

基于“通用”引物的 PCR 扩增方法会遗漏很多种类的微生物, 为追寻这些被“遗漏”的微生物, 需要改进微生物的分离培养方法并加强特定功能微生物的富集培养, 并且需要充分改进和利用元基因组和元转录组方法及其数据库。

全哲学

追寻被“遗漏”的微生物

全哲学

(复旦大学 生命科学学院 微生物学与微生物工程系 上海 200433)

摘要: 人类对生态环境中微生物的认识从依赖于纯培养微生物的研究阶段已进入到结合各种组学方法的微生物群落代谢机制的研究阶段。在微生物群落组成的研究中, 基于“通用”引物的 PCR 扩增方法会“遗漏”很多种类微生物, 因此需要探索一些方法, 以找回这些被“遗漏”的微生物。目前生态环境中能培养的微生物种类较为有限, 但是通过培养方法的改进, 分离培养新的微生物或富集培养特殊功能的微生物依然是扩展微生物种类认知范围的重要途径。而且, 通过元基因组数据库分析, 可以了解常用的“通用”引物所不能覆盖的微生物范围, 并能阐明不同生态环境中各种微生物类型的分布情况。由于元转录组中最多的是核糖体 RNA, 所以可通过改进的元转录组方法同时分析有活性的细菌、古生菌和真核微生物群落结构。追寻被“遗漏”的微生物不仅能扩展我们对微生物的认知范围, 同时也是研究并正确理解全球物质循环过程的一个重要领域。

关键词: 被“遗漏”的微生物, “通用”引物, 富集培养, 元基因组, 元转录组

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170114)

*通讯作者: Tel: 86-21-65643334; 信箱: quanzx@fudan.edu.cn

收稿日期: 2012-10-29; 接受日期: 2012-11-27

Seeking of “missed” microorganisms

QUAN Zhe-Xue

(Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences,
Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The knowledge of microorganisms in ecological environments is already reached to the level of metabolic process study of microbial community with omics methods from the isolation dependent study. However, the normally used microbial community analysis method which is based on PCR amplification with “universal” primers would cause the “miss” of various microorganisms. Therefore, we need to seek some methods to find the “missed” microorganisms. Although there are critical limitations in cultivation of microorganisms, the modification of cultivation method to isolate novel types of microorganisms or enrich special functional microorganisms is still a useful method to increase the boundary of our knowledge. Based on the metagenome databases, we can analyze the coverage of “universal” primers and can also analyze the global patterns of different functional microorganisms. Because of high content of ribosomal RNA, modified metatranscriptome analysis will become a useful method for the simultaneous determination of active bacteria, archaea and microeukaryotes. Seeking “missed” microorganisms is an important research field to extend our knowledge about microorganisms and correctly understand different earth element cycles.

Keywords: “Missed” microorganisms, “Universal” primers, Enrichment, Metagenome, Metatranscriptome

人类对微生物的认识始于 17 世纪列文虎克的显微镜观察。而后在科学家发明了应用固体培养基分离纯化微生物新方法之后的很长一段时期里,微生物的研究主要依赖于其纯培养物。随着分子生物学技术的发展,特别是 PCR 技术的发展,人们发现用现有方法仅能分离到生态环境中 1% 的微生物^[1]。因而,在生态环境样品的微生物群落结构分析中,基于 PCR 扩增的分子生物学方法替代了传统的培养方法。随着高通量测序技术的发展,各种组学方法也开始应用于微生物生态科学研究中;通过对环境样品中微生物的 DNA、RNA 以及蛋白质的元(宏)基因组(Metagenome)、元(宏)转录组(Metatranscriptome)和元(宏)蛋白质

组(Metaproteome)分析,人们可以进行复杂微生物群落整体代谢途径的研究,由此可以回答微生物群落中的各种微生物到底“做什么”的问题。但人们容易忽视的一个问题是现在常用的微生物群落分析方法是否已能准确回答在各种生态环境“谁在那里”?因此,我们需要借助新的方法认识被“遗漏”的微生物的范围,并追寻这些被“遗漏”的微生物。

1 分离培养依然是找出被“遗漏”微生物的重要方法

以前人们对自然界中存在的微生物的认识主要靠显微镜观察和分离培养。20 世纪 70 年代末,

Woese 通过小亚基核糖体 RNA (SSU rRNA, 指细菌和古生菌的 16S rRNA 和真核生物的 18S rRNA) 的分析构建了系统发育树并提出了三域学说^[2], 这给微生物分类学和微生物分子生态学带来了革命性的发展。之后的 PCR 扩增技术和测序技术的发展使人们更易获得纯培养微生物 16S rRNA 基因序列。因此, 20 世纪 80 年代起伯杰氏手册的细菌分类从以表型和实用性鉴定指标为主的鉴定细菌学体系^[3]转向了鉴定遗传型的系统进化分类新体系^[4]。

基于遗传型的系统进化分类体系的建立, 使人们对生态环境中微生物有了更加深入的认识。微生物的分类也从 20 多年前的 10 多个门^[2]发展到现在的 70 多个门^[5], 其中一半以上还没有分离菌株, 只根据环境样品的 16S rRNA 基因克隆序列来确定的候选门(Candidatus phylum)^[6-7]。虽然不依赖培养的微生物群落结构的分子生物学检测方法已得到了广泛的应用, 但纯培养微生物的分离培养依然是微生物生理、功能以及遗传等方面研究的基础。通过培养条件的摸索和改进, 近几年人们建立了好几个新的门, 如 Gemmatimonadetes^[8]、Caldiserica^[9]和 Elusimicrobia^[10]。

候选门 OP10 是 1998 年基于对美国黄石公园温泉沉积物样品的克隆文库分析中得到的 16S rRNA 基因序列而提出的^[11]。后来, 人们发现属于这个候选门的微生物在高温、高盐环境的水和土壤以及各种好养或厌氧废水处理反应器中广泛存在^[12-14]。2011 年, 日本科学家从中温土壤中分离出了属于这个候选门的菌株, 并把 OP10 更名为正式的门 Armatimonadetes^[13]。之后, Lee 等^[14]基于 2008 年从新西兰高温土壤中分离出的嗜热微生物^[15]提出了属于 Armatimonadetes 的新的纲(Class)。我们实验室和韩国研究者合作分离鉴定了属于这个门的第三个新的纲 Fimbriimonadia^[16]。为了确定所分离到的菌株属于该门新的纲, 我们

从多个公共数据库中提取出该门的所有近全长的序列, 与其他 49 个门的 500 多个不同种类细菌的 16S rRNA 基因序列作比较, 并通过系统发育学分析确定属于这个门的大部分微生物的 16S rRNA 基因序列可以分为 5 个群(Group), 每个群可能对应于一个纲^[16]。在这基础上, 我们设计了 Fimbriimonadia 特异性的引物, 并分析了不同环境中的分布情况(暂未发表)。

为了分离培养以前未能培养的微生物, 人们创建了很多较复杂的新方法^[17], 但既使对现在常用分离培养方法稍加改进, 也能分离培养出新的微生物。这些方法包括: (1) 降低培养基中营养物质的浓度, 使得培养基成分更接近于自然环境条件。其中 R2A 培养基就是最近常用于微生物分离筛选的营养物质浓度较低的一种培养基, 而且常把这种培养基稀释 2-10 倍之后再应用。(2) 延长培养时间。以往人们应用固体培养基分离环境样品中微生物时, 通常培养 2-7 d 之后就挑取单菌落来分离微生物。但这种方法仅挑取在固体培养基上生长速度较快的微生物, 因而会遗漏很多自然生态环境中的主要微生物。所以现在针对环境样品中微生物分离时, 常将培养时间延长到 14-60 d 或更长。(3) 对形态特征相同的菌落也要进行 16S rRNA 基因序列分析, 否则易漏掉含量相对少的、形态特征差别并不明显的各种微生物。我们和韩国研究者合作分离鉴定的属于 Fimbriimonadia 的微生物, 就是采用上述方法获得的, 具体为: 将种植人参田地的土壤浸出液置于 5 倍稀释的改进 R2A 固体培养基上培养两个月后, 对平板上长出的所有菌落(约 800 个)进行 16S rRNA 基因序列的分析^[16], 最终发现了属于该新纲的菌株。而且基于这 800 个左右菌株, 韩国合作者已报道了 40 个以上的新属或新种^[16]。因此, 改进微生物培养方法来扩展可分离培养的微生物范围依然是我们认识被“遗漏”微生物的重要途径。

2 富集培养是找出被“遗漏”的特定功能微生物的重要方法

虽然通过培养方法的改进能扩大可分离培养微生物的范围,但至今大部分微生物还是不能被分离培养。其中很多微生物虽然不能在固体培养基上以单菌落形式分离出,但它们可以在液体培养基里生长。因为各种功能微生物可以结合分子生物学方法基于其功能代谢进行定向富集培养,因此在功能微生物的研究中富集培养特别重要。而且基于元基因组、元转录组和元蛋白质组的分析,对富集培养物也能做到以前只能在纯培养微生物中进行的生理生化方面的研究。氨氧化古生菌和厌氧氨氧化细菌的发现过程,很好地说明微生物分子生物学研究方法和富集培养方法在新的功能微生物发现中的重要作用。

2004年,Creig Venter 课题组^[18]从通过海水元基因组测序结果的拼接而得到的一个古生菌相关骨架(Scaffold)中发现了氨氧化单加氧酶基因 *amoA*; 2005年, Schleper 课题组^[19]从构建的土壤元基因组 Fosmid 文库中找到了一个既含有 *amoA* 基因又含有古生菌 16S rRNA 基因片段的克隆,从而在基因水平明确了氨氧化古生菌的存在。基于这些序列,人们设计了引物并对各种环境样品进行了分析,最终确定氨氧化古生菌在各种海洋生态环境中广泛存在^[20]。通过进一步分析,发现土壤中氨氧化古生菌的量远高于氨氧化细菌^[21]。同一年, Stahl 课题组^[22]以碳酸氢盐为碳源富集培养了自养的氨氧化古生菌,后用稀释传代培养的方法进行菌种的纯化,最后检测了其氨氧化活性。从此,氨氧化古生菌成为生态环境中氨氧化研究的重要组成部分。

厌氧氨氧化是 20 世纪 90 年代才发现的新的氨氧化途径。起初,在厌氧反硝化废水处理过程

中人们发现了氨的消失^[23]。之后,通过研究^[24]确认了厌氧条件下的氨氧化是微生物参与的生物学过程,并采用通过稳定同位素底物分析法确认氨和亚硝酸盐反应形成氮气。此过程相比于传统的硝化-反硝化除氮过程,可以减少曝气费用并无需外加有机碳源,所以在废水处理中很受重视,并已在现场应用^[25]。在黑海相关研究中,人们还发现 30%–50% 的海洋固定氮是通过厌氧氨氧化过程以氮气形式释放到空气中^[26–27]。通过富集培养提高厌氧氨氧化细菌的含量之后,再通过密度梯度离心法,人们分离出了厌氧氨氧化细菌,并确定此细菌是属于浮霉菌门的、新的类型微生物^[28]。之后 Jetten 课题组从废水处理反应器和海水缺氧层中鉴定到了属于候选属 *Brocadia*^[29]、*Kuenenia*^[30]、*Anammoxoglobus*^[31] 和 *Scalindua*^[32] 的微生物。本课题组在对厌氧氨氧化反应器颗粒污泥中的厌氧氨氧化微生物分析时,发现其中的主要厌氧氨氧化细菌 16S rRNA 基因序列与上述报道的四个候选属有较大差异,且约占整个细菌含量的 1/2。我们对此厌氧氨氧化细菌 16S 和 23S rRNA 基因序列与其他的厌氧氨氧化菌相关序列进行比较,并设计脞氧化酶 *hzo* 基因的引物进行了系统发育学分析,最后把此类厌氧氨氧化细菌归为新的候选属 *Jettenia*^[33]。我们还分析了厌氧氨氧化反应器中各种类型微生物的组成^[34],并对含有候选属 *Jettenia* 的污泥进行元基因组分析,获得了此厌氧氨氧化细菌的基因组信息,而且发现其基因组上缺失厌氧氨氧化过程中重要的亚硝酸还原酶 *nirS* 基因等现象。厌氧氨氧化微生物的发现,还表明废水处理系统是一个很好的特定功能微生物的富集培养装置;因为运行体系相对稳定,而且一般运行几个月到几年,可以富集到特定类型的功能微生物。

除了厌氧氨氧化途径和氨氧化古生菌的发

现, 硫酸盐或硝酸盐还原耦合的厌氧甲烷氧化的发现和研究等都是分子生物学方法和富集培养方法的有机结合, 而且富集培养是研究这些功能微生物的代谢机制和生态作用的重要基础。

3 元基因组/元转录组数据库是认识“遗漏”微生物现状的重要资源

微生物群落结构的分析一直是微生物生态学和环境微生物学的研究热点。基于 16S/18S rRNA 基因序列的分子系统发育分析已成为人们研究生态环境样品中细菌、古生菌和真核微生物群落结构以及其变化的主要方法^[35]。一般对微生物群落的分子生物学检测首先是从环境样品中提取 DNA, 并对 rRNA 基因进行 PCR 扩增, 然后通过克隆文库的构建^[36]、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)^[37]、末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP)^[38]等方法对 PCR 产物进行分析。在 rRNA 基因的 PCR 扩增过程中, 为了覆盖大部分的细菌(或古生菌、真菌), 一般采用在 rRNA 基因序列的保守区所设计的“通用”引物。虽然加标签 PCR 产物的焦磷酸测序 (Barcoded pyrosequencing)^[39]使得对每个环境样品的测序数量能提高到几千、几十万的水平, 并能检测到一些“稀少”的微生物, 但仍然需要“通用”引物的 PCR 扩增这一步骤。由于存在对环境样品中不同微生物的 PCR 扩增偏向性, 这种基于 PCR 的微生物多样性分析方法不能准确反映样品中各种微生物的组成情况。PCR 循环数、退火温度、DNA 模板的二级结构及引物与模板的匹配程度等, 都影响各类微生物 DNA 的 PCR 扩增效率^[40]。其中最关键的是引物与模板的匹配程度, 因为所选择的引物不同, 可使不同类型的微生物被低估或未被检测到^[41]。虽然人们可通过 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)等数据库的分析, 增加所用“通用”引物

的简并度 (Degenerate), 来提高引物的覆盖度, 但仍然不能覆盖大部分的“稀少”微生物^[42], 因为所用的 RDP 数据库中的大部分序列就是基于这些“通用”引物所得到的偏向性结果。

随着高通量测序方法的普及和测序价格的下降, 大量的元基因组和元转录组原始数据被提交到公共数据库[如: NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>), CAMERA (<http://www.camera.calit2.net/>) 和 MG-RAST (<http://metagenomics.nal.gov/>)等]中。这些数据为我们在不受 PCR 偏向性的影响下分析“通用”引物的覆盖度提供了基础。我们从 RDP 数据库中选择每个门对应的代表序列, 在 CAMERA 数据库通过 BLAST 筛选了多个元基因组数据集 (Datasets) 中的细菌 16S rRNA 基因序列, 进行了常用的各种“通用”引物的覆盖度的分析 (其流程参照图 1), 发现这些“通用”引物的覆盖度大部分低于 90%, 并在特定环境样品中微生物的覆盖度低于 50%^[43]。这说明基于“通用”引物 PCR 扩增的微生物群落结构分析中可能遗漏很多微生物类群, 而且在特定环境中这些被遗漏的微生物可能是主要微生物。因此在对特定环境样品进行微生物多样性分析之前需要考虑引物的覆盖度, 并进行改进。通过引物覆盖度分析, 可以知道现用“通用”引物覆盖度的问题, 并以增加引物的简并度来提高覆盖度。但引物的简并度不能无限增加, 简并度达到一定程度之后就会大大降低 PCR 扩增效率。因此, 需要开发适用于这些高简并引物的 PCR 扩增方法。虽然微生物生态分析中常用的荧光原位杂交 (FISH) 和荧光定量 PCR 分析能给出特定类型微生物含量的定量结果, 但这也受所选择的“通用”探针或引物覆盖度的影响。因此, 需要开发能用高简并引物的 PCR 扩增方法或不依赖“通用”引物也能分析微生物群落结构的新方法。

大量的元基因组和元转录组原始数据的公共数据库, 不仅可应用于“通用”引物覆盖度的分析, 而且在不受 PCR 偏向性的影响下可分析各种环境中的主要微生物类型, 并能分析各类微生物的

全球分布格局。这些数据也可以应用于功能微生物的研究, 分析我们常用的物质循环相关的功能基因“通用”引物的覆盖度, 并认识各种功能微生物的全球分布格局(图 1)。

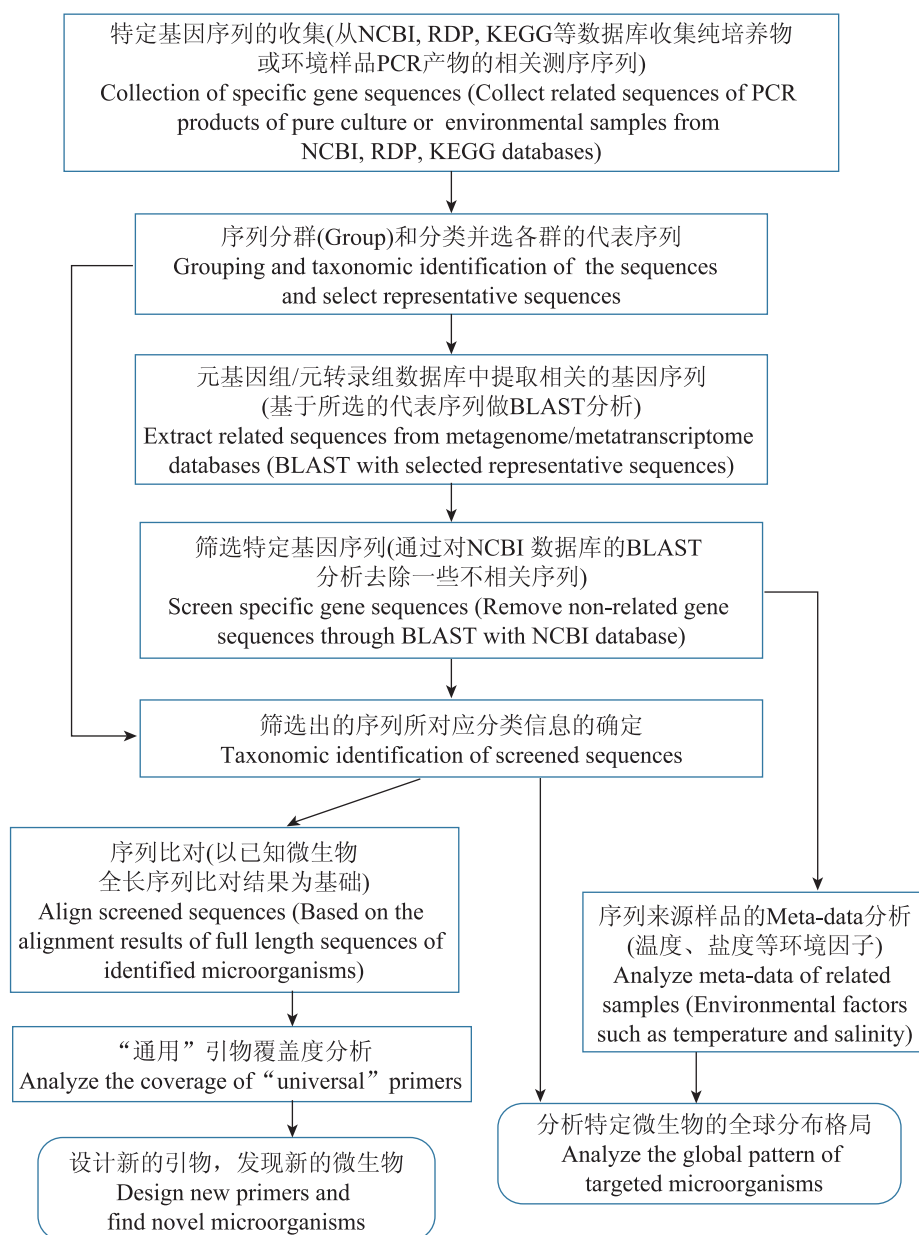


图 1 基于元基因组/元转录组数据库的数据挖掘流程

Fig. 1 Data mining process from metagenome/metatranscriptome databases

4 基于元转录组的微生物群落结构分析方法, 可以避开 PCR 过程中微生物的“遗漏”

就如上面所述, 我们可以根据元基因组序列中的 16S/18S rRNA 基因序列分析微生物群落结构。虽然此法不受 PCR 偏向性的干扰, 但此法的最大缺陷是元基因组测序结果中 16S/18S rRNA 所占的比例不到 0.5%^[44-45], 而元转录组序列分析就可以避免这种缺陷。在微生物 RNA 中 rRNA 所占的比例较高, 而 mRNA 的比例相对较低 (1%-5%)^[46]; 而且因原核微生物的 mRNA 不像真核生物可通过 Poly-T 来选择性地合成 cDNA, 因而细菌和古生菌的 RNA 一般需要用随机引物来进行反转录; 从而产物中大部分是对应于 rRNA 的 cDNA, 因此原核微生物转录组数据中 rRNA 所占的比例一般能达到 80% 以上^[46]。随着组学和高通量测序技术的发展, 环境样品中微生物元转录组的测序分析成了研究环境中微生物作用机制的新方法。元转录组分析首先是用随机引物对环境样品的总 RNA 进行反转录, 后对所得到的 cDNA 进行高通量测序并对测序结果进行分析。虽然一般元转录组分析的主要研究对象是 mRNA, 但是在这过程中产生的大量 rRNA 序列可以用来分析微生物群落结构。由于从环境样品的 RNA 合成 cDNA 过程中采用随机引物, 从而可避免部分微生物类群被遗漏的问题。而且因不需要多循环的 PCR 扩增, 规避了 PCR 扩增中所产生的偏差, 使得所得到的结果能够更准确地反映样品中各类微生物组成和比例。元转录组分析的对象是环境样品微生物 RNA, 因此反映的是样品中有活性微生物群落结构和多样性, 从而避免了死去的残留微生物干扰, 而且此法可同时分析细菌、古生菌和真核微生物, 所以就能了解这三类微生物之间的比例。

2008 年, Urich 等^[47]首次利用元转录组的高通量测序方法分析了一个土壤样品中的微生物群落结构。之后, 还有数篇有关元转录组研究中分析 mRNA 的同时也根据 rRNA 序列分析群落结构的报道^[48-49], 但至今此方法并没有被推广, 而且也没有被应用于微生物群落结构变化的分析。其原因是现有的元转录组分析方法不适合于多个样品中微生物群落结构的同时分析, 也没有完善的数据处理和分析软件, 并且对结果的准确性没有做过系统性的分析。为了提高元转录组测序的效率, 最近的元转录组分析中都使用基于 rRNA 特异性探针的消减杂交等方法去除 rRNA, 由此提高对应于 mRNA 的序列在元转录组数据中的比例^[46,50]。由于去除 rRNA 过程中会破坏不同微生物 rRNA 序列的组成^[46], 从而在这些改进的元转录组分析过程中得到的 rRNA 序列没法用于微生物群落结构的分析。因此, 在现有元转录组分析方法的基础上, 必须对此法进行改进使其能适合于微生物群落结构的分析。

我们实验室正在开展基于元转录组方法所得到的结果能否在不同分类水平都能准确体现样品中微生物群落结构的研究, 并着手对现有的元转录组方法进行改进, 使其能适用于大量样品的同时分析和微生物量较少的环境样品的分析。此方法若能与稳定同位素标记方法相结合, 就不但可弃去 PCR 扩增这一步骤, 同时也能了解利用特定底物的功能微生物群落结构。

随着高通量测序技术的快速发展, 目前测序长度变长而测序价格迅速下降。因此基于元转录组中 rRNA 的微生物群落结构分析方法可以成为微生物分子生态学新一轮发展的重要工具, 并在此分析过程中可得到大量不受引物覆盖度限制的 rRNA 序列, 从而可为新的微生物类型的发现提供良好基础。

基于元基因组和元转录组的微生物群落分析

方法可以避免 PCR 扩增过程中的微生物“遗漏”, 然而仍存在 DNA 或 RNA 提取过程中“遗漏”微生物的问题。虽然采用培养方法能找到的被“遗漏”微生物种类较为有限, 但目前该法仍具有一定的实用价值。对被“遗漏”微生物的研究将扩展人们对微生物的认识领域, 并对地球物质循环的认识和新微生物资源的开发具有重要的意义。

参考文献

- [1] Amann RL, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143–169.
- [2] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiological Reviews, 1987, 51(2): 221–271.
- [3] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1974.
- [4] Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984.
- [5] Pace NR. Mapping the tree of life: progress and prospects[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, 73(4): 565–576.
- [6] Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 369–394.
- [7] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(4): 669–685.
- [8] Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 1155–1163.
- [9] Mori K, Yamaguchi K, Sakiyama Y, et al. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 11): 2894–2898.
- [10] Geissinger O, Herlemann DPR, Morschel E, et al. The ultramicrobacterium “*Elusimicrobium minutum*” gen. nov., sp. nov., the first cultivated representative of the termite group 1 phylum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2831–2840.
- [11] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(2): 366–376.
- [12] Portillo MC, Gonzalez JM. Members of the candidate division OP10 are spread in a variety of environments[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(2): 347–353.
- [13] Tamaki H, Tanaka Y, Matsuzawa H, et al. *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 6): 1442–1447.
- [14] Lee KCY, Dunfield PF, Morgan XC, et al. *Chthonomonas calidirosea* gen. nov., sp. nov., an aerobic, pigmented, thermophilic microorganism of a novel bacterial class, *Chthonomonadetes* classis nov., of the newly described phylum *Armatimonadetes* originally designated candidate division OP10[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 10): 2482–2490.
- [15] Stott MB, Crowe MA, Mountain BW, et al. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(8): 2030–2041.
- [16] Im WT, Hu ZY, Kim KH, et al. Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. nov. within the *Fimbriimonadia* class nov., of the phylum *Armatimonadetes*[J]. Antonie van

- Leeuwenhoek, 2012, 102(2): 307–317.
- [17] Stewart EJ. Growing unculturable bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(16): 4141–4160.
- [18] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. Science, 2004, 304(5667): 66–74.
- [19] Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(12): 1985–1995.
- [20] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, 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.
- [21] Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. Nature, 2006, 442(7104): 806–809.
- [22] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon[J]. Nature, 2005, 437(7058): 543–546.
- [23] Mulder A, Vandegraaf AA, Robertson LA, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, 16(3): 177–183.
- [24] van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1246–1251.
- [25] Abma WR, Schultz CE, Mulder JW, et al. Full-scale granular sludge anammox process[J]. Water Science and Technology, 2007, 55(8/9): 27–33.
- [26] Kuypers MMM, Sliekers AO, Lavik G, et al. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J]. Nature, 2003, 422(6932): 608–611.
- [27] Kuypers MMM, Lavik G, Woebken D, et al. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(18): 6478–6483.
- [28] Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. Nature, 1999, 400(6743): 446–449.
- [29] Kuenen JG, Jetten MSM. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidising bacteria[J]. American Society for Microbiology News, 2001, 67: 456–463.
- [30] Schmid M, Twachtman U, Klein M, et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23(1): 93–106.
- [31] Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, et al. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(1): 39–49.
- [32] Schmid M, Walsh K, Webb R, et al. *Candidatus* “Scalindua brodae”, sp. nov., *Candidatus* “Scalindua wagneri”, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(4): 529–538.
- [33] Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, et al. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3130–3139.
- [34] Li XR, Du B, Fu HX, et al. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(4): 278–289.
- [35] Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, et al. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach[J]. Annual Reviews of Microbiology, 1986, 40(1): 337–365.
- [36] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. Science, 1997, 276(5313): 734–740.
- [37] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695–700.

- [38] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516–4522.
- [39] Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, et al. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing[J]. *Plos Genetics*, 2008, 4(11): e1000255.
- [40] Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3724–3730.
- [41] Hong SH, Bunge J, Leslin C, et al. Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity[J]. *ISME Journal*, 2009, 3(12): 1365–1373.
- [42] Wang Y, Qian PY, Field D. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies[J]. *Plos One*, 2009, 4(10): e7401.
- [43] Mao DP, Zhou Q, Chen CY, et al. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12(1): e66.
- [44] Mou XZ, Sun SL, Edwards RA, et al. Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean[J]. *Nature*, 2008, 451(7179): 708–711.
- [45] Biers EJ, Sun SL, Howard EC. Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(7): 2221–2229.
- [46] He SM, Wurtzel O, Singh K, et al. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(10): 807–812.
- [47] Urich T, Lanzén A, Qi J, et al. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome[J]. *Plos One*, 2008, 3(6): e2527.
- [48] Poretsky RS, Hewson I, Sun SL, et al. Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(6): 1358–1375.
- [49] Shrestha PM, Kube M, Reinhardt R, et al. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 960–970.
- [50] Gifford SM, Sharma S, Rinta-Kanto JM, et al. Quantitative analysis of a deeply sequenced marine microbial metatranscriptome[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(3): 461–472.