

从微生物组到合成功能菌群

刘炜伟^{1,2} 吴冰¹ 向梅春¹ 刘杏忠^{1,2*}

(1. 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室 北京 100101)

(2. 中国科学院大学生命科学学院 北京 100049)

摘要: 微生物组是指特定微环境中的微生物群落及其组学,自然界中的生物过程几乎都是通过微生物组完成的。随着测序技术的发展和成本降低,微生物组已经成为微生物生态学研究的热点领域。继合成生物学之后,基于微生物组的合成功能菌群研究正在兴起,在人类健康、农业、工业和生态等领域都有广泛的应用前景。本文从微生物组到合成功能菌群的角度系统论述了其在不同领域的研究现状与发展趋势,为微生物组从理论研究到应用提供思路。

关键词: 微生物群落, 功能微生物, 合成菌群, 生态学, 宏组学

From microbiome to synthetic microbial community

LIU Wei-Wei^{1,2} WU Bing¹ XIANG Mei-Chun¹ LIU Xing-Zhong^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2. School of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Microbiome describes the microbial community and its -omics that reside in a specific niche, and almost all the biological processes in nature are conducted by certain microbiome. Along with the development and cost effectiveness of DNA sequencing technique, microbiome has become a hot research area. After synthetic biology, synthetic microbial community based on the microbiome will increase our ability to harness the power of microbial communities in biotechnology and to manipulate such communities to promote human health, agriculture, industry and environment. This paper reviews the research progress and application of microbiome in various fields from a viewpoint of ‘from microbiome to synthetic microbial community’, and provides ideas from the theoretical research to application of microbiome.

Keywords: Microbial community, Functional microorganism, Synthetic microbial community, Ecology, Meta-omics

Foundation item: Beijing Municipal Science and Technology Project (No. D151100003915002); National Natural Science Foundation of China (No. 31670014)

*Corresponding author: Tel: 86-10-64807505; E-mail: liuxz@im.ac.cn

Received: August 18, 2016; **Accepted:** November 09, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 05, 2016
基金项目: 北京市科技计划项目(No. D151100003915002); 国家自然科学基金项目(No. 31670014)

*通讯作者: Tel: 86-10-64807505; E-mail: liuxz@im.ac.cn

收稿日期: 2016-08-18; 接受日期: 2016-11-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-05

微生物广泛分布在所有生态系统中,是地球物质循环的主要参与者。然而传统的微生物研究方法(如分离培养等方法)仅能获得自然界中1%–10%的微生物^[1],严重制约了微生物的研究和应用。第二代测序技术和生物信息学以环境中微生物的基因组、转录组或蛋白质组的总和为研究对象,不仅克服了传统研究方法的缺点,还可以结合生物信息学揭示微生物之间、微生物与环境之间相互作用的规律,显著促进了环境微生物群落更系统、全面和深入的研究^[2],并衍生出两个新概念:微生物组和功能菌群。

微生物组(Microbiome)主要包含两个层面:生活在特定环境中的微生物及这些微生物的宏组学数据。近年来,微生物组研究已取得巨大进展,并且在一些领域已经产生了显著的经济效益,被列为“能重塑未来的十大新兴技术”之一。功能菌群是相同或不同形态执行着同一种功能的微生物,可以根据微生物的生理特性将微生物分为不同的功能类群,如蛋白质降解菌、脂肪降解菌、纤维素降解菌等。人为地将两个或多个物种在已知的培养条件下共培养而人工创建的微生物群体称为合成功能菌群(Synthetic microbial community)^[3],其创建主要包括两个部分:从自然环境中分离培养或通过基因改造得到微生物,并在理想的条件下以确定的比例混合构成合成群落。功能菌群可以便捷、高效地利用微生物组,因此其应用也引起了人们的广泛重视。

微生物组研究为功能菌群的应用提供理论基础,功能菌群将微生物组的结果应用到医学、农业、工业和生态等领域中,两者的关系密不可分。微生物组和功能菌群研究可推动基础研究向实际应用的转化,具有巨大的应用潜力,并且已经获得一系列创新性的进展。例如:在医学上采用益生菌群治疗肥胖、心脏疾病或自身免疫性疾病,提高免疫力并减少病毒或过敏原的传播;在农业上通过研究植物与土壤系统相关微生物组间的关系来提高作物产量,研发不含抗生素的促生长饲料等;在工业上通过研发生物燃料高效转化反应器,将废弃物

转变为新型能源或新型化合物;在生态上监测甲烷排放细菌的数量、追踪入侵物种、预测环境压力下生态系统的变化等^[4]。微生物组研究显著促进了当前生物科学应用格局的革新^[4]。本文分别从以上应用领域详细阐述微生物组与功能菌群的应用及研究方法。

1 微生物组

美国白宫科学和技术政策局与联邦局联合启动了“国家微生物组计划”(National microbiome initiative, NMI),旨在促进微生物领域的科学研究,进一步开发微生物在医学、农业、工业和生态领域的应用。

1.1 微生物组与医学

微生物组最早的研究系统是人体,包括生活在人体表面和内部的共栖、共生和致病的所有微生物。人体微生物组(The human microbiome)已被归入人类基因组的一部分,并在人类健康中发挥着重要的作用。例如,人体肠道内微生物群落的稳定性显著影响人体健康,其群落结构也与肥胖^[5]和疾病^[6]密切相关。

通过将4对人类双胞胎的肠道菌群转接到无菌小鼠中,每对双胞胎包括一个肥胖患者和一个健康人,研究发现转接来自肥胖患者肠道微生物可导致无菌小鼠肥胖,而转接正常人群肠道微生物的无菌小鼠体重正常。将肥胖小鼠和正常小鼠置于同一个透明罩内,肥胖小鼠的体重会趋于正常,且肠道菌群结构与正常小鼠相似。证明不良肠道菌群可能是导致肥胖的原因之一^[7]。

另一个研究范例是慢性复发性多病灶性骨髓炎(Chronic recurrent multifocal osteomyelitis, CRMO),这是一种主要发生于儿童的自身炎症性疾病,目前尚无明确的治疗方法,多以非甾体抗炎药止痛治疗。通过构建携带CRMO致病基因的小鼠模型,发现小鼠食物营养成分可显著影响特定肠道微生物的数量,如普雷沃菌属 *Prevotella*。而 *Prevotella* 菌与骨髓炎、关节炎、牙周炎等炎症性疾

病密切相关。同时,通过调节饮食限制肠道中 *Prevotella* 菌的生长,可以预防突变小鼠的骨髓炎病症;而且移植健康小鼠的肠道菌,也能保护携带致病突变的小鼠免于发病,从而证实了肠道菌群与骨髓炎之间存在关联^[6]。

艰难梭菌 *Clostridium difficile* 一般寄生在人的肠道内,如果过度服用某些抗生素, *C. difficile* 的菌群增长速度加快,就会影响肠道中其他细菌,从而引发炎症。基于住院病人肠道菌群的数学模型分析,发现人体和小鼠中一种常见的细菌 *Clostridium scindens* 对 *C. difficile* 引发的感染具有抑制作用,可提高对感染的抗性,并通过临床研究、宏基因组学分析和数学建模方法确定了一株可用于治疗 *C. difficile* 感染的益生菌。这些研究结果为诊断、治疗 *C. difficile* 引发的病害提供了基础,并为抗菌药物的设计提供了新的方法^[8]。

因此,微生物组研究可为一些尚无治疗方法的疾病提供新的解决途径,如通过传统药物开发和新合成生物学的方法将微生物用于药物治疗^[9],且目前已经取得一定进展。将正常捐赠者排泄物的微生物菌群移植给复发性艰难梭菌感染(Recurrent *Clostridium difficile* infection, RCDI)患者,可快速调整肠道菌群结构,从而有效治疗 RCDI^[10]。这为其它疾病的治疗提供了思路,为人类疾病治疗提供了新的方法。

1.2 微生物组与农业

与人类微生物组相似,根际微生物组也与植物的健康息息相关,微生物群落的结构和功能决定着植物的健康状况^[11]。植物微生物组的发现对可持续农业的进步具有显著推动作用,例如基于微生物组概念研发的微生物菌剂可用于生物肥料或生防制剂等应用^[12-13]。

在农业生产中,通过人工接种对植物和土壤有益的微生物来改善根际环境系统,从而提高作物产量的做法由来已久^[14]。例如,将植物有益微生物(如固氮菌、磷降解菌、木霉菌和丛枝菌根真菌等)人工接种到植物根际可以有效防治植物病害^[13,15-17]。但

是由于受到多种环境因素的影响,在土壤中使用单一菌株常常被土壤抑菌作用抑制,这种人工接种的方法在农田条件下的防治效果并不稳定^[18]。已有研究报道,在土壤环境中进行生物防治的有效微生物并不是单独发挥作用的,而是受到多种微生物的影响^[19]。因此,农业微生物生物防治的研究重点由单一微生物菌株转向了微生物组的群体水平。

抑制性土壤(Suppressive soil)是自然界生物防治的典范,可不同程度影响病原物存活、侵染或繁殖。抑制性土壤又称抑菌土或衰退土,如果土壤中存在植物病原菌,且有较适宜的气候条件和寄主植物,但是病害不发生或者发病率很低,这样的土壤被称为抑菌性土壤。Chen (2007)研究发现,长期种植大豆感病品种可降低大豆孢囊线虫的种群数量与侵染水平,这样的土壤称为大豆孢囊线虫抑制性土壤^[20]。本实验室研究发现抑制性土壤中的孢囊数量明显减少,空孢囊数量明显增多,且发现该土壤具有传导性和生物源特性,抑制性土壤中引起大豆孢囊线虫种群数量减少主要是定殖于大豆孢囊线虫上真菌的作用^[21]。随着基因芯片和高通量测序技术的发展,越来越多的研究证明根际微生物对抑制性土壤形成具有重要的贡献。本实验室通过分析东北大豆孢囊线虫病株、健康株及生防菌剂处理后大豆根际细菌群落结构,初步证明大豆孢囊线虫病株、健康株和生防菌处理后的大豆植株根际细菌群落存在明显的差异,大豆可利用根际细菌群落来阻止大豆孢囊线虫侵染或外来生物的危害^[22]。通过研究不同连作时间大豆孢囊中的细菌群落结构,发现连作时间少于8年的大豆孢囊细菌群落与连作8年以上的细菌群落显著不同,证明大豆连作时间影响微生物的组成,与抑制性土壤的形成具有一定关系^[23]。通过高通量测序,我们发现在大豆孢囊线虫抑制性土壤中的细菌如 Actinobacteria、Bacteroidetes、Proteobacteria 和真菌子囊菌 Ascomycota 远高于导病土,将抑制性土壤和导病土混合可大大提高子囊菌 Ascomycota 的种群数量,而且一些具有生物防治功能的真菌如 *Pseudomonas*、

Purpureocillium、*Pochonia* 等属在长期连作大豆根系土壤中的含量显著高于连作时间较短的样本, 这些微生物可能是抑制性土壤发挥作用的重要类群, 我们称之为大豆孢囊线虫抑制性土壤的核心微生物组(Core microbiome)^[24]。虽然微生物种类和数量在不同连作时间的土壤中有所波动, 但我们发现 *Purpureocillium lilacinum* 和 *Pseudomonas* spp. 在抑制性土壤中的丰度随着连作时间增加而显著升高, 它们可能属于抑制性土壤的核心微生物种(Core taxa)^[24]。这些结果说明大豆根际微生物对大豆孢囊线虫抑制性土壤形成具有重要影响。

目前的研究已经实现肠道环境人工培养核心微生物组的精确转移^[7], 然而这种技术尚未在根际环境中实现。由于肠道微生物组和根际微生物组之间具有极高的相似性^[11], 实现根际环境中核心微生物组的人工转移可行性很高。这些研究不仅印证了微生物群体的重要性, 且核心微生物组的提出和应用也为将来功能菌群的研究奠定了基础。

1.3 微生物组与工业

微生物组在工业(尤其在污染物处理和酿造业)中也有很重要的应用价值, 其中应用最广泛的是环境有机污染物的微生物处理。目前对环境有机污染物有 3 种处理方式, 即物理、化学和生物处理。由于生物处理中的微生物法成本低、效果好、操作简单且不会引发二次污染, 因此受到国内外学者广泛的关注。微生物处理方法的这些优点在对多种有机污染物的降解和转化方面有着巨大潜力。应用基因组学和微生物组学方法, 可以充分利用微生物来解决能源危机、环境污染、温室气体排放等问题。通过对降解生物质微生物的基因组测序(如里氏木霉 *Trichoderma reesei*) 以及植物根际微生物组测序(如玉米), 为发掘微生物处理方法的应用提供了前提。

中国大曲酒是世界上香味组分最丰富的蒸馏酒。独特的发酵工艺和大曲酒微生物的多样性造就了中国大曲酒的多种香型以及繁杂的香味组分物质。通过大曲酒的微生物组学研究, 一方面可以对

大曲酒微生物及其基因和酶资源进行发掘, 从中筛选得到影响大曲酒发酵的功能酶和功能菌; 另一方面对微生物生态学研究可以从整体微生物群落水平来研究大曲酒微生物, 揭示不同大曲酒的微生物群落多样性及其变化, 从而全面了解大曲酒微生物群落的代谢机理和形成大曲酒与众不同的香味组分的构成和风味特征^[25]。除酒曲微生物外, 白酒生产地域周边土壤对于窖底泥的形成具有一定的影响。酱香型白酒厂周边土壤中的微生物多样性极其丰富, 相比窖底泥中的微生物组成更加复杂, 土壤微生物为窖底泥驯化提供了重要的微生物来源^[26]。通过对两个酒厂新老窖池不同取样位置的窖泥样品原核生物群落结构和理化性质测定, 表明窖池老熟过程本质上是窖泥理化性质与其中微生物群落多样性交互作用的过程^[27]。对白酒微生物组的研究为深入了解白酒酿酒工艺及影响因素打下了坚实基础。

1.4 微生物组与生态

微生物可以通过各种方式在不同的生态系统间转移, 与其它微生物群落进行交流。微生物还可以与同种或不同种之间采用多种机制进行基因复制和基因交换。在这个过程中, 微生物之间通过直接接触、利用质粒或其它可移动遗传元素、由噬菌体等病毒介导或者直接获取环境中裸露的 DNA 等方式进行基因复制和基因交换, 这些基因交换过程称为水平基因迁移(Horizontal gene transfer, HGT)。最近的研究表明, 人类微生物组水平基因迁移频率最高, 其次为家禽和家畜微生物组, 且多数水平基因迁移涉及抗性相关基因, 例如病原菌出现抗生素耐药性的过程^[28]。因此, 生态系统中存在的水平基因迁移等现象可能与微生物组有关。

微生物组还可以影响环境系统的功能。例如, 菌根真菌的多样性可改变植物生物量和土壤的营养^[29]; 通过河流沉积物的转移实验, 证明微生物组成对河流沉积物的功能也有影响^[30]。生态系统微生物组的分析可以应用于草原恢复、调查人类对生态系统的影响等^[30-33]。此外, 大于 73% 的海洋微生物

组与人类肠道微生物类似, 但海洋微生物组具有更高的遗传多样性和功能多样性, 约是人体肠道微生物组的 4 倍^[31], 因此通过海洋生态微生物组的研究或许可揭示生命的起源。

1.5 微生物组研究趋势

高通量测序和生物信息学已经阐明了微生物群落的组成和结构, 但微生物组怎样以群落的形式发挥功能, 如何与寄主和环境互作, 如何有效改善健康或生态系统, 这些问题尚不明。目前微生物组学研究主要针对微生物组多样性及系统功能^[34], 比如: 健康、稳定的微生物组有什么特征? 微生物组中有哪些关键基因、蛋白质或代谢产物, 有什么功能? 群落是怎样聚集成的? 环境因素是怎样影响微生物组的? 微生物如何保护植物和动物宿主免受病害侵染? 由于微生物组多样性高、分布广, 这些问题受到方法、技术或概念的局限。因此, 需要不断更新研究方法, 包括数据收集方法、分析技术、参考基因序列、参考数据库等。

另外, 由于不同生态系统研究者之间的协作较少, 导致科学领域的分裂和缺乏多种微生物组的研究合作^[4]。所以, 急需建立国际微生物组项目来指导微生物组研究的发展, 促进各学科合作, 创办论坛, 发展一个共同的研究议程, 实现从地方到全球的对比分析^[35]。

2 合成功能菌群

de Roy 等在 2008 年将合成功能菌群定义为两种或多种已知微生物在特定的可控环境条件中形成的共培养体系^[36]。Großkopf 等在 2014 年将合成功能菌群定义为在成分明确的基质条件下, 人工创建的两个或多个物种共培养微生物群体^[3]。合成功能菌群的主要特征是其中的微生物能够通过相互交流和分工行使不同的复杂功能, 且更加适应环境变化等^[37]。因此合成功能菌群不仅可以用来探索微生物群落的性能和稳定性, 还可以用于研究种群相互作用(如共生或竞争), 以及复杂的动态系统的结构、功能和演化。合成功能菌群相对于自然微生物

群落和单菌株来说有很多优势: (1) 自然微生物群落往往由许多功能未知的微生物混合组成, 而合成功能菌群中的物种是已知的, 组成相对比较简单且可控性较高; (2) 因为群落中的微生物存在种间的交流和差异, 相较于单一纯培养物, 微生物群体更能适应易变的环境, 实现更复杂的功能; (3) 微生物群落可以根据不同的代谢途径进行分工, 通过个体功能的优化来减少细胞的代谢负担^[37-39]; (4) 功能菌群在生物技术生产过程中对环境的影响具有更强的适应能力^[40-41]; (5) 由于人工设计的群体比自然菌群结构简单, 因此可以通过数学模型描述来构建和证明更复杂的系统模型。

微生物生态学方法的快速发展, 以及微生物基因表达和代谢分析, 加速了我们对于微生物群落组成、功能和互作的理解^[42], 同时也为合成功能菌群的应用提供了前提, 例如选择性地富集培养某种特定功能微生物(如某种代谢物的产生菌), 或通过筛选环境微生物来发现新的药物。目前已经有一些研究通过细胞间的交流和功能分化在实验室条件下构建合成功能菌群, 主要通过将自然群落中已知微生物进行整合和互作来设计合成功能菌^[37,43]。我们认为合成功能菌群的构建有 3 个基本要素: (1) 安全性是构建菌群的首要前提, 因此需要采用对环境无害的微生物来设计出健康、环保的合成功能菌群; (2) 考虑到生产成本, 可以将低成本材料或废弃物通过复杂的代谢途径转化为生物技术产品; (3) 为了构建结构和功能稳定的功能菌群, 需深入分析和研究不同微生物的分工和稳定性, 优化和调控生物处理过程。合成生物学家通过微生物群体研究, 将微生物组研究应用于实际生产中, 如微生物药物、微生物燃料的生产等。

合成功能菌群因其物种组成和作用机制明确, 可控性和稳定性较好, 近年来已受到广泛关注和应用。

2.1 合成功能菌群和工业发酵

合成功能菌群在工业发酵过程中具有重要作用。生物发酵乙醇工业生产的主要原材料是玉米、

甘蔗和甜菜,主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。由于缺乏可以将木质纤维素高效转化为乙醇的微生物,乙醇转化率相对较低,因此构建由多种微生物组成的高效降解菌群迫在眉睫^[44]。2007年 Patle 等创建了由发酵单胞菌和假丝酵母组成的木质纤维素高效转化体系,转化率达 97.7%,大大提高了乙醇的产量和产率,降低了生产成本^[45]。

以酸奶发酵为例,在传统发酵业中,人们将自然发酵形成的酸奶作为发酵剂,利用酸奶中自然微生物群落进行发酵。但是由于环境因素的影响,发酵产物性质不稳定,且其中的腐生菌也会降低产品的贮藏时间,因此人们分离出其中的功能菌群并加以利用。最早由 Lister 从酸奶中分离出乳酸链球菌,提纯后可作为发酵剂来生产发酵乳制品。这种方式相对于前者来说较为方便和稳定,发酵条件也易于控制,但依然存在发酵周期长、发酵菌种易退化和污染等缺点。发展至今,已筛选出多种具有优良特性的乳酸菌,目前工业生产和自制酸奶经常使用的发酵剂一般由嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌组成^[46],通过浓缩培养可以在较短的时间内生产出风味纯正的酸奶。

2.2 合成功能菌群和化合物合成

合成功能菌群已广泛应用于化合物合成。利用古龙酸菌 *Ketogulonicigenium vulgare* 和巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 组成的功能菌群进行维生素 C 前体 2-KGA 的工业生产,巨大芽孢杆菌的细胞溶菌作用为古龙酸菌生长和 2-KGA 的生产提供必需关键元素^[47]。在淀粉制氢生产过程中,虽然单菌株生产比混合菌株的氢气产量更高,但单菌株生产需要在无菌条件下进行,且共培养不需要预水解就可降解淀粉^[48],因此合成功能菌群的生产成本远低于单菌株生产;而目前的合成功能菌群,如巴氏梭菌 *Clostridium pasteurianum* 和费新尼亚浸麻梭菌 *C. felsineum*、丁酸梭菌 *C. butyricum* 和巴氏梭菌 *C. pasteurianum*,在不同碳源的氢气生产方面比单一菌株表现更好。因此合成功能菌群在淀粉制氢过程中具有明显优势。

2.3 合成功能菌群和生物修复

合成功能菌群的另一个应用领域是通过人工添加具有降解特定污染物功能的微生物对污染地区进行生物修复。鉴于一些污染物结构非常复杂,添加合成功能菌群的修复效果远远高于单一微生物,如农药利谷隆的生物降解^[49]。利谷隆生物降解体系主要由多噬菌 *Variovorax* sp.、食酸丛毛单胞菌 *Delftia acidovorans* 和假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 组成。多噬菌 WDL1 可以将利谷隆作为营养来源进行降解,食酸丛毛单胞菌 WDL34 和假单胞菌 WDL5 虽然无法降解利谷隆,但可作为降解媒介。这 3 种菌株形成合成群落时,多噬菌与另外两种细菌的协同作用可以显著提高利谷隆降解率。另一污染物 4-氯水杨酸酯(4-Chlorosalicylate)的降解也利用了合成功能菌群,只有 *Pseudomonas reinekei* (MT1)、*Wautersiella falsenii* (MT2)、*Achromobacter spanius* (MT3)、*P. veronii* (MT4)同时存在时才能降解此化合物^[50]。

2.4 合成功能菌群和生物防治

目前,基于微生物群落生态学原理,人工合成的功能微生物菌群在抵御有害生物入侵、控制土壤病害和增加植物生物量等方面发挥着越来越重要的作用。合成并利用生物兼容性好且生防作用方式互补、增效的功能型复合微生物菌群不仅可以改善单一生防菌株在大田环境中适应性不足的缺点,也是提高土传病害生防效果的有效途径^[51]。根结线虫是一类重要的土传性病原物,对露地和温室蔬菜造成严重的经济损失。我们通过平板试验,对本实验室前期筛选的杀线虫优良菌株淡紫拟青霉 YES-2、红灰链霉菌 *S. rubrogriseus* HDZ-9-47 及植物根际促生菌苍白杆菌 NC1 三个功能菌株的生物兼容性进行系统评价,构建出一组生物兼容性好、作用方式互补的功能型复合微生物菌群;并以各功能菌株发酵菌体为活性成分,研制出一种防治黄瓜根结线虫的功能型复合微生物菌剂^[51]。通过大田试验评价该复合菌剂对黄瓜根结线虫的防效及植株生物量和产量的影响,结果表明,施用该复合菌剂的土壤线

虫扩繁指数最低; 移栽后 38 d 和 105 d, 该复合菌剂处理的根结级数分别为 2.0 和 4.6, 对病害防效为 56.5% 和 42.5%, 效果优于 10% 噻唑膦处理; 施用该复合菌剂可以促进植株生长、增加黄瓜产量^[51]。本实验室的研究不仅为蔬菜根结线虫病的生物防治提供了新思路, 也为微生物组在农业生物防治的应用打下了基础。

3 研究方法

微生物组和功能菌群的主要研究方法包括高通量多样性分析、宏组学方法以及数学模型预测等。

3.1 高通量多样性分析

高通量测序技术(High-throughput sequencing)能一次并行对数十条到数百万条 DNA 分子进行序列测定, 又称为“下一代”测序(Next-generation sequencing)或深度测序(Deep sequencing)^[43]。高通量测序可以检测到环境中的未培养微生物及痕量微生物, 因其高通量、高准确性、高灵敏度和低运行成本等特点而备受关注。

高通量测序技术已经广泛应用于各种环境中微生物群落的多样性研究, 如土壤^[52]、海洋^[53]等。此外, 该技术还可以进行大规模基因组测序^[54], 用于基因表达分析^[55]、非编码小分子 RNA 的鉴定^[56]、转录因子靶基因的筛选^[57]和 DNA 甲基化^[58]等相关研究。

尽管高通量分析技术用途广泛, 它也有其局限性。如在研究与动植物互作的微生物群落时, 可能会检测出不需要的动、植物 DNA, 从而降低所需微生物信息的数据量。为了避免动、植物序列的干扰, 我们可以增加引物的特异性或提高高通量的数据获取能力来获得更多的信息量。随着技术的进步和发展, 高通量分析技术会逐步完善。

3.2 宏组学方法

宏组学方法(Meta-omics)涵盖了宏基因组学(Metagenomics)、宏转录组学(Metatranscriptomics)和宏蛋白质组学(Metaproteomics)。

宏基因组学又叫元基因组学, 是在微生物基

因组学的基础上发展起来的一种研究微生物多样性、开发新生理活性物质(或获得新基因)的新理念和新方法。宏基因组学摆脱了传统研究方法的束缚, 针对环境样品中微生物的基因组总和进行研究^[59], 为研究不同环境中微生物之间或微生物与周围环境间相互影响开辟了新的途径。宏转录组学从转录与表达水平上对微生物群落进行进一步研究, 解决了宏基因组学不能揭示微生物区系在特定时空环境下基因动态表达和调控等相关问题。宏蛋白质组学主要研究环境混合微生物群落中所有生物的蛋白质组总和^[60], 可以通过揭示微生物群落中蛋白质间相互关系、蛋白质组成与丰度以及蛋白质不同的修饰, 认识群落的种内关系、营养竞争关系及群落发展等^[61], 从而促进对微生物组更全面的理解。结合宏基因组、宏转录组和宏蛋白质组学方法, 不仅可以推测微生物组的潜在功能, 还可以发现微生物组的功能活性^[62]。

目前, 宏组学已经成为微生物研究的热点和前沿, 应用于各种各样的环境, 包括土壤、海洋和人类肠道样本等, 取得了显著成果。随着全宏基因组鸟枪法(Whole-metagenome shotgun, WMS)测序技术的发展, 宏组学的研究内容已从只能体现一个样本特征的高深度测序转向可体现不同样本间差异的大样本量测序, 由某一个时间点的样本测序转向响应不同外界环境的动态过程测序^[62]。然而目前的宏组学研究方法还存在一定的缺陷和不足, 对环境样本的宏组学分析虽然可以了解该样本中所有测序基因的多样性及功能, 但无法解析某个微生物个体的所有基因及功能, 这为探索环境中的功能微生物带来了极大的困难。我们期待单细胞基因组测序(Single-cell genome sequencing)等新方法可以解决这些难题^[63]。

3.3 预测数学模型方法

预测数学模型的构建是微生物学、统计学和数学等学科的结合, 通过对微生物组进行数学建模, 可以预测和描述微生物的生长和互作^[64]。预测数学模型不仅有助于理解自然微生物群落和功能菌群

的自然属性以及动态变化的基本原则,也为功能菌群的改造奠定了理论基础^[65]。微生物代谢互作的系统建模还可以为肠道微生物的预测提供基础,为功能菌群的设计及个性化的微生物组药物和医疗提供必要前提^[66],功能菌群的设计也将依赖于现代材料科学和数学建模^[67]。

4 展望

微生物组在动植物乃至人类健康、气候变化的减缓、产业创新的促进等方面均发挥着至关重要的作用,微生物组研究具有重要理论价值;而合成功能菌群的应用能实现对微生物组更简便和高效的利用,从而将理论基础转化到实践应用中来。近年的研究已初步阐述了人类、动物和植物环境中微生物组的结构和动态变化,并应用于人体的营养和疾病、土壤或水生环境的稳定性、植物的营养获取和压力耐受以及工业能源的开发和利用等方面。随着研究的深入,相信从微生物组到功能菌群的应用会是未来研究及应用领域的新趋势。

参 考 文 献

- [1] Li GJ, Liu JS, Li BY, et al. New methods and techniques for the isolation and culture of microorganisms[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009(11): 10-11 (in Chinese)
李国娟, 柳纪省, 李宝玉, 等. 微生物分离与培养的新方法与新技术[J]. 畜牧兽医科技信息, 2009(11): 10-11
- [2] Sun X, Gao Y, Yang YF. Recent advancement in microbial environmental research using metagenomics tools[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 393-400 (in Chinese)
孙欣, 高莹, 杨云锋. 环境微生物的宏基因组学研究新进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 393-400
- [3] Großkopf T, Soyer OS. Synthetic microbial communities[J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 18: 72-77
- [4] Offresident EO. The federal science, technology, engineering, and mathematics (stem) education portfolio. A report from the federal inventory of stem education fast-track action committee on stem education national science and technology council[J]. Executive Office of the President, 2011: 117
- [5] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023
- [6] Lukens JR, Gurung P, Vogel P, et al. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease[J]. Nature, 2014, 516(7530): 246-249
- [7] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. Science, 2013, 341(6150): 1241-1244
- [8] Buffie CG, Bucci V, Stein RR, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*[J]. Nature, 2015, 517(7533): 205-208
- [9] Garber K. Drugging the gut microbiome[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 228-231
- [10] Song Y, Garg S, Girotra M, et al. Microbiota dynamics in patients treated with fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81330
- [11] Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486
- [12] Berg G, Zachow C, Müller H, et al. Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture[J]. Agronomy, 2013, 3(4): 648-656
- [13] Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(1): 11-18
- [14] Gopal M, Gupta A, Thomas GV. Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 355
- [15] Antoun H. Plant-growth-promoting *Rhizobacteria*[A]/Brenner S, Miller J F. Brenner's Encyclopedia of Genetics[M]. 2nd Edition. New York: Academic Press, 2013: 353-355
- [16] Qiu MH, Li SQ, Zhou X, et al. De-coupling of root-microbiome associations followed by antagonist inoculation improves rhizosphere soil suppressiveness[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(2): 217-224
- [17] Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(5): 489-499
- [18] Bakker MG, Manter DK, Sheflin AM, et al. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management[J]. Plant and Soil, 2012, 360(1/2): 1-13
- [19] Mendes R, Kruijt M, De Bruij I, et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. Science, 2011, 332(6033): 1097-1100
- [20] Chen SY. Suppression of *Heterodera glycines* in soils from fields with long-term soybean monoculture[J]. Biocontrol Science and Technology, 2007, 17(2): 125-134
- [21] Sun MH, Liu XZ. Suppressive soils of soybean cyst nematode in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2000, 30(4): 353-356, 363 (in Chinese)
孙漫红, 刘杏忠. 连作土壤中大豆孢囊线虫种群数量减少的原因探讨[J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 353-356, 363
- [22] Zhu YB, Tian JQ, Shi FY, et al. Rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Heterodera glycines*-infected soybean roots[J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 58: 32-37
- [23] Zhu YB, Shi FY, Tian JQ, et al. Effect of soybean monoculture on the bacterial communities associated with cysts of *Heterodera glycines*[J]. The Journal of Nematology, 2013, 45(3): 228-235
- [24] Hamid MI, Hussain M, Wu YP, et al. Successive soybean-monoculture cropping assembles rhizosphere microbial communities for the soil suppression of soybean cyst nematode[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016. DOI:10.1093/femsec/fiw222
- [25] Huang ZX. The application of metagenomics in the research on microbial community in Daqu liquor production[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2009(10): 17-21 (in Chinese)
黄祖新. 宏基因组学及其在大曲酒微生物研究中的应用[J]. 酿酒科技, 2009(10): 17-21
- [26] Lei ZH. Primary analysis on the fermented microorganism of Fen-flavor liquor by high-throughput sequencing[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(9): 164-167 (in Chinese)
雷振河. 采用高通量测序技术分析清香型白酒酿造微生物[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(9): 164-167
- [27] Li KY, Wen Z, Deng B, et al. High-throughput sequencing using in research for community diversity of prokaryotes in pit mud of different ages[J]. The Food Industry, 2016, 37(6): 121-125 (in Chinese)

- Chinese)
李克亚, 文章, 邓斌, 等. 不同窖龄窖泥原核生物多样性的高通量测序研究[J]. 食品工业, 2016, 37(6): 121-125
- [28] Smillie CS, Smith MB, Friedman J, et al. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome[J]. Nature, 2011, 480(7376): 241-244
- [29] Van Der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity[J]. Nature, 1998, 396(6706): 69-72
- [30] Reed HE, Martiny JBH. Microbial composition affects the functioning of estuarine sediments[J]. The ISME Journal, 2012, 7(4): 868-879
- [31] Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, et al. Ocean plankton. Structure and function of the global ocean microbiome[J]. Science, 2015, 348(6237): 1261359
- [32] Singh BK, Bardgett RD, Smith P, et al. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(11): 779-790
- [33] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-1031
- [34] Martiny JBH, Jones SE, Lennon JT, et al. Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective[J]. Science, 2015, 350(6261): aac9323
- [35] Dubilier N, McFall-Ngai M, Zhao LP. Microbiology: Create a global microbiome effort[J]. Nature, 2015, 526(7575): 631-634
- [36] de Roy K, Marzorati M, Van Den Abbeele P, et al. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(6): 1472-1481
- [37] Biliouris K, Babson D, Schmidt-dannert C, et al. Stochastic simulations of a synthetic bacteria-yeast ecosystem[J]. BMC Systems Biology, 2012, 6: 58
- [38] Pandhal J, Noirel J. Synthetic microbial ecosystems for biotechnology[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(6): 1141-1151
- [39] Markx GH, Andrews JS, Mason VP. Towards microbial tissue engineering?[J]. Trends in Biotechnology, 2004, 22(8): 417-422
- [40] Brenner K, You LC, Arnold FH. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(9): 483-489
- [41] Jagmann N, Philipp B. Design of synthetic microbial communities for biotechnological production processes[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 184: 209-218
- [42] Orphan VJ. Methods for unveiling cryptic microbial partnerships in nature[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(3): 231-237
- [43] Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. Nature Methods, 2008, 5(1): 16-18
- [44] Chen YL. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(5): 581-597
- [45] Patle S, Lal B. Ethanol production from hydrolysed agricultural wastes using mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Candida tropicalis*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(12): 1839-1843
- [46] Huang LC, Lü XL, Xing XH. Research progress of yoghurt starter[J]. Modern Food Science and Technology, 2001, 17(3): 43-46 (in Chinese)
黄良昌, 吕晓玲, 邢晓慧. 酸奶发酵剂的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2001, 17(3): 43-46
- [47] Ma Q, Zhou J, Zhang WW, et al. Integrated proteomic and metabolomic analysis of an artificial microbial community for two-step production of vitamin C[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26108
- [48] Masset J, Calusinska M, Hamilton C, et al. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp.[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 35
- [49] Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, et al. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1532-1541
- [50] Pawelczyk S, Abraham WR, Harms H, et al. Community-based degradation of 4-chlorosalicylate tracked on the single cell level[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 75(1): 117-126
- [51] Ji Y, Wu YP, Wang Y, et al. Study on the efficiency of functional multi-microbial agent against root-knot nematode *Meloidogyne* spp. on cucumber[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(4): 493-502 (in Chinese)
冀宇, 武云鹏, 王胤, 等. 功能型复合微生物菌剂防治黄瓜根结线虫的研究[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(4): 493-502
- [52] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. The ISME Journal, 2007, 1(4): 283-290
- [53] Huber JA, Welch DBM, Morrison HG, et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere[J]. Science, 2007, 318(5847): 97-100
- [54] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing[J]. Nature, 2008, 452(7189): 872-876
- [55] Eveland A, Satoh-Nagasawa N, Goldshmidt A, et al. Digital gene expression signatures for maize development[J]. Plant Physiology, 2010, 154(3): 1024-1039
- [56] Lu C, Tej SS, Luo SJ, et al. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome[J]. Science, 2005, 309(5740): 1567-1569
- [57] Wang XC, Wen QW, Teng C, et al. Overexpression of *PGA37/MYB118* and *MYB115* promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*[J]. Cell Research, 2009, 19(2): 224-235
- [58] Cokus SJ, Feng SH, Zhang XY, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning[J]. Nature, 2008, 452(7184): 215-219
- [59] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): R245-R249
- [60] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2541-2547
- [61] Dai X, Zhu YX, Luo YF, et al. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40430
- [62] Franzosa EA, Hsu T, Sirota-madi A, et al. Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 360-372
- [63] Prosser JI. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbial ecology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(7): 439-446
- [64] Li BL, Guo JF, Ou J. Research approach of microbial modeling on predictive microbiology[J]. Food Science, 2004, 25(11): 52-57 (in Chinese)
李柏林, 郭剑飞, 欧杰. 预测微生物学数学建模的方法构建[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 52-57
- [65] Song HS, Cannon WR, Beliaev AS, et al. Mathematical modeling of microbial community dynamics: a methodological review[J]. Processes, 2014, 2: 711-752
- [66] Ji BY, Nielsen J. From next-generation sequencing to systematic modeling of the gut microbiome[J]. Frontiers in Genetics, 2015, 6: 219
- [67] Larsen PE, Gibbons SM, Gilbert JA. Modeling microbial community structure and functional diversity across time and space[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 332(2): 91-98