



专论与综述

## 活性污泥微生物群落宏组学研究进展

鞠峰<sup>1,2</sup> 张彤<sup>\*3,4</sup>

1 西湖大学工学院环境与资源工程中心环境微生物组与生物技术实验室 浙江 杭州 310024

2 浙江西湖高等研究院前沿技术研究所 浙江 杭州 310024

3 香港大学土木系环境生物技术实验室 香港 999077

4 南方科技大学环境科学与工程学院 广东 深圳 518055

**摘要:** 活性污泥是全球最常用的废水生物处理人工生态系统,微生物是驱动其污染净化能力的关键。活性污泥微生物群落所有物种与基因(简称“微生物组”)的研究先后经历了“显微镜观察和纯菌培养分离”(1915)、“PCR 扩增-测序”(1994)和“高通量测序-宏组学分析”(2006)三个重要阶段的发展变迁。相应地,我们对活性污泥微生物组的认知经历了从最早对微型动物(如钟虫和轮虫)及其他微生物的形貌观察和纯种培养鉴定到今天对整个微生物组的全局多样性认识的飞跃。近 13 年来,基于高通量测序的宏组学方法被广泛应用于揭示活性污泥微生物群落组成结构和功能,我们现在充分意识到活性污泥微生物组蕴藏着大量不可培养新物种和基因多样性,驱动着各类污染物的降解与转化。目前,特异性分子标记基因的扩增子测序技术已经被广泛应用于揭示城市和工业废水处理活性污泥微生物组和典型功能种群(如硝化细菌和聚磷菌)的时空多样性和群落构建机制,进而为未来实现活性污泥微生物组功能的精准调控奠定理论基础。宏基因组学研究在群落、种群和个体基因组水平全面解析了活性污泥微生物组驱动的碳、氮、磷元素循环过程,以及有机微污染物的生物降解和转化机理。将来活性污泥微生物组学研究需要在“标准化的组学分析方法和绝对定量”“高通量培养组学”“高通量功能基因组学”和“多组学方法的结合及多种方法并用”4 个方面取得实现精准生态基因组学所需的技术突破,以最大限度发掘活性污泥微生物组在污水处理与资源回收领域的生态学与工程学价值。

**关键词:** 活性污泥, 微生物组, 群落基因组学, 群落结构, 微生物功能

## Advances in meta-omics research on activated sludge microbial community

JU Feng<sup>1,2</sup> ZHANG Tong<sup>\*3,4</sup>

1 Environmental Microbiome and Biotechnology Laboratory (EMBLab), Environmental and Resource Engineering Center, School of Engineering, Westlake University, Hangzhou, Zhejiang 310024, China

2 Institute of Advanced Technology, Westlake Institute for Advanced Study, Hangzhou, Zhejiang 310024, China

3 Environmental Biotechnology Laboratory, Department of Civil Engineering, The University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

4 School of Environmental Science and Engineering, Southern University of Science and Technology, Shenzhen, Guangdong 518055, China

**Abstract:** Activated sludge is the most popular artificial ecosystem for biotechnological wastewater

\*Corresponding author: E-mail: zhangt@hku.hk

Received: 25-04-2019; Accepted: 13-06-2019; Published online: 09-07-2019

\*通信作者: E-mail: zhangt@hku.hk

收稿日期: 2019-04-25; 接受日期: 2019-06-13; 网络首发日期: 2019-07-09

treatment worldwide, and microorganisms are the key driver of its de-contamination ability of wastewater. The study of all species and genes of activated sludge microbial communities (referred to as ‘microbiome’) has undergone three major stages of tremendous development: microscopic observation and pure culture isolation (since 1915), PCR amplification and sequencing (since 1994), and high-throughput sequencing (HTS) and meta-omics (since 2006). Correspondingly, our understanding of the activated sludge microbiome has experienced the leap from the earliest observations of the morphology of micro-fauna (e.g. *Vorticella* and *Rotifera*) and other microorganisms to complete diversity profile of the entire microbiome nowadays. In the past 13 years, HTS-based meta-omics research has been widely used to reveal the structure and function of activated sludge microbiome. We have now fully realized that the activated sludge microbiome contains a large diversity of uncultivable new species and genes, driving the degradation and conversion of various pollutants. At present, amplicon sequencing analysis of specific molecular marker genes has been widely used to reveal the spatial and temporal diversity of urban and industrial wastewater treatment activated sludge microbiome, typical functional bacteria (e.g. nitrifying bacteria and polyphosphate-accumulating bacteria) and community assembly patterns, providing theoretical basis for achieving precise regulation of activated sludge microbiome functioning. Metagenomic studies have comprehensively revealed, the microbiome-driven carbon, nitrogen and phosphorus cycling in activated sludge and the biodegradation and transformation mechanisms of organic micro-pollutants at levels of community, population and individual genomes. Future research on the activated sludge microbiome is supposed to make breakthroughs in the following four technical aspects for the achievement of precision eco-genomics: i) standardized meta-omics approaches and absolute quantification, ii) high-throughput culture omics; iii) high-throughput functional metagenomics, and iv) integrated use of multi-omics methods and multiple methods, which are important for maximizing the ecological and engineering values of activated sludge microbiome in wastewater treatment and resource recovery.

**Keywords:** Activated sludge, Microbiome, Community genomics, Community structure, Microbial function

## 1 活性污泥微生物组简述

活性污泥是一种由原核生物、真菌、微型动物(原生动物和后生动物)、病毒等多种类型微生物与污水中胞外聚合物、悬浮颗粒物、溶解性有机物混杂在一起所形成的复杂人工生态系统(图 1)。活性污泥具有很强的吸附分解有机物的能力和沉降性能良好的絮状结构<sup>[1]</sup>。其用于处理各种市政和工业废水已有 105 年的历史,是全球应用最广泛的废水生物处理技术,在保护环境和人类健康方面发挥着重要作用。活性污泥微生物群落(简称“微生物组”)蕴藏着较高的生物量和微生物多样性;这些微生物驱动着有机碳、氮、磷等污染物的降解与转化过程,是工艺效能和稳定性的重要决定因素<sup>[2-3]</sup>。正如人体和自然环境(如土壤、河流、底泥、底栖生物膜等)的微生物学研究,活性污泥微生物组学研究方法发展先后经历了“显微镜观察和纯菌培养分离”<sup>[4]</sup>、“PCR 扩增-测序”<sup>[5]</sup>、“高通量测

序-宏组学分析”<sup>[6]</sup>三个主要阶段的变迁。相应地,我们对活性污泥微生物多样性的认知经历了从最原始的土著原生动物和后生动物(如钟虫、轮虫)形貌观察<sup>[4]</sup>到今天借助高通量测序技术实现对微生物组所有物种、基因和功能多样性的宏组学全局性分析的飞跃<sup>[2,6-9]</sup>。

## 2 主要宏组学方法简述

高通量测序技术的快速发展促进了标记基因扩增子测序技术、宏基因组学<sup>[10]</sup>、宏转录组学和宏蛋白组学技术在活性污泥微生物群落研究领域的应用(图 2)。特异性标记基因扩增子测序技术已经被广泛应用于活性污泥系统,扩展了传统分子生物学时代对活性污泥中复杂微生物群落<sup>[2,7,11-13]</sup>,特别是关键功能微生物(如硝化细菌<sup>[14-15]</sup>、聚磷菌<sup>[16-17]</sup>、丝状菌<sup>[18-19]</sup>),时间与空间多样性和微生物与环境间的相互作用的认识<sup>[20-21]</sup>。宏基因组、转录组和蛋白组学分析可在生态系统、群落和种

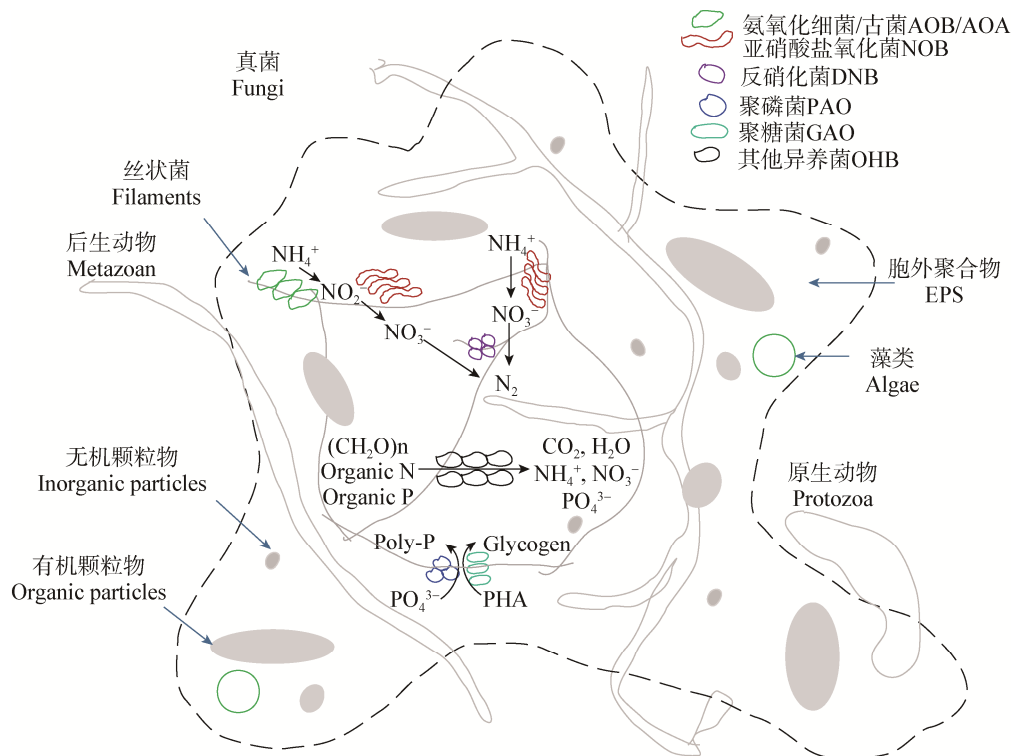


图 1 活性污泥絮体内非生物因素和微生物群落构建示意图

Figure 1 A schematic diagram of abiotic factors and microbial community within activated sludge flocs

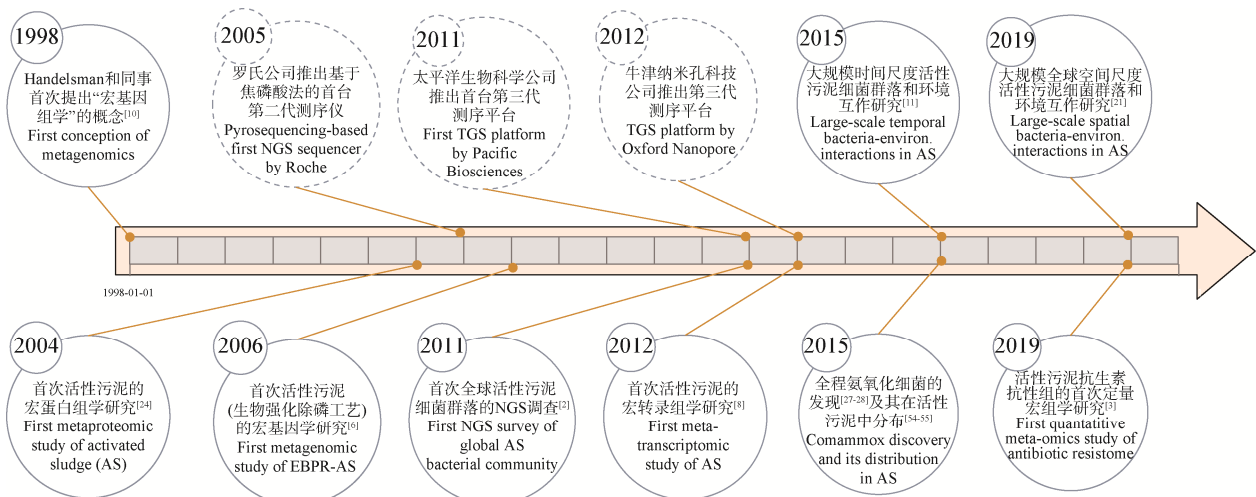


图 2 活性污泥微生物群落宏组学方法与应用大事记

Figure 2 Meta-omics approaches of activated sludge microbial community and their application events

群水平揭示驱动碳、氮、磷等营养物质代谢，有机微污染物降解和转化，以及微生物的结构和功能多样性<sup>[22]</sup>。这一领域的重要突破包括强化生物除磷过程微生物组的全组学解析<sup>[6,23-24]</sup>、活性污泥微生物组的宏基因组与转录组对比分析<sup>[8]</sup>和抗生素

抗性组的宏基因组学和定量宏转录组学解析<sup>[3,25]</sup>等。近年来，宏基因组测序数据组装(Assembly)和分箱(Binning)方法的快速发展让大规模构建不可培养微生物基因组成为可能。通过获得的宏基因组组装基因组(Metagenome assembly genomes, MAGs)

的功能注释和代谢通路分析, 可预测不可培养微生物的生理生化代谢特征及其在生物地球化学循环中的作用<sup>[20]</sup>。相关活性污泥系统的重要研究进展主要包括聚磷菌 *Accumulibacter* 基因组和代谢模型的构建和解读<sup>[6,23]</sup>, 糖代谢相关 *Saccharibacteria* (之前称“TM7”)和污泥膨胀相关丝状菌 *Promineofilum* 成员基因组构建和解读<sup>[26]</sup>, 以及全程氨氧化(Comammox)细菌的发现<sup>[27-28]</sup>。总之, 与依赖显微镜观察、培养分离或低通量的传统微生物学研究方法不同, 宏组学方法实现了对活性污泥系统原核生物和真核生物群落多样性既全面又系统的认识。下文将对重要的宏组学研究进展做详细的介绍。

### 3 活性污泥微生物群落宏组学研究进展

#### 3.1 原核生物组

活性污泥中原核生物群落由细菌和古菌两大类群组成, 而 16S 核糖体 RNA 基因扩增子测序技术的大规模应用极大促进了对其多样性的认识。广泛的调查研究表明, 活性污泥中细菌来自至少 30-40 个门, 超过 700 多个属<sup>[2,7,11]</sup>。与细菌相比, 活性污泥古菌多样性和相对丰度较低。据估算, 古菌序列在所有宏基因组序列中占 1.1%<sup>[29]</sup>, 而古菌 16S rRNA 基因序列在宏基因组 16S 和 18S rRNA 基因序列中占 0.11%-0.40%<sup>[30]</sup>; 在细胞水平, 荧光原位杂交法表明古菌占活性污泥中总细胞数的 1.6%, 并且以单细胞和菌落两种形式存在<sup>[31]</sup>。基于 16S rRNA 基因的高通量测序分析表明<sup>[2,7,11-13,30,32-34]</sup>, 活性污泥中最主要的细菌门包括 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria* 和 *Firmicutes*; 其他高丰度 (>1%) 细菌门包括 *Verrucomicrobia*、*Chloroflexi*、*Acidobacteria*、*Planctomycetes* 和 *Acidobacteria* 等。此外, 活性污泥中通常还存在较低丰度的 *Spirochaetes*、*Nitrospira*、*Synergistetes*、*Chlorobi*、*Cyanobacteria* 和未培养的门类群(如 OD1、OP10 等)。常见已知功能菌包括氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)属 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira*; 亚

硝酸盐氧化菌(Nitrite-oxidizing bacteria, NOB)属 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter*, 聚磷菌 (Phosphate-accumulating organisms, PAO) 属 *Accumulibacter* 和 *Tetrasphaera*; 聚糖菌 (Glycogen-accumulating organisms, GAO) 属 *Competibacter* 和 *Defluviicoccus*; 反硝化菌 (Denitrifying bacteria, DNB) 属 *Comamonas*、*Dechloromonas*、*Hyphomicrobium* 和 *Thauera* 等; 丝状菌(Filaments)属 *Acinetobacter*、*Caldilinea*、*Gordonia*、*Legionella*、*Microthrix* 和 *Zoogloea* 等。活性污泥中已知最主要的古菌门是 *Euryarchaeota*<sup>[30-31,35-36]</sup>, 其次是 *Thaumarchaeota*、*Crenarchaeota* 和 *Parvarchaeota*<sup>[31,36]</sup>; 纲水平主要包括产甲烷菌 *Methanosarcinales*、*Methanomicrobiales* 和 *Methanobacteriales*; 然而, 这些产甲烷菌的产甲烷活性较低, 对活性污泥碳代谢作用的贡献有限<sup>[31,35]</sup>。属水平包括产甲烷菌属 *Methanosaeta*、*Methanobacterium* 和 *Methanospirillum*, 以及氨氧化古菌属 *Nitrosotenuis*<sup>[37]</sup>和 *Nitrosocosmicus*<sup>[38]</sup>等(表 1)。接下来将重点阐述活性污泥工艺关键功能微生物及其与其他微生物或环境间的相互作用。

#### 3.1.1 氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌

微生物驱动了活性污泥系统内硝化作用和反硝化作用等基本氮循环过程。活性污泥样品的首次宏基因组学(DNA 序列)和宏转录组学(cDNA 序列)对比分析表明, 微生物氮代谢相关功能基因及其转录本在群落所有基因和所有转录本中分别占 1.5%和 2.4%, 接近其在海洋微生物组和土壤微生物组中的相对水平<sup>[8]</sup>。在土壤和海洋环境中, 氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)丰度和古菌 *amoA* 基因丰度显著高于氨氧化细菌 AOB<sup>[49]</sup>, 表明 AOA 是这些栖息地中氨氧化的主要驱动者, 在全球氮循环中发挥更重要的作用。与之相反, 活性污泥系统内 AOB 对污水中氨氮氧化成亚硝酸盐过程的贡献远高于 AOA<sup>[29]</sup>。活性污泥中最常见的 AOB 是 *Nitrosomonas* 和 *Nitrosospira*。Yu 等的研究表明, 活性污泥内编码氨单加氧酶(Ammonia

表 1 污水和活性污泥中已报道的典型功能微生物菌属

Table 1 Typical functional microbial genera reported in wastewater and activated sludge

代谢功能 Metabolic functions	功能菌类型 Functional groups	功能菌属 Functional genera	参考文献 References
氨氧化 Ammonia oxidation	氨氧化细菌	<i>Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrosovibrio</i>	[7,39-40]
	AOB		
	完全氨氧化菌	<i>Candidatus Nitrospira</i>	[27-28]
	Comammox		
亚硝酸盐氧化 Nitrite oxidation	氨氧化古菌	<i>Nitrosoarchaeum, Nitrosocaldus, Nitrosocosmicus, Nitrosopumilus,</i>	[38,41]
	AOA	<i>Nitrososphaera, Nitrosotalea, Nitrosotenuis</i>	
	亚硝酸盐氧化菌	<i>Nitrobacter, Nitrospira, Nitrotoga</i>	[42-43]
反硝化 Denitrification	NOB		
	反硝化菌	<i>Accumulibacter, Acidovorax, Alcaligenes, Azoarcus, Azospirillum, Aquaspirillum, Comamonas, Rhodocyclus, Curvibacter, Dechloromonas, Hyphomicrobium, Paracoccus, Pseudomonas, Rhodobacter, Thauera, Xanthobacter, Zoogloea, etc.</i>	[7,44]
生物除磷 Biological phosphorus removal	聚磷菌	<i>Accumulibacter, Halomonas, Microlunatus, Pseudomonas, Tetrasphaera, etc.</i>	[45-46]
	PAO		
	聚糖菌	<i>Competibacter, Defluviicoccus</i>	[7,45]
甲烷代谢 Methane metabolism	GAO		
	产甲烷菌	<i>Methanobacterium, Methanosaeta, Methanosarcina, Methanospirillum</i>	
异养代谢 Heterotrophic metabolism	Methanogens		
	丝状菌	<i>Acinetobacter, Anaerolinea, Aquaspirillum, Beggiatoa, Caldilinea, Chryseobacterium, Flexibacter, Gordonia, Haliscomenobacter, Isosphaera, Leptothrixdiscophora, Leucothrix, Microthrix, Meganema, Moraxella, Mycobacterium, Nocardia, Nostocoida, Prevotella, Rhodococcus, Skermania, Sphaerotilus, Tannerella, Tetrasphaera, Thrichococcus, Thiothrix, Tsukamurella, Zoogloea, etc.</i>	[5,18-19]
	Filaments		
	异养菌或粪便细菌 Heterotrophic or fecal bacteria	<i>Aeromonas, Arcobacter, Bacteroides, Bifidobacterium, Campylobacter, Clostridium, Enterobacter, Escherichia, Eubacterium, Helicobacter, Klebsiella, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, etc.</i>	[7,11,47-48]

monooxygenase, *amo*) 基因的细菌最主要是 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira*, 其次是未知的 *Beta-proteobacterium* 氨氧化菌和其他未培养的细菌<sup>[8]</sup>; 通过对 cDNA 和 DNA 序列丰度比例的分析发现, 完成硝化作用的关键功能基因 *amo* 和羟胺氧化酶基因(Hydroxylamine oxidoreductase, *hao*)的相对表达活性远高于其他代谢过程的功能基因, 表明活性污泥中硝化作用具有很高的功能基因表达活性<sup>[8]</sup>。关于 NOB, 在活性污泥系统中发现的优势属是 K-型战略者(增长速率低, 底物亲和力高) *Nitrospira*, 其次是 r-型策略者(增长速率高, 底物亲和力低) *Nitrobacter*<sup>[43]</sup>。传统观念认为, *Nitrospira* 属成员的代谢能力有限, 它们在环境中的存在常被认为是亚硝酸盐氧化的指示。然而, 近期研究发现该菌属成员具有更广泛的代谢灵活性, 包括好

氧条件下甲酸盐和氢气代谢以及在适宜的电子供体存在条件下厌氧还原硝酸盐到亚硝酸盐<sup>[50]</sup>。

近年来, 宏基因组组装基因组(MAGs)分析技术为 Comammox 的发现和分布提供了充分的基因组学证据<sup>[50]</sup>。2015 年奥地利维也纳大学 Wagner 课题组和荷兰奈梅亨大学 Lückner 课题组在同期《自然》杂志发表论文, 宣称通过反应器富集和 MAGs 分析发现了 *Nitrospira* 属的不同菌株, 其基因组编码了完成“氨氮氧化成亚硝酸盐”和“亚硝酸盐氧化成硝酸盐”两步反应的所有必需基因, 可通过完全氨氧化获取生长所需能量<sup>[27-28]</sup>。这些新发现从根本上改变了硝化过程中两步反应严格分工的传统观念, 表明完全氨氧化 *Nitrospira* 菌是氮循环微生物群落的关键组成部分, 在全球生物地球化学氮循环过程中发挥着重要的作用。自此

之后,大量研究通过宏基因组测序和 MAGs 分析考察了完全氨氧化 *Nitrospira* 的环境分布和丰度,以及它们的潜在代谢能力。目前,这些菌主要发现于工程生物膜系统,如再循环水产养殖系统生物过滤池<sup>[27]</sup>,饮用水处理或供应设施<sup>[51-53]</sup>以及污水处理生物膜和活性污泥系统<sup>[54-55]</sup>,也有少量发现于自然生态系统,如施肥后的土壤<sup>[56]</sup>。

### 3.1.2 聚磷菌和聚糖菌

磷是水体富营养化的限制因素,因而控制水体磷污染尤为重要。强化生物除磷技术(Enhanced biological phosphorus removal, EBPR)是一种常用、高效的除磷技术,已被广泛应用于磷污染的治理。聚磷菌(PAO)是一类特殊的微生物,可以在好氧条件下吸收磷元素,而在厌氧条件下又可以充分释放磷元素,是 EBPR 工艺发挥功能的关键。除磷作用由哪种微生物主导,一直是科学家重点关注的问题。2006年, Martín 等对两个实验室规模的 EBPR 反应污泥进行了宏基因组测序分析,首次报道了 EBPR 工艺除磷作用由未培养的 *Accumulibacter* 细菌主导<sup>[6]</sup>。2007年,Carvalho 等利用荧光原位杂交(FISH)技术证实 *Accumulibacter* 是 EBPR 工艺过程中的主要功能生物<sup>[57]</sup>。其后,一系列研究相继将 *Accumulibacter* 的代谢活性与 EBPR 过程中观察到的除磷效能联系起来<sup>[58-60]</sup>。科学家在宏基因组方面研究积累的数据,最终促成了首个聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade IIA str. UW-1 基因组(GenBank 登录号 CP001715)的组装完成。借助宏基因组学分析,研究人员继续发掘了一系列聚磷菌的遗传信息。Flowers 等报道了 Clade IA 的成员 UW-2 的基因组序列草图,比较了该菌株与 Clade IIA str. UW-1 的代谢反应,揭示了两个基因组中反硝化和 EBPR 必需的功能基因,发现参与碳储存聚合物和多磷酸盐代谢的基因具有较高的保守性<sup>[61]</sup>;Mao 等也报道了 Clade IB 成员 HKU-1 菌株的基因组草图<sup>[23]</sup>;近期 Gao 等报道了两个 Clade IA 和 IC 成员的菌株的基因组草图<sup>[62]</sup>。

聚糖菌(GAO)是聚磷菌(PAO)的竞争物种,它

们会在厌氧阶段与 PAO 竞争有机底物(图 3),将糖原发酵成聚羟基烷酸(PHA),但不释放磷;在好氧条件下分解 PHA,但不吸收磷。因此,GAO 利用有机底物却不参与磷的去除,同时挤占了 PAO 的生存空间。当在某些条件下该菌成为反应中主导的微生物种群时,EBPR 的除磷效率会大大降低。近年来,这两种菌的竞争关系一直是领域研究的热点。Lopez-Vazquez 等发现,在低温(10 °C)条件下,无论使用何种碳源或 pH 值的进水,PAO 都是主要的功能微生物;在中等温度(20 °C)条件下,若同时提供丙酸盐和乙酸盐,PAO 在竞争中仍占主导地位,而若只使用丙酸盐或乙酸盐作为唯一碳源且 pH 低于 7.5,PAO 生长会受到抑制;同时,在更高的温度(30 °C)条件下,GAO 的竞争力更强,通常是主要的微生物类群<sup>[45]</sup>。Stokholm-Bjerregaard 等使用 16S rRNA 基因扩增子测序分析对来自 18 个丹麦污水处理厂 9 年的样品进行了评估,发现 PAO 的优势菌属为 *Tetrasphaera*,而丰度最高的潜在 GAO 包括放线菌 *Micropruina* 和 sbr-gs28 的种系型。此外, *Defluviococcus* 属、*Propionivibrio* 属、*Competibacteraceae* 和 spb280 组的成员在部分污水处理厂有较高的丰度<sup>[63]</sup>。

### 3.1.3 细菌群落驱动因素和相互作用

活性污泥工艺内有机物降解、硝化作用、生物除磷等关键污染净化功能由细菌群落决定,而群落多样性与组成结构受环境因素和生物因素共同驱动。首先,进水类型(市政污水 vs.工业废水)<sup>[7]</sup>和组成<sup>[13]</sup>、有机碳和无机氮负荷<sup>[11,64]</sup>、温度<sup>[65]</sup>、溶解氧<sup>[66]</sup>、水力停留时间<sup>[64]</sup>、污泥停留时间<sup>[11]</sup>、工艺类型<sup>[32]</sup>、时间尺度<sup>[11-12,30,67]</sup>和地理位置<sup>[2,7]</sup>等因素都可能影响微生物群落组成结构。近期,一项针对活性污泥污水处理厂细菌群落的全球多样性和生物地理学特征研究表明,微生物群落的空间周转率与研究的尺度有关;尽管确定性环境因素(温度和有机物的输入)非常重要,但微生物群落构建似乎很大程度上是由随机过程(如扩散和漂移)所驱动<sup>[21]</sup>。除时空环境和随机因素外,一项针对

某市政污水处理厂活性污泥细菌群落 5 年动态的共现网络分析研究表明, 环境因素(如污泥停留时间和曝气池无机氮浓度)仅能部分解释群落的系统发育关系和丰度的差异性, 而物种间亲缘关系和相互作用是细菌群落构建的重要决定因素<sup>[11]</sup>。

活性污泥中不同细菌类群间存在着协同、共生、竞争等复杂相互作用(图 3)<sup>[11]</sup>, 因而是理想的微生物生态学研究模型系统。例如, AOB 和 NOB 间存在协同共生关系: 前者为后者提供亚硝酸盐作为代谢底物, 后者去除亚硝酸盐以减轻其对前者的抑制作用。再如, 经由一部分异氧菌降解生成的有机小分子物质(例如: *Saprospiraceae* 水解蛋白质形成的氨基酸)可被其他异养菌(Other

heterotrophic bacteria, OHB)获取利用。活性污泥系统内其他典型的微生物合作性互作包括: (1) AOB 和 NOB 可以为反硝化细菌(DNB)提供亚硝酸盐和硝酸盐等反硝化底物; (2) 异氧菌降解作用释放的  $\text{CO}_2$  可以被自养型 AOB 和 NOB 同化; (3) AOB 和 NOB 细胞死亡和裂解后释放的可溶性微生物产物(SMPs)可作为异氧菌的有机碳源。典型的竞争作用包括: (1) AOB 和 NOB 之间竞争碳源和氧气, 同时与异氧菌竞争氧气和必需生长因子(Essential growth factor, EGFs); (2) 不同的 AOB、NOB 和 DNB 间相互竞争氨氮、亚硝酸盐或硝酸盐; (3) DNB 与 OHB, 以及 PAO 与 GAO 间相互竞争碳源、氧气和必需生长因子。

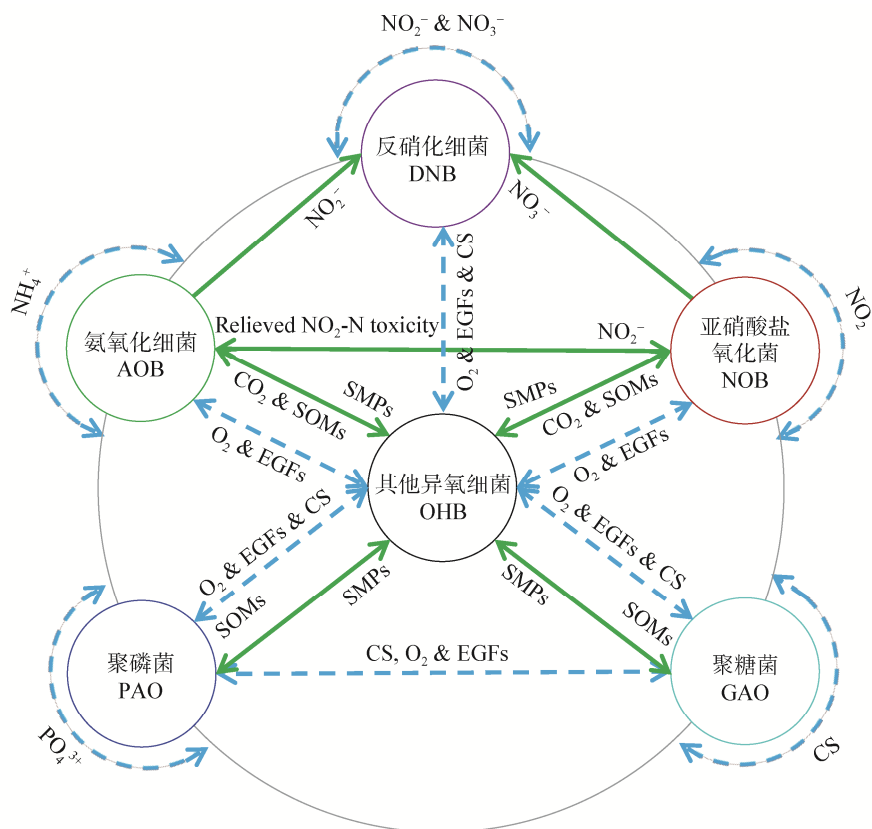


图 3 活性污泥微生物组内自养细菌和异养细菌之间相互作用的假定模型<sup>[11]</sup>

**Figure 3 A hypothetical model for interactions between autotrophic and heterotrophic bacteria in activated sludge microbiome<sup>[11]</sup>**

注: 正负相互作用用实线和虚线表示, 箭头表示基质或营养元素的交换或竞争。AOB: 氨氧化细菌; NOB: 亚硝酸盐氧化细菌; DNB: 反硝化细菌; PAO: 聚磷菌; GAO: 聚糖菌; OHB: 其他异氧代谢菌; SMPs: 可溶性微生物产物; SOMs: 有机小分子物质; EGFs: 必需生长因子; CS: 碳源。

Note: A solid line and a dash line represent a positive and a negative correlation, respectively. AOB: Ammonia-oxidizing bacteria; NOB: nitrite-oxidizing bacteria; DNB: Denitrifying bacteria; PAO: Phosphate-accumulating organisms; GAO: Glycogen-accumulating organisms; OHB: Other heterotrophic bacteria; SMPs: Soluble organic matter; EGFs: Essential growth factors; CS: carbon source.

### 3.2 真核生物组

活性污泥的真核生物群落主要由原生动物和后生动物等微型动物、真菌和藻类组成。与原核生物组(主要是细菌)相比,活性污泥真核生物组的研究相对较少。

#### 3.2.1 微型动物

传统基于显微镜观察的研究普遍认为,原生动物和后生动物在污水处理工艺中出现是有氧活性污泥系统中废水处理质量良好的指示。Wang 等通过采用 18S rRNA 和 16S rRNA 基因扩增子测序考察了投加白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 对序批式活性污泥反应器处理苯酚废水的效果及其对微生物群落的影响,发现该生物增强方法可显著提高活性污泥的沉降能力以及反应器内生物质和苯酚的去除效果,显著提高群落中细菌数量相对于真核生物数量的比例;真核生物组由 28 个纲,包括真菌(7 类)、微藻类(6 类)、原生动物(11 类)、微型后生动物(4 类)和其他未培养或未分类生物组成;处理组和对照组内原生动物和后生动物组成的不同表明了两组反应器性能的差异,但其总相对丰度差异无法反映反应器性能的不同。因此,不建议采用原生和后生动物作为处理效果的衡量指标<sup>[68]</sup>。Matsunaga 等利用 18S rRNA 基因扩增和克隆测序手段的研究结果表明:活性污泥中原生动物主要包括囊泡虫(*Alveolata*)、有孔虫界(*Rhizaria*)、眼虫门(*Euglenozoa*)和变形虫门(*Amoebozoa*);后生动物主要包括轮形动物门(*Rotifera*)、腹毛动物门(*Gastrotricha*)和线虫动物门(*Nematoda*)<sup>[69]</sup>。Ju 等通过宏基因组中 16S 和 18S rRNA 基因短序列分析发现,活性污泥系统中真核生物主要由线虫动物门、轮形动物门、节肢动物门(*Arthropoda*)和腹毛动物门组成。与细菌(85.6%–93.0%)和古菌(0.11%–0.40%)情况相反,真核生物在宏基因组 18S 和 16S 序列中的相对丰度(0.73%–7.3%)在夏季明显高于冬季<sup>[30]</sup>。

#### 3.2.2 真菌

除微型动物外,活性污泥中还存在着酵母、

丝状真菌、微藻等其他类型的真核生物,它们通常被认为是参与污染物去除的主要真核生物<sup>[70–71]</sup>,能协助增强对污水中抑制性有毒污染物(如苯酚)和营养元素的去除效果<sup>[68]</sup>。真菌既可以通过城市管道和污水进水直接扩散到活性污泥系统,又可能通过大气沉降、植物气溶胶或土壤冲刷侵蚀等间接途径迁移至活性污泥系统。传统分离和培养方法表明,活性污泥中寄居的大多数真菌来自子囊菌门,包括 *Acremonium*、*Aspergillus*、*Candida*、*Chrysosporium*、*Cladosporium*、*Fusarium*、*Oidium*、*Penicillium*、*Sporothrix* 和 *Trichoderma* 属;还有少量担子菌门(*Basidiomycota*)菌(例如 *Rhodotorula*、*Trichosporon*、*Mucor* 和 *Mortierella*)以及捕食性真菌<sup>[70]</sup>。相比于培养分离法,不依赖于培养的分子生物学方法和标记基因扩增测序分析极大拓宽了对活性污泥真菌多样性的认识。Evans 等采用不依赖于培养的 18S rRNA 基因序列和系统发育关系分析发现部分污水厂中主要真菌类群包括 *Chytridiomycota*、*Zygomycota*、*Blastocladiomycota* 和 *Cryptomycota*;在所有样品中检出的绝大多数真菌都是来自这些真菌类群(特别是新发现的 *Cryptomycota*)中的不可培养代表。与传统基于分离培养的研究不同,作者并未在采集的活性污泥样品中检测到 *Penicillium*、*Cladosporium*、*Aspergillus* 和 *Mucor* 之前经常被报道的真菌属<sup>[70]</sup>。Niu 等首次基于大规模的真菌内转录间隔区扩增子测序分析调查了 18 个市政污水处理厂中的真菌群落多样性,共发现了 7 个门和 195 个属;其中,*Ascomycota* 和 *Basidiomycota* 是相对丰度最高的门,主要成员包括 *Pluteus*、*Wickerhamiella* 和 *Penicillium* 属;23 个真菌属组成了污水系统的核心真菌群落,占有真菌序列的 50.1%。该研究还发现随着污水处理厂间距离增加,污水厂内真菌群落组成结构和多样性相似度降低,而群落均匀度(Evenness)指数显著提高。冗余分析表明溶解氧和碳氮比(C/N)是真菌群落结构动态变化的最主要决定因素<sup>[72]</sup>。



### 3.2.3 藻类

目前关于活性污泥中藻类的研究主要集中在利用微藻和细菌组成的共生系统去除污水营养物和同步回收生物能源的工艺过程<sup>[73]</sup>,而对藻类群落组成结构或功能多样性的研究报道相对较少。Ghosh 等利用编码二氧化碳(CO<sub>2</sub>)固定的核酮糖-二磷酸羧化酶基因(*rbcL*)大亚基扩增子序列分析研究表明:废水处理厂出水沉淀池和反硝化过滤反应器的藻类主要由硅藻(*Diatom*)、绿藻(*Chlorella*)、蓝藻(*Cyanobacteria*)、大眼藻纲(*Eustigmatophyceae*)和未知不等鞭毛门(*Stramenopiles*)组成;污水厂内藻类多样性较高,每个污水厂样品中能检测到 19–24 个独特的 *rbcL* 基因序列,且不同污水厂间藻类组成差异性较大;作者提议可将 *rbcL* 基因用作废水中藻类多样性分析的标记基因<sup>[74]</sup>。相比之下, Matsunaga 等<sup>[69]</sup>和 Ju 等<sup>[30]</sup>基于 18S rRNA 基因序列分析结果揭示了不等鞭毛门是活性污泥中最主要的藻类真核生物。Su 等<sup>[71]</sup>考察了藻类和污泥的接种比例对活性污泥处理效率和累积生物量沉降性能的影响,提出将藻类/污泥比例控制在 5:1 时氮和磷污染物的去除效率最高;相比之下,藻类/污泥比例控制在 1:5 具有最佳的污泥沉降性能;16S rRNA 基因分析表明,不同藻类的共生细菌群落存在差异并且在反应器运行过程中富集不同特定类型的细菌。Su 等发现藻类生长会减缓好氧污泥颗粒化过程。相对于无藻对照组,共生系统中颗粒代谢活动显著降低,胞外聚合物中蛋白质和多糖分泌量降低(25.7%和 22.5%),氮和磷的去除率显著降低,共生藻类的生长改变了微生物群落,不利于与氮和磷去除相关的功能细菌,特别是 *Nitrospiraceae* 和 *Nitrosomonadaceae* 的生长<sup>[71]</sup>。

### 3.3 病毒组

根据不同的宿主类型,病毒可划分为植物病毒、动物病毒和细菌病毒(又称“噬菌体”)。污水处理厂不同部位病毒浓度在 10<sup>8</sup>–10<sup>10</sup> 个病毒样颗粒/mL,比天然水生环境高出 10–1 000 倍。在污水处理系统中,活性污泥是各类细菌和病毒的重要聚集

地;其中,分布最广的噬菌体和与人类健康相关的致病性病毒是病毒组研究中最主要的关注点。Tamaki 等对某热带市政污水处理厂进水、活性污泥、厌氧污泥和出水中病毒 DNA 进行了宏基因组测序,获得的 93 600 条 DNA 序列与其他环境样品病毒组序列相似比例不足 5%,可成功进行功能注释的序列不足 5%–20%<sup>[75]</sup>,说明污水处理系统的活性污泥中蕴含着大量新的病毒物种和功能多样性。近期 Wang 等通过宏基因组测序和组装分析的方法从 2 个污水处理厂活性污泥样品中构建了 8 478 个来自病毒基因组的重叠群(>5 kb);其中,60%的重叠群在 NCBI 和 IMG/VR 病毒序列数据库中覆盖率低,且仅不足 35%的基因可以被有效注释<sup>[76]</sup>。

#### 3.3.1 噬菌体

Parsley 等通过活性污泥取样、病毒 DNA 提取和测序分析发现肌尾噬菌体科(*Myoviridae*)、长尾噬菌体科(*Siphoviridae*)和短尾噬菌体科(*Podoviridae*)是最主要的病毒类型<sup>[77]</sup>。作为能够侵染和杀死细菌的病毒,噬菌体在调控活性污泥中细菌群落的结构和功能方面可能发挥重要作用。例如, Barr 等利用荧光原位杂交(FISH)、透射电镜(TEM)等方法发现某实验室规模序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR)中聚磷菌 *Accumulibacter* 受到特定噬菌体的侵染,导致聚磷菌在活性污泥中的丰度大幅降低,进而导致反应器除磷效率降低<sup>[78]</sup>。Liu 等通过 4 种噬菌体分离物投加的生物操控方式将导致活性污泥起泡的有害丝状菌 *Gordonia* 的物种丰度降低至原来的 10%,进而达到控制污泥起泡这类常见活性污泥工艺运行问题的目的<sup>[79]</sup>。噬菌体还可作为基因信息交换的载体,通过普遍性或局限性转导将遗传特征从供体细菌细胞传播到受体细胞,其中转导对抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)的传播是目前的研究热点之一<sup>[80]</sup>。近年来大量研究通过噬菌斑培养实验<sup>[81]</sup>、qPCR<sup>[82–83]</sup>和宏基因组学<sup>[84–86]</sup>方法揭示了污水处理系统中的噬菌体是 ARGs 的重要载体,其中污泥被认为是部分噬菌体携带 ARGs 的重要来源,并且

噬菌体所携带的 ARGs 比细菌携带的更难通过 UV、氯化、高温等灭活处理<sup>[84-85]</sup>。

### 3.3.2 人类病毒

污水和活性污泥浓缩了来自人类的废物, 因而极有可能具有较高的病原体多样性。Bibby 等将采集的污泥进行宏基因组测序与分析后, 鉴定出 43 种人类病毒, 占有重叠群(Contigs)的 0.1%, 其中 DNA 病毒包括疱疹病毒、乳头瘤病毒、腺病毒、博卡病毒等; RNA 病毒包括冠状病毒、科萨病毒、轮状病毒、丙型肝炎病毒等, 较完整地描述了污水处理系统中病毒病原体的多样性<sup>[87]</sup>。Miura 等通过实验室膜生物反应器(Membrane bioreactor, MBR)研究发现, 活性污泥混合液吸附是污水中人类肠道病毒、诺罗病毒 GII 和萨波病毒去除的重要途径, 其中对萨波病毒的去除作用强于其他两种病毒, 这意味着活性污泥对病毒的吸附效率具有种属特异性<sup>[88]</sup>。

尽管近年来传统方法和新技术的应用加深了对活性污泥系统病毒组的认识, 但是基于培养的方法存在的局限性(如绝大多数病毒及其宿主不可培养、实验中人为添加的选择压力)以及不基于培养的方法的不成熟(如难以去除的污染因素和数据库的不全面及信息不准确)使得现有相关研究结果存在较多的不确定性。例如, Enault 等认为在先前人体和小鼠噬菌体基因组研究中 ARGs 的水平被严重高估, 并建议通过降低细菌基因序列污染(保证 16S rRNA 基因比例低于 0.02%)和采用更保守的功能注释策略来提高病毒组研究的准确度<sup>[89]</sup>。因此, 可以推测现有对活性污泥病毒组为数不多的研究也可能存在同样问题, 优化相关的评估和分析方法是未来病毒组研究的关键。

## 4 展望

高通量测序技术和宏组学方法的快速发展使得活性污泥微生物群落组成与功能基因信息变得更全面且具更高分辨率, 能有效回答“谁在那里?”和“它们在做什么?”这两个基本生态学问题。目前, 活性污泥微生物组的研究还需要在“标准化的组学分析方法和绝对定量”“高通量培养组学”“高通

量功能基因组学”“多组学与多学科方法交叉并用”几个方面进行技术突破, 才能实现精准生态基因组学研究, 以最大限度地发掘其在污水处理与资源回收领域的工程学与生态学价值。

### 4.1 标准化的组学分析方法和绝对定量

标准化的组学分析方法对实现可重复实验和跨样品与跨研究之间的比较至关重要, 然而微生物组的标准化组学检测仍处于起步阶段。当前活性污泥污水处理系统微生物群落的宏组学研究还主要停留在基于序列的相对定量层面, 无法得到细胞数、基因和转录本的绝对定量信息, 而微生物基因和转录本的绝对与相对丰度变化趋势有时并不一致<sup>[3]</sup>。考虑到污水处理系统不同部位或不同活性污泥样品间生物量和细菌总数之间的巨大差异, 物种、基因和转录本的相对丰度往往无法真实反映特定功能微生物生物量、基因浓度和表达活性。因此, 绝对定量是实现准确评估活性污泥微生物组对环境因素(如运行或污水理化参数)变化响应强度和污染物生物降解或转化动力学的第一步。目前, 基于内标物投加的宏组学, 即向环境样品中混入已知量且样品中不存在的 DNA 或 mRNA 内标物的高通量测序, 被证明是一种简单、廉价、可高分辨率实现微生物组绝对定量的广谱检测方法<sup>[3,90-91]</sup>。近期, Ju 等基于 mRNA 内标物投加和定量 PCR 分析成功实现了污水和活性污泥微生物组的首次定量宏基因组和定量宏转录组分析, 解析了 ARGs 在传统二级污水处理工艺中的归趋、表达活性和潜在选择因素<sup>[3]</sup>, 揭示了细菌群落组成、基因转移和细菌生物量对污水厂抗生素抗性组的影响。该研究提出的一系列可实现微生物组基因和转录本绝对与相对定量的新方法和衡量指标(请参见文献[3]表格 S1), 需要通过今后更多的应用实例来检验并充分发展使其满足未来标准化的组学分析的新需求。

### 4.2 高通量培养组学

尽管环境微生物组中绝大多数微生物仍然难以培养, 但是研究者们从未松懈和放弃获得纯培

养的努力<sup>[92-93]</sup>。获取活性污泥微生物纯培养物对于发现新物种、构建功能微生物相互作用模型、改进基因注释、验证新基因序列功能、理解碳氮磷代谢机制、筛选重要功能物种资源(如高效降解菌)和量化污染物(如新兴有机微污染物<sup>[94]</sup>)降解或转化动力学具有重要意义。由于活性污泥独特的絮状结构以及内部紧密而复杂的微生物相互作用关系(图 3), 获取其功能微生物的纯培养物是一项长期而艰巨的任务。在今后, 可预先通过活性污泥微生物群落基因组测序和生物信息学分析来阐明顽固或关键功能微生物(如硝化菌、聚磷菌、微污染物降解菌)的特定培养和分离条件, 这一策略将有利于培养组的发展<sup>[22]</sup>。另外, 使用多种培养基, 包括模拟植物的培养基以及一些特殊的寡营养培养基, 梯度改变营养物质的浓度, 可以增加活性污泥可培养微生物的种类<sup>[93]</sup>。微流控技术结合 MALDI-TOF 质谱检测<sup>[95]</sup>或 rRNA 基因全长测序<sup>[96]</sup>(如牛津纳米孔或 PacBio 测序)可大幅提高单细胞分离培养和物种鉴定的通量。微流控技术还使微生物共培养或定向培养成为可能, 有利于从活性污泥中分离共生以及互生或具备特定污染物降解能力的功能菌株。

#### 4.3 高通量功能基因组学

考虑到绝大多数环境微生物难以培养的现状, 单细胞测序或宏基因组测序结合组装和分箱等方法正被广泛用于直接获取未被培养微生物类群的基因组数据。然而, 即使将来获取了每种活性污泥微生物的基因组信息, 仍然无法准确理解这些微生物消减污染和回收资源的生态功能。一方面, 当前全球范围内新基因序列产生和数据库信息膨胀的速度已经远远超过我们能及时利用传统方法验证新序列功能的速度, 这会导致传统基于序列同源性比对来预测基因功能的方法更容易产生“假阳性”的功能注释和判定。另一方面, 考虑到先前基于功能宏基因组学方法从活性污泥、人类肠道和土壤样品中筛选出的 ARGs 序列与 NCBI 数据库的平均全局相似度较低(分别仅为 62%、

75%和 59%)<sup>[97]</sup>, 依赖序列的高度同源性来预测基因功能可能产生“假阴性”的功能注释和判定。为了克服这两个方面的根本问题, 需要设法提高利用传统功能基因组学实施新基因序列编码功能验证任务的效率与通量, 以扩大现有高质量基因与蛋白参考序列数据库, 进而提高基因功能预测的注释率和准确度, 降低基因序列功能预测的错误判定风险。近年来, 微流控芯片和 3D 打印等前沿技术在实现新基因序列的低成本、超高通量的功能基因组学验证方面展示出良好的应用前景<sup>[98]</sup>, 还需要深入研究以取得新的方法学突破。

#### 4.4 多组学与多学科方法交叉并用

尽管我们获取活性污泥微生物组遗传信息的能力已经明显提升, 但是大规模解码微生物群落结构与功能关联的能力仍旧受到严重限制。同样, 我们无法在复杂的活性污泥微生物之间及其与环境间的相互作用网络中建立明确的因果关系(图 3), 这也在很大程度上限制了我们预测和精准操控微生物组并利用其为可持续性的污水处理与资源回收服务的能力。Ju 等率先将网络关联性和拓扑性分析应用于探索“微生物-微生物”, “微生物-环境”以及“微生物-环境-效能”之间的未知相互作用, 为探索微生物工程系统群落构建机制与调控措施提供了新方法和新思路<sup>[7,11]</sup>。例如, 作者通过微生物、水质指标、运行环境参数在 5 年时间尺度上的共现网络分析有效揭示了以典型活性污泥起孢菌(*Gordonia*)和部分丝状菌(包括 *Chloroflexi* 和 TM7 成员)为代表的“有害”群体的生态位与以典型硝化与反硝化菌为代表的“益生”群体显著不同; 提出延长污泥停留时间(Sludge retention time, SRT)和维持适宜污泥混合液浓度(Mixed liquid suspended solids, MLSS)可增加活性污泥细菌群落多样性, 有利于恢复并提高硝化与反硝化菌和起孢菌间的底物竞争能力(图 4), 进而控制或减少污泥起孢这类常见运行问题的发生<sup>[7]</sup>。

值得注意的是, 基因组测序只是潜能而非实际功能或活性的测量, 其他的信号分子(如 RNA、

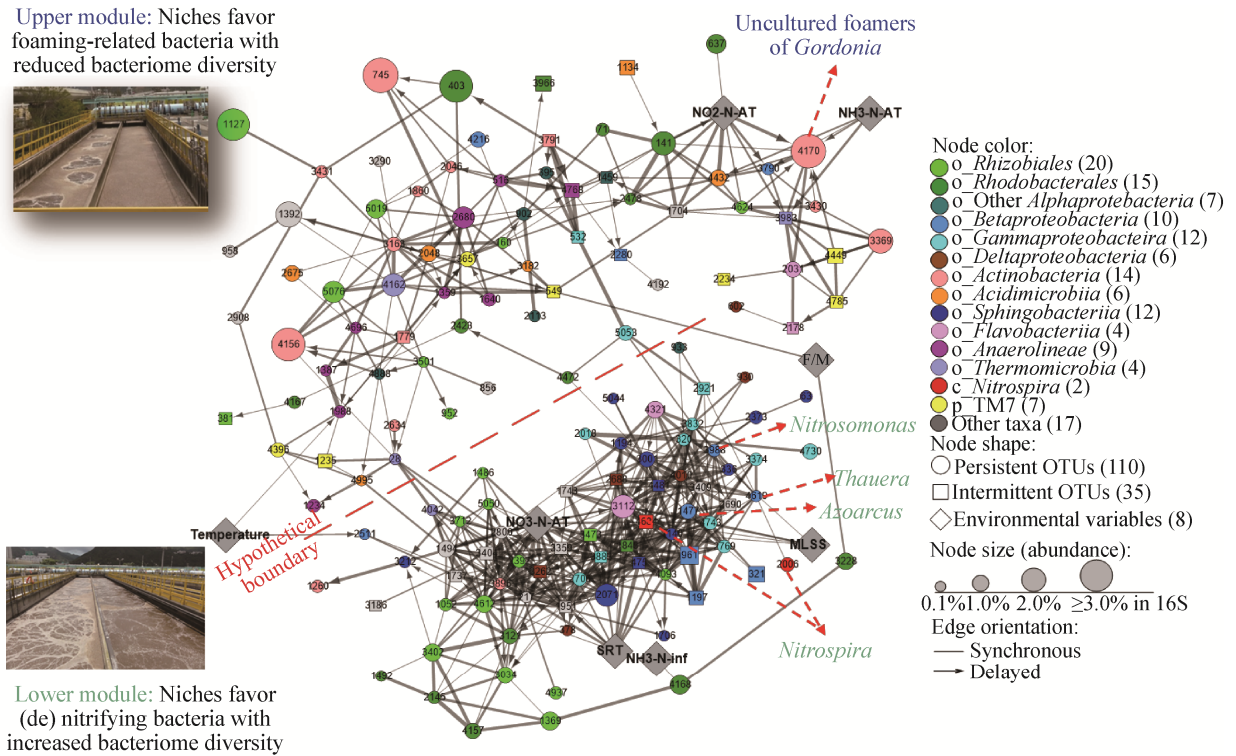


图 4 细菌-细菌和细菌-环境共现关联网络表明活性污泥起泡菌与(反)硝化菌具有不同的生态位<sup>[11]</sup>

Figure 4 Bacteria-bacteria and bacteria-environment co-occurrence association network reveals distinct niches of foaming-thrived bacteria versus (de)nitrifying bacteria<sup>[11]</sup>

注: 网络中圆形(5 年持续出现)和正方形(间歇出现)节点代表细菌 OTUs (97%相似度), 菱形节点代表水质或运行环境参数. 网络边代表其连接的两个节点变量具有强相关性( $P$  值 $\leq 0.05$ ,  $Q$  值 $\leq 0.01$ ).

Note: A circle represents a bacterial OTU, and a diamond represents a water quality or an operational parameter. An edge between two nodes represents a statistically significant and strong correlation between them.

蛋白质、代谢物)可以为原位检测微生物活性提供更好的分析手段。例如, 联合采用宏基因组和宏转录组的多组学方法能更好地揭示活性污泥微生物组内部的物种相互作用和基因表达活性的环境响应<sup>[3,8]</sup>。随着微生物群落的转录组或蛋白质组分辨率的提高<sup>[99-100]</sup>, 再结合代谢组学方法, 有望更准确地揭示微生物组关键功能基因活性、功能冗余度和代谢途径多样性<sup>[100]</sup>, 进而为精准定向调控微生物组以服务于新一代污水处理厂的功能需求(即“水质永续、资源回收、能源自给和环境友好”)提供理论基础。除多组学方法结合之外, 微生物组研究的新突破将需要跨学科协同创新以加速科学与技术的新发现。这些学科包括微生物学、环境科学、基因组学、系统生物学、计算、高级成像、材料科学和

工程学等。正如人类基因组计划跨越传统生物、物理、工程、社会科学领域得以开拓科学新领域和开发新技术一样, 下一代活性污泥微生物组学研究的进步也需要进一步加强微生物学、生态学和工程领域传统视角、概念和方法学之间的交叉融合。

## REFERENCES

- [1] Steiner AE, McLaren DA, Forster CF. The nature of activated sludge flocs[J]. *Water Research*, 1976, 10(1): 25-30
- [2] Zhang T, Shao MF, Ye L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1137-1147
- [3] Ju F, Beck K, Yin XL, et al. Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(2): 346-360
- [4] Bartow E, Mohlman FW. Purification of sewage by aeration in the presence of activated sludge[J]. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*, 1915, 7(4): 318-320

- [5] Blackall LL. Molecular identification of activated sludge foaming bacteria[J]. *Water Science & Technology*, 1994, 29(7): 35-42
- [6] Martin HG, Ivanova N, Kunin V, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(10): 1263-1269
- [7] Ju F, Xia Y, Guo F, et al. Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(8): 2421-2432
- [8] Yu K, Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38183
- [9] Wilmes P, Bond PL. Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of metaproteomic analyses to activated sludge[J]. *Water Science & Technology*, 2006, 54(1): 217-226
- [10] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-R249
- [11] Ju F, Zhang T. Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(3): 683-695
- [12] Jiang XT, Ye L, Ju F, et al. Toward an intensive longitudinal understanding of activated sludge bacterial assembly and dynamics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(15): 8224-8232
- [13] Ibarbalz FM, Figuerola ELM, Erijman L. Industrial activated sludge exhibit unique bacterial community composition at high taxonomic ranks[J]. *Water Research*, 2013, 47(11): 3854-3864
- [14] Wells GF, Park HD, Yeung CH, et al. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: Betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of crenarchaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(9): 2310-2328
- [15] Zhang T, Ye L, Tong AHY, et al. Ammonia-oxidizing archaea and ammonia-oxidizing bacteria in six full-scale wastewater treatment bioreactors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(4): 1215-1225
- [16] He SM, Gall DL, McMahon KD. "*Candidatus Accumulibacter*" population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(18): 5865-5874
- [17] Mielczarek AT, Nguyen HTT, Nielsen JL, et al. Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants[J]. *Water Research*, 2013, 47(4): 1529-1544
- [18] Guo F, Zhang T. Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing[J]. *Water Research*, 2012, 46(8): 2772-2782
- [19] Nielsen PH, Kragelund C, Seviour RJ, et al. Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(6): 969-998
- [20] Ju F, Zhang T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(10): 4119-4129
- [21] Wu LW, Ning DL, Zhang B, et al. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants[J]. *Nature Microbiology*, 2019. DOI: 10.1038/s41564-019-0426-5
- [22] Ju F, Zhang T. Experimental design and bioinformatics analysis for the application of metagenomics in environmental sciences and biotechnology[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(21): 12628-12640
- [23] Mao YP, Yu K, Xia Y, et al. Genome reconstruction and gene expression of "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" clade IB performing biological phosphorus removal[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(17): 10363-10371
- [24] Wilmes P, Bond PL. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9): 911-920
- [25] Yang Y, Li B, Ju F, et al. Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(18): 10197-10205
- [26] Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, et al. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(6): 533-538
- [27] van Kessel MAHJ, Speth DR, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 555-559
- [28] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528: 504-509
- [29] Ye L, Zhang T. Ammonia-oxidizing bacteria dominates over ammonia-oxidizing archaea in a saline nitrification reactor under low DO and high nitrogen loading[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(11): 2544-2552
- [30] Ju F, Guo F, Ye L, et al. Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6(1): 80-89
- [31] Fredriksson NJ, Hermansson M, Wilén BM. Diversity and dynamics of *Archaea* in an activated sludge wastewater treatment plant[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 140
- [32] Hu M, Wang XH, Wen XH, et al. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 72-79
- [33] Wang XH, Hu M, Xia Y, et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(19): 7042-7047
- [34] Xia SQ, Duan L, Song YH, et al. Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19): 7391-7396
- [35] Gray ND, Miskin IP, Kornilova O, et al. Occurrence and activity of *Archaea* in aerated activated sludge wastewater treatment plants[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(3): 158-168
- [36] Qin H, Ji B, Zhang SF, et al. Study on the bacterial and archaeal community structure and diversity of activated sludge from three wastewater treatment plants[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 135: 801-807
- [37] Li YY, Ding K, Wen XH, et al. A novel ammonia-oxidizing

- archaeon from wastewater treatment plant: its enrichment, physiological and genomic characteristics[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23747
- [38] Sauder LA, Albertsen M, Engel K, et al. Cultivation and characterization of *Candidatus nitrosocosmicus* exaquare, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(5): 1142-1157
- [39] Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, et al. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 3042-3051
- [40] McIlroy SJ, Saunders AM, Albertsen M, et al. Midas: the field guide to the microbes of activated sludge[J]. *Database*, 2015, 2015: bav062
- [41] Limpiyakorn T, Fürhacker M, Haberl R, et al. *amoA*-encoding archaea in wastewater treatment plants: a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(4): 1425-1439
- [42] Saunders AM, Albertsen M, Vollertsen J, et al. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(1): 11-20
- [43] Nowka B, Daims H, Spieck E. Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: nitrite availability as a key factor in niche differentiation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(2): 745-753
- [44] Thomsen TR, Kong YH, Nielsen PH. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(3): 370-382
- [45] Lopez-Vazquez CM, Oehmen A, Hooijmans CM, et al. Modeling the PAO-GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature[J]. *Water Research*, 2009, 43(2): 450-462
- [46] Ge HQ, Batstone DJ, Keller J. Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at very short sludge ages mediated by novel PAO clade *Comamonadaceae*[J]. *Water Research*, 2015, 69: 173-182
- [47] Cai L, Ju F, Zhang T. Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3317-3326
- [48] Li B, Ju F, Cai L, et al. Profile and fate of bacterial pathogens in sewage treatment plants revealed by high-throughput metagenomic approach[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(17): 10492-10502
- [49] You J, Das A, Dolan EM, et al. Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal[J]. *Water Research*, 2009, 43(7): 1801-1809
- [50] Koch H, van Kessel MAHJ, Lüscher S. Complete nitrification: Insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 177-189
- [51] Palomo A, Fowler SJ, Gülay A, et al. Metagenomic analysis of rapid gravity sand filter microbial communities suggests novel physiology of *Nitrospira* spp.[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(11): 2569-2581
- [52] Pinto AJ, Marcus DN, Ijaz UZ, et al. Metagenomic evidence for the presence of comammox *Nitrospira*-like bacteria in a drinking water system[J]. *mSphere*, 2016, 1(1): e00054-15
- [53] Wang YL, Ma LP, Mao YP, et al. Comammox in drinking water systems[J]. *Water Research*, 2017, 116: 332-341
- [54] Chao YQ, Mao YP, Yu K, et al. Novel nitrifiers and comammox in a full-scale hybrid biofilm and activated sludge reactor revealed by metagenomic approach[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 8225-8237
- [55] Gonzalez-Martinez A, Rodriguez-Sanchez A, van Loosdrecht MCM, et al. Detection of comammox bacteria in full-scale wastewater treatment bioreactors using *tag-454*-pyrosequencing[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(24): 25501-25511
- [56] Orellana LH, Chee-Sanford JC, Sanford RA, et al. Year-round shotgun metagenomes reveal stable microbial communities in agricultural soils and novel ammonia oxidizers responding to fertilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e01646-17
- [57] Carvalho G, Lemos PC, Oehmen A, et al. Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure[J]. *Water Research*, 2007, 41(19): 4383-4396
- [58] Wilmes P, Wexler M, Bond PL. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment[J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1778
- [59] Wang Q, Shao YQ, Huong VTT, et al. Fine-scale population structure of *Accumulibacter phosphatis* in enhanced biological phosphorus removal sludge[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(7): 1290-1297
- [60] Peterson SB, Warnecke F, Madejska J, et al. Environmental distribution and population biology of *Candidatus Accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(10): 2692-2703
- [61] Flowers JJ, He SM, Malfatti S, et al. Comparative genomics of two '*Candidatus Accumulibacter*' clades performing biological phosphorus removal[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(12): 2301-2314
- [62] Gao H, Mao YP, Zhao XT, et al. Genome-centric metagenomics resolves microbial diversity and prevalent truncated de-nitrification pathways in a denitrifying PAO-enriched bioprocess[J]. *Water Research*, 2019, 155(15): 275-287
- [63] Stokholm-Bjerregaard M, McIlroy SJ, Nierychlo M, et al. A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 718
- [64] Han H, Zhang Y, Cui C, et al. Effect of COD level and HRT on microbial community in a yeast-predominant activated sludge system[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3463-3465
- [65] Alawi M, Off S, Kaya M, et al. Temperature influences the population structure of nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(3): 184-190
- [66] Kim YM, Cho HU, Lee DS, et al. Influence of operational parameters on nitrogen removal efficiency and microbial communities in a full-scale activated sludge process[J]. *Water Research*, 2011, 45(17): 5785-5795
- [67] Jiang XT, Ye L, Ju F, et al. Temporal dynamics of activated sludge bacterial communities in two diversity variant full-scale sewage treatment plants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(21): 9379-9388
- [68] Wang HL, Li P, Wang Y, et al. Metagenomic insight into the

- bioaugmentation mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* in an activated sludge system treating coking wastewater[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 321: 820-829
- [69] Matsunaga K, Kubota K, Harada H. Molecular diversity of eukaryotes in municipal wastewater treatment processes as revealed by 18S rRNA gene analysis[J]. Microbes and Environments, 2014, 29(4): 401-407
- [70] Evans TN, Seviour RJ. Estimating biodiversity of fungi in activated sludge communities using culture-independent methods[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(4): 773-786
- [71] Su YY, Mennerich A, Urban B. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios[J]. Bioresource Technology, 2012, 105: 67-73
- [72] Niu LH, Li Y, Xu LL, et al. Ignored fungal community in activated sludge wastewater treatment plants: Diversity and altitudinal characteristics[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(4): 4185-4193
- [73] Li YC, Chen YF, Chen P, et al. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(8): 5138-5144
- [74] Ghosh S, Love NG. Application of *rbcL* based molecular diversity analysis to algae in wastewater treatment plants[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3619-3622
- [75] Tamaki H, Zhang R, Angly FE, et al. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(2): 441-452
- [76] Wang YL, Jiang XT, Liu L, et al. High-resolution temporal and spatial patterns of virome in wastewater treatment systems[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(18): 10337-10346
- [77] Parsley LC, Consuegra EJ, Thomas SJ, et al. Census of the viral metagenome within an activated sludge microbial assemblage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2673-2677
- [78] Barr JJ, Slater FR, Fukushima T, et al. Evidence for bacteriophage activity causing community and performance changes in a phosphorus-removal activated sludge[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 74(3): 631-642
- [79] Liu M, Gill JJ, Young R, et al. Bacteriophages of wastewater foaming-associated filamentous *Gordonia* reduce host levels in raw activated sludge[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13754
- [80] Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(7): e1004219
- [81] Gunathilaka GU, Tahlan V, Mafiz AI, et al. Phages in urban wastewater have the potential to disseminate antibiotic resistance[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017, 50(5): 678-683
- [82] Calero-Cáceres W, Muniesa M. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater[J]. Water Research, 2016, 95: 11-18
- [83] Calero-Cáceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, et al. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(13): 7602-7611
- [84] Wang MZ, Xiong WG, Liu P, et al. Metagenomic insights into the contribution of phages to antibiotic resistance in water samples related to swine feedlot wastewater treatment[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2474
- [85] Subirats J, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, et al. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2016, 48(2): 163-167
- [86] Parsley LC, Consuegra EJ, Kakirde KS, et al. Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(11): 3753-3757
- [87] Bibby K, Peccia J. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(4): 1945-1951
- [88] Miura T, Okabe S, Nakahara Y, et al. Removal properties of human enteric viruses in a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) process[J]. Water Research, 2015, 75: 282-291
- [89] Enault F, Briet A, Bouteille L, et al. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses[J]. The ISME Journal, 2017, 11(1): 237-247
- [90] Satinsky BM, Gifford SM, Crump BC, et al. Use of internal standards for quantitative metatranscriptome and metagenome analysis[J]. Methods in Enzymology, 2013, 531: 237-250
- [91] Hardwick SA, Chen WY, Wong T, et al. Synthetic microbe communities provide internal reference standards for metagenome sequencing and analysis[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3096
- [92] Stewart EJ. Growing unculturable bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(16): 4151-4160
- [93] Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 309(1): 1-7
- [94] Grandclément C, Seyssiecq I, Piram A, et al. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: a review[J]. Water Research, 2017, 111: 297-317
- [95] Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 791
- [96] Karst SM, Dueholm MS, McIlroy SJ, et al. Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(2): 190-195
- [97] Munck C, Albertsen M, Telke A, et al. Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8452
- [98] Colin PY, Kintses B, Gielen F, et al. Ultrahigh-throughput discovery of promiscuous enzymes by picodroplet functional metagenomics[J]. Nature Communications, 2015, 6: 10008
- [99] Ottesen EA, Young CR, Eppley JM, et al. Pattern and synchrony of gene expression among sympatric marine microbial populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(6): E488-E497
- [100] Brooks B, Mueller RS, Young JC, et al. Strain-resolved microbial community proteomics reveals simultaneous aerobic and anaerobic function during gastrointestinal tract colonization of a preterm infant[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 654