

宏转录组学在环境微生物生态学中的应用

李莹¹, 吴兴杰², 贺治斌², 贝水宽², 马可¹, 彭静静^{2*} (1. 中国农业大学资源与环境学院, 农田土壤污染防治与修复北京市重点实验室, 北京 100193; 2. 中国农业大学资源与环境学院, 国家农业绿色发展研究院, 植物-土壤相互作用教育部重点实验室, 北京 100193)

摘要: 系统总结了宏转录组学实验操作及数据分析流程, 概述了宏转录组学在环境微生物生态学的研究策略和最新进展, 并指出其应用前景。宏转录组学在解析环境微生物群落功能上具有广阔的前景, 为了解微生物群落的动态演化及其与环境因素和生态系统功能的关系提供了强有力的工具。

关键词: 宏转录组; 微生物组; 群落结构; 功能基因; mRNA 富集; RNA

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)09-4341-08

Application of metatranscriptomics in environmental microbial ecology. LI Ying¹, WU Xing-Jie², HE Zhi-Bin², BEI Shui-Kuan², MA Ke¹, PENG Jing-Jing^{2*} (1. Beijing Key Laboratory of Farmland Soil Pollution Prevention and Remediation, College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Key Laboratory of Plant-Soil Interactions, Ministry of Education College of Resources and Environmental Sciences, National Academy of Agriculture Green Development, China Agricultural University, Beijing 100193, China). *China Environmental Science*, 2021, 41(9): 4341~4348

Abstract: In this review, the pipeline for metatranscriptomics workflow and data analysis were systematically summarized. Then, the strategy of research in environmental microbial ecology was discussed. Based on the above, the prospects of metatranscriptomics application were proposed. Metatranscriptomics has been useful in analyzing the function of environmental microbiomes. It provides a powerful tool for us to better understand the dynamic evolution of the functional microbial community and its relationship with environmental factors and ecosystem function.

Key words: metatranscriptomics; microbiome; community structure; functional gene expression; mRNA enrichment; RNA

近年来,微生物组学发展迅速。宏基因组、宏转录组、宏蛋白组和宏代谢组等组学方法被广泛用于揭示微生物群落组成及功能,探索生态系统中复杂微生物群落的基因图谱传递的信息。其中宏转录组侧重于研究活跃微生物组基因的表达及其对环境的响应,为研究活跃微生物组群落动态变化和功能响应提供了全新见解。

微生物组是指包括微生物(细菌、古菌、真核生物和病毒)的基因组(基因)及其环境在内的所有生物和非生物因素的总和^[1]。环境微生物组存在着极大的物种和功能多样性,是生态系统发挥功能和服务人类的基础^[2],在生物地球化学循环^[3]、农业生产^[4-5]、土壤修复^[6]以及温室气体调控^[7]等方面均发挥着重要作用,直接或间接地影响着动植物和人类健康以及气候变化。土壤微生物的生物量与陆地动物和植物的生物量相当,是保持土壤肥力、有机碳固定^[8]、促进植物生产以及维持生态系统功能的重要组成部分^[9-10]。海洋微生物则在生物地球化学循环过程中扮演着重要角色,对保持海洋生态系统的健

康和稳定做出了巨大贡献^[11]。大气微生物近年来也备受关注,了解大气微生物群落的全球分布和季节性变化^[12]对于理解其调控气候变化的机制^[13]和对粮食安全及环境保护^[14]的影响至关重要。

目前绝大多数微生物尚不能被分离培养,其功能及代谢特征尚未可知,因此限制了对环境微生物的挖掘和利用。近年来,随着微生物组学研究方法的快速发展和突破,极大地推动了环境微生物的研究进程。微生物组学技术以不依赖于分离培养的优势可针对环境样品中的全部微生物进行研究,能够系统性地揭示整体微生物群落的组成、活性、功能及动态变化等^[1,15]。其中,宏转录组学通过分离提取微生物群落中的 RNA 或者富集 mRNA,合成 cDNA^[7]进行高通量测序分析。这种方法可针对微生物群落研究其在某一特定环境、特定时期和特定状态下进行转录的所有 RNA 的类型及数量,来确定活跃微生

收稿日期: 2021-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41977038)

* 责任作者, 副教授, jingjing.peng@cau.edu.cn

物的代谢功能.相对于宏基因组研究微生物群落的组成和功能(包括死亡和休眠微生物),宏转录组的优势是可以揭示微生物群落中活跃物种的组成及其基因的表达.以宏转录组为代表的多组学研究方法为解析不同生境微生物群落动态变化、相互作用和功能响应提供了前所未有的机遇.自2007年以来,宏转录组学在各领域得到广泛应用,与宏转录组学相关文章数量持续上升,其中2018年发文量达到200余篇(注:截止至2020年12月5日,以metatranscriptomics和metatranscriptome为主题检索Web of Science数据库).本文系统地介绍了宏转录组学的原理和数据分析流程,归纳了环境中微生物群落及其代谢能力的最新进展,并强调了如何利用宏转录组学来研究环境中微生物类群的生态适应及其功能关联.

1 宏转录组学的研究策略

1.1 宏转录组学的基本原理

宏转录组学主要关注微生物群落的总RNA或者mRNA,研究步骤通常包括样品采集、总RNA提取、mRNA的富集、cDNA合成、上机测序和数据分析5个步骤(图1).由于mRNA的稳定性较差,易降解,且占总RNA的比例仅有1%~5%,因此如何除去核糖体RNA来富集mRNA以及防止其降解是宏转录组学技术的关键^[16-17].此外,也有研究未进行mRNA富集(表1),直接合成cDNA后进行测序.

1.1.1 样品的采集和保存 mRNA分子的平均半衰期在几秒到几分钟范围内,且具有相同生物学功能的基因显示出相似的mRNA降解率,这是宏转录组学样品提取中存在的主要难点^[18].此外,mRNA稳定性会受到微生物生长速度的影响,在微生物种内和种间也存在较大差异^[19].因此,为了最大限度地减少前期准备导致的RNA转录谱及其完整性的变化,需要尽可能缩短在实验样本采集、贮存、运输和制备过程中的时间.例如,样本采集后应立即投入液氮中快速冷冻或者将样品转移到RNAlater等核酸保存液中,然后转移至-80℃冰箱中保存,尽量避免反复冻融.理想情况下,采样过程引起的延迟应在分秒范围内^[20].

1.1.2 总RNA的提取 总RNA的提取一般是借助物理方法(微珠)结合细胞裂解液将细胞破碎,利用

试剂使蛋白质变性,从而将RNA释放到溶液中.Mettel等人^[21]基于腐殖酸含量不同的4种土壤(草地、稻田、森林和农田),从RNA的纯度、完整性及产率等方面评估和优化了RNA提取方法.一般来说,从低pH(4.5~5.0)土壤要比从高pH(7.0~8.0)土壤中提取RNA的稳定性和完整性高,并且腐殖酸含量较低.近年来,各种高效商业试剂盒也逐渐用于土壤RNA的提取.目前,PowerSoilTM总RNA提取试剂盒(MoBio)最为常用.此试剂盒基于苯酚(pH=4.5~5.0)进行提取,然后采用试剂盒特异性的RNA纯化方法.在RNA的提取过程中,要注意提取条件(如是否需要低温)和污染控制.RNA酶分布广泛且非常稳定,容易降解mRNA,因此在提取RNA过程中要操作规范,以减轻RNA酶污染.

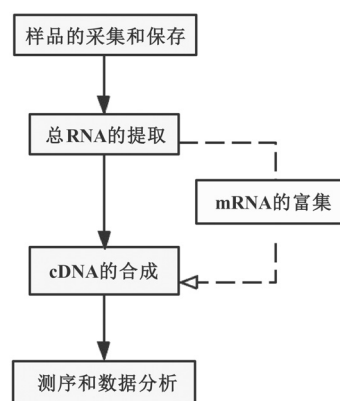


图1 宏转录组学实验流程

Fig.1 Schematic workflow of processing steps involved in Metatranscriptomics

1.1.3 mRNA的富集 环境微生物群落中的总RNA主要由mRNA、tRNA和rRNA组成,其中mRNA约占1%~5%^[22].模板mRNA的质量与cDNA的合成效率密切相关.因此,富集mRNA是微生物群落基因表达功能分析中的关键一步,也是宏转录组实验中的重要一步.从环境样品中富集mRNA的方法包括以下几种:

(1) rRNA消减杂交处理^[23]. rRNA的消减杂交保留了mRNA转录本的全部多样性,因此可以用于针对mRNA的研究中.消减杂交的关键是利用一组捕获探针与rRNA内高度保守的序列区域互补. MICROBExpress细菌mRNA富集试剂盒可用于通过消减杂交特异性去除细菌rRNA,但将其应用于土壤RNA提取时仍存在一些缺陷.例如,土壤微生物

组的多样性及复杂性使得靶向 rRNA 捕获探针的物种覆盖范围成为 mRNA 富集的限制因子. rRNA 探针的设计要尽可能涵盖更多的物种类别.此外,随着用于 mRNA 富集的 RNA 片段增加,消减杂交的 rRNA 去除效率也会下降^[22].

(2) 优先降解 rRNA 的核酸外切酶处理.其原理是利用 5'-单磷酸酯依赖核酸外切酶酶促反应来降解 rRNA.成熟的 rRNA 易被 5'-单磷酸酯酸化,而真核生物的 mRNA 受帽子结构保护,细菌 mRNA 带有三磷酸基团, mRNA 由此被保留下来.因此认为 rRNA 被 5'-单磷酸酯酸化是通过 5'端至 3'端进行核酸外切酶特异性降解,从而达到 mRNA 的富集.然而,当用其提取土壤 RNA 时,由于细菌的 mRNA 衰变过程中,位于 5'端的三磷酸基团转化为单磷酸形式,所以 5'-单磷酸酯依赖核酸外切酶不仅降解 rRNA,还会大量的降解 mRNA^[21-22,24].此外,腐殖质是强大的酶抑制剂,会影响 5'-单磷酸依赖核酸外切酶的活性,因此提取土壤 RNA 时必须先要去除腐殖质^[21].

(3) 凝胶电泳片段分离^[16].通过精确切除主要 rRNA 条带之间的琼脂糖可回收非 rRNA.此方法可以通过切除 23S, 16S 和 5S 核糖体条带之间的琼脂糖来有效去除 rRNA,但 mRNA 中可能仍含有微量的 rRNA.由于腐殖酸在电场中的迁移速度比 RNA 分子快,该方法还可以同时去除腐殖酸^[16].

(4) 双链特异性核酸酶(DSN)处理^[25].双链特异性核酸酶是一种在高温下优先降解双链 DNA 的酶.该方法通常在富含 mRNA 的 cDNA 文库中降解 rRNA 反转录的 cDNA.一般在 RNA 状态下使用 mRNA 特异性 Poly(A)尾部选择,或者使用寡核苷酸引物方法从总 RNA 中进行逆转录.

1.1.4 cDNA 的合成 一般来说,当前的高通量测序平台需要以 cDNA 为模板.因此,富集的 mRNA 需要经过反转录为 cDNA 后再进行测序. cDNA 合成基本步骤如下:首先以 RNA 单链为模板,在 DNA 反转录酶的作用下催化合成 cDNA 第一链,随后以其为模板,利用聚合酶生成 cDNA 第二链.通过将 cDNA 双链和载体连接,以此为模板进行 PCR 扩增,即可构建 cDNA 文库,用于微生物基因表达及调控分析.

1.2 宏转录组学测序

早期宏转录组学借助 DNA 芯片技术或微阵列

的方法,但考虑到灵敏度、效率和成本的因素,该方法逐渐被新兴的测序技术所取代.随着测序技术的发展,宏转录组学技术得以大范围应用.第一代测序技术(Sanger 双脱氧法测序)^[26]首次进行核酸序列测序.但因其测序通量低且无法批量测序的缺陷难以进一步应用.二代测序技术(NGS)极大地增加了测序通量,并可实现自动化流程,推动了微生物组学研究的进步.目前常用的第二代测序技术,以 Illumina 平台为例,具有通量高、错误率低以及测序读长涵盖范围广等优势^[28-29],广泛用于宏转录组学研究中.近年来,以单分子和纳米孔测序技术为代表的三代测序技术开始兴起^[30].单分子测序速度较快,读长较长并且不需要 PCR 扩增,可用于全长转录本测序^[29];纳米孔技术亦可直接测定 RNA 序列,但其主要缺点是错误率和成本较高.

1.3 宏转录组学的数据分析方法

近年来,针对宏转录组数据分析的一些软件和在线工具被广泛开发和使用,自动化、高效和高通量分析成为人们对宏转录组数据分析流程的基本要求.本文对宏转录组数据处理流程及常用的软件和数据库进行了系统的总结(图 2),有助于相关研究者根据需求选择合适流程.

原始下机数据一般为 fastq 格式,其包含测序过程中添加的引物、接头、测序错误序列以及宿主污染等,因此需要对数据进行质控.在质量控制阶段, Cutadapt^[31]和 Trimmomatic^[32]常用来去除接头(adapter)和低质量碱基.数据质控后,可使用本地软件或者在线工具通过对比数据库进行 mRNA 和 rRNA 分离提取. CAMERA^[33]和 MG-RAST^[34]是用于宏转录组数据处理的在线分析网站,可通过对其已有数据库进行序列的对比分析.通过 SortMeRNA^[35]软件对比相应数据库,可从宏转录组数据中筛选出 rRNA 和 mRNA 序列.在对 RNA 序列进行预测和分类后,基于 Trinity^[36]、PANDAsseq^[37]或 FLASH^[38]等软件分别对获得的 RNA 的转录本序列碎片进行重叠配对,分离后的 mRNA 序列可用于构建宏转录组长片段并进行基因表达鉴定,对于 rRNA 的分析则可获得相应的微生物物种信息.拼接产生的 mRNA contigs,映射阶段使用的软件为 Bowtie2^[39],可将上一步生成的 mRNA 长序列映射到参考基因组.基于 NCBI_nr, KEGG(<https://www.kegg>).

jp/), COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)等数据库对比可用于对获取的序列进行功能注释.而基于 SILVA (<http://www.arb-silva.de/>)和 NCBI_nt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库可以得到碱基序列所携带的物种和结构组成信息. 序列对比至数据库可使用 USEARCH^[40]、BLAST^[41]或 DIAMOND^[42]等软件.MEGAN^[43]软件可以将数据库对比结果进行物种分类和功能注释.

最后,通过 DESeq2^[44]或 edgeR^[45]软件对基因进行差异表达分析,可借助绘图软件进行数据可视化处理.针对提取的 rRNA 序列,使用 BLAST 进行聚类分析, SOAP2^[46]用于提取 rRNA,再用 QIIME2^[47-48]、MOTHUR^[49]对比基因数据库参考从而对 rRNA 序列进行物种注释,获得精确度较高的物种组成图谱.

2 宏转录组学在环境微生物生态学中的应用

采用宏转录组学的方法,可以发现特定生境下微生物群落基因的动态表达与调控机制,解密复杂的群落多样性及环境因素对其代谢过程的影响,从而为探索微生物群落结构及生态学功能奠定基础.表 1 对宏转录组学在不同生境微生物生态学中的研究进行了总结.

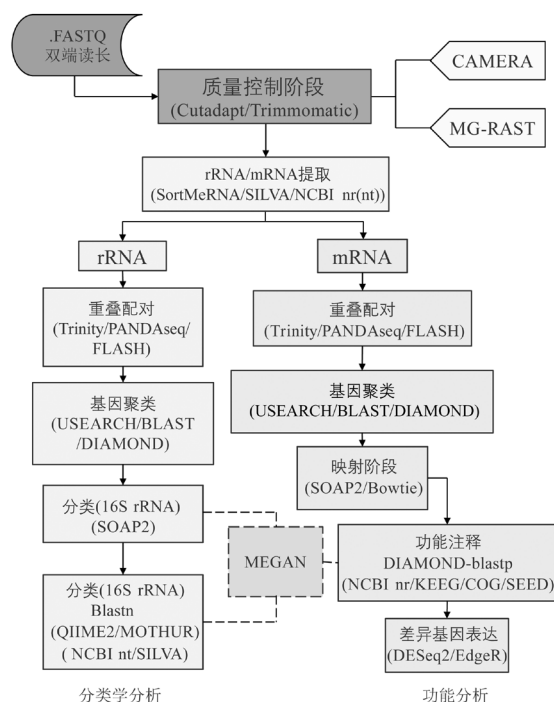


图 2 宏转录组学的数据分析流程

Fig.2 Flow diagram of the Metatranscriptomic analysis pipeline

2.1 宏转录组学在土壤生态环境研究中的应用

土壤微生物是陆地生态系统可持续性的基础,驱动着陆地生态系统中的残体降解、养分循环和植物生产,对生态系统多功能性的维持和提升中有着重要作用^[68].每克土壤中约有 $10^9 \sim 10^{10}$ 个的微生物个体,这些微生物群体参与了土壤有机碳的周转和氮素的循环以及温室气体排放等相关过程,并对气候变化具有反馈调节作用^[69].近年来,宏转录组学方法的应用极大地促进了土壤生态系统微生物组的功能研究,包括微生物介导的甲烷产生与氧化、有机碳的固定与分解以及氮、磷、硫等元素的生物地球化学循环等^[50,53,70-71].以产甲烷过程为例,宏转录组学的方法揭示了稻田土壤中不同功能微生物组参与的多聚体水解、脂肪酸互营养化和产甲烷等有机质厌氧降解的复杂代谢网络^[7].基于宏转录组学技术对于产甲烷古菌的研究进一步扩展了对碳代谢途径的认识,并发现了众多之前未被报道的新型产甲烷古菌^[72],为研究甲烷代谢相关微生物的代谢途径和分离培养奠定了基础.对于甲烷氧化过程,有学者认为传统的甲烷氧化菌在大气甲烷氧化中发挥主要的作用^[73].对甲烷循环过程的深入挖掘将不断加深对碳循环途径的了解.宏转录组学方法还可以关注氮素循环过程中以往被忽视的方面.例如,利用宏转录组学首次发现 *Deltaproteobacteria* 是驱动水稻土氮素还原过程(硝酸盐异化还原为铵和固氮作用)中的关键微生物类群,而该微生物类群在以往的研究中一直被忽略^[71].宏转录组除了可以揭示功能基因表达水平,还可以对活跃的微生物代谢功能进行研究.酸杆菌的硫代谢基因能够在不同缺氧环境下表达上调,而硫杆菌的代谢参与了多糖水解、糖利用、有氧呼吸、发酵和氢氧化等,扩展了对已知酸杆菌的生理和遗传特性的认识^[74].

2.2 宏转录组学在极端环境微生物研究中的应用

极端环境中可能存在一些适应性较强的未知物种,宏转录组与宏基因组、宏蛋白组学等联合分析有助于揭示该环境中微生物群落和功能多样性及相互关系,帮助人们揭示其生物学本质.已有学者研究了受气候变化影响的北极多年冻土,发现固氮和反硝化微生物是其土壤微生物群落中的活跃成员^[75],并且甲烷氧化菌群落组成及活性会随着冻土

融化进程而发生显著变化^[76].在对南极 Vostok 湖积冰的微生物研究中发现,该极端环境具有高度的物种多样性,不仅存在嗜冷微生物,还包括嗜热、耐碱、耐盐以及海洋微生物^[77-78].南、北极沿海可溶性有机碳施入会引起常见微生物群落(如 *Flavobacteriia*, *Gammaproteobacteria* 和 *SAR11*)的异养代谢过程的

明显转录反应并可检测到细胞应对环境胁迫的适应机制^[79].宏基因组和宏转录组学方法的共同应用发现了酸性矿山废水中具有极高的转录活性的微生物类群^[80]及其环境适应机制^[81].由此可见,宏转录组学为研究极端环境微生物群落以及挖掘未知基因提供了全新见解.

表 1 宏转录组学在环境生态学中的应用研究
Table 1 Application of metatranscriptomics in environmental research

研究对象	组学方法	RNA 提取方法	测序量	片段长度
稻田土壤厌氧产甲烷微食物网 ^[7]	宏转录组	Mettel 等 ^[21] , 2010	4,434,974	2×250
湿地土壤的甲烷氧化过程 ^[51]	扩增子/宏基因组/宏转录组	Powersoil total RNA isolation kits (MoBio)	63,627,320	2×150
酸性泥炭土壤中的硫循环 ^[53]	扩增子/宏基因组/宏转录组	Leininger 等 ^[52] , 2006	27,000,000–188,000,000	—
草原根际微生物组 ^[54]	宏转录组	Mettel ^[21] , 2010 (soil)	2,494,048	2×250
干旱胁迫下的沙漠土壤微生物组 ^[55]	宏转录组	CTAB	22,359,636	—
干旱胁迫下的草原土壤微生物组 ^[56]	扩增子/宏基因组/宏转录组/代谢组	Powersoil total RNA isolation kits (MoBio)	10,000,000	2×250
重构土壤微生物组 ^[57]	扩增子/宏转录组	TRIzol 试剂 (Invitgen,加拿大)	12,394,671	—
重金属污染土壤微生物组 ^[58]	宏转录组	GTHE,Pei 等 ^[58] ,2020	66,024,925	2×150
植物凋落物的微生物组 ^[59]	宏转录组/代谢组	Rneasy PowerSoil Total RNA Kit	—	100
淡水河沉积物微生物组 ^[60]	宏转录组	Powersoil total RNA isolation kits (MoBio)	22,000,000	—
深海无脊椎动物及其表面共生微生物组 ^[61]	宏转录组	Powersoil total RNA isolation kits (MoBio)	795,048	2×200
石油污染的海洋中碳氢化合物降解微生物组 ^[62]	扩增子/宏转录组	phenol-chloroform	24,000,000	2×150
大气沉降影响海水细菌微生物组 ^[63]	宏转录组	TRIzol reagent in combination with the PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion, Austin, Texas, USA).	8,823,420	—
湖水蓝藻水华微生物组 ^[64]	宏转录组	Modified PowerWater DNA Isolation Kit (Qiagen, United States)	89,605,031	2×150
污水和污泥中抗性基因 ^[65]	扩增子/宏基因组/宏转录组	Powersoil total RNA isolation kits (MoBio)	176,979,008	2×150
高浓度硝酸盐污水中氮代谢途径 ^[66]	扩增子/宏基因组/宏转录组	TransZol Up Plus RNA kit (Transgen,Beijing)	43,699,668	—
膜生物反应器的难降解有机废水微生物组 ^[67]	扩增子/宏转录组	TriZol (Invitrogen, Carlsbad, USA)	2,990,056	250

2.3 宏转录组学在污染环境中的应用

由人类活动或自然因素所引起的环境污染可能会破坏微生物生境而引起微生物群落结构变化,进而影响微生物群落基因的表达.宏转录组学可以从转录水平上揭示污染物降解过程,以及污染物对微生物群落代谢的影响.Falk 等^[60]研究了受人为污染的淡水沉积物中的微生物群落,指出 β 氧化、糖异生和聚酯合成相关基因在有机污染物丰富的地方出现高表达,且降解谱的终点是硝酸盐还原和产甲烷过程.Lu 等^[82]基于扩增子研究并未发现草甘膦对淡水微生物群落结构有显著影响,但宏转录组学分析表明草甘膦显著影响了一些蓝藻的转录.宏转录组学还可以用来研究污染物对微生物群落基因表

达产生的影响以及污染物代谢过程的影响因素.Doyle 等^[62]研究石油污染海水发现,沿不同海岸线的距离会导致烷烃和多环芳烃分解代谢途径的差异表达;含氧相可以通过微生物介导的替代电子受体(如硫化物)的再氧化以及通过生物固氮提供氮,促进缺氧相中石油的生物降解^[83].此外,宏转录组还可以挖掘代谢污染物的主要微生物类群.Zhou 等^[84]利用宏转录组研究汞污染的稻田,发现了该地微生物群落中相对丰度较低但能够降解汞的主要微生物是 *Catenulisporaceae*, *Frankiaceae*, *Mycobacteriaceae* 和 *Thermomonosporaceae*; Sharma 等^[85]指出古菌在重金属和农药污染的土壤中发挥着重要的作用.因此宏转录组为生物修复的相关研究开拓了新思路.

3 结语

随着微生物组学研究的深入,宏转录组学的重要性及其传递的生物学信息逐渐被重视.相对于扩增子、宏基因组等在微生物群落组成和基因潜力研究方面的优势,宏转录组更注重研究微生物群落中活跃物种的组成及其基因表达.然而单一组学分析手段无法满足微生物群落多样性、功能及动态变化的系统性研究.将宏转录组学与其它组学进行联合分析,从物种组成、基因潜力、基因表达等多水平发挥各自优势,是全面了解微生物群落信息的有效途径,也是未来微生物组学领域研究的热点.

作为一种较新的研究手段,宏转录组学在未来环境微生物研究中具有广泛的应用潜力.但在实验步骤优化、数据融合及解决现实问题等方面仍存在诸多亟待解决的问题.这些问题的解决也将是宏转录组学未来发展的主要方向.优化 RNA 提取方法,实现对更多类型环境样本和研究要求的 RNA 的有效提取,同时开发出快捷有效的宏转录组数据分析方法和软件是该领域难点;如何将宏转录组与生物学数据进行匹配,以达到多组学数据互相补充解释的目的,将是未来生信数据分析中的重点研究方向;针对特殊环境开发原位提取技术,降低运输过程中造成的样品降解程度也是宏转录组学研究亟待突破的瓶颈之一;研究环境污染对微生物群落的影响以及微生物群落应对环境胁迫的适应机制,开发具有污染修复能力的菌株并应用到污染环境中,或将是未来宏转录组研究的重要领域.

参考文献:

- [1] Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges [J]. *Microbiome*, 2020,8(1):1–22.
- [2] Wagg C, Schlaeppi K, Banerjee S, et al. Heijden MGA. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning [J]. *Nature Communications*, 2019,10(1):1–10.
- [3] 吴金水,葛体达,胡亚军.稻田土壤关键元素的生物地球化学耦合过程及其微生物调控机制 [J]. *生态学报*, 2015,35(20):6626–6634.
Wu J S, Ge T D, Hu Y J. A review on the coupling of biogeochemical process for key elements and microbial regulation mechanisms in paddy rice ecosystems [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(20):6626–6634.
- [4] Wei Z, Gu Y, Friman V P, et al. Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health [J]. *Science Advances*, 2019,5(9):0759.
- [5] 白 洋,钱景美,周俭民,等.农作物微生物组:跨越转化临界点的现代生物技术 [J]. *中国科学院院刊*, 2017,32(3):260–265.
- [6] Bai Y, Qian J M, Zhou J M, et al. Crop microbiome: Breakthrough technology for agriculture [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017,32(3):260–265.
- [7] Zhu D, An X L, Chen Q L, et al. Antibiotics disturb the microbiome and increase the incidence of resistance genes in the gut of a common soil collembolan [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5):3081–3090.
- [8] Peng J J, Wegner C, Bei Q C, et al. Metatranscriptomics reveals a differential temperature effect on the structural and functional organization of the anaerobic food web in rice field soil [J]. *Microbiome*, 2018,6(1):169.
- [9] 刘洋茨,王 尚,厉舒祯,等.基于功能基因的微生物碳循环分子生态学研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017,44(7):1676–1689.
Liu Y Y, Wang S, Li S Z, et al. Advances in molecular ecology on microbial functional genes of carbon cycle [J]. *Microbiology China*, 2017,44(7):1676–1689.
- [10] 朱永官,彭静静,韦 中,等.土壤微生物组与土壤健康 [J]. *中国科学:生命科学*, 2020,50:1–11.
Zhu Y G, Peng J J, Wei Z, et al. Linking the soil microbiome to soil health [J]. *Science China Press*, 2020,50:1–11.
- [11] Fierer N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome [J]. *Nature Review Microbiology*, 2017,15(10): 579–590.
- [12] Li M, Baker BJ, Anantharaman K, et al. Genomic and transcriptomic evidence for scavenging of diverse organic compounds by widespread deep-sea archaea [J]. *Nature Communications*, 2015,6(1):1–6.
- [13] Tignat-Perrier R, Dommergue A, Thollot A, et al. Seasonal shift in airborne microbial communities [J]. *Science of the Total Environment*, 2020,716:129–137.
- [14] Vaitilingom M, Amato P, Sancelme M, et al. Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010,76(1):23–29.
- [15] Brown J K M, Hovmøller M S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease [J]. *Science*, 2002,297(5581):537–541.
- [16] 朱永官,沈仁芳,贺纪正,等.中国土壤微生物组:进展与展望 [J]. *中国科学院院刊*, 2017,32:554–565.
Zhu Y G, Shen R F, He J Z, et al. China soil microbiome initiative: progress and perspective [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017,32:554–565.
- [17] McGrath K C, Thomas-Hall S R, Cheng C T, et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008,75(2):172–176.
- [18] Shrestha P M, Kube M, Reinhardt R, et al. Transcriptional activity of paddy soil bacterial communities [J]. *Environmental Microbiology*, 2009,11(4):960–970.
- [19] Deutscher M P. Degradation of RNA in bacteria: Comparison of mRNA and stable RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006,34(2): 659–666.
- [20] Dressaire C, Picard F, Redon E, et al. Role of mRNA stability during bacterial adaptation [J]. *PLoS One*, 2013,8(3):e59059.
- [21] Carvalhais L C, Dennis P G, Tyson G W, et al. Application of metatranscriptomics to soil environments [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012,91(2):246–251.

- [21] Mettel C, Kim Y, Shrestha P M, et al. Extraction of mRNA from Soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010,76(17):5995–6000.
- [22] He S, Wurtzel O, Singh K, et al. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics [J]. *Nature Methods*, 2010,7(10):807–812.
- [23] Pang X, Zhou D, Song Y, et al. Bacterial mRNA purification by magnetic capture–hybridization method [J]. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(2):91–96.
- [24] Celesnik H, Deana A, Belasco J G. Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal [J]. *Molecular Cell*, 2007,27(1):79–90.
- [25] Yi H, Cho Y, Won S, et al. Duplex-specific nuclease efficiently removes rRNA for prokaryotic RNA-seq [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011,39(20):1–9.
- [26] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977,74(12):5463–5467.
- [27] Metzker M L. Sequencing technologies—the next generation [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010,11(1):31–46.
- [28] White 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.
- [29] Heather J M, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA [J]. *Genomics*, 2016,107(1):1–8.
- [30] Clarke J, Wu H, Jayasinghe L, et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009,4(4):265–270.
- [31] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. [J]. *EMBnet Journal*, 2011,17(1):10–12.
- [32] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014,30(15):2114–2120.
- [33] Sun S, Chen J, Li W, et al. Community cyberinfrastructure for advanced microbial ecology research and analysis: The CAMERA resource [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010,39:546–551.
- [34] 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):1–8.
- [35] Kopylova E, Da L N C, Alberti A, et al. Deciphering metatranscriptomic data [M]/Picardi E. *RNA Bioinformatics. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2015:279–291.
- [36] 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):644–652.
- [37] Masella A P, Bartram A K, Truszkowski J M, et al. PANDAseq: Paired-end assembler for Illumina sequences [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012,13:31.
- [38] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011,27(21):2957–2963.
- [39] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie2 [J]. *Nature Methods*, 2012,9(4):357–359.
- [40] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010,26(19):2460–2461.
- [41] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990,215(3):403–410.
- [42] Buchfink B, Xie C, Huson D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nature Methods*, 2015,12(1):59–60.
- [43] Huson D H, Mitra S, Ruscheweyh H J, et al. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4 [J]. *Genome Research*, 2011,21(9):1552–1560.
- [44] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014,15(550):1–21.
- [45] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. EdgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Bioinformatics*, 2009,26(1):139–140.
- [46] Li R, Yu C, Li Y, et al. SOAP2: An improved ultrafast tool for short read alignment [J]. *Bioinformatics*, 2009,25(15):1966–1967.
- [47] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010,7(5):335–336.
- [48] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2 [J]. *Nature Biotechnology*, 2019,37(8):852–857.
- [49] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009,75(23):7537–7541.
- [50] Peng J J, Wegner C E, Liesack W. Short-term exposure of paddy soil microbial communities to salt stress triggers different transcriptional responses of key taxonomic groups [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017,8:400.
- [51] Smith G J, Angle J C, Salden L M, et al. Members of the genus *methylobacter* are inferred to account for the majority of aerobic methane oxidation in oxic soils from a freshwater wetland [J]. *mBio*, 2018,9(6):1–17.
- [52] Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. *Nature*, 2006,442(7104): 806–809.
- [53] Hausmann B, Pelikan C, Rattei T, et al. Long-Term transcriptional activity at zero growth of a cosmopolitan rare biosphere member [J]. *mBio*, 2019,10(1):1–16.
- [54] Bei Q, Moser G, Wu X, et al. Metatranscriptomics reveals climate change effects on the rhizosphere microbiomes in European grassland [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019,138:107604.
- [55] León-Sobrino C, Ramond J, Maggs-Köling G, et al. Nutrient acquisition, rather than stress response over diel cycles, drives microbial transcription in a Hyper-Arid namib desert soil [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019,10.
- [56] Roy C T, Lee J Y, Bottos E M, et al. Metaphenomic responses of a native prairie soil microbiome to moisture perturbations [J]. *mSystems*, 2019,4(4):10.1128/mSystems.00061–19.
- [57] Naylor D, Fansler S, Brislawn C, et al. Deconstructing the soil microbiome into reduced-complexity functional modules [J]. *mBio*, 2020,11(4):1–19.
- [58] Pei Y, Mamtimin T, Ji J, et al. The guanidine thiocyanate-high EDTA method for total microbial RNA extraction from severely heavy

- metal-contaminated soils [J]. Microbial Biotechnology, 2020,0(0): 1–14.
- [59] Malik AA, Swenson T, Weihe C, et al. Drought and plant litter chemistry alter microbial gene expression and metabolite production [J]. The ISME Journal, 2020,14(9):2236–2247.
- [60] Falk N, Reid T, Skoyles A, et al. Microbial metatranscriptomic investigations across contaminant gradients of the Detroit River [J]. Science of The Total Environment, 2019,690:121–131.
- [61] Motoki K, Watsuji T, Takaki Y, et al. Metatranscriptomics by *In situ* RNA stabilization directly and comprehensively revealed epibiotic microbial communities of Deep-Sea squat lobsters [J]. mSystems, 2020,5(5):1–20.
- [62] Doyle S M, Lin G, Morales-Mcdevitt M, et al. Niche partitioning between coastal and offshore shelf waters results in differential expression of alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic pathways [J]. mSystems, 2020,5(4):1–20.
- [63] Tan S, Cheung S, Ho T, et al. Metatranscriptomics of the bacterial community in response to atmospheric deposition in the Western North Pacific Ocean [J]. Marine Genomics, 2019,45:57–63.
- [64] Davenport E J, Neudeck M J, Matson P G, et al. Metatranscriptomic analyses of diel metabolic functions during a microcystis bloom in western lake erie (United states) [J]. Frontiers in Microbiology, 2019,10(2081):1–16.
- [65] Liu Z, Klümper U, Liu Y, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal activity and hosts of antibiotic resistance genes in activated sludge [J]. Environment International, 2019,129:208–220.
- [66] Wang D, Zheng Q, Huang K, et al. Metagenomic and metatranscriptomic insights into the complex nitrogen metabolic pathways in a single-stage bioreactor coupling partial denitrification with anammox [J]. Chemical Engineering Journal, 2020,98(125653): 1–9.
- [67] Patsios S I, Michailidou S, Pasentsis K, et al. Analysis of microbial community dynamics during the acclimatization period of a membrane bioreactor treating table olive processing wastewater [J]. Applied Sciences, 2019,9(3647):1–17.
- [68] 陆雅海.土壤微生物学研究现状与展望 [J]. 中国科学院院刊, 2015,30(Z1):106–114.
- Lu Y H. Recent development of soil microbiology and future perspectives [J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2015, 30(Z1):106–114.
- [69] Jansson J K, Hofmockel K S. Soil microbiomes and climate change [J]. Nature Reviews Microbiology, 2020,18(1):35–46.
- [70] Levy-Booth D J, Giesbrecht I J W, Kellogg C T E, et al. Seasonal and ecohydrological regulation of active microbial populations involved in DOC, CO₂, and CH₄ fluxes in temperate rainforest soil [J]. The ISME Journal, 2019,13(4):950–963.
- [71] Masuda Y, Itoh H, Shiratori Y, et al. Predominant but previously-overlooked prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, revealed by metatranscriptomics [J]. Microbes and environments, 2017,32(2):180–183.
- [72] Zhang C J, Pan J, Liu Y, et al. Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments [J]. Microbiome, 2020,8(1):94.
- [73] Cai Y F, Zheng Y, Bodelier P L E, et al. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils [J]. Nature Communication, 2016,7(11728):1–10.
- [74] Hausmann B, Pelikan C, Herbold C W, et al. Peatland Acidobacteria with a dissimilatory sulfur metabolism [J]. The ISME Journal, 2018,12(7):1729–1742.
- [75] Altshuler I, Ronholm J, Layton A, et al. Denitrifiers, nitrogen-fixing bacteria and N₂O soil gas flux in high Arctic ice-wedge polygon cryosols [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019,95(5):1–12.
- [76] Singleton C M, McCalley C K, Woodcroft B J, et al. Methanotrophy across a natural permafrost thaw environment [J]. The ISME Journal, 2018,12:2544–2558.
- [77] Rogers S, Shtarkman Y, Koçer Z, et al. Ecology of subglacial lake vostok (Antarctica), based on Metagenomic/Metatranscriptomic analyses of accretion ice [J]. Biology, 2013,2(2):629–650.
- [78] Gura C, Rogers SO. Metatranscriptomic and metagenomic analysis of biological diversity in subglacial lake vostok (Antarctica) [J]. Biology, 2020,9(55):1–20.
- [79] Cerro-Gálvez E, Casal P, Lundin D, et al. Microbial responses to anthropogenic dissolved organic carbon in the Arctic and Antarctic coastal seawaters [J]. Environmental Microbiology, 2019,21(4):1466–1481.
- [80] Chen L X, Hu M, Huang L N, et al. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage [J]. The ISME Journal, 2015,9(7):1579–1592.
- [81] Hua Z S, Han Y J, Chen L X, et al. Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics [J]. The ISME Journal, 2015,9(6):1280–1294.
- [82] Lu T, Xu N, Zhang Q, et al. Understanding the influence of glyphosate on the structure and function of freshwater microbial community in a microcosm [J]. Environmental Pollution, 2020,260(114012):1–9.
- [83] Karthikeyan S, Kim M, Heritier-Robbins P, et al. Integrated omics elucidate the mechanisms driving the rapid biodegradation of deepwater horizon oil in intertidal sediments undergoing oxic-anoxic cycles [J]. Environmental Science & Technology, 2020,54(16):10088–10099.
- [84] Zhou X, Hao Y, Gu B, et al. Microbial communities associated with methylmercury degradation in paddy soils [J]. Environmental Science & Technology, 2020,54(13):7952–7960.
- [85] Sharma P K, Sharma V, Sharma S, et al. Comparative metatranscriptome analysis revealed broad response of microbial communities in two soil types, agriculture versus organic soil [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2019,17(6):1–13.
- [86] Herold M, Martinez A S, Narayanasamy S, et al. Integration of time-series meta-omics data reveals how microbial ecosystems respond to disturbance [J]. Nature Communication, 2020,11(5281): 1–14.

作者简介: 李莹(1998-),女,河北廊坊人,中国农业大学硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。