

海洋沉积物氨氧化菌群落结构的测序分析

贺惠^{1, 2, 3}, 陈阳阳^{2, 3, 4}, 王勋功^{2, 3, 4}, 甄毓^{2, 3, 4}, 米铁柱^{2, 3, 4},
于志刚^{2, 5}, 李迎^{2, 3, 4}

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 4. 中国海洋大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100; 5. 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100)

摘要: 本文以氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)特征基因氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO) α 亚基基因(*amoA*)为目标基因(~491 bp), 分别采用克隆文库、454高通量测序和illumina测序技术对其群落结构进行了比较研究。结果表明, 454高通量测序和illumina测序技术得到的菌群多样性及丰富度均高于克隆文库技术。在菌群组成方面, 虽然3种测序技术检测到的优势类群均为亚硝化螺菌, 但在菌群丰度方面存在差异。3种测序技术中, 克隆文库技术在很大程度上可能高估物种丰度, 且对部分低丰度类群的检测能力有限; illumina单端测序由于其测序片段较短, 可能存在物种注释错误、不能准确区分各物种间序列差异等问题; 比较而言, 454高通量测序技术能较为全面和准确地反映海洋沉积物中AOB的菌群结构特征。

关键词: 氨氧化细菌; 454高通量测序技术; illumina测序技术; 克隆文库; 沉积物

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2018)08-0022-08

DOI: 10.11759/hyqx20171215002

海洋沉积物是地球上最大面积的覆盖层, 约占地球总面积的48.6%^[1]。沉积物中丰富的微生物, 是沉积物与水体之间物质交换的主要推动力; 微生物的分布与代谢也影响着沉积物中碳、氮等生源要素的生物地球化学过程。氨氧化过程作为硝化过程的关键限速步骤, 在全球氮循环中发挥着极为重要的作用。氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)是氨氧化过程的主要驱动者之一, 氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)是氨氧化微生物特有的一种胞内酶。对AOB来说, 该酶由*amoC*、*amoB*和*amoA*三个亚基组成, 为一保守的*amoCAB*结构^[2, 3]。*amoA*基因编码氨单加氧酶的活性位点, 且在AOB中保守性较高, 因此*amoA*基因常用作AOB群落研究的特征基因, 已被用于多种生境中AOB群落信息的研究^[4-7]。

20世纪90年代以来, 以第1代测序技术为基础的分子生物学方法得到了广泛应用, 极大推动了微生物生态学的研究进程。克隆文库技术是目前最常用的微生物群落组成和多样性分析方法, 该方法通常与第1代测序技术相结合, 获得微生物群落的组

成和多样性特征。但是克隆文库技术能获得的基因序列条数有限, 仅能反映有限的优势微生物类群, 且工作量大、花费较高^[8]。同时, 由于克隆子的选择是随机的, 从统计学角度来说, 只有克隆子数目足够多时, 克隆文库才能比较真实地反映环境中微生物的群落组成情况^[9]。21世纪初, 第2代测序技术开始兴起, 在各种环境如土壤^[10, 11]、海水^[12]、活性污泥^[13]、沉积物^[14, 15]的微生物群落分析中发挥了重要作用。其中海洋环境中的微生物群落由少数高丰度类群和多数低丰度类群组成^[16], 而基于第1代测序技术的

收稿日期: 2017-12-15; 修回日期: 2018-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(41521064, 41620104001); 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室、青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学开放课题(KLMEES201601)

[Foundation: the National Natural Science Foundation of China, No.41521064, 41620104001; the Open Fund of Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, and Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No.KLMEES201601]

作者简介: 贺惠(1987-), 女, 山东日照人, 博士, 主要从事海洋生态学研究, 电话: 0532-66781940, E-mail: hehui-07@163.com; 甄毓, 通信作者, 电话: 0532-66781940, E-mail: zhenyu@ouc.edu.cn

克隆文库对这些低丰度类群的检测能力有限，因此，第2代测序技术在其中的应用就显得尤为重要。

以往研究中，根据*amoA*基因序列，AOB群落可划分为10~40个OTUs^[17-19]，与其他微生物类群如硫酸盐还原菌相比，AOB的物种丰富度和多样性水平相对较低。迄今为止，克隆文库技术仍是AOB群落结构和多样性的主流方法，采用高通量测序技术分析AOB群落结构和多样性的研究并不多见^[20-22]。基于以上考虑，本研究以*amoA*基因为目的基因，分别采用克隆文库技术、454高通量测序技术和illumina测序技术，分析了东海海域沉积物中AOB菌群组成、多样性等方面的特征，旨在比较不同测序技术在分析海洋沉积物AOB菌群特征中的优劣，为海洋沉积物中AOB分子生态学研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品的采集与保存

2011年8月初采集东海海域表层沉积物样品，采样站位为31站(122.55°E, 29.56°N)(图1)。用箱式采泥器采集表层沉积物后，刮取表层3 cm样品，置于封口袋中，于-20°C冰箱中保存用于核酸提取。

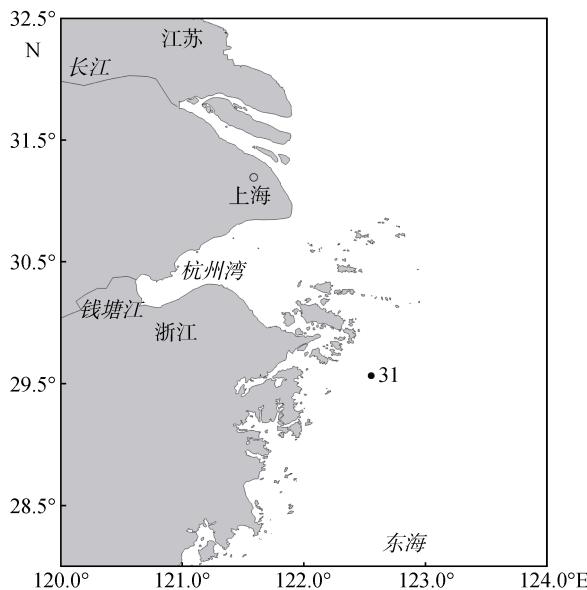


图1 2011年8月航次表层沉积物采样站位

Fig. 1 Sampling site of surface sediments in August 2011

1.2 沉积物微生物基因组DNA提取

将沉积物解冻混匀后，用PowerSoil® DNA Isolation Kit(MOBIO, 美国)提取微生物基因组DNA，

得到的DNA保存于-20°C冰箱中待用。基因组DNA提取步骤如下：

将0.25 g沉积物样品加入到PowerBead Tubes中，涡旋混匀后加入60 μL Solution C1，颠倒混匀。把PowerBead Tubes固定在涡旋仪上，最大转速涡旋连续振荡10 min。室温10 000 g离心30 s，吸取转移上清至一个干净的2 mL Collection Tube中。加入250 μL Solution C2后，涡旋混匀5 s。4°C孵育5 min，室温10 000 g离心1 min。避开沉淀小珠，转移上清至新的离心管中。加入200 μL Solution C3到上清中，涡旋混匀。4°C孵育5 min，室温10 000 g离心1 min后避开沉淀小珠，转移上清至新的离心管中；加入1 200 μL Solution C4到上清中，涡旋混匀5 s。将上清转移至Spin Filter，室温10 000 g离心1 min。弃去滤液，继续加入上清，室温10 000 g离心1 min。重复直至过滤完所有上清；加入500 μL Solution C5至Spin Filter中，室温10 000 g离心30 s。弃去上清，室温10 000 g离心1 min。小心转移Spin Filter到2 mL Collection Tube中，加入100 μL Solution C6到白色滤膜中心，室温10 000 g离心30 s后，弃去Spin Filter，置于-20°C保存。

1.3 克隆文库构建及生物信息学分析

1.3.1 克隆文库构建

使用引物 amoA-1F(5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT)和 amoA-2R(5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC)扩增*amoA*基因，长度约491 bp^[23]。PCR反应程序为94°C下解链10 min，随后35个循环包括94°C变性30 s，58°C复性45 s，72°C延伸1 min，72°C延伸10 min后于4°C保存。用1%琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物，收集目的条带处的凝胶，DNA凝胶回收试剂盒(Takara, 大连)纯化目的片段。

将纯化产物连接到pMD18-T载体上后转化到*Escherichia coli* Trans 5α感受态细胞中，通过蓝白斑筛选含有目的基因的阳性克隆，随机挑取约100个白色克隆至新的Luria-Bertani固体培养基(含100 μg/mL氨苄青霉素)上，37°C培养箱中倒置培养4~6 h后送测序(华大基因，北京)。测序结果提交至GenBank数据库，登录号为KF560993-KF561094。

1.3.2 生物信息学分析

利用VecScreen(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscren/>)去除载体序列后，使用DOTUR软件在97%相似性水平下对*amoA*基因序列进行聚类，得到用于

物种分类的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)^[22, 24], 并挑选出每个OTU的代表序列。Chao 1、Shannon 和覆盖度指数等均由 DOTUR 软件给出。

1.4 454 高通量测序及生物信息学分析

1.4.1 454 高通量测序

用于 *amoA* 基因的扩增引物同上, 扩增时在引物 5'端加入 barcode。PCR 产物使用 1.5% 琼脂糖电泳检测, 纯化目的条带。采用试剂盒进行扩增子文库构建, 检测合格后, 使用 GS FLX+ Titanium 平台进行上机测序。454 焦磷酸测序委托上海派森诺生物科技有限公司进行。测序得到的 *amoA* 序列在 Sequence Read Archive(SRA)数据库中的登录号为 SRP073073。

1.4.2 生物信息学分析

使用 Quantitative Insights into Microbial Ecology(QIIME)(version 1.9.0)对原始下机序列进行筛选, 将含有引物错配、模糊碱基、碱基质量分数低于 20 及长度较短的序列等予以删除, 得到高质量序列, 用于后续的生物信息学分析。使用 Uparse 软件在 97% 序列相似性水平上对 *amoA* 基因序列进行聚类, 得到用于物种分类的 OTUs, 并从每个 OTU 中挑选出一条序列作为该 OTU 的代表序列。利用 QIIME 软件分析样品的多样性情况, 包括 Chao 1、Shannon 和覆盖度等指数, 并绘制稀释曲线。

1.5 illumina 测序及生物信息学分析

1.5.1 illumina 测序

用于 *amoA* 基因的扩增引物同上, 扩增时在引物 5'端加入 barcode。PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化目的条带。使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 进行扩增子文库构建, 文库检测合格后, 使用 Hiseq2500 PE250 平台进行上机测序。由于 Hiseq PE250 测序平台所得序列有效长度通常在 400 bp 以内^[25], 而 *amoA* 基因序列较长(~491 bp), 因此本研究仅对 *amoA* 基因 5'端进行 illumina 测序, 并将该测序过程定义为 illumina 单端测序。*amoA* 基因 illumina 单端测序委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行, 测序得到的 *amoA* 序列在 SRA 上的登录号为 SRP073074。

1.5.2 生物信息学分析

将原始下机序列删除引物和 barcode 序列后, 使用 QIIME 对其进行筛选, 将含有模糊碱基、碱基质量分数低于 20 的序列等予以删除, 得到高质量序列, 用于后续的生物信息学分析。使用 Uparse 软件在

97% 序列相似性水平上对 *amoA* 基因序列进行聚类, 得到用于物种分类的 OTUs, 并从每个 OTU 中挑选出一条序列作为该 OTU 的代表序列。利用 QIIME 软件分析样品的多样性情况, 包括 Chao 1、Shannon 和覆盖度等指数, 并绘制稀释曲线。

2 结果和分析

2.1 *amoA* 基因的扩增

amoA 基因用引物 amoA-1F、amoA-2R 扩增后电泳结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, 扩增产物长度在 500 bp 左右, 在 *amoA* 基因长度范围内, 说明 *amoA* 基因扩增成功。

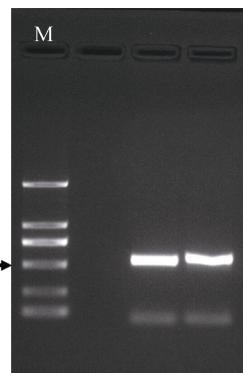


图 2 *amoA* 基因扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of *amoA* gene

2.2 氨氧化细菌菌群多样性比较

采用克隆文库技术、454 高通量测序技术和 illumina 单端测序技术对 AOB 菌群多样性进行比较研究, 结果如表 1。就覆盖度而言, 3 种测序技术得到的覆盖度均高于 90%, 但 2 种高通量测序技术得到的覆盖度高于克隆文库技术得到的覆盖度, 因此更能客观地反映样品中氨氧化细菌菌群结构的真实信息。Chao 1 指数用来表征微生物群落的丰富度, 由表 1 可知, 两种高通量测序技术检测到的 OTU 个数与 Chao 1 指数一致, 表明高通量测序技术基本能够覆盖样品中所有的 AOB 种类; 而克隆文库技术检测到的 OTU 个数仅为 Chao 1 指数的二分之一, 说明克隆文库技术获得的 AOB 种类较实际情况少, 低估了 AOB 的菌群丰富度。Shannon 指数通常用来估算微生物群落的多样性, 由表 1 可知, 基于克隆文库技术检测到的 Shannon 指数为 1.91, 基于 454 高通量测序技术检测到的 Shannon 指数为 2.06, 基于 illumina 单端测序技术得到的 Shannon 指数为 2.01。从整体趋

势来说，两种高通量测序技术检测到的菌群多样性

高于克隆文库技术检测到的菌群多样性。

表 1 不同测序技术得到的氨氧化细菌菌群丰富度和多样性比较

Tab. 1 Richness and diversity indexes of ammonia-oxidizing bacteria by different sequencing methods

	OTU 数/个	Chao 1 指数	Shannon 指数	覆盖度/%
克隆文库	15	33	1.91	91.48
454 高通量测序	27	27	2.06	100.00
illumina 单端测序	24	24	2.01	100.00

运用 3 种测序技术得到的氨氧化细菌菌群稀释曲线如图 3 所示。两种高通量测序方法得到的稀释曲线均呈现出逐渐平缓的趋势，说明数据饱和度较

好；而克隆文库得到的稀释曲线呈现出陡峭的上升趋势，说明数据饱和度不够，只有增加测序深度才能较真实地反映氨氧化细菌菌群结构的信息。

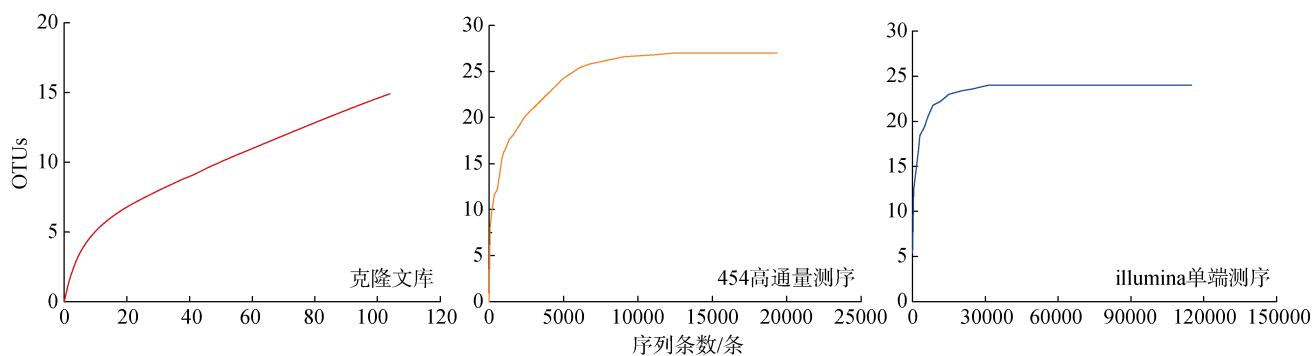


图 3 不同测序方法得到的氨氧化细菌菌群稀释曲线

Fig. 3 Rarefaction curves of ammonia-oxidizing bacteria by different sequencing methods

2.3 氨氧化细菌菌群群落组成比较

将 OTU 代表序列与 AOB 纯培养菌株序列进行比对分析发现，在属分类水平上，克隆文库、454 高通量测序和 illumina 单端测序技术得到的优势类群均为亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)，详见图 4。尽管 3 种测序技术获得的优势菌群的具体比例不同，但都可以反映出菌群中的优势组成情况。

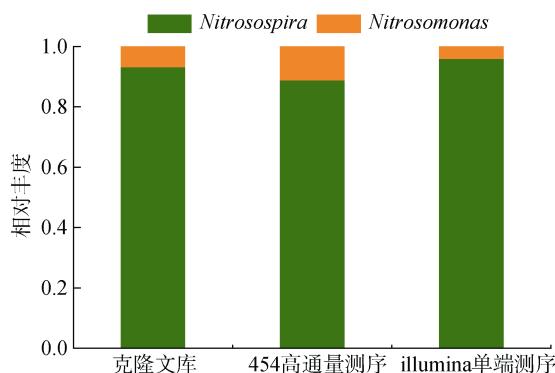


图 4 不同测序方法得到的属分类水平上 AOB 菌群组成分析

Fig. 4 Community composition of AOB at genus level by different sequencing methods

将 3 种测序技术(克隆文库技术、454 高通量测序技术和 illumina 单端测序技术)得到的 *amoA* 基因序列合并，按照 97% 相似度划分 OTU，采用韦恩图来研究不同测序技术得到的 OTUs 之间的关系(图 5)。结果表明，454 高通量测序技术所得到的 OTUs 能完整覆盖克隆文库技术所测得的所有 OTUs。454 高通量测序技术和 illumina 单端测序技术各自独有的 OTUs 分别为 8 个和 5 个；且所有独有 OTU 的相对

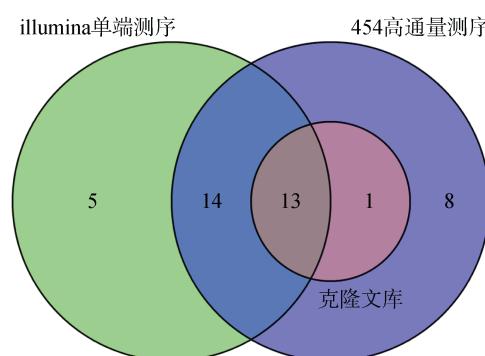


图 5 不同测序方法得到的 OTUs 分布韦恩图

Fig. 5 Venn graph of OTUs obtained from different sequencing methods

丰度均低于 1%。因此,对于 AOB 而言,454 高通量测序技术能够检测到更多菌群,尤其是低丰度菌群。

进一步分析 3 种测序技术中不同 OTU 所占比例,将序列丰度低于 1% 的 OTU 定义为 others(图 6)。克隆文库技术检测到的菌群优势种是 OTU4,而该物种在 454 高通量测序结果中丰度相对较低(3.56%),在 illumina 单端测序结果中丰度则低于 1%。而对于两种高通量测序结果中丰度相对较高的类群,如 OTU6,并没有在克隆文库结果中发现。这可能由于克隆文库技术测序通量较低,导致抽样误差较大,在反映菌群遗传信息量方面较为有限。而对于 illumina 单端测序来说,该技术也不能准确反映菌群组成情况,这一点在 OTU 水平上表现得尤为显著,其与 454 高通量测序得到的菌群组成结果差异较大。

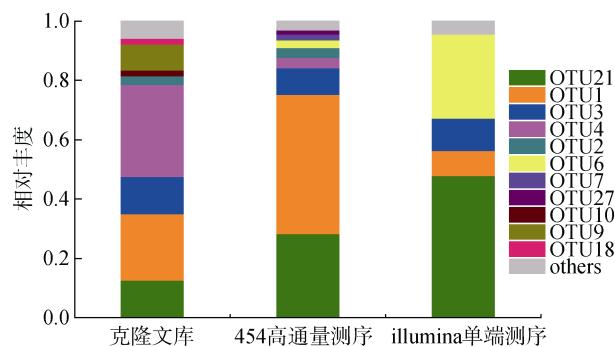


图 6 不同测序方法得到的 OTU 分类水平上 AOB 菌群组成分析

Fig. 6 Community composition of AOB at OTU level by different sequencing methods

3 讨论与结论

1986 年 Pace 等首次将核酸测序技术应用于微生物学分析^[26]后,变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、克隆文库等技术逐渐应用到微生物生态学的研究中^[27-30]。在上述几种方法中,克隆文库技术是目前研究微生物群落组成及多样性的主流方法。自然环境中微生物组成极为复杂,但由于方法的限制,克隆文库技术对微生物群落结构的了解仍不全面,尤其是丰度较低的微生物类群。近几年 454 高通量测序和 illumina 高通量测序技术开始兴起,在微生物生态学研究中发挥着越来越重要的作用。与传统的克隆文库技术相比,高通量测序技术能提供大量遗传信息,可以检测到环境中的低丰度类群,有助于对微生物

的群落结构进行全面深入研究。

亚硝化单胞菌属是土壤、淡水、废水及生物滤池中的主要类群,而近岸海洋环境中 AOB 则以亚硝化螺菌属为主。本研究中的优势菌群是亚硝化螺菌,与其他研究结果相吻合^[31-33]。虽然克隆文库技术和高通量测序技术检测到的优势类群均为亚硝化螺菌,但在优势类群丰度方面存在差异。与此类似,龚俊等^[34]基于 16S rRNA 基因对烟叶表面微生物类群的比较分析发现,克隆文库和高通量测序技术检测到的细菌优势类群相同,但优势类群的相对丰度存在差异。illumina 单端测序技术由于测序长度方面的限制,可能会导致物种注释错误等,因此通过该技术得到的群落结构可能与真实群落结构存在偏差。而对于测序片段长度相同的两种技术,亚硝化螺菌属在克隆文库结果中的丰度较其在 454 高通量测序结果中的丰度高,这主要是由于克隆文库和高通量测序技术的测序通量不同导致的。对克隆文库来说,基于实验成本的考虑,通常测序的克隆子数目仅为几百个,远低于高通量技术测序的上万个、甚至十几万个。因此高通量测序结果较克隆文库结果而言,能更好地反映氨氧化细菌的群落结构。从本文结果看,克隆文库技术存在高估物种丰度的可能,这一研究结果与蔡言安等^[35]分别采用克隆文库和高通量测序技术对生物滤池内微生物群落结构的研究结果相一致。

在 OTU 水平上,克隆文库技术测得的优势种为 OTU4(相对丰度为 31.07%),而该物种在 454 高通量测序结果中仅占 3.56%,illumina 单端测序结果中该物种所占比例低于 1%,说明克隆文库技术高估了 OTU4 的相对丰度,推测与其较低的测序通量有关。同时,对于两种高通量技术测得的部分物种,克隆文库技术并没有检测到,由此也说明克隆文库技术在菌群组成方面的检测能力有限。与此类似,张玉等^[36]以异化型亚硫酸盐还原酶基因(dissimilatory sulfite reductase, dsrB)为目的基因,运用克隆文库、454 和 illumina 高通量测序技术对沉积物中硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing prokaryotes, SRP)进行研究,结果表明克隆文库高估了部分 SRP 类群的相对丰度;而对于采用 454 和 Illumina 高通量测序技术所检测到的部分 SRP 主要类群,在克隆文库技术中并未检测到。

对比 3 种测序技术,克隆文库技术通过对氨氧化细菌 *amoA* 基因片段构建文库,进而推测复杂环境微生物群落的结构,技术成熟且操作性好。但该技术在分析群落组成及多样性时测序量较大,花费较多,

反映的微生物遗传信息量较为有限，主要以优势菌群为主，高估物种丰度及低估菌群大小和多样性的可能性较高^[37]。高通量测序技术操作简单、通量高、成本低，得到的序列信息丰富，在环境微生物的研究中具有一定的优越性，能比较真实地反映菌群结构及多样性情况。但在实际操作中我们发现，由于 illumina 单端测序片段较短，在菌群组成分析时，在准确区分各物种间序列差异方面存在不足，特别在 OTU 水平上利用 *amoA* 序列对 AOB 群落组成进行分析时表现尤为显著。同时，由于环境样品组成复杂，对不同海域的氨氧化细菌、或者相同海域的其他功能菌群来说，单端测序仍可能存在低估菌群丰富度和多样性、物种注释错误等问题。因此，illumina 单端测序对于利用 *amoA* 序列进行氨氧化细菌菌群分析是不可取的。综上，在分析海洋沉积物中氨氧化细菌菌群时，454 高通量测序技术可以更全面和准确的了解其结构特征。

参考文献：

- [1] 宋金明. 海洋沉积物中的生物种群在生源物质循环中的功能[J]. 海洋科学, 2000, 24(4): 22-25.
Song Jinming. Roles of marine sediments species diversity in biogenic element cycling[J]. Marine Sciences, 2000, 24(4): 22-25.
- [2] Nicol G W, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(5): 207-212.
- [3] Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2010, 54(1): 33-45.
- [4] Sinigalliano C D, Kuhn D N, Jones R D. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(7): 2702-2706.
- [5] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils[J]. Nature Geoscience, 2009, 2(9): 621-624.
- [6] Cao H L, Hong Y G, Li M, et al. 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.
- [7] Hou J, Cao X Y, Song C L, et al. Predominance of ammonia-oxidizing archaea and *nirK*-gene-bearing denitrifiers among ammonia-oxidizing and denitrifying populations in sediments of a large urban eutrophic lake (lake Donghu)[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2013, 59(7): 456-464.
- [8] Wintzingerode F V, Göbel U B, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 21(3): 219-229.
- [9] 叶文瑾. 太湖富营养化水体和底泥中微生物群落的分子生态学研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
Ye Wenjin. Molecular Ecology Research on Microbial Community in the Water and Sediment of Eutrophic Lake Taihu[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2009.
- [10] Will C, Thürmer A, Wollherr A, et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(20): 6751-6759.
- [11] Kuffner M, Hai B, Rattei T, et al. Effects of season and experimental warming on the bacterial community in a temperate mountain forest soil assessed by 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. FEMS Microbial Ecology, 2012, 82(3): 551-562.
- [12] Kirchman D L, Cottrell M T, Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(5): 1132-1143.
- [13] Zhang X W, Qu Y Y, Ma Q, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals diverse microbial communities of activated sludge systems stimulated by different aromatics for indigo biosynthesis from Indole[J]. PloS One, 2015, 10(4): e0125732.
- [14] Kristiansson E, Fick J, Janzon A, et al. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high level of resistance and gene transfer elements[J]. PloS One, 2011, 6(2): e17038.
- [15] Zhu D C, Tanabe S-H, Yang C, et al. Bacterial community composition of South China Sea sediments through pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. PloS One, 2013, 8(10): e78501.
- [16] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [17] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [18] Mosier A C, Francis C A. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3002-3016.
- [19] Dang H Y, Li J, Chen R P, et al. Diversity, abundance,

- and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing betaproteobacteria in response to environmental gradients and coastal eutrophication in Jiaozhou Bay, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4691-4702.
- [20] Pester M, Rattei T, Flechl S, et al. amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions [J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(2): 525-539.
- [21] Marusenko Y, Garcia-Pichel F, Hall S J. Ammonia-oxidizing archaea respond positively to inorganic nitrogen addition in desert soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(2): 1-11.
- [22] Wang B Z, Zhao J, Guo Z Y, et al. Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1062-1075.
- [23] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [24] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [25] 张玉. 东海沉积物中硫酸盐还原菌和硫氧化菌分子生态学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2017.
Zhang Yu. Microbial ecology of sulfate-reducing bacteria and sulfur-oxidizing bacteria in sediments from east China Sea[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2017.
- [26] Pace N R, Stahl D A, Lane D J, et al. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences[J]. Advances in Microbiology Ecology, 1986, 9(4): 1-55.
- [27] Osborn A M, Moore E, Timmis K N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(1): 39-50.
- [28] Boon N, Windt W D, Verstraete W, et al. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39(2): 101-112.
- [29] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5142-5150.
- [30] Herrmann M, Saunders A M, Schramm A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 3279-3283.
- [31] Santoro A E, Casciotti K L, Francis C A. Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(7): 1989-2006.
- [32] Chen Y Y, Zhen Y, He H, et al. Diversity, abundance, and spatial distribution of ammonia-oxidizing β -Proteobacteria in sediments from Changjiang Estuary and its adjacent area in East China Sea[J]. Microbial Ecology, 2014, 67(4): 788-803.
- [33] Yu S L, Yao P, Liu J W, et al. Diversity, abundance, and niche differentiation of ammonia-oxidizing prokaryotes in mud deposits of the east China marginal seas[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 137.
- [34] 龚俊, 刘玉配, 李媛媛. 烟叶表面微生物类群两种检测方法的比较研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2016, 3: 92-101.
Gong Jun, Liu Yupei, Li Yuanyuan. Comparative analysis of microbial communities on tobacco leaves between clone library and high-throughput sequencing[J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 2016, 3: 92-101.
- [35] 蔡言安, 李东, 毕学军, 等. 基于不同测序技术的生物群落结构及功能菌分析[J]. 中国环境科学, 2016, 36(6): 1830-1834.
Cai Yan'an, Li Dong, Bi Xuejun, et al. Analysis of microbial community structure and functional bacteria in a biofilter with different sequencing technologies[J]. China Environmental Science, 2016, 36(6): 1830-1834.
- [36] 张玉, 米铁柱, 甄毓, 等. 海洋沉积物中硫酸盐还原菌和硫氧化菌群落分析方法的比较[J]. 环境科学, 2018, 1: 438-449.
Zhang Yu, Mi Tiezhu, Zhen Yu, et al. Analysis of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes community structures in marine sediments with different sequencing technologies[J]. Environmental Science, 2018, 1: 438-449.
- [37] 陈玲, 袁玉菊, 曾丽云, 等. 16S rDNA 克隆文库法与高通量测序法在浓香型大曲微生物群落结构分析中的对比分析[J]. 酿酒科技, 2015, 12: 33-36.
Chen Ling, Yuan Yuju, Zeng Liyun, et al. 16S rDNA clone library vs. high-throughput sequencing method in the analysis of the microbial communities in Nongxiang Daqu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 12: 33-36.

Analysis of ammonia-oxidizing bacteria community structure in marine sediments using different sequencing technologies

HE Hui^{1, 2, 3}, CHEN Yang-yang^{2, 3, 4}, WANG Xun-gong^{2, 3, 4}, ZHEN Yu^{2, 3, 4}, MI Tie-zhu^{2, 3, 4}, YU Zhi-gang^{2, 5}, LI Ying^{2, 3, 4}

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Qingdao 266100, China; 4. College of Environmental Science and Engineering, Qingdao 266100, China; 5. Key Laboratory of Marine Chemical Theory and Technology, Ministry of Education, Qingdao 266100, China)

Received: Dec. 15, 2017

Key words: ammonia-oxidizing bacteria; pyrosequencing; illumina sequencing; clone library; sediment

Abstract: In this study, we evaluated the advantages and disadvantages of clone library, pyrosequencing, and illumina sequencing of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) communities in marine sediments using ammonia monooxygenase α subunit (*amoA*) (~491 bp). Results showed that the diversity and richness of AOB communities based on pyrosequencing and illumina sequencing were much higher than those obtained by traditional clone library. Although *Nitrosospira* was the predominant species detected by the three sequencing technologies, there were still some differences in its abundance. Among these three sequencing analyses, clone library may overestimate the abundance of species, and it is also limited for some low-abundance groups. Due to its short fragments, single-end illumina sequencing may result in annotation errors and cannot accurately distinguish divergence among sequences. Thus, pyrosequencing could provide a relatively more accurate and comprehensive description of AOB community structure in marine sediments.

(本文编辑: 梁德海)