

The Application of High-Throughput Sequencing Technologies in the Research of Wetland Microbiology

Jianli Liu¹, Linhui Wu¹, Ruifang Du^{1,2}, Ji Zhao^{1*}

¹College of Environment & Resources, Inner Mongolia University, Huhhot

²College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot

Email: ljl2489@sina.com, *ndzj@imu.edu.cn

Received: Aug. 25th, 2014; revised: Oct. 16th, 2014; accepted: Oct. 20th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Microbes play an important role in the wetland ecosystem, and DNA sequencing technology is one of the important tools to study microbes. Recently, the booming development of high-throughput sequencing technologies has made it possible for us to research more accurately about microorganisms in wetland ecosystem. In this review, the difference between high-throughput sequencing and other sequencing technologies is described. The applications of high-throughput sequencing in microbial community structures and diversities, functional bacteria and ecosystem functions, metagenomics are elaborated. Furthermore, the spatial heterogeneity of microorganism is also revealed. Finally, we prospect the development direction of this technology in the future.

Keywords

High-Throughput Sequencing, Wetland Microorganism, Ecological Function

高通量测序技术在湿地微生物研究中的应用

刘建丽¹, 武琳慧¹, 杜瑞芳^{1,2}, 赵吉^{1*}

¹内蒙古大学, 环境与资源学院, 呼和浩特

²内蒙古大学, 生命科学学院, 呼和浩特

*通讯作者。

Email: lij2489@sina.com, * ndzj@imu.edu.cn

收稿日期: 2014年8月25日; 修回日期: 2014年10月16日; 录用日期: 2014年10月20日

摘要

微生物在湿地生态系统中扮演着重要的角色, DNA测序技术是研究微生物的重要工具之一。近几年来高通量测序技术的迅速发展, 为更加精细地研究湿地生态系统的微生物信息提供了可能性。本文比较了高通量测序技术与其他测序技术之间差异, 阐述了该技术在微生物群落结构及其多样性、功能菌群与生态系统功能关系, 以及宏基因组学方面的应用, 进一步分析了湿地微生物的空间异质性成因, 对高通量测序技术的发展方向进行了展望。

关键词

高通量测序, 湿地微生物, 生态功能

1. 高通量测序技术简介

微生物作为湿地生态系统的分解者, 在物质循环、能量流动、生物多样性保护和生态平衡等方面都起着十分重要的作用。湿地生态系统中微生物的传统研究方法, 只能简单地描述微生物的表型特征, 对微生物群落结构、种群分布及个体形态等无法作出精细的描述[1] [2]。分子生物学技术为微生物的研究提供了方便, 但也存在一定的局限性, 如: 以 PCR 为基础的变形梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、随机扩增 DNA 多态性分析(Random amplified polymorphim DNA, RAPD)等技术, 在一定程度上为微生物的研究提供了更加灵敏和精确的检测, 但检测成本高, PCR 扩增对检测的精确性和重复性影响较大[3] [4]。依赖于电泳分离技术的 Sanger 末端终止法第一代测序技术, 不仅受 DNA 提取方法和引物选择等的影响, 而且通量低、样品制备成本高、难以做大量的平行测序, 无法满足基因组学方面的研究, 第二代测序应用而生[5]-[7]。

高通量测序技术(High-throughput sequencing)以 454 测序公司的 454 GS FLX+ 和 454 GS Junior、Illumina 公司的 HiSeq 和 MiSeq、美国 ABI 公司的 5500xl SOLiD 代表, 测序流程主要包括: 克隆文库的制备、基因组 DNA 随机片段化(如: 酶切、液力剪切、声波及雾化剪切等[7])和端标记测序及数据分析。在读取片段、运行时间、测序效率等方面各有优势, 主要体现在如下几个方面: 1) 读长长, 如 454 焦磷酸测序读取片段 700~800 个碱基; 2) 产生的 DNA 片段浓度高, 且正确率高(如 Illumina 测序技术, 正确率达到了 98.5%); 3) 测序效率高, 通过使用微阵列配置技术实现了大规模并行化测序(如 Illumina HiSeq 2000 测序仪, 一次运行能产生约 3000 亿碱基); 4) 时间短(Illumina 测序约 27 h 左右); 5) 无需克隆过程, 设备微型, 降低了测序各个环节的成本(高通数据的成本约 1\$/碱基) [8]-[12]。

2. 高通量测序在湿地微生物研究中的应用

在湿地生态系统中, 微生物以群落的形式广泛存在, 不仅能代谢自然条件下的各种有机物, 还可以降解人工合成的复杂化合物, 加快系统物质交换和能量流动[13]。鉴于高通量测序技术准确性高、拼接率高, 可为后续的生物信息分析提供可靠的保障, 它在各类湿地生态系统, 如: 沼泽、红树林、泥炭地、

湖滨、河流、河口湾、盐沼、水稻田等自然和人工湿地中微生物群落结构及其多样性、微生物功能菌群及其生态评估、宏基因组、湿地生态系统空间异质性等方面得到广泛的应用。

2.1. 微生物群落结构及其多样性

通过测序技术来获取微生物群落结构、多样性等生物信息已逐步成为研究微生物的重要手段之一。随着高通量测序技术的快速发展,大大减少了基因组测序的成本和时间,为更多实验室开展菌类、原核生物的研究提供了机会。

关于湿地菌类群落结构及其多样性的研究,目前主要集中在真菌、细菌和古菌等方面。孟晗等[14]对崇明东滩湿地及水田和旱地土壤中真菌群落结构进行分析,发现结构变化可能与土壤中 K^+ 、 NH_4^+ 、 Ca^{2+} 浓度等理化性质有关,有助于湿地土壤围垦后农业利用的可持续管理。Arfi 等[15]通过对红树林湿地生态系统中真菌的 ITS1、ITS2、NU-SSU-V5 和 NU-SSU-V7 区进行标记,测序共得到 209,544 片段,发现在这个小生境中微生物分布明显不同,优势菌种为子囊菌,占了 82%,可能是子囊菌门对红树林内环境适应能力较强,也进一步的证实焦磷酸测序技术在巩固和完善微生物群落多样性研究中的实用性。

Ligi 等[16]运用 Illumina 测序技术对人工湿地生态系统中 16S rRNA V6 高变区进行测序,发现 γ -、 δ -和 β -变形菌(protobacteria)是最丰富的类群,而且在长期淹水区、过渡区和偶尔淹水区土壤微生物群落结构之间存在着显著差异,说明水文条件对湿地细菌群落结构有一定的影响,这一结果与 Ahn [17]的研究结果一致。王玉等[18]分析了香港米埔红树林湿地潮间带中沉积物细菌和古菌群落结构特点,发现潮间带沉积物中微生物主要由广古菌门和泉古菌门组成,另外还有一小部分纳米古菌门存在,这一发现有助于更好的为潮间带是一个独特的海陆边缘生态系统理论提供一些理论依据。Rita [19]运用 454 焦磷酸测序技术对人工和天然湿地中细菌群落结构进行表征,发现较之人工湿地,自然湿地土壤中细菌群落多样性丰富,酸杆菌群为优势菌种,且细菌群落结构与土壤理化性质,尤其是 C:N ($\rho = 0.43, p < 0.01$)和 pH ($\rho = 0.39, p < 0.01$)关系比较密切。因此,在人工湿地的创建过程中,我们可以通过监测土壤理化性质来反映其生态功能。

该技术也用于表征原生物群落结构及其多样性。针对形态学分析和高通量测序技术在湿地原生物多样性的研究中缺乏严格比较的问题,Medinger 等[20]对贫营养性湖泊湿地中囊泡虫类测序,共获得 447,910 序列,发现高通量测序技术在群落结构分析中占有优势,但是较之于确定绝对物种丰度信息,更适合精确估测物种丰度的变化。在实际应用中,应结合形态学分析,为高通量测序数据的可靠性提供保障。高通量测序技术在检测生物圈稀有物种多样性的研究中更具有优越性[21],这对于进一步从分类学、群落结构和微生物类群深入地描述微生物多样性有着重要的意义。

2.2. 微生物功能菌群和生态作用评估

高通量测序技术的发展,为环境中功能微生物(如甲烷氧化菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌、硝化细菌等)在生态系统调节及生态价值评估等方面资源的深度开发利用提供了机遇。

O_3 作为一种重要的温室气体,也对人体、动物和植物,甚至全球气候都有影响[22]。Feng 等[23]探究了 O_3 作用下稻田产甲烷古菌群落结构及其多样性变化,发现产甲烷古菌主要属于甲烷微菌纲(Methanomicrobia, 81.1%)和甲烷杆菌纲(methanobacteria, 10.2%)。 O_3 通过抑制稻田优势菌群的活性,从而影响水稻田内产甲烷古菌的群落结构,这一发现有助于全面了解稻田生态系统对全球气候变化的响应和二者之间的反馈作用。Lüke 和 Kip 等分别以水稻田和水藓泥炭地湿地生态系统中甲烷氧化菌为研究对象,发现焦磷酸测序过程中 16S rRNA 序列插入缺失率较低,在后续分析中,能提供更多关于未知的和不可培养的 *pmoA* 序列,为研究甲烷氧化菌提供更多具体的功能基因信息,有利于进一步深入挖掘甲烷

氧化生态学的研究价值,在探究其他生境功能微生物方面也有很大的发展潜力[24] [25]。类似的,郑燕等[26]将高通量测序技术与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术相结合,对稻田红壤甲烷氧化特定功能微生物生理过程的分子机制和调控机制进行研究为新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究复杂环境中微生物生理生态过程的分子机制提供一定的技术参考。

长期以来认为在酸性土壤中由于受 pH、硝酸盐、亚硝酸盐等的影响,氨氧化过程中优势菌种为异养硝化细菌[27]。然而,He 等[28]关于酸性土壤中自养型氨氧化菌 *thaumarchaeal* 的研究认为:自养型氨氧化菌 *thaumarchaeal* 在氨氧化过程中起着主导作用,并且提出了酸性土壤氨氧化过程中氨氧化古菌(AOA)较氨氧化细菌(AOB)为优势种群的假说。Li 等[25]对红树林沉积物中 AOA 和 AOB 多样性、空间分布及丰度信息进行分析,进一步加深了对不同生境下 AOA 与厌氧氨氧化菌的耦合关系、AOB 对硝化作用的影响及其 NH_4^+ 、盐度和 pH 等对 AOA、AOB 生态位影响的理解,为更有效地利用红树林湿地处理废水或含高无机氮地表径流提供更具体的生物学信息。

此外,高通量测序技术也为生态评估提供可靠的生物学信息。如通过对真核生物 18S rRNA 基因序列进行生态相关的测序分析,发现不仅能鉴别高浓度污染物的影响,而且能够检测非原始基点和中度污染样点之间细微的差异,据此可以将生态学数据与化学、生态毒理学等数据相结合进行生态风险评估[29]。Shange 等[30]对美国某湿地细菌群落结构测序研究,发现细菌群落结构及其多样性有可能成为生态系统评估的重要指标。Dos Santos 等[31]发现红树林生态系统的石油污染区的变形菌门,特别是 γ -、 δ -变形菌纲可能作为生物监测红树林石油污染的指标微生物,为评估人类活动对生态系统的影响提供了一条快捷、低成本的新途径。

综上所述,通过对湿地功能微生物的深入研究,不仅有助于微生物资源的利用,而且为区域性湿地的具体评估,解决湿地所面临的污染、退化等问题提供生物层面的监测数据,以保护湿地资源,保持湿地生态系统资源的可持续利用。

2.3. 宏基因组学的应用

宏基因组学(Metagenomics)通过直接从环境样品中提取全部微生物 DNA,构建克隆文库,研究环境样品中全部微生物的遗传组成及其群落功能[32]。采用高通量测序技术进行宏基因组测序,无需构建克隆文库,避免了文库构建过程中引起的系统偏差,操作过程简化,测序效率提高,这是环境相关微生物研究的新方法。

微生物介导下的砷代谢可以改变砷在环境中的存在状态,使得砷迁移率增加,毒性增强,引起严重的环境问题。而另一方面微生物直接或间接的转化作用,可以控制砷的转化途径,达到减轻其毒性的作用。Cai 等[33]对南海海滨取沉积物宏基因组测序,构建了共包括 17 个子数据库的蛋白质数据库,弥补了未公开的砷代谢基因或蛋白质数据库的缺憾,还发现砷代谢基因在环境中呈现出高度多样化,砷(III)氧化酶的编码基因 *aioA* 和甲基化的编码基因 *arsM*,砷(V)还原酶的编码基因 *arrA*、*arsB* 和 *acr3* 的分布、多样性及丰度等变化显著。借助这样的方法更有利于探究无污染或低重金属污染下的特殊环境,并且了解其中微生物的代谢作用及其生存机制。

极端环境下微生物群落的遗传特性及适应机制较为独特,对北极永久冻土层泥炭地季节性解冻层土样宏基因组分析,发现环境中存在许多能够编码聚合物降解酶的基因,随着北极泥炭地活跃层深度的增加和生长季节的延长,未来甲烷的释放度将主要取决于甲烷细菌对环境变化的响应[34]。结合 Illumina 和 454 测序技术,分别对耐寒好氧甲烷氧化 γ 变形菌 *M. tundripaludum* SV96(ATCC BAA-1195)菌株和耐盐菌 *sp. GK1* 全基因组进行测序,为研究极端环境中特殊菌株微生物的生命过程及生态适应机制提供了理论基础,同时也有助于理解微生物进化史,为进一步研究特殊菌株的代谢和其他湿地微生物奠定基础

[35] [36]。

但是，目前极端环境下微生物宏基因组文库及其适应机制还有待于进一步的研究和完善，这将有助于我们更好的理解极端环境生态系统，并对其加以调控和利用，也将成为人类在太空中寻找地外生命的理论依据。

2.4. 湿地空间异质性研究

空间异质性(spatial heterogeneity)是指生态学过程和格局在空间分布上的不均匀性及其复杂性，也可理解为空间斑块性(patchiness)和梯度(gradient) [37]。对于一个生境或景观，空间异质性格局的变化可通过环境资源可利用性、环境因子空间特征及生态学实体(生物个体、种群、物种等)等进行体现[38]。

据统计，全世界的湿地面积占陆地总面积的 6.4%，其中亚热带占 29.3%，寒温带占 13.4%，寒带占 11%，热带占 10.9% [39]。然而由于每个地域的地貌和生态环境等各异，因此即使同为泥炭地，土壤微生物群落结构、代谢途径等都会发生改变。热带酸性泥炭地作为一个独特的生物圈重要陆地碳汇生态系统，以好氧和兼性厌氧微生物为主，且酸杆菌门(Acidobacteria)和 α -变形菌以及少数的具有代表性的古菌和真核微生物群落在植物多糖(如木质纤维素和淀粉多糖)分解代谢中起着关键性的作用；而寒温带条件下的北极泥炭地中，微生物群落主要属于放线菌门、疣微菌门和拟杆菌门，以无氧代谢为主，而且存在许多能够编码聚合物降解酶(如降解土壤有机碳)的基因，甲基杆菌属的 *tundripaludum* 甲烷氧化菌在碳循环中起着重要的作用[34] [40]。

盐度等基质环境对微生物的生态结构空间异质性有一定影响。盐湖环境下微生物群落结构各异，以青藏高原湖泊湿地的柴达木盆地达布逊盐湖和青海湖为研究对象，采用高通量测序与传统培养技术，发现达布逊盐湖以嗜盐的盐杆菌科(Halobacteriaceae)为主，放线菌门(Actinobacteria)为优势菌；而青海湖以中度嗜盐菌盐单胞菌属为青海湖嗜盐菌的优势种群，约占 62.9%，耐盐菌与非嗜盐菌分别占 11.4%和 2.9%。因此，微生物生态结构上的空间异质性，可能与青海湖区的盐度环境以及湖泊成因和演化阶段有关，使得在长期进化和适应过程中出现了差异性[41] [42]。

而植被群落演替等生物因素对微生物的营养选择和富集、微生物本身都有一定的影响。关于中国黄河三角洲植物原生演替垂直方向上微生物群落遗传多样性的研究，发现沿海岸线垂直方向上微生物群落结构呈现出一定的空间分布规律，盐生环境下的光板地样点中 Fimiiicutes 门的 *Bacillm* 属占 70.39%，*Halobacillus* 属占 98.65%；而在演替末期的补血草、芦苇群落的微生物种类主要以能够降解纤维素，甚至是芳香族化合物为主[43]。同样中国东部黄河口植物演替下微生物群落结构的响应，进一步证实植被及土壤有机质对微生物空间异质性的影响，对改善滨海滩涂盐碱土壤环境和开发湿地微生物资源具有一定的应用价值。在红树林沉积物水平方向上，也通常具有不同的微生物类群组成[44] [45]。

空间异质性在湿地生态系统中普遍存在，也就是说，在湿地生态系统中，微生物作为水体、沉积物和沉水植物的重要组成部分，其种群结构会对生境条件的变化做出反应，使得不同地域、不同湿地类型及基质条件下微生物群落结构、密度等的分布具有明显的差异。而这种异质性会直接影响到环境内部微生物种群数量及其组成，也将导致环境空间格局的改变。

3. 展望

高通量测序技术已经成为 DNA 测序技术发展的一个里程碑，目前已广泛应用于动植物学、环境微生物基因组学乃至人类微生物群的研究，引起了各领域高水平机构和专家的关注。它为湿地生态系统中微生物多样性提供更多的信息，展现出了巨大的应用潜力，并将在医药、物种保护、环境、生物催化等方面发挥更大的作用。该技术以低廉单碱基测序成本的优势为更多生物物种的基因组测序提供了可能，从

而解密更多的物种基因组遗传密码,同时对亚种、变种等进行全基因组重测序,但依旧存在一些亟待解决的问题:1) 如何解决单分子测序中零模波导孔中 DNA 聚合酶传输效率低和易降解的问题? [46]; 2) 目前高通量测序技术多用于生物体基因组的测序,但是关于作用机理方面的应用有待于进一步的发展。另外由于该技术产生的数据量大及应用领域广泛,因此对软件和数据分析软件的要求较高。根据测序平台、片段长度、模板类别等,数据分析软件如 BFAST、CloudBurst、MapReads 等都有一定的局限性[47],有待于进一步的提高。

综上所述,传统微生物技术为研究湿地生态环境中微生物奠定了基础,分子生物学技术进一步揭示了湿地微生物群落的生态功能和多样性。而高通量测序技术的出现为极大限度地分析研究湿地微生物群落结构及其多样性提供了可能性,使得人们能够更深层次地认识微生物在湿地地球化学循环甚至人类健康中的重要作用,为保护湿地生态系统提供理论基础和建设性的意见。

致 谢

非常感谢赵吉教授及武琳慧老师对本论文的指导,感谢杜瑞芳同学和史昊先同学给了我许多无私的帮助。感谢国家自然科学基金项目“蒙古高原沼泽化湿地甲烷及氢氧化菌的空间异质性与环境功能性研究”(项目编号:31160129)、内蒙古自然科学基金“蒙古高原湿地参与甲烷循环微生物群落结构与功能研究”(项目编号:2012MS0610)和内蒙古大学自治区级研究生创新项目对本论文资金上的支持。

参考文献 (References)

- [1] Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., et al. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**, 806-809.
- [2] 蔡燕飞, 廖宗文 (2002) 土壤微生物生态学研究方法进展. *土壤与环境*, **2**, 167-171.
- [3] Matovelle, G. and Hernán, D. (2007) Comparison of the molecular methods, terminal restriction fragment length polymorphism and denaturant gradient gel electrophoresis, to characterize the microbiota in feces from breastfed infants. Tesis (Magíster en Microbiología), Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Postgrados; Quito, Ecuador, Mayo.
- [4] Sakata, S., Tonooka, T., Ishizeki, S., et al. (2005) Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiology Letters*, **243**, 417-423.
- [5] Polz, M.F. and Cavanaugh, C.M. (1998) Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3724-3730.
- [6] Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, C., et al. (2012) High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Gene Amplicons: Effects of extraction Procedure, Primer Length and Annealing Temperature. *PLOS ONE*, **7**.
- [7] Niedringhaus, T.P., Milanova, D., Kerby, M.B., et al. (2011) Landscape of Next-Generation Sequencing Technologies. *Analytical Chemistry*, **83**, 4327-4321.
- [8] Schadt, E.E., Turner, S. and Kasarskis, A. (2010) A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, **19**, 227-240.
- [9] Kolb, S. and Stacheter, A. (2013) Prerequisites for amplicon pyrosequencing of microbial methanol utilizers in the environment. *Frontiers in Microbiology*, **4**, 1-12.
- [10] Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., et al. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, **21**, 1794-1805.
- [11] Rothberg, J.M. and Leamon, J.H. (2008) The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology*, **26**, 1117-1124.
- [12] Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X.X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., et al. (2005) Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*, **309**, 1728-1732.
- [13] 郑春雨, 王光华 (2012) 湿地生态系统中主要功能微生物研究进展. *湿地科学*, **2**, 243-249.
- [14] 孟晗 (2011) 长三角地区土壤不同发育阶段微生物群落结构的变化. 硕士论文, 复旦大学, 上海.
- [15] Arfi, Y., Buée, M., Marchand, C., Lévassieur, A. and Record, E. (2012) Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiology Ecology*, **79**, 433-444.

- [16] Ligi, T., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J.K., Nölvak, H., Mitsch, W.J., Mander, Ü. and Truu, J. (2013) Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, in press.
- [17] Ahn, C. and Peralta, R.M. (2009) Soil bacterial community structure and physicochemical properties in mitigation wetlands created in the Piedmont region of Virginia (USA). *Ecological Engineering*, **35**, 1036-1042.
- [18] 王玉 (2012) 基于 BIPES 分析三种沉积物的微生物群落多样性. 硕士学位论文, 南方医科大学, 广州.
- [19] Peralta, R.M., Ahn, C. and Gillevet, P.M. (2013) Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands. *Science of the Total Environment*, **443**, 725-732.
- [20] Dentener, F., Stevenson, D., Ellingsen, K., van Noije, T., Schultz, M., Amann, M., et al. (2006) The global atmospheric environment for the next generation. *Environmental Science & Technology*, **40**, 3586-3594.
- [21] Medinger, R., Nolte, V., Pandey, R.V., Jost, S., Ottenwälder, B., Schlötterer, C. and Boenigk, J. (2010) Diversity in a hidden world: Potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Molecular Ecology*, **19**, 32-40.
- [22] Taib, N., Mangot, J.F., Domaizon, I., Bronner, G. and Debroas, D. (2013) Phylogenetic affiliation of SSU rRNA genes generated by massively parallel sequencing: New insights into the freshwater protist diversity. *PLoS ONE*, **8**, e58950.
- [23] Feng, Y.Z., Lin, X.G., Yu, Y.C., Zhang, H.Y., Chu, H.Y. and Zhu, J.G. (2013) Elevated ground-level O₃ negatively influences paddy methanogenic archaeal community. *Scientific Reports*, **3**, Article Number: 3193.
- [24] Kip, N., Dutilh, B.E., Pan, Y., Bodrossy, L., Neveling, K., Kwint, M.P., et al. (2011) Ultra-deep pyrosequencing of pmoA amplicons confirms the prevalence of *Methylomonas* and *Methylocystis* in sphagnum mosses from a Dutch peat bog. *Environmental Microbiology Reports*, **3**, 667-673.
- [25] Lüke, C. and Frenzel, P. (2011) Potential of pmoA amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 6305-6309.
- [26] 郑燕, 贾仲君 (2013) 新一代高通量测序与稳定性同位素示踪 DNA/RNA 技术研究稻田红壤甲烷氧化的微生物过程. *微生物学报*, **2**, 173-184.
- [27] De Boer, W. and Kowalchuk, G.A. (2001) Nitrification in acid soils: Micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 853-866.
- [28] He, J.Z., Hu, H.W. and Zhang, L.M. (2012) Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **55**, 146-154.
- [29] Chariton, A.A., Court, L.N., Hartley, D.M., Colloff, M.J. and Hardy, C.M. (2010) Ecological assessment of estuarine sediments by pyrosequencing eukaryotic ribosomal DNA. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **8**, 233-238.
- [30] Shange, R., Haugabrooks, E., Ankumah, R., Ibekwe, A.M., Smith, R.C. and Dowd, S. (2013) Assessing the diversity and composition of bacterial communities across a wetland, transition, upland gradient in Macon County Alabama. *Diversity*, **5**, 461-478.
- [31] Dos Santos, H.F., Cury, J.C., Do Carmo, F.L., dos Santos, A.L., Tiedje, J., van Elsas, J.D., et al. (2011) Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: Bacterial proxies for oil pollution. *PLoS ONE*, **6**, e16943.
- [32] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培 (2008) 宏基因组学的研究现状和发展趋势. *环境科学学报*, **2**, 210-216.
- [33] Cai, L., Yu, K., Yang, Y., Chen, B.W., Li, X.D. and Zhang, T. (2013) Metagenomic exploration reveals high levels of microbial arsenic metabolism genes in activated sludge and coastal sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 9579-9588.
- [34] Tveit, A., Schwacke, R., Svenning, M.M. and Ulrich, T. (2013) Organic carbon transformations in high-Arctic peat soils: Key functions and microorganisms. *The ISME Journal*, **7**, 299-311.
- [35] Svenning, M.M., Hestnes, A.G., Wartianen, I., Stein, L.Y., Klotz, M.G., Kalyuzhnaya, M.G., et al. (2011) Genome sequence of the arctic methanotroph *Methylobacter tundripaludum* SV96. *Journal of Bacteriology*, **193**, 6418-6419.
- [36] Yeganeha, L.P., Azarbaijania, R., Sarikhan, S., Mousavi, H., Ramezani, M., Amoozegar, M.A., et al. (2012) Complete genome sequence of oceanimonas sp. GK1, a halotolerant acterium from Gavkhouni wetland in Iran. *Journal of Bacteriology*, **194**, 2123-2124.
- [37] 杨持 (2008) 生态学. 高等教育出版社, 北京.
- [38] 陈玉福, 董鸣 (2003) 生态学系统的空间异质性. *生态学报*, **2**, 346-352.
- [39] 王宪礼, 李秀珍 (1997) 湿地的国内外研究进展. *生态学杂志*, **1**, 58-62.
- [40] Kanokratana, P., Uengwetwanit, T., Rattanachomsri, U., Bunternngsook, B., Nimchua, T., Tangphatsornruang, S., et al. (2011) Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial commu-

- nity by metagenomic analysis. *Microbial Ecology*, **61**, 518-528.
- [41] 朱德锐, 刘建, 韩睿, 等 (2012) 青海湖嗜盐微生物系统发育与种群多样性. *生物多样性*, **4**, 495-504.
- [42] 赵婉雨, 杨渐, 董海良, 等 (2013) 柴达木盆地达布逊盐湖微生物多样性研究. *地球与环境*, **4**, 398-405.
- [43] 余悦 (2012) 黄河三角洲原生演替中土壤微生物多样性及其与土壤理化性质关系. 博士论文, 山东大学, 山东.
- [44] Yu, Y., Wang, H., Liu, J., Wang, Q., Shen, T.L., Guo, W.H. and Wang, R.Q. (2012) Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary. *European Journal of Soil Biology*, **49**, 12-21.
- [45] Jiang, X.T., Peng, X., Deng, G.H., Sheng, H.F., Wang, Y., Zhou, H.W. and Tam, N.F.Y. (2013) Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland. *Microbial Ecology*, **66**, 96-104.
- [46] Thomas, P.N., Denitsa, M., Matthew, B.K., Snyder, M.P. and Barron, A.E. (2011) Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical Chemistry*, **83**, 4327-4341.
- [47] Fonseca, N.A., Rung, J., Brazma, A. and Marioni, J.C. (2012) Tools for mapping high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **28**, 3169-3177.