

张丁予,章婷曦,王国祥. 第二代测序技术的发展及应用[J]. 环境科学与技术 2016, 39(9): 96-102. Zhang Dingyu, Zhang Tingxi, Wang Guoxiang. Development and application of second-generation sequencing technology[J]. Environmental Science & Technology 2016, 39(9): 96-102.

第二代测序技术的发展及应用

张丁予¹, 章婷曦^{1,2,*}, 王国祥^{1,2,3}

(1. 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心, 江苏 南京 210023; 3. 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 江苏 南京 210023; 4. 江苏省环境演变与生态建设重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘 要 基于双脱氧核苷酸末端终止测序法的第一代测序技术, 由于其通量低、成本高的缺点, 逐步被第二代测序技术取代。基于高通量测序的第二代测序技术由于其通量大、可定量、成本低廉的优点, 在各个领域方面的研究越来越广泛。该文首先详细介绍了以 454 测序、Solexa 测序和 SOLiD 测序为代表的第二代高通量测序技术的原理、方法, 并将以这 3 种测序方法为基础构建的 3 种测序平台的优缺点、适用研究对象、测序精确度等进行了对比总结, 然后对第二代测序技术目前在土壤、沉积物、人体、海洋和污水方面等领域的应用情况进行了介绍。最后, 对第三代测序技术的发展作了相应展望。

关键词 第二代测序技术; 土壤; 沉积物; 人体; 海洋; 污水

中图分类号: X172 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1003-6504.2016.09.017 文章编号: 1003-6504(2016)09-0096-07

Development and Application of Second-Generation Sequencing Technology

ZHANG Dingyu¹, ZHANG Tingxi^{1,2,*}, WANG Guoxiang^{1,2,3}

(1. School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, Nanjing 210023, China; 4. Jiangsu Key Laboratory of Environmental Change & Ecological Construction, Nanjing 210023, China)

Abstract : The second-generation sequencing technology based on the high-throughput sequencing is with the advantages of high-throughput and low cost compared with the first-generation sequencing technology based on the dideoxy chain termination method. Therefore, the second-generation sequencing technology is more widely used in various areas. This paper introduces the working principles and methods of the second-generation sequencing technologies which include 454 sequencing technology, Solexa sequencing technology and SOLiD sequencing technology. Furthermore, applications of second-generation sequencing technology in soil, sediment, the human body, marine and sewage are reviewed. Finally, the prospects of the third-generation sequencing technology are discussed.

Key words : second-generation sequencing technology; soil; sediment; human; marine; sewage

21 世纪是生命科学的世纪, 生物产业是当前最具活力和先导性的产业, 人类也希望发掘更多的微生物种来为自己造福。通过了解以及合理的利用微生物能够改变农业食品、能源材料、人口卫生、资源信息、环境生态的状况。

但是, 各大环境中的微生物资源丰富, 种类繁多,

传统的微生物的研究方法不仅工作量大, 而且可发现微生物种类少, 其研究方法通常包含以下流程: 样品的采集、微生物的分离纯化、扩大培养、培养物的获得、目标物质的抽提鉴定、目标物质的开发利用。传统的研究方法需要依赖于微生物的培养, 但是很多微生物的生长环境是不可复制的, 导致很多极端环境、特殊

《环境科学与技术》编辑部 (网址) <http://fjks.chinajournal.net.cn/> (电话) 027-87643502 (电子信箱) hjkxyjs@vip.126.com

收稿日期: 2015-11-23; 修回: 2016-03-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(41303058, 41573061); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省太湖水污染治理专项(TH2014402)

作者简介: 张丁予(1991-), 女, 硕士, 主要研究方向为水环境生态修复 (电子信箱) 841575181@qq.com; * 通讯作者 (电子信箱) zhangtingxi@njnu.edu.cn。

生境的微生物无法在实验室的条件下生存和培养^[1]。所以这种传统依赖培养的筛选方法导致我们丧失了大部分的微生物资源。这就促使我们试图寻找一种生物技术,可以不需要预先培养就能开发这些微生物的基因组,于是宏基因组学就应运而生。

1 宏基因组概念

宏基因组也称微生物环境基因组或元基因组是生境中全部微小生物遗传物质的总和。它包含了可培养的和未可培养的所有微生物的基因,它通过直接从环境样品中提取全部微生物的DNA,构建宏基因组文库,利用基因组学的研究策略研究环境样品所包含的全部微生物遗传组成及其群落功能^[2]。宏基因组学是在微生物基因组学的基础上发展起来的以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系为研究目的的新的微生物研究方法。一般包括从环境样品中提取基因组DNA,进行高通量测序分析,或克隆DNA到合适的载体,导入宿主菌体,筛选目的转化子等工作。

宏基因组是生物行业近年研究的热点,宏基因组有着相当大的数据量,所以能兼并高通量的测序技术和高效的数据处理能力的第二代测序技术就成为热点中的热点。图1是对微生物群落基于核酸水平上的宏基因组学分析。

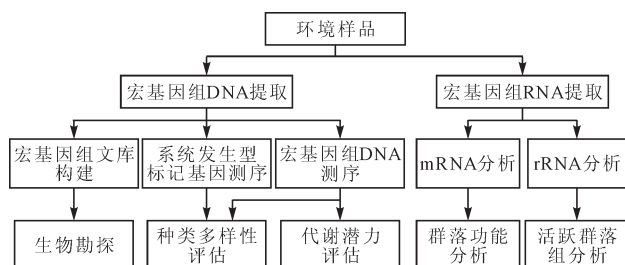


图1 宏基因组学分析^[3]
Fig.1 Metagenomic analysis

2 测序技术的发展和介绍

测序技术在宏基因组学上的使用使得我们在研究各个领域如人体、土、海洋等环境中获得大量地序列数据,通过分析这些数据有助于我们了解环境微生物群落的物种和功能的多样性。测序技术的产生也有着它的发展史。

2.1 第一代测序技术

在1977年,Sanger等首先提出了经典的双脱氧核苷酸末端终止测序法,这就是第一代测序技术也叫做Sanger测序法。它的基本原理是:双脱氧核糖核苷酸进行延伸反应,生成相互独立的若干组带放射性标记的寡核苷酸,每组核苷酸都有共同的起点,却随机

终止于一种(或多种)特定的残基,形成一系列以某一特定核苷酸为末端的长度各不相同的寡核苷酸混合物,这些寡核苷酸的长度由这个特定碱基在待测DNA片段上的位置所决定。然后通过高分辨率的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。经放射自显影后,从放射自显影胶片上直接读出待测DNA上的核苷酸顺序。但由于其通量低成本高的缺点,逐步被第二代测序技术取代。

2.2 第二代测序技术

第二代测序技术也叫做高通量测序,有通量大,可以同时进行平行测序,可定量,样品中DNA被测序的次数就反映了它的丰度,成本低廉,耗资不到传统测序法的1%的优点。

第二代测序技术平台的应用,包括罗氏公司454测序平台、ABI公司的Solid测序平台,以及Illumina公司的Solexa测序平台,他们对宏基因组的研究起到了重大影响。

2.2.1 454 测序技术

454测序是Roche公司应用焦磷酸测序原理的测序技术,原理简单来说就是:测序时,将放置在4个单独的试剂瓶里的4种碱基T、A、C、G,按顺序依次循环进入PTP(Pico Titer Plate)板,当碱基配对,就会释放一个焦磷酸。这个焦磷酸在利用4种酶(DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶)的协同作用下,经过相关反应,荧光素被氧化成氧化荧光素,并释放出光信号,一次信号和一个碱基配对是相对应的,就可以准确地确定待测模板的碱基序列。图2为454测序步骤流程图。

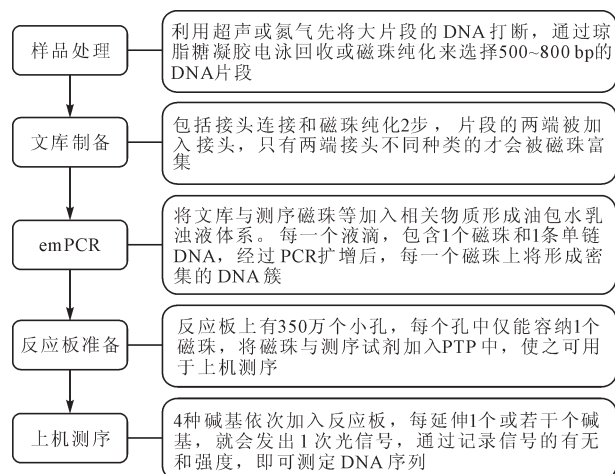


图2 454测序步骤流程图
Fig.2 454 sequencing flow chart

2.2.2 Solexa 测序技术

Solexa测序是Illumina公司应用合成测序原理的测序技术,其原理为:将基因组DNA片段的随机附

着到光学透明的玻璃表面(即 Flow cell),这些 DNA 片段经过延伸和桥式扩增后,在 Flow cell 上形成了数以亿计 Cluster,每个 Cluster 是具有数千份相同模板的单分子簇。然后利用带荧光基团的四种特殊脱氧核糖核苷酸,通过可逆性终止的边合成边测序技术对待测的模板 DNA 进行测序。图 3 为 Solexa 测序步骤流程图。

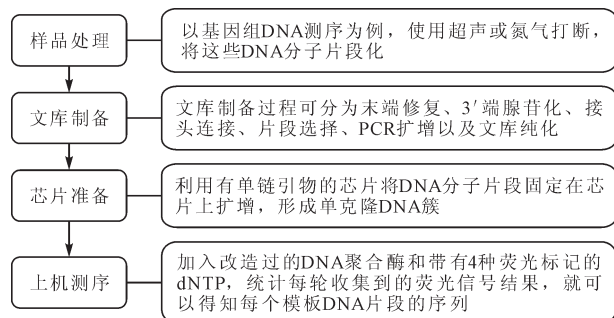


图3 Solexa测序步骤流程图
Fig.3 Solexa sequencing flow chart

针混合物。连接反应中,这些探针按照碱基互补规则与单链 DNA 模板链配对。这样经过 5 轮测序反应后便可以得到所有的碱基序列。图 4 为 Solid 测序步骤流程图。

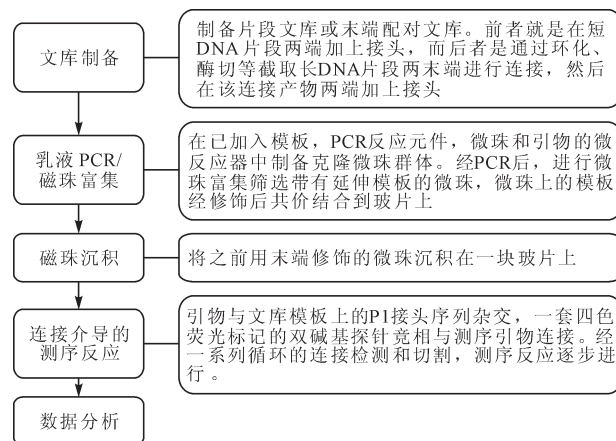


图4 Solid测序步骤流程图
Fig.4 Solid sequencing flow chart

2.2.3 Solid 测序技术

Solid 测序是 ABI 公司使用的连接技术的测序技术,其原理为连接反应的底物是 8 碱基单链荧光探

各个公司的测序技术都有其应用的技术参数,表 1 对这 3 个测序平台的相关技术内容及特点进行了系统的分析和比较。

表 1 3 种测序平台比较
Table 1 Comparison of 3 sequencing technologies

公司	技术原理	优点	缺点	适用	PCR	测序载体	精确度	平均读长	平均通量
Roche	焦磷酸测序	读取长度大,重复序列少	通量较低,成本相对较高	从头测序和宏基因组测序,序列拼装,获得新基因	磁珠乳化 PCR	磁珠	Q20	400 bp	0.5 G
Illumina	边合成边测序	高通量、低错误率、低成本、应用范围广	读长较短有给从头测序拼接带来困难	RNA 测序、表观遗传学研究	桥式 PCR	玻片	Q30	100 bp	30 G
ABI	基于磁珠的大规模并行连接测序	高通量,高准确度,易区分 SNP 和测序错误	读长较短给从头测序拼接带来困难	对于高 GC 含量的样品适合,基因组重测序、SNP 检测	磁珠乳化 PCR	玻片	Q40	50bp	50G

注 Q20 的错误率为 1% Q30 的错误率为 0.1% Q40 的错误率为 0.01%。

3 第二代测序技术在研究上的应用

在上述介绍的第二代测序技术当中,454 测序平台是最多产的。454 测序平台的突出优势是读长,已超过 400 bp。Illumina 测序平台的产量也不低,而且其成本要远低于 454 测序,最大优势就是通量高。其性价比最高,所以在不同领域的应用也非常广泛。

3.1 在土壤中的研究^[4-8]

土壤中的微生物种类繁多,数量极大,1 g 肥沃土壤中通常含有几亿到几十亿个微生物,贫瘠土壤每克也含有几百万至几千万个微生物,研究土壤中微生物的物种组成、群落结构及功能对改善土壤土质,促进农业发展等方向都有着积极的意义。已经有人通过一些研究方法对土壤微生物群落进行了分析。如 Buee 等^[9]利用 454 高通量测序技术调查 6 个不同的森林土

壤真菌的多样性。81%的 OTUs 属于子囊菌门和担子菌门,73%的 ITS-1 序列存在于其中的 26 个最丰富的 OTU 中,分析确定了 Agaricomycetes 作为主要真菌类。第二代测序技术的使用加速研究森林土壤生态系统中真菌群落的时空动态。Huang 等^[10]利用 454 高通量测序技术研究中国 3 种稻田土壤的水稻种植前后古菌(AOA)和细菌(AOB)亚硝化单胞菌 subcluster 5 和 subcluste 3 的 AOB 能很好地适应铵浓度高的土壤。亚硝化单胞菌 subclusters 2 和 subclusters 9 能很好地适应酸性水稻土。结果表明,多个环境因素如铵含量和土壤 pH 值,对古菌(AOA)和细菌(AOB)群落结构变化和丰富度有重要影响。Ma 等^[11]基于 454 高通量测序技术来研究土壤中生存的大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 及相关的化学、物理和生物变量的影响。结果显示土壤中大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 和土壤盐度(EC)呈负相关,但

和总氮(TN)和水溶性有机碳(WSOC)呈正相关。大肠杆菌 $O_{157}H_7$ 与放线菌和酸杆菌的丰度呈正相关,而与变形菌门和拟杆菌门呈负相关。本实验有助于研究土壤中各个细菌种类的影响因素。

3.2 在沉积物中的研究^[12-15]

沉积物是集化学物质和微生物于一体的特殊的生态系统,在这个环境中微生物对整个生态系统的能量流动和物质转化起着不可估量的作用。研究沉积物的微生物组成及其活性物质功能基因的筛选有重大理论实践意义。就现在的研究进展而言,Wang等^[16]通过 Illumina 测序平台技术比较珠江淡水中、潮间湿地和海洋3种不同类型沉积物细菌群落。结果表明,在淡水沉积物中的细菌丰富性和均匀度是最高的,其次是潮间带沉积物,最低的是海洋沉积物。这有助于系统的理解自然沉积物环境中细菌群落。Wu等^[17]对来自富营养化的淡水湖太湖中的沉积物在不同温度下培养8周。利用454高通量测序技术研究细菌16S rRNA基因来揭示底泥沉积物不同温度情况下微生物的群落组成,分析了解在季节性差异时细菌和古菌导致氨的氧化的作用,对处理底泥中的元素物质有着至关重要的作用。Jiang等^[18]通过使用illumina测序技术对香港特别行政区的红树林湿地的微生物进行测序分析,成熟的红树林中沉积物中alpha细菌多样性最高,而没有植被泥滩沉积物中则最低。在营养丰富的红树林沉积物内部范围主要是放线菌、酸杆菌、硝化螺旋菌、疣微菌,而在红树林沉积物外部范围主要是变形菌和 *Deferribacterias*。

3.3 在人体上的研究^[19-22]

到目前为止,人体微生物中仍只有少数群体在遗传学上被描述和鉴定,对于它们是如何对人类的健康和疾病起作用的还知之甚少,第二代测序技术的使用能让人类更好地了解和追溯这些物种的来源,以及这些物种的某些代谢物与人类基因组可能产生的相互作用。Cooper等^[23]对97名儿童的粪便进行微生物群分析,发现有30名儿童未感染,17名儿童感染鞭虫,50名儿童同时感染了鞭虫和蛔虫,利用454高通量测序技术分析14名只感染鞭虫的儿童和21名未受感染的儿童,发现在两者之间微生物群在不同分类水平无显著差异,混合型感染的儿童和另2组相比粪便微生物群落有变化。表示人类感染鞭虫可能没有影响粪便微生物群变化,但感染蛔虫可能干扰粪便微生物群落。Qin等^[24]利用Illumina测序平台对345个中国人的肠道微生物样本进行了深度测序,并开发了一种叫做全宏基因组关联研究的方法,深入的研究了肠道微生物失调和2型糖尿病与之间的关系。Militello等^[25]

通过454测序技术建立和评估在临床样本454人乳头状瘤病毒类型的新方法,测序中高覆盖率,可以正确识别单一或多重感染的所有高危人乳头状瘤病毒类型,也有可能发现新的人乳头状瘤病毒类型,这对准确评价和监测人乳头状瘤病毒疫苗的至关重要。Rutvisuttinunt等^[26]将从泰国和尼泊尔收集的6种呼吸道急性临床标本的流感病毒进行分离培养,并利用第二代测序中的MiSeq Illumina公司平台来获取流感病毒分离物的完整的基因组序列信息。此次实验可以提高我们对流感病毒进化的了解,有助于发现新品种,提高在设计预防疫苗的精度。

3.4 在海洋中的研究^[27-31]

海洋环境的复杂多变性使得其微生物的物种资源极其丰富,也具有其他环境中的无与伦比的基因功能和生态功能,若能将这些特殊环境下的微生物资源良好的利用将给人类寻求新的发展平台起着举足轻重的作用。就目前我们了解到的通过第二代测序技术对海洋类微生物进行研究的有Goldberg等^[32]首次应用454测序技术结合Sanger测序对海洋微生物进行了分析,结果表明第二代测序技术比第一代测序技术获得更高质量低成本的微生物基因组数据,由此真正拉开了第二代测序的序幕。

Wilkins等^[33]利用454高通量测序技术对霍巴特到南极洲的默茨冰川这一块南海地区进行了宏基因组调查结果表明在北方的蓝藻的初级生产转移到了在南方的真核浮游植物,并反映了这2个地区的不同营养状态。这项研究通过描述微生物组合的对比分类和功能特征,使我们深入的了解微生物群落。Peressutti等^[34]利用454高通量测序比较研究在阿根廷海域微生物浮游细菌生物结构,结果从测出的36188个测序中发现4600个细菌序列,组成了280个种系型,从测出的47700个测序中发现2700个古细菌序列,只有5种不同的种系型。这些微生物种类对生态可能起着至关重要的作用。Sogin等^[35]利用454高通量测序大西洋海底和热泉中的微生物的数量比以前报道的数量要高1~2个数量级,其物种种类也要比我们了解到的复杂得多。这种非常罕见而又古老的生物圈中的微生物将会为我们提供更多新的基因组数据,这将对我们更多的了解地球的演变过程带来深远的影响。Xia等^[36]在中国第五次北极科学考察期间收集了来自西太平洋、北太平洋、北冰洋和挪威海等几个海域的海洋气溶胶样品,并利用454焦磷酸测序技术进行分析,结果表明太平洋海域的气溶胶样品中的微生物群落结构比挪威海域样品中的微生物群落结构更加多样化,而且细菌可以通过海上气溶胶进行

远距离传输。

3.5 在污水中的研究^[37-39]

污水是由于某些有害化学物质的混入,或者由于温度的升高而造成水的使用价值降低或丧失,造成环境污染。污水分为生活污水、工业废水以及受污染的雨水 3 类。污水处理的结果与人类的健康息息相关,目前应用最广泛的是使用微生物对其进行处理,而高通量测序技术能够就微生物种类、功能等对污水的净化方面的研究提供相关的参考作用。目前研究进展有 Ye 等^[40]利用 454 高通量测序技术来研究污水处理厂含盐污水中活性污泥、消化污泥、进水口和出水口的细菌群落。对于每一个样本选择 18 808 个有效序列去做细菌的多样性和丰度的分析。其中有 4 种优势菌种分别是 Alphaproteo Bacteria、Thermotogae、Deltaproteo Bacteria 和 Gammaproteo Bacteria。在这个污水样品中发现分枝杆菌和弧菌属还包含致病性细菌。Ye 等^[41]通过 Illumina 公司 HiSeq 2000 平台研究实验室规模下 2 个生物反应器中提取的活性污泥中的微生物群落结构、功能配置和代谢途径。他们对氨氧化古生菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的相对丰度进行了分析,结果表明在 2 个反应器中 AOB 比 AOA 更丰富而且 2 个反应器内的活性污泥的微生物代谢模式极为相似。此外,他们发现宏基因组测序要比 QPCR(实时荧光定量核酸扩增检测系统)更适合对活性污泥中的氨氧化古生菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)进行定量分析。Ye 等^[42]为全面了解污水处理生物反应器中的微生物群落,利用 454 高通量测序技术分析了在实验室硝化反应器和一个大规模的污水处理厂的微生物细菌 16 s rRNA 基因,并分别从 2 个样品污泥中获得 27 458 和 26 906 个有效序列,并在门和属的水平上比较了 2 个样品中微生物复杂物种,测序结果显示单从实验室反应器中的污泥细菌菌落是远远不能够全面的反映细菌菌落的。Sanapareddy 等^[43]通过 454 高通量测序对对废水处理厂的活性污泥提取的总 DNA 进行测序,在得到的相当庞大的序列数据中只有 0.3% 的序列组装成有意义的重叠群,通过将所得的序列与已知微生物基因组进行比较,可以知道这些污水处理厂中的微生物种类与之前了解到的分类单元的亲缘关系较远。Lu 等^[44]利用 454 焦磷酸测序技术检测来自制革、服装厂、钮扣厂等不同工厂排放生物污水样本,选择有效的基因序列用于细菌多样性分析和丰度分析。结果表明,来自不同类型工厂的污水虽然理化性质差异较大,但其在降低微生物多样性、物种丰度以及影响河流均质化方面有着相似的作用。

4 结语与展望

宏基因组学是由 Handelsman 等^[45]1998 年提出的新名词,在分析和开发复杂生态系统的微生物群落中,宏基因组学在环境微生物生态学中起到变革性的突破,它通过构建基因组文库并对文库进行筛选来寻找和发现新的酶和药物。但在一些极端环境中分离 DNA 在技术上仍然是一项挑战。第二代测序方法的产生在应用于大规模的分析微生物群落中形成了一种新的方法,不仅可以应用在宏基因组学上,还可以应用在宏转录组学和宏蛋白质组学。在研究土壤、水体、沉积物等时,我们往往通过分析它们的标记基因如 16rRNA。虽然使用第二代测序技术如 454 焦磷酸测序对细菌 16rRNA 片段进行测序分析时相对于传统的微生物学研究方法如 DGGE、T-RFLP 或者 Sanger 测序法能得到前所未有的测序深度,但在某些方面还是有很多不足^[3]。其一,在制备文库的时候需要经过 PCR 扩增,而这一 PCR 过程很大程度上会使得后续分析结果有偏差。其二,在处理数据时,往往需要对片段进行拼接而第二代测序的读长还是普遍偏低,以单分子实时测序和纳米孔为标志的第三代测序技术就被开发出来,第三代测序平台有几点优点:(1)不需要进行 PCR 扩增;(2)测序成本低于第二代;(3)测序读段长度长,可以达到几千个碱基,为基因组的重复序列的拼接提供了非常好的条件;(4)精度高,达到 99.999 9%。虽然第三代测序技术不如第二代测序平台这样普及和产生高通量数据。但它在比如说测序长度和准确率方面的优势会使得第三代测序在接下来的几十年中,逐渐普及进而成为一种常规的技术。但也有可能为了研究某一复杂的微生物群落,需要采用几种技术,彼此协调配合以获得高通量、长度长、高准确率的基因片段,希望人们不仅关注测序技术本身的发展,而应该更加注意测序本身带给我们探究微生物的领域以及医学上的创新的意义。

[参考文献]

- [1] 李翔,秦岭,戴世鲲,等. 海洋微生物宏基因组工程进展与展望[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 548-553.
Li Xiang, Qin Lin, Dai Shikun, et al. Marine microbial metagenomics progress and prospect[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(3): 548-553. (in Chinese)
- [2] 贺纪正,张丽梅,沈菊培,等. 宏基因组学的研究现状和发展趋势[J]. 环境科学学报, 2008, 28(2): 209-218.
He Jizheng, Zhang Limei, Shen Jupei, et al. Advances and perspectives of metagenomics[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(2): 209-218. (in Chinese)
- [3] Carola S, Rolf D. Trends metagenomic analyses past and future[J]. Environmental Microbiology, 2011, 77(4): 1153-

- 1161.
- [4] Hirsch J , Galidevara S , Strohmeier S , et al. Effects on diversity of soil fungal community and fate of an artificially applied beauveria bassiana strain assessed through 454 pyrosequencing[J]. Microbial Ecology , 2013 , 66(3) : 608–620.
- [5] Schmidt P A , Balint M , Greshake B , et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community[J]. Soil Biology and Biochemistry , 2013(65) : 128–132.
- [6] Hagedorn F , Hiltbrunner D , Streit K , et al. Nine years of CO₂ enrichment at the alpine treeline stimulates soil respiration but does not alter soil microbial communities[J]. Soil Biology and Biochemistry , 2013(57) : 390–400.
- [7] Frisli T , Haverkamp T , Jakobsen K S , et al. Estimation of metagenome size and structure in an experimental soil microbiota from low coverage next-generation sequence data[J]. Journal of Applied Microbiology , 2013 , 114(1) : 141–151.
- [8] McGuire K L , Payne S G , Palmer M I , et al. Digging the New York city skyline soil fungal communities in green roofs and city parks[J]. Plos One , 2013 , 8(3) : e58020.
- [9] Buee M , Reich M , Murat C , et al. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity[J]. New Phytologist , 2009 , 184(2) : 449–456.
- [10] Huang L Q , Dong H L , Wang S , et al. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in diverse Chinese paddy soils[J]. Geomicrobiology Journal , 2013 , 31(1) : 12–22.
- [11] Ma J , Ibekwe A M , Yang C H , et al. Influence of bacterial communities based on 454-pyrosequencing on the survival of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ in soils[J]. Fems Microbiology Ecology , 2013 , 84(3) : 542–554.
- [12] Lecroq B , Lejzerowicz F , Bachar D , et al. Ultra-deep sequencing of foraminiferal microbarcodes unveils hidden richness of early monothalamous lineages in deep-sea sediments [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America , 2011 , 108(32) : 13177–13182.
- [13] Sun M Y , Dafforn K A , Johnston E L , et al. Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients[J]. Environmental Microbiology , 2013 , 15(9) : 2517–2531.
- [14] Hollister E B , Engledow S A , Hammett A , et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments[J]. The ISME Journal , 2010(4) : 829–838.
- [15] Dos S H , Cury J C , Docarmo F L , et al. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing bacterial proxies for oil pollution[J]. Plos One , 2011 , 6(3) : e16943.
- [16] Wang Y , Sheng H F , He Y , et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater , intertidal wetland , and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. Applied and Environmental Microbiology , 2012 , 78(23) : 8264–8271.
- [17] Wu Y C , Ke X B , Hernandez M , et al. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures[J]. Applied and Environmental Microbiology , 2013 , 79(9) : 3076–3084.
- [18] Jiang X T , Peng X , Deng G H , et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland[J]. Microbial Ecology , 2013 , 66(1) : 96–104.
- [19] Ott S J , Musfeldt M , Wenderoth D F , et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease[J]. Gut , 2004 , 53(5) : 685–693.
- [20] Lazarevic V , Whiteson K , Huse S , et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing[J]. Microbiol Methods , 2009 , 79(3) : 266–271.
- [21] Qin J , Li R , Raes J , et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature , 2010 , 464(7285) : 59–65.
- [22] Hillmer A M , Yao F , Inaki K , et al. Comprehensive long span paired end tag mapping reveals characteristic patterns of structural variations in epithelial cancer genomes[J]. Genome Research , 2011 , 21(5) : 665–675.
- [23] Cooper P , Walker AW , Reyes J , et al. Patent human infections with the whipworm , *Trichuris trichiura* , are not associated with alterations in the faecal microbiota[J]. Plos One , 2013 , 8(10) : e76573.
- [24] Qin J J , Li Y R , Cai Z M , et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. Nature , 2012 , 490(7418) : 55–60.
- [25] Militello V , Lavezzo E , Costanzi G , et al. Accurate human papillomavirus genotyping by 454 pyrosequencing[J]. Clinical Microbiology and Infection , 2013 , 19(10) : E428–E434.
- [26] Rutvisuttinunt W , Chinnawirotpisan P , Simasathien S , et al. Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform[J]. Journal of Virological Methods , 2013 , 193(2) : 394–404.
- [27] Zehr J P , Bench S R , Carter B J , et al. Globally distributed uncultivated oceanic N₂ fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem[J]. Science , 2008 , 322(5904) : 1110–1112.
- [28] Habura A , Hou Y , Reilly AA , et al. High-throughput sequencing of *Astrammina rara* sampling the giant genome of a giant foraminiferan protist[J]. BMC Genomics , 2011(12) : 169–173.
- [29] Star B , Nederbragt AJ , Jentoft S , et al. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system[J]. Nature , 2011 , 477(7363) : 207–210.
- [30] Wietz M , Mansson M , Bowman J S , et al. Wide distribution

- of closely related , antibiotic -producing arthrobacter strains throughout the Arctic ocean[J]. Applied and Environment Microbiology ,2012 ,78(6) :2039-2042.
- [31] Bowman J S , Rasmussen S , Blom N , et al. Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface sea-water by 454 sequencing of the 16S RNA gene[J]. ISME Journal ,2012 ,6(1) :11-20.
- [32] Goldberg S , Johnson J , Busam D , et al. A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America ,2006 ,103(30) :11240-11245.
- [33] Wilkins D , Lauro F M , Williams T J , et al. Biogeographic partitioning of southern ocean microorganisms revealed by metagenomics [J]. Environmental Microbiology , 2013 ,15 (5) :1318-1333.
- [34] Peressutti S R , Costagliola M , Artigas L F , et al. A comparative study of bacterioplankton structure in Argentinian sea waters by the 454-tag pyrosequencing method [J]. Revisia Argentina Demicrobiologia ,2010 ,42(4) :288-297.
- [35] Sogin M L , Morrison H G , Huber J A , et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America ,2006 ,103(32) :12115-12120.
- [36] Xia X M , Wang J , Ji J B. Bacterial communities in marine aerosols revealed by 454 pyrosequencing of the 16s rRNA gene[J]. Journal of the Atmospheric Sciences ,2015 ,72(8) :2997-3008.
- [37] Ye L , Zhang T. Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing[J]. Environmental Science and Technology ,2011 ,45(17) :7173-7179.
- [38] Zhang T , Shao M F , Ye L , et al. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. ISME Journal ,2012 ,6(6) :1137-1147.
- [39] Zhang T , Ye L , Tong A , et al. Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors[J]. Applied Microbiology and Biotechnology ,2011 ,91(4) :1215-1225.
- [40] Ye L , Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing [J]. Applied Microbiology and Biotechnology ,2013 ,97(6) :2681-2690.
- [41] Ye L , Zhang T , Wang T T , et al. Microbial structures , functions , and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing [J]. Environmental Science and Technology ,2012 ,46(24) :13244-13252.
- [42] Ye L , Shao M F , Zhang T , et al. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing[J]. Water Research ,2011 ,45(15) :4390-4398.
- [43] Sanapareddy N , Hamp T J , Gonzalez L C , et al. Molecular diversity of a North Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing[J]. Applied and Environmental Microbiology ,2009 ,75(6) :1688-1696.
- [44] Lu X M , Lu Z. Characterization of bacterial communities in sediments receiving various wastewater effluents with high-throughput sequencing analysis[J]. Environmental Microbiology ,2014(67) :612-623.
- [45] Handelsman J , Rondon M R , Brady S F , et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes : a new frontier for natural products[J]. Chembiol ,1998 ,5(10) :245-249.

(上接第 27 页)

- [32] 林笠,周婷,汤帆,等. 镉铅污染灰潮土中添加磷对草莓生长及重金属累积的影响 [J]. 农业环境科学学报,2013 ,32(3) :503-507.
- Lin Li , Zhou Ting , Tang Fan , et al. Effects of phosphorus on growth and uptake of heavy metals in strawberry grown in the soil contaminated by Cd and Pb [J]. Journal of Agro-environment Science ,2013 ,32(3) :503-507.(in Chinese)
- [33] Gervais Ruffykiri , Jean Wannijn , Lian Wang. Effects of phosphorus fertilization on the availability and uptake of uranium and nutrients by plants grown on soil derived from uranium mining debris[J]. Environmental Pollution , 2006 (141) :420-427.