



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201713775 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：105120098

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 24 日

(51)Int. Cl. : *C12Q1/06 (2006.01)* *C12Q1/68 (2006.01)*
G06F19/00 (2011.01)

(30)優先權：2015/06/25 美國 62/184,650
2016/01/07 美國 62/276,142

(71)申請人：亞斯科生物科學公司 (美國) ASCUS BIOSCIENCES, INC. (US)
美國

(72)發明人：詹格勒 卡斯登 ZENGLER, KARSTEN (DE)；安柏瑞 瑪洛利 EMBREE,
MALLORY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：86 項 圖式數：8 共 125 頁

(54)名稱

用於自複雜的異源群集中分析微生物品系、預測及識別其機能性關係及交互作用，且依據前述選擇並合成微生物系集之方法、裝置及系統

METHODS, APPARATUSES, AND SYSTEMS FOR ANALYZING MICROORGANISM STRAINS FROM COMPLEX HETEROGENEOUS COMMUNITIES, PREDICTING AND IDENTIFYING FUNCTIONAL RELATIONSHIPS AND INTERACTIONS THEREOF, AND SELECTING AND SYNTHESIZING MICROBIAL ENSEMBLES BASED THEREON

(57)摘要

本發明揭示用於自複雜的異源群集中篩選、分析及選擇微生物，預測及識別其機能性關係及交互作用，且依據前述合成微生物系集之方法、裝置及系統。亦揭示用於識別及確定微生物類型及品系之絕對細胞計數，以及識別活性微生物與環境參數之間的網路關係的方法。

Methods, apparatuses, and systems for screening, analyzing and selecting microorganisms from complex heterogeneous communities, predicting and identifying functional relationships and interactions thereof, and synthesizing microbial ensembles based thereon are disclosed. Methods for identifying and determining the absolute cell count of microorganism types and strains, along with identifying the network relationships between active microorganisms and environmental parameters, are also disclosed.

指定代表圖：

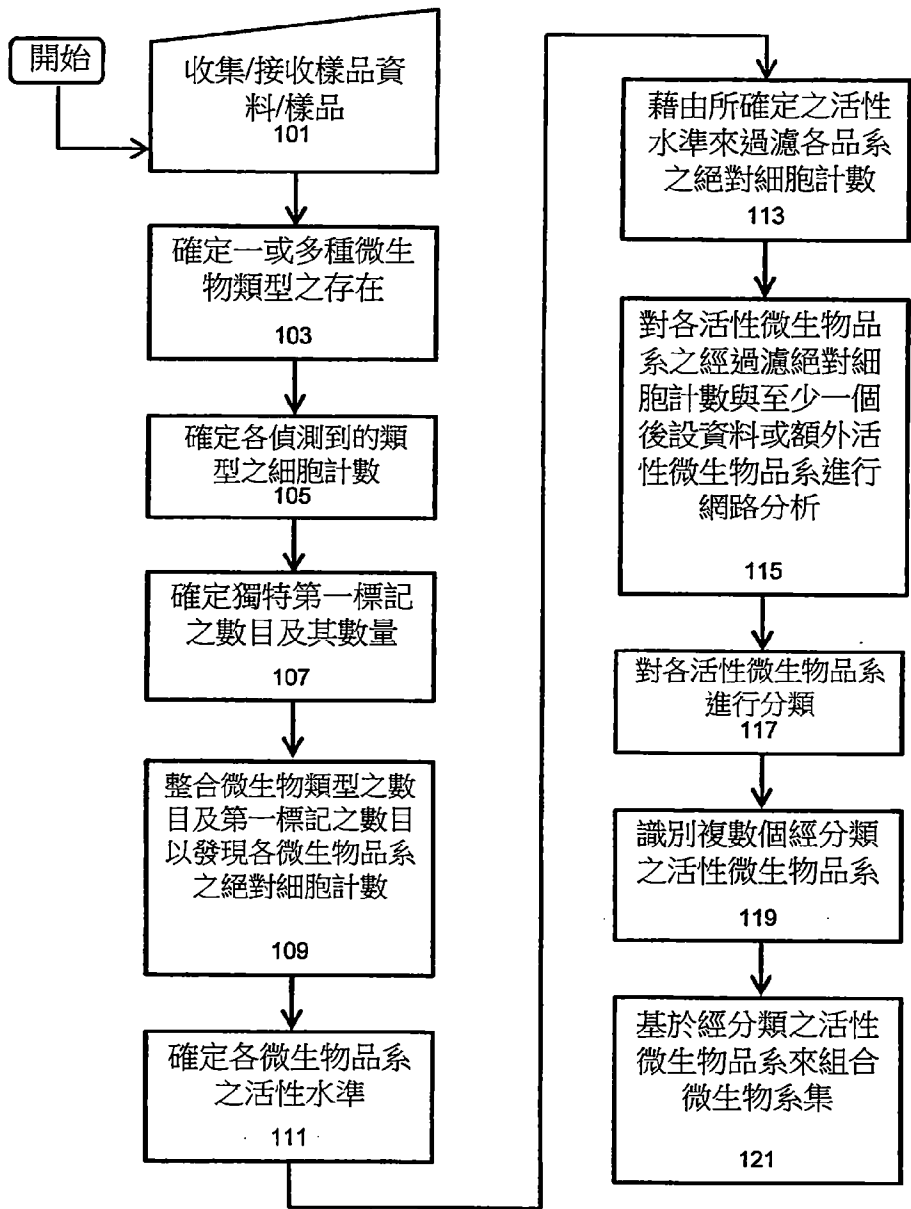


圖1A

符號簡單說明：

- 101 . . . 收集/接收樣品資料/樣品
- 103 . . . 確定一或多種微生物類型之存在
- 105 . . . 確定各偵測到的類型之細胞計數
- 107 . . . 確定獨特第一標記之數目及其數量
- 109 . . . 整合微生物類型之數目及第一標記之數目以發現各微生物品系之絕對細胞計數
- 111 . . . 確定各微生物品系之活性水準
- 113 . . . 藉由所確定之活性水準來過濾各品系之絕對細胞計數
- 115 . . . 對各活性微生物品系之經過濾絕對細胞計數與至少一個後設資料或額外活性微生物品系進行網路分析
- 117 . . . 對各活性微生物品系進行分類
- 119 . . . 識別複數個經分類之活性微生物品系
- 121 . . . 基於經分類之活性微生物品系來組合微生物系集

201713775

發明摘要

※ 申請案號：105/20098

※ 申請日：105.6.24

※ IPC 分類：

C12Q 1/66, 1/68 (2006.01)

G06F 19/00 (2011.01)

【發明名稱】

用於自複雜的異源群集中分析微生物品系、預測及識別其機能性關係及交互作用，且依據前述選擇並合成微生物系集之方法、裝置及系統

METHODS, APPARATUSES, AND SYSTEMS FOR ANALYZING MICROORGANISM STRAINS FROM COMPLEX HETEROGENEOUS COMMUNITIES, PREDICTING AND IDENTIFYING FUNCTIONAL RELATIONSHIPS AND INTERACTIONS THEREOF, AND SELECTING AND SYNTHESIZING MICROBIAL ENSEMBLES BASED THEREON

【中文】

本發明揭示用於自複雜的異源群集中篩選、分析及選擇微生物，預測及識別其機能性關係及交互作用，且依據前述合成微生物系集之方法、裝置及系統。亦揭示用於識別及確定微生物類型及品系之絕對細胞計數，以及識別活性微生物與環境參數之間的網路關係的方法。

【英文】

Methods, apparatuses, and systems for screening, analyzing and selecting microorganisms from complex heterogeneous communities, predicting and identifying functional relationships and interactions thereof, and synthesizing microbial ensembles based thereon are disclosed. Methods for identifying and determining the absolute cell count of microorganism types and strains, along with identifying the network relationships between active microorganisms and environmental parameters, are also disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1A）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

- 101 收集/接收樣品資料/樣品
- 103 確定一或多種微生物類型之存在
- 105 確定各偵測到的類型之細胞計數
- 107 確定獨特第一標記之數目及其數量
- 109 整合微生物類型之數目及第一標記之數目以發現各微
生物品系之絕對細胞計數
- 111 確定各微生物品系之活性水準
- 113 藉由所確定之活性水準來過濾各品系之絕對細胞計數
- 115 對各活性微生物品系之經過濾絕對細胞計數與至少一
個後設資料或額外活性微生物品系進行網路分析
- 117 對各活性微生物品系進行分類
- 119 識別複數個經分類之活性微生物品系
- 121 基於經分類之活性微生物品系來組合微生物系集

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於自複雜的異源群集中分析微生物品系、預測及識別其機能性關係及交互作用，且依據前述選擇並合成微生物系集之方法、裝置及系統

METHODS, APPARATUSES, AND SYSTEMS FOR ANALYZING MICROORGANISM STRAINS FROM COMPLEX HETEROGENEOUS COMMUNITIES, PREDICTING AND IDENTIFYING FUNCTIONAL RELATIONSHIPS AND INTERACTIONS THEREOF, AND SELECTING AND SYNTHESIZING MICROBIAL ENSEMBLES BASED THEREON

本申請案主張2015年6月25日申請的標題為「微生物群集篩選方法(Methods for Screening Microbial Communities)」之美國臨時申請案第62/184,650號的優先權，且主張2016年1月7日申請的標題為「微生物群集篩選方法」之美國臨時申請案第62/276,142號的優先權，前述申請案各自以引用的方式明確地併入本文中。

【先前技術】

微生物在自然界中以群集形式共存且參與多種交互作用，導致個別群集成員之間的合作及競爭。微生物生態學之進展已顯示大多數群集具有高水準之物種多樣性及複雜性。微生物在環境中普遍存在，居住在生物圈內之廣泛的一系列生態系統中。個別微生物及其各別群集在諸如海洋站點(深海及海洋表面)、土壤及動物組織(包括人類組織)之環境中發揮獨特作用。

【發明內容】

在本發明之一個態樣中，揭示一種用於自複數個樣品中識別活性微生物、用至少一個後設資料識別微生物且基於分析創建微生物系集之方法。該方法之實施例包括確定樣品中一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數，其中一或多個活性微生物品系存在於樣品中之微生物群集中。一或多個微生物品系為微生物類型之亞分類單元。在本文所提供之方法中使用的樣品可為任何環境來源的。舉例而言，在一個實施例中，樣品來自動物、土壤(例如，非根際土或根際土)、空氣、鹹水、淡水、廢水污泥、沈積物、油、植物、農產品、植物或極端環境。在另一實施例中，動物樣品為血液、組織、牙齒、汗液、指甲、皮膚、毛髮、糞便、尿液、精液、黏液、唾液、胃腸道、瘤胃、肌肉、腦、組織或器官樣品。在一個實施例中，提供一種用於確定一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法。

在本發明之一個實施例中，一或多種微生物類型為一或多種細菌(例如，支原菌(*mycoplasma*)、球菌(*coccus*)、桿菌(*bacillus*)、立克次體菌(*rickettsia*)、螺旋菌(*spirillum*))、真菌(例如，絲狀真菌、酵母菌)、線蟲、原蟲、古菌(*archaea*)、藻類、腰鞭毛蟲、病毒(例如，噬菌體)、類病毒及/或其組合。在一個實施例中，一或多個微生物品系為一或多種細菌(例如，支原菌、球菌、桿菌、立克次體菌、螺旋菌)、真菌(例如，絲狀真菌、酵母菌)、線蟲、原蟲、古菌、藻類、腰鞭毛蟲、病毒(例如，噬菌體)、類病毒及/或其組合。在另一實施例中，一或多個微生物品系為一或多個真菌物種或真菌亞種。在另一實施例中，一或多個微生物品系為一或多個細菌物種或細菌亞種。在甚至另一實施例中，樣品為瘤胃樣品。在一些實施例中，瘤胃樣品來自牛。在甚至另一實施例中，樣品為胃腸道樣品。在一些實施例中，胃腸道樣品來自豬或雞。

在用於確定樣品中一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法之一個實施例中，偵測到樣品中一或多種微生物類型之存在且確定樣品中一或多種微生物類型各自之絕對數目。量測獨特第一標記之數目以及該等獨特第一標記各自之數量或豐度。如本文所描述，獨特第一標記為獨特微生物品系之標記。隨後藉由量測一或多個獨特第二標記之表現量在蛋白質或RNA含量下評估活性。獨特第二標記與第一獨特標記相同或不同，且為生物品系之活性的標記。基於一或多個獨特第二標記之表現量，確定(若存在)一或多個微生物品系具有活性。在一個實施例中，微生物品系在其以臨限值位準或高於臨限值位準之百分比表現第二獨特標記時被視為具有活性。一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數係基於一或多個活性微生物品系之一或多個第一標記的數量及一或多個微生物品系為亞分類單元之微生物類型的絕對數目確定。

在一個實施例中，確定樣品中一或多種生物類型各自之數目包含對樣品或其部分進行核酸定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)或流式細胞測量術。

在一個實施例中，量測樣品中第一獨特標記之數目包含量測獨特基因組DNA標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中第一獨特標記之數目包含量測獨特RNA標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特蛋白質標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特代謝物標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特代謝物標記之數目包含量測獨特碳水化合物標記、獨特脂質標記或其組合之數目。

在另一實施例中，量測獨特第一標記之數目及其數量包含對樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。在一個實施例中，獨特第一標

記之量測包含例如與對獨特第一標記具有特異性之引子的標記特異性反應。在另一實施例中，一種總體基因組學方法。

在一個實施例中，量測又一個獨特第二標記之表現量包含對樣品中之RNA (例如，miRNA、tRNA、rRNA及/或mRNA)進行表現分析。在另一實施例中，基因表現分析包含定序反應。在又一實施例中，RNA表現分析包含定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

在一個實施例中，量測樣品中第二獨特標記之數目包含量測獨特蛋白質標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特第二標記之數目包含量測獨特代謝物標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特代謝物標記之數目包含量測獨特碳水化合物標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特代謝物標記之數目包含量測獨特脂質標記之數目。在另一實施例中，一或多個微生物品系之絕對細胞計數係在複數個樣品中量測。在另一實施例中，該複數個樣品係自相同環境或類似環境獲得。在另一實施例中，該複數個樣品係在複數個時間點獲得。

在另一實施例中，量測又一個獨特第二標記之量包含對樣品或其部分進行質譜分析。在又一實施例中，量測又一個獨特第二標記之表現量包含對樣品或其部分進行總體核糖體剖析或核糖體剖析。

在本發明之另一態樣中，在複數個樣品中確定一種用於確定一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法，且絕對細胞計數目與一或多個後設資料(例如，環境)參數有關。在一個實施例中，絕對細胞計數目與一或多個後設資料參數有關包含共現量測、相互資訊量測、連鎖分析及/或其類似者。在一個實施例中，一或多個後設資料參數為第二活性微生物品系之存在。因此，絕對細胞計數值在此方法之一個實施例中用於確定微生物群集中的一或多個活性微生物品系與

環境參數之共現。在另一實施例中，一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數目與諸如獲得微生物群集之環境的餵食條件、pH、營養素或溫度之環境參數有關。

在此態樣中，一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數與一或多個環境參數有關。環境參數可為樣品本身之參數，例如pH、溫度、樣品中蛋白質之量、群集中其他微生物之存在。在一個實施例中，參數為獲得樣品之宿主之特定基因組序列(例如，特定基因突變)。或者，環境參數為影響微生物群集之身分的變化(亦即，其中微生物群集之「身分」由微生物品系之類型及/或群集中特定微生物品系之數目表徵)或受微生物群集之身分變化的影響之參數。舉例而言，在一個實施例中，環境參數為動物之攝食量或由哺乳反芻產生之乳量(或乳蛋白或乳脂含量)。在本文所描述之一些實施例中，環境參數稱為後設資料參數。

在一個實施例中，確定樣品中一或多個活性微生物品系之共現包含創建以表示一或多個環境參數及活性微生物品系相關性之鏈接填充的矩陣。

在一個實施例中，確定一或多個活性生物品系及後設資料參數之共現包含一種網路及/或叢集分析方法來量測品系在網路內之連接性，其中網路為共用共同或類似環境參數之兩個或更多個樣品的集合。在另一實施例中，網路分析包含連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。在另一實施例中，叢集分析方法包含構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型。在另一實施例中，網路分析包含經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。在另一實施例中，網路分析包含相互資訊、最大資訊係數計算，或變數之間用於建立連接性之其他非參數方

法。在另一實施例中，網路分析包含基於微分方程式之種群建模。在另一實施例中，網路分析包含洛特卡-沃爾泰拉(Lotka-Volterra)建模。

基於該分析，一或多個活性相關品系被識別為包括於微生物系集中。

【圖式簡單說明】

圖1A展示根據一些實施例，用於自複雜的異源群集中篩選及分析微生物品系、預測其機能性關係及交互作用，且依據前述選擇並合成微生物系集之例示性高層次方法流程。

圖1B展示根據實施例，用於確定一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的一般方法流程。

圖2展示根據實施例，確定樣品中一或多個活性微生物品系或樣品與一或多個後設資料(環境)參數之共現的一般方法流程。

圖3A為說明根據實施例之例示性微生物交互作用分析及選擇系統300之示意圖，且圖3B為與該系統一起使用之例示性方法流程。相對於圖3A及3B，描述用於確定天然微生物群集內之多維種間交互作用及依賴性，識別活性微生物及選擇複數個活性微生物來形成將改變指定參數及/或相關量測之微生物的系集、聚集體或其他合成分組之系統及方法。

圖3C及3D提供說明本發明之一些態樣的例示性資料。

圖4展示在實驗過程中產生的用於確定影響乳牛中乳脂之產生之瘤胃微生物群集成分之非線性乳脂磅數。

圖5展示在活性過濾器之情況下目標品系Ascus_713之絕對細胞計數與所產生的乳脂之磅數(lbs)的相關性。

圖6展示在實驗過程中在活性過濾器之情況下目標品系Ascus_7之絕對細胞計數及所產生的乳脂之磅數(lbs)。

圖7展示在無活性過濾器之情況下目標品系Ascus_3038之相對豐

度與所產生的乳脂之磅數(lbs)的相關性。

圖8展示現場試驗之結果，其中向乳牛投與根據所揭示之方法製備的微生物系集；圖8A展示隨時間推移所產生的乳脂之磅數的平均數；圖8B展示隨時間推移所產生的乳蛋白之磅數的平均數；且圖8C展示隨時間推移所產生的能量校正乳(ECM)之磅數的平均數。

【實施方式】

微生物群集亦為多種不同類型生態系統中之環境過程及地球之生物地球化學的中心，例如藉由循環營養素及固定碳(Falkowski等人 (1998) *Science* 281, 第237-240頁，其以全文引用的方式併入本文中)。然而，因為群集複雜性及任何給定微生物群集之大多數成員之可培養性缺乏，仍不能充分理解此等過程之分子及生態細節以及影響因素。

微生物群集之定性及定量組成不同且各微生物群集為獨特的，且其組成視其所在的給定生態系統及/或環境而定。微生物群集成員之絕對細胞計數受制於存在群集的環境之變化，以及由微生物引起之生理及代謝變化(例如，細胞分裂、蛋白表現等)。環境參數及/或群集內一個活性微生物之數量的變化可對群集之其它微生物及對發現群集之生態系統及/或環境具有深遠的影響。為對此等微生物群集之變化作出理解、預測及反應，需要識別樣品中之活性微生物及各別群集中活性微生物之數目。然而，迄今為止，絕大部分關於微生物群集成員之研究集中於特定微生物群集中微生物之比例而非絕對細胞計數(Segata等人 (2013). *Molecular Systems Biology* 9, 第666頁，其以全文引用的方式併入本文中)。

雖然微生物群集組成可容易(例如)經由使用高通量定序方法確定，需要更深地理解如何組合及維持各別群集。

微生物群集參與關鍵過程，諸如基本元素之生物地球化學循

環，例如碳、氧、氮、硫、磷及各種金屬之循環，碳、氧、氮、硫、磷及各種金屬之黏附；且各別群集之結構、交互作用及動力學對生物圈之存在至關重要 (Zhou 等人 (2015). *mBio* 6(1):e02288-14. Doi:10.1128/mBio.02288-14，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。此類群集為高度異源的且幾乎始終包括細菌、病毒、古菌及其他微真核生物(諸如真菌)之複雜混合物。人類環境(諸如腸道及陰道)中微生物群集異源性之水準與諸如發炎性腸道疾病及細菌性陰道病有關(Nature (2012). 第486卷，第207頁，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。然而，值得注意地，即使健康個體，在此類環境中佔據組織之微生物顯著不同(Nature (2012). 第486卷，第207頁)。

由於多種微生物可能不可培養或另外難以培養/培養成本高，諸如核酸定序之不依賴培養的方法已促進對各種微生物群集之多樣性的理解。小亞單位核糖體RNA (SSU rRNA或16s rRNA)基因之擴增及定序為研究群集中之微生物多樣性的基本方法，部分地基於基因之普遍存在及相對均勻的演變速率。高通量方法之進展已導致總體基因組學分析，其中對微生物之整個基因組進行定序。此類方法不需要群集之先驗知識，允許探索新穎微生物品系。總體基因組學、總體轉錄組學、宏蛋白質組學及代謝組學皆能夠探測群集來辨別結構及機能。

不僅為群集中之微生物編目錄，且亦解密活性成員、彼等生物之數目及微生物群集成員彼此及與環境參數之共現(例如群集中響應於群集環境之變化的兩種微生物之共現)的能力將允許理解各別環境因子(例如，氣候、營養素存在、環境pH)對微生物群集內的微生物之身分(及其各別編號)具有重要性，以及某些群集成員對群集所在的環境具有重要性。本發明解決此等及其他需要。

如在本說明書中所用，除非上下文另外明確規定，否則單數形

式「一(a/an)」及「該」包括複數指示物。因此，例如術語「生物類型」欲意謂單一生物類型或多種生物類型。對於另一實例，術語「環境參數」可意謂單一環境參數或多個環境參數，除非上下文明確要求有一個且僅一個環境參數，否則使得不定冠詞「一(a/an)」不排除多於一個環境參數存在的可能性。

本說明書通篇中對「一個實施例」、「實施例」、「一個態樣」或「態樣」、「一個實施方案」或「實施方案」之提及意謂結合實施例描述之特定特徵、結構或特性包括於本發明之至少一個實施例中。因此，片語「在一實施例中」或「在實施例中」在本說明書通篇中各處之出現未必皆指同一實施例。此外，在一或多個實施例中，可以任何適合方式組合特定特徵、結構或特性。

如本文所用，在特定實施例中，術語「約」或「大約」在數值之前時指示該值加或減10%範圍。

如本文所用，「分離(isolate/isolated)」、「分離之微生物」及相似術語欲意謂一或多種微生物已與其在特定環境(例如土壤、水、動物組織)中所結合之物質中的至少一者分離。因此，「分離之微生物」不存在於其天然存在之環境中；實際上，微生物已經由本文所描述之各種技術自其天然環境中移出且置於存在的非天然存在之狀態中。因此，分離之品系可例如以生物純培養物之形式存在，或以與可接受之載劑結合之孢子(或品系之其他形式)的形式存在。

如本文所用，「微生物系集」係指一種組合物，其包含藉由本發明之方法、系統及/或裝置識別且不天然存在於天然存在之環境中及/或呈不在自然界中存在之比率或量的一或多種活性微生物。舉例而言，微生物系集或聚集體可由一或多個分離之微生物品系以及適當介質或載劑形成。微生物系集可應用於或投與給目標，諸如目標環境、種群及/或動物。

根據本發明之微生物系集選自活性、相關個別微生物物種或物種品系之集、子集及/或分組。如藉由本發明方法識別之關係及網路係在進行一或多種共同機能的基礎上分組及/或鏈接，或可描述為參與或導致可辨識參數或與可辨識參數相關，諸如相關表型特點(例如在反芻下的乳產量提高)。從中選擇微生物系集之群組及/或微生物系集本身可包括微生物之兩個或更多個物種、物種品系或不同物種之品系。在一些情況下，微生物可在群組及/或微生物系集內共生共存。

在本發明之某些態樣中，微生物系集為或係基於以分離且生物純培養物之形式存在的一或多種分離之微生物。所屬領域的技術人員應瞭解，特定微生物之分離且生物純培養物表示該培養物實質上不含(在科學原因內)其他活生物且僅含有所討論之個別微生物。培養物可含有不同濃度之該微生物。本發明指出分離且生物純微生物通常「必定不同於不大純或不純之物質」。參見例如In re Bergstrom, 427 F.2d 1394, (CCPA 1970)(論述經純化之前列腺素)，亦參見In re Bergy, 596 F.2d 952 (CCPA 1979)(論述經純化之微生物)，亦參見Parke-Davis & Co. v. H.K. Mulford & Co., 189 F. 95 (S.D.N.Y. 1911) (Learned Hand, 論述經純化之腎上腺素), aff'd in part, rev'd in part, 196 F. 496 (2d Cir. 1912)，各自以引用的方式併入本文中。此外，在一些態樣中，本發明之實施方案可能需要待用於所揭示之微生物系集中之分離且生物純微生物培養物所必須達成的濃度或純度限制之某些定量量測。在某些實施例中，此等純度值之存在為區分藉由目前所揭示之方法自存在於天然狀態下之彼等微生物中識別的微生物之另一屬性。參見例如Merck & Co. v. Olin Mathieson Chemical Corp., 253 F.2d 156 (4th Cir. 1958) (論述由微生物產生之維生素B12的純度限制)，其以引用的方式併入本文中。

如本文所用，「載劑」、「可接受之載劑」或「醫藥載劑」係指與

其一起使用或用於微生物系集中之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。此類載劑可為無菌液體，諸如水及油，包括石油、動物、植物或合成來源之油，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及其類似物。較佳使用水或鹹水溶液及右旋糖與甘油水溶液作為載劑，在一些實施例中，作為可注射溶液。或者，載劑可為固體劑型載劑，包括(但不限於)黏合劑(用於壓縮丸劑)、滑動劑、包封劑、調味劑及著色劑中之一或多者。載劑之選擇可相對於預期投與途徑及標準醫藥實踐來選擇。參見 Hardee 及 Baggo (1998. *Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms*. 第2版 CRC Press. 第504頁)；E.W. Martin (1970. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 第17版 Mack Pub. Co.)；及 Blaser等人(US Publication US20110280840A1)，各自以全文引用的方式明確地併入本文中。

術語「微生物(microorganism/microbe)」在本文中可互換使用且指作為域細菌、真核生物或古菌之任何微生物。微生物類型包括(但不限於)細菌(例如，支原菌、球菌、桿菌、立克次體菌、螺旋菌)、真菌(例如，絲狀真菌、酵母菌)、線蟲、原蟲、古菌、藻類、腰鞭毛蟲、病毒(例如，噬菌體)、類病毒及/或其組合。生物品系為生物類型之亞分類單元，且可為例如特定微生物之物種、亞種、亞型、基因變異體、致病變型或血清變型。

如本文所用，術語「標記」或「獨特標記」為獨特微生物類型、微生物品系或微生物品系活性之指標。標記可在生物樣品中量測，且包括(但不限於)基於核酸之標記(諸如核糖體RNA基因)、基於肽或蛋白質之標記及/或代謝物或其他小分子標記。

如本文所用，術語「代謝物」為代謝之中間物或產物。在一個實施例中，代謝物為小分子。代謝物具有各種機能，包括以下方面：燃料、結構、信號傳導、對酶之刺激及抑制作用、作為酶之輔因子、

防禦及與其他生物(諸如顏料、氣味劑及信息素)之交互作用。主要代謝物直接參與正常生長、發育及繁殖。次要代謝物不直接參與此等過程但通常具有重要的生態機能。代謝物之實例包括(但不限於)抗生素及顏料，諸如樹脂及萜烯等。一些抗生素使用主要代謝物作為前驅體，諸如放線菌素，其由主要代謝物色胺酸形成。如本文所用，代謝物包括小的親水性碳水化合物、大的疏水性脂質及複雜的天然化合物。

在本發明之一個態樣中，揭示一種用於識別複數個微生物品系與一或多個後設資料及/或參數之間的關係之方法。如圖1A中所說明，接收來自至少兩個樣品源的至少兩個樣品之樣品及/或樣品資料101，且對於各樣品，確定一或多種微生物類型之存在103。確定各樣品中一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目(細胞計數)105，且確定各樣品中獨特第一標記之數目及其數量107，各獨特第一標記為微生物品系之標記。將各微生物類型之數目及第一標記之數目整合產生各樣品中存在之各微生物品系之絕對細胞計數109，且基於各微生物品系之至少一個獨特第二標記之超出指定臨限值的量測值來確定各樣品中各微生物品系之活性水準111，在一微生物品系之至少一個獨特第二標記之量測值超出相應臨限值時，該品系被識別為具有活性。隨後藉由所確定之活性來過濾各微生物品系之絕對細胞計數，提供至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單113。對至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之經過過濾絕對細胞計數之清單與至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行網路分析115，該網路分析包括確定各活性微生物品系與每一其他活性微生物品系之間的最大資訊係數評分及確定各活性微生物品系與至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之間的最大資訊係數評分。隨後可基於機能、所預測的機能及/或化學性質對活性

微生物品系進行分類117，且基於分類來識別及輸出複數個活性微生物品系119。在一些實施例中，該方法進一步包含組合來自所識別之多個微生物品系的活性微生物系集121，微生物系集在應用於目標時經組態以改變對應於至少一個經量測後設資料之性質。該方法可進一步包含基於輸出的複數個所識別之活性微生物品系來識別至少一個病原體(額外細節參見實例4)。在一些實施例中，該複數個活性微生物品系可用於組合在應用於目標時經組態以處理至少一個所識別病原體及/或治療與至少一個所識別病原體相關之症狀的活性微生物系集。

在本發明之一個態樣中，提供一種用於確定一個樣品或複數個樣品中之一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法，其中一或多個活性微生物品系存在於樣品中之微生物群集中。一或多個微生物品系為一或多種生物類型之亞分類單元(參見圖1B之方法1000)。對於各樣品，偵測樣品中一或多種微生物類型之存在(1001)。確定樣品中一或多種生物類型各自之絕對數目(1002)。量測獨特第一標記之數目以及獨特第一標記各自之數量(1003)。如本文所描述，獨特第一標記為獨特微生物品系之標記。隨後藉由量測一或多個獨特第二標記之表現量在蛋白質及/或RNA含量下評估活性(1004)。獨特第二標記可與第一獨特標記相同或不同，且為生物品系之活性的標記。基於一或多個獨特第二標記之表現量，確定(若存在)微生物品系具有活性(1005)。若微生物品系表現特定量或高於臨限值位準之第二獨特標記(1005)，例如，高於臨限值位準至少約10%、至少約20%、至少約30%或至少約40%，則微生物品系被視為具有活性，(應理解，可基於特定應用及/或實施方案來確定各個臨限值，例如臨限值可隨著樣品源，諸如特定物種、樣品源位置、相關後設資料、環境等而變化。一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數可基於一或多個活性微生物品系之一或多個第一標記的數量及一或多個微生物品系為亞分類單元之生物類型

的絕對數目確定。

如圖2中所提供，在本發明之另一態樣中，在複數個樣品中確定一或多種活性微生物之絕對細胞計數，且該絕對細胞計數與後設資料(環境參數)有關(2001-2008)。對複數個樣品進行一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的分析，其中若活性量測值處於複數個樣品中之至少一者的臨限值位準或高於臨限值位準，則一或多個活性微生物品系被視為具有活性(2001-2006)。隨後一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數與特定實施方案及/或應用之後設資料參數有關(2008)。

在一個實施例中，隨時間推移自相同環境源(例如，在一段時間過程內的相同動物)收集複數個樣品。在另一實施例中，該複數個樣品來自複數個環境源(例如，不同動物)。在一個實施例中，環境參數為第二活性微生物品系之絕對細胞計數。在另一實施例中，一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數值用於確定一或多個活性微生物品系與微生物群集之第二活性微生物品系之共現。在另一實施例中，第二環境參數與一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及/或第二環境品系之絕對細胞計數有關。

通篇論述此等態樣之實施例。

用於本文所提供之方法的樣品重要地可為包括微生物群集之任何類型。舉例來說，用於本文所提供之方法的樣品涵蓋(但不限於)動物樣品(例如，哺乳動物、爬行動物、鳥類)、土壤、空氣、水(例如，海水、淡水、廢水污泥)、沈積物、油、植物、農產品、植物、土壤(例如，根際土)及極端環境樣品(例如，酸性礦井水、水熱系統)。在海水或淡水樣品之情況下，樣品可來自水體表面或水體之任何深層，例如深海樣品。在一個實施例中，水樣為海洋、河流或湖泊樣品。

在一個實施例中，動物樣品為體液。在另一實施例中，動物樣品為組織樣品。非限制性動物樣品包括牙齒、汗液、指甲、皮膚、毛

髮、糞便、尿液、精液、黏液、唾液、胃腸道。動物樣品可為例如人類、靈長類動物、牛類動物、豬類動物、犬類動物、貓類動物、嚙齒動物(例如，小鼠或大鼠)或鳥類樣品。在一個實施例中，鳥類樣品包含來自一或多種雞之樣品。在另一實施例中，樣品為人類樣品。人類微生物群落(microbiome)包含在皮膚之表面及深層上，在乳腺、唾液、口腔黏膜、結膜及胃腸道中發現的微生物之集合。在微生物群落中發現之微生物包括細菌、真菌、原蟲、病毒及古菌。不同身體部分展現不同微生物多樣性。微生物之數量及類型可能為個體之健康或患病狀態的信號。細菌分類群之數目呈數千，且病毒可能為大量的。身體給定位點之細菌組成因人而異，不僅類型且亦豐度或數量不同。

在另一實施例中，樣品為瘤胃樣品。反芻動物(諸如牛)依賴於多樣微生物群集來消化其飼料。此等動物已進化至藉由具有改質之上消化道(網狀瘤胃或瘤胃)使用營養價值較差之飼料，其中飼料在其由厭氧微生物群集發酵時保留。瘤胃微生物群集非常密集，每毫升約 3×10^{10} 個微生物細胞。厭氧發酵微生物在瘤胃中占主導。瘤胃微生物群集包括所有三個生活域之成員：細菌、古菌及真核生物。瘤胃發酵產物為其各別宿主所需用於身體維持及生長，以及乳產生(van Houtert (1993). *Anim. Feed Sci. Technol.* 43, 第189-225頁；Bauman等人 (2011). *Annu. Rev. Nutr.* 31, 第299-319頁，出於所有目的各自以全文引用的方式併入本文中)。此外，據報導乳產量及組成與瘤胃微生物群集相關(Sandri等人 (2014). *Animal* 8, 第572-579頁；Palmonari等人 (2010). *J. Dairy Sci.* 93, 第279-287頁，出於所有目的各自以全文引用的方式併入本文中)。在一個實施例中，經由Jewell等人 (2015). *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 第4697-4710頁(出於所有目的以全文引用的方式併入本文中)中所描述之方法收集瘤胃樣品。

在另一實施例中，樣品為土壤樣品(例如，非根際土或根際土樣

品)。據估計，1公克土壤含有數以萬計的細菌分類群及多達十億個細菌細胞以及約2億真菌菌絲(Wagg等人 (2010). *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 111, 第5266-5270頁，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。細菌、放線菌、真菌、藻類、原蟲及病毒均在土壤中發現。土壤微生物群集多樣性已牽涉於土壤微環境之結構及肥力、植物養分採集、植物多樣性及生長以及地上與地下群集之間的資源循環。因此，評估隨時間推移土壤樣品之微生物含量及活性微生物之共現(以及活性微生物之數目)，提供對與環境後設資料參數(諸如養分採集及/或植物多樣性)相關之微生物的深刻理解。

在一個實施例中，土壤樣品為根際土樣品，亦即，直接受根分泌物及相關土壤微生物影響之土壤窄區域。根際土為密集填充區域，其中已觀測到微生物活性升高且植物根部經由營養素及生長因子之交換而與土壤微生物交互作用(San Miguel等人 (2014). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-014-5545-6，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。由於植物分泌多種化合物至根際土中，根際土中之生物類型的分析可對確定其中所生長之植物的特徵有用。

在另一實施例中，樣品為海水或淡水樣品。海水含有每毫升多達一百萬個微生物及數千種微生物類型。此等數目在具有較高生產率及較高有機物及營養素之沿海水域可為較高數目級。海洋微生物對於以下各者為至關重要的：海洋生態系統之運行；維持所產生的二氧化碳與固定二氧化碳之間的平衡；在地球上經由海洋光養微生物(諸如藍藻細菌(*Cyanobacteria*)、矽藻及微微型與微型浮游植物)產生超過50%氧氣；提供新穎的生物活性化合物及代謝途徑；藉由佔據海洋食物網中之關鍵底部營養層來確保海產品之可持續供應。海洋環境中發現之生物包括病毒、細菌、古菌及一些真核生物。海洋病毒可經由病毒溶解在控制海洋細菌種群中發揮顯著作用。海洋細菌作為其他小微

生物之食物來源以及作為有機物之生產者為重要的。在海洋水柱中發現的古菌為深海古菌且其豐度與海洋細菌之豐度競爭。

在另一實施例中，樣品包含來自極端環境，亦即含有不利於地球上大多數生命之條件的環境之樣品。在極端環境中茁壯成長之生物稱為極端微生物。雖然域古菌含有極端微生物之熟知實例，域細菌亦可具有此等微生物之代表。極端微生物包括：嗜酸菌，其生長在3或更低之pH水準下；嗜鹼菌，其生長在9或更高之pH水準下；厭氧菌，諸如鎧甲動物菌種(*Spinoloricus Cinzia*)，其不需要氧氣用於生長；隱藏岩內生物，其生活在地下深部中之填充有地下水之岩石、裂隙、含水層及斷層內的微觀空間中；嗜鹽菌，其生長在約至少0.2 M濃度之鹽中；超嗜熱菌，其在諸如在水熱系統中發現之高溫(約80°C -122°C)下茁壯成長；石下生物，其生活在凍原岩石之下；無機自養生物，諸如歐洲亞硝化單胞菌(*Nitrosomonas europaea*)，其自還原之礦物化合物(如黃鐵礦)得到能量且在地球化學循環中具有活性；耐金屬生物，其忍受高濃度之溶解重金屬，諸如銅、鎘、砷及鋅；貧營養生物，其在營養有限的環境中生長；嗜高滲生物，其在具有高糖濃度之環境中生長；嗜壓生物(或嗜重生物)，其在諸如在海洋或地下深部發現之高壓下茁壯成長；嗜冷生物/嗜冰生物，其在約-15°C或更低之溫度下存活、生長及/或再生；耐輻射生物，其對高水準之電離輻射具有抗性；嗜熱生物，其在45°C至122°C之溫度下茁壯成長；耐旱生物，其可在極其乾燥條件中生長。聚嗜極生物為在多於一種類別下認定為極端微生物且包括嗜熱嗜酸生物之生物(偏好溫度為70°C -80°C且pH在2與3之間)。古菌之泉古菌門(Crenarchaeota)群包括嗜熱嗜酸生物。

樣品可包括來自一或多個域之微生物。舉例來說，在一個實施例中，樣品包含細菌及/或真菌之異源種群(在本文中亦稱為細菌或真菌品系)。

在本文所提供之用於確定樣品中一或多個微生物之存在及絕對細胞計數，例如自相同或不同環境及/或在多個時間點內收集之複數個樣品中之一或多個微生物的絕對細胞計數之方法中，一或多個微生物可為任何類型。舉例來說，一或多個微生物可來自域細菌、古菌、真核生物或其組合。細菌及古菌為原核生物，具有無內部細胞器之非常簡單的細胞結構。細菌可分為革蘭氏(gram)陽性/無外膜、革蘭氏陰性/外膜存在及未分組門。古菌構成單細胞微生物之域或界。雖然目測類似於細菌，古菌具有與真核生物，尤其參與轉錄及轉譯之酶的基因及代謝途徑更密切有關的基因及數種代謝途徑。古菌生物化學之其他態樣為獨特的，諸如其細胞膜中存在醚脂質。古菌分為四個公認門：奇古菌門(Thaumarchaeota)、曙古菌門(Aigarchaeota)、泉古菌門及初古菌門(Korarchaeota)。

真核生物之域包含真核生物，真核生物由膜結合細胞器(諸如細胞核)定義。原蟲為單細胞真核生物。所有多細胞生物為真核生物，包括動物、植物及真菌。已將真核生物分成四界：原生生物界、植物界、真菌界及動物界。然而，存在數種替代分類。另一分類將真核生物分成六界：古蟲界(各種鞭毛蟲原蟲)；變形蟲界(葉狀變形蟲及黏液絲狀真菌)；後鞭毛生物(動物、真菌、領鞭毛蟲)；有孔蟲界(有孔蟲、放射蟲及各種其他變形蟲樣原蟲)；囊泡藻界(原生藻菌(Stramenopile) (褐藻、矽藻)、定鞭藻門、隱藻門(或隱滴蟲)及囊泡蟲)；原始色素體生物(Archaeplastida/Primoplantae) (陸地植物、綠藻、紅藻及灰胞藻)。

在真核生物域內，真菌為在微生物群集中為主型的微生物。真菌包括諸如酵母及絲狀真菌以及熟悉的蘑菇之微生物。真菌細胞具有含有葡聚糖及甲殼素之細胞壁，此為此等生物之獨特特徵。真菌形成單一組之相關生物，命名為真菌門(*Eumycota*)，其共用共同的祖先。

據估計，真菌界處於150萬至500萬物種，約5%此等物種已被正式分類。大多數真菌之細胞以管狀、細長及絲狀結構(稱為菌絲)之形式生長，其可含有多個核。一些物種以單細胞酵母形式生長，其藉由出芽或二分裂再生。真菌之主要門(有時稱為部門)主要基於其性生殖結構之特性分類。目前，提出七個門：微孢子門(Microsporidia)、壺菌門(Chytridiomycota)、芽枝黴門(Blastocladiomycota)、新美鞭菌門(Neocallimastigomycota)、球囊菌門(Glomeromycota)、子囊菌門(Ascomycota)及擔子菌門(Basidiomycota)。

用於藉由本文所描述之方法偵測及定量之微生物亦可為病毒。病毒為僅在其他生物之活細胞內部複製之小感染物。病毒可感染真核生物、細菌及古菌之域中的所有類型之生命形式。病毒粒子(稱為病毒體)由以下兩個或三個部分組成：(i)遺傳物質，其可為DNA或RNA；(ii)保護此等基因之蛋白質塗層；及在一些情況下(iii)脂質包膜，當其在細胞外部時其包圍蛋白質塗層。已確立病毒之七個目：有尾噬菌體目(Caudovirales)、疱疹病毒目(Herpesvirales)、韌帶病毒目(Ligamenvirales)、單股反鏈病毒目(Mononegavirales)、網巢病毒目(Nidovirales)、小RNA病毒目(Picornavirales)及蕪菁黃花葉病毒目(Tymovirales)。病毒基因組可為單鏈(ss)或雙鏈(ds) RNA或DNA，且可或可不使用逆轉錄酶(RT)。另外，ssRNA病毒可為有義(+)或反義(-)的。此分類將病毒分成七組：I：dsDNA病毒(諸如腺病毒、疱疹病毒、痘病毒)；II：(+) ssDNA病毒(諸如小病毒)；III：dsRNA病毒(諸如呼腸孤病毒)；IV：(+) ssRNA病毒(諸如小RNA病毒、披衣病毒)；V：(-) ssRNA病毒(諸如正黏液病毒、棒狀病毒)；VI：(+) ssRNA-RT病毒，其生命週期中有DNA中間物(諸如逆轉錄病毒)；VII：dsDNA-RT病毒(諸如肝炎病毒)。

用於藉由本文所描述之方法偵測及定量之微生物亦可為類病

毒。類病毒為已知的最小感染性病原體，僅由環狀單鏈RNA之短鏈組成而無蛋白質塗層。其主要為植物病原體，其中一些具有經濟重要性。類病毒基因組之尺寸極小，在約246至約467個核鹼基範圍內。

根據本文所提供之方法，處理樣品以偵測樣品中一或多種微生物類型之存在(圖1B，1001；圖2，2001)。確定樣品中一或多種微生物之生物類型之絕對數目(圖1B，1002；圖2，2002)。對一或多種生物類型之存在及至少一種生物類型之絕對數目的確定可並行或連續進行。舉例來說，在包含有包含細菌(亦即，一種微生物類型)及真菌(亦即，第二微生物類型)之微生物群集的樣品之情況下，在一個實施例中，使用者偵測樣品中一或兩種生物類型之存在(圖1B，1001；圖2，2001)。在另一實施例中，使用者確定樣品中至少一種生物類型之絕對數目，在此實例之情況下，樣品中之細菌、真菌或其組合的數目(圖1B，1002；圖2，2002)。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行流式細胞測量術(FC)分析以偵測一或多種微生物類型之存在及/或數目(圖1B，1001、1002；圖2，2001、2002)。在一個流式細胞儀實施例中，個別微生物細胞以至少約 300 s^{-1} ，或至少約 500 s^{-1} ，或至少約 1000 s^{-1} 之速率通過照明區域。然而，一般技術者應認識到，此速率可視所用儀器之類型而變化。以電子方式閘控之偵測器量測脈衝量值，該值表示光散射程度。此等脈衝之量值以電子方式分類成「倉」或「通道」，允許顯示具有一定定量性質(例如，細胞染色性質、直徑、細胞膜)的細胞之數目對比通道數之直方圖。該分析允許確定各「倉」中細胞之數目，該槽在本文所描述之實施例中為「微生物類型」倉，例如細菌、真菌、線蟲、原蟲、古菌、藻類、腰鞭毛蟲、病毒、類病毒等。

在一個實施例中，樣品經一或多種螢光染料染色，其中螢光染料對特定微生物類型具有特異性，能夠經由流式細胞儀或利用螢光之

一些其他偵測及定量方法(諸如螢光顯微術)實現偵測。該方法可提供對樣品中給定生物類型之細胞數目及/或細胞體積之定量。在另一實施例中，如本文所描述，利用流式細胞測量術確定生物類型之獨特第一標記及/或獨特第二標記(諸如酶表現、細胞表面蛋白表現等)之存在及數量。舉例來說，亦可產生光散射對比細胞膜染色之螢光(對比蛋白質染色或DNA染色之螢光)之兩變數或三變數直方圖或等高線圖，且因此可獲得種群中細胞之間的相關多種性質之分佈的整體印象。許多此類多參數流式細胞測量資料之顯示為常用的且適合用於本文所描述之方法。

在處理樣品以偵測一或多種微生物類型之存在及數目之一個實施例中，採用顯微術分析(圖1B，1001、1002)。在一個實施例中，顯微術為光學顯微術，其中使用可見光及透鏡系統來放大樣品之影像。可藉由電荷耦合器件(CCD)相機來捕獲數位影像。其他顯微技術包括(但不限於)掃描電子顯微術及透射電子顯微術。微生物類型可根據本文所提供之態樣目測及定量。

在本發明之另一實施例中，為偵測一或多種微生物類型之存在及數目，對各樣品或其部分進行螢光顯微術。可使用不同螢光染料直接對樣品中之細胞進行染色及使用落謝螢光顯微鏡以及上文所描述之流式細胞測量術定量總細胞計數。用於定量微生物之有用染料包括(但不限於)吡啶橙(AO)、4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)及5-羧基-2,3-二甲苯基四唑鎢氯化物(CTC)。活細胞可藉由生存力染色法，諸如LIVE/DEAD[®]細菌生存力套組(Bac-Light[™])估計，該套組含有兩種核酸染料：綠色螢光SYTO⁹[™]染料穿過所有膜且紅色螢光碘化丙錠(PI)染料穿過膜受損之細胞。因此，膜受損之細胞將染紅色，而膜未受損之細胞將染綠色。螢光原位雜合(FISH)擴展落謝螢光顯微術，允許快速偵測及計數特定生物。FISH使用螢光標記之寡核苷酸探針(通常15-

25個鹼基對)，該等探針特異性地結合於樣品中之生物DNA，允許使用落謝螢光或共聚焦激光掃描顯微鏡(CLSM)可視化細胞。催化之報導子沈積螢光原位雜合(CARD-FISH)藉由使用經辣根過氧化酶(HRP)標記之寡核苷酸探針擴增自所研究微生物獲得的信號之強度來改進FISH方法。FISH可與其他技術組合用於表徵微生物群集。一種組合技術為高親和力肽核酸(PNA)-FISH，其中探針穿過胞外聚合物質(EPS)基質之能力增強。另一實例為LIVE/DEAD-FISH，其使細胞生存力套組與FISH組合且已用於評估滅菌在飲用水分佈系統中之效率。

在另一實施例中，對各樣品或其部分進行拉曼(Raman)微光譜分析以便確定微生物類型之存在及至少一種微生物類型之絕對數目(圖1B，1001-1002；圖2，2001-2002)。拉曼微光譜分析為能夠偵測及量測單細胞拉曼光譜(SCRS)之非破壞性且無標記之技術。典型SCRS提供單細胞之固有生物化學「指紋」。SCRS含有其內生物分子之豐富資訊，包括核酸、蛋白質、碳水化合物及脂質，允許表徵不同細胞種類、生理變化及細胞表型。拉曼顯微術藉由不同細胞生物標記之化學鍵檢查雷射光之散射。SCRS為一個單細胞中所有生物分子之光譜的總和，指示細胞之表型概況。作為基因表現之結果，細胞表型通常反映基因型。因此，在相同生長條件下，不同微生物類型給出對應於其基因型差異之不同SCRS且可因此藉由其拉曼光譜識別。

在又一實施例中，對樣品或其部分進行離心以便確定微生物類型之存在及至少一種微生物類型之數目(圖1B，1001-1002；圖2，2001-2002)。此過程藉由使用由離心機產生之離心力使異源混合物沈積。混合物之更密集組分遠離離心機之軸遷移，而混合物之較不密集組分朝向該軸遷移。離心可使樣品部分分離成細胞質、膜及胞外部分。其亦可用於確定相關生物分子之定位資訊。另外，離心可用於部

分分離總微生物群集DNA。不同原核生物群之DNA的鳥嘌呤加胞嘧啶(G+C)含量不同，因此，基於G+C含量之密度-梯度離心為區分生物類型及與各類型相關之細胞的數目的一種方法。該技術產生整個群集DNA之部分分離概況且指示DNA之豐度隨G+C含量而變。總群集DNA以物理方式分離成高度純化溶離份，各自表示不同G+C含量，該等溶離份可藉由額外分子技術，諸如變性梯度凝膠電泳(DGGE)/擴增核糖體DNA限制分析(ARDRA) (參見本文論述)分析來評估總微生物群集多樣性及一或多種微生物類型之存在/數量。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行染色以便確定微生物類型之存在及至少一種微生物類型之數目(圖1B，1001-1002；圖2，2001-2002)。染色及染料可用於使生物組織、細胞或細胞內之細胞器可視化。染色可與顯微術、流式細胞測量術或凝膠電泳結合用於使對不同微生物類型具有獨特性之細胞或生物分子可視化或標記該等細胞或生物分子。活體內染色為對活組織進行染色之過程，而活體外染色涉及對已自其生物背景移出之細胞或結構進行染色。用於本文所描述之方法的特定染色技術之實例包括(但不限於)：革蘭氏染色，用於確定細菌之革蘭氏狀態；內生孢子染色，用於識別內生孢子之存在；紀-尼二氏染色(Ziehl-Neelsen staining)；蘇木精及曙紅染色，用於檢查薄組織切片；巴氏染色(papanicolaou staining)，用於檢查各種身體分泌物之細胞樣品；碳水化合物之過碘酸-希夫染色(Schiff staining)；梅森氏三色染色(Masson's trichome)，採用三色染色方案區分細胞與周圍結締組織；羅氏染色(Romanowsky stain) (或包括瑞氏染色(Wright's stain)、哲納爾氏染色(Jenner's stain)、梅-格二氏染色(May-Grunwald stain)、雷氏曼染色(Leishman stain)及吉氏染色(Giemsa stain)之常見變體)，用於檢查血液或骨髓樣品；銀染色，用於顯示蛋白質及DNA；脂質之蘇丹染色(Sudan staining)；及康氏染色(Conklin's

staining)，用於偵測真正的內生孢子。常見生物染色包括：用於細胞週期確定之吡啶橙；用於酸性黏液素之俾斯麥棕(bismarck brown)；用於肝醣之胭脂紅；用於細胞核之胭脂紅礬；用於蛋白質之庫馬斯藍(Coomassie blue)；用於神經元細胞質之酸性組分之甲苯酚紫；用於細胞壁之結晶紫；用於細胞核之DAPI；用於細胞質物質、細胞膜、一些胞外結構及紅血球之曙紅；用於DNA之溴化乙錠；用於膠原蛋白、平滑肌或粒線體之酸性品紅；用於細胞核之蘇木精；用於DNA之赫斯特染色(Hoechst stain)；用於澱粉之碘；用於吉梅內染色(Gimenez staining)技術中之細菌及用於孢子之孔雀綠；用於染色質之甲基綠；用於動物細胞之亞甲基藍；用於尼斯爾物質(Nissl substance)之中性紅；用於細胞核之尼羅藍(Nile blue)；用於親脂性實體之尼羅紅；用於脂質之四氧化鐵；用於螢光顯微術之若丹明(rhodamine)；用於細胞核之番紅。染色亦用於透射電子顯微術來增強對比度，且包括磷鎢酸、四氧化鐵、四氧化釷、鉬酸鉍、碘化鎘、碳醯肼、氯化鐵、六胺、三氯化銦、硝酸釷、乙酸鉛、檸檬酸鉛、硝酸鉛(II)、過碘酸、磷鉬酸、鐵氰化鉀、亞鐵氰化鉀、釷紅、硝酸銀、蛋白銀、氯金酸鈉、硝酸鉍、氨基硫脲、乙酸鉬鹽、硝酸鉬鹽及硫酸鉬鹽。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行質譜分析(MS)以便確定微生物類型之存在及至少一種微生物類型之數目(圖1B，1001-1002；圖2，2001-2002)。如下文所論述，MS亦可用於偵測樣品中一或多個獨特標記之存在及表現(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。MS用於例如偵測對微生物類型具有獨特性之蛋白質及/或肽標記之存在及數量，且因此提供對樣品中各別微生物類型之數目的評估。定量可在有穩定同位素標記或無標記之情況下進行。亦可直接自MS/MS光譜或序列標記進行肽之重新定序(產生可匹配資料庫之短標籤)。MS亦可顯示蛋白質之轉譯後改質及識別代謝物。MS可與層析及其他分離技術

(諸如氣相層析、液相層析、毛細管電泳、離子遷移)結合用於增強質量解析度及測定。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行脂質分析以便確定微生物類型之存在及至少一種微生物類型之數目(圖1B，1001-1002；圖2，2001-2002)。脂肪酸以相對恆定比例之細胞生物質量存在，且簽名脂肪酸存在於可區分群集內的微生物類型之微生物細胞中。在一個實施例中，脂肪酸藉由皂化隨後衍生化提取，得到各別脂肪酸甲酯(FAME)，其隨後藉由氣相層析分析。在一個實施例中，隨後將FAME概況與參考FAME資料庫進行比較以藉由多變數統計分析識別脂肪酸及其相應微生物簽名。

在本文所提供之方法之態樣中，量測樣品或其部分(例如，樣品等分試樣)中獨特第一標記之數目，以及獨特第一標記各自之數量(圖1B，1003；圖2，2003)。獨特標記為微生物品系之標記。一般技術者應理解，視探測及量測之獨特標記而定，不必分析整個樣品。舉例而言，若獨特標記對細菌品系具有獨特性，則不必分析樣品之真菌部分。如上文所描述，在一些實施例中，量測樣品中一或多種生物類型之絕對細胞計數包含例如經由流式細胞測量術按生物類型分離樣品。

在本文中可採用對生物品系具有獨特性之任何標記。舉例而言，標記可包括(但不限於)小亞單位核糖體RNA基因(16S/18S rDNA)、大亞單位核糖體RNA基因(23S/25S/28S rDNA)、中間5.8S基因、細胞色素c氧化酶、 β -微管蛋白、伸長因子、RNA聚合酶及內轉錄間隔區(ITS)。

核糖體RNA基因(rDNA)，尤其小亞單位核糖體RNA基因，亦即在真核生物之情況下的18S rRNA基因(18S rDNA)及在原核生物之情況下的16S rRNA (16S rDNA)，為用於評估微生物群集中之生物類型及品系的主要目標。然而，亦靶向大亞單位核糖體RNA基因28S

rDNA。rDNA適合於分類識別，因為：(i)其在所有已知生物中普遍存在；(ii)其具有保守區及可變區；(iii)有其序列之可用於比較之指數膨脹資料庫。在樣品之群集分析中，保守區充當相應的通用PCR及/或定序引子之退火位點，而可變區可用於系統發育分化。另外，細胞中rDNA之高複本數有助於自環境樣品之偵測。

亦靶向位於18S rDNA與28S rDNA之間的內轉錄間隔區(ITS)。在組合核糖體之前使ITS轉錄但剪接。ITS區由兩個高度可變間隔區(ITS1及ITS2)及中間5.8S基因組成。此rDNA操縱子出現在基因組中之多個複本中。因為ITS區不編碼核糖體組分，該區為高度可變的。

在一個實施例中，獨特RNA標記可為mRNA標記、siRNA標記或核糖體RNA標記。

亦可在本文中使用的編碼蛋白質之機能基因作為獨特第一標記。此類標記包括(但不限於)：重組酶A基因家族(細菌RecA、古菌RadA及RadB、真核Rad51及Rad57、噬菌體UvsX)；RNA聚合酶β亞單位(RpoB)基因，其負責轉錄起始及伸長；伴侶蛋白。亦已識別細菌加古菌之候選標記基因：核糖體蛋白S2 (rpsB)、核糖體蛋白S10 (rpsJ)、核糖體蛋白L1 (rplA)、轉譯伸長因子EF-2、轉譯起始因子IF-2、金屬內肽酶、核糖體蛋白L22、ffh信號辨識粒子蛋白、核糖體蛋白L4/L1e (rplD)、核糖體蛋白L2 (rplB)、核糖體蛋白S9 (rpsI)、核糖體蛋白L3 (rplC)、苯丙胺鹽基-tRNA合成酶β亞單位、核糖體蛋白L14b/L23e (rplN)、核糖體蛋白S5、核糖體蛋白S19 (rpsS)、核糖體蛋白S7、核糖體蛋白L16/L10E (rplP)、核糖體蛋白S13 (rpsM)、苯丙胺鹽基-tRNA合成酶α亞單位、核糖體蛋白L15、核糖體蛋白L25/L23、核糖體蛋白L6 (rplF)、核糖體蛋白L11 (rplK)、核糖體蛋白L5 (rplE)、核糖體蛋白S12/S23、核糖體蛋白L29、核糖體蛋白S3 (rpsC)、核糖體蛋白S11 (rpsK)、核糖體蛋白L10、核糖體蛋白S8、tRNA假尿苷合成酶B、核

糖體蛋白L18P/L5E、核糖體蛋白S15P/S13e、膽色素原脫胺酶、核糖體蛋白S17、核糖體蛋白L13 (rplM)、磷酸核糖甲醯甘胺脒環-連接酶(rpsE)、核糖核酸酶HII及核糖體蛋白L24。細菌之其他候選標記基因包括：轉錄伸長蛋白NusA (nusA)、rpoB DNA導引之RNA聚合酶亞單位 β (rpoB)、GTP結合蛋白EngA、rpoC DNA導引之RNA聚合酶亞單位 β' 、priA引發體組合蛋白、轉錄-修復偶合因子、CTP合成酶(pyrG)、secY前蛋白移位酶亞單位SecY、GTP結合蛋白Obg/CgtA、DNA聚合酶I、rpsF 30S核糖體蛋白S6、poA DNA導引之RNA聚合酶亞單位 α 、肽鏈釋放因子1、rplI 50S核糖體蛋白L9、多核糖核苷酸核苷酸基轉移酶、tsf伸長因子Ts (tsf)、rplQ 50S核糖體蛋白L17、tRNA (鳥嘌呤-N(1)-)-甲基轉移酶(rplS)、rplY可能50S核糖體蛋白L25、DNA修復蛋白RadA、葡萄糖抑制分裂蛋白A、核糖體結合因子A、NDA錯配修復蛋白MutL、smpB SsrA結合蛋白(smpB)、N-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶、S-腺苷-甲基轉移酶MraW、UDP-N-乙醯胞壁醯基丙胺酸--D-麩胺酸連接酶、rplS 50S核糖體蛋白L19、rplT 50S核糖體蛋白L20 (rplT)、ruvA霍利迪(Holliday)交叉DNA解螺旋酶、ruvB霍利迪交叉DNA解螺旋酶B、serS絲胺醯基-tRNA合成酶、rplU 50S核糖體蛋白L21、rpsR 30S核糖體蛋白S18、NDA錯配修復蛋白MutS、rpsT 30S核糖體蛋白S20、DNA修復蛋白RecN、frr核糖體循環因子(frr)、重組蛋白RecR、未知機能蛋白UPF0054、miaA tRNA異戊烯基轉移酶、GTP結合蛋白YchF、染色體複製引發劑蛋白DnaA、脫磷CoA激酶、16S rRNA加工蛋白RimM、ATP錐域蛋白、1-脫氧-D-木酮糖5-磷酸還原異構酶、2C-甲基-D-赤藻糖醇2,4-環二磷酸合成酶、脂肪酸/磷脂合成蛋白PlsX、tRNA (Ile)-賴西丁合成酶、dnaG DNA引發酶(dnaG)、ruvC霍利迪交叉解離酶、rpsP 30S核糖體蛋白S16、重組酶A recA、核黃素生物合成蛋白RibF、甘胺醯基-tRNA合成酶 β 亞單位、trmU tRNA (5-甲胺基甲基-

2-硫尿苷酸)-甲基轉移酶、rpmI 50S核糖體蛋白L35、hemE尿卟啉原脫羧酶、桿狀測定蛋白、rpmA 50S核糖體蛋白L27 (rpmA)、肽基-tRNA水解酶、轉譯起始因子IF-3 (infC)、UDP-N-乙醯胞壁醯基-三肽合成酶、rpmF 50S核糖體蛋白L32、rpIL 50S核糖體蛋白L7/L12 (rpIL)、leuS白胺醯基-tRNA合成酶、ligA NAD依賴性DNA連接酶、細胞分裂蛋白FtsA、GTP結合蛋白TypA、ATP依賴性Clp蛋白酶、ATP結合亞單位ClpX、DNA複製與修復蛋白RecF及UDP-N-乙醯烯醇丙酮醯基葡萄糖胺還原酶。

根據本文所描述之方法，亦可使用磷脂脂肪酸(PLFA)作為獨特第一標記。因為PLFA在微生物生長期間快速合成，在儲存分子中不可見且在細胞死亡期間快速降解，其提供目前活群集之精確普查。所有細胞含有脂肪酸(FA)，脂肪酸可提取且酯化形成脂肪酸甲酯(FAME)。當使用氣相層析-質譜分析來分析FAME時，所得分佈構成樣品中微生物之『指紋』。域細菌及真核生物中之生物的膜之化學組合物由藉由酯型鍵連接至甘油之脂肪酸組成(磷脂脂肪酸(PLFA))。相比之下，古菌之膜脂質由藉由醚型鍵接合至甘油之長鏈及分支鏈烴組成(磷脂醚脂質(PLEL))。此為最常使用的用於區分三個域之非遺傳標準之一。在此情形下，來源於微生物細胞膜、由不同醯基鏈表徵之磷脂為極佳簽名分子，因為此類脂質結構多樣性可與特定微生物分類群有關。

如本文所提供，為判定生物品系是否為活性，量測一或多個獨特第二標記之表現量，該表現量可與第一標記相同或不同(圖1B，1004；圖2，2004)。上文描述獨特第一標記。獨特第二標記為微生物活性之標記。舉例而言，在一個實施例中，出於本發明之目的，上文所描述之第一標記中之任一者的mRNA或蛋白表現被視為獨特第二標記。

在一個實施例中，若第二標記之表現量高於臨限值位準(例如，對照水準)或處於臨限值位準，則微生物被視為活性(圖1B，1005；圖2，2005)。在一個實施例中，若第二標記之表現量相比於臨限值位準(在一些實施例中，為對照水準)改變了至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%或至少約30%，則確定活性。

在一個實施例中，在蛋白質、RNA或代謝物含量下量測第二獨特標記。獨特第二標記與第一獨特標記相同或不同。

如上文所提供，可根據本文所描述之方法偵測多個獨特第一標記及獨特第二標記。此外，根據一般技術者已知之方法進行獨特第一標記之偵測及定量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。

在一個實施例中，使用核酸定序(例如，gDNA、cDNA、rRNA、mRNA)確定獨特第一標記及/或獨特第二標記之絕對細胞計數。定序平台包括(但不限於)桑格定序(Sanger sequencing)及可自Roche/454 Life Sciences, Illumina/Solexa, Pacific Biosciences, Ion Torrent and Nanopore獲得之高通量定序法。定序可為特定DNA或RNA序列之擴增子定序或整個總體基因組/轉錄組鳥槍法定序。

傳統桑格定序(Sanger等人 (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 74, 第5463-5467頁，其以全文引用的方式併入本文中)依賴於在活體外DNA複製期間藉由DNA聚合酶選擇性摻入鏈終止雙脫氧核苷酸，且適合用於本文所描述之方法。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行核酸提取、用適合引子擴增相關DNA(諸如rRNA基因)及使用定序載體構築無性繁殖系庫。隨後藉由桑格定序對所選無性繁殖系進行定序且檢索相關DNA之核苷酸序列，允許計算樣品中獨特微生物品系之數目。

來自Roche/454 Life Sciences之454焦磷酸定序產生長讀數且可用

於本文所描述之方法(Margulies等人 (2005) *Nature*, 437, 第376-380頁；美國專利第6,274,320號、第6,258,568號、第6,210,891號，各專利案基於所有目的以全文引用方式併入本文中)。待定序之核酸(例如，擴增子或霧化基因組/總體基因組DNA)具有在任一端上藉由PCR或接合所附著之特定銜接子。具有銜接子之DNA固定至懸浮於油包水乳液中之微小珠粒(理想地，一個珠粒將具有一個DNA片段)。隨後進行乳液PCR步驟以製得各DNA片段之多個複本，產生一組珠粒，其中各珠粒含有相同DNA片段之多個無性繁殖複本。隨後將各珠粒置於光纖晶片之孔中，光纖晶片亦含有用於合成定序反應必要之酶。添加鹼(諸如A、C、G或T)觸發焦磷酸鹽釋放，產生閃光，記錄閃光以推斷各孔中DNA片段之序列。可達成每一運行約1百萬個讀數，讀數長度高達1,000個鹼基。可進行成對端定序，產生讀數對，其各自在給定DNA片段之一端開始。可產生分子條形碼且置於銜接子序列與多重反應中之相關序列之間，使各序列在生物信息學上分配至樣品。

Illumina/Solexa定序產生約25鹼基對(bp)至約300 bp之平均值讀數長度(Bennett等人 (2005) *Pharmacogenomics*, 6:373-382；Lange等人 (2014). *BMC Genomics* 15, 第 63 頁；Fadrosh等人 (2014) *Microbiome* 2, 第6頁；Caporaso等人 (2012) *ISME J*, 6, 第1621-1624頁；Bentley等人 (2008) *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature*, 456:53-59)。此定序技術亦為合成定序但採用可逆染料終止子及連接有寡核苷酸域之流式樣品槽(flow cell)。待定序之DNA片段在任一端上具有特定銜接子，且在填充有與該等片段之末端雜合之特異性寡核苷酸的流式樣品槽內洗滌。隨後複製各片段，製得相同片段之叢集。隨後在流式樣品槽內洗滌可逆染料終止子核苷酸給定時間來連接。洗掉過量核苷酸，對流式樣品槽進行成像且可移除可逆終止子，以便在後續週期中該過程可重

複且可繼續添加核苷酸。可達成長度各自為300個鹼基之成對端讀數。Illumina平台可以成對端方式產生40億個片段，其中單次運行之各讀數有125個鹼基。條形碼亦可用於樣品複用，但使用索引之引子。

SOLiD (藉由寡核苷酸接合及偵測來定序，Life Technologies)方法為一種「接合定序」方法，且可在本文所描述之方法中用於偵測第一標記及/或第二標記之存在及數量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004) (Peckham等人 SOLiD™ Sequencing and 2-Base Encoding. San Diego, CA: American Society of Human Genetics, 2007；Mitra等人 (2013) Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. BMC Genomics, 14(增刊5): S16；Mardis (2008) Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet, 9:387-402)。DNA片段庫係由待定序之樣品製備，且用於製備無性繁殖系珠粒種群，其中僅一種片段將存在於各磁珠之表面上。連接至磁珠之片段將具有通用P1銜接子序列，使得每一片段之起始序列已知且相同。在庫模板內引子與P1銜接子序列雜合。一組四個螢光標記雙鹼基探針競爭與定序引子接合。藉由在各接合反應中詢問每個第一及第二鹼基來達成雙鹼基探針之特異性。進行接合、偵測及裂解之多次循環，其中循環次數決定最終讀數長度。SOLiD平台可產生高達每一運行30億個讀數，其中讀數為75個鹼基長。成對端定序為可用的且可用於本文中，但該對中第二讀數僅為35個鹼基長。樣品之複用經由等效於Illumina所用之具有單獨索引運行之系統的系統為可能的。

Ion Torrent系統，如454定序適合在本文所描述之方法中用於偵測第一標記及/或第二標記之存在及數量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。其使用含有連接DNA片段之珠粒之微孔板。然而，其偵

測鹼基摻入之方式不同於所有其他系統。當添加鹼基至生長DNA鏈中時，釋放質子，其稍微改變周圍pH。對pH敏感之微偵測器與板上之孔相關聯，且在此等變化發生時記錄其。依次洗滌不同鹼基(A、C、G、T)通過各孔，允許推斷各孔之序列。Ion Proton平台可產生高達每一運行5000萬個讀數，讀數長度為200個鹼基。Personal Genome Machine平台具有400個鹼基較長讀數。雙向定序為可用的。複用經由標準在線分子條形碼定序為可能的。

Pacific Biosciences (PacBio) SMRT定序使用單分子即時定序法，且在一個實施例中，在本文所描述之方法中用於偵測第一標記及/或第二標記之存在及數量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。PacBio定序系統不涉及擴增步驟，除其他主要下一代定序系統以外均設置擴增步驟。在一個實施例中，在含有多個零模式波導(ZMW)偵測器之晶片上進行定序。DNA聚合酶連接至ZMW偵測器，且在合成DNA鏈時即時地對磷酸聯染料標記之核苷酸摻入進行成像。PacBio系統產生極長讀數長度(平均約4,600個鹼基)及每一運行極大量讀數(約47,000)。典型的「成對端」方法不適用於PacBio，因為讀數通常足夠長以致片段經由CCS可被覆蓋多次而不必自各端獨立地定序。用PacBio進行複用不涉及獨立讀數，而是遵循標準「在線」條形碼模型。

在第一獨特標記為ITS基因組區域之一個實施例中，在一個實施例中使用自動化核糖體基因間間隔分析來確定樣品中微生物品系之數目及身分(圖1B，1003；圖2，2003)(Ranjard等人(2003). *Environmental Microbiology* 5, 第1111-1120頁，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。ITS區域之長度及核苷酸序列具有顯著異源性。螢光標記正向引子及自動DNA定序儀之使用准許高分離解析度及高通量。各樣品中包括內標提供確定一般片段大小之精確度。

在另一實施例中，使用PCR擴增rDNA片段之片段長度多形現象

(RFLP) (另外稱為擴增核糖體DNA限制分析(ARDRA))來表徵獨特第一標記及樣品中獨特第一標記之數量(圖1B, 1003; 圖2, 2003) (關於額外細節, 參見Massol-Deya等人 (1995). *Mol. Microb. Ecol. Manual*. 3.3.2, 第1-18頁, 出於所有目的其全部內容以引用的方式併入本文中)。rDNA片段係使用一般引子藉由PCR產生, 用限制酶消化, 在瓊脂糖或丙烯醯胺凝膠中電泳且用溴化乙錠或硝酸銀進行染色。

在偵測獨特第一標記之存在及豐度中使用之一種指紋識別技術為單鏈構形多形現象(SSCP) (參見Lee等人 (1996). *Appl Environ Microbiol* 62, 第3112-3120頁; Scheinert等人 (1996). *J. Microbiol. Methods* 26, 第103-117頁; Schwieger及Tebbe (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 第4870-4876頁, 其各自以全文引用的方式併入本文中)。在此技術中, 使DNA片段, 諸如用對16S rRNA基因具有特異性之引子獲得之PCR產物變性且直接在非變性膠凝上電泳。分離係基於單鏈DNA之尺寸及摺疊構形的差異, 該等差異影響電泳遷移。在電泳期間DNA鏈之重退火可藉由多種策略防止, 包括在PCR中使用一個磷酸化引子隨後用 λ 核酸外切酶特定消化磷酸化鏈及在變性之後使用一個生物素標記引子進行一個單鏈之磁分離。為評估給定微生物群集中之主要種群之身分, 在一個實施例中, 切下且定序帶, 或SSCP模式可與特定探針雜合。電泳條件, 諸如膠凝基質、溫度及添加甘油至膠凝中可影響分離。

除基於定序之方法以外, 用於定量第二標記之表現(例如, 基因、蛋白表現)之其他方法適合在本文所提供之方法中用於確定一或多個第二標記之表現量(圖1B, 1004; 圖2, 2004)。舉例而言, 定量RT-PCR、微陣列分析、線性擴增技術(諸如基於核酸序列之擴增(NASBA))皆適合用於本文所描述之方法, 且可根據一般技術者已知之方法進行。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行定量聚合酶鏈反應(PCR)以偵測第一標記及/或第二標記之存在及數量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。特定微生物品系活性係藉由經轉錄核糖體及/或信使RNA (rRNA及mRNA)逆轉錄成互補DNA (cDNA)，隨後藉由PCR (RT-PCR)量測。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行基於PCR之指紋識別技術以偵測第一標記及/或第二標記之存在及數量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。PCR產物可基於核苷酸組成藉由電泳分離。不同DNA分子之間的序列變異影響熔融行為，且因此具有不同序列之分子將停止在膠凝中的不同位置遷移。因此，電泳圖譜可由不同帶或峰之位置及相對強度界定且可轉譯為數值資料用於計算多樣性指數。帶亦可自膠凝切下且隨後進行定序來顯示群集成員之系統發育隸屬。電泳方法可包括(但不限於)：變性梯度凝膠電泳(DGGE)、溫度梯度凝膠電泳(TGGE)、單鏈構形多形現象(SSCP)、限制性片段長度多形現象分析(RFLP)或擴增核糖體DNA限制分析(ARDRA)、末端限制性片段長度多形現象分析(T-RFLP)、自動化核糖體基因間間隔分析(ARISA)、隨機擴增多形性DNA (RAPD)、DNA擴增指紋識別(DAF)及Bb-PEG電泳。

在另一實施例中，對樣品或其部分進行基於晶片之平台(諸如微陣列或微流體)以確定獨特第一標記之數量及/或獨特第二標記之存在/數量(圖1B，1003-1004；圖2，2003-2004)。PCR產物自樣品中之總DNA擴增且與附著至微陣列之已知分子探針直接雜合。在螢光標記PCR擴增子與探針雜合之後，藉由使用共聚焦激光掃描顯微術對陽性信號進行評分。微陣列技術允許樣品藉由複製而快速評估，其為微生物群集分析中之顯著優點。微陣列上之雜合信號強度可與目標生物之數量成正比。通用高密度16S微陣列(例如，PHYLOCHIP)含有靶向幾

個經培養微生物物種及「候選區」之16SrRNA基因的約30,000個探針。此等探針靶向所有121個分界原核生物目且允許同時偵測8,741種細菌及古菌分類群。用於剖析微生物群集之另一微陣列為機能性基因陣列(FGA)。不同於PHYLOCHIP，FGA經設計主要偵測細菌之特定代謝群。因此，FGA不僅顯示群集結構，其亦闡明原位群集代謝可能性。FGA含有來自具有已知生物機能之基因的探針，因此其適用於鏈接微生物群集組成與生態系統機能。被稱為GEOCHIP之FGA含有來自參與各種生物地球化學、生態及環境過程(諸如氨氧化、甲烷氧化及氮固定)之所有已知代謝基因的>24,000個探針。

在一個實施例中，蛋白表現分析在本文所描述之方法中用於確定一或多個第二標記之表現量(圖1B，1004；圖2，2004)。舉例而言，在一個實施例中，使用質譜分析或免疫分析(諸如酶聯免疫吸附分析(ELISA))來定量一或多個獨特第二標記之表現量，其中一或多個獨特第二標記為蛋白質。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行溴脫氧尿苷(BrdU)摻入以確定第二獨特標記之含量(圖1B，1004；圖2，2004)。可將胸苷之合成核苷類似物BrdU摻入複製細胞之最新合成之DNA中。隨後可使用對BrdU具有特異性之抗體偵測鹼基類似物。因此，BrdU摻入識別積極複製其DNA之細胞，對根據本文所描述之方法之一個實施例的微生物之活性的量測。BrdU摻入可與FISH組合用於提供目標細胞之身分及活性。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行微自動放射照相術(MAR)以及FISH以確定第二獨特標記之含量(圖1B，1004；圖2，2004)。MAR-FISH係基於放射性底物摻入細胞中，使用自動放射照像術偵測活細胞及使用FISH識別細胞。用顯微鏡進行在單細胞解析度下活細胞之偵測及識別。MAR-FISH提供關於總細胞、探針靶向細胞及摻有

給定放射性標記物質之細胞的百分比之資訊。該方法提供對目標微生物之原位機能的評估且為研究活體內微生物生理學之有效方法。經開發用於定量細胞特異性底物吸收之技術與MAR-FISH之組合被稱為定量MAR (QMAR)。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行穩定同位素拉曼光譜分析以及FISH (拉曼-FISH)以確定第二獨特標記之含量(圖1B，1004；圖2，2004)。此技術組合穩定同位素探測、拉曼光譜分析及FISH以鏈接代謝過程與特定生物。穩定同位素摻入占細胞之比例影響光散射，導致經標記細胞組分(包括蛋白質及mRNA組分)之可量測的峰移位。拉曼光譜分析可用於識別是否為細胞合成化合物，包括(但不限於)：油(諸如烷烴)、脂質(諸如三醯甘油(TAG))、特異性蛋白(諸如血紅素蛋白、金屬蛋白)、細胞色素(諸如P450、細胞色素c)、葉綠素、發色團(諸如捕光色素類胡蘿蔔素及視紫質)、有機聚合物(諸如聚羥基烷酸酯(PHA)、聚羥基丁酸酯(PHB))、藿烷類化合物、類固醇、澱粉、硫化物、硫酸鹽及次要代謝物(諸如維生素B12)。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行DNA/RNA穩定同位素探測(SIP)以確定第二獨特標記之含量(圖1B，1004；圖2，2004)。SIP允許確定與特定代謝途徑相關之微生物多樣性，且一般應用於研究涉及使用碳及氮化合物之微生物。相關底物經穩定同位素(諸如 ^{13}C 或 ^{15}N)標記且添加至樣品中。僅能夠代謝底物之微生物將底物摻入其細胞中。隨後， ^{13}C -DNA及 ^{15}N -DNA可藉由密度梯度離心分離且用於總體基因組分析。基於RNA之SIP可為供SIP研究之用的響應性生物標記，因為RNA自身為細胞活性之反映。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行同位素陣列以確定第二獨特標記之含量(圖1B，1004；圖2，2004)。同位素陣列允許以高通量方式進行活性微生物群集之機能性及系統發育篩選。該技術使用用

於監測底物吸收概況之SIP及用於確定活性微生物群集之分類一致性之微陣列技術的組合。使樣品與 ^{14}C 標記底物一起培育，該底物在生長過程期間變得摻入微生物生物質量中。使 ^{14}C 標記rRNA與未標記rRNA分離且隨後用螢光染料標記。螢光標記rRNA與系統發育微陣列雜合，隨後掃描放射性及螢光信號。因此，該技術允許同時研究微生物群集組成及複雜微生物群集之代謝活性微生物的特定底物消耗。

在一個實施例中，對樣品或其部分進行代謝組學分析以確定第二獨特標記之含量(圖1B，1004；圖2，2004)。代謝組學研究表示生物細胞、組織、器官或生物中之所有代謝物、細胞過程之最終產物之集合的代謝物組。此方法可用於監測微生物及/或微生物介導過程之存在，因為其允許關聯特定代謝物概況與不同微生物。與微生物活性相關之胞內及胞外代謝物之概況可使用諸如氣相層析-質譜分析(GC-MS)之技術獲得。代謝體學樣品之複雜混合物可藉由諸如氣相層析、高效液相層析及毛細管電泳之技術分離。代謝物可藉由質譜分析、核磁共振(NMR)光譜分析、離子遷移光譜測定法、電化學偵測(與HPLC耦合)及放射性標記(在與薄層層析組合時)偵測。

根據本文所描述之實施例，確定樣品中一或多個活性微生物品系之存在及各別數目(圖1B，1006；圖2，2006)。舉例而言，對自分析第一標記之數目及存在所獲得的品系身分資訊進行分析以確定獨特第一標記出現幾次，進而表示獨特微生物品系(例如，藉由計數在定序分析中讀取之序列數)。在一個實施例中，此值可表示為第一標記之總序列讀數之百分比，得到特定微生物類型之獨特微生物品系之百分比。在另一實施例中，此百分比乘以微生物類型之數目(在步驟1002或2002中獲得，參見圖1B及圖2)，得到樣品中且給定體積之一或多個微生物品系之絕對細胞計數。

如上文所描述，若第二獨特標記之表現量處於臨限值位準，高

於臨限值，例如高於對照水準至少約5%、至少約10%、至少約20%或至少約30%，則一或多個微生物品系被視為活性。

在本發明之另一態樣中，在複數個樣品中確定一種用於確定一或多個微生物品系之絕對細胞計數的方法(圖2，尤其參見2007)。對於將分類為活性之微生物品系，其僅需要在一個樣品中為活性。樣品可在多個時間點內取自相同來源，或可來自不同環境源(例如，不同動物)。

在一個實施例中，樣品內之絕對細胞計數值用於使一或多個活性微生物品系與環境參數關聯(圖2，2008)。在一個實施例中，環境參數為第二活性微生物品系之存在。在一個實施例中，藉由用網路分析確定品系及參數之共現來進行一或多個活性微生物品系與環境參數之關聯。

在一個實施例中，確定一或多個活性微生物品系與環境參數之共現包含網路及/或叢集分析方法來量測網路內之品系或品系與環境參數之連接性，其中網路為共用共同或類似環境參數之兩個或更多個樣品之集合。在另一實施例中，網路分析包含包括用於建立變數之間的連接性之相互資訊的非參數方法。在另一實施例中，網路分析包含連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。在另一實施例中，叢集分析方法包含構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型，及/或使用群集偵測算法，諸如魯汶(Louvain)、布朗-克博施(Bron-Kerbosch)、格文-紐曼(Girvan-Newman)、克洛賽-紐曼-穆爾(Clauset-Newman-Moore)、龐斯-拉塔皮(Pons-Latapy)及齋田-鶴見(Wakita-Tsurumi)之算法。

在一個實施例中，叢集分析方法為基於模組化優化之啟發式方法。在另一實施例中，叢集分析方法為魯汶法(參見例如，Blondel等

人 (2008) Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 第2008卷, 2008年10月中所描述之方法, 出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。

在另一實施例中, 網路分析包含經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。在另一實施例中, 網路分析包含基於微分方程式之種群建模。在另一實施例中, 網路分析包含洛特卡-沃爾泰拉建模。

在一個實施例中, 樣品中一或多個活性微生物品系與環境參數(例如, 確定共現)之關聯包含創建以表示環境參數及微生物品系相關性之鏈接填充的矩陣。

在一個實施例中, 將在步驟2007中獲得之多個樣品資料(例如, 在可在兩個或更多個時間點收集之兩個或更多個樣品內, 其中各時間點對應於個別樣品)編譯。在另一實施例中, 各樣品中一或多個微生物品系各自之細胞數目儲存於關聯矩陣(在一些實施例中, 其可為數量矩陣)中。在一個實施例中, 關聯矩陣用於使用經關聯(例如數量)資料加權之規則挖掘方法識別特定時間點樣品中之活性微生物品系之間的相關性。在一個實施例中, 過濾器應用於移除不顯著規則。

在一個實施例中, 一或多個或兩個或更多個活性微生物品系之絕對細胞計數與一或多個環境參數有關(圖2, 2008), 例如經由共現確定。環境參數係由使用者視待分析樣品而選擇且不受本文所描述之方法限制。環境參數可為樣品自身之參數, 例如pH、溫度、樣品中蛋白質之量。或者, 環境參數為影響微生物群集之身分的變化(亦即, 其中微生物群集之「身分」由微生物品系之類型及/或群集中特定微生物品系之數目表徵)或受微生物群集之身分變化的影響之參數。舉例而言, 在一個實施例中, 環境參數為動物之攝食量或由哺乳反芻產生之乳量(或乳蛋白或乳脂含量)。在一個實施例中, 環境參數

為存在於相同樣品中之微生物群集中之第二微生物品系之存在、活性及/或數量。

在本文所描述之一些實施例中，環境參數稱為後設資料參數，且反之亦然。

後設資料參數之其他實例包括(但不限於)來自獲得樣品之宿主的遺傳資訊(例如，DNA突變資訊)、樣品pH、樣品溫度、特定蛋白質或mRNA之表現、營養條件(例如，周圍環境/生態系統之一或多種營養素之含量及/或身分)、對疾病之易感性或抵抗性、疾病之發作或進展、樣品對毒素之易感性或抵抗性、外來生物化合物(藥物)之功效、天然產物之生物合成或其組合。

舉例而言，根據一個實施例，微生物品系數目變化係根據圖2之方法(亦即，在2001-2007處)在多個樣品內計算。編譯一或多個活性品系隨時間推移之品系數目變化(例如，最初已根據步驟2006被識別為活性之一或多個品系)，且指出變化之方向性(亦即，負值表示減少，正值表示增加)。隨時間推移之細胞數目表示為網路，其中微生物品系表示節點且數量加權規則表示邊緣。利用馬爾可夫鏈(Markov chain)及隨機遊動槓桿(walks)確定節點之間的連接性及定義叢集。在一個實施例中，使用後設資料過濾叢集以便識別與合乎需要的後設資料相關之叢集(圖2，2008)。

在另一實施例中，微生物品系係藉由整合隨時間推移之細胞數目變化及存在於目標叢集中之品系根據重要性進行排名，其中最高細胞數目變化排名最高。

在一個實施例中，網路及/或叢集分析方法用於量測網路內之一或多個品系之連接性，其中網路為共用共同或類似環境參數之兩個或更多個樣品之集合。在一個實施例中，網路分析包含連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心

性量測或其組合。在另一實施例中，網路分析包含經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、社會網路理論、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。在另一實施例中，網路分析包含相互資訊、最大資訊係數計算，或變數之間用於建立連接性之其他非參數方法。在另一實施例中，網路分析包含基於微分方程式之種群建模。在又一實施例中，網路分析包含洛特卡-沃爾泰拉建模。

叢集分析方法包含構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型。

舉例而言，進行圖2之方法步驟2008之基於網路及叢集之分析可經由處理器、組件及/或模組進行。如本文所用，組件及/或模組可為例如任何組零件、指令及/或一組可操作地耦合之電氣組件，且可包括例如記憶體、處理器、電跡線、光連接器、軟體(在硬體中執行)及/或其類似者。

圖3A為根據實施例之說明微生物分析、篩選及選擇平台及系統300之示意圖。根據本發明之平台可包括用於確定天然微生物群集內之多維種間交互作用及依賴性之系統及過程，且相對於圖3A描述實例。圖3A為架構圖，且因此省略某些態樣以提高描述之清晰度，但一般技術者在本發明之上下文中查看時應顯而易知此等態樣。

如圖3A中所示，微生物篩選及選擇平台及系統300可包括：一或多個處理器310；資料庫319；記憶體320；通信介面390；輸入/輸出介面，其經組態以與使用者輸入器件396及周邊器件397 (包括(但不限於)資料收集及分析器件，諸如FAC、選擇/培育/調配器件及/或額外資料庫/資料源；遠端資料收集器件(例如，可收集後設資料環境資料，諸如樣品特性、溫度、氣候等之器件，包括收集此類資訊之移動智慧型電話操作應用程式以及其他移動或靜止器件)交互作用；網路介面，其經組態以在通信網路392 (例如，LAN、WAN及/或網際網路)內

接收及傳輸資料至用戶端393b及使用者393a；資料收集組件330；絕對計數組件335；樣品關係組件340；活動組件345；網路分析組件350；及品系選擇/微生物系集產生組件355。在一些實施例中，微生物篩選系統300可為單一物理器件。在其他實施例中，微生物篩選系統300可包括多個物理器件(例如，藉由網路可操作地耦合)，其各自可包括圖3A中所示之一個或多個組件及/或模組。

微生物篩選系統300中之各組件或模組可操作地耦合至各其餘組件及/或模組。微生物篩選系統300中之各組件及/或模組可為能夠進行與彼組件及/或模組相關之一或多種特定機能之硬體及/或軟體(在硬體中儲存及/或執行)的任何組合。

記憶體320可為例如隨機存取記憶體(RAM) (例如，動態RAM、靜態RAM)、快閃記憶體、可移除記憶體、硬驅動機、資料庫及/或等等。在一些實施例中，記憶體320可包括例如資料庫(例如，如同319)、處理、應用、虛擬機及/或一些其他軟體組件、程式及/或模組(在硬體中儲存及/或執行)或經組態以執行微生物篩選過程之硬體組件/模組，及/或用於微生物篩選及系集產生之一或多種相關方法(例如，經由資料收集組件330、絕對計數組件335、樣品關係組件340、活動組件345、網路分析組件350、品系選擇/微生物系集產生組件355(及/或類似模組))。在該等實施例中，執行微生物篩選及/或系集產生過程及/或相關方法之指令可儲存在記憶體320內且在處理器310處執行。在一些實施例中，經由資料收集組件330收集之資料可儲存於資料庫319及/或記憶體320中。

處理器310可經組態以控制例如通信介面390之操作，將資料寫入記憶體320中及自記憶體320讀取資料及執行在記憶體320內儲存之指令。處理器310亦可經組態以執行及/或控制例如資料收集組件330、絕對計數組件335、樣品關係組件340、活動組件及網路分析組

件350之操作，如本文進一步詳細描述。在一些實施例中，在處理器310之控制下且基於記憶體320內儲存之方法或過程，資料收集組件330、絕對計數組件335、樣品關係組件340、活動組件345、網路分析組件350及品系選擇/系集產生組件355可經組態以執行微生物篩選、選擇及合成系集產生過程，如本文進一步詳細描述。

通信介面390可包括及/或經組態以管理微生物篩選系統300之一個或多個端口(例如，經由輸入輸出介面395)。在一些情況下，舉例而言，通信介面390 (例如，網路介面卡(NIC))可包括一或多個線路卡，其各自可包括(可操作地)耦合至器件(例如，周邊器件397及/或使用輸入器件396)之一或多個端口。包括於通信介面390中之端口可為可主動與耦合器件通信或在網路392內通信(例如，與終端使用者器件393b、主機器件、伺服器等通信)之任何實體。在一些實施例中，該端口不必定為硬體端口，但可為虛擬端口或由軟體界定之端口。通信網路392可為能夠傳輸資訊(例如，資料及/或信號)之任何網路或網路組合，且可包括例如電話網路、乙太網路、光纖網路、無線網路及/或蜂巢式網路。通信可在諸如Wi-Fi或無線區域網路(「WLAN」)連接、無線廣域網路(「WWAN」)連接及/或蜂巢式連接之網路內進行。網路連接可為有線連接，諸如乙太網連接、數位訂購線(「DSL」)連接、寬頻同軸連接及/或光纖連接。舉例而言，微生物篩選系統300可為經組態以使一或多個計算器件393b經由網路392訪問之主機器件。以此方式，計算器件可經由網路392向微生物篩選系統300提供資訊及/或自該系統接收資訊。此類資訊可為例如關於微生物篩選系統300用於收集、關聯、確定、分析及/或產生活性網路分析微生物之系集的資訊，如本文進一步詳細描述。類似地，計算器件可經組態以檢索及/或請求來自微生物篩選系統300之確定資訊。

在一些實施例中，通信介面390可包括及/或經組態以包括輸入/

輸出界面395。輸入/輸出界面可接受、通信及/或連接至使用者輸入器件、周邊器件、密碼編譯處理器器件及/或其類似者。在一些情況下，一個輸出裝置可為視訊顯示器，其可包括例如陰極射線管(CRT)或液晶顯示器(LCD)、LED或具有自視訊介面接受信號之介面(例如，數位視覺介面(DVI)電路及電纜)之基於電漿監測器。在該等實施例中，通信介面390可經組態以具有其他機能，接收資料及/或資訊及傳送微生物篩選修改、命令及/或指令。

資料收集組件330可為任何硬體及/或軟體組件及/或模組(儲存於記憶體(諸如記憶體320)中及/或在諸如處理器310之硬體中執行)，其經組態以收集、處理及/或校正資料用於藉由絕對計數組件335、樣品關係組件340、活動組件345、網路分析組件350及/或品系選擇/系集產生組件355進行對天然微生物群集內之多維種間交互作用及依賴性的分析。在一些實施例中，資料收集組件330可經組態以確定給定體積之樣品中一或多個活性生物品系之絕對細胞計數。基於又一個活性微生物品系之絕對細胞計數，資料收集組件330可使用標記序列識別絕對細胞計數資料集內之活性品系。資料收集組件330可連續收集資料持續一定時間段以表示樣品內之微生物種群的動力學。資料收集組件330可編譯時間資料且將各活性生物品系之細胞數目儲存於記憶體(諸如記憶體320)中之數量矩陣中。

樣品關係組件340及網路分析組件350可經組態以共同確定天然微生物群集內之多維種間交互作用及依賴性。樣品關係組件340可為任何硬體及/或軟體組件(儲存於記憶體(諸如記憶體320)中及/或在諸如處理器310之硬體中執行)，其經組態以使後設資料參數(環境參數，例如經由共現)與一或多個活性微生物品系之存在關聯。在一些實施例中，樣品關係組件340可使一或多個活性生物品系與一或多個環境參數關聯。

網路分析組件350可為任何硬體及/或軟體組件(儲存於記憶體(諸如記憶體320)中及/或在諸如處理器310之硬體中執行)，其經組態以確定樣品中之一或多個活性微生物品系與環境(後設資料)參數之共現。在一些實施例中，基於由資料收集組件330收集之資料及藉由樣品關係組件340確定之一或多個活性微生物品系與一或多個環境參數之間的關係，網路分析組件350可創建以表示環境參數及微生物品系相關性之鏈接、一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及又一個獨特第二標記之表現量填充的矩陣，表示微生物品系之異源種群之一或多個網路。舉例而言，網路分析可使用關聯(數量及/或豐度)矩陣在樣品中使用經數量資料加權之規則挖掘方法識別活性微生物品系與後設資料參數之間的相關性(例如，兩個或更多個活性微生物品系之相關性)。在一些實施例中，網路分析組件350可應用過濾器來選擇及/移除規則。網路分析組件350可計算活性品系隨時間推移之細胞數目變化，指出變化之方向性(亦即，負值表示減少，正值表示增加)。網路分析組件350可將矩陣表示為網路，其中微生物品系表示節點且數量加權規則表示邊緣。網路分析組件350可使用馬爾可夫鏈及隨機遊動槓桿確定節點之間的連接性及定義叢集。在一些實施例中，網路分析組件350可使用後設資料過濾叢集以便識別與合乎需要的後設資料相關之叢集。在一些實施例中，網路分析組件350可藉由整合隨時間推移之細胞數目變化及存在於目標叢集中之品系對目標微生物品系進行排名，其中最高細胞數目變化排名最高。

在一些實施例中，網路分析包括連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。在另一實施例中，可使用之叢集分析方法包括構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型。在另一實施例中，網路分析包括經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基

於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。在另一實施例中，網路分析包含相互資訊、最大資訊係數計算，或變數之間用於建立連接性之其他非參數方法。在另一實施例中，網路分析包括基於微分方程式之種群建模。在另一實施例中，網路分析包括洛特卡-沃爾泰拉建模。

圖3B展示根據本發明之一個實施例之例示性邏輯流程。首先，收集及/或接收複數個樣品及/或樣品集3001。應理解，如本文所用，「樣品」可指一或多個樣品、樣品集、複數個樣品(例如，來自特定種群)，使得當論述兩個或更多個不同樣品時便於理解，且各樣品可包括複數個子樣品(例如，當論述第一樣品及第二樣品時，第一樣品可包括2、3、4、5個或更多個自第一種群收集之子樣品，且第二樣品可包括2、3、4、5個或更多個自第二種群收集或者自第一種群但在不同時間點(諸如在收集第一子樣品之後一週或一個月)收集之子樣品)。當收集子樣品時，可監測及儲存各子樣品之個別收集標誌及參數，包括環境參數、定性及/或定量觀測結果、種群成員身分(例如，因此，當樣品係在兩個或更多個不同時間自相同種群收集時，子樣品藉由識別成對，因此，在時間1之來自動物1的子樣品鏈接至在時間2之自相同動物收集的子樣品等)。

對於各樣品、樣品集及/或子樣品，基於目標生物類型對細胞進行染色3002，對各樣品/子樣品或其部分進行稱重且連續稀釋3003且處理3004，確定各樣品/子樣品中各微生物類型之細胞數目。在一個例示性實施方案中，可使用細胞分類器計數來自樣品(諸如來自環境樣品)之個別細菌及真菌細胞。作為本發明之部分，開發特定染料使得能夠計數先前根據傳統方法不可計數之微生物。遵循本發明之方法，使用特定染料對細胞壁(例如，細菌及/或真菌)進行染色，且目標細胞之離散種群可基於蜂巢式特性使用雷射自較大種群計數。在一個特定實例中，製備環境樣品且在等滲緩衝溶液中稀釋並用以下染料進

行染色：(a)對於細菌，以下染料可用於染色，DNA：Sybr Green，呼吸：5-氰基-2,3-二甲苯基氯化四唑及/或CTC，細胞壁：孔雀綠及/或結晶紫；(b)對於真菌，以下染料可用於染色，細胞壁：增白劑、剛果紅、錐蟲藍、直接黃96、直接黃11、直接黑19、直接橙10、直接紅23、直接紅81、直接綠1、直接紫51、麥胚凝集素(WGA)、活性黃2、活性黃42、活性黑5、活性橙16、活性紅23、活性綠19及/或活性紫5。

在本發明之發展中，宜發現雖然直接及活性染料通常與基於纖維素之物質(亦即，棉、亞麻及黏膠人造絲)的染色相關，其亦可用於對甲殼素及聚葡萄糖胺糖進行染色，因為分別存在 β -(1 $\rightarrow$ 4)-連接之N-乙醯基葡萄糖胺鏈及 β -(1 $\rightarrow$ 4)-連接之D-葡萄糖胺及N-乙醯基-D-葡萄糖胺鏈。當此等亞單元組合成鏈時，形成極類似於纖維素鏈之平坦纖維狀結構。直接染料經由染料與纖維分子之間的凡得瓦爾力(Van der Waals force)黏附至甲殼素及/或聚葡萄糖胺糖分子。兩者之間的表面區域接觸愈多，交互作用愈強。另一方面，活性染料與甲殼素及/或聚葡萄糖胺糖形成共價鍵。

將各染色樣品裝載至FAC 3004上用於計數。樣品可經由具有特定尺寸之產生單獨液滴流(例如，大約1/10th微升(0.1 μ L))之噴嘴(例如100 μ m，視實施方案及應用而選擇)的微流晶片運行。此等變數(噴嘴尺寸、液滴形成)可針對各目標微生物類型進行優化。理想地，封裝在各液滴中的為一個單元或「事件」，且當各液滴受雷射衝擊時，激發經染色之任何東西且發射不同波長之光。FAC以光學方式偵測各發射，且可將其繪製為事件(例如，在2D圖上)。典型圖式由一個軸為事件大小(藉由「正向散射」確定)且另一軸為螢光強度組成。可在此等圖式上在離散種群周圍繪製「閘」，且可計數此等閘中之事件。

圖3C展示用直接黃染色之真菌之例示性資料，包括酵母菌單一

培養物3005a (陽性對照，左側)、大腸桿菌3005b (陰性對照，中間)及環境樣品3005c (實驗，右側)。在該圖中，「反向散射」(BSC-A)量測事件之複雜性，而FITC量測來自直接黃之螢光發射的強度。各點表示一個事件，且事件之密度由綠色至紅色之顏色變化指示。閘B指示預期發現目標事件(在此情況下為用直接黃染色之真菌)之一般區域。

返回至圖3B，以自一或多個來源收集之兩個或更多個樣品3001 (包括自以下各者收集之樣品：隨時間推移個別動物或單地理位置；地理、品種、效能、膳食、疾病等不同之兩個或更多個群組；經歷生理擾動或事件之一或多個群組；及/或其類似者)開始，樣品可經分析以使用流式細胞測量術(包括染色3002)確立絕對計數，如上文所討論。將樣品稱重且連續稀釋3003，且使用FAC處理3004。隨後處理來自FAC之輸出以確定各樣品中所需生物類型之絕對數目3005。以下編碼片段展示根據一個實施例之用於此類處理之例示性方法：

```
# User defined variables
#
# volume = volume of sample measured by FACs
# dilution = dilution factor
# beads_num = counting bead factor
# total_volume = total volume of sample (if applicable) in mL
#
# Note on total_volume: This is can be directly measured (i.e.
# rumen evacuation to measure entire volume content of the
# rumen),
# or via a stable tracer (i.e. use of an undigestible marker dosed
# in a known quantity in order to backcalculate volume of small
# intestine.)
```

```

Read FACsoutput as x
for i in range(len(x)):
    holder = x[i]
    mule=[]
    for j in range(len(holder)):
        beads = holder[-1]
        if beads == 0:
            temp = (((holder[j]/beads_num) * (51300/volume)) * 1000)
* dilution * 100 * total_volume
            mule.append(temp)
        else:
            temp = (((holder[j]/holder[-1]) * (51300/volume)) * 1000)
* dilution * 100*total_volume
            mule.append(temp)
    organism_type_1 = mule[column_location]
    call = sample_names[i]
    cell_count = [call, organism_type_1]
    savetxt(output_file,cell_count)
    output_file.close()

```

自各樣品中分離總核酸3006。將核酸樣品溶離份分成兩個部分(通常兩個相同部分)，且各部分經酶純化獲得純化DNA 3006a或純化RNA 3006b。純化RNA經由酶轉化為cDNA 3006c而穩定。使用PCR製備純化DNA及純化cDNA之定序庫(例如，ILLUMINA定序庫)以連接適當條形碼及銜接子區域，及擴增適於量測所需生物類型之標記區域3007。可評估及定量庫品質，且所有庫隨後可合併及定序。

對原始定序讀數進行品質修整及合併3008。使經處理之讀數去

複製且叢集，產生存在於複數個樣品中之所有獨物品系之清單3009。此清單可用於分類識別存在於複數個樣品中之各品系3010。可識別來源於DNA樣品之定序庫，且將來自所識別之DNA庫的定序讀數映射回至去複製品系之清單以便識別何種品系存在於各樣品中，且定量各樣品中各品系之讀數的數目3011。隨後使定量之讀數清單與目標微生物類型之絕對細胞計數整合以便確定各品系之絕對數目或細胞計數3013。以下編碼片段展示根據一個實施例之用於此類處理之例示性方法：

```
# User defined variables
#
# input = quantified count output from sequence analysis
# count = calculated absolute cell count of organism type
# taxonomy = predicted taxonomy of each strain
#
Read absolute cell count file as counts
Read taxonomy file as tax
ncols= len(counts)
num_samples = ncols/2
tax_level = []
tax_level.append(unique(taxonomy['kingdom'].values.ravel()))
tax_level.append(unique(taxonomy['phylum'].values.ravel()))
tax_level.append(unique(taxonomy['class'].values.ravel()))
tax_level.append(unique(taxonomy['order'].values.ravel()))
tax_level.append(unique(taxonomy['family'].values.ravel()))
tax_level.append(unique(taxonomy['genus'].values.ravel()))
tax_level.append(unique(taxonomy['species'].values.ravel()))
```

```
tax_counts = merge(left=counts,right=tax)

# Species level analysis

tax_counts.to_csv('species.txt')

# Only pull DNA samples

data_mule = loadcsv('species.txt', usecols=xrange(2,ncols,2))

data_mule_normalized = data_mule/sum(data_mule)

data_mule_with_counts = data_mule_normalized*counts

Repeat for every taxonomic level
```

識別來源於 cDNA 樣品之定序庫 3014。隨後將來自所識別之 cDNA 庫的定序讀數映射回至去複製品系之清單以便確定各樣品中之活性品系。若讀數之數目低於指定或指示之臨限值 3015，則品系被視為或識別為無活性的且自後續分析中移除 3015a。若讀數之數目超出臨限值 3015，則品系被視為或識別為具有活性且保留在分析中 3015b。隨後自輸出過濾無活性品系 3013，產生各樣品之活性品系及各別絕對數目/細胞計數之清單 3016。以下編碼片段展示根據一個實施例之用於此類處理之例示性方法：

```
# continued using variables from above

# Only pull RNA samples

active_data_mule = loadcsv('species.csv', usecols = xrange(3,ncols+1,2))

threshold = percentile(active_data_mule, 70)

for i in range(len(active_data_mule)):

    if data_mule_activity >= threshold

        multiplier[i] = 1

    else

        multiplier[i] = 0

active_data_mule_with_counts = multiplier * data_mule_with_counts
```

Repeat for every taxonomic level

識別、檢索及/或收集各樣品(樣品集、子樣品等)之定性及定量後設資料(例如，環境參數等) 3017且儲存3018於資料庫(例如，319)中。可識別適當後設資料，且視應用/實施方案而定，查詢資料庫以抽取各樣品之所識別及/或相關後設資料用於分析3019。隨後將後設資料之子集與活性品系及其相應絕對數目/細胞計數之清單合併，藉由樣品矩陣創建大物種及後設資料3020。

隨後計算品系與後設資料之間的最大資訊係數(MIC) 3021a及品系之間的最大資訊係數(MIC) 3021b。合併結果，創建所有關係及其相應MIC評分之清單3022。若關係評分低於給定臨限值3023，則關係被視為/識別為不相關3023b。若關係高於給定臨限值3023，則關係被視為/識別為相關3023a，且進一步進行網路分析3024。以下編碼片段展示根據一個實施例之用於此類分析之例示性方法：

```
Read total list of relationships file as links
```

```
threshold = 0.8
```

```
for i in range(len(links)):
```

```
    if links >= threshold
```

```
        multiplier[i] = 1
```

```
    else
```

```
        multiplier[i] = 0
```

```
end if
```

```
links_temp = multiplier*links
```

```
final_links = links_temp[links_temp != 0]
```

```
savetxt(output_file,final_links)
```

```
output_file.close()
```

基於網路分析之輸出選擇活性品系3025用於製備含有所選品系

之產品(例如，系集、聚集體及/或其他合成分組)。網路分析之輸出亦可用於通知品系選擇用於進一步產品組成測試。

上文論述臨限值之用途，其用於分析及測定。臨限值可視實施方案及應用而定：(1)憑經驗確定(例如，基於分佈水準，在移除指定或顯著部分之低水準讀數之數目處設置截止)；(2)任何非零值；(3)基於百分比/百分位；(4)僅標準化第二標記(亦即，活性)讀數大於標準化第一標記(細胞計數)讀數之品系；(5)活性與數量或細胞計數之間log2倍變化；(6)對於整個樣品(及/或樣品集)，標準化第二標記(活性)讀數大於平均第二標記(活性)讀數；及/或上文所描述之除統計臨限值(亦即，顯著性測試)以外的任何量值臨限值。以下實例提供根據一個實施例，基於RNA之第二標記量測相對於基於DNA之第一標記量測之分佈的臨限值細節。

收集一個雄性Cobb500之小腸內含物且根據本發明進行分析。簡言之，使用FAC確定樣品中細菌細胞之總數(例如，3004)。自固定小腸樣品中分離總核酸(例如，3006)。製備DNA (第一標記)及cDNA (第二標記)定序庫(例如，3007)，且裝載至ILLUMINA MISEQ上。對來自各庫之原始定序讀數進行品質過濾、去複製、叢集及定量(例如，3008)。使來自基於DNA之庫及基於cDNA之庫的經定量品系清單與細胞計數資料整合，確立樣品內各品系之細胞的絕對數目(例如，3013)。雖然cDNA並非必需為品係數量之直接量測(亦即，高度活性品系可具有相同RNA分子之多個複本)，在此實施例中使基於cDNA之庫與細胞計數資料整合以維持用於DNA庫之相同校正程序。

在分析之後，在基於cDNA之庫中識別702品系(46獨特)且在基於DNA之庫中識別1140品系。若使用0作為活性臨限值(亦即保持任何非零值)，則此樣品內之57%具有基於DNA之第一標記的品系亦與基於cDNA之第二標記相關。此等品系被識別為/視為微生物群集之活性部

分，且僅此等品系繼續用於後續分析。若使臨限值更嚴格且僅第二標記值超過第一標記值之品系被視為活性，則僅289品系(25%)符合臨限值。符合此臨限值之品系對應於高於圖3D中之DNA (第一標記)線之品系。

本發明包括多種方法，其識別影響彼此之複數個活性微生物品系以及一或多個參數或後設資料，及選擇所識別之微生物用於包括個別微生物物種之微生物群集之選擇子集或物種品系的微生物系集，在進行或影響共同機能中鏈接，或可描述為參與或導致或與可辨識參數(諸如相關表型特點(例如反芻乳產量增加))相關。本發明亦包括進行及/或促進該等方法之多種系統及裝置。

在一些實施例中，該方法包含：獲得共用至少一種共同特性(諸如樣品地理位置、樣品類型、樣品源、樣品源之個體、樣品目標動物、樣品時間、品種、膳食、溫度等)且具有至少一種不同特性(諸如樣品地理位置/時間位置、樣品類型、樣品源、樣品源之個體、樣品目標動物、樣品時間、品種、膳食、溫度等，不同於共同特性)之至少兩個樣品。對於各樣品，偵測一或多種微生物類型之存在；確定各樣品中一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；及量測各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，各獨特第一標記為微生物品系之標記。在此之後，整合各微生物類型之數目及第一標記之數目，產生各樣品中所存在之各微生物品系之絕對細胞計數；基於指定臨限值量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定各樣品中之彼微生物品系的活性水準；藉由所確定之活性來過濾絕對細胞計數，提供至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單；對至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之經過過濾絕對細胞計數彼此進行比較且與至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料進行比較，且基於所預測之機能及/或化學性質將活性微生

物品系分類成至少兩個群組。舉例而言，該比較可為網路分析，其識別各別微生物品系之間及各微生物品系與後設資料之間及/或後設資料與微生物品系之間的關係。至少一種微生物可選自至少兩個群組，且組合形成微生物系集，其經組態以改變對應於至少一個後設資料之性質(例如目標之性質，諸如牛或牛種群之乳產量)。形成系集可包括分離該或各微生物品系，基於分析選擇先前經分離之微生物品系，及/或基於分析使特定微生物品系培育/生長，及組合品系形成微生物系集。系集可包括允許以使得其中之微生物可影響接受者(例如，增加乳產量)之方式遞送系集中之微生物之適當介質、載劑及/或醫藥載劑。

獨特第一標記之數目的量測可包括量測各樣品中獨特基因組DNA標記之數目，量測各樣品中獨特RNA標記之數目，量測各樣品中獨特蛋白質標記之數目，及/或量測各樣品中獨特代謝物標記之數目(包括量測各樣品中獨特脂質標記之數目及/或量測各樣品中獨特碳水化合物標記之數目)。

在一些實施例中，量測獨特第一標記之數目及其數量包括對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應及/或對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。獨特第一標記可包括mRNA標記、siRNA標記及/或核糖體RNA標記中之至少一者。另外或或者，獨特第一標記可包括 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白及/或代謝酶中之至少一者。

在一些實施例中，量測至少一個獨特第二標記包括量測各樣品中至少一個獨特第二標記之表現量，且可包括對樣品中之mRNA進行基因表現分析。基因表現分析可包括定序反應、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

在一些實施例中，量測至少一個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析及/或對各樣品或其部分進行總體核糖

體剖析或核糖體剖析。一或多種微生物類型包括細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合，且一或多個微生物品系包括一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。一或多個微生物品系可為一或多個真菌物種或亞種，及/或一或多個微生物品系可為一或多個細菌物種或亞種。

在一些實施例中，確定各樣品中一或多個微生物類型各自之數目包括對各樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。

獨特第一標記可包括系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。量測獨特標記之數目及其數量可包括對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應，對基因組DNA進行基因組定序及/或對基因組DNA進行擴增子定序。

在一些實施例中，至少一種不同特性包括：對至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集時間，使得第一樣品之收集時間不同於第二樣品之收集時間；對至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集位置(地理位置差異及/或個別樣品目標/動物收集差異)，使得第一樣品之收集位置不同於第二樣品之收集位置。至少一種共同特性可包括樣品源類型，使得第一樣品之樣品源類型與第二樣品之樣品源類型相同。樣品源類型可為動物類型、器官類型、土壤類型、水類型、沈積物類型、油類型、植物類型、農產品類型、非根際土類型、根際土類型、

植物部分類型及/或其類似者中之一者。在一些實施例中，至少一種共同特性包括至少兩個樣品中之每一者為胃腸道樣品，其在一些實施方案中可為瘤胃樣品。在一些實施方案中，本文所提供之共同/不同特性實際上可為某些樣品之間的不同/共同特性。在一些實施例中，至少一種共同特性包括動物樣品源類型，各樣品具有另一共同特性，使得各樣品為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品或器官樣品。

在一些實施例中，上述方法可進一步包含基於至少一個經量測後設資料自目標獲得至少另一樣品，其中來自目標之至少另一樣品與至少兩個樣品共用至少一種共同特性。隨後，對於來自目標之至少另一樣品，偵測一或多種微生物類型之存在；確定一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；量測獨特第一標記之數目及其數量；整合各微生物類型之數目及第一標記之數目，產生所存在的各微生物品系之絕對細胞計數；量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定彼微生物品系之活性水準；藉由所確定之活性來過濾絕對細胞計數，提供來自目標之至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單。在該等實施例中，基於來自目標之至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單自至少兩個群組中選擇至少一個微生物品系，使得所形成之系集經組態以改變目標之對應於至少一個後設資料的性質。舉例而言，使用該實施方案，可自取自荷斯坦牛(Holstein cow)之樣品及取自澤西牛(Jersey cow)或水牛之目標樣品中識別微生物系集，其中分析識別原始樣品及目標樣品之相同或類似微生物品系之間的相同、實質上類似或類似網路關係。

在一些實施例中，對至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之經過過濾絕對細胞計數與至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量

測後設資料或額外活性微生物品系進行比較包括確定各樣品中之一或多個活性微生物品系與至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現。至少一個經量測後設資料可包括一或多個參數，其中一或多個參數為以下中之至少一者：樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、樣品源之體重、樣品源之餵食量、樣品源之體重增加、樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、樣品源之物理特性或量測值、樣品源之生產特性或其組合。參數亦可包括由樣品源產生之乳清蛋白豐度、酪蛋白豐度及/或乳脂豐度。

在一些實施例中，確定各樣品中一或多個活性微生物品系及至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現可包括創建以表示兩個或更多個樣品集中之後設資料及微生物品系相關性之鏈接、一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及又一個獨特第二標記之量測值填充的矩陣，表示異源微生物群集之一或多個網路。確定一或多個活性微生物品系及至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現及對活性微生物品系進行分類可包括網路分析及/或叢集分析來量測網路內各微生物品系之連接性，網路表示共用共同特性、經量測後設資料及/或相關環境參數之至少兩個樣品之集合。網路分析及/或叢集分析可包括連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。叢集分析可包括構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型及/或質心模型。在一些實施方案中，網路分析可包括經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性、其組合及/或其類似者。網路分析可包含基於微分方程式之種群建模及/或洛特卡-沃爾泰拉建模。該分析可為啟發式方法。在一些實施例中，該分析可為魯汶法。網路分析可包括用於建立變數之間的連接性之非參數方

法，及/或變數之間用於建立連接性之相互資訊及/或最大資訊係數計算。

對於一些實施例，用於形成活性微生物品系之系集的方法，該系集經組態以改變基於在兩個或更多個樣品集之間共用至少一個共同或相關環境參數且在兩個或更多個樣品集之間具有至少一個不同環境參數的兩個或更多個樣品集之環境之性質或特性，各樣品集包含包括異源微生物群集之至少一個樣品，其中一或多個微生物品系為一或多種生物類型之亞分類單元，該方法包含：偵測各樣品中複數種微生物類型之存在；確定各樣品中偵測到的微生物類型各自之細胞絕對數目；及量測各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，其中獨特第一標記為微生物品系之標記。隨後，在蛋白質或RNA含量下，量測一或多個獨特第二標記之表現量，其中獨特第二標記為微生物品系之活性的標記；基於一或多個獨特第二標記之超出指定臨限值的表現量來確定各樣品之偵測到的微生物品系之活性；基於一或多個第一標記之數量及一或多個微生物品系為亞分類單元之微生物類型之細胞的絕對數目來計算各樣品中各偵測到的活性微生物品系之絕對細胞計數，其中一或多個活性微生物品系表現高於指定臨限值之第二獨特標記。隨後基於最大資訊係數網路分析量測網路內各微生物品系之連接性來確定樣品中之活性微生物品系與至少一個環境參數之共現，其中網路為至少兩個或更多個樣品集與至少一個共同或相關環境參數之集合。基於網路分析自一或多個活性微生物品系中選擇複數個活性微生物品系，及由所選複數個活性微生物品系形成活性微生物品系之系集，當活性微生物品系之系集被引入環境中時活性微生物品系之系集經組態以選擇性改變彼環境之性質或特性。對於一些實施方案，第一樣品集之至少一個共同或相關環境因子之至少一個量測標誌不同於第二樣品集之至少一個共同或相關環境因子之量測標誌。舉例而言，若樣品/樣品集

來自牛，則第一樣品集可來自餵以草膳食之牛，而第二樣品集可來自餵以玉米膳食之牛。雖然一個樣品集可為單一樣品，其或者可為複數個樣品，且樣品集內各樣品之至少一個共同或相關環境因子之量測標誌實質上類似(例如，一個集中之樣品皆取自餵草畜群)，且一個樣品集之平均量測標誌不同於另一樣品集之平均量測標誌(第一樣品集來自餵草畜群，且第二樣品集為來自餵玉米畜群之樣品)。可能存在將在分析中考慮之額外差異及相似性，諸如不同品種、不同膳食、不同效能、不同年齡、不同餵料添加劑、不同生長階段、不同生理特性、不同健康狀況、不同海拔、不同環境溫度、不同季節、不同抗生素等。而在一些實施例中，各樣品集包含複數個樣品，且第一樣品集自第一種群收集且第二樣品集自第二種群收集，在額外或替代實施例中，各樣品集包含複數個樣品，且第一樣品集在第一時間自第一種群收集且第二樣品集在不同於第一時間之第二時間自第一種群收集。舉例而言，第一樣品集可在第一時間自牛群(在其被餵食草時)採集，且第二樣品集可在第二時間(例如，2個月後)採集，其中牛群在被採集第一樣品集之後立刻切換至玉米餵食。在該等實施例中，可收集樣品且對種群進行分析，及/或可包括對個別動物之特定提及，使得在一段時間內個別動物發生之變化可被識別，且提供更精細之資料粒度水準。

在一些實施例中，至少一個共同或相關環境因子包括營養資訊、膳食資訊、動物特性、感染資訊、健康狀況及/或其類似者。

至少一個量測標誌可包括樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、樣品源之體重、樣品源之餵食量、樣品源之體重增加、樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、樣品源之物理特性或量測值、樣品源之生產特性、由樣品源產生之乳清蛋

白的豐度、由樣品源產生之酪蛋白的豐度及/或由樣品源產生之乳脂的豐度或其組合。

視實施例而定，量測各樣品中獨特第一標記之數目可包含量測獨特基因組DNA標記之數目，量測獨特RNA標記之數目及/或量測獨特蛋白質標記之數目。複數種微生物類型可包括一或多個細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合。

在一些實施例中，確定各樣品中微生物類型中之每一者之絕對數目包括對樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。在一些實施例中，一或多個活性微生物品系為選自一或多個細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合之一或多種微生物類型之亞分類單元。在一些實施例中，一或多個活性微生物品系為一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。在一些實施例中，一或多個活性微生物品系為一或多個細菌物種或亞種。在一些實施例中，一或多個活性微生物品系為一或多個真菌物種或亞種。

在一些實施例中，至少一個獨特第一標記包含系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。

在一些實施例中，量測獨特第一標記之數目及其數量包含對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應及/或對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。在一些實施方案中，獨特第一標記可包括

mRNA標記、siRNA標記及/或核糖體RNA標記。在一些實施方案中，獨特第一標記可包括 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白、代謝酶或其組合。

在一些實施例中，量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對各樣品中之mRNA進行基因表現分析，且在一些實施方案中，基因表現分析包含定序反應。在一些實施方案中，基因表現分析包含定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

在一些實施例中，量測一或多個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析、總體核糖體剖析及/或核糖體剖析。

在一些實施例中，量測至少一或多個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行總體核糖體剖析或核糖體剖析(Ribo-Seq) (Ingolia, N.T., S. Ghaemmamghami, J.R. Newman及J.S. Weissman. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science 324:218-223 ; Ingolia, N.T. 2014. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. Nat. Rev. Genet. 15:205-213)。Ribo-seq為可用於在基因組規模下確定活體內蛋白質合成之分子技術。此方法直接量測在轉錄物結合及與mRNA交互作用時經由足紋核糖體主動轉譯之轉錄物。隨後處理結合mRNA區且進行高通量定序反應。已展示Ribo-seq與定量蛋白質組學具有強相關性(Li, G.W., D. Burkhardt, C. Gross及J.S. Weissman. 2014. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. Cell 157:624-635)。

樣品源類型可為以下中之一者：動物、土壤、空氣、鹹水、淡水、廢水、污泥、沈積物、油、植物、農產品、非根際土、根際土、植物部分、蔬菜、極端環境或其組合。在一些實施方案中，各樣品為

消化道及/或瘤胃樣品。在一些實施方案中，樣品可為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品、組織樣品及/或器官樣品。

視實施方案而定，本發明之微生物系集可包含兩個或更多個實質上純微生物或微生物品系、所需微生物/微生物品系之混合物，且亦可包括可投與目標例如用於恢復動物之微生物群的任何額外組分。根據本發明製得之微生物系集可與試劑一起投與以允許微生物在目標環境(例如，動物之胃腸道，其中系集經組態以抵抗低pH且在胃腸道環境中生長)中存活。在一些實施例中，微生物系集可包括增加一或多個所需微生物或微生物品系之數目及/或活性之一或多種試劑，系集中所包括之微生物/品系中存在或不存在該等品系。此類試劑之非限制性實例包括果寡醣(例如，果寡醣、菊糖、菊糖型果聚糖)、半乳寡醣、胺基酸、醇及其混合物(參見Ramirez-Farias等人 2008. *Br. J. Nutr.* 4:1-10；及Pool-Zobel及Sauer 2007. *J. Nutr.* 137:2580-2584及增刊，出於所有目的其各自以全文引用的方式併入本文中)。

藉由本發明之方法識別之微生物品系可在包括在系集中之前培養/生長。介質可用於該生長，且可包括適合於支持微生物生長之任何介質，作為非限制性實例，包括天然或人工的，包括胃泌素補充瓊脂、LB介質、血清及/或組織培養凝膠。應瞭解，介質可單獨或與一或多種其他介質組合使用。其亦可在有或無外源性營養素添加之情況下使用。介質可經改質或富含額外化合物或組分，例如可幫助微生物及/或其品系之特定群組之交互作用及/或選擇之組分。舉例而言，抗生素(諸如青黴素)或滅菌劑(例如，四級銨鹽及氧化劑)可能存在，及/或可修改物理條件(諸如鹽度、營養素(例如有機及無機礦物質(諸如磷、含氮鹽、氨、鉀及微量營養素(諸如鈷及鎂))、pH及/或溫度)。

如上文所討論，系統及裝置可根據本發明經組態，且在一些實施例中，可包含處理器及記憶體，記憶體儲存處理器可讀/可發行指令來進行該方法。在一個實施例中，系統及/或裝置經組態以進行該方法。亦揭示該等方法之處理器實施方案，如參考圖3A所論述。舉例而言，處理器實施之方法可包含：接收來自共用至少一種共同特性且具有至少一種不同特性之至少兩個樣品的樣品資料；對於各樣品，確定各樣品中一或多種微生物類型之存在；確定各樣品中一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之細胞數目；確定各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，各獨特第一標記為微生物品系之標記；經由一或多個處理器整合各微生物類型之數目及第一標記之數目，產生各樣品中所存在之各微生物品系之絕對細胞計數；基於各微生物品系之至少一個獨特第二標記之超出指定臨限值的量測值來確定各樣品中各微生物品系之活性水準，若一微生物品系之至少一個獨特第二標記之量測值超出相應臨限值，則品系被識別為具有活性；藉由所確定之活性來過濾各微生物品系之絕對細胞計數，提供至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單；經由一或多個處理器對至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之經過濾絕對計數與至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行分析，且基於機能、所預測之機能及/或化學性質對活性微生物品系進行分類；基於分類識別複數個活性微生物品系；及輸出所識別之複數個活性微生物品系用於組合活性微生物系集，活性微生物系集在應用於目標時經組態以改變目標之對應於至少一個經量測後設資料之性質。在一些實施例中，輸出可用於產生、合成、評估及/或測試合成及/或轉殖基因微生物及微生物品系。一些實施例可包括儲存用於進行該方法及/或促進該方法執行之指令的處理器可讀非暫時性電腦可讀媒體。在一些實施例中，根據本發明之分析及篩選方

法、裝置及系統可用於識別有問題的微生物及品系，諸如病原體，如下實例4中所論述。在該等情形下，將使用已知症狀後設資料(諸如病變評分)進行樣品之網路分析。

意欲本文所描述之系統及方法可藉由軟體(儲存於記憶體中及/或在硬體上執行)、硬體或其組合進行。硬體組件及/或模組可包括例如通用處理器、場可程式閘極陣列(FPGA)及/或特殊應用積體電路(ASIC)。軟體組件及/或模組(在硬體上執行)可以多種軟體語言(例如，電腦編碼)表現，包括Unix公用程式、C、C++、Java™、JavaScript (例如，ECMAScript 6)、Ruby、SQL、SAS®、R編程語言/軟體環境、Visual Basic™及其他面向對象的過程式或其他編程語言及開發工具。電腦編碼之實例包括(但不限於)微編碼或微指令、機器指令(諸如由編譯程式產生)、用於產生web服務之編碼及含有由使用解譯器之電腦執行之較高級別指令的檔案。電腦編碼之額外實例包括(但不限於)控制信號、加密編碼及壓縮編碼。

本文所描述之一些實施例係關於具有非暫時性電腦可讀媒體(亦可被稱作非暫時性處理器可讀媒體或記憶體)之器件，非暫時性電腦可讀媒體上具有用於進行各種電腦實施操作之指令或電腦編碼。電腦可讀媒體(或處理器可讀媒體)為非暫時性的，意為其不包括暫時性傳播信號本身(例如，攜帶關於傳輸介質(諸如空間或電纜)之資訊的傳播電磁波)。介質及電腦編碼(亦可被稱作編碼)可為經設計及構築用於特定目的之介質及電腦編碼。非暫時性電腦可讀媒體之實例包括(但不限於)：磁儲存媒體，諸如硬碟、軟碟及磁帶；光學儲存媒體，諸如緊密光碟/數位視訊盤(CD/DVD)、緊密光碟-唯讀記憶體(CD-ROM)及全像器件；磁光儲存媒體，諸如光碟；載波信號處理組件及/或模組；及專門經組態以儲存及執行程式碼之硬體器件，諸如特殊應用積體電路(ASIC)、可程式化邏輯器件(PLD)、唯讀記憶體(ROM)及隨機

存取記憶體(RAM)器件。本文所描述之其他實施例係關於電腦程式產品，其可包括例如本文所論述之指令及/或電腦編碼。

雖然上文已描述圖3A之各種實施例，應理解，該等實施例僅作為實例提出且並非為限制性的。在上文所描述之方法及步驟指示某些事件以一定順序發生之情況下，可修改某些步驟之排序。另外，某些步驟在可能時可在平行過程中同時進行，以及如上文所描述依次進行。雖然各種實施例已描述為具有特定特徵及/或組件之組合，其他實施例可能具有本文所描述之任何實施例之任何特徵及/或組件的任何組合或子組合。此外，雖然各種實施例描述為具有與特定計算器件相關聯之特定實體，在其他實施例中，不同實體可與其他及/或不同計算器件相關聯。

實驗資料及實例

進一步參考以下實驗資料及實例說明本發明之揭示內容。然而，應注意，此等實驗資料及實例(如上文所描述之實施例)為說明性的且不視為以任何方式限制本發明之範疇。

實例1

參考在圖2提供之步驟。

2000：自牛瘤胃樣品細胞切掉基質。此可藉由經由音波處理或渦旋劇烈摻合或混合樣品隨後差速離心自細胞移除基質來進行。離心可包括使用Nycodenz或Percoll之梯度離心步驟。

2001：使用靶向特定生物類型之螢光染料對生物進行染色。使用流式細胞測量術基於染色性質及尺寸區分不同種群。

2002：藉由例如流式細胞測量術確定樣品中生物之絕對數目。此步驟產生關於多少生物類型(諸如細菌、古菌、真菌、病毒或原生生物)呈給定體積之資訊。

2003：獲得牛瘤胃樣品且黏附至基質之細胞直接經由珠磨溶

解。使總核酸純化。用RNase處理總純化核酸，獲得純化基因組DNA (gDNA)。使用qPCR同時擴增本體gDNA之特定標記及使定序銜接子及條形碼與各標記連接。在指數擴增開始時停止qPCR反應以使PCR相關偏壓降至最低。合併樣品且使用Illumina Miseq對合併之樣品進行多重定序。

2004：來自牛瘤胃樣品之黏附至基質之細胞直接經由珠磨溶解。使用基於管柱之方法將總核酸純化。用DNase處理總純化核酸，獲得純化RNA。使用逆轉錄酶將總RNA轉化為cDNA。使用qPCR同時擴增本體cDNA之特定標記及使定序銜接子及條形碼與各標記連接。在指數擴增開始時停止qPCR反應以使PCR相關偏壓降至最低。合併樣品且使用Illumina Miseq對合併之樣品進行多重定序。

2005：藉由移除低品質鹼基對及截斷讀數來處理定序輸出(fastq檔案)。使用定製的UPARSE管道分析基於DNA之資料集，且使定序讀數與現有資料庫條目匹配以識別種群內之品系。添加獨特序列至資料庫中。使用定製的UPARSE管道分析基於RNA之資料集。使用更新之資料庫識別活性品系。

2006：使用在先前步驟(2005)中獲得之品系識別資料，確定代表各品系之讀數的數目且表示為總讀數之百分比。該百分比乘以細胞計數(2002)以計算樣品中且給定體積之各生物類型之絕對細胞計數。使用基於RNA之資料集中所存在之標記序列連同適當臨限值一起識別絕對細胞計數資料集內之活性品系。自分析中移除不符合臨限值之品系。

2007：重複2003至2006以建立表示多個牛瘤胃內之微生物種群之動力學的時程。編譯時間資料且將各樣品之各活性生物品系及後設資料之細胞的數目儲存於數量或豐度矩陣中。使用數量矩陣使用經數量資料加權之規則挖掘方法識別特定時間點樣品中之活性品系之間的

相關性。應用過濾器來移除不顯著規則。

2008：計算活性品系隨時間推移之細胞數目變化，指出變化之方向性(亦即，負值表示減少，正值表示增加)。將矩陣表示為網路，其中生物品系表示節點且數量加權規則表示邊緣。利用馬爾可夫鏈及隨機遊動槓桿確定節點之間的連接性及定義叢集。使用後設資料過濾叢集從而識別與合乎需要的後設資料(環境參數)相關之叢集。藉由整合隨時間推移之細胞數目變化及目標叢集中所存在之品系對目標生物品系進行排名，其中最高細胞數目變化排名最高。

實例2

實驗設計及物質及方法

目標：確定影響乳牛中乳脂生產之瘤胃微生物群集成分。

動物：八頭泌乳、瘤胃插管之荷斯坦牛以個別栓養式圈養以供實驗之用。牛每日餵食兩次，一日兩次擠奶，且連續獲得淡水。一頭牛(牛1)在實驗之前由於由流產引起之併發症而在第一次膳食乳脂抑制之後自該研究中移除。

實驗設計及處理：該實驗使用2個群組及1個實驗期之交叉設計。實驗期持續38天：共變數/清洗期為10天及資料收集及取樣為28天。資料收集期由10天膳食乳脂抑制(MFD)及18天恢復組成。在第一實驗期之後，所有牛經歷10天清洗期，隨後開始2期。

藉由低纖維(29% NDF)、高澱粉可降解性(70%可降解)及高多不飽和脂肪酸含量(PUFA, 3.7%)之全混合日糧(TMR)誘導膳食MFD。恢復期包括兩個膳食之澱粉可降解性變數。四頭牛被隨機分配以高纖維(37% NDF)、低PUFA (2.6%)及高澱粉可降解性(70%可降解)之恢復膳食。其餘四頭牛被餵以高纖維(37% NDF)、低PUFA (2.6%)但低澱粉可降解性(35%)之恢復膳食。

在10天共變數及10天清洗期期間，牛被餵以高纖維、低PUFA及

低澱粉可降解性之膳食。

樣品及量測：在整個共變數、清洗及樣品收集時期，每日量測各動物之乳產量、乾物質攝入及餵食效率。量測TMR樣品之營養組成。在收集期期間，每隔3天收集乳樣且進行分析。分析樣品之乳組分濃度(乳脂、乳蛋白、乳糖、乳脲氮、體細胞計數及固體)及脂肪酸組成。

在收集期期間，每隔3天收集瘤胃樣品且分析微生物群集組成及活性。在膳食MFD之第0天、第7天及第10天期間，在餵食之後0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20及22小時集中取樣瘤胃。類似地，在恢復期期間，在第16天及第28天在餵食之後0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20及22小時集中取樣瘤胃。分析瘤胃內含物之pH、乙酸濃度、丁酸濃度、丙酸濃度、異酸濃度及長鏈及CLA異構體濃度。

瘤胃樣品製備及定序：在收集之後，使瘤胃樣品在擺鬥式離心機中在4°C下以4,000 rpm離心20分鐘。傾析上清液，且將各瘤胃內含物樣品之等分試樣(1-2 mg)添加至以0.1 mm玻璃珠預填充之無菌1.7 mL管中。收集第二等分試樣且儲存於空的無菌1.7 mL管中用於細胞計數。

藉由珠磨使具有玻璃珠之瘤胃樣品(第一等分試樣)均質化以溶解微生物。自各樣品中提取DNA及RNA且純化，且經製備用於在Illumina Miseq上定序。使用成對端化學對樣品定序，其中300個鹼基對在庫各端上進行定序。對空管中之瘤胃樣品(第二等分試樣)進行染色且穿過流式細胞儀來定量各樣品中各微生物類型之細胞數目。

定序讀數處理及資料分析：定序讀數經品質修整及處理以基於標記基因識別瘤胃中所存在之細菌物種。使計數資料集及活動資料集與定序讀數整合來確定瘤胃微生物群集內之活性微生物物種之絕對細

胞數目。在實驗過程內使用相互資訊將牛隨時間推移之生產特性(包括所產生的乳之磅數)鏈接至各樣品內活性微生物之分佈。計算所產生的乳脂之磅數與各活性微生物之絕對細胞計數之間的最大資訊係數(MIC)。藉由MIC評分對微生物進行排名，且選擇具有最高MIC評分之微生物作為與所產生的乳之磅數最相關之目標物種。

藉由自定序分析中省略適當資料集來運行確定計數資料、活動資料及計數及活動對最終輸出之影響的測試用例。為評估使用線性相關而非MIC對目標選擇之影響，亦計算所產生的乳脂之磅數相比於所有微生物之相對豐度及活性微生物之絕對細胞計數的皮爾森係數(Pearson's coefficient)。

結果及論述

相對豐度對比絕對細胞計數

基於MIC評分識別頂級15個目標物種之包括細胞計數資料的資料集(絕對細胞計數，表2)及不包括細胞計數資料的資料集(相對豐度，表1)。在此分析中不使用活動資料以便隔離細胞計數資料對最終目標選擇之影響。最終，頂級8個目標在兩個資料集之間為相同的。在其餘7個中，5個品系以不同順序存在於兩個清單上。不管此5個品系之排名差異，各品系之經計算之MIC評分在兩個清單之間為相同的。存在於絕對細胞計數清單而非相對豐度清單上之兩個品系 *ascus_111* 及 *ascus_288* 在相對豐度清單上分別排名91及排名16。存在於相對豐度清單而非絕對細胞計數清單上之兩個品系 *ascus_102* 及 *ascus_252* 在絕對細胞計數清單上分別排名50及排名19。此4個品系在各清單上確實具有不同MIC評分，因此，解釋其在排名及對清單中其他品系之後續影響中的變化。

表1：在無活動過濾器下在使用相對豐度下之頂級15個目標品系

目標品系	MIC	最接近分類
ascus_7	0.97384	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3217), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_82	0.97173	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醣酸酵菌(0.0073)
ascus_209	0.95251	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9991), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8645)
ascus_126	0.91477	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1242), g:醣酸酵菌(0.0073)
ascus_1366	0.89713	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9445), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.0986)
ascus_1780	0.89466	d:細菌(0.9401), p:擬桿菌門(0.4304), c:擬桿菌綱(0.0551), o:擬桿菌目(0.0198), f:普雷沃氏菌科(0.0067), g:普雷沃菌屬(0.0052)
ascus_64	0.89453	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8823), o:梭菌目(0.6267), f:瘤胃球菌科(0.2792), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_299	0.88979	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9963), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.5795)
ascus_102	0.87095	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9628), c:梭菌(0.8317), o:梭菌目(0.4636), f:瘤胃球菌科(0.2367), g:醣酸酵菌(0.0283)
ascus_1801	0.87038	d:細菌(0.8663), p:擬桿菌門(0.2483), c:擬桿菌綱(0.0365), o:擬桿菌目(0.0179), f:紫單胞菌科(0.0059), g:丁酸弧菌(0.0047)
ascus_295	0.86724	d:細菌(1.0000), p:SR1(0.9990), g:SR1_genera_incertae_sedis(0.9793)
ascus_1139	0.8598	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9951), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.4747)
ascus_127	0.84082	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9992), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8035)
ascus_341	0.8348	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9992), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8035)
ascus_252	0.82891	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9986), c:梭菌(0.9022), o:梭菌目(0.7491), f:毛螺菌科(0.3642), g:Lachnospiracea_incertae_sedis(0.0859)

表2：在無活動過濾器下在使用絕對細胞計數下之頂級15個目標品系

目標品系	MIC	最接近分類
ascus_7	0.97384	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3217), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_82	0.97173	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醣酸酵菌(0.0073)
ascus_209	0.95251	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9991), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8645)
ascus_126	0.91701	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1242), g:醣酸酵菌(0.0073)
ascus_1366	0.89713	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9445), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.0986)
ascus_1780	0.89466	d:細菌(0.9401), p:擬桿菌門(0.4304), c:擬桿菌綱(0.0551), o:擬桿菌目(0.0198), f:普雷沃氏菌科(0.0067), g:普雷沃菌屬(0.0052)
ascus_64	0.89453	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8823), o:梭菌目(0.6267), f:瘤胃球菌科(0.2792), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_299	0.88979	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9963), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.5795)
ascus_1801	0.87038	d:細菌(0.8663), p:擬桿菌門(0.2483), c:擬桿菌綱(0.0365), o:擬桿菌目(0.0179), f:紫單胞菌科(0.0059), g:丁酸弧菌(0.0047)

ascus_295	0.86724	d:細菌(1.0000) , p:SR1(0.9990) , g:SR1_genera_incertae_sedis(0.9793)
ascus_1139	0.8598	d:細菌(1.0000) , p:TM7(0.9951) , g:TM7_genera_incertae_sedis(0.4747)
ascus_127	0.84082	d:細菌(1.0000) , p:TM7(0.9992) , g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8035)
ascus_341	0.8348	d:細菌(1.0000) , p:TM7(0.9992) , g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8035)
ascus_111	0.83358	d:細菌(1.0000) , p:厚壁菌門(0.7947) , c:梭菌(0.4637) , o:梭菌目(0.2335) , f:瘤胃球菌科(0.1062) , g:乳頭桿菌屬(0.0098)
ascus_288	0.82833	d:細菌(0.7925) , p:擬桿菌門(0.2030) , c:擬桿菌綱(0.0327) , o:擬桿菌目(0.0160) , f:紫單胞菌科(0.0050) , g:丁酸弧菌(0.0042)

細胞計數資料之整合未必總是影響分配給各品系之最終MIC評分。此可歸因於如下事實：雖然微生物種群每日及在38天實驗過程內在瘤胃內確實變化，其始終在 10^7 - 10^8 個細胞/毫升內。種群數量之更大的變化將無庸置疑地對最終MIC評分具有更廣泛影響。

無活性物種對比活性物種

為基於活動資料評估過濾品系之作用，自利用在有(表3)及無(表1)活動資料之情況下相對豐度之資料集以及利用在有(表4)及無(表2)活動資料之情況下絕對細胞計數之資料集中識別目標物種。

對於相對豐度之情況，ascus_126、ascus_1366、ascus_1780、ascus_299、ascus_1139、ascus_127、ascus_341及ascus_252在應用活動資料之前被視為目標品系。此八個品系(53%之最初頂級15個目標)在整合活動資料之後降低於排名15。在絕對細胞計數之情況下觀測到類似趨勢。在活動資料集整合之後，Ascus_126、ascus_1366、ascus_1780、ascus_299、ascus_1139、ascus_127及ascus_341 (46%之最初頂級15個目標)降低於排名15。

活動資料集對目標排名及選擇之影響比細胞計數資料集更嚴重。當將此等資料集整合在一起時，若發現樣品無活性，則其基本上變為「0」且不被視為分析之一部分。由於此，樣品內點之分佈可在整合之後變得嚴重改變或偏斜，繼而大大影響最終MIC評分且因此目標微生物之排名順序。

表3：在活動過濾器下在使用相對豐度下之頂級15個目標品系

目標品系	MIC	最接近分類
ascus_7	0.97384	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3217), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_82	0.93391	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醣酸酵菌(0.0073)
ascus_102	0.87095	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9628), c:梭菌(0.8317), o:梭菌目(0.4636), f:瘤胃球菌科(0.2367), g:醣酸酵菌(0.0283)
ascus_209	0.84421	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9991), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8645)
ascus_1801	0.82398	d:細菌(0.8663), p:擬桿菌門(0.2483), c:擬桿菌綱(0.0365), o:擬桿菌目(0.0179), f:紫單胞菌科(0.0059), g:丁酸弧菌(0.0047)
ascus_372	0.81735	d:細菌(1.0000), p:螺旋體屬(0.9445), c:螺旋體屬(0.8623), o:螺旋體目(0.5044), f:螺旋體科(0.3217), g:螺旋體(0.0190)
ascus_26	0.81081	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9080), c:梭菌(0.7704), o:梭菌目(0.4230), f:瘤胃球菌科(0.1942), g:Clostridium_IV(0.0144)
ascus_180	0.80702	d:細菌(1.0000), p:螺旋體屬(0.9445), c:螺旋體屬(0.8623), o:螺旋體目(0.5044), f:螺旋體科(0.3217), g:螺旋體(0.0237)
ascus_32	0.7846	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.4024), o:梭菌目(0.1956), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:氫桿菌屬(0.0144)
ascus_288	0.78229	d:細菌(0.7925), p:擬桿菌門(0.2030), c:擬桿菌綱(0.0327), o:擬桿菌目(0.0160), f:紫單胞菌科(0.0050), g:丁酸弧菌(0.0042)
ascus_64	0.77514	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8823), o:梭菌目(0.6267), f:瘤胃球菌科(0.2792), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_295	0.76639	d:細菌(1.0000), p:SR1(0.9990), g:SR1_genera_incertae_sedis(0.9793)
ascus_546	0.76114	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:Clostridiaceae_1(0.0208), g:Clostridium_sensu_stricto(0.0066)
ascus_233	0.75779	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3642), g:瘤胃球菌屬(0.0478)
ascus_651	0.74837	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.4637), o:梭菌目(0.2335), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:Clostridium_IV(0.0069)

表4：在活動過濾器下在使用絕對細胞計數下之頂級15個目標品系

目標品系	MIC	最接近分類
ascus_7	0.97384	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3217), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_82	0.93391	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醣酸酵菌(0.0073)
ascus_209	0.84421	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9991), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8645)
ascus_1801	0.82398	d:細菌(0.8663), p:擬桿菌門(0.2483), c:擬桿菌綱(0.0365), o:擬桿菌目(0.0179), f:紫單胞菌科(0.0059), g:丁酸弧菌(0.0047)
ascus_372	0.81735	d:細菌(1.0000), p:螺旋體屬(0.9445), c:螺旋體屬(0.8623), o:螺旋體目(0.5044), f:螺旋體科(0.3217), g:螺旋體(0.0190)
ascus_26	0.81081	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9080), c:梭菌(0.7704), o:梭菌目

		(0.4230), f:瘤胃球菌科(0.1942), g:Clostridium_IV(0.0144)
ascus_102	0.81048	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9628), c:梭菌(0.8317), o:梭菌目(0.4636), f:瘤胃球菌科(0.2367), g:醣酸酵菌(0.0283)
ascus_111	0.79035	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.4637), o:梭菌目(0.2335), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:乳頭桿菌屬(0.0098)
ascus_288	0.78229	d:細菌(0.7925), p:擬桿菌門(0.2030), c:擬桿菌綱(0.0327), o:擬桿菌目(0.0160), f:紫單胞菌科(0.0050), g:丁酸弧菌(0.0042)
ascus_64	0.77514	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8823), o:梭菌目(0.6267), f:瘤胃球菌科(0.2792), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_295	0.76639	d:細菌(1.0000), p:SR1(0.9990), g:SR1_genera_incertae_sedis(0.9793)
ascus_546	0.76114	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:Clostridiaceae_1(0.0208), g:Clostridium_sensu_stricto(0.0066)
ascus_32	0.75068	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.4024), o:梭菌目(0.1956), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:氫桿菌屬(0.0144)
ascus_651	0.74837	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.4637), o:梭菌目(0.2335), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:Clostridium_IV(0.0069)
ascus_233	0.74409	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3642), g:瘤胃球菌屬(0.0478)

相對豐度及無活性對比絕對細胞計數及活性

最終，此處定義之方法利用細胞計數資料及活動資料來識別與相關後設資料特性高度相關之微生物。在使用兩種方法(表4，表1)所選之頂級15個目標內，在兩個清單上僅發現7個品系。八個品系(53%)獨特於絕對細胞計數及活動清單。兩個清單上之頂級3個目標之兩個品系以及排名匹配。然而，在兩個清單上三分之二不具有相同MIC評分，表明其受活動資料集整合影響但不足以打亂其排名順序。

線性相關對比非參數方法

計算所產生的乳脂之磅數與各樣品內活性微生物之絕對細胞計數之間的皮爾森係數及MIC評分(表5)。品系係藉由MIC (表5a)或皮爾森係數(表5b)進行排名來選擇與乳脂生產最相關之目標品系。在各情況下報導MIC評分及皮爾森係數兩者。在兩個清單上發現六個品系，意謂使用MIC方法識別九個(60%)獨物品系。在清單之間品系之排名順序不匹配藉由各方法識別之頂級3個目標品系，該等目標品系亦為獨特的。

類似皮爾森係數，據報導，MIC評分在0至1範圍內，其中1表明兩個變數之間的極密切關係。此處，頂級15個目標展現在0.97至0.74範圍內之MIC評分。然而，在相關性測試之情況下皮爾森係數之範圍為0.53至0.45，實質上低於相互資訊測試之情況。此差異可歸因於各分析方法所固有的差異。而相關性為線性估計，其量測線周圍點之分散、相互資訊利用概率分佈及量測兩個分佈之間的相似性。在實驗過程內，所產生的乳脂之磅數非線性地改變(圖4)。此特定機能藉由相互資訊可比藉由相關性更好地表示及估計。為研究此，對使用相關性及相互資訊分別識別之頂級目標品系Ascus_713 (圖5)及Ascus_7 (圖6)進行繪製以確定各方法如何很好地預測品系與乳脂之間的關係。若兩個變數展現強相關性，則其在相對於彼此繪製時由幾乎無點分散之線表示。在圖5中，Ascus_713與乳脂弱相關，如廣泛點擴散所指示。同樣，相互資訊量測兩個點分佈如何類似。在乳脂之情況下繪製Ascus_7 (圖6)時，顯而易見兩個點分佈極類似。

整體本發明方法對比習知方法

分析微生物群集之習知方法依賴於相對豐度資料之使用而無活動資訊之摻入，且最終以微生物物種與後設資料之簡單相關性結束(參見例如，美國專利第9,206,680號，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。此處，吾人已展示各資料集之摻入如何逐漸影響目標之最終清單。當整體應用時，本文所描述之方法與習知方法相比選擇完全不同之目標組(表5a及5c)。對使用習知方法所選之頂級目標品系Ascus_3038相對於乳脂進行繪製以使相關性之強度可視化(圖7)。類似前述實例，Ascus_3038亦展現與乳脂之弱相關性。

表5：在使用相互資訊或相關性下之頂級15個目標品系

表5a. 在活動過濾器下在使用絕對細胞計數下之MIC

目標品系	MIC	皮爾森係數	最接近分類
ascus_7	0.97384	0.25282502	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3217), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_82	0.93391	0.42776647	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醣醱酵菌(0.0073)
ascus_209	0.84421	0.3036308	d:細菌(1.0000), p:TM7(0.9991), g:TM7_genera_incertae_sedis(0.8645)
ascus_1801	0.82398	0.5182261	d:細菌(0.8663), p:擬桿菌門(0.2483), c:擬桿菌綱(0.0365), o:擬桿菌目(0.0179), f:紫單胞菌科(0.0059), g:丁酸弧菌(0.0047)
ascus_372	0.81735	0.34172258	d:細菌(1.0000), p:螺旋體屬(0.9445), c:螺旋體屬(0.8623), o:螺旋體目(0.5044), f:螺旋體科(0.3217), g:螺旋體(0.0190)
ascus_26	0.81081	0.5300298	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9080), c:梭菌(0.7704), o:梭菌目(0.4230), f:瘤胃球菌科(0.1942), g:Clostridium_IV(0.0144)
ascus_102	0.81048	0.35456932	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9628), c:梭菌(0.8317), o:梭菌目(0.4636), f:瘤胃球菌科(0.2367), g:醣醱酵菌(0.0283)
ascus_111	0.79035	0.45881805	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.4637), o:梭菌目(0.2335), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:乳頭桿菌屬(0.0098)
ascus_288	0.78229	0.46522045	d:細菌(0.7925), p:擬桿菌門(0.2030), c:擬桿菌綱(0.0327), o:擬桿菌目(0.0160), f:紫單胞菌科(0.0050), g:丁酸弧菌(0.0042)
ascus_64	0.77514	0.45417055	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8823), o:梭菌目(0.6267), f:瘤胃球菌科(0.2792), g:瘤胃球菌屬(0.0605)
ascus_295	0.76639	0.24972263	d:細菌(1.0000), p:SR1(0.9990), g:SR1_genera_incertae_sedis(0.9793)
ascus_546	0.76114	0.23819838	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:Clostridiaceae_1(0.0208), g:Clostridium_sensu_stricto(0.0066)
ascus_32	0.75068	0.5179697	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.4024), o:梭菌目(0.1956), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:氫桿菌屬(0.0144)
ascus_651	0.74837	0.27656645	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.4637), o:梭菌目(0.2335), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:Clostridium_IV(0.0069)
ascus_233	0.74409	0.36095098	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3642), g:瘤胃球菌屬(0.0478)

表5b. 在活動過濾器下在使用絕對細胞計數下之相關性

目標品系	MIC	皮爾森係數	最接近分類
ascus_713	0.71066	0.5305876	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醱酵菌(0.0073)
ascus_26	0.81081	0.5300298	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9080), c:梭菌(0.7704), o:梭菌目(0.4230), f:瘤胃球菌科(0.1942), g:Clostridium_IV(0.0144)
ascus_1801	0.82398	0.5182261	d:細菌(0.8663), p:擬桿菌門(0.2483), c:擬桿菌綱(0.0365), o:擬桿菌目(0.0179), f:紫單胞菌科(0.0059), g:丁酸弧菌(0.0047)
ascus_32	0.75068	0.5179697	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.4024), o:梭菌目(0.1956), f:瘤胃球菌科(0.0883), g:氫桿菌屬(0.0144)
ascus_119	0.6974	0.4968678	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:瘤胃球菌科(0.3217), g:瘤胃球菌屬(0.0478)
ascus_13899	0.64556	0.48739454	d:細菌(1.0000), p:放線菌門(0.1810), c:放線菌門(0.0365), o:放線菌目(0.0179), f:丙酸桿菌科(0.0075), g:小月菌屬(0.0058)
ascus_906	0.49256	0.48418677	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1242), g:乳頭桿菌屬(0.0098)
ascus_221	0.44006	0.47305903	d:細菌(1.0000), p:擬桿菌門(0.9991), c:擬桿菌綱(0.9088), o:擬桿菌目(0.7898), f:普雷沃氏菌科(0.3217), g:普雷沃菌屬(0.0986)
ascus_1039	0.65629	0.46932846	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:瘤胃球菌科(0.0329), g:Clostridium_IV(0.0069)
ascus_288	0.78229	0.46522045	d:細菌(0.7925), p:擬桿菌門(0.2030), c:擬桿菌綱(0.0327), o:擬桿菌目(0.0160), f:紫單胞菌科(0.0050), g:丁酸弧菌(0.0042)
ascus_589	0.40868	0.4651165	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9981), c:梭菌(0.9088), o:梭菌目(0.7898), f:毛螺菌科(0.5986), g:Clostridium_XIVa(0.3698)
ascus_41	0.67227	0.46499047	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.3426), o:梭菌目(0.1618), f:瘤胃球菌科(0.0703), g:氫桿菌屬(0.0098)
ascus_111	0.79035	0.45881805	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.4637), o:梭菌目(0.2335), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:乳頭桿菌屬(0.0098)
ascus_205	0.72441	0.45684373	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.3426), o:梭菌目(0.1618), f:Peptococcaceae_2(0.0449), g:醱酵菌屬(0.0069)
ascus_64	0.77514	0.45417055	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9922), c:梭菌(0.8823), o:梭菌目(0.6267), f:瘤胃球菌科(0.2792), g:瘤胃球菌屬(0.0605)

表5c. 在無活動過濾器下在使用相對豐度下之相關性

目標品系	MIC	皮爾森係數	最接近分類
ascus_3038	0.56239	0.6007549	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9945), c:梭菌(0.8623), o:梭菌目(0.5044), f:毛螺菌科(0.2367), g:Clostridium_XIVa(0.0350)
ascus_1555	0.66965	0.59716415	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7947), c:梭菌(0.3426), o:梭菌目(0.1618), f:瘤胃球菌科(0.0449), g:Clostridium_IV(0.0073)
ascus_1039	0.68563	0.59292555	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:瘤胃球菌科(0.0329), g:Clostridium_IV(0.0069)
ascus_1424	0.55509	0.57589555	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8897), c:梭菌(0.7091), o:梭菌目(0.3851), f:瘤胃球菌科(0.1422), g:乳頭桿菌屬(0.0144)
ascus_378	0.77519	0.5671971	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.8349), c:梭菌(0.5251), o:梭菌目(0.2714), f:瘤胃球菌科(0.1062), g:醣醯酵菌(0.0073)
ascus_407	0.69783	0.56279755	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.7036), c:梭菌(0.3426), o:梭菌目(0.1618), f:Clostridiaceae_1(0.0329), g:Clostridium_sensu_stricto(0.0069)
ascus_1584	0.5193	0.5619939	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9945), c:梭菌(0.8756), o:梭菌目(0.5860), f:毛螺菌科(0.3217), g:糞球菌屬(0.0605)
ascus_760	0.61363	0.55807924	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:Clostridiaceae_1(0.0208), g:Clostridium_sensu_stricto(0.0066)
ascus_1184	0.70593	0.5578006	d:細菌(1.0000), p:「擬桿菌門」(0.9992), c:「擬桿菌綱」(0.8690), o:「擬桿菌目」(0.5452), f:擬桿菌科(0.1062), g:擬桿菌(0.0237)
ascus_7394	0.6269	0.5557023	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9939), c:梭菌(0.7704), o:梭菌目(0.4230), f:毛螺菌科(0.1422), g:Clostridium_XIVa(0.0350)
ascus_1360	0.57343	0.5535785	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.9992), c:梭菌(0.9351), o:梭菌目(0.8605), f:毛螺菌科(0.7052), g:Clostridium_XIVa(0.2649)
ascus_3175	0.53565	0.54864305	d:細菌(1.0000), p:「擬桿菌門」(0.9991), c:「擬桿菌綱」(0.8955), o:「擬桿菌目」(0.7083), f:「普雷沃氏菌科」(0.1942), g:普雷沃菌屬(0.0605)
ascus_2581	0.68361	0.5454486	d:細菌(1.0000), p:「螺旋體門」(0.9445), c:螺旋體屬(0.8623), o:螺旋體目(0.5044), f:螺旋體科(0.3217), g:螺旋體(0.0237)
ascus_531	0.71315	0.5400517	d:細菌(1.0000), p:厚壁菌門(0.6126), c:梭菌(0.2851), o:梭菌目(0.1324), f:Clostridiaceae_1(0.0208), g:Clostridium_sensu_stricto(0.0066)
ascus_1858	0.65165	0.5393882	d:細菌(1.0000), p:「螺旋體門」(0.9263), c:螺旋體屬(0.8317), o:螺旋體目(0.4636), f:螺旋體科(0.2792), g:螺旋體(0.0237)

實例3

增加牛之總乳脂、乳蛋白及能量校正乳(ECM)

實例3展示旨在增加由泌乳反芻產生之乳脂及乳蛋白的總量及經計算之ECM之特定實施方案。如本文所用，ECM表示乳中以乳體積、乳脂及乳蛋白計之能量的量。ECM將乳組分調節至3.5%脂肪及3.2%蛋白質，因此均衡動物效能且允許比較隨時間推移在個別動物及畜群位準下之生產。用於計算ECM之如與本發明有關之方程式為：

$$\text{ECM} = (0.327 \times \text{乳磅數}) + (12.95 \times \text{脂肪磅數}) + (7.2 \times \text{蛋白質磅數})$$

應用本文所提出之方法，使用所揭示之方法識別活性相關微生物/微生物系及自其中產生微生物系集，說明由泌乳反芻產生之乳脂及乳蛋白的總量增加。此等增加不需要進一步添加激素即可實現。

在此實例中，在五週時段內向處於中期泌乳之荷斯坦牛投與根據上述揭示內容所識別及產生之包含兩個分離微生物 Ascusb_X 及 Ascusf_Y 的微生物系集。將牛隨機分配成2個群組(8頭)，其中一個群組為接受缺乏微生物系集之緩衝液的對照組。第二群組(實驗組)每天一次投與包含 Ascusb_X 及 Ascusf_Y 之微生物系集持續五週。每一頭牛被圈養在個別圍欄中且給定自由獲得飼料及水。膳食為高乳產量膳食。對牛隨意餵食，且在當天結束時稱重飼料，且稱重並丟棄前一天的拒食。用來自 Salter Brecknell (Fairmont, MN) 之 PS-2000 量表進行稱重。

對牛進行插管，使得套管延伸至牛之瘤胃中。進一步對牛提供至少10天恢復後套管插入術，隨後投與對照劑量或實驗劑量。

向對照組投與包括20 ml中性緩衝鹹水，而向實驗組投與包括懸浮於20 mL中性緩衝鹹水中之大約 10^9 個細胞。對照組每天一次接受20 ml鹹水，而實驗組接受進一步包含所描述之微生物系集之 10^9 個微生物細胞的20 ml鹹水。

在第0天、第7天、第14天、第21天及第35天取樣每頭牛之瘤

胃，其中第0天為微生物投與之前一天。應注意，實驗及對照投與係在彼天取樣瘤胃之後進行。在第0天開始，每日取樣瘤胃，將來自 Hanna Instruments (Woonsocket, RI)之pH測定計插入所收集之瘤胃流體中用於記錄。瘤胃取樣包括經由套管自瘤胃之中心、背側、腹側、前側及後側區域進行微粒及流體取樣，且將所有五個樣品合併至含有 1.5 ml停止溶液(95%乙醇，5%酚)之15 ml錐形瓶中。亦在各取樣天收集糞便樣品，其中藉由使用觸診套管自直腸收集糞便。在每次取樣時稱重牛。

將糞便樣品置於2盎司小瓶中，儲存冷凍且分析以確定表觀中性洗滌纖維(NDF)消化率、表觀澱粉消化率及表觀蛋白質消化率。瘤胃取樣由取樣瘤胃之流體及微粒部分組成，其中每一者儲存於15 ml錐形管中。細胞用10%停止溶液(5%苯酚/95%乙醇混合物)固定且保持在4°C下，且用冰運送至 Ascus Biosciences (San Diego, California)。

每天兩次量測乳產量，一次在早晨且一次在夜晚。每天兩次量測乳組成(脂肪%及蛋白質%等)，一次在早晨且一次在夜晚。進一步藉由近紅外光譜學分析乳樣品之蛋白質脂肪、固體，分析乳脲氮(MUN)及在圖萊里(Tulare)奶牛群改良協會(DHIA) (Tulare, California)下之體細胞計數(SCC)。每天一次確定個別牛之餵食量及瘤胃pH。

在適應期之最後一天收集全混合日糧(TMR)之樣品，且隨後連續每週一次收集。藉由四分法進行取樣，其中樣品儲存於真空密封袋中，將真空密封袋運送至 Cumberland Valley Analytical Services (Hagerstown, MD)且用NIR1套裝分析。投與緩衝液及/或微生物之生物系集之最後一天為第35天，然而所有其他量測及取樣如所描述繼續直至第46天。

圖8A展現基於所揭示之方法接受微生物系集之牛展現平均乳脂產量對比投與單獨緩衝溶液之牛增加了20.9%。圖8B展現投與微生物

系集之牛展現平均乳蛋白產量對比投與單獨緩衝溶液之牛增加了20.7%。圖8C展現投與微生物系集之牛展現平均能量校正乳之產量增加了19.4%。圖8A-C中可見之增加在停止投與系集之後變得較不顯著，如由與資料點相交之垂直線描繪。

實例4

對於肉雞中之病變形成，偵測產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringen*)為病原體

用不同量之產氣莢膜梭菌刺激160個雄性Cobb 500 (表6a)。其被飼養21天，處死且進行病變評分以定量壞死性腸炎之進展及產氣莢膜梭菌之作用。

表6a

處理	NE刺激 (Y/N)	處理描述	鳥類/圍欄之數目	圍欄之數目	鳥類/處理之數目
1	N	未刺激	20	2	40
2	Y	用一半典型劑量(1.25 ml/鳥類； $2.0-9.0 \times 10^8$ cfu/ml)刺激	20	2	40
3	Y	用典型劑量(2.5 ml/鳥類； $2.0-9.0 \times 10^8$ cfu/ml)刺激	20	2	40
4	Y	用兩倍典型劑量(5.0 ml/鳥類； $2.0-9.0 \times 10^8$ cfu/ml)刺激	20	2	40
總計				8	160

實驗設計

在提供地面空間及[約0.69 ft²/鳥類]鳥類密度、溫度、照明、餵料器及水之木地板圍欄(餵料器空間為約4' × 4'減2.25 sq. ft)中之環境受控設施內圈養鳥類。將鳥類置於含有適當深度之木屑的乾淨圍欄中以為雞提供舒適環境。在研究期間若圍欄對於測試鳥類之舒適條件變得過於潮濕，則添加額外刨屑至圍欄中。經由白熾燈照明且如下使用商業照明程式。

表6b

近似鳥類年齡(天數)	每24小時時段近似的連續光照小時數	近似光強度(燭光)
0 - 4	24	1.0 - 1.3
5 - 10	10	1.0 - 1.3
11 - 18	12	0.2 - 0.3
19 - 結束	16	0.2 - 0.3

鳥類之環境條件(亦即鳥類密度、溫度、照明、餵料器及水空間)對於所有治療組為類似的。為防止在圍欄之間鳥類遷移及細菌擴散，各圍欄具有在圍欄之間高度為大約24吋之固體(塑膠)間隔物。

疫苗接種及治療藥物：

鳥類在孵化時接種馬立克(Marek)。在接受之後(研究第0天)，鳥類藉由噴霧應用接種新城與感染性支氣管炎。藉由最終報導提供疫苗製造商、批號及有效期之文件。

水：

在整個研究中經由每一圍欄一個普拉松(Plasson)飲水器隨意提供水。每日兩次檢查飲水器且按需要清潔以確保向鳥類供應乾淨且恆定的水。

餵食：

在整個研究中經由每一圍欄一個懸掛之約17吋直徑管餵料器隨意提供餵料。將雞餵料盤置於各圍欄中持續大約前4天。根據實驗設計在接受之後(第0天)將鳥類置於其各別治療膳食上。稱重且記錄自第0天至研究結束自圍欄所添加及移除之餵料。

每日觀測結果：

至少每日兩次觀測測試設施、圍欄及鳥類之一般畜群條件、照明、水、餵料、通風及意外事件。在每日兩次觀測結果中之任一者下注意到異常條件或異常行為時記錄其且文件包括研究記錄。每日一次記錄測試設施之最低-最高溫度。

圍欄卡：

各圍欄附有2張卡。一張卡識別圍欄編號且第二張表示治療數目。

動物處理：

動物保持在可居住性理想條件下。以此方式處理動物以便減少損傷及不必要的壓力。嚴格執行人道措施。

獸醫護理、干預及安樂死：

發展與測試程序無關之臨床上顯著併發疾病之鳥類由研究調查員或指定人員酌情處理，自研究中移除且根據站點SOP使安樂死。另外，在站點獸醫或合格技術員授權之後亦使瀕死或受傷之鳥類安樂死。記錄任何停藥之原因。在動物死亡或出於人道原因移除及安樂死時，其被記錄在圍欄之死亡表上，且進行屍體解剖並向文件中存檔移除原因。

若研究調查員認為需要進行安樂死，則藉由頸椎脫位術使動物安樂死。

死亡及剔除：

在研究第0天開始，對被發現死亡或移除且處死之任何鳥類進行稱重及屍體解剖。將無法得到餵料或水之剔除鳥類處死，稱重且記錄。在圍欄死亡記錄上記錄體重及可能的死亡原因及屍體解剖結果。

體重及餵食量：

在大約第14天及第21天，按圍欄及單獨地對鳥類稱重。在研究第14天及第21天，對各圍欄中剩餘的餵料稱重且記錄。計算在第14天至第21天期間之餵食量。

體重增加及餵料轉化：

概述在各稱重日基於圍欄及個體之平均鳥類體重。在研究第21天(亦即第0天至第21天)使用圍欄中之總耗料量除以存活鳥類之總重

量來計算平均飼料轉化。使用圍欄中之總耗料量除以存活鳥類之總重量及死亡或自彼圍欄中移除之鳥類的體重來計算調整後的飼料轉化。

產氣莢膜梭菌刺激

投與方法：

經由飼料投與此研究中之產氣莢膜梭菌(CL-15，A型， α 及 β 2毒素)培養物。使用來自各圍欄之飼料器的飼料與培養物混合。在圍欄中置放培養物之前，自鳥類移出治療飼料持續大約4-8小時。對於各圍欄之鳥類，使基於研究設計之固定量之濃度為大約 $2.0-9.0 \times 10^8$ cfu/ml之液體培養物與固定量之飼料(約25 g/鳥類)在飼料盤中混合，且以相同方式處理所有經刺激之圍欄。大多數培養物-飼料在1-2小時內被消耗。因此，在所有處理中類似地處理鳥類，未經刺激之群組在與經刺激群組相同的時間段期間亦移出飼料。

梭菌屬刺激：

使產氣莢膜梭菌培養物(CL-15)在含有澱粉之流體硫乙醇酸鹽培養基中在約37°C下生長約5小時。CL-15為在科羅拉多州爆發的肉雞之產氣莢膜梭菌之野生品系。每天製備且使用新鮮液體培養物。對於各圍欄之鳥類，使固定量之隔夜液體培養物與固定量之治療飼料在飼料盤中混合(參見投與)。在最終報導中記錄飼料之量、培養物接種物之體積及定量及給予天數，且以相同方式處理所有圍欄。鳥類接受產氣莢膜梭菌培養物一天(研究第17天)。

收集之資料：

- 用於藉由根據本發明之Ascus平台方法進行分析之腸道內含物。
- 在大約第14天及第21天，按圍欄及單獨地及按圍欄之飼料效率之鳥類體重。
- 自第0天至研究結束自各圍欄所添加及移除之飼料量。

- 死亡：第0天至研究結束，性別、體重及可能的死亡原因。
- 移除之鳥類：第0天至研究結束，剔除原因、性別及體重。
- 設施及鳥類、每日設施溫度之每日觀測結果。
- 在大約第21天，5隻鳥類/圍欄之病變評分

病變評分：

在最後一次產氣莢膜梭菌培養物投與之後四天，藉由第一次鳥類捕獲自各圍欄隨機選擇五隻鳥類，處死且進行壞死性腸炎之腸道病變評分。病變評分如下：

- 0 =正常：無NE病變，小腸具有正常彈性(在打開之後回退至正常位置)
- 1 =輕度：小腸壁薄而鬆軟(在打開時保持平坦且在打開之後不回退至正常位置)；過量黏液覆蓋黏液膜
- 2 =中度：腸道壁明顯變紅且腫脹；腸道膜輕微潰瘍及壞死；過量黏液
- 3 =嚴重：小腸膜之大面積壞死及潰瘍；顯著出血；黏液膜上之纖維蛋白層及壞死碎屑(土耳其浴巾(Turkish towel)外觀)
- 4 =死亡或瀕死：將有可能在24小時內死亡且NE病變評分為2或大於2之鳥類

結果

使用上文所揭示之方法(例如，如參考圖1A、1B及2以及在說明書通篇中所論述)以及習知相關性方法(如上文所論述)分析結果。確定各鳥類之小腸內含物之品系水準之微生物豐度及活性，且相對於圍欄之兩種不同鳥類特性：個別病變評分及平均病變評分來分析此等概況。

在個別病變評分分析中使用37隻鳥類，雖然對40隻鳥類進行評分，僅37隻具有用於分析之足夠腸道物質。本發明之Ascus方法及習

知方法均使用相同定序讀數及相同定序分析管道。然而，Ascus方法亦整合活動資訊以及各樣品之細胞計數資訊，如先前詳述。

使用Ascus相互資訊方法對37隻肉雞之活性品系之豐度與個別病變評分之間的關係進行評分。對於習知方法，計算37隻肉雞之品系與個別病變評分之間的皮爾森相關性。經由相對於自樣品集合中識別之生物的清單之全域對準搜索來確認致病品系產氣莢膜梭菌。隨後基於各分析方法之輸出來識別此特定品系之排名。Ascus方法將在實驗中投與之產氣莢膜梭菌識別為與個別病變評分有關之排名第一品系。習知方法將此品系識別為與個別病變評分有關之第26最高品系。

在平均病變評分分析中使用102隻鳥類。如同前述情況，Ascus方法及習知方法均使用相同定序讀數及相同定序分析管道。同樣，Ascus方法亦整合活動資訊以及各樣品之細胞計數資訊。

使用Ascus相互資訊方法對各圍欄之活性品系之豐度與平均病變評分之間的關係進行評分。對於習知方法，計算各圍欄之品系與個別病變評分之間的皮爾森相關性。經由相對於自樣品集合中識別之生物的清單之全域對準搜索來確認致病品系產氣莢膜梭菌。隨後基於各分析方法之輸出來識別此特定品系之排名。Ascus方法將在實驗中投與之產氣莢膜梭菌識別為與圍欄之平均病變評分有關之第4最高品系。習知方法將產氣莢膜梭菌識別為與圍欄之平均病變評分有關之第15最高品系。由於被大量/平均量測遮蔽之產氣莢膜梭菌感染的水準可變，圍欄之平均病變評分相比於個別病變評分為較不精確量測值。預期在比較個別病變評分分析與平均圍欄病變評分分析時排名下降。以下提供所收集之後設資料

表7

雞編號	處理組	平均病變評分	個別病變評分
2112	2	1.4	
2113	2	1.4	1
2115	2	1.4	
2116	2	1.4	
2117	2	1.4	2
2118	2	1.4	1
2119	2	1.4	
2120	2	1.4	
2124	2	1.4	
2125	2	1.4	
2126	2	1.4	
2127	2	1.4	1
2129	2	1.4	
2130	2	1.4	
2131	2	1.4	
6917	4	2.2	
6919	4	2.2	2
6920	4	2.2	2
6922	4	2.2	
6923	4	2.2	
6924	4	2.2	
6925	4	2.2	
6927	4	2.2	
6928	4	2.2	1
6929	4	2.2	
6930	4	2.2	
6931	4	2.2	
6932	4	2.2	3
6934	4	2.2	3
6935	4	2.2	
2134	3	1.4	1
2135	3	1.4	
2136	3	1.4	1
2137	3	1.4	
2139	3	1.4	1
2140	3	1.4	
2142	3	1.4	3
2144	3	1.4	
2145	3	1.4	1
2149	3	1.4	
6937	1	0.6	
6938	1	0.6	
6939	1	0.6	0
6940	1	0.6	0
6941	1	0.6	1
6942	1	0.6	
6943	1	0.6	1
6944	1	0.6	
6950	1	0.6	
6951	1	0.6	
6952	1	0.6	
6953	1	0.6	
6954	1	0.6	1
6955	1	0.6	
2152	2	2.4	
2153	2	2.4	

雞編號	處理組	平均病變評分	個別病變評分
2154	2	2.4	1
2156	2	2.4	1
2157	2	2.4	
2158	2	2.4	
2160	2	2.4	
2162	2	2.4	2
2165	2	2.4	
2167	2	2.4	4
2168	2	2.4	
2170	2	2.4	
2171	2	2.4	4
6956	4	2.2	1
6959	4	2.2	2
6960	4	2.2	3
6962	4	2.2	
6963	4	2.2	
6965	4	2.2	
6966	4	2.2	2
6970	4	2.2	
6971	4	2.2	
6972	4	2.2	
6973	4	2.2	
6974	4	2.2	
6975	4	2.2	3
2172	1	0	
2174	1	0	
2175	1	0	
2176	1	0	0
2177	1	0	0
2178	1	0	
2180	1	0	
2181	1	0	0
2183	1	0	
2185	1	0	
2186	1	0	0
6976	3	2.2	
6977	3	2.2	1
6978	3	2.2	1
6983	3	2.2	
6984	3	2.2	
6986	3	2.2	
6987	3	2.2	
6989	3	2.2	4
6990	3	2.2	
6992	3	2.2	
6994	3	2.2	4

實例5

使用基於相互資訊之方法相比於基於相關性之方法偵測複雜微生物群集中之關係的能力

經由套管在乳脂抑制發作期間自三頭中期泌乳荷斯坦牛收集一系列瘤胃樣品。在第0天、第7天、第10天、第16天及第28天在4AM收集瘤胃樣品。由自瘤胃內含物純化之DNA製備定序庫且進行定序。

使用原始定序讀數識別樣品集合中所存在之所有微生物品系，在樣品集合中識別4,729個獨物品系。隨後計算各微生物品系之相對豐度且用於後續分析。

表 8a

		產生之乳脂(lbs)	模擬品系值
牛1	第0天	2.99325	1.99325
	第7天	2.244	1.244
	第10天	2.29296	1.29296
	第16天	1.01232	0.01232
	第28天	2.6904	1.6904
牛2	第0天	2.77356	1.77356
	第7天	2.261	1.261
	第10天	2.2638	1.2638
	第16天	1.416	0.416
	第28天	2.2977	1.2977
牛3	第0天	2.92784	1.92784
	第7天	1.75294	0.75294
	第10天	1.79118	0.79118
	第16天	2.1299	1.1299
	第28天	2.8073	1.8073

表8a中給出各動物在各時間點產生之乳脂之經量測磅數。創造模擬品系，藉由取得乳脂值且減去1用於此分析來確保模擬品系及乳脂值隨時間推移之趨勢共同一致，亦即，模擬品系與乳脂值之間存在已知之線性趨勢/關係。隨後將此模擬品系添加至先前在群集中識別之所有品系之矩陣中。同時計算所產生的乳脂之磅數與不同條件(下文描述)下矩陣內之所有品系之間的MIC值及皮爾森係數來確立此等量

之一些實施例來處理資料集中之此類「間隙」且因此靶向特別相關之微生物及品系。

實例6

選擇活性微生物品系之系集來提高肉雞之餵食效率

96隻雄性Cobb 500飼養21天。確定個別鳥類之體重及餵食量，且在處死之後收集盲腸刮片。使用本發明之方法處理盲腸樣品以識別在向處於生產環境中之肉雞投與時將增強餵食效率之微生物的系集。

實驗設計

基於膳食治療將120隻Cobb 500雞劃分且置於圍欄中。自0至14D藉由處理將鳥類置於地面圍欄中。測試設施各自分為2個圍欄1個區塊及2個個別籠子48個區塊。使用完整隨機分組區塊設計將處理分配至圍欄/籠子；在整個研究中圍欄/籠子保留其處理。處理藉由數字編碼識別。鳥類被隨機分配至籠子/圍欄。特定治療組如下表9。

表9

處理	處理描述	品系	鳥類/地面圍欄之數目	地面圍欄/Trt之數目	鳥類/籠子之數目	籠子/Trt之數目	鳥類/處理之數目
1	0.042%鹽黴素	Cobb 500	60	1	1	48	48 (D14) 60 (D0)
2	無鹽黴素	Cobb 500	60	1	1	48	48 (D14) 60 (D0)

圈養：

使用電腦程式進行對籠子/圍欄之處理的分配。電腦產生之分配如下：

鳥類被圈養在由固體塑膠(4'高)與乾淨墊料構築之大的混凝土地面圍欄(4' × 8')中之環境受控設施中。在第14天，將96隻鳥類移至相同環境受控設施內之籠子中。各籠子為24"×18"×24"。

經由白熾燈照明且使用商業照明程式。每24小時時段之連續光照小時數如下表10。

表10

近似鳥類年齡(天數)	每24小時時段近似的 連續光照小時數	近似光強度(燭光)
0-6	23	1.0 - 1.3
7-21	16	0.2 - 0.3

鳥類之環境條件(亦即0.53 ft²)、溫度、照明、餵料器及水空間)對於所有治療組為類似的。

為防止鳥類遷移，檢查各圍欄以確保圍欄之間高度為大約14吋不存在大於1吋之開口。

疫苗接種：

鳥類在孵化時接種馬立克。在接受之後(研究第0天)，鳥類藉由噴霧應用接種新城與感染性支氣管炎。藉由最終報導提供疫苗製造商、批號及有效期之文件。

水：

在整個研究中隨意提供水。地面圍欄水係經由自動鐘狀飲水器。層架式籠子水係經由一個接頭飲水器。每日兩次檢查飲水器且按需要清潔以確保一直向鳥類供應乾淨水。

餵食：

在整個研究中隨意提供餵料。地面圍欄餵料係經由懸掛之約17吋直徑管餵料器。層架式籠子餵料係經由一個9"×4"餵料槽。將雞餵料盤置於各地面圍欄中持續大約前4天。

每日觀測結果：

至少每日兩次觀測測試設施、圍欄及鳥類之一般畜群條件、照明、水、餵料、通風及意外事件。每日一次記錄測試設施之最低-最高溫度。

死亡及剔除：

在研究第0天開始，對被發現死亡或移除且處死之任何鳥類進行

屍體解剖。將無法得到飼料或水之剔除鳥類處死且屍體解剖。在圍欄死亡記錄上記錄可能的死亡原因及屍體解剖結果。

體重及餵食量：

每天單獨地稱重約96隻鳥類。自第14天至第21天每日稱重且記錄各籠子中之剩餘飼料。每天確定各籠子之餵食量。

體重增加及飼料轉化：

自第14天至第21天確定基於籠子之體重增加及基於治療之平均體重增加。每天且總體而言14-21D時段，使用籠子之總耗料量除以鳥類體重來計算飼料轉化。藉由對治療內各籠子之個別飼料轉化取平均值來確定14-21天時段之平均治療飼料轉化。

獸醫護理、干預及安樂死：

發展顯著併發疾病之動物受傷，且自該研究中移除其可能影響研究結果之條件且在作出決定時使安樂死。在刺激之後六天，移出籠子中之所有鳥類且進行病變評分。

收集之資料：

自第14天至第21天，每天單獨地鳥類體重及飼料轉化。

自第0天至研究結束，自地面圍欄及籠子所添加及移除之飼料量。

死亡：第0天至研究結束，可能的死亡原因。

移除之鳥類：第0天至研究結束，剔除原因。

設施及鳥類、每日設施溫度之每日觀測結果。

在第21天，各鳥類之盲腸內含物。

結果

使用上文所揭示之方法(例如，如參考圖1A、1B及2以及在說明書通篇中所論述)分析結果。確定各鳥類之盲腸內含物之品系水準之微生物豐度及活性。在所有96隻肉雞盲腸樣品中偵測到總計22,461個

獨物品系。藉由活性臨限值過濾各品系之絕對細胞計數來創建活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單。平均而言，在處死時各肉雞中僅48.3%品系被視為活性。在過濾之後，使各鳥類中活性微生物之概況與不同鳥類後設資料(包括餵食效率、最終體重及膳食中鹽黴素之存在/不存在)整合，以便選擇改善所有此等特點之效能之系集。

本發明之相互資訊方法用於(對所有96隻鳥類而言)對活性品系之絕對細胞計數與效能量測值之間的關係以及兩個不同活性品系之間的關係進行評分。在應用臨限值之後，4039後設資料-品系關係被視為顯著的，且8842品系-品系關係被視為顯著的。此等藉由MIC評分加權之鏈接隨後用作邊緣(用後設資料及品系作為節點)來創建用於後續群集偵測分析之網路。將魯汶法群集偵測算法應用於網路使節點分類成子群組。

魯汶法藉由首先自其當前子群組中移除節點及置於相鄰子群組中來優化網路模組化。若節點之相鄰者的模組化已改善，則將節點重新分配至新的子群組。若多個群組已改善模組化，則選擇具有最正向變化之子群組。對網路中每一節點重複此步驟直至不進行新分配。下一步驟涉及創建新的粗粒度網路，亦即所發現之子群組變為新節點。由各子群組內所有較低層級節點之總和界定節點之間的邊緣。由此，重複第一及第二步驟直至不再可能進行模組化優化之改變。可研究局部(亦即在迭代步驟中得到的群組)及全局(亦即最終分組)最大值來解析在總微生物群集內存在之子群組，以及識別可能存在的潛在層次。

模組化：

$$Q = \frac{1}{2m} \sum_{i,j} \left[A_{ij} - \frac{k_i k_j}{2m} \right] \delta(c_i, c_j)$$

其中A為後設資料-品系及品系-品系關係之矩陣； $k_i = \sum_j A_{ij}$ 為連接至節點*i*之總鏈路權重；且 $m = \frac{1}{2} \sum_{i,j} A_{ij}$ 。克羅內克符號 $\delta(c_i, c_j)$ 在節點*i*

及*j*分配至相同群集時為1，且另外為0。

計算在移動節點時模組化之變化：

$$\Delta Q = \left[\frac{\Sigma_{in} + k_{i,in}}{2m} - \left(\frac{\Sigma_{tot} + k_i}{2m} \right)^2 \right] - \left[\frac{\Sigma_{in}}{2m} - \left(\frac{\Sigma_{tot}}{2m} \right)^2 - \left(\frac{k_i}{2m} \right)^2 \right]$$

Δ*Q*為子群組*C*中模組化之增加。Σ_{in}為*C*中鏈路之權重的總和，Σ_{tot}為*C*中節點發生的鏈路之權重的總和，*k_i*為節點*i*發生的鏈路之權重的總和，*k_{i,in}*為*I*至*C*中節點之鏈路之權重的總和，且*m*為網路中所有鏈路之權重的總和。

使用魯汶群集偵測方法在雞微生物群集中偵測五個不同子群組。雖然自然界中存在大量微生物多樣性，但機能性多樣性少得多。代謝能力之相似性及重疊產生冗餘。對相同環境刺激或營養素作出響應之微生物品系有可能有類似趨勢，此由本發明之方法捕獲，且此等微生物將最終被分組在一起。所得分類及層次顯示在群集偵測分析之後基於其所屬之群組對品系之機能的預測。

在完成品系之分類之後，自樣品中培養微生物品系。由於與使無菌培養物自異源微生物群集分離及生長相關之技術困難，僅通過本發明方法之活性及關係臨限值之小部分品系將一直在實驗室環境中無菌繁殖。在完成培養之後，基於無菌培養物是否存在及品系所分類成的子群組來選擇微生物品系之系集。系集經創建含有儘可能多的機能性多樣性，亦即品系經選擇使得在系集中表示子群組之多樣範圍。隨後在功效及現場研究中測試此等系集以確定品系之系集作為產品之有效性，且若品系之系集展現對生產之貢獻，則品系之系集可產生及分發作為產品。

* * * * *

雖然本發明已參考其特定實施例加以描述，但熟習此項技術者應理解，在不脫離本發明之真實精神及範疇的情況下可進行各種改變

且可替代等效物。另外，可對所描述之本發明之目標精神及範疇進行許多修改以採用特定情況、物質、物質組成、方法、方法步驟或步驟。所有該等修改意欲在此處隨附之申請專利範圍之範疇內。出於所有目的，本文所提及之專利、專利申請案、專利申請公開案、期刊文章及協定以全文引用的方式併入本文中。

【符號說明】

101	收集/接收樣品資料/樣品
103	確定一或多種微生物類型之存在
105	確定各偵測到的類型之細胞計數
107	確定獨特第一標記之數目及其數量
109	整合微生物類型之數目及第一標記之數目以發現各微生物品系之絕對細胞計數
111	確定各微生物品系之活性水準
113	藉由所確定之活性水準來過濾各品系之絕對細胞計數
115	對各活性微生物品系之經過過濾絕對細胞計數與至少一個後設資料或額外活性微生物品系進行網路分析
117	對各活性微生物品系進行分類
119	識別複數個經分類之活性微生物品系
121	基於經分類之活性微生物品系來組合微生物系集
300	微生物交互作用分析及選擇系統
310	處理器
319	資料庫
320	記憶體
330	資料收集組件
335	絕對計數組件
340	樣品關係組件

345	活動組件
350	網路分析組件
355	品系選擇/系集產生組件
390	通信介面
392	通信網路
393a	使用者
393b	用戶端
395	輸入/輸出介面(I/O)
396	使用者輸入器件
397	周邊器件
1000	方法
1001	偵測一或多種微生物類型之存在(例如，藉由流式細胞測量術)
1002	確定樣品中一或多種微生物類型之絕對數目
1003	量測獨特第一標記之數目及各自的數量，其中獨特標記為特定微生物品系之標記
1004	量測一或多個獨特第二標記(與第一標記相同或不同)之表現量且第二標記為微生物品系之活性的標記
1005	基於一或多個獨特第二標記之表現量確定何種微生物品系具有活性
1006	計算一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數
2000	步驟
2001	偵測一或多種生物類型之存在(例如，藉由流式細胞測量術)
2002	確定樣品中一或多種生物類型之絕對數目
2003	量測獨特第一標記之數目及各自的豐度，其中獨特

- 標記為特定生物品系之標記
- 2004 量測一或多個獨特第二標記(與第一標記相同或不同)之表現量且第二標記為生物品系之活性的標記
- 2005 基於一或多個獨特第二標記之表現量確定何種生物品系具有活性
- 2006 計算一或多個活性微生物品系之絕對豐度
- 2007 對於第二樣品，在另一時間點重複步驟 2001 至 2006，其中在2006下量測相同的一或多個活性微生物品系之絕對豐度
- 2008 確定樣品中之一或多個活性生物品系之共現(例如，經由包含相互資訊之網路分析)
- 3001 收集/接收樣品集/樣品
- 3002 基於目標微生物類型對各樣品內之細胞進行染色
- 3003 稱重且連續稀釋各樣品
- 3004 經由FAC處理各樣品
- 3005 確定各樣品中各微生物類型之細胞數目
- 3005a 酵母菌單一培養物
- 3005b 大腸桿菌
- 3005c 環境樣品
- 3006 自各樣品中分離總核酸
- 3006a 使來自各樣品之DNA純化
- 3006b 使來自各樣品之RNA純化
- 3006c 對於各樣品，將RNA轉化為cDNA
- 3007 庫製備/品質控制/定序
- 3008 定序讀數品質過濾，去複製，叢集，讀數定量
- 3009 去複製品系清單

- 3010 分類識別
- 3011 識別DNA
- 3013 整合資料以確立各樣品中之品系之絕對數目
- 3014 識別RNA
- 3015 讀數之數量>臨限值?
- 3015a 視為無活性，自分析中移除
- 3015b 視為具有活性，保留在分析中
- 3016 產生各樣品之活性品系及各別絕對細胞計數之清單
- 3017 識別樣品後設資料/環境參數
- 3018 添加至/更新資料庫
- 3019 識別/檢索適當之樣品後設資料用於分析
- 3020 整合後設資料及活性品系絕對細胞計數清單
- 3021a 活性品系與後設資料之間的MIC計算
- 3021b 活性品系之間的MIC計算
- 3022 產生關係之清單
- 3023 MIC評分>臨限值?
- 3023a 視為相關
- 3023b 視為不相關
- 3024 相關關係之網路分析
- 3025 基於分析選擇用於產品組成之複數個活性相關品系

申請專利範圍

1. 一種方法，其包含：

獲得共用至少一種共同特性且具有至少一種不同特性之至少兩個樣品；

對於各樣品，偵測各樣品中一或多種微生物類型之存在；

確定各樣品中該一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；

量測各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，各獨特第一標記為微生物品系之標記；

整合各微生物類型之數目及該等第一標記之數目，產生各樣品中所存在之各微生物品系之絕對細胞計數；

基於指定臨限值量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定各樣品中之彼微生物品系的活性水準；

藉由所確定之活性來過濾該絕對細胞計數，提供該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單；

對該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之該等經過過濾絕對細胞計數與該至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行比較，且基於所預測之機能及/或化學性質將該等活性微生物品系分類成至少兩個群組；

自該至少兩個群組中選擇至少一個微生物品系；及

使來自該至少兩個群組之該所選至少一個微生物品系組合形成微生物系集，其經組態以改變對應於該至少一個後設資料之性質。

2. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特基因組DNA標記之數目。
3. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特RNA標記之數目。
4. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特蛋白質標記之數目。
5. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特代謝物標記之數目。
6. 如請求項5之方法，其中量測獨特代謝物標記之數目包括量測各樣品中獨特脂質標記之數目。
7. 如請求項5之方法，其中量測獨特代謝物標記之數目包括量測各樣品中獨特碳水化合物標記之數目。
8. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包括對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。
9. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包括對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。
10. 如請求項1之方法，其中該等獨特第一標記包括mRNA標記、siRNA標記及/或核糖體RNA標記中之至少一者。
11. 如請求項1之方法，其中該等獨特第一標記包括 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白及/或代謝酶中之至少一者。
12. 如請求項1至11中任一項之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記包括量測各樣品中該至少一個獨特第二標記之表現量。
13. 如請求項12之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記之表現量包括對該樣品中之mRNA進行基因表現分析。
14. 如請求項13之方法，其中該基因表現分析包括定序反應。
15. 如請求項13之方法，其中該基因表現分析包括定量聚合酶鏈反

應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

16. 如請求項12之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析。
17. 如請求項12之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行總體核糖體剖析或核糖體剖析。
18. 如請求項1至11中任一項之方法，其中該一或多種微生物類型包括細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合。
19. 如請求項1至11中任一項之方法，其中該一或多個微生物品系為一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。
20. 如請求項19之方法，其中該一或多個微生物品系為一或多個真菌物種或亞種；及/或其中該一或多個微生物品系為一或多個細菌物種或亞種。
21. 如請求項1至11中任一項之方法，其中確定各樣品中該一或多種微生物類型中之每一者的數目包括對各樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。
22. 如請求項1之方法，其中該等獨特第一標記包括系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。
23. 如請求項22之方法，其中量測獨特標記之數目及其數量包括對

各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。

24. 如請求項22之方法，其中量測獨特標記之數目及其數量包含對基因組DNA進行基因組定序。
25. 如請求項22之方法，其中量測獨特標記之數目及其數量包含對基因組DNA進行擴增子定序。
26. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種不同特性包括對該至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集時間，使得第一樣品之收集時間不同於第二樣品之收集時間。
27. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種不同特性包括對該至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集位置，使得第一樣品之收集位置不同於第二樣品之收集位置。
28. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種共同特性包括樣品源類型，使得第一樣品之樣品源類型與第二樣品之樣品源類型相同。
29. 如請求項28之方法，其中該樣品源類型為動物類型、器官類型、土壤類型、水類型、沈積物類型、油類型、植物類型、農產品類型、非根際土類型、根際土類型或植物部分類型中之一者。
30. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種共同特性包括該至少兩個樣品中之每一者為胃腸道樣品。
31. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種共同特性包括動物樣品源類型，各樣品具有另一共同特性，使得各樣品為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品或器官樣品。
32. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其進一步包含：

基於該至少一個經量測後設資料自目標獲得至少另一樣品，其中來自該目標之該至少另一樣品與該至少兩個樣品共用至少一種共同特性；及

對於來自該目標之該至少另一樣品，偵測一或多種微生物類型之存在；確定該一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；量測獨特第一標記之數目及其數量；整合各微生物類型之數目及該等第一標記之數目，產生所存在的各微生物品系之絕對細胞計數；量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定彼微生物品系之活性水準；藉由所確定之活性來過濾該絕對細胞計數，提供來自該目標之該至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單；

其中基於來自該目標之該至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單自該至少兩個群組中之每一者中選擇該至少一個微生物品系，使得所形成之系集經組態以改變該目標之對應於該至少一個後設資料的性質。

33. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中對該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之該等經過濾絕對細胞計數與該至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行比較包括確定各樣品中之該一或多個活性微生物品系與該至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現。
34. 如請求項33之方法，其中該至少一個經量測後設資料包括一或多個參數，其中該一或多個參數為以下中之至少一者：樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、該樣品源之體重、該樣品源之餵食量、該樣品源之體重增加、該

樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、該樣品源之物理特性或量測值、該樣品源之生產特性或其組合。

35. 如請求項34之方法，其中該一或多個參數為乳清蛋白豐度、酪蛋白豐度及/或乳脂豐度中之至少一者。
36. 如請求項33之方法，其中確定各樣品中該一或多個活性微生物品系及該至少一個經量測後設資料之共現包括創建以表示後設資料及微生物品系相關性之鏈接、該一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及該又一個獨特第二標記之量測值填充的矩陣，表示異源微生物群集之一或多個網路。
37. 如請求項36之方法，其中該至少一個經量測後設資料包含第二微生物品系之存在、活性及/或數量。
38. 如請求項33之方法，其中確定該一或多個活性微生物品系及該至少一個經量測後設資料之共現及對該等活性微生物品系進行分類包括網路分析及/或叢集分析來量測網路內各微生物品系之連接性，其中該網路表示共用共同特性、經量測後設資料及/或相關環境參數之至少兩個樣品之集合。
39. 如請求項38之方法，其中該至少一個經量測後設資料包含第二微生物品系之存在、活性及/或數量。
40. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析及/或叢集分析包括連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。
41. 如請求項38至40中任一項之方法，其中該叢集分析包括構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型。
42. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包括經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。

43. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包含基於微分方程式之種群建模。
44. 如請求項43之方法，其中該網路分析包含洛特卡-沃爾泰拉 (Lotka-Volterra)建模。
45. 如請求項38或39之方法，其中該叢集分析為啟發式方法。
46. 如請求項45之方法，其中該啟發式方法為魯汶法 (Louvain method)。
47. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包括用於建立變數之間的連接性之非參數方法。
48. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包括變數之間用於建立連接性之相互資訊及/或最大資訊係數計算。
49. 一種用於形成活性微生物品系之系集的方法，該系集經組態以改變基於在兩個或更多個樣品集之間共用至少一個共同或相關環境參數且在該兩個或更多個樣品集之間具有至少一個不同環境參數的兩個或更多個樣品集之環境之性質或特性，各樣品集包含包括異源微生物群集之至少一個樣品，其中該一或多個微生物品系為一或多種生物類型之亞分類單元，該方法包含：
 - 偵測各樣品中複數種微生物類型之存在；
 - 確定各樣品中該等偵測到的微生物類型中之每一者之細胞的絕對數目；
 - 量測各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，其中獨特第一標記為微生物品系之標記；
 - 以蛋白質或RNA含量，量測一或多個獨特第二標記之表現量，其中獨特第二標記為微生物品系之活性的標記；
 - 基於該一或多個獨特第二標記之超出指定臨限值的表現量來確定各樣品之該等偵測到的微生物品系之活性；

基於該一或多個第一標記之數量及該一或多個微生物品系為亞分類單元之微生物類型之細胞的絕對數目來計算各樣品中各偵測到的活性微生物品系之絕對細胞計數，其中該一或多個活性微生物品系表現高於該指定臨限值之第二獨特標記；

基於最大資訊係數網路分析確定該等樣品中該等活性微生物品系與至少一個環境參數或額外活性微生物品系之共現以量測網路內各微生物品系之連接性，其中該網路為該至少兩個或更多個樣品集與至少一個共同或相關環境參數之集合；

基於該網路分析自該一或多個活性微生物品系中選擇複數個活性微生物品系；及

由該所選複數個活性微生物品系形成活性微生物品系之系集，當活性微生物品系之該系集被引入環境中時活性微生物品系之該系集經組態以選擇性改變彼環境之性質或特徵。

50. 如請求項49之方法，其中該至少一個環境參數包含第二微生物品系之存在、活性及/或數量。
51. 如請求項49或50之方法，其中第一樣品集之至少一個共同或相關環境因子之至少一個量測標誌不同於第二樣品集之至少一個共同或相關環境因子之量測標誌。
52. 如請求項49或50之方法，其中各樣品集包含複數個樣品，且樣品集內各樣品之至少一個共同或相關環境因子之量測標誌實質上類似，且一個樣品集之平均量測標誌不同於另一樣品集之平均量測標誌。
53. 如請求項49或50之方法，其中各樣品集包含複數個樣品，且第一樣品集自第一種群收集且第二樣品集自第二種群收集。
54. 如請求項49或50之方法，其中各樣品集包含複數個樣品，且第一樣品集在第一時間自第一種群收集且第二樣品集在不同於該

第一時間之第二時間自該第一種群收集。

55. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括營養資訊。
56. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括膳食資訊。
57. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括動物特性。
58. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括感染資訊或健康狀況。
59. 如請求項51之方法，其中至少一個量測標誌為樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、該樣品源之體重、該樣品源之餵食量、該樣品源之體重增加、該樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、該樣品源之物理特性或量測值、該樣品源之生產特性或其組合。
60. 如請求項49或50之方法，其中該至少一個參數為乳清蛋白豐度、酪蛋白豐度及/或乳脂豐度中之至少一者。
61. 如請求項49或50之方法，其中量測各樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特基因組DNA標記之數目。
62. 如請求項49或50之方法，其中量測該樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特RNA標記之數目。
63. 如請求項49或50之方法，其中量測該樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特蛋白質標記之數目。
64. 如請求項49或50之方法，其中該複數種微生物類型包括一或多個細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合。

65. 如請求項49或50之方法，其中確定各樣品中該等微生物類型中之每一者之絕對細胞數目包括對該樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。
66. 如請求項49或50之方法，其中一或多個活性微生物品系為選自一或多個細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合之一或多種微生物類型之亞分類單元。
67. 如請求項49或50之方法，其中一或多個活性微生物品系為一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。
68. 如請求項49或50之方法，其中一或多個活性微生物品系為一或多個真菌物種、真菌亞種、細菌物種及/或細菌亞種。
69. 如請求項49或50之方法，其中至少一個獨特第一標記包含系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。
70. 如請求項49或50之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包含對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。
71. 如請求項49或50之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包含對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。
72. 如請求項49或50之方法，其中獨特第一標記包含mRNA標記、siRNA標記或核糖體RNA標記。
73. 如請求項49或50之方法，其中獨特第一標記包含 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白、代謝酶或其組合。

74. 如請求項49或50之方法，其中量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對該樣品中之mRNA進行基因表現分析。
75. 如請求項74之方法，其中該基因表現分析包含定序反應。
76. 如請求項74之方法，其中該基因表現分析包含定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。
77. 如請求項49或50之方法，其中量測一或多個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析。
78. 如請求項49或50之方法，其中量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對該樣品或其部分進行總體核糖體剖析及/或核糖體剖析。
79. 如請求項49或50之方法，其中該等樣品之源類型為動物、土壤、空氣、鹹水、淡水、廢水污泥、沈積物、油、植物、農產品、非根際土、根際土、植物部分、蔬菜、極端環境或其組合中之一者。
80. 如請求項49或50之方法，其中各樣品為胃腸道樣品。
81. 如請求項49或50之方法，其中各樣品為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品、組織樣品或器官樣品中之一者。
82. 一種處理器實施之方法，其包含：
 - 接收來自共用至少一種共同特性且具有至少一種不同特性之至少兩個樣品的樣品資料；
 - 對於各樣品，確定各樣品中一或多種微生物類型之存在；
 - 確定各樣品中該一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；
 - 確定各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，各獨特第一標

記為微生物品系之標記；

經由處理器整合各微生物類型之數目及該等第一標記之數目，產生各樣品中所存在之各微生物品系之絕對細胞計數；

基於各微生物品系之至少一個獨特第二標記之超出指定臨限值的量測值來確定各樣品中各微生物品系之活性水準，若一微生物品系之至少一個獨特第二標記之量測值超出相應臨限值，則該品系被識別為具有活性；

藉由所確定之活性來過濾各微生物品系之該絕對細胞計數，提供該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單；

經由至少一個處理器對該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之該等經過過濾絕對細胞計數與該至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行網路分析，該網路分析包括確定各活性微生物品系與每一其他活性微生物品系之間的最大資訊係數評分及確定各活性微生物品系與各別至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之間的最大資訊係數評分；

基於所預測之機能及/或化學性質對該等活性微生物品系進行分類；

基於該分類識別複數個活性微生物品系；及

輸出該所識別之複數個活性微生物品系。

83. 如請求項82之處理器實施之方法，其進一步包含：

組合活性微生物系集，活性微生物系集在應用於目標時經組態以改變對應於該至少一個經量測後設資料之性質。

84. 如請求項82之處理器實施之方法，其中該輸出的複數個活性微生物品系用於組合活性微生物系集，該活性微生物系集在應用

於目標時經組態以改變對應於該至少一個經量測後設資料之性質。

85. 如請求項82之處理器實施之方法，其進一步包含：基於該輸出的複數個所識別之活性微生物品系識別至少一個病原體。
86. 如請求項82至85中任一項之處理器實施之方法，其中該輸出的複數個活性微生物品系進一步用於組合活性微生物系集，該活性微生物系集在應用於目標時經組態以靶向該至少一個所識別病原體及治療及/或預防與該至少一個所識別病原體相關之症狀。

圖式

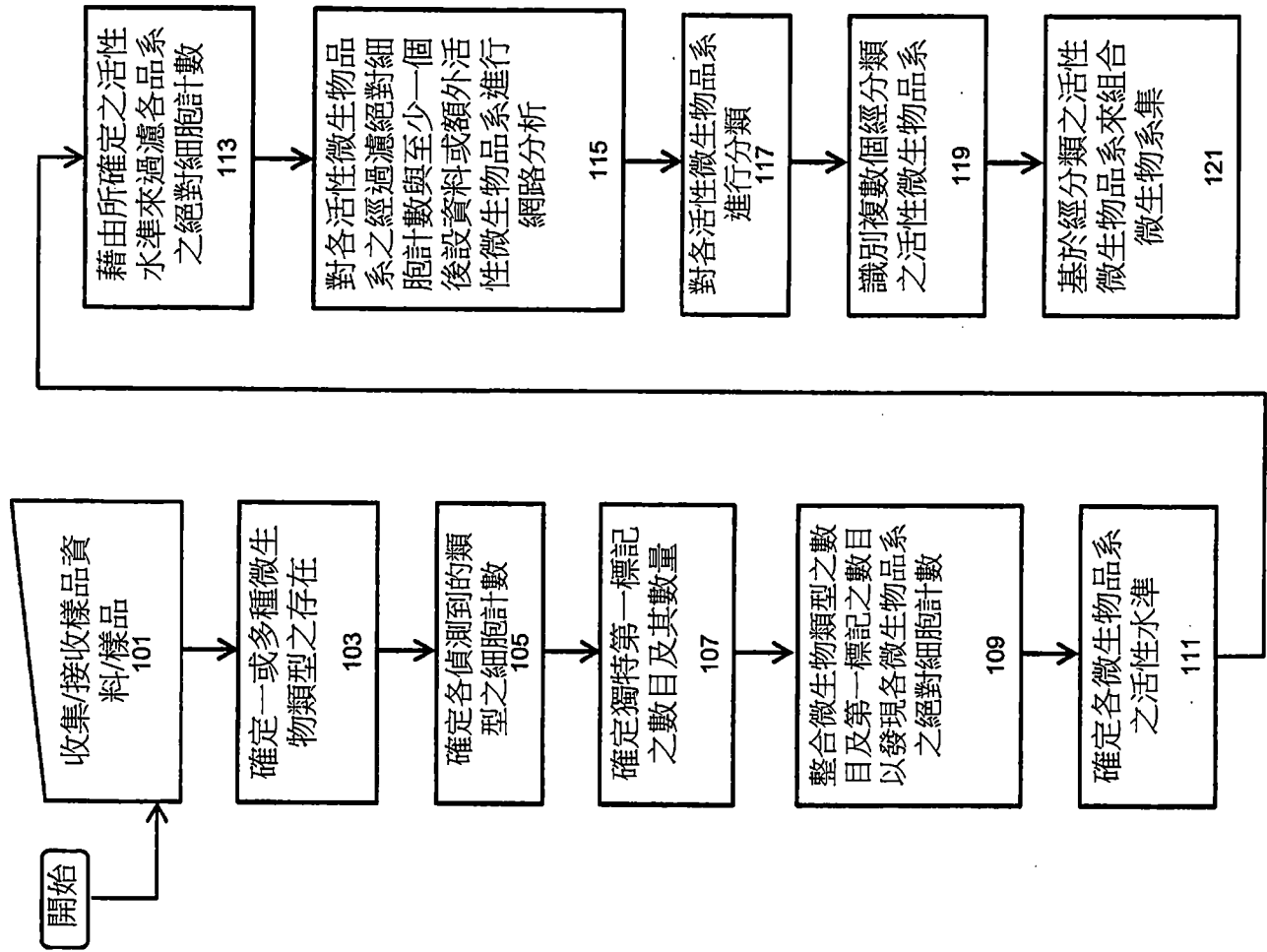


圖 1A

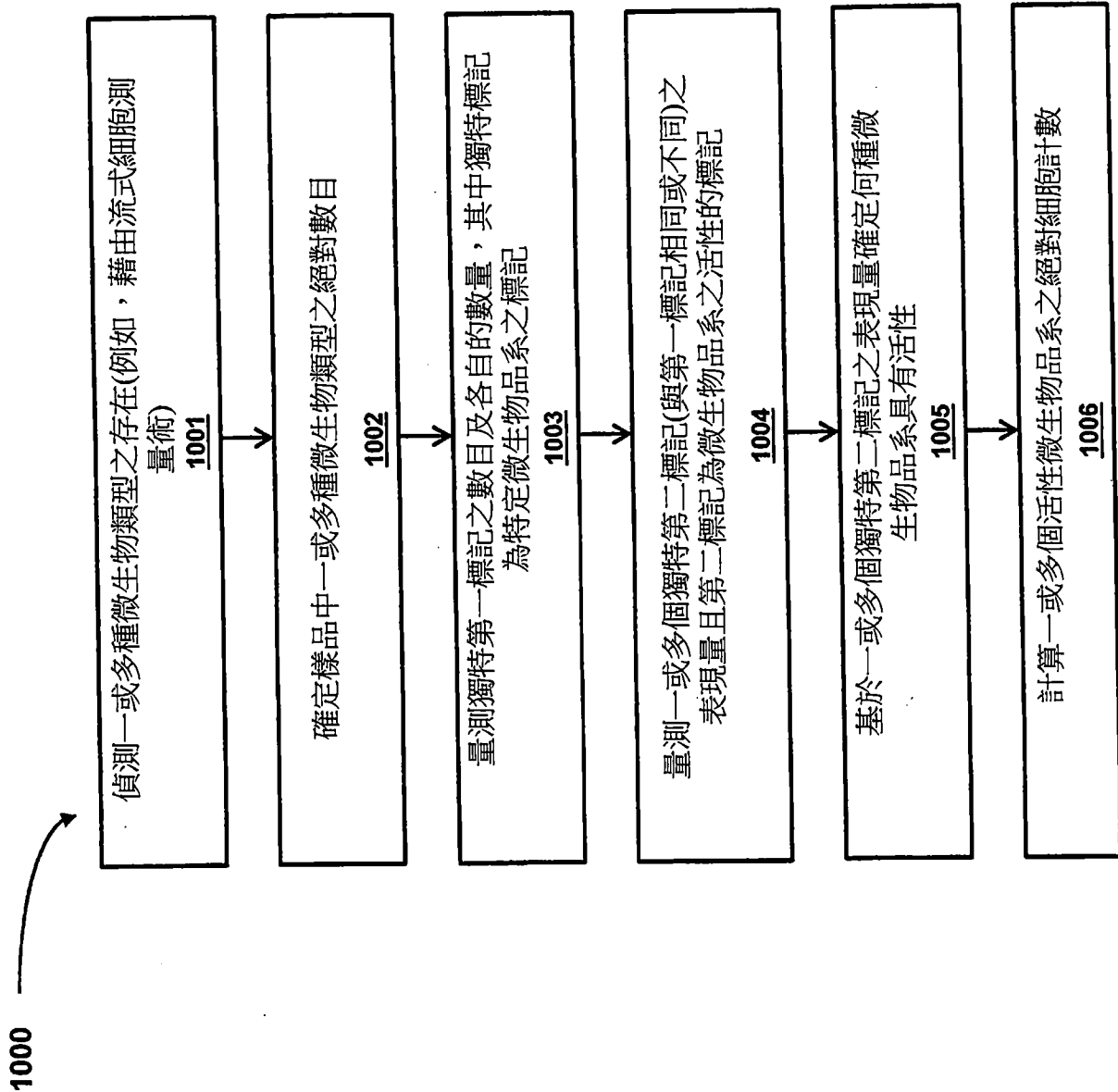


圖1B

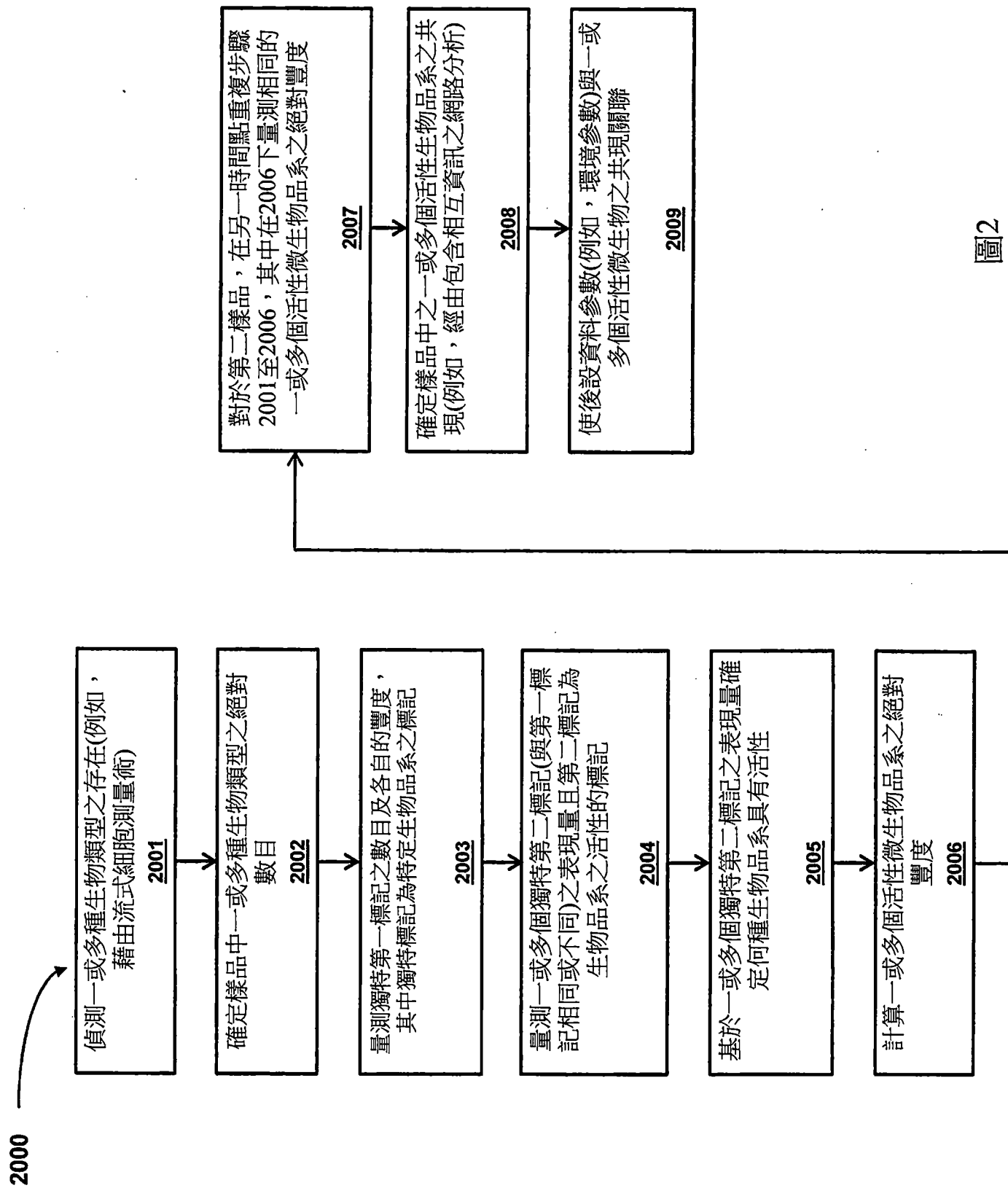
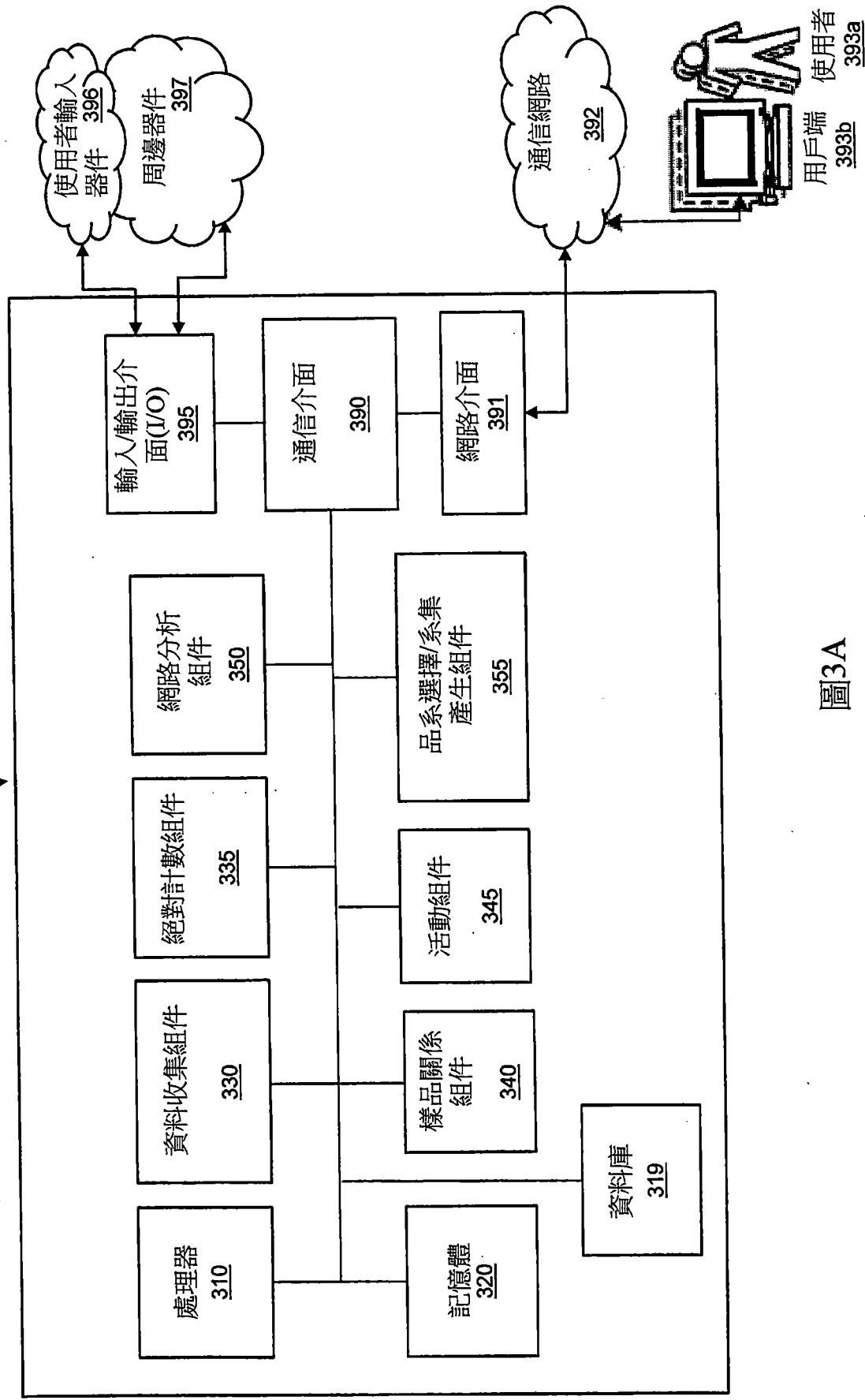


圖2

微生物交互作用分析及選擇系統
300



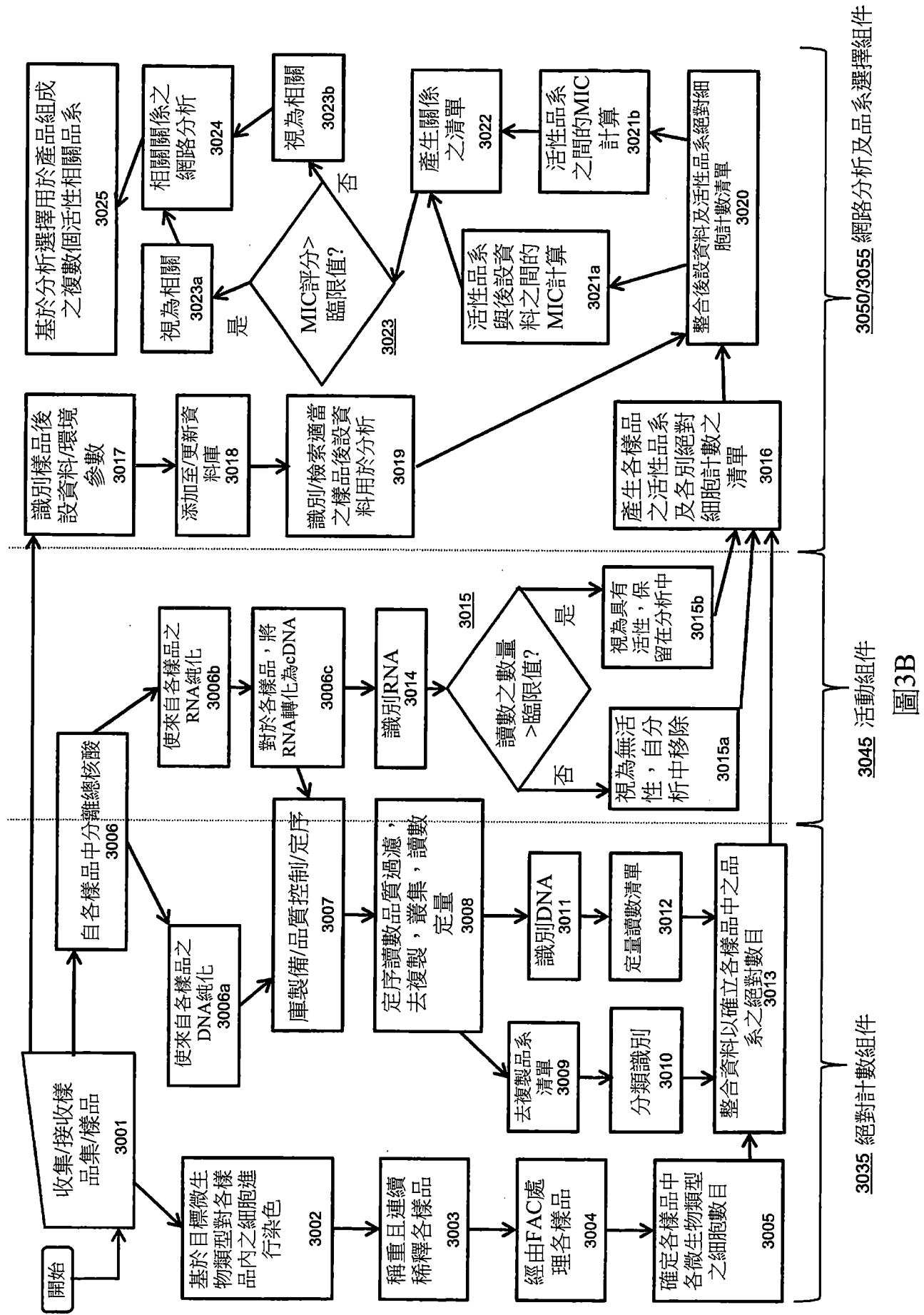


圖3B

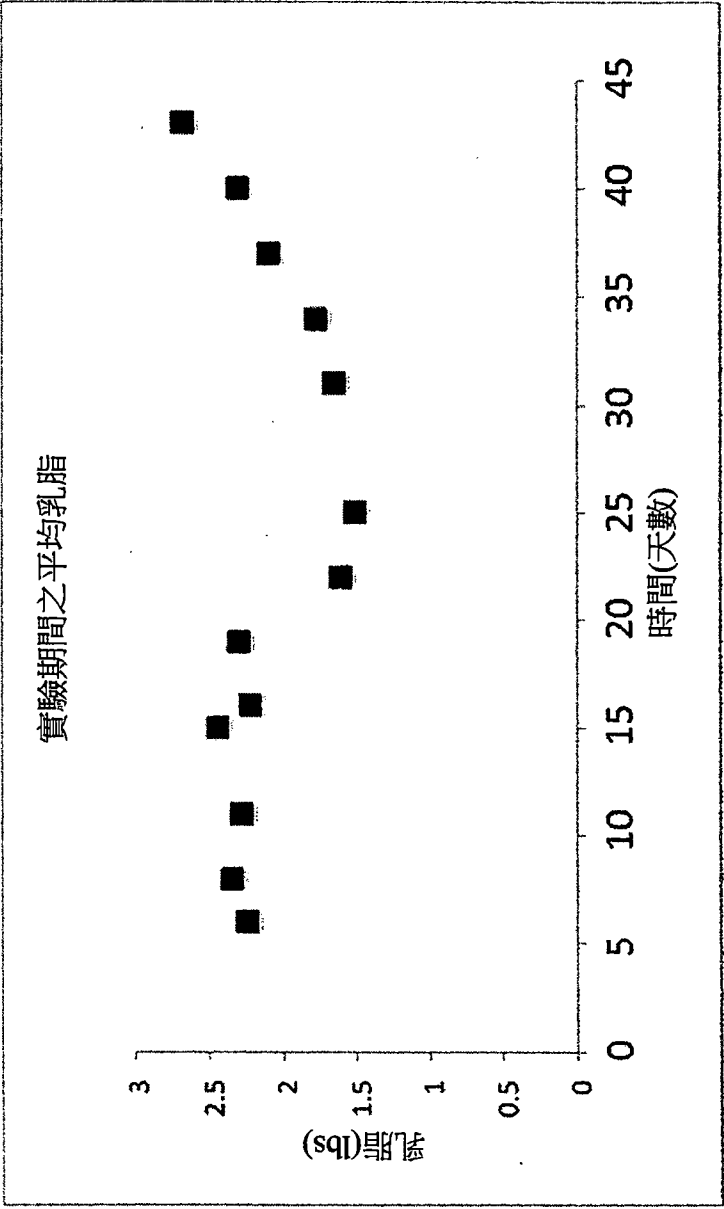


圖4

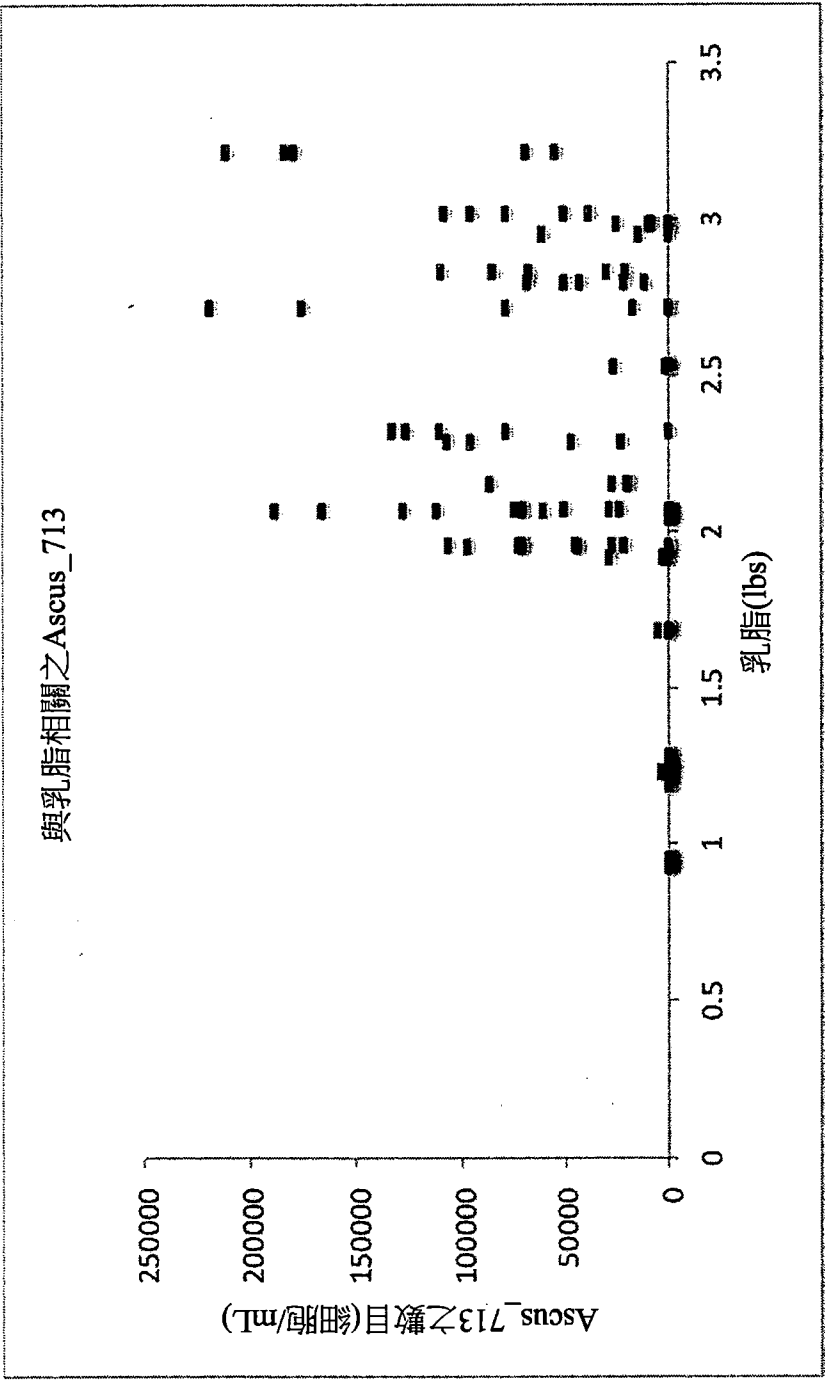


圖5

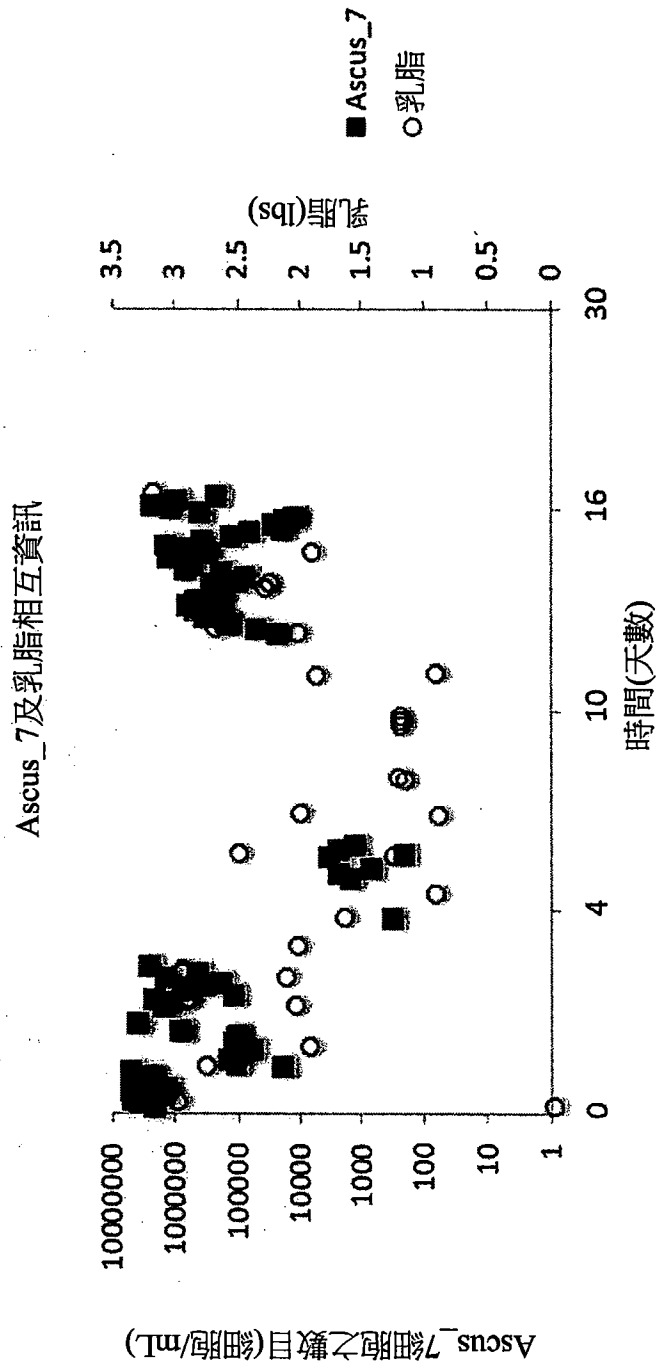


圖6

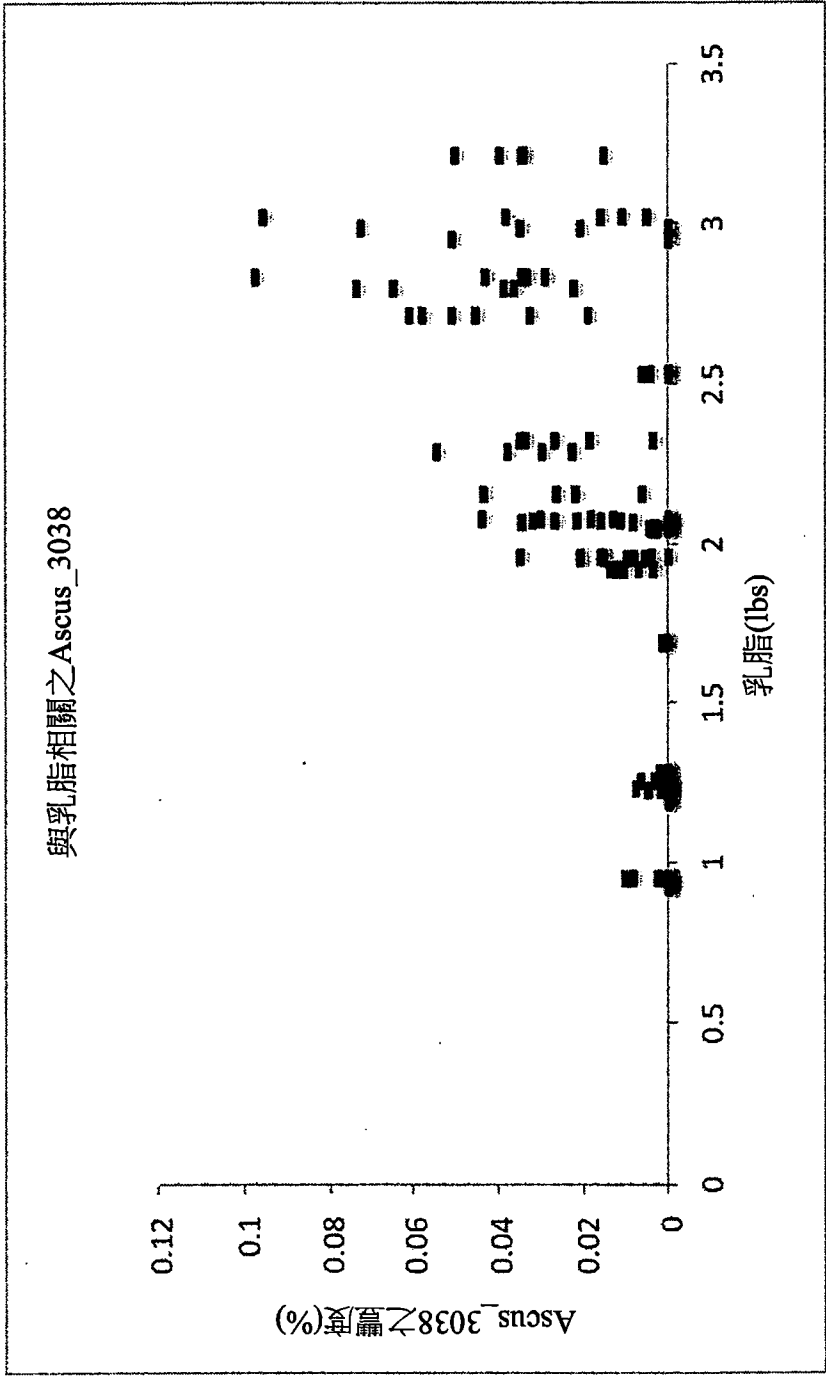
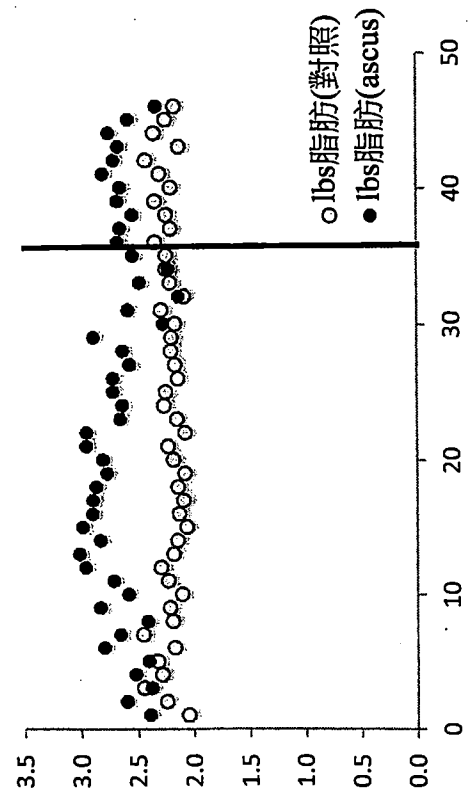


圖7

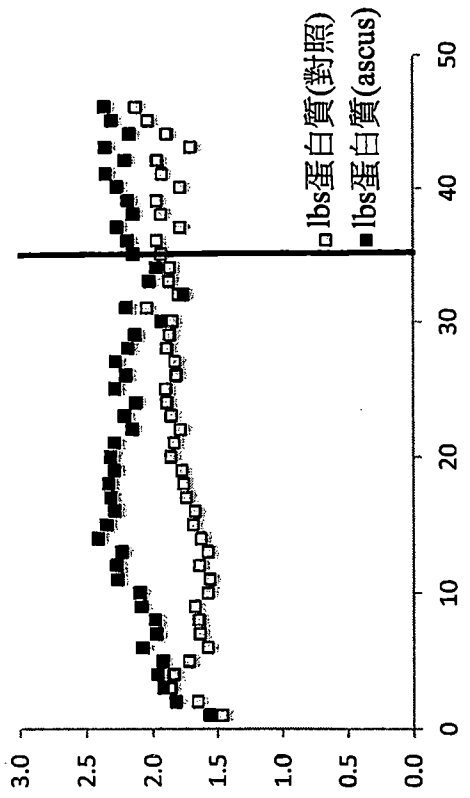
A

隨時間推移產生之平均乳脂



B

隨時間推移產生之平均乳蛋白



C

隨時間推移之平均能量校正乳

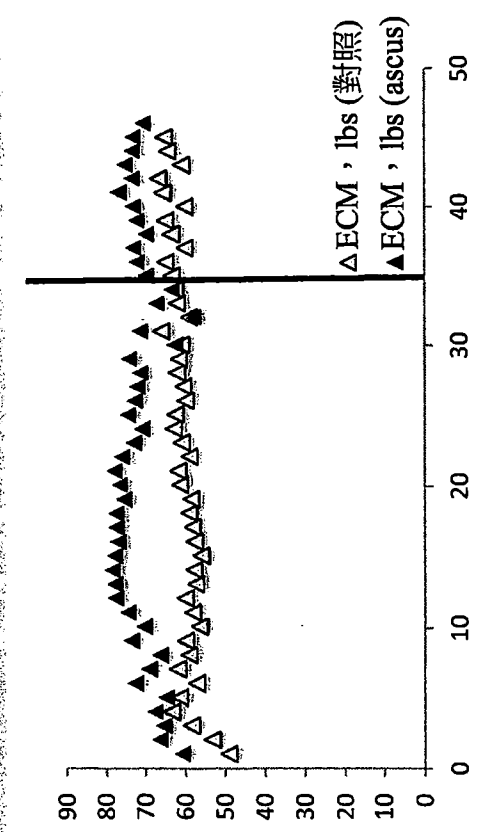


圖8

乳脂：增加20.9%
乳蛋白：增加20.7%
ECM：增加19.4%

在用於確定樣品中一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法之一個實施例中，偵測到樣品中一或多種微生物類型之存在且確定樣品中一或多種微生物類型各自之絕對數目。量測獨特第一標記之數目以及該等獨特第一標記各自之數量或豐度。如本文所描述，獨特第一標記為獨特微生物品系之標記。隨後藉由量測一或多個獨特第二標記之表現量在蛋白質或RNA含量下評估活性。獨特第二標記與第一獨特標記相同或不同，且為生物品系之活性的標記。基於一或多個獨特第二標記之表現量，確定(若存在)一或多個微生物品系具有活性。在一個實施例中，微生物品系在其以臨限值位準或高於臨限值位準之百分比表現第二獨特標記時被視為具有活性。一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數係基於一或多個活性微生物品系之一或多個第一標記的數量及一或多個微生物品系為亞分類單元之微生物類型的絕對數目確定。

在一個實施例中，確定樣品中一或多種生物類型各自之數目包含對樣品或其部分進行核酸定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)或流式細胞測量術。

在一個實施例中，量測樣品中第一獨特標記之數目包含量測獨特基因組DNA標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中第一獨特標記之數目包含量測獨特RNA標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特蛋白質標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特代謝物標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特代謝物標記之數目包含量測獨特碳水化合物標記、獨特脂質標記或其組合之數目。

在另一實施例中，量測獨特第一標記之數目及其數量包含對樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。在一個實施例中，獨特第一標

- 記之量測包含例如與對獨特第一標記具有特異性之引子的標記特異性反應。在另一實施例中，一種總體基因組學方法。

在一個實施例中，量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對樣品中之RNA (例如，miRNA、tRNA、rRNA及/或mRNA)進行表現分析。在另一實施例中，基因表現分析包含定序反應。在又一實施例中，RNA表現分析包含定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

在一個實施例中，量測樣品中第二獨特標記之數目包含量測獨特蛋白質標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特第二標記之數目包含量測獨特代謝物標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特代謝物標記之數目包含量測獨特碳水化合物標記之數目。在另一實施例中，量測樣品中獨特代謝物標記之數目包含量測獨特脂質標記之數目。在另一實施例中，一或多個微生物品系之絕對細胞計數係在複數個樣品中量測。在另一實施例中，該複數個樣品係自相同環境或類似環境獲得。在另一實施例中，該複數個樣品係在複數個時間點獲得。

在另一實施例中，量測一或多個獨特第二標記之量包含對樣品或其部分進行質譜分析。在又一實施例中，量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對樣品或其部分進行總體核糖體剖析或核糖體剖析。

在本發明之另一態樣中，在複數個樣品中確定一種用於確定一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法，且絕對細胞計數目與一或多個後設資料(例如，環境)參數有關。在一個實施例中，絕對細胞計數目與一或多個後設資料參數有關包含共現量測、相互資訊量測、連鎖分析及/或其類似者。在一個實施例中，一或多個後設資料參數為第二活性微生物品系之存在。因此，絕對細胞計數值在此方法之一個實施例中用於確定微生物群集中的一或多個活性微生物品系與

度與所產生的乳脂之磅數(lbs)的相關性。

圖8展示現場試驗之結果，其中向乳牛投與根據所揭示之方法製備的微生物系集；圖8A展示隨時間推移所產生的乳脂之磅數的平均數；圖8B展示隨時間推移所產生的乳蛋白之磅數的平均數；且圖8C展示隨時間推移所產生的能量校正乳(ECM)之磅數的平均數。

【實施方式】

微生物群集亦為多種不同類型生態系統中之環境過程及地球之生物地球化學的中心，例如藉由循環營養素及固定碳(Falkowski等人 (1998) *Science* 281, 第237-240頁，其以全文引用的方式併入本文中)。然而，因為群集複雜性及任何給定微生物群集之大多數成員之可培養性缺乏，仍不能充分理解此等過程之分子及生態細節以及影響因素。

微生物群集之定性及定量組成不同且各微生物群集為獨特的，且其組成視其所在的給定生態系統及/或環境而定。微生物群集成員之絕對細胞計數受制於存在群集的環境之變化，以及由微生物引起之生理及代謝變化(例如，細胞分裂、蛋白表現等)。環境參數及/或群集內一個活性微生物之數量的變化可對群集之其它微生物及對發現群集之生態系統及/或環境具有深遠的影響。為對此等微生物群集之變化作出理解、預測及反應，需要識別樣品中之活性微生物及各別群集中活性微生物之數目。然而，迄今為止，絕大部分關於微生物群集成員之研究集中於特定微生物群集中微生物之比例而非絕對細胞計數(Segata等人 (2013). *Molecular Systems Biology* 9, 第666頁，其以全文引用的方式併入本文中)。

雖然微生物群集組成可容易(例如)經由使用高通量定序方法確定，需要更深地理解如何組合及維持各別群集。

微生物群集參與關鍵過程，諸如基本元素之生物地球化學循

環，例如碳、氧、氮、硫、磷及各種金屬之循環；且各別群集之結構、交互作用及動力學對生物圈之存在至關重要(Zhou等人 (2015). mBio 6(1):e02288-14. Doi:10.1128/mBio.02288-14，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。此類群集為高度異源的且幾乎始終包括細菌、病毒、古菌及其他微真核生物(諸如真菌)之複雜混合物。人類環境(諸如腸道及陰道)中微生物群集異源性之水準與諸如發炎性腸道疾病及細菌性陰道病有關(Nature (2012). 第486卷，第207頁，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。然而，值得注意的是，即使健康個體，在此類環境中佔據組織之微生物顯著不同(Nature (2012). 第486卷，第207頁)。

由於多種微生物可能不可培養或另外難以培養/培養成本高，諸如核酸定序之不依賴培養的方法已促進對各種微生物群集之多樣性的理解。小亞單位核糖體RNA (SSU rRNA或16s rRNA)基因之擴增及定序為研究群集中之微生物多樣性的基本方法，部分地基於基因之普遍存在及相對均勻的演變速率。高通量方法之進展已導致總體基因組學分析，其中對微生物之整個基因組進行定序。此類方法不需要群集之先驗知識，允許探索新穎微生物品系。總體基因組學、總體轉錄組學、宏蛋白質組學及代謝組學皆能夠探測群集來辨別結構及機能。

不僅為群集中之微生物編目錄，且亦解密活性成員、彼等生物之數目及微生物群集成員彼此及與環境參數之共現(例如群集中響應於群集環境之變化的兩種微生物之共現)的能力將允許理解各別環境因子(例如，氣候、營養素存在、環境pH)對微生物群集內的微生物之身分(及其各別編號)具有重要性，以及某些群集成員對群集所在的環境具有重要性。本發明解決此等及其他需要。

如在本說明書中所用，除非上下文另外明確規定，否則單數形

微生物品系進行分類117，且基於分類來識別及輸出複數個活性微生物品系119。在一些實施例中，該方法進一步包含組合來自所識別之多個微生物品系的活性微生物系集121，微生物系集在應用於目標時經組態以改變對應於至少一個經量測後設資料之性質。該方法可進一步包含基於輸出的複數個所識別之活性微生物品系來識別至少一個病原體(額外細節參見實例4)。在一些實施例中，該複數個活性微生物品系可用於組合在應用於目標時經組態以處理至少一個所識別病原體及/或治療與至少一個所識別病原體相關之症狀的活性微生物系集。

在本發明之一個態樣中，提供一種用於確定一個樣品或複數個樣品中之一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的方法，其中一或多個活性微生物品系存在於樣品中之微生物群集中。一或多個微生物品系為一或多種生物類型之亞分類單元(參見圖1B之方法1000)。對於各樣品，偵測樣品中一或多種微生物類型之存在(1001)。確定樣品中一或多種生物類型各自之絕對數目(1002)。量測獨特第一標記之數目以及獨特第一標記各自之數量(1003)。如本文所描述，獨特第一標記為獨特微生物品系之標記。隨後藉由量測一或多個獨特第二標記之表現量在蛋白質及/或RNA含量下評估活性(1004)。獨特第二標記可與第一獨特標記相同或不同，且為生物品系之活性的標記。基於一或多個獨特第二標記之表現量，確定(若存在)微生物品系具有活性(1005)。若微生物品系表現特定量或高於臨限值位準之第二獨特標記(1005)，例如，高於臨限值位準至少約10%、至少約20%、至少約30%或至少約40%，則微生物品系被視為具有活性(應理解，可基於特定應用及/或實施方案來確定各個臨限值，例如臨限值可隨著樣品源，諸如特定物種、樣品源位置、相關後設資料、環境等而變化)。一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數可基於一或多個活性微生物品系之一或多個第一標記的數量及一或多個微生物品系為亞分類單元之生物類型

的絕對數目確定。

如圖2中所提供，在本發明之另一態樣中，在複數個樣品中確定一或多種活性微生物之絕對細胞計數，且該絕對細胞計數與後設資料(環境參數)有關(2001-2008)。對複數個樣品進行一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數的分析，其中若活性量測值處於複數個樣品中之至少一者的臨限值位準或高於臨限值位準，則一或多個活性微生物品系被視為具有活性(2001-2006)。隨後一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數與特定實施方案及/或應用之後設資料參數有關(2008)。

在一個實施例中，隨時間推移自相同環境源(例如，在一段時間過程內的相同動物)收集複數個樣品。在另一實施例中，該複數個樣品來自複數個環境源(例如，不同動物)。在一個實施例中，環境參數為第二活性微生物品系之絕對細胞計數。在另一實施例中，一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數值用於確定一或多個活性微生物品系與微生物群集之第二活性微生物品系之共現。在另一實施例中，第二環境參數與一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及/或第二環境品系之絕對細胞計數有關。

通篇論述此等態樣之實施例。

用於本文所提供之方法的樣品重要地可為包括微生物群集之任何類型。舉例來說，用於本文所提供之方法的樣品涵蓋(但不限於)動物樣品(例如，哺乳動物、爬行動物、鳥類)、土壤、空氣、水(例如，海水、淡水、廢水污泥)、沈積物、油、植物、農產品、植物、土壤(例如，根際土)及極端環境樣品(例如，酸性礦井水、水熱系統)。在海水或淡水樣品之情況下，樣品可來自水體表面或水體之任何深層，例如深海樣品。在一個實施例中，水樣為海洋、河流或湖泊樣品。

在一個實施例中，動物樣品為體液。在另一實施例中，動物樣品為組織樣品。非限制性動物樣品包括牙齒、汗液、指甲、皮膚、毛

網路分析組件350可為任何硬體及/或軟體組件(儲存於記憶體(諸如記憶體320)中及/或在諸如處理器310之硬體中執行)，其經組態以確定樣品中之一或多個活性微生物品系與環境(後設資料)參數之共現。在一些實施例中，基於由資料收集組件330收集之資料及藉由樣品關係組件340確定之一或多個活性微生物品系與一或多個環境參數之間的關係，網路分析組件350可創建以表示環境參數及微生物品系相關性之鏈接、一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及一或多個獨特第二標記之表現量填充的矩陣，表示微生物品系之異源種群之一或多個網路。舉例而言，網路分析可使用關聯(數量及/或豐度)矩陣在樣品中使用經數量資料加權之規則挖掘方法識別活性微生物品系與後設資料參數之間的相關性(例如，兩個或更多個活性微生物品系之相關性)。在一些實施例中，網路分析組件350可應用過濾器來選擇及/或移除規則。網路分析組件350可計算活性品系隨時間推移之細胞數目變化，指出變化之方向性(亦即，負值表示減少，正值表示增加)。網路分析組件350可將矩陣表示為網路，其中微生物品系表示節點且數量加權規則表示邊緣。網路分析組件350可使用馬爾可夫鏈及隨機遊動槓桿確定節點之間的連接性及定義叢集。在一些實施例中，網路分析組件350可使用後設資料過濾叢集以便識別與合乎需要的後設資料相關之叢集。在一些實施例中，網路分析組件350可藉由整合隨時間推移之細胞數目變化及存在於目標叢集中之品系對目標微生物品系進行排名，其中最高細胞數目變化排名最高。

在一些實施例中，網路分析包括連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。在另一實施例中，可使用之叢集分析方法包括構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型。在另一實施例中，網路分析包括經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基

於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。在另一實施例中，網路分析包含相互資訊、最大資訊係數計算，或變數之間用於建立連接性之其他非參數方法。在另一實施例中，網路分析包括基於微分方程式之種群建模。在另一實施例中，網路分析包括洛特卡-沃爾泰拉建模。

圖3B展示根據本發明之一個實施例之例示性邏輯流程。首先，收集及/或接收複數個樣品及/或樣品集3001。應理解，如本文所用，「樣品」可指一或多個樣品、樣品集、複數個樣品(例如，來自特定種群)，使得當論述兩個或更多個不同樣品時便於理解，且各樣品可包括複數個子樣品(例如，當論述第一樣品及第二樣品時，第一樣品可包括2、3、4、5個或更多個自第一種群收集之子樣品，且第二樣品可包括2、3、4、5個或更多個自第二種群收集或者自第一種群但在不同時間點(諸如在收集第一子樣品之後一週或一個月)收集之子樣品)。當收集子樣品時，可監測及儲存各子樣品之個別收集標誌及參數，包括環境參數、定性及/或定量觀測結果、種群成員身分(例如，因此，當樣品係在兩個或更多個不同時間自相同種群收集時，子樣品藉由識別成對，因此，在時間1之來自動物1的子樣品鏈接至在時間2之自相同動物收集的子樣品等)。

對於各樣品、樣品集及/或子樣品，基於目標生物類型對細胞進行染色3002，對各樣品/子樣品或其部分進行稱重且連續稀釋3003且處理3004，確定各樣品/子樣品中各微生物類型之細胞數目。在一個例示性實施方案中，可使用細胞分類器計數來自樣品(諸如來自環境樣品)之個別細菌及真菌細胞。作為本發明之部分，開發特定染料使得能夠計數先前根據傳統方法不可計數之微生物。遵循本發明之方法，使用特定染料對細胞壁(例如，細菌及/或真菌)進行染色，且目標細胞之離散種群可基於蜂巢式特性使用雷射自較大種群計數。在一個特定實例中，製備環境樣品且在等滲緩衝溶液中稀釋並用以下染料進

```

tax_counts = merge(left=counts,right=tax)

# Species level analysis

tax_counts.to_csv('species.txt')

# Only pull DNA samples

data_mule = loadcsv('species.txt', usecols=xrange(2,ncols,2))

data_mule_normalized = data_mule/sum(data_mule)

data_mule_with_counts = data_mule_normalized*counts

Repeat for every taxonomic level

```

識別來源於 cDNA 樣品之定序庫 3014。隨後將來自所識別之 cDNA 庫的定序讀數映射回至去複製品系之清單以便確定各樣品中之活性品系。若讀數之數目低於指定或指示之臨限值 3015，則品系被視為或識別為無活性的且自後續分析中移除 3015a。若讀數之數目超出臨限值 3015，則品系被視為或識別為具有活性且保留在分析中 3015b。隨後自輸出過濾無活性品系 3013，產生各樣品之活性品系及各別絕對數目/細胞計數之清單 3016。以下編碼片段展示根據一個實施例之用於此類處理之例示性方法：

```

# continued using variables from above

# Only pull RNA samples

active_data_mule = loadcsv('species.csv', usecols = xrange(3,ncols+1,2))

threshold = percentile(active_data_mule, 70)

for i in range(len(active_data_mule)):

    if data_mule_activity >= threshold

        multiplier[i] = 1

    else

        multiplier[i] = 0

active_data_mule_with_counts = multiplier * data_mule_with_counts

```

Repeat for every taxonomic level

識別、檢索及/或收集各樣品(樣品集、子樣品等)之定性及定量後設資料(例如，環境參數等) 3017且儲存3018於資料庫(例如，319)中。可識別適當後設資料，且視應用/實施方案而定，查詢資料庫以抽取各樣品之所識別及/或相關後設資料用於分析3019。隨後將後設資料之子集與活性品系及其相應絕對數目/細胞計數之清單合併，藉由樣品矩陣創建大物種及後設資料3020。

隨後計算品系與後設資料之間的最大資訊係數(MIC) 3021a及品系之間的最大資訊係數(MIC) 3021b。合併結果，創建所有關係及其相應MIC評分之清單3022。若關係評分低於給定臨限值3023，則關係被視為/識別為不相關3023b。若關係高於給定臨限值3023，則關係被視為/識別為相關3023a，且進一步進行網路分析3024。以下編碼片段展示根據一個實施例之用於此類分析之例示性方法：

```
Read total list of relationships file as links
```

```
threshold = 0.8
```

```
for i in range(len(links)):
```

```
    if links >= threshold
```

```
        multiplier[i] = 1
```

```
    else
```

```
        multiplier[i] = 0
```

```
end if
```

```
links_temp = multiplier*links
```

```
final_links = links_temp[links_temp != 0]
```

```
savetxt(output_file,final_links)
```

```
output_file.close()
```

基於網路分析之輸出選擇活性品系3025用於製備含有所選品系

物品系分類成至少兩個群組。舉例而言，該比較可為網路分析，其識別各別微生物品系之間及各微生物品系與後設資料之間及/或後設資料與微生物品系之間的關係。至少一種微生物可選自至少兩個群組，且組合形成微生物系集，其經組態以改變對應於至少一個後設資料之性質(例如目標之性質，諸如牛或牛種群之乳產量)。形成系集可包括分離該微生物品系或各微生物品系，基於分析選擇先前經分離之微生物品系，及/或基於分析使特定微生物品系培育/生長，及組合品系形成微生物系集。系集可包括允許以使得其中之微生物可影響接受者(例如，增加乳產量)之方式遞送系集中之微生物之適當介質、載劑及/或醫藥載劑。

獨特第一標記之數目的量測可包括量測各樣品中獨特基因組DNA標記之數目，量測各樣品中獨特RNA標記之數目，量測各樣品中獨特蛋白質標記之數目，及/或量測各樣品中獨特代謝物標記之數目(包括量測各樣品中獨特脂質標記之數目及/或量測各樣品中獨特碳水化合物標記之數目)。

在一些實施例中，量測獨特第一標記之數目及其數量包括對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應及/或對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。獨特第一標記可包括mRNA標記、siRNA標記及/或核糖體RNA標記中之至少一者。另外或或者，獨特第一標記可包括 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白及/或代謝酶中之至少一者。

在一些實施例中，量測至少一個獨特第二標記包括量測各樣品中至少一個獨特第二標記之表現量，且可包括對樣品中之mRNA進行基因表現分析。基因表現分析可包括定序反應、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

在一些實施例中，量測至少一個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析及/或對各樣品或其部分進行總體核糖

體剖析或核糖體剖析。一或多種微生物類型包括細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合，且一或多個微生物品系包括一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。一或多個微生物品系可為一或多個真菌物種或亞種，及/或一或多個微生物品系可為一或多個細菌物種或亞種。

在一些實施例中，確定各樣品中一或多個微生物類型各自之數目包括對各樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。

獨特第一標記可包括系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。量測獨特標記之數目及其數量可包括對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應，對基因組DNA進行基因組定序及/或對基因組DNA進行擴增子定序。

在一些實施例中，至少一種不同特性包括：對至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集時間，使得第一樣品之收集時間不同於第二樣品之收集時間；對至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集位置(地理位置差異及/或個別樣品目標/動物收集差異)，使得第一樣品之收集位置不同於第二樣品之收集位置。至少一種共同特性可包括樣品源類型，使得第一樣品之樣品源類型與第二樣品之樣品源類型相同。樣品源類型可為動物類型、器官類型、土壤類型、水類型、沈積物類型、油類型、植物類型、農產品類型、非根際土類型、根際土類型、

植物部分類型及/或其類似者中之一者。在一些實施例中，至少一種共同特性包括至少兩個樣品中之每一者為胃腸道樣品，其在一些實施方案中可為瘤胃樣品。在一些實施方案中，本文所提供之共同/不同特性實際上可為某些樣品之間的不同/共同特性。在一些實施例中，至少一種共同特性包括動物樣品源類型，各樣品具有另一共同特性，使得各樣品為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品或器官樣品。

在一些實施例中，上述方法可進一步包含基於至少一個經量測後設資料自目標獲得至少另一樣品，其中來自目標之至少另一樣品與至少兩個樣品共用至少一種共同特性。隨後，對於來自目標之至少另一樣品，偵測一或多種微生物類型之存在；確定一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；量測獨特第一標記之數目及其數量；整合各微生物類型之數目及第一標記之數目，產生所存在的各微生物品系之絕對細胞計數；量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定彼微生物品系之活性水準；藉由所確定之活性來過濾絕對細胞計數，提供來自目標之至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單。在該等實施例中，基於來自目標之至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單自至少兩個群組中選擇至少一個微生物品系，使得所形成之系集經組態以改變目標之對應於至少一個後設資料的性質。舉例而言，使用該實施方案，可自取自荷斯坦牛(Holstein cow)之樣品及取自澤西牛(Jersey cow)或水牛之目標樣品中識別微生物系集，其中分析識別原始樣品及目標樣品之相同或類似微生物品系之間的相同、實質上類似或類似網路關係。

在一些實施例中，對至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之經過過濾絕對細胞計數與至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量

測後設資料或額外活性微生物品系進行比較包括確定各樣品中之一或多個活性微生物品系與至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現。至少一個經量測後設資料可包括一或多個參數，其中一或多個參數為以下中之至少一者：樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、樣品源之體重、樣品源之餵食量、樣品源之體重增加、樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、樣品源之物理特性或量測值、樣品源之生產特性或其組合。參數亦可包括由樣品源產生之乳清蛋白豐度、酪蛋白豐度及/或乳脂豐度。

在一些實施例中，確定各樣品中一或多個活性微生物品系及至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現可包括創建以表示兩個或更多個樣品集中之後設資料及微生物品系相關性之鏈接、一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及一或多個獨特第二標記之量測值填充的矩陣，表示異源微生物群集之一或多個網路。確定一或多個活性微生物品系及至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現及對活性微生物品系進行分類可包括網路分析及/或叢集分析來量測網路內各微生物品系之連接性，網路表示共用共同特性、經量測後設資料及/或相關環境參數之至少兩個樣品之集合。網路分析及/或叢集分析可包括連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。叢集分析可包括構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型及/或質心模型。在一些實施方案中，網路分析可包括經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性、其組合及/或其類似者。網路分析可包含基於微分方程式之種群建模及/或洛特卡-沃爾泰拉建模。該分析可為啟發式方法。在一些實施例中，該分析可為魯汶法。網路分析可包括用於建立變數之間的連接性之非參數方

申請專利範圍

1. 一種方法，其包含：

獲得共用至少一種共同特性且具有至少一種不同特性之至少兩個樣品；

對於各樣品，偵測各樣品中一或多種微生物類型之存在；

確定各樣品中該一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；

量測各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，各獨特第一標記為微生物品系之標記；

整合各微生物類型之數目及該等第一標記之數目，產生各樣品中所存在之各微生物品系之絕對細胞計數；

基於指定臨限值量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定各樣品中之彼微生物品系的活性水準；

藉由所確定之活性來過濾該絕對細胞計數，提供該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單；

對該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之該等經過過濾絕對細胞計數與該至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行比較，且基於所預測之機能及/或化學性質將該等活性微生物品系分類成至少兩個群組；

自該至少兩個群組中選擇至少一個微生物品系；及

使來自該至少兩個群組之該所選至少一個微生物品系組合形成微生物系集，其經組態以改變對應於該至少一個後設資料之性質。

2. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特基因組DNA標記之數目。
3. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特RNA標記之數目。
4. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特蛋白質標記之數目。
5. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目包括量測各樣品中獨特代謝物標記之數目。
6. 如請求項5之方法，其中量測獨特代謝物標記之數目包括量測各樣品中獨特脂質標記之數目。
7. 如請求項5之方法，其中量測獨特代謝物標記之數目包括量測各樣品中獨特碳水化合物標記之數目。
8. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包括對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。
9. 如請求項1之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包括對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。
10. 如請求項1之方法，其中該等獨特第一標記包括mRNA標記、siRNA標記及/或核糖體RNA標記中之至少一者。
11. 如請求項1之方法，其中該等獨特第一標記包括 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白及/或代謝酶中之至少一者。
12. 如請求項1至11中任一項之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記包括量測各樣品中該至少一個獨特第二標記之表現量。
13. 如請求項12之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記之表現量包括對該樣品中之mRNA進行基因表現分析。
14. 如請求項13之方法，其中該基因表現分析包括定序反應。
15. 如請求項13之方法，其中該基因表現分析包括定量聚合酶鏈反

應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。

16. 如請求項12之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析。
17. 如請求項12之方法，其中量測該至少一個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行總體核糖體剖析或核糖體剖析。
18. 如請求項1至11中任一項之方法，其中該一或多種微生物類型包括細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合。
19. 如請求項1至11中任一項之方法，其中該一或多個微生物品系為一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。
20. 如請求項19之方法，其中該一或多個微生物品系為一或多個真菌物種或亞種；及/或其中該一或多個微生物品系為一或多個細菌物種或亞種。
21. 如請求項1至11中任一項之方法，其中確定各樣品中該一或多種微生物類型中之每一者的數目包括對各樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。
22. 如請求項1之方法，其中該等獨特第一標記包括系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。
23. 如請求項22之方法，其中量測獨特標記之數目及其數量包括對

各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。

24. 如請求項22之方法，其中量測獨特標記之數目及其數量包含對基因組DNA進行基因組定序。
25. 如請求項22之方法，其中量測獨特標記之數目及其數量包含對基因組DNA進行擴增子定序。
26. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種不同特性包括對該至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集時間，使得第一樣品之收集時間不同於第二樣品之收集時間。
27. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種不同特性包括對該至少兩個樣品中之每一者進行收集之收集位置，使得第一樣品之收集位置不同於第二樣品之收集位置。
28. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種共同特性包括樣品源類型，使得第一樣品之樣品源類型與第二樣品之樣品源類型相同。
29. 如請求項28之方法，其中該樣品源類型為動物類型、器官類型、土壤類型、水類型、沈積物類型、油類型、植物類型、農產品類型、非根際土類型、根際土類型或植物部分類型中之一者。
30. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種共同特性包括該至少兩個樣品中之每一者為胃腸道樣品。
31. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中該至少一種共同特性包括動物樣品源類型，各樣品具有另一共同特性，使得各樣品為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品或器官樣品。
32. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其進一步包含：

基於該至少一個經量測後設資料自目標獲得至少另一樣品，其中來自該目標之該至少另一樣品與該至少兩個樣品共用至少一種共同特性；及

對於來自該目標之該至少另一樣品，偵測一或多種微生物類型之存在；確定該一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；量測獨特第一標記之數目及其數量；整合各微生物類型之數目及該等第一標記之數目，產生所存在的各微生物品系之絕對細胞計數；量測各微生物品系之至少一個獨特第二標記以確定彼微生物品系之活性水準；藉由所確定之活性來過濾該絕對細胞計數，提供來自該目標之該至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單；

其中基於來自該目標之該至少另一樣品之活性微生物品系及其各別絕對細胞計數的清單自該至少兩個群組中之每一者中選擇該至少一個微生物品系，使得所形成之系集經組態以改變該目標之對應於該至少一個後設資料的性質。

33. 如請求項1至11及22至25中任一項之方法，其中對該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之該等經過濾絕對細胞計數與該至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行比較包括確定各樣品中之該一或多個活性微生物品系與該至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之共現。
34. 如請求項33之方法，其中該至少一個經量測後設資料包括一或多個參數，其中該一或多個參數為以下中之至少一者：樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、該樣品源之體重、該樣品源之餵食量、該樣品源之體重增加、該

樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、該樣品源之物理特性或量測值、該樣品源之生產特性或其組合。

35. 如請求項34之方法，其中該一或多個參數為乳清蛋白豐度、酪蛋白豐度及/或乳脂豐度中之至少一者。
36. 如請求項33之方法，其中確定各樣品中該一或多個活性微生物品系及該至少一個經量測後設資料之共現包括創建以表示後設資料及微生物品系相關性之鏈接、該一或多個活性微生物品系之絕對細胞計數及該一或多個獨特第二標記之量測值填充的矩陣，表示異源微生物群集之一或多個網路。
37. 如請求項36之方法，其中該至少一個經量測後設資料包含第二微生物品系之存在、活性及/或數量。
38. 如請求項33之方法，其中確定該一或多個活性微生物品系及該至少一個經量測後設資料之共現及對該等活性微生物品系進行分類包括網路分析及/或叢集分析來量測網路內各微生物品系之連接性，其中該網路表示共用共同特性、經量測後設資料及/或相關環境參數之至少兩個樣品之集合。
39. 如請求項38之方法，其中該至少一個經量測後設資料包含第二微生物品系之存在、活性及/或數量。
40. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析及/或叢集分析包括連鎖分析、模組化分析、穩固性量測、中間性量測、連接性量測、傳遞性量測、向心性量測或其組合。
41. 如請求項38至40中任一項之方法，其中該叢集分析包括構建連接性模型、子空間模型、分佈模型、密度模型或質心模型。
42. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包括經由鏈路挖掘及預測進行網路之預測建模、集合分類、基於鏈路之叢集、關係相似性或其組合。

43. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包含基於微分方程式之種群建模。
44. 如請求項43之方法，其中該網路分析包含洛特卡-沃爾泰拉 (Lotka-Volterra) 建模。
45. 如請求項38或39之方法，其中該叢集分析為啟發式方法。
46. 如請求項45之方法，其中該啟發式方法為魯汶法 (Louvain method)。
47. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包括用於建立變數之間的連接性之非參數方法。
48. 如請求項38或39之方法，其中該網路分析包括變數之間用於建立連接性之相互資訊及/或最大資訊係數計算。
49. 一種用於形成活性微生物品系之系集的方法，該系集經組態以改變基於在兩個或更多個樣品集之間共用至少一個共同或相關環境參數且在該兩個或更多個樣品集之間具有至少一個不同環境參數的兩個或更多個樣品集之環境之性質或特性，各樣品集包含包括異源微生物群集之至少一個樣品，其中該一或多個微生物品系為一或多種生物類型之亞分類單元，該方法包含：
 - 偵測各樣品中複數種微生物類型之存在；
 - 確定各樣品中該等偵測到的微生物類型中之每一者之細胞的絕對數目；
 - 量測各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，其中獨特第一標記為微生物品系之標記；
 - 以蛋白質或RNA含量，量測一或多個獨特第二標記之表現量，其中獨特第二標記為微生物品系之活性的標記；
 - 基於該一或多個獨特第二標記之超出指定臨限值的表現量來確定各樣品之該等偵測到的微生物品系之活性；

基於該一或多個第一標記之數量及該一或多個微生物品系為亞分類單元之微生物類型之細胞的絕對數目來計算各樣品中各偵測到的活性微生物品系之絕對細胞計數，其中該一或多個活性微生物品系表現高於該指定臨限值之第二獨特標記；

基於最大資訊係數網路分析確定該等樣品中該等活性微生物品系與至少一個環境參數或額外活性微生物品系之共現以量測網路內各微生物品系之連接性，其中該網路為該至少兩個或更多個樣品集與至少一個共同或相關環境參數之集合；

基於該網路分析自該一或多個活性微生物品系中選擇複數個活性微生物品系；及

由該所選複數個活性微生物品系形成活性微生物品系之系集，當活性微生物品系之該系集被引入環境中時活性微生物品系之該系集經組態以選擇性改變彼環境之性質或特徵。

50. 如請求項49之方法，其中該至少一個環境參數包含第二微生物品系之存在、活性及/或數量。
51. 如請求項49或50之方法，其中第一樣品集之至少一個共同或相關環境因子之至少一個量測標誌不同於第二樣品集之至少一個共同或相關環境因子之量測標誌。
52. 如請求項49或50之方法，其中各樣品集包含複數個樣品，且樣品集內各樣品之至少一個共同或相關環境因子之量測標誌實質上類似，且一個樣品集之平均量測標誌不同於另一樣品集之平均量測標誌。
53. 如請求項49或50之方法，其中各樣品集包含複數個樣品，且第一樣品集自第一種群收集且第二樣品集自第二種群收集。
54. 如請求項49或50之方法，其中各樣品集包含複數個樣品，且第一樣品集在第一時間自第一種群收集且第二樣品集在不同於該

第一時間之第二時間自該第一種群收集。

55. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括營養資訊。
56. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括膳食資訊。
57. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括動物特性。
58. 如請求項49或50之方法，其中至少一個共同或相關環境因子包括感染資訊或健康狀況。
59. 如請求項51之方法，其中至少一個量測標誌為樣品pH、樣品溫度、脂肪豐度、蛋白質豐度、碳水化合物豐度、礦物質豐度、維生素豐度、天然產品豐度、指定化合物豐度、該樣品源之體重、該樣品源之餵食量、該樣品源之體重增加、該樣品源之餵食效率、一或多個病原體之存在或不存在、該樣品源之物理特性或量測值、該樣品源之生產特性或其組合。
60. 如請求項49或50之方法，其中該至少一個參數為乳清蛋白豐度、酪蛋白豐度及/或乳脂豐度中之至少一者。
61. 如請求項49或50之方法，其中量測各樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特基因組DNA標記之數目。
62. 如請求項49或50之方法，其中量測該樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特RNA標記之數目。
63. 如請求項49或50之方法，其中量測該樣品中獨特第一標記之數目包含量測獨特蛋白質標記之數目。
64. 如請求項49或50之方法，其中該複數種微生物類型包括一或多個細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合。

65. 如請求項49或50之方法，其中確定各樣品中該等微生物類型中之每一者之絕對細胞數目包括對該樣品或其部分進行定序、離心、光學顯微術、螢光顯微術、染色、質譜分析、微流體、定量聚合酶鏈反應(qPCR)、凝膠電泳及/或流式細胞測量術。
66. 如請求項49或50之方法，其中一或多個活性微生物品系為選自一或多個細菌、古菌、真菌、原蟲、植物、其他真核生物、病毒、類病毒或其組合之一或多種微生物類型之亞分類單元。
67. 如請求項49或50之方法，其中一或多個活性微生物品系為一或多個細菌品系、古菌品系、真菌品系、原蟲品系、植物品系、其他真核生物品系、病毒品系、類病毒品系或其組合。
68. 如請求項49或50之方法，其中一或多個活性微生物品系為一或多個真菌物種、真菌亞種、細菌物種及/或細菌亞種。
69. 如請求項49或50之方法，其中至少一個獨特第一標記包含系統發育標記，系統發育標記包含5S核糖體亞單位基因、16S核糖體亞單位基因、23S核糖體亞單位基因、5.8S核糖體亞單位基因、18S核糖體亞單位基因、28S核糖體亞單位基因、細胞色素c氧化酶亞單位基因、 β -微管蛋白基因、伸長因子基因、RNA聚合酶亞單位基因、內轉錄間隔區(ITS)或其組合。
70. 如請求項49或50之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包含對各樣品之基因組DNA進行高通量定序反應。
71. 如請求項49或50之方法，其中量測獨特第一標記之數目及其數量包含對各樣品之基因組DNA進行總體基因組定序。
72. 如請求項49或50之方法，其中獨特第一標記包含mRNA標記、siRNA標記或核糖體RNA標記。
73. 如請求項49或50之方法，其中獨特第一標記包含 σ 因子、轉錄因子、核苷相關蛋白、代謝酶或其組合。

74. 如請求項49或50之方法，其中量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對該樣品中之mRNA進行基因表現分析。
75. 如請求項74之方法，其中該基因表現分析包含定序反應。
76. 如請求項74之方法，其中該基因表現分析包含定量聚合酶鏈反應(qPCR)、總體轉錄組定序及/或轉錄組定序。
77. 如請求項49或50之方法，其中量測一或多個獨特第二標記之表現量包括對各樣品或其部分進行質譜分析。
78. 如請求項49或50之方法，其中量測一或多個獨特第二標記之表現量包含對該樣品或其部分進行總體核糖體剖析及/或核糖體剖析。
79. 如請求項49或50之方法，其中該等樣品之源類型為動物、土壤、空氣、鹹水、淡水、廢水污泥、沈積物、油、植物、農產品、非根際土、根際土、植物部分、蔬菜、極端環境或其組合中之一者。
80. 如請求項49或50之方法，其中各樣品為胃腸道樣品。
81. 如請求項49或50之方法，其中各樣品為組織樣品、血液樣品、牙齒樣品、汗液樣品、指甲樣品、皮膚樣品、毛髮樣品、糞便樣品、尿液樣品、精液樣品、黏液樣品、唾液樣品、肌肉樣品、腦樣品或器官樣品中之一者。
82. 一種處理器實施之方法，其包含：
 - 接收來自共用至少一種共同特性且具有至少一種不同特性之至少兩個樣品的樣品資料；
 - 對於各樣品，確定各樣品中一或多種微生物類型之存在；
 - 確定各樣品中該一或多種微生物類型之各偵測到的微生物類型之數目；
 - 確定各樣品中獨特第一標記之數目及其數量，各獨特第一標

記為微生物品系之標記；

經由處理器整合各微生物類型之數目及該等第一標記之數目，產生各樣品中所存在之各微生物品系之絕對細胞計數；

基於各微生物品系之至少一個獨特第二標記之超出指定臨限值的量測值來確定各樣品中各微生物品系之活性水準，若一微生物品系之至少一個獨特第二標記之量測值超出相應臨限值，則該品系被識別為具有活性；

藉由所確定之活性來過濾各微生物品系之該絕對細胞計數，提供該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系及其各別絕對細胞計數之清單；

經由至少一個處理器對該至少兩個樣品中之每一者的活性微生物品系之該等經過過濾絕對細胞計數與該至少兩個樣品中之每一者的至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系進行網路分析，該網路分析包括確定各活性微生物品系與每一其他活性微生物品系之間的最大資訊係數評分及確定各活性微生物品系與各別至少一個經量測後設資料或額外活性微生物品系之間的最大資訊係數評分；

基於所預測之機能及/或化學性質對該等活性微生物品系進行分類；

基於該分類識別複數個活性微生物品系；及

輸出該所識別之複數個活性微生物品系。

83. 如請求項82之處理器實施之方法，其進一步包含：

組合活性微生物系集，活性微生物系集在應用於目標時經組態以改變對應於該至少一個經量測後設資料之性質。

84. 如請求項82之處理器實施之方法，其中該輸出的複數個活性微生物品系用於組合活性微生物系集，該活性微生物系集在應用

於目標時經組態以改變對應於該至少一個經量測後設資料之性質。

85. 如請求項82之處理器實施之方法，其進一步包含：基於該輸出的複數個所識別之活性微生物品系識別至少一個病原體。
86. 如請求項82至85中任一項之處理器實施之方法，其中該輸出的複數個活性微生物品系進一步用於組合活性微生物系集，該活性微生物系集在應用於目標時經組態以靶向該至少一個所識別病原體及治療及/或預防與該至少一個所識別病原體相關之症狀。

