

环境微生物的宏基因组学研究新进展

孙 欣 高 莹 杨云锋*

(清华大学环境学院, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 宏基因组学以环境中微生物的基因组的总和为研究对象, 从而规避了传统方法中绝大部分微生物不能培养的缺陷, 因此近年来在环境微生物学研究中得到了广泛应用。本文重点介绍了宏基因组学技术中关键的两类技术: 即以罗氏454及Illumina为代表的高通量测序技术和以基因芯片(GeoChip)为代表的基因芯片技术在微生物研究中的应用。测序技术可以发现新物种和新基因, 但由于测序深度有限, 定量性差, 不易发现低丰度物种, 且易受污染物干扰。芯片技术很好地克服了这些局限, 但不易于发现新基因。本文介绍了这些技术近年来在气候变化、水处理工程系统、极端环境、人体肠道、石油污染修复、生物冶金等方面取得的部分代表性成果。在此基础上, 对宏基因组技术在环境微生物研究方面的未来发展方向提出了预判和展望。我们认为由于两种技术各自的优缺点, 今后将两类技术结合起来的综合研究会越来越多。另外, 由于大量数据的处理方法已成为制约宏基因组学发展的瓶颈, 相应的生物信息学技术开发将是未来科研的热点和难点。

关键词: 宏基因组学, 生物信息学, 高通量测序, 基因芯片

Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools

Xin Sun, Ying Gao, Yunfeng Yang*

State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084

Abstract: Metagenomics is the study of microbial meta-genomes from environmental samples, which is independent on the ability to cultivate microbes in the laboratory. It provides a new way of examining the microbial world and has been widely used in microbiological research for the past decade. Sequencing-based metagenomic technology, represented by 454 and Illumina sequencing platforms, and microarray-based technology, often using GeoChip, are two of the most commonly used technologies in metagenomics. Sequencing-based technologies are capable of detecting new microbes and genes, but are limited with regard to sequence depth and quantification, and present problems of contamination when used on complex microbial communities. Microarray-based technologies are complementary to sequencing-based technologies in regard to advantages and disadvantages. They have been widely used, for example, in studies of climate change, energy, engineering, metallurgy, extreme environments and human health. However, their use in examining the extremely complex and diverse microbial world merits further technical development, with a focus on integrating both technologies and the development of appropriate bioinformatics tools.

Key words: metagenomics, bioinformatics, high-throughput sequencing, GeoChip

微生物是地球上分布最为广泛的类群, 存在于各种生境, 在物质合成、降解、碳氮等元素地球化学循环等方面具有十分重要的生态功能(Zhou *et al.*, 2010)。同时, 微生物也是一切高等生物体内不

可或缺的部分。已有的研究表明寄生在人体上的微生物广泛参与人体内消化、免疫和毒素降解等重要生理过程, 对人体健康和发育有显著影响(Backhed *et al.*, 2004)。但由于微生物个体微小、新陈代谢旺

盛、扩散能力强及易发生变异,目前人类对微生物的作用机理仍缺乏充分了解。此外,环境中可培养的微生物仅占自然界微生物的极少部分(<1–10%) (Kellenberger, 2001),而纯培养等传统的研究方法又会丢失大量有效信息,因而通过传统方法对微生物的整体情况难以获得全面和准确的了解。

1998年, Handelsman 首次提出了宏基因组 (Metagenome)概念,认为应该针对环境样品中细菌和真菌的基因组总和进行研究(Handelsman *et al.*, 1998)。宏基因组学(Metagenomics)是将环境中全部微生物的遗传信息看作一个整体,自上而下地研究微生物与自然环境或生物体之间的关系(Zengler & Palsson, 2012)。宏基因组学不仅克服了微生物难以培养的困难,而且还可以结合生物信息学的方法,揭示微生物之间、微生物与环境之间相互作用的规律,大大拓展了微生物学的研究思路与方法,为从群落结构水平上全面认识微生物的生态特征和功能开辟了新的途径。目前,微生物宏基因组学已经成为微生物研究的热点和前沿,广泛应用于气候变化、水处理工程系统、极端环境、人体肠道、石油污染修复、生物冶金等领域,取得了一系列引人瞩目的重要成果。

本文将重点介绍宏基因组学新技术的优越性,并结合最新研究成果介绍宏基因组学新技术在微生物多样性研究中的应用现状,展望未来的发展趋势和研究重点。

2 微生物检测技术

高通量测序技术和基因芯片技术作为宏基因组学最为成熟的关键技术,其全面性、准确性以及信息的深入程度都令其他传统技术无法企及(表1)。在多种高通量测序技术(也被称为第二代测序技术)中,罗氏454测序技术和Illumina测序技术是目前应用最为广泛的两项技术。罗氏454测序技术是最早得到商业化的第二代技术。基因片段的读取长度是将序列匹配到相应数据库产生基因注释的关键因素(Wommack *et al.*, 2008)。与Illumina测序读取片段相比,罗氏454测序每次运行读取的片段较长(约400碱基对) (Hugenholtz & Tyson, 2008),因此在获得微生物群落信息方面发挥了不小的作用(Smith *et al.*, 2007)。但Illumina测序因其低错误率、低成本和高通量,也明显占据优势(Hugenholtz & Tyson,

表1 高通量测序和基因芯片技术的性能比较
Table 1 Comparison of high throughput-sequencing and GeoChip technologies

方法 Technologies	高通量测序 Sequencing	基因芯片 Microarray
准确性 Accuracy	高 High	高 High
全面性 Coverage	高 High	高 High
信息深度 Depth	高 High	高 High
定量性 Quantification	低 Low	高 High
发现新物种 Detecting new species/genes	有 Yes	无 No
受污染物干扰 Interference by contaminants	高 High	低 Low
受群落主要物种干扰 Interference by abundant species	高 High	低 Low

2008; Bartram *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012)。随着Illumina测序读取长度的逐渐改善,我们预计Illumina测序技术将因其高性价比而逐步取代454测序技术,成为宏基因组学研究中应用的主流。

基因芯片是一种小型化的DNA阵列。它通过将大量DNA探针固定于固体基质的表面,产生二维DNA探针阵列;然后将荧光标记后的目标物与之杂交,通过检测杂交信号实现对生物样品高效检测及分析(邢婉丽和程京, 2004)。在环境微生物研究领域中得到应用的基因芯片主要包括功能基因芯片(GeoChip)和系统发育芯片(PhyloChip)两种。随着高通量测序技术的发展,PhyloChip已经受到功能相似的16S rDNA测序技术的冲击。但GeoChip将微生物群落的结构和功能紧密结合,与高通量测序技术相互补充,可用于对原位微生物群落功能结构和代谢功能的研究(He *et al.*, 2007; van Nostrand *et al.*, 2009; Waldron *et al.*, 2009)。最新版本的功能基因芯片GeoChip 4.0包含了83,992个寡核苷酸探针,对应于410个功能基因类别,以及包括调控碳、氮、磷、硫等物质循环在内的152,414个功能基因。

高通量测序和基因芯片等高通量宏基因组学技术为微生物研究提供了极大的数据量,如何从这些海量数据中挖掘有效信息,成为宏基因组学研究的一大难题。特别是随着高通量测序和基因芯片技术成本不断下降、通量逐渐提高、准确度越来越有保障,生物信息学(Bioinformatics)的发展将成为制约微生物研究的瓶颈(Simon & Daniel, 2011; Logares *et al.*, 2012)。生物信息学主要是通过对宏基因组数据进行模型或网络的构建,分析微生物群落内部以及微生物与环境之间相互作用的信息(Faust

& Raes, 2012)。最近, Deng等(2012)基于宏基因组学技术的高通量数据成功构建了分子生态网络(Molecular Ecological Networks, MENs), 该网络可根据数据固有特性自动选择阈值, 可较好地反映环境中微生物之间的相关性, 并且对高通量技术普遍存在的高噪音问题有很好的耐受性。

高通量测序和基因芯片技术的优缺点见表1。高通量测序准确度高, 对环境微生物群落的主要物种的识别真实、可靠, 结合先进的生物信息学方法可以发现新物种; 但其分析方法较为复杂, 并且由于通量的限制, 信息深度、定量性还不够好, 不易发现群落中丰度较低的微生物。此外, 在研究动植物体内的微生物群落时, 动植物的DNA也会被测序, 从而增加了测序成本。基因芯片则与高通量测序互补, 虽然它不能发现新基因, 但其高通量性、准确性、定量性、对环境污染的抗性、微生物基因检验的深度和效率是传统方法和高通量测序技术都无法相比的(Zhou *et al.*, 2004)。

3 宏基因组学在重要领域的近期进展

3.1 气候变化

由人类活动引起的全球气候变化问题一直备受关注。其中, 温室气体特别是CO₂浓度的上升引起的全球变暖问题尤其受到重视。气候变暖将对地球碳氮等物质循环、陆地及海洋生态系统功能等产生重大影响。同时, 地球化学物质循环(如碳、氮、磷、硫等)也是生态系统响应气候变化的关键过程, 而微生物是该循环过程的主要驱动力(Austin *et al.*, 2009)。近年来, 宏基因组学的运用为微生物对气候变化响应和反馈的研究提供了全新的视角, 并取得了相当大的进展。

例如, Danovaro等(2011)的研究表明, 海洋中病毒的结构、功能以及病毒与宿主的相互作用都受到全球气候变化的影响, 并反作用于全球气候变化和物质循环。另外, Simister等(2012)研究了珊瑚礁微生物群落对升温的响应, 发现处于生长状态的珊瑚礁上的微生物群落不受温度升高的影响, 而坏死珊瑚礁上的微生物的群落结构和组成发生了改变。上述研究结果都说明微生物群落的复杂性, 不同的种群有不同的反应机制, 因此微生物群落的结构与功能需要进一步深入探讨。

Zhou等(2012)基于功能基因芯片的长期增温实

验表明, 土壤微生物群落结构在增温条件下发生了显著改变, 分解易降解碳的基因变得活跃, 而分解难降解碳的基因并没有显著改变, 这就保证了土壤碳存储的相对稳定。通过构建微生物的分子生态学网络, Deng等(2012)发现不同气温条件下, 微生物基因在网络中扮演的角色以及相互作用规律发生了明显改变。

另外, 功能基因芯片也被用于研究CO₂浓度升高的效应。CO₂浓度升高刺激了调节重要物质循环过程基因的活性, 其中碳固定基因、易降解碳基因以及氮循环基因的数量明显增多(He *et al.*, 2010)。另一方面, He等(2012)基于系统发育芯片的实验发现, CO₂浓度升高导致微生物可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)的丰度显著增加。将上述两种芯片分别进行网络构建后发现微生物基因间的相互作用受到CO₂浓度的显著影响, 且不同CO₂浓度下发挥关键作用的特征基因和模块的核心基因均不同(Zhou *et al.*, 2010, 2011)。

3.2 水处理工程系统

对水处理系统尤其是对活性污泥中微生物群落组成和功能的研究, 不仅有助于深入了解反应器处理污染物的作用机理, 更可以指示反应器的性能, 为系统运行提供预警, 完善管理措施。

Ye等(2012)基于Illumina高通量测序的研究揭示了不同反应器中微生物整体新陈代谢路径相似, 但参与特定糖类代谢和膜运输的基因显著不同。在不同污水处理反应器和不同采样时间, 微生物的降解基因丰度和多样性有显著差异, 这一结果为监测和评估活性污泥降解有机污染物和净化废水的能力提供了重要依据(Fang *et al.*, 2013)。此外, Illumina技术的应用还包括对饮用水氯消毒的微生物研究。研究发现, 微生物群落结构显著受到氯消毒的影响, 抗性微生物和微生物的抗性基因都得到浓缩, 其中变形菌(Proteobacteria)是优势抗性微生物(Shi *et al.*, 2013)。Ye和Zhang(2013)利用罗氏454测序技术也有效揭示了活性污泥中微生物的优势种群, 为研究活性污泥中的微生物群落结构组成提供了重要信息。

总之, 宏基因组学技术为研究微生物群落结构与功能之间、工程系统功能与微生物群落功能之间的关系提供了有效手段, 极大推动了工程系统的机理研究。

3.3 极端环境

在高温、高寒、酸碱等极端环境中生活的微生物比普通环境下的微生物更难分离、培养和研究,而宏基因组学技术在极端环境微生物的研究中显示出了极大的优势。

利用高通量罗氏454测序,Chu等(2010)发现北极的微生物群落与其他地区的微生物群落没有本质不同,土壤pH值是决定微生物群落的最主要因素,而空间距离不是预测土壤多样性差异大小的可靠标准。Mackelprang等(2011)基于454测序技术的研究表明,当永久冻土随气温升高而融化时,微生物群落也随之出现迅速、明显的变化;其碳循环功能基因的变化,与永久冻土里甲烷释放等现象存在相关性。通过组装序列,他们在不分离微生物的情况下,第一次从环境中得到了一个较完整的甲烷菌的全基因组序列。而甲烷菌的分离和培养一直是技术上的难点,可见高通量的测序方法具有明显优势。

Wang等(2009)利用基因芯片对胡安·德富卡海岭的深海新发育热泉的研究表明,微生物群落组成结构在热泉的增长过程中瞬息万变,微生物群落在代谢和生理上呈高度动态变化。而且在该环境条件的成熟热泉中,细菌比古菌有更强的适应性。而Yang等(2013)对中国青藏高原高寒草甸生态系统土壤微生物群落结构的研究发现,在高寒气候放牧条件下,微生物功能基因结构发生了改变。其中,毒素降解基因、抗环境压力基因和抗生素抗性基因的丰度增加,但碳固定、碳降解以及甲烷产生和氧化的相关基因却受到了抑制。

3.4 人体肠道

人体肠道中各种微生物约有 10^{13} – 10^{14} 个,总基因组数量大概是人体基因组的100倍(Gill *et al.*, 2006b)。已有研究表明肠道微生物群落对人体健康十分重要,其群落的组成变化与肥胖症、炎症肠疾病、糖尿病都有一定的相关性(Turnbaugh *et al.*, 2006; Willing *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2012)。宏基因组学方法在肠道微生物群落研究中的应用,大大推进了人类对肠道微生物组多样性和功能方面的认识。2006年, Gill等(2006a)首先利用大规模鸟枪法测序(shotgun sequencing)分析了两名健康成年人粪便中的菌群,首次对人体肠道微生物多样性有了全方位的了解。之后,华大基因运用深度鸟枪法测序对中

国345人(171人患有II型糖尿病)的肠道细菌DNA进行分析,发现II型糖尿病患者的肠道微生物环境恶劣,表现为中度失调,其中产丁酸盐细菌丰度降低,而致病菌以及其他与还原硫酸盐和氧化应激耐受有关的微生物的功能增加(Qin *et al.*, 2012a)。基于Illumina测序技术平台,科学家们分析了来自美国和欧洲的207人的205种粪便样品,发现肠道微生物的基因差异很大,但群落核心部分组成非常稳定(Schloissnig *et al.*, 2012)。另一项运用16S rRNA 454测序技术的分析表明,人类肠道微生物组成在怀孕期和老年期会发生剧烈变化(Claesson *et al.*, 2012; Howitt & Garrett, 2012)。虽然宏基因组学方法的应用使肠道微生物研究取得了突破性的进展,但由于肠道内微生物数量庞大,且大部分无法进行纯培养,人类对其认识还很全面,因此还需要更深入的研究。

虽然目前还没有基因芯片应用于人体肠道微生物的报道,但基因芯片有大量的针对人体肠道微生物的功能基因,可以预计,如能获得适当的肠道微生物样品,基因芯片应用于肠道微生物研究不存在技术问题。事实上基因芯片有一子类型为HumChip,是专门针对人体微生物设计的。

3.5 石油污染修复

如果原油或其他石油制品在开采、炼制、贮运和使用过程中进入环境,容易造成环境污染,严重影响土壤和水的生态环境和质量,危害人类健康。目前,利用微生物降解对石油污染进行生物修复越来越受到关注,其主要思路是通过调控土壤或水体的微生物生态环境,改变微生物群落结构,以提高微生物降解石油的活性和能力。学者已开展了对石油污染的土壤或水体中微生物群落特征的研究,希望能够找到在降解污染过程中起作用的关键微生物或功能基因。

Kostka等(2011)利用高通量测序技术研究了2010年墨西哥湾石油污染事件对沿海沙滩的影响,发现石油污染对微生物群落的丰度和组成有明显的扰动,而 γ -变形菌(Gamma-proteobacteria)中的食碱菌属(*Alcanivorax*)、海杆菌属(*Marinobacter*)和 α -变形菌(Alpha-proteobacteria)中的红杆菌科(Rhodobacteraceae)中的微生物对自然清除石油污染起了关键的作用。这一结果被Dos Santos(2011)使用454测序的工作所部分证实,海细菌属(*Marinobacter*-

ium)、海杆菌属(*Marinobacter*)和解环菌属(*Cycloclasticus*)等微生物种群在石油污染的土壤中丰度增加,因此这些微生物可以用作表征石油污染的关键指示类群。

Liang等(2009b)运用基因芯片(GeoChip 2.0)技术对比了用臭氧氧化处理和生物增效降解处理石油污染的土壤中微生物群落结构特点,发现臭氧氧化处理土壤的微生物调控碳、氮、硫及有机物降解的关键功能基因多样性降低,而在生物增效处理土壤中这些基因的多样性又能够恢复。Liang等(2009b)用该项技术研究了石油污染的土壤中微生物群落结构,发现细菌、古菌和真菌所占的比例显著下降,调控碳氮固定和碳降解的功能基因丰度也下降,但与分解儿茶酚等物质相关的功能基因丰度升高(Liang *et al.*, 2009a),表明石油污染的土壤具有生物自我修复的潜力。Liang等(2011)同样利用该项技术分析了中国5个不同地区的石油污染土壤样品,发现相同地区的微生物群落结构相似,与污染程度无关,而有关碳氮循环的基因丰度与石油污染程度呈负相关。Hazen(2010)等将功能基因芯片(GeoChip 4.0)和系统发育芯片(PhyloChip)结合,研究了墨西哥湾石油污染的海水微生物群落结构功能,发现泄漏的石油刺激了深海中某些能够分解石油的微生物,其群落结构功能在石油污染40天后变化巨大,表明海洋微生物能够迅速对外界环境变化做出响应,在石油污染的生物修复过程中可能起重要的作用。进一步的研究表明,厌氧烃降解多种代谢相关的基因丰度增加,且与微生物有关的碳、氮、磷、硫和铁循环、金属抗性以及与噬菌体复制相关的功能基因丰度也都增加(Lu *et al.*, 2012)。可见,海洋本身存在的微生物在自然分解石油污染方面显示出了巨大的潜力。

3.6 生物冶金

生物冶金是利用微生物的生物浸出作用分离和提取金属的技术。它具有流程短、成本低和污染小等特点,虽然与其他方法相比效率较低,但是在低品位和复杂的矿产资源的处理中仍得到了广泛应用。

Kuang等(2013)等利用454测序研究了分布于中国华东、华南的酸性金属矿中的59个微生物群落,发现微生物群落结构组成与地理距离的远近关系不大,主要受周围环境影响。与Chu(2010)对北极微

生物群落结构的研究结果相一致的是,其中pH值是最重要的影响因素。在弱酸性环境中, β -变形菌(*Betaproteobacteria*)是主要类群,而 α -变形菌、广古菌(*Euryarchaeota*)、 γ -变形菌和硝化螺菌(*Nitrospira*)更适应强酸性环境。在高度酸性的环境中(pH 0–1),微生物群落组成非常简单(Jones *et al.*, 2012),70%以上的微生物细胞为硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*),15%为热原体目(*Thermoplasmatales*)的古菌,5%左右为酸微菌科(*Acidimicrobiaceae*)。酸微菌科(*Acidithiobacillus*)拥有Rubisco和nitrogen assimilation等功能基因,因此是一种自养型细菌。

应用基因芯片技术可以对浸矿过程微生物的群落变化进行定量分析,找到与微生物浸矿相关的功能基因,解决了浸矿微生物群落结构与功能活动不能同步检测的问题(申丽等, 2008)。此外,Xie等(2011)利用基因芯片研究了我国几个铜矿的酸矿水环境中的微生物功能基因多样性,检测到大量关键功能基因(包括碳氮降解基因等),说明在酸性环境中仍存在大量微生物。结合环境参数信息,发现微生物群落结构形成与酸矿水中金属离子浓度相关,该研究为深入了解酸矿水微生物代谢潜力提供了直接证据。目前,针对酸矿水中微生物群落结构特点已开发出一类专一性的功能基因芯片,其检测结果与微生物纯培养的特异性试验结果相比较,具有良好的特异性、灵敏性和定量性,在研究酸矿水中微生物群落结构方面有较大的潜力,有助于揭示基因与嗜酸性微生物和微生物在酸性环境群落组成之间的关系(Yin *et al.*, 2007)。

4 展望

宏基因组学在微生物研究中已经占据了重要的地位。由于高通量测序技术和基因芯片技术各有优缺点,因此结合两者同步进行研究将可得到比较全面的信息。对于高通量测序,其中的Illumina测序因其低错误率、低成本及高通量等优势,显示出了极大的发展潜力,因此在今后的工作中可优先考虑。

随着科学技术的飞速发展,大数据时代已经到来。如何进行有效的数据挖掘,成为绝大多数科研领域的核心问题。虽然基于生物信息学来构建模型和网络等方法,都已应用于微生物宏基因组学数据分析中,并取得了一定成果,但随着技术的进步,

数据量会越来越庞大。如何更快捷更深入更有效地挖掘数据, 获得尽可能准确和丰富的信息, 是当前面临的巨大挑战。

宏基因组学技术在不远的将来有望进一步优化。如 454 焦磷酸测序的通量需要进一步提高, Illumina 的片段读取长度需要进一步加长, 基因芯片的假阳性问题也需要克服。随着这些技术的发展, 环境微生物学已逐步从生物学领域延伸到包括生物、环境、地理、统计、计算机、自动化等在内的多个学科。因此需要多学科领域的研究人员展开更广泛、更深入的合作; 同时, 也需要科研人员具备多种学科的相关知识, 这对宏基因组学的研究人员来说是珍贵的机遇也是巨大的挑战。同时, 这些困难和挑战也是推动该领域技术和理论发展的动力, 在其推动下, 微生物世界的神秘面纱将会被人类慢慢揭开。

参考文献

- Austin EE, Castro HF, Sides KE, Schadt CW, Classen AT (2009) Assessment of 10 years of CO₂ fumigation on soil microbial communities and function in a sweetgum plantation. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 514–520.
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **101**, 15718–15723.
- Bartram AK, Lynch MD, Stearns JC, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD (2011) Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 3846–3852.
- Chu H, Fierer N, Lauber CL, Caporaso J, Knight R, Grogan P (2010) Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, **12**, 2998–3006.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HMB, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, **488**, 178–184.
- Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'anno A, Fuhrman JA, Middelburg JJ, Noble RT, Suttle CA (2011) Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiology Review*, **35**, 993–1034.
- Deng Y, Jiang YH, Yang Y, He Z, Luo F, Zhou J (2012) Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics*, **13**, 113.
- Dos Santos HF, Cury JC, Do Carmo FL, Dos Santos AL, Tiedje J, van Elsas JD, Rosado AS, Peixoto RS (2011) Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PLoS ONE*, **6**, e16943.
- Fang H, Cai L, Yu Y, Zhang T (2013) Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresource Technology*, **129**, 209–218.
- Faust K, Raes J (2012) Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 538–550.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE (2006a) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, **5**, R245–R249.
- Hazen TC, Dubinsky EA, DeSantis TZ, Andersen GL, Piceno YM, Singh N, Jansson JK, Probst A, Borglin SE, Fortney JL (2010) Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, **330**, 204–208.
- He Z, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC, Huang Z, Wu W, Gu B, Jardine P, Criddle C, Zhou J (2007) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *The ISME Journal*, **1**, 67–77.
- He ZL, Piceno Y, Deng Y, Xu MY, Lu ZM, Desantis T, Andersen G, Hobbie SE, Reich PB, Zhou JZ (2012) The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME Journal*, **6**, 259–272.
- He ZL, Xu MY, Deng Y, Kang SD, Kellogg L, Wu LY, van Nostrand JD, Hobbie SE, Reich PB, Zhou J (2010) Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO₂. *Ecology Letters*, **13**, 564–575.
- Howitt MR, Garrett WS (2012) A complex microworld in the gut: gut microbiota and cardiovascular disease connectivity. *Nature Medicine*, **18**, 1188–1189.
- Hugenholtz P, Tyson GW (2008) Microbiology: metagenomics. *Nature*, **455**, 481–483.
- Jones DS, Albrecht HL, Dawson KS, Schaperdorth I, Freeman KH, Pi Y, Pearson A, Macalady JL (2012) Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *The ISME Journal*, **6**, 158–170.
- Kellenberger E (2001) Exploring the unknown—The silent revolution of microbiology. *EMBO Reports*, **2**, 5–7.
- Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, Green SJ, Freyer G, Canion A, Delgadito J, Norton N, Hazen TC, Huettel M (2011) Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 7962–7974.
- Kuang JL, Huang LN, Chen LX, Hua ZS, Li SJ, Hu M, Li JT, Shu WS (2013) Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *The ISME Journal*, **7**, 1038–1050.

- Liang Y, Li G, Van Nostrand JD, He Z, Wu L, Deng Y, Zhang X, Zhou J (2009a) Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. *FEMS Microbiology Ecology*, **70**, 324–333.
- Liang Y, Nostrand JDV, Wang J, Zhang X, Zhou J, Li G (2009b) Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil. *Chemosphere*, **75**, 193–199.
- Liang Y, Van Nostrand JD, Deng Y, He Z, Wu L, Zhang X, Li G, Zhou J (2011) Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China. *The ISME Journal*, **5**, 403–413.
- Logares R, Haverkamp THA, Kumar S, Lanzén A, Nederbragt AJ, Quince C, Kauserud H (2012). Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *Journal of Microbiological Methods*, **91**, 106–113.
- Lu Z, Deng Y, Van Nostrand JD, He Z, Voordeckers J, Zhou A, Lee Y-J, Mason OU, Dubinsky EA, Chavarria KL, Tom LM, Fortney JL, Lamendella R, Jansson JK, D'Haeseleer P, Hazen TC, Zhou J (2012) Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *The ISME Journal*, **6**, 451–460.
- Luo CW, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT (2012) Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS ONE*, **7**, e30087.
- Mackelprang R, Waldrop MP, DeAngelis KM, David MM, Chavarria KL, Blazewicz SJ, Rubin EM, Jansson JK (2011) Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, **480**, 368–371.
- Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto J-M, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, **490**, 55–60.
- Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K, Sunyaev SR, Weinstock GM, Bork P (2013) Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*, **493**, 45–50.
- Shen L (申丽), Liu XD (刘学端), Qiu GZ (邱冠周) (2008) 16S rDNA based microbial diversity analysis of eleven acid mine drainages obtained from three Chinese copper mines. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), **24**, 968–974. (in Chinese with English abstract)
- Shi P, Jia S, Zhang X, Zhang T, Cheng S, Li A (2013) Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Research*, **47**, 111–120.
- Simister R, Taylor MW, Tsai P, Fan L, Bruxner TJ, Crowe ML, Webster N (2012) Thermal stress responses in the bacterial biosphere of the Great Barrier Reef sponge, *Rhopaloeides odorabile*. *Environmental Microbiology*, **14**, 3232–3246.
- Simon C, Daniel R (2011) Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 1153–1161.
- Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, Mekalanos JJ, Ornston LN, Gerstein M, Snyder M (2007) New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development*, **21**, 601–614.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027–1031.
- Van Nostrand JD, Wu W-M, Wu L, Deng Y, Carley J, Carroll S, He Z, Gu B, Luo J, Criddle CS, Watson DB, Jardine PM, Marsh TL, Tiedje JM, Hazen TC, Zhou J (2009) GeoChip-based analysis of functional microbial communities during the reoxidation of a bio-reduced uranium-contaminated aquifer. *Environmental Microbiology*, **11**, 2611–2626.
- Waldron PJ, Wu L, Van Nostrand JD, Schadt CW, He Z, Watson DB, Jardine PM, Palumbo AV, Hazen TC, Zhou J (2009) Functional gene array-based analysis of microbial community structure in groundwaters with a gradient of contaminant levels. *Environmental Science & Technology*, **43**, 3529–3534.
- Wang F, Zhou H, Meng J, Peng X, Jiang L, Sun P, Zhang C, Van Nostrand JD, Deng Y, He Z, Wu L, Zhou J, Xiao X (2009) GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **106**, 4840–4845.
- Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, Järnerot G, Tysk C, Jansson JK, Engstrand L (2010) A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*, **139**, 1844–1854. e1.
- Wommack KE, Bhavsar J, Ravel J (2008) Metagenomics: read length matters. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 1453–1463.
- Xie J, He Z, Liu X, Liu X, Van Nostrand JD, Deng Y, Wu L, Zhou J, Qiu G (2011) GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 991–999.
- Xing WL (邢婉丽), Cheng J (程京) (2004) *Biochip Technology* (生物芯片技术). Tsinghua University Press, Beijing. (in Chinese)
- Yang Y, Wu L, Lin Q, Yuan M, Xu D, Yu H, Hu Y, Duan J, Li

- X, He Z, Xue K, Van Nostrand JD, Wang S, Zhou J (2013) Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland. *Global Change Biology*, **19**, 637–648.
- Ye L, Zhang T (2013) Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 2681–2690.
- Ye L, Zhang T, Wang T, Fang Z (2012) Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environmental Science & Technology*, **46**, 13244–13252.
- Yin H, Cao L, Qiu G, Wang D, Kellogg L, Zhou J, Dai Z, Liu X (2007) Development and evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in Acid Mine Drainages and bioleaching systems. *Journal of Microbiological Methods*, **70**, 165–178.
- Zengler K, Palsson BO (2012) A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nature Reviews. Microbiology*, **10**, 366–372.
- Zhou J, Deng Y, Luo F, He Z, Tu Q, Zhi X (2010) Functional molecular ecological networks. *mBio*, **1**, e00169–10.
- Zhou J, Deng Y, Luo F, He Z, Yang Y (2011) Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂. *MBio*, **2**, e00122–11
- Zhou J, Thompson DK, Xu Y, Tiedje JM (2004) *Microbial Functional Genomics*. Wiley-Liss, New York.
- Zhou J, Xue K, Xie J, Deng Y, Wu L, Cheng X, Fei S, Deng S, He Z, Van Nostrand JD, Luo Y (2012) Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming. *Nature Climate Change*, **2**, 106–110.

(责任编辑: 贺纪正 责任编辑: 周玉荣)