

环境微生物组多样性及功能研究进展*

吴波¹, 冯凯^{2,3}, 职晓阳⁴, 何强^{1,5}, 许玫英⁶, 邓晔², 肖凡书¹,
汪善全¹, 于玲¹, 鲁祺鸿¹, 连英丽¹, 罗丽娟⁷, 原珂⁸, 陈保卫⁸,
颜庆云¹, 仇荣亮¹, 栾天罡⁷, 贺志理^{1,9}

- (1. 中山大学环境科学与工程学院环境微生物组研究中心, 广东 广州 510006;
2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085;
3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 云南大学生命科学学院微生物研究所, 云南 昆明 650091;
5. 田纳西大学城市与环境工程系及环境生物技术研究中心, 田纳西 诺克斯维尔 37996;
6. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070;
7. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;
8. 中山大学海洋科学学院, 广东 广州 510275;
9. 俄克拉荷马大学环境基因组学研究所, 俄克拉荷马 诺曼 73019)

摘要: 快速发展的测序技术和各种高通量手段使我们能够深入探索环境微生物的多样性及其功能。本文中提及的环境微生物组 (environmental microbiome) 界定为特定环境中所有微生物基因组的集合。环境微生物组研究的主要目的是解读特定环境中微生物的多样性、结构、功能、相互作用和进化, 以及它们与环境因子和生态系统功能之间的关系等。本文重点关注土壤、水体及空气中的微生物组研究, 回顾了目前的高通量测序技术和主要的环境微生物组学数据分析工具, 然后综述了不同的生态环境中微生物组研究的主要的进展, 最后, 提出了环境微生物组研究中的关键科学问题, 并突出了在未来环境微生物组研究中微生物功能和生态机制的重要性。

关键词: 环境微生物组; 微生物功能; 宏基因组; 生物信息学工具

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2017) 05-0001-11

Progresses in environmental microbiome diversity and function research

WU Bo¹, FENG Kai^{2,3}, ZHI Xiaoyang⁴, HE Qiang^{1,5}, XU Meiyang⁶, DENG Ye²,
XIAO Fanshu¹, WANG Shanquan¹, YU Ling¹, LU Qihong¹, LIAN Yingli¹, LUO Lijuan⁷,
YUAN Ke⁸, CHEN Baowei⁸, YAN Qingyun¹, QIU Rongliang¹, LUAN Tiangang⁷, HE Zhili^{1,9}

- (1. Environmental Microbiome Research Center and the School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;
2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
4. Yunnan Institute of Microbiology, School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China;

* 收稿日期: 2017-07-18

基金项目: 中山大学千人计划项目 (38000-18821105); 中山大学百人计划项目 (38000-18821107)

作者简介: 吴波 (1986年生), 女; 研究方向: 微生物生态; E-mail: wubo28@mail.sysu.edu.cn

冯凯 (1992年生), 男; 研究方向: 微生物生态和生物信息; E-mail: kaifeng_st@rcees.ac.cn

(以上2人并列第1作者)

通信作者: 贺志理 (1965年生), 男; 研究方向: 微生物组学; E-mail: hezhili@mail.sysu.edu.cn

5. Department of Civil and Environmental Engineering, The University of Tennessee, Knoxville, TN, 37996, USA;
6. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;
7. School of Marine Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
8. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
9. Institute for Environmental Genomics, University of Oklahoma, Norman, OK, 73019, USA)

Abstract: Currently developed sequencing and other high throughput technologies enable us to explore the role of microorganisms in the environment. Here environmental microbiome is defined as the collection of microbial genomes in a particular environment, and the environmental microbiome research (or environmental microbiomics) aims to understand the biodiversity, composition, structure, function, interaction, evolution and dynamics of microbial communities as well as their linkages with environmental drivers and ecosystem functioning. This review is focused on environmental microbiomes from soil, water and air. Firstly, the current advanced sequencing technologies and associated tools for environmental microbiome data analysis are reviewed, then the current research progress in environmental microbiomes were summarized with foci on addressing key scientific questions in microbial ecology and environmental science. This review proposes key scientific questions, and highlights the importance of our understanding of microbial functions and underlying mechanisms in future environmental microbiome studies.

Key words: environmental microbiomes; microbial function; metagenome sequencing; bioinformatics tools

微生物广泛分布于我们生活的环境甚至是极端环境中,且在全球生产力、人类健康、生物地球化学循环(如碳、氮、磷、硫、金属等)、食品和生物资源、以及环境污染物修复等方面发挥着重要的作用。研究表明,土壤微生物能帮助植物抵抗疾病、促进生长、增强抗逆性和影响作物的产量及质量等^[1-5]。

微生物通常分为 3 大类:细菌,古菌和真核生物,其个体大小差异非常大,从 0.2 μm 到 200 μm 不等,是公认的多样性最高的生物类群。但是因为检测限的制约,使得稀有微生物多样性的检测受到了极大的挑战^[6]。最近,基于 35 000 个样地的高通量分子数据,通过相似律结合对数正态模型预测全球微生物大概有 10^{12} 种,但目前只有 0.001% 的种类被鉴定^[7]。在此,“微生物组”指的是特定环境中的微生物基因组的集合,包括主体相关的生态系统,而“微生物群”是指微生物的集合。环境微生物组学是指分析各种环境中的微生物基因组信息,包括自然环境(如土壤、沉积物、水和空气)和人工环境(如生物反应器、建筑)。环境微生物组研究的目的是理解微生物群落的多样性、结构、功能、相互作用、动态演化等及其与环境因素和生态系统功能的关系。

相对于人类、动物和植物微生物组,环境微生物

组研究面临着更多的挑战。第一,环境微生物的多样性和丰度特别高,它们交织在一起形成极为复杂的关系网。1 g 土壤可能含有数以百万计的微生物种类^[8-9];全球海底沉积微生物丰度约为 2.9×10^{29} 个细胞^[10]。因此,表征多样性极高的微生物群体仍然是一个非常艰巨的任务。其次,大部分(>99%)的微生物还无法培养^[7,11],所以研究它们在环境中的功能更加困难。第三,由于环境变化,微生物会快速的适应和进化,产生了时间变化和生物地理学的动态模式。此外,只有少部分的环境微生物被测序作为参考基因组,这限制了对微生物在环境中的功能作用和潜在机制的了解。

本文重点关注土壤、水体和空气环境中的微生物组,并回顾了目前环境微生物组学技术的发展。我们也提出了要解决的关键科学问题,突出了在未来环境微生物组研究中对微生物功能、相互作用和潜在机制的理解。

1 环境微生物组研究中测序技术及生物信息学工具的发展历程

高通量测序技术的发展对我们探索微生物多样性、组成、功能、作用和演变等基本问题至关重要。同时,生物信息学工具的开发在解析和理解这些由高通量测序产生的海量数据中具有不可或缺的

作用。因此，我们首先回顾了当前的测序技术和与环境微生物组学分析相关的生物信息学工具。

1.1 测序技术

测序技术已发展到第 3 代：包括第 1 代传统的 Sanger 测序、第 2 代高通量测序、第 3 代单分子测序。目前，第 2 代测序技术，尤其是 Illumina 平台（例如，Miseq, Hiseq, Hiseq X, Moleculo, NovaSeq 等）对于环境微生物组学研究有许多优点，具有通量高、错误率和成本低等特征^[12-13]。Illumina 测序平台具有能获得不同测序读长和通量的测序仪，例如，Moleculo 能够产生更长的读长（> 8 kb）^[14]。

单分子测序技术的开发为微生物的研究提供了更便利的条件。由于不需进行 DNA 扩增，因此极大地提高了测序精度，降低了错误率^[12]。目前，最广泛使用的是太平洋生物科学公司（PacBio）基于单分子实时（SMRT）测序技术的平台^[15]，这种测序方法取决于 DNA 聚合酶和零模波导孔所指示的光能。PacBio 测序仪能在很短的时间内产生长达 10 ~ 25 kb 的读长，并且能检测 DNA 的甲基化修饰^[16]。另外一种有前景的单分子测序由牛津纳米科技公司（Oxford Nanopore Technologies）开发的纳米孔测序，其中单个 DNA 分子在通过纳米孔时被直接测序^[17]。虽然 PacBio 和纳米孔测序技术都可以检测 DNA 修饰碱基^[17]，但是都存在测序通量低，测序错误率高的问题^[13]，从而限制了它们的环境微生物组研究中的应用。而当单分子测序技术和第二代测序技术结合使用时，Tsai 等^[18]能够检测微生物的单核苷酸多态性水平的变化，表明这种结合使用的方法将成为环境微生物组研究中进行宏基因组定量、重建以及功能注释的强有力手段。

1.2 环境微生物数据分析工具

通常环境微生物研究可以产生两种类型的数据：扩增子及鸟枪法宏基因组/宏转录组测序数据。由于它们的分析方法不同，因此相应地开发了多种数据分析工具。

1.2.1 扩增子测序数据 系统发育和功能性标记基因对于探索环境微生物的分类学、系统发育以及种群多样性及其功能具有重要意义。系统进化分子标记基因中，用于标记细菌和古细菌的 16S rRNA 基因^[19]及用于真菌的核糖体 DNA 内转录间隔区（ITS）^[20]最为常见，因此针对系统发育标记基因扩增产物的分析开发出了许多生物信息学工具（例如，QIIME、Mothur）。

功能基因扩增子测序可以提供与微生物群落功

能直接相关的信息，例如 *nifH* 基因与固氮菌^[21]，及 *amoA* 基因与硝化细菌^[22]功能的相关性，而这些在系统发育基因中的研究较少。功能基因扩增子分析与基于系统发育标记的分析类似，但功能基因扩增子分析需要额外的步骤进行移码校正来预测蛋白质编码区，并与相应的功能基因数据库比对以获得相应的功能信息。但如果没有对应的功能基因数据库，就需要为每个功能基因家族构建一个数据库。值得关注的是，FunGene 提供多种功能基因数据库，涉及多种生态途径（如 C、N 循环）以及集成功能基因分析工具，如 mcClust, RDPTools 及 FrameBot^[23]。值得一提的是，其中的一些具体算法和工具，如 PICRUSt, Tax4Fun, FAPROTAX, FUNGuild 及 PAPERICA 可通过系统发育标记基因序列推断微生物功能特征。

1.2.2 鸟枪法宏基因组及宏转录组测序数据 鸟枪法宏基因组及宏转录组测序数据确保了信息从遗传物质到功能角度的传递，并为探索所有遗传要素及其在环境中的动态提供了可能^[24]。通常宏基因组测序数据分析包括基于读长的分析和基于组装的分析。基于读长的分析包括以下 5 个步骤：① 对原始读长进行预处理；② 将序列比对到分类群；③ 基因预测；④ 功能基因注释；⑤ 丰度计算及统计分析。基于组装的分析与基于读长的分析类似，除了在基因预测之前需要使用多种组装方法将短的原始读长组装成更长的片段，组装方法包括基于参考序列的组装和从头组装。

由于对计算资源的高度要求，基于宏基因组测序数据的组装分析一般是以网络为基础的工作流程^[25]。目前，常用的宏基因组分析工具/流程是 MEGAN^[26]，MG-RAST^[27]，IMG/M^[28] 和 CAMERA^[29]。最近开发的 MEGAN CE 可用于大规模的微生物测序数据分析，是 MEGAN 的更新版本^[30]。MEGAN CE 结合了 DIAMOND^[31] 与 MganServer，具有大规模鸟枪法宏基因组测序数据分析的能力^[30]。MG-RAST^[27] 使用 SEED 子系统^[32] 对宏基因组测序数据分析，包含了公共宏基因组数据的注释。IMG/M^[28] 使用多个能在微生物宏基因组深入分析时使用的参考数据库（如 IGM 系统的基因组）以进行宏基因组测序数据的注释。CAMERA^[29] 包含大规模数据库及多种注释工具，最近已被纳入 QIIME^[33]。

由于宏基因组测序数据分析需要大量的计算机资源并且非常耗时，多种通过宏基因组测序数据进行微生物种群检测或鉴定的算法或方法已被开发。

GSMer 是一个新的基于 k-mer 的方法, 其利用现有微生物基因组特异标记 (genome-specific markers, GSMS) 从菌株/物种水平对原始宏基因组测序数据进行标识^[34]。潜在菌株分析 (latent strain analysis, LSA) 可以检测宏基因组测序数据集中的菌株并识别低丰度的菌株 (相对丰度小于 0.000 01%)^[35]。ConStrains 采用单核苷酸多态性模式, 从宏基因组测序数据中识别同种细菌菌株, 并重建这些物种的亲缘关系^[36]。这些方法的发展提供了对宏基因组测序数据的快速、高分辨分析的替代手段, 进一步提高我们对微生物群落及其在环境中功能的认识。

宏转录组测序数据分析也有与宏基因组测序数据分析类似的步骤和工具, 但仍需要特殊的组装及 rRNA 去除步骤及工具。宏转录组测序数据的组装工具是基于 de Bruijn 图形开发用于从头组装, 例如 TAG^[37], IDBA - MT^[38], Trinity^[39] 及 Oases^[40]。由于参照宏基因组碎片化, TAG 有更多的转录组丢失风险^[37]。IDBA - MT^[38] 是一种从头组装方法, 又进一步发展为 IDBA - MTP^[41], 通过利用已知的蛋白数据库及相应的核苷酸序列, 来进行宏转录组的组装, 从而有效的组装 mRNAs。从鸟枪法宏转录组测序数据去除 rRNA 的工具在有或没有任何参考数据库的情况下开发。riboPicker^[42] 及 rRNASelector^[43] 都可以从宏转录组序列中选择并去除 rRNA, 而 rRNAFilter^[44] 可用在没有任何参考序列的情况下去除 rRNA 读长。此外, SortMeRNA 可以识别 mRNA 和 rRNA, 从宏转录组测序数据集中快速过滤、去除 rRNA 基因片段^[45]。对于其他类型的 RNA, 例如非编码 RNA 以及小分子 RNA (sRNA)^[46], INFERNAL^[47] 能够依靠 Rfam 数据库搜索 RNA 结构^[48], 对已知的 sRNA 进行分配和进一步功能注释, 这与通过对多种数据库进行比較的宏基因组测序数据分析类似。BioBakery 是其中一种宏转录组测序数据分析综合流程, SAMSA^[49] 是近年开发的宏转录组测序数据综合分析工具。

用于扩增子、宏基因组及宏转录组测序数据分析的生物信息学工具的发展, 使我们能够表征环境微生物, 并探究它们的多样性及其在环境中的功能作用。这样的数据集在大小和样本数量上不断增加, 因此需要更加快速、高效、自动、准确及强大的生物信息工具与流程, 这将带领环境微生物的研究进入一个新纪元。

2 环境微生物研究进展

测序技术、组学技术以及数据处理技术的发

展, 逐渐打破了环境微生物组研究中的技术瓶颈。在此, 我们对具有代表性的生境中的微生物组研究进行了归纳总结, 包括土壤 (农田、草地、森林、苔原)、水体 (海洋和淡水) 以及空气微生物组。这些研究在环境微生物的多样性、组成、功能、相互作用、进化、演替以及环境生态功能等方面均有新的突破和见解。

2.1 土壤微生物组

土壤中的微生物多样性极高, 据估计每克土壤有 10^9 个微生物^[9], 隶属 10^4 个不同的物种^[50]。土壤微生物在地球化学循环过程中扮演着重要的角色^[11], 同时也是生态系统的维护者, 如维持植物生产力^[1]、实现污染物的生物修复^[51]等。已有研究证明生物多样性是影响生态系统功能的主要因素^[52-54]。但是, 以往大部分的研究主要通过分析 16S rRNA 和 ITS 基因来研究微生物的群落结构, 而无法提供重要的功能信息。

宏基因组学方法 (shotgun sequencing) 则弥补上述缺陷, 为我们提供微生物的功能信息。最近有研究利用宏基因组学的方法揭示了氮代谢途径与生境类型、土壤碳、氮含量显著相关, 同时, 该研究有效的将物种与功能联系起来, 指出在土壤中, 一些 δ -变形菌 (δ -Proteobacteria) 具有完整的氮代谢途径, 而参与氮循环的蓝细菌 (Cyanobacteria) 则只含有一些特定的氮代谢的途径^[55]。本文将重点介绍近年来来自农田、草原、森林、苔原等生境中土壤微生物组研究进展, 尤其是应用了宏基因组和宏转录组学方法的研究。

2.1.1 农田 作物相关微生物被认为是作物的第二基因组, 其对农作物的健康和产量有着至关重要的作用。研究表明, 使用 PhyloChip 研究抑病土壤的微生物群落, 发现土壤微生物中 γ -变形菌 (γ -Proteobacteria) 通过非核糖体肽合酶介导的抑制真菌的代谢途径与农作物病害抑制率密切相关^[56]。另外, 有关大豆根际微生物群落分类和功能的研究表明, 生境选择 (niche-based selection) 主导了微生物群落的组成^[57]。同时, 通过宏转录组的方法研究大豆根系微生物对高浓度的 CO_2 和 O_3 的响应, 发现碳、氮循环中的关键基因的表达被高含量的 CO_2 刺激上调, 而被 O_3 刺激下调, 从而揭示了土壤微生物应对全球气候变化的潜在机制^[58]。这些研究都表明组学方法在揭示土壤微生物在维持植物健康和应对环境变化的研究中是一个有利的工具。

2.1.2 草地 全球约有 40% 的土地面积被草地所

覆盖^[59]。草地在生物地球化学循环中起着重要的作用，草地土壤微生物对环境及气候变化的响应成为研究热点^[60-63]。英国洛桑研究所通过宏基因组分析公园草地中的土壤微生物发现，其功能变化受季节及垂直距离的影响异常地低。同时也发现，碳代谢相关基因的丰度最高，cAMP 信号因子、Ton 和 Tol 转运系统等的表达量高^[64]。

为了洞悉草地对全球气候变化的相应，研究者在加温 2 °C 长达 10 年的草地土壤中，分析了微生物的宏基因组数据，发现碳、氮循环的关键代谢途径（如纤维所降解、反硝化等）在加温条件下被显著性富集^[65]。另一组学研究调查了长期高含量 CO₂ 对草地土壤微生物组成及其功能的影响，研究表明高含量的 CO₂ 提高了有机物降解途径、异化硝酸盐还原、氮固定中关键基因的丰度，而谷氨酰胺合成和厌氧氨氧化途径的关键基因则降低了^[66]。总之，草地土壤微生物的功能特性在研究草地生态功能及草地应对环境变化过程中有着十分重要的指示作用。

2.1.3 森林 森林生态系统是复杂且差异性大的陆地生境之一，为地球碳循环和生物多样性的维持提供了重要的生态作用^[67-68]。森林土壤微生物对森林生态系统的地球元素循环有着重要作用^[69-70]。有研究利用宏基因组学分析方法发现人为扰动对森林土壤微生物功能特性有着显著性的影响，降低了木质素、纤维素、半纤维素和果胶降解相关功能基因的丰度^[71]。而利用宏转录组方法分析加氮肥对森林土壤微生物影响发现，氮的添加会引起碳代谢途径中酶的过表达但不会影响群落结构和生物量的变化^[72]。此外，通过系统发育和功能基因的研究发现，重金属污染会显著影响森林土壤微生物的群落结构，但该研究也证实了森林土壤微生物在重金属污染压力下的恢复性，验证了金属浓度与金属抗性基因之间的关系，以此阐明了微生物功能分析的重要性^[73]。利用宏基因组学研究森林土壤微生物中编码卤化和脱卤酶这类特异性的功能基因表明，森林土壤微生物中涉及卤素循环基因多样性高，且发现了多种非特异性脱卤以及协同脱卤基因，表明了自然脱卤的稳健性^[70]。以上研究表明，森林土壤微生物有多种多样的已知和未知新型的功能，包括营养循环、生物修复和其他生态系统功能。

2.1.4 苔原 苔原土壤主要分布在在北极圈和高山（高山林线以上），是一类没有树木生长的生境^[74]。其土壤层作为永久冻土带，储存了含量巨大的碳元素^[75]。由于气候变暖以及冻土解冻，逐

渐升高的地表温度影响着微生物的活性和相关的地球元素循环^[76-78]。最近，越来越多的宏基因组学研究手段应用于苔原微生物组学的研究。例如，对短时（1 周）冻土解冻的苔原土壤微生物进行的深度测序，研究表明碳氮循环相关基因，尤其是涉及甲烷代谢的相关基因发生了快速的响应^[79]。而且，多组学研究手段包含 16S rRNA 扩增子测序，宏基因组以及宏转录组测序被用于分析不同冻土（完整的冻土，季节融化的活性层，和热融沼泽）的微生物组，检测其分类组成、功能活性的变化，结果展示了不同代谢（在沼泽中甲烷合成）速率和代谢相关的组学数据良好的相关性，而在冻融活性层则发现了大量的冷激蛋白以及趋化、运动相关的蛋白的基因^[80]。这些有关苔原的研究阐明了冻土微生物组对全球气候变化的快速响应，但也表明不同的功能微生物菌群在不同的时间和空间上响应均有差异。因此，以上的研究有助于我们预测未来全球变暖对苔原生态功能的影响。

2.2 水体微生物组

微生物广泛分布于各类水环境，并在生物地球化学过程中扮演着重要的角色，包括水生生态系统的营养循环和能量流动^[81]。水体生态系统中的浮游细菌是地球上最广泛分布的一类微生物^[82]，如 1 mL 表层海水中包含了 10⁴ ~ 10⁶ 个细菌^[83]，全球海洋中的浮游细菌总数 > 3.1 × 10²⁸^[82]。它们不仅在表层水中比较常见，而且在深海海底也有广泛的分布^[84]，被认为是海洋 C、N 和 S 循环的引擎^[85]。越来越多的研究发现这些生物地球化学过程是由环境中所有的成员（即群落）发生复杂交互作用引起的，而非由特定的某些物种引起^[86]。因此，在群落水平上研究水体微生物群落是非常必要的，这样我们才可以对生态系统功能有一个比较全面的认识。

2.2.1 海洋 有研究提出海洋微生物的种类是无处不在的^[87-88]，但是近来越来越多的研究认为浮游微生物群落的分布主要基于生态位过程的影响，如发现某些物种只分布在一些特定的区域^[89-90]。此外，海洋中的细菌群落可反复出现特定的格局表明微生物群落和组成能够通过环境参数来进行预测^[91]。有些环境因子，如盐度^[92]、温度^[93]能够显著影响浮游细菌的组成。值得一提的是，最近发现海洋生态系统中浮游细菌在长时间尺度会随环境的周期性改变而重复演替^[94-95]。

虽然仍有不足，但是近期已经使用宏基因组学、宏转录组学和单细胞测序等技术证明海洋微生

物群落的功能特征。例如, 基于单细胞基因组学对来自海洋“微生物暗物质”的 201 株野生古菌和细菌进行的单细胞测序, 揭露出野生古菌和细菌细胞令人意想不到的代谢特征^[96-97]。利用宏基因组技术检测红海微生物群落的过量表达 (over-representation) 基因表明海洋微生物群落能获得特定的环境适应性^[98]。对采自 Tara 海 243 个样品的宏基因组测序数据分析显示, 73% 以上的海洋微生物与人类消化道菌群具有同样的功能^[99]。一项最近针对红海微生物的宏基因组研究表明, 只有功能协变模式不会随着环境梯度的改变而改变, 但是大多数的变化都是由温度的改变导致的^[100]。

2.2.2 淡水 淡水通常被定义为溶解盐小于 1 000 mg/L 的天然水体^[101], 包括湖水、河水和地下水等。单细胞基因组学和宏基因组学测序分析显示, 淡水湖泊中好氧的化能自养菌比以前的预测更加普遍^[102]。这些研究也为种群间的基因迁移和视紫红质基因重组提供了证据。宏基因组测序发现已知同源物微囊藻毒素 - 降解基因并没有过多表达, 但是生物异源物质代谢的基因在微囊藻毒素 - 修正生态中过量表达^[103], 表明异生基因在微囊藻毒素降解中非常重要。

宏基因组测序和基于功能推理的方法发现“核心功能特性 (core functional traits)”在密西西比河中是保守的^[104]。利用宏基因组和转录组对哥伦比亚河不同盐度的水样品进行测序发现, 宏基因组中的功能基因表达谱是非常类似的, 但是与转录组相关的基因表达谱随着河水盐度梯度的变化而高度变异^[105]。在时间尺度上, 通过对河水微生物群落的研究, 发现在水质不好的环境中营养代谢菌和噬菌体大量存在, 主要是因为农田径流增加^[106]。在空间上, 涉及 N 循环的大量功能基因被检测到沿着河流有明显的变化^[107]。

地下水是另一种重要的淡水资源, 受到了人类活动的威胁, 包括工业副产物、农业径流和人类/动物粪便的污染^[108]。近年来淡水微生物群落受环境扰动的响应逐渐成为研究的热点^[108-110]。宏基因组的比较分析表明受到污染的淡水微生物群落比未受污染的淡水微生物群落更脆弱, 功能也衰退, 从而营养循环和适应性减弱^[108]。Hemme 等^[111]还发现淡水微生物群落在进化过程中受到重金属污染时会发生基因水平转移。

2.3 大气微生物组

大气环境中的微生物在物种多样性及丰度 (如 25.6 ~ 124.4 cfu/m³)^[112]上都远低于土壤及水

环境。但大气微生物组不仅对大气过程有显著影响, 而且对大气物理、化学及气候变化等都具有重要作用^[113]。此外, 大气微生物组对人类健康、农业生产力和生态系统稳定性也极其重要^[114]。然而, 目前对于大气微生物组的研究还处于起步阶段, 主要集中在对于室内空气微生物的研究方面^[115]。

截至目前, 关于大气微生物的研究主要是针对住所、办公区、教室、医院、公共休息室、博物馆和地铁等环境的调查。通常, 建筑内部的空气微生物主要来自人类、宠物、植物、城市管道系统、供暖/通风/空调系统、霉菌和灰尘重悬浮以及室外空气^[116]。尽管微生物组成随着地理位置、季节、用途和样品基质 (是否接近表面) 发生改变, 但是这些建筑环境中丰度最高的通常是变形菌门、厚壁菌门和放线菌门^[115]。将建筑周围空气中的微生物组与居住者携带的微生物组进行对比分析, 发现建筑周围的空气是建筑环境中微生物组的主要来源, 而居住者皮肤携带的微生物组也是重要来源但其贡献相对较小。

然而空气流通、潮湿以及其他因素也可能对大气微生物组产生重要影响, 但很少有研究系统探讨这些机制对微生物多样性、组成及功能的影响。因此, 需要开展相关工作, 以评价这些机制在大气环境中微生物组形成中的重要性。而大气环境微生物组如何影响人类健康则是另一个值得关注的科学问题。尽管有许多研究对空气环境中微生物的 16S rRNA 基因进行了测序分析, 但关于大气环境中微生物功能和活性的信息却很少, 导致我们很难评估建筑周围空气中微生物对人类健康的潜在影响。近期, 一种针对宏基因组测序的大气微生物 DNA 提取方法被开发出来, 在一定程度上缓解了大气环境微生物的生物量过低导致研究难以开展的问题^[117]。

3 展 望

多组学技术的发展, 如 DNA 和 RNA 测序技术、蛋白和代谢谱分析、功能基因矩阵等提高了我们分析环境微生物的能力。随着计算工具、统计和建模手段的发展, 研究人员在过去 10 年取得了前文所述各项重要进展。然而, 大部分研究都集中在不同地点环境微生物组的生物多样性, 及其对环境波动 (特别是全球变化和环境污染) 和时空变化的响应方面, 但很少有针对环境微生物组的功能、代谢活性、相互作用、进化和潜在机制的研究。未

来我们在解决微生物生态学和环境科学方面的实际问题时必须重视以下6个方面的研究内容：①微生物组在环境中的功能是什么？②环境微生物多样性及功能的形成和维持的机制是什么？③微生物群落中的各微生物如何相互作用？④关键微生物、优势和稀有物种在生态系统稳定性和生产力中扮演怎样的角色？⑤微生物组、环境和生态系统之间如何相互关联？⑥如何通过微生物数据预测生态系统功能？尽管当代的测序技术和相关的生物信息工具已极大地提高了我们对环境微生物组的认识能力，但相关的技术挑战仍然存在，包括测序手段的进一步发展、更高效的计算和分析软件、更全面的环境基因和基因组数据库以及环境微生物研究者更多的跨学科训练。

4 结 论

高通量测序和其他组学技术不断革新了我们认识各种生境如土壤、沉积物、水及空气中微生物的多样性、组成、功能、相互作用、进化和演替的能力。在过去10年间，这些研究为我们了解环境微生物组提供了新的见解。首先，我们对微生物多样性的认识得到了加强；其次，新的微生物基因、基因组、微生物群体和通路的发现拓展了我们对环境中微生物功能的认识。此外，科学家也开始通过宏转录组和宏蛋白组分析研究原位微生物群落的活性。不仅如此，也有研究在微生物生态系统中发现了宏观生态学中的一些时空变化规律，这能促使我们去探索生物系统中的普遍规律。通过上述的研究手段，我们将宏观生态学及环境科学的实验策略、理论和假说应用于环境微生物组研究。最后，研究发现环境微生物组对导致微生物群落形成和调控其功能的全球环境变化十分敏感，相应地，环境微生物也可能对生态系统功能产生反馈。

然而，我们在对环境微生物组的功能和机制，以及它们与环境驱动力和生态系统功能的相关性的理解上仍然面临许多挑战。因此，未来环境微生物组研究的方向将集中于：①开发新的测序方法和策略以及更高效的微生物组信息分析工具；②探讨不同生境中微生物功能和活性的机制；③了解关键微生物、优势和稀有物种在生态系统稳定性和生产力中的作用；④理解微生物之间以及微生物和宿主间的相互作用；⑤通过新的分离方法和单细胞基因组学技术获得更多的参考基因组用于以基因组为核心的研究；⑥利用微生物数据增强对生态系统功能的预测能力；⑦通过合成生物学和系

统微生物学方法构建理想的功能微生物组；⑧利用基因工程微生物提高环境健康。

参考文献：

- [1] van der HEIJDEN M G A, BARDGETT R D, van STRAALEN N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems[J]. *Ecology Letters*, 2008, 11(3): 296 - 310.
- [2] BERENDSEN R L, PIETERSE C M, BAKKER P A. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478 - 486.
- [3] MENDES R, GARBEVA P, RAAIJMAKERS J M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 634 - 663.
- [4] BERG G, GRUBE M, SCHLOTTER M, et al. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014(5): 148.
- [5] HUNTER P. Plant microbiomes and sustainable agriculture[J]. *EMBO Reports*, 2016: e201643476 - n/a.
- [6] HAEGEMAN B, HAMELIN J, MORIARTY J, et al. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(6): 1092 - 1101.
- [7] LOCEY K J, LENNON J T. Scaling laws predict global microbial diversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(21): 5970 - 5975.
- [8] TORSVIK V, OVREAS L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240 - 245.
- [9] GANS J, WOLINSKY M, DUNBAR J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. *Science*, 2005, 309(5739): 1387 - 1390.
- [10] KALLMEYER J, POCKALNY R, ADHIKARI R R, et al. Global distribution of microbial abundance and biomass in seafloor sediment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(40): 16213 - 16216.
- [11] WHITMAN W B, COLEMAN D C, WIEBE W J. Prokaryotes: The unseen majority[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(12): 6578 - 6583.
- [12] HEATHER J M, CHAIN B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA[J]. *Genomics*, 2016, 107(1): 1 - 8.
- [13] WHITE III R A, CALLISTER S J, MOORE R J, et al. The past, present and future of microbiome analyses

- [J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(11): 2049–2053.
- [14] VOSKOBOYNIK A, NEFF N F, SAHOO D, et al. The genome sequence of the colonial chordate, *Botryllus schlosseri*[J]. *Elife*, 2013, 2:e00569.
- [15] van DIJK E L, AUGER H, JASZCZYCZYNSKY Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. *Trends in Genetics*, 2014, 30(9): 418–426.
- [16] MURRAY I A, CLARK T A, MORGAN R D, et al. The methylomes of six bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(22): 11450–11462.
- [17] LAVER T, HARRISON J, O'NEILL P A, et al. Assessing the performance of the oxford nanopore technologies minion[J]. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2015, 3: 1–8.
- [18] TSAI Y C, CONLAN S, DEMING C, et al. Resolving the complexity of human skin metagenomes using single-molecule sequencing[J]. *Mbio*, 2016, 7(1): e01948–15.
- [19] MUKHOPADHYAY A, HE Z, ALM E J, et al. Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: an integrated genomics approach[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 4068–4078.
- [20] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHNDORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(16): 6241–6246.
- [21] ZHOU J, DENG Y, SHEN L, et al. Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12083.
- [22] SANCHEZ O, FERRERA I, GONZALEZ J M, et al. Assessing bacterial diversity in a seawater-processing wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing of the 16S rRNA and *amoA* genes[J]. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(4): 435–442.
- [23] FISH J A, CHAI B, WANG Q, et al. FunGene: the functional gene pipeline and repository[J]. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 291.
- [24] SINGH A H, DOERKS T, LETUNIC I, et al. Discovering functional novelty in metagenomes: Examples from light-mediated processes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(1): 32–41.
- [25] DUDHAGARA P, BHAUSAR S, BHAGAT C, et al. Web resources for metagenomics studies[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13(5): 296–303.
- [26] HUSON D H, MITRA S. Introduction to the analysis of environmental sequences: metagenomics with MEGAN[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 856: 415–29.
- [27] MEYER F, PAARMANN D, D'SOUZA M, et al. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes[J]. *Bmc Bioinformatics*, 2008, 9: 386.
- [28] MARKOWITZ V M, IVANOVA N N, SZETO E, et al. IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D534–D538.
- [29] SUN S L, CHEN J, LI W Z, et al. Community cyberinfrastructure for advanced microbial ecology research and analysis: the CAMERA resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: D546–D551.
- [30] HUSON D H, BEIER S, FLADE I, et al. MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data[J]. *Plos Computational Biology*, 2016, 12(6): e1004957.
- [31] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nat Meth*, 2015, 12(1): 59–60.
- [32] OVERBEEK R, BEGLEY T, BUTLER R M, et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(17): 5691–5702.
- [33] CAPORASO J G, BITTINGER K, BUSHMAN F D, et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(2): 266–267.
- [34] TU Q C, HE Z L, ZHOU J Z. Strain/species identification in metagenomes using genome-specific markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(8).
- [35] CLEARY B, BRITO I L, HUANG K, et al. Detection of low-abundance bacterial strains in metagenomic datasets by eigengenome partitioning[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(10): 1053–1060.
- [36] LUO C, KNIGHT R, SILJANDER H, et al. ConStrains identifies microbial strains in metagenomic datasets[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(10): 1045–1052.
- [37] YE Y Z, TANG H X. Utilizing de Bruijn graph of metagenome assembly for metatranscriptome analysis[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(7): 1001–1008.
- [38] LEUNG H C M, YIU S M, PARKINSON J, et al. IDBA-MT: De novo assembler for metatranscriptomic data generated from next-generation sequencing technology[J]. *Journal of Computational Biology*, 2013, 20(7): 540–550.
- [39] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–U130.
- [40] SCHULZ M H, ZERBINO D R, VINGRON M, et al. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(8): 1086–1092.

- [41] LEUNG H C M, YIU S M, CHIN F Y L. IDBA-MTP: A hybrid metatranscriptomic assembler based on protein information [J]. *Journal of Computational Biology*, 2015, 22(5): 367–376.
- [42] SCHMIEDER R, LIM Y W, EDWARDS R. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(3): 433–435.
- [43] LEE J H, YI H, CHUN J. rRNASelector: A computer program for selecting ribosomal RNA encoding sequences from metagenomic and metatranscriptomic shotgun libraries[J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 49(4): 689–691.
- [44] WANG Y, HU H, LI X. rRNAFilter: a fast approach for ribosomal RNA read removal without a reference database[J]. *Journal of Computational Biology*, 2017, 24(4): 368–375.
- [45] KOPYLOVA E, NOE L, TOUZET H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(24): 3211–3217.
- [46] SHI Y, TYSON G W, DELONG E F. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 266–269.
- [47] NAWROCKI E P, EDDY S R. Infernal 1.1: 100–fold faster RNA homology searches [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(22): 2933–2935.
- [48] GRIFFITHS-JONES S, MOXON S, MARSHALL M, et al. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: D121–D124.
- [49] WESTREICH S T, KORF I, MILLS D A, et al. SAMSA: A comprehensive metatranscriptome analysis pipeline[J]. *BMC Bioinformatics*, 2016, 17: 399.
- [50] CURTIS T P, SLOAN W T, SCANNELL J W. Estimating prokaryotic diversity and its limits[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(16): 10494–10499.
- [51] PAUL D, PANDEY G, PANDEY J, et al. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration[J]. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, 23(3): 135–142.
- [52] BALVANERA P, PFISTERER A B, BUCHMANN N, et al. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services[J]. *Ecology Letters*, 2006, 9(10): 1146–1156.
- [53] WAGG C, BENDER S F, WIDMER F, et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(14): 5266–5270.
- [54] MENDES L W, TSAI S M, NAVARRETE A A, et al. Soil-borne microbiome: linking diversity to function[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 255–265.
- [55] NELSON M B, MARTINY A C, MARTINY J B. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(29): 8033–8040.
- [56] MENDES R, KRUIJT M, de BRUIJN I, et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 2011, 332(6033): 1097–1100.
- [57] MENDES L W, KURAMAE E E, NAVARRETE A A, et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(8): 1577–1587.
- [58] HE Z L, XIONG J B, KENT A D, et al. Distinct responses of soil microbial communities to elevated CO₂ and O₃ in a soybean agro-ecosystem [J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(3): 714–726.
- [59] REVENGA C, BRUNNER J, HENNINGER N, et al. Pilot analysis of global ecosystem: Grassland ecosystems [R]. World Resources Institute & International Food Policy Research Institute, 2000: 103–118.
- [60] GRAYSTON S J, GRIFFITH G S, MAWDSLEY J L, et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(4/5): 533–551.
- [61] HU S, FIRESTONE M K, FIELD C B, et al. Nitrogen limitation of microbial decomposition in a grassland under elevated CO₂ [J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 188–191.
- [62] XUE K, XIE J P, ZHOU A F, et al. Warming Alters Expressions of Microbial Functional Genes Important to Ecosystem Functioning[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 668.
- [63] ZHOU J, XUE K, XIE J, et al. Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming[J]. *Nature Climate Change*, 2012, 2(2): 106–110.
- [64] DELMONT T O, PRESTAT E, KEEGAN K P, et al. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(9): 1677–1687.
- [65] LUO C, RODRIGUEZ R L, JOHNSTON E R, et al. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(5): 1777–86.
- [66] TU Q, HE Z, WU L, et al. Metagenomic reconstruction of nitrogen cycling pathways in a CO₂-enriched grassland

- ecosystem[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, 106: 99 – 108.
- [67] UROZ S, BUEE M, DEVEAU A, et al. Ecology of the forest microbiome: Highlights of temperate and boreal ecosystems [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 103: 471 – 488.
- [68] PAN Y D, BIRDSEY R A, FANG J Y, et al. A large and persistent carbon sink in the world's forests [J]. *Science*, 2011, 333(6045): 988 – 993.
- [69] ROSCH C, MERGEL A, BOTHE H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3818 – 3829.
- [70] WEIGOLD P, EL-HADIDI M, RUECKER A, et al. A metagenomic-based survey of microbial (de)halogenation potential in a German forest soil[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28958.
- [71] CARDENAS E, KRANABETTER J M, HOPE G, et al. Forest harvesting reduces the soil metagenomic potential for biomass decomposition [J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(11): 2465 – 2476.
- [72] HESSE C N, MUELLER R C, VUYISICH M, et al. Forest floor community metatranscriptomes identify fungal and bacterial responses to N deposition in two maple forests[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015: 6337.
- [73] AZARBAD H, NIKLIŃSKA M, LASKOWSKI R, et al. Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2015, 91(1): 1 – 11.
- [74] BONAN G B, III F S C, THOMPSON S L. Boreal forest and tundra ecosystems as components of the climate system[J]. *Climatic Change*, 1995, 29(2): 145 – 167.
- [75] TARNOCAI C, CANADELL J G, SCHUUR E A G, et al. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2009, 23(2): 2607 – 2617.
- [76] HEIMANN M, REICHSTEIN M. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks [J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 289 – 292.
- [77] McCALLEY C K, WOODCROFT B J, HODGKINS S B, et al. Methane dynamics regulated by microbial community response to permafrost thaw[J]. *Nature*, 2014, 514(7523): 478 – 481.
- [78] COOLEN M J L, ORSI W D. The transcriptional response of microbial communities in thawing Alaskan permafrost soils [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 197.
- [79] MACKELPRANG R, WALDROP M P, DEANGELIS K M, et al. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw[J]. *Nature*, 2011, 480(7377): 368 – U120.
- [80] HULTMAN J, WALDROP M P, MACKELPRANG R, et al. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes [J]. *Nature*, 2015, 521(7551): 208 – 212.
- [81] AZAM F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens [J]. *Science*, 1998, 280(5364): 694 – 696.
- [82] KARNER M B, DELONG E F, KARL D M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean [J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 507 – 510.
- [83] DUCKLOW H. Bacterial production and biomass in the oceans [M]// KIRCHMAN D L, ed. *Microbial ecology of the oceans*. New York: Wiley, 2000: 85 – 120.
- [84] DAS S, LYLA P S, KHAN S A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives [J]. *Current Science*, 2006, 90(10): 1325 – 1335.
- [85] FUHRMAN J A. Microbial community structure and its functional implications [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 193 – 199.
- [86] STROM S L. Microbial ecology of ocean biogeochemistry: a community perspective [J]. *Science*, 2008, 320(5879): 1043 – 1045.
- [87] FINLAY B J, CLARKE K J. Ubiquitous dispersal of microbial species [J]. *Nature*, 1999, 400(6747): 828 – 828.
- [88] FINLAY B J. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species [J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1061 – 1063.
- [89] EILER A, HAYAKAWA D H, RAPPE M S. Non-random assembly of bacterioplankton communities in the subtropical North Pacific Ocean [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 140.
- [90] LANGENHEDER S, BERGA M, OSTMAN O, et al. Temporal variation of β -diversity and assembly mechanisms in a bacterial metacommunity [J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1107 – 1114.
- [91] FUHRMAN J A, HEWSON I, SCHWALBACH M S, et al. Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(35): 13104 – 13109.
- [92] LOGARES R, LINDSTROM E S, LANGENHEDER S, et al. Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change [J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(5): 937 – 948.
- [93] FUHRMAN J A, STEELE J A, HEWSON I, et al. A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(22): 7774 – 7778.
- [94] CHOW C-E T, SACHDEVA R, CRAM J A, et al.

- Temporal variability and coherence of euphotic zone bacterial communities over a decade in the Southern California Bight[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(12): 2259 – 2273.
- [95] CRAM J A, CHOW C-E T, SACHDEVA R, et al. Seasonal and interannual variability of the marine bacterioplankton community throughout the water column over ten years[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 563 – 580.
- [96] RINKE C, SCHWIENTEK P, SCZYRBA A, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 431 – 437.
- [97] GAWAD C, KOH W, QUAKE S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(3): 175 – 188.
- [98] THOMPSON L R, FIELD C, ROMANUK T, et al. Patterns of ecological specialization among microbial populations in the Red Sea and diverse oligotrophic marine environments[J]. *Ecology and Evolution*, 2013, 3(6): 1780 – 1797.
- [99] SUNAGAWA S, COELHO L P, CHAFFRON S, et al. Structure and function of the global ocean microbiome [J]. *Science*, 2015, 348(6237): 1261359.
- [100] THOMPSON L R, WILLIAMS G J, HAROON M F, et al. Metagenomic covariation along densely sampled environmental gradients in the Red Sea[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(1): 138 – 151.
- [101] OKAFOR N. Ecology of microorganisms in freshwater [J]. *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems*, 2011: 111 – 122.
- [102] MARTINEZ-GARCIA M, SWAN B K, POULTON N J, et al. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(1): 113 – 123.
- [103] MOU X, LU X, JACOB J, et al. Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e61890.
- [104] STALEY C, GOULD T J, WANG P, et al. Core functional traits of bacterial communities in the Upper Mississippi River show limited variation in response to land cover[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 414.
- [105] FORTUNATO C S, CRUMP B C. Microbial gene abundance and expression patterns across a river to ocean salinity gradient[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0140578.
- [106] van ROSSUM T, PEABODY M A, UYAGUARI-DIAZ M I, et al. Year-long metagenomic study of river microbiomes across land use and water quality[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015. 6:1405.
- [107] YAN Q, BI Y, DENG Y, et al. Impacts of the Three Gorges Dam on microbial structure and potential function[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:8605.
- [108] HEMME C L, TU Q, SHI Z, et al. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:1205.
- [109] HEMME C L, DENG Y, GENTRY T J, et al. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(5): 660 – 672.
- [110] LENSKI R E. Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations[J]. *The ISME Journal*, 2017. DOI:10.1038/ismej.2017.69.
- [111] HEMME C L, GREEN S J, RISHISHWAR L, et al. Lateral gene transfer in a heavy metal-contaminated-groundwater microbial community[J]. *MBio*, 2016, 7(2): e02234 – 15.
- [112] ORTIZ G, YAGUEE G, SEGOVIA M, et al. A study of air microbe levels in different areas of a hospital[J]. *Current Microbiology*, 2009, 59(1): 53 – 58.
- [113] YOO K, LEE T K, CHOI E J, et al. Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: a review [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 51:234 – 247.
- [114] BRODIE E L, DESANTIST Z, PARKER J P M, et al. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(1): 299 – 304.
- [115] ADAMS R I, BATEMAN A C, Bik H M, et al. Microbiota of the indoor environment: a meta-analysis [J]. *Microbiome*, 2015, 3(1): 1 – 18.
- [116] PRUSSIN A J, MARR L C. Sources of airborne microorganisms in the built environment [J]. *Microbiome*, 2015, 3: 78.
- [117] JIANG W J, LIANG P, WANG B Y, et al. Optimized DNA extraction and metagenomic sequencing of airborne microbial communities [J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(5): 768 – 779.