

基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析黄芪内生细菌多样性

刘蓬蓬^{1,2,3}, 陈江宁^{1,2,3}, 孟莉^{1,2,3}, 贾天柱^{1,2,3*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 国家中医药管理局中药炮制原理解析重点实验室, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 分析黄芪内生细菌群落多样性, 为筛选菌种发酵转化黄芪中活性成分的定向炮制工艺研究提供参考依据。方法 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术测定黄芪内生细菌的 16 S rDNA V3-V4 区域序列并进行物种丰度等生物信息分析。结果 获得有效序列 40 051 条, 操作分类单元 (OTUs) 967 个, 测序数量接近于饱和, 测序数据量合理。黄芪内生细菌主要分布于 *Anderseniella* 属、芽孢杆菌属 *Bacillus*、伯克氏菌属 *Burkholderia*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、海洋芽孢杆菌属 *Oceanobacillus* 6 个属。结论 黄芪内生细菌群落多样性较低, *Anderseniella* 属和芽孢杆菌属 *Bacillus* 是黄芪内生细菌的优势种群。

关键词: Illumina MiSeq; 黄芪; 内生细菌; 高通量测序; 多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)11-2640-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.024

Diversity of endophytic bacteria in *Astragali Radix* analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology

LIU Peng-peng^{1,2,3}, CHEN Jiang-ning^{1,2,3}, MENG Li^{1,2,3}, JIA Tian-zhu^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Key Laboratory of Processing Theory Analysis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China

Abstract: Objective This study aimed to analyze the diversity of endophytic bacterial communities, and to provide reference to the oriented processing technology, which helps to screen bacteria fermentation and conversion in the active ingredients of *Astragali Radix*.

Methods The 16S rDNA V3-V4 region of *Astragali Radix* was sequenced by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology, and the abundance of species and other biological information were analyzed. **Results** The results showed that the numbers of effective sequences and OTUs for sample were 40 051 and 967, respectively. The number of sequencing was close to saturation, and the sequencing data volume was reasonable. The endophytic bacteria of *Astragali Radix* mainly belonged to *Anderseniella*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, and *Oceanobacillus*. **Conclusion** The diversity of endophytic bacteria was low in *Astragali Radix*. The dominant population of endophytic bacteria in *Astragali Radix* belongs to *Anderseniella* and *Bacillus*.

Key words: Illumina MiSeq; *Astragali Radix*; endophytic bacteria; high-throughput sequencing; diversity

黄芪 *Astragali Radix* 为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。黄芪为临床常用配伍用药, 其药用历史悠久, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒

排脓、敛疮生肌之功^[1]。

黄芪中以黄芪皂苷 I、II、III、IV 等皂苷类成分和毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、染料木苷等黄酮苷为主要活性成分。而中药中的苷类成分作为大分子活性物质在体内生物利用度较低、吸收性较差, 通常需经肠道内的微生物代谢转化为次级苷或

收稿日期: 2017-12-20

基金项目: 国家中医药管理局“中药炮制技术传承基地建设”项目 (2015132)

作者简介: 刘蓬蓬 (1988—), 男, 在读博士, 主要从事中药炮制研究。Tel: (0411)85890154 E-mail: liupengpeng0411@163.com

*通信作者 贾天柱, 男, 博士生导师, 教授, 主要从事中药炮制研究。Tel: (0411)85890135 E-mail: jiatzh@126.com

苷元而产生药效作用^[2]。故本课题组基于上述原则,欲通过采用生物转化中的发酵作用来促进苷类成分向次级苷或苷元成分定向发生转化,从而发挥药效作用。

植物内生菌是指生活在植物体内的微生物,主要包括细菌、真菌、放线菌等^[3]。内生菌不仅能够参与植物次生代谢产物的合成以及对植物次生代谢产物进行转化,还能独立产生丰富的次生代谢产物^[4-13]。目前,植物内生菌的研究多以可在人工培养基上生长、培养的内生菌进行分离分析,而该部分内生菌仅占植物内生微生物总数的 0.1%~10%,其余大多数的内生菌是不可培养或难以培养的^[14-15]。目前,有关黄芪内生细菌多样性的研究均采用培养法^[16-17],通过培养法获得的实验结果不能真实地反映植物内生细菌的群落组成。故本实验首次通过基于 Illumina MiSeq 平台的第二代测序技术^[18]对黄芪中传统培养法和非培养法未检测到的及痕量内生细菌的种类进行宏基因组测序分析,以求更加准确、科学地探析黄芪中内生细菌的多样性,为筛选目的功能菌种并进行微生物纯种或混合菌种发酵转化黄芪中苷类成分成次级苷或苷元的定向炮制工艺研究,提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

黄芪购自辽宁省朝阳市黄芪中药材生产质量管理规范种植基地,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。植物 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司;DNA 检测试剂盒购自美国 Life 公司;高效高保真酶购自美国 Thermo 公司;核酸纯化试剂盒购自美国 Beckman 公司。

1.2 仪器

Pico-21 型台式离心机(Thermo, 美国), GL-88B 型漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), TND03-H-H 型混匀型干式恒温器(深圳拓能达科技有限公司), DYY-6C 型电泳仪电源、DYCZ-21 电泳槽(北京市六一仪器厂), BioDoc 型凝胶成像系统(UVP 公司, 美国), MiSeq System 型高通量测序仪(Illumina 公司, 美国), Q32866 Qubit[®] 2.0 型荧光计(Invitrogen 公司, 美国), T100[™] Thermal Cycler 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(Bio-Rad 公司, 美国), Research plus 型 0.5~10 μ L

移液器(Eppendorf 公司, 德国)。

2 方法

2.1 总 DNA 提取

取鲜黄芪的根部用清水去除表面泥土后置于 75%乙醇中浸泡 10 min, 于超净台内用无菌的 PBS 溶液进行清洗并置紫外灯下照射 15 min 以获得表面洁净无菌的黄芪。将该黄芪切成 2 半, 从中间掏取黄芪块, 以保证无菌, 然后切成小块并用 PBS 溶液反复冲洗, 取冲洗液于 8 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 合并沉淀于 -80 $^{\circ}$ C 冻存后取出立即用组织研磨棒进行研磨提取 DNA。使用 DNA 提取试剂盒并参照说明书进行总 DNA 的提取。采用琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的纯度和浓度。

2.2 16 S rDNA V3-V4 区的 PCR 扩增

利用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量, 以确定 PCR 反应应加入的 DNA 量。PCR 所用的引物已经融合了 Miseq 测序平台的 V3-V4 通用引物, 341F 引物: 5'-CCCTACACGACGCTCTTC CGATCTG (barcode) CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 805R 引物: 5'-GACTGGAGTTCCTTGGCAGCCG-AGAATTCCAGACTACHVGGGTATCTAATCC-3', 并使用高效和高保真酶进行 PCR 扩增, 确保扩增效率和准确性。

2.3 PCR 产物的纯化和混样

PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并利用核酸纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收。采用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量, 按照 1:1 进行混合后测序。

2.4 上机测序

将样品 DNA 浓度调整为 20 pmol/L 上机测序^[19-24]。测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2.5 生物信息学和数据分析

测序得到的原始数据存在一定比例的干扰数据, 为了保证信息分析质量, 使得结果更加准确、可靠, 首先使用 Cutadapt 软件去除引物接头序列, Pear 软件进行序列拼接, Prinseq 软件质控过滤去除 barcode、primer 以及部分低质量序列, Usearch 软件去除非扩增区域、嵌合体及靶区域外序列, 得到有效数据^[25]。采用 Usearch 软件对有效数据在 97% 相似水平上进行 OTU 聚类, 采用 RDP classifier 方式对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分

析,并在各水平上统计样品的群落组成。利用 Mothur 软件进行稀释曲线和多样性分析,其中以 Shannon-稀释曲线反映群落中 OTU 丰度,以 Simpson 分析指数、Chao1 分析指数、ACE 分析指数和 Coverage 分析指数反映 Alpha 多样性。使用 GraPhlAn 软件制作物种进化分类树图。使用 PICRUST 软件进行功能分类分析。综上生物信息统计分析,得到黄芪内生细菌群落结构组成及功能分类^[26-27]。

3 结果与分析

3.1 序列长度分布

黄芪样品所测得的 41 255 条 PE Reads 长度分布在 360~440 bp 内,长度为 406 bp 的序列最多(图 1)。从序列长度的分布来看,与 16 S rDNA V3-V4 区序列长度大致吻合。

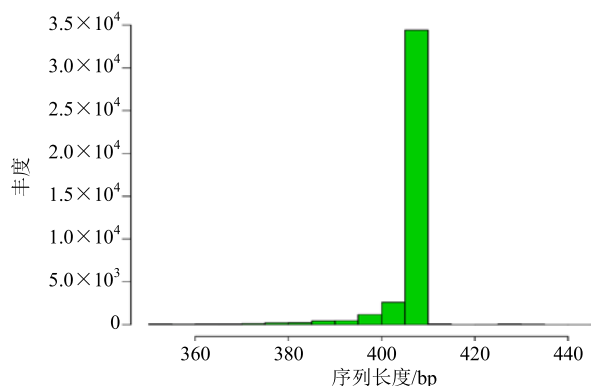


图 1 黄芪内生细菌的序列长度分布

Fig. 1 Sequence length distribution of endophytic bacteria reads in *Astragali Radix*

3.2 样品复杂度分析

从 Shannon-稀释曲线来看(图 2),随着测序数量的增加,稀释曲线斜率逐渐降低,趋向平坦但未进入平台期,说明再增加测序数量也只会产生少量新的 OTUs,并结合 Alpha 多样性分析中的 Simpson 指数结果 0.89、Chao1 指数 27 908、ACE 指数结果 82 173 和 Coverage 指数 0.98,表明测序数据量合理,可以反映样品中绝大多数的微生物信息;从 Rank-abundance 曲线(图 3)来看,样品中优势菌群所占比例很高,表明黄芪内生细菌的多样性较低。

3.3 OTUs 数目统计及物种注释分析

黄芪样品共获得 40 051 条 Tags(过滤后得到的拼接序列数),可分为 967 个 OTUs(97%的序列相似性,下同),主要被注释到 14 个属(图 4),其中

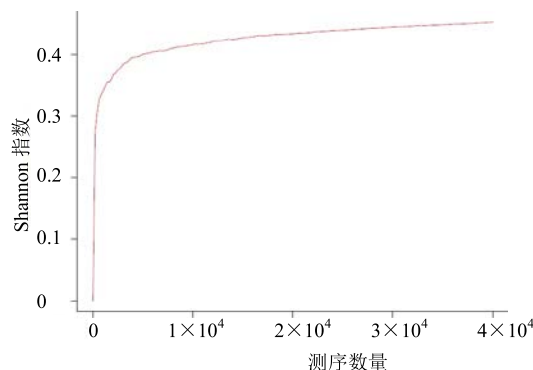


图 2 黄芪内生细菌的 Shannon-稀释曲线

Fig. 2 Shannon-rarefaction curve of endophytic bacteria in *Astragali Radix*

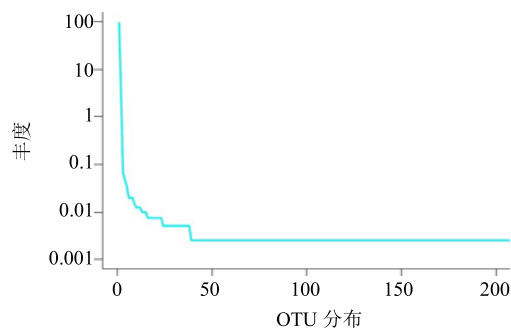


图 3 黄芪内生细菌的 OTU-丰度曲线

Fig. 3 Rank-abundance curve of endophytic bacteria in *Astragali Radix*

依据相对丰度大小排名前 6 的依次为 *Andersenella* 属、芽孢杆菌属 *Bacillus*、伯克氏菌属 *Burkholderia*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、海洋芽孢杆菌属 *Oceanobacillus*。

3.4 样品中内生细菌物种分类

从门的分类水平看,黄芪内生细菌主要分布在变形菌门(Proteobacteria, 95.64%)、厚壁菌门(Firmicutes, 0.18%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.04%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 0.02%)、放线菌门(Actinobacteria, 0.01%)等;从纲的分类水平看,黄芪内生细菌在 α -变形杆菌纲(Alphaproteobacteria, 95.49%)、芽孢杆菌纲(Bacilli, 0.16%)、 γ -变形杆菌纲(Gammaproteobacteria, 0.08%)、 β -变形杆菌纲(Betaproteobacteria, 0.07%)、Sphingobacteriia 纲(0.03%)、浮霉菌纲(Planctomycetacia, 0.02%)、放线菌纲(Actinobacteria, 0.01%)、Bacteroidia 纲(0.01%)、 δ -变形杆菌纲(Deltaproteobacteria, 0.01%)中均有分布;从目的分类水平看,黄芪内生细菌主要分布在根瘤菌目

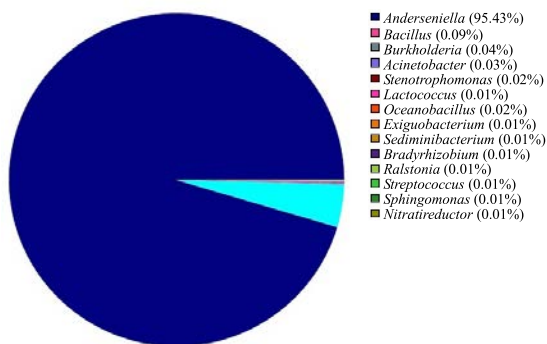


图 4 黄芪内生细菌属水平的相对丰度分布

Fig. 4 Relative abundance distribution of genus of endophytic bacteria in *Astragali Radix*

(Rhizobiales, 95.46%)、芽孢杆菌目 (Bacillales, 0.14%)、伯克霍尔德氏菌目 (Burkholderiales, 0.06%)、假单胞菌目 (Pseudomonadales, 0.04%)、鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales, 0.03%)、黄色单胞菌目 (Xanthomonadales, 0.03%)、乳酸杆菌目 (Lactobacillales, 0.02%)、鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales, 0.02%)、浮霉菌目 (Planctomycetales, 0.02%)、梭菌目 (Clostridiales, 0.01%)、柄杆菌目 (Caulobacteriales, 0.01%)、肠杆菌目 (Enterobacteriales, 0.01%)、拟杆菌目 (Bacteroidales, 0.01%) 等; 从科的水平看, 黄芪内生细菌在红菌科 (Rhodobiaceae, 95.44%)、芽孢杆菌科 (Bacillaceae, 0.12%)、伯克氏菌科 (Burkholderiaceae, 0.05%)、莫拉氏菌科 (Moraxellaceae, 0.03%)、黄色单胞菌科

(Xanthomonadaceae, 0.03%)、Chitinophagaceae 科 (0.02%)、鞘脂单胞菌科 (Sphingomonadaceae, 0.02%)、浮霉菌科 (Planctomycetaceae, 0.02%)、链球菌科 (Streptococcaceae, 0.02%)、叶杆菌科 (Phyllobacteriaceae, 0.01%)、丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae, 0.01%)、腐螺旋菌科 (Saprospiraceae, 0.01%)、慢生根瘤菌科 (Bradyrhizobiaceae, 0.01%)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae, 0.01%)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae, 0.01%) 中均有分布; 从属的分类水平看, 黄芪内生细菌在 *Anderseniella* 属 (95.43%)、芽孢杆菌属 *Bacillus* (0.09%)、伯克霍尔德菌属 *Burkholderia* (0.04%)、不动杆菌属 *Acinetobacter* (0.03%)、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* (0.02%)、*Oceanobacillus* 属 (0.02%)、*Sediminibacterium* 属 (0.01%)、罗尔斯通菌属 *Ralstonia* (0.01%)、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* (0.01%)、*Nitratireductor* 属 (0.01%)、链球菌属 *Streptococcus* (0.01%)、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* (0.01%)、微杆菌属 *Exiguobacterium* (0.01%)、乳球菌属 *Lactococcus* (0.01%) 中均有分布。丰度前 100 个物种进化分类树如图 5 所示, 其中丰度前 20 个物种 (以字母标出) 所对应的门按不同的颜色标出, 圈和星号的大小代表丰度大小, 外围样本环中颜色深浅随着各物种的丰度而变化^[28]。由此可见, *Anderseniella* 属和芽孢杆菌属 *Bacillus* 是黄芪内生细菌的优势种群。

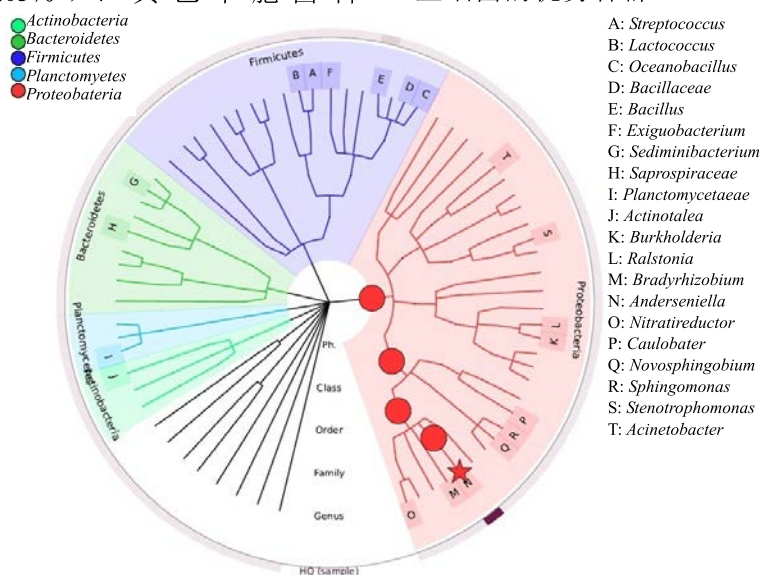


图 5 黄芪内生细菌的分类树

Fig. 5 Taxonomic tree of endophytic bacteria in *Astragali Radix*

3.5 黄芪内生细菌中的基因功能分类分析

通过对黄芪内生细菌进行 COG (cluster of orthologous groups) 功能分类分析, 共获得 25 类功能, 其中最大类是“一般功能预测”, 占比为 13.10%。此外, “次生代谢产物生物合成、运输和分解代谢”功能占比为 1.85%, 其他功能分类见图 6。KEGG

数据库比对分析发现, 可注释获得 262 个 KEGG 通路, 其中包括与黄酮类、萜类化合物骨架、醌类、甾体类、生物碱类、苯丙素类等成分生物合成有关的通路。上述获得的黄芪中化学成分合成的相关基因信息, 为研究黄芪中有效成分的生物合成和运输分解提供了参考依据。

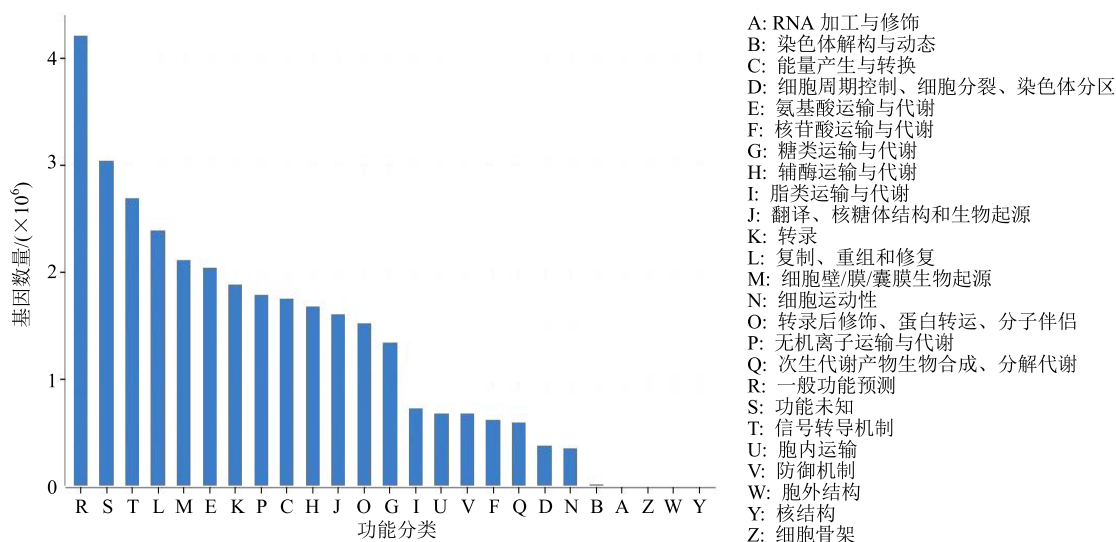


Fig. 6 COG function classification of endophytic bacteria in *Astragali Radix*

4 讨论

由于市面所售及临床应用较为广泛的黄芪品种为蒙古黄芪, 故本实验以蒙古黄芪作为研究样本。目前, 关于黄芪内生菌的研究尤以真菌方面为主, 而黄芪内生细菌的研究较少, 故本实验首次利用高通量测序技术对黄芪内生细菌进行研究, 并发现黄芪内生细菌群落多样性较低, *Andersenella* 属和芽孢杆菌属 *Bacillus* 是黄芪内生细菌的优势种群, 这与先前有学者采用平板划线法分离、纯化鉴定得到的可培养的芽孢杆菌属为黄芪优势内生细菌的结果相一致^[16-17]。但平板划线法只能分离出可培养的菌落且不能保证每个菌落为纯种菌落, 而高通量测序法能较为全面地分析得出菌落的生物学信息。在高通量测序中, Sanger 测序法是第一代测序技术, 具有较长的读长和较高的测序质量, 但测序通量低、速度慢。第二代测序技术以低成本、高通量、高效率的优势为当今应用最广泛的测序技术, 其读长较短不能进行全长序列分析, 而只能对一个或几个高变区进行测序分析且测序深度较高^[29-33]。故本实验采用的第二代高通量测序技术是由 Illumina 公司推出的 Miseq 平台进行分析研究, 尚有 Roche 454 GS FLX

Tianium 和 SOLiD 5 500 xl 分析平台亦为目前应用较多的高通量测序平台^[34]。

本实验结果表明, 同为优势菌群的 *Andersenella* 属和芽孢杆菌属中, 可培养的芽孢杆菌属占比较低。同时, 对黄芪内生细菌中的基因功能分类进行分析时, 获得的有效成分生物合成、分解代谢的基因相关信息, 进一步从分子水平上, 论证说明了植物内生细菌具有参与植物次生代谢产物的合成及代谢转化的能力。为接下来通过采用纯种或混合内生菌种进行发酵转化黄芪中苷类成分成次级苷或苷元的定向炮制工艺研究提供理论支撑。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 蔡金坊, 代云桃, 肖永庆, 等. 系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的改变 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 47-52.
- [3] Flrnn J C, Matthews J G, Benoit R L. Blind pinning of displaced supracondylar fractures of the humerus in children: Sixteen years. Experience with long term follow up [J]. *J Bone Joint surg*, 1974, 56(2): 263-272.
- [4] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. *Microb Mol Biol Rev*, 2003, 67(4): 491-502.

- [5] Strobel G, Daisy B, Castillo U, *et al.* Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 257-268.
- [6] Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants [J]. *Plant Sci*, 2007, 172(5): 861-875.
- [7] Hassan S, Mathesius U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signaling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(1): 3429-3444.
- [8] Estrada C, Weislo W. T, Bael S. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants [J]. *New Phytol*, 2013, 198(1): 241-251.
- [9] Aikkonen K, Gundel P E, Helander M. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grass [J]. *J Chem Ecol*, 2013, 39(7): 962-968.
- [10] 周永强, 程玉鹏, 刘丹丹, 等. 药用植物内生真菌代谢产物的活性研究进展 [J]. 中医药信息, 2014, 31(3): 158-161.
- [11] Tian Y, Amand S, Buisson D, *et al.* The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 95-101.
- [12] Nicoletti R, Ferranti P, Caira S, *et al.* Myrtucommulone production by a strain of *Neofusicoccum australe* endophytic in myrtle (*Myrtus communis*) [J]. *World J Microb Biot*, 2014, 30(3): 1047-1052.
- [13] Shen L, Li L Y, Zhang X J, *et al.* A new indole derivative from endophyte *Myrothecium roridum* IFB-E091 in *Artemisia annua* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(10): 1305-1308.
- [14] Ammann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Micro Biol Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [15] Tholozan J L, Cappelier J M, Tissier J P, *et al.* Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells [J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(3): 1110-1116.
- [16] 胡青, 诸葛增玉, 任超. 中药黄芪内生菌的分离鉴定及方法分析 [J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(2): 59-60.
- [17] 宋颖娟. 药用植物(黄精和黄芪)内生菌的分离鉴定及胞外多糖结构和生物活性的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [18] Claesson M J, O'Sullivan O, Wang Q, *et al.* Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6669.
- [19] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(1): 4516-4522.
- [20] Youssef N, Sheik C S, Krumholz L R, *et al.* Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16 S rRNA gene-based environmental surveys [J]. *Appl Envir Microb*, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [21] Hess M, Sczyrba A, Egan R, *et al.* Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 463-467.
- [22] Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, *et al.* Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing technologies on the same microbial community DNA sample [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30087.
- [23] Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(6): 863-864.
- [24] Magoč T, Steven L, Salzberg. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [25] Zhang J, Kobert K, Flouri T, *et al.* PEAR: A fast and accurate Illumina paired-end read merger [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(5): 614-620.
- [26] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, *et al.* Introducing mother: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Envir Microb*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [27] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [28] Asnicar F, Weingart G, Tickle T L, *et al.* Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn [J]. *Peer J*, 2015, 3: e1029.
- [29] Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, *et al.* Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing [J]. *J Microbiol Methods*, 2009, 79(3): 266-271.
- [30] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [31] Roesch L F, Fulthorpe R R, Riva A, *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity [J]. *ISME J*, 2007, 1(4): 283-290.
- [32] Jiang B, Liang X, Chen Y, *et al.* Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 936.
- [33] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1135-1145.
- [34] 刘莉扬, 崔鸿飞, 田埂. 高通量测序技术在宏基因组学中的应用 [J]. 中国医药生物技术, 2013, 8(3): 196-200.