニア酸化細菌の多様性が低い結果となった。この *Nitrosomonas* sp. clone74 は SHARON リアクター<sup>8)</sup>から検出されたクローンであった。この SHARON リアクターは高アンモニア性窒素濃度 (1000 mg-N/L) の消化廃水进行处理しており、今回解析した養豚場排水処理施設と同程度のアンモニア性窒素濃度であったことから、優占的なアンモニア酸化細菌が同じであったと考えられる。この cluster-2 に属する *Nitrosomonas eutropha* のアンモニア性窒素に対する  $K_m$  値は 750  $\mu$ M と報告されており<sup>9)</sup>、一概には言えないが、 $K_m$  値が他のアンモニア酸化細菌と比べて大きいことも優占種となった理由のひとつであると考えられる。また、養豚場排水処理施設の処理水に浮遊する汚泥を解析した結果、検出された 26 クローンのうち、12 クローンが cluster-2 に属し、*Nitrosomonas* sp. clone74 と最も近縁であった。しかしながら、この養豚場排水処理施設では水質測定の結果から硝化反応が進行していなかった。この理由として、*Nitrosomonas* sp. clone74 は 25℃ 以上で活性が高いという報告もあり<sup>8)</sup>、検出された clone74 は高濃度のアンモニア性窒素濃度で優占的であるものの、有機物負荷、低溶存酸素濃度、水温等の影響により、硝化活性が低下したものと考えられる。また、この処理水サンプルからは cluster-1 に属するものが 5 クローン、cluster-4 に属するものが 9 クローン検出された。曝気槽サンプルに比べて多様性が大きくなった理由としては、処理によって有機物濃度が低下したことにより、cluster-1 や 4 に属する細菌が生存しやすい環境になったものと考えられる。

### 3.2 低濃度アンモニア性窒素サンプルの解析

アンモニア性窒素が低濃度 (1 mg-N/L 以下) である河川から検出されたクローンの系統樹を図 2 に示す。

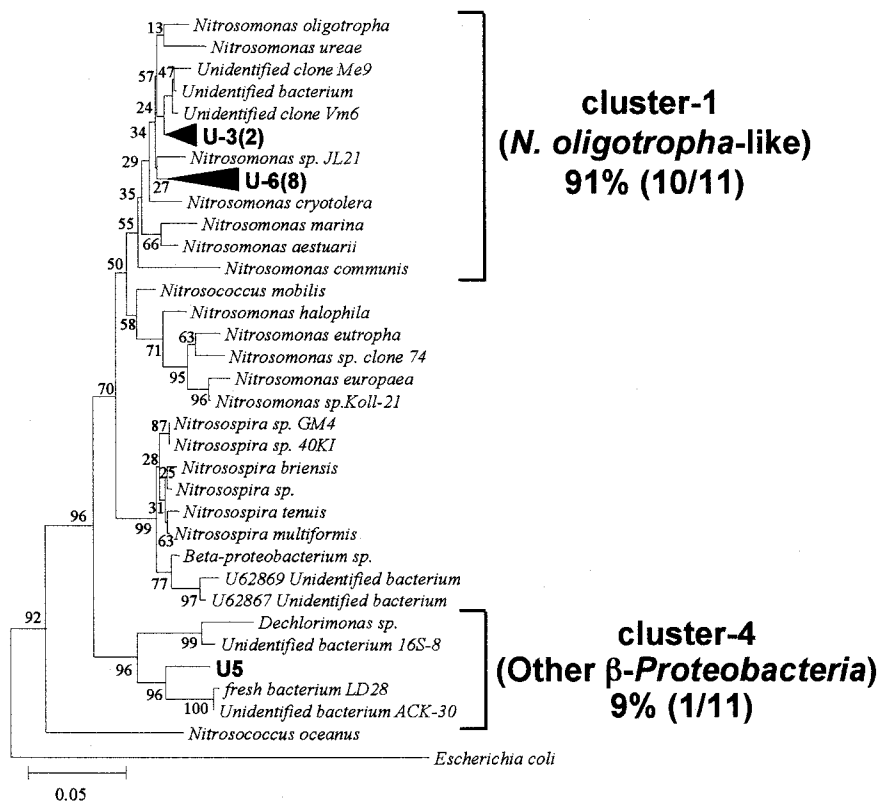


図 2 河川から検出されたクローンの系統樹

解析した 11 クローンのうち 10 クローンは *Nitrosomonas oligotropha* を中心とする cluster-1 に属した。cluster-4 に属するクローンはひとつだけであった。さらに浄水場の生物活性炭塔をサンプルとした系統解析においても、解析した 31 クローンのうち 26 クローンは cluster-1 に属した。図 2 において cluster-1 に属したクローンはさらに二つのクラスターに分けることができた。U-3(2)で示されるクラスターは *Nitrosomonas oligotropha* に近縁であり 97%以上の相同性を有していた。一方、U-6(8)で示されるクラスターは *Nitrosomonas oligotropha* とは一番高い相同性で 94%しかなく、未だ同定・単離されていない新規のアンモニア酸化細菌であることが示唆された。河川や浄水場のような貧栄養条件下では *Nitrosomonas oligotropha* を中心とする cluster-1 が優占的なアンモニア酸化細菌であり、硝化反応を担っていると考えられる。このことは純粋培養系における *Nitrosomonas oligotropha* のアンモニア性窒素に対する  $K_m$  値が 30-75  $\mu\text{M}$  と低く、これらのアンモニア酸化細菌はアンモニア性窒素が低濃度の環境で優占種であるという報告と一致する<sup>9)</sup>。

### 3.3 中濃度アンモニア性窒素サンプルの解析

図 3 にし尿処理場の第 4 曝気槽から検出されたクローンの系統樹を示す。養豚場や河川と比べてアンモニア性窒素濃度が中程度 (10-20 mg-N/L 付近) であるし尿処理場のサンプルでは、4 つに分類した全ての cluster でクローンが検出され、半分以上が cluster-2 に属する結果となった。さらに、図 3 において KAT4-23(5)で示されるクラスターは *Nitrosomonas europaea* と 95%の相同性であり、検出されたクローン同士の相同性は 98%

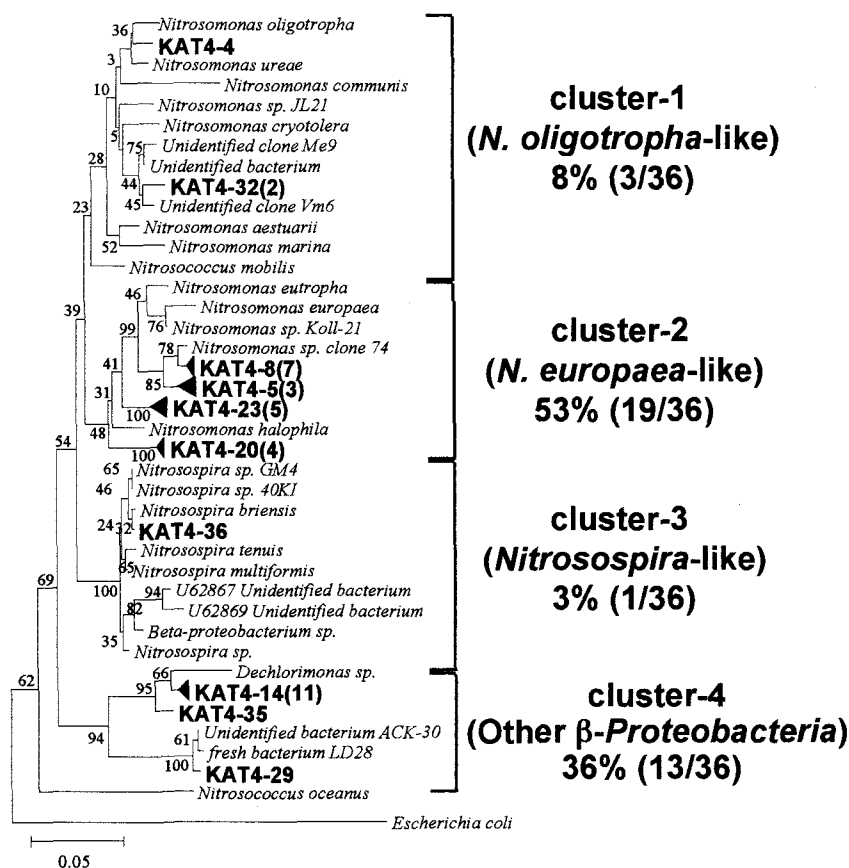


図 3 し尿処理場の第 4 曝気槽から検出されたクローンの系統樹

以上であることから cluster-2 に属する新規のアンモニア酸化細菌である可能性が示唆された。また、し尿処理場のサンプルでは cluster-2 の検出割合が高いのに対し、都市下水処理場では cluster-1 の検出割合が高かった。この理由としては、都市下水処理場の方がより低濃度のアンモニア性窒素であることが考えられる。また、データには示していないが、し尿処理場では亜硝酸性窒素の蓄積が見られ、溶存酸素濃度の低下等によりアンモニア酸化細菌の生態構造が影響を受けたものと考えられる。このような環境で優占的な cluster-2 に属するアンモニア酸化細菌は cluster-1 の細菌よりも亜硝酸性窒素に対する耐性が高いことも考えられる。Okabe ら<sup>10)</sup>は FISH 法と微小電極を用いて回転円板リアクターにおける硝化細菌の動態解析をしており、系内に亜硝酸性窒素の蓄積がみられたとき、*Nitrosomonas oligotropha* を中心とするグループの増殖は抑制され *Nitrosomonas europaea* を中心とするグループの増殖が顕著にみられたと報告しており、これは本研究の結果と一致する。一方、アンモニア性窒素濃度は下水処理場やし尿処理場とほぼ同程度である水族館のサンプルでは *Nitrosospira* 属が約 90% 検出され、優占的であった。これは海水に含まれる塩濃度に起因していると考えられ、*Nitrosospira* 属は海洋由来のサンプルにおいて優占種であるという Stephen ら<sup>11)</sup>の報告と一致する結果となった。また、低濃度のアンモニア性窒素が流入する流動床リアクターにおいて Schramm ら<sup>12)</sup>はアンモニア性窒素濃度と優占的な *Nitrosospira* 属の細菌数からアンモニア性窒素に対する  $K_m$  値を推定し、40  $\mu$ M と報告していることから、アンモニア性窒素が中程度であるサンプルでは  $K_m$  値が異なるアンモニア酸化細菌が共存し、多様性が高いことが明らかとなった。

### 3.4 アンモニア酸化細菌の多様性

各サンプルにおける分類したクラスターごとのクローンの検出割合を表 2 に示す。*Nitrosomonas oligotropha* を中心とする cluster-1 の検出割合は低アンモニア性窒素濃度において高く、高濃度においては低くなった。一方、*Nitrosomonas europaea* を中心とする cluster-2 の検出割合は高アンモニア性窒素濃度で高く、低濃度の環境下では低くなった。このことから、低アンモニア性窒素濃度の環境下では基質親和性の高い *Nitrosomonas oligotropha* に近縁なアンモニア酸化細菌群 (K-strategist) が、高アンモニア性窒素濃度の環境下では基質親和性の低い *Nitrosomonas europaea* に近縁なアンモニア酸化細菌群 (r-strategist) が優占種となり、純粋培養系で報告<sup>9),12)</sup>されているアンモニア酸化細菌の生理学的特性は実際の環境におけるアンモニア酸化細菌の多様性を裏付ける結果となった。pH は養豚場由来のサンプルが 8.0 以上であり、他のサンプルは 7.0 付近であったが、今回の解析では pH よりもアンモニア性窒素濃度が多様性に大きく影響する傾向がみられた。アンモニ

表 2 各サンプルにおけるクローンの検出割合

| Cluster | 代表的近縁種                          | 養豚場     |         | し尿処理場   |         | 下水処理場   |         | 水族館     |         | 浄水場     | 河川      |
|---------|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |                                 | 曝気槽     | 処理水     | 第1      | 第4      | 原水      | 活性汚泥    | 27℃     | 11℃     |         |         |
| 1       | <i>Nitrosomonas oligotropha</i> | 0%      | 19%     | 19%     | 8%      | 67%     | 62%     | 0%      | 0%      | 84%     | 91%     |
|         | <i>Nitrosomonas ureae</i>       | (0/20)  | (5/26)  | (6/31)  | (3/36)  | (18/27) | (18/29) | (0/31)  | (0/25)  | (26/31) | (10/11) |
| 2       | <i>Nitrosomonas eutropha</i>    | 100%    | 46%     | 68%     | 53%     | 0%      | 3%      | 0%      | 0%      | 6%      | 0%      |
|         | <i>Nitrosomonas sp. clone74</i> | (20/20) | (12/26) | (21/31) | (19/36) | (0/27)  | (1/29)  | (0/31)  | (0/25)  | (2/31)  | (0/11)  |
|         | <i>Nitrosomonas europaea</i>    |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| 3       | <i>Nitrosospira spp.</i>        | 0%      | 0%      | 0%      | 3%      | 33%     | 0%      | 90%     | 88%     | 0%      | 0%      |
|         |                                 | (0/20)  | (0/26)  | (0/31)  | (1/36)  | (9/27)  | (0/29)  | (28/31) | (22/25) | (0/31)  | (0/11)  |
| 4       | Others                          | 0%      | 35%     | 13%     | 36%     | 0%      | 35%     | 10%     | 12%     | 10%     | 9%      |
|         |                                 | (0/20)  | (9/26)  | (4/31)  | (13/36) | (0/27)  | (10/29) | (3/31)  | (3/25)  | (3/31)  | (1/11)  |

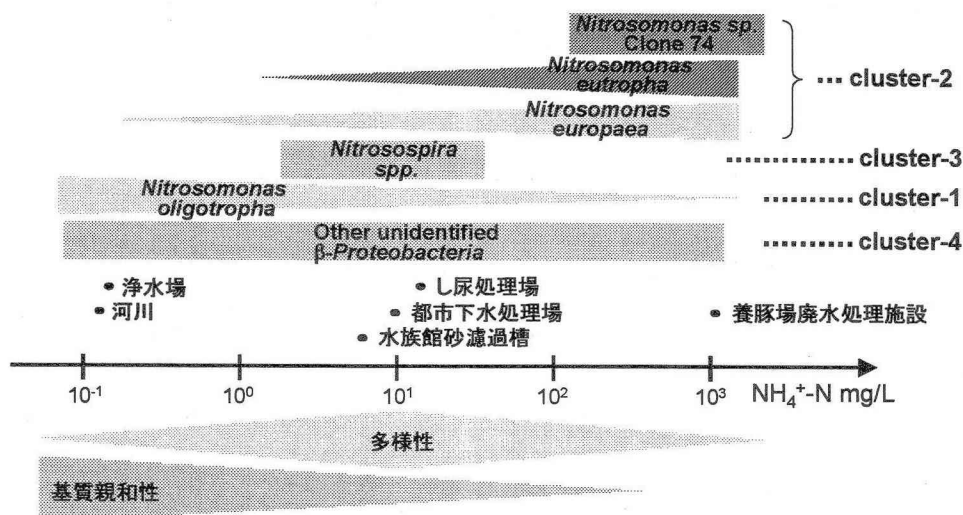


図4 アンモニア酸化細菌の多様性とアンモニア性窒素濃度の関係

アンモニア性窒素濃度が 1000 mg-N/L 付近である養豚場由来のサンプルでは *Nitrosomonas* sp. clone74 の検出割合が 100% となり、環境中のアンモニア性窒素濃度が高いほどアンモニア酸化細菌の多様性が乏しくなり、菌相が単純化する傾向が示唆された。また、*Nitrospira* sp. を中心とする cluster-3 の検出割合は水族館や都市下水処理場由来のサンプルで多く検出され、塩濃度が多様性に影響を与えることが示唆された。Purkhold ら<sup>7)</sup> は *amoA* 遺伝子を対象に様々な処理場におけるアンモニア酸化細菌の多様性を検討したが、*Nitrospira* 属はある下水処理場のみで検出された。この *Nitrospira* 属の好む環境条件は明らかとなっていないが、低濃度のアンモニア性窒素を好む K-strategist であると推察される<sup>12)</sup>。cluster-4 は CTO プライマーで増幅されたアンモニア酸化細菌以外の  $\beta$ -Proteobacteria を示しており、多くの処理施設から *Dechlorimonas* 属に近縁なクローンが検出された。これらの細菌がアンモニア酸化能を有するかについては現在のところ明らかにはなっていない。Purkhold ら<sup>7)</sup> によれば、アンモニア酸化細菌の 16S rDNA 間の相同性と *amoA* 遺伝子間の相同性には相関がみられ、*amoA* 遺伝子を対象とした系統解析でも同様のクラスターに分類できることが示されている。今回使用した CTO プライマーはアンモニア酸化細菌以外の細菌を検出する可能性があるため、環境中でアンモニア酸化機能を持つ細菌をより特異的に検出できる *amoA* 遺伝子を対象として解析することが必要である。

以上によりアンモニア酸化細菌の多様性を模式的にまとめたものを図 4 に示す。今回の解析の結果から、アンモニア酸化細菌の多様性はアンモニア性窒素濃度と細菌の基質親和性に強く関係しており、アンモニア性窒素濃度 10-100 mg-N/L の範囲では多様な種が生育・増殖可能であり、極限環境に近づくにつれ生育できる種属が限られてくることが示唆された。また、アンモニア性窒素濃度が中程度の環境では、多様なアンモニア酸化細菌がアンモニア酸化反応を分担することで外的環境要因の変動等に柔軟に対応することが可能となり、比較的安定したアンモニア酸化が達成されていると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では様々な施設から採取した試料中のアンモニア酸化細菌群集に対して 16S rDNA に基づく系統解析を行ったところ以下のような結果が得られた。

1. アンモニア性窒素濃度が極端に高濃度 (1000 mg-N/L) あるいは低濃度 (1 mg-N/L) である環境条件下では菌相が単純化し、中程度 (1-10 mg-N/L) のアンモニア性窒素濃度の環境下では、菌相に多様性がみられ

ることが明らかとなった。

2. 高アンモニア性窒素濃度では *Nitrosomonas europaea* が、低濃度では *Nitrosomonas oligotropha* が優占種となり、高塩濃度の環境下では、*Nitrosospira* sp. が優占種となった。
3. 亜硝酸性窒素濃度の高い環境では *Nitrosomonas oligotropha* に近縁な種の検出割合は低くなり、*Nitrosomonas europaea* に近縁な種の検出割合が高くなった。このことから *Nitrosomonas oligotropha* に近縁な種は亜硝酸耐性が低く、*Nitrosomonas europaea* に近縁な種は亜硝酸耐性が高いことが示唆された。

今後の課題としては、各サンプルにおいて解析するクローン数を増やすことで、より正確に多様性を評価できると考えられる。また、今回用いた CTO プライマーではアンモニア酸化細菌以外の  $\beta$ -*Proteobacteria* が検出されたことから、アンモニア酸化反応を触媒するアンモニアモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子 (*amoA*) についても解析することで、より正確に多様性が評価できるものと考えられる。さらに、アンモニア酸化細菌の菌数を把握できる Real-Time PCR 法や様々な環境条件下で活性のあるアンモニア酸化細菌を *in situ* で特定できる MAR-FISH 法<sup>13)</sup>を適用することで、環境条件と多様性および優占種との関係を明らかにできると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、パナソニック MSE (株) の高倉恭子さん、国土環境 (株) の河野快子さんの協力を得た。記して謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Aakra, Å., Utåker, J. B., Pommerening-Röser, A., Koops, H-P., and Nes, I. F.: Detailed phylogeny of ammonia oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2021-2030, 2001.
- 2) Teske A, Wawer C, Muyzer G, and Ramsing N. B.: Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1405-15, 1996.
- 3) Kowalchuk G A., Stephen J. R., De Boer W., Prosser J. I., Embley T. M., and Woldendorp J. W.: 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1489-97, 1997.
- 4) Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990.
- 5) Thompson, J. D., D. G Higgins, and T. J. Gibson.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680, 1994.
- 6) Saito, N., and M. Nei.: The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425, 1987.
- 7) Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H. P. Koops, and M. Wagner.: Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5368-5382, 2000.
- 8) Logemann, S., Schantl, J., Bijvank, S., van, Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. and Jetten, M. S. M.: Molecular

Microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:239-249, 1998.

- 9) Stehr, G., B. Böttcher, P. Dittberner, G. Rath, and H.-P. Koops.: The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17:177-186, 1995.
- 10) Okabe, S., H. Satoh, and Y. Watanabe.: In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3182-3191, 1999.
- 11) Stephen, J. R., McCaig, A. E., Smith, Z., Prosser, J. I., Embley, T. M.: Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4147-4154, 1996.
- 12) Schramm, A., D. de Beer, J. C. van den Heuvel, S. Ottengraf, and R. Amann.: Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3690-3696, 1999.
- 13) Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner.: Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1289-1297, 1999.