

宏基因组学在环境工程领域的应用及研究进展

邓 晔^{1,2,*} 冯 凯^{1,2,3} 魏子艳^{1,2} 刘文宗^{1,2} 梁玉婷⁴ 金德才^{1,2}

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院环境生物技术重点实验室, 北京 100085;
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中丹科研教育中心, 北京 100190;
4. 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘 要 宏基因组学作为环境生物学(特别是环境微生物学)和基因组学结合而产生的新兴学科,利用其独特的生物分子检测技术和高通量基因筛选方法,在环境微生物群落研究和资源开发上取得了一系列突破性的进展,并逐步应用到环境科学与工程各个领域。旨在通过对宏基因组技术的简单介绍,总结近期它在环境工程领域,如水处理工程、污染土壤生物修复、生活垃圾生物处理、海洋及其他生境石油泄漏修复和生物电化学工程中的应用和进展。同时,也为环境工程领域中生物处理技术的改进提供更多微生物层面上的理论依据和方法学思路,并对宏基因组学在环境工程领域内的应用和发展进行了展望。

关键词 宏基因组学; 水处理工程; 石油泄漏; 生物修复; 垃圾处理; 生物电化学系统

中图分类号 X172 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2016)07-3373-10 DOI 10.12030/j.cjee.201501219

Recent studies and applications of metagenomics in environmental engineering

DENG Ye^{1,2,*} FENG Kai^{1,2,3} WEI Ziyang^{1,2} LIU Wenzong^{1,2} LIANG Yuting⁴ JIN Decai^{1,2}

(1. Key Laboratory of Environmental Biology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Sino-Danish Center for Education and Research, Beijing 100190, China;
4. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science, Nanjing 210008, China)

Abstract Metagenomics is an emerging research area that combines environmental biology (especially environmental microbiology) and genomics. It has achieved substantial progress in the areas of environmental microbial community dynamics and resource exploitation, and has been applied to the fields of environmental science and engineering using specialized molecular biology detection and high-throughput techniques. This review provides a brief introduction to metagenomics technology and a summary of its applications and recent progress in environmental engineering, including wastewater treatment, bioremediation of polluted soils, biological treatment of domestic garbage, oil leakage bioremediation at marine and other contaminated sites, and bioelectrochemical engineering. Theoretical results and methodological approaches at the microbial level are discussed to improve biological technology in environmental engineering. Finally, this review describes the prospects for the application and development of metagenomics in environmental engineering in the near future.

Key words metagenomics; wastewater treatment engineering; oil leakage; bioremediation; garbage treatment; bioelectrochemical system

1 宏基因组学简述

环境微生物在地球生态系统的能量和物质循环

中起着关键作用。环境微生物学作为研究微生物群落的生态分布、菌种组成、多样性结构、群体遗传特征和与环境相互作用的学科,近年来越来越得到环

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21437005);中国科学院战略性先导科技专项 B(XDB15010302);森林与土壤生态国家重点实验室开放基金课题(LFSE2014-02)

收稿日期:2015-01-29; **修订日期:**2015-03-25

作者简介:邓晔(1979—),男,博士,研究员,研究方向:环境宏基因组分子检测技术,微生物群落结构、功能、与环境的关联机制以及物种间的交互作用等。E-mail: yedeng@rcees.ac.cn

* 通讯联系人

境科学^[1-2]、医学健康^[3-4]和生物领域^[5-6]的极大重视。然而,微生物有着个体微小、新陈代谢旺盛、易扩散及变异能力强的特性,所以目前我们对环境微生物的作用机理、群体效应和遗传机制仍缺乏足够的了解。环境中可培养的微生物仅占自然界微生物中的较少部分,研究证实 1 g 土壤中的 10⁷ 个细菌种类仅能被培养 1% ~ 10% 左右^[7]。利用传统的微生物分离及培养技术不能完全反映环境中的微生物群落结构组成及多样性特征,因此,我们亟需一个高效和通用的技术方法帮助获取环境中微生物群落的组成、结构和功能信息。

1998 年,HANDELSMAN 等^[8]首先提出了宏基因组 (metagenome, 也称元基因组) 的概念,认为应该将环境中的所有基因组综合进行研究。而宏基因组

学 (metagenomics) 则是研究宏基因组的新兴学科。它将环境中的所有微生物看作一个整体,从基因组的水平和微生物群落的层面上,利用分子生物学的技术对其进行统一的检测和分析,探讨微生物与自然环境或生物体之间的关系^[9]。宏基因组学分析不同于传统的基于培养的微生物学分析手段,它不需要筛选各微生物群落的纯培养物,而是直接测定样品中所有微生物的核酸序列,以此分析微生物群落的组成和结构。表 1 将常用的环境微生物的分子检测方法进行了比较,列出了其应用范围。宏基因组学不局限于单一样品的分析,还通过对不同样品进行比较,发现不同物种间的组成和基因功能结构上的异同,为进一步了解环境样品间基因型与表型的差异提供了有效方法^[10]。

表 1 常用环境微生物分子检测技术的比较
Table 1 Comparison of commonly used molecular techniques in environmental microbiology

技术	用于环境样本研究年份	基本原理	操作过程	优点	缺点
变性梯度凝胶电泳 (DGGE) ^[11]	1993	不同的双链 DNA 片段沿着化学梯度的不同解链行为在凝胶的不同位置上停止迁移	1. 核酸 DNA 提取 2. 高保守序列或功能基因片段 DNA 的 PCR 扩增 3. 凝胶电泳分析 PCR 产物	1. 可直接克隆分析序列 2. 可同时分析多个样品 3. 可重复、快速、容易操作	1. PCR 引起的偏见 2. 只能分离较小的片段 3. 通常只显示优势种类的片段 4. 对群落中细菌数量可能估计过多
末端限制性片段长度多态性技术 (TRFLP) ^[12]	1997	一端荧光标记的引物进行 PCR 扩增,将其产物限制性内切酶消化,进行 DNA 测序仪分离,通过激光扫描,得到荧光标记的片段图谱	1. 提取群落 DNA 并以带有荧光标记的引物进行 PCR 扩增 2. 限制性内切酶酶切 3. 测序胶分离 4. 识别标记片段 5. 分析激光扫描图谱	1. 可检测丰度较低的种群 2. 可以推断系统发生分类 3. 精确度和图谱分辨率高 4. 可重复、快速	1. 无法直接克隆分析序列,匹配不够精确 2. 无法鉴定至种甚至属水平 3. 低估生物多样性
基因芯片技术 ^[13]	2001	通过与一组已知核酸探针杂交进行核酸序列测定,即杂交测序方法	1. 环境样品中 DNA 提取、纯化、定量、PCR 扩增 2. 基因芯片构建、荧光标记 3. DNA 的准备 4. 芯片杂交 5. 芯片扫描和杂交信号定量分析	1. 通量高,准确,全面,定量性高 2. 确定功能准确 3. 可以检测到低丰度微生物 4. 受污染干扰小	1. 受到功能基因探针限制 2. 不能与未知基因比较相似性 3. 不能鉴别新基因
高通量测序技术 ^[14-15]	2006	边合成边测序,加入 dNTP 通过酶促反应催化底物激发荧光或直接加入荧光标记的 dNTP 来释放荧光信号,通过捕获荧光信号来获得 DNA 互补链序列信息	1. 提取 DNA 样品进行末端修饰,并连接到测序平台 2. 进行测序反应 3. 数据分析	1. 通量高,准确,全面 2. 可鉴别新的基因 3. 序列数据可用于探索生物物种	1. 低丰度物种受到检测深度限制 2. 受到注释准确性的限制 3. 分析难度大

目前,宏基因组学中的微生物高通量检测方法主要有 2 种,即高通量测序技术和基因芯片技术。在高通量测序技术里,以罗氏 454 测序技术和 Illumina 测序技术是目前应用最为广泛的技术。罗氏 454 测序技术出现较早,但 Illumina 测序技术以其低错误率、低成本和高通量的特点,逐步在测序市场中占据优势地位^[16]。基因芯片是一种小型的 DNA 阵列,目前在环境微生物研究领域主要应用的有功能基因芯片 (GeoChip)^[17] 和系统发育芯片 (Phylo-Chip)^[18] 2 种。高通量测序准确度高,对微生物识别率好,可以发现新基因,但分析方法较为复杂,其定量性不够好。而基因芯片虽然不能发现新基因,但其高通量性、准确度、定量性以及微生物基因的检测深度是高通量测序无法比拟的^[19]。因而基因芯片与高通量测序技术互补,有着各自的优势。环境微生物宏基因组技术结合环境地球化学参数,在微生物群落组成和多样性鉴定、微生物群落功能、以及微生物与环境的相互作用研究方面展现出巨大的潜力(图 1),但随着测序成本的下降和测序的增加,宏基因组的高通量数据量增加迅速,同时序列的拼接及序列与基因预测往往需要大量的运算资源,这也对宏基因组的分析提出了更高的要求^[20]。

目前,微生物宏基因组学已经成为微生物领域和环境科学与工程领域内的研究热点和前沿内容,广泛应用于各个方面,诸如全球气候变化^[21]、生物地理分布^[22]、海洋环境研究^[23]、农业生态系统^[24]、人体共生微生物^[25]、生物修复^[26] 和资源开发^[27] 等各个领域。而本文主要选取环境工程领域的 5 个主

要研究方面进行讨论,总结近期宏基因组技术在水处理工程、污染土壤生物修复、生活垃圾生物处理、海洋及其他生境石油泄漏修复和生物电化学工程等环境工程领域的研究成果,展示宏基因组学在环境工程中的广阔应用前景,展望其未来的发展趋势和研究方向。

2 宏基因组学在环境工程领域的应用研究

2.1 宏基因组学在水处理工程方面的研究

近年来生活污水和工业废水的产量逐年上升,加上一些重污染企业的减排需求,水处理工程无疑逐步成为环境工程领域尤为重要的部分。现阶段,在水处理工艺上,普遍选用以生物处理为主的厌氧或好氧处理方法,因此,对水处理系统中的微生物群落组成和功能进行研究,不仅可以深入了解处理工艺上的机理,而且可以预测反应器自身的处理能力变化,为污水处理厂的管理与改进提供了有效的依据^[28]。

运用宏基因组学技术,可以从环境中分离出具有可降解污染物或有活性的基因簇,从而指导难降解污染物的降解,目前主要涉及石油烃、重金属及各种有毒有害化合物等^[29]。JIA 等^[30] 对制革污水处理厂的活性污泥进行 DNA 提取,采用 Illumina 测序技术得到起到相应降解作用的关键基因,进而对能处理污水中金属铜离子和镉离子的功能微生物进行分析,对后续的污水中提高铜、镉离子的生物处理效率提供了有效的途径。WANG 等^[31] 利用基因芯片技术,分析了北京的 4 个污水处理厂活性污泥的微

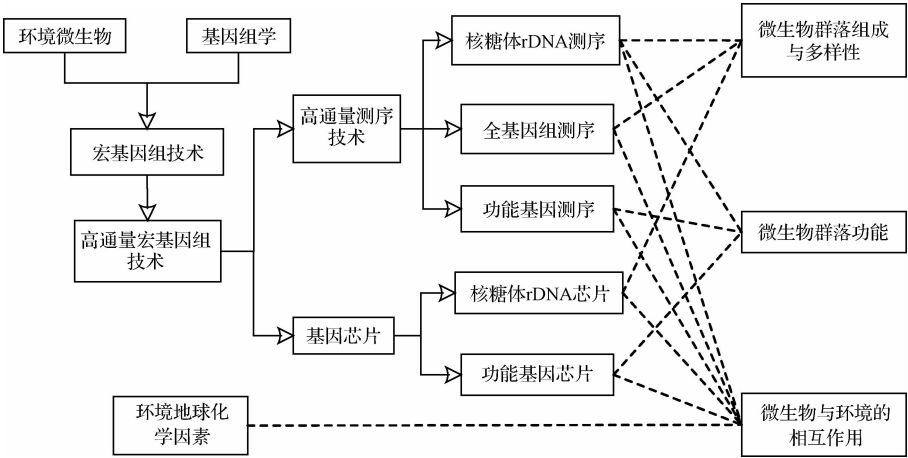


图 1 环境微生物宏基因组与环境地球化学因素结合揭示微生物群落的组成和功能

Fig. 1 Microbial community composition and function revealed by environmental microbial metagenomics and environmental geochemical parameters

生物种群结构及特性基因,发现不同的微生物在处理污水中难降解物质时有着相似的基因。同时,微生物的功能跟污水的温度、溶解氧浓度、氨浓度以及化学需氧量的负荷率有着密切关系,并辨析了微生物群落和污水处理的环境变量之间的关系。YE等^[32]基于 Illumina 高通量测序的研究表明,不同反应器中微生物整体新陈代谢途径相似,但特定代谢途径中的基因序列是不同的。在不同的污水处理反应器和不同时间下,微生物的降解污染物的基因丰度和多样性有明显差异,为监测和评估活性污泥降解污染物和净化废水的能力提供了有力的依据。

水处理工程中不但需要降解污水中有机物,还需要去除污水中的氮、磷元素,减小水体富营养化的几率。XU等^[33]采用基因芯片技术分析限氧和高浓度有机物进水条件下,脱硫和脱氮微生物群落多样性,发现在限氧条件下硫酸盐还原微生物的功能基因并未表现出显著差异,然而脱氮基因的丰度有所减少,更重要的是,硫酸盐还原菌可能会改变其自身菌种或基因来更高效地进行硫化物的氧化,这为工程上废水处理提供了新的处理思路。ZENG等^[34]将亚硝化和厌氧氨氧化相结合,耦合工艺进行脱氮,通过宏基因组技术对其相应优势菌种进行检测,发现在厌氧氨氧化阶段,其菌种由起初的厌氧氨氧化菌中某一属菌(*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*)转变成另一属菌(*Candidatus Brocadia fulgida*)。ZHAO等^[35]利用基因芯片技术,考察了亚硝化和厌氧氨氧化反应器中微生物群落,发现氮化合物、碳氮比和操作参数是微生物脱氮的重要因素。LIU等^[36]在研究其反应器的甲烷化、反硝化和厌氧氨氧化作用时,利用高通量测序技术发现反应器中微生物群落表现出了丰富的多样性,细菌、古细菌和真核微生物含量分别为 87.9%、6.3% 和 5.3%。HE等^[37]研究表明,*Candidatus Accumulibacter* 是对污水处理脱磷过程较为重要的一类细菌,同时这一细菌在群落中的新陈代谢、生理特征和生态分布以及脱磷机制也得到了进一步的研究。高通量测序技术也在饮用水氯消毒的微生物种群研究中得到了应用,微生物群落结构受到氯消毒的影响,其抗性微生物和抗性基因都得到富集,其中变形菌是最为优势的细菌门^[38]。

污水处理中含有抗生素的工业废水处理现在也是研究的热点,微生物种群在其中的效应和反馈又十分特殊。一方面抗生素对于大部分微生物有致死

作用,而另一方面一些特殊的微生物又具有抗生素抗性,并能够把这一能力传播给其他微生物。合理的利用微生物的代谢途径,对含抗生素的废水能产生较好处理效果^[39]。ZHANG等^[40]利用高通量的基因芯片技术,结合定量 PCR 和基因克隆技术,对主要含土霉素的生化废水中的微生物种群进行分析。结果显示,微生物中的降解基因跟废水抗生素的浓度有较高的关联性,同时这些微生物拥有抗生素的抗性基因,并发现了降解碳元素的功能基因,微生物群落的结构呈现出了丰富的功能多样性,为含抗生素的废水处理系统中微生物群落的多样性提供了事实依据。YANG等^[41]利用 Illumina 测序技术和生物信息分析方法,对污水处理厂中抗生素的抗性基因的迁移进行了揭示,将近 99.82% 的抗生素抗性基因在污水处理过程中被去除。CHRISTGEN等^[39]也利用 Illumina 测序技术对厌氧、好氧及厌氧-好氧反应器中抗生素抗性基因进行研究,发现出水抗生素抗性基因浓度分别降到 74、34 和 29 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (进水浓度 198 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),厌氧-好氧反应器处理效果最优。

研究环境微生物对污水中污染物的降解机理,有助于预测反应器的运行状态,而膜生物反应器(MBR)在废水处理中拥有着较广的市场,目前已广泛用于处理城市污水^[42]。膜生物反应器的性能完全依赖于活性污泥中的微生物群落的结构,然而,MBR中的微生物功能结构仍需要进一步的研究。SUN等^[43]利用基因芯片技术,对4座MBR中的微生物基因进行分析,不仅发现不同的反应器中的微生物功能基因有抗生素耐药性、耐金属离子和有机物的降解作用,还揭示了反应器中微生物功能结构与反应器的变量(水力停留时间、进水COD、氨氮浓度、温度和腐殖质浓度)之间的关系,同时还提出了基于基因芯片来研究污水处理厂中微生物群落的方法。

2.2 宏基因组学在土壤生物修复方面的研究

土壤生态系统中微生物组成复杂、类群繁多、数量巨大、功能多样,使得微生物在土壤中有有机物的分解与转化、营养元素的循环、肥力形成以及污染区域的净化起着重要作用。对土壤微生物群落结构多样性、分布格局以及元素循环的考察与研究也一直受到众多学者的关注^[44]。近年来,探究这一问题的最前沿的方法是利用宏基因组学的相关技术,通过分析分子、细胞、群落和生态系统等水平相互之间的关

系和网状结构,对土壤生态系统进行全面的研究,进而促进生物修复的相关工作^[45]。将土壤微生物的研究应用于生产实践,相关理论和进展将有利于优化微生物的功能,增强其功能表达效率、提高作物养分供给、减少对生态环境的负面影响,在增加生产的同时,保证环境不受到危害。

通过宏基因组技术可以考察微生物群落与环境污染物之间的关系,并通过环境微生物的富集手段,从污染环境中筛选出具有不同降解污染物功能的细菌,为生物降解提供有效的途径。目前,已经发现微生物具有降解农药、塑料、多氯联苯、多环芳烃、石油烃、染料和酚类化合物等多种有机污染物的功能级相关基因,可以对土壤环境的生物修复起着重要作用^[46]。JIANG等^[47]从煤矿中的土壤,通过DNA分析鉴定菌种,富集得到甲烷氧化混合菌群,对煤矿土壤中的瓦斯气体的去除有一定的促进作用,改善了煤矿内部土壤环境,提供了安全可靠的生产作业空间。

宏基因组技术同时被大量用于分析和监控土壤重金属污染的修复过程。例如,美国汉福德地区由于哥伦比亚河流的铬污染,因而受到影响。2004年,大量的释氢化合物被投加到该地区土壤中,希望通过原位生物修复的方式来调整该地区微生物种群,降低铬污染。通过直接细胞计数法分析,土壤中细胞数达到 10^8 个 $\cdot$ mL⁻¹,铬的浓度在一年内由 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 降低到背景值以下,并利用系统发育芯片技术发现原位微生物种群发生了明显变化^[48]。这种靶向富集作用得到的细菌通过分析,主要有硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌和铁还原菌,均能对铬产生还原作用^[49]。土壤中的重金属也可能受到化工污染等其他因素的影响。NAVARRO-NOYA等^[50]对墨西哥的银尾矿中的植物根际微生物的宏基因组DNA进行分析,发现在该区域的土壤中主要菌种为化能自养型和硫氧化型细菌。

宏基因组学也可以结合一些相关分子生物学技术来进行研究,通过不同手段对微生物群落结构和特性进行深入挖掘,提高目标基因在基因组中出现频率,从而构建出更多的工程菌,对解决各类结构复杂、难于降解的污染物的处理和环境保护产生积极作用。RICHARDSON等^[51]结合荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)与宏基因组学技术,对采用蒸汽修复土壤的微生物群落结构特性进行研究,发现具有降解特性的微生物大部分属

于中温种群,经对土壤修复处理后,细菌和古菌均可存活,且细菌的生长更为明显。SMIDT等^[52]利用稳定同位素标记(stable isotope probing, SIP)和宏基因组技术相结合,通过检测与PCBs降解相关的双加氧酶活性的缺失或活力不足,可以得出厌氧处理法更有助于PCBs的脱氯,从而对土壤的生物修复措施进行调整。

2.3 宏基因组学在生活垃圾生物处理方面的研究

随着城市化进程的加快,生活垃圾的处理成为环境工程重要课题。但是在城市生活垃圾中,厨余类有机物在垃圾中的含量占有较大比例,不利于直接将其进行填埋,这为现在的生活垃圾的处理技术提出了较高要求。利用堆肥的生物发酵技术,可以合理地利用生活垃圾中的有机物中的能量,重新释放出能量,解决部分地区的电力供应问题和热量供应,同时,发酵之后的无机物,作为营养元素较为丰富的无机肥,可以归还到土地中,重新得到利用。堆肥凭借其自身的优点,逐渐被研究人员所重视。YANG等^[53]以垃圾中的木质素为主要营养来源,构建了多种微生态稳定菌群来进行生物转化纤维质废弃物来进行产酶,通过宏基因组的技术对菌群进行分析,结果发现,所构建微生态菌群组成丰富,主要有曲霉(*Aspergillus*)、青霉(*Penicillium*)、木霉(*Trichoderma*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和代尔夫特菌(*Delft bacteria*)等微生物,在反应进行中一直对垃圾中的木质素保持较高的降解效率和产酶活性。ZHAO等则对水稻秸秆^[54]、牛粪^[55]等固体废弃物进行厌氧发酵、产甲烷进行研究,采用微生物燃料电池和连续搅拌釜式反应器结合的技术,揭示了在产甲烷发酵中的优势菌种,为低温下进行生物发酵产甲烷的工业进步提供了保障。LI等^[56]采用宏基因组技术,对固态生物发酵反应器中的微生物进行研究,发现普遍的发酵微生物有:分解蛋白质和纤维素的厚壁菌门的梭菌目(*Clostridiales*),分解脂肪和碳水化合物的杆菌(*Bacillus*)、变形菌(*Proteobacteria*)和拟杆菌(*Bacteroidetes*),还有以产甲烷菌(*Methanogenus*)为代表的古细菌等,在此基础上,对垃圾发酵的条件提出建设性意见,增强优势菌种的培养,以期提高产甲烷速率及有机物降解效率,增强固体废弃物的利用率。

在垃圾填埋方面,由于垃圾渗滤液成分复杂多变,垃圾渗滤液的处理也一直是环境工程领域的一大热门研究方向。原位微生物群落在污染物的降解

方面,起着重要作用,可以反映污染物的地球化学作用,同时,微生物群落的组成在一定程度上表明,垃圾渗滤液的生物修复方面的微生物具有的巨大潜能^[57]。LU等^[58]利用基因芯片技术对垃圾渗滤液中的微生物群落的功能基因多样性和结构进行分析,微生物群落功能多样性趋于随着垃圾渗滤液地球化学作用变化而变化,如pH、硫浓度、氨浓度和溶解性有机物浓度的变化等,为生物处理渗滤液问题提供了一些依据。

2.4 宏基因组学在海洋及其他生境石油泄漏修复方面的研究

复杂多变的海洋环境为海洋微生物提供了多种生存环境,使其在物种多样性、基因多样性和生态功能多样性方面具有独特的优势。海洋中的可培养微生物仅占海洋微生物总量的0.001%~0.1%^[59],因此宏基因组学的相关技术为探索海洋微生物的资源提供新的手段,并且也为海洋污染修复提供了新的解决思路。采用生物法进行石油修复具有处理费用低、治理效果好、对环境影响小、无二次污染等优点,逐渐吸引越来越多的研究人员深入开展研究^[60]。近年来,石油远洋运输产业发展迅速,随之而来的是原油在运输过程中容易泄漏到海洋中,给海洋带来灾难。目前处理石油的菌种多来自于常温或高温环境,这与海洋环境条件有着较大区别,可能导致微生物活性不高,因此利用宏基因组技术,筛选出适用于低温降解石油的微生物更适合于海洋石油生物修复的发展路线。KUBE等^[61]使用宏基因组技术从黑海底泥中筛选出了苯甲酸盐厌氧降解基因,并构建了基因文库,推断出了芳香族化合物的降解途径,为石油污染重芳香族化合物的降解提供了新的降解思路。

在石油泄漏之后,海洋微生物对海洋环境的生物修复作用是不可忽视的,借此可以为海洋中石油泄漏生物修复提供一些研究思路。KOSTKA等^[62]利用高通量测序技术研究了2010年墨西哥湾石油污染事件对沿海沙滩的影响,发现石油污染对于周边环境微生物的群落结构及丰度组成有着一定的影响,变形菌中的碱菌属(*Alcanivorax*)、海杆菌属(*Marinobacter*)和红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)中的微生物对于石油降解起着关键作用。HAZEN等^[1]利用功能基因芯片和系统发育芯片,研究了墨西哥湾石油污染的海水微生物群落结构功能,发现泄漏至海洋中的石油,刺激了深海中某些能分解石油的

微生物,并在40 d左右的时间内,石油周围海域中的微生物群落发生较大变化,表明海洋微生物能对海洋中的环境改变作出较快反应并在污染的生物修复中起着关键作用。LU等^[63]用基因芯片技术,对深海石油泄漏之后影响区域的微生物群落结构进行分析,发现在石油泄漏地区,可以降解碳氢化合物的厌氧和好氧途径的微生物代谢途径都有所增强,并且与碳、氮、磷、硫和铁循环、金属抗性以及噬菌体复制等有关的功能基因丰度也有所提高,表明深海石油泄漏之后,海洋中的原位微生物完全有足够的潜能进行生物降解和原位生物修复。此外,MASON等^[64]对海洋螺菌(*Oceanospirillales*)进行了研究,发现海洋螺菌在石油泄漏之后,可以对石油降解做出快速响应,并利用自身代谢途径对石油进行降解,为石油泄漏原位修复产生重要作用。可见海洋本身存在的微生物在天然条件下降解石油污染具有较大潜力。

油田中石油污染物的迁移转化也是关注的重点^[65]。石油污染物的迁移和积累将会影响到环境生态,有可能对生态系统乃至人类造成威胁。LIANG等^[66]对中国东北部的某油田附近土壤按石油污染浓度梯度进行采样,并利用基因芯片技术对该区域原位微生物群落结构进行分析,结合多元统计分析方法对功能基因和石油污染物浓度关系进行分析。结果发现,随着污染物梯度变化,功能基因的丰度和多样性逐渐减少,此外,石油浓度和土壤中速效氮的浓度是影响该区域微生物群落结构的主要因素。这些结果对石油污染地区提供了微生物功能多样性分布的特点,为石油污染原位修复和管理提供了潜在的信息。

石油污染的土壤自身也有一定的潜力来进行自我修复,恢复生态功能。LIANG等^[67]运用基因芯片技术研究了石油污染的土壤中微生物群落结构,发现细菌、古菌和真菌所占的比例显著下降,调控碳氮固定和碳降解的功能基因丰度也有所下降,但与分解儿茶酚等石油污染物类物质相关的基因丰度却有所提高。DOS SANTOS等^[68]使用454测序技术也表明,海细菌属(*Marinobacterium*)、海杆菌属(*Marinobacter*)和解环菌属(*Cycloclasticus*)等微生物种群在石油污染的土壤中丰度也有所增加,再次验证了石油污染区域进行原位生物修复的可能。

2.5 宏基因组学在生物电化学工程中的研究

生物电化学系统(bioelectrochemical system,

BES)是一类在电化学系统的阳极和阴极中至少有一侧电化学反应是在微生物的催化作用下进行的系统装置^[69],利用微生物胞外电子传递能力回收生物质能源,主要包括产生电能的微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)^[70]和产生氢能的微生物电解池(microbial electrolysis cell, MEC)^[71]。BES 系统的优势在于处理废水的同时,能回收废水废弃生物质所蕴含的大量能量,因而 BES 系统将是环境工程废水处理极具发展潜力的新技术。BES 系统中的微生物群落结构和工作机理尚有巨大研究空间,如何实现高效 BES 系统构建以及优化调控废水处理效能,都需要基于电子传递菌群和系统菌群功能的解析,宏基因组学技术已经成为 BES 系统开发和优化的重要分析手段。

LIU 等^[72]利用基因芯片技术对不同操作条件下 MECs 反应器中的微生物群落的功能结构进行分析,MECs 反应器在单一的基质条件下培养 4 个月之后,微生物的功能和系统发育多样性已显著提高,发现产氢越高的反应器中微生物多样性越丰富,与此同时,改变不同的 MECs 反应器的启动条件和培养条件,微生物群落结构发生明显变化,并且这种变化与反应器内电子回收利用率和 COD 的降解有关。LIU 等^[73]进一步通过基因芯片技术对 MEC 反应器生物膜形成过程的群落结构变化及反应器功能关联进行分析,发现电极生物膜中与电子传递不直接相关的少数微生物因竞争而减少或消失,这些菌群只能利用特定基质生长,大多数产电微生物(脱硫弧菌(*Desulfovibrio*),红假单胞菌(*Rhodopseudomonas*),希瓦氏菌(*Shewanella*)和地杆菌(*Geobacter*))能在较短的时间内快速生长,并使 MEC 反应器获得较好的性能。

WANG 等^[74]对使用废水作为基质进行产生物气的 MEC 反应器中的浮游微生物群落状态进行研究,通过基因芯片和相关生物统计方法分析发现高产氢反应器的功能菌群特征,主要有 4 种特定的群落构成,包括希瓦氏菌(*Shewanella*),假单胞杆菌属(*Pseudomonas*),地杆菌(*Geobacter*)和根瘤菌(*Bradyrhizobium*)。高产氢 MEC 系统中微生物受到 pH 变化冲击后表现出系统恢复差异,发现决定产氢量相关的产电微生物比其他功能菌群具有较高的 pH 适应灵敏性。VARRONE 等^[75]采用污水接种,搭建了处理污水并产氢的 MEC 反应器,并利用基因芯片技术对微生物进行分析,结果显示,利用污水进行接

种可以驯化得到高产氢、高污水处理效率的微生物菌种,并且 MEC 反应器中产氢效率可以通过电子传递过程进行控制。此外,结果显示,异化金属还原菌和产甲烷菌的拮抗作用是 MEC 反应器中高效率产氢的关键。

LIANG 等^[76]用基因芯片和 Illumina 16S rRNA Miseq 测序技术,考察了不同碳源(葡萄糖和碳酸盐)的生物阴极还原硝基苯的微生物群落结构和系统发育功能,从开始接种到生物阴极正常运行过程,碳源变化对生物阴极的微生物群落结构产生明显改变。借助条件优化生物阴极系统将硝基苯还原为毒性较小的苯胺,结合功能基因变化阐释了在不同碳源条件下利用生物阴极还原硝基苯机理,但是生物阴极从电极直接接受电子并实现污染物彻底降解的潜在功能菌群及其协作功能尚待深入研究。

目前,生物电化学工程作为环境工程领域新兴的处理废物的方法,仍需要更多的研究来使得该领域变得成熟。宏基因组学的相关技术在研究生物电化学系统中微生物群落结构和系统发育功能的同时,结合相关的生态学理论知识,极大促进了生物电化学系统中相关处理机理及机制的研究,为生物电化学工程处理废物提供了更多的思路及方法。

3 展 望

宏基因组学在微生物研究中已经占据了重要的地位,通过不同的基因文库的筛选方法和 2 种不同的基因测序技术的结合,宏基因组学在水处理工程、污染土壤生物修复、生活垃圾处理、海洋及其他生境石油泄漏修复和生物电化学工程等方面均取得了成果,使得宏基因组学在环境工程领域的应用和推广得到了进一步的提升。

随着生物技术的迅速发展,宏基因组学的研究内容和手段也在不断深入,但如何快速有效地处理高通量的数据成为其发展的主要瓶颈^[77-78]。而在环境工程领域,这一问题更加突出,大部分环境工程研究人员缺乏生物信息挖掘和统计分析的相关背景,这造成了研究者很难从高通量的宏基因组数据中迅速的分析得到最直观的信息,从而极大地限制了这一技术的进一步推广。因此,现阶段我们不光要推广宏基因组技术,也得构建面向环境科学和工程研究者使用的公共分析平台,能够简洁、快速地帮助研究者解读宏基因组里蕴含的核心数据^[20]。只有这样,环境微生物的世界也才会逐步被人类所了

解,进而推动环境科学和工程实践进入新的发展时期。

参考文献

- [1] HAZEN T. C. , DUBINSKY E. A. , DESANTIS T. Z. , et al. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science*, **2010**, 330(6001):204-208
- [2] WILKINS D. , YAU S. , WILLIAMS T. J. , et al. Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments. *FEMS Microbiology Reviews*, **2013**, 37(3):303-335
- [3] FRANK D. N. , PACE N. R. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current Opinion in Gastroenterology*, **2008**, 24(1):4-10
- [4] DANTAS G. , SOMMER M. O. A. Context matters-the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Current Opinion in Microbiology*, **2012**, 15(5):577-582
- [5] CHISTOSERDOVA L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnology Letters*, **2010**, 32(10):1351-1359
- [6] FAUST K. , RAES J. Microbial interactions; From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, **2012**, 10(8):538-550
- [7] KELLENBERGER E. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO Reports*, **2001**, 2(1):5-7
- [8] 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. *Chemistry & Biology*, **1998**, 5(10):R245-R249
- [9] ZENGLER K. , PALSSON B. O. A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nature Reviews Microbiology*, **2012**, 10(5):366-372
- [10] TURNBAUGH P. J. , LEY R. E. , MAHOWILD M. A. , et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **2006**, 444(7122):1027-1031
- [11] MUYZER G. , DE WAAL E. C. , UITTERLINDEN A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **1993**, 59(3):695-700
- [12] LIU W. T. , MARSH T. L. , CHENG H. , et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **1997**, 63(11):4516-4522
- [13] WU Liyou, THOMPSON D. K. , LI Guangshan, et al. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**, 67(12):5780-5790
- [14] POINAR H. N. , SCHWARZ C. , QI Ji, et al. Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*, **2006**, 311(5759):392-394
- [15] EDWARDS R. A. , RODRIGUEZ-BRITO B. , WEGLEY L. , et al. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, **2006**, 7(1):57-70
- [16] VAN Vliet A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: Challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, **2010**, 302(1):1-7
- [17] HE Zhili, DENG Ye, ZHOU Jizhong. Development of functional gene microarrays for microbial community analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **2012**, 23(1):49-55
- [18] HAMADY M. , LOZUPONE C. , KNIGHT R. Fast UniFrac: Facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *The ISME Journal*, **2010**, 4(1):17-27
- [19] ZHOU Jizhong, HE Zhili, YANG Yunfeng, et al. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. *MBIO*, **2015**, 6(1):e02288-14
- [20] 魏子艳, 金德才, 邓晔. 环境微生物宏基因组学研究中的生物信息学方法. *微生物学通报*, **2015**, 42(5):890-901
- WEI Ziyang, JIN Decai, DENG Ye. Bioinformatics tools and applications in the study of environmental microbial metagenomics. *Microbiology*, **2015**, 42(5):890-901 (in Chinese)
- [21] ZHOU Jizhong, XUE Kai, XIE Jianping, et al. Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming. *Nature Climate Change*, **2012**, 2(2):106-110
- [22] MARON P. A. , MOUGEL C. , RANJARD L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, **2011**, 334(5/6):403-411
- [23] SIMON H. M. , SMITH M. W. , HERFORT L. Metagenomic insights into particles and their associated microbiota in a coastal margin ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, **2014**, 5:466
- [24] WLASIUK G. , VERCELLI D. The farm effect, or: When, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, **2012**, 12(5):461-466
- [25] REYES A. , SEMEKOVICH N. P. , WHITESON K. , et al. Going viral: Next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nature Reviews Microbiology*, **2012**, 10(9):607-617
- [26] NTOUGIAS S. , BOURTZIS K. , TSIAMIS G. The microbiology of olive mill wastes. *Biomed Research International*, **2013**, 2013:784591
- [27] KUANG Jialiang, HUANG Linan, CHEN Linxing, et al. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *The ISME Journal*, **2013**, 7(5):1038-1050
- [28] FANG Hua, CAI Lin, YU Yunlong, et al. Metagenomic a-

- analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresource Technology*, **2013**, 129:209-218
- [29] 程凡升,蔡婷,金剑,等. 水体宏基因组学研究进展及应用. *北京农学院学报*, **2010**, 25(1):77-80
CHENG Fansheng, CAI Ting, JIN Jian, et al. Research advance and applications in aquatic metagenomics. *Journal of Beijing University of Agriculture*, **2010**, 25(1):77-80 (in Chinese)
- [30] JIA Shuyu, WANG Zhu, ZHANG Xuxiang, et al. Metagenomic analysis of cadmium and copper resistance genes in activated sludge of a tannery wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Biology*, **2013**, 34(S2):375-380
- [31] WANG Xiaohui, XIA Yu, WEN Xianghua, et al. Microbial community functional structures in wastewater treatment plants as characterized by geochip. *PLoS One*, **2014**, 9(3):e93422
- [32] YE Lin, ZHANG Tong, WANG Taitao, et al. Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environmental Science & Technology*, **2012**, 46(24):13244-13252
- [33] XU Xijun, CHEN Chuan, WANG Aijie, et al. Bioreactor performance and functional gene analysis of microbial community in a limited-oxygen fed bioreactor for co-reduction of sulfate and nitrate with high organic input. *Journal of Hazardous Materials*, **2014**, 278:250-257
- [34] ZENG Taotao, LI Dong, ZHANG Jie. Characterization of the microbial community in a partial nitrifying sequencing batch biofilm reactor. *Current Microbiology*, **2011**, 63(6):543-550
- [35] ZHAO Jian, ZUO Jiane, WANG Xiaolu, et al. GeoChip-based analysis of microbial community of a combined nitrification-anammox reactor treating anaerobic digestion supernatant. *Water Research*, **2014**, 67:345-354
- [36] LIU Bo, QI Xuliang, WANG Zhu, et al. Integration of methanogenesis with anaerobic ammonium oxidation and denitrification for treatment of tannery wastewater in an uasb reactor. *Fresenius Environmental Bulletin*, **2013**, 22(1A):286-292
- [37] HE Shaomei, MCMAHON K. D. Microbiology of '*Candidatus Accumulibacter*' in activated sludge. *Microbial Biotechnology*, **2011**, 4(5):603-619
- [38] SHI Peng, JIA Shuyu, ZHANG Xuxiang, et al. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Research*, **2013**, 47(1):111-120
- [39] CHRISTGEN B., YANG Ying, AHAMMAD S. Z., et al. Metagenomics shows that low-energy anaerobic-aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene levels from domestic wastewater. *Environmental Science & Technology*, **2015**, 49(4):2577-2584
- [40] ZHANG Yu, XIE Jianping, LIU Miaomiao, et al. Microbial community functional structure in response to antibiotics in pharmaceutical wastewater treatment systems. *Water Research*, **2013**, 47(16):6298-6308
- [41] YANG Ying, LI Bing, ZOU Shichun, et al. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Research*, **2014**, 62:97-106
- [42] HUANG Xia, XIAO Kang, SHEN Yuexiao. Recent advances in membrane bioreactor technology for wastewater treatment in China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, **2010**, 4(3):245-271
- [43] SUN Yanmei, SHEN Yuexiao, LIANG Peng, et al. Linkages between microbial functional potential and wastewater constituents in large-scale membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research*, **2014**, 56:162-171
- [44] 贺纪正,袁超磊,沈菊培,等. 土壤宏基因组学研究方法与进展. *土壤学报*, **2012**, 49(1):155-164
HE Jizheng, YUAN Chaolei, SHEN Jupei, et al. Methods for and progress in research on soil metagenomics. *Acta Pedologica Sinica*, **2012**, 49(1):155-164 (in Chinese)
- [45] CHAKRABORTY R., WU C. H., HAZEN T. C. Systems biology approach to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, **2012**, 23(3):483-490
- [46] 张薇,高洪文,张化永. 宏基因组技术及其在环境保护和污染修复中的应用. *生态环境*, **2008**, 17(4):1696-1701
ZHANG Wei, GAO Hongwen, ZHANG Huayong. Metagenomic technology and its application in environmental protection and bioremediation. *Ecology and Environment*, **2008**, 17(4):1696-1701 (in Chinese)
- [47] JIANG Hao, CHEN Yin, JIANG Peixia, et al. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal*, **2010**, 49(3):277-288
- [48] FAYBISHENKO B., Hazen T. C., LONG P. E., et al. In situ long-term reductive bioimmobilization of Cr(VI) in groundwater using hydrogen release compound. *Environmental Science & Technology*, **2008**, 42(22):8478-8485
- [49] HAN Ruyang, GELLER J. T., YANG Li, et al. Physiological and transcriptional studies of Cr(VI) Reduction under aerobic and denitrifying conditions by an aquifer-derived pseudomonad. *Environmental Science & Technology*, **2010**, 44(19):7491-7497
- [50] NAVARRO-NOYA Y. E., JAN-ROBLERO J., GONZÁLEZ-CHÁVZE M. D. C., et al. Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopoda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2010**, 97(4):335-349
- [51] RICHARDON R. E., JAMES C. A., BHUPATHIRAJU V. K., et al. Microbial activity in soils following steam treatment. *Biodegradation*, **2002**, 13(4):285-295
- [52] SMIDT H., DE VOS W. M. Anaerobic microbial dehaloge-

- nation. *Annual Review of Microbiology*, **2004**, 58: 43-73
- [53] YANG Lu, DU Shanshan, LU Jianzhang, et al. Construction of the starter to produce lignocellulases via solid state fermentation of metropolis lignocellulosic waste defoliation. *Advanced Materials Research*, **2012**, 356-360: 1823-1826
- [54] ZHAO Guang, MA Fang, WEI Li, et al. Using rice straw fermentation liquor to produce bioflocculants during an anaerobic dry fermentation process. *Bioresource Technology*, **2012**, 113: 83-88
- [55] ZHAO Guang, MA Fang, WEI Li, et al. Electricity generation from cattle dung using microbial fuel cell technology during anaerobic acidogenesis and the development of microbial populations. *Waste Management*, **2012**, 32 (9): 1651-1658
- [56] LI An, CHU Ya'nan, WANG Xumin, et al. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnology for Biofuels*, **2013**, 6: 3
- [57] SCHMIDTOVA J., BALDWIN S. A. Correlation of bacterial communities supported by different organic materials with sulfate reduction in metal-rich landfill leachate. *Water Research*, **2011**, 45 (3): 1115-1128
- [58] LU Zhenmei, HE Zhili, PARISI V. A., et al. GeoChip-based analysis of microbial functional gene diversity in a landfill leachate-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology*, **2012**, 46 (11): 5824-5833
- [59] AMANN R. I., LUDWIG W., SCHLEIFER K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1995**, 59 (1): 143-169
- [60] CHANDRA S., SHARMA R., SINGH K., et al. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, **2013**, 63 (2): 417-431
- [61] KUBE M., BECK A., MEYERDIERKS A., et al. A catabolic gene cluster for anaerobic benzoate degradation in methanotrophic microbial Black Sea mats. *Systematic and Applied Microbiology*, **2005**, 28 (4): 287-294
- [62] KOSTKA J. E., PRAKASH O., OVERHOLT W. A., et al. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico Beach Sands impacted by the Deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **2011**, 77 (22): 7962-7974
- [63] LU Zhenmei, DENG Ye, VAN NOSTRAND J. D., et al. Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *The ISME Journal*, **2012**, 6 (2): 451-460
- [64] MASON O. U., HAZEN T. C., BORGLIN S., et al. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME Journal*, **2012**, 6 (9): 1715-1727
- [65] HAMID H. R. A., KASSIM W. M. S., EL HISHIR A., et al. Risk assessment and remediation suggestion of impacted soil by produced water associated with oil production. *Environmental Monitoring and Assessment*, **2008**, 145 (1/2/3): 95-102
- [66] LIANG Yuting, LI Guanghe, VAN NOSTRAND J. D., et al. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. *FEMS Microbiology Ecology*, **2009**, 70 (2): 324-333
- [67] LIANG Yuting, VAN NOSTRAND J. D., WANG Jian, et al. Microarray-based functional gene analysis of soil microbial communities during ozonation and biodegradation of crude oil. *Chemosphere*, **2009**, 75 (2): 193-199
- [68] DOS SANTOS H. F., CURY J. C., DO CARMO F. L., et al. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by Pyrosequencing: Bacterial proxies for oil pollution. *PLoS One*, **2011**, 6 (3): e16943
- [69] RABAEY K., ANGENENT L., SCHRODER U., et al. Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application. *Integrated Environmental Technology Series*. London, New York: IWA Publishing, **2010**: 488
- [70] LOGAN B. E., HAMELERS B., ROZENDAL R., et al. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, **2006**, 40 (17): 5181-5192
- [71] LOGAN B. E., CALL D., CHENG Shao'an, et al. Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environmental Science & Technology*, **2008**, 42 (23): 8630-8640
- [72] LIU Wenzong, WANG Aijie, CHENG Shao'an, et al. GeoChip-based functional gene analysis of anodophilic communities in microbial electrolysis cells under different operational modes. *Environmental Science & Technology*, **2010**, 44 (19): 7729-7735
- [73] LIU Wenzong, WANG Aijie, SUN Dan, et al. Characterization of microbial communities during anode biofilm reformation in a two-chambered microbial electrolysis cell (MEC). *Journal of Biotechnology*, **2012**, 157 (4): 628-632
- [74] WANG Aijie, LIU Wenzong, DENG Ye, et al. Multiple community states of planktonic communities on functional gene structure in microbial electrolysis cell (MEC). *Journal of Biotechnology*, **2010**, 150 (S): 239-240
- [75] VARRONE C., VAN NOSTRAND J. D., LIU Wenzong, et al. Metagenomic-based analysis of biofilm communities for electrohydrogenesis: From wastewater to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, **2014**, 39 (9): 4222-4233
- [76] LIANG Bin, CHENG Haoyi, VAN NOSTRAND J. D., et al. Microbial community structure and function of nitrobenzene reduction biocathode in response to carbon source switchover. *Water Research*, **2014**, 54: 137-148
- [77] BLOW N. Metagenomics: Exploring unseen communities. *Nature*, **2008**, 453 (7195): 687-690
- [78] TEELING H., GLÖCKNER F. O. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis—a bioinformatic perspective. *Briefings in Bioinformatics*, **2012**, 13 (6): 728-742