

MicROcensus: ZEITNAHE MIKROBIOM- ANALYSEN AUF ARA

Ein zeitnahes Biomonitoring mit Nanopore-Sequenzierung gewährt neue Einblicke in die biologischen Prozesse einer Abwasserreinigungsanlage (ARA). Im Rahmen des Projekts «MicROcensus» wurde an verschiedenen ARA die Einsatzfähigkeit solcher Mikrobiom-Analysen als Diagnoseinstrument evaluiert. So unterstützen Momentaufnahmemessungen die Ursachenfindung von Prozessinstabilitäten oder Begleitphänomenen. Während wöchentliche Analysen des Mikrobioms – bei Bekanntsein der jahreszeitlichen Dynamiken – als Frühwarnsystem dienen und praxisrelevante Daten für den ARA-Betrieb liefern können.

Robert Niederdorfer; Wenzel Gruber; Adriano Joss; Helmut Bürgmann, Eawag

RÉSUMÉ

MicROcensus: ANALYSES RAPIDES DU MICROBIOME DANS LES STEP

Des indices clairs démontrent que dans les stations d'épuration des eaux usées (STEP), les défaillances ou les baisses de performance en matière d'élimination biologique de l'azote sont en corrélation avec des modifications dans le microbiome de l'étape d'épuration biologique, et qu'elles les précèdent. Dans le cadre du projet «MicROcensus», la possibilité d'utilisation d'analyses rapides du microbiome en tant qu'instrument de diagnostic a été évaluée dans différentes STEP. Une biosurveillance régulière, p. ex. toutes les semaines, permet de détecter rapidement les évolutions de l'abondance de microbes importants sur le plan fonctionnel ou d'identifier de nouveaux microbes. Ces informations permettent, le cas échéant, de prendre les mesures nécessaires avant que les modifications du microbiome n'aient un impact sur les processus. Grâce à une expérience croissante des liens entre microbiome et performance et stabilité des processus, ce procédé deviendra sans aucun doute un outil de plus en plus précieux. Il peut également être utilisé de façon pertinente pour des analyses ad hoc. Des analyses séquentielles réalisées sur place peuvent, en quelques heures, donner des renseignements sur l'état microbiologique des boues activées ou d'autres échantillons.

EINLEITUNG

Die biologische Reinigungsstufe von Abwasserreinigungsanlagen (ARA) ist ein künstliches Ökosystem, das aus einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft – einem Mikrobiom – besteht. Diese steuert die biologische Entfernung von Nährstoffen im Abwasser [1, 2]. Daher ist es nicht überraschend, dass eine gut funktionierende und etablierte mikrobielle Gemeinschaft auch essenziell für eine stabile Prozessleistung der ARA ist. Mehrere wissenschaftliche Studien zeigten den Zusammenhang zwischen einer Störung der mikrobiellen Gemeinschaft und Prozessstörungen wie Schwimmschlamm, erhöhte N₂O-Emissionen und reduzierte Prozessleistung [3-6].

Veränderungen in der Gemeinschaft führen nicht zwingend zu Prozessstörungen oder Leistungsausfällen [5, 7-10]. Geht aber beispielsweise eine funktionale Gilde verloren oder nehmen einzelne Arten überhand, kann sich dies auf die gesamte Gemeinschaft auswirken und letztlich zu Prozessstörungen und längeren Phasen mit ungenügender Leistung führen [4, 10-12]. Studien der Universität von Aalborg [6, 13-17] und der Eawag [4] liefern zusätzliche Bestätigungen für diese Perspektive.

Die Mikrobiom-Analyse mittels DNA-Sequenzierung des Belebtschlammes erlaubt eine detaillierte Charakterisierung der Arten-

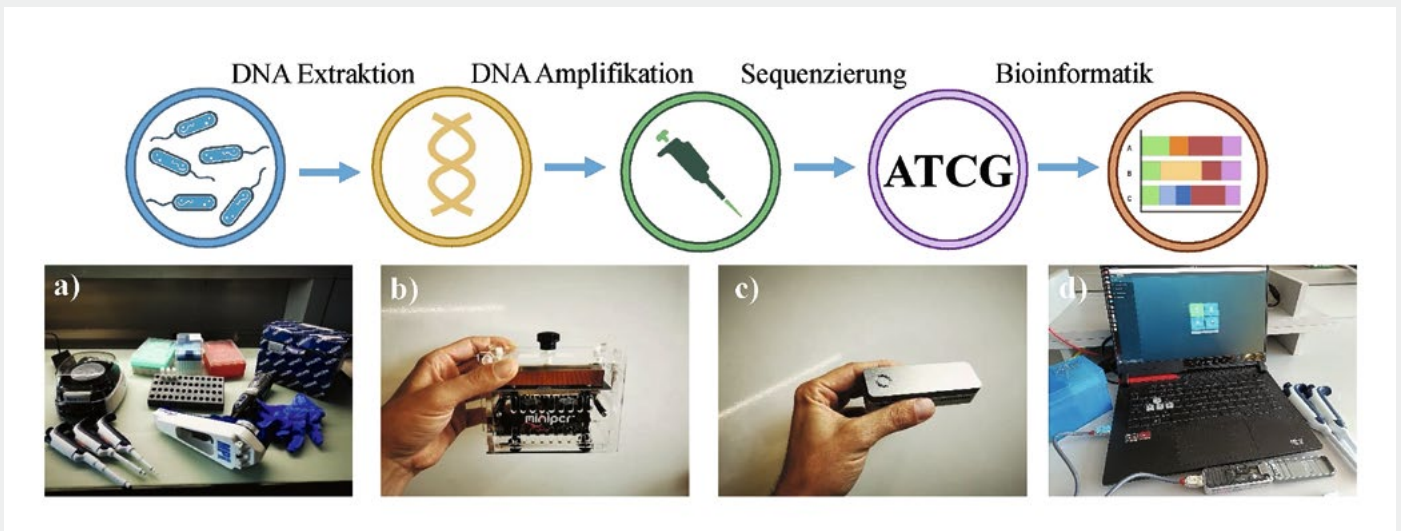


Fig. 1 Obere Reihe: Icons zur Veranschaulichung des Biomonitoring-Workflows von der DNA-Extraktion bis zum Sequenzierungsergebnis.

Untere Reihe: Bilder, die die für den Biomonitoring-Arbeitsablauf erforderlichen Gerätschaften zeigen: a) Material für die DNA-Extraktion,

b) Mini-PCR-Thermocycler, c) MinION-Sequenzierer, d) Steuerung von Sequenzierer und Mini-PCR und Echtzeitanalyse der Daten auf einem Laptop.

zusammensetzung der Mikrobengemeinschaft. Deshalb kann sie ein wertvolles Instrument für die Schlamm- und Prozessüberwachung sein. Prozessstörungen (z. B. Schaumbildung, Blähschlamm, reduziertes Absetzverhalten, Nitrifikationsversagen, NO_2 -Akkumulation), die mit Veränderungen des Mikrobioms in Verbindung gebracht werden können, könnten so in einem früheren Stadium erkannt und proaktive Abhilfestrategien angewendet werden [8, 18–21].

Bis vor Kurzem war es nicht möglich, detaillierte molekularbiologische Analysen schnell genug durchzuführen, dass sie für operative Entscheidungen in Betracht gezogen werden konnten [22]. Sequenzierungen waren ein langwieriger Prozess und benötigten hoch spezialisierte Labore mit teurer Ausstattung. Dies hat sich jedoch mit jüngsten Entwicklungen wie zum Beispiel der Sequenzierertechnologie von Oxford Nanopore (Oxford Nanopore Technologies) geändert. Der MinION-Sequenzierer (Fig. 1c) ist das kleinste derzeit am Markt verfügbare Sequenziergerät. Dies ermöglicht die DNA-Sequenzierung vor Ort, in Echtzeit und mit hohem Durchsatz bei einer Durchlaufzeit von etwa acht Stunden von der Probenahme bis zum Ergebnis.

Das Projekt «MicroCensus» hatte zum Ziel, auf Grundlage der Nanopore-Sequenzierertechnologie einen mikrobiellen Monitoring-Workflow zu etablieren. Dieser sollte eine Mikrobiom-Analyse innerhalb eines Arbeitstages ermöglichen und deshalb als rasche Entscheidungshilfe für den ARA-Betrieb

METHODEN

Das DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Deutschland) ermöglicht die schnelle Extraktion von DNA aus Umweltproben. Neben dem obligatorischen Pipettenset (1000 μl , 200 μl und 20 μl) werden ein Mini-Bead-Beating-Gerät (SuperFastPrep-2™, MP Biomedicals, Kalifornien) und eine Mini-Zentrifuge (Fisherbrand™ Mini-Centrifuge, Vereinigtes Königreich) benötigt (Fig. 1a). Bei der Mikrobiom-Analyse wird nicht die gesamte DNA einer Probe ausgelesen, stattdessen wird das in allen Zellen vorhandene Gen für die Proteinfabriken der Mikrobzellen, die «16S ribosomale RNA» (16S rRNA), mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Da sich die Gensequenz von Art zu Art unterscheidet, kann man damit die vorhandenen Bakterienarten identifizieren. Im 16S-Barcoding-Kit von Nanopore (SQK-RAB204) sind die für die PCR benötigten Primer und Kennsequenzen, mit denen bis zu 24 Proben in einem Lauf markiert werden können, enthalten. Das miniPCR-Gerät (miniPCR bio, Massachusetts) (Fig. 1b) ermöglicht die PCR unter Feldbedingungen.

Um mit der Sequenzierung zu beginnen, muss das MinION™-Gerät (Fig. 1c) mit einer Messzelle (Flow Cell) bestückt werden (Fig. 1d). Diese enthält die Reaktionskammer sowie die Steuer- und Messelektronik. Die Flow Cells sind Verbrauchsmaterial, sie können aber für mehrere Messvorgänge (2–3) benutzt und nach Gebrauch rezykliert werden. Die

Lösungen und die für die Sequenzierung vorbereitete DNA werden mit wenigen Pipettierschritten in die Flow Cell geladen. Je länger die Sequenzierung durchgeführt wird, desto mehr Sequenzen (abgelesene Gene) werden produziert. Unserer Erfahrung nach reichen 30 000 bis 40 000 Sequenzen aus, um die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft detailliert zu erfassen. Dies dauert für zwölf Proben ca. drei Stunden.

Während die Sequenzierung durchgeführt wird, können die Ergebnisse bereits in Echtzeit analysiert und überwacht werden. Für tiefergehende Analysen können anschließend öffentlich verfügbare Softwarepakete und Datenbanken verwendet werden. Zum Beispiel ermöglicht die EMU-Analysesoftware die taxonomische Bestimmung der Sequenzen mithilfe eines Datenbankabgleichs. Die Midas-Datenbank [24, 25] ist die am besten geeignete Datenbank zur taxonomischen Bestimmung von ARA-Bakterien und deren Rolle in ARA-relevanten Prozessen.

VORGEHEN

Um die Praxistauglichkeit der Nanopore-Sequenzierung für das Biomonitoring von ARA zu bestätigen, wurden Sequenzierung vor Ort wie auch wöchentliches Biomonitoring mit Sequenzierungen im Labor durchgeführt:

- 6–10 Proben pro Stunde im Feld
- 16 Proben pro Stunde im Labor

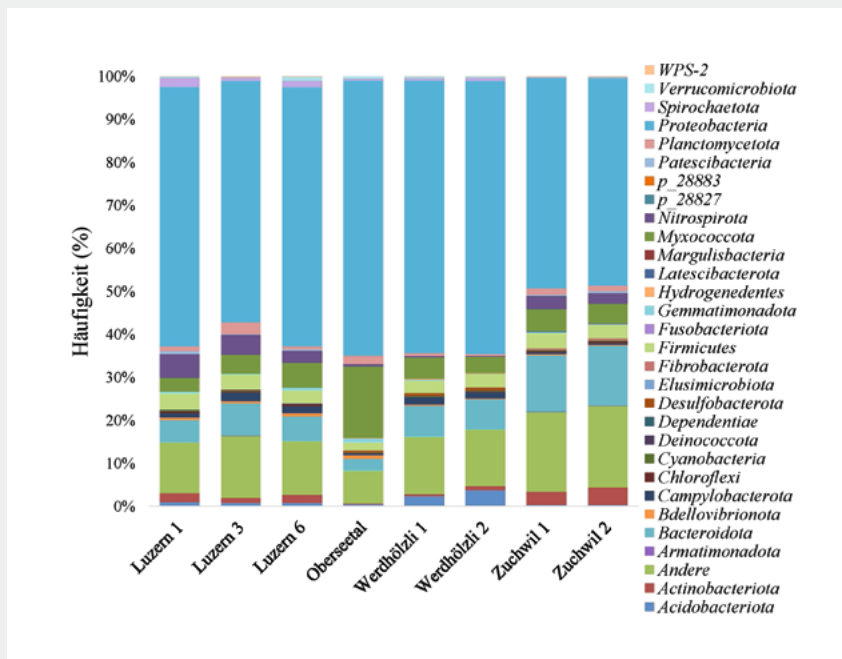


Fig. 2 Mikrobielle Gemeinschaft auf Phylum-Ebene von unterschiedlichen ARA vor Ort sequenziert und analysiert. Farben kennzeichnen die unterschiedlichen bakteriellen Phyla. (Das Phylum ist eine taxonomische Hierarchiestufe analog zum «Stamm» bei Tieren, z. B. Wirbeltiere, Weichtiere).

in Betracht gezogen werden. Weiterhin sollten die Analysen auf die Bedürfnisse des ARA-Betriebs adaptierbar sein und eine Charakterisierung von z. B. Belebtschlamm, Granulen, Anammox erlauben.

RESULTATE

Im Sommer 2022 wurde an den ARA Buholz (Luzern), Oberseetal, Werdhölzli (Zürich) und der ZASE (Zuchwil) Nanopore-

Sequenzierung vor Ort getestet und eine Momentaufnahme des Belebtschlamm-Mikrobioms aus parallelen Strassen erstellt (Fig. 2). Das Ziel einer Analyse bis zum nächsten Tag wurde dabei erreicht. Diese Analysen haben Folgendes gezeigt: Nicht nur unterscheidet sich das Mikrobiom zum jeweiligen Zeitpunkt von ARA zu ARA, es gibt auch erkennbare Unterschiede zwischen den einzelnen Strassen innerhalb derselben ARA

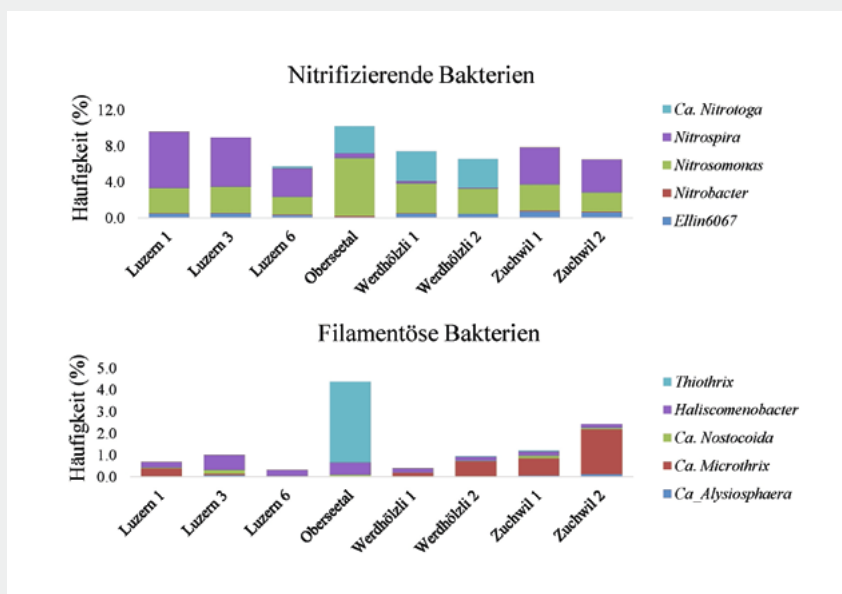


Fig. 3 Oben: Häufigkeit nitrifizierender Gattungen in den unterschiedlichen ARA (Strassen) zum jeweiligen Analysezeitpunkt. Unten: Häufigkeit der bekannten filamentösen Bakteriengattungen.

(z. B. zwischen den Strassen 1 und 6, ARA Buholz).

Bei der Häufigkeit und Zusammensetzung der nitrifizierenden Bakterien wurden deutliche Unterschiede zwischen den ARA, aber nicht zwischen einzelnen Strassen derselben ARA gefunden (Fig. 3). Während in Luzern und in Zuchwil *Nitrospira* der dominante Nitritoxidierer war, was es in der ARA Werdhölzli und im Oberseetal *Candidatus Nitrotoga*. *Nitrosomonas* war in allen ARA der dominante Ammoniumoxidierer. Die über alle ARA gemittelte relative Häufigkeit der Ammoniumoxidierer betrug $3,6 \pm 1,2\%$ und die der Nitritoxidierer $4,2 \pm 1\%$ (Fig. 3).

Innerhalb der Gruppe der filamentösen Bakterien wurde häufig ein hoher Anteil der bekannten Gattung *Ca. Microthrix* gefunden. Dies führte aber auf keiner der untersuchten Anlagen zu Schlammabsetzproblemen. Zum Messzeitpunkt hatte einzig die ARA Oberseetal deutliche Absetzprobleme, die auf die Dominanz der Gattung *Thiothrix* zurückgeführt werden konnte (Fig. 3).

MOMENTAUFNAHME: VOR- UND NACHTEILE

Die Analysen zeigten deutlich Unterschiede zwischen den einzelnen ARA, zudem bestätigten sie die Praxistauglichkeit des angewandten portablen Sequenzierlabors. Innerhalb eines Arbeitstages erhält der ARA-Betrieb eine detaillierte Auflistung der im Schlamm befindlichen Bakterien. Allerdings ist eine solche Momentaufnahme einer Prozessoptimierung wenig dienlich. Hierfür braucht es Wissen über das für jede ARA individuell typische Belebtschlamm-Mikrobiom mit zeitlichem Verlauf. Mit anderen Worten: Entscheidend ist ein regelmässiges Monitoring, wie weiter unten beschrieben.

Für die Ursachenfindung von Prozessinstabilitäten oder Begleitphänomenen kann eine Momentaufnahme hingegen nützlich sein. Zum Beispiel kam es auf der ARA Langmatt im Frühjahr 2023 zu starker Schaumbildung innerhalb der Biologie. Aluminiumdosierungen konnten nichts dagegen ausrichten. Die laufende Biomonitoring-Kampagne allein konnte jedoch keinen Aufschluss darüber geben, welches Bakterium Verursacher der Schaumproblematik war (Fig. 3). Eine zusätzliche Analyse des Schaumes konnte noch am gleichen Tag die filamentöse Gattung *Nocardia* als Ursache für

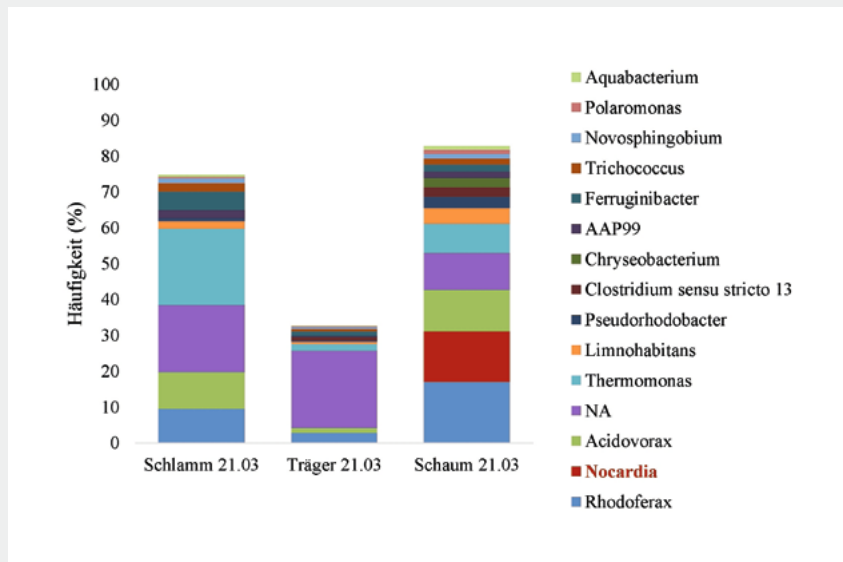


Fig. 4 Mikrobielle Zusammensetzung des Belebtschlammes, des Hybridwirbelbett-Trägers und des Schaumes zum gleichen Probenzeitpunkt.

die Schaumbildung identifizieren. Somit konnten geeignete Gegenmassnahmen ergriffen werden (erhöhte Hydraulik zur Schaumauschwemmung und manueller Schaumabzug).

BIOMONITORING

ARA Buholz

Seit Anfang 2023 wurde auf der ARA Buholz eine wöchentliche Biomonitoring-Kampagne durchgeführt. Dafür wurden vom ARA-Personal wöchentlich Schlammproben genommen und per Post an das Labor der Eawag versendet. Die Belebtschlammproben wurden bei Erhalt im Labor der Eawag in Kastanienbaum sequenziert. Die Ergebnisse wurden innerhalb von sieben Tagen bereitgestellt. (Diese Zeitspanne basiert auf logistischen Überlegungen und kann grundsätzlich noch deutlich reduziert werden.)

Im Fall der ARA Buholz korrelierte der Schlammvolumenindex (SVI) (ml/g) in den beiden untersuchten Strassen sehr gut mit dem Vorkommen des *Ca. Microthrix* (Strasse 1: $1,5 \pm 1\%$; Strasse 6: $0,6 \pm 0,6\%$) (Fig. 5). Wie schon in anderen Studien beobachtet [22], kann dieses filamentöse Bakterium also in diesem Fall mit den Absetzproblemen in der ARA in Verbindung gebracht werden.

Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen Rückschlüsse auf Veränderungen der Bakteriengemeinschaft und ihren Bezug zu Prozessveränderungen erst im Nachhinein analysiert werden konnten, erlaubt das langfristige Biomonitoring eine Überwachung der Wachstumsdynamik

des *Ca. Microthrix* anhand wöchentlicher Analysen. Bedarfsweises Dosieren von Aluminium beim Aufkommen von *Ca. Microthrix* könnte somit ein übermässiges Wachstum und schlechte Absetzung im Vornhinein verhindern. Auch kann die Wirksamkeit der Dosierung wöchentlich überprüft werden. Weiterführende Analysen sind hier jedoch vonnöten, da nicht alle *Ca. Microthrix*-Spezies auf Aluminiumdosierungen reagieren [6]. Die unterschiedliche Beschickung der Strassen (Strasse 1: Zentrat, Strasse 6 Abwasser) hat nicht nur Einfluss auf die filamentöse Gemeinschaft (< Strasse 6; Fig. 5), sondern auch auf die Nitrifikanten (Fig. 6). Während *Nitrospira* $6,7 \pm 2,5\%$ der

Gemeinschaft in Strasse 1 ausmacht, beträgt die durchschnittliche Abundanz in Strasse 6 mit $3,7 \pm 2,3\%$ nur gut die Hälfte. Anfang Mai kam es auch zu schlechteren Nitrifikationsleistungen in der Strasse 6. Es konnte in dieser Zeit auch eine Erhöhung der Nitritwerte beobachtet werden. Dies deckt sich mit einer Verdrängung von *Ca. Nitrotoga* durch *Nitrospira*. Diese Dynamik konnte schon in vorgängigen Studien als Verursacher für Nitritakkumulationen erkannt werden [4]. Da es im Fall der *Nitrospira*/*Nitrotoga*-Dynamik noch keine ausgereiften Gegenmassnahmen gibt, hilft dieses Ergebnis zunächst, das Problem besser zu verstehen, und bietet Gelegenheit, gezielte Eingriffe zu testen. Gegebenenfalls kann die betroffene Strasse mit anderem Schlamm angeimpft werden oder weniger beschickt werden, bis eines der beiden nitritoxidierenden Bakterien (NOB) wieder vollkommen etabliert ist und die erwartete Leistung erbracht wird.

ARA Schönau

Neben der Biologie kann Biomonitoring auch für Anammox-Reaktoren oder Faultürme genutzt werden. Mittels DNA-Sequenzierung wird seit Januar 2023 das Mikrobiom des Faulturms der ARA Schönau beobachtet. Der Fokus liegt hier auf der Frage, wie sich prozessrelevante Mikroorganismen wie methanproduzierende Archaeobakterien und die mit ihnen vergesellschafteten gärenden Bakterien über die Zeit verändern. Das Monitoring zeigte hier eine bakterielle Gemeinschaft,

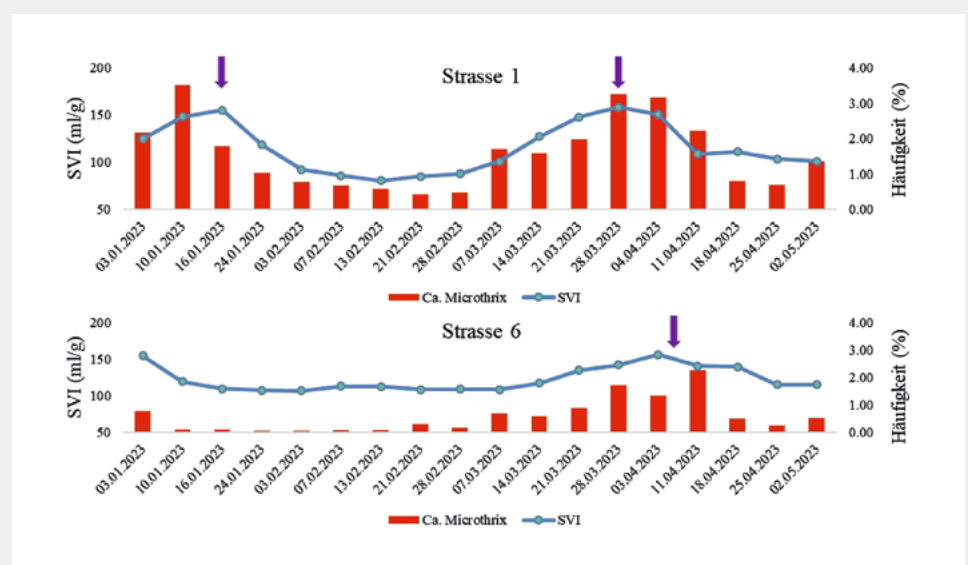


Fig. 5 Abundanz des filamentösen Bakteriums *Ca. Microthrix* und der korrespondierende Schlammvolumenindex (SVI) über einen Messzeitraum von fünf Monaten in zwei Strassen der ARA Buholz. Die Pfeile zeigen die Aluminiumdosierungen.

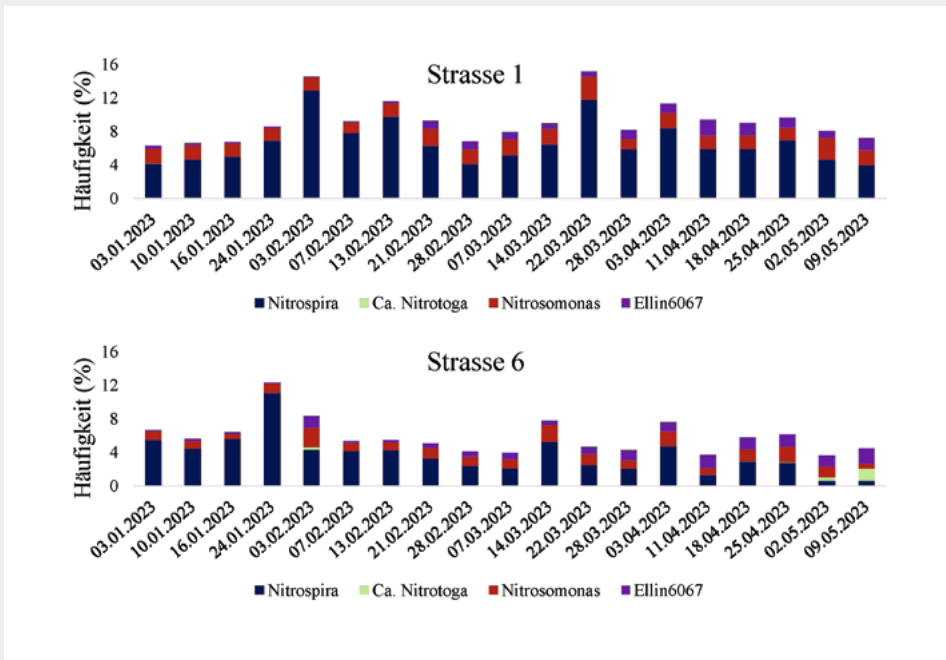


Fig. 6 Nitrifikante Dynamiken in der ARA Buholz über fünf Monate.

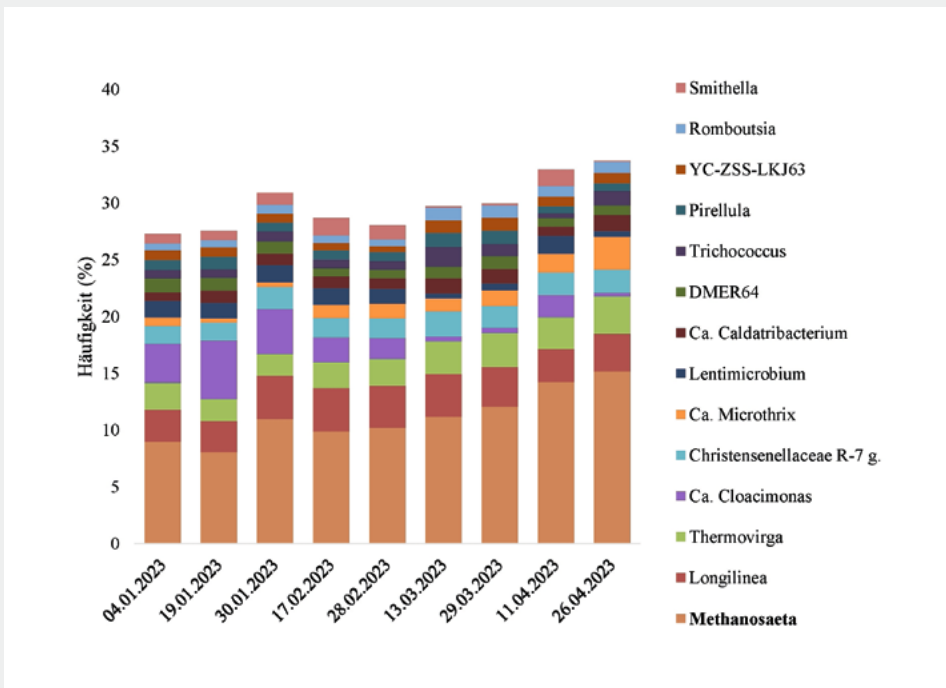


Fig. 7 Die 15 häufigsten bakteriellen Genera über die Zeit im Faulturn der ARA Schönau.

die sich mit der Zeit nur leicht verändert. Allerdings konnte ein starker Einfluss von Veränderungen in der Biologie des Belebtschlammes auf das Mikrobiom des Faulturns beobachtet werden. Während eines *Ca.-Microthrix*-Ausbruchs in der Biologie konnte das Bakterium auch verstärkt im Faulturn nachgewiesen werden. Das prominenteste methanproduzierende Archaeobakterium (*Methanosaeta*), das im Durchschnitt $11,2 \pm 2,2\%$ der Gemeinschaft ausmacht, nahm über die Zeit zu. Hier können auch Korrelationen mit

den Veränderungen in Biogasproduktion und Mikrobiom erstellt werden.

FAZIT

Ein zeitnahe Biomonitoring mithilfe von *Nanopore*-Sequenzierung gibt neue Einblicke in die biologischen Prozesse in ARA. So ermöglicht regelmässiges z. B. wöchentliches Biomonitoring ein rasches Erkennen von Abundanzveränderungen funktionell wichtiger oder die Identifizierung neu einwachsender Mikroben.

Solche Informationen erlauben unter Umständen, Massnahmen einzuleiten, bevor sich die Veränderungen im Mikrobiom auf die Prozessebene auswirken. Mit zunehmender Erfahrung über die Zusammenhänge zwischen Mikrobiom und Prozessleistung und -stabilität wird dies zweifellos ein immer wertvolleres Werkzeug werden.

Auch für *Ad-hoc*-Analysen gibt es sinnvolle Einsatzmöglichkeiten. Vor Ort durchgeführte Sequenzanalysen können innert weniger Stunden Aufschluss über den mikrobiellen Status von Belebtschlamm oder anderen Proben geben. Im Falle der ARA Langmatt konnte eine Analyse des Schaums das Bakterium *Nocardia* als Verursacher der Schaumbildung identifizieren, der sich nicht durch Aluminiumfällung beseitigen liess. Gezielte DNA-Analysen können also als Entscheidungshilfe für Gegenmassnahmen dienen und eine Kostenersparnis ermöglichen. Auch ob sich spezifische funktionelle Gilden (z. B. Nitrifikanten, Anammox) im System befinden, kann untersucht werden. Dies könnte zukünftig eine Ergänzung zu Aktivitätstests sein, wenn das Vorhandensein dieser Bakterien respektive ihre Häufigkeit mit einem Leistungspotenzial korreliert. Die Mikrobiom-Analyse erlaubt aber darüber hinaus, zu

BAKTERIELLE GRUPPEN UND INFORMATIONSGEHALT FÜR DIE ARA

- Abundanz der NOB: Prozesspotenzial Nitritoxidation
- Dominanzwechsel bei NOB: Prozessinstabilitäten, Nitritakkumulation
- Abundanz der AOB: Prozesspotenzial Ammoniumoxidation
- Abundanz von Anammox: Prozesspotenzial Anammox
- Abnahme NOB, AOB oder Anammox: Prozessprobleme, Auswaschung von prozessrelevanten Mikroben
- Hohe Abundanz, Abundanzunahme oder Einwachsen neuer Arten filamentöser Bakterien: Absetzprobleme, Schaumbildung
- Allgemein starke Veränderung der Zusammensetzung oder der Diversität des Mikrobioms: mögliche Stresssituation, erhöhte Aufmerksamkeit

unterscheiden, ob z. B. ein Leistungsverlust das Resultat eines Verlustes der entsprechenden Mikroben ist oder eher aus einer momentanen Hemmung resultiert. Rückblickend auf die bisher durchgeführten Messkampagnen, kann man festhalten, dass wöchentliches Mikrobiom-Monitoring dank der schnellen Verfügbarkeit der Messresultate bereits heute praxisrelevante Daten liefern kann. Da jede ARA ein individuelles Mikrobiom besitzt, ist zunächst die Erstellung einer «Baseline» der jahreszeitlichen Dynamik des Mikrobioms notwendig, um robuste Schlussfolgerungen aus aktuellen Monitoringdaten ziehen zu können.

Eine wichtige Aufgabe der Forschung wird sein, die für die Praxis nützlichen Analysen und Datenprodukte zu identifizieren und zugänglich zu machen. Dies kann nur in enger Zusammenarbeit mit den Abwasserreinigungsanlagen gelingen.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Wu, L. (2019): et al., *Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants*, *Nat Microbiol*, vol. 4, no. 7, pp. 1183–1195, doi: 10.1038/s41564-019-0426-5
- [2] Nierychlo, M. et al. (2020): *MiDAS 3: An ecosystem-specific reference database, taxonomy and knowledge platform for activated sludge and anaerobic digesters reveals species-level microbiome composition of activated sludge*, *Water Res*, vol. 182, p. 115955, doi: 10.1016/j.watres.2020.115955
- [3] de Celis, M. et al. (2020): *Tuning up microbiome analysis to monitor WWTPs' biological reactors functioning*, *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, doi: 10.1038/s41598-020-61092-1
- [4] Gruber, W. et al. (2021): *Linking seasonal N₂O emissions and nitrification failures to microbial dynamics in a SBR wastewater treatment plant*, *Water Res X*, vol. 11, p. 100098, doi: 10.1016/j.wroa.2021.100098
- [5] Wágner, D. S. et al. (2022): *Seasonal microbial community dynamics complicates the evaluation of filamentous bulking mitigation strategies in full-scale WRRFs*, *Water Res*, vol. 216, no. 3, p. 118340, doi: 10.1016/j.watres.2022.118340
- [6] Nierychlo, M. et al. (2020): *Candidatus Amarolinea and Candidatus Microthrix Are Mainly Responsible for Filamentous Bulking in Danish Municipal Wastewater Treatment Plants*, *Front Microbiol*, vol. 11, no. 6, pp. 1–17, doi: 10.3389/fmicb.2020.01214
- [7] Jiang, X. T. et al. (2015): *Population dynamics of bulking and foaming bacteria in a full-scale wastewater treatment plant over five years*, *Sci Rep*, vol. 6, no. 10, pp. 1–9, doi: 10.1038/srep24180
- [8] Jiang, X. T. et al. (2018): *Temporal dynamics of activated sludge bacterial communities in two diversity variant full-scale sewage treatment plants*, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 102, no. 21, pp. 9379–9388, doi: 10.1007/s00253-018-9287-8
- [9] Peces, M. et al. (2022): *Microbial communities across activated sludge plants show recurring species-level seasonal patterns*, *ISME Communications*, vol. 2, no. 1, doi: 10.1038/s43705-022-00098-4
- [10] Griffin, J. S.; Wells, G. F. (2017): *Regional synchrony in full-scale activated sludge bioreactors due to deterministic microbial community assembly*, *ISME Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 500–511, doi: 10.1038/ismej.2016.121
- [11] Johnston J.; Behrens, S. (2020): *Seasonal dynamics of the activated sludge microbiome in sequencing batch reactors, assessed using 16s rRNA transcript amplicon sequencing*, *Appl Environ Microbiol*, vol. 86, no. 19, pp. 1–17, doi: 10.1128/AEM.00597-20
- [12] Johnston, J. (2019): *Composition and Dynamics of the Activated Sludge Microbiome during Seasonal Nitrification Failure*, *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, doi: 10.1038/s41598-019-40872-4
- [13] Jiang, C. et al. (2021): *Characterizing the growing microorganisms at species level in 46 anaerobic digesters at Danish wastewater treatment plants: A six-year survey on microbial community structure and key drivers*, *Water Res*, vol. 193, p. 116871, doi: 10.1016/j.watres.2021.116871
- [14] Kirkegaard, R. H. et al. (2017): *The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters*, *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, doi: 10.1038/s41598-017-09303-0
- [15] Singleton, C. M. et al. (2021): *Connecting structure to function with the recovery of over 1000 high-quality metagenome-assembled genomes from activated sludge using long-read sequencing*, *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, doi: 10.1038/s41467-021-22203-2
- [16] Vollertsen, J. et al. (2001): *Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater*, *Water Res*, vol. 35, no. 7, pp. 1649–1658, doi: 10.1016/S0043-1354(00)00450-4
- [17] Andersen, M. H. et al. (2023): *Fast DNA-analyses for surveillance of microbial communities in full-scale deammonification tanks: Potential for control and troubleshooting*, *Water Res*, vol. 236, doi: 10.1016/j.watres.2023.119919
- [18] Ju, F. et al. (2014): *Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years*, *Environ Microbiol Rep*, vol. 6, no. 1, pp. 80–89, doi: 10.1111/1758-2229.12110
- [19] Petrovski, S. et al. (2020): *The community compositions of three nitrogen removal wastewater treatment plants of different configurations in Victoria, Australia, over a 12-month operational period*, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 104, no. 22, pp. 9839–9852, doi: 10.1007/s00253-020-10901-8
- [20] Krohn-Molt, I. et al. (2013): *Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors*, *Appl Environ Microbiol*, vol. 79, no. 20, pp. 6196–6206, doi: 10.1128/AEM.01641-13
- [21] Sun, C. et al. (2021): *Seasonal dynamics of the microbial community in two full-scale wastewater treatment plants: Diversity, composition, phylogenetic group based assembly and co-occurrence pattern*, *Water Res*, vol. 200, p. 117295, doi: 10.1016/j.watres.2021.117295
- [22] Fumasoli, A. et al. (2022): *DNA-Analyse im Belebtschlamm*. [Online]. www.aquatogas.ch/wasser/abwasser/20220112_ag1_dna-analyse
- [23] Curry, K. D. et al. (2022): *Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data*, *Nat Methods*, vol. 19, no. 7, pp. 845–853, doi: 10.1038/s41592-022-01520-4
- [24] Nierychlo, M. et al. (2020): *MiDAS 3: An ecosystem-specific reference database, taxonomy and knowledge platform for activated sludge and anaerobic digesters reveals species-level microbiome composition of activated sludge*, *Water Res*, vol. 182, p. 115955, doi: 10.1016/j.watres.2020.115955
- [25] McIlroy, S. J. et al. (2017): *MiDAS 2.0: An ecosystem-specific taxonomy and online database for the organisms of wastewater treatment systems expanded for anaerobic digester groups*, *Database*, vol. 2017, no. 1, pp. 1–9, doi: 10.1093/database/bax016