

环境微生物群落结构与功能多样性研究方法

刘开朗, 王加启*, 卜登攀, 李 旦, 于 萍, 赵圣国

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:微生物群落的结构及群落内种间相互作用是影响其生态功能的决定性因素。尽管微生物群落是地球生物化学循环的主要驱动者,但是由于传统的微生物培养方法只能分离约 1%—10% 的环境微生物,对复杂的环境微生物群落结构和功能多样性了解甚少。元基因组学、单细胞分析和群落遗传学等方法的出现,及其与微生物学的交叉融合,使得人们能够从微生物群落组成、物种功能、种间相互作用和预测模型等方面分析微生物群落。重点综述了元基因组学、单细胞分析和群落遗传学等方法及其在环境微生物群落结构和功能多样性中的应用进展。

关键词:群落生态学;群落遗传学;种间相互作用;元基因组学;鲁棒性

文章编号:1000-0933(2010)03-0001-07 中图分类号: 文献标识码:A

Current progress in approaches to the study of structure and function diversities of environmental microbial communities

LIU Kailang, WANG Jiaqi, BU Dengpan, LI Dan, YU Ping, ZHAO Shengguo

State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(3): 0001—000.

Abstract: Microbial community structure and interspecies interactions are the key factors that determine the function of the community. Although these communities are the major drivers of many biosphere processes, due to the fact that only 1%—10% of natural microbes could be recovered by classical culture-dependent methods, relatively little is known about their structure and function. Some recently emerged novel methods, e. g. metagenomics, single cell analysis and community genetics enable researcher could decipher the ecological properties of microbial communities on the basis of the questions being asked: the composition of the community, the function of individual species, the model of interspecies interaction and predictive modeling at the community level. In the present review, we describe the current concept and application of metagenomics, single cell analysis and community genetics to study microbial ecology and progress toward predictive modeling.

Key Words: community ecology; community genetics; interspecies interaction; metagenomics; robustness

微生物以群落的形式存在于自然环境中,微生物群落是地球生物化学循环的主要驱动者。微生物群落的生态特征可分为结构特征和功能特征,其中结构特征描述微生物群落成员的种类、丰度及其在不同环境条件下的更替,而功能特征则描述群落的行为:底物代谢过程;与宿主或环境以及群落内其他成员的相互作用;以及对外界干扰的反应等。微生物群落的种群结构及种间相互作用是影响其生态功能的决定因素。

20 世纪 70 年代以前,对微生物群落的研究主要依赖传统的分离培养方法,依靠形态学、培养特征、生理生化特性的比较进行分类鉴定和计数。但是,由于可培养微生物仅为自然界微生物总数的 1%—10%,因此,

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD04A03);动物营养学国家重点实验室自主研究课题资助项目(2004DA125184(团)0801)

收稿日期:2008-12-30; 修订日期:2009-05-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wang-jia-qi@263.net

分离培养方法对环境微生物群落结构及多样性的认识是不全面和有选择性的。近年来,随着实验生物学、生物信息学和系统生物学等学科的发展及其与微生物学领域的交叉融合,极大地促进了微生物生态学的研究,为克服微生物分离纯化培养的限制,全面反映微生物群落的结构和功能特征提供了新的技术手段。

1 微生物群落结构特征和鲁棒性

微生物群落的种群多样性一直是微生物生态学研究的重点。近几年来,环境微生物群落结构和鲁棒性成为研究的热点。群落结构不仅决定了群落的生态功能性,而且结构的稳定性是实现功能鲁棒性的重要基础。因此,通过对环境微生物群落的种群结构和多样性进行解析并研究其动态变化,可以为优化群落结构、调节群落功能和发现新的重要微生物功能类群提供可靠的依据。

1.1 结构特征

微生物群落的结构特征指的是群落的组成种类及其丰度。由于环境中大量(约占90%—99%)微生物仍然无法培养,因此,与依赖于培养的传统微生物学研究方法相比,不依赖于培养的分子生态学方法能够更完整地反应群落的丰度。小核糖体RNA(16S rRNA)是常用的微生物分类和进化标记基因,但是16S克隆文库只能代表自然环境微生物群落中的部分种类,因此16S克隆文库数据常被用于预测群落丰度。预测结果在很大程度上取决于预测方法和数据类型^[1],EstimateS和DOTUR是常用的两个预测软件。DOTUR能够根据系统发育距离将各序列划分为分类操作单位(*operational taxonomic unit, OTU*),并计算不同序列相似性水平上物种的丰度,已经被广泛用于环境微生物群落结构的预测^[1]。

群落结构与群落多样性有所区别,两者分别反映了群落的不同特征。多样性指数是评价微生物群落中物种丰度和均度的常用参数,而群落结构反映的是物种组成以及各物种的丰度。在微生物生态学研究中,群落多样性指数和结构参数主要都用于微生物群落的比较分析;研究表明群落结构与群落多样性之间并没有必然联系。例如,转基因植物的引入和菌根复育均可影响菌根微生物群落的结构,但对多样性没有影响^[2-3]。

除了从整体上分析微生物群落外,对群落内不同水平生态位和集团的分析也具有重要的意义。集团是群落中以相似方法利用相同资源的物种种群的集合,这些种群组合在一起形成特定类群。在研究中,集团的概念使得研究者能够将复杂的微生物群落分为具有特定生物功能的类群,便于分析其结构和功能特性^[4]。例如,在沉积物、淡水污泥以及动物和昆虫消化道等环境中,复杂有机物的厌氧发酵就是由初级发酵细菌、次级发酵细菌(也称为质子还原互养菌)和两种产甲烷古菌等集团协同完成的,其活性和结构均随着时间甲烷可利用程度的变化而波动。

1.2 鲁棒性

微生物群落的鲁棒性指的是群落在外界干扰因素影响下保持功能和结构稳定性的能力。事实上,生物系统的鲁棒性非常广泛,它普遍存在于生物种群、整体、器官、细胞、分子等各种层次。生物系统总是处在变化的环境中,但是它可以保持一个相对稳定的内环境,使其在各种环境下都能生存。因此,生物鲁棒性最能体现在生物系统对环境的适应上。在高度鲁棒性的系统中,即使系统的结构受到了损伤,系统的行为也只产生很微小的变化。这种鲁棒特性是通过系统的反馈、冗余、模块和结构稳定来实现。

微生物群落的鲁棒性可以分为结构鲁棒性和功能鲁棒性两个方面。Ainslie等将微生物群落的结构鲁棒性定义为群落结构在时间尺度上的一致性(时间稳定性)、在外界扰动下保持结构稳定的能力(抵抗力)以及结构变化后恢复原有结构的能力(恢复力)等3个方面^[5]。一般而言,现有的研究大部分仅涉及其中的一个方面,其中研究得最多的是时间稳定性。

功能鲁棒性指的是微生物群落在扰动下保持特定活性的能力。尽管大量研究表明功能稳定性与结构稳定性之间存在相关性,但是功能稳定性与群落的组成并无必然联系^[6-9]。在土壤中添加少量酿酒残渣堆肥时,土壤微生物群落可表现出结构和功能恢复力;随着酿酒残渣堆肥添加量的提高,微生物群落被破坏,无法恢复其原有活性^[10]。Yannarell等^[11]研究了飓风对巴哈马群岛微生物席的影响,发现尽管飓风破坏了原有的微生物群落结构,但是其固氮能力却逐渐恢复至原有水平。

结构鲁棒性和功能鲁棒性之间的关系是一个长期以来存在争议的话题^[12-13],争论的焦点主要集中在群落多样性与稳定性之间是否存在正相关或负相关关系。在宏观生态学中,许多学者探讨了多样性与生产力的关系^[14-16],但由于研究者生态学背景、试验条件、试验方法和分析方法的不同以及研究对象的错综复杂等原因,对于多样性与生产力的关系很难得出普遍适合的结论,甚至存在着对立的观点。在微生物生态学中,此类研究尚不多见。

Girvan 等^[17]采用变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和稳定同位素研究了苯和铜离子对两个不同多样性水平土壤微生物群落的结构稳定性和功能恢复力的影响。发现苯处理导致两个群落二氯苯酚代谢速率下降,但是多样性水平较高的群落在9周试验期内重新恢复了原有的二氯苯酚代谢速率,表明微生物群落的多样性与功能恢复力之间存在正相关关系。这些结果表明微生物群落的多样性和外界扰动来源是功能鲁棒性的重要影响因素,也表明土壤微生物群落的功能恢复力部分来自于功能冗余,但是多样性水平的提高也可能有助于提高抵抗力与功能稳定性。这与 Tilman 等^[14]在宏观生态学中获得的结论是类似的。但是,就微生物生态学而言,还需要更多的研究才能够进一步分析多样性与功能鲁棒性之间的关系。

2 微生物群落生态学研究方法

微生物群落生态学仍然处于发展初期,目前大部分研究的方法都是从环境中分离微生物,然后分析微生物-微生物或微生物-宿主之间的相互作用。这是分析微生物群落中复杂种间相互作用的基础。但是,依赖于分离培养的方法可能存在不足甚至错误,无法应用于复杂微生物群落的分析。目前,元基因组学、单细胞分析和群落遗传学等方法的出现和与微生物生态学的交叉融合使得人们能够从微生物群落组成、物种功能、种间相互作用和预测模型等方面分析微生物群落的生态特征。

2.1 群落组成

群落组成是微生物群落的基本特点,也是其功能作用的基础。目前,微生物群落组成的研究方法主要可以分为依赖于培养的方法和不依赖于培养的方法。

(1) 依赖于培养的方法 传统的微生物研究是通过纯培养获得菌株后,对其特性进行描述。然而,由于无法重现微生物的天然环境条件、缺少微生物种间相互作用,使得约有90%—99%的环境微生物无法培养^[18]。由于纯培养是研究微生物表型特征和细胞过程的前提,因此这一限制使得微生物特征很难被具体描述。此外,传统分析方法为微生物进化关系的研究提供的信息很有限,导致难以对微生物进行精确分类。

(2) 不依赖于培养的方法 近年来,以16SrRNA分析为基础的未培养微生物研究技术的发展大大拓展了微生物研究的内容,通过对细菌分类和进化标记基因16SrRNA基因进行测序,全面深入地反映环境微生物群落结构的多样性,使人们对微生物有了新的认识^[18]。

在相当长的生物进化过程中,rRNA分子的功能几乎保持恒定,而且其有些部位的分子排列顺序变化非常小,从这种排列顺序可以检测出种系发生关系。rRNA结构既具有保守性,又具有高变性。保守性能够反映出生物物种的亲缘关系,为系统发育重建提供线索;高变性则能揭示出生物物种的特征核酸序列,是种属鉴定的分子基础。细菌rRNA有3种类型:23SrRNA、16SrRNA和5SrRNA。其中,16SrRNA的相对分子质量适中,较易于进行序列测定的分析比较。目前,16SrRNA/rDNA作为一个科学可靠的指标广泛用于微生物的遗传特征和分子差异的研究,广泛用于克隆文库、DGGE和末端限制性片段长度多样性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)等分析。

16S rRNA序列的高保守性和基因组内的多拷贝性使其应用受到了一定的限制,而rpoB等蛋白质编码基因能够在种属和亚种水平提供更准确的系统发育信息,也逐渐被用于微生物群落结构分析^[19]。

2.2 物种功能

在确定微生物群落的组成后,微生物生态学要解决的问题是各个物种在群落代谢过程中的作用。传统方法是微生物生理学研究的基础,而元基因组学和单细胞分析等方法为鉴定物种功能提供了有力的工具。

(1) 微生物生理学 长期以来,传统培养分离方法一直是认识微生物生理的主要方法。在分析天然微生

物群落的代谢时,常采用富集培养的方法,筛选在特定条件下可生长的微生物,并根据其发酵底物和代谢产物分析这些微生物在群落代谢中的作用。Garland 和 Mills^[20]提出群落水平生理学指纹方法(community-level physiological profiles, CLPP),通过检测微生物样品对底物利用模式来反映种群组成。由 BIOLOG 公司开发的 BIOLOG 氧化还原方法能够有效地评价环境微生物群落结构,操作相对简单快速,但是 BIOLOG 体系仅能鉴定快速生长的微生物,测试中近中性的缓冲体系、高浓度的碳源及有生物毒性的指示剂红四氮唑使得测试结果的误差进一步增大。

(2)元基因组学 直接克隆大片段微生物 DNA、并对其进行功能分析构成了微生物研究的一个重要方向,其中主要的技术是以序列分析为基础的元基因组学(metagenomics)方法。元基因组指的是自然环境中全部微生物的基因组。自 Jo Handelsman 首次提出元基因组学概念以来,元基因组学概念及方法在近几年得到了迅速的发展^[21-23]。

(3)元基因组学改变了环境微生物群落的研究方法 元基因组学研究的基本研究策略包括:环境基因组大片段 DNA 的提取和纯化、文库构建、目的基因的筛选和/或大规模测序分析。元基因组文库中既包含了可培养的又包含了不可培养的微生物基因和基因组,将某个自然环境中的总 DNA 克隆到可培养的宿主细胞中,从而避开了微生物分离培养的难题。在元基因组学研究中,借助于大规模序列分析,在基因序列分析的基础上,结合生物信息学工具,能够发现大量过去无法得到的未知微生物新基因或新的基因簇,这对了解微生物区系组成、进化历程和代谢特点,挖掘具有应用潜力的新基因等都具有重要意义。近 4a 来,随着基因组测序成本的降低和基因组学、生物信息学工具的发展,元基因组学呈现出迅速的发展势头,在微生物分子生态学和微生物资源利用等领域取得了瞩目的成就,被称为“生物学研究中的革命”^[24]。

功能元基因组学。截止到目前为止,大部分元基因组学研究都是以序列分析为主,通过与已知功能的基因进行序列比对来预测基因功能。但是,许多来自元基因组文库的开放阅读框与已知功能的基因序列相似性较低,限制了这种分析方法在发现新功能基因中的应用。而且,从由环境复杂群落构建的元基因组文库中获得特定的目标基因,需要测序成千上万的克隆,工作量极大,需要大量实验经费投入。与此相反,功能驱动筛选(function-driven screening)主要利用基于表达产物活性水平的筛选方法,不依赖于任何已知序列信息,仅根据文库克隆子产生的酶活性进行筛选。功能驱动筛选需要编码目的酶的基因能够在替代宿主中表达,并且其活性可以通过颜色反应等表型性状检测。通过这种方法,研究者已筛选出了产生具有脂酶、淀粉酶等水解酶和抗菌活性的克隆^[25-26]。但是,功能元基因组学的主要限制因素是:工作量大、效率低,并且生物转化的产物仅在少数情况下具有可见性状;为了提高功能筛选的灵敏度,研究者提出了底物诱导基因表达^[27]等基因陷阱(gene trap)技术,使编码特定生物转化过程的基因被“选择”出来,而不是被“筛选”出来。基因陷阱方法的关键技术在于建立高度耐受的“超相容性”表达系统,以表达任意来源的编码蛋白和酶。

(4)稳定同位素探针 尽管通过元基因组学的方法筛选到了一些功能基因,但是功能驱动筛选的随机性太大。稳定同位素联合元基因组技术(SIP-enabled metagenomics)可大大减少克隆的数量,提高功能驱动筛选的特异性^[28]。SIP 技术采用稳定同位素标记底物,其中的“重”原子掺入到具有代谢活性的微生物核酸中,采用密度梯度离心的方法分离“重”DNA 或 RNA,可以作为模板构建元基因组文库。SIP 技术的主要优势在于:直接监控标记底物的代谢过程、检测微生物群落中具有代谢活性的菌群,而不需要预先知道其特性及在样品中的存在状态;富集目标微生物,构建库容较小、针对性强的目标微生物功能元基因组,从而极大地减少筛选的克隆数量。目前,稳定同位素联合元基因组学技术主要用于环境甲级营养菌(甲烷营养菌和甲醇营养菌)、有机污染物降解菌、植物-微生物-微生物相互作用以及厌氧环境中互养微生物相互作用等代谢过程和群落结构的分析^[29]。

(5)单细胞分析 对群落功能的完整了解依赖于对群落在群落、类群、种群和细胞等各个水平上的功能和活性的了解。在同一种群内,各个细胞处于不同的生长速率、其基因表达谱也各不相同。Strovas 等^[30]利用流式细胞术和激光扫描发现 *Methylobacterium extorquens* 细胞的分裂细胞大小、分裂时间和生长速率各不相同,

这些细胞对底物变化的反应也各不相同。单细胞分析不仅有利于了解群落内各个个体的功能,而且能够分析群落内的低丰度和未培养微生物。多重错配扩增使用了随机引物和 φ 29DNA 聚合酶,既能够在构建元基因组文库时扩增低丰度 DNA,也能够用于扩增单细胞的完整基因组^[31-33]。将多重错配扩增与微流体等单细胞捕捉技术相结合,能够从基因组学的角度分析群落内低丰度微生物的功能。

2.3 种间相互作用

相互作用是微生物组成群落的基础,但是就目前而言,该领域仍然充满挑战。微生物的分离培养仍然是微生物研究的基本方法,是构成现有微生物学知识体系的基石。目前,不同微生物菌株的共培养是目前研究微生物的种间相互关系的主要方法。另一方面,随着微生物基因组学的快速发展,细菌遗传学为分析种间相互作用提供了新的证据。

(1) 共培养 不同微生物之间的共培养具有悠久的历史。1895 年,Winogradsky 从空气中分离得到一种固氮细菌 *Clostridium pasteurianum*,通过一系列纯培养和共培养试验发现 *Clostridium pasteurianum* 是一种严格厌氧菌,只有在厌氧条件下才具有固氮能力。*Clostridium pasteurianum* 与极端好氧菌共培养能够恢复其固氮能力^[34-35]。目前,不同菌株的共培养仍然是我们研究微生物之间相互作用的主要方法之一。Gilbert 等^[36]报道将抗生素产生菌 *Bacillus cereus* UW85 加入大豆根能提高 *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) 类细菌的丰度。Peterson 等^[37]进一步证实 *Bacillus cereus* UW85 与 CF 类细菌之间的共生关系主要是由 *Bacillus cereus* UW85 的肽聚糖介导的。但是,共培养体系只能容纳少量微生物,限制了其在分析复杂微生物群落背景下种间相互作用中的应用。

(2) 细菌遗传学 细菌遗传学不仅是了解纯培养微生物遗传特性的基础,而且还有助于解析微生物群落内各物种间的相互作用。细菌遗传学的基本方法是构建随机突变体、筛选其中的特定表型,从而鉴定基因功能。近年来,基因芯片和基因组学的发展促进了许多基因功能鉴定新方法的出现。但是,由于许多基因的功能无法从序列特征预测,因此筛选在鉴定未知基因的功能中仍然具有重要作用。

将细菌遗传学方法应用到微生物群落的解析,还面临许多挑战。鉴定参与群落功能或过程的基因需要构建大规模突变体库,筛选条件也更加复杂、耗时长。但是,这种大规模筛选仍然具有重要的意义,其中突出的例子就是参与群体感性和编码抗生素基因功能的鉴定。在微生物群落内,参与群体感应的基因普遍存在,表明依赖于细菌密度的细胞-细胞间通信是微生物通信的常见形式^[38, 39]。编码抗生素的基因也广泛分布于纯培养的环境微生物菌株中,但是抗生素在天然微生物环境中的作用仍然没有定论^[40-42]。有研究表明这些物质有助于宿主获得竞争优势^[43]。一种海洋细菌产生的抗菌蛋白在其与其他细菌竞争形成生物膜以及从生物膜中脱离的过程中具有重要的作用^[44]。

2.4 群落水平的预测

提高对群落的生态学原理和动态变化的了解,一个重要的目的是建立预测模型,以预测未知群落的生态特性。为此,需要在群落组成、功能和相互作用等各方面进行大量基础研究。分子生物学、特别是计算生物学的发展已经推动了适用于微生物群落的预测生态学模型。

(1) 整合模型 在系统生物学思维的推动下,在微生物群落特性的研究中涌现出了许多全新的方法:整合生物化学、热力学、代谢运输与利用、元基因组测序、调控和代谢网络分析以及比较基因组学和进化基因组学等。利用微生物芯片数据可以预测特定环境下微生物的代谢活性,根据基因组序列可以预测微生物的行为和生活方式^[45]。根据现有天然环境条件及其微生物群落种属构成数据,构建生态小环境模型(如 GARP, Genetic Algorithm for Rule-set Production),可以预测不同地理环境条件下微生物群落的种属构成。

(2) 群落遗传学 群落遗传学是“研究孟德尔定律和其他遗传原理如何应用于整个群落的学科”,强调相互作用的种群间、群落间的进化遗传过程分析。目前,群落遗传学的主要研究内容是优势种和关键种种内遗传变异的作用及其对依赖它们而存在的物种、群落组织和生态系统动态的影响。在宏观生态学研究领域中,已经有部分研究采用群落遗传学方法。Whitham 等^[46]发现植物遗传背景的差异影响食草昆虫、鸟类和真菌

群落的多样性。也有研究观察到种群动态和营养互作影响昆虫对转基因作物产生抗性的速率。

截止到目前为止,群落遗传学在微生物群落中的应用仍然寥寥无几,但是可以预想这将成为一个富有成果的领域。构建基因突变体,将突变体引入微生物群落,比较野生型和突变体对微生物群落特性的影响,从而分析该基因对种群和群落的影响。在20世纪,细菌遗传学为剖析微生物细胞过程提供了大量准确、详实的数据,可以预计,群落遗传学将成为21世纪群落过程的有力工具。

3 研究展望

环境微生物群落结构复杂,具有重要的代谢功能,与环境进行着活跃的代谢交换以及“共代谢”过程。尽管环境微生物多样性的相关研究积累了大量研究数据,但是,环境微生物群落中影响环境代谢的关键功能菌鉴定及其作用模式问题仍然悬而未决。综合利用分子生态学、元基因组学、单细胞分析和群落遗传学等方法,研究环境微生物群落内及其与环境之间的交互作用,可能成为揭示环境微生物群落与环境关系、充分利用环境微生物群落遗传资源的新突破口。

References:

- [1] Schloss P D, Handelsman J. The last word: books as a statistical metaphor for microbial communities. *Annu Rev Microbiol*, 2007, 61:23-34.
- [2] de Carter D A, Martin M, Karlson U, Rivilla R. Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:6224-6232.
- [3] LeBlanc P M, Hamelin R C, Filion M. Alteration of soil rhizosphere communities following genetic transformation of white spruce. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:4128-4134.
- [4] Mackenzie A, Ball A S, Virdee S R. Instant Notes in Ecology (2nd edition). London: BIOS Scientific Publishers Limited, 2003.
- [5] Ainslie E F, Courtney J R, Peterson S B, Kenneth F R, Handelsman J. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annu Rev Microbiol*, 2008, 62:375-401.
- [6] Chu H, Fujii T, Morimoto S, Lin X, Yagi K, Hu J L, Zhang J B. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:485-491.
- [7] Gentile M E, Lynn Nyman J, Criddle C S. Correlation of patterns of denitrification instability in replicated bioreactor communities with shifts in the relative abundance and the denitrification patterns of specific populations. *ISME J*, 2007, 1:714-728.
- [8] Smith J M, Castro H, Ogram A. Structure and function of methanogens along a short-term restoration chronosequence in the Florida Everglades. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:4135-4141.
- [9] Shrestha M, Abraham W R, Shrestha P M, Noll M, Conrad R. Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environ Microbiol*, 2008, 10:400-412.
- [10] Saison C, Degrange V, Oliver R, Millard P, Commeaux C, Montange D, Le Roux X. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environ Microbiol*, 2006, 8:247-257.
- [11] Yannarell A C, Steppe T F, Paerl H W. Disturbance and recovery of microbial community structure and function following Hurricane Frances. *Environ Microbiol*, 2007, 9:576-583.
- [12] McCann K S. The diversity-stability debate. *Nature*, 2000, 405:228-233.
- [13] Ives AR, Carpenter SR. Stability and diversity of ecosystems. *Science*, 2007, 317:58-62.
- [14] Tilman D, Wedin D, Knops J. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature*, 1996, 379:718-720.
- [15] Bai Y F, Han X G, Wu J G, Chen Z Z, Li L H. Ecosystem stability and compensatory effects in the Inner Mongolia grassland. *Nature*, 2004, 431:181-184.
- [16] Cardinale B J, Wright J P, Cadotte M W, Carroll I T, Hector A, Srivastava D S, Loreau M, Weis J J. Impacts of plant diversity on biomass production increase through time because of species complementarity. *Proc Nat Acad Sci*, 2007, 104: 18123-18128.
- [17] Girvan M S, Campbell C D, Killham K, Prosser J I, Glover L A. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol*, 2005, 7:301-313.
- [18] Curtis T P, Head I M, Lunn M, Woodcock S, Schloss P D, Sloan W T. What is the extent of prokaryotic diversity? *Philos Trans R Soc London Ser B*, 2006, 361:2023-2037.
- [19] Case RJ, Boucher Y, Dahllof I. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:278-288.
- [20] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source-utilization. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 2351-2359.
- [21] Handelsman Jo. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Bio Rev*, 2004, 68: 669-685.

- [22] Li W, Zhao Y, Wang Y J. Advances in metagenomic clone library analysis methods. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(5) : 2070-2076.
- [23] Li H, He J J, Zhang Y, Xu H Chen G X. Application of metagenomic technique in the exploring of uncultured environmental microbial gene resource. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(4) : 1762-1773.
- [24] National Research Council Committee on Metagenomics. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of our Microbial Planet*. Washington DC: National Academies Press. 2007.
- [25] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, Brady S F, Grossman T H, Liles M R, Loiacono K A, Lynch B A, MacNeil I A, Minor C, Tiong C L, Gilman M, Osburne M S, Clardy J, Handelsman J, Goodman R M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 : 2541-2547.
- [26] Courtois S, Cappellano C M, Ball M, Francou F X, Normand P, Helynck G, Martinez A, Kolvek S J, Hopke J, Osburne M S, August P R, Nalin R, Guerineau M, Jeannin P, Simonet P, Pernodet J L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 : 49-55.
- [27] Uchiyama T, Abe T, Ikemuraet T, Kazuya W. Substrate-induced gene expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol*, 2005, 23 : 88-93.
- [28] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, Murrell J C. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403 : 646-649.
- [29] Wellington E M, Berry A, Krsek M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6 : 295-301.
- [30] Strovas T J, Sauter L M, Guo X, Lidstrom M E. Cell-to-cell heterogeneity in growth rate and gene expression in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, 2007, 189 : 7127-7133.
- [31] Hellani A, Coskun S, Sakati N, Benkhalifa M, Al-Odaib A, Ozand P. Multiple displacement amplification on single cell and possible preimplantation genetic diagnosis applications. *Fertil Steril*, 2004, 82 : S28.
- [32] Gonzalez JM, Portillo MC, Saiz-Jimenez C. Multiple displacement amplification as a prepolymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments. *Environ Microbiol*, 2005, 7 : 1024-1028.
- [33] Neufeld JD, Chen Y, Dumont MG, Murrell J C. Marine methylotrophs revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. *Environ Microbiol*, 2008, 10 : 1526-1535.
- [34] Rhee S K, Liu X D, Wu L Y, Chong S C, Wan X F, Zhou J Z. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 : 4303-4317.
- [35] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, Allen E E, Ram R J, Richardson P M, Solovyev V V, Rubin E M, Rokhsar D S, Banfield J F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428 : 37-43.
- [36] Gilbert G, Parke J L, Clayton M K, Handelsman J. Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*, 1993, 74 : 840-854.
- [37] Peterson S B, Dunn A K, Klimowicz A K, Handelsman J. Peptidoglycan from *Bacillus cereus* mediates commensalism with rhizosphere bacteria from the Cytophaga-Flavobacterium group. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 : 5421-5427.
- [38] Bassler B L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2 : 582-587.
- [39] Manefield M, Turner S L. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiol*, 2002, 148 : 3762-3764.
- [40] Brinkhoff T, Bach G, Heidorn T, Liang L, Schlingloff A, Simon M. Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 : 2560-2565.
- [41] Li J, Beatty P K, Shah S, Jensen S E. Use of PCR-targeted mutagenesis to disrupt production of fusaricidin-type antifungal antibiotics in *Paenibacillus polymyxa*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73 : 3480-3489.
- [42] Yim G, Wang H H, Davies J. Antibiotics as signaling molecules. *Philos Trans R Soc London Ser B*, 2007, 362 : 1195-1200.
- [43] Franks A, Egan S, Holmstrom C, James S, Lappin - Scott H, Kjelleberg S. Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 : 6079-6087.
- [44] Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, Stelzer S, Egan S, James S, Webb J S, Kjelleberg S. Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70 : 3232-3238.
- [45] Antonovics J. Towards community genetics. In: Fritz R. S. and Simms E. L. ed. *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics*. Chicago: Universe Chicago Press. 1992. 426-449.
- [46] Whitham T G, Young W P, Martinsen G D, Gehring C A, Schweitzer J A, Shuster S M, Wimp G M, Fischer D G, Bailey J K, Lindroth R L. Community and ecosystem genetics: a consequence of the extended phenotype. *Ecology*, 2003, 84 : 559-573.

参考文献：

- [22] 李武, 赵勇, 王玉炯. 元基因组文库分析技术研究进展. 生态学报, 2007, 27(5) : 2070-2076.
- [23] 李慧, 何晶晶, 张颖, 徐慧, 陈冠雄. 宏基因组技术在开发未培养环境微生物基因资源中的应用. 生态学报, 2008, 28(4) : 1762-1773.