

# 纳米孔测序技术在环境微生物研究中的应用

李中宏<sup>1,2</sup>, 杜彩丽<sup>1</sup>, 林彦锋<sup>3</sup>, 张列宇<sup>1</sup>, 李晓光<sup>1</sup>, 黎佳茜<sup>1</sup>, 陈素华<sup>2</sup>

1 中国环境科学研究院 国家环境保护地下水污染过程模拟与控制重点实验室, 北京 100012

2 南昌航空大学 环境与化学工程学院, 江西 南昌 330063

3 中国人民解放军疾病预防控制中心 生物安全科, 北京 100071

李中宏, 杜彩丽, 林彦锋, 张列宇, 李晓光, 黎佳茜, 陈素华. 纳米孔测序技术在环境微生物研究中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(1): 5-13.

LI ZH, DU CL, LIN YF, ZHANG LY, LI XG, LI JX, CHEN SH. Application of nanopore sequencing in environmental microbiology research. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 5-13.

**摘要:** 高通量测序技术是研究环境微生物的有效手段, 而以纳米孔测序为代表的第三代测序技术以其测序读长长、测序速度快、测序数据实时监控、仪器方便携带、无 GC 偏好性、无需经过 PCR 扩增等显著优势有力推动了环境微生物研究的发展。本文对纳米孔测序技术的技术原理和特点进行了简要概述, 重点介绍了纳米孔测序技术在环境微生物扩增子测序、宏基因组测序、全基因组测序等领域的研究应用, 并分析了纳米孔测序技术在环境微生物应用中的优势及存在的问题。

**关键词:** 纳米孔测序技术; 扩增子测序; 宏基因组测序; 全基因组测序; 环境微生物

## Application of nanopore sequencing in environmental microbiology research

LI Zhonghong<sup>1,2</sup>, DU Caili<sup>1</sup>, LIN Yanfeng<sup>3</sup>, ZHANG Lieyu<sup>1</sup>, LI Xiaoguang<sup>1</sup>, LI Jiayi<sup>1</sup>, CHEN Suhua<sup>2</sup>

1 State Environmental Protection Key Laboratory of Simulation and Control of Groundwater Pollution, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

2 School of Environmental and Chemical Engineering, Nanchang Hangkong University, Nanchang 330063, Jiangxi, China

3 Department of Biological Safety, Center for Disease Control and Prevention of People's Liberation Army of China, Beijing 100071, China

**Abstract:** The development of high-throughput sequencing techniques enabled a deeper and more

**Received:** January 27, 2021; **Accepted:** April 2, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2019YFC0409202)

**Corresponding author:** LI Xiaoguang. Tel: +86-10-84918164; E-mail: xgli1982@163.com

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2019YFC0409202)

comprehensive understanding of environmental microbiology. Specifically, the third-generation sequencing techniques represented by nanopore sequencing have greatly promoted the development of environmental microbiology research due to its advantages such as long sequencing reads, fast sequencing speed, real-time monitoring of sequencing data, and convenient machine carrying, as well as no GC bias and no PCR amplification requirement. This review briefly summarized the technical principle and characteristics of nanopore sequencing, followed by discussing the application of nanopore sequencing techniques in the amplicon sequencing, metagenome sequencing and whole genome sequencing of environmental microorganisms. The advantages and challenges of nanopore sequencing in the application of environmental microbiology research were also analyzed.

**Keywords:** nanopore sequencing technique; amplicon sequencing; metagenome; whole genome sequencing; environmental microbiology

环境微生物学是研究污染环境中的微生物学,其主要研究对象为生物群落的分布、多样性结构以及遗传特征和特定环境之间的作用。近年来,环境微生物学在环境科学、医学健康及生物科学等交叉领域得到重要发展。然而,微生物有着个体微小、新陈代谢旺盛、易扩散及变异能力强等特征,现有研究对环境微生物的作用机理、群体效应和遗传机制仍缺乏足够的了解。目前现有的传统微生物分离和培养技术无法对自然环境中大部分微生物进行培养和定量<sup>[1]</sup>,无法观察到微生物间的相互作用,无法反映环境中的微生物群落结构组成及多样性特征,且易对微生物生长产生抑制作用,从而制约了传统微生物分离和培养技术的应用<sup>[2]</sup>。基于此,亟需开发通用、高效的技术方法,用于获取环境中微生物群落的组成、结构和功能信息。荧光原位杂交 (FISH)、末端限制性酶切片长度多态性分析 (T-RFLP)、变形梯度凝胶电泳 (DGGE)、聚合酶链式反应 (PCR)、基因芯片技术等分子生物学技术在环境微生物研究中虽无需微生物分离和培养步骤,但易受到样品质量、样品采集等因素的影响,无法满足环境微生物研究的需求<sup>[3]</sup>。

在过去的 15 年中,人们对微生物的研究实

现了质的飞跃,主要得益于高通量测序技术的应用。1977 年 Sanger 等<sup>[4]</sup>发明的双脱氧链核苷酸终止法被称为第一代测序技术。Sanger 测序法的出现极大地促进了现代分子生物学的研究,且凭借其操作简单、读取序列长 (700–900 bp)、准确率高等优点,使人类得以在 1990 年开始人类基因组计划。但该方法在测序时存在速度相对较慢、通量低、成本较高等问题,无法进行广泛的商业化应用。2005 年以边合成边测序 (sequencing by synthesis, SBS) 为测序原理的 Roche GS-FLX 454 平台的问世彻底变革了测序技术,随后出现的 Illumina Solexa 和 ABI SOLiD 等二代测序平台也极大地推动了高通量测序技术的发展。相比于 Sanger 一代测序法,二代测序技术的测序通量大大提高,但其读长短 (仅 30–450 bp) 及扩增过程容易产生引入外源基因引起错配等不足限制了其进一步发展<sup>[5]</sup>。近 10 年来,测序技术逐渐出现了以单分子实时测序技术 (single molecule real time sequencing, SMRT) 和纳米孔单分子测序技术 (single-molecule nanopore DNA sequencing) 为代表的第三代测序技术<sup>[6]</sup>。

牛津纳米孔技术公司 (Oxford nanopore technologies, ONT) 的单分子纳米孔测序技术

是近几年来兴起的新一代测序技术,该技术能够实现单分子测序,具有测序读长长、测序速度快、可实时监控测序数据、仪器方便携带等特点。不同于 Sanger 测序、焦磷酸测序、边合成边测序、连接法测序和单分子实时测序 (SMRT) 等方法,纳米孔测序技术可直接对 DNA 链进行识别而无需 DNA 合成<sup>[7-8]</sup>。纳米孔测序技术已经广泛应用于医学<sup>[9]</sup>、流行病学<sup>[10]</sup>、食品<sup>[11]</sup>、农业<sup>[12]</sup>和环境科学<sup>[13]</sup>等诸多领域。随着纳米孔测序技术的不断发展,该技术逐渐成为了研究环境微生物不可或缺的方法之一。因此,全面系统地了解纳米孔测序技术对环境微生物研究有着重要意义。本文对纳米孔测序技术的原理性能及其在环境微生物领域的应用进行了综述。

## 1 纳米孔测序技术原理

ONT 纳米孔测序技术的技术原理是采用“边解链边测序”的方法,通过电信号来实现对基因组上碱基的测定(图 1)。纳米孔测序系统的核心是纳米孔,纳米孔是一个外表面由脂质双分子层而且两端分别各有一对电极的跨膜蛋白

白构成的纳米孔通道<sup>[14]</sup>,不同版本的测序芯片的主要区别在于其使用的跨膜蛋白不同。当 DNA 分子通过纳米孔时,电流会受到干扰,由于不同碱基对电流的影响不同,便可通过电流的变化特征实现对不同碱基的判定<sup>[15]</sup>。

## 2 纳米孔测序技术特点

### 2.1 简单便携

纳米孔测序技术简单便携,无需成像系统便可直接检测核酸序列,这使得整体仪器的系统体积缩小成为可能,可以方便地移植到不同平台。当前的 MinION 测序平台,重量仅为 90 g,大小为 3.3 cm×10.5 cm×2.3 cm,仅有手掌大小,并通过笔记本电脑的通用串行总线 (USB) 端口连接计算机,有助于研究人员在极端条件下完成以往在现场不可能完成的实验,解决了生物材料运输受到物理条件限制时而遇到的困难。目前,MinION 测序仪已经成功在热带雨林<sup>[16]</sup>、南极干谷<sup>[17]</sup>、北极高海拔冰川<sup>[18]</sup>、国际空间站<sup>[19]</sup>等场景下完成测序,有效突破了地域和实验条件的限制,实现现场微生物遗传信息的快速检测。

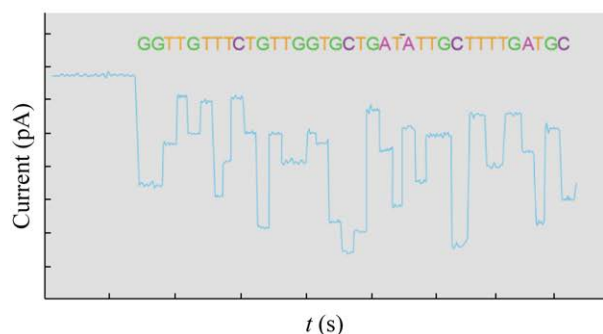
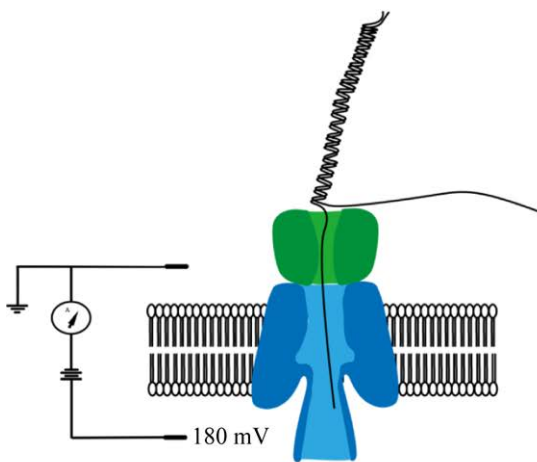


图 1 纳米孔测序技术示意图

Figure 1 Schematic representation of nanopore sequencing technique.

## 2.2 无需扩增

DNA 测序过程中基因组鸟嘌呤和胞嘧啶所占的比率 (GC 含量) 对测序结果质量有着较大的影响。第二代测序技术中文库构建及测序过程均会涉及 PCR 的扩增过程, 而 GC 含量过高和 GC 含量过低的基因组区域难以被 PCR 扩增, 从而导致测序结果中基因组的覆盖组不足<sup>[20]</sup>。而纳米孔测序技术在测序过程中无需扩增, 不需要通过 PCR 对碱基进行信号放大, 避免了在 PCR 过程中出现碱基错配。无需 DNA 聚合酶或者连接酶, 亦不需 dNTPs, 理论上只经过核酸提取步骤即可得到足够长度的序列, 进而进行检测。

## 2.3 超长读长

在纳米孔测序中, 读长长度不受限于测序设备, 读长长度可以等于输入片段长度, 纳米孔测序读长通常超过 20 kb<sup>[21]</sup>。长读长具有诸多优势, 如何提高基因组组装的准确率和效率, 特别是覆盖低复杂性序列区域 (low-complexity region, LCR) 获得更高质量、更完整、更连续的基因组<sup>[22]</sup>。同时, 在序列比对和检测结构变异等方面, 长读长也具有明显的优势。

## 2.4 错误率高

相比于第一代和第二代测序技术, 错误率高是目前纳米孔测序的主要缺点。根据分子类型和文库制备方法的不同, 错误率范围在 5%–20% 之间, 错误类型主要包括插入和删除<sup>[23]</sup>。不同于 Pacific Bioscience 公司的单分子实时测序, 纳米孔测序技术有系统错误, 通常需要短读长对其进行纠错。目前, base-calling 等生物信息学纠错软件可改善纳米孔测序错误率较高的问题。

# 3 纳米孔测序技术在环境微生物中的应用

扩增子测序、宏基因组测序及全基因组测

序是目前纳米孔测序技术在环境微生物中的主要应用领域。

## 3.1 扩增子测序

扩增子测序是对 16S rRNA/18S rRNA/ITS 等功能基因特定区段的 PCR 产物进行高通量测序, 被广泛应用于环境样品的微生物群落结构分析<sup>[24]</sup>。大多数细菌含有 16S rRNA 基因, 该基因由 9 个高度可变区组成, 两侧都有保守序列<sup>[25]</sup>。对于不同菌种而言保守区的差异不是很明显, 通过分析保守区可以反映不同物种之间的亲缘关系; 而高变区则在种或者是属等方面具有较大的差异性。所以在对微生物系统发育以及相关的分类鉴定时, 16S rRNA 基因成为国际公认的一项指标。由于二代测序读长比较短, 在对 16S rRNA 基因进行测序时只能分析单个或者连续两个不同的可变区, 且由于选区的偏好性导致的局限性, 往往很难达到精细的分类鉴定, 无法反映微生物群落的真实情况<sup>[26]</sup>。纳米孔测序技术平均读长达到 20 kb, 可完全覆盖原核微生物 16S rRNA 基因, 甚至整个核糖体操纵子。全长 16S rRNA 基因测序获得全部变异区域序列信息, 不仅能提高物种鉴定的分辨率, 还能提高样本中微生物组成鉴定的精确度, 从而更加真实地反映样本中微生物的群落结构。同样, 纳米孔测序技术亦可用于真核生物 (18S rRNA 基因) 和真菌 (ITS 基因) 的鉴定和多样性分析。Krishnaswamy 等<sup>[27]</sup>使用 Nanopore MinION 测序仪, 对处理含偶氮染料纺织废水的活性污泥微生物群落 16S rRNA 基因全长进行测序, 分析了微生物群落结构组成及代谢的多样性。结果显示, 共获得 30 700 条读长, 其中 28 245 条读长可以被分类, 2 455 条读长不可被分类; 并且鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌 *Burkholderia pseudomalle* MSHR3960 的读长数量最多, 占有分类读长的 13.79%, 其次为伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia* sp.

JKS000303, 占有分类读长的 10.34%。使用全长 16S rRNA 基因对物种多样性、微生物组成进行研究, 可以显著提升实验的准确性和分辨率, 同时将研究深入到种水平, 而不是局限在属水平上<sup>[28]</sup>。

二代测序读长较短的不足, 使其无法获取物种全部相关代谢功能信息, 限制了其对菌群代谢功能的深入理解<sup>[29]</sup>。Krishnaswamy 等<sup>[27]</sup>通过 Metacyc 数据库对活性污泥微生物群落中的基因和蛋白质进行预测, 对编码各种蛋白质、tRNA、rRNA 的基因进行注释。结果显示, 被鉴定为插入元件、转座元件和编码 Lysil-tRNA 的基因, 占有功能注释基因的 16%。甲基-tRNA 甲酰转移酶 (methyl-tRNA formyltransferase)、肽脱甲酰基酶 (peptide deformylase)、Rossmann 折叠核苷酸结合 (Rossmann fold nucleotide binding)、DNA 拓扑异构酶 III (DNA topoisomerase III) 等功能占潜在功能的 14%。在通路注释中, 胺类 (amines)、多胺类 (polyamines)、芳香族化合物 (aromatic compounds)、碳水化合物 (carbohydrates)、羧化物 (carboxylates)、氯化化合物 (chlorinated compound)、环己烷 (cyclohexane) 和聚合物化合物 (polymeric compound) 的降解占主要。参与降解有机和无机物质的不同微生物占污泥微生物的主导地位, 这一结果为深入探究在活性污泥中发挥作用的各種生物提供数据基础。

除了用于细菌的 16S rRNA 基因的多样性检测分析, 纳米孔测序技术还广泛应用于真菌的微生物多样性检测分析, Samson 等<sup>[30]</sup>使用 MinION 测序仪对恒河和亚穆纳河两条河流交汇处沉积物中真菌的多样性进行分析, 结果共鉴定出 63 个操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU), 其中曲霉属 *Aspergillus*、青霉属 *Penicillium*、克鲁弗氏酵母属

*Kluveromyces*、娄德酵母属 *Lodderomyces* 和那卡酵母属 *Nakaseomyces* 等真菌可能为河流汇合区污染和富营养化的潜在生物标志。

### 3.2 宏基因组测序

宏基因组测序是指应用高通量测序技术对样品中全部 DNA (或 RNA) 序列进行测序, 而不需要对特定标记基因进行扩增。宏基因组不仅可以对微生物群进行深入的分类鉴定, 而且可以同时比较微生物群中所有生物的相对丰度。与 16S rRNA 基因测序等扩增子测序相比, 宏基因组测序的主要优点是能够将微生物群中的细菌鉴定到其物种/菌株水平<sup>[31]</sup>。此外, 宏基因组还可以提供关于样本中存在的所有基因、基因组结构和组织、微生物群落结构及进化关系的全面信息。

相比于 ELISA、PCR 和杂交芯片等传统病原微生物检测技术, 以二代测序为代表的高通量测序技术 (next generation sequencing, NGS) 准确性较好, 不依赖于培养, 既可减少微生物鉴定所需要的成本和时间, 也可用于检测不可培养的微生物。但 NGS 技术亦存在一些不足, 如鉴定细菌时通常只达到属水平, 并只能估计微生物大概的比例<sup>[32]</sup>; 且其读长短, 很难获得病原微生物完整的序列及抗生素抗性基因和毒力基因序列; 测序时间亦稍长于其他技术<sup>[33]</sup>。这些不足使其无法确定实际感染的风险。

三代测序具有读长长、测序时间短等特点<sup>[34]</sup>, 传统方法只能以已知病毒为目标, 很难发现新的病毒, 而病毒宏基因组学的方法则结合新一代的测序技术和随机 PCR 技术, 能够挖掘海量的未知病毒, 且不需要分离培养, 对一些过于分散、丰度低的病毒也可以进行系统分析和鉴定<sup>[35]</sup>。对病毒研究来说, 纳米孔测序技术的超长读长使其可以覆盖绝大多数病毒基因组, 在病毒相关疫情监测、病毒全基因组测序、病毒

的进化与遗传变异等研究方面拥有显著优势<sup>[36]</sup>。

纳米孔测序技术可以更好地挖掘环境微生物中的病毒资源,揭示环境微生物和病毒的多样性及其与环境之间的关系。Overholt 等<sup>[13]</sup>研究发现与二代 Illumina 测序技术相比,纳米孔测序技术可以鉴定的细菌和古菌数量增加了 1 倍,并鉴定出 4 倍的疑似病毒序列以及 10 倍以上的假定噬菌体序列,鉴定时间也大大缩短。Bialasek 等<sup>[37]</sup>基于 MinION 测序平台,通过宏基因组学快速鉴定出城市雨水中的 37 种多重耐药细菌、11 种耐药类型和多种病毒,还发现有携带抗生素抗性基因的人类致病菌(博德特氏菌 *Bordetella* 和贪婪丙酸杆菌 *Propionibacterium avidum*)。这表明,MinION 测序技术可快速筛查环境样本中潜在的未知病原微生物,尤其是人类致病菌,是未来环境样本中未知病原微生物检测的重要手段。

纳米孔测序技术具有轻量、可携带等优点,使其可以突破地域限制,在极端环境中通过宏基因组学测序实现微生物的鉴定。Carr 等<sup>[38]</sup>模拟了在木星、木卫二和月球附近等低重力环境,纳米孔测序仪的性能依然能保持一致。NASA 约翰逊航天中心的微生物学家 Castro-Wallace 等测试了在太空站环境中的无重力条件下,将纳米孔测序技术用于鉴定噬菌体 ( $\lambda$ )、细菌(大肠杆菌)和哺乳动物(老鼠)等标准样品,结果显示,MinION 测序仪的数据输出量和数据量都没有受失重的影响,验证了纳米孔测序技术在国际空间站动态环境中对环境微生物的快速原位诊断和鉴定的可行性<sup>[19]</sup>。

### 3.3 全基因组测序

全基因组测序是指在没有任何参考序列情况下,利用生物信息学方法来实现对物种序列的拼接以及组装,进而得到该物种的基因组图谱<sup>[39]</sup>。全基因组测序有利于人们深入了解物种

的基因组成以及分子进化,第二代测序技术读长相对较短,细菌/真菌基因组中的高重复区域和高 GC 区域的组装问题难以解决,组装后的基因组中往往存在很多缺失序列。而三代测序技术以其超长的测序读长和无 GC 偏好性等优势克服了上述部分难题,在单细菌/真菌的基因组组装中取得了重大突破<sup>[40]</sup>。目前,利用纳米孔测序技术对不同环境介质中分离出的细菌进行全基因组测序技术已经非常成熟。Sher 等通过 Illumina 测序平台和 Nanopore 测序平台对从工业废水中分离出来的 1 株携带多重金属基因的细菌进行全基因组测序,并组装出完整序列,经 16S rRNA 序列鉴定为藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 并命名为 AS2<sup>[41]</sup>。藤黄微球菌 AS2 基因组大小为 2.86 Mbp,GC 含量为 72.8%。使用 PROKKA 对染色体上的 2 682 个编码序列进行预测并基因注释,结果表明,分离到的菌株携带有砷、镉、汞、锌和镍金属抗性相关的基因。Jose 等使用纳米孔测序技术对 1 株水源霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 进行全基因组测序,MinION 测序仪共产生了 17 901 条读长,151 833 237 个碱基,平均长度为 8 551 bp,覆盖深度为 38 $\times$ 。最长序列长度为 86 745 bp。经 Canu 组装后的序列占基因组分数的 89.97%。组装后的序列 GC 含量为 47.72%,N50 值为 2 984 kb。通过纳米孔测序成功获得了霍乱弧菌的近全长基因组<sup>[42]</sup>。Finton 等<sup>[43]</sup>通过二代测序平台 Illumina MiSeq 及三代测序平台 Oxford Nanopore MinION 对校园池塘水样中分离出来的抗生素耐药细菌进行全基因组测序,鉴定出了大肠杆菌、肺炎克雷伯菌及旁壶霍尔德菌。全基因组测序数据分析显示,肠杆菌携带了包括 *bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CMY</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>KPC-like</sub> 等基因在内的  $\beta$ -内酰胺酶类抗生素抗性基因和包括铁捕获系统 (*chuA*, *fyuA*, *iroN*, *irp1*, *irp2*,

*iuc*, *iutA*, *sitA*)、保护素 (*kpsS*, *kpsM*) 血清抗性 (*iss*, *traT*)、黏附素 (*csg*, *eilA*, *dr/afa*, *fdeC*, *fimH*, *iha*, *pap*) 及毒素 (*astA*, *hlyD*, *sat*, *vat*, *hbp*) 等在内的 UPEC 相关毒力基因。抗生素耐药性的定量监测有利于我们了解和掌握抗生素耐药性的潜在环境健康风险, 纳米孔测序技术通过对环境介质中多重耐药细菌的全基因组分析可快速获得其携带的耐药性信息。Sorokin 等从 Kulunda Steppe 高盐碱湖中分离出 1 株新的嗜盐菌种 AB-CW3, 通过 Nanopore 测序技术和 Illumina 测序技术相结合组装出 AB-CW3 的完整基因组, 发现其携带并表达了 1 种迄今为止只由革兰氏阳性细菌才会产生的抗菌肽抗生素<sup>[44]</sup>。将 AB-CW3 的全基因组与其他 18 个来自海洋、高盐和碱湖生境的向文洲菌 *Wenzhouxiangella* 基因组进行进化分析, 发现 AB-CW3 与其他 *Wenzhouxiangella* 菌株的进化距离较远, 将其命名为“*Wenzhouxiangella alkaliphil*”。纳米孔测序技术还被用于解析和分离贻贝<sup>[45]</sup>、养猪场<sup>[46]</sup>和医院<sup>[47]</sup>等不同环境介质中的多重耐药菌的全基因组及遗传结构。

## 4 讨论

目前, 一代测序技术和二代测序技术已经非常成熟, 尤其是二代测序技术已经成为环境微生物研究的主要技术, 但由于一代测序技术和二代测序技术存在一些不足, 第三代测序技术越来越受到研究学者的关注。以纳米孔测序技术为代表的第三代测序技术, 凭借其读长长、简单便携和实时数据监测等特点成为环境微生物研究的主流手段。目前 ONT 公司已经推出更高通量的测序平台 GridION 和 PromethION, 并致力于开发可在手机上进行测序的、更为小巧轻便的 SmidgION 测序仪和自动化文库制备的微流控设备 VolTRAX, 这表明纳米孔测序技术

在向通量更高、便携性更强、自动化程度更高的方向发展。MinION 测序长度已可以达到 150 kb<sup>[48]</sup>, 随着纳米孔测序技术的完善, 其测序长度可以得到更大的提升。纳米孔测序技术因其独特的基于电信号的测序原理, 目前依旧存在着错误率高和测序成本较高的问题<sup>[49]</sup>, 且很多纳米孔测序技术的数据分析开发不如二代测序, 仍需开发高效的计算方法和分析工具。

随着纳米孔测序技术的不断发展和完善, 纳米孔测序技术不断替代传统的二代测序技术, 并在扩增子测序、宏基因(组)和全基因组测序, 甚至是宏转录组等研究领域发挥作用<sup>[50]</sup>。可以预见在不久的将来, 纳米孔测序技术将突破传统分子生物学方法和二代测序的瓶颈, 在环境微生物领域研究中展示其独特的优势。

## REFERENCES

- [1] Overmann J, Abt B, Sikorski J. Present and future of culturing bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 711-730.
- [2] Daims H, Wagner M. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(2): 237-248.
- [3] Li RY, Zhang T, Fang HHP. Application of molecular techniques on heterotrophic hydrogen production research. *Bioresour Technol*, 2011, 102(18): 8445-8456.
- [4] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [5] Shokralla S, Gibson JF, Nikbakht H, et al. Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14(5): 892-901.
- [6] Treffer R, Deckert V. Recent advances in single-molecule sequencing. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(1): 4-11.
- [7] Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4(4): 265-270.
- [8] Branton D, Deamer DW, Marziali A, et al. The potential

- and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1146-1153.
- [9] Wang KY, Li PH, Lin YF, et al. Metagenomic diagnosis for a culture-negative sample from a patient with severe pneumonia by nanopore and next-generation sequencing. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 182.
- [10] Pfefferle S, Huang JB, Nörz D, et al. Complete genome sequence of a SARS-CoV-2 strain isolated in northern Germany. *Microbiol Resour Announc*, 2020, 9(23): e00520-20.
- [11] Cao Y, Fanning S, Proos S, et al. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1829.
- [12] Cui C, Herlihy JH, Bombarely A, et al. Draft assembly of *Phytophthora capsici* from long-read sequencing uncovers complexity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2019, 32(12): 1559-1563.
- [13] Overholt WA, Hölzer M, Geesink P, et al. Inclusion of Oxford nanopore long reads improves all microbial and viral metagenome-assembled genomes from a complex aquifer system. *Environ Microbiol*, 2020, 22(9): 4000-4013.
- [14] Feng Y, Zhang Y, Ying C, et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(1): 4-16.
- [15] Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(5): 265-279.
- [16] Menegon M, Cantaloni C, Rodriguez-Prieto A, et al. On site DNA barcoding by nanopore sequencing. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0184741.
- [17] Johnson SS, Zaikova E, Goerlitz DS, et al. Real-time DNA sequencing in the Antarctic dry valleys using the Oxford nanopore sequencer. *J Biomol Tech*, 2017, 28(1): 2-7.
- [18] Edwards A, Debonnaire AR, Sattler B, et al. Extreme metagenomics using nanopore DNA sequencing: a field report from Svalbard, 78 N. *BioRxiv*, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1101/073965>.
- [19] Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, et al. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the international space station. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 18022.
- [20] Aird D, Ross MG, Chen WS, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol*, 2011, 12(2): R18.
- [21] Schalamun M, Nagar R, Kainer D, et al. Harnessing the MinION: an example of how to establish long-read sequencing in a laboratory using challenging plant tissue from *Eucalyptus pauciflora*. *Mol Ecol Resour*, 2019, 19(1): 77-89.
- [22] Jain M, Olsen HE, Paten B, et al. The Oxford nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 239.
- [23] Rang FJ, Kloosterman WP, De Ridder J. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 90.
- [24] Calus ST, Ijaz UZ, Pinto AJ. NanoAmpli-Seq: a workflow for amplicon sequencing for mixed microbial communities on the nanopore sequencing platform. *Gigascience*, 2018, 7(12): giy140.
- [25] Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, et al. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(13): 3025-3049.
- [26] Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(22): e200.
- [27] Krishnaswamy VG, Aishwarya S, Kathawala TM. Extrication of the microbial interactions of activated sludge used in the textile effluent treatment of anaerobic reactor through metagenomic profiling. *Curr Microbiol*, 2020, 77(9): 2496-2509.
- [28] Earl JP, Adappa ND, Krol J, et al. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*, 2018, 6(1): 190.
- [29] 韩迎亚, 杨乔乔, 王倩楠, 等. 单分子实时测序技术在环境微生物研究中的应用. *微生物学通报*, 2019, 46(11): 3140-3147.
- Han YY, Yang QQ, Wang QN, et al. Application of single molecule real time sequencing in environmental microorganisms research. *Microbiol China*, 2019, 46(11): 3140-3147 (in Chinese).
- [30] Samson R, Rajput V, Shah M, et al. Deciphering taxonomic and functional diversity of fungi as potential bioindicators within confluence stretch of Ganges and Yamuna Rivers, impacted by anthropogenic activities. *Chemosphere*, 2020, 252: 126507.
- [31] Bangayan NJ, Shi BC, Trinh J, et al. MG-MLST: characterizing the microbiome at the strain level in metagenomic data. *Microorganisms*, 2020, 8(5): 684.
- [32] Hortelano I, Moreno Y, Moreno-Mesonero L, et al.



- Deep-amplicon sequencing (DAS) analysis to determine the presence of pathogenic *Helicobacter* species in wastewater reused for irrigation. *Environ Pollut*, 2020, 264: 114768.
- [33] Yu X, Jiang W, Shi Y, et al. Applications of sequencing technology in clinical microbial infection. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7143-7150.
- [34] Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, et al. The third revolution in sequencing technology. *Trends Genet*, 2018, 34(9): 666-681.
- [35] 徐志伟, 魏云林, 季秀玲. 病毒宏基因组学研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2560-2570.  
Xu ZW, Wei YL, Ji XL. Advances in viral metagenomics. *Microbiol China*, 2020, 47(8): 2560-2570 (in Chinese).
- [36] Takeda H, Yamashita T, Ueda Y, et al. Exploring the hepatitis C virus genome using single molecule real-time sequencing. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(32): 4661-4672.
- [37] Białasek M, Miłobędzka A. Revealing antimicrobial resistance in stormwater with MinION. *Chemosphere*, 2020, 258: 127392.
- [38] Carr CE, Bryan NC, Saboda KN, et al. Nanopore sequencing at Mars, Europa, and microgravity conditions. *Npj Microgravity*, 2020, 6: 24.
- [39] Góngora-Castillo E, Buell CR. Bioinformatics challenges in *de novo* transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. *Nat Prod Rep*, 2013, 30(4): 490-500.
- [40] 曹影, 李伟, 褚鑫, 等. 单分子纳米孔测序技术及其应用研究进展. *生物工程学报*, 2020, 36(5): 811-819.  
Cao Y, Li W, Chu X, et al. Research progress and application of nanopore sequencing technology. *Chin J Biotech*, 2020, 36(5): 811-819 (in Chinese).
- [41] Sher S, Hussain SZ, Rehman A. Phenotypic and genomic analysis of multiple heavy metal-resistant *Micrococcus luteus* strain AS2 isolated from industrial waste water and its potential use in arsenic bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(5): 2243-2254.
- [42] Jose VL, Pileggi MT, Alam MT, et al. Draft genome sequence of an environmental *Vibrio cholerae* strain, 2012Env-25, obtained using nanopore sequencing technology. *Microbiol Resour Announc*, 2020, 9(32): e00625-20.
- [43] Finton MD, Meisal R, Porcellato D, et al. Whole genome sequencing and characterization of multidrug-resistant (MDR) bacterial strains isolated from a Norwegian university campus pond. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1273.
- [44] Sorokin DY, Mosier D, Zorz JK, et al. *Wenzhouxiangella* strain AB-CW3, a proteolytic bacterium from hypersaline soda lakes that preys on cells of gram-positive bacteria. *Front Microbiol*, 2020, 11: 597686.
- [45] Grevskott DH, Salvà-Serra F, Moore ERB, et al. Nanopore sequencing reveals genomic map of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases carried by *Escherichia coli* strains isolated from blue mussels (*Mytilus edulis*) in Norway. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 134.
- [46] Li RC, Peng K, Li Y, et al. Exploring Tet(X)-bearing tigeicycline-resistant bacteria of swine farming environments. *Sci Total Environ*, 2020, 733: 139306.
- [47] Chng KR, Li C, Bertrand D, et al. Cartography of opportunistic pathogens and antibiotic resistance genes in a tertiary hospital environment. *Nat Med*, 2020, 26(6): 941-951.
- [48] Quick J, Quinlan AR, Loman NJ. A reference bacterial genome dataset generated on the MinION™ portable single-molecule nanopore sequencer. *Gigascience*, 2014, 3: 22.
- [49] Leggett RM, Alcon-Giner C, Heavens D, et al. Rapid MinION profiling of preterm microbiota and antimicrobial-resistant pathogens. *Nat Microbiol*, 2020, 5(3): 430-442.
- [50] Kilianski A, Haas JL, Corriveau EJ, et al. Bacterial and viral identification and differentiation by amplicon sequencing on the MinION nanopore sequencer. *Gigascience*, 2015, 4: 12.

(本文责编 陈宏宇)