



## 宏组学方法在污水处理系统中的应用进展

王琳\* 田璐

中国海洋大学环境科学与工程学院 山东 青岛 266100

**摘要:** 污水生物处理由微生物生理过程驱动, 宏组学方法能够获得不同水平的分子信息, 为认识污水处理系统中的微生物提供了新途径。本文对宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学与代谢组学等宏组学方法的发展进行综述, 着重介绍各组学及整合宏组学在污水处理系统中的研究现状, 并指出其应用前景。

**关键词:** 宏基因组学, 宏转录组学, 宏蛋白质组学, 代谢组学, 污水处理

## Application of metaomics in wastewater treatment

WANG Lin\* TIAN Lu

School of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266100, China

**Abstract:** Biological wastewater treatment systems are driven by microbial physiological processes, metaomics approaches obtain information from different molecular levels, providing a new way to understand microorganism in wastewater treatment systems. In this review, we summarize the developments of metaomics such as metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics and metabolomics, highlight the current research of metaomics and integrated metaomics in wastewaters treatment systems, also indicate the prospect in practical application.

**Keywords:** Metagenomics, Metatranscriptomics, Metaproteomics, Metabolomics, Wastewater treatment

快速工业化和人口膨胀导致了各种污染物的产生和排放, 不仅破坏环境, 而且威胁人体健康。目前的研究与应用旨在利用和增强不同微生物的自然能力来代谢污染物。微生物主导的污水生物处理以一种生态可接受的方式来净化污染水体, 是主流的污水处理方式。污水的生物处理过程由混合微生物群落驱动, 污染物的转化与消除依赖于微生物

生理过程。成功设计污水生物处理设施和提升其性能的关键在于彻底了解进行污染物转化的微生物群落。

高速发展的高通量测序技术和现代质谱技术使不同水平的分子信息(核酸、蛋白质、代谢物等)得以快速、简便地获得, 形成了宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白质组学与代谢组学等宏

**Foundation items:** Key Project of Jinan People's Livelihood Research (201704315); Key Research and Development Program of Shandong Province (2016GSF117018); National Key Research and Development Program of China (2018YFC0408004)

\*Corresponding author: E-mail: lwangouc@126.com

**Received:** 26-09-2018; **Accepted:** 07-12-2018; **Published online:** 24-12-2018

**基金项目:** 济南市社会民生重大专项(201704315); 山东省重点研发计划项目(2016GSF117018); 国家重点研发计划(2018YFC0408004)

\*通信作者: E-mail: lwangouc@126.com

**收稿日期:** 2018-09-26; **接受日期:** 2018-12-07; **网络首发日期:** 2018-12-24

组学方法,为认识污水处理系统中的微生物群落与其代谢能力提供了有力工具<sup>[1-2]</sup>。污水的生物处理是一个高度动态的过程,系统的净化功能受到宏基因组、转录组学、宏蛋白质组学、代谢组等之间的相互作用,因此不仅要单独对各组学进行研究,而且要理解它们之间是如何作用的。

## 1 基于高通量测序的宏基因组学和宏转录组学

### 1.1 测序技术的发展

DNA 测序技术产生至今的 40 年间发生了 3 次重要的“技术革命”,常用测序平台的对比如表 1 所示。

Maxam 和 Gilbert 在 1977 年提出的化学裂解法(Maxam-Gilbert 法)<sup>[3]</sup>,与 Sanger 和 Coulson 同年提出的双脱氧链终止法(Sanger 法)<sup>[4]</sup>被称为第一代测序技术。Maxam-Gilbert 法因读长短、试剂毒性大、程序复杂等缺点被淘汰, Sanger 法凭其长读长、高准确度等优点,长期作为 DNA 测序的金标准,然而其存在测序费力、耗时、昂贵等不足。

第二代测序技术又称为下一代测序技术(Next-generation sequencing, NGS), 2005 年 454 公司推出第一个商用 NGS 平台,标志着第二代测序技术商品化的开端。此后各测序平台竞争激烈,

极大降低了 DNA 测序的成本,美国国家人类基因组研究所数据显示,从 2008 年到 2017 年,每兆碱基的测序费用由 32.3 美元降至 0.013 美元<sup>[5-6]</sup>。Illumina 平台为当今 NGS 主流平台,其读长一般在 50–300 bp,运行一次可产生 300 Gb 数据,准确度超过 99.9%<sup>[7]</sup>,已成为基础生物学的标准工具。尽管 NGS 技术非常强大,但它的缺点不容忽视,短读长是其主要限制因素;此外 NGS 依赖 PCR 技术,导致(C+G)mol%含量极端的区域无法有效扩增。

第三代测序技术(Third-generation sequencing, TGS)的显著特征是单分子与实时测序<sup>[8-9]</sup>,第一个可行的 TGS 技术是 PacBio 公司于 2011 年发布的单分子实时测序(Single-molecule real-time, SMRT)技术<sup>[10-11]</sup>。SMRT 是目前使用最广泛的长读长测序平台,与 NGS 相比, SMRT 测序的主要优势是其超长读长。但由于 DNA 聚合酶活性的限制,测序长度不能继续增长。SMRT 的主要不足是低通量和高错误率,好在错误是随机分布的,可以通过多次测序来进行有效纠错<sup>[10,12]</sup>。

纳米孔测序的思想早在 20 世纪 80 年代就已提出,由于技术限制,2014 年 Oxford Nanopore Technologies (ONT)公司才推出第一台纳米孔测序仪 MinION。与其他借助二次信号(如光、颜色、pH

表 1 常用测序平台对比

Table 1 Comparison of common sequencing platforms

| Platform | Instrument   | Read length (bp)                  | Throughput (Gb) | Pros                                                                                    | Cons                                                           |
|----------|--------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Sanger   | ABI 3730XL   | 500–1 000                         | 0.000 3         | Long reads;<br>High sequencing quality                                                  | Low throughput;<br>High cost                                   |
| Illumina | MiSeq        | 50–600                            | 0.3–15          | High throughput;<br>High accuracy                                                       | Short reads;<br>Rely on PCR<br>amplification                   |
|          | HiSeq2500    | 50–250                            | 10–800          |                                                                                         |                                                                |
|          | HiSeq X Ten  | 50–300                            | 900–1 800       |                                                                                         |                                                                |
| PacBIO   | PacBIO RS II | 10 000–15 000                     | 0.5–1.0         | Long reads;<br>Direct detection of<br>epigenetic                                        | High error rate at single pass;<br>Relatively high cost per Gb |
|          | Sequel       | 10 000–15 000                     | 5–10            |                                                                                         |                                                                |
| ONT      | MinION       | Depend on DNA<br>molecule lengths | 20              | Real long reads;<br>High throughput;<br>Direct detection of<br>epigenetic modifications | High overall error rate;<br>Relatively high cost               |
|          | PromethION   |                                   | 15 000          |                                                                                         |                                                                |
|          | GridION      |                                   | 100             |                                                                                         |                                                                |

等)的测序平台不同, 纳米孔测序直接检测单链 DNA 分子的组成。与 SMRT 测序不同的是, 纳米孔测序的读长不受技术本身的限制, 而是取决于 DNA 分子的长度, 只要 DNA 质量足够好, 就可以获得极长的读数。纳米孔测序的不足是错误率高(约 15%), 而且不能像 SMRT 测序那样对同一条链进行多次测序纠错, ONT 声称对双链 DNA 分子两条链进行测序可将错误率降至 3%, 但同时也使测序时间翻倍、通量降低<sup>[12-13]</sup>。

## 1.2 宏基因组学

### 1.2.1 宏基因组学概念

宏基因组学的概念由 Handelsman 等在 1998 年首次提出, 以特定环境中全部微生物基因组为研究对象, 通过功能基因筛选和测序分析, 研究微生物多样性、群落结构、进化关系和功能活性等<sup>[14]</sup>。

### 1.2.2 宏基因组学在污水处理系统中的应用

#### (1) 基于 16S rRNA 基因的微生物群落分析

16S rRNA 基因长度适中、信息量大、易于分析, 是分析细菌群落常用的标记分子。该基因包含 11 个保守区和 9 个可变区(V1-V9)<sup>[15-16]</sup>, 由于 NGS 的短读限制, 只能选择最有效的靶区作为系统发育标记。根据不同 NGS 平台读长, 可针对一个或多个可变区测序。王琳等<sup>[17]</sup>利用 Illumina MiSeq 平台, 针对 16S rRNA 基因的 V4 区测序研究 Biostyr 曝气生物滤池的沿程微生物多样性, 结果发现优势菌群有拟杆菌、疣微菌门、厚壁菌门、变形菌门等, 而且沿程微生物丰富度差异小但多样性差异大。Sun 等<sup>[18]</sup>研究了以剩余污泥为碳源改善 UASB 反应器对低浓度硝酸盐废水净化效果的可行性, 利用 Illumina MiSeq 平台对 16S rRNA 基因的 V3-V4 区测序, 测序分析表明, 在反应器启动和短期消化期间, 细菌群落发生了较大变化, 并发现假单胞菌属和陶厄氏菌属的某些细菌能够释放有机物用于反硝化反应。

由于个体物种的遗传距离与子区域和全长序列之间的相似性有关<sup>[19]</sup>, 短读测序可能低估微生物多样性。研究证明随着读长的增加, 分类的灵敏

度和准确率也会提高, 因此长读测序可以在物种水平上提高微生物群落分析的分辨率<sup>[20]</sup>。Wang 等<sup>[21]</sup>建立了进行同步硝化反硝化和去除有机物的 SBBR 反应器, 用于处理高盐榨菜废水, 利用 PacBio SMRT 对 16S rRNA 基因全长(V1-V9)测序, 实验发现随着盐度的增加, 反应器中微生物多样性下降, 亚硝酸盐氧化细菌(Nitrite-oxidizing bacteria, NOB)受到明显抑制。目前纳米孔测序尚未应用于污水处理系统微生物研究, 在小鼠肠道细菌的研究中, Shin 等<sup>[22]</sup>分别利用纳米孔测序(MinION 平台)和短读测序(Illumina 平台)对 16S rRNA 基因全长和 V3-V4 区测序, 对比发现, 在物种层面, 纳米孔测序比短读测序能识别更多的物种, 促进细菌群落的精确分类。全长 16S rRNA 基因扩增子测序方法将有助于快速、准确、高效地检测各种生物或环境样品中的微生物多样性。

#### (2) 基于宏基因组的功能基因分析

与基于 16S rRNA 基因测序的方法相比, 宏基因组学以偏差较小的方式进行分类并可直接推断微生物群落的代谢潜力。宏基因组学是非靶向方法, 定性、定量描述可能被特定微生物群落表达的基因, 能够深入了解微生物群落整体功能, 包括群落代谢能力和成员间潜在的功能上的相互关系等信息<sup>[23]</sup>。

借助各种测序平台可进行宏基因组学研究。Illumina MiSeq 和 HiSeq 平台等短读测序平台覆盖度高、性价比高, 允许精确量化基因拷贝数和等位基因变体, 但是组装和注释的过程存在挑战。Chao 等<sup>[24]</sup>基于 Illumina HiSeq 对活性污泥和生物膜样品进行宏基因组测序, 结果表明生物膜中硝化细菌和反硝化细菌的多样性和丰度比活性污泥低, 但硝化和反硝化功能基因丰度较活性污泥高。

长读测序平台, 如 PacBio 和 ONT 平台, 其读长有利于组装和注释, 但产生的读数少, 无法提供短读平台的测序深度, 不能精确定量基因拷贝数和等位基因变体, 用于宏基因组研究过于昂贵<sup>[25-26]</sup>。Driscoll 等<sup>[27]</sup>基于 PacBio SMRT 的宏基因组测序, 对来自上克拉斯湖共培养的 3 个完整的细菌基

基因组进行组装,与基于 Illumina HiSeq 的宏基因组测序结果相比,总基因组长度相差 7%。此研究表明,当前的技术允许对多样性较低的群体进行基因组测序,未来随着测序平台的改进,长读测序技术在宏基因组学中将大放异彩。

### 1.3 宏转录组学

#### 1.3.1 宏转录组学概念

宏转录组学对特定时刻、特定环境中全部微生物的转录本进行测序,代表生态系统转录水平上功能和分类的表达及调控,提供特定时间微生物群落功能活性的信息,是衡量宏基因组表达的方法<sup>[28]</sup>。早期的宏转录组学采用微阵列或 DNA 芯片技术,存在设计复杂、价格昂贵、无法检测模板之外基因的表达水平等缺陷,高通量测序技术的发展解决了这些问题。

#### 1.3.2 宏转录组学在污水处理系统中的应用

Crovadore 等<sup>[29]</sup>利用好氧颗粒污泥处理湿式氧化反应器出水,基于 Illumina HiSeq 平台,采用宏基因组学和宏转录组学研究了好氧污泥颗粒中微生物群落结构演替和氮代谢相关的 7 种酶对应编码基因的表达水平;研究表明,宏转录组学可以提供功能代谢信息并识别优势活菌,与宏基因组学信息互补。Yu 等<sup>[30]</sup>首次将宏基因组学和宏转录组学应用于活性污泥微生物群落结构和基因表达研究,利用 Illumina HiSeq 平台对 DNA 与 cDNA 测序,发现 DNA 和 cDNA 数据集之间微生物群落组成和基因表达存在差异;他们以脱氮为目的的进一步基因表达注释表明,反硝化相关基因在 DNA 和 cDNA 数据集中均占主导地位,硝化基因也以相对高的水平表达。

## 2 基于质谱的宏蛋白质组学和代谢组学

质谱(Mass spectrometry, MS)技术是宏蛋白质组学和宏代谢组学的主要分析方法,通常结合色谱与质谱技术对复杂样品中的蛋白质或代谢物进行表征。

### 2.1 宏蛋白质组学

#### 2.1.1 宏蛋白质组学概念及技术

微生物的任何代谢过程都由多种蛋白质共同

调控,蛋白质之间相互作用,动态发挥功能,因此要在动态和整体水平上研究蛋白质<sup>[31]</sup>。宏蛋白质组学对特定时刻环境中表达的所有蛋白质定性或定量,提供蛋白质表达和功能信息。

宏蛋白质组学的研究策略主要有两种:一是凝胶法,混合蛋白质首先由一维或二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PADE)分离,然后切割凝胶上的蛋白点或条带,用胰蛋白酶或其他酶将其消化成肽,对所得的肽进行质谱或串联质谱分析;二是液相色谱法(即鸟枪法),蛋白质无需事先分离,用蛋白酶将其消化为成分更为复杂的肽混合物,然后用强阳离子交换色谱法或微毛细管反相分离所得肽,采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析<sup>[32-33]</sup>。

在过去十年内,宏蛋白质组学由传统的双向凝胶电泳、蛋白质从头测序等发展为“鸟枪法”,可同时进行蛋白质分离、鉴定和定量<sup>[34-35]</sup>。与凝胶法相比,“鸟枪法”大大增加了蛋白质组的覆盖率,允许短时间内对上千个蛋白质进行高通量鉴定,还可鉴定不溶性膜蛋白,因此“鸟枪法”成为目前宏蛋白质组学研究的主要策略<sup>[32,35-36]</sup>。

#### 2.1.2 宏蛋白质组学在污水处理系统中的应用

相比于宏蛋白质组学在其他环境(如肠道、海洋、土壤等)研究中的应用<sup>[37-39]</sup>,目前污水处理领域取得的成果有限;由于样品中存在干扰蛋白质分离的腐殖质化合物、微生物群落的高度复杂性以及缺乏供蛋白质鉴定的基因组序列,使宏蛋白质组学在污水处理系统中的应用仍具有挑战性。

##### (1) 基于宏蛋白质组学的代谢途径分析

大多数研究污水处理系统的宏蛋白质组学描述了复杂微生物群落分类和功能组成。Abram 等<sup>[40]</sup>利用系统发育分析和宏蛋白质组学对厌氧工业废水处理生物反应器中的微生物群落进行了表征,识别 18 种不同的蛋白质,其中 14 种可归类于代谢功能范畴,与糖酵解和甲烷生成过程有关,其余 4 种酶分别属于膜蛋白、氧化还原、转录、蛋白质降解等,证明宏蛋白质组学是一个强大的工具,能够发现特定生物反应器中发生的关键代谢途径。

## (2) 基于宏蛋白质组学的调控过程分析

一些研究将宏蛋白质组学与污水处理系统的环境因素、运行参数等关联<sup>[41]</sup>。Lin 等<sup>[42]</sup>运用宏蛋白质组学检测不同温度下 Anammox 群落的蛋白质组调控模式, 所检测的许多丰富的蛋白质与 Anammox 代谢有关, 意味着它们在 Anammox 细菌的生长和维持中具有重要作用; 较低温度下, 丰度升高的蛋白质数量远超丰度降低的蛋白质, 说明 Anammox 细菌改变了它们的分子过程来适应温度下降的影响。Wang 等<sup>[43]</sup>通过微生物群落分析和宏蛋白质组学揭示了盐度对好氧颗粒污泥特性的影响, 实验发现孔蛋白和周质结合蛋白在高盐耐受性中起重要作用, 证明了利用蛋白质来指示好氧颗粒污泥在盐胁迫下反应的潜力。

## 2.2 代谢组学

### 2.2.1 代谢组学概念及技术

代谢组学旨在分析特定时刻、特定条件下生物体的代谢物, 包括来自初级代谢和次级代谢的数千种细胞基质和代谢物, 涉及到信号传递和应激反应等许多具体的功能<sup>[44-45]</sup>。靶向代谢组学具有高度特异性, 可以对预先选定的代谢物进行检测定量<sup>[46-47]</sup>; 非靶向代谢组学是全面的、非特异性的, 允许对广泛的代谢物无偏检测, 旨在同时分析尽可能多的代谢物, 有助于揭示新的代谢途径或生物标志物<sup>[48-50]</sup>。

应用代谢组学对大量代谢物进行全面分析严重依赖于分离技术的发展。代谢组学常用的分析方法有气相色谱-质谱联用(GC-MS)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、核磁共振(NMR)、傅里叶转换红外光谱(FTIR)或它们的组合<sup>[51]</sup>。GC-MS、LC-MS 与 NMR 是分析代谢物最常用的手段, 能在一次运行中检测多种代谢物。GC-MS 是一种高分辨率的色谱分离方法, 广泛用于挥发性和半挥发性有机物的分析, 适用于检测初级代谢产物脂肪酸、碳水化合物等, 大多数基于 MS 的环境代谢组学研究都是使用 GC-MS 进行的<sup>[52-53]</sup>, 但 GC-MS 对化合物的检测是间接的, 使样品中新代谢物的定量和阐明复杂

化<sup>[54]</sup>。LC-MS 是检测非挥发性化合物最常用的方法, 无需使样品衍生化, 可直接检测代谢物, 比如黄酮类化合物、生物碱等次级代谢物, 以及氨基酸、碳水化合物等初级代谢物<sup>[52]</sup>。NMR 无需大量的样品制备和分馏工作, 可迅速检测样品中最丰富的代谢物; 此外, NMR 可以检测出 MS 难以电离的化合物, 稳健量化小分子量挥发性有机化合物, 但与 MS 技术相比, 其灵敏性较差、覆盖率低<sup>[52,55]</sup>。没有一种单一的分析方法能够覆盖样品的全部代谢组成分, 这些方法有各自的优劣, 可结合使用、相互补充<sup>[56-57]</sup>。

### 2.2.2 代谢组学在污水处理系统中的应用

代谢物来源于复杂的生化途径网络, 微生物代谢组学提供了微生物群功能状态的化学指纹图谱, 揭示了微生物群落与环境的相互作用机制。Feng 等<sup>[58]</sup>利用基于 LC-MS 的代谢组学分析揭示膜生物反应器中自养型和混合营养型 Anammox 菌群代谢途径的差异, 在此研究中检测到 440 种代谢物, 超过 350 个代谢物的含量因 C/N 比的变化而显著改变。自养型和混合营养型 Anammox 菌群的氮去除率、生物量和 EPS 分泌量的差异主要在于能量代谢的变化, 而不是群落演替。Dai 等<sup>[59]</sup>利用代谢组学分析了进水  $\text{Ca}^{2+}$  对反硝化除磷系统微生物代谢的影响, 分析表明, 高浓度钙离子影响微生物群落的代谢谱, 氨基酸的积累、核苷酸和胺类代谢物的减少是高  $\text{Ca}^{2+}$  负载的重要响应。与宏蛋白质组和宏转录组相比, 代谢组更易受到环境因素波动的影响, 这使代谢组学成为理解特定代谢途径的有效方法。

## 3 整合宏组学

宏基因组学能给出任何环境中微生物的基因组信息, 但在阐明基因表达和活性方面作用有限, 单凭宏基因组学难以推断取样时有何种代谢基因表达, 需要宏转录组学提供相关信息<sup>[54,60]</sup>; 宏转录组学从 mRNA 水平进行研究, 给出基因表达与活性信息; 蛋白质直接调节微生物的生理活

动,宏蛋白质组学揭示了微生物的代谢途径、与环境的响应关系和微生物间相互作用等;代谢组学揭示微生物细胞代谢物状态,提供关键信息,帮助了解相关代谢途径发生的变化。宏基因组学和宏转录组学解释了微生物生理现象的深层原因,宏蛋白质组学发掘表层原因,而代谢组学阐明分子结果,整合宏组学结合原因与结果探讨污水生物处理机制,较单个组学的研究更加可靠。

Roume 等<sup>[61]</sup>基于宏基因组学、宏转录组学和宏蛋白质组学开发了一个重建群落代谢网络框架,该框架通过整合群落结构与功能测量,识别重要功能基因,与重要的群落成员相结合。Dai 等<sup>[62]</sup>采用宏基因组学与宏代谢组学结合的分析方法,揭示化学磷回收对生物营养物去除过程的影响,此研究利用宏基因组学得到了群落结构变化、功能分类与功能潜力分析和硝化反硝化除磷过程中关键酶的变化等信息,利用代谢组学分析提供了胞内代谢物的变化,发现代谢谱的总体变化与基于宏基因组分析的功能分类结果大体一致。整合这些宏组学信息,能够增强我们对微生物及相关过程的理解,从而提高关键群落的生存率,改善污水处理系统处理污染物的性能<sup>[63]</sup>。

#### 4 结论与展望

由于污水处理系统内部复杂的微生物动力学和生理变化,污水处理厂的傳統管理多以“黑箱”理论为指导,宏组学为认识其微生物生态系统内部结构和相互关系带来曙光。宏组学使我们对污水处理系统中的微生物群落结构、代谢基因、代谢途径有了深入的认识,将来可能发现新的物种与代谢途径等,有助于加深我们对微生物系统运行的理解。此外,宏组学信息说明了存在有利于污水处理的微生物群落,未来可针对性地在污水处理系统中富集或引入有利微生物。

随着测序、质谱技术的发展,单个宏组学分析所产生的数据集在通量和质量上迅速提高,使多组学研究具有可行性,但如何以一种有意义的方式组

合单个宏组学数据具有挑战性<sup>[64]</sup>。多组学方法虽然仍处于开发的早期阶段,但已经促成了新功能基因的发现,并将它们与相关废水处理过程中的功能微生物群落联系起来,有效结合的多组学将为污水处理系统的设计提供有效、可靠的预测信息。

#### REFERENCES

- [1] Kopczyński D, Coman C, Zahedi RP, et al. Multi-OMICS: a critical technical perspective on integrative lipidomics approaches[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2017, 1862(8): 808-811
- [2] Rodríguez E, García-Encina PA, Stams AJM, et al. Meta-omics approaches to understand and improve wastewater treatment systems[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2015, 14(3): 385-406
- [3] Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(2): 560-564
- [4] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(12): 5463-5467
- [5] Schloss JA. How to get genomes at one ten-thousandth the cost[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1113-1115
- [6] Wetterstrand KA. DNA sequencing costs: data from the NHGRI genome sequencing program (GSP)[EB/OL]. [2018-04-25]. <https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>
- [7] Ghurye JS, Cepeda-Espinoza V, Pop M. Metagenomic assembly: overview, challenges and applications[J]. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2016, 89(3): 353-362
- [8] Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353
- [9] Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing[J]. *Human Molecular Genetics*, 2010, 19(R2): R227-R240
- [10] Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13(5): 278-289
- [11] Travers KJ, Chin CS, Rank DR, et al. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(15): e159
- [12] van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, et al. The third revolution in sequencing technology[J]. *Trends in Genetics*, 2018, 34(9): 666-681
- [13] Bleidorn C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research[J]. *Systematics and Biodiversity*, 2016, 14(1): 1-8
- [14] 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
- [15] Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, et al. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies[J]. *Applied and*

- Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7724-7736
- [16] Vincent AT, Derome N, Boyle B, et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 138: 60-71
- [17] Wang L, Xiao JL, Dou NS. Microorganism characteristics along Biostyr biological aerated filter[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(11): 6283-6289 (in Chinese)  
王琳, 肖娇玲, 窦娜莎. Biostyr 曝气生物滤池的沿程微生物多样性[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11): 6283-6289
- [18] Sun HH, Wu Q, Yu P, et al. Denitrification using excess activated sludge as carbon source: performance and the microbial community dynamics[J]. Bioresource Technology, 2017, 238: 624-632
- [19] Schloss PD. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies[J]. PLoS Computational Biology, 2010, 6(7): e1000844
- [20] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(9): 635-645
- [21] Wang JL, Gong BZ, Huang W, et al. Bacterial community structure in simultaneous nitrification, denitrification and organic matter removal process treating saline mustard tuber wastewater as revealed by 16S rRNA sequencing[J]. Bioresource Technology, 2017, 228: 31-38
- [22] Shin J, Lee S, Go MJ, et al. Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29681
- [23] Chistoserdova L. Functional metagenomics: recent advances and future challenges[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2009, 26(1): 335-352
- [24] 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
- [25] Prakash T, Taylor TD. Functional assignment of metagenomic data: challenges and applications[J]. Briefings in Bioinformatics, 2012, 13(6): 711-727
- [26] Garrido-Cardenas J, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo J, et al. DNA sequencing sensors: an overview[J]. Sensors, 2017, 17(3): 588
- [27] Driscoll CB, Otten TG, Brown NM, et al. Towards long-read metagenomics: complete assembly of three novel genomes from bacteria dependent on a diazotrophic cyanobacterium in a freshwater lake co-culture[J]. Standards in Genomic Sciences, 2017, 12: 9
- [28] Ma HX, Zhang LL, Sun XM, et al. Understanding microbial communities and their functions by meta-omics approaches[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 902-912 (in Chinese)  
马海霞, 张丽丽, 孙晓萌, 等. 基于宏组学方法认识微生物群落及其功能[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 902-912
- [29] Crovadore J, Soljan V, Calmin G, et al. Metatranscriptomic and metagenomic description of the bacterial nitrogen metabolism in waste water wet oxidation effluents[J]. Heliyon, 2017, 3(10): e00427
- [30] 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
- [31] Hu SD, Guo J, Zou SL, et al. Application of metaproteomics in study of activated sludge[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016, 22(4): 725-731 (in Chinese)  
胡少达, 郭锦, 邹少兰, 等. 宏蛋白质组学在活性污泥研究中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(4): 725-731
- [32] Wang DZ, Kong LF, Li YY, et al. Environmental microbial community proteomics: status, challenges and perspectives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1275
- [33] Wu ZD, Huang J, Zhou RQ. Recent advance and application of metaproteomics[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(5): 259-263 (in Chinese)  
吴重德, 黄钧, 周荣清. 宏蛋白质组学研究进展及应用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 259-263
- [34] Wilmes P, Heintz-Buschart A, Bond PL. A decade of metaproteomics: where we stand and what the future holds[J]. Proteomics, 2015, 15(20): 3409-3417
- [35] Petriz BA, Franco OL. Metaproteomics as a complementary approach to gut microbiota in health and disease[J]. Frontiers in Chemistry, 2017, 5: 4
- [36] Bize A, Cardona L, Desmond-Le Quémener E, et al. Shotgun metaproteomic profiling of biomimetic anaerobic digestion processes treating sewage sludge[J]. Proteomics, 2015, 15(20): 3532-3543
- [37] Li DX, Zhang H, Chen XH, et al. Metaproteomics reveals major microbial players and their metabolic activities during the blooming period of a marine dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(2): 632-644
- [38] Gavin PG, Mullaney JA, Loo D, et al. Intestinal metaproteomics reveals host-microbiota interactions in subjects at risk for type 1 diabetes[J]. Diabetes Care, 2018, 41(10): 2178-2186
- [39] Graham EB, Crump AR, Kennedy DW, et al. Multi 'omics comparison reveals metabolome biochemistry, not microbiome composition or gene expression, corresponds to elevated biogeochemical function in the hyporheic zone[J]. Science of the Total Environment, 2018, 642: 742-753
- [40] Abram F, Enright AM, O'Reilly J, et al. A metaproteomic approach gives functional insights into anaerobic digestion[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(6): 1550-1560
- [41] Heyer R, Schallert K, Zoun R, et al. Challenges and perspectives of metaproteomic data analysis[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 261: 24-36
- [42] Lin XM, Wang YY, Ma X, et al. Evidence of differential adaptation to decreased temperature by anammox bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(10): 3514-3528
- [43] Wang XG, Yang TY, Lin B, et al. Effects of salinity on the performance, microbial community, and functional proteins in an aerobic granular sludge system[J]. Chemosphere, 2017, 184: 1241-1249
- [44] Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(1/2): 155-171

- [45] Kumar M, Kuzhiumparambil U, Pernice M, et al. Metabolomics: an emerging frontier of systems biology in marine macrophytes[J]. *Algal Research*, 2016, 16: 76-92
- [46] Begou O, Gika HG, Wilson ID, et al. Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics[J]. *Analyst*, 2017, 142(17): 3079-3100
- [47] Klepacki J, Klawitter J, Klawitter J, et al. Amino acids in a targeted versus a non-targeted metabolomics LC-MS/MS assay. Are the results consistent?[J]. *Clinical Biochemistry*, 2016, 49(13/14): 955-961
- [48] Tzoulaki I, Iliou A, Mikros E, et al. An overview of metabolic phenotyping in blood pressure research[J]. *Current Hypertension Reports*, 2018, 20(9): 78
- [49] Bloszies CS, Fiehn O. Using untargeted metabolomics for detecting exposome compounds[J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2018, 8: 87-92
- [50] Naz S, Vallejo M, García A, et al. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1353: 99-105
- [51] Shulaev V, Isaac G. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry – a metabolomics perspective[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1092: 499-505
- [52] Viant MR, Sommer U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review[J]. *Metabolomics*, 2013, 9(S1): 144-158
- [53] Xu YJ, Wang CS, Ho WE, et al. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 56: 37-48
- [54] White III RA, Rivas-Ubach A, Borkum MI, et al. The state of rhizospheric science in the era of multi-omics: a practical guide to omics technologies[J]. *Rhizosphere*, 2017, 3: 212-221
- [55] Karu N, Deng L, Slae M, et al. A review on human fecal metabolomics: methods, applications and the human fecal metabolome database[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1030: 1-24
- [56] Tomita S, Nakamura T, Okada S. NMR- and GC/MS-based metabolomic characterization of sunki, an unsalted fermented pickle of turnip leaves[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 25-34
- [57] Zhang MH, Chen JQ, Guo HM, et al. Combination of LC/MS and GC/MS based metabolomics to study the hepatotoxic effect of realgar nanoparticles in rats[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2017, 15(9): 684-694
- [58] Feng Y, Zhao YP, Guo YZ, et al. Microbial transcript and metabolome analysis uncover discrepant metabolic pathways in autotrophic and mixotrophic anammox consortia[J]. *Water Research*, 2018, 128: 402-411
- [59] Dai HL, Wu YF, Peng LH, et al. Effects of calcium on the performance, bacterial population and microbial metabolism of a denitrifying phosphorus removal system[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 828-835
- [60] Malla MA, Dubey A, Yadav S, et al. Understanding and designing the strategies for the microbe-mediated remediation of environmental contaminants using omics approaches[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1132
- [61] Roume H, Heintz-Buschart A, Muller EEL, et al. Comparative integrated omics: identification of key functionalities in microbial community-wide metabolic networks[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2015, 1: 15007
- [62] Dai HL, Dai ZQ, Peng LH, et al. Metagenomic and metabolomic analysis reveals the effects of chemical phosphorus recovery on biological nutrient removal system[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 328: 1087-1097
- [63] Miao LL, Liu ZP. Microbiome analysis and -omics studies of microbial denitrification processes in wastewater treatment: recent advances[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(7): 753-761
- [64] Haas R, Zelezniak A, Iacovacci J, et al. Designing and interpreting 'multi-omic' experiments that may change our understanding of biology[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2017, 6: 37-45