

# 宏基因组学在环境微生物组研究中的应用与展望

王慧<sup>1</sup>, 鞠峰<sup>\*1,2</sup>

1 西湖大学工学院环境微生物组与生物技术实验室, 浙江 杭州 310030

2 西湖大学生命科学学院 西湖实验室, 浙江 杭州 310030

王慧, 鞠峰. 宏基因组学在环境微生物组研究中的应用与展望[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1814-1833.

WANG Hui, JU Feng. Applications and perspectives of metagenomics in environmental microbiome research[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1814-1833.

**摘要:** 自 2005 年罗氏公司推出首台商业化第二代 DNA 测序仪, 基于高通量测序的宏基因组学方法被广泛用于各种环境中微生物群落的组成和功能分析, 揭示了环境微生物组中蕴藏着的大量未被发现的新物种、新基因、酶和代谢过程。该系列工作表明了未培养微生物在驱动生物地球化学循环中发挥着重要作用, 同时促进了污染物降解、环境修复、生物技术和天然药物研发等领域的理论突破和技术创新。本文从发现新的物种、功能基因(簇)、物质代谢途径和微生物(M)-环境(E)-效能(P)关联 4 个方面综述了宏基因组学在环境微生物组研究中的应用与进展, 并对未来研究进行了展望。

**关键词:** 宏基因组学; 环境微生物组; 物种; 基因; 代谢过程

## Applications and perspectives of metagenomics in environmental microbiome research

WANG Hui<sup>1</sup>, JU Feng<sup>\*1,2</sup>

1 Environmental Microbiome and Biotechnology Laboratory, School of Engineering, Westlake University, Hangzhou 310030, Zhejiang, China

2 School of Life Sciences & Westlake Laboratory, Westlake University, Hangzhou 310030, Zhejiang, China

**Abstract:** Since Roche launched the first commercial next-generation DNA sequencer in 2005, high-throughput sequencing-based metagenomic approaches have been widely employed to analyze the composition and functions of microbial communities in various environments, revealing numerous novel species, genes, enzymes, and metabolic processes within environmental

资助项目: 浙江省自然科学基金(LR22D010001); 国家自然科学基金(22241603); 浙江省“领雁”研发攻关计划(2022C03075)  
This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LR22D010001), the National Natural Science Foundation of China (22241603), and the “Lingyan” Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2022C03075).

\*Corresponding author. E-mail: jufeng@westlake.edu.cn

Received: 2023-12-30; Accepted: 2024-03-06; Published online: 2024-04-09

microbiomes. The relevant work indicates that uncultured microorganisms play crucial roles in driving biogeochemical cycles and promotes theoretical breakthroughs and technological innovation in areas such as pollutant degradation, environmental remediation, biotechnology, and natural pharmaceutical development. This review comprehensively discusses the applications and progress of metagenomics in environmental microbiome, focusing on four aspects of discovery including new species, functional genes (clusters), metabolic pathways, and Microorganism-Environment-Performance (M-E-P) nexus, and prospects the future research.

**Keywords:** metagenomics; environmental microbiome; species; genes; metabolic processes

微生物的种类繁多且分布广泛,对自然界的物质循环和能量转化至关重要,然而环境中绝大部分微生物尚未被分离培养<sup>[1]</sup>。基于经典的分离培养方法不能全面解析环境中微生物群落的组成、多样性和功能,环境中海量的未培养微生物资源有待开发与利用。

## 1 环境微生物与宏基因组学

宏基因组学(metagenomics)也称元基因组学或生态基因组学(ecogenomics),通过直接分析环境样品中的遗传材料来研究微生物群落的结构与功能<sup>[2]</sup>。宏基因组学方法不依赖对微生物的分离培养,也无须对微生物进行富集或对其 DNA 进行 PCR 扩增,避免了来自微生物可培养性、引物设计和扩增偏好性等问题的干扰,能更真实反映微生物群落在实际环境中的时空多样性及组成信息。近 20 年来,随着 DNA 测序成本的大幅降低,第 2 代与第 3 代高通量测序技术(next-generation sequencing, NGS)相继得以不断发展和大规模应用,环境微生物宏基因组学已发展成环境科学与微生物学交叉学科研究中的一个重要分支,显著转变了环境微生物学与微生物生态学的传统研究方式<sup>[3-4]</sup>。同时,伴随着现代分子生物学方法的自动化与技术流程的商业化,当前环境微生物群落研究的主要科研时间与经济成本投入已从检测通量低、劳动密集型的分子生物学“湿实验”转变

为检测通量高、数据处理密集型的计算生物学“干实验”(例如生物信息学分析与统计学分析等)<sup>[4-5]</sup>。

宏基因组学是打开通往未培养环境微生物世界大门的钥匙,近 10 余年来显著推动了包括新物种、新功能基因(簇)以及新物质代谢途径的发现,其方法学的不断完善与广泛应用也极大拓展了我们对各类生境中微生物暗物质多样性的认知,以及对其功能进行深度挖掘与利用的能力。同时,随着微生物生态基因组学研究的深入,新生命进化树与物种分类新规则也相继被提出,完善了微生物的进化谱系并为环境微生物多样性的研究提供了新方法与新参考。此外,大规模时空尺度的环境微生物组的宏基因组学研究也广泛用于解析微生物之间及微生物与环境之间的相互作用关系,进而阐释群落构建机制,显著完善了微生物组的群落生态学理论<sup>[6-10]</sup>。本文综述了在近 10 年里,宏基因组学在环境微生物组研究中的应用和所取得的一系列新发现与代表性成果,并展望了这一全球新兴研究领域的发展趋势和未来研究重点。

## 2 宏基因组学在环境微生物组研究中的应用及进展

### 2.1 新物种的发现与物种分类新规则

环境中的微生物多样性高,但其中大部分微生物尚未被成功分离和培养,仍有待进一步

研究。宏基因组学为揭示环境中微生物群落的结构与功能多样性提供了高效的方法,极大地推动了新生命进化树的构建和物种分类新规则的建立(图 1)。在宏基因组学研究中,首要的步骤通常是需要从目标环境样本中提取核酸,并进行 DNA 测序。然后,借助生物信息学中的一系列先进工具和方法,对得到的数据进行分析,以重构样品中微生物的基因组。这一过程不仅有助于我们识别环境样本中赋存的新物种,更能深入探究微生物群落的结构和功能多样性,从而为揭示环境微生物组中的奥秘提供重要信息<sup>[11-12]</sup>。例如, Brown 等利用宏基因组组装基因组(metagenome-assembled genome, MAG)和转录组分析,研究了美国科罗拉多河地区蓄水层的微生物群落,在其中发现了一类“不寻常微生物”,这类微生物被命名为“候选门辐射群”

(candidate phyla radiation, CPR)<sup>[13]</sup>;此外,这项对 CPR 微生物基因组结构的研究也挑战了学者们对原核生物基因序列应该是连续无间断的传统理解。相较于传统观点,即认为原核生物的基因序列连续且不具有内含子结构,只有真核生物的基因组含有不连续 DNA 序列构成的断裂基因,CPR 微生物的基因组却编码了外显子与内含子。该发现更新了学界对原核生物基因组组成的理解,也引发了国际同行对包括 CPR 在内的未培养微生物暗物质的广泛关注和研究<sup>[14-17]</sup>。除此之外, Singleton 团队利用长度长测序、MAG 分析和转录组分析等方法对全球污水处理系统的微生物群落进行了研究,重构得到了大量高质量的 MAG<sup>[18]</sup>,并在其中发现了新型脱氮除磷功能菌,如 *Candidatus Methylophosphatis*、*Candidatus Dechloromonas phosphoritropha* 和

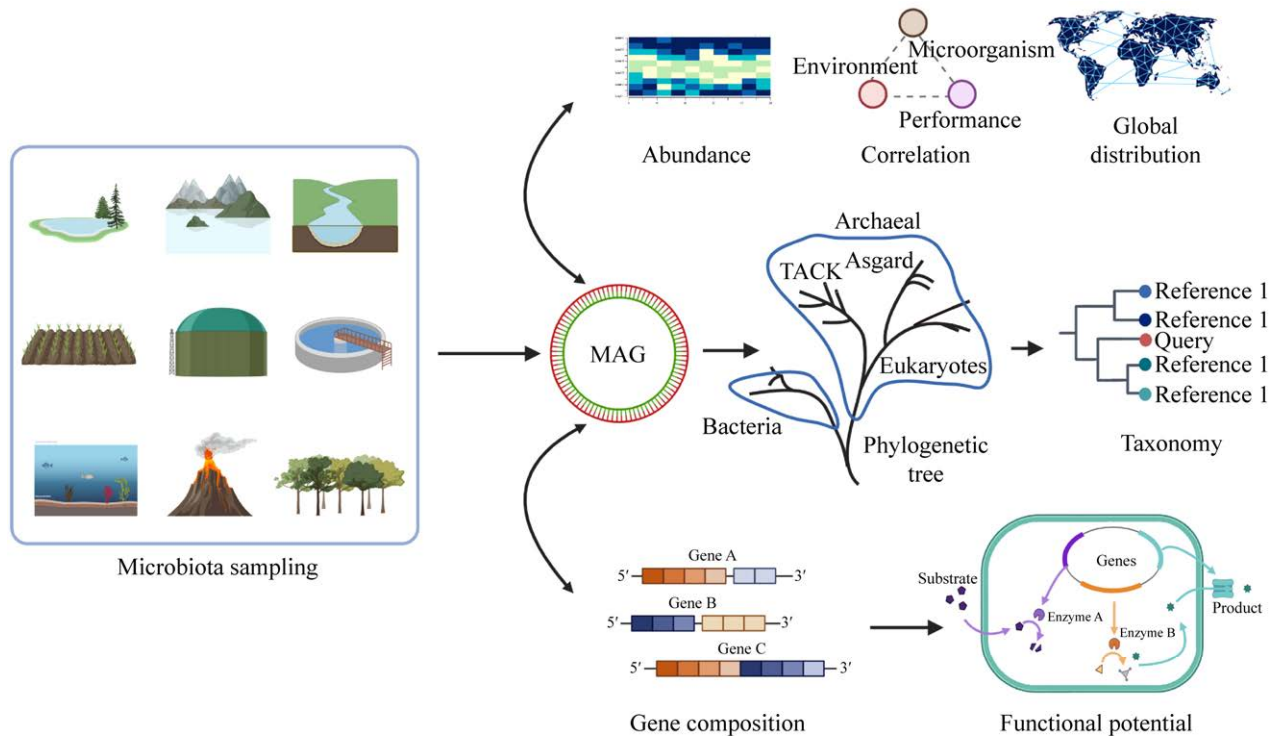


图 1 基于宏基因组组装基因组方法发现并研究环境微生物群落中新物种的路线图

Figure 1 Roadmap for discovering and studying novel microorganisms in environmental microbial communities based on a metagenome-assembled genome (MAG) approach.

*Candidatus Dechloromonas phosphorivorans*<sup>[19]</sup>。这些发现不仅丰富了学界对聚磷微生物多样性的认识,也为未来的环境微生物组学研究提供了新思路。

真核生物起源被认为是生物界中仅次于生命起源的第二大未解之谜<sup>[20]</sup>。宏基因组学推动了环境中新物种的发现,为揭示真核生物的起源提供了线索。Spang 等<sup>[21]</sup>通过对北冰洋中脊受热液作用的深海沉积物进行样品采集与宏基因组学研究,发现了首个 Asgard 古菌超门中的 *Lokiarchaeota* 古菌门,系统发育树分析表明该门类是当时已知的微生物中与真核生物亲缘关系最近的古菌生物,并且它们基因组中也编码了大量传统认为真核生物的特有蛋白。从此, Asgard 古菌超门被假定为真核生物的起源,但是, Asgard 古菌超门中的哪一支是真核生物的祖先仍然有很大的不确定性。随着 Asgard 超门中 *Odinarchaeota*、*Heimdallarchaeota*、*Thorarchaeota* 和 *Helarchaeota* 等古菌门<sup>[22-23]</sup>被陆续发现,与真核生物亲缘关系最近的物种被修正至 *Heimdallarchaeota* 古菌。2021 年, Liu 等<sup>[24]</sup>对滨海湿地、近海沉积物和西太平洋深渊等不同环境样品进行宏基因组学研究,通过对 162 个高质量的 Asgard 古菌基因组的分析,他们发现了 6 个新门;其中,新发现的 *Wukongarchaeota* 具有氢氧化化的自养代谢潜能。此外,该研究还提出真核生物可能起源于 *Heimdallarchaeota* 和 *Wukongarchaeota* 古菌的共同祖先分支,为真核生物起源提供了新见解和依据<sup>[20,24]</sup>。

生命进化树与物种分类规则是微生物多样性和生态学研究的重要基础<sup>[25-26]</sup>。生命进化树分析可以揭示不同微生物的进化历史和亲缘关系,帮助我们理解微生物适应环境的生态学机制。物种分类规则为更准确地识别微生物的种

类提供了方法,促进了微生物在生态系统中角色、功能和相互作用的研究<sup>[12,27-28]</sup>。环境微生物宏基因组学研究增加了我们对环境中微生物多样性的认知,进而推动了新的生命进化树和物种分类新规则的建立。Hug 等通过 MAG 分析重构了来自不同生境中的上千种未培养微生物的基因组草图,结合公共数据库中已发表的数据,对基因组中完整核糖体蛋白的序列进行系统发育分析,提出了生命之树可以重新划分为 2 个域的观点<sup>[26]</sup>,这个新的系统发育关系也支持了真核生物从古菌内部演化而来的观点<sup>[21]</sup>。Parks 等利用从公共数据库中获取的细菌和古菌的基因组构建了基因组分类数据库(genome taxonomy database, GTDB),并根据基因组间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)选择出了不同物种的代表基因组,同时他们将 GTDB 中包含的所有基因组划分为数量明确的物种簇并进行命名,建立了一个可以为细菌和古菌基因组提供完整的从域到种的分类学新框架<sup>[29-31]</sup>。目前, GTDB 已被广泛用于宏基因组数据分析中的物种分类研究,极大促进了研究人员对未培养物种的鉴定和领域同行之间所取得研究结果的交流<sup>[12,27-28]</sup>。由此可见,全球公共数据库中储存的宏基因组数据是环境微生物学研究的宝贵资源,其不但为关于生命进化树新见解的提出和物种分类新规则的建立提供必要的基础数据,还是解析环境中海量未培养微生物的多样性和功能潜力的重要参考依据<sup>[25-26]</sup>。例如, Eloie-Fadrosh 等<sup>[32]</sup>对 JGI-IMG/M 数据库中 5.2 TB 的宏基因组数据进行重分析与深度挖掘,发现了一种新的候选细菌门 *Candidatus Kryptonia*。基因组分析表明该门中的未培养微生物为异养菌,主要分布在高温且 pH 呈中性的地热泉环境中<sup>[32]</sup>。这项研究充分展示了如何通过全球公共数据库中可开源获取的宏基因组

数据的重分析和深度挖掘,发现微生物的新物种并解码其功能潜力,为后续相关研究提供了指导和研究范式。

## 2.2 新功能基因(簇)的挖掘

针对各种环境样品的大规模测序与宏基因组学研究极大地推动了微生物编码的新功能基因(簇)的发现。例如,CRISPR 是“成簇规律间隔短回文重复序列”(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)的英文首字母缩写,该序列在细菌和古菌基因组中发挥着至关重要的作用。CRISPR 编码了一种获得性免疫系统,该系统能够精准地识别入侵细菌的病毒 DNA 序列并启动防御机制。一旦识别到外源 DNA,CRISPR 系统便会迅速启动,产生如 Cas9 等特殊的酶类,对入侵病毒的 DNA 进行破坏,从而使病毒失活<sup>[33]</sup>。2012 年, Jinek 等在 *Science* 期刊上发表核心论文,揭示了 CRISPR-Cas9 系统的作用机制,并指明了其作为基因编辑工具的巨大应用潜力,推动了 CRISPR 基因编辑技术在基因功能研究、药物靶点筛选、疾病治疗、和农作物育种等领域的发展和应<sup>[34-36]</sup>。随后, Burstein 等对来自地下水、底泥、生物膜、土壤以及婴儿肠道等不同环境微生物样品的宏基因组数据进行分析和深度挖掘,从 TB 级别的宏基因组序列中重构了约 1.55 亿个蛋白(酶)编码基因和大量 MAG; 该研究进一步通过对这些重构的 MAG 展开深入研究,发现了首个来自古菌域的 Cas9 蛋白编码基因,以及两种新的细菌的 CRISPR-Cas 系统,分别命名为 CRISPR-CasX 和 CRISPR-CasY<sup>[37]</sup>。Jennifer Doudna 教授及其合作者因其在 CRISPR/Cas9 系统研究领域的杰出贡献,于 2020 年荣获“诺贝尔化学奖”。综上所述,宏基因组学研究为寻找更多新型 CRISPR-Cas 系统提供了有力工具,同时也为该系统在生物技术和疾病治疗等领域的进一步发展提供了更多

的新机会和广阔的可能性。

宏基因组学方法不仅极大地推动了新型基因编辑系统的发现,而且在挖掘新型生物活性物质,特别是抗生素的过程中,发挥着举足轻重的作用。生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)是生物体内一组编码特定化合物合成途径的基因,其主要作用是合成次级代谢产物(secondary metabolites, SMs)<sup>[38]</sup>。目前,这些微生物合成次级代谢产物已成为抗生素等药物的重要来源,并在生物医药领域发挥着关键作用。然而,现有大多数抗生素类药物主要来自于已被成功分离培养的微生物,这仅仅涵盖了自然界微生物多样性的冰山一角,很多重要的微生物合成基因簇还有待被发掘和利用。近年来,某些新型传染性疾病和超级耐药细菌的出现,对全球公共卫生安全构成了威胁。传统的抗生素对于这些新型病原体和耐药细菌的处理效果往往不佳,因此,开发新型有效的抗生素和药物变得尤为迫切<sup>[39-41]</sup>。宏基因组学方法的应用,为学者们提供了从大规模环境样品中发掘更多生物合成基因簇的机会。例如,发现合成新型抗生素、抗菌剂和免疫抑制剂等微生物次级代谢产物的编码基因簇并对其进行利用<sup>[42-45]</sup>。Hover 等对来自不同环境的 2 000 多份土壤样品进行微生物群落的 DNA 提取和测序,从中发现了可以合成新型抗生素“马拉西啉(malacidins)”的基因簇<sup>[45]</sup>; 这种新型抗生素具有直接攻击细菌细胞壁关键部位的能力,且微生物不会对其产生耐药性。此外,中国学者也在这一领域取得了显著进展。Zhang 等自主构建了首个中国南海微生物天然产物的资源库,并开发出了高通量筛选活性化合物的新方法,这不仅促进了对活性新颖天然产物的高效发掘与利用,还为揭示微生物天然产物的作用机制和微生物天然产物的高效合成和制造方面取得突破奠定了基

础<sup>[46-49]</sup>。例如,聚酮类药物<sup>[50]</sup>、青蒿素类<sup>[51]</sup>和阿维菌素<sup>[52-53]</sup>等多种药物的功能机制研究和生物制造。

环境微生物组赋存的生物合成基因簇测序、生物信息学识别和候选功能基因簇的异源表达等步骤是发掘环境微生物赋存的新型次级代谢产物的重要方法和技术途径。随着高通量测序技术和相关生物信息学分析方法的快速发展,利用宏基因组学技术挖掘土壤与海洋等热点环境中的各类生物合成基因簇,并结合先进的功能基因组学与合成生物学技术(如内源表达或异源表达)进行功能验证和转化应用(图2),必将为更多微生物天然产物的开发及其在生物医药等领域的转化应用持续带来更多的新发现与新突破。

### 2.3 新物质代谢途径的发现

宏基因组学不仅有助于发现新的功能基因(簇)和酶系统,还推动了学界对未培养微生物的物质与能量代谢途径以及它们在全球生物地球

化学循环中作用的全新认知。氨氧化过程作为全球氮循环的核心组成部分,一直备受学术界的广泛关注。本文列举了以氨氧化过程为代表的微生物驱动的氮循环过程,以及氮元素与碳、硫、磷和铁等其他元素之间的代谢耦合过程,涵盖了相应的功能菌和代表性物种(表1)。2015年,Daims等<sup>[54]</sup>和van Kessel等<sup>[55]</sup>在*Nature*杂志同期发表研究论文,他们通过富集培养、宏基因组测序和生物信息学分析等多种方法,发现并证实了完全氨氧化(Comammox)微生物的存在。这一重大发现打破了“硝化过程需要氨氧化菌与亚硝酸盐氧化菌两种功能微生物类群分两步完成”的传统观念,为理解完全氨氧化微生物在生物地球化学循环中的作用奠定了基础。厌氧氨氧化(Anammox)是由厌氧氨氧化细菌主导的一种高效低能耗的脱氮过程,其在厌氧条件下直接将亚硝态氮和氨氮转化为氮气,无须外加有机碳源,在处理低碳氮比污水中具有广阔的应用前景<sup>[73]</sup>。厌氧氨氧化细菌来自浮霉菌门

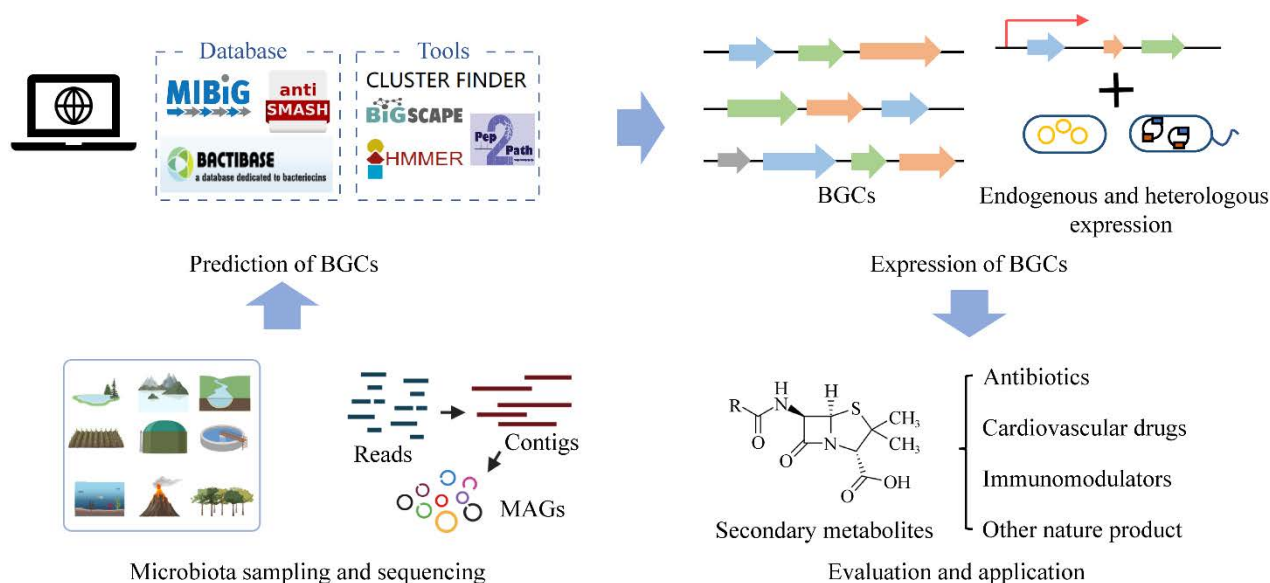


图2 新的生物合成基因簇的挖掘和面向新型天然生物活性化合物转化应用的研究路线

Figure 2 Exploration of novel biosynthetic gene clusters (BGCs) and research pathways for the transformation applications of novel natural bioactive compounds.

表 1 环境微生物驱动的氮循环及其与其他元素耦合代谢过程的宏基因组学研究

Table 1 Metagenomic research on microbial mediated nitrogen cycling and coupled metabolic processes with other elements in the environment

名称 Name	代谢途径/过程 Metabolic pathway/Process	功能菌及代表物种 Functional microorganisms and representative species
<b>氨氧化过程 Ammonia oxidation process</b>		
完全氨氧化 Complete ammonia oxidation (Comammox)	$\text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{amoA, Hao, Nxr}} \text{NO}_3^-$	Comammox bacteria, e.g., <i>Candidatus Nitrospira inopinata</i> <sup>[54]</sup> , <i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i> , <i>Candidatus Nitrospira nitrificans</i> <sup>[55]</sup>
厌氧氨氧化 Anaerobic ammonia oxidation (Anammox)	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3 \xrightarrow{\text{Nir}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{Hzs}} \text{N}_2\text{H}_4 \xrightarrow{\text{Hzo/Hao}} \text{N}_2$	Comammox bacteria, e.g., <i>Candidatus Brocadia</i> <sup>[56]</sup> , <i>Candidatus Kuenenia</i> <sup>[57]</sup> , <i>Candidatus Jettenia</i> <sup>[58]</sup> , <i>Candidatus Scalindua</i> <sup>[59]</sup> , <i>Candidatus Anammoxglobus</i> <sup>[60]</sup> , <i>Candidatus Loosdrechtia</i> <sup>[61]</sup>
直接氨氧化 Direct ammonia oxidation (Dirammox)	$\text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{DnfABC}} \text{N}_2$	Dirammox bacteria, e.g., <i>Alcaligenes ammonioxydans</i> <sup>[62-63]</sup>
<b>氮碳耦合过程 Nitrogen-carbon coupling process</b>		
亚硝酸盐/硝酸盐型厌氧甲烷氧化 Anaerobic methane oxidation coupled with nitrite/nitrate	$\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{CH}_4} \text{NO}_2^-/\text{N}_2$ $\text{CO}_2$	Denitrifying anaerobic methane oxidation (n-DAMO) bacteria, e.g., <i>Candidatus Methyloirabilis sinica</i> <sup>[64]</sup> , <i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> <sup>[65]</sup> , and n-DAMO archaea, e.g., <i>Candidatus Methanoperedens nitroreducens</i> <sup>[66]</sup>
<b>氮硫耦合过程 Nitrogen-sulfur coupling process</b>		
硫酸盐型厌氧氨氧化 Anaerobic ammonia oxidation coupled with sulfate	$\text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{SO}_4^{2-}} \text{N}_2$ $\text{S}$	Sulfate-coupled anaerobic ammonia-oxidizing (SRAO) bacteria, e.g., <i>Anammoxoglobus sulfate</i> <sup>[67]</sup> and <i>Bacillus benzoovorans</i> <sup>[68]</sup>
硫自养反硝化 Sulfur autotrophic denitrification	$\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{S, S}^{2-}, \text{S}_2\text{O}_3^{2-}} \text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ $\text{SO}_4^{2-}$	Sulfur autotrophic denitrifying (SDAD) bacteria, e.g., <i>Thiobacillus denitrificans</i> and <i>Sulfurimonas denitrificans</i> <sup>[69]</sup>
<b>氮磷耦合过程 Nitrogen-phosphorus coupling process</b>		
反硝化聚磷 Denitrifying phosphate accumulation	$\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{PO}_4^{3-}} \text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ $\text{Poly-P}$	Denitrifying polyphosphate accumulating organisms (DPAO), e.g., members within the genera <i>Tetrasphaera</i> <sup>[70]</sup> and <i>Dechloromonas</i> <sup>[19]</sup>
<b>氮铁耦合过程 Nitrogen-iron coupling process</b>		
铁自养反硝化 Iron autotrophic denitrification	$\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{Fe, Fe}^{2+}} \text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ $\text{Fe}^{3+}$	Iron autotrophic denitrifying organisms (NDFO), e.g., members within the genera <i>Paracoccus</i> , <i>Ferrooxidans</i> , <i>Acidovorax</i> , and <i>Pseudomonas</i> <sup>[71-72]</sup>

(*Planctomycetes*), 分布在该门下的 6 个属<sup>[56,74]</sup>, 包括 *Candidatus Scalindua*<sup>[59]</sup>、*Candidatus Kuenenia*<sup>[57]</sup>、*Candidatus Brocadia*<sup>[56]</sup>、*Candidatus Anammoxoglobus*<sup>[60]</sup>、*Candidatus Jettenia*<sup>[58]</sup> 以及近期在德国某污水处理厂发现的 *Candidatus Loosdrechtia*<sup>[61]</sup>。尽管厌氧氨氧化细菌的分离培

养仍是一大挑战, 但以标记基因测序分析、宏基因组、宏转录组等为代表的宏组学 (meta-omics) 方法已成为探究该类微生物代谢特征和功能机制的重要手段, 这对于厌氧氨氧化工艺的推广应用和优化升级具有重要价值。宏基因组学也在研究其他氨氧化代谢途径中发

挥了重要作用(表 1)。值得一提的是, Wu 等从活性污泥中分离出一株可以将氨直接氧化为氮气的微生物, *Alcaligenes ammonioxydans* strain HO-1; 通过分子生物学实验和基因组与转录组测序, 该研究发现 HO-1 菌株编码的功能基因 *dnfABC* 介导了直接氨氧化过程<sup>[62]</sup>。这一发现为开发新型、高效的污水脱氮工艺提供了新思路<sup>[63]</sup>。在自然生境中, 宏基因组学也帮助学者们揭示了氮循环的更多奥秘。Kraft 等利用宏基因组学研究 and 实验验证, 发现海洋中的氨氧化古菌 *Nitrosopumilus maritimus* 在缺氧条件下能够通过自身产生氧气进行氨氧化, 同时将亚硝酸盐还原为一氧化二氮和氮气<sup>[75]</sup>。这加深了学界对海洋环境中最小含氧带氮循环和微生物多样性的理解。

环境微生物在自然界中发挥着关键作用, 不仅驱动氮元素的循环, 还深刻影响着碳、硫等元素的地球化学循环和它们之间的耦合过程。近期, Yao 等成功分离了一株厌氧甲烷氧化细菌 *Candidatus Methyloirabilis sinica*, 并证实了该菌独立介导的全程反硝化型厌氧甲烷氧化反应和在自然界中的分布广泛<sup>[64]</sup>。该发现不仅拓宽了学界对全球碳氮循环的理解, 也为水处理领域新工艺的开发提供了科学支撑。除了亚硝酸盐/硝酸盐型厌氧甲烷氧化过程, 好氧反硝化过程也属于碳氮循环中的一环, 但是目前对该过程的研究仍处于起步阶段, 其中的酶学特征和脱氮路径还有待进一步研究和证实<sup>[76-79]</sup>。在硫循环方面, 硫酸盐氧化菌和硫酸盐还原菌是主要的功能菌。根据有无光敏色素, 硫酸盐氧化菌可以分为绿色硫细菌、紫色硫细菌、紫色非硫细菌以及无色硫细菌等 4 类<sup>[80]</sup>, 它们的代表性物种分别为 *Chlorobaculum tepidum*<sup>[81]</sup>、*Allochrochromatium vinosum*<sup>[82]</sup>、*Rhodospseudomonas palustris*<sup>[83]</sup> 和 *Beggiatoa leptomitiformis*<sup>[84]</sup>。硫

酸盐还原菌主要分布在 *Deltaproteobacteria*、*Nitrospirae*、*Clostridia*、*Negativicutes* 和 *Thermodesulfobacteria* 组成的 5 个细菌纲以及 *Thermoprotei* 和 *Archaeoglobi* 组成的 2 个古菌纲中<sup>[85]</sup>。此外, 硫循环与氮循环紧密相关, 特别是在缺氧条件下, 硫化物氧化与硝酸盐还原过程存在强烈的耦合作用。Walsh 等对海洋最小含氧带中的微生物群落进行宏基因组研究, 发现海洋中存在自发进行的硫氮耦合过程<sup>[86]</sup>。Canfield 等基于宏基因组学研究发现在智利北部海岸无氧水域中存在着不同寻常的硫酸盐还原和硫化物氧化过程, 这些过程与厌氧氨氧化在内的氮循环过程密切相关<sup>[87]</sup>。这些研究揭示了海洋环境中硫氮耦合过程的复杂性和重要性, 也为学界理解全球海洋硫氮循环提供了新视角。此外, 硫氮耦合过程的研究也促进了水处理新工艺的开发。例如, Jiang 等基于硫循环驱动的厌氧氨氧化过程开发了异养硫酸盐还原、自养反硝化、硝化反应一体化的高盐污水处理技术, 成功实现了对低碳氮比污水的主流处理, 展现了微生物驱动的硫氮循环耦合过程在水处理新工艺开发中的应用潜力<sup>[88]</sup>。

环境微生物通过调控磷的形态驱动了自然生态系统中磷元素及其与氮元素耦合循环的过程。其中, 解磷菌能够将不溶态的磷转化为溶解态, 使磷能够被生物利用, 这类微生物在土壤、沉积物和污水处理系统中普遍存在。Jing 等基于单细胞拉曼分选技术分离了污水中的解磷菌, 并结合通量测序和宏组学分析等技术解析了解磷菌新类群的解磷机制<sup>[89]</sup>。聚磷菌也是一类在污水生物除磷过程中发挥重要作用的微生物, 它们具有厌氧释磷, 好氧超量吸磷的特性<sup>[90-91]</sup>。目前常见的聚磷菌属包括 *Candidatus Accumulibacter*、*Tetrasphaera* 和 *Dechloromonas* 等<sup>[70]</sup>。Stokholm-Bjerregaard 等基于 16S rRNA



基因扩增子测序技术,研究了污水厂中聚磷菌的多样性,并较为全面地总结了目前假定的聚磷菌的物种分类,为学界认识这类微生物的多样性提供了参考<sup>[92]</sup>。近年来宏基因组学和实验验证结合的研究发现以 *Tetrasphaera* 为代表的聚磷菌不仅具有除磷功能,还具有发酵和反硝化的功能潜力,能够同步驱动污水处理系统中的碳、氮、磷元素循环耦合过程<sup>[93-94]</sup>。这一发现为污水反硝化除磷除碳新工艺的开发提供了新思路,展示了环境微生物在污水处理领域的巨大潜力。此外,微生物也驱动了铁元素与铁氮耦合的地球化学循环过程,宏组学方法促进了对于驱动铁循环的功能微生物的多样性、代谢通路和胞外电子传递机制的研究<sup>[95]</sup>。研究表明,介导铁氧化的微生物在 *Thiobacillus*、*Leptothrix*、*Sideroxydans* 和 *Gallionella* 等多个细菌属中均有分布<sup>[95-97]</sup>。介导铁还原过程的微生物也分布在多个细菌门和古菌目中,其中 *Geobacter* 和 *Shewanella* 较为常见<sup>[98-99]</sup>。在铁氮耦合方面, Yang 等在自然生境中证实了厌氧铁氨氧化过程的存在<sup>[100]</sup>。Huang 等分离了首株可以还原三价铁的同时将氨氮氧化为亚硝氮的厌氧铁氨氧化菌 *Acidimicrobiaceae* sp. A6,并基于 16S rRNA 基因扩增子测序和分析阐明了其系统发育地位<sup>[101]</sup>。尽管目前关于厌氧铁氨氧化过程的驱动机制仍存在争议,但这一过程可实现自养脱氮,无须外加碳源和曝气,具有发展成为一种新型污水脱氮工艺的潜力<sup>[102]</sup>。

综上所述,环境微生物驱动的生物地球化学循环过程丰富多样,而以宏基因组与宏转录组等为代表的宏组学方法为深入解析各种环境中微生物驱动的新物质代谢途径提供了强有力的工具,从而加速了学界对微生物介导的物质代谢过程的理解。这将有助于推动农业生产、工业制造和环境修复等领域的生物技术创新与

可持续发展。

## 2.4 微生物-环境-效能 (microorganism-environment-performance, M-E-P) 新关联的发现

M-E-P 关联是指微生物之间以及微生物与其生存环境之间的相互作用以及其对于效能的影响。该关联涵盖了微生物在特定环境中的相互作用、适应性和对环境的响应,旨在揭示该关联如何共同影响整个系统的功能和稳定性。在环境微生物组工程系统中,通过解码 M-E-P 关联,工程师能够更加准确和全面了解影响系统效能的重要功能微生物类群及其关键环境影响因素,从而制定出合理的调控策略优化系统的运行效能。在自然生态系统中, M-E-P 关联解析可以预测环境变化对微生物多样性和系统效能的影响,从而制定相应的生态系统调控与管理策略,还可以为生态系统中环境指示微生物的识别、环境污染物的预测和通过微生物群落评价生态系统健康提供基础数据与理论支撑。相较于以往单独研究微生物与环境因子之间的关系或者微生物与系统运行效能之间关联, M-E-P 关联能够综合考虑微生物、环境和系统效能的相互作用,从而提升了我们对生态系统功能的全面理解,以及对其进行利用和调控的能力。例如,调控土壤微生物群落的组成以提高作物的产量<sup>[103]</sup>、人工投加微生物菌剂修复受污染水体<sup>[104]</sup>以及富集培养具有特定功能的微生物用于污水中的资源回收<sup>[105]</sup>等。

环境微生物群落的多样性高且环境因素复杂多变, M-E-P 关联的准确和全面解析需要大量高度相关的时空数据支撑,包括微生物群落、环境参数和系统效能的大数据信息,因此 M-E-P 关联解析的研究面临着有效数据获取和处理的挑战。环境中微生物群落的大规模时间或空间尺度的样品采集和高通量测序,已经成

为解析微生物之间及微生物与环境之间复杂相互作用的重要研究方法。例如,在工程生态系统中, Ju 等<sup>[7]</sup>对我国香港特别行政区沙田污水处理厂活性污泥工艺在 5 年时间尺度上的 M-E-P 关联进行系统性解析,发现了活性污泥微生物群落中驱动生物脱氮的“有益”菌群和导致污泥起泡的“有害”菌群分布在共现网络的不同模块,其各自占据的生态位与主控环境因素显著不同,并基于此提出了适当延长污泥停留时间和维持充足污泥混合液浓度的调控策略来抑制“有害”菌群的暴发,进而减轻活性污泥起泡问题的不利影响。Wu 等<sup>[106]</sup>开展了 23 个国家 269 座污水处理厂的活性污泥微生物群落调研,揭示了其细菌群落中的核心物种包括 28 个属,并发现活性污泥微生物群落组成受温度和进水有机物浓度等确定性因素的显著影响,但群落构建很大程度由随机过程所驱动。Zhang 等<sup>[107]</sup>通过时间和空间尺度的样品采集解析了南水北调中线工程总干渠中微生物群落的动态变化规律与构建机制,发现干渠水中整体微生物群落结构受季节变化的影响大于受水流变化的影响。在超长跨流域调水过程中蓝藻和潜在致病细菌的丰度显著降低,微生物在水体自净化过程中发挥重要作用。

针对自然生态系统中 M-E-P 关联解析有助于揭示微生物组对于生态系统功能的影响。García-García 等<sup>[108]</sup>对美国威斯康星州 8 个沼泽湖进行为期 3 年的采样,通过 M-E-P 关联解析,发现群落的多样性对于其在复杂环境中维持功能稳定性具有重要影响。Bahram 等<sup>[109]</sup>研究了全球 645 个湿地土壤的微生物群落结构和功能潜力并原位测定  $N_2O$  的浓度,从而评估了古菌、细菌、真菌在氮循环、 $N_2O$  释放中发挥的作用,这为全球湿地土壤  $N_2O$  排放引起气温上升的原因提供了新见解。Gao 等<sup>[110]</sup>在中国太湖蓝藻水

华暴发期间进行连续采样,解析了水体中微生物群落结构的时空动态变化规律,并结合实验室内降解实验确定了蓝藻肽类在微生物群落构建中的重要作用,为理解蓝藻水华形成背后的生态学机制以及科学预测、监控和治理蓝藻水华提供了重要见解。Zhao 等<sup>[111]</sup>通过对太平洋西海岸面积最大的淤泥质潮间带湿地(盐城湿地)进行高分辨率的时间序列采样和测序分析,发现潮间带表层水微生物群落结构潮汐周期响应的节律模式,并揭示了人为活动和污染物排放对于潮间带地下水微生物群落的影响,从而为海岸带生态健康的监测和评估提供了重要的数据支撑。

针对工程系统中 M-E-P 关联解析有助于理解并利用微生物群落服务社会与经济发展。人工构建微生物群落在环境领域应用广泛,尤其在生物降解、生物资源和生物合成等方面发挥着重要作用。近年来,学者们提出人工构建微生物群落应该遵循“设计-建造-测试-学习 (design-build-test-learn, DBTL)”循环的研究路线。该路线分为“自上而下”以及“自下而上”两种策略<sup>[112-113]</sup>。“自上而下”的策略是指利用设计的环境条件,驱动现有微生物群落进行生态选择,从而获得可执行目标功能的微生物群落。常见的方法包括直接富集、人工筛选和定向进化等。在该策略中, M-E-P 关联在构建微生物群落的环境条件设计中发挥了重要指导作用。例如, Wang 等设计了有助于发酵型聚磷菌选择性富集的复合碳源,并使用基于硫脲的调控策略构建了强化除磷微生物群落,并验证了其用于污水中资源回收的应用潜力<sup>[114]</sup>。Chrysene (屈)是一种具有极强致癌性的多环芳烃。Vaidya 等以屈为唯一碳源构建了可以降解屈的微生物群落,为多环芳烃污染土壤的生物修复提供了微生物资源<sup>[115]</sup>。“自下而上”的策略则是指利用天

然或工程菌株, 基于对它们代谢网络和相互作用等过程的认识, 设计和构建微生物群落。其中, M-E-P 关联的知识对于推断微生物间的相互作用和构建群落代谢网络具有指导价值。例如, Zengler 等<sup>[116]</sup>系统性地描述了如何基于微生物间的共养相互作用构建复杂群落。Mee 等<sup>[117]</sup>根据这一原理构建了 14 种不同缺陷型大肠杆菌组成的群落, 并证明了合成群落通过优化氨基酸合成途径来强化群落中微生物的协同生长。因此, 在 DBTL 循环的研究路线中, M-E-P 关联既是指导群落设计的关键信息, 也是实现目标微生物群落构建和测试的前提。对于已成功构建的微生物群落进行学习, 解析其中的 M-E-P 关联, 并识别驱动群落组装的关键环境因子和选择条件, 进而为微生物群落下一阶段的优化设计提供指导(图 3)。例如, Kim 等<sup>[118]</sup>通过解析己酸合成微生物群落的 M-E-P 关联和多次 DBTL 循环的优化建立了可以快速稳定产生己酸的微生物群落, 己酸合成的效率相较于优

化前提升了 3.6 倍。综上可见, 基于宏基因组学解析 M-E-P 关联在 DBTL 循环中的设计和学习阶段发挥了重要作用, 推动了循环的进行, 对于实现微生物群落的定向构建和精准调控, 用于改善人民生活水平和实现社会可持续发展意义重大。

### 3 展望

微生物在地球环境、生物经济和人类系统中发挥不可或缺的作用。宏基因组学是当前环境微生物学和微生物组研究的核心方法学, 已被广泛用于不同环境中微生物生态学研究与微生物资源发掘。然而, 鉴于环境样品中微生物的种类繁多且遗传代谢方式各异, 目前学界对环境微生物功能的认知极其有限。因此, 进一步的研究和探索显得尤为必要。本文从实验操作与组学方法的标准化、高质量参考数据库的构建与资源管理、多组学与多学科交叉协同 3 个方面对宏基因组学在环境微生物组研究中的应用进行展望。

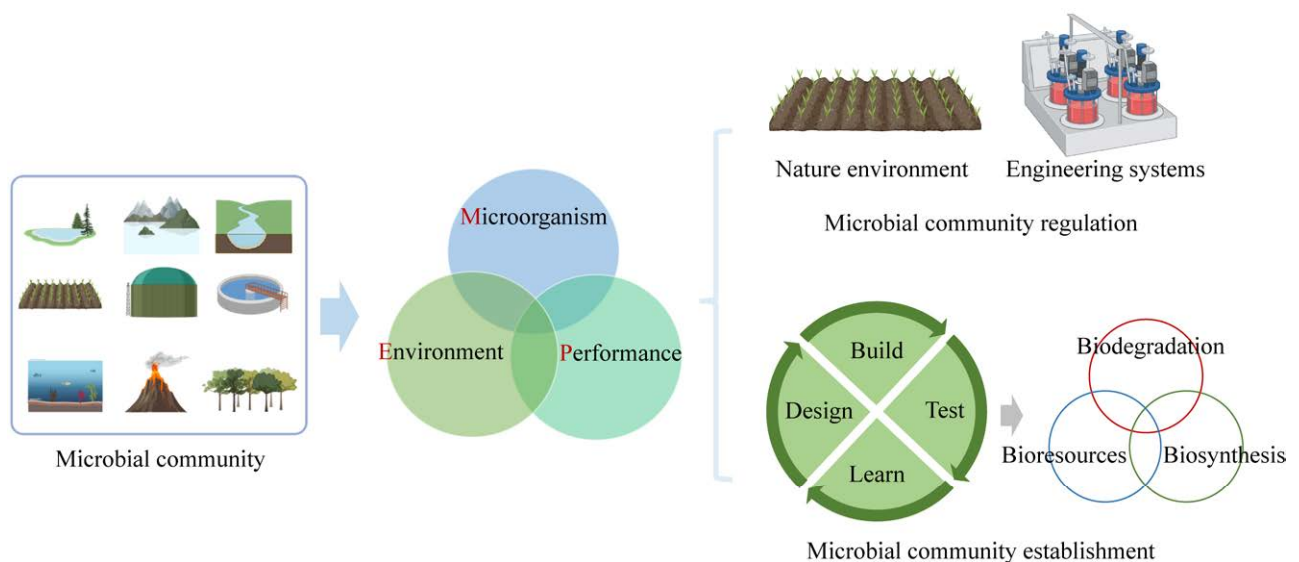


图 3 微生物-环境-效能(M-E-P)关联分析方法及其在环境微生物群落研究中的应用

Figure 3 Microorganism-environment-performance (M-E-P) nexus analysis and its application in environmental microbial community research.

### (1) 标准化的实验操作与定量宏组学方法

微生物样品的采集、核酸提取、高通量测序和生物信息学分析等实验操作是开展环境微生物群落的宏基因组学与宏转录组学等宏组学(meta-omics)研究的必要步骤,可能影响研究结果的准确性和全面性。目前环境微生物群落的宏组学研究分析方法主要停留在基于高通量测序数据的相对定量分析层面,但对于不同类型或者受环境扰动前后生物量变化较大的环境样品,其相对丰度无法反映出其绝对量的组间差异或时空变化,这限制了我们对群落水平各种微生物的生长与代谢速率的预测以及对环境因素实际影响的精准评估<sup>[119]</sup>。因此,针对微生物群落开展绝对细胞数、基因和转录本拷贝数等绝对定量信息的分析以及样品之间的比较尤为重要。目前,基于人工合成核酸内标物的宏组学已被证明是一种可以有效实现微生物群落绝对定量的方法<sup>[120-122]</sup>,但是不同类型环境样品中微生物核酸提取效率的差异及其对绝对定量结果的影响还有待系统评估。

### (2) 功能基因数据库的构建与注释工具开发

环境微生物群落的种类繁多且组成复杂,构建完备的功能基因参考序列数据库对于研究环境微生物的多样性和功能机制至关重要。目前 KEGG 和 NCBI nr 等权威参考数据库中包含的大部分基因序列的功能均基于同源性分析预测,尚未被实验验证。因此,结合高通量的功能基因组学实验验证,扩展不同类型功能基因的参考序列数据库具有重要意义。近年来,牛津纳米孔与 PacBio 长读长三代测序技术的应用显著提升了 MAG 的整体质量(如完整性与连续性),促进了对未培养微生物的分类学<sup>[123-124]</sup>与功能潜力<sup>[125-128]</sup>的探究,但同时也对数据的处理和分析提出了挑战。相较于二代测序数据的分析流程和工具,长读长测序数据的分析方法仍处于

发展阶段,数据分析工具需求迫切,尤其是序列错误率校正、数据组装等方面的新工具<sup>[129]</sup>。随着人工智能与宏组学时代的到来,新的生物信息学算法和工具不断涌现,这也必将加速环境微生物组研究及相关功能基因与酶资源的发掘。

### (3) 多组学方法联用与多学科交叉

随着高通量测序技术和宏组学分析方法的不断进步,目前研究人员已能够容易地通过宏基因组测序分析大规模重构环境中未培养微生物的基因组草图,并据此预测其功能潜力和物种间的相互作用。然而,基因组层面的分析无法揭示微生物的功能表达与实际代谢活性。因此,宏基因组学与宏转录组学<sup>[130]</sup>、培养组学<sup>[131]</sup>、宏代谢组学<sup>[132]</sup>和宏蛋白质组学<sup>[133]</sup>等其多组学(multi-omics)方法的联用,将为深入剖析微生物群落功能及其环境响应机制提供有效途径。同时,获得功能微生物的纯培养物不仅可验证基于宏组学预测的微生物功能潜力、互作关系<sup>[134]</sup>与代谢途径<sup>[135]</sup>,还能应用于污染物降解<sup>[131]</sup>或高附加值产物合成<sup>[136]</sup>,具有良好的学术价值与工程应用潜力。此外,宏基因组学研究为环境微生物的分离培养提供了指示性的基因组功能信息<sup>[137]</sup>,为其功能的发掘和利用提供新基础。除了多组学方法的联用,多学科方法也在推动环境微生物组研究中起了关键作用。例如,通过宏基因组学与稳定同位素核酸探针技术、拉曼分选技术、荧光原位杂交技术等其他方法的交叉融通,研究人员能够更全面地探索微生物群落的互作<sup>[138]</sup>、空间组装<sup>[139]</sup>和原位代谢活性<sup>[140]</sup>等。因此,多组学方法联用与多学科交叉合作将会成为环境微生物组学领域发展的趋势。

## 致谢

感谢中国农业科学院深圳农业基因组研究所刘永鑫研究员和西湖大学张璐博士在文章撰

写和修改中给予的宝贵建议和指导；感谢西湖大学的赵泽和黄昕瑜在文章构思和文献整理中给予的帮助。

## REFERENCES

- [1] STEEN AD, CRITS-CHRISTOPH A, CARINI P, de ANGELIS KM, FIERER N, LLOYD KG, THRASH JC. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 3126-3130.
- [2] HUGENHOLTZ P, TYSON GW. Metagenomics[J]. *Nature*, 2008, 455(7212): 481-483.
- [3] 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.
- [4] LIU YX, QIN Y, CHEN T, LU MP, QIAN XB, GUO XX, BAI Y. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data[J]. *Protein & Cell*, 2021, 12(5): 315-330.
- [5] 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.
- [6] 鞠峰, 张彤. 活性污泥微生物群落宏组学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(8): 2038-2052.  
JU F, ZHANG T. Advances in meta-omics research on activated sludge microbial community[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(8): 2038-2052 (in Chinese).
- [7] 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.
- [8] JU F, XIA Y, GUO F, WANG ZP, ZHANG T. Taxonomic relatedness shapes bacterial assembly in activated sludge of globally distributed wastewater treatment plants[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(8): 2421-2432.
- [9] HU AY, JU F, HOU LY, LI JW, YANG XY, WANG HJ, MULLA SI, SUN Q, BÜRGMANN H, YU CP. Strong impact of anthropogenic contamination on the co-occurrence patterns of a riverine microbial community[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4993-5009.
- [10] 刘永鑫, 秦媛, 郭晓璇, 白洋. 微生物组数据分析方法与应用[J]. *遗传*, 2019, 41(9): 845-862.
- LIU YX, QIN Y, GUO XX, BAI Y. Methods and applications for microbiome data analysis[J]. *Hereditas*, 2019, 41(9): 845-862 (in Chinese).
- [11] TYSON GW, CHAPMAN J, HUGENHOLTZ P, ALLEN EE, RAM RJ, RICHARDSON PM, SOLOVYEV VV, RUBIN EM, ROKHSAR DS, BANFIELD JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment[J]. *Nature*, 2004, 428: 37-43.
- [12] CASTELLE CJ, BANFIELD JF. Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1181-1197.
- [13] BROWN CT, HUG LA, THOMAS BC, SHARON I, CASTELLE CJ, SINGH A, WILKINS MJ, WRIGHTON KC, WILLIAMS KH, BANFIELD JF. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria[J]. *Nature*, 2015, 523: 208-211.
- [14] DUDEK NK, SUN CL, BURSTEIN D, KANTOR RS, ALIAGA GOLTSMAN DS, BIK EM, THOMAS BC, BANFIELD JF, RELMAN DA. Novel microbial diversity and functional potential in the marine mammal oral microbiome[J]. *Current Biology: CB*, 2017, 27(24): 3752-3762.e6.
- [15] LEMOS LN, MEDEIROS JD, DINI-ANDREOTE F, FERNANDES GR, VARANI AM, OLIVEIRA G, PYLRO VS. Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultra-small *Saccharimonadia* (phylum CPR/patescibacteria) suggest a symbiotic lifestyle[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(18): 4259-4271.
- [16] TIAN RM, NING DL, HE ZL, ZHANG P, SPENCER SJ, GAO SH, SHI WL, WU LW, ZHANG Y, YANG YF, ADAMS BG, ROCHA AM, DETIENNE BL, LOWE KA, JOYNER DC, KLINGEMAN DM, ARKIN AP, FIELDS MW, HAZEN TC, STAHL DA, et al. Small and mighty: adaptation of superphylum Patescibacteria to groundwater environment drives their genome simplicity[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 51.
- [17] HARO-MORENO JM, CABELLO-YEVES PJ, GARCILLÁN-BARCIA MP, ZAKHARENKO A, ZEMSKAYA TI, RODRIGUEZ-VALERA F. A novel and diverse group of *Candidatus* Patescibacteria from bathypelagic Lake Baikal revealed through long-read metagenomics[J]. *Environmental Microbiome*, 2023, 18(1): 12.
- [18] SINGLETON CM, PETRIGLIERI F, KRISTENSEN JM, KIRKEGAARD RH, MICHAELSEN TY, ANDERSEN MH, KONDROTAITE Z, KARST SM, DUEHOLM MS, NIELSEN PH, ALBERTSEN M. Connecting structure to function with the recovery of over 1000 high-quality

- metagenome-assembled genomes from activated sludge using long-read sequencing[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2009.
- [19] PETRIGLIERI F, SINGLETON C, PECES M, PETERSEN JF, NIERYCHLO M, NIELSEN PH. “*Candidatus* Dechloromonas phosphoritropha” and “*Ca.* D. phosphorivorans”, novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(12): 3605-3614.
- [20] EME L, SPANG A, LOMBARD J, STAIRS CW, ETTEMA TJG. Archaea and the origin of eukaryotes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15: 711-723.
- [21] SPANG A, SAW JH, JØRGENSEN SL, ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA K, MARTIJN J, LIND AE, van EIJK R, SCHLEPER C, GUY L, ETTEMA TJG. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes[J]. *Nature*, 2015, 521: 173-179.
- [22] ZAREMBA-NIEDZWIEDZKA K, CACERES EF, SAW JH, BÄCKSTRÖM D, JUZOKAITE L, VANCAESTER E, SEITZ KW, ANANTHARAMAN K, STARNAWSKI P, KJELDSSEN KU, STOTT MB, NUNOURA T, BANFIELD JF, SCHRAMM A, BAKER BJ, SPANG A, ETTEMA TJG. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity[J]. *Nature*, 2017, 541: 353-358.
- [23] SEITZ KW, DOMBROWSKI N, EME L, SPANG A, LOMBARD J, SIEBER JR, TESKE AP, ETTEMA TJG, BAKER BJ. Asgard Archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1822.
- [24] LIU Y, MAKAROVA KS, HUANG WC, WOLF YI, NIKOLSKAYA AN, ZHANG XX, CAI MW, ZHANG CJ, XU W, LUO ZH, CHENG L, KOONIN EV, LI M. Expanded diversity of Asgard archaea and their relationships with eukaryotes[J]. *Nature*, 2021, 593: 553-557.
- [25] MARTINY JBH, JONES SE, LENNON JT, MARTINY AC. Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective[J]. *Science*, 2015, 350(6261): aac9323.
- [26] HUG LA, BAKER BJ, ANANTHARAMAN K, BROWN CT, PROBST AJ, CASTELLE CJ, BUTTERFIELD CN, HERNSDORF AW, AMANO Y, ISE K, SUZUKI Y, DUDEK N, RELMAN DA, FINSTAD KM, AMUNDSON R, THOMAS BC, BANFIELD JF. A new view of the tree of life[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 16048.
- [27] SHU WS, HUANG LN. Microbial diversity in extreme environments[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20: 219-235.
- [28] WASHBURNE AD, MORTON JT, SANDERS J, McDONALD D, ZHU QY, OLIVERIO AM, KNIGHT R. Methods for phylogenetic analysis of microbiome data[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3: 652-661.
- [29] PARKS DH, CHUVOCHINA M, WAITE DW, RINKE C, SKARSHEWSKI A, CHAUMEIL PA, HUGENHOLTZ P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36: 996-1004.
- [30] PARKS DH, CHUVOCHINA M, CHAUMEIL PA, RINKE C, MUSSIG AJ, HUGENHOLTZ P. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 1079-1086.
- [31] CHAUMEIL PA, MUSSIG AJ, HUGENHOLTZ P, PARKS DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(6): 1925-1927.
- [32] ELOE-FADROSH EA, PAEZ-ESPINO D, JARETT J, DUNFIELD PF, HEDLUND BP, DEKAS AE, GRASBY SE, BRADY AL, DONG HL, BRIGGS BR, LI WJ, GOUDEAU D, MALMSTROM R, PATI A, PETT-RIDGE J, RUBIN EM, WOYKE T, KYRPIDES NC, IVANOVA NN. Global metagenomic survey reveals a new bacterial candidate Phylum in geothermal springs[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10476.
- [33] AMITAI G, SOREK R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14: 67-76.
- [34] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [35] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20: 490-507.
- [36] ZHU HC, LI C, GAO CX. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21: 661-677.
- [37] BURSTEIN D, HARRINGTON LB, STRUTT SC, PROBST AJ, ANANTHARAMAN K, THOMAS BC, DOUDNA JA, BANFIELD JF. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes[J]. *Nature*, 2017, 542: 237-241.
- [38] XIA LM, MIAO YZ, CAO AL, LIU Y, LIU ZH, SUN XL, XUE YS, XU ZH, XUN WB, SHEN QR, ZHANG

- N, ZHANG RF. Biosynthetic gene cluster profiling predicts the positive association between antagonism and phylogeny in *Bacillus*[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1023.
- [39] ASLAM B, WANG W, ARSHAD MI, KHURSHID M, MUZAMMIL S, RASOOL MH, NISAR MA, ALVI RF, ASLAM MA, QAMAR MU, SALAMAT MKF, BALOCH Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis[J]. Infection and Drug Resistance, 2018, 11: 1645-1658.
- [40] JOAKIM LARSSON DG, FLACH CF. Antibiotic resistance in the environment[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20: 257-269.
- [41] MOREHEAD MS, SCARBROUGH C. Emergence of global antibiotic resistance[J]. Primary Care, 2018, 45(3): 467-484.
- [42] MALIT JLL, WU CH, LIU LL, QIAN PY. Global genome mining reveals the distribution of diverse thioamidated RiPP biosynthesis gene clusters[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 635389.
- [43] NIELSEN JC, GRIJSEELS S, PRIGENT S, JI BY, DAINAT J, NIELSEN KF, FRISVAD JC, WORKMAN M, NIELSEN J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17044.
- [44] SCHERLACH K, HERTWECK C. Mining and unearthing hidden biosynthetic potential[J]. Nature Communications, 2021, 12: 3864.
- [45] HOVER BM, KIM SH, KATZ M, CHARLOP-POWERS Z, OWEN JG, TERNEI MA, MANIKO J, ESTRELA AB, MOLINA H, PARK S, PERLIN DS, BRADY SF. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens[J]. Nature Microbiology, 2018, 3: 415-422.
- [46] ZHANG LX, YAN KZ, ZHANG Y, HUANG R, BIAN J, ZHENG CS, SUN HX, CHEN ZH, SUN N, AN R, MIN FG, ZHAO WB, ZHUO Y, YOU JL, SONG YJ, YU ZY, LIU ZH, YANG KQ, GAO H, DAI HQ, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(11): 4606-4611.
- [47] ZARINS-TUTT JS, BARBERI TT, GAO H, MEARNS-SPRAGG A, ZHANG LX, NEWMAN DJ, GOSS RJM. Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products[J]. Natural Product Reports, 2016, 33(1): 54-72.
- [48] WANG MX, CARVER JJ, PHELAN VV, SANCHEZ LM, GARG N, PENG Y, NGUYEN DD, WATROUS J, KAPONO CA, LUZZATTO-KNAAN T, PORTO C, BOUSLIMANI A, MELNIK AV, MEEHAN MJ, LIU WT, CRÜSEMANN M, BOUDREAU PD, ESQUENAZI E, SANDOVAL-CALDERÓN M, KERSTEN RD, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34: 828-837.
- [49] LIANG MD, LIU LS, XU F, ZENG XQ, WANG RJ, YANG JL, WANG WS, KARTHIK L, LIU JK, YANG ZH, ZHU GL, WANG SL, BAI LQ, TONG YJ, LIU XT, WU M, ZHANG LX, TAN GY. Activating cryptic biosynthetic gene cluster through a CRISPR-Cas12a-mediated direct cloning approach[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(6): 3581-3592.
- [50] WANG WS, LI SS, LI ZL, ZHANG JY, FAN KQ, TAN GY, AI GM, LAM SM, SHUI GH, YANG ZH, LU HZ, JIN PJ, LI YH, CHEN XY, XIA XK, LIU XT, DANNELLY HK, YANG C, YANG Y, ZHANG SL, ALTEROVITZ G, XIANG WS, ZHANG LX. Harnessing the intracellular triacylglycerols for titer improvement of polyketides in *Streptomyces*[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38: 76-83.
- [51] YAN WP, SONG H, SONG FH, GUO YS, WU CH, HER AS, PU Y, WANG S, NAOWAROJNA N, WEITZ A, HENDRICH MP, COSTELLO CE, ZHANG LX, LIU PH, ZHANG YJ. RETRACTED ARTICLE: Endoperoxide formation by an  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent mononuclear non-haem iron enzyme[J]. Nature, 2015, 527: 539-543.
- [52] ZHUO Y, ZHANG WQ, CHEN DF, GAO H, TAO J, LIU M, GOU ZX, ZHOU XL, YE BC, ZHANG Q, ZHANG SL, ZHANG LX. Reverse biological engineering of hrdB to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(25): 11250-11254.
- [53] GAO Q, TAN GY, XIA XK, ZHANG LX. Learn from microbial intelligence for avermectins overproduction[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 251-257.
- [54] DAIMS H, LEBEDEVA EV, PJEVAC P, HAN P,

- HERBOLD C, ALBERTSEN M, JEHLICH N, PALATINSZKY M, VIERHEILIG J, BULAEV A, KIRKEGAARD RH, von BERGEN M, RATTEI T, BENDINGER B, NIELSEN PH, WAGNER M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528: 504-509.
- [55] van KESSEL MAHJ, SPETH DR, ALBERTSEN M, NIELSEN PH, OP den CAMP HJM, KARTAL B, JETTEN MSM, LÜCKER S. Complete nitrification by a single microorganism[J]. *Nature*, 2015, 528: 555-559.
- [56] STROUS M, FUERST JA, KRAMER EHM, LOGEMANN S, MUYZER G, van de PAS-SCHOONEN KT, WEBB R, KUENEN JG, JETTEN MSM. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. *Nature*, 1999, 400: 446-449.
- [57] SCHMID M, TWACHTMANN U, KLEIN M, STROUS M, JURETSCHKO S, JETTEN M, METZGER JW, SCHLEIFER KH, WAGNER M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23(1): 93-106.
- [58] QUAN ZX, RHEE SK, ZUO JE, YANG Y, BAE JW, PARK JR, LEE ST, PARK YH. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3130-3139.
- [59] SCHMID M, WALSH K, WEBB R, RIJSTRA WI, van de PAS-SCHOONEN K, VERBRUGGEN MJ, HILL T, MOFFETT B, FUERST J, SCHOUTEN S, DAMSTÉ JS, HARRIS J, SHAW P, JETTEN M, STROUS M. *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(4): 529-538.
- [60] KARTAL B, RATTRAY J, van NIFTRIK LA, van de VOSENBERG J, SCHMID MC, WEBB RI, SCHOUTEN S, FUERST JA, DAMSTÉ JS, JETTEN MSM, STROUS M. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1): 39-49.
- [61] YANG YC, LU ZY, AZARI M, KARTAL B, DU H, CAI MW, HERBOLD CW, DING XH, DENECKE M, LI XY, LI M, GU JD. Discovery of a new genus of anaerobic ammonium oxidizing bacteria with a mechanism for oxygen tolerance[J]. *Water Research*, 2022, 226: 119165.
- [62] WU MR, HOU TT, LIU Y, MIAO LL, AI GM, MA L, ZHU HZ, ZHU YX, GAO XY, HERBOLD CW, WAGNER M, LI DF, LIU ZP, LIU SJ. Novel *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov. from wastewater treatment sludge oxidizes ammonia to N<sub>2</sub> with a previously unknown pathway[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(11): 6965-6980.
- [63] PAN Y, LIU DF. Tapping the potential of wastewater treatment with direct ammonia oxidation (dirammox)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(18): 7106-7108.
- [64] YAO XW, WANG JQ, HE MY, LIU ZS, ZHAO YX, LI YF, CHI TL, ZHU L, ZHENG P, JETTEN MSM, HU BL. Methane-dependent complete denitrification by a single *Methylomirabilis* bacterium[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9: 464-476.
- [65] ETTWIG KF, BUTLER MK, PASLIER DL, PELLETIER E, MANGENOT S, KUYPERS MMM, SCHREIBER F, DUTILH BE, ZEDELIOUS J, BEER D, GLOERICH J, WESSELS HJCT, ALEN T, LUESKEN F, WU ML, PAS-SCHOONEN KT, CAMP HJMO, JANSSEN-MEGENS EM, FRANCOIJS KJ, STUNNENBERG H, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464: 543-548.
- [66] HAROON MF, HU SH, SHI Y, IMELFORT M, KELLER J, HUGENHOLTZ P, YUAN ZG, TYSON GW. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage[J]. *Nature*, 2013, 500: 567-570.
- [67] LIU ST, YANG FL, GONG Z, MENG FG, CHEN HH, XUE Y, FURUKAWA K. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 6817-6825.
- [68] 蔡靖, 蒋坚祥, 郑平. 一株硫酸盐型厌氧氨氧化菌的分离和鉴定[J]. *中国科学: 化学*, 2010, 40(4): 421-426. CAI J, JIANG JX, ZHENG P. Isolation and identification of bacteria responsible for simultaneous anaerobic ammonium and sulfate removal[J]. *Scientia Sinica (Chimica)*, 2010, 40(4): 421-426 (in Chinese).
- [69] WANG JJ, HUANG BC, LI J, JIN RC. Advances and challenges of sulfur-driven autotrophic denitrification (SDAD) for nitrogen removal[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(10): 2567-2574.
- [70] ZHAO WH, BI XJ, PENG YZ, BAI M. Research advances of the phosphorus-accumulating organisms of *Candidatus Accumulibacter*, *Dechloromonas* and *Tetrasphaera*: metabolic mechanisms, applications and



- influencing factors[J]. *Chemosphere*, 2022, 307(Pt 1): 135675.
- [71] KISKIRA K, PAPIRIO S, van HULLEBUSCH ED, ESPOSITO G. Fe(II)-mediated autotrophic denitrification: a new bioprocess for ironbioprecipitation/biorecovery and simultaneous treatment of nitrate-containing wastewaters[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 119: 631-648.
- [72] 王彤, 汪涵, 周明达, 冉小川, 王伟刚, 吴敏, 王亚宜. 污水脱氮功能微生物的组学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4844-4870.
- WANG T, WANG H, ZHOU MD, RAN XC, WANG WG, WU M, WANG YY. Advances in omics of functional microorganisms for nitrogen removal in wastewater[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4844-4870 (in Chinese).
- [73] 朱琪, 林丽敏, 王婧, 汪晓军, 陈振国, 鞠峰. 养猪废水中试规模亚硝化-反硝化-厌氧氨氧化组合工艺脱氮效能及群落结构分析[J]. *环境科学学报*, 2024, 44(4): 95-105.
- ZHU Q, LIN LM, WANG J, WANG XJ, CHEN ZG, JU F. Analysis of nitrogen removal efficiency and community structure in a pilot-scale partial nitrification-denitrification-anammox combined process for swine wastewater treatment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 44(4): 95-105 (in Chinese).
- [74] 刘兰, 明语真, 吕爱萍, 焦建宇, 李文均. 厌氧氨氧化细菌的研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): 969-986.
- LIU L, MING YZ, LÜ AP, JIAO JY, LI WJ. Recent advance on the anaerobic ammonium oxidation bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 969-986 (in Chinese).
- [75] KRAFT B, JEHLICH N, LARSEN M, BRISTOW LA, KÖNNEKE M, THAMDRUP B, CANFIELD DE. Oxygen and nitrogen production by an ammonia-oxidizing archaeon[J]. *Science*, 2022, 375(6576): 97-100.
- [76] HE TX, LI ZL, SUN Q, XU Y, YE Q. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 493-499.
- [77] JOO HS, HIRAI M, SHODA M. Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis* no. 4 and L1[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(1): 66-73.
- [78] SONG T, ZHANG XL, LI J, WU XY, FENG HX, DONG WY. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149319.
- [79] 杨航, 黄钧, 刘博. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 的研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(4): 585-592.
- YANG H, HUANG J, LIU B. Advances in research of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2008, 14(4): 585-592 (in Chinese).
- [80] 张宏, 李颖杰, 王文颖, 王禄山. 微生物硫循环网络的研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(6): 1567-1581.
- ZHANG H, LI YJ, WANG WY, WANG LS. Research progress of the microbial sulfur-cycling network[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1567-1581 (in Chinese).
- [81] SAKURAI H, OGAWA T, SHIGA M, INOUE K. Inorganic sulfur oxidizing system in green sulfur bacteria[J]. *Photosynthesis Research*, 2010, 104(2): 163-176.
- [82] GHOSH S, BAGCHI A. Insight into the molecular mechanism of the sulfur oxidation process by reverse sulfite reductase (rSiR) from sulfur oxidizer *Allochromatium vinosum*[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2018, 24(5): 117.
- [83] BAARS O, MOREL FMM, ZHANG XN. The purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum* produces novel petrobactin-related siderophores under aerobic and anaerobic conditions[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(5): 1667-1676.
- [84] FOMENKOV A, VINCZE T, GRABOVICH MY, DUBININA G, ORLOVA M, BELOUSOVA E, ROBERTS RJ. Complete genome sequence of the freshwater colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* neotype strain D-402<sup>T</sup>[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01436-e01415.
- [85] 马巧丽, 杜欢, 刘杨, 李猛. 红树林湿地硫酸盐还原菌的多样性及其参与驱动的元素耦合机制[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 4606-4627.
- MA QL, DU H, LIU Y, LI M. Sulfate-reducing prokaryotes in mangrove wetlands: diversity and role in driving element coupling[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4606-4627 (in Chinese).
- [86] WALSH DA, ZAIKOVA E, HOWES CG, SONG YC, WRIGHT JJ, TRINGE SG, TORTELL PD, HALLAM SJ. Metagenome of a versatile chemolithoautotroph from

- expanding oceanic dead zones[J]. *Science*, 2009, 326(5952): 578-582.
- [87] CANFIELD DE, STEWART FJ, THAMDRUP B, de BRABANDERE L, DALSGAARD T, DELONG EF, REVSBECH NP, ULLOA O. A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1375-1378.
- [88] JIANG CK, DENG YF, XU Z, SIRIWEERA B, WU D, CHEN GH. Sulphate reduction, mixed sulphide- and thiosulphate-driven autotrophic denitrification, nitrification, and anammox (SANIA) integrated process for sustainable wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2023, 247: 120824.
- [89] JING XY, GONG YH, PAN HH, MENG Y, REN YS, DIAO ZD, MU RZ, XU T, ZHANG J, JI YT, LI YD, WANG C, QU LY, CUI L, MA B, XU J. Single-cell Raman-activated sorting and cultivation (scRACS-Culture) for assessing and mining *in situ* phosphate-solubilizing microbes from nature[J]. *ISME Communications*, 2022, 2: 106.
- [90] 彭永臻, 薛桂松, 苗志加, 翁冬晨. 葡萄糖为碳源的EBPR 长期运行效果及聚磷菌的富集培养[J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2013, 43(1): 136-141.  
PENG YZ, XUE GS, MIAO ZJ, WENG DC. Long term effect of glucose as sole carbon source on EBPR and PAOs enrichment[J]. *Journal of Southeast University (Natural Science Edition)*, 2013, 43(1): 136-141 (in Chinese).
- [91] QIU GL, ZUNIGA-MONTANEZ R, LAW Y, THI SS, NGUYEN TQN, EGANATHAN K, LIU XH, NIELSEN PH, WILLIAMS RBH, WUERTZ S. Polyphosphate-accumulating organisms in full-scale tropical wastewater treatment plants use diverse carbon sources[J]. *Water Research*, 2019, 149: 496-510.
- [92] STOKHOLM-BJERREGAARD M, McILROY SJ, NIERYCHLO M, KARST SM, ALBERTSEN M, NIELSEN PH. 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.
- [93] GAO H, LIU MM, GRIFFIN JS, XU LC, XIANG D, SCHERSON YD, LIU WT, WELLS GF. Complete nutrient removal coupled to nitrous oxide production as a bioenergy source by denitrifying polyphosphate-accumulating organisms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(8): 4531-4540.
- [94] MARQUES R, SANTOS J, NGUYEN H, CARVALHO G, NORONHA JP, NIELSEN PH, REIS MAM, OEHMEN A. Metabolism and ecological niche of *Tetrasphaera* and *Ca. Accumulibacter* in enhanced biological phosphorus removal[J]. *Water Research*, 2017, 122: 159-171.
- [95] MELTON ED, SWANNER ED, BEHRENS S, SCHMIDT C, KAPPLER A. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12: 797-808.
- [96] EDWARDS KJ, ROGERS DR, WIRSEN CO, MCCOLLOM TM. Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic alpha- and gamma-proteobacteria from the deep sea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2906-2913.
- [97] EMERSON D, WEISS JV. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: findings from the field and the laboratory[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2004, 21(6): 405-414.
- [98] LOVLEY DR, HOLMES DE, NEVIN KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 219-286.
- [99] LOVLEY DR, PHILLIPS EJ. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(6): 1472-1480.
- [100] YANG WH, WEBER KA, SILVER WL. Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction[J]. *Nature Geoscience*, 2012, 5: 538-541.
- [101] HUANG S, JAFFÉ PR. Isolation and characterization of an ammonium-oxidizing iron reducer: *Acidimicrobiaceae* sp. A6[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0194007.
- [102] 胡凯耀, 王亚娥, 李杰, 慕浩, 任爽, 朱红娟, 易宏学, 王倩. 铁氨氧化研究进展及在污水脱氮中的应用探索[J]. *环境化学*, 2023, 42(1): 264-276.  
HU KY, WANG YE, LI J, MU H, REN S, ZHU HJ, YI HX, WANG Q. Research progress of Feammox and its application in wastewater denitrification[J]. *Environmental Chemistry*, 2023, 42(1): 264-276 (in Chinese).
- [103] de VRIES FT, GRIFFITHS RI, KNIGHT CG, NICOLITCH O, WILLIAMS A. Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production[J]. *Science*, 2020, 368(6488): 270-274.
- [104] PI KF, WANG YX, XIE XJ, MA T, LIU YQ, SU CL, ZHU YP, WANG ZQ. Remediation of

- arsenic-contaminated groundwater by in situ stimulating biogenic precipitation of iron sulfides[J]. *Water Research*, 2017, 109: 337-346.
- [105] YUAN ZG, PRATT S, BATSTONE DJ. Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(6): 878-883.
- [106] WU LW, NING DL, ZHANG B, LI Y, ZHANG P, SHAN XY, ZHANG QT, BROWN MR, LI ZX, van NOSTRAND JD, LING FQ, XIAO NJ, ZHANG Y, VIERHEILIG J, WELLS GF, YANG YF, DENG Y, TU QC, WANG AJ, ACEVEDO D, et al. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4: 1183-1195.
- [107] ZHANG L, YIN W, WANG C, ZHANG AJ, ZHANG H, ZHANG T, JU F. Untangling microbiota diversity and assembly patterns in the world's largest water diversion canal[J]. *Water Research*, 2021, 204: 117617.
- [108] GARCÍA-GARCÍA N, TAMAMES J, LINZ AM, PEDRÓS-ALIÓ C, PUENTE-SÁNCHEZ F. Microdiversity ensures the maintenance of functional microbial communities under changing environmental conditions[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 2969-2983.
- [109] BAHRAM M, ESPENBERG M, PÄRN J, LEHTOVIRTA-MORLEY L, ANSLAN S, KASAK K, KÖLJALG U, LIIRA J, MADDISON M, MOORA M, NIINEMETS Ü, ÖPIK M, PÄRTEL M, SOOSAAR K, ZOBEL M, HILDEBRAND F, TEDERSOO L, MANDER Ü. Structure and function of the soil microbiome underlying N<sub>2</sub>O emissions from global wetlands[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1430.
- [110] GAO H, ZHAO Z, ZHANG L, JU F. Cyanopeptides restriction and degradation co-mediate microbiota assembly during a freshwater cyanobacterial harmful algal bloom (CyanoHAB)[J]. *Water Research*, 2022, 220: 118674.
- [111] ZHAO Z, ZHANG L, ZHANG GQ, GAO H, CHEN XG, LI L, JU F. Hydrodynamic and anthropogenic disturbances co-shape microbiota rhythmicity and community assembly within intertidal groundwater-surface water continuum[J]. *Water Research*, 2023, 242: 120236.
- [112] LAWSON CE, HARCOTBE WR, HATZENPICHLER R, LINDEMANN SR, LÖFFLER FE, O'MALLEY MA, GARCÍA MARTÍN H, PFLEGER BF, RASKIN L, VENTURELLI OS, WEISSBRODT DG, NOGUERA DR, McMAHON KD. Common principles and best practices for engineering microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 725-741.
- [113] HU HY, WANG MX, HUANG YQ, XU ZY, XU P, NIE Y, TANG HZ. Guided by the principles of microbiome engineering: accomplishments and perspectives for environmental use[J]. *mLife*, 2022, 1(4): 382-398.
- [114] WANG H, WANG YB, ZHANG GQ, ZHAO Z, JU F. Temporal dynamics and performance association of the *Tetrasphaera*-enriched microbiome for enhanced biological phosphorus removal[J]. *Engineering*, 2023, 29: 168-178.
- [115] VAIDYA S, DEVPURA N, JAIN K, MADAMWAR D. Degradation of chrysene by enriched bacterial consortium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1333.
- [116] ZENGLER K, ZARAMELA LS. The social network of microorganisms—how auxotrophies shape complex communities[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16: 383-390.
- [117] MEE MT, COLLINS JJ, CHURCH GM, WANG HH. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(20): E2149-E2156.
- [118] KIM BC, MOON C, JEON BS, ANGENENT LT, CHOI Y, NAM K. Shaping a reactor microbiome generating stable n-caproate productivity through design-build-test-learn approach[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 425: 131587.
- [119] 黄昕瑜, 张璐, 袁凌, 鞠峰. 微生物组的定量宏基因组学和定量宏转录组学方法[J]. *微生物组实验手册*, 2021, Bio-101: e2003693.
- HUANG XY, ZHANG L, YUAN L, JU F. Quantitative metagenomics and metatranscriptomics methods of microbiome[J]. *Microbiome Protocols*, 2021, Bio-101: e2003693 (in Chinese).
- [120] JU F, BECK K, YIN XL, MACCAGNAN A, McARDELL CS, SINGER HP, JOHNSON DR, ZHANG T, BÜRGMANN H. Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13: 346-360.
- [121] SATINSKY BM, GIFFORD SM, CRUMP BC, MORAN MA. Use of internal standards for quantitative metatranscriptome and metagenome analysis[M]// *Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 2013: 237-250.
- [122] HARDWICK SA, CHEN WY, WONG T, KANAKAMEDALA BS, DEVESON IW, ONGLEY SE, SANTINI NS, MARCELLIN E, SMITH MA, NIELSEN

- LK, LOVELOCK CE, NEILAN BA, MERCER TR. Synthetic microbe communities provide internal reference standards for metagenome sequencing and analysis[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3096.
- [123] HON T, MARS K, YOUNG G, TSAI YC, KARALIUS JW, LANDOLIN JM, MAURER N, KUDRNA D, HARDIGAN MA, STEINER CC, KNAPP SJ, WARE D, SHAPIRO B, PELUSO P, RANK DR. Highly accurate long-read HiFi sequencing data for five complex genomes[J]. *Scientific Data*, 2020, 7: 399.
- [124] WANG YH, ZHAO Y, BOLLAS A, WANG YR, AU KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39: 1348-1365.
- [125] ALBERTSEN M. Long-read metagenomics paves the way toward a complete microbial tree of life[J]. *Nature Methods*, 2023, 20: 30-31.
- [126] KIM CY, MA J, LEE I. HiFi metagenomic sequencing enables assembly of accurate and complete genomes from human gut microbiota[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 6367.
- [127] KO KKK, CHNG KR, NAGARAJAN N. Metagenomics-enabled microbial surveillance[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7: 486-496.
- [128] CIUFFREDA L, RODRÍGUEZ-PÉREZ H, FLORES C. Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1497-1511.
- [129] TAŞ N, de JONG AE, LI YM, TRUBL G, XUE YX, DOVE NC. Metagenomic tools in microbial ecology research[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 184-191.
- [130] OYSERMAN BO, NOGUERA DR, del RIO TG, TRINGE SG, McMAHON KD. Metatranscriptomic insights on gene expression and regulatory controls in *Candidatus Accumulibacter phosphatis*[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(4): 810-822.
- [131] WANG QK, HE JZ. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5[J]. *Water Research*, 2020, 185: 116300.
- [132] QIU GL, LIU XH, SAW NMMT, LAW Y, ZUNIGA-MONTANEZ R, THI SS, NGOC NGUYEN TQ, NIELSEN PH, WILLIAMS RBH, WUERTZ S. Metabolic traits of *Candidatus Accumulibacter* clade IIF strain SCELSE-1 using amino acids as carbon sources for enhanced biological phosphorus removal[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(4): 2448-2458.
- [133] SUKUL P, SCHÄKERMANN S, BANDOW JE, KUSNEZOWA A, NOWROUSIAN M, LEICHERT LI. Simple discovery of bacterial biocatalysts from environmental samples through functional metaproteomics[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 28.
- [134] WU YC, FU CX, PEACOCK CL, SØRENSEN SJ, REDMILE-GORDON MA, XIAO KQ, GAO CH, LIU J, HUANG QY, LI ZX, SONG PY, ZHU YG, ZHOU JZ, CAI P. Cooperative microbial interactions drive spatial segregation in porous environments[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 4226.
- [135] ZHANG Z, PENG HR, YANG DC, ZHANG GQ, ZHANG JL, JU F. Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5360.
- [136] PI SS, YANG WJ, FENG W, YANG RJ, CHAO WX, CHENG WB, CUI L, LI ZD, LIN YL, REN NQ, YANG C, LU L, GAO X. Solar-driven waste-to-chemical conversion by wastewater-derived semiconductor biohybrids[J]. *Nature Sustainability*, 2023, 6: 1673-1684.
- [137] ZHANG AN, MAO YP, WANG YB, ZHANG T. Mining traits for the enrichment and isolation of not-yet-cultured populations[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 96.
- [138] ZHANG L, HUANG XY, ZHOU JZ, JU F. Active predation, phylogenetic diversity, and global prevalence of myxobacteria in wastewater treatment plants[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17: 671-681.
- [139] CAO ZH, ZUO WL, WANG LX, CHEN JY, QU ZP, JIN F, DAI L. Spatial profiling of microbial communities by sequential FISH with error-robust encoding[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1477.
- [140] FERNANDO EY, McILROY SJ, NIERYCHLO M, HERBST FA, PETRIGLIERI F, SCHMID MC, WAGNER M, NIELSEN JL, NIELSEN PH. Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman-FISH[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13: 1933-1946.