



**UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE**



WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII

Dziedzina nauk inżynieryjno-technicznych

Dyscyplina: inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka

mgr inż. Martyna Godzieba

Rozprawa doktorska

**Wykorzystanie sieci społecznych do badania wzorców współwystępowania bakterii
przekształcających związki azotu w układach oczyszczania ścieków**

**Utilizing social networks to study co-occurrence patterns of nitrogen-converting
bacteria in wastewater treatment systems**

Praca wykonana w Katedrze Biotechnologii w Ochronie Środowiska

Promotor pracy: prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2025

1:8342459215

Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów składających się na rozprawę doktorską:

P1. Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Ciesielski S. Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12, 12558 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>

(MNiSW₂₀₂₂ = 140 pkt, IF = 4,6)

P2. Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>

(MNiSW₂₀₂₄ = 100 pkt, IF = 7,4)

P3. Godzieba, M., Hliwa, P., Ciesielski, S. Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: an unfaltering cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea. *Water*, 17, 52 (2025). <https://doi.org/10.3390/w17010052>

(MNiSW₂₀₂₅ = 100 pkt, IF = 3,0)

P4. Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia J., Ciesielski, S. Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 17, 107494 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>

(MNiSW₂₀₂₅ = 100 pkt, IF = 6,3)

Sumaryczny Impact Factor opublikowanych wyżej wymienionych publikacji zgodnie z bazą JCR: **21,3**.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW opublikowanych ww. publikacji: **440**.

Impact Factor i sumaryczna liczba punktów MNiSW zostały obliczone uwzględniając punktację z dnia publikacji.

Pełne teksty wymienionych powyżej wymienionych prac (wraz z oświadczeniami współautorów publikacji) stanowią załączniki do prezentowanej pracy.

Wsparcie finansowe badań

Narodowe Centrum Nauki:

- projekt nr 2017/27/B/NZ9/01039, pt.: „Identyfikacja, charakterystyka i modelowanie procesu COMAMMOX - nowego ogniwa w obiegu azotu w układach oczyszczania ścieków” – uczestnictwo jako stypendysta
- projekt nr 2021/41/N/NZ9/01749, pt.: „Bakterie comammox w świetle badań meta-omicznych - analiza porównawcza sieci interakcji nitryfikatorów w różnych środowiskach” – jako kierownik projektu

Spis treści

Streszczenie.....	4
Abstract	6
1. Wstęp.....	8
1.1. Zależności ekologiczne w zespołach mikroorganizmów.....	8
1.2. Bakterie przekształcające związki azotowe w układach oczyszczania ścieków.....	10
1.3. Sekwencjonowanie nowej generacji.....	14
1.4. Sieci społeczne w badaniach mikrobiologicznych	15
2. Cel i zakres badań.....	19
3. Hipotezy badawcze.....	20
4. Materiały i metody	21
4.1. Opis systemów źródłowych badanych mikrobiomów	21
4.2. Ekstrakcja kwasów nukleinowych.....	23
4.3. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji.....	24
4.4. Konstrukcja sieci współwystępowania	24
5. Wyniki	25
6. Weryfikacja hipotez.....	39
7. Podsumowanie i wnioski.....	43
8. Spis literatury	44
9. Spis rysunków	52

Streszczenie

Mikroorganizmy uczestniczące w przemianach związków azotowych w układach oczyszczania wody i ścieków tworzą różnorodne zespoły, które kształtowane są nie tylko przez czynniki środowiskowe ale również przez relacje ekologiczne. Dlatego też konieczny jest rozwój nowych metod i narzędzi badawczych umożliwiających badanie tych mikroekosystemów w sposób holistyczny, uwzględniając zarówno strukturę zespołów mikroorganizmów, możliwe interakcje między nimi oraz wpływ czynników środowiskowych. Dzięki rozwojowi metod sekwencjonowania nowej generacji, oraz metod meta-omicznych, możliwe stało się precyzyjne badanie mikrobiomów. Metody meta-omiczne generują ogromne ilości danych, a selekcja odpowiednich informacji i ich prawidłowa interpretacja wymaga właściwego podejścia. Obiecującą metodą analizy takich danych może być analiza korelacji współwystępowania różnych taksonów. Skorelowane taksony są reprezentowane w formie sieci ilustrującej społeczność bakteryjną. Analiza sieci może być szczególnie przydatna do badania społeczności mikroorganizmów w oczyszczalniach ścieków, ponieważ daje możliwość włączenia czynników operacyjnych do sieci. Dzięki takiemu podejściu można zaobserwować, jak zmiany różnych parametrów technologicznych wpływają na poszczególne grupy bakterii i określić, które grupy w największym stopniu przyczyniają się do usuwania zanieczyszczeń. Niniejsza praca miała na celu określenie możliwości zastosowania analizy sieci współwystępowania mikroorganizmów do badania zależności ekologicznych i powiązań pomiędzy bakteriami przekształcającymi związki azotowe w bioreaktorach oczyszczania wody i ścieków. Badania prowadzono w reaktorach zróżnicowanych pod względem ich zastosowania, typu biomasy i zastosowanych parametrów, co determinowało rodzaj zachodzących procesów przemiany związków azotowych. Zastosowanie nowoczesnych analiz meta-omicznych pozwoliło na badanie potencjalnych relacji istniejących między członkami społeczności bakteryjnych. Dzięki takiemu podejściu zdefiniowano nie tylko skład taksonomiczny badanych środowisk ale także określono, które grupy mikroorganizmów mogą pełnić w nich kluczowe funkcje. Wykazano między innymi, że w warunkach ograniczonej dostępności substratów pokarmowych nasilają się zależności konkurencyjne między bakteriami. Istotna ekologicznie rola nityfikatorów znajduje odzwierciedlenie w strukturze sieci, a węzły je reprezentujące charakteryzują się wysokimi parametrami centralności. Analiza sieci współwystępowania jest obiecującym narzędziem umożliwiającym identyfikację

potencjalnych zależności ekologicznych w populacjach bakteryjnych. Pełne zrozumienie zależności między funkcjonalnymi grupami mikroorganizmów może w przyszłości ułatwić sterowanie procesami biologicznego oczyszczania wody i ścieków nie tylko w warunkach laboratoryjnych ale również przemysłowych.

Słowa kluczowe: sieci współwystępowania, sekwencjonowanie nowej generacji, zbiorowiska mikroorganizmów, cykl azotowy, AOB, NOB

Abstract

Microorganisms involved in the transformation of nitrogen compounds in wastewater treatment systems form diverse communities influenced by both environmental factors and ecological relationships. Therefore, it is essential to develop new research methods and tools that enable the holistic study of these microecosystems, considering the composition of the population, potential interactions among community members, and the impact of environmental conditions. Thanks to advancements in next-generation sequencing methods and meta-omics techniques, it has become feasible to study microbiomes precisely. Meta-omics methods generate vast amounts of data, and selecting the appropriate information and interpreting it correctly requires a suitable approach. A promising method for analyzing such data may involve examining the correlations of the co-occurrence of different taxa. Correlated taxa can be represented in a network that illustrates the bacterial community structure. Network analysis is particularly beneficial for studying microbial communities in wastewater treatment systems, as it allows for the inclusion of operational factors within the network. This approach enables researchers to observe how changes in various technological parameters affect individual groups of bacteria and to identify which groups contribute most to pollutant removal. The aim of this study was to explore the use of microbial co-occurrence network analysis to investigate the ecological relationships and connections among bacteria involved in nitrogen compound transformation in water and wastewater treatment bioreactors. The research was conducted in reactors differing in usage, biomass type, and operating parameters, which influenced the types of nitrogen transformation processes occurring. Utilizing modern meta-omics analyses provided insights into potential relationships among the members of bacterial communities. This approach allowed for a comprehensive understanding of the taxonomic composition of the environments studied and identified which groups of microorganisms perform key functions. It was observed that, under conditions of limited substrate availability, competitive interactions among bacteria intensify. The ecological significance of nitrifying bacteria was evident in the network structure, with nodes representing these bacteria characterized by high centrality measures. Co-occurrence network analysis presents a promising tool for identifying potential ecological relationships within bacterial populations. A complete understanding of the relationships among functional

groups of microorganisms could enhance the control of biological water and wastewater treatment processes in both laboratory and industrial settings in the future.

Keywords: co-occurrence networks, next-generation sequencing, microbial communities, nitrogen cycle, AOB, NOB

1. Wstęp

Złożone społeczności mikroorganizmów odgrywają zasadniczą rolę w obiegu pierwiastków takich jak azot, węgiel czy fosfor, zarówno w ekosystemach naturalnych jak i inżynieryjnych. Wykorzystywane są w wielu różnych procesach technologicznych związanych z ochroną środowiska i gospodarką wodną, takich jak oczyszczanie ścieków, produkcja biogazu, procesy bioremediacji gleb czy kompostowanie odpadów organicznych (Gaspari i in., 2021; Li i in., 2023; Xiong i in., 2024). Wszystkie te procesy bazują na zdolności mikroorganizmów do pracy w zespołach, w których różne mikroorganizmy wykorzystują kolejno produkty przemian innych członków społeczności. Jednak mikroekosystemy tworzone są często przez setki różnych rodzajów bakteryjnych, które nie tylko współpracują między sobą, ale również konkurują o dostępną przestrzeń, substraty pokarmowe oraz tlen. Mechanizmy tych ekologicznych interakcji mogą być bardzo zróżnicowane, a ich poznanie i zrozumienie jest niezbędne do właściwego zarządzania procesami technologicznymi wykorzystującymi mikroorganizmy. Dlatego też badania nad tymi zespołami mikroorganizmów, zwanych powszechnie mikrobiomami, mogą przyczynić się do rozwoju wielu różnych dziedzin nauki (Kwiatkowska i Ormaniec, 2024; Suman i in., 2022). Z uwagi na postępującą antropogeniczną degradację środowiska szczególnie istotnym kierunkiem są badania nad mikrobiomami środowiskowymi (Shade, 2023). Ze względu na szerokie wykorzystanie mikroorganizmów w wielu procesach, badania nad strukturą mikrobiomów, czynnikami wpływającymi na ich kształtowanie i różnicowanie czy też przyczynami potencjalnych zaburzeń są niezbędne dla rozwoju biogospodarki.

1.1. Zależności ekologiczne w zespołach mikroorganizmów

Mikroorganizmy tworzą złożone społeczności, których kształt i funkcjonowanie zależy od wielu różnych czynników środowiskowych jak i interakcji międzygatunkowych. Interakcje między bakteriami tworzą skomplikowaną sieć bezpośrednich i pośrednich powiązań, zarówno o charakterze antagonistycznym jak i nieantagonistycznym (Geesink i in., 2024). Konsumując zasoby środowiskowe i produkując różne metabolity, mikroorganizmy mogą pozytywnie lub negatywnie wpływać na wzrost innych grup bakterii, a stabilność systemu zależy od równowagi między różnymi grupami. Zrozumienie tych zależności jest szczególnie istotne w systemach oczyszczania ścieków, ponieważ przekładają się one na wydajność procesu. Przykładowo Zhou i in. (2023) badali zależność między bakteriami anammox

(przeprowadzającymi proces beztlenowego utleniania amoniaku) i DNRA (przeprowadzającymi dysymilacyjną redukcję azotanów do amoniaku) w reaktorze membranowym (MBR), przy różnych stosunkach $\text{NH}_4^+\text{-N}$ do $\text{NO}_2^-\text{-N}$. Wyniki tych badań wskazały, że przy zbyt wysokim stosunku $\text{NH}_4^+\text{-N}$ do $\text{NO}_2^-\text{-N}$, może dojść do nadmiernego namnożenia bakterii DNRA, akumulacji $\text{NO}_2^-\text{-N}$ i zahamowania aktywności anammox, co skutkuje załamaniem procesu. Przy niższym stosunku $\text{NH}_4^+\text{-N}$ do $\text{NO}_2^-\text{-N}$ te dwie grupy bakterii mogą tworzyć zrównoważony system, w którym bakterie DNRA generują azotyny i amoniak, wspierając proces anammox. Równowaga między mikroorganizmami może wynikać również z bardziej złożonych mechanizmów niż prosta zależność producent – konsument. Badania Bayer i in. (2019) wykazały na przykład, że wiele szczepów archeonów utleniających amoniak (AOA), nie posiada genu kodującego katalazę – enzymu rozkładającego nadtlenek wodoru. W związku z tym są one wrażliwe na stres oksydacyjny. Jednakże związki organiczne będące produktem ich metabolizmu mogą być wykorzystywane przez heterotrofy, które z kolei neutralizują nadtlenek wodoru obecny w środowisku. Taka relacja przynosi korzyści obu grupom mikroorganizmów. Z drugiej strony zależności konkurencyjne wynikają z rywalizacji o ten sam substrat pokarmowy lub zajmowanie podobnej niszy ekologicznej. Również w tym przypadku kluczową cechą interakcji między mikroorganizmami jest modyfikacja środowiska np. poprzez zmianę pH (Ratzke i Gore, 2018). Ponadto wiele bakterii produkuje również związki, np. bakteriocyny, które bezpośrednio hamują rozwój lub niszczą konkurencyjne grupy bakterii (Yim i Wang, 2021). Równowaga mikrobiomu jest więc wypadkową sprzężenia zwrotnego wynikającego z ciągłego reagowania na zmiany środowiskowe oraz indukowania tych zmian przez poszczególnych członków społeczności mikroorganizmów, a także bezpośrednich oddziaływań antagonistycznych (Mougi, 2023). Zmiana liczebności jednej grupy może wpłynąć na liczebność innej, co doprowadzi do przegrupowania całej społeczności mikroorganizmów. Ogromna złożoność mikrobiocenozy oznacza, że oddzielenie przyczyn od skutków jest zwykle wyzwaniem. Dlatego też konieczny jest rozwój metod i narzędzi badawczych umożliwiających badanie mikroekosystemów w całości, uwzględniając zarówno skład populacji, możliwe interakcje między członkami społeczności oraz wpływ czynników środowiskowych. Szczególnie istotnym obiektem badań są mikroekosystemy antropogeniczne, takie jak układy oczyszczania wody i ścieków, z uwagi na kluczową rolę mikroorganizmów w procesie technologicznym.

1.2. Bakterie przekształcające związki azotowe w układach oczyszczania ścieków

Związki azotu zawarte w ściekach, głównie w postaci amoniaku, azotynów i azotanów, stanowią źródło zanieczyszczenia wód gruntowych i powierzchniowych, i mogą powodować eutrofizację zbiorników wodnych. Usuwanie azotu ze ścieków jest zatem krytycznym procesem w oczyszczaniu ścieków. W związku z tym jedną z najważniejszych grup bakterii są bakterie przekształcające związki azotowe. Jednym z podstawowych procesów zachodzących podczas oczyszczania ścieków jest nityfikacja, podczas której amoniak jest utleniany do azotanów. W procesach oczyszczania ścieków i wody populacje nityfikatorów najczęściej tworzą bakterie AOB (np. *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* (Soliman i Eldyasti, 2018)), NOB (ich przedstawicieli można znaleźć wśród alfa-, beta-, delta- i gammaproteobacteria oraz w typie *Nitrospirota* (Al-Ajeel i in., 2022)), bakterie comammox *Nitrospira* (Daims i in., 2015; van Kessel i in., 2015) oraz archeony z typu *Thaumarchaeota* (Pester i in., 2011). Spośród tych różnorodnych mikroorganizmów najmniej zbadaną grupę stanowią bakterie comammox, z uwagi na ich stosunkowo niedawne odkrycie.

Mimo iż odkrycie bakterii zdolnych do całkowitego utleniania amoniaku nastąpiło zaledwie kilka lat temu, już wcześniej prowadzono rozważania teoretyczne na ten temat. Rozważania te opierano na analizie termodynamiki procesu nityfikacji. Mianowicie podczas utleniania amoniaku do azotanów generowana jest większa ilość energii ($\Delta G^{\circ} = -349 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NH}_3$), niż w przypadku osobnego utleniania amoniaku ($\Delta G^{\circ} = -275 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NH}_3$) i azotynów ($\Delta G^{\circ} = -74 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ NO}_2^-$) (Daims i in., 2016). Tak więc z punktu widzenia termodynamiki korzystniejsze byłoby, całkowite utlenianie amoniaku przez pojedynczy mikroorganizm, ponieważ uzyskałby on więcej energii z każdej cząsteczki substratu. Podział długiego szlaku metabolicznego może być jednak korzystny w wielu środowiskach, ponieważ maksymalizuje tempo produkcji ATP, skutkując szybszym tempem wzrostu, kosztem mniejszej wydajności, co tłumaczy powszechność występowania AOB i NOB. Jednakże wolno rosnące bakterie comammox mogłyby się okazać konkurencyjne w środowiskach o ograniczonej dostępności substratu oraz w biofilmach bakteryjnych (Costa i in., 2006).

Różnorodność nityfikatorów skłania do poszukiwania czynników wpływających na kształtowanie się ich populacji, a także preferowanych przez nie nisz. Mikroorganizmy zdolne do utleniania amoniaku wykazują do niego różne powinowactwo. Do określania i

porównywania powinowactwa różnych mikroorganizmów do substratu wykorzystuje się równanie Michaelisa-Mentena i wynikającą z niego stałą Michaelisa $K_m(app)$ oraz maksymalną szybkość reakcji V_{max} . Stała $K_m(app)$ definiowana jest jako stężenie substratu potrzebne do osiągnięcia połowy maksymalnej szybkości reakcji. Tak więc niższa wartość K_m wskazuje na większe powinowactwo do substratu. Z kolei V_{max} definiowana jest jako maksymalna szybkość reakcji, przy całkowitym wysyceniu substratem. Kits i in. (2017) stwierdzili, że $K_m(app)$ czystej kultury *Nitrospira inopinata* wynosiło około 0,053–0,083 $\mu\text{M NH}_3$, przy czym V_{max} osiągnięto przy całkowitym stężeniu amoniaku wynoszącym zaledwie 5 μM . W badaniach prowadzonych przez Sakoula i in. (2021) kultura wzbogacona *Nitrospira kreftii* również wykazywała bardzo wysokie powinowactwo do amoniaku ($K_m(app) = 0,040 \mu\text{M NH}_3$). Generalnie uważa się, że u większości przedstawicieli AOB powinowactwo do amoniaku jest niższe. Jednakże w tej grupie występuje pewne zróżnicowanie. Na przykład niektórzy przedstawiciele rodzaju rodzaju *Nitrosomonas*, zwłaszcza z klastra 6a, tacy jak *Nitrosomonas oligotropha*, preferują środowiska oligotroficzne i posiadają stosunkowo wysokie powinowactwo do amoniaku, przy czym wartości $K_m(app)$ wahają się od $\sim 0,24$ do $4,4 \mu\text{M NH}_3$ (Kikuchi i in., 2023; Sedlacek i in., 2016, 2019). Natomiast gatunki *Nitrosomonas* z klastra 7 lepiej rozwijają się w środowiskach eutroficznych i przy wyższych stężeniach amoniaku, przy czym wartości $K_m(app)$ wahają się od $12,5$ do nawet $160 \mu\text{M NH}_3$ (Sedlacek i in., 2019; Thandar i in., 2016). Również AOA wykazują zróżnicowanie pod względem powinowactwa do amoniaku. Przykładowo, szczep modelowy AOA *Nitrosopumilus maritimus* SCM1, występujący w słonej wodzie i biofiltrach morskich recyrkulacyjnych systemów akwakultury (RAS), wykazywał bardzo niską stałą $K_m(app)$ wynoszącą $\sim 3 \text{ nM NH}_3$. To skłoniło naukowców do początkowego przekonania, że większość archeonów będzie również wykazywać wysokie powinowactwo do amoniaku (Martens-Habbena i in., 2009). Jednak późniejsze badania podważyły ten pogląd. Na przykład Jung i in. (2022) opisali dwa szczepy rodzaju *Nitrosocosmicus* sp. o znacznie niższym powinowactwie do amoniaku, porównywalnym z większością AOB, z wartościami $K_m(app)$ wynoszącymi około $12,37 \mu\text{M NH}_3$ i $16,32 \mu\text{M NH}_3$. Wskazuje to, że *Nitrosocosmicus* sp. może zajmować podobne nisze ekologiczne jak AOB. Wyniki tych badań wskazują, że stężenie azotu amonowego może być jednym z najważniejszych czynników wpływających na skład populacji nityfikatorów.

Nitryfikacja jest procesem w głównej mierze przeprowadzanej przez mikroorganizmy autotroficzne, jednak zdolność utleniania azotu amonowego wykazują również niektóre mikroorganizmy heterotroficzne (Gao i in., 2023). Mimo, iż są one wykrywane w systemach oczyszczania ścieków (Duan i in., 2022; Gupta i in., 2022), mechanizmy tego procesu są stosunkowo słabo poznane i raczej nie jest on wykorzystywany w skali technicznej. Heterotroficzna nitryfikacja jest zwykle uznawana za część metabolizmu wtórnego bakterii (Qin i in., 2024). Nitryfikatory heterotroficzne mogą utleniać nieorganiczne związki azotowe takie jak amoniak czy azotyny, ale również różne organiczne związki azotowe (Martikainen, 2022). Informacje na temat enzymów biorących udział w tych szlakach metabolicznych oraz genów je kodujących są jednak ograniczone, zwłaszcza w przypadku ścieżki utleniania organicznych związków azotu. U niektórych przedstawicieli tej grupy potwierdzono obecność genów kodujących monooksygenazę amonową (*amo*) oraz reduktazę hydroksyloaminy (*hao*), jednak u innych nie potwierdzono ich obecności (Hu i in., 2024; Lu i in., 2024; Qin i in., 2024). Niektóre bakterie wykazują również zdolność do jednoczesnej heterotroficznej nitryfikacji i tlenowej denitryfikacji (HNAD), co uważane jest za mechanizm adaptacyjny w środowiskach o zmiennej dostępności tlenu. Jednoczesna nitryfikacja i denitryfikacja związana jest z metabolizmem energetycznym bakterii, a więc w przeciwieństwie do samej nitryfikacji heterotroficznej wykazuje cechy metabolizmu pierwotnego (Martikainen, 2022). Najlepiej opisanym przykładem z tej grupy jest *Paracoccus denitrificans* (Robertson i Kuenen, 1990), ale proces ten został również zaobserwowany m. in. u bakterii z rodzajów *Pseudomonas* (Lan i in., 2023), *Acinetobacter* (Xia i in., 2020), *Diaphorobacter* (Zhang i in., 2017) i *Alcaligenes* (Chen i in., 2021). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie tym procesem, ponieważ może on pomóc w oczyszczaniu ścieków o wysokim stosunku C/N (Bian i in., 2022). Do głównych czynników wpływających na liczebność i aktywność bakterii HNAD w reaktorach oczyszczania ścieków zalicza się: źródło węgla organicznego (HNAD zwykle preferują prostsze związki węgla takie jak karboksylany, zamiast np. bardziej złożonych węglowodanów), stosunek C/N (optimum między 7 a 10), pH (optimum między 7 a 8) oraz stężenie rozpuszczonego tlenu (DO). Zakres optymalnej wartości DO różni się jednak pomiędzy różnymi badaniami i może się wahać między 0,5 mg/l a 6 mg/l (Bian i in., 2022; Fu i in., 2022; B. Hu i in., 2023; Jin i in., 2023).

Najbardziej zróżnicowaną grupą w układach oczyszczania ścieków są bakterie denitryfikacyjne. Geny związane z tym procesem obecne są u bakterii reprezentujących wiele różnych rodzajów, np. *Pseudomonas* (Zhang i in., 2022a), *Bacillus* (Zhang i in., 2022b), *Flavobacterium* (Abdelhamed i in., 2021) czy *Paracoccus* (Zhang i in., 2023). Pierwszym etapem jest redukcja azotanów do azotynów katalizowana przez reduktazę azotanową. Enzym ten może być związany z błoną (kodowany jest wtedy przez geny operonu *narGHJ*) lub występować w przestrzeni peryplazmatycznej (kodowany jest wtedy przez geny operonu *napABC*) (Kandeler i in., 2006). Kolejny etap, redukcja azotynów do tlenku azotu, katalizowana jest przez dwa różne typy reduktaz azotynowych. Cytochrom cd1 kodowany przez gen *nirS*, natomiast drugi typ reduktazy azotynowej, zawierający atom Cu, kodowany jest przez gen *nirK* (Wittorf i in., 2018). Tlenek azotu ulega redukcji do podtlenku azotu w reakcji katalizowanej przez reduktazę tlenku azotu kodowaną przez *norBC* (Harland i in., 2023). Redukcja podtlenku azotu jest ostatnim etapem w szlaku denitryfikacji i jest katalizowana przez reduktazę podtlenku azotu kodowaną przez gen *nosZ* (Intrator i in., 2024). Nie wszystkie denitryfikatory posiadają pełen zestaw enzymów umożliwiających przeprowadzenie całego szlaku denitryfikacji. Wiele z nich przeprowadza jedynie fragmenty całej ścieżki. W związku z tym proces nitryfikacji często wymaga współpracy między różnymi rodzajami bakterii. Przebieg prawidłowego procesu denitryfikacji w układach oczyszczania zależy przede wszystkim od takich czynników jak obecność azotanów, niskie stężenie DO (poniżej 0,5 g/m³) oraz źródło węgla organicznego.

W ostatnich latach na coraz szerszą skalę prowadzi się badania nad możliwościami stosowania anammox jako alternatywny dla klasycznego procesu nitryfikacji-denitryfikacji. Proces anammox mógłby zredukować koszty procesu oczyszczania ścieków, gdyż nie wymaga tak intensywnego napowietrzania ani zewnętrznego źródła węgla. Wszystkie poznane bakterie anammox znajdują się w obrębie typu Planctomycetota i zalicza się do nich rodzaje *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Jettenia*, *Candidatus Scalindua*, *Candidatus Anammoximicrobium*, *Candidatus Anammoxoglobus* and *Candidatus Bathyanammoxibiaceae* (Liao i in., 2022). Komórki bakterii anammox zawierają wyjątkowe otoczone błoną organellum zwane anammoksosomem, w którym zachodzi proces anammox (van Teeseling i in., 2013). Przemiany związków azotowych u bakterii są złożone anammox i można podzielić na kilka etapów katalizowanych przez różne

enzymy: redukcja azotynów do tlenku azotu przez NirS, redukcja tlenku azotu do hydroksyloaminy przez HZS (syntaza hydrazyny), katalityczna konwersja hydroksyloaminy i amoniaku do hydrazyny przez HZS, wychwytywanie hydrazyny przez specyficzne nośniki białkowe, transport do HDH (dehydrogenaza hydrazynowa) i utlenianie do N₂ (Jiang i in., 2024). Prowadzone są między innymi badania nad procesem polegającym na połączeniu częściowej nitryfikacji i beztlenowego utleniania amoniaku (partial nitrification/anammox, PN/A). Skuteczny proces PN/A zależy od obecności AOB i bakterii anammox (Wu i in., 2023). Jednak bakterie anammox wykazują bardzo wolne tempo wzrostu i są wrażliwe na warunki środowiskowe, zwłaszcza temperaturę. Przyjmuje się, że ich optimum temperaturowe mieści się w zakresie między 30 °C a 37 °C (Peng i in., 2023). Ponadto proces PN/A może być zaburzony przez nadmierny wzrost NOB, które mogą konkurować z bakteriami anammox o azotyny (Xiang i in., 2021).

1.3.Sekwencjonowanie nowej generacji

Rozwój technologii sekwencjonowania nowej generacji znacznie ułatwił badanie złożonych społeczności bakterii. Szczególnie przydatne podejście opiera się na analizie DNA pochodzącego bezpośrednio ze środowiska, tj. DNA metagenomowego. Sekwencjonowanie całego metagenomu generuje ogromną ilość informacji na temat całej społeczności mikroorganizmów i pozwala określić jej skład taksonomiczny. Do profilowania mikrobiomów stosuje się najczęściej podejście wykorzystujące sekwencjonowanie genów markerowych, np. 16S rRNA lub sekwencjonowanie całego metagenomu metodą „shotgun” (Durazzi i in., 2021). W przypadku sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA ustalenie składu taksonomicznego badanego środowiska odbywa się poprzez amplifikowanie i sekwencjonowanie regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA. Sekwencjonowanie metagenomu metodą „shotgun” polega natomiast na losowej fragmentacji metagenomu i sekwencjonowaniu poszczególnych fragmentów. Dane uzyskane w ten sposób są następnie składane przy użyciu narzędzi bioinformatycznych. Oba te podejścia mają zarówno szereg zalet jak i ograniczeń. Sekwencjonowanie regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA jest tańsze, a uzyskane dane są stosunkowo łatwe do analizy, z uwagi na dużą dostępność narzędzi bioinformatycznych i baz referencyjnych. Jednakże ta metoda dostarcza jedynie informacji o charakterze taksonomicznym oraz ma ograniczoną rozdzielczość, pozwalając zazwyczaj na identyfikację bakterii na poziomie najniżej rodzaju (Abellan-Schneyder i in., 2021; Johnson i in., 2019). Z drugiej strony sekwencjonowanie typu

„shotgun” pozwala na określenie potencjału funkcjonalnego badanej społeczności mikroorganizmów oraz ma większą rozdzielczość, ale jego koszt jest większy, a z uwagi na ogromną ilość generowanych danych ich analiza jest trudniejsza (Han i in., 2020; Toole i in., 2021). Badania mikrobiomów coraz częściej wzbogaca się również o inne podejścia metaomiczne, co pozwala na bardziej kompleksowe spojrzenie na procesy biologiczne w nich zachodzące (Herold i in., 2020). Przykładowo wykorzystanie metatranskryptomiki dostarcza informacji o wszystkich aktywnych genach i umożliwia stworzenie profilu funkcjonalnego badanej społeczności mikroorganizmów. Sekwencjonowanie metatranskryptomu jest podejściem stosunkowo nowym, a analiza uzyskanych danych jest trudna, w związku z czym nie jest wykorzystywana tak często jak analizy oparte na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA czy metagenomu. Jednak dużą przewagą tego podejścia jest możliwość analizy aktywnych a nie tylko potencjalnych szlaków metabolicznych. Ponadto metatranskryptomika daje możliwość badania reakcji mikroorganizmów na zmiany czynników środowiskowych. Pozwala to określić kluczowe funkcje konsorcjum mikroorganizmów w danych warunkach oraz jak te funkcje zmieniają się pod wpływem czynników stresowych.

1.4. Sieci społeczne w badaniach mikrobiologicznych

Dzięki postępowi w technologiach sekwencjonowania kwasów nukleinowych i rozwojowi narzędzi metaomicznych wiedza na temat składu gatunkowego oraz procesów zachodzących w różnych społecznościach mikroorganizmów znacznie wzrosła. Ponadto ogromna ilość danych uzyskanych dzięki technikom metaomicznym może być użyta do dalszego badania dynamiki populacji oraz zależności ekologicznych łączących członków złożonych zespołów mikroorganizmów. Jedną z metod badania społeczności mikrobiologicznych jest tworzenie sieci społecznych (social network analysis - SNA). Taki rodzaj analizy wykorzystywany jest w badaniach socjologicznych, a od niedawna znajduje też zastosowanie w badaniach dotyczących ekologii mikroorganizmów. W obu tych odległych dyscyplinach sieci są wykorzystywane w tym samym celu – pozwalają na całościowe spojrzenie na badane społeczności oraz mogą ujawniać potencjalne wzorce interakcji między ich członkami (Li i in., 2021). Opisywanie i analizowanie powiązań między mikroorganizmami jest trudne i wymaga odpowiednich metod. Pierwszym krokiem jest zawsze uzyskanie danych na temat składu i liczebności poszczególnych taksonów, które składają się na badaną społeczność. Społeczności mikroorganizmów można monitorować za pomocą kilku technik, w tym cytometrii przepływowej,

mikromacierzy, sekwencjonowania genów kodujących rRNA i uzyskiwania kompletnych metagenomów (Faust i Raes, 2012). Na podstawie danych uzyskanych w ten sposób można przewidzieć relacje między mikroorganizmami, zakładając, że silnie nielosowe wzorce dystrybucji wynikają z przyczyn ekologicznych (Poudel i in., 2016).

Podstawowym elementem sieci są węzły, które w sieciach mikrobiologicznych, w zależności od zastosowanej metodyki, mogą symbolizować np. grupę taksonomiczną (np. rodzinę, rodzaj), OTU (operational taxonomic unit), ASV (amplicon sequence variants), MAG (metagenome assembled genome) (Abdulkadir i in., 2024; Azli i in., 2022; Begmatov i in., 2022). W zależności od charakteru eksperymentu oraz ewentualnych dodatkowych analiz, węzły mogą również symbolizować np. geny, białka, a także różne parametry środowiskowe, takie jak pH, temperatura, stężenia różnych związków (Jiang i in., 2019). Gdy między dwoma węzłami istnieje statystycznie istotna relacja, są one połączone łącznikiem określanym jako krawędź. Sieci mikrobiologiczne najczęściej konstruowane są w oparciu o wyniki analizy korelacji występowania rodzajów bakteryjnych, dlatego są często określane mianem sieci współwystępowania (Liu i in., 2023). W zależności od rodzaju analizowanych danych stosuje się różne statystyczne miary korelacji, takie jak współczynnik Pearsona, Spearmana czy Bray’a-Curtis’a (Weiss i in., 2016).

Krawędziom można przypisać wagi, aby zilustrować siłę obserwowanej relacji. Wagą krawędzi może być wartość współczynnika korelacji (Guseva i in., 2022). Sieci można podzielić na skierowane i nieskierowane. W sieciach skierowanych istniejące relacje można opisać w kategoriach źródła i celu, a końce krawędzi opatrzone są strzałkami obrazującymi kierunek interakcji. W przeciwieństwie do sieci skierowanych, w sieciach nieskierowanych możliwe jest jedynie stwierdzenie wystąpienia określonej relacji między dwoma węzłami, bez określenia związku przyczynowo skutkowego. W takim wypadku krawędź jest linią łączącą dwa węzły. Możliwe są też sieci mieszane, w których obecne są oba typy krawędzi (Oña i in., 2025). Konstrukcja sieci w oparciu o analizę korelacji jest często stosowana ze względu na swoją prostotę, ale wiąże się to z pewnymi ograniczeniami, takimi jak np. fakt, że krawędzie w tych sieciach mają zawsze charakter nieskierowany (Dohlman i Shen, 2019).

Statystyczna analiza tych dwóch podstawowych składowych sieci - węzłów i krawędzi - pozwala wytypować potencjalnie najistotniejszych członków społeczności. W

przypadku sieci mikrobiologicznych mogą to być bakterie zapoczątkowujące szlaki przemian różnych związków, będące producentami substratów dla innych grup bakterii. W SNA do lokalizacji takich kluczowych węzłów sieci wykorzystuje się miary centralności węzłów, które obliczane są w oparciu o krawędzie (Zamkovaya i in., 2021). Istnieje wiele różnych miar centralności węzłów, jednak w sieciach współwystępowania najczęściej wykorzystywane są dwa: stopień węzła (ang. degree) oraz stopień pośredniości (ang. betweenness centrality) (Kajihara i Hynson, 2024). Stopień węzła to liczba bezpośrednich połączeń między jednym węzłem a innymi węzłami. Jeżeli dane wyjściowe pozwalają na utworzenie sieci skierowanej można określać stopnie wejściowe (liczbę krawędzi wchodzących do węzła) oraz stopnie wyjściowe (liczbę krawędzi wychodzących z węzła) (Sierocki, 2020; Röttjers i Faust, 2018). Stopień pośredniości to parametr, który wskazuje jak często dany węzeł znajduje się na drodze najkrótszych połączeń pomiędzy wszystkimi możliwymi parami węzłów w sieci (Kajihara i Hynson, 2024). W teorii SNA węzły charakteryzujące się wysokim stopniem pośredniości są często określane jako „gatekeepers” i są kluczowe dla przepływu informacji lub zasobów w sieci. Węzły te często stanowią mosty łączące subpopulacje sieci, a ich usunięcie może poważnie zakłócić łączność i strukturę sieci, prowadząc nawet do jej zerwania (Guo i in., 2022).

W oparciu o charakterystykę krawędzi łączących węzły, złożone sieci mikrobiologiczne mogą być podzielone na mniejsze podgrupy nazywane najczęściej modułami lub klastrami. Węzły wchodzące w skład tego samego modułu mogą być ze sobą połączone zarówno bezpośrednio jak i pośrednio. Algorytmy zaimplementowane w programach do analizy sieci wyznaczają moduły w oparciu o gęstość i wagę połączeń między węzłami (Liu i in., 2023). Moduł tworzony jest przez grupę węzłów, pomiędzy którymi występuje silne zagęszczenie połączeń, a jednocześnie są słabiej połączone z węzłami nie wchodzącymi w skład tego modułu. Każdy węzeł może należeć tylko do jednego modułu. Parametr określający jak silnie sieć jest podzielona na moduły nazywany jest modularnością. W sieciach mikrobiologicznych bakterie w obrębie tych samych modułów mogą wykazywać silne interakcje i wspólne funkcje oraz wskazywać na określone role ekologiczne lub szlaki metaboliczne (Du i in., 2022).

Sieci mogą być używane do określania interakcji między poszczególnymi członkami społeczności, między sub-społecznościami oraz między członkami społeczności a warunkami środowiskowymi (Guo i in., 2022). Wizualizacja i analiza sieci

umożliwiają określenie w badanych społecznościach grup kluczowych, potencjalnie współzależnych lub tych, które potencjalnie konkurują ze sobą. Implementacja metod analizy sieci społecznych w badaniach mikrobiologicznych pozwoliła na bardziej holistyczne podejście do badania zbiorowisk mikroorganizmów. Jednakże interpretacja sieci mikrobiologicznych jest znacznie bardziej skomplikowana niż sieci makroekosystemów, z uwagi na trudność w obserwacji interakcji między poszczególnymi mikroorganizmami w środowisku naturalnym, a także ogromną złożoność i różnorodność gatunkową mikroekosystemów (Goberna i Verdú, 2022). Z tego powodu sieci obrazujące mikrobiomy opierają się na współwystępowaniu mikroorganizmów, co narzuca szereg ograniczeń w interpretacji znaczenia krawędzi łączących węzły. Sieci współwystępowania nie dostarczają informacji o charakterze relacji istniejących między połączonymi grupami. Przykładowo powiązanie między grupami mikroorganizmów może wynikać z podobnego reagowania na stresowy czynnik środowiskowy, nakładanie się nisz ekologicznych albo występujące między mikroorganizmami interakcje ekologiczne, takie jak wymiana metabolitów bądź konkurencja o substraty pokarmowe (Barroso-Bergadà i in., 2021).

Podsumowując, ekologiczne relacje między mikroorganizmami w systemach oczyszczania ścieków i wody są złożone i podlegają wpływom wielu czynników. Dlatego sieci współwystępowania mogą posłużyć jako cenne narzędzia do modelowania potencjalnych interakcji między mikroorganizmami, ale interpretacja zaobserwowanych powiązań wymaga dogłębniejszej analizy całego środowiska. Rozwój metod mapowania sieci ekologicznych społeczności mikrobiologicznych może pomóc w przewidywaniu skutków zmian i zaburzeń w ekosystemach, a także umożliwić projektowanie i manipulowanie złożonymi społecznościami mikrobiologicznymi.

2. Cel i zakres badań

Celem badań było określenie możliwości zastosowania analizy sieci współwystępowania mikroorganizmów do badania zależności ekologicznych i powiązań pomiędzy bakteriami przekształcającymi związki azotowe w bioreaktorach wykorzystywanych do oczyszczania wody i ścieków. Badania prowadzono w reaktorach zróżnicowanych pod względem ich zastosowania, typu biomasy i zastosowanych parametrów, co determinowało rodzaj zachodzących procesów przemiany związków azotowych.

Zakres badań obejmował:

1. Ekstrakcję kwasów nukleinowych i ich analizę ilościową i jakościową.
2. Analizę strukturalną i funkcjonalną uzyskanych sekwencji nukleotydowych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych.
3. Charakterystykę taksonomiczną i funkcjonalną zbiorowisk bakteryjnych.
4. Charakterystykę zależności występujących pomiędzy mikroorganizmami w oparciu o analizę sieci współwystępowania.

3. Hipotezy badawcze

W rozprawie doktorskiej weryfikowano poniższe hipotezy badawcze:

H1.: Błona biologiczna (biofilm) jest bardziej zróżnicowana pod względem składu bakterii niż osad czynny, co znajduje odzwierciedlenie w strukturze sieci.

H2.: Stężenie związków azotowych wpływa na skład populacji nitryfikatorów.

H3.: Dostępność substratów pokarmowych wpływa na zależności ekologiczne między mikroorganizmami.

H4.: W procesach oczyszczania wody i ścieków bakterie nitryfikacyjne stanowią kluczowe węzły sieci.

H5.: Sieciowanie pozwala uzyskać unikalne informacje o interakcjach między członkami społeczności bakteryjnych.

4. Materiały i metody

Część badawcza pracy doktorskiej obejmowała analizę zespołów mikroorganizmów w czterech bioreaktorach. Dwa z nich stanowiły reaktory SBR zasilane ściekami syntetycznymi, które opisano dokładnie w publikacjach **P1.** i **P2.** W kolejnych dwóch publikacjach, **P3.** i **P4.**, badano bakterie mikrobiomu biofiltrów oczyszczających wodę w recyrkulacyjnych systemach hodowli ryb.

4.1. Opis systemów źródłowych badanych mikrobiomów

Reaktory SBR zasilane ściekami syntetycznymi

P1. Reaktor IFAS-MBSBBR Zakładu Zaopatrzenia w Wodę i Odprowadzania Ścieków Politechniki Warszawskiej

Pierwsze z przeprowadzonych badań dotyczyło mikrobiomu rozwijającego się w postaci osadu czynnego i biofilmu w reaktorze hybrydowym ze złożem ruchomym IFAS-MBSBBR (Integrated Fixed-Film Activated Sludge-Moving-Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor). Reaktor miał objętość 28 l i zawierał nośniki z tworzywa sztucznego EvU Pearl[®], na których rozwijał się biofilm. Nośniki cylindryczne o wymiarach $\Phi 5$ mm, $h = 8$ mm i powierzchni właściwej $600 \text{ m}^2/\text{m}^3$ stanowiły 25% objętości czynnej reaktora. Stężenie osadu czynnego utrzymywano na poziomie około $1,7 \text{ g MLSS/l}$. Działanie IFAS-MBSBBR było w pełni zautomatyzowane i kontrolowane za pomocą oprogramowania DreamSpark Premium (system SCADA).

Do reaktora doprowadzano ścieki syntetyczne, symulujące skład ścieków komunalnych. Przyjęto następujące parametry ścieków: ChZT $510 \text{ mg O}_2/\text{l}$, TN 60 mg N/l , $40 \text{ mg NH}_4^+-\text{N/l}$, $8 \text{ mg PO}_4^{3-}-\text{P/l}$, pH 7,7.

Reaktor pracował w systemie 3 ośmiogodzinnych cykli na dobę. Pojedynczy cykl oczyszczania obejmował następujące fazy: I faza bez napowietrzania z dozowaniem ścieków (50 min), I faza tlenowa (190 min), II faza bez napowietrzania z dozowaniem ścieków (30 min), II faza tlenowa (150 min), sedymentacja (50 min), dekantacja (10 min). Eksperyment prowadzono przez 573 dni, podczas których zmieniano strategię napowietrzania oraz stężenie tlenu. Podczas pierwszych 42 dni eksperymentu prowadzono napowietrzanie ciągłe, a stężenie tlenu wynosiło $3 \text{ mg O}_2/\text{l}$. W kolejnych etapach prowadzono napowietrzanie naprzemienne w fazach tlenowych, stopniowo zmniejszając stężenie tlenu oraz skracając długość napowietrzania.

P2. Reaktor SBR Katedry Inżynierii Sanitarnej Politechniki Gdańskiej

W kolejnym etapie pobierano biomasę z reaktora, w którym prowadzono proces deamonifikacji w różnych warunkach temperaturowych. Temperaturę procesu stopniowo obniżano, a każdą z zadanych temperatur utrzymywano aż do ustabilizowania procesu, co weryfikowano na podstawie szybkości zużycia azotu amonowego $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (AUR), szybkości przyrostu azotu azotanowego $\text{NO}_3\text{-N}$ (NPR), szybkości przyrostu azotu azotynowego $\text{NO}_2\text{-N}$ (NiPR) oraz szybkości zużycia azotu azotynowego $\text{NO}_2\text{-N}$ (NiUR). Eksperyment prowadzono w sumie przez 118 dni, w coraz niższych temperaturach: 30 °C (20 dni), 25 °C (23 dni), 20 °C (21 dni), 15 °C (35 dni), and 12 °C (19 dni). Próbki biomasy do analiz mikrobiologicznych pobierano tydzień po przejściu na nową temperaturę.

Reaktor miał objętość 10 l i zaszczerpiony został inokulum wzbogaconym w bakterie anammox, pochodzącym z bocznego ciągu miejskiej oczyszczalni ścieków w Słupsku. Do reaktora doprowadzano nieorganiczne ścieki syntetyczne o składzie zgodnym z rekomendowanym przez Dapena-Mora i in. i wzbogacanych amoniakiem (500 mg N/l). Wartość pH utrzymywano pomiędzy 7,5 a 7,8 poprzez dodawanie 1 M HCl. Całkowity ładunek azotu (TNL) wahał się od 0,1 do 1,5 gN/Ld, w zależności od aktywności i temperatury w reaktorze. Pojedynczy cykl operacyjny trwał 6 godzin składał się z czterech etapów: napełniania (20 min), reakcji (300 min), sedimentacji (20 min) i dekantacji (20 min).

Przenośne biofiltry kanistrowe Katedry Ichtiologii i Akwakultury Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

P3. Recyrkulacyjny system wykorzystywany do chowu trawianek

Wszystkie próbki pobrano z filtra kanistrowego EHEIM professional 3 (model 1200XLT) o pojemności 13,5 l. Biofiltr zawierał trzy rodzaje materiału filtracyjnego. Dolna część wypełniona była kulistymi kształtkami wykonanymi z PCV o średnicy około 1,5 cm i powierzchni z licznymi kanalikami. Środkowa część filtra wypełniona była pustymi w środku ceramicznymi cylindrami, natomiast górna część porowatą gąbką. Woda z akwarium była pompowana do dolnej części filtra, a oczyszczona woda była odprowadzana z górnej części filtra z powrotem do akwarium.

Filtr oczyszczał wodę pochodzącą ze szklanego zbiornika o objętości 0,35 m³, w którym hodowano 50 osobników *Percottus glenii* (Dybowski, 1877) o średniej masie 17,0 ± 5,7 g. Ryby karmiono co trzeci dzień komercyjną karmą (Aller Aqua Ltd., Christiansfeld, Dania) w ilości około 2 % całkowitej biomasy ryb. Temperatura wody w systemie wynosiła 19,3 ± 0,2 °C, a stężenie rozpuszczonego tlenu 8,98 ± 0,06 mg/l. Odczyn pH wody był stabilny, ze średnią wartością 7,8 ± 0,1.

Próbki biomasy do badań mikrobiologicznych pobierano dzień przed oraz dzień po karmieniu ryb. Równocześnie pobierano próbki wody z dopływu i odpływu do badań stężeń związków azotu. Próbki pobrano w dwóch powtórzeniach, z dwutygodniowym odstępem czasowym.

P4. Recyrkulacyjny system wykorzystywany do chowu karpia i jesiotrów

Biofiltr używany w tym systemie hodowli oraz sposób pobierania prób do badań były analogiczne z tymi opisanymi w publikacji **P3**.

Filtr oczyszczał wodę pochodzącą ze zbiornika o objętości 1,05 m³ wykonanego z laminatu poliestrowo-szklanego, w którym hodowano dwa gatunki ryb: 12 osobników jesiotra syberyjskiego *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) i 35 osobników karpia pospolitego *Cyprinus carpio* L. (średnia wielkość odpowiednio 320 ± 75 g i 180 ± 35 g). Ryby karmiono co trzeci dzień komercyjną karmą (Aller Aqua Ltd.) w ilości około 2 % masy obsady ryb. Temperatura wody w testowanym systemie wynosiła 18,7 ± 0,2 °C, a stężenie rozpuszczonego tlenu 8,7 ± 0,3 mg/l. Odczyn pH wody był stabilny, osiągając średnią wartość 7,8 ± 0,1.

4.2. Ekstrakcja kwasów nukleinowych

Wszystkie próbki biomasy zamrażano natychmiast po pobraniu i przechowywano w temperaturze -20 °C do momentu izolacji kwasów nukleinowych. Ponadto próbki RNA natychmiast po pobraniu zawieszano w roztworze fenolu i soli chaotropowych w celu inaktywacji RNAz i zapobiegnięciu degradacji transkryptów. Przed procedurą ekstrakcji próbki rozmrażano i odwirowywano w celu usunięcia nadmiaru płynów. Ekstrakcje prowadzono zgodnie z instrukcjami producentów zestawów. DNA izolowano przy użyciu zestawu FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Bio, Solon, OH, USA). RNA izolowano przy użyciu zestawu Total RNA Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) Stężenie wyizolowanych kwasów nukleinowych mierzono fluorymetrem Qubit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) przy użyciu zestawów Qubit™ Broad Range Quantification Assay

Kits (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Jakość wyizolowanych kwasów nukleinowych przeznaczonych do sekwencjonowania typu „shotgun” mierzono przy użyciu aparatu 2100 Bioanalyzer 6000 Nano Assay System (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA).

4.3. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji

Sekwencjonowanie kwasów nukleinowych technologią Illumina zlecono specjalistycznym przedsiębiorstwom.

W **P1**. zastosowano masowe sekwencjonowanie regionów hiperzmiennych V3 – V4 genu 16S rRNA. Surowe odczyty były następnie procedowane z wykorzystaniem pakietu QIIME II. Analizy bioinformatyczne obejmowały skalanie odczytów, odfiltrowanie odczytów niskiej jakości, detekcję i usunięcie chimer, klastrowanie sekwencji i konstrukcję OTU, anotację taksonomiczną.

W kolejnych etapach zastosowano sekwencjonowanie losowych fragmentów DNA/RNA („shotgun” sequencing). Analizy bioinformatyczne surowych odczytów obejmowały kontrolę jakości uzyskanych odczytów, składanie odczytów *de novo*, anotację taksonomiczną, identyfikację sekwencji genów kodujących enzymy związane z przemianami związków azotu, mapowanie odczytów RNA do zidentyfikowanych genów oraz oszacowanie poziomów ekspresji w oparciu o wyniki mapowania.

Szczegółowy opis wykonanych procedur bioinformatycznych oraz użytych do tego celu narzędzi został przedstawiony w sekcji Materiały i metody każdej publikacji z cyklu.

4.4. Konstrukcja sieci współwystępowania

Sieć współwystępowania poszczególnych rodzajów bakterii skonstruowano na podstawie analizy korelacji. Do analizy wybrano rodzaje, które w badanych metagenomach były najliczniejsze. Korelację rang Spearmana obliczano przy użyciu programu Statistica (wersja 13.1, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Otrzymane macierze korelacji wykorzystano do konstrukcji sieci za pomocą oprogramowania Gephi (wersja 0.10.1), w którym obliczono także podstawowe statystyki sieci. Sieci wykreślono tylko dla silnie skorelowanych taksonów, zdefiniowanych jako te ze współczynnikami korelacji $\geq 0,75$ lub $\leq -0,75$.

5. Wyniki

P1. Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Ciesielski S. Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12, 12558 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>

W wyniku analizy danych uzyskanych z sekwencjonowania amplikonów genu 16S rRNA, w reaktorze IFAS-MBSBBR zidentyfikowano łącznie 26 typów i 783 rodzajów bakterii. Zarówno w biofilmie, jak i w osadzie czynnym, najliczniejszymi typami były *Pseudomonadota*, ze średnią liczebnością odpowiednio $39,3 \% \pm 9,0 \%$ i $40,8 \% \pm 8,2 \%$, oraz *Bacteroidota*, ze średnią liczebnością odpowiednio $14,2 \% \pm 4,9 \%$ i $26,1 \% \pm 13,7 \%$. Ponadto biofilm charakteryzował się istotnie statystycznie (test White'a, $p \leq 0,05$) większą liczebnością *Chlorofexi*, *Acidobacteriota* i *Nitrospirota*, natomiast osad czynny większą liczebnością *Firmicutes*. Taki skład bakteryjny jest typowy dla reaktorów zasilanych ściekami komunalnymi.

W obu środowiskach liczebność różnych grup bakterii zmieniała się w czasie, pod wpływem zmian w sposobie natleniania. W biofilmie, wraz ze spadającym stężeniem tlenu oraz skracaniem fazy natleniania stopniowo spadała liczebność *Pseudomonadota* i *Actinomycetota*, podczas gdy liczebność *Chlorofexi* wzrastała. W osadzie czynnym zmiany liczebności były większe i bardziej gwałtowne. W największym stopniu wahała się liczebność *Bacteroidota*, *Patescibacteria* oraz *Armatimonadota*.

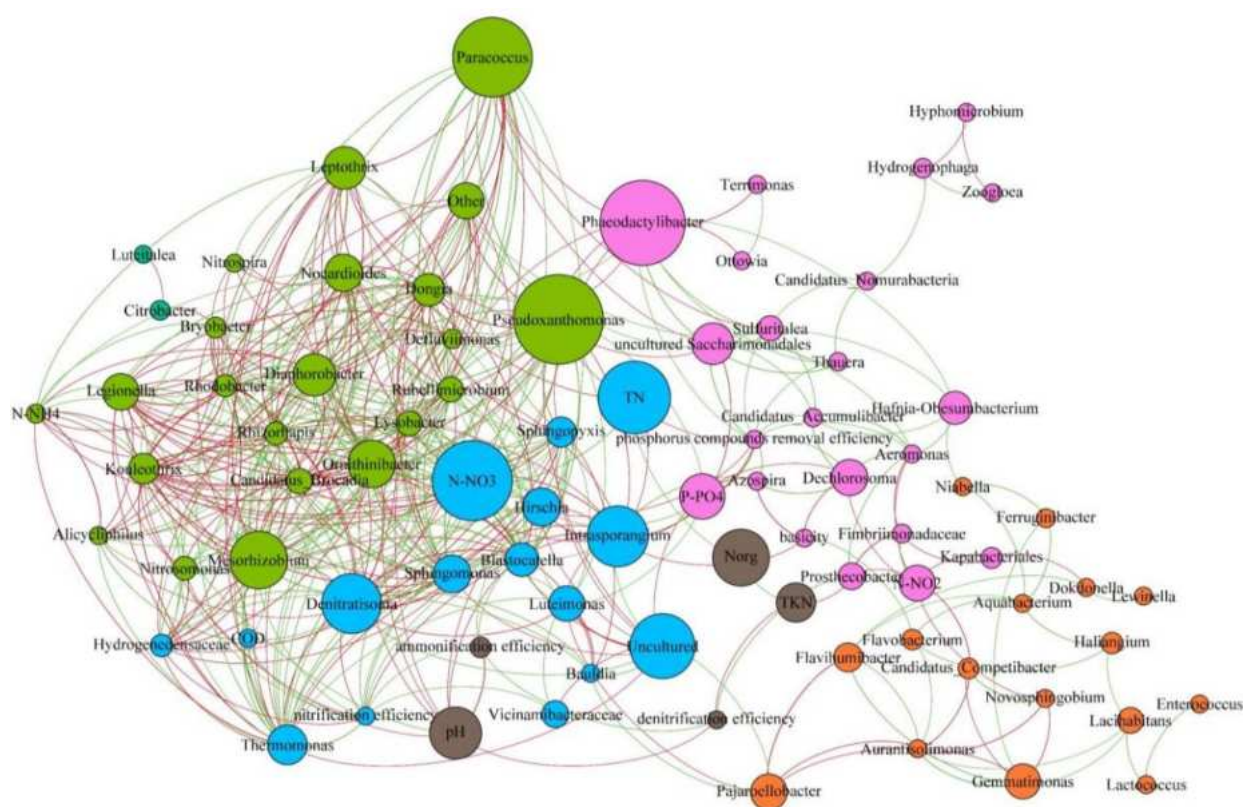
Na poziomie rodzaju *Denitratisoma*, *Nitrospira*, *Candidatus Competibacter*, *Dechlorosoma*, *Candidatus Accumulibacter* i *Kouleothrix* były istotnie liczniejsze w biofilmie, podczas gdy *Zooglea*, niezidentyfikowany rodzaj należący do *Saccharimonadales*, *Rhodobacter* i *Ottowia* były istotnie liczniejsze w osadzie czynnym (test White'a, $p \leq 0,05$). Generalnie duży udział w populacji bakteryjnej miały mniej liczne rodzaje (o liczebności $< 1,5 \%$). Ich sumaryczny udział wynosił $45,6 \% \pm 5,8 \%$ w próbkach biofilmu i $30,5 \% \pm 6,0 \%$ w osadzie czynnym.

Biofilm charakteryzował się także istotnie większą różnorodnością mikrobiologiczną wyrażoną ilością specyficznych OTU (1614 ± 141) oraz indeksami Chao1 (1735 ± 139) oraz Shannon ($5,34 \pm 0,23$), w porównaniu z osadem czynnym (OTU – 876 ± 361 , Chao1 – 1105 ± 109 , Shannon – $4,27 \pm 0,41$) (test Wilcoxona, $p \leq 0,05$).

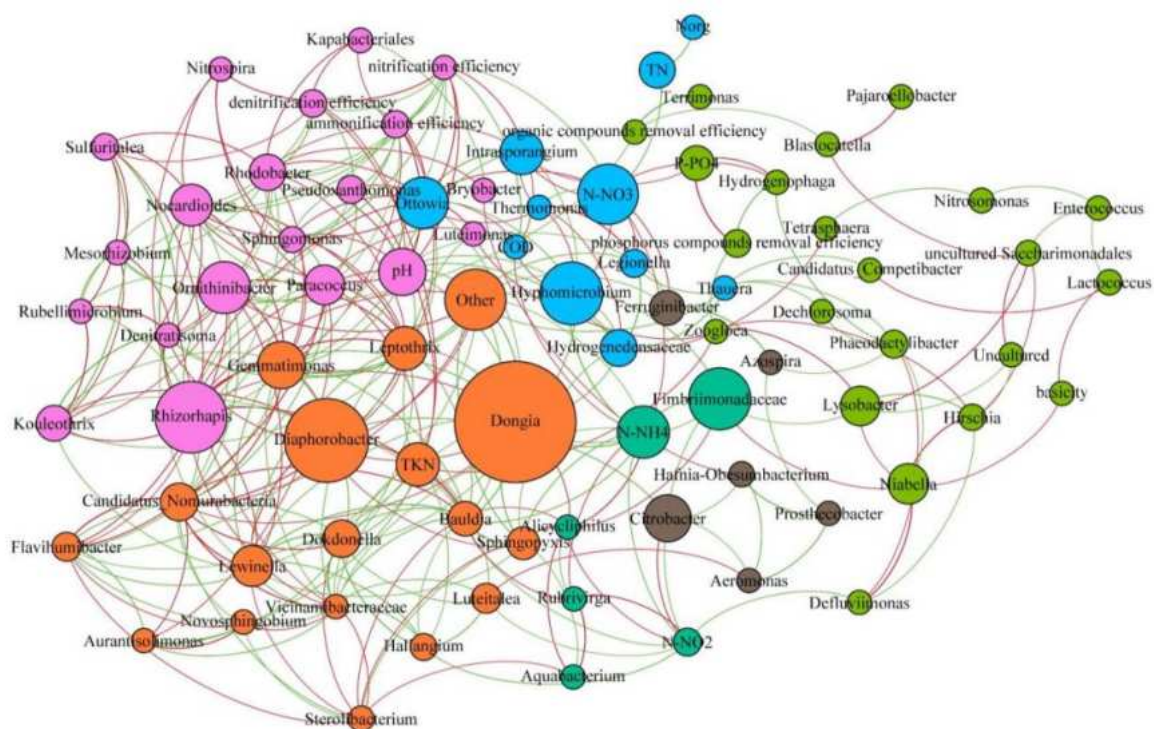
Zmiany sposobu napowietrzania i stężenia tlenu powodowały zmiany w populacji bakteryjnej zarówno biofilmu jak i osadu czynnego. Liczebność poszczególnych rodzajów zmieniała się gwałtowniej w osadzie czynnym niż w biofilmie, co obrazują szybkie spadki i wzrosty liczebności wielu grup bakterii w kolejnych okresach. Gwałtowniejsze zmiany liczebności różnych grup bakterii w osadzie czynnym, wskazują że ta forma biomasy jest mniej odporna na zmienne czynniki środowiskowe niż biofilm. Odporność biofilmu może być wynikiem jego zwartej struktury, utworzonej z komórek otoczonych warstwą pozakomórkowych substancji polimerowych (EPS), która działa jak fizyczna bariera chroniąca komórki bakteryjne przed stresem środowiskowym.

Skonstruowano dwie sieci współwystępowania bakterii obrazujące społeczność bakteryjną biofilmu (Rys. 1) i osadu czynnego (Rys. 2). Obie sieci miały taką samą liczbę węzłów (83), ale sieć biofilmu miała więcej krawędzi, co może świadczyć, o większej ilości zależności ekologicznych między bakteriami biofilmu niż osadu czynnego. W sieci biofilmu znajdowały się cztery węzły o wysokim stopniu (≥ 30), a więc mające liczne bezpośrednie powiązania z innymi węzłami sieci: *Diaphorobacter*, *Rhizorapis*, *Mesorhizobium* i *Pseudoxanthomonas*. Stopień węzła *Nitrosomonas* był nieco niższy (15), ale wciąż był to jeden z węzłów o największej liczbie połączeń. Stopień węzła *Nitrospira* był na poziomie średniej wartości stopnia wszystkich węzłów sieci, wynoszącej 6. Średni stopień węzłów w sieci osadu czynnego był niższy, a największą liczbę połączeń (≥ 20) miały 4 z nich: *Nocardioides*, *Gemmatimonas*, *Leptothrix* i *Rhizorhapis*. Interesującym jest fakt, że rodzaje o największej liczbie połączeń nie odznaczały się najwyższą liczebnością. W sieci biofilmu *Paracoccus*, *Phaeodactylibacter* i *Pseudoxanthomonas* miały najwyższe wartości centralności pośredniej, podczas gdy w sieci osadu czynnego najwyższe wartości tego parametru miały *Dongia*, *Diaphorobacter* i *Rhizorhapis*.

Do konstrukcji sieci wykorzystano również dane o wydajności usuwania związków organicznych i fosforowych, amonifikacji, nitrifikacji i denitrifikacji. Analiza sieci wykazała, że pozytywne powiązania między liczebnością bakterii a wydajnością usuwania związków azotu i fosforu były częstsze w społeczności biofilmu niż w społeczności osadu czynnego. Może to wskazywać, że biofilm jest lepszym środowiskiem dla wzrostu bakterii zdolnych do rozkładu tych związków. Hipotezę tę potwierdza również większy udział w biofilmie takich bakterii jak *Nitrospira*, *Nitrosomonas* czy *Candidatus Accumulibacter*.



Rysunek 1. Sieć współwystępowania mikroorganizmów biofilmu w reaktorze IFAS-MBSBBR, z węzłami reprezentującymi taksony na poziomie rodzaju lub efektywności usuwania zanieczyszczeń oraz krawędziami reprezentującymi korelacje (zielone krawędzie – korelacja dodatnia; czerwone krawędzie – korelacja ujemna). Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. (P1.; Godzieba i in., 2022).



Rysunek 2. Sieć współwystępowania mikroorganizmów osadu czynnego w reaktorze IFAS-MBSBBR, z węzłami reprezentującymi taksony na poziomie rodzaju lub efektywności usuwania zanieczyszczeń oraz krawędziami reprezentującymi korelacje (zielone krawędzie – korelacja dodatnia; czerwone krawędzie – korelacja ujemna). Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. (P1.; Godzieba i in., 2022).

P2. Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>

Do uzyskania danych o populacji bakteryjnej reaktora, wykorzystano sekwencjonowanie losowych fragmentów DNA (sekwencjonowanie „shotgun”), dzięki czemu możliwe było zbadanie nie tylko składu populacji ale również jej metabolicznego potencjału. Uzyskano w sumie 116 Gbp surowych odczytów, a ich obróbka bioinformatyczna pozwoliła zrekonstruować 105 MAGów, spełniających przyjęte wymagania jakościowe (kompletność $\geq 50\%$, zanieczyszczenie $\leq 10\%$). Najwięcej spośród zrekonstruowanych MAGów reprezentowało typy *Pseudomonadota*, *Chloroflexi* i *Bacteroidota*. Pod względem liczebności populacja bakteryjna zdominowana była przez typy *Pseudomonadota* ($47,7\% \pm 8,9\%$), *Chloroflexi* ($24,5\% \pm 2,6\%$), *Planctomycetota*

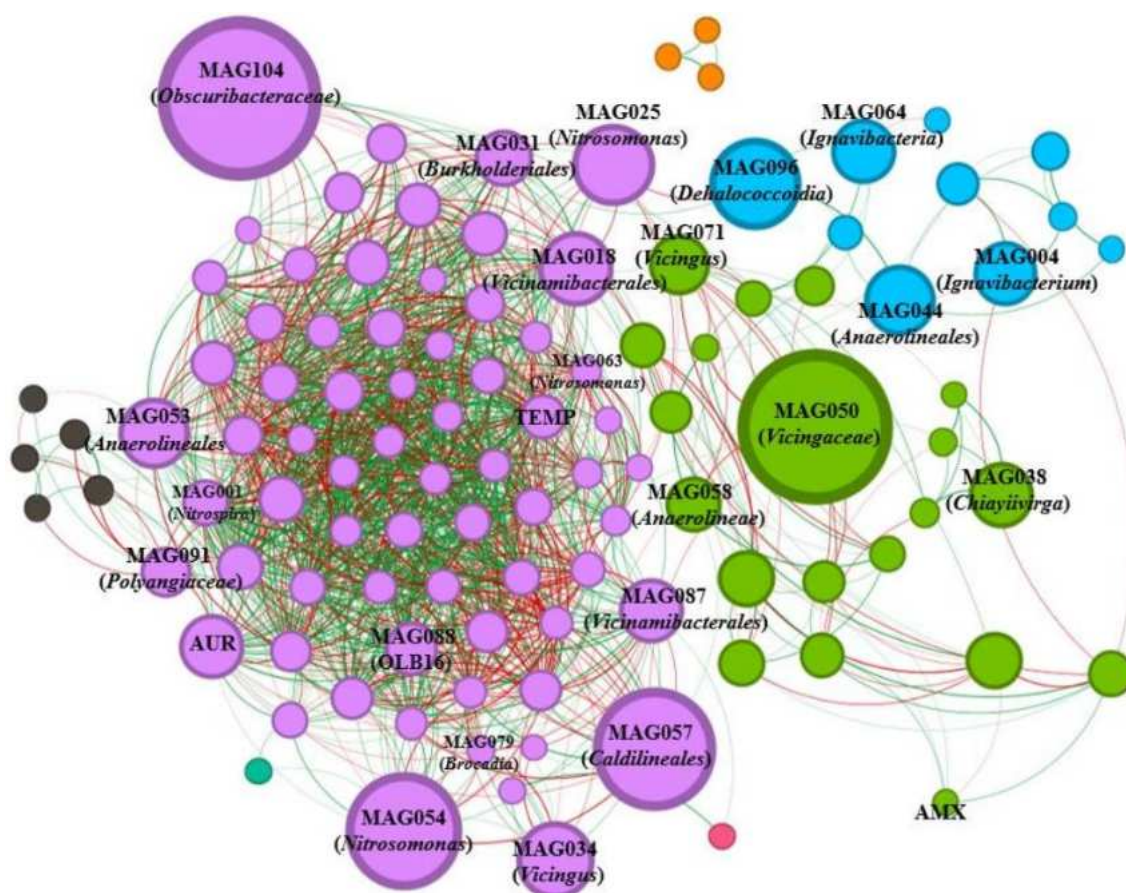
(7,5 % $\pm$ 3,1 %), *Bacteroidota* (6,0 % $\pm$ 4,5 %), *Nitrospirota* (5,4 % $\pm$ 2,9 %) i *Acidobacteriota* (2,4 % $\pm$ 1,6 %). Podobna populacja bakteryjna jest typowa dla tego typu procesów. Na początku eksperymentu nastąpiła szybka zmiana w proporcjach dominujących grup bakteryjnych, po czym nastąpiło ustalenie się równowagi między nimi. Największy spadek liczebności zaobserwowano w przypadku *Nitrospirota*, co może być efektem ograniczonej zdolności adaptacyjnej tych bakterii do niskich temperatur. Na poziomie rodzaju największą liczebność miały *Nitrosomonas* (20,6 % $\pm$ 7,5 %), *Dokdonella* (6,1 % $\pm$ 2,4 %), *Candidatus Brocadia* (4,7 % $\pm$ 3,2 %) i *Nitrospira* (4,6 % $\pm$ 2,4 %).

Dzięki zastosowaniu sekwencjonowania typu „shotgun”, możliwe było dokładniejsze zbadanie potencjału funkcjonalnego populacji bakteryjnej reaktora. Większość spośród zrekonstruowanych MAGów posiadała geny związane z procesem denitryfikacji (*nar*, *nap*, *nirK*, *nirS*, *nor*, *nos*). Proces nitryfikacji przeprowadzany był przez bakterie *Nitrosomonas* (4 MAGi) posiadające geny *amo* oraz *Nitrospira* (1 MAG) z genami *nxr*. Nie wykryto obecności bakterii *comammox Nitrospira*. Wykryto natomiast MAGi posiadające geny związane ze szlakiem DNRA – *nrfAH*, *nirBD*. Ponadto MAG079 (*Candidatus Brocadia*) zawierał geny związane z procesem anammox (*hzs*, *hdh*). Osad granulowany, obecny w reaktorze, jest dobrym środowiskiem dla rozwoju złożonych mikroekosystemów. Dyfuzja tlenu i substratów pokarmowych do wnętrza granuli jest ograniczona, dzięki czemu w różnych warstwach mogą rozwinać się bakterie o odmiennych preferencjach środowiskowych i przeprowadzających różne procesy. W najbardziej zewnętrznej warstwie granuli panują warunki tlenowe i zachodzi w niej proces nitryfikacji. W środkowej, anoksycznej, warstwie mogą rozwijać się denitryfikatory i bakterie DNRA, natomiast w wewnętrznej, beztlenowej, bakterie anammox. Takie mikrobiologiczne zróżnicowanie sprzyja wykształceniu wielu zależności ekologicznych między członkami społeczności. Typowym przykładem jest wykorzystywanie azotynów produkowanych przez AOB przez bakterie anammox. Z drugiej strony przykładem zależności konkurencyjnej, jest rywalizacja o azotany i organiczne związki węgla między denitryfikatorami a bakteriami DNRA. Jednak w tak różnorodnej populacji występują również bardziej złożone relacje. Przykładowo obecność bakterii DNRA może mieć zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ na proces anammox. Z jednej strony bakterie te redukują azotany do azotynów i amoniaku, które są substratami dla bakterii anammox. Z drugiej strony nadmierny wzrost bakterii

DNRA może doprowadzić do akumulacji azotynów i ostatecznie doprowadzić do zahamowania aktywności bakterii anammox. Bakterie DNRA i denitryfikatory są bakteriami heterotroficznymi, a źródłem niezbędnego dla nich węgla organicznego mogą być egzopolisacharydy produkowane przez inne bakterie.

Złożoność zależności ekologicznych w badanej populacji potwierdziła analiza sieci (Rys. 3). Sieć składała się ze 108 węzłów: 105 reprezentujących MAGi i 3 reprezentujących parametry technologiczne. Węzły były połączone 1496 krawędziami, tworząc gęstą sieć. Ponad połowa (57 %) połączeń była dodatnia. Zidentyfikowano siedem odrębnych modułów. Sieć była zdominowana przez jeden moduł, składający się z 68 węzłów (63% wszystkich węzłów sieci) i 1368 krawędzi (91% wszystkich krawędzi sieci). Moduł ten obejmował bakterie, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie związków azotowych: *Nitrosomonas*, *Nitrospira* i *Candidatus Brocadia*. Drugi co do wielkości moduł składał się z 20 węzłów (19 %) i 64 krawędzi (4 %). Pozostałe moduły były znacznie mniejsze, i obejmowały nie więcej niż 10 % spośród wszystkich węzłów i nie więcej niż 1 % spośród wszystkich krawędzi. Średni stopień węzłów w sieci wynosił 14. Węzeł reprezentujący temperaturę miał najwyższy stopień (58), co wskazuje na jej znaczący wpływ na liczebność wielu członków społeczności bakteryjnej. Wysokim stopniem charakteryzował się również węzeł reprezentujący AUR, natomiast węzeł reprezentujący AMX – niskim (5). Może to oznaczać, że wiele grup bakterii było zaangażowanych w procesy związane z bezpośrednim wykorzystaniem amoniaku lub dalszych produktów jego przemian. Amoniak i produkty jego przemian (azotyny i azotany) są kluczowymi substratami dla wielu różnych bakterii, ponadto związki te są często współdzielone przez różne grupy mikroorganizmów, co prowadzi do wielu interakcji troficznych i korelacji w sieci. Z kolei niski stopień węzła AMX, może sugerować, że aktywność bakterii anammox jest słabo skorelowana z dynamiką reszty wspólnoty, co mogłoby oznaczać, że działają one w bardziej stabilnym lub odizolowanym środowisku. Ponadto końcowym produktem procesu anammox jest azot cząsteczkowy, który nie stanowi źródła energii ani składników odżywczych dla innych mikroorganizmów. Ogranicza to potencjalne interakcje troficzne i może tłumaczyć niższą liczbę współwystępujących taksonów powiązanych z aktywnością bakterii anammox. Podobnie jak w przypadku sieci analizowanych w **P1.**, również w tym przypadku duża liczba połączeń, niekoniecznie związana była z dużą liczebnością danego rodzaju bakterii. Spośród węzłów bakteryjnych, *Nitrospira*, *Phycisphaerae* i *Prostheco bacter*

miały najwyższy stopień (57). Spośród czterech MAGów *Nitrosomonas*, MAG099 i MAG063 charakteryzowały się wysoką wartością stopnia, wynoszącą odpowiednio 50 i 38, natomiast MAGi 054 i 025 charakteryzowały się jednymi z najwyższych wartości stopnia pośredniości wynoszącymi odpowiednio 377 i 234.



Rysunek 3. Sieć współwystępowania mikroorganizmów w reaktorze w którym prowadzono proces deamonifikacji. Węzły reprezentują MAGi lub wybrane parametry technologiczne, a krawędzie reprezentują korelacje dodatnie (zielone) lub ujemne (czerwone). Grubość krawędzi odpowiada sile korelacji. Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. (P2.; Godzieba i in., 2024a).

P3. Godzieba, M., Hliwa, P., Ciesielski, S. Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: an unfaltering cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea. *Water*, 17, 52 (2025). <https://doi.org/10.3390/w17010052>

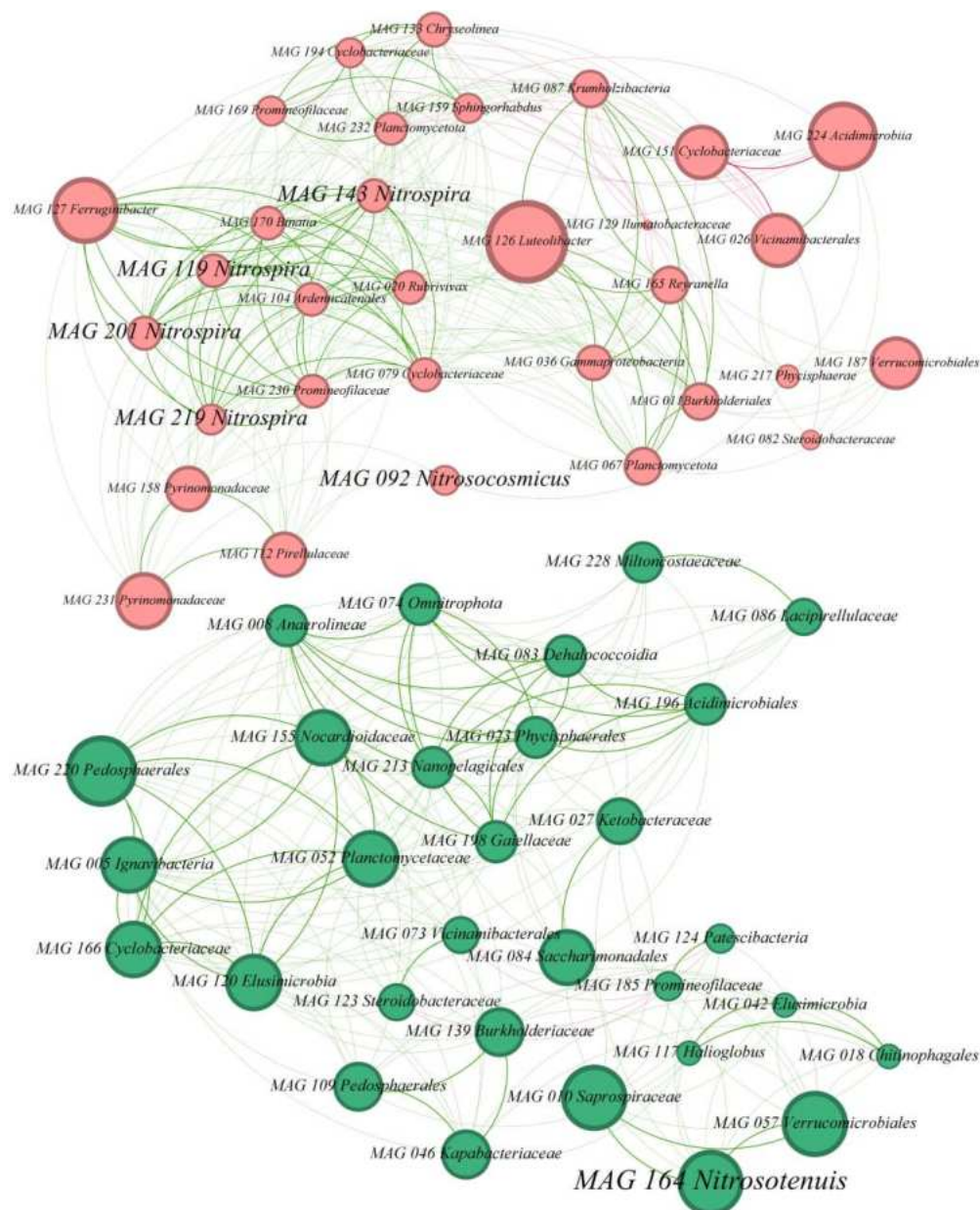
W tej publikacji badano bakterie mikrobiomu filtra z recyrkulacyjnego systemu chowu trawianek. Podobnie jak w poprzedniej publikacji, do analizy danych metagenomicznych zastosowano podejście opierające się na złożeniu MAGów. Sekwencjonowanie metagenomów dało łącznie 71,5 Gbp surowych odczytów sekwencji.

Bioinformatyczna obróbka tych danych pozwoliła zrekonstruować 203 MAG-i spełniające założone wymagania jakościowe, tj. co najmniej 50% kompletności i co najwyżej 10% zanieczyszczeń. Analiza filogenetyczna MAG-ów wykazała, że 200 z nich reprezentowało genomy bakterii, podczas gdy 3 reprezentowały genomy archeonów. Wszystkie zrekonstruowane genomy przypisano do jednego z 23 typów, z których najwięcej przedstawicieli stanowiły *Planctomycetota* (45 MAGów), *Bacteroidota* (32 MAGi), *Pseudomonadota* (29 MAGów) i *Chloroflexota* (22 MAGi). 5 MAGów należało do typu *Nitrospirota*, natomiast 3 MAGi należały do typu archeonów *Thermoproteota*.

Spośród wszystkich 203 MAG-ów tylko 37 osiągnęło liczebność co najmniej 1% w co najmniej jednej próbce. Zarówno przed, jak i po karmieniu ryb, *Actinomycetota* dominowały w mikrobiomie biofiltra. Drugie i trzecie miejsce zajęły odpowiednio *Planctomycetota* (BF— $14,2 \pm 0,7\%$, AF— $14,0 \pm 0,3\%$) i *Pseudomonadota* (BF— $10,6 \pm 0,4\%$, AF— $12,3 \pm 0,9\%$). Populację nityfikatorów tworzyły bakterie *Nitrospira* oraz AOA. Nie znaleziono jednak MAGów pochodzących od innych organizmów nityfikacyjnych, takich jak np. *Nitrosomonas*. Sumaryczna liczebność wszystkich pięciu MAGów *Nitrospira* wynosiła $9,5 \pm 0,2\%$ w próbkach przed karmieniem i $11,9 \pm 1,4\%$ w próbkach po karmieniu. Liczebność archeonów była również dość wysoka: przed karmieniem – $4,5 \pm 0,7\%$, po karmieniu – $4,0 \pm 0,2\%$. Przeprowadzono także analizę filogenetyczną MAGów sklasyfikowanych jako *Nitrospira*. Wykazała wysokie podobieństwo tych MAGów do genomów bakterii comammox. W biofiltrze obecne były oba kłady comammox *Nitrospira*. Do kładu A należały cztery MAGi: MAG 143, MAG 144, MAG 201 i MAG 219, natomiast do kładu B jeden: MAG 119. MAG 119 miał znacznie większą liczebność niż pozostałe MAGi *Nitrospira* ($7,3 \pm 0,1\%$ w próbkach przed karmieniem i $8,3 \pm 0,5\%$ w próbkach po karmieniu), a także był drugi pod względem liczebności spośród wszystkich 203 MAGów. Wśród archeonów zidentyfikowano dwie rodziny: *Nitrosopumilaceae* (MAG 164 i 199) i *Nitrososphaeraceae* (MAG 092). Wśród *Nitrosopumilaceae* MAG 164 był kilkakrotnie bardziej liczny niż MAG 199 i plasował się na piątym miejscu pod względem liczebności ($2,7 \pm 0,2\%$ (przed karmieniem) i $2,2 \pm 0,4\%$ (po karmieniu)). MAG 092 miał nieco niższą liczebność ($1,6\%$) w obu grupach. Wysoką liczebnością charakteryzowały się także denityfikatory, szczególnie należące do rodziny *Gaiellaceae* – MAG 198 był najliczniej występującym MAGiem, liczebnością wynoszącą $12,7 \pm 1,0\%$ w próbkach przed karmieniem i $9,0 \pm 0,2\%$ w próbkach po karmieniu.

W większości MAG-ów znaleziono geny związane z cyklem azotowym, tj. *amo*, *hao*, *nxr*, *napA/narG*, *nirK/nirS*, *nrfA*, *norB* i *nosZ*. Najczęściej występującymi genami były te związane z procesem denitryfikacji: *napA/narG* występował w 46 MAG-ach, *nirK/nirS* w 73, *nrfA/nrfH* w 39, *norB* w 40, a *nosZ* w 42. We wszystkich MAGach *Nitrospira* zidentyfikowano geny kodujące monooksygenazę amonową, co potwierdza ich zdolność do przeprowadzania całkowitej nitrifikacji. MAGi 119, 143 i 219 miały ponadto kompletny zestaw genów związanych z nitrifikacją (*amo*, *hao*, *nxr*). Oprócz bakterii comammox, archeony również odgrywały ważną rolę w procesie nitrifikacji w biofiltrze. Obecność genu *amo* wykryto w dwóch z trzech MAGów: MAG 092 – *Nitrosocosmicus* i MAG 164 – *Nitrosotenuis*.

Sieć obrazująca badaną populację składa się z 62 węzłów połączonych 844 krawędziami (Rys. 4). W sieci 415 krawędzi miało ujemny współczynnik korelacji, podczas gdy 429 dodatni. Analiza sieci wykazała podział populacji bakteryjnej biofiltra na dwa moduły. MAGi reprezentujące comammox *Nitrospira* i *Nitrosocosmicus* zostały przypisane do tego samego modułu, podczas gdy *Nitrosotenuis* został przypisany do drugiego modułu. Większość z krawędzi łączących członków różnych modułów miała wartość ujemną. Z kolei krawędzie występujące między członkami tego samego modułu miały przeważnie wartość dodatnią. Taki rozkład może wskazywać na istnienie dwóch konkurujących subpopulacji. Co ciekawe pomiędzy poszczególnymi archeonami i comammox *Nitrospira* nie zaobserwowano istotnej statystycznie ujemnej korelacji. Może to być spowodowane nieco odmiennymi preferencjami środowiskowymi tych dwóch mikroorganizmów. Środowisko biofilmu zapewnia gradient substancji odżywczych, umożliwiając rozwój i współwystępowanie różnorodnych mikroorganizmów. Występowanie mikroorganizmów o podobnej funkcji ekosystemowej w różnych warstwach biofilmu może minimalizować bezpośrednią konkurencję między nimi. W sieci najwyższe wartości stopnia pośredniości odpowiadały MAG 126 (*Luteolibacter*), 48,7; MAG 224 (*Acidimicrobiia*), 40,5; i MAG 127 (*Ferruginibacter*), 38,7. Nitrifikatory miały umiarkowane wartości stopnia pośredniości (od 16,7 do 19,2), z wyjątkiem MAG 164 (*Nitrosotenuis*), który miał wartość 30,6. Jednak węzły reprezentujące *Nitrospira* miały bardzo wysokie wartości parametru stopnia (39–40), który mierzy liczbę bezpośrednich połączeń, jakie dany węzeł ma z innymi węzłami w sieci.



Rysunek 4. Sieć współwystępowania mikroorganizmów w biofiltrze oczyszczającym wodę w recyrkulacyjnym systemie wykorzystywanym do chowu trawianek. Węzły reprezentują najliczniejsze MAGi (z względną liczebnością wynoszącą co najmniej 0,5 % w przynajmniej jednej próbce). Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. Czerwone krawędzie oznaczają ujemne korelacje, podczas gdy zielone krawędzie oznaczają dodatnie korelacje. Grubość krawędzi odpowiada sile korelacji. W celu zwiększenia czytelności pominięto krawędzie, łączące dwa konkurujące moduły. (P3.; Godzieba i in., 2024b).

P4. Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia J., Ciesielski, S. Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 17, 107494 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>

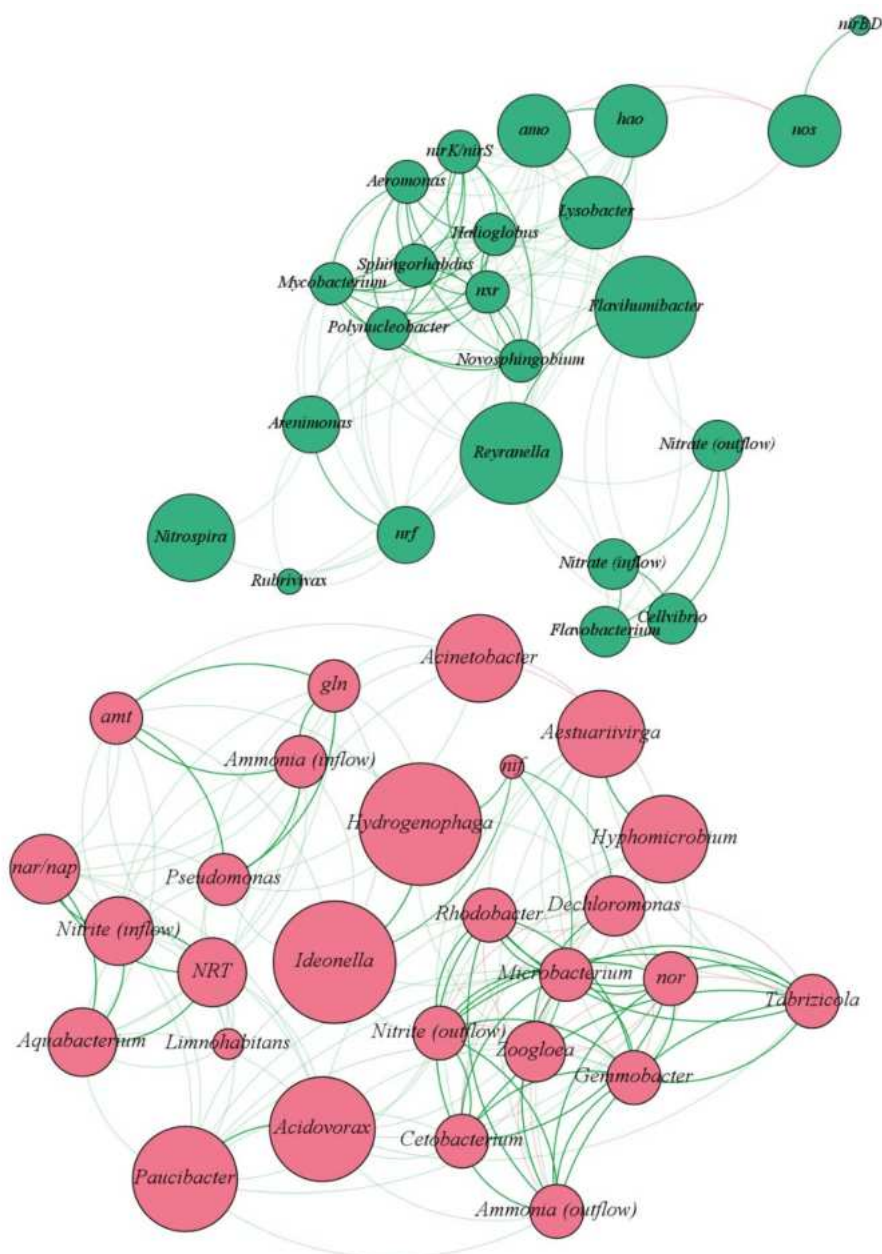
W tym badaniu do uzyskania informacji o populacji mikroorganizmów wykorzystano podejście obejmujące połączenie metagenomiki i metatranskryptomiki. Takie podejście pozwoliło nie tylko na określenie składu mikrobiologicznego społeczności mikroorganizmów oraz jej potencjału funkcjonalnego, ale również na zbadanie poziomu ekspresji genów związanych z przemianami azotu i monitorowanie zmian tych poziomów w różnych warunkach. Analizy bioinformatyczne przeprowadzono na poziomie contigów, aby jak najdokładniej opisać profil funkcjonalny populacji bakteryjnej biofiltra. Takie podejście pozwala uniknąć utraty genów pochodzących od organizmów o niskiej liczebności, umożliwiając dokładniejsze odzwierciedlenie aktywności metabolicznej społeczności, ze szczególnym uwzględnieniem procesów cyklu azotowego.

W badanych próbkach zidentyfikowano łącznie 178 typów oraz 3741 rodzajów bakteryjnych. Zdecydowana większość zidentyfikowanych typów i rodzajów miała bardzo niską liczebność, nieprzekraczającą 0,5 %. Tylko 10 typów osiągnęło liczebność co najmniej 0,5 % w co najmniej jednej próbce, jednak ich liczebność stanowiła ponad 95 % całkowitej populacji. We wszystkich próbkach zdecydowaną większość populacji stanowiły *Pseudomonadota*. Ich liczebność wahała się od 55 % do 70 %. Kolejne pod względem liczebności były *Bacteroidota* (8–14 %). Bakterie z gromad *Nitrospirota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota*, *Actinobacteriota* i *Acidobacteriota* były również dość liczne (2–5%). W próbkach przed karmieniem istotnie liczniejsze były *Aeromonas* i *Mycobacterium*, podczas gdy w próbkach po karmieniu istotnie liczniejszy był *Pseudomonas* (test White'a, $p < 0,05$). Ponadto we wszystkich próbkach liczne były bakterie z rodzaju *Nitrospira* (3,3 % – 5,2 %). Analiza taksonomiczna na poziomie gatunku wykazała obecność *Candidatus Nitrospira nitrosa* i *Candidatus Nitrospira nitrificans*. Ponadto analiza filogenetyczna genu zidentyfikowanego genu *amoA* wykazała duże podobieństwo do referencyjnych genów *amoA* występujących u przedstawicieli bakterii comammox, zwłaszcza *Candidatus Nitrospira nitrosa*, co potwierdza obecność bakterii comammox w biofiltrze. Inne nitryfikatory, takie jak np. *Nitrosomonas*, były znacznie mniej liczne (średnia liczebność 0,1 %). W biofiltrze

rozwinęła się także populacja denitryfikatorów, takich jak *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acidovorax*, *Dechloromonas*, *Acinetobacter* i *Hydrogenophaga*, które były szczególnie liczne w próbkach po karmieniu.

Analiza danych metatranskryptomicznych dostarczyła szczegółowych informacji o procesach przemian związków azotowych w biofiltrze. Najsilniejszy poziom ekspresji, wyrażony wartością TPM (transcripts per milion), dotyczył transkryptów związanych z procesem nityfikacji (*amo*, *hao* i *nxr*). Jednakże w próbkach po karmieniu nastąpił spadek poziomu transkrypcji tych genów, wzrósł natomiast poziom transkrypcji genów związanych z asymilacją amoniaku (*gln*) i jego transportem do komórki (*amt*). Ponadto w okresach po karmieniu wzrastał też udział transkryptów związanych z procesami DNRA i denitryfikacji.

Dane meta-omiczne posłużyły do stworzenia modelu społeczności mikrobiologicznej biofiltra w postaci sieci (Rys. 5). Podobnie jak w przypadku pierwszego biofiltra, w badanej sieci utworzyły się dwie konkurujące populacje. Pierwszy moduł składał się z bakterii, które wykazywały dodatnią korelację z transkryptami związanymi z asymilacją amoniaku (*amt*, *gln*). Bakterie z tego modułu sieci były liczniejsze w próbkach po karmieniu. Większość relacji zidentyfikowanych między członkami tego modułu była dodatnia, ale istniała również subpopulacja złożona z kilku heterotrofów (*Rhodobacter*, *Zooglea*, *Dechloromonas*, *Cetobacterium*, *Tabrizicola*, *Microbacterium*, *Gemmobacter*), między którymi występowały ujemne korelacje. Było to prawdopodobnie spowodowane konkurencją o ograniczoną dostępność związków organicznych. Drugi moduł zawierał bakterie, które były liczniejsze w próbkach przed karmieniem. W tym module korelacje między bakteriami były wyłącznie kooperacyjne. To właśnie w tym module znalazły się bakterie comammox *Nitrospira*, a także bakterie denitryfikacyjne (np. *Aeromonas*, *Flaviumibacter*, *Flavobacterium*). Ponadto moduł ten zawierał również węzły reprezentujące transkrypty *nirK/nirS*, *nirB/nirD* i stężenia azotanów. Taki podział na dwa moduły wskazuje, że w biofiltrze rozwinęły się dwie konkurujące ze sobą subpopulacje: pierwsza, do której należały bakterie comammox, rozwijała się lepiej przy niższych stężeniach związków organicznych i wykazywała głównie aktywność nityfikacyjną i denitryfikacyjną/DNRA, podczas gdy druga charakteryzowała się szybszym tempem wzrostu przy wyższej dostępności związków organicznych i wykorzystywała amoniak do wzrostu biomasy.



Rysunek 5. Sieć współwystępowania mikroorganizmów w biofiltrze oczyszczającym wodę w recyrkulacyjnym systemie wykorzystywanym do chowu karp i jesiotrów. Węzły reprezentują najliczniejsze rodzaje (z względną liczebnością wynoszącą co najmniej 0,01 % w przynajmniej jednej próbce), stężenie związków azotowych i ilości transkryptów genów związanych z cyklem azotowym. Czerwone krawędzie symbolizują ujemną korelację, natomiast zielone dodatnią. Grubość krawędzi odpowiada sile korelacji. Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. W celu zwiększenia czytelności pominięto krawędzie, łączące dwa konkurujące moduły. (P4.; Godzieba i in., 2025).

Węzeł reprezentujący comammox *Nitrospira* charakteryzował się poza tym jedną z najwyższych wartości parametru określanego stopniem pośredniości. W analizie sieci stopień pośredniości jest jednym z kluczowych parametrów, ponieważ wskazuje, jak często dany węzeł znajduje się na najkrótszej ścieżce między innymi węzłami w sieci.

Węzeł o wysokim stopniu pośredniości prawdopodobnie będzie odgrywał centralną rolę w społeczności, a jego usunięcie może zakłócić strukturę sieci, chyba że między pozostałymi węzłami zostaną utworzone nowe połączenia. Wysoki stopień pośredniości comammox *Nitrospira* wynikał prawdopodobnie z faktu, że był to dominujący nityfikator w biofiltrze. W związku z tym była ona również głównym producentem azotanów, wykorzystanych przez liczne denitryfikatory.

6. Weryfikacja hipotez

Analiza populacji bakteryjnej przeprowadzona na pierwszym etapie badań wskazuje, że populacja biofilmu wykazuje większe zróżnicowanie niż populacja osadu czynnego, co potwierdzają istotnie wyższe wartości wskaźników Shannona i Chao oraz liczba specyficznych OTU (**H1.**). Powodem tej różnicy może być warstwowa struktura biofilmu. Warunki w każdej warstwie biofilmu są nieco inne, co wynika na przykład z różnych ilości tlenu i substancji odżywczych przenikających do coraz głębszych warstw biofilmu. W poszczególnych warstwach biofilmu rozwijają się więc różnorodne grupy bakterii, o odmiennych preferencjach środowiskowych. To większe zróżnicowanie znalazło również odzwierciedlenie w strukturze sieci biofilmu. Węzły w tej sieci były połączone większą ilością krawędzi w porównaniu z siecią osadu czynnego. W bardziej różnorodnych ekosystemach mogą rozwijać się bardziej złożone interakcje zarówno nieantagonistyczne jak i antagonistyczne. Interakcje nieantagonistyczne mogą mieć np. charakter wymiany metabolitów, których zróżnicowanie prawdopodobnie było większe w biofilmie niż w osadzie czynnym z uwagi na jego większe bogactwo gatunkowe. Z drugiej strony ograniczona dyfuzja substratów pokarmowych i tlenu w biofilmie mogła być też przyczyną silniejszej konkurencji o dostępne zasoby.

Na poszczególnych etapach pracy badane układy różniły się między innymi pod względem stężenia związków w ściekach. W reaktorach opisanych w **P1.** i **P2.** stężenia azotu amonowego były zdecydowanie większe i wynosiły odpowiednio około 40 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$ oraz 300 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$. Z kolei w filtrach opisanych w **P3.** i **P4.** stężenie azotu amonowego nie przekraczało 1 mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$. Te różnice prawdopodobnie były jednym z głównych czynników wpływających na skład populacji nityfikatorów. Przy najwyższym stężeniu amoniaku (**P2.**) populacja była zdominowana przez bakterie *Nitrosomonas*, których liczebność sięgała kilkunastu procent, natomiast liczebność bakterii z rodzaju *Nitrospira* była kilkukrotnie niższa. Ponadto brak genów *amo* w genomie *Nitrospira* wskazywał na to, że jest to klasyczna *Nitrospira* NOB, a nie comammox. W **P1.**, nityfikatory również były reprezentowane przez *Nitrosomonas* i *Nitrospira*, jednak na tym etapie proporcje były odwrotne. Średnia liczebność *Nitrospira* w biofilmie wynosiła $2,8 \% \pm 1,8 \%$, natomiast *Nitrosomonas* $0,5 \% \pm 0,7 \%$. Jednak udział *Nitrosomonas* w niektórych etapach był wyższy i zbliżony do udziału *Nitrospira*. Niestety ograniczenia sekwencjonowania genów 16S rRNA nie pozwalają na określenie czy obecna w biofilmie *Nitrospira* była zdolna do całkowitego utleniania amoniaku czy też nie. W obu

recyrkulacyjnych systemach hodowli ryb badanych w **P3.** i **P4.**, dominującym nitryfikatorem była comammox *Nitrospira*, a w systemie z trawiankami licznie rozwinęła się również populacja AOA. Liczebność innych nitryfikatorów, takich jak np. *Nitrosomonas* była w biofiltrach znikoma. Takie wyniki wskazują, że przy wyższych stężeniach związków azotowych liczniej rozwijają się bakterie z rodzaju *Nitrosomonas*, natomiast przy niższym stężeniu bakterie comammox *Nitrospira* i AOA (**H2.**).

Ta różnica liczebności może być wytłumaczona teorią selekcji r/K oraz różnicami w powinowactwie do amoniaku różnych przedstawicieli nitryfikatorów. Powinowactwo to jest zwykle niższe u większości przedstawicieli AOB, chociaż pomiędzy gatunkami występuje pewna zmienność. Wiele gatunków *Nitrosomonas* preferuje środowiska o wyższym stężeniu amoniaku i zaliczane są do organizmów wykazujących strategię r. Takie bakterie charakteryzują się szybkim tempem wzrostu i niskim powinowactwem do substratu. W kontekście oczyszczania ścieków oznacza to, że bakterie te lepiej rozwijają się w systemach o większym obciążeniu amoniakiem i mogą osiągnąć wysokie wskaźniki usuwania zanieczyszczeń. Z kolei comammox *Nitrospira* zaliczana jest do bakterii wykazujących strategię K. Bakterie tej grupy wykazują wolniejsze tempo wzrostu, większe powinowactwo do substratu i lepiej rozwijają się w środowiskach o niskim stężeniu amoniaku.

Analiza wszystkich sieci wykazała również różnice w modularności sieci populacji bakteryjnych rozwijających się w reaktorach o różnym obciążeniu. W **P1.** i **P2.** liczba modułów w sieciach była wyższa (5-6) niż w **P3.** i **P4.** (2). Ponadto w sieciach w **P1.** i **P2.** powiązania między węzłami, zarówno wewnątrz jak i pomiędzy modułami, były dodatnie jak i ujemne. W sieciach w **P3.** i **P4.** korelacje wewnątrz modułów były głównie dodatnie, natomiast pomiędzy modułami ujemne. Taki układ sieci wskazuje, że dostępność substratów pokarmowych wpływa na zależności ekologiczne między mikroorganizmami (**H3.**). Przy większej dostępności substratów rozwija się więcej różnorodnych wyspecjalizowanych grup bakterii, zajmujących bardziej specyficzne i różnorodne nisze ekologiczne. Bakterie w tym samym module silnie współpracują (lub konkurują) ze sobą, ale mają mniej powiązań z innymi grupami (modułami), które zajmują inną niszę ekologiczną bądź wykorzystują inne typy zasobów. W środowiskach o mniejszej dostępności substancji odżywczych wiele organizmów korzysta z tych samych, ograniczonych zasobów. W konsekwencji, w sieci obrazującej taką populację tworzą się duże moduły, utworzone przez bakterie, które mogą być powiązane np.

zależnością typu producent-konsument. Ograniczone zasoby, powodują natomiast nasilenie konkurencji pomiędzy grupami (modułami). Ujemne korelacje między nimi mogą wskazywać, że w takich warunkach jedna grupa bakterii rośnie kosztem drugiej.

Z uwagi na rolę bakterii nitryfikacyjnych będącymi producentami azotynów i azotanów wykorzystywanych przez inne grupy mikroorganizmów, oczekiwano, że w procesach oczyszczania wody i ścieków bakterie nitryfikacyjne będą stanowiły kluczowe węzły sieci, tj. takie o wysokich wartościach stopnia pośredniości oraz stopnia węzła (H4.). Hipoteza ta została potwierdzona, ponieważ większość węzłów reprezentujących nitryfikatory charakteryzowała się wysoką wartością przynajmniej jednego z tych parametrów. Jednak we wszystkich wykreślonych sieciach obecne były również inne węzły, które zgodnie z teorią SNA można określić jako kluczowe. Może być kilka przyczyn takiej struktury sieci. Wysoka centralność niektórych węzłów, będąca odzwierciedleniem dużej liczby istotnych korelacji we współwystępowaniu, może być wynikiem podobnych preferencji środowiskowych lub podobnej odpowiedzi na zmiany czynników środowiskowych, a nie z bezpośredniej współpracy w np. cyklu azotowym. W P2. największy stopień miał węzeł reprezentujący temperaturę, co wskazuje na jego znaczący wpływ na wielu członków społeczności bakteryjnej. Jeżeli bakterie reagują w podobny sposób na presję czynnika środowiskowego (w tym przypadku spadek temperatury), pomiędzy ich liczebnością może pojawić się dodatnia korelacja. Duża liczba takich korelacji spowoduje wzrost stopnia węzła. Poza tym wysoką centralnością mogą odznaczać się mikroorganizmy wytwarzające substancje stabilizujące strukturę agregatów mikrobiologicznych, takich jak biofilm, granule czy kłaczkosady czynnego. Takie bakterie pełnią istotną rolę w populacji bakteryjnej, ponieważ stwarzają odpowiednie środowisko rozwoju różnych grup bakterii. Ponadto stabilność mikroekosystemów jest wynikiem równowagi pomiędzy wieloma złożonymi procesami, a zależności w reaktorach oczyszczania ścieków mogą być dużo bardziej złożone i niekoniecznie wynikające bezpośrednio z cyklu azotowego.

Badania mikrobiomów rozwijających się w układach oczyszczania wody i ścieków zwykle skupiają się na analizie wybranych rodzajów bakteryjnych, mających bezpośrednią rolę w procesie przemian związków azotowych, co jest narzucone przez ograniczenia powszechnie stosowanych metody badawczych np. qPCR czy testów takich jak AUR, NPR, NiUR. SNA pozwala na mniej wybiórczą i bardziej kompleksową interpretację danych uzyskanych z sekwencjonowania nowej generacji, dostarczając

informacji o potencjalnych interakcjach (**H5.**). SNA pozwala także na integrację w jednej analizie danych o liczebności mikroorganizmów z danymi środowiskowymi, co może przyczynić się do rozwoju metod tworzenia modeli predykcyjnych. Poza tym SNA może również umożliwiać analizę modułów funkcjonalnych, w przeciwieństwie do innych metod, które rzadko pozwalają zobrazować jak mikroorganizmy współpracują przy pełnieniu określonych funkcji. Analiza sieci i węzłów wykazujących wysokie wartości parametrów centralności może posłużyć zatem jako narzędzie pomagające w identyfikacji nieoczywistych, ważnych członków populacji bakteryjnej, które przy wykorzystaniu tradycyjnych metod zostałyby przeoczone. Lepsze zrozumienie roli tych bakterii pozwoli uzyskać pełniejszy obraz złożonych społeczności mikroekosystemów i relacji między bakteriami, które je tworzą.

7. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły zweryfikować postawione w pracy hipotezy badawcze i wykazać, że:

- Konsorcjum bakteryjne biofilmu różni się od osadu czynnego, chociaż niektóre główne grupy bakterii (*Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* i *Acidobacteriota*) występują licznie w obu typach biomasy.

- Biofilm jest bardziej zróżnicowany pod względem składu bakteryjnego i stanowi lepsze środowisko dla rozwoju nitryfikatorów (np. *Nitrospira*, *Nitrosomonas*) i organizmów akumulujących fosfor (*Ca. Accumulibacter*). Ponadto w sieci biofilmu więcej bakterii było powiązanych z wydajnością usuwania azotu i fosforu, co wskazuje, że biofilm może odgrywać ważniejszą rolę w usuwaniu tych zanieczyszczeń.

- Presja czynników środowiskowych, takich jak np. niska temperatura może wywierać silniejszy wpływ na kształtowanie się społeczności mikrobiologicznej niż zależności ekologiczne, takie jak konkurencja.

- Wyższe stężenia związków azotowych sprzyjają rozwojowi klasycznych AOB i NOB.

- Przy niskich stężeniach związków azotowych comammox *Nitrospira* w dominuje zarówno pod względem liczebności jak i aktywności nad klasycznymi AOB i NOB, a także AOA.

- W warunkach ograniczonej dostępności substratów pokarmowych nasilają się zależności konkurencyjne między bakteriami.

- Istotna ekologicznie rola nitryfikatorów znajduje odzwierciedlenie w strukturze sieci, a węzły je reprezentujące charakteryzują się wysokimi parametrami centralności.

- Analiza sieci współwystępowania jest obiecującym narzędziem umożliwiającym identyfikację potencjalnych zależności ekologicznych w populacjach bakteryjnych. Pełne zrozumienie zależności między funkcjonalnymi grupami mikroorganizmów może w przyszłości ułatwić sterowanie procesami biologicznego oczyszczania wody i ścieków nie tylko w warunkach laboratoryjnych ale również przemysłowych.

8. Spis literaturey

- Abdelhamed, H., Nho, S. W., Karsi, A., & Lawrence, M. L. (2021). The role of denitrification genes in anaerobic growth and virulence of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1062–1074. <https://doi.org/10.1111/jam.14855>
- Abdulkadir, N., Saraiva, J. P., Zhang, J., Stolte, S., Gillor, O., Harms, H., & Rocha, U. (2024). Genome-centric analyses of 165 metagenomes show that mobile genetic elements are crucial for the transmission of antimicrobial resistance genes to pathogens in activated sludge and wastewater. *Microbiology Spectrum*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02918-23>
- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: Issues in 16S rRNA gene sequencing. *MSphere*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.01202-20>
- Al-Ajeel, S., Spasov, E., Sauder, L. A., McKnight, M. M., & Neufeld, J. D. (2022). Ammonia-oxidizing archaea and complete ammonia-oxidizing *Nitrospira* in water treatment systems. *Water Research X*, 15, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2022.100131>
- Azli, B., Razak, M. N., Omar, A. R., Mohd Zain, N. A., Abdul Razak, F., & Nurulfiza, I. (2022). Metagenomics insights into the microbial diversity and microbiome network analysis on the heterogeneity of influent to effluent water. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.779196>
- Barroso-Bergadá, D., Pauvert, C., Vallance, J., Delière, L., Bohan, D. A., Buée, M., & Vacher, C. (2021). Microbial networks inferred from environmental DNA data for biomonitoring ecosystem change: Strengths and pitfalls. *Molecular Ecology Resources*, 21(3), 762–780. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13302>
- Bayer, B., Pelikan, C., Bittner, M. J., Reinthaler, T., Köneke, M., Herndl, G. J., & Offre, P. (2019). Proteomic response of three marine ammonia-oxidizing archaea to hydrogen peroxide and their metabolic interactions with a heterotrophic alphaproteobacterium. *MSystems*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00181-19>
- Begmatov, S., Dorofeev, A. G., Kadnikov, V. V., Beletsky, A. V., Pimenov, N. V., Ravin, N. V., & Mardanov, A. V. (2022). The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow. *Scientific Reports*, 12(1), 3458. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07132-4>
- Bian, X., Wu, Y., Li, J., Yin, M., Li, D., Pei, H., Chang, S., & Guo, W. (2022). Effect of dissolved oxygen on high C/N wastewater treatment in moving bed biofilm reactors based on heterotrophic nitrification and aerobic denitrification: Nitrogen removal performance and potential mechanisms. *Bioresource Technology*, 365, 128147. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128147>
- Chen, J., Xu, J., Zhang, S., Liu, F., Peng, J., Peng, Y., & Wu, J. (2021). Nitrogen removal characteristics of a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria, *Alcaligenes faecalis* strain WT14. *Journal of Environmental Management*, 282, 111961. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.111961>
- Costa, E., Pérez, J., & Kreft, J.-U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology*, 14(5), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.006>

- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(9), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>
- Dohlman, A. B., & Shen, X. (2019). Mapping the microbial interactome: Statistical and experimental approaches for microbiome network inference. *Experimental Biology and Medicine*, 244(6), 445–458. <https://doi.org/10.1177/1535370219836771>
- Du, H., Pan, J., Zou, D., Huang, Y., Liu, Y., & Li, M. (2022). Microbial active functional modules derived from network analysis and metabolic interactions decipher the complex microbiome assembly in mangrove sediments. *Microbiome*, 10(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01421-w>
- Duan, S., Zhang, Y., & Zheng, S. (2022). Heterotrophic nitrifying bacteria in wastewater biological nitrogen removal systems: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(13), 2302–2338. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1877976>
- Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., & De Cesare, A. (2021). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific Reports*, 11(1), 3030. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82726-y>
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Fu, W., Song, G., Wang, Y., Wang, Q., Duan, P., Liu, C., Zhang, X., & Rao, Z. (2022). Advances in research into and applications of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying microorganisms. *Frontiers in Environmental Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.887093>
- Gao, W., Fan, C., Zhang, W., Li, N., Liu, H., & Chen, M. (2023). Heterotrophic nitrification of organic nitrogen in soils: process, regulation, and ecological significance. *Biology and Fertility of Soils*, 59(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s00374-023-01707-7>
- Gaspari, M., Treu, L., Zhu, X., Palù, M., Angelidaki, I., Campanaro, S., & Kougias, P. G. (2021). Microbial dynamics in biogas digesters treating lipid-rich substrates via genome-centric metagenomics. *Science of The Total Environment*, 778, 146296. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146296>
- Geesink, P., ter Horst, J., & Ettema, T. J. G. (2024). More than the sum of its parts: uncovering emerging effects of microbial interactions in complex communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae029>
- Goberna, M., & Verdú, M. (2022). Cautionary notes on the use of co-occurrence networks in soil ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 166, 108534. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108534>
- Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Makinia, J., & Ciesielski, S. (2024a). Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic

ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(6), 114661. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>

Godzieba, M., Hliwa, P., & Ciesielski, S. (2024b). Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: An unfaltering cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea. *Water*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.3390/w17010052>

Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia, J., & Ciesielski, S. (2025). Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 72, 107494. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>

Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., & Ciesielski, S. (2022). Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12(1), 12558. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>

Guo, B., Zhang, L., Sun, H., Gao, M., Yu, N., Zhang, Q., Mou, A., & Liu, Y. (2022). Microbial co-occurrence network topological properties link with reactor parameters and reveal importance of low-abundance genera. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00263-y>

Gupta, R. K., Poddar, B. J., Nakhate, S. P., Chavan, A. R., Singh, A. K., Purohit, H. J., & Khardenavis, A. A. (2022). Role of heterotrophic nitrifiers and aerobic denitrifiers in simultaneous nitrification and denitrification process: a nonconventional nitrogen removal pathway in wastewater treatment. *Letters in Applied Microbiology*, 74(2), 159–184. <https://doi.org/10.1111/lam.13553>

Guseva, K., Darcy, S., Simon, E., Alteio, L. V., Montesinos-Navarro, A., & Kaiser, C. (2022). From diversity to complexity: Microbial networks in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 169, 108604. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108604>

Han, D., Gao, P., Li, R., Tan, P., Xie, J., Zhang, R., & Li, J. (2020). Multicenter assessment of microbial community profiling using 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomic sequencing. *Journal of Advanced Research*, 26, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.010>

Harland, J. B., Samanta, S., & Lehnert, N. (2023). Bacterial nitric oxide reductase (*NorBC*) models employing click chemistry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 246, 112280. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112280>

Herold, M., Martínez Arbas, S., Narayanasamy, S., Sheik, A. R., Kleine-Borgmann, L. A. K., Lebrun, L. A., Kunath, B. J., Roume, H., Bessarab, I., Williams, R. B. H., Gillece, J. D., Schupp, J. M., Keim, P. S., Jäger, C., Hoopmann, M. R., Moritz, R. L., Ye, Y., Li, S., Tang, H., ... Wilmes, P. (2020). Integration of time-series meta-omics data reveals how microbial ecosystems respond to disturbance. *Nature Communications*, 11(1), 5281. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19006-2>

Hu, B., Lu, J., Qin, Y., Zhou, M., Tan, Y., Wu, P., & Zhao, J. (2023). A critical review of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: Influencing factors and mechanisms. *Journal of Water Process Engineering*, 54, 103995. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103995>

Hu, J., Tian, J., Deng, X., Liu, X., Zhou, F., Yu, J., Chi, R., & Xiao, C. (2024). Heterotrophic nitrification processes driven by glucose and sodium acetate: New insights into microbial

- communities, functional genes and nitrogen metabolism from metagenomics and metabolomics. *Bioresource Technology*, 408, 131226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131226>
- Intrator, N., Jayakumar, A., & Ward, B. B. (2024). Aquatic nitrous oxide reductase gene (*nosZ*) phylogeny and environmental distribution. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1407573>
- Jiang, D., Armour, C. R., Hu, C., Mei, M., Tian, C., Sharpton, T. J., & Jiang, Y. (2019). Microbiome multi-omics network analysis: statistical considerations, limitations, and opportunities. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00995>
- Jiang, Z., He, Y., Zeng, M., Zhang, Y., Xu, X., & Zhang, M. (2024). Revealing critical functional enzymes in anammox nitrogen removal and rate-limiting step in catalytic pathways: Insight into metaproteomics and density functional theory. *Bioresource Technology*, 406, 131090. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2024.131090>
- Jin, Y., Ding, J., Zhan, W., Du, J., Wang, G., Pang, J., Ren, N., & Yang, S. (2023). Effect of dissolved oxygen concentration on performance and mechanism of simultaneous nitrification and denitrification in integrated fixed-film activated sludge sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 387, 129616. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129616>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jung, M.-Y., Sedlacek, C. J., Kits, K. D., Mueller, A. J., Rhee, S.-K., Hink, L., Nicol, G. W., Bayer, B., Lehtovirta-Morley, L., Wright, C., de la Torre, J. R., Herbold, C. W., Pjevac, P., Daims, H., & Wagner, M. (2022). Ammonia-oxidizing archaea possess a wide range of cellular ammonia affinities. *The ISME Journal*, 16(1), 272–283. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01064-z>
- Kajihara, K. T., & Hynson, N. A. (2024). Networks as tools for defining emergent properties of microbiomes and their stability. *Microbiome*, 12(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01868-z>
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tscherko, D., Bru, D., & Philippot, L. (2006). Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957–5962. <https://doi.org/10.1128/AEM.00439-06>
- Kikuchi, S., Fujitani, H., Ishii, K., Isshiki, R., Sekiguchi, Y., & Tsuneda, S. (2023). Characterisation of bacteria representing a novel *Nitrosomonas* clade: Physiology, genomics and distribution of missing ammonia oxidizer. *Environmental Microbiology Reports*, 15(5), 404–416. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13158>
- Kits, K. D., Sedlacek, C. J., Lebedeva, E. V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P., Daebeler, A., Romano, S., Albertsen, M., Stein, L. Y., Daims, H., & Wagner, M. (2017). Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. *Nature*, 549(7671), 269–272. <https://doi.org/10.1038/nature23679>
- Kwiatkowska, K., & Ormaniec, P. (2024). Microbial succession on microplastics in wastewater treatment plants: Exploring the complexities of microplastic-microbiome interactions. *Microbial Ecology*, 87(1), 105. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02422-y>

- Lan, M., Yin, Q., Wang, J., Li, M., Li, Y., & Li, B. (2023). Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification performance of a novel strain, *Pseudomonas* sp. B-1, isolated from membrane aerated biofilm reactor. *Environmental Research*, 220, 115199. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115199>
- Li, F., Ghanizadeh, H., Cui, G., Liu, J., Miao, S., Liu, C., Song, W., Chen, X., Cheng, M., Wang, P., Zhang, Y., & Wang, A. (2023). Microbiome - based agents can optimize composting of agricultural wastes by modifying microbial communities. *Bioresource Technology*, 374, 128765. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128765>
- Li, N., Huang, Q., Ge, X., He, M., Cui, S., Huang, P., Li, S., & Fung, S.-F. (2021). A review of the research progress of social network structure. *Complexity*, 2021(1). <https://doi.org/10.1155/2021/6692210>
- Liao, T., Wang, S., Stüeken, E. E., & Luo, H. (2022). Phylogenomic evidence for the origin of obligate anaerobic anammox bacteria around the great oxidation event. *Molecular Biology and Evolution*, 39(8), msac170. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac170>
- Liu, C., Li, C., Jiang, Y., Zeng, R. J., Yao, M., & Li, X. (2023). A guide for comparing microbial co-occurrence networks. *IMeta*, 2(1). <https://doi.org/10.1002/imt2.71>
- Lu, J., Tan, Y., Tian, S., Qin, Y., Zhou, M., Hu, H., Zhao, X., Wang, Z., & Hu, B. (2024). Effect of carbon source on carbon and nitrogen metabolism of common heterotrophic nitrification-aerobic denitrification pathway. *Chemosphere*, 361, 142525. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142525>
- Martens-Habben, W., Berube, P. M., Urakawa, H., de la Torre, J. R., & Stahl, D. A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature*, 461(7266), 976–979. <https://doi.org/10.1038/nature08465>
- Martikainen, P. J. (2022). Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle. *Soil Biology and Biochemistry*, 168, 108611. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108611>
- Mougi, A. (2023). Eco-evolutionary dynamics in microbial interactions. *Scientific Reports*, 13(1), 9042. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36221-1>
- Oña, L., Shreekar, S. K., & Kost, C. (2025). Disentangling microbial interaction networks. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.01.013>
- Peng, L., Shi, R., Tao, Y., Huang, Q., Yang, M., He, Y., & Xu, W. (2023). Starting up anammox system with high efficiency nitrogen removal at low temperatures: Performance optimization, sludge characterization and microbial community analysis. *Journal of Environmental Management*, 325, 116542. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116542>
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.007>
- Poudel, R., Jumpponen, A., Schlatter, D. C., Paulitz, T. C., Gardener, B. B. M., Kinkel, L. L., & Garrett, K. A. (2016). Microbiome networks: A systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management. *Phytopathology*®, 106(10), 1083–1096. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0058-FI>

- Qin, Y.-L., Liang, Z.-L., Ai, G.-M., Liu, W.-F., Tao, Y., Jiang, C.-Y., Liu, S.-J., & Li, D.-F. (2024). Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* links organic and inorganic nitrogen metabolism. *The ISME Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae174>
- Ratzke, C., & Gore, J. (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLOS Biology*, 16(3), e2004248. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>
- Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1990). Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57(3), 139–152. <https://doi.org/10.1007/BF00403948>
- Röttgers, L., & Faust, K. (2018). From hairballs to hypotheses—biological insights from microbial networks. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 761–780. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy030>
- Sakoula, D., Koch, H., Frank, J., Jetten, M. S. M., van Kessel, M. A. H. J., & Lüscher, S. (2021). Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *The ISME Journal*, 15(4), 1010–1024. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00827-4>
- Sedlacek, C. J., McGowan, B., Suwa, Y., Sayavedra-Soto, L., Laanbroek, H. J., Stein, L. Y., Norton, J. M., Klotz, M. G., & Bollmann, A. (2019). A Physiological and genomic comparison of *Nitrosomonas* cluster 6a and 7 ammonia-oxidizing bacteria. *Microbial Ecology*, 78(4), 985–994. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01378-8>
- Sedlacek, C. J., Nielsen, S., Greis, K. D., Haffey, W. D., Revsbech, N. P., Ticak, T., Laanbroek, H. J., & Bollmann, A. (2016). Effects of bacterial community members on the proteome of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain Is79. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4776–4788. <https://doi.org/10.1128/AEM.01171-16>
- Shade, A. (2023). Microbiome rescue: directing resilience of environmental microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 72, 102263. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102263>
- Sierocki, R. (2020) Analiza sieci społecznych jako metoda badawcza w socjologii. *Rocznik Antropologii Historii*, X(13), 223–255. <https://doi.org/10.25945/rah2020.13.009>
- Soliman, M., & Eldyasti, A. (2018). Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications—a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(2), 285–321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>
- Suman, J., Rakshit, A., Ogireddy, S. D., Singh, S., Gupta, C., & Chandrakala, J. (2022). Microbiome as a key player in sustainable agriculture and human health. *Frontiers in Soil Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.821589>
- Thandar, S. M., Ushiki, N., Fujitani, H., Sekiguchi, Y., & Tsuneda, S. (2016). Ecophysiology and comparative genomics of *Nitrosomonas mobilis* Ms1 isolated from autotrophic nitrifying granules of wastewater treatment bioreactor. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01869>
- Toole, D. R., Zhao, J., Martens-Habbena, W., & Strauss, S. L. (2021). Bacterial functional prediction tools detect but underestimate metabolic diversity compared to shotgun metagenomics in southwest Florida soils. *Applied Soil Ecology*, 168, 104129. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104129>

- van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- van Teeseling, M. C. F., Neumann, S., & van Niftrik, L. (2013). The anammoxosome organelle is crucial for the energy metabolism of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 23(1–2), 104–117. <https://doi.org/10.1159/000346547>
- Weiss, S., Van Treuren, W., Lozupone, C., Faust, K., Friedman, J., Deng, Y., Xia, L. C., Xu, Z. Z., Ursell, L., Alm, E. J., Birmingham, A., Cram, J. A., Fuhrman, J. A., Raes, J., Sun, F., Zhou, J., & Knight, R. (2016). Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *The ISME Journal*, 10(7), 1669–1681. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.235>
- Wittorf, L., Jones, C. M., Bonilla-Rosso, G., & Hallin, S. (2018). Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases. *Research in Microbiology*, 169(6), 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.010>
- Wu, J., Xinduan, W., Qiufeng, G., Chi, Z., & Miao, Z. (2023). Mathematical simulation and experimental verification of a novel control strategy for a single stage PN/A (partial nitrification/Anammox) SBR (sequencing batch reactor). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(1), 109154. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.109154>
- Xia, L., Li, X., Fan, W., & Wang, J. (2020). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. *Bioresource Technology*, 301, 122749. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122749>
- Xiang, T., Liang, H., Wang, P., & Gao, D. (2021). Insights into two stable mainstream deammonification process and different microbial community dynamics at ambient temperature. *Bioresource Technology*, 331, 125058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125058>
- Xiong, F., Su, Z., Tang, Y., Dai, T., & Wen, D. (2024). Global WWTP microbiome-based integrative information platform: From experience to intelligence. *Environmental Science and Ecotechnology*, 20, 100370. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2023.100370>
- Yim, S. S., & Wang, H. H. (2021). Exploiting interbacterial antagonism for microbiome engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 19, 100307. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2021.100307>
- Zamkovaya, T., Foster, J. S., de Crécy-Lagard, V., & Conesa, A. (2021). A network approach to elucidate and prioritize microbial dark matter in microbial communities. *The ISME Journal*, 15(1), 228–244. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00777-x>
- Zhang, F., Xie, F., Zhou, K., Zhang, Y., Zhao, Q., Song, Z., & Cui, H. (2022b). Nitrogen removal performance of novel isolated *Bacillus* sp. capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 3196–3211. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03877-w>
- Zhang, K., Zeng, Q., Jiang, R., Shi, S., Yang, J., Long, L., & Tian, X. (2023). Three novel marine species of *Paracoccus*, *P. aerodenitrificans* sp. nov., *P. sediminicola* sp. nov. and *P. albus* sp. nov., and the characterization of their capability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Microorganisms*, 11(6), 1532. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061532>

- Zhang, M., Li, A., Yao, Q., Xiao, B., & Zhu, H. (2022a). *Pseudomonas oligotrophica* sp. nov., a novel denitrifying bacterium possessing nitrogen removal capability under low carbon–nitrogen ratio condition. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.882890>
- Zhang, S., Sun, X., Fan, Y., Qiu, T., Gao, M., & Wang, X. (2017). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205 using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as the sole carbon source. *Bioresource Technology*, 241, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.185>
- Zhou, L., Zhao, B., & Zhuang, W.-Q. (2023). Double-edged sword effects of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) bacteria on anammox bacteria performance in an MBR reactor. *Water Research*, 233, 119754. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119754>

9. Spis rysunków

Rys. 1. Sieć współwystępowania mikroorganizmów biofilmu w reaktorze IFAS-MBSBBR, z węzłami reprezentującymi taksony na poziomie rodzaju lub efektywności usuwania zanieczyszczeń oraz krawędziami reprezentującymi korelacje (zielone krawędzie – korelacja dodatnia; czerwone krawędzie – korelacja ujemna). Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. (P1.; Godzieba i in., 2022)..... 27

Rys. 2. Sieć współwystępowania mikroorganizmów osadu czynnego w reaktorze IFAS-MBSBBR, z węzłami reprezentującymi taksony na poziomie rodzaju lub efektywności usuwania zanieczyszczeń oraz krawędziami reprezentującymi korelacje (zielone krawędzie – korelacja dodatnia; czerwone krawędzie – korelacja ujemna). Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. (P1.; Godzieba i in., 2022)..... 28

Rys. 3. Sieć współwystępowania mikroorganizmów w reaktorze w którym prowadzono proces deamonifikacji. Węzły reprezentują MAGi lub wybrane parametry technologiczne, a krawędzie reprezentują korelacje dodatnie (zielone) lub ujemne (czerwone). Grubość krawędzi odpowiada sile korelacji. Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. (P2.; Godzieba i in., 2024a)..... 31

Rys. 4. Sieć współwystępowania mikroorganizmów w biofiltrze oczyszczającym wodę w recyrkulacyjnym systemie wykorzystywanym do chowu trawianek. Węzły reprezentują najliczniejsze MAGi (z względną liczebnością wynoszącą co najmniej 0,5 % w przynajmniej jednej próbce). Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. Czerwone krawędzie oznaczają ujemne korelacje, podczas gdy zielone krawędzie oznaczają dodatnie korelacje. Grubość krawędzi odpowiada sile korelacji. W celu zwiększenia czytelności pominięto krawędzie, łączące dwa konkurujące moduły. (P3.; Godzieba i in., 2024b). 34

Rys. 5. Sieć współwystępowania mikroorganizmów w biofiltrze oczyszczającym wodę w recyrkulacyjnym systemie wykorzystywanym do chowu karpi i jesiotrów. Węzły reprezentują najliczniejsze rodzaje (z względną liczebnością wynoszącą co najmniej 0,01 % w przynajmniej jednej próbce), stężenie związków azotowych i ilości transkryptów genów związanych z cyklem azotowym. Czerwone krawędzie symbolizują ujemną korelację, natomiast zielone dodatnią. Grubość krawędzi odpowiada sile korelacji. Rozmiar węzłów jest wprost proporcjonalny do rozmiaru parametru stopnia pośredniości. W celu zwiększenia czytelności pominięto krawędzie, łączące dwa konkurujące moduły. (P4.; Godzieba i in., 2025)..... 37

Załączniki

**Załącznik nr 3 do Załącznika nr 2
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora**

Olsztyn 15.05.2025

(miejscowość, data)

mgr inż. Martyna Godzieba

(imię i nazwisko kandydata)

Inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka

(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem „Wykorzystanie sieci społecznych do badania wzorców współwystępowania bakterii przekształcających związki azotu w układach oczyszczania ścieków” została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Martyna Godzieba

(podpis kandydata)

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 2

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn 19.05.2025

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko

promotora/~~promotora-pomoenniczego*~~)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

promotora/~~promotora-pomoenniczego*~~ rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Godzieby pod tytułem „Wykorzystanie sieci społecznych do badania wzorców współwystępowania bakterii przekształcających związki azotu w układach oczyszczania ścieków” została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Stefan Anna

(podpis promotora)

** niepotrzebne skreślić*

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Martyna Godzieba

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Kandydata

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Ciesielski S. Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12, 12558 (2022).

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 55 %.

Martyna Godzieba

(podpis)

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Ciesielski S. Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12, 12558 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, recenzowaniu i edycji tekstu, merytorycznym nadzorze pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.



(podpis)

Kiersawa, 08.05.2025

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Monika Żubrowska-Sudol
(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Ciesielski S. Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12, 12558 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, sprawowaniu kontroli nad układem badawczym, recenzowaniu i edycji tekstu, merytorycznym nadzorze pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.

M. Sudol

(podpis)

Warszawa, 08 05 2025

(miejscowość, data)

dr inż. Justyna Walczak

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Ciesielski S. Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor. *Scientific Reports*, 12, 12558 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: sprawowaniu kontroli nad układem badawczym, pozyskaniu wyników technologicznych, recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.

Justyna Walczak

(podpis)



OPEN

Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor

Martyna Godzieba^{1✉}, Monika Zubrowska-Sudol², Justyna Walczak² & Sławomir Ciesielski¹

Microorganisms play a key role in biological wastewater treatment. The form in which biomass develops determines the efficiency and mechanisms of organic compound conversion, due to different conditions in various microbial structures. However, the results of studies comparing the microbial communities in biofilm and activated sludge have often conflicted. Therefore, this study compared the composition and development of the bacterial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor, employing 16S rRNA sequencing. Statistical analysis of the sequencing data included the identification of taxa characteristic to the biofilm and activated sludge, alpha and beta diversity analysis, and network analysis. These analyses indicated that the biofilm bacterial community was richer and more diverse than the activated sludge community. The mean numbers of OTU were 1614 in the biofilm and 993 in the activated sludge, and the mean values of the Chao1 (1735 vs. 1105) and Shannon (5.3 vs. 4.3) biodiversity indices were significantly higher for the biofilm. The biofilm was a better environment for development of nitrifiers (e.g., *Nitrosomonas*, *Nitrospira*) and phosphorus accumulating organisms (*Candidatus Accumulibacter*). Bacteria in the biofilm co-occurrence network had more connections (based on Spearman's rank correlation coefficient) with each other, indicating that they interact more than those in the activated sludge.

Hybrid biological reactors, which combine the growth of microorganisms in activated sludge and in biofilm, are widely used in wastewater treatment in a variety of different configurations. In the most common type of hybrid bioreactors, the biofilm develops on moving carriers added to an aeration tank, but there are also systems with other technological solutions like a rotating biological contactor or a submerged bed. Using bioreactors based on hybrid technology allows the concentration of biomass to increase and the efficiency of wastewater treatment to improve. An example of this type of technology is the Integrated Fixed-Film Activated Sludge-Moving-Bed Sequencing Batch Biofilm reactor (IFAS-MBSBBR), which is a modification of conventional sequencing batch reactor technology. In this reactor, both forms of biomass coexist in the same tank. The main advantages of this technology are the elimination of sludge bulking and the possibility of receiving a larger load of contaminants¹.

Regardless of the technological solution used, microorganisms play a key role in biological wastewater treatment. The formation of the microbial community is influenced by many factors, including the operating conditions and the composition of the incoming wastewater². An important factor affecting the efficiency of pollutant removal and the performance of the whole process is the sludge age. The sludge age, also called the solids retention time (SRT), is the time that the solid fraction (bacteria) spends in the reactor. Each group of bacteria has a different optimal time for multiplying, and too short a SRT leads to them being washed out of the system. The requirements of different bacteria in terms of the time needed for multiplication are quite different: a long SRT favours the development of nitrifying and filamentous bacteria, while short SRT favours phosphorus accumulating bacteria and denitrifies^{3–5}. The form in which biomass develops also has a substantial effect on the final structure of the microbial community. The conditions in biofilm differ from those in activated sludge: for example, in biofilm there are concentration gradients of oxygen and nutrients, and less of these substances reaches the deeper layers of the biofilm. Therefore, activated sludge and biofilm have different mechanisms of pollutant removal⁶. An optimal thickness of biofilm is crucial for performance of wastewater treatment processes. If it is

¹Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland. ²Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Warsaw University of Technology, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland. ✉email: martyna.godzieba@uwm.edu.pl

too thin, it does not provide anoxic conditions for the proliferation of denitrifying bacteria; if it is too thick, it is unfavourable to nitrifying bacteria, since it acts as a barrier that limits access to nutrients⁷. The form of a microbial community is also determined by its stage of development. In both activated sludge and biofilm, the proportions of individual groups of bacteria will change as the maturation process proceeds.

Advances in molecular techniques and next-generation sequencing have facilitated the study of complex bacterial communities in wastewater treatment systems. One of the most commonly used approaches in environmental microbiology studies is sequencing the 16S rRNA gene. By comparing the obtained sequences with sequences available in extensive databases, it is possible to identify bacteria present in environmental samples. 16S rRNA gene sequencing generates a vast amount of information on the entire microbial community and allows its taxonomic composition to be defined. However, this approach does not provide information on the active genes and metabolic pathways. Therefore to study gene expression and create a functional profile of microbial community it is required to use RNA based methods, such as metatranscriptomics. 16S rRNA gene sequencing enables estimation of the abundance of microorganisms forming a particular community but cannot provide information on the relationships between its members or the factors affecting its development⁸. One method for studying the interactions between microorganisms is creating a network representing the studied community, which allows it to be comprehensively analysed. The nodes in such networks symbolize operational taxonomic units (OTU). The nodes are linked to each other by edges, which represent the interactions between them (most often, a correlation in abundance). Visualization and analysis of the networks allows the key taxa in the studied communities to be determined, as well as potentially interdependent taxa, or those that potentially compete with each other.

Currently, several studies comparing biofilm and activated sludge communities have been published, but the results of these studies are often conflicting. For example, in some studies it was found that the biofilm and the activated sludge bacterial communities are similar, especially in mature forms of biomass⁹. Other studies, however, suggest the existence of significant differences in the structure of these two environments^{10,11}. In studies by Jo et al.¹², it was noted that certain groups of bacteria are common in both forms of biomass, while there are significant differences in their abundances, as well as in the interactions between community members, which was visible in differences in network topological features. Therefore, there is a need for a more in-depth study of these microbiomes, in particular their metabolic specialization in wastewater treatment and differences in their development and response to changing environmental conditions, e.g., aeration strategy, along with differences in interactions between community members. Therefore, the aim of this work was to characterize the differences in structure between the microbial community in the biofilm and the community in the activated sludge of a hybrid reactor treating municipal wastewater while using different aeration strategies. The role of particular bacterial species in organic compounds conversion in the studied reactor is discussed. The experiment was conducted over a long period of time, which allowed the two forms of biomass to be studied and compared at different stages of development. We used an approach involving a combination of 16S rRNA sequencing with analysis of microorganism co-occurrence networks. The sequencing technique provided information on the microbial composition of the communities in the biofilm and activated sludge. The second goal of this study was to obtain insight into the ecological relationships between members of these communities. This required statistical analysis of the obtained data and the creation of correlation matrices to quantify the co-occurrence of individual microorganism groups. Based on the correlation matrices, co-occurrence networks for the most strongly correlated taxa were created. The advantages of this approach are not only that the taxonomic composition of the studied environment was defined, but also that the groups of microorganisms that most often coexist and interact with each other were determined. Thus, this study provides new information on the ecology of bacteria in wastewater treatment systems and will help to develop understanding of the relationships between bacteria involved in wastewater compound transformations. Extending knowledge about these bacteria will enable better control of the pollutant removal processes in wastewater treatment systems.

Results

Bacterial community composition. In order to study the microbial structure of the biofilm and activated sludge that were developing in the IFAS-MBSBBR reactor, a total of 15 samples were taken at intervals during an experiment lasting 573 days. The microbiome of both environments was described at the phylum and genus levels. A total of 26 bacterial phyla and 783 bacterial genera were identified. The most numerous phyla and genera in the biofilm and activated sludge samples are presented in in Figs. 1 and 2. Both in the biofilm and the activated sludge, the most numerous phyla were *Proteobacteria*, with respective mean abundances of $39.3\% \pm 9.0$ and $40.8\% \pm 8.2$, and *Bacteroidota*, with respective mean abundances of $14.2\% \pm 4.9$ and $26.1\% \pm 13.7$. Additionally, the phylum *Chloroflexi* was rather abundant in the biofilm (with a mean abundance of 13.9 ± 8.1), while *Actinobacteriota* and *Patescibacteria* were relatively abundant in the activated sludge (with mean abundances of $9.0\% \pm 9.6$ and $7.5\% \pm 8.1$, respectively). STAMP analysis identified significant overrepresentations of *Chloroflexi*, *Acidobacteriota*, and *Nitrospirota* in biofilm and of *Firmicutes* in activated sludge.

In both environments, the abundances of various groups of bacteria changed over time. In the biofilm, the abundance of *Proteobacteria* and *Actinobacteria* gradually decreased, while that of *Chloroflexi* increased. In the activated sludge, the changes in abundance were larger and more rapid, and the abundance of *Bacteroidota* changed to the largest extent, ranging from 12.7% after 42 days of reactor operation to 52.3% after 110 days, when it was the predominant phylum. The abundance of *Patescibacteria* also changed substantially: its abundance was highest on the 78th, 205th and 447th days of the process, reaching values of 20.1%, 11.0%, and 7.2%, respectively. Similar changes took place in the abundance of *Armatimonadota*, which reached 11.4% and 7.6% on the 547th and 573th day, but did not exceed 0.1% in the samples taken at other times.

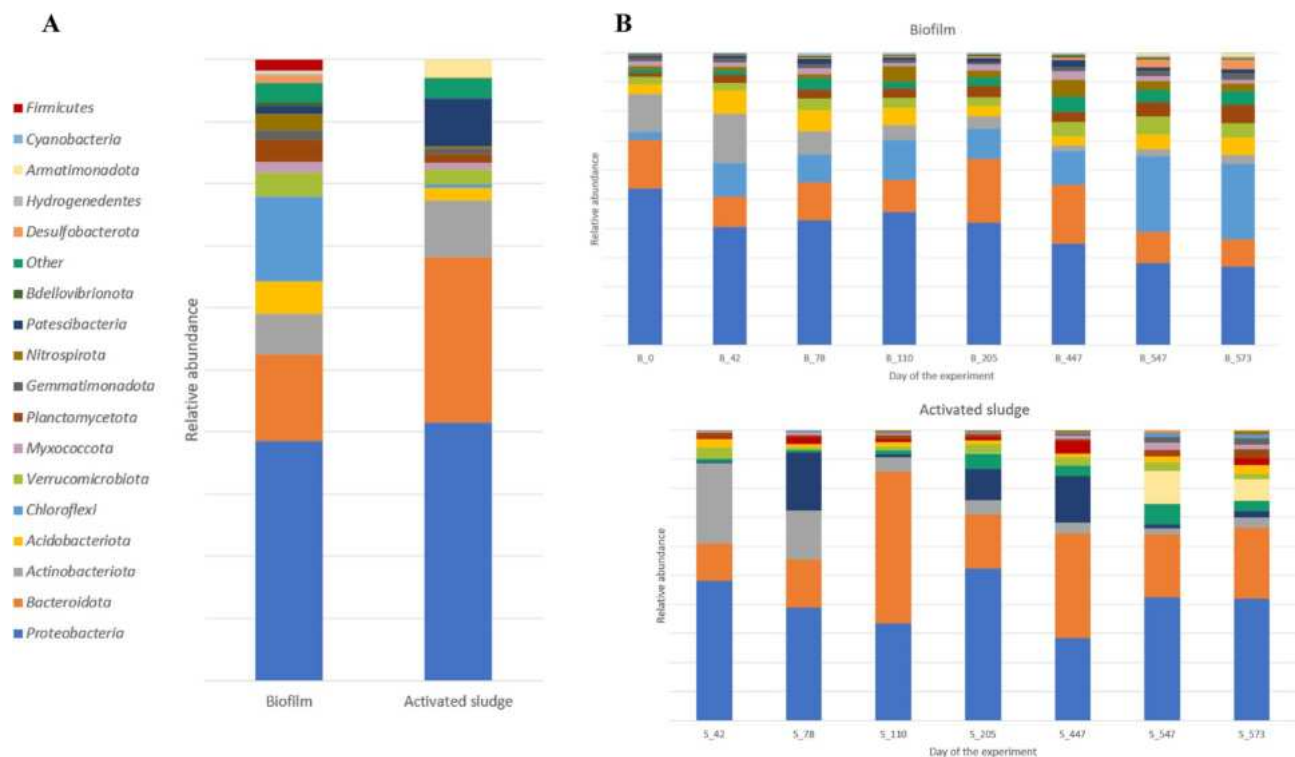


Figure 1. Relative abundance (%) of the most prevalent phyla in the biofilm and activated sludge samples in general, as the mean values of relative abundance from all biofilm and activated sludge samples (A), and in each individual sample (B). The graph shows only phyla which contributed more than 0.5% to the total bacterial community in at least one sample. The abundance of the remaining phyla was summed and labelled as "other".

At the genus level, the less abundant genera (each < 1.5% of the total bacterial community) combined to constitute the largest shares in all samples of biofilm and activated sludge samples (mean abundance of $45.6\% \pm 5.8$ and $30.5\% \pm 6.0$, respectively). Initially, *Ornithinibacter* was relatively abundant in the biofilm, which is the reason for its fairly large mean abundance of $4.3\% \pm 5.3\%$. Over time, however, the abundance of this group decreased substantially, and at the end of the process, it was only 0.3%. Similarly, the abundance of *Rhizorhapis* was 13.92% in the first sample, but then it decreased and this genus was not detected after the 205th day. The changes in the abundance of *Nitrospira* and *Candidatus Competibacter* are also noteworthy, first increasing and then decreasing. *Nitrospira* was most abundant in the sample from 447th day (5.7%), and *Candidatus Competibacter*, in the sample from 110th day (6.4%). The abundance of the remaining genera did not exceed 5% at any time during this study.

In the samples of activated sludge, the abundance of *Ornithinibacter* also decreased significantly at the beginning of the experiment (from 23.0% in the first sample and 12.5% on the 78th day to values below 3% in subsequent periods). Generally, the abundances of individual genera changed more rapidly in the activated sludge than in the biofilm. There were also rapid decreases and increases in the abundance of many groups of bacteria in the following periods, particularly in the case of uncultured *Saccharimonadales* and *Zoogloea*. Figure 3 shows groups of bacteria that differed significantly between biofilm and sludge samples. *Denitratisoma*, *Nitrospira*, *Candidatus Competibacter*, *Dechlorosoma*, *Candidatus Accumulibacter*, and *Kouleothrix* were significantly more abundant in the biofilm than in the biomass, while *Zoogloea*, uncultured *Saccharimonadales*, *Rhodobacter*, and *Ottowia* were significantly less abundant in the biofilm.

Bacterial diversity. Bacterial community indices were estimated using the EZBioCloud platform (Table 1). The average Good's coverage of all samples was $99.75\% \pm 0.04\%$, indicating that the sequencing coverage was very high. The total number of OTUs differed between samples and types of biomass. The mean number of OTUs was 1614 ± 141 for biofilm and 993 ± 109 for activated sludge. The Chao1 index was used to evaluate community richness, i.e., the number of species in the biofilm and activated sludge communities, and the Shannon index was used to measure community diversity, taking into account both the abundance and the evenness of the species. The mean values of these indices indicated that the biofilm community was richer and more diverse than the activated sludge community (Chao1: 1734.64 ± 138.59 vs. 1105.72 ± 138.59 ; Shannon: 5.34 ± 0.23 vs. 4.27 ± 0.41). The differences between communities were all statistically significant ($P < 0.05$).

Figure 4 shows the results of beta diversity analysis based on the Bray–Curtis dissimilarity. Principal Coordinates Analysis showed that the biofilm and activated sludge samples grouped into two separate clusters, although the distances between individual samples were quite large. Hierarchical analysis indicated the development of biofilm and activated sludge was independent and confirmed the distance of the differences between these two types of biomass.

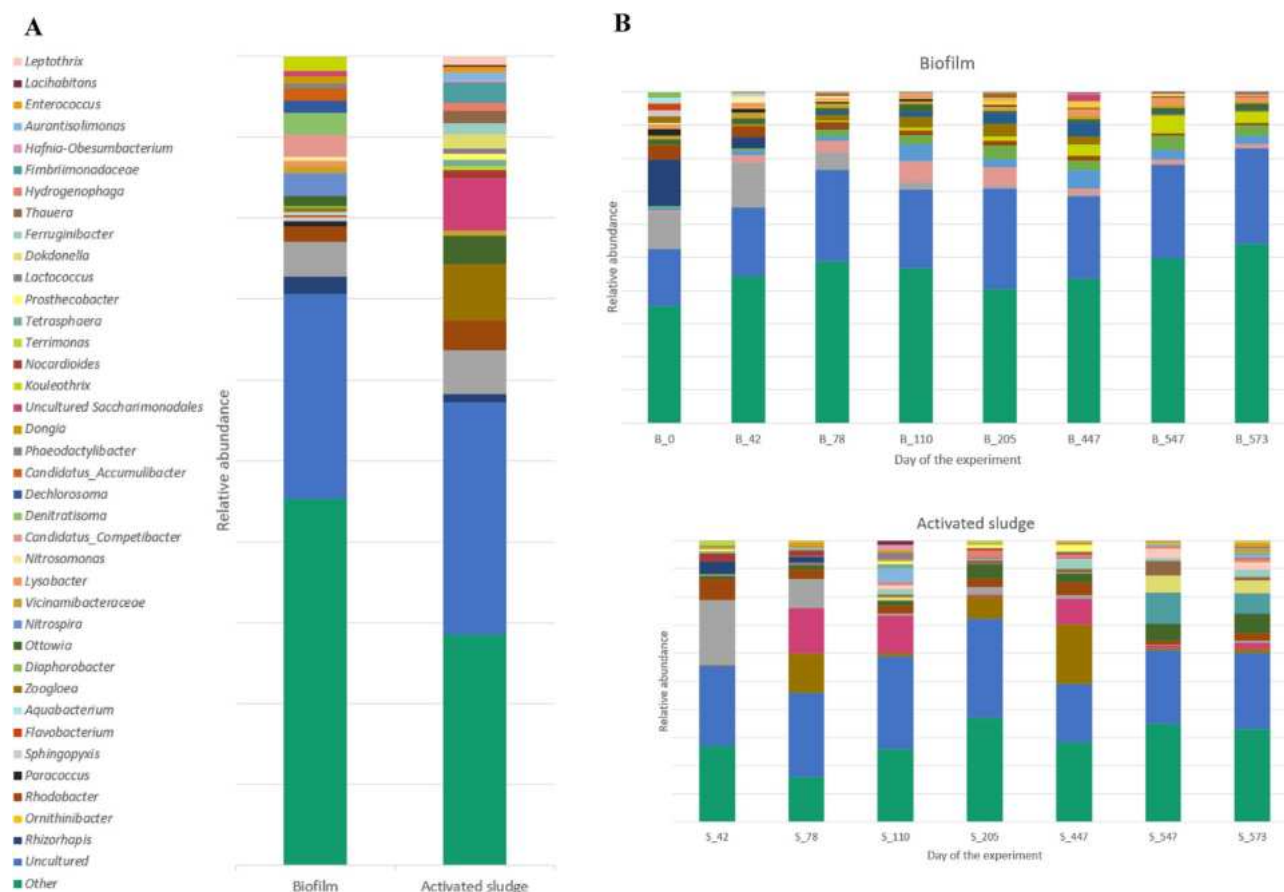
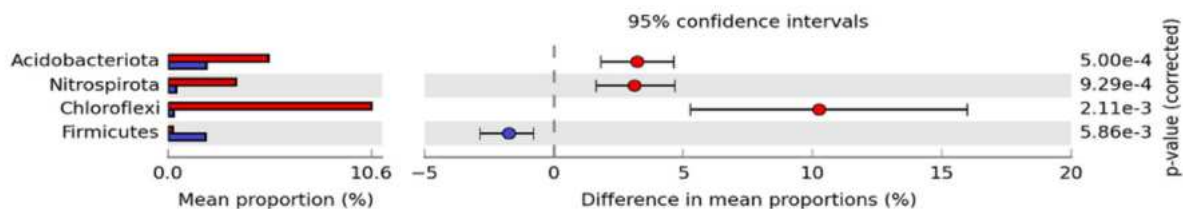


Figure 2. Relative abundance (%) of the most prevalent genera in the biofilm and activated sludge samples in general, as the mean values of relative abundance from all biofilm and activated sludge samples (A), and in each individual sample (B). The graph shows only genera which contributed more than 1.5% to the total bacterial community in at least one sample. The abundance of the remaining genera was summed and labelled as "other".

To model interactions and relationships between bacteria in the biofilm and activated sludge, co-occurrence network analysis was used. In the present study, two networks were created that represent the co-occurrence of genera in the biofilm and activated sludge. In Figs. 5 and 6, the color of each node is based on its modularity class parameter, and its size is based on its betweenness centrality. The basic parameters characterizing both networks are presented in Table S1. In general, the biofilm network had more connections between nodes than the activated sludge network, and the distance between nodes was smaller in the biofilm network, indicating that the microorganisms creating the biofilm are more closely related and have more relationships between them. Both networks had the same number of nodes (83), but the biofilm network had more edges (connectors between nodes symbolizing co-occurrence). In both networks, the number of positive associations was slightly higher than that of negative associations, accounting for 55% of the total number of connections. The mean clustering coefficient (i.e., the ratio between the observed and the maximum possible number of links between a node and its neighbors) was higher for the biofilm than for the activated sludge (0.556 vs. 0.432). Similarly, the network density, which is the ratio between the observed number edges and the maximum possible number of them, was higher for the biofilm (0.073 vs. 0.05). The network diameter (the distance between the two most distant nodes) was shorter for the biofilm than for the biomass (6 vs. 7). Likewise, the average path length, which is the number of edges in the shortest path between pair of nodes, was shorter in the biofilm network than in the activated sludge network (1.984 vs. 2.241). The mean node degree (the number of edges between one node and other nodes in the network) was greater in the biofilm network than in the activated sludge network (6.012 vs. 4.12). Node degree ranged from 1 to 31 in the biofilm network and from 1 to 23 in the activated sludge network. In the biofilm network there were four nodes with the highest degrees (≥ 30) that can be considered hub nodes: *Diaphorobacter*, *Rhizorhapis*, *Mesorhizobium*, and *Pseudoxanthomonas*. These microorganisms had 61.5% positive and 38.5% negative connections with other microorganisms. Interestingly, although the abundance of *Mesorhizobium* and *Pseudoxanthomonas* was low (not exceeding 1.5% of the total bacterial community in any sample) they had positive associations with highly abundant bacteria, e.g., *Ornithinibacter*. The activated sludge network also had 4 hub nodes (with node degree ≥ 20): *Nocardioideis*, *Gemmatimonas*, *Leptothrix* and *Rhizorhapis*. These hub nodes were connected to other nodes by similar amounts of positive and negative edges (51.8% and 48.2%, respectively). The size of the nodes in the created networks is proportional to their betweenness centrality (a parameter that indicates the frequency of occurrence of a particular node on the paths between two other nodes). High values of betweenness centrality indicate that a node has a central location in a network, while low values

A



B

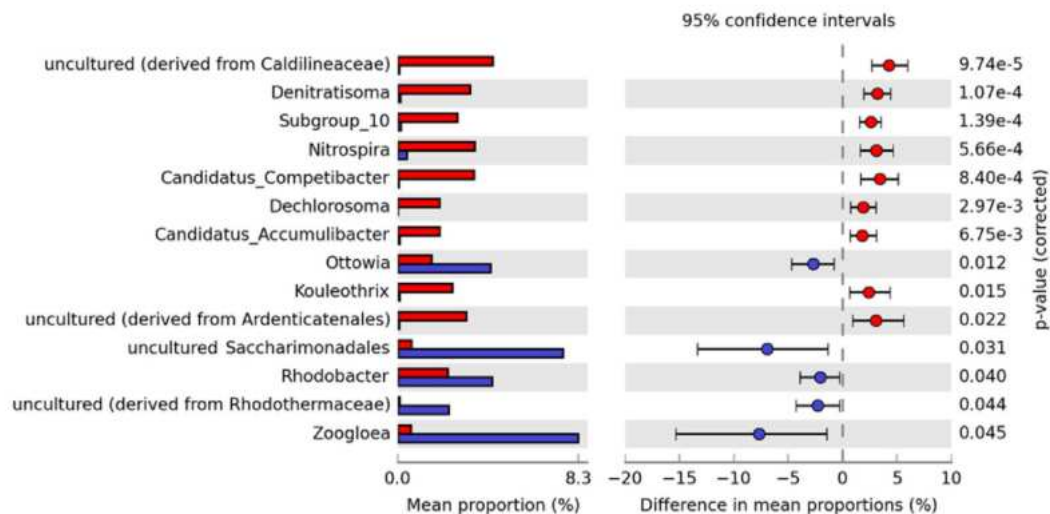


Figure 3. Mean proportions of microbial phyla (A) and genera (B) that differed significantly between biofilm (red) and sludge (blue) samples. Plots were made using Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) software. P-values and confidence intervals were calculated with White's nonparametric t-test.

Type of biomass	Sample Name	OTUs	Chao1	Shannon	Good's coverage of library (%)
Biofilm	B_0	1380	1538.80	4.87	99.63
	B_42	1567	1707.56	5.18	99.73
	B_78	1710	1836.02	5.51	99.72
	B_110	1660	1780.21	5.36	99.74
	B_205	1563	1652.45	5.35	99.79
	B_447	1557	1676.54	5.42	99.76
	B_547	1606	1685.47	5.43	99.76
	B_573	1869	2000.10	5.62	99.71
Mean		1614	1734.64	5.34	99.73
Activated sludge	S_42	1026	1121.76	3.69	99.74
	S_78	962	1088.88	3.90	99.79
	S_110	910	1008.95	4.09	99.81
	S_205	875	985.94	4.20	99.82
	S_447	911	1037.90	4.74	99.78
	S_547	1162	1280.44	4.55	99.72
	S_573	1108	1216.18	4.70	99.73
Mean		993	1105.72	4.27	99.77

Table 1. Estimates of diversity and richness indices for biofilm and activated sludge samples.

indicate that it has a peripheral location¹³. Microorganisms with high betweenness centrality play key roles and act like bridges between other bacteria in the network. In the biofilm network, *Paracoccus*, *Phaeodactylibacter*, and *Pseudoxanthomonas* had the highest values of betweenness centrality, whereas in the activated sludge network, *Dongia*, *Diaphorobacter*, and *Rhizorhapis* had the highest values.

The networks were constructed with additional nodes representing the efficiency of pollutant removal processes, i.e., removal of organic and phosphorus compounds, as well as denitrification, ammonification, and nitrification. In the biofilm network, the efficiencies of phosphorus compound removal and of nitrification had

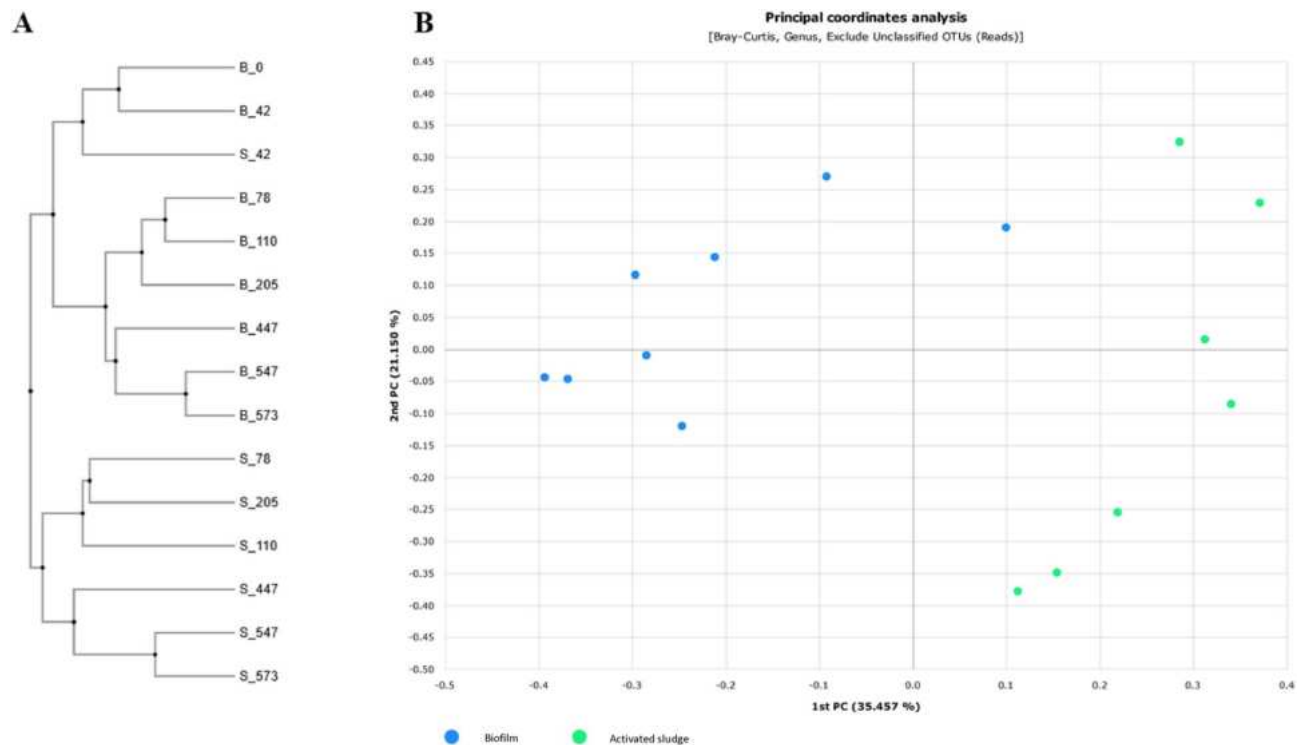


Figure 4. Hierarchical clustering and Principal Coordinates Analysis plot of biofilm (B) and sludge (S) samples.

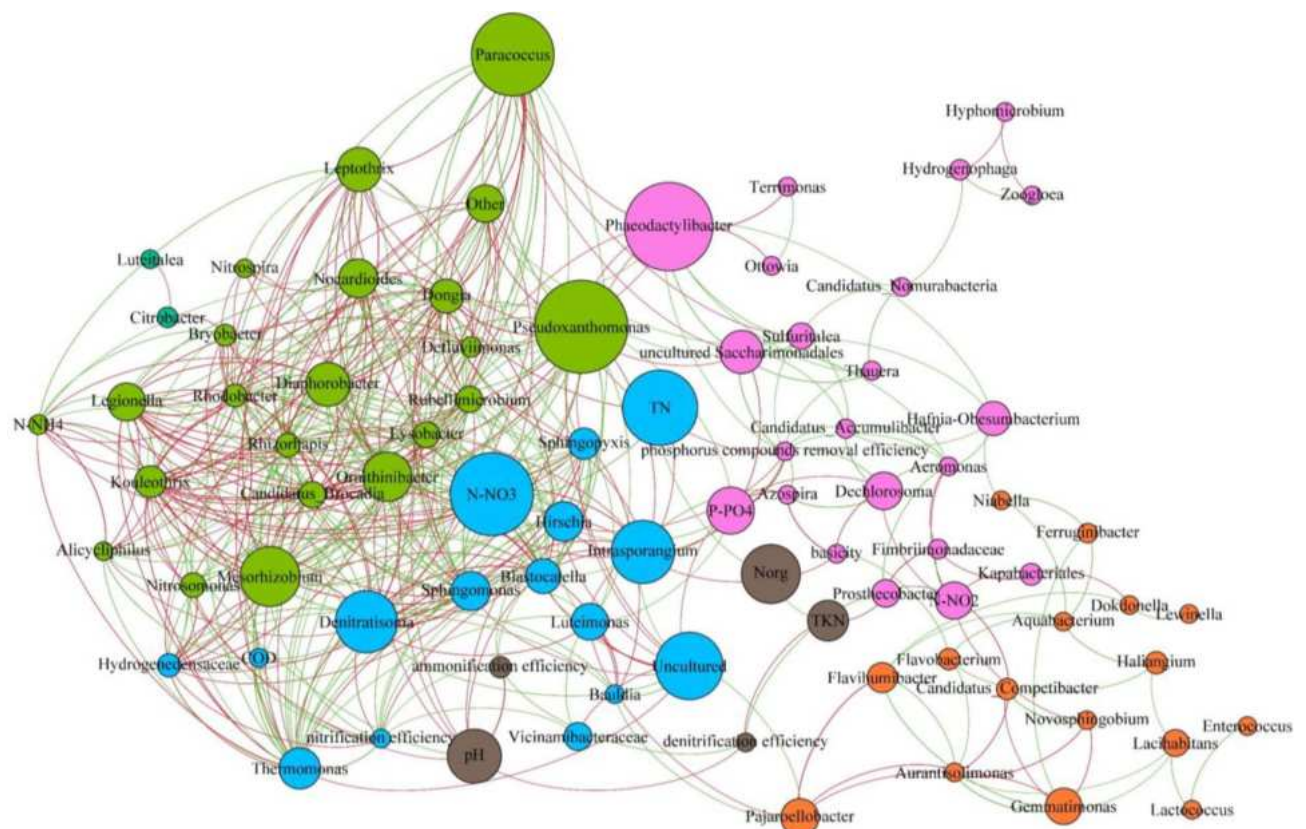


Figure 5. Network of the biofilm microbiome with nodes representing taxa at the genus level or efficiencies of pollutant removal and edges representing correlations (green edges—positive correlation; red edges—negative correlation).

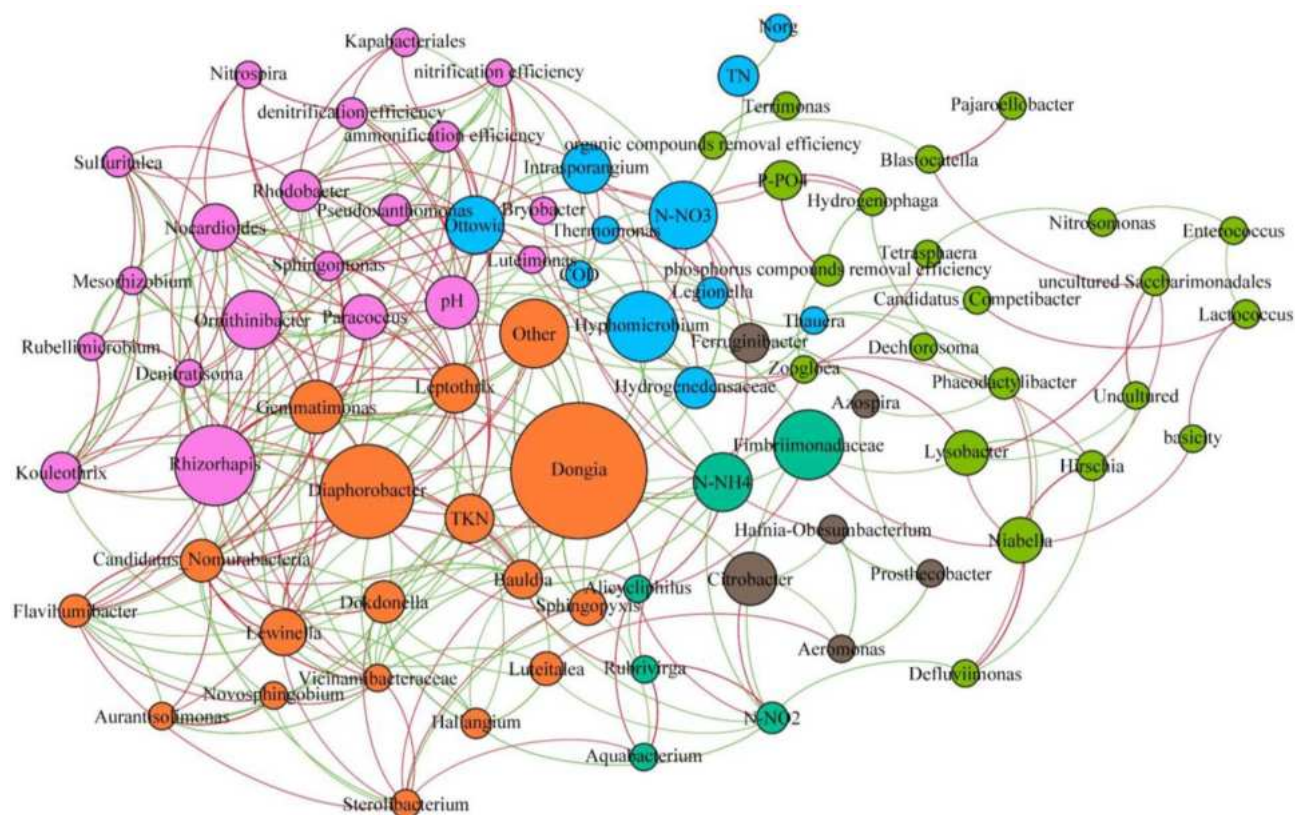


Figure 6. Network of the activated sludge microbiome with nodes representing taxa at the genus level or efficiencies of pollutant removal and edges representing correlations (green edges—positive correlation, red edges—negative correlation).

the most associations with microbial nodes (9 positive and 2 negative, and 6 positive and 4 negative, respectively). The efficiency of phosphorus removal was positively associated with the abundance of *Candidatus Accumulibacter*, *Dechlorosoma*, *Thauera*, and uncultured *Saccharimonadales*, while nitrification was positively associated with the abundance of taxa such as *Nitrosomonas*, *Sphingomonas*, and *Thermomonas*. The remaining efficiencies of pollutant removal had no or only 1–2 connections with microbial nodes. In the activated sludge network, in contrast, all efficiency nodes were connected with those of microbes, with degree ranging from 2 to 9. The nitrification and ammonification efficiency nodes had the highest degree and were positively associated with, for example, *Nocardioideis*, *Rhodobacter*, and *Sphingomonas*. Organic compound removal efficiency was positively associated with *Blastocatella*, *Ornithinibacter*, and *Terrimonas*, whereas in the biofilm network, it had no edges.

Discussion

The biodiversity of both forms of biomass was examined using the Chao1 and Shannon indices. In all samples, the values of both these indices were significantly higher in the biofilm. This finding is consistent with the results obtained by Dong et al.¹⁴ with a similar reactor; however, Jo et al.¹² obtained contrary results and did not observe similar differences. They speculated that this lack of differences might be caused by the fact that both flocks and biofilm result from microbial aggregation. On the other hand, biofilms have a layered structure and the conditions in each layer are a bit different, which is optimal for development of different groups of bacteria. This might be the reason why, in the present study, the biofilm community was richer and more diverse than that of the activated sludge.

Various aeration strategies were applied during the experiment, which influenced the growth of the microorganisms in the reactor. Apparently, the change in aeration strategy had a stronger effect on the activated sludge bacterial community than on the biofilm community. In PCoA analysis, the biofilm samples, except for the first sample, were clustered more tightly than the activated sludge samples. This finding indicates that the biofilm community is more resistant to changing environmental conditions than the activated sludge community. This resistance to change can be explained by the fact that biofilm is a complex bacterial structure and is surrounded by a layer of extracellular polymeric substances (EPS) produced by the microbes, which acts as a physical barrier protecting the bacterial cells from environmental stress.

In both types of biomass, *Proteobacteria* and *Bacteroidota* were the most abundant phyla. *Proteobacteria* are typically the most abundant group in bacterial communities in municipal wastewater treatment systems. This taxon has many subgroups, the most common of which is *Betaproteobacteria*, which are largely responsible for removal of organic matter and nutrients¹⁵. The next most abundant phyla in the biofilm were *Chloroflexi*, *Actinobacteriota* and *Acidobacteriota*. *Chloroflexi* are filamentous bacteria that favor the formation of microbiological

structures. Their filaments protrude from flocs and biofilm, which probably gives them better access to substrates in the surrounding liquid⁹ and is believed to provide scaffolds on which activated sludge flocs form^{16,17}. *Actinobacteriota*, as well as *Proteobacteria* and *Bacteroidota*, have been reported to be some of the core phyla that are widespread in wastewater treatment systems^{18,19}. *Acidobacteriota* are involved in P-removal and have the potential to utilize various organic compounds, including glucose, xylose, acetate, and fatty acids²⁰. After *Proteobacteria* and *Bacteroidota*, the next most abundant phyla in the activated sludge were *Actinobacteriota* and *Patescibacteria* (especially the uncultured *Saccharimonadales*). *Patescibacteria* have a small cell size and a reduced genome, which suggests that they are host-dependent syntrophs or parasitic²¹. Their small cell size might be advantageous in oligotrophic environments, due to their correspondingly increased surface-to-volume ratio²². The genus *Zooglea* was more abundant in activated sludge than in biofilm. *Zooglea* produce exopolysaccharides that participate in the formation of activated sludge flocs²³.

Network analysis revealed that positive associations between the abundance of taxa and the efficiency of nitrogen and phosphorus compound removal were more common in the biofilm community than in the activated sludge community. This may indicate that biofilm is a better environment for the growth of bacteria capable of decomposing these compounds. This hypothesis is also supported by the high abundance of certain groups of bacteria in the biofilm. For example, both the phylum *Nitrospirota* and the genus *Nitrospira* were significantly more abundant in the biofilm than in the activated sludge. *Nitrospirota* includes bacteria that oxidize nitrites to nitrates (NOB), as well as the recently discovered comammox bacteria (complete ammonia oxidizers), which can perform both steps of the nitrification process^{24,25}. It could suggest that in the biofilm the comammox process could be important in ammonia oxidation. *Nitrosomonas*, a representative of ammonia oxidizing bacteria (AOB), was also more abundant in the biofilm, but it was not as numerous as *Nitrospira*. The results of this study are similar to those of Shao et al.²⁶, who compared attached biofilm and activated sludge flocs in an Integrated Fixed-Film Activated Sludge—Sequencing Batch Biofilm Reactor (IFAS-SBR). *Nitrosomonas* had also negative association with anammox bacterium *Candidatus Brocadia*, which may be caused by the competition for the same substrate. Probably *Candidatus Brocadia* was abundant in deeper layers of a biofilm, where concentration of oxygen is low. Hosokawa et al.²⁷ reported that anammox bacteria occur together with *Patescibacteria*, however in our study this taxa was more abundant in the activated sludge. Perhaps this is an example of the cooperation of biofilm with activated sludge in a hybrid system. In the biofilm, denitrifiers were highly abundant, although they were also quite common in the activated sludge. From this group of microorganisms, *Denitratisoma*, *Rhodobacter* and *Dechlorosoma* were present in the biofilm, while *Rhodobacter* and *Thaurea* were present in the activated sludge.

Bai et al.²⁸ observed similar results and concluded that biofilm is a better environment than activated sludge for the development of *Denitratisoma*, *Rhodobacter* and *Dechlorosoma*, due to the longer solid retention time associated with biofilm. Interestingly, those authors also observed that there were more phosphorus accumulating organisms (PAO) in the activated sludge. This differs from the results of the present study, in which, for example, *C. Accumulibacter*, a PAO, was more abundant in the biofilm than in the activated sludge flocs. McIlroy et al.²⁹ reported that *Candidatus Competibacter* was also quite numerous in biofilm samples; this is a glycogen-accumulating organism that is believed to compete for resources with PAOs. Although associations between bacteria and efficiency of different pollutant removal were observed, there is no clear connection between bacteria and concentration of nitrogen forms. For instance, since *Nitrosomonas* oxidize ammonia, it can be expected that in the network, abundance of *Nitrosomonas* will be inversely proportional to the ammonia concentration and directly proportional to the nitrates concentration. However, such obvious dependencies did not occur in the analyzed network. The reason for this may be that in the tested system, different processes, carried out by many different groups of microorganisms, and affecting the concentration of individual forms of nitrogen, take place. Because many different groups of bacteria cooperate with each other in removing nitrogen compounds from wastewater, creating a kind of functional whole, it is difficult to determine the contribution of individual units in this process.

Although the number of nodes was similar in the biofilm and activated sludge networks, the number of interactions between nodes was greater in the biofilm network. These results indicate that the genera present in the biofilm interact with each other to a greater degree than those in the activated sludge. The correlations in the abundance of taxa were predominately positive in both types of biomass. A greater number of positive than negative correlations was also noted by Jo et al.¹² in their research, but the number of positive associations in their study (92% in the biofilm network and 75% in the activated sludge network) was much higher than in ours (55%). Based on their betweenness centrality, key taxa were identified in both networks. Microorganisms with high betweenness centrality often lie on the shortest path between two other nodes, and for this reason, they are considered important for the flow of information between community members³⁰. One of these key taxa in the biofilm network was *Paracoccus*, which is a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium that can also remove phosphorus³¹. Other groups of bacteria with high betweenness centrality were *Pseudoxanthomonas* (capable of removing nitrogen and phosphorus under aerobic conditions³² and *Phaeodactylibacter* (a denitrifier³³). In the activated sludge network *Dongia* and *Diaphorobacter* had the highest betweenness centrality; these taxa are involved in the transformation of nitrogen compounds^{27,34}. The differences between the biofilm and the activated sludge network also indicate that other bacteria may be responsible for the transformation of nitrogen compounds in these two environments. Network analysis and the high values of betweenness centrality of the mentioned above taxa suggest that even taxa with a low abundance might play important roles in the bacterial community. The role of such bacteria in wastewater treatment processes is not well known and requires further investigation.

Period (days)	Oxygen concentration (mg O ₂ /L)	Aeration strategy	Duration of periods with blower unit turned on ($t_{\text{withAer.}}$) and off ($t_{\text{withoutAer.}}$) during aerobic phases for intermittent aeration $t_{\text{withAer.}}/t_{\text{withoutAer.}}$ (min.)	Organic Loading Rate (g COD/m ³ d)
0–42	3.0	Continuous	–	540
43–78	3.0	Intermittent	40/10	540
79–110	2.0	Intermittent	30/10	540
111–205	1.5	Intermittent	30/10	540
206–447	1.5	Intermittent	20/10	540
448–547	1.5	Intermittent	20/10	360
548–573	1.5	Intermittent	20/10	540

Table 2. Reactor operating conditions.

Conclusions

This study compared the structures of the microbial communities in biofilm and activated sludge from an IFAS-MBSBBR hybrid reactor. The bacterial composition of the biofilm differed from that of the activated sludge, although some core groups of bacteria (*Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* and *Acidobacteriota*) were highly abundant in both types of biomass. The biofilm was more diverse in terms of bacterial composition and a better environment for the development of nitrifiers (e.g., *Nitrospira*, *Nitrosomonas*) and phosphorus accumulating organisms (*C. Accumulibacter*). The bacteria in the biofilm network had more connections with each other than those in the activated sludge network. Furthermore, in the biofilm network, more bacteria were connected with nitrogen and phosphorus removal efficiency, which indicates that biofilm might play a larger role in the removal of these pollutants. Network analysis also revealed that even bacteria with low abundance might play important roles in the community, although these roles require further investigation. A better understanding of the contribution of these taxa will provide a more complete picture of these complex communities and the relationships between the bacteria that create them.

Materials and methods

Description of the IFAS-MBSBBR reactor and operating conditions. The study was conducted in a laboratory model of a sequencing batch reactor with an active volume of 28 L in which microorganisms developed in the form of activated sludge, and biofilm on EvU-Perl moving bed (Integrated Fixed-Film Activated Sludge—Moving-Bed Sequencing Batch Biofilm Reactor—IFAS-MBSBBR). The cylindrical carriers with dimensions of $\Phi 5$ mm, $h = 8$ mm, and specific surface area of 600 m²/m³ constituted 25% of the active volume of the reactor. The concentration of activated sludge was maintained at a level of approximately 1.7 g MLSS/L. The operation of IFAS-MBSBBR was fully automated and controlled through DreamSpark Premium software (SCADA system). Wastewater was supplied to the reactor by means of a peristaltic pump Ismatec Ecoline, and its content was stirred with a slow-speed paddle mixer CAT R-50D. Oxygen concentration was measured by an optical probe Oxymax COS61D cooperating with a transmitter Liguline CM 442. The system operated in an air-conditioned room, ensuring 20°C temperature in the reactor.

The reactor was supplied with synthetic wastewater simulating the composition of municipal wastewater. The following wastewater characteristics were assumed: COD 510 mg O₂/L, TN 60 mg N/L, N-NH₄⁺ 40 mg N-NH₄⁺/L, P-PO₄³⁻ 8 mg P-PO₄³⁻/L, pH 7.7. Their preparation employed peptone (135 mg/L), starch (45 mg/L), glucose (45 mg/L), glycerine (0.0495 ml/L), ammonium acetate (225 mg/L), NaHCO₃ (125 mg/L), Na₂HPO₄ (15 mg/L), and KH₂PO₄ (4.5 mg/L).

The reactor operated in a system of 3 eight-hour cycles per day. A single treatment cycle involved the following phases: I phase without aeration with wastewater dosing (50 min), I phase with aeration (190 min), II phase without aeration with wastewater dosing (30 min), II aerobic phase (150 min), sedimentation (50 min), decantation (10 min). During 573 days of the experiment duration, periods with blower unit turned off were introduced in aerobic phases to obtain an intermittent aeration strategy, or oxygen concentration was changed. Moreover, between the 447 and 547th research day, the contamination load of the reactor was decreased through a decrease in wastewater dose from 10 L/d to 6.6 L/d (Table 2). Samples of infow and outflow water were collected between December 2018 and June 2020. Chemical analysis was carried out according to standard methods (Table_S2).

DNA extraction. Biomass samples for microbiological tests were collected from biofilm and activated sludge at specified intervals from December 2018 to June 2020. The samples were stored at -25° C. DNA was isolated from 200 ng of biomass (both activated sludge and biofilm) using a FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). The isolation procedure was performed according to the manufacturer's instructions. A Qubit fluorometer (Invitrogen, USA) was used to measure the amount of isolated DNA. The obtained DNA was stored at -18 °C until further analysis.

High-throughput 16S rRNA gene sequencing. High-throughput Illumina sequencing targeting the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was performed with S-d-Bact-0341-b-S-17 and S-d-Bact-0785-a-A-21 primers³⁵ and NEBNext®High-Fidelity 2X PCR Master Mix (Bio Labs inc., USA) following the manufacturer's manual. The sequencing reactions were carried out with a MiSeq sequencer and a MiSeq Reagent Kit V2 (Illu-

mina, USA) by applying paired-end technology with read lengths of 2×250 bp following the manufacturer's protocols.

Sequencing data analysis. Raw paired-end sequences were processed using the QIIMEII³⁶ software package. Paired-end sequences were merged using the fast-join algorithm. Reads that software could not merge were excluded from further analyses. The filtering process quality score ($q < 20$) was obtained using the Cutadapt algorithm³⁷. Chimeric sequences were detected and excluded from analyses using USEARCH³⁸. 16S rRNA OTUs were picked from the Illumina reads using a closed-reference OTU picking protocol against the SILVA_V_138 database³⁹. Sequences were clustered at 97% identity and trimmed to span only the 16S rRNA V4 region flanked by the sequencing primers. Taxonomy assignments were associated with OTUs based on the taxonomy associated with the SILVA_V_138 reference sequence defining each OTU.

Statistical analysis. Statistical comparison of biofilm and activated sludge samples was made using STAMP software (Statistical Analysis of Metagenomics Profiles (<http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>))⁴⁰. Significance was determined with White's non-parametric t-test. Results with $P < 0.05$ were considered significant.

Bacteria co-occurrence networks were created based on a correlation analysis of the taxonomic profiles⁴¹. For the analysis, the most abundant taxa in the studied metagenomes were selected. Spearman's correlation analysis (with a significance threshold of $\alpha = 0.05$) was carried out using STATISTICA v.13.1 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Networks were plotted only for strongly correlated taxa (with correlation coefficients higher than 0.75 or lower than -0.75). The correlation matrices obtained in this way were used to create networks using Gephi software⁴². Alpha and beta diversity analysis were performed with the use of EZBioCloud platform⁴³.

Data availability

The sequences reads were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the accession number PRJNA793374.

Received: 25 April 2022; Accepted: 12 July 2022

Published online: 22 July 2022

References

1. Sytek-Szmeichel, K., Podedworna, J. & Zubrowska-Sudol, M. Efficiency of wastewater treatment in SBR and IFAS-MBSBBR systems in specified technological conditions. *Water Sci. Technol.* **73**(6), 1349–1356. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.611> (2016).
2. Kim, Y. K. *et al.* The capacity of wastewater treatment plants drives bacterial community structure and its assembly. *Sci. Rep.* **9**(1), 14809. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50952-0> (2019).
3. Nilusha, R. T., Yu, D., Zhang, J. & Wei, Y. Effects of solids retention time on the anaerobic membrane bioreactor with yttria-based ceramic membrane treating domestic wastewater at ambient temperature. *Membranes* **10**(9), 196. <https://doi.org/10.3390/membranes10090196> (2020).
4. Roots, P. *et al.* Pushing the limits of solids retention time for enhanced biological phosphorus removal: Process characteristics and *Accumulibacter* population structure. *Water Sci. Technol.* **82**(8), 1614–1627. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.437> (2020).
5. Cotto, I. *et al.* Long solids retention times and attached growth phase favor prevalence of comammox bacteria in nitrogen removal systems. *Water Res.* **169**, 115268. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115268> (2020).
6. Mahendran, B., Lishman, L. & Liss, S. N. Structural, physicochemical and microbial properties of flocs and biofilms in integrated fixed-film activated activated sludge (IFFAS) systems. *Water Res.* **46**(16), 5085–5101. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.058> (2012).
7. Wu, L. *et al.* Denitrifying biofilm processes for wastewater treatment: Developments and perspectives. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **7**, 40–67. <https://doi.org/10.1039/D0EW00576B> (2021).
8. Tavakoli, S. & Yoosheph, S. Learning a mixture of microbial networks using minorization-maximization. *Bioinformatics* **35**(14), i23–i30. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz370> (2019).
9. Ziegler, A. S. *et al.* Dynamics of the fouling layer microbial community in a membrane bioreactor. *PLoS ONE* **11**(7), e0158811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158811> (2016).
10. Rehman, Z. U., Fortunato, L., Cheng, T. & Leiknes, T. Metagenomic analysis of sludge and early-stage biofilm communities of a submerged membrane bioreactor. *Sci. Total Environ.* **701**, 134682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134682> (2020).
11. Miura, Y. *et al.* Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. *Water Res.* **41**(3), 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.005> (2007).
12. Jo, S. J., Kwon, H., Jeong, S. Y., Lee, C. H. & Kim, T. G. Comparison of microbial communities of activated sludge and membrane biofilm in 10 full-scale membrane bioreactors. *Water Res.* **101**, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.042> (2016).
13. Ma, Q. *et al.* Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresour. Technol.* **179**, 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.041> (2015).
14. Dong, B. *et al.* Linking nitrification characteristic and microbial community structures in integrated fixed film activated sludge reactor by high-throughput sequencing. *Water Sci. Technol.* **74**(6), 1354–1364. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.312> (2016).
15. Nascimento, A. L. *et al.* Sewage sludge microbial structures and relations to their sources, treatments, and chemical attributes. *Front. Microbiol.* **9**, 1462. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01462> (2018).
16. Speirs, L., Rice, D., Petrovski, S. & Seviour, R. J. The phylogeny, biodiversity, and ecology of the *Chloroflexi* in activated sludge. *Front. Microbiol.* **10**, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02015> (2019).
17. Nierychlo, M. *et al.* The morphology and metabolic potential of the *Chloroflexi* in full-scale activated sludge wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy228> (2019).
18. Azari, M., Jurnalis, A. & Denecke, M. The influence of aeration control and temperature reduction on nitrogen removal and microbial community in two anammox-based hybrid sequencing batch biofilm reactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **96**, 3358–3370. <https://doi.org/10.1002/jctb.6889> (2021).
19. Begmatov, S. *et al.* The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow. *Sci. Rep.* **12**(1), 3458. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07132-4> (2022).
20. Kristensen, J. M., Singleton, C., Clegg, L. A., Petriglieri, F. & Nielsen, P. H. High diversity and functional potential of undescribed “*Acidobacteriota*” in Danish wastewater treatment plants. *Front. Microbiol.* **12**, 643950. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643950> (2021).

21. Singleton, C. M. *et al.* Connecting structure to function with the recovery of over 1000 high-quality metagenome-assembled genomes from activated sludge using long-read sequencing. *Nat. Commun.* **12**(1), 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22203-2> (2009).
22. Herrmann, M. *et al.* Predominance of *Cand. Patescibacteria* in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions. *Front. Microbiol.* **10**, 1407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01407> (2019).
23. An, W. *et al.* Comparative genomics analyses on EPS biosynthesis genes required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria. *Water Res.* **102**, 494–504. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.058> (2016).
24. Daims, H. *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **528**(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461> (2015).
25. van Kessel, M. A. *et al.* Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* **528**(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459> (2015).
26. Shao, Y., Shi, Y., Mohammed, A. & Liu, Y. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **116**, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.026> (2017).
27. Hosokawa, S. *et al.* Cometabolism of the superphylum *Patescibacteria* with anammox bacteria in a long-term freshwater anammox column reactor. *Water* **13**, 208. <https://doi.org/10.3390/w13020208> (2021).
28. Bai, Y., Zhang, Y., Quan, X. & Chen, S. Nutrient removal performance and microbial characteristics of a full-scale IFAS-EBPR process treating municipal wastewater. *Water Sci. Technol.* **73**(6), 1261–1268. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.604> (2016).
29. McIlroy, S. J. *et al.* 'Candidatus Competibacter'-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity. *ISME J.* **8**(3), 613–624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.162> (2014).
30. Costa, A. *et al.* Ecological networks: Pursuing the shortest path, however narrow and crooked. *Sci. Rep.* **9**(1), 17826. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54206-x> (2019).
31. Medhi, K., Mishra, A. & Thakur, I. S. Genome sequence of a heterotrophic nitrifier and aerobic denitrifier, *Paracoccus denitrificans* strain ISTOD1, isolated from wastewater. *Genome Announc.* **6**(15), e00210–e218. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00210-18> (2018).
32. Rajta, A., Bhatia, R., Setia, H. & Pathania, P. Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *J. App. Microbiol.* **128**(5), 1261–1278. <https://doi.org/10.1111/jam.14476> (2020).
33. Li, Y., Wu, Y., Wang, S. & Jia, L. Effect of organic loading on phosphorus forms transformation and microbial community in continuous-flow A2/O process. *Water Sci. Technol.* **83**(11), 2640–2651. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.158> (2021).
34. Khardenavis, A. A., Kapley, A. & Purohit, H. J. Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**(2), 403–409. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1176-5> (2007).
35. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41**(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808> (2013).
36. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9> (2019).
37. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J* **17**(1), 10–12. <https://doi.org/10.1480/ej.17.1.200> (2011).
38. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**(19), 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461> (2010).
39. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* **41**(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219> (2013).
40. Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P. & Beiko, R. G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494> (2014).
41. Ofiteru, I. D. *et al.* Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 15345–15350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000604107> (2010).
42. Bastian M., Heymann S. & Jacomy M. Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. International AAAI Conference on Weblogs and Social Media. <https://gephi.org/publications/gephi-bastian-feb09.pdf> (2009).
43. Yoon, S. H. *et al.* Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol.* **67**(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755> (2017).

Acknowledgements

This work was funded by the Polish National Science Centre No. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

Author contributions

M.G.: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing—Original Draft. M.Z.-S.: Conceptualization, Methodology, Writing—review and editing. J.W.: Investigation, Writing—review and editing. S.C.: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing—review and editing.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16570-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Development of microbial communities in biofilm and activated sludge in a hybrid reactor

Martyna Godzieba^{1*}, Monika Zubrowska-Sudol², Justyna Walczak², Sławomir Ciesielski¹

¹ University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Department of Environmental Biotechnology, Sloneczna 45G, 10-709 Olsztyn, Poland

² Warsaw University of Technology, Faculty of Building Services, Hydro and Environmental Engineering, Department of Water Supply and Wastewater Treatment, Nowowiejska 20, 00-653 Warsaw, Poland

* Corresponding author. E-mail address: martyna.godzieba@uwm.edu.pl

Table S1. Biofilm and activated sludge network statistics

	Biofilm network	Activated sludge network
Number of nodes	83	83
Number of edges	499	342
Positive correlations	275	190
Negative correlations	224	152
Network density	0.073	0.05
Modularity	0.306	0.416
Average degree	6.012	4.12
Average clustering coefficient	0.556	0.432
Average path length	1.984	2.241
Network diameter	6	7

Table S2. Chemical analysis of influent and effluent

Influent														Effluent							Load			Efficiency					
	COD	TN	N-NH ₄	N-NO ₂	N-NO ₃	N _{org}	TKN	P-PO ₄	pH	basicity	COD	N	N-NH ₄	N-NO ₂	N-NO ₃	N _{org}	TKN	P-PO ₄	pH	basicity	COD	N-NH ₄	P-PO ₄	ΔCOD	ΔN	ΔN-org	ΔTKN	ΔP-PO ₄	
	[mgO ₂ /l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgP/l]	[-]	[mval/l]	[mgO ₂ /l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgN/l]	[mgP/l]	[-]	[mval/l]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]	[mg/l/d]
Biofilm	B_0	492	65.10	41.90	0.002	1.580	21.618	63.518	7.21	7.61	8.3	35.2	15.50	0.20	0.090	12.90	2.31	2.51	3.90	7.70	5.3	530.9	66.1	7.8	492.9	53.5	20.8	65.8	3.6
	B_42	552	64.50	37.93	0.009	2.480	24.081	62.011	7.18	7.60	8.5	16.5	12.40	0.57	0.045	10.40	1.39	1.96	7.19	7.53	5.2	595.7	65.4	7.7	577.9	56.2	24.5	64.8	0.0
	B_78	523	67.30	41.00	0.012	1.650	24.638	65.638	7.43	7.75	7.2	18.4	14.00	0.32	0.025	12.20	1.46	1.78	1.11	7.53	4.7	564.4	69.3	8.0	544.5	57.5	25.0	68.9	6.8
	B_110	509	63.65	39.50	0.013	1.880	22.257	61.757	6.77	7.84	7.9	18.3	12.40	0.44	0.018	9.32	2.62	3.06	2.23	7.59	4.3	549.3	63.8	7.3	529.5	55.3	21.2	63.3	4.9
	B_205	517	57.90	36.75	0.005	1.780	19.365	56.115	7.74	7.86	7.0	10.4	6.88	0.47	0.015	5.06	1.34	1.81	0.06	7.72	4.5	557.9	59.1	8.4	546.7	55.1	19.5	58.6	8.3
	B_447	514	61.40	39.52	0.013	1.180	20.687	60.207	7.93	7.69	7.8	16.9	5.63	0.82	0.032	4.27	0.51	1.33	0.32	7.69	4.7	554.7	64.4	8.6	536.4	60.2	21.8	63.5	8.2
	B_547	511	61.00	40.44	0.015	0.296	20.249	60.689	7.61	8.15	8.2	15.8	13.70	1.02	0.264	8.84	3.58	4.60	3.39	9.09	5.0	551.4	61.6	8.2	534.4	51.0	18.0	60.5	4.6
	B_573	513	57.10	36.25	0.011	0.890	19.949	56.199	7.62	7.77	7.5	8.27	6.37	1.18	0.443	3.73	1.02	2.20	0.16	8.03	4.5	553.6	59.5	8.2	544.7	54.7	20.4	58.3	8.1
Activated sludge	S_42	552	64.50	37.93	0.009	2.480	24.081	62.011	7.18	7.60	8.5	16.5	12.40	0.57	0.045	10.40	1.39	1.96	7.19	7.53	5.2	595.7	65.4	7.7	577.9	56.2	24.5	64.8	0.0
	S_78	523	67.30	41.00	0.012	1.650	24.638	65.638	7.43	7.75	7.2	18.4	14.00	0.32	0.025	12.20	1.46	1.78	1.11	7.53	4.7	564.4	69.3	8.0	544.5	57.5	25.0	68.9	6.8
	S_110	509	63.65	39.50	0.013	1.880	22.257	61.757	6.77	7.84	7.9	18.3	12.40	0.44	0.018	9.32	2.62	3.06	2.23	7.59	4.3	549.3	63.8	7.3	529.5	55.3	21.2	63.3	4.9
	S_205	517	57.90	36.75	0.005	1.780	19.365	56.115	7.74	7.86	7.0	10.4	6.88	0.47	0.015	5.06	1.34	1.81	0.06	7.72	4.5	557.9	59.1	8.4	546.7	55.1	19.5	58.6	8.3
	S_447	514	61.40	39.52	0.013	1.180	20.687	60.207	7.93	7.69	7.8	16.9	5.63	0.82	0.032	4.27	0.51	1.33	0.32	7.69	4.7	554.7	64.4	8.6	536.4	60.2	21.8	63.5	8.2
	S_547	511	61.00	40.44	0.015	0.296	20.249	60.689	7.61	8.15	8.2	15.8	13.70	1.02	0.264	8.84	3.58	4.60	3.39	9.09	5.0	551.4	61.6	8.2	534.4	51.0	18.0	60.5	4.6
	S_573	513	57.10	36.25	0.011	0.890	19.949	56.199	7.62	7.77	7.5	8.27	6.37	1.18	0.443	3.73	1.02	2.20	0.16	8.03	4.5	553.6	59.5	8.2	544.7	54.7	20.4	58.3	8.1

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Martyna Godzieba

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Kandydata

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu. Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 55 %.

Martyna Godzieba

(podpis)

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, recenzowaniu i edycji tekstu, merytorycznym nadzorze pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.



(podpis)

Gdańsk, 12.05.2025 r

(miejscowość, data)

dr inż. Dominika Sobotka

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, pozyskaniu i interpretacji wyników technologicznych, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (rozdziały 2.1, 2.2, 3.1), graficznym opracowaniu wyników (ryc. 1 i 2), recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.



Signed by /
Podpisano przez:

Dominika Sobotka
Politechnika
Gdańska

Date / Data: 2025-
05-12 18:45

(podpis)

Gdańsk, 30.042025 r.

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Jacek Mąkinia

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, merytorycznym nadzorze pracy, recenzowaniu i edycji tekstu, pozyskaniu środków finansowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.



Signed by /
Podpisano przez:

Jacek Albert
Mąkinia

Date / Data:
2025-04-30 07:17

(podpis)

WARSZAWA, 5.05.2025

(miejscowość, data)

dr Maciej Florczyk

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (rozdział 2.4), recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.

Maciej Florczyk

(podpis)

Gołenisk 30.04.2025

(miejscowość, data)

dr inż. Przemysław Kowal

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

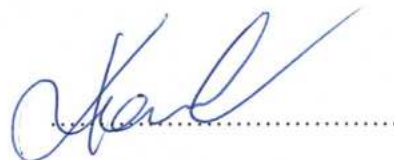
OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Florczyk, M., Kowal, P., Sobotka, D., Mąkinia, J., Ciesielski, S. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, 114661 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, pozyskaniu i interpretacji wyników technologicznych, recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części prac badawczych (izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa), opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, analizie zależności pomiędzy wynikami badań technologicznych i mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.



(podpis)



Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data

Martyna Godzieba^a, Maciej Florczyk^a, Przemysław Kowal^b, Dominika Sobotka^b, Jacek Makinia^b, Sławomir Ciesielski^{a,*}

^a University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Geoengineering, Department of Environmental Biotechnology, Słoneczna 45G, Olsztyn 10-709, Poland

^b Gdansk University of Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering, Department of Sanitary Engineering, ul. Narutowicza 11/12, Gdansk 80-233, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Candidatus Brocadia
Cold anammox
Deammonification
Low temperature
Metagenomics
Microbial networks

ABSTRACT

The implementation of anaerobic ammonia removal has potential for reducing the operating costs in wastewater treatment plants. However, the application of this process in mainstream treatment presents various challenges, particularly due to the sensitivity of anammox bacteria to low temperatures. To address these challenges, changes in the bacterial community were investigated under decreasing temperatures (from 30 to 12 °C) within a deammonification process conducted in a 10-L sequencing batch reactor (SBR) over a period of 114 days. The aim of the study was to determine which groups of microorganisms are most strongly linked by ecological relationships with anammox bacteria and how these relationships change in response to decreasing temperature. Community dynamics were analyzed by combining metagenomics, network analysis, and specific process rates. The nitrification process was most efficient at 25 °C, as indicated by high values of the ammonia and nitrite utilization rate, and nitrate production rate, all of which declined as the temperature decreased. In contrast, the activity and abundance of anammox bacteria remained stable throughout all phases of the experiment. The decreasing temperature negatively impacted *Nitrospira* bacteria, the main competitors of anammox in the deammonification system. Despite the reduced process efficiency, the SBR maintained stable functionality even at temperatures as low as 12 °C. Network analysis identified which bacterial groups most frequently co-occurred and interacted, as well as those most sensitive to temperature fluctuations. Among the bacterial nodes, *Nitrospira*, *Phycisphaerae*, and *Prostheobacter* exhibited the highest degree of connectivity, suggesting that they participate in multiple interactions, such as metabolite exchange, cooperation, or competition. Nevertheless, the temperature node had a greater number of connections than any bacterial node, indicating that this environmental factor had a more important effect on microbial community formation than direct ecological relationships. These results contribute to a comprehensive understanding of the role of anammox bacteria in deammonification systems, their ecological interactions within microbial networks, and their activity under suboptimal temperature conditions, which is crucial for future practical applications.

1. Introduction

A traditional and widely used method of wastewater treatment is based on the nitrification-denitrification process. However, despite its simplicity, this method has several disadvantages. In the first stage, aerobic nitrifying bacteria oxidize ammonia into nitrite and nitrate. This process requires intensive aeration, which results in high energy consumption [1]. In the next stage, denitrifying bacteria reduce nitrate to

dinitrogen gas, requiring an adequate amount of carbon compounds [2]. Many wastewater treatment plants (WWTPs) have an unfavorable carbon-to-nitrogen ratio for denitrifying bacteria, and it is necessary to provide an additional carbon source, like methanol, ethanol, or acetic acid, which increases operational costs [3].

To address these disadvantages, alternative methods have been developed based on the anaerobic ammonia oxidation (anammox) process. Deammonification is a two-step process, consisting of partial

* Corresponding author.

E-mail address: slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S. Ciesielski).

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114661>

Received 26 August 2024; Received in revised form 28 October 2024; Accepted 1 November 2024

Available online 6 November 2024

2213-3437/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

nitritation and anammox, in which ammonia is converted to nitrogen gas with some residual nitrate. An effective deammonification process depends on the presence of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and anammox bacteria. However, anammox bacteria grow slowly and are sensitive to environmental conditions. Additionally, the accumulation of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) can inhibit the anammox process by competing with anammox bacteria. Therefore, controlling wastewater treatment parameters to inhibit NOB without harming AOB and anammox bacteria is crucial [4]. One of the basic parameters that must be controlled to achieve a stable deammonification process is the dissolved oxygen (DO) concentration. Intermittent aeration at low DO levels favors AOB over NOB while promoting anammox activity during non-aerated phases [5,6]. Temperature is another critical factor for anammox bacteria. In the natural environment, anammox bacteria are found across a wide temperature range, including aquatic ecosystems, both marine and freshwater, as well as arctic areas [7]. These observations suggest the potential use of anammox bacteria in various types of wastewater treatment systems. However, in practice, anammox bacteria show maximum activity at temperatures of 30–37 °C [8], which is typical for sidestream treatment systems. Recently, there has been growing interest in "cold anammox" processes between 5 and 15 °C [9, 10]. Developing stable deammonification methods at low temperatures would facilitate their use in higher latitudes and mainstream applications [11].

Although anammox bacteria are able to adapt to lower temperatures (10–12 °C) to some extent [12], this adaptation results in reduced growth and metabolic rates [13]. Previous studies have indicated that a temperature drop from 30 °C to 10–15 °C can lead to a tenfold decrease in anammox activity [13]. Temperature changes can also shift the structure of anammox communities. For example, Li et al. [14] observed a shift from *Candidatus* Brocadia to *Candidatus* Kuenenia as the dominant anammox genus in response to a temperature decrease in an SBR.

Most studies focus on the impact of temperature reduction on anammox bacteria population and activity. However, nitrogen-converting bacteria in WWTPs form a complex ecosystem with interconnected ecological relationships. Changes in environmental conditions can affect the number and activity of different bacterial groups both directly and indirectly. For example, a temperature decrease may reduce the abundance of one bacterial group, thereby influencing another group linked through ecological relationships [15]. Therefore, holistically analyzing the bacterial community in WWTPs is essential to consider all interdependencies. Thanks to the development of next-generation sequencing (NGS) methods, particularly metagenomics, it has become possible to investigate ecological relationships within complex microbiomes. Metagenomic sequencing generates vast amounts of data, and selecting relevant information requires the use of appropriate methods, such as correlation analysis of the co-occurrence of different taxa [16]. Correlated taxa are represented in the form of a network illustrating the bacterial community. Network analysis can be particularly useful for studying the microbial community of wastewater treatment plants, as it provides the opportunity to incorporate operational factors or performance indicators into the network. This approach makes it possible to observe how changes in various technological parameters affect individual bacterial groups and determine which groups contribute most to the removal of pollutants [17].

The objectives of this work were to (i) describe changes in bacterial community composition due to temperature changes, (ii) identify the dominant bacterial groups involved in nitrogen transformation, and (iii) determine the ecological relationships among them. It has been hypothesized that a gradual reduction in temperature allows anammox bacteria to adapt, maintaining their activity and abundance, while negatively affecting competing bacterial populations. This advantage would strengthen anammox bacteria's position in the ecosystem.

To achieve these goals, metagenomic sequencing was employed to identify metagenomic assembled genomes (MAGs) of nitrogen-converting bacteria and determine their functional roles in the

wastewater treatment process. Network analysis was used to identify bacterial groups that frequently co-occur and interact. This application of social network analysis in microbiome research provides insights into both microbial composition and ecological relationships. The data obtained through the combination of metagenomics and co-occurrence network analysis were interpreted alongside specific process rates, providing novel insight into the effect of temperature reduction on microbial community dynamics and changes in ecological dependencies within the reactor microbiome. Comprehensive knowledge of anammox bacteria's environmental requirements, roles, and position in the ecosystem can facilitate their implementation in mainstream treatment. Additionally, the use of network analysis can help identify bacteria that compete or cooperate with anammox bacteria. Our research brings a new perspective to the study of the deammonification process, showing that not only the microbiological composition but, above all, the changing interactions between microorganisms are crucial for the efficiency of this process at low temperatures. This allows us to better understand the mechanisms supporting the activity of anammox under suboptimal temperature conditions, which is important for future technological applications.

2. Materials and methods

2.1. Experimental set-up and operating conditions

The impact of temperature on anammox bacteria in the deammonification process was investigated in a 10-L plexiglass SBR over a period of 118 days. The reactor was inoculated with anammox-enriched biomass obtained from a full-scale sidestream treatment system at a large municipal WWTP in Słupsk (200,000 PE) in northern Poland. The SBR was equipped with a mixer and placed in a thermostatic water jacket to maintain the temperature at the desired levels. Control systems were also installed for aeration and pH.

The process temperature was decreased according to the following phases, each maintained until process stabilization (verified based on the measured process rates): 30 °C (20 days), 25 °C (23 days), 20 °C (21 days), 15 °C (35 days), and 12 °C (19 days). Each week, during a single SBR cycle, mixed liquor samples were collected on a regular basis (hourly), then filtered and analyzed for different N forms, including $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^+\text{-N}$, and $\text{NO}_2^+\text{-N}$ to assess process rates, such as the ammonium utilization rate – AUR, the nitrate production rate – NPR, and the nitrite production rate – NiPR. For microbiological analyses, biomass samples were taken one week after the transition to the new temperature set point.

To ensure conditions for the partial nitritation and anammox process, an intermittent aeration mode was used in the reaction phase (an aeration/mixing phase of 3/6 min at 20–30 °C and 2/10 min at the lower temperatures), and the reactor was fed with inorganic synthetic wastewater as recommended by Dapena-Mora et al. [18], and enriched with ammonia (500 mg N/L). A single operational cycle (6 hours) was divided into four phases: filling (20 min), reaction (300 min), settling (20 min), and decantation (20 min). The pH was maintained between 7.5 and 7.8 by adding 1 M HCl. The total nitrogen load (TNL) ranged from 0.1 to 1.5 gN/Ld, depending on the activity and temperature in the reactor.

2.2. Analytical methods

Mixed liquor samples were filtered using 1.2 µm pore-size nitrocellulose membrane filters (Whatman, Kent, UK). Concentrations of nitrate, nitrite, and ammonia were measured via spectrophotometric cuvette tests (Hach Lange GmbH). The activity of anammox bacteria was measured using dedicated Hach Kits (Hach Lange GmbH). Concentrations of suspended solids, specifically mixed liquor suspended solids (MLSS) and its volatile fraction (MLVSS), were determined following the procedures outlined in Standard Methods (APHA 2005). Biomass-

specific process rates (NRR) were calculated based on the maximum slope in the reaction phase of (1) NH_4^+ -N consumption (AUR), (2) NO_3^- -N production (NPR), (3) NO_2^- -N production (NiPR), and (4) NO_2^- -N consumption (NiUR), divided by the MLVSS concentration. The formulae for these calculations can be found in the paper by Al-Hazmi et al. [19].

2.3. DNA extraction and metagenomic sequencing

Biomass samples for metagenomic sequencing were collected from the deammonification reactor at specific stages of operation. The samples were placed in clean 50 ml tubes and stored at -70°C until DNA extraction. DNA was extracted from 200 mg of biomass using a FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), following the procedure described by Florczyk et al. [20]. The amount of isolated nucleic acids was measured using a Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The extracted nucleic acids were stored at -18°C until further analysis.

A TruSeq DNA PCR-Free Kit was used to generate the metagenome library. Metagenomes were sequenced using the HiSeq Illumina platform to generate 151 bp paired-end reads. Shotgun sequencing was performed at Macrogen Inc., Seoul, Korea. The raw sequences reads were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the accession number PRJNA1113848.

2.4. DNA data analysis

To predict MAGs, the ATLAS assembly-based metagenome analysis workflow was used with the default parameters [21]. Quality control of raw sequence data, including removing PCR duplicates and adapters, trimming and filtering reads based on quality and length, and removing contaminants, was performed using the BBTools suite [22]. *De novo* assembly was performed using metaSPAdes [23] with ATLAS default parameters for k-mer lengths and k-mer step size was used. Assembled contigs shorter than a minimal length or without mapped reads were filtered out to yield high-quality contigs. ATLAS assembles MAGs for each individual sample, producing more continuous genomes than co-assembly. MAGs were binned using two binning methods Metabat2 [24] and Maxbin2 [25]. Bins were combined using DAS Tool [26]. Completeness and contamination of each MAG were assessed using CheckM [27]. To obtain a non-redundant set of MAGs, genomes were clustered using dRep [28], Mash [29] and MUMmer [30]. The abundance of each genome was quantified across samples by mapping reads to the non-redundant MAGs.

To identify sequences involved in the nitrogen cycle, a custom protein database was constructed. Sequences were downloaded from the NCBI RefSeq protein database using a selected set of keywords. Sequences with similarity $> 80\%$ were clustered using cd-hit [31]. Non-redundant sequences were aligned to predicted MAGs using the Diamond sequence aligner with a 'very sensitive' mode, which is slower than default mode but is designed for finding hits across the whole range of pairwise alignments, even $<40\%$ identity [32].

2.5. Network analysis

Networks of co-occurrence of bacterial groups were created based on correlation analysis of MAGs abundances and selected technological parameters. The correlation matrix was created using Spearman's rank correlation test. Correlation coefficients were calculated using the Statistica program (v.13.1, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Networks were drawn only for highly correlated MAGs, i.e., those with a correlation coefficient greater than 0.75 or less than -0.75 , with a significance level of $\alpha = 0.05$. Based on the obtained correlation matrices, networks were constructed using the open-source Gephi software (version 0.10.1, Gephi Consortium, France) [33] with the "Force Atlas" layout. Subgroups were recognized using the Leiden algorithm.

3. Results

3.1. Technological results

The deammonification biomass in the SBR was intentionally acclimated to lower process temperatures to enhance the deammonification process and reduce the risk of SBR failure. The influent and effluent characteristics are shown in Fig. 1.a. Throughout the SBR operation, the temperature was progressively reduced to 30°C , 25°C , 20°C , 15°C , and 12°C , as illustrated in Fig. 1.b. Initially, the MLVSS concentration in the reactor was 4.5 g/L , which decreased to 2 g/L after 20 days of operation, after which the biomass was no longer removed from the SBR (Fig. 1.b).

Although the nitrogen removal efficiency was poor, the specific process rates were good indicators of microbial activity. The rates at different temperatures are presented in Fig. 1.c. The initial AUR was $3.26 \pm 0.45\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$. The highest AUR of $7.25 \pm 2.19\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$ was achieved at 25°C , decreasing to $2.42 \pm 0.28\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$ as the temperature decreased. The initial NPR at 30°C was $0.5 \pm 0.29\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$, reaching the highest value of $1.01 \pm 0.63\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$ in the second phase of the experiment. Subsequently, the NPR was gradually decreasing, with the lowest value of $0.41 \pm 0.16\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$ observed at 15°C .

In the temperature range from 30 to 20°C , NO_2^- -N utilization peaked at 20°C ($\text{NiUR} = 0.54 \pm 1.49\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$). Despite reduced process efficiency, the SBR operated stably even at 12°C . NO_2^- -N was entirely depleted in the reactor until the process temperature decreased from 30 to 15°C , but a slight increase in the concentration of NO_2^- -N was observed with further decreasing the temperature. At 12°C , the NiPR reached $0.96 \pm 0.24\text{ mg N (gVSS h)}^{-1}$. The initial AMX was $1.19 \pm 0.19\text{ }\mu\text{molCC/gVSS}$ at $T = 30^\circ\text{C}$, with a slight increase observed during the experiment. The maximum AMX ($1.52 \pm 0.04\text{ }\mu\text{molCC/gVSS}$) was observed at 15°C . The stable operation of the SBR at 12 – 15°C , despite a decline in process efficiency, should be emphasized and warrants further investigation to understand the underlying mechanisms and potential mitigation strategies.

Deammonification is crucial in wastewater treatment for effective removal of nitrogen compounds. The process depends on the cooperation between AOB and anammox bacteria. Two key ratios indicate the process efficiency: the theoretical ratio of total nitrogen removed to ammonia removed ($\Delta\text{TN}/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$), typically around 0.86, and the ratio of nitrate produced to ammonia removed ($\Delta\text{NO}_3^-/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$), approximately 0.11, while remaining nitrogen is incorporated into biomass of anammox bacteria according to the equation: $\text{NH}_4^+ + 1.32\text{NO}_2^- + 0.66\text{HCO}_3^- + 0.13\text{H}^+ \rightarrow 0.066\text{CH}_2\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.15} + 1.02\text{N}_2 + 0.26\text{NO}_3^- + 2.03\text{H}_2\text{O}$.

Theoretical ratios are based on an ideal PN/A process in which nitrate production and total nitrogen removal are solely attributed to the cooperation between AOB and anammox bacteria. This model does not account for the effect of other bacterial groups, such as NOB, denitrifiers, or DNRA. Deviations from theoretical ratios can reveal insights into the processes within the system. For instance, a $\Delta\text{NO}_3^-/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$ ratio exceeding 0.11 may indicate the presence of NOB bacteria that convert ammonia to nitrate, while a $\Delta\text{TN}/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$ greater than 0.86 suggests excessive total nitrogen removal, likely due to simultaneous denitrification occurring within the system [34].

Deammonification performance was evaluated in accordance with these two indicators, as detailed in Fig. 2. The average $\Delta\text{NO}_3^-/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$ ratios at different temperatures were 0.15 ± 0.05 (30°C), 0.15 ± 0.08 (25°C), 0.20 ± 0.06 (20°C), 0.15 ± 0.10 (15°C) and 0.30 ± 0.05 (12°C). These results indicated relatively stable performance at temperatures between 30 and 15°C , with effective suppression of NOB ($\Delta\text{NO}_3^-/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$ periodically below 0.11). However, a decrease in the temperature to 12°C specifically caused a deterioration in performance, with insufficient NOB suppression observed.

A decrease in the $\Delta\text{TN}/\Delta\text{NH}_4^+-\text{N}$ ratio was observed with decreasing

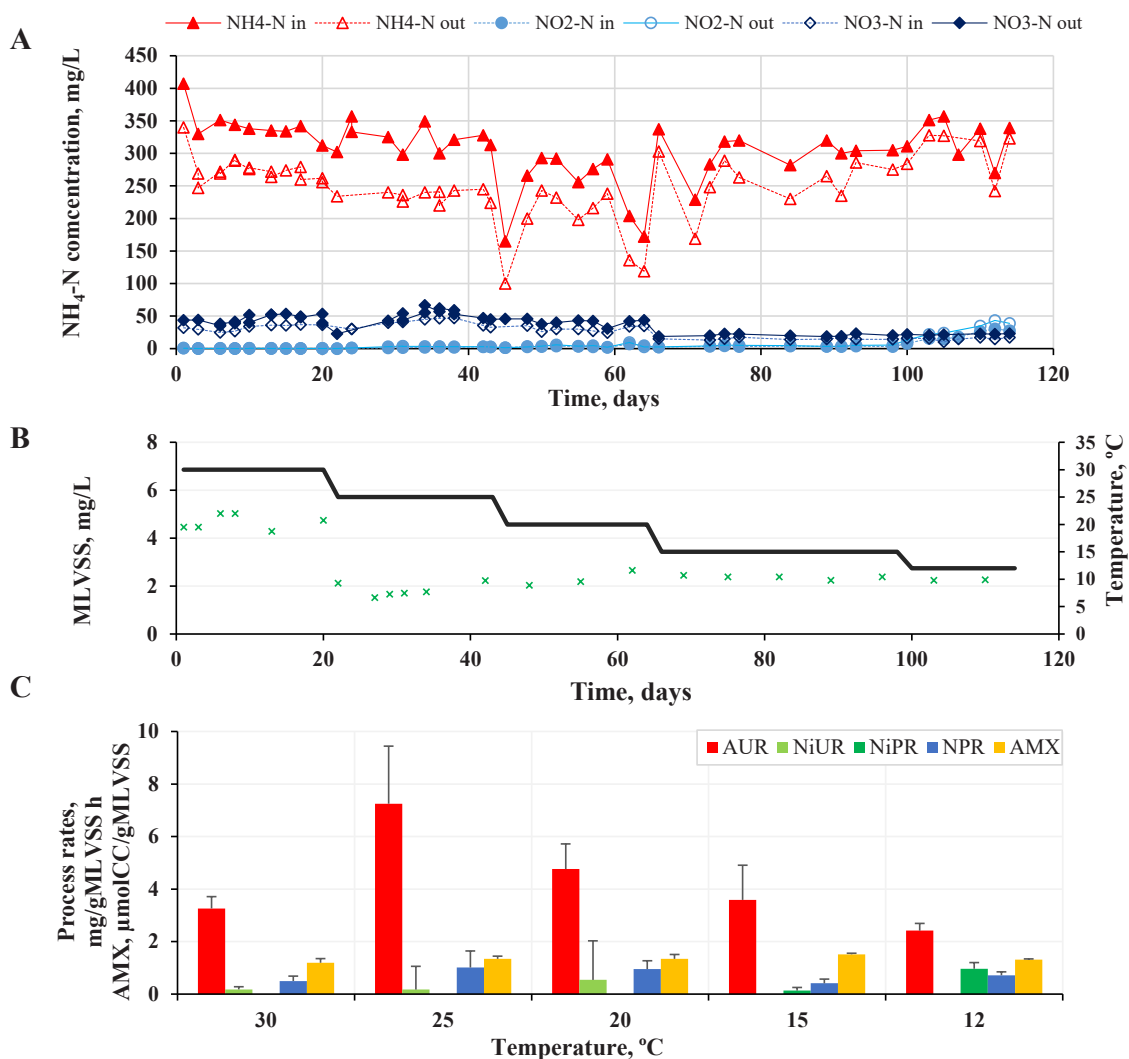


Fig. 1. Behaviour of the influent and effluent ammonium, nitrite and nitrate concentrations (a) along with the MLVSS, temperature (b) and process rates (c) observed during the long-term acclimation experiment.

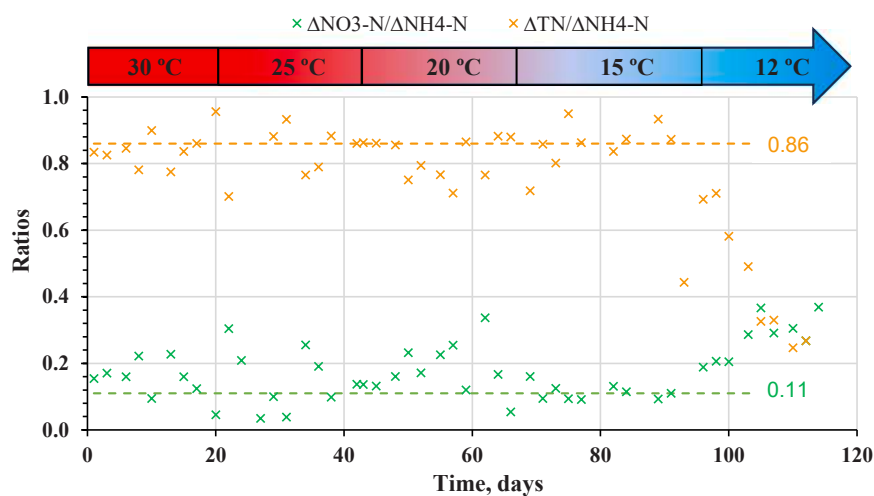


Fig. 2. Variations in the $\Delta\text{NO}_3\text{-N}/\Delta\text{NH}_4\text{-N}$ and $\Delta\text{TN}/\Delta\text{NH}_4\text{-N}$ ratios in the deammonification system. The values of 0.11 and 0.86 represent the theoretical stoichiometric ratios, respectively.

temperature, reaching the lowest values at 12 °C, i.e., 0.85 ± 0.05 (30 °C), 0.84 ± 0.07 (25 °C), 0.81 ± 0.06 (20 °C), 0.80 ± 0.13 (15 °C), and 0.31 ± 0.19 (12 °C).

3.2. Genomes reconstruction and microbial community composition

Eight metagenomic libraries were sequenced from biomass samples of the deammonification reactor, resulting in 116 Gbp of Illumina short-read data. Assembly and binning of these data yielded 105 high-quality bacterial MAGs, each with over 50 % completeness and less than 10 % contamination. Phylogenetic analysis revealed low taxonomic diversity across 15 phyla, with *Proteobacteria* being the most represented (34 of 105 MAGs) (Fig. 3). *Chloroflexota* (17 MAGs) and *Bacteroidota* (14 MAGs) also had significant representation. A genome from the uncharacterized phylum OLB16 (1 MAG) was also identified.

Proteobacteria were the most abundant phyla in all samples (Fig. 4), showing a general increase throughout the experiment, nearly doubling the abundance from the first to the last sample. *Chloroflexota* was the second most abundant phylum, peaking at 26.8 % in day 0 and remaining constant until day 66, when it decreased to 20.5 %. *Planctomycetota*, *Bacteroidota* and *Acidobacteriota* were abundant in the raw sample (sample of the biomass from the wastewater treatment plant, taken before the acclimatization process), but their abundance

significantly decreased in subsequent samples, maintaining low levels until the end of the experiment. *Nitrospirota* showed an initial low abundance (1.9 % in the raw sample), but their abundance increased fivefold to 9.7 % in the day 0 sample, gradually decreasing back to the initial level on day 100 (2.1 %).

Only 28 of the 105 MAGs were classified at the genus level (Fig. 5), representing 18 different genera. The most dominant genus was *Nitrosomonas*, with 4 MAGs, averaging 20.6 % in abundance. The abundance gradually increased from 5.6 % in the first sample to 28.1 % in the last sample on day 100. Other genera were less abundant, not exceeding 10 % in any sample, except for *Candidatus Brocadia*, which peaked at 11.6 % in the raw sample. The next most abundant genera were *Dokdonella* (6.1 %), *Candidatus Brocadia* (4.7 %), and *Nitrospira* (4.6 %).

3.3. Nitrogen cycle-related genes

Various genes related to the nitrogen cycle were found in most of the obtained MAGs. The most common were genes associated with the denitrification process (*narGHI*, *napAB*, *nirK*, *nirS*, *norBC*, *nosZ*) (Fig. 6). The nitrification process was carried out by typical AOB, *Nitrosomonas*, with functional genes *amoABC*, and NOB, *Nitrospira*, with *nxr* genes. No comammox *Nitrospira* bacteria were detected. Four MAGs, including three MAGs belonging to *Anaerolineae* (MAG011, MAG057, MAG067)

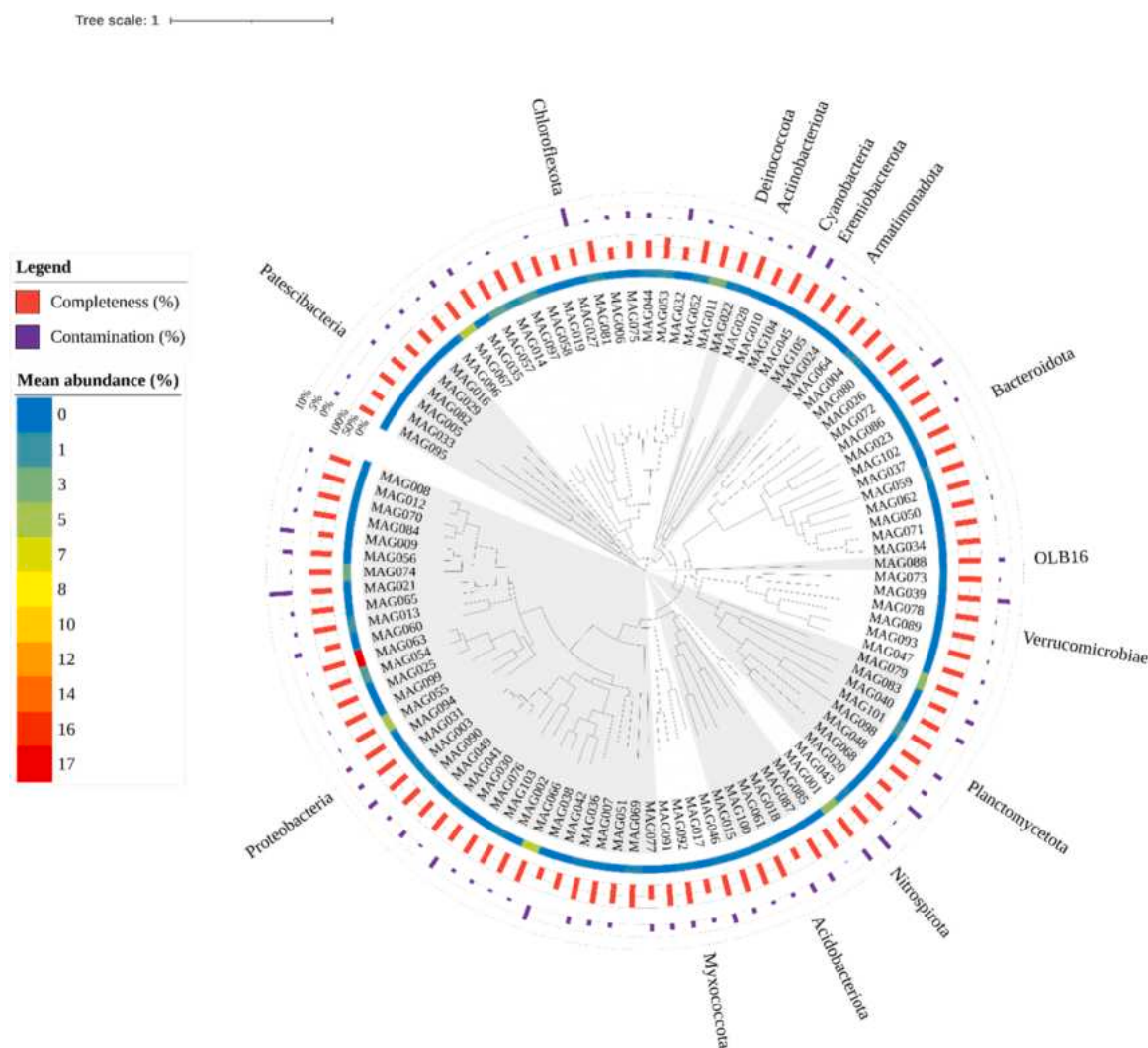


Fig. 3. Phylogenetic tree of the 105 bacterial MAGs reconstructed from the reactor. The tree was constructed using GTDB-Tk algorithm, based on multiple sequence alignments against 120 bacterial protein markers. The inner circle heatmap shows the mean abundance of each MAG. Completeness and contamination of each MAG are represented in the outside bar plots, with values calculated using CheckM.

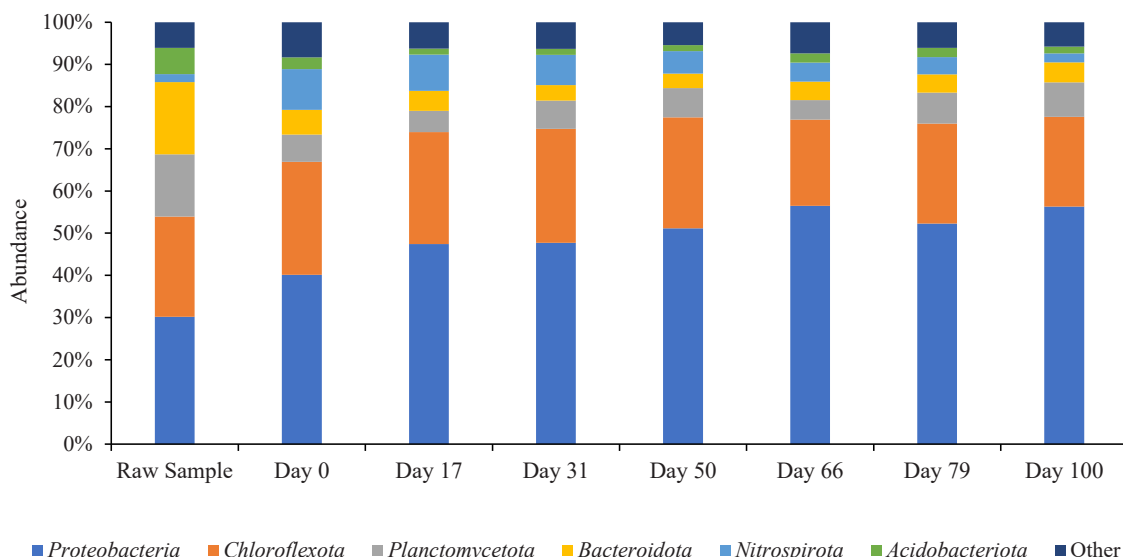


Fig. 4. Abundance of the most prevalent phyla (with an average abundance of at least 2 %). Phyla with an average abundance of less than 2 % were summed and labelled as "other." The percentage of each phylum in the bacterial community was determined based on the taxonomic classification of the obtained MAGs.

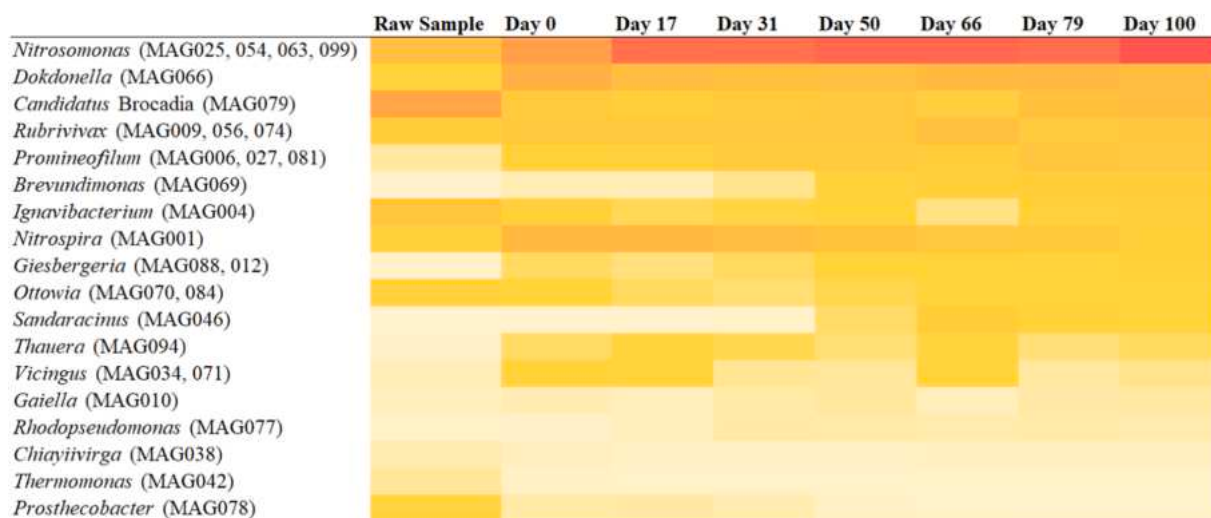


Fig. 5. Changes in the abundance of all classified genera. MAGs not classified at the genus level were excluded from the heatmap.

and one belonging to *Candidatus Brocadia* (MAG079), showed potential for dissimilatory nitrate reduction (DNRA) due to the presence of both dissimilatory nitrate reductases (*narGHI*) and nitrite reductases (*nrfAH*). Additionally, one MAG classified as *Candidatus Brocadia* contained genes related to the anammox process.

3.4. Microbial co-occurrence network and ecological relationships prediction

Network analysis was used to model the interactions and relationships between the bacteria in the deammonification reactor, as graphically shown in Fig. 7. The network consisted of 108 nodes: 105 representing the MAGs and 3 representing the technological parameters. In the figure, the size of the nodes is proportional to the betweenness centrality value. The nodes were connected by 1496 edges; green edges indicate a positive correlation (Spearman's rank correlation coefficient above 0.75), and red edges indicate a negative correlation (Spearman's rank correlation coefficient below -0.75). More than half (57 %) of the connections were positive. The thickness of the edges is proportional to the correlation coefficient.

The Leiden algorithm was used to detect subgroups (clusters). Seven clusters were identified, each marked with a different color in the figure. Clusters were based on a higher density of connections between certain nodes, which have weaker connections to others. Nodes with stronger connections formed clusters. The resulting network was dominated by one cluster (marked in purple), comprising 68 nodes (63 % of all network nodes) and 1368 edges (91 % of all network edges). This cluster included bacteria that play crucial roles in the metabolism of nitrogen compounds: *Nitrosomonas*, *Nitrospira* and *Candidatus Brocadia*. The second largest cluster (marked in green) consisted of 20 nodes (19 %) and 64 edges (4 %). The remaining clusters were much smaller, with no more than 10 % of the nodes and no more than 1 % of the edges each.

The average degree (number of edges between a node and other nodes in the network) of the nodes in the network was 14. The temperature node had the highest degree (58), indicating its significant influence on many members of the bacterial community. Among the bacterial nodes, *Nitrospira*, *Phycisphaerae* and *Prostheobacter* had the highest degree (57).

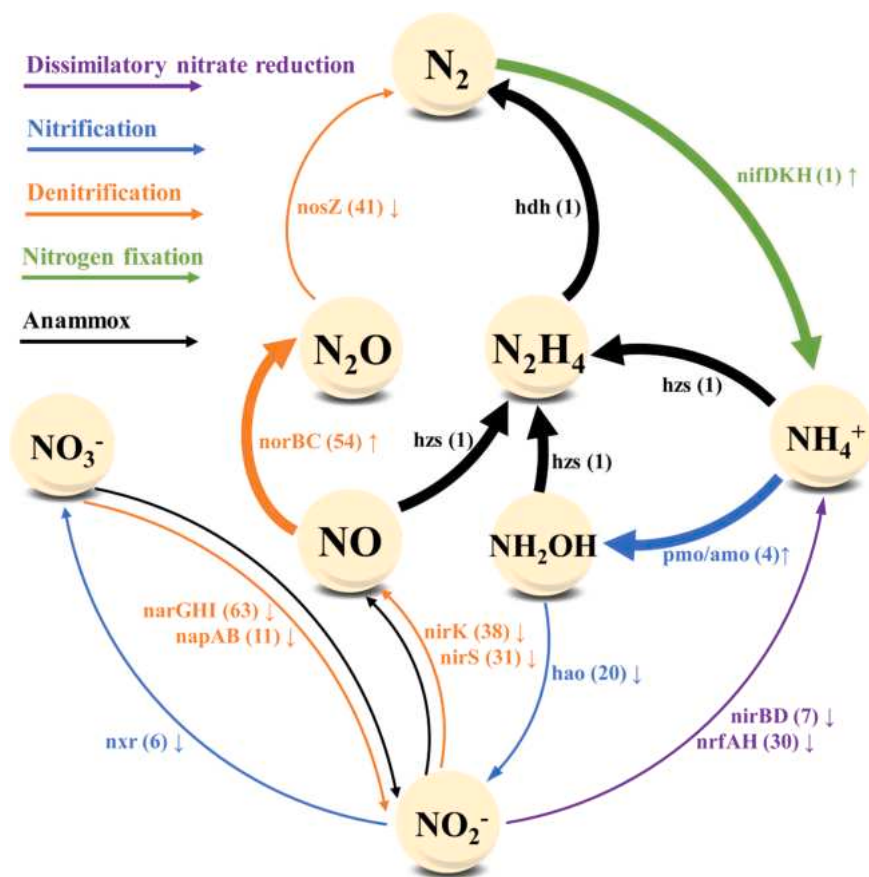


Fig. 6. Genes associated with the nitrogen cycle. The numbers in brackets next to each gene indicate the number of MAGs containing that gene. The thickness of the arrows indicates whether the mean abundance of MAGs containing those genes was lower (thin line) or higher (thick line) at low temperatures (12–15 °C) in comparison to higher temperatures (20–30 °C). pmo/amo - methane/ammonia monooxygenase, hao - hydroxylamine dehydrogenase, nxr - nitrite oxidoreductase, narGHI - respiratory nitrate reductase, napAB - periplasmic nitrate reductase, nirK/nirS - nitrite reductase (NO-forming), norBC - nitric oxide reductase, nosZ - nitrous oxide reductase, nirBD - nitrite reductase (NADH), nrfAH - nitrite reductase (cytochrome; ammonia forming), nifDKH - nitrogenase molybdenum-iron protein, hzs - hydrazine synthase, hdh - hydrazine dehydrogenase.

4. Discussion

4.1. Biomass specific process rates and main bacterial groups involved in the transformation of nitrogen compounds

During the experiment, the deammonification SBR was operated at decreasing temperatures, significantly influencing the microbial population composition and its activity. In the initial phases, at higher temperatures, the nitrification process was most efficient, as evidenced by high AUR, NPR and NiUR values. The atypical increase in AUR and NPR after lowering the temperature from 30 to 25 °C was attributed to higher substrate availability due to a reduction in biomass concentration in the reactor. The observed decrease in AUR and NPR with further decreasing temperatures is consistent with literature findings, indicating the sensitivity of these processes to temperature variations [19,35]. However, the AMX was slightly higher at 15 °C (Fig. 1), suggesting that anammox bacteria can potentially remain active at ambient temperatures, although their activity is reduced due to the inhibitory effect of lower temperature.

The values of the technological parameters corresponded with the abundance profiles of bacteria associated with nitrogen transformation. AOB were represented by the genus *Nitrosomonas* (MAG063 was particularly abundant), while NOB were mainly represented by the genus *Nitrospira*. The sole anammox representative was *Candidatus Brocadia*. *Candidatus Brocadia* is a common representative of anammox bacteria in PN/A systems. Under optimum conditions, their abundance can reach several dozen percent [36]. However, lowering the

temperature can significantly reduce both their abundance and their activity. Wang et al. [37] found a statistically significant decrease in the expression of genes related to the anammox process (*hzsA* and *hdh*) when the process temperature was lowered to 15 °C. Although the abundance of *Nitrosomonas* and *Candidatus Brocadia* slightly increased at lower temperatures, these differences were not statistically significant (White's non-parametric t-test, Storey FDR correction in STAMP). Statistically significant changes were observed in *Nitrospira*, which were more abundant at higher temperatures.

4.2. Bacterial community dynamics and the influence of temperature on competition between *Nitrospira* and *Candidatus Brocadia*

At the phylum level, *Proteobacteria*, *Chloroflexota*, *Planctomycetota*, *Bacteroidota*, *Nitrospirota*, and *Acidobacteriota* were dominant. Similar bacterial compositions are typical of this type of reactor. Right after the experiment began, there was a rapid shift in the proportions of these dominant bacterial groups, followed by the establishment of an equilibrium among them. Similar dynamics of bacterial population changes were described by Ribeiro et al. [38]. Shortly after the reactor was started, they also observed a significant change in the proportions of dominant bacterial groups, noticeable even at a high taxonomic level. During the subsequent 397 days of operation of the partial nitrification-anammox upflow reactor at ambient temperature, gradual changes in the bacterial community were observed. Similar to our experiment, the abundance of *Nitrosomonas* and *Candidatus Brocadia* increased, although these groups were not as numerous as in our

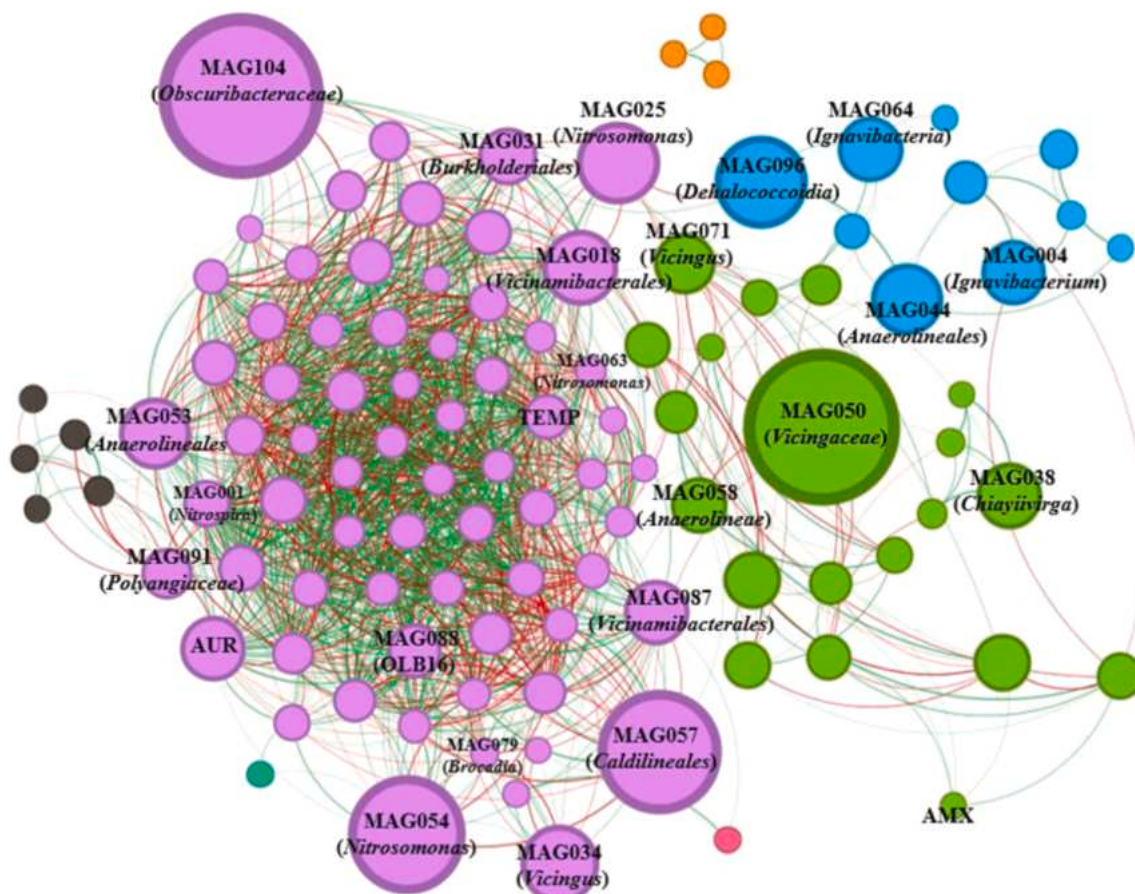


Fig. 7. Microbial community network with nodes representing MAGs or selected technological parameters and edges representing positive (green) or negative (red) correlations.

experiment, likely due to differences in inoculum composition. As in our case, *Chloroflexota*, particularly *Anaerolineae*, were also abundant. *Anaerolineae* are classified as filamentous bacteria and may play an important structural role in the formation of anammox bacterial aggregates [39]. *Nitrospirota* displayed the most marked decline in abundance.

Numerous studies in various wastewater treatment systems have indicated that the optimal temperature for *Nitrospira* ranges between 30 °C – 35 °C [40]. Jia et al. [41] found that the abundance of *Nitrospira* was always higher in summer (average temperature 25 °C) compared to winter (average temperature 9 °C) in wetland systems. Similarly, Miao et al. [42] reported that *Nitrospira* activity remained high at 32 °C even under very low DO concentration in a PN/A system. *Nitrospira* is the most diverse genus of NOB comprising six phylogenetically distinct sublineages [9,12], each exhibiting different temperature tolerances. For example, *Nitrospira* sublineages II and IV were prevalent in geothermal springs [43]. While comammox *Nitrospira* was found in hot springs [44]. The first isolated species of comammox *Nitrospira* was from a biofilm in hot water pipelines (56 °C) [45]. In contrast, *Nitrospira* sublineage I was less resistant to high temperatures and better adapted to wastewater treatment systems [46].

The results of this study suggest that controlling temperature conditions in deammonification systems can help suppress undesirable NOB proliferation. Inhibition of *Nitrospira* at low temperatures can facilitate the adaptation of the PN/A process in mainstream applications. The competition between *Nitrospira* and anammox bacteria, may have resulted in slightly lower AMX at 30 °C. Literature data indicate that anammox bacteria are most active at high temperatures [10,47]. Network analysis showed a negative correlation between *Nitrospira* and

Candidatus Brocadia, and in the early phases of the experiment, other bacteria with *nxr* (nitrite oxidoreductase) genes were also present. This indicates that strong competition for nitrite between NOB and anammox bacteria occurred. At lower temperatures, the decrease in NOB abundance reduced competition for the substrate, leading to a slight increase in anammox bacteria. At the same time, an increase in NiPR and a decrease in NiUR were observed at 15 °C and 12 °C. Similar responses to temperature changes in a PN/A reactor were observed by Gilbert et al. [48], who reported a strong influence of temperature reduction on *Nitrospira* abundance compared to *Candidatus Brocadia*. Additionally, *ex situ* recovery of anammox rates was observed at 10 °C, unlike *ex situ* nitrification rates and NOB abundance. The persistence of anammox population at high levels even at low temperatures was also observed by Lv et al. [49], indicating greater adaptability of anammox bacteria compared to NOB.

Many studies have reported that *Candidatus Brocadia* is the dominant anammox genus at low temperatures [50,51]. Metaproteomics studies by Lin et al. [52] suggested that anammox bacteria maintain constant levels of key enzymes involved in the anammox process at low temperatures, despite reduced activity. These studies also showed increased stress due to the presence of toxic nitrogen compounds and reactive oxygen species at low temperatures, affecting *Candidatus Kuenenia* and *Candidatus Jettenia* more than *Candidatus Brocadia*. Some authors have suggested that substrate concentration may influence the anammox population, with *Candidatus Brocadia* considered an r-strategist, thriving under constant substrate excess, unlike the k-strategist *Candidatus Kuenenia* [53]. However, there are also contradictory results. For example, Li et al. [14] observed a shift in the dominant anammox genus with decreasing temperature, where *Candidatus Brocadia* decreased and

Candidatus Kuenenia increased, even with excess substrate. These contradictions indicate that the adaptation mechanism of anammox bacteria to low temperatures are complex and depend on many factors, requiring further in-depth research for full explanation.

4.3. Functional genes and abundance of denitrifiers

In the deammonification system under study, a significant proportion of MAGs possessed genes associated with the denitrification process. A large percentage of denitrifiers are often observed in PN/A reactors. Although they are not major players in the anammox system, their ability to break down organic matter can prevent disruption of autotroph activity and contribute to maintaining the balance in the system [36]. Furthermore, by reducing nitrates, they provide a source of nitrites necessary for anammox bacteria [54]. The genus with the second highest average abundance was *Dokdonella* (MAG066), recognized as a common heterotrophic denitrifier [55]. Wang et al. [56] used network analysis to explore bacterial populations in a simultaneous anammox and denitrification reactor and observed a positive correlation between the abundance of *Dokdonella* and the nitrite reductase genes *nirS* and *nirK*. These findings are consistent with our results, as we also found these genes in the genome of *Dokdonella* in the studied system. The authors of the above paper also found that the most important denitrifiers were *Thermomonas* and *Pseudomonas*, as they showed a positive correlation with the *narG* gene. However, in this study, their representatives did not possess this gene.

In the present study, *Chloroflexota*, specifically the order *Anaerolineales*, were prominently represented, however, its abundance decreased significantly at lower temperatures. Many MAGs assigned to *Anaerolineales* possessed the *nirS* or *nirK* gene, indicating their role as important denitrifiers in this system. Similar findings regarding the presence of these genes in *Anaerolineales* were also reported by Schwartz et al. [57].

4.4. Structure of the microbial network

Significant changes in the abundance of certain MAGs were observed at lower temperatures. MAG069 (*Brevundimonas*), MAG036 (*Xanthomonadales*), MAG041 (*Steroidobacteraceae*), MAG081 (*Promineofilum*) and MAG046 (*Sandaracinus*) were significantly more prevalent. However, the roles of these bacteria in wastewater treatment systems remain poorly understood. The strong influence of temperature on the development of various groups of microorganisms is further supported by network analysis where the temperature node had the highest number of connections among all network nodes (degree = 58).

In network analysis, the betweenness centrality parameter is crucial as it indicates the extent to which a particular node lies on the shortest path between other nodes in the network. A node with high betweenness centrality likely plays a central role in the community, and its removal can disrupt the network structure, unless new links are formed among the remaining nodes [58]. Three of the four MAGs classified as *Nitrosomonas* exhibited high betweenness centrality values. These MAGs had the *amo*, *nirK*, *norB* and *norC* genes, which is consistent with existing literature [59]. *Nitrosomonas*, the most common representative of AOB, performed the first stage of nitrification, providing a substrate for anammox bacteria, making it essential for the proper functioning of deammonification systems.

Interestingly, the highest betweenness centrality value was recorded for the MAGs with low abundance and unknown role in wastewater treatment systems. The potential significance of such bacteria has recently gained interest among researchers [60]. It has been found that low-abundance species may be more sensitive to environmental factors than high-abundance species [61].

4.5. Opportunities, limitations and challenges of the anammox process

The successful introduction of the anammox process into the mainstream of wastewater treatment could significantly reduce operating costs, primarily due to lower costs of aeration and external carbon supplementation. However, achieving this goal is challenging for several reasons. One major challenge is the reduced activity of anammox bacteria at low temperatures and their low growth rate. The exact doubling time of anammox bacteria is not known due to the lack of pure cultures of anammox bacteria, but some authors suggest that it could be as low as 25–30 days. To maintain anammox biomass in the reactor, especially at low temperatures, it is essential to prolong the solids retention time (SRT) [62].

Many studies indicate that the activity of anammox bacteria decreases at temperatures below 20 °C, while the average temperature of wastewater is lower in temperate climates. Therefore, various strategies are employed to adapt anammox bacteria to low temperatures, including gradual acclimation by slowly lowering the temperature or short-term temperature shocks [63]. Another important issue is the ecological competition between anammox bacteria and NOB. Controlling the growth of NOB bacteria is achieved by managing various parameters, most commonly by adjusting DO concentrations and introducing alternating aeration, but also through treatment with free ammonia (FA) or free nitrous acid (FNA) [64].

In the present study, gradual temperature reduction allowed the anammox population to adapt and maintain their abundance, while it had a strong negative effect on the abundance of NOB population. However, there are also conflicting results regarding the methods used to suppress NOB, and the extent of their adaptability to challenging environmental conditions remains unclear. Some NOB have been shown to grow well at low ammonia concentrations and even at low temperatures [65]. Therefore, long-term suppression of NOB remains one of the main obstacles to developing anammox-based systems for nitrogen removal.

5. Conclusions

By examining the abundance of each bacterial group at high (20 °C – 30 °C) and low (12 °C – 15 °C) temperatures, and supporting this with statistical analysis, it was concluded that:

- Temperature affects the dynamics of changes in the reactor's bacterial community.
- Reducing temperature decreases the abundance of *Nitrospira* bacteria.
- Under the investigated conditions, the abundance of *Nitrosomonas* and *Candidatus* Brocadia bacteria remains stable, but their activity decreases.
- *Candidatus* Brocadia demonstrates the potential to adapt to low temperatures.
- Temperature reflects a stronger effect on the formation of the microbial community than ecological relationships, such as competition.

The co-occurrence patterns in the microbial network also suggest that low-abundance bacteria may play a more significant role in the microbiome than previously thought, although this role is not yet fully understood.

CRedit authorship contribution statement

Slawomir Ciesielski: Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Conceptualization. **Jacek Maki-nia:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Conceptualization. **Dominika Sobotka:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology,

Investigation, Formal analysis, Data curation. **Przemysław Kowal:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Maciej Florczyk:** Writing – review & editing, Software, Formal analysis, Data curation. **Martyna Godziewa:** Writing – original draft, Visualization, Investigation, Formal analysis, Data curation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Xianbao Xu (Gdansk University of Technology) for his help in creating Figure No. 6. This work was supported by the Polish National Science Center under the project no. UMO-2017/27/B/NZ9/01039.

Data Availability

Raw sequences were deposited in an NCBI SRA database, and the accession number is mentioned in the manuscript.

References

- [1] A. Kamp, L.D.M. Ottosen, N.B. Thøgersen, N.P. Revsbech, B. Thamdrup, M. H. Andersen, Anammox and partial nitrification in the mainstream of a wastewater treatment plant in a temperate region (Denmark), *Water Sci. Technol.* 79 (2019) 1397–1405, <https://doi.org/10.2166/wst.2019.141>.
- [2] H. Wang, C. Jiang, X. Wang, S. Xu, X. Zhuang, Application of internal carbon source from sewage sludge: a vital measure to improve nitrogen removal efficiency of low C/N Wastewater, *Water (Basel)* 13 (2021) 2338, <https://doi.org/10.3390/w13172338>.
- [3] X. Huang, Y. Wang, W. Wang, B. Li, K. Zhao, X. Kou, S. Wu, T. Shao, Simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification process for the treatment of simulated municipal sewage in a single-stage biofilter reactor, *Chemosphere* 287 (2022) 131974, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131974>.
- [4] T. Xiang, H. Liang, P. Wang, D. Gao, Insights into two stable mainstream deammonification process and different microbial community dynamics at ambient temperature, *Bioresour. Technol.* 331 (2021) 125058, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125058>.
- [5] Y. Yan, W. Wang, M. Wu, M.S.M. Jetten, J. Guo, J. Ma, H. Wang, X. Dai, Y. Wang, Transcriptomics uncovers the response of anammox bacteria to dissolved oxygen inhibition and the subsequent recovery mechanism, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 14674–14685, <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02842>.
- [6] J. Wu, W. Xinduan, G. Qiufeng, Z. Chi, Z. Miao, Mathematical simulation and experimental verification of a novel control strategy for a single stage PN/A (partial nitrification/Anammox) SBR (sequencing batch reactor), *J. Environ. Chem. Eng.* 11 (2023) 109154, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.109154>.
- [7] R. Zhao, A.R. Babbitt, D.L. Roerdink, I.H. Thorseth, S.L. Jørgensen, Nitrite accumulation and anammox bacterial niche partitioning in arctic mid-ocean ridge sediments, *ISME Commun.* 3 (2023), <https://doi.org/10.1038/s43705-023-00230-y>.
- [8] L. Peng, R. Shi, Y. Tao, Q. Huang, M. Yang, Y. He, W. Xu, Starting up anammox system with high efficiency nitrogen removal at low temperatures: performance optimization, sludge characterization and microbial community analysis, *J. Environ. Manag.* 325 (2023) 116542, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116542>.
- [9] T. Lotti, R. Kleerebezem, C. van Erp Taalman Kip, T.L.G. Hendrickx, J. Kruijt, M. Hoekstra, M.C.M. van Loosdrecht, Anammox growth on pretreated municipal wastewater, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7874–7880, <https://doi.org/10.1021/es500632k>.
- [10] D. Sobotka, J. Zhai, J. Makinia, Generalized temperature dependence model for anammox process kinetics, *Sci. Total Environ.* 775 (2021) 145760, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145760>.
- [11] A. Pedrouso, A. Val del Rio, N. Morales, J.R. Vazquez-Padin, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, Mainstream anammox reactor performance treating municipal wastewater and batch study of temperature, pH and organic matter concentration cross-effects, *Process Saf. Environ.* 145 (2021) 195–202, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.07.052>.
- [12] V. Kouba, Ch Bachmannová, T. Podzimek, P. Lipovová, M.C.M. van Loosdrecht, Physiology of anammox adaptation to low temperatures and promising biomarkers: a review, *Bioresour. Technol.* 349 (2022) 126847, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126847>.
- [13] S. Cho, C. Kambey, V. Nguyen, Performance of anammox processes for wastewater treatment: a critical review on effects of operational conditions and environmental stresses, *Water (Basel)* 12 (2019) 20, <https://doi.org/10.3390/w12010020>.
- [14] Q. Li, S. Wang, P. Zhang, J. Yu, C. Qiu, J. Zheng, Influence of temperature on an Anammox sequencing batch reactor (SBR) system under lower nitrogen load, *Bioresour. Technol.* 269 (2018) 50–56, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.057>.
- [15] K. Guseva, S. Darcy, E. Simon, L.V. Alteio, A. Montesinos-Navarro, C. Kaiser, From diversity to complexity: microbial networks in soils, *Soil Biol. Biochem.* 169 (2022) 108604, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108604>.
- [16] S. Srinivasan, A. Jnana, T.S. Murali, Modeling microbial community networks: methods and tools for studying microbial interactions, *Micro Ecol.* 87 (2024) 56, <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02370-7>.
- [17] B. Guo, L. Zhang, H. Sun, M. Gao, N. Yu, Q. Zhang, A. Mou, Y. Liu, Microbial co-occurrence network topological properties link with reactor parameters and reveal importance of low-abundance genera, *NPJ Biofilms Micro* 8 (2022) 3, <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00263-y>.
- [18] A. Dapena-Mora, B. Arrojo, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, R. Méndez, Improvement of the settling properties of anammox sludge in an SBR, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79 (2004) 1417–1420, <https://doi.org/10.1002/jctb.1140>.
- [19] H.E. Al-Hazmi, Z. Yin, D. Grubba, J.B. Majtacz, J. Makinia, Comparison of the efficiency of deammonification under different do concentrations in a laboratory-scale sequencing batch reactor, *Water (Basel)* 14 (2022) 368, <https://doi.org/10.3390/w14030368>.
- [20] M. Florczyk, A. Cydzik-Kwiatkowska, A. Ziembinska-Buczynska, S. Ciesielski, Comparison of three DNA extraction kits for assessment of bacterial diversity in activated sludge, biofilm, and anaerobic digestate, *Appl. Sci.* 12 (2022) 9797, <https://doi.org/10.3390/app12199797>.
- [21] S. Kieser, J. Brown, E.M. Zdobnov, M. Trajkovski, L.A. McCue, ATLAS: a snakemake workflow for assembly, annotation, and genomic binning of metagenome sequence data, *BMC Bioinforma.* 21 (2020) 257, <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03585-4>.
- [22] B. Bushnell, BBTools, <https://Sourceforge.Net/Projects/Bbmap/> (2019).
- [23] S. Nurk, D. Meleshko, A. Korobeynikov, P.A. Pevzner, metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler, *Genome Res* 27 (2017) 824–834, <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>.
- [24] D.D. Kang, F. Li, E. Kirton, A. Thomas, R. Egan, H. An, Z. Wang, MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies, *PeerJ* 7 (2019) e7359, <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>.
- [25] Y.-W. Wu, B.A. Simmons, S.W. Singer, MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets, *Bioinformatics* 32 (2016) 605–607, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>.
- [26] C.M.K. Sieber, A.J. Probst, A. Sharrar, B.C. Thomas, M. Hess, S.G. Tringe, J. F. Banfield, Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy, *Nat. Microbiol* 3 (2018) 836–843, <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1>.
- [27] D.H. Parks, M. Imelfort, C.T. Skennerton, P. Hugenholtz, G.W. Tyson, CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes, *Genome Res* 25 (2015) 1043–1055, <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.
- [28] M.R. Olm, C.T. Brown, B. Brooks, J.F. Banfield, dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication, *ISME J.* 11 (2017) 2864–2868, <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.126>.
- [29] B.D. Ondov, T.J. Treangen, P. Melsted, A.B. Mallonee, N.H. Bergman, S. Koren, A. M. Phillippy, Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash, *Genome Biol.* 17 (2016) 132, <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>.
- [30] S. Kurtz, A. Phillippy, A.L. Delcher, M. Smoot, M. Shumway, C. Antonescu, S. L. Salzberg, Versatile and open software for comparing large genomes, *Genome Biol.* 5 (2004) R12, <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12>.
- [31] L. Fu, B. Niu, Z. Zhu, S. Wu, W. Li, CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data, *Bioinformatics* 28 (2012) 3150–3152, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>.
- [32] B. Buchfink, K. Reuter, H.-G. Drost, Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND, *Nat. Methods* 18 (2021) 366–368, <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>.
- [33] M. Bastian, S. Heymann, M. Jacomy, Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks, *Proc. Int. AAAI Conf. Web Soc. Media* 3 (2009) 361–362, <https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937>.
- [34] X. Wang, D. Gao, In-situ restoration of one-stage partial nitrification-anammox process deteriorated by nitrate build-up via elevated substrate levels, *Sci. Rep.* 6 (2016) 37500, <https://doi.org/10.1038/srep37500>.
- [35] D. Sobotka, K. Czerwionka, J. Makinia, Influence of temperature on the activity of anammox granular biomass, *Water Sci. Technol.* 73 (2016) 2518–2525, <https://doi.org/10.2166/wst.2016.103>.
- [36] W. Borowska, M. Zubrowska-Sudol, N. Doskocz, Integration of batch assays and microbial community analysis for partial nitrification and anammox process monitoring, *J. Environ. Chem. Eng.* 12 (2024) 114004, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114004>.
- [37] H. Wang, H. Chen, L. Chen, Y. Chen, Z. Liang, E. Yang, D. Yang, X. Dai, Deciphering the effect of temperature reduction on the biofilm in partial nitrification-anammox system: insights from microbial community to metabolic pathways, *J. Environ. Chem. Eng.* 11 (2023) 110022, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110022>.

- [38] H. Ribeiro, I.M.W. Wijaya, V. Soares-Santos, E.S. Soedjono, A. Slamet, C. Teixeira, A.A. Bordalo, Microbial community composition, dynamics, and biogeochemistry during the start-up of a partial nitrification-anammox pathway in an upflow reactor, *Sustain. Environ. Res.* 32 (2022) 18, <https://doi.org/10.1186/s42834-022-00130-1>.
- [39] S. Wang, H. Yu, Q. Su, J. Zuo, Exploring the role of heterotrophs in partial nitrification-anammox process treating thermal hydrolysis process - anaerobic digestion reject water, *Bioresour. Technol.* 341 (2021) 125762, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125762>.
- [40] A. Vijayan, R.K. Vattiringal Jayadradhan, D. Pillai, P. Prasannan Geetha, V. Joseph, B.S. Isaac Sarojini, *Nitrospira* as versatile nitrifiers: Taxonomy, ecophysiology, genome characteristics, growth, and metabolic diversity, *J. Basic Microbiol.* 61 (2021) 88–109, <https://doi.org/10.1002/jobm.202000485>.
- [41] F. Jia, C. Lai, L. Chen, G. Zeng, D. Huang, F. Liu, X. Li, P. Luo, J. Wu, L. Qin, C. Zhang, M. Cheng, P. Xu, Spatiotemporal and species variations in prokaryotic communities associated with sediments from surface-flow constructed wetlands for treating swine wastewater, *Chemosphere* 185 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.132>.
- [42] Y. Miao, L. Zhang, Y. Yang, Y. Peng, B. Li, S. Wang, Q. Zhang, Start-up of single-stage partial nitrification-anammox process treating low-strength swage and its restoration from nitrate accumulation, *Bioresour. Technol.* 218 (2016) 771–779, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.125>.
- [43] Q. Zhao, D. Sun, X. Tang, L. Hou, M. Liu, P. Han, An investigation of *Nitrospira* bacteria in coastal wetlands of China: distribution pattern and related environmental driving factors, *Front Mar. Sci.* 10 (2023), <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1288142>.
- [44] Y. Zhang, T. Liu, M.-M. Li, Z.-S. Hua, P. Evans, Y. Qu, S. Tan, M. Zheng, H. Lu, J.-Y. Jiao, S. Lückner, H. Daims, W.-J. Li, J. Guo, Hot spring distribution and survival mechanisms of thermophilic comammox *Nitrospira*, *ISME J.* 17 (2023) 993–1003, <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01409-w>.
- [45] H. Daims, E.V. Lebedeva, P. Pjevac, P. Han, C. Herbold, M. Albertsen, N. Jehmlich, M. Palatinszky, J. Vierheilig, A. Bulaev, R.H. Kirkegaard, M. von Bergen, T. Rattei, B. Bendinger, P.H. Nielsen, M. Wagner, Complete nitrification by nitrospira bacteria, *Nature* 528 (2015) 504–509, <https://doi.org/10.1038/nature16461>.
- [46] H. Daims, M. Wagner, In Situ Techniques and Digital Image Analysis Methods for Quantifying Spatial Localization Patterns of Nitrifiers and Other Microorganisms in Biofilm and Flocs, in: 2011: pp. 185–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00008-7>.
- [47] L.-T. Le, J. Jeon, B.-T. Dang, X.-T. Bui, D. Jahng, Influence of temperature on anammox reaction and microbial diversity in a bio-carriers reactor under mainstream conditions, *Environ. Technol. Innov.* 25 (2022) 102178, <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102178>.
- [48] E.M. Gilbert, S. Agrawal, S.M. Karst, H. Horn, P.H. Nielsen, S. Lackner, Low temperature partial nitrification/anammox in a moving bed biofilm reactor treating low strength wastewater, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 8784–8792, <https://doi.org/10.1021/es501649m>.
- [49] Y. Lv, J. Pan, T. Huo, J. Li, S. Liu, Enhance the treatment of low strength wastewater at low temperature with the coexistence system of AnAOB and heterotrophic bacteria: performance and bacterial community, *Sci. Total Environ.* 714 (2020) 136799, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136799>.
- [50] V. Kouba, K. Hůrková, K. Navrátilová, D. Kok, A. Benáková, M. Laurení, P. Vodičková, T. Podzimek, P. Lipovová, L. van Niftrik, J. Hajslová, M.C.M. van Loosdrecht, D.G. Weissbrodt, J. Bartáček, On anammox activity at low temperature: effect of ladderane composition and process conditions, *Chem. Eng. J.* 445 (2022) 136712, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136712>.
- [51] T. Lotti, R. Kleerebezem, M.C.M. van Loosdrecht, Effect of temperature change on anammox activity, *Biotechnol. Bioeng.* 112 (2015) 98–103, <https://doi.org/10.1002/bit.25333>.
- [52] X. Lin, Y. Wang, X. Ma, Y. Yan, M. Wu, P.L. Bond, J. Guo, Evidence of differential adaptation to decreased temperature by anammox bacteria, *Environ. Microbiol.* 20 (2018) 3514–3528, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14306>.
- [53] Q. Yin, Y. Sun, B. Li, Z. Feng, G. Wu, The r/K selection theory and its application in biological wastewater treatment processes, *Sci. Total Environ.* 824 (2022) 153836, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153836>.
- [54] D. Jeong, H. Lim, W. Kim, Low-ammonia wastewater treatment by integration of partial nitrification and anaerobic ammonium oxidation (anammox) at 20 °C, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 105122, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105122>.
- [55] K. Fu, Z. Zeng, S. Huang, Effect of Sulfur Autotrophic Denitrification Sludge on the Start-Up Characteristics of Anaerobic Ammonia Oxidation, *Water (Basel)* 15 (2023) 1275, <https://doi.org/10.3390/w15071275>.
- [56] D. Wang, T. Li, K. Huang, X. He, X.-X. Zhang, Roles and correlations of functional bacteria and genes in the start-up of simultaneous anammox and denitrification system for enhanced nitrogen removal, *Sci. Total Environ.* 655 (2019) 1355–1363, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.321>.
- [57] S.L. Schwartz, L. Momper, L.T. Rangel, C. Magnabosco, J.P. Amend, G.P. Fournier, Novel nitrite reductase domain structure suggests a chimeric denitrification repertoire in the phylum Chloroflexi, *Microbiologyopen* 11 (2022), <https://doi.org/10.1002/mbo3.1258>.
- [58] M.S. Machado, M. Lauber, S. Reitmeier, T. Kacprowski, J. Baumbach, D. Haller, M. List, Network analysis methods for studying microbial communities: a mini review, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19 (2021) 2687–2698, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>.
- [59] C.J. Sedlacek, A.T. Giguere, M.D. Dobie, B.L. Mellbye, R.V. Ferrell, D. Woebken, L. A. Sayavedra-Soto, P.J. Bottomley, H. Daims, M. Wagner, P. Pjevac, Transcriptomic response of *Nitrosomonas europaea* transitioned from ammonia- to oxygen-limited steady-state growth, *MSystems* 5 (2020), <https://doi.org/10.1128/mSystems.00562-19>.
- [60] X. Liu, Y. Nie, X.-L. Wu, Predicting microbial community compositions in wastewater treatment plants using artificial neural networks, *Microbiome* 11 (2023) 93, <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01519-9>.
- [61] H. Sun, N. Yu, Y. Liu, Importance of low-abundance microbial species in response to disturbances in wastewater bioreactors, *Process Saf. Environ. Prot.* 162 (2022) 663–671, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.04.047>.
- [62] H.P. Trinh, S.-H. Lee, G. Jeong, H. Yoon, H.-D. Park, Recent developments of the mainstream anammox processes: challenges and opportunities, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 105583, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105583>.
- [63] V. Kouba, D. Vejmelková, E. Zwolsman, K. Hůrková, K. Navrátilová, M. Laurení, P. Vodičková, T. Podzimek, J. Hajslová, M. Pabst, M.C.M. van Loosdrecht, J. Bartáček, P. Lipovová, D.G. Weissbrodt, Adaptation of anammox bacteria to low temperature via gradual acclimation and cold shocks: Distinctions in protein expression, membrane composition and activities, *Water Res.* 209 (2022) 117822, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117822>.
- [64] T.R. Kent, Y. Sun, Z. An, C.B. Bott, Z.-W. Wang, Mechanistic understanding of the NOB suppression by free ammonia inhibition in continuous flow aerobic granulation bioreactors, *Environ. Int.* 131 (2019) 105005, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105005>.
- [65] D. Hauserr, R. Niederdorfer, H. Bürgmann, M.F. Lehmann, P. Magyar, J. Mohn, E. Morgenroth, A. Joss, Successful mainstream nitrification through NOB inactivation, *Sci. Total Environ.* 822 (2022) 153546, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153546>.

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Martyna Godzieba

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

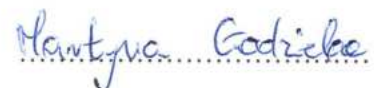
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Kandydata

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Ciesielski, S. Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: an unflinching cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea. *Water*, 17, 52 (2025). <https://doi.org/10.3390/w17010052>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych. Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 55 %.



(podpis)

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Ciesielski, S. Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: an unfaltering cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea. *Water*, 17, 52 (2025). <https://doi.org/10.3390/w17010052>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, recenzowaniu i edycji tekstu, merytorycznym nadzorze pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych.

Sławomir Ciesielski

(podpis)

Olsztyn, 29.04.2015

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Piotr Hliwa

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Ciesielski, S. Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: an unfaltering cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea. *Water*, 17, 52 (2025). <https://doi.org/10.3390/w17010052>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: sprawowaniu kontroli nad układem badawczym, udziale w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (rozdział 2.1), recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych.

Piotr Hliwa

(podpis)

Article

Network of Nitrifying Bacteria in Aquarium Biofilters: An Unfaltering Cooperation Between Comammox *Nitrospira* and Ammonia-Oxidizing Archaea

Martyna Godzieba ¹, Piotr Hliwa ² and Sławomir Ciesielski ^{1,*}

¹ Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna St. 45G, 10-719 Olsztyn, Poland; martyna.godzieba@uwm.edu.pl

² Department of Ichthyology and Aquaculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn Warszawska St. 117A, 10-719 Olsztyn, Poland; phliwa@uwm.edu.pl

* Correspondence: slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl

Abstract: Nitrification plays a crucial role in aquatic ecosystems and in the biofilters used in fish farms. Despite their importance, the role of canonical nitrifiers, comammox bacteria, and archaea has not yet been sufficiently investigated. The aim of this study was to characterize the microbiome of the external canister biofilter in a freshwater fish aquarium, with particular focus on the role of comammox *Nitrospira* and their competition with other nitrifiers. To achieve this, a comprehensive approach combining metagenome sequencing and co-occurrence network analysis was used to study the interactions between microorganisms in portable biofilter. The fish were subjected to a changing feeding regime that affected the ecological relationships and abundance of different microbial taxa. The results showed the presence of two types of nitrifiers in the biofilter: comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea (AOA). Five comammox *Nitrospira* genomes were reconstructed, with comammox clade B being the most abundant with an average abundance of $7.8 \pm 0.4\%$. In addition, two families of archaea were identified: *Nitrosopumilaceae* and *Nitrososphaeraceae*, with an average abundance of $4.3 \pm 0.4\%$. Heterotrophs were also abundant in the bacterial community, particularly in the genera *Actinomycetota*, *Planctomycetota*, and *Pseudomonadota*. Network analysis indicated competitive interactions between comammox and heterotrophs, whereas no competition was observed between comammox and AOA. The predominance of comammox *Nitrospira*, and AOA over canonical nitrifiers emphasizes their better adaptation to oligotrophic environments. This study highlights the importance of competition within the biofilter microbiome and the role of ecological interaction networks, which can contribute to the optimization of water purification systems in RASs.



Academic Editors:

Alejandro Gonzalez-Martinez,
Alejandro Rodriguez-Sanchez and
Barbara Muñoz-Palazon

Received: 28 November 2024

Revised: 20 December 2024

Accepted: 25 December 2024

Published: 28 December 2024

Citation: Godzieba, M.; Hliwa, P.; Ciesielski, S. Network of Nitrifying Bacteria in Aquarium Biofilters: An Unfaltering Cooperation Between Comammox *Nitrospira* and Ammonia-Oxidizing Archaea. *Water* **2025**, *17*, 52. <https://doi.org/10.3390/w17010052>

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: ammonia oxidizing archaea; aquarium biofilter; comammox *Nitrospira*; co-occurrence network; microbial community

1. Introduction

Aquaculture, i.e., the farming of aquatic organisms, is playing an increasingly important role in ensuring global food security. According to statistics from the Food and Agriculture Organization of the United Nations, the global consumption of seafood has increased more than fivefold in the last sixty years [1]. In view of the growing demand for aquatic products and the increasing problem of overfishing, it is necessary to constantly increase the amount of fish from different types of farms on the market. This requires the development of farming technologies that are not only efficient but also ecologically

sustainable. Conventional aquaculture systems such as the well-known and widely used ponds or cages have numerous disadvantages, including a strong dependence on water resources, the risk of pollution, and limited control over farming conditions [2,3]. For this reason, the development of recirculating aquaculture systems (RASs) has gained interest as a more sustainable alternative. In recirculating systems, water is repeatedly treated and purified, reducing water consumption while allowing more the precise control of environmental conditions such as temperature, pH, oxygen concentration, and contaminant levels [4].

One of the biggest challenges in fish farming in recirculation systems is the effective management of water quality, which is crucial for the health and growth of the fish [5]. In particular, fish metabolites such as ammonia (NH_3), which are produced as a by-product of protein metabolism, can accumulate in the water and lead to serious health problems or even the death of the farmed organisms [6]. Ammonia occurs in water in two forms: the more toxic non-ionized form and the less toxic ionized form. The proportion of the non-ionic fraction grows as the pH and temperature increase, and, at the same time, the risk of fish poisoning increases [7]. The tolerable concentrations of these compounds depend on the species and the age of the organisms [8]. Aquatic invertebrates are the most sensitive to elevated ammonia concentrations [9], particularly filter-feeding freshwater mussels of the family Unionidae, four of which have been classified by the United States Environmental Protection Agency as the most sensitive to acute ammonia toxicity, with a 96 h LC50 even as low as 0.06 mg/L [10]. Freshwater and marine fish are considered generally less sensitive, with similar tolerance levels, ranging from 0.068 to 2.0 $\text{NH}_3\text{-N}$ mg/L and 0.09 to 3.35 $\text{NH}_3\text{-N}$ mg/L (96 h LC50), respectively [11]. The duration of exposure to elevated ammonia concentrations is also important [12].

Biofilters, an integral part of recirculation systems, are responsible for biological water purification via the aforementioned nitrogen conversion. The microbiome of the biofilter, which consists of different groups of bacteria, plays a fundamental role in this process [13,14]. Among the microorganisms involved in nitrification, ammonia-oxidizing bacteria (AOB—*Nitrosomonas* sp. and *Nitrosococcus* sp.) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB—*Nitrobacter* sp., *Nitrotoga* sp., and *Nitrospira* sp.) play important roles, oxidizing ammonia to nitrites and nitrites to nitrates, respectively [15]. In recent years, however, new groups of microorganisms have been discovered that are also involved in this process, including complete ammonia oxidizing bacteria (comammox), which are able to oxidize ammonia directly to nitrates, and archaea from the phylum *Thaumarchaeota* [16].

According to the ecological theory of r/K strategies, comammox and ammonia oxidizing archaea (AOA) exhibit characteristics of organisms favoring the K strategy, which means that they are adapted to low-resource conditions [17]. Aquacultures, where it is imperative to ensure low ammonia concentrations, are a good example of such an oligotrophic environment. These microorganisms develop slowly but utilize the available resources more efficiently. In general, they are characterized by a high affinity for ammonia, although different genera of AOA exhibit varying levels of affinity [18].

In contrast, r-strategists, represented by species such as those of the genus *Nitrosomonas*, are faster-growing and display a lower affinity for ammonia than K-strategists [19]. However, there is also diversity within this taxon, meaning that different *Nitrosomonas* species can thrive in a wide range of environments. For example, *Nitrosomonas oligotropha*, as the name suggests, thrives in oligotrophic environments, while *Nitrosomonas europaea* is adapted to eutrophic environments [20].

Many different types of nitrifiers are found in aquaculture biofilters, and the formation of the microbiome in these biofilters is influenced by many factors. Key influences are known to include water temperature, oxygen concentration, and pH [21], as well as the

availability of organic substances and the water retention time [22]. Additionally, the design of the biofilter and the materials used in its construction can play crucial roles, as the properties of different surfaces can favor the colonization and growth of specific microorganisms. Changes in environmental conditions, e.g., fluctuations in the amount of nitrogen compounds resulting from changes in dosing and feeding schedules, can disrupt the ecological balance and lead to shifts in the abundance of certain bacterial groups, affecting the efficiency of the nitrification process. This is why it is so important to understand the processes that determine the effectiveness of the nitrogen compounds degradation in the fish breeding tank.

Unfortunately, the factors that determine the niche differentiation of nitrifiers and the shape of bacterial communities in RASs are not well-understood. In addition, most research has focused on large RASs with biofilters similar to those in wastewater treatment plants, while smaller portable canister filters remain largely unexplored. Portable canister biofilters are rarely studied, although unique processes can develop in this unusual environment that lead to the removal of pollutants. Furthermore, in such an environment, unique relationships may develop between the bacteria responsible for these processes. Due to the cyclical feeding of the fish, the microbiome of the biofilter is subject to constant change, which also makes it an extremely interesting research object for biological processes. This type of feeding harbors the risk that the activity and abundance of nitrifying bacteria will be significantly reduced at times when the food substrate is scarce. As a result, after feeding, when the level of nitrogen compounds increases, the risk of accumulation of toxic nitrogen compounds also increases, as the bacteria may not be able to adapt and process these compounds quickly enough. To our knowledge, this aspect of the biofilter function has not yet been investigated.

One approach to gaining greater insight into factors influencing nitrifier niche-differentiation and the shape of bacterial communities in RASs is to combine metagenome sequencing with network analysis. In recent years, metagenome-sequencing techniques have opened up new possibilities for studying the complexities of microbial communities in biofilters. Most bacteria cannot be cultivated in laboratory settings, making molecular and bioinformatics tools essential for studying them. Shotgun metagenome sequencing produces numerous reads, from which metagenome-assembled genomes (MAGs) are created. These MAGs represent the genomes of the bacteria present in the environment being examined. Metagenome sequencing enables the analysis of the whole metagenome of microorganisms present in environmental samples, facilitating the identification of both known and unknown bacterial and archaeal species [23]. This technique provides detailed information about the composition and function of the microbiome, enabling a better understanding of the factors that influence its formation. In combination with network analysis of the bacterial community, it is possible to identify complex interactions between different microbial species, which can lead to the discovery of new ecological relationships that would not be visible using traditional research methods [24]. Combining metagenome sequencing with network analysis provides a powerful research tool that enables a more comprehensive understanding of how the microbiome functions in recirculating systems.

Therefore, this study combined these techniques with the objectives of (i) testing the hypothesis that K-strategists dominate in an external freshwater canister biofilter, (ii) identifying the bacterial groups that dominate the competition for nutrients in the biofilter, and (iii) determining whether alternating the feeding regime affects the ecological relationships and abundance of different microbial taxa. This combination of metagenome sequencing with network analysis enabled a more detailed investigation of the complexity of the microbiome of portable biofilters, which can contribute to a better understanding and optimization of the processes occurring within them. In turn, this knowledge could

enable engineers to improve existing filters or design new ones for use in aquaculture recirculation systems.

2. Materials and Methods

2.1. Description of the Fish Farming Tank and Filtration System

All biomass samples for the microbial community analysis were taken from an EHEIM Professionel 3 (model 1200XLT) external canister filter with a volume of 13.5 L (EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau, Germany). The filter was equipped with both a mechanical filter and an ultraviolet light chamber, which inactivated heterotrophic and coliform bacteria. The biofilter contained three types of filter media. The bottom layer was filled with spherical PVC shapes, approximately 1.5 cm in diameter, with surfaces featuring numerous channels. The middle layer consisted of hollow ceramic cylinders, while the top layer was filled with a porous sponge. Water from the aquarium was pumped into the lower part of the filter, and the cleaned water was drained from the upper part back into the aquarium. A diagram of the filter can be seen in Figure 1. The maximum flow rate through the biofilter was 400 L per hour. This biofilter was designed to handle up to 0.5 kg of feed per day, based on the predicted ammonia production from fish protein catabolism at this feeding rate.

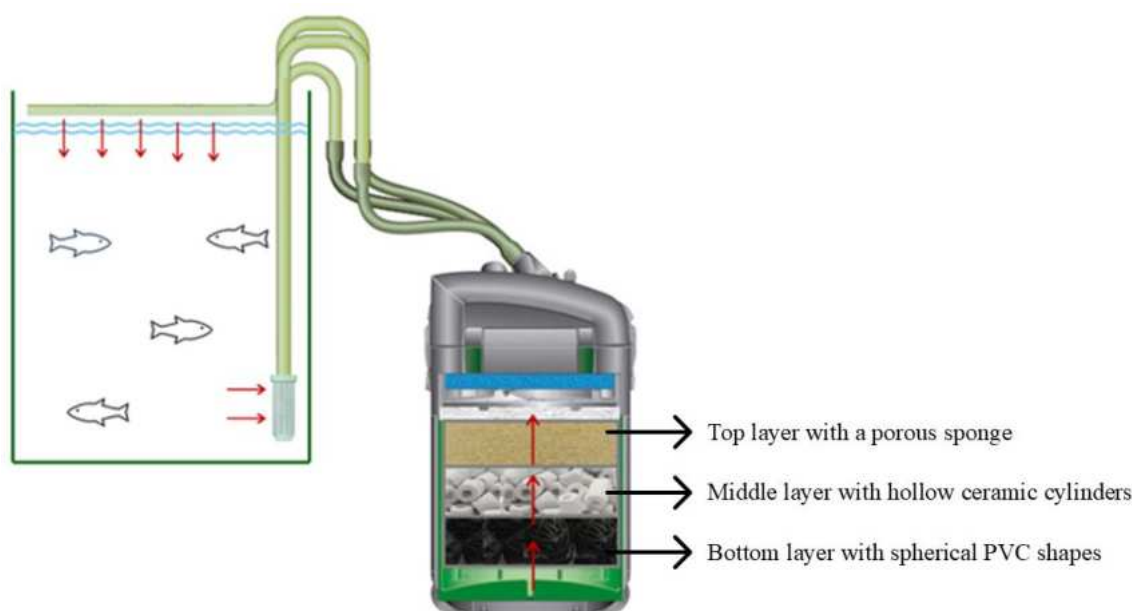


Figure 1. Schematic diagram of the fish farm and the biofilter under investigation. Red arrows indicate the direction of water flow. Figure 1 was created by modifying the schematic drawing of the biofilter from the enclosed instructions for use [25].

The RAS was a glass tank with a volume of 0.35 m³, in which 50 Amur sleeper fish (*Percottus glenii* Dybowski, 1877) were reared, with an average weight of 17.0 ± 5.7 g. The fish were fed every third day with commercial feed (Aller Aqua Ltd., Christiansfeld, Denmark) at a rate of approximately 2% of the total fish biomass. The typical water temperature in the system was 19.3 ± 0.2 °C, and the dissolved oxygen concentration was 8.98 ± 0.06 mg/L. The water's pH was stable, with an average value of 7.8 ± 0.1 . The photoperiod was consistent with natural day–night cycles.

2.2. Sampling and DNA Extracion

To assess the composition of the biofilter microbiome and any potential changes caused by alternating feeding, biomass samples were collected for microbiological analysis both the day before and the day after fish feeding. To reduce variability, sampling was conducted

during two distinct periods (Period I and Period II), each consisting of these two sampling days. On each sampling day, biomass samples were obtained from different layers of the biofilter and collected into sterile 50 mL Falcon tubes. The samples were promptly frozen and stored at -20°C until further analysis.

Before isolating DNA, the samples were centrifuged to eliminate excess water, and 500 mg of semi-dry biomass was used for DNA extraction. DNA samples isolated separately from each layer of the biofilter on the same sampling day were pooled together. This process ensured that the resulting DNA libraries provided a comprehensive representation of the microbiome throughout the entire biofilter.

DNA was isolated using the FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Bio, Solon, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the isolated nucleic acids was measured with a Qubit fluorimeter (Invitrogen, Waltham, MA, USA) using Qubit[™] Broad Range Quantification Assay Kits (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

2.3. Concentration of Nitrogen Compounds and Dissolved Oxygen

Water samples from both the inflow and outflow of the filter were collected at the same time as the biomass samples to determine the concentrations of various nitrogen compounds. The concentrations of ammonia, nitrite, and nitrate were measured on the day of sampling using photometric LCK cuvette tests (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany). The temperature and oxygen concentrations were measured using an HQ40D digital multimeter (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany).

2.4. Metagenomic Sequencing and Data Analysis

DNA sequencing was performed by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). A TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare the metagenomic library, which was sequenced on a NovaSeq 6000 S4 (Illumina, San Diego, CA, USA) using paired-end sequencing (2×150 bp). The raw sequences were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under accession number PRJNA1175723.

Read preprocessing, metagenomic assembly, binning, and taxonomic classification of the MAGs were carried out using tools from the KBase platform [26]. Briefly, raw reads underwent quality assessment, including trimming and filtering based on quality and length, using Trimmomatic (v.0.36) [27] and FastQC (v.0.12.1) [28]. The four metagenomic datasets were co-assembled using two different assemblers: MEGAHIT (v.1.2.9) [29] and metaSPAdes (v.3.15.3) [30], with a minimum contig length of 2000 bp. The two assemblies were compared using the KBase app "Compare Assembled Contig Distributions" (v.1.1.2), which generates a report similar to MetaQUAST. Based on assembly statistics (number of contigs, longest contig, N50, L50), the metaSPAdes assembly was selected for further analysis. MAGs were binned using three tools: MetaBAT2 [31], MaxBin2 [32], and CONCOCT [33]. To enhance binning quality, consensus assignments from these tools were integrated using DAS Tool [34] to create an optimized, non-redundant set of bins. Completeness and contamination of each MAG were assessed with CheckM [35].

MAGs that met quality thresholds (completeness $\geq 50\%$ and contamination $< 10\%$) were taxonomically classified using the GTDB-Tk toolkit [36]. Genome abundance was quantified across samples by mapping reads to the MAGs, with normalized abundance calculated using the formula from Yang et al. (2020) [37].

To investigate the metabolic roles of MAGs in the microbial community of the biofilter and identify bacteria involved in the nitrogen cycle, the DRAM [38] annotation pipeline on the KBase platform was used. DRAM uses Prodigal for gene prediction, with annotation based on the KOfam, Pfam, CAZy, and MEROPS databases.

Alpha and beta biodiversity analyses were conducted on the obtained MAGs. Bacterial community indices (Simpson index (1-D) and Shannon index (H)) and principal coordinate analysis based on Bray–Curtis dissimilarity were calculated using the PAST software (version 4.03) [39].

2.5. Construction of Microbial Co-Occurrence Network

The co-occurrence network of individual bacterial genera was constructed based on a correlation analysis. Spearman's correlation coefficients were calculated for bacterial genera that had an abundance of at least 0.01% in at least one sample. Spearman's rank correlation was calculated using Statistica (v.13.1, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). The resulting correlation matrix was used to visualize the network with Gephi software (v.0.10.1) [40], applying the "Force Atlas" layout. The network included only highly correlated taxa, defined as those with correlation coefficients ≥ 0.75 or ≤ -0.75 .

3. Results

3.1. Results of Physicochemical Measurements

The concentrations of nitrite and ammonia were very low in both the water that entered the filter and the purified water (at the detection limit). In contrast, the nitrate concentrations were higher than ammonia and nitrite concentrations in all the samples tested (Table 1). At the same time, there were no significant differences between the samples before and after feeding. Low ammonia and nitrite concentrations and the presence of nitrates indicate that the biofiltration system was functioning effectively and that the nitrification process was stable.

Table 1. Values of physicochemical characteristics measured in water flowing into and out of the biofilter.

		Before Feeding I (BF_I)	After Feeding I (AF_I)	Before Feeding II (BF_II)	After Feeding II (AF_II)
Ammonia (mg N/L)	inflow	0.01	0.016	0.007	0.008
	outflow	0.011	0.011	0.007	0.009
Nitrite (mg N/L)	inflow	0.015	0.009	0.065	0.01
	outflow	0.014	0.011	0.06	0.011
Nitrate (mg N/L)	inflow	4.05	4.66	4.39	2.49
	outflow	4.33	4.56	4.37	4.41
Dissolved oxygen (mg/L)		8.96	9.02	8.95	9.07
Temperature (°C)		19.1	19.2	19.7	19.2

3.2. Genome Reconstruction and Biofilter Microbiome Composition

The metagenome sequencing of biomass samples from the biofilter yielded a total of 71.5 Gbp of Illumina short-read raw data. The processing of these raw reads led to the reconstruction of 203 MAGs meeting the assumed quality requirements, i.e., at least 50% completeness and at most 10% contamination. Phylogenetic analysis of these MAGs based on 120 bacterial and 53 archaeal marker genes revealed that 200 of them represent bacterial genomes, while 3 represent archaeal genomes. All reconstructed genomes were assigned to one of 23 phyla, of which *Planctomycetota* (45 MAGs), *Bacteroidota* (32 MAGs), *Pseudomonadota* (29 MAGs), and *Chloroflexota* (22 MAGs) had the most representatives (Figure 2). Five MAGs were assigned to the phylum *Nitrospirata*, while three MAGs were assigned to the archaea phylum *Thermoproteota*. The large number of representatives of these phyla does not necessarily mean that they were very abundant in the microbial community. Of all 203 MAGs, only 37 reached an abundance of at least 1% in at least one sample. Both before and after feeding, *Actinomycetota* dominated the biofilter microbiome, although

their average abundance in the AF samples decreased significantly (from $22.4 \pm 1.8\%$ to $15.6 \pm 0.2\%$) (Figure 3). *Planctomycetota* (BF— $14.2 \pm 0.7\%$, AF— $14.0 \pm 0.3\%$) and *Pseudomonadota* (BF— $10.6 \pm 0.4\%$, AF— $12.3 \pm 0.9\%$) ranked second and third, respectively. The phylum *Nitrospirata*, which was represented by only five MAGs, ranked fourth (BF— $9.5 \pm 0.2\%$, AF— $11.9 \pm 1.4\%$). The abundance of archaea was also quite high: BF— $4.5 \pm 0.7\%$, AF— $4.0 \pm 0.2\%$.

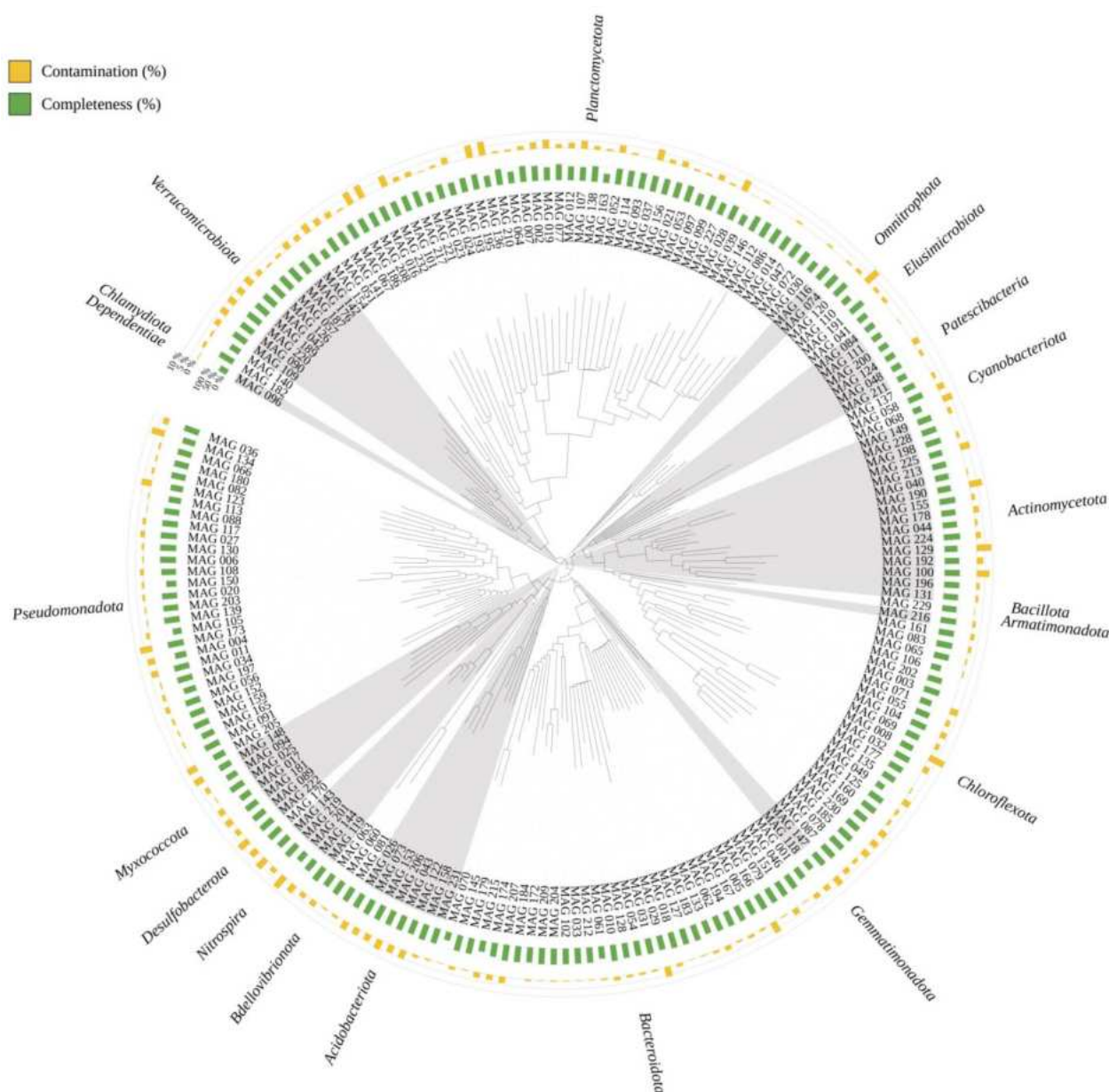


Figure 2. Phylogenetic maximum likelihood tree with the reconstructed bacterial MAGs. The tree was based on the concatenated alignment of 120 bacterial marker genes created by GTDB—Tk [36] with Genome Taxonomy Database (GTDB) release 207 and 214 and visualized using iTOL software (v. 7) [41].

The alpha diversity was assessed using the Simpson index of diversity (1-D) and Shannon index (H) (Table S1). The Simpson index highlights the evenness of the community and can be interpreted as the probability that two randomly selected individuals from a sample belong to different species. High values of this index indicate greater diversity within the community. Meanwhile, the Shannon index focuses on the richness of the community. The values of both of these indices did not change significantly before and after feeding. The beta biodiversity was analyzed using principal coordinate analysis based

on the Bray–Curtis dissimilarity. Figure S1 showed that no pairs grouped together and the considerable distances between the samples suggest that the microbial communities of the biofilter experienced significant fluctuations due to changing feeding conditions.

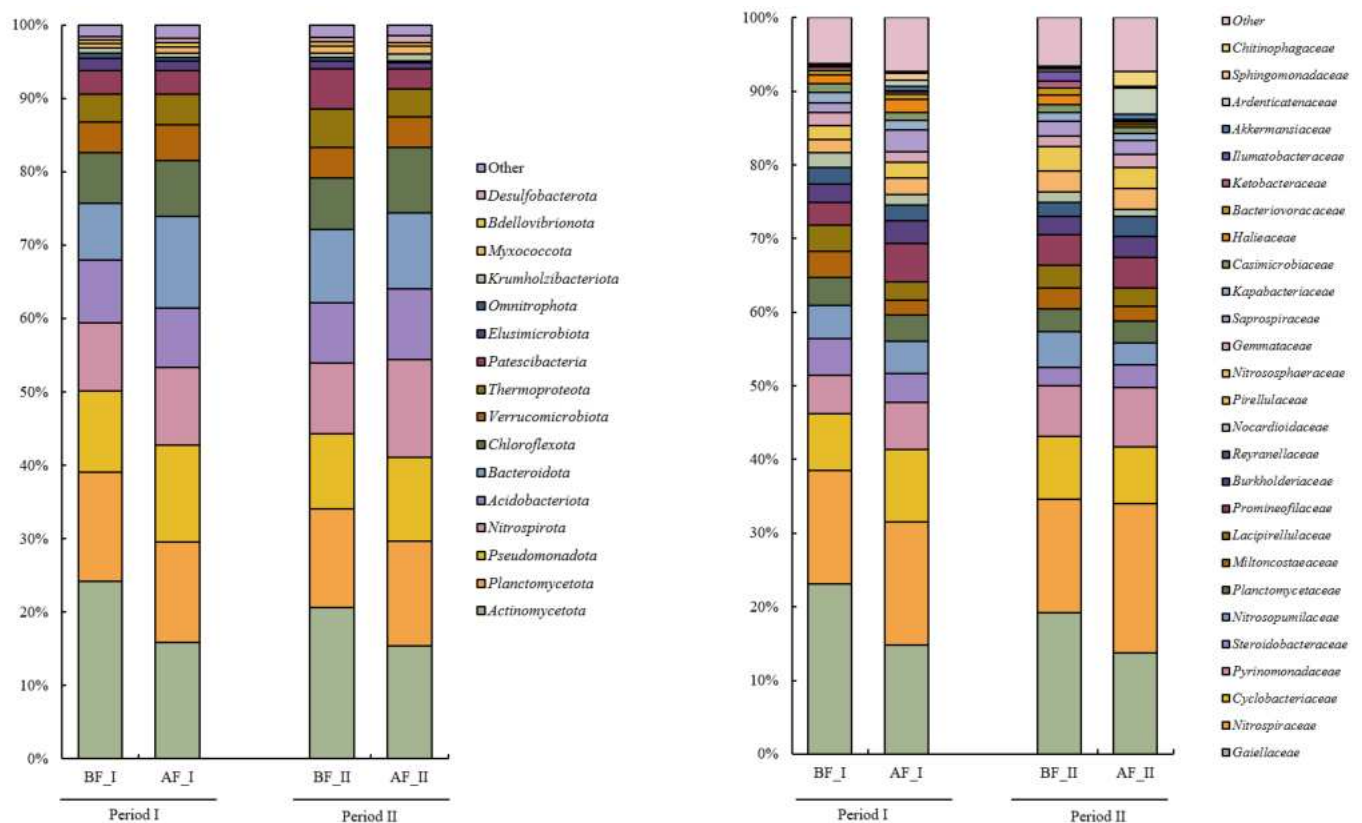


Figure 3. Abundance of the most abundant phyla (left) and families (right). Taxa whose abundance did not exceed 0.5 in any of the samples were summed and labelled “Other”. At the family level, the unclassified part of the bacterial community was omitted for better readability.

At lower taxonomic levels, the abundance of identified MAGs decreased. At the family level, nearly 40% of MAGs remained unclassified (BF: $38.4 \pm 1.0\%$, AF: $35.3 \pm 1.0\%$), while, at the genus level, as many as 80% of MAGs were unclassified (BF: $80.5 \pm 1.2\%$, AF: $75.7 \pm 1.4\%$). Due to this, the family level was chosen as the lowest taxonomic level for analysis (Figure 3). The most abundant family was *Gaiellaceae*, represented by two MAGs: 198 and 225. MAG 198 was the most abundant of all MAGs, with a relative abundance of $12.7 \pm 1.0\%$ and $9.0 \pm 0.2\%$ in BF and AF samples, respectively, whereas the abundance of MAG 225 ranged from 0.2% to 0.4%. The second most abundant family was *Nitrospiraceae*, with abundances of $9.5 \pm 0.2\%$ (BF) and $11.9 \pm 1.4\%$ (AF). Similar to *Gaiellaceae*, one of the five MAGs belonging to *Nitrospiraceae* (MAG 119) had a significantly (*t*-test $p < 0.05$) higher abundance than the others, with values of $7.3 \pm 0.1\%$ in BF samples and $8.3 \pm 0.5\%$ in AF samples. Two families of archaea were identified: *Nitrosopumilaceae* (MAGs 164 and 199) and *Nitrososphaeraceae* (MAG 092). Among the *Nitrosopumilaceae*, MAG 164 was several times more abundant than MAG 199 and ranked fifth in abundance at $2.7 \pm 0.2\%$ (BF) and $2.2 \pm 0.4\%$ (AF). MAG 092 had a slightly lower abundance, at 1.6% in both BF and AF groups.

A phylogenetic analysis of the MAGs classified as *Nitrospira* sp. was also carried out (Figure 4). It showed that both clades of comammox *Nitrospira* were present in the biofilter. Clade A comprised four MAGs—MAG 143, MAG 144, MAG 201, and MAG 219—while clade B comprised one—MAG 119.

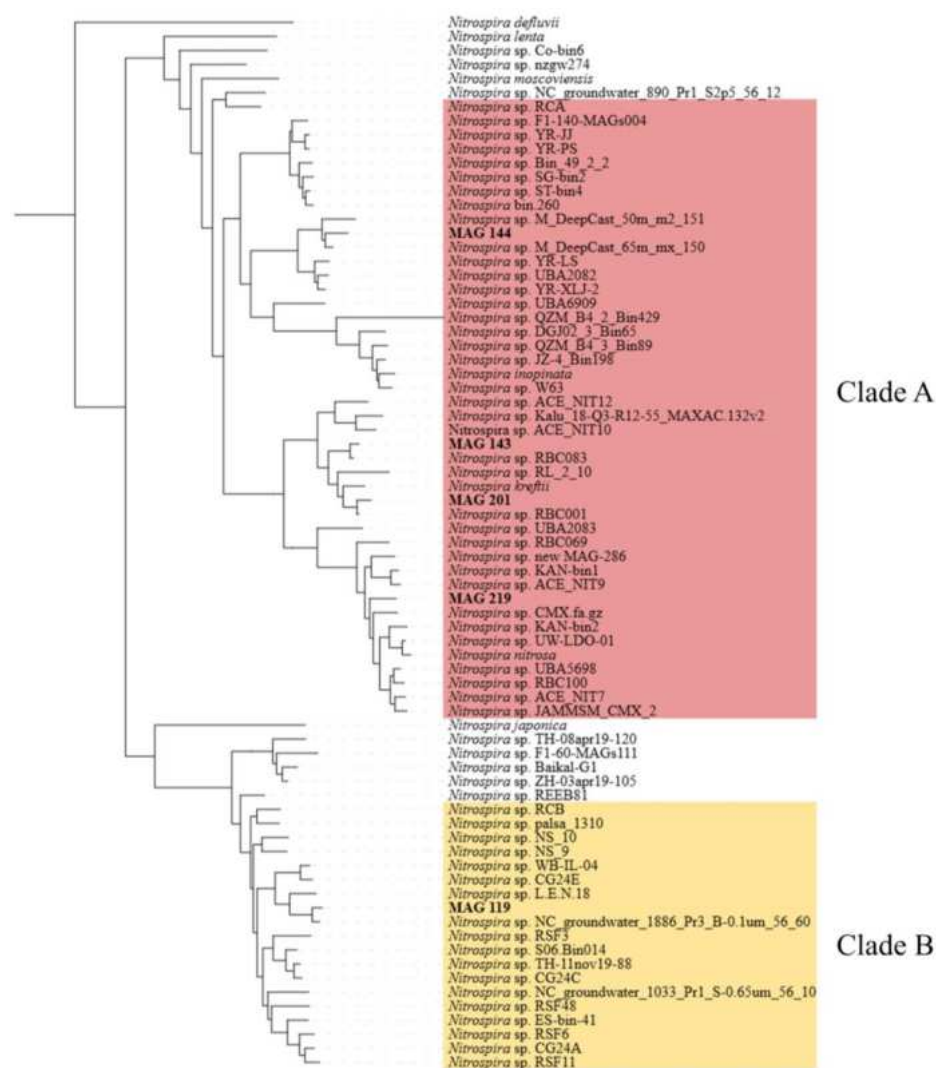


Figure 4. Phylogenetic maximum likelihood tree of the five reconstructed comammox *Nitrospira* genomes (MAG 119, MAG 143, MAG 144, and MAG 201). *Nitrospira* MAGs obtained in this study are highlighted in bold. Red and yellow boxes indicate comammox clades A and B, respectively. The tree was based on the concatenated alignment of 120 bacterial marker genes created by GTDB—Tk [36] with Genome Taxonomy Database (GTDB) release 207 and 214 and visualized using iTOL software (v.7) [41].

3.3. Biofilter Microbial Network

The structure of the microbial community of the biofilter was modelled using a co-occurrence network (Figure 5). The nodes in the network represent MAGs with a minimum abundance of 0.5% in at least one sample, and the edges connecting the nodes indicate the existence of strong correlations in co-occurrence and possible ecological dependence. The resulting network consists of 62 nodes connected by 844 edges. In the network, 415 edges have a negative correlation coefficient (red), while 429 have a positive one (green). The presence of two modules was detected in the network, which are marked with two colors. The modularity class depends on the density of connections between the microorganisms in the network and reflects a particular group of microorganisms that have more interactions with each other than with others. In the case of the studied biofilter microbiome, the pink module was slightly larger and contained 32 nodes (51.6%), while the green module contained 30 nodes (48.4%). MAGs representing *Nitrospira* sp. and *Nitrosocosmicus* sp. were assigned to the pink cluster, while *Nitrosotenuis* sp. was assigned to the green cluster. Most of the 402 edges connecting members of different modules had a negative value (385). In

turn, edges between members of the same module had a predominantly positive value. Such a distribution could indicate the existence of two competing subpopulations.

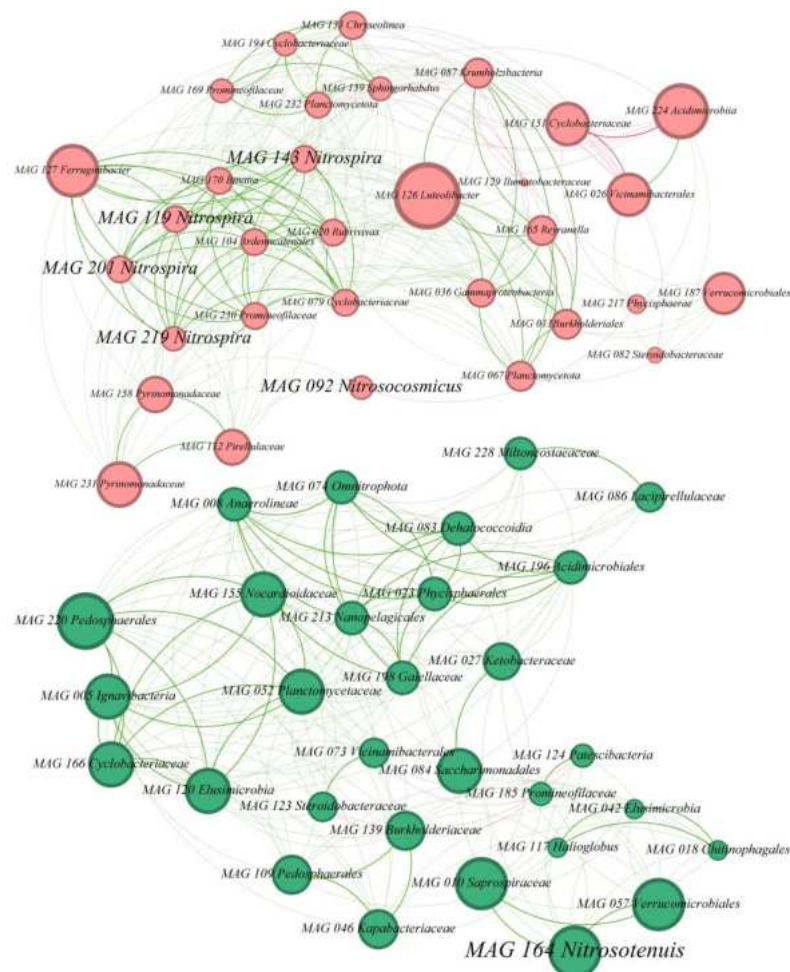


Figure 5. Microbial community network with nodes representing the most abundant MAGs (with a relative abundance of at least 0.5% in at least one sample). Each node represents a single MAG. The size of the nodes is directly proportional to the size of the betweenness centrality parameter. Red edges indicate negative correlations, while green edges indicate positive correlations. The thickness of the edges corresponds to the strength of the correlation. Using the “Modularity” function of the Gephi software, two subpopulations (marked with pink and green) were identified, which are connected by numerous negative edges. All negative edges connecting pink and green clusters were omitted to improve the readability of the graph.

The size of the nodes in the network is directly proportional to the value of betweenness centrality. This is a measure of how often a particular node is on the shortest paths between pairs of other nodes in the network. High betweenness centrality values of nodes representing bacterial genera indicate that they have a substantial effect on the connections between different bacterial groups and that ecological or metabolic dependencies exist between these genera. In the network, the highest values of betweenness centrality corresponded to MAG 126 (*Luteolibacter* sp.), 48.7; MAG 224 (*Acidimicrobiia* sp.), 40.5; and MAG 127 (*Ferruginibacter* sp.), 38.7. The nitrifiers had moderate betweenness centrality values (from 16.7 to 19.2), with the exception of MAG 164 (*Nitrosotenuis* sp.), which had a value of 30.6. However, the nodes representing *Nitrospira* sp. had very high values of the degree parameter (39–40), which measures the number of direct connections that a given node has with other nodes in the network.

3.4. Nitrogen-Cycle-Related Genes

Genes related to the nitrogen cycle, i.e., *amo*, *hao*, *nxr*, *napA/narG*, *nirK/nirS*, *nrfA*, *norB*, and *nosZ*, were found in most MAGs (Figure 6). All *Nitrospira* sp. MAGs had genes encoding ammonium monooxygenase, suggesting that they can be categorized as comammox *Nitrospira*. MAGs 119, 143, and 219 had a complete set of genes related to nitrification (*amo*, *hao*, and *nxr*). The *Nitrospira* sp. MAGs also differed in terms of other genes related to the nitrogen cycle. The *nirK/nirS* gene was not detected in MAGs 201 and 219, while *norB* was detected in MAGs 143, 144, and 219. In addition to comammox bacteria, archaea also played an important role in the nitrification process. The presence of the *amo* gene was detected in two of the three MAGs: MAG 092 (*Nitrosocosmicus* sp.) and MAG 164 (*Nitrosotenuis* sp.). The *nxr* gene was more frequent and was detected in a total of 30 MAGs. The most frequent genes were those related to the denitrification process: *napA/narG* was present in 46 MAGs, *nirK/nirS* in 73, *nrfA/nrfH* in 39, *norB* in 40, and *nosZ* in 42.

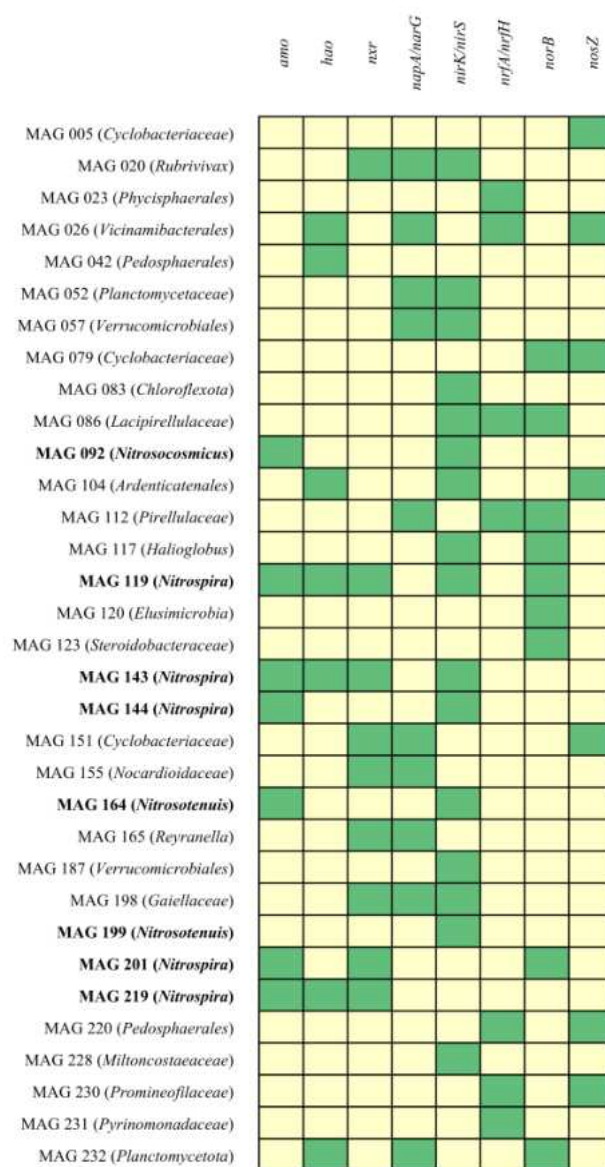


Figure 6. Presence of genes related to the nitrogen cycle in the reconstructed genomes. Only MAGs with an abundance of at least 1% in at least one sample are shown in the graph.

4. Discussion

4.1. The Diversity and Role of Nitrifiers in the Biofilter

The nitrifier community in the tested biofilter consisted of bacteria from the genus *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea from the genus *Thermoproteota*. The presence of the *amo*, *hao*, and *nrx* genes in all *Nitrospira* sp. MAGs clearly indicates that these bacteria are capable of complete nitrification. However, no MAGs were found from other nitrifying organisms, such as *Nitrosomonas* sp., which are commonly present in biofilters. Earlier studies attributed the major role in ammonia oxidation in biofilters to AOB [42], and, later on, to archaea [43]. In recent years, however, this perspective has evolved with the discovery of complete ammonia oxidizers within *Nitrospira* genus and extensive studies on their ecophysiology. Research indicates that comammox *Nitrospira* are highly abundant in oligotrophic environments, such as biofilters [44–46]. The advantage of these groups over canonical AOB could be their higher affinity for ammonia. The kinetic Michaelis–Menten equations, which yield the apparent half-saturation constant $K_{m(app)}$ and the maximum reaction rate V_{max} , are used to determine and compare the substrate affinity of different microorganisms. $K_{m(app)}$ is defined as the effective substrate concentration needed to achieve half of the maximum reaction rate. Thus, a lower $K_{m(app)}$ value indicates more effective substrate binding, even at low concentrations. V_{max} , on the other hand, represents the reaction rate when the enzyme is saturated with substrate [47]. Kits et al. (2017) [18] found that the $K_{m(app)}$ of a pure culture of *Nitrospira inopinata* ranged from 0.65 to 1.1 μM total ammonium (equivalent to ~ 0.053 – $0.083 \mu\text{M NH}_3$), with V_{max} reached at total ammonium concentrations as low as 5 μM . Currently, there are no other pure cultures of comammox bacteria available, so no precise kinetic data for other species of comammox *Nitrospira* exist. However, enrichment cultures are under investigation. In a study conducted by Sakoula et al. (2021) [48], the enrichment culture of *Nitrospira kreffii* demonstrated a very high affinity for ammonia, with a $K_{m(app)}$ of 0.040 $\mu\text{M NH}_3$. In general, the affinity for ammonia is typically lower in most representatives of AOB, although there is some variation. For instance, representatives of cluster 6a within the *Nitrosomonas* genus, such as *Nitrosomonas oligotropha*, prefer oligotrophic environments and possess a relatively high affinity for ammonia, with $K_{m(app)}$ values ranging from ~ 0.24 to 4.4 $\mu\text{M NH}_3$ [20,49,50]. In contrast, *Nitrosomonas* species from cluster 7 thrive better in eutrophic environments and at higher ammonia concentrations, with $K_{m(app)}$ values ranging from 12.5 to as much as 160 $\mu\text{M NH}_3$ [50,51]. Archaea also display varying levels of ammonia affinity. Notably, the AOA model strain *Nitrosopumilus maritimus* SCM1, found in saltwater and marine RAS biofilters, exhibited a very low half-saturation constant ($K_{m(app)} = 0.132 \mu\text{M}$ total ammonium, equivalent to $\sim 3 \text{ nM NH}_3$). This led researchers to initially believe that most archaea would also demonstrate a high affinity for ammonia [52]. However, later studies challenged this view. For example, Jung et al. (2022) [47] reported two strains of the genus *Nitrosocosmicus* sp. with significantly lower ammonia affinities, comparable to most AOB, with $K_{m(app)}$ values of approximately 12.37 $\mu\text{M NH}_3$ and 16.32 $\mu\text{M NH}_3$. This indicates that *Nitrosocosmicus* sp. may occupy similar ecological niches to AOB.

In this study, *Nitrosocosmicus* sp. was relatively abundant but less than *Nitrosotenuis* sp., the latter of which has been identified in freshwater biofilters, showing an affinity for ammonium with $K_{m(app)}$ values ranging from 38.7 to 41.9 μM total ammonium (approximately 4.86 to 5.26 $\mu\text{M NH}_3$) [18]. Low ammonium concentrations in biofilters favor the growth of bacteria exhibiting an “K” strategy with high substrate affinity. Considering the differences in ammonium affinity among various nitrifiers, the proportions observed in the tested biofilter align with the findings of the kinetic studies. Comammox bacteria were the most abundant, followed by AOA *Nitrosotenuis* sp. and *Nitrosocosmicus* sp., while canonical AOB, which typically follow an “r” strategy, were suppressed due to intense competition.

However, in systems with higher ammonia concentrations, the abundance of AOB may also increase. This was evident in the work of Roalkvam et al. (2021) [53], which investigated the microbial communities of two biofilters with different fish stocking densities. In the first biofilter, ammonia levels reached up to 17.6 mg N/L, with the abundance of *Nitrosomonas* sp. ranging from 2.3% to 2.9%. In the second biofilter, where ammonia concentrations reached up to 8.3 mg N/L, a high abundance of *Nitrosococcus* sp. and *Nitrosomonas* sp. was observed, with percentages of up to 3.3% and 2.7%, respectively.

The coexistence of potentially competing AOA and comammox is common in the microbiome of a single biofilter, although their proportions can vary. In this study, both groups remained abundant, although the total abundance of archaea decreased slightly after feeding. This change was not statistically significant (Wilcoxon test, $p > 0.05$). In contrast, the total abundance of *Nitrospira* sp. increased significantly (Wilcoxon test, $p < 0.05$), likely due to the greater availability of nitrogen and organic compounds. The concentrations of ammonia, nitrate, and nitrite were very low both before and after feeding. This is probably attributable to the high activity and rapid processing of nitrogen compounds by the bacteria in the biofilter. Consequently, any increase in nitrogen compound concentrations after feeding was not detectable at the time of water sampling for physico-chemical tests. This means that the microorganisms present in the biofilter had sufficient adaptability to react quickly to the increase in pollution.

Based on the phylogeny of the *amoA* gene, comammox *Nitrospira* can be divided into clades A and B, and further into subclades. A phylogenetic analysis of *Nitrospira* sp. MAGs revealed a diverse array of these organisms, indicating their affiliation with both comammox clades. Unlike previous biofilter studies that reported the presence of comammox bacteria, our findings showed that clade B was the most abundant in this study. A recent investigation of biofilters in freshwater aquaria found that comammox clade A was dominant, with 38 biofilters analyzed [45]. In that study, PCR was used to detect comammox, and clade A comammox *Nitrospira* was abundant across all samples, while clade B was not found. Overall, many studies suggest that comammox clade A is typically more common in various environments, with subclade A.1 frequently identified in aquatic and engineered systems, whereas subclade A.2 and clade B are often associated with soils and sediments [54–57]. However, the significant presence of comammox clade B in the freshwater biofilter examined in this study indicates that these patterns may not be universal. This highlights the fact that, despite a substantial advancement in our understanding of complete nitrifiers in recent years, it remains challenging to accurately determine the ecological niche preferences of these microorganisms.

4.2. Diversity and Role of Heterotrophic Bacteria in the Biofilter

One of the objectives of this study was to determine the composition of the microbial population in the biofilter and the roles of its individual members in the ecosystem, particularly regarding the purification of recirculating water. Nitrifying bacteria are crucial for the effectiveness of the water purification system. However, the majority of the biofilter community consists of heterotrophic bacteria, which are much more diverse. Such proportions of these two groups of microorganisms are typical for systems in which the C/N ratio is high, e.g., in fish farming systems, but also in wastewater treatment systems. As autotrophs, nitrifying bacteria prefer to utilize inorganic carbon [58]. Organic carbon, on the other hand, which in RAS systems comes from uneaten feed and fish feces, favors the development of heterotrophic bacteria. The autotrophic metabolism of carbon compounds is energetically less efficient than the heterotrophic metabolism, which is the reason for the higher maximum growth rates and growth yields of the heterotrophs compared to the autotrophs. A sudden increase in the amount of organic matter in the period after

feeding can lead to an intensification of the competitive relationship between heterotrophs and autotrophs [59]. Fast-growing heterotrophs consume the oxygen resources necessary for nitrification, which can lead to a reduction in nitrification rates and the accumulation of toxic fish metabolites in the recirculating water. However, heterotrophic bacteria also require nitrogen compounds for their growth, so, in the environment of RAS systems, the amount of available N is a factor limiting their growth, even under conditions of periodic growth of C compounds. The high affinity of comammox bacteria and AOA for ammonia gives them an advantage in competition with heterotrophs for this substrate, which, in this study, was probably the reason for the increase in abundance of nitrifiers and the decrease in abundance of the main representative of heterotrophs—*Gaiellaceae* (MAG 198)—in the samples after feeding.

Typically, bacteria from the phyla *Pseudomonadota* and *Bacteroidota* dominate in biofilters [13,60]. In the biofilter tested, these groups were present in significant numbers, but *Actinomycetota* and *Planctomycetota* were even more abundant.

Bacteria from the phylum *Actinomycetota* are commonly found in aquatic environments. Their presence in fish culture systems can positively influence both water quality and fish health, as they produce a wide range of secondary metabolites, including antibacterial compounds. Many genera within the *Actinomycetota* have the potential to be used as probiotics and in bioremediation [61]. As saprophytic heterotrophs, they produce various hydrolytic enzymes that decompose organic material, thereby improving water quality. In the study conducted by Babu et al. (2018) [62], the addition of *Actinomycetota* bacteria led to a significant reduction in biochemical oxygen demand (BOD) in pond shrimp culture systems. In this study, the phylum *Actinomycetota* was represented by 16 members, with the most prevalent member being MAG 198 from the *Gaiellaceae* family. This bacterium was first isolated from a deep mineral water aquifer [63] and has since been found mainly in various extreme environments, including aquatic settings such as the water-sediment interface of an acidic lake [64], mangrove wetlands [65], and the deep sea [66]. In this study, MAG 198 played a role in the denitrification process, as genes coding for nitrate and nitrite reductase were identified. This finding is consistent with existing literature, which states that the only known member of the *Gaiellaceae* family, *Gaiella occulta*, possesses genes coding for the *narGHJ* nitrate reductase complex and the MFS-type nitrate/nitrite transporter (*narK/nasA*) [67]. The abundance of *Gaiellaceae* decreased significantly in the samples after feeding. However, due to the limited information available on their ecophysiology, it is difficult to determine whether this decline is a direct consequence of environmental changes or the result of strong competitive pressure from growing comammox bacteria. Other families of the phylum *Actinomycetota*, including *Miltoncostaeaceae* and *Nocardiidaceae*, were found in much lower numbers.

In contrast to *Actinomycetota*, the abundance of *Planctomycetota* remained stable and did not change significantly in the samples after feeding. This phylum was the most abundant, represented by 45 MAGs. However, none of these MAGs dominated as strongly as MAG 198 in the *Actinomycetota* phylum. Like *Actinomycetota*, *Planctomycetota* are widespread in biofilter communities. Burut-Archanai et al. 2021 [68] also found that *Planctomycetota* developed more in biofilters acclimatized to low total ammonia nitrogen (TAN) concentrations (5 mg N/L), while *Actinomycetota* thrived at high TAN concentrations (100 mg N/L); however, in this study both groups were abundant despite low ammonia concentrations. This study identified several families of *Planctomycetota*: *Gemmataceae*, *Lacipirellulaceae*, *Pirellulaceae*, *Planctomycetaceae*, and *Tepidisphaeraceae*. *Planctomycetota* is a highly diverse group of aerobic or facultatively anaerobic heterotrophs. The only exceptions are anaerobic autotrophic anammox bacteria, which were not detected in this study. The genomes of bacteria from the phylum *Planctomycetota* contain genes related to the metabolism of nitrogen, oxygen, sulfur,

and metal(oids), highlighting their metabolic versatility and explaining their widespread occurrence in various environments.

In the analyzed biofilter, representatives of *Planctomycetota* likely played a significant role in several stages of the nitrogen transformation process. The *nxr* gene was identified in two MAGs, while the *hao* gene was found in eleven. At least one key gene associated with denitrification (*napA/narG*, *nirK/nirS*, *norB*, and *nosZ*) was present in thirty-five MAGs, and the *nrfAH* gene, essential for dissimilatory nitrate reduction (DNRA), was detected in twenty MAGs. Although the biofilter was aerobic, deeper layers of the biofilm, where oxygen diffusion is limited, may have facilitated anaerobic processes. Notably, nitrate reductase in the *Planctomycetota* MAGs was primarily encoded by the *napA* gene, which can function under both aerobic and anaerobic conditions. This contrasts with nitrate reductase encoded by *narG*, whose expression is inhibited by oxygen [69]. This suggests that aerobic denitrification could also occur in the biofilter. However, without gene expression studies, it is impossible to ascertain whether aerobic or anaerobic processes predominate.

Pseudomonadota and *Bacteroidota* are typically the most abundant phyla found in biofilters within the studied systems; however, their presence was lower in this analysis. An examination of the genes present in MAGs from these groups indicated their involvement in denitrification processes. The unusual proportions of the dominant bacterial groups may result from various environmental and ecological factors, as well as stochastic processes influencing the formation and differentiation of the microbiome. Furthermore, biofilter ecosystems in fish farms represent unique environments, as each system differs significantly from the others, which subsequently impacts the diversity of their microbiomes. Indeed, it is often suggested that this diversity is so extensive that each system possesses its own unique microbiological “fingerprint” [44]. This variability can be attributed to significant differences among individual recirculating aquaculture systems, such as the species and developmental stages of the fish being reared, the type of feed utilized, and the frequency and method of disinfection, as well as the design, filter material, and capacity of the biofilter itself [70]. The formation of the microbial community is also influenced by physicochemical factors such as the pH value, the total dissolved solids, or the oxygen concentration. For example, Bayer et al. 2019 [71], when studying several compartments of the same RAS system, found that the bacterial population in these compartments was modelled by physico-chemical parameters such as temperature, pH, and salinity, although they originated from the same reservoir. These diverse bacterial groups play important roles in various biological processes and, together with nitrifiers, help maintain the desired quality of recirculating water. For example, numerous species of denitrifiers not only engage in the conversion of nitrogen compounds but also degrade organic matter. Due to the differing environmental requirements of the various bacterial groups, particularly their varying tolerances to oxygen, bacterial biofilms in biofilters exhibit spatial organization [72]. In canister filters, where aerobic conditions prevail, anaerobic bacteria can develop in the deeper layers of the biofilm, while aerobic nitrifiers grow in the outer layers.

4.3. Competitive and Symbiotic Relationships Within the Bacterial Network of the Biofilter

In the plotted network, nitrifiers were characterized by high betweenness centrality and degree values. Nodes exhibiting these characteristics are likely to play a central role in the community, and their removal could disrupt the network structure unless new connections form between the remaining nodes [24]. The high values of these parameters in nitrifiers, especially in environments with large populations of denitrifiers, are likely due to their role as nitrate producers. However, this mutually beneficial cooperation can be much more complex.

The mutual positive influence between heterotrophs and comammox bacteria or AOA has been observed in various studies. For instance, in the research conducted by Xu et al. (2022) [73], which examined the nitrifying community within a wastewater nutrient removal system supplemented with volatile fatty acids, comammox bacteria were found to be abundant. The authors noted that comammox bacteria can provide vitamins and cofactors, such as cobalamin and biotin, to heterotrophs (e.g., *Burkholderiaceae*). In return, these heterotrophs supply amino acids, such as phenylalanine and tyrosine, which comammox bacteria cannot synthesize on their own.

Mehrani et al. (2022) [74] revised the conventional two-stage nitrification model by incorporating comammox and heterotrophic denitrification based on soluble microbial products (SMP). SMPs are organic compounds produced as a result of normal metabolic processes in microorganisms and the decomposition of biomass. These products, which can originate from autotrophic bacteria, can be effectively used as a carbon source by heterotrophic organisms, even at low concentrations.

Another example of symbiotic cooperation is between AOA and heterotrophs, as described by Bayer et al. 2019 [71]. The authors highlight that many AOA strains are sensitive to oxidative stress and lack the catalase gene, which encodes an enzyme that detoxifies hydrogen peroxide—a by-product of oxygen metabolism. The organic compounds released by the archaea can be utilized by the heterotrophs, which, in turn, neutralize the hydrogen peroxide present in the environment. This relationship benefits both groups of microorganisms.

The significant number of positive correlations identified in the network analyzed in this study suggests beneficial dependencies between autotrophs and heterotrophs. However, the division of the network into two distinct clusters, characterized primarily by negative correlations, indicates the presence of two competing populations. The cluster labelled in green primarily included those MAGs that had higher abundance before feeding, while the cluster labelled in pink consisted mainly of those with greater abundance following feeding. In a context of persistent nitrogen deficiency, this separation may arise from intensified competition for substrate during periods of greater availability.

All *Nitrospira* sp. MAGs were located in the pink cluster, while the most abundant AOA were found in the green cluster. Notably, none of the *Nitrospira* sp. MAGs displayed direct negative correlations with one another or with the AOA MAGs, despite potentially competing for the same substrate. It is important to recognize that ecological relationships among microorganisms are complex and influenced by a variety of factors. While network analysis has its limitations and cannot provide definitive conclusions, it serves as a valuable preliminary tool for modelling potential interactions among microorganisms and between these organisms and their environment. The relationships observed in this analysis may suggest new avenues for further research.

5. Conclusions

By studying the bacterial biofilter community and the role of its members in nitrogen transformation processes under varying availability of nitrogen compounds, we found that the role of canonical AOB in freshwater canister biofilters is much smaller than previously thought; in the case of the biofilter tested, it turned out to be negligible. In addition, comammox bacteria thrive much better than AOB in this type of biofilter due to their high affinity for ammonia. AOA can also significantly influence the nitrification process in the biofilter, although they are under competitive pressure from the comammox bacteria, which leads to a reduction in their abundance. Furthermore, fluctuations in the availability of food substrates shape the microbiome of the biofilter and affect the competitive relationships between the microorganisms.

The conclusions drawn may be useful for users of this type of aquarium biofilter. Often, when setting up smaller, non-commercial aquaria, users opt for ready-made preparations containing cultures of nitrifying bacteria, typically from the genera *Nitrosomonas* or *Nitrobacter*. However, this study suggests that aquarium biofilters are not an ideal environment for these bacteria, which should be taken into account when producing and using such preparations. Furthermore, the impact of feeding regimes on the abundance and competitive relationships among bacteria indicates that a planned feeding schedule for fish is essential in order to maintain a consistent level of food substrates for microorganisms.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/w17010052/s1>, Figure S1: Principal coordinates analysis based on the Bray—Curtis dissimilarity for the samples before (BF) and after feeding (AF); Table S1: Values of alpha biodiversity indices in microbial samples before (BF) and after feeding (AF).

Author Contributions: Conceptualization, M.G. and S.C.; methodology, S.C. and P.H.; formal analysis, M.G. and P.H.; investigation, M.G.; resources, M.G., S.C. and P.H.; data curation, M.G.; writing—original draft preparation, M.G. and P.H.; writing—review and editing, S.C. and P.H.; visualization, M.G.; supervision, S.C.; project administration, M.G.; funding acquisition, M.G. and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Polish National Science Center under the project no. UMO-2021/41/N/NZ9/01749.

Data Availability Statement: The raw sequences were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under accession number PRJNA1175723.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024—Blue Transformation in Action*; FAO: Rome, Italy, 2024; ISBN 978-92-5-138763-4.
2. Nyakeya, K.; Masese, F.O.; Gichana, Z.; Nyamora, J.M.; Getabu, A.; Onchieku, J.; Odoli, C.; Nyakwama, R. Cage Farming In The Environmental Mix Of Lake Victoria: An Analysis Of Its Status, Potential Environmental And Ecological Effects, And A Call For Sustainability. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* **2022**, *25*, 37–52. [\[CrossRef\]](#)
3. Thomas, M.; Pasquet, A.; Aubin, J.; Nahon, S.; Lecocq, T. When More Is More: Taking Advantage of Species Diversity to Move towards Sustainable Aquaculture. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2021**, *96*, 767–784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Ahmad, A.L.; Chin, J.Y.; Mohd Harun, M.H.Z.; Low, S.C. Environmental Impacts and Imperative Technologies towards Sustainable Treatment of Aquaculture Wastewater: A Review. *J. Water Process Eng.* **2022**, *46*, 102553. [\[CrossRef\]](#)
5. Yang, J.; Jia, L.; Guo, Z.; Shen, Y.; Li, X.; Mou, Z.; Yu, K.; Lin, J.C.-W. Prediction and Control of Water Quality in Recirculating Aquaculture System Based on Hybrid Neural Network. *Eng. Appl. Artif. Intell.* **2023**, *121*, 106002. [\[CrossRef\]](#)
6. Jamal, A.; Nasser, A.; van Rijn, J. Real-Time Ammonia Estimation in Recirculating Aquaculture Systems: A Data Assimilation Approach. *Aquac. Eng.* **2024**, *106*, 102432. [\[CrossRef\]](#)
7. Lin, W.; Luo, H.; Wu, J.; Hung, T.-C.; Cao, B.; Liu, X.; Yang, J.; Yang, P. A Review of the Emerging Risks of Acute Ammonia Nitrogen Toxicity to Aquatic Decapod Crustaceans. *Water* **2022**, *15*, 27. [\[CrossRef\]](#)
8. Vaage, B.; Myrick, C. The Effects of Acute and Chronic Exposure of Ammonia on Juvenile Burbot (*Lota lota*) Growth and Survival. *Aquaculture* **2021**, *542*, 736891. [\[CrossRef\]](#)
9. Zhang, T.-X.; Li, M.-R.; Liu, C.; Wang, S.-P.; Yan, Z.-G. A Review of the Toxic Effects of Ammonia on Invertebrates in Aquatic Environments. *Environ. Pollut.* **2023**, *336*, 122374. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. USEPA. *Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia*; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, USA, 2013; p. 2013.
11. Vera, L.; Aguilar Galarza, B.; Reinoso, S.; Bohórquez-Cruz, M.; Sonnenholzner, S.; Argüello-Guevara, W. Determination of Acute Toxicity of Unionized Ammonia in Juvenile Longfin Yellowtail (*Seriola rivoliana*). *J. World Aquac. Soc.* **2023**, *54*, 1110–1120. [\[CrossRef\]](#)
12. van der Meeren, T.; Mangor-Jensen, A. Tolerance of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) Larvae to Acute Ammonia Exposure. *Aquac. Int.* **2020**, *28*, 1753–1769. [\[CrossRef\]](#)

13. Almeida, D.B.; Magalhães, C.; Sousa, Z.; Borges, M.T.; Silva, E.; Blanquet, I.; Mucha, A.P. Microbial Community Dynamics in a Hatchery Recirculating Aquaculture System (RAS) of Sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **2021**, *539*, 736592. [CrossRef]
14. Dahle, S.W.; Gaarden, S.I.; Buhaug, J.F.; Netzer, R.; Attramadal, K.J.K.; Busche, T.; Aas, M.; Ribicic, D.; Bakke, I. Long-Term Microbial Community Structures and Dynamics in a Commercial RAS during Seven Production Batches of Atlantic Salmon Fry (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2023**, *565*, 739155. [CrossRef]
15. Neissi, A.; Rafiee, G.; Rahimi, S.; Farahmand, H.; Pandit, S.; Mijakovic, I. Enriched Microbial Communities for Ammonium and Nitrite Removal from Recirculating Aquaculture Systems. *Chemosphere* **2022**, *295*, 133811. [CrossRef] [PubMed]
16. Al-Ajeel, S.; Spasov, E.; Sauder, L.A.; McKnight, M.M.; Neufeld, J.D. Ammonia-Oxidizing Archaea and Complete Ammonia-Oxidizing *Nitrospira* in Water Treatment Systems. *Water Res. X* **2022**, *15*, 100131. [CrossRef] [PubMed]
17. Ghimire-Kafle, S.; Weaver, M.E.; Kimbrel, M.P.; Bollmann, A. Competition between Ammonia-Oxidizing Archaea and Complete Ammonia Oxidizers from Freshwater Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2024**, *90*, e01698-23. [CrossRef] [PubMed]
18. Kits, K.D.; Sedlacek, C.J.; Lebedeva, E.V.; Han, P.; Bulaev, A.; Pjevac, P.; Daebeler, A.; Romano, S.; Albertsen, M.; Stein, L.Y.; et al. Kinetic Analysis of a Complete Nitrifier Reveals an Oligotrophic Lifestyle. *Nature* **2017**, *549*, 269–272. [CrossRef]
19. Yin, Q.; Sun, Y.; Li, B.; Feng, Z.; Wu, G. The r/K Selection Theory and Its Application in Biological Wastewater Treatment Processes. *Sci. Total Environ.* **2022**, *824*, 153836. [CrossRef]
20. Kikuchi, S.; Fujitani, H.; Ishii, K.; Isshiki, R.; Sekiguchi, Y.; Tsuneda, S. Characterisation of Bacteria Representing a Novel *Nitrosomonas* Clade: Physiology, Genomics and Distribution of Missing Ammonia Oxidizer. *Environ. Microbiol. Rep.* **2023**, *15*, 404–416. [CrossRef]
21. Li, H.; Cui, Z.; Cui, H.; Bai, Y.; Yin, Z.; Qu, K. A Review of Influencing Factors on a Recirculating Aquaculture System: Environmental Conditions, Feeding Strategies, and Disinfection Methods. *J. World Aquac. Soc.* **2023**, *54*, 566–602. [CrossRef]
22. Chen, Z.; Chang, Z.; Zhang, L.; Jiang, Y.; Ge, H.; Song, X.; Chen, S.; Zhao, F.; Li, J. Effects of Water Recirculation Rate on the Microbial Community and Water Quality in Relation to the Growth and Survival of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 192. [CrossRef] [PubMed]
23. Rieder, J.; Kapopoulou, A.; Bank, C.; Adrian-Kalchhauser, I. Metagenomics and Metabarcoding Experimental Choices and Their Impact on Microbial Community Characterization in Freshwater Recirculating Aquaculture Systems. *Environ. Microbiome* **2023**, *18*, 8. [CrossRef] [PubMed]
24. Machado, M.S.; Lauber, M.; Reitmeier, S.; Kacprowski, T.; Baumbach, J.; Haller, D.; List, M. Network Analysis Methods for Studying Microbial Communities: A Mini Review. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 2687–2698. [CrossRef]
25. EHEIM GmbH & Co. KG. EHEIM Professional 3 1200XLT Manual. Available online: https://eheim.com/en_GB/aquatics/technology/external-filters/professionel-3/professionel-3-1200xlt?c=1939 (accessed on 1 October 2024).
26. Arkin, A.P.; Cottingham, R.W.; Henry, C.S.; Harris, N.L.; Stevens, R.L.; Maslov, S.; Dehal, P.; Ware, D.; Perez, F.; Canon, S.; et al. KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 566–569. [CrossRef]
27. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [CrossRef] [PubMed]
28. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc> (accessed on 28 November 2023).
29. Li, D.; Liu, C.-M.; Luo, R.; Sadakane, K.; Lam, T.-W. MEGAHIT: An Ultra-Fast Single-Node Solution for Large and Complex Metagenomics Assembly via Succinct de Bruijn Graph. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1674–1676. [CrossRef] [PubMed]
30. Nurk, S.; Meleshko, D.; Korobeynikov, A.; Pevzner, P.A. MetaSPAdes: A New Versatile Metagenomic Assembler. *Genome Res.* **2017**, *27*, 824–834. [CrossRef] [PubMed]
31. Kang, D.D.; Froula, J.; Egan, R.; Wang, Z. MetaBAT, an Efficient Tool for Accurately Reconstructing Single Genomes from Complex Microbial Communities. *PeerJ* **2015**, *3*, e1165. [CrossRef] [PubMed]
32. Wu, Y.-W.; Simmons, B.A.; Singer, S.W. MaxBin 2.0: An Automated Binning Algorithm to Recover Genomes from Multiple Metagenomic Datasets. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 605–607. [CrossRef]
33. Alneberg, J.; Bjarnason, B.S.; de Bruijn, I.; Schirmer, M.; Quick, J.; Ijaz, U.Z.; Lahti, L.; Loman, N.J.; Andersson, A.F.; Quince, C. Binning Metagenomic Contigs by Coverage and Composition. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 1144–1146. [CrossRef]
34. Sieber, C.M.K.; Probst, A.J.; Sharrar, A.; Thomas, B.C.; Hess, M.; Tringe, S.G.; Banfield, J.F. Recovery of Genomes from Metagenomes via a Dereplication, Aggregation and Scoring Strategy. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 836–843. [CrossRef] [PubMed]
35. Parks, D.H.; Imelfort, M.; Skennerton, C.T.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. CheckM: Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered from Isolates, Single Cells, and Metagenomes. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1043–1055. [CrossRef] [PubMed]
36. Chaumeil, P.-A.; Mussig, A.J.; Hugenholtz, P.; Parks, D.H. GTDB-Tk v2: Memory Friendly Classification with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* **2022**, *38*, 5315–5316. [CrossRef] [PubMed]
37. Yang, Y.; Pan, J.; Zhou, Z.; Wu, J.; Liu, Y.; Lin, J.-G.; Hong, Y.; Li, X.; Li, M.; Gu, J.-D. Complex Microbial Nitrogen-Cycling Networks in Three Distinct Anammox-Inoculated Wastewater Treatment Systems. *Water Res.* **2020**, *168*, 115142. [CrossRef] [PubMed]

38. Shaffer, M.; Borton, M.A.; McGivern, B.B.; Zayed, A.A.; La Rosa, S.L.; Solden, L.M.; Liu, P.; Narrowe, A.B.; Rodríguez-Ramos, J.; Bolduc, B.; et al. DRAM for Distilling Microbial Metabolism to Automate the Curation of Microbiome Function. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 8883–8900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hammer, D.A.T.; Ryan, P.D.; Hammer, Ø.; Harper, D.A.T. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 1.
40. Bastian, M.; Heymann, S.; Jacomy, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Proc. Int. AAAI Conf. Web Soc. Media* **2009**, *3*, 361–362. [[CrossRef](#)]
41. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (ITOL): An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 127–128. [[CrossRef](#)]
42. Burrell, P.C.; Phalen, C.M.; Hovanec, T.A. Identification of Bacteria Responsible for Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5791–5800. [[CrossRef](#)]
43. Bagchi, S.; Vlaeminck, S.E.; Sauder, L.A.; Mosquera, M.; Neufeld, J.D.; Boon, N. Temporal and Spatial Stability of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Aquarium Biofilters. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bartelme, R.P.; McLellan, S.L.; Newton, R.J. Freshwater Recirculating Aquaculture System Operations Drive Biofilter Bacterial Community Shifts around a Stable Nitrifying Consortium of Ammonia-Oxidizing Archaea and Comammox *Nitrospira*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. McKnight, M.M.; Neufeld, J.D. Comammox *Nitrospira* among Dominant Ammonia Oxidizers within Aquarium Biofilter Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2024**, *90*, e00104-24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yang, X.; Wu, Y.; Shu, L.; Gu, H.; Liu, F.; Ding, J.; Zeng, J.; Wang, C.; He, Z.; Xu, M.; et al. Unraveling the Important Role of Comammox *Nitrospira* to Nitrification in the Coastal Aquaculture System. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, 1355859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jung, M.-Y.; Sedlacek, C.J.; Kits, K.D.; Mueller, A.J.; Rhee, S.-K.; Hink, L.; Nicol, G.W.; Bayer, B.; Lehtovirta-Morley, L.; Wright, C.; et al. Ammonia-Oxidizing Archaea Possess a Wide Range of Cellular Ammonia Affinities. *ISME J.* **2022**, *16*, 272–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sakoula, D.; Koch, H.; Frank, J.; Jetten, M.S.M.; van Kessel, M.A.H.J.; Lüscher, S. Enrichment and Physiological Characterization of a Novel Comammox *Nitrospira* Indicates Ammonium Inhibition of Complete Nitrification. *ISME J.* **2021**, *15*, 1010–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sedlacek, C.J.; Nielsen, S.; Greis, K.D.; Haffey, W.D.; Revsbech, N.P.; Ticak, T.; Laanbroek, H.J.; Bollmann, A. Effects of Bacterial Community Members on the Proteome of the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas* Sp. Strain Is79. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 4776–4788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Sedlacek, C.J.; McGowan, B.; Suwa, Y.; Sayavedra-Soto, L.; Laanbroek, H.J.; Stein, L.Y.; Norton, J.M.; Klotz, M.G.; Bollmann, A. A Physiological and Genomic Comparison of *Nitrosomonas* Cluster 6a and 7 Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Microb. Ecol.* **2019**, *78*, 985–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Thandar, S.M.; Ushiki, N.; Fujitani, H.; Sekiguchi, Y.; Tsuneda, S. Ecophysiology and Comparative Genomics of *Nitrosomonas mobilis* Ms1 Isolated from Autotrophic Nitrifying Granules of Wastewater Treatment Bioreactor. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Martens-Habben, W.; Berube, P.M.; Urakawa, H.; de la Torre, J.R.; Stahl, D.A. Ammonia Oxidation Kinetics Determine Niche Separation of Nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **2009**, *461*, 976–979. [[CrossRef](#)]
53. Roalkvam, I.; Drønen, K.; Dahle, H.; Wergeland, H.I. A Case Study of Biofilter Activation and Microbial Nitrification in a Marine Recirculation Aquaculture System for Rearing Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.* **2021**, *52*, 94–104. [[CrossRef](#)]
54. Bai, X.; Hu, X.; Liu, J.; Yu, Z.; Jin, J.; Liu, X.; Wang, G. Canonical Ammonia Oxidizers and Comammox Clade A Play Active Roles in Nitrification in a Black Soil at Different PH and Ammonium Concentrations. *Biol. Fertil. Soils* **2024**, *60*, 471–481. [[CrossRef](#)]
55. Ding, F.; He, T.; Qi, X.; Zhang, H.; An, L.; Xu, S.; Zhang, X. Comammox *Nitrospira* Dominates the Nitrification in Artificial Coniferous Forest Soils of the Qilian Mountains. *Sci. Total Environ.* **2024**, *906*, 167653. [[CrossRef](#)]
56. Hsu, P.-C.; Di, H.J.; Cameron, K.; Podolyan, A.; Chau, H.; Luo, J.; Miller, B.; Carrick, S.; Johnstone, P.; Ferguson, S.; et al. Comammox *Nitrospira* Clade B Is the Most Abundant Complete Ammonia Oxidizer in a Dairy Pasture Soil and Inhibited by Dicyandiamide and High Ammonium Concentrations. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1048735. [[CrossRef](#)]
57. Yuan, D.; Zheng, L.; Tan, Q.; Wang, X.; Xing, Y.; Wang, H.; Wang, S.; Zhu, G. Comammox Activity Dominates Nitrification Process in the Sediments of Plateau Wetland. *Water Res.* **2021**, *206*, 117774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Steuernagel, L.; de León Gallegos, E.L.; Azizan, A.; Dampmann, A.-K.; Azari, M.; Denecke, M. Availability of Carbon Sources on the Ratio of Nitrifying Microbial Biomass in an Industrial Activated Sludge. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2018**, *129*, 133–140. [[CrossRef](#)]
59. Navada, S.; Knutsen, M.F.; Bakke, I.; Vadstein, O. Nitrifying Biofilms Deprived of Organic Carbon Show Higher Functional Resilience to Increases in Carbon Supply. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

60. Hüpeden, J.; Wemheuer, B.; Indenbirken, D.; Schulz, C.; Spieck, E. Taxonomic and Functional Profiling of Nitrifying Biofilms in Freshwater, Brackish and Marine RAS Biofilters. *Aquac. Eng.* **2020**, *90*, 102094. [[CrossRef](#)]
61. Sunish, K.S.; Sreedharan, K.; Shadha Nazreen, S.K. *Actinomycetes* as a Promising Candidate Bacterial Group for the Health Management of Aquaculture Systems: A Review. *Rev. Aquac.* **2023**, *15*, 1198–1226. [[CrossRef](#)]
62. Babu, D.T.; Archana, K.; Kachiprath, B.; Solomon, S.; Jayanath, G.; Singh, I.S.B.; Philip, R. Marine Actinomycetes as Bioremediators in Penaeus Monodon Rearing System. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *75*, 231–242. [[CrossRef](#)]
63. Albuquerque, L.; França, L.; Rainey, F.A.; Schumann, P.; Nobre, M.F.; da Costa, M.S. *Gaiella occulta* Gen. Nov., Sp. Nov., a Novel Representative of a Deep Branching Phylogenetic Lineage within the Class *Actinobacteria* and Proposal of *Gaiellaceae* Fam. Nov. and *Gaiellales* Ord. Nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34*, 595–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Cuevas, M.; Francisco, I.; Díaz-González, F.; Diaz, M.; Quatrini, R.; Beamud, G.; Pedrozo, F.; Temporetti, P. Nutrient Structure Dynamics and Microbial Communities at the Water–Sediment Interface in an Extremely Acidic Lake in Northern Patagonia. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, 1335978. [[CrossRef](#)]
65. Liu, M.; Huang, H.; Bao, S.; Tong, Y. Microbial Community Structure of Soils in Bamenwan Mangrove Wetland. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8406. [[CrossRef](#)]
66. Chen, R.-W.; He, Y.-Q.; Cui, L.-Q.; Li, C.; Shi, S.-B.; Long, L.-J.; Tian, X.-P. Diversity and Distribution of Uncultured and Cultured *Gaiellales* and *Rubrobacterales* in South China Sea Sediments. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 657072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Severino, R.; Froufe, H.J.C.; Barroso, C.; Albuquerque, L.; Lobo-da-Cunha, A.; da Costa, M.S.; Egas, C. High-Quality Draft Genome Sequence of *Gaiella occulta* Isolated from a 150 Meter Deep Mineral Water Borehole and Comparison with the Genome Sequences of Other Deep-Branching Lineages of the Phylum *Actinobacteria*. *Microbiologyopen* **2019**, *8*, e00840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Burut-Archana, S.; Ubertino, D.; Chumtong, P.; Mhuanlong, W.; Powtongsook, S.; Piyapattanakorn, S. Dynamics of Microbial Community During Nitrification Biofilter Acclimation with Low and High Ammonia. *Mar. Biotechnol.* **2021**, *23*, 671–681. [[CrossRef](#)]
69. Deng, M.; Dai, Z.; Senbati, Y.; Li, L.; Song, K.; He, X. Aerobic Denitrification Microbial Community and Function in Zero-Discharge Recirculating Aquaculture System Using a Single Biofloc-Based Suspended Growth Reactor: Influence of the Carbon-to-Nitrogen Ratio. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Li, Q.; Hasezawa, R.; Saito, R.; Okano, K.; Shimizu, K.; Utsumi, M. Abundance and Diversity of Nitrifying Microorganisms in Marine Recirculating Aquaculture Systems. *Water* **2022**, *14*, 2744. [[CrossRef](#)]
71. Bayer, B.; Pelikan, C.; Bittner, M.J.; Reinthaler, T.; Könneke, M.; Herndl, G.J.; Offre, P. Proteomic Response of Three Marine Ammonia-Oxidizing Archaea to Hydrogen Peroxide and Their Metabolic Interactions with a Heterotrophic *Alphaproteobacterium*. *mSystems* **2019**, *4*, e00181-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Cremin, K.; Duxbury, S.J.N.; Rosko, J.; Soyer, O.S. Formation and Emergent Dynamics of Spatially Organized Microbial Systems. *Interface Focus* **2023**, *13*, 20220062. [[CrossRef](#)]
73. Xu, S.; Chai, W.; Xiao, R.; Smets, B.F.; Palomo, A.; Lu, H. Survival Strategy of Comammox Bacteria in a Wastewater Nutrient Removal System with Sludge Fermentation Liquid as Additional Carbon Source. *Sci. Total Environ.* **2022**, *802*, 149862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Mehrani, M.-J.; Sobotka, D.; Kowal, P.; Guo, J.; Małania, J. New Insights into Modeling Two-Step Nitrification in Activated Sludge Systems—The Effects of Initial Biomass Concentrations, Comammox and Heterotrophic Activities. *Sci. Total Environ.* **2022**, *848*, 157628. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Network of nitrifying bacteria in aquarium biofilters: an unfaltering cooperation between comammox *Nitrospira* and ammonia-oxidizing archaea

Martyna Godzieba ¹, Piotr Hliwa ² and Sławomir Ciesielski ^{1,*}

¹ Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna St. 45G, 10-719 Olsztyn, Poland; martyna.godzieba@uwm.edu.pl

² Department of Ichthyology and Aquaculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn Warszawska St. 117A, 10-719 Olsztyn, Poland; phliwa@uwm.edu.pl

* Correspondence: slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl

Table S.1. Values of alpha biodiversity indices in microbial samples before (BF) and after feeding (AF).

	BF_I	BF_II	AF_I	AF_II
Simpson_1-D	0.97	0.97	0.98	0.98
Shannon_H	4.35	4.43	4.57	4.48

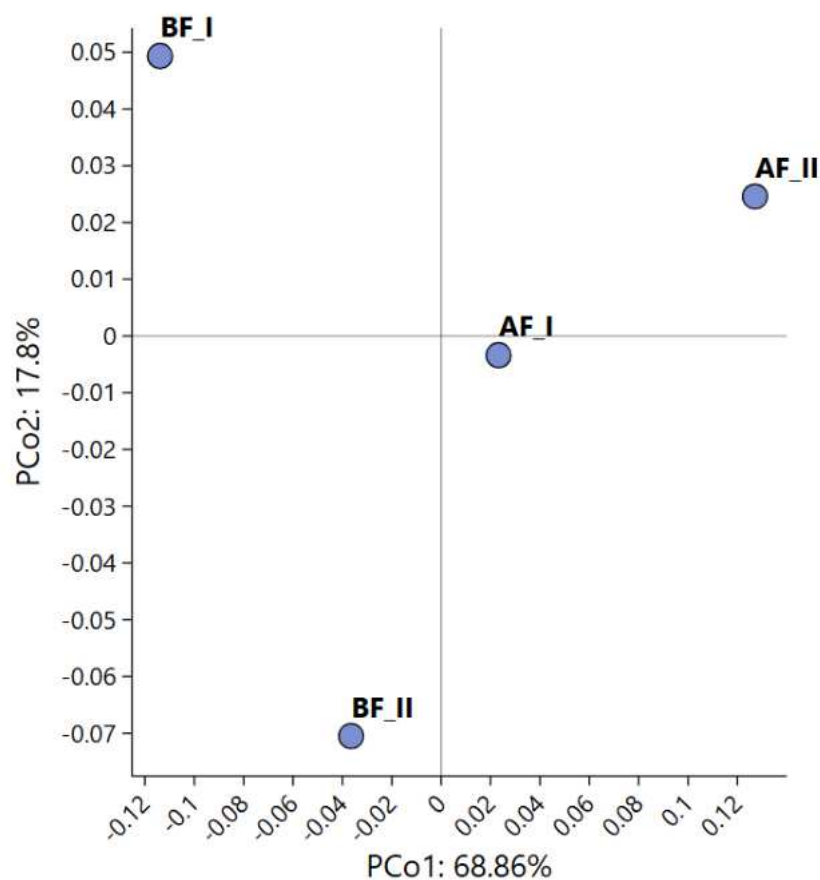


Figure S.1. Principal coordinates analysis based on the Bray – Curtis dissimilarity for the samples before (BF) and after feeding (AF).

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Martyna Godzieba

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Kandydata

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia J., Ciesielski, S. Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 17, 107494 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych. Mój procentowy udział w przygotowaniu publikacji szacuję na 55 %.

Martyna Godzieba

(podpis)

Olsztyn, 22.04.2024

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia J., Ciesielski, S. Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 17, 107494 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, recenzowaniu i edycji tekstu, merytorycznym nadzorze pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych.



(podpis)

Olsztyn, 29.04.2025

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Piotr Hliwa

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia J., Ciesielski, S. Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 17, 107494 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: sprawowaniu kontroli nad układem badawczym, udziale w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (rozdział 2.1), recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych.



(podpis)

Gdańsk, 30.04.2025 r.

(miejscowość, data)

prof. dr hab. inż. Jacek Mąkinia

(imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. inż. Marcin Dębowski

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

Współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Godzieba, M., Hliwa, P., Mąkinia J., Ciesielski, S. Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm. *Journal of Water Process Engineering*, 17, 107494 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>, mój wkład merytoryczny w jej przygotowaniu polegał na: pomocy w interpretacji wyników technologicznych, udziale w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, recenzowaniu i edycji tekstu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Panią Martynę Godziebę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata (55 %) Pani Martyny Godzieby polegający na: udziale w zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części badawczej (pobór prób, izolacja kwasów nukleinowych oraz ich analiza ilościowa i jakościowa, pomiar stężenia związków azotowych), informatycznej obróbce surowych odczytów sekwencji, opracowaniu i interpretacji wyników mikrobiologicznych, graficznym opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, pozyskaniu środków finansowych.



Signed by /
Podpisano przez:

Jacek Albert
Mąkinia

Date / Data:
2025-04-30 07:17

(podpis)



Comammox *Nitrospira* dominates the nitrifying bacterial community in the external canister biofilter in the tank fish farm

Martyna Godzieba^a, Piotr Hliwa^b, Jacek Mąkinia^c, Sławomir Ciesielski^{a,*}

^a Department of Environmental Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Sloneczna St. 45G, 10-719 Olsztyn, Poland

^b Department of Ichthyology and Aquaculture, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Warszawska St. 117A, 10-719 Olsztyn, Poland

^c Gdansk University of Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering, Department of Sanitary Engineering, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdansk, Poland

ARTICLE INFO

Editor: H.H. NGO

Keywords:

Canister biofilter

Comammox *Nitrospira*

Microbial community

Nitrification

RAS

ABSTRACT

Portable canister filters are often used in aquaria or smaller recirculating aquaculture systems (RAS). However, the microbiome of these canister filters, especially the presence of comammox bacteria, has not been extensively studied. The aim of this study was to explain the mechanisms of nitrogen transformation, with a focus on the comammox process, in a portable filter under varying organic compound availability. Biomass samples were collected before and after feeding, and the microbial community was profiled using metagenomics and meta-transcriptomics, with ecological relationships analyzed through network analysis. The results showed that *Nitrospira* was the dominant nitrifier in the biofilter, with an average abundance of 4.2 %, while other nitrifiers, such as *Nitrosomonas*, were present at significantly lower levels (0.1 % average abundance). High transcription levels of the *amo*, *hao*, and *nxr* genes of comammox *Nitrospira* further indicated their critical role in nitrification within the filter. Aerobic denitrifiers, e.g. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, and *Aeromonas*, were also abundant in the biofilter (8.3 %, 4.2 %, and 1.6 % average abundance respectively). Nitrogen transformations varied across filter layers, with more intensive nitrification occurring in the lower layers and increased denitrification in the upper layers. The most important competitors of the comammox bacteria were heterotrophic bacteria of the genus *Pseudomonas*, which increase in abundance after feeding and inhibit comammox activity. These findings provide insights into nitrogen conversion in canister filters at the molecular level and offer practical recommendations for engineers when designing this type of filter.

1. Introduction

Traditional aquaculture methods face significant challenges, including environmental impact and limited opportunities for further development to meet increasing consumer demand [1]. These methods typically include cage-based systems in natural water bodies, such as rivers, lakes, or oceans, as well as pond farming and land-based systems with flow-through tanks and raceways [2]. While these conventional systems are still in use, they present several drawbacks, including water pollution [3], transmission of parasites and pathogens between farmed fish and wild fish populations [4], escape of farmed fish, the need for substantial water resources [5], and the generation of wastewater [6].

In response to the above problems, the fish production industry has evolved in recent years and is increasingly using recirculating aquaculture systems (RAS) [7]. The advantages of such systems over traditional aquaculture methods are due in part to their ability to grow fish at

higher densities in indoor tanks under strictly controlled conditions. This is particularly important in countries where the environmental conditions for rearing fish and seafood in natural or artificial external water reservoirs are unfavorable [8]. In addition, closed-loop farming reduces the impact of aquaculture facilities on the natural environment, as less wastewater is discharged, and water is reused. However, fish farming in RAS, with tanks that generally have a high stocking density, presents a number of challenges that need to be overcome [9]. In order to maintain the well-being and health of the fish, it is necessary to ensure adequate water quality and to remove fish metabolic products from the water. Special biofilters are used for this purpose, which are inhabited by populations of bacteria that utilise and neutralize the metabolic products of the fish.

The most important by-product of fish metabolism is ammonia, and its toxicity depends on the form in which it occurs. Total ammonia nitrogen (TAN) consists of ammonia in ionic (NH_4^+) and non-ionic (NH_3)

* Corresponding author.

E-mail address: slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl (S. Ciesielski).

<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107494>

Received 29 October 2024; Received in revised form 26 February 2025; Accepted 13 March 2025

2214-7144/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

forms. Non-ionic ammonia penetrates biological membranes more easily and accumulates in tissues and organs, impairing their function. For this reason, it is many times more toxic than ionized ammonia [10]. The proportion of the non-ionic fraction grows as the pH and temperature increase, and at the same time, the risk of fish poisoning increases [11]. Nitrite is another toxic nitrogen compound, which is formed during the nitrification process via ammonia oxidation. Tolerable concentrations of these compounds differ between fish species and the age of farmed fish. For example for Atlantic salmon the total concentration of ammonia-nitrogen should not exceed 2 mg N/l and the nitrite concentration should not exceed 0.1 mg N/l [12]. In sturgeons, very young individuals are the most sensitive, and a 24-h exposure to ammonia at a concentration of 0.9 mg N/l can be fatal for half of the individuals (LC50) [13]. This sensitivity decreases with age and the LC value for fish weighing around 450 g is 2.5 mg N/l. Sturgeons are also considered to be relatively resistant to nitrite [14].

Since even low concentrations of ammonia and nitrite can be very harmful to fish, their effective removal is crucial for the success of an aquaculture facility. To achieve this, water purification filters in RAS provide a microbiologically rich environment [15,16], which is colonized by groups similar to those found in wastewater treatment plants. The filters contain numerous nitrifying bacteria: ammonia oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA), as well as nitrite oxidizing bacteria (NOB) [17]. In the first step of nitrogen removal, ammonia is oxidized to nitrite. Bacteria of the genus *Nitrosomonas* or *Nitrosococcus* are involved in this process. In the next stage, bacteria such as *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, or *Nitrospira* oxidize nitrite to nitrate.

However, most nitrifying bacteria are classified as so-called r-strategists, which have a low affinity for the substrate and develop well under eutrophic conditions [18]. In RAS systems, on the other hand, the concentration of nitrogen compounds is relatively low (compared to, e.g. wastewater treatment plants), especially in the periods before feeding. Therefore, RAS systems seem to be a good environment for the development of K-strategists such as comammox *Nitrospira*, which have a high affinity for the substrate and grow well in resource-limited environments [19]. The presence of comammox *Nitrospira* has been confirmed in various commercial-scale RAS using different types of biofilters, for example in the fluidized sand biofilter [17], fixed bed biofilters [16] and moving bed biofilter [20]. Its abundance, however, is highly variable between the different systems, and the reason for this variability is not explained. Moreover, many different types of nitrifiers are found in biofilters, and the factors that determine their niche differentiation and shape the bacterial communities in RAS are not well understood. The most common factors that determine the composition of the microbial community in aquaculture biofilters include the species of fish being farmed, the type of feed, and physicochemical parameters such as pH, temperature, and salinity. The design of the biofilter and the type of biofilter medium are also likely to be important factors influencing the microbiome. Fish health in RAS depends on the health and functioning of the microbial community in the filters. Changes in feeding doses and schedules can cause large variations in nitrogen compound levels in the water, which can have important effects on the microbial community, affecting its ability to treat the recirculated water. Thus, considering the importance of effective water treatment for the health of fish in RAS systems, it seems important to understand how alternating feeding and the resulting variations in nitrogen-compound concentrations would affect the filter microbiome. In addition, most studies have focused on commercial-scale RAS with large biofilters similar to those used in wastewater treatment plants, while smaller portable canister filters have not yet been investigated. Portable canister biofilters are commonly used because they are easy to set up, inexpensive to maintain, and readily available on the market. These advantages make them suitable for small recirculating systems, such as laboratory-scale research setups, pet shops, and private aquariums of hobbyists. Despite their frequent use, these biofilters are rarely studied, even though unique processes can develop in this particular environment, leading to the elimination of

harmful pollutants. The use of different materials in these layered filters creates conditions that favor the development of various groups of microorganisms with different ecological preferences. In addition, the microbiome of the biofilter under investigation is subject to constant changes and is exposed to environmental stress through the alternating feeding of the fish. This variability can favor the development of unique relationships between the bacteria responsible for these pollutant removal processes, making the biofilter an extremely interesting subject for the study of microbiological processes.

The aim of this study was to address this knowledge gap by (i) verifying the presence of comammox *Nitrospira* in the freshwater external canister biofilter and identifying the main bacterial groups it competes with for the nitrogen transformations (ii) describing the ecological network of relationships among these bacteria, and (iii) determining how variations in organic/nitrogen compound concentrations influence the activity and abundance of different microbial taxa. To achieve these aims, we employed shotgun sequencing to identify the bacterial groups within the biofilter and metatranscriptomics to assess their activity in response to substrate availability. In addition, we used co-occurrence network analysis to indicate ecological relationships. Gaining deeper insights into these complex systems can enhance the management of aquaculture recirculating systems, thus improving fish welfare and increasing production.

2. Materials and methods

2.1. Description of recirculating aquaculture system biofilter

All samples were taken from an EHEIM professional 3 (model 1200XLT) external canister filter with a volume of 13.5 l, equipped with a mechanical filter and an ultraviolet light chamber unit that inactivated heterotrophic and coliform bacteria. The biofilter contained three types of filter material. The bottom one, was filled with spherical shapes made of PCV with a diameter of about 1.5 cm and a surface with numerous channels. The middle level consisted of hollow ceramic cylinders, and the top one was filled with a porous sponge. The water from the aquarium was pumped into the lower part of the filter, and the cleaned water was drained from the upper part of the filter back into the aquarium. The hydraulic retention time (HRT) of the system tank was 2.6 h. A diagram of the filter is shown in Fig. 1. The recirculation system discussed in this study has been used to maintain a stock of carp and sturgeon. As this system was designed for fish maintenance rather than research purposes, the fish were fed at a low intensity. Over a period of 6 months, the average increase in fish biomass was about 165 grammes for sturgeon and about 100 grammes for carp. The fish were fed every third day with commercial feed (Aller Aqua Ltd., Christians-feld, Denmark) at a dose corresponding to approximately 2 % of the total fish biomass per

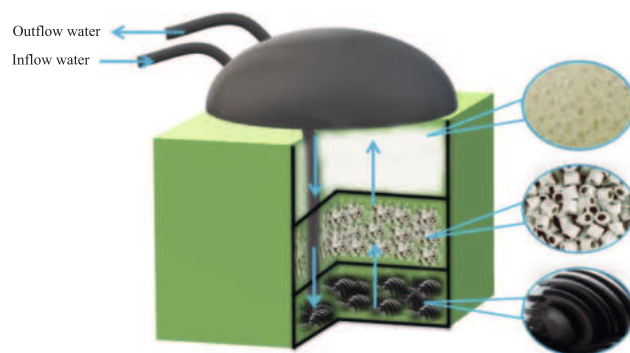


Fig. 1. Schematic diagram of the biofilter in the recirculation system that purified the water in the rearing aquarium. The biomass samples for the microbiological tests were taken from the three layers, which contained different types of filter materials.

day. This feeding regimen is routinely used in this system and was not modified for the purposes of this study. The filter is cleaned on average every six months. After cleaning and introduction of the fish into the tank, it is operated for 2 weeks without stocking, in water with the addition of approximately 100 g of feed, which is later fed to the fish. This ensures that the microbiome in the system is stabilised before the fish are added to the tank. The RAS system was a square tank with a volume of 1.05 m³ made of polyester-glass laminate where two fish species were cultured: 12 individuals of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt, 1869) and 35 individuals of common carp *Cyprinus carpio* L. juveniles (mean size 320 ± 75 g and 180 ± 35 g, respectively). The typical water temperature in the tested system was (mean ± standard deviation) 18.7 °C ± 0.2, and the dissolved oxygen concentration was 8.7 mg/l ± 0.3. pH of water was stable reaching a mean value of 7.8 ± 0.1. The photoperiod was consistent with the natural one.

2.2. Sample collection and extraction of nucleic acids

To assess the composition of the biofilter microbiome and possible changes caused by alternating feeding, biomass samples were taken for microbiological analysis both the day before and the day after fish feeding. To reduce variability, samples were collected in two different time periods: the first sampling (I) and the second sampling (II) approximately two weeks apart. On each sampling day, biomass samples were taken from different layers of the biofilter. The biomass for DNA extraction and metagenomics was collected into sterile 50 ml Falcon tubes. The samples for RNA isolation and metatranscriptome analysis were collected into sterile 2 ml Eppendorf tubes. These RNA samples were centrifuged immediately after collection to remove excess water and suspended in a phenol solution (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) to prevent degradation of the transcripts. All biomass samples were frozen immediately after collection and stored at −20 °C until the isolation of nucleic acids.

Prior to the extraction procedure, the samples were thawed and centrifuged to remove excess liquids. For DNA extraction, 500 mg of the semi-dry biomass was used, while 50 mg was used for RNA extraction. The DNA samples isolated from each layer of the biofilter on the same sampling day were pooled together. This procedure ensured that the resulting DNA libraries provided a comprehensive representation of the microbiome throughout the entire biofilter. To investigate which bacterial groups were most active in each layer of the biofilter, the RNA samples from each layer were sequenced separately.

DNA was isolated using an MP Bio FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Bio, Solon, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. For RNA isolation, a Total RNA Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) was used. The concentration of isolated nucleic acids was measured with a Qubit fluorimeter (Invitrogen, Waltham, MA, USA) using Qubit™ Broad Range Quantification Assay Kits (Invitrogen, Waltham, MA, USA). The quality of the isolated RNA was measured using a 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.3. Concentration of nitrogen compounds and dissolved oxygen

Samples of the water flowing into and out of the filter were taken at the same time as the biomass samples in order to determine the concentration of the individual nitrogen compounds. The concentrations of ammonia, nitrite, and nitrate were measured on the day of sampling using photometric LCK cuvette tests (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany). An HQ40D digital multimeter (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany) was used to measure temperature and oxygen concentration.

2.4. Shotgun sequencing and data analysis

DNA and RNA sequencing were performed by Macrogen Inc. (Seoul,

Korea). A TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare the metagenomic library, and a NEBNext® rRNA Depletion Kit (Bacteria) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used to prepare the metatranscriptome library. The libraries were sequenced on a NovaSeq 6000 S4 (Illumina, San Diego, CA, USA) using the paired-end method (2 × 150 bp). The raw sequences were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under accession number PRJNA1149071.

Read preprocessing, taxonomic classification, and metagenomic assembly were performed using tools from the KBase platform [21]. Briefly, raw reads were first subjected to quality assessment, including trimming and filtering of reads based on quality and length using Trimmomatic (v.0.36) [22] and FastQC (v.0.12.1) [23]. The metagenomic reads processed in this way were used for taxonomic profiling using Kaiju (v.1.9.0) [24] with the default parameters against the NCBI BLAST non-redundant protein database. All four metagenomics datasets were then co-assembled using two different assemblers: MEGAHIT (v.1.2.9) [25] and metaSPAdes (v.3.15.3) [26] with a minimum contig length of 2000. These two assemblies were then compared with the KBase app “Compare Assembled Contig Distributions” (v.1.1.2). This tool generates a report that is similar to the report generated by MetaQUAST and allows a simple comparison of the number and size distribution of the contigs. Based on assembly statistics (number of contigs, longest contig, N50, L50), the assembly created with metaSPAdes was selected for further analysis.

MetaGeneMark (v.3.25) was used to predict genes in the metaSPAdes assembly and generated over 2.6 million possible genes. To identify genes related to the nitrogen cycle, genes predicted by MetaGeneMark [27] were aligned to the NCBI nr database using DIAMOND [28] with an *E*-value < 1e-3. The gene identified as ammonia monooxygenase subunit A (*amoA*) was utilized to construct the phylogenetic tree using Maximum Likelihood method with 1000 bootstrap replicates. The analysis was done against reference sequences downloaded from NCBI GenBank using MEGA (version 12) [29]. The iTOL software (version 7.0) was used to visualize the tree [30]. The abundance of genes and transcripts associated with the nitrogen cycle was determined using the tools available on the Galaxy platform [31]. Trimmed DNA and RNA reads were mapped to the predicted nitrogen cycle genes using HISAT2 (v.2.2.1) [32]. The quality of the mapping was checked using QualiMap BamQC [33]. The output of HISAT2 was further processed using StringTie (v.2.2.3) [34] to estimate the expression levels of genes related to the nitrogen cycle in the analyzed samples.

2.5. Network construction and microbial diversity analysis

The network of co-occurrence of individual bacteria was plotted on the basis of a correlation analysis. Spearman's correlation coefficients were calculated for the bacterial genera whose abundance in at least one sample was at least 0.01 %. Spearman's rank correlation test was performed in Statistica (v.13.1, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). The resulting correlation matrix was used to visualize the network using Gephi software (version 0.10.1) [35] with the “Force Atlas” layout. Subgroups were identified using the Leiden algorithm. The network was only drawn for highly correlated taxa, i.e. those with a correlation coefficient ≥ 0.75 for a positive relationship or ≤ −0.75 for a negative relationship. The analysis of alpha diversity (Chao1 and Shannon_H indices) and beta diversity (PERMANOVA) was performed with Past (v.4.17).

3. Results

3.1. Concentration of nitrogen compounds

Ammonia, nitrite, and nitrate concentrations were measured in the filter inflow and outflow one day before and one day after feeding the fish. The results are presented in Table 1. Ammonia concentrations were notably high, especially after feeding, with only a minimal reduction

Table 1

Ammonia, nitrite, and, nitrate in the influent and effluent of the biofilter on the day the biomass was sampled.

		Before Feeding I (BF_I)	After Feeding I (AF_I)	Before Feeding II (BF_II)	After Feeding II (AF_II)
ammonia (mg N/l)	inflow	0.066	0.429	0.087	0.806
	outflow	0.053	0.322	0.065	0.007
nitrite (mg N/l)	inflow	0.021	0.221	0.026	0.044
	outflow	0.024	0.26	0.028	0.02
nitrate (mg N/l)	inflow	3.25	5.11	2	0.47
	outflow	3.26	5.17	2.99	0.52
Dissolved oxygen (mg/l)	inflow	8.96	9.02	8.95	9.07
Temperature (°C)	inflow	19.1	19.2	19.7	19.2

observed in the effluent. A significant decrease in ammonia concentration was recorded only in the final sample analyzed. Nitrite concentrations remained generally low across all samples, but were increasing after feeding. In contrast, nitrate concentrations were consistently higher after feeding, except in the final sample.

3.2. Bacterial community composition and diversity

The bacterial population in the biofilter was analyzed before and after feeding. DNA was isolated from biomass samples taken from each of the three types of filter fillings that were then mixed to obtain four sequencing libraries, one for each time period. Using Kaiju, a total of 178 bacterial and archaeal phyla and 3741 genera were identified in the analyzed metagenomes. On average, 53 % of the reads were taxonomically annotated. The vast majority of the identified phyla and genera had a very low abundance, not exceeding 0.5 %. The most abundant

phyla and genera are shown in Figs. 2 and 3.

Only 10 phyla reached an abundance of at least 0.5 % in at least one sample. However, the abundance of these 10 phyla accounted for over 95 % of the total population. In all samples, the vast majority of the population were bacteria from the very numerous and diverse phylum *Proteobacteria*. Their numbers varied between 55 % and 70 %. In second place were bacteria from the phylum *Bacteroidetes* (8–14 %). Bacteria from the phyla *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* were also quite abundant (2–5 %), although with varying abundances in individual samples. Although some differences in the abundance of individual phyla were observed, the differences before and after feeding were not statistically significant (White's non-parametric *t*-test, $p > 0.05$). As with the phyla, most of the identified genera occurred in very low abundance. At this taxonomical level, however, the rare groups made up a substantially larger proportion of the total population, ranging from 31 % to 37 %. There was also a high percentage ($34.8 \% \pm 1.8 \%$ (mean $\pm$ standard deviation)) of microorganisms that were not identified at the genus level. Thirty-one identified genera with an abundance of >0.5 % in at least one sample accounted for a total of 29 % to 39 % of the total population. The pre-feeding samples contained significantly more *Aeromonas* and *Mycobacterium* bacteria, whereas the post-feeding samples contained significantly more *Pseudomonas* bacteria (White's non-parametric *t*-test, $p < 0.05$). In addition, all samples contained numerous bacteria of the genus *Nitrospira* (3.3 % – 5.2 %), which were the only representatives of nitrifying bacteria. There were also numerous representatives of denitrifiers, such as *Flavobacterium* and *Acidovorax*. The denitrifier population was particularly well developed in the last sample examined (AF_II). *Pseudomonas* (13.6 %) was the most common, followed by *Dechloromonas* (4.1 %), *Acinetobacter* (3.0 %), and *Hydrogenophaga* (2.2 %), while their mean abundance in Before Feeding samples was 3.9 %, 0.3 %, 0.2 %, 0.3 % respectively.

The vast majority of identified genera were present in all samples,

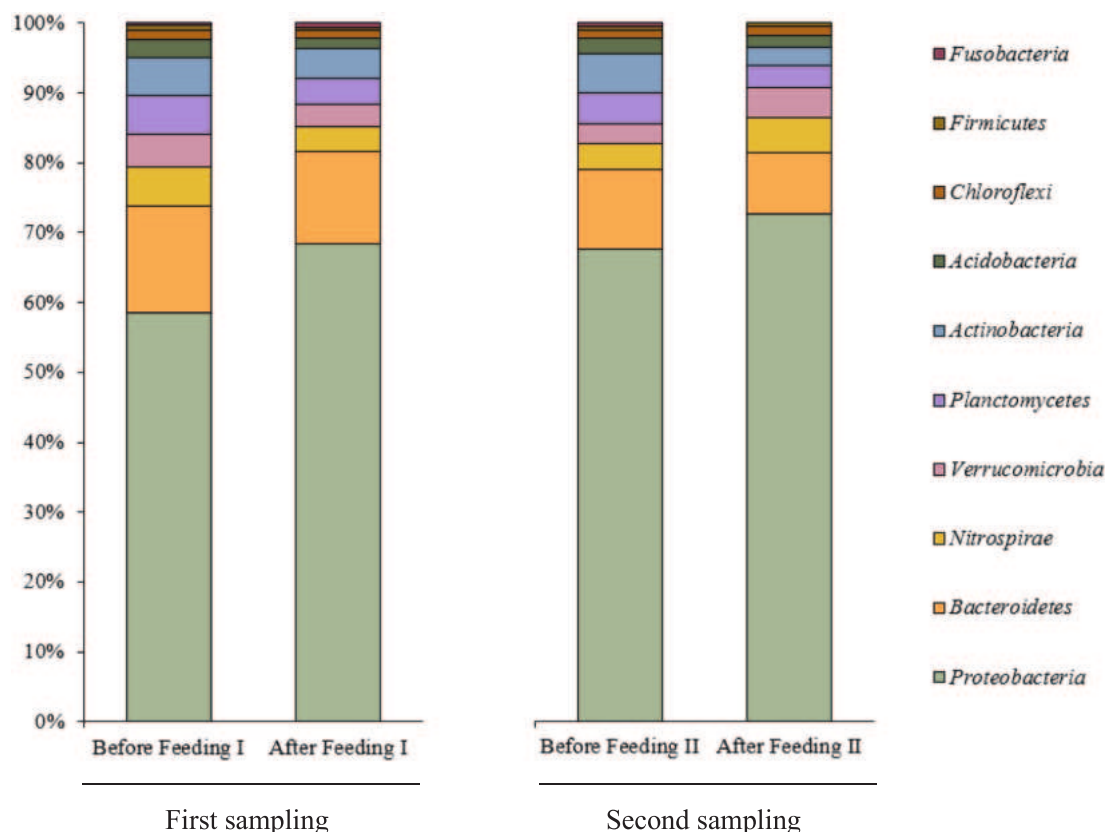


Fig. 2. Relative abundance of the most numerous bacterial phyla. The graph shows only those phyla which had an abundance of at least 0.5 % in at least one sample.



Fig. 3. Relative abundance of the 20 most numerous bacterial genera.

although with varying abundances. Only a few genera were unique in individual metagenomes, and they all belonged to the rare genera. The value of the Chao1 coefficient depends on the total number of genera observed in the sample and is thus an indicator of the richness of the population. In addition, this indicator is sensitive to rare genera represented by only one or two representatives. The value of the Shannon_H coefficient is influenced not only by the number of bacterial groups observed, but also by the uniformity of their occurrence. The values of these coefficients in the analyzed groups are shown in Fig. 4. The decrease in the values of these coefficients in the “After feeding” group indicates that in the periods after feeding some bacterial groups gained predominance and their number in the population increased at the expense of a decrease in the number of other groups. However, Permutation multivariate analysis (PERMANOVA) based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix revealed no statistically significant differences between the population before and after feeding (Bonferroni corrected p -values: 0.33).

3.3. Network analysis

The interactions between the individual bacterial groups in the tested biofilter were visualized using the co-occurrence network analysis. In addition, the concentrations of nitrogen compounds were also taken into account in the correlation analysis and the creation of the network in order to determine which bacterial groups have the strongest influence on the values of these parameters. The network shown in Fig. 5 consists of 50 nodes representing the most numerous generations and concentrations of nitrogen compounds in the influent and effluent water. The nodes of the network are connected by 502 edges symbolizing the presence of correlations in co-occurrence. Positive values of the correlation coefficient are marked in green, while negative values are marked in red. The color of the nodes indicates the affiliation to one of the two identified clusters. This algorithm identifies the affiliation of nodes to a particular cluster by analyzing the number of connections between them. If several nodes are connected to each other by many edges, while they are only weakly connected to others, they belong to

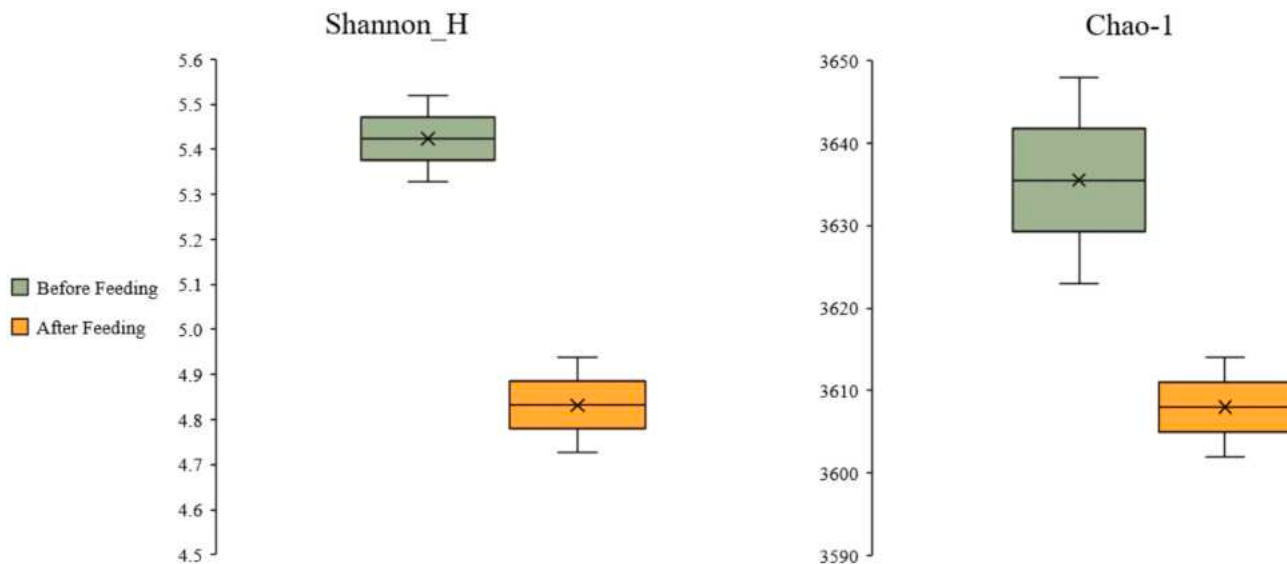


Fig. 4. Values of the alpha-biodiversity coefficients in the bacterial population of the tested biofilter before and after feeding.



between them. Among the nodes representing bacteria, *Flaviumibacter*, *Reyranella*, *Ideonella*, *Hydrogenophaga*, *Nitrospira*, and *Acidovorax* had the highest betweenness centrality value.

3.4. Nitrogen cycle-related genes and transcripts

The phylogenetic analysis of the *amoA* gene revealed a high similarity to the *amoA* genes present in representatives of comammox bacteria, especially *Candidatus Nitrospira nitrosa* (Fig. 6). To construct the phylogenetic tree, reference sequences of the *amoA* genes from both comammox bacteria, such as *Nitrospira*, and canonical ammonia oxidizers like *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* were utilized. The analyzed sequences formed three distinct clusters: the upper cluster (marked in red) contained *amoA* sequences from comammox Clade A, the middle cluster (marked in yellow) represented comammox Clade B, and the lower cluster comprised sequences from canonical AOB. The *amoA* sequences identified in this study (marked in bold) were closely related to those of *Candidatus Nitrospira nitrosa*.

Fig. 7 shows the average expression levels of transcripts associated with the nitrogen cycle in the samples before and after feeding. In general, the strongest expression level, expressed by the TPM (transcript per million) value, concerned transcripts related to the nitrification process (*amo*, *hao*, and *nxr*). All these transcripts belonged to bacteria of the genus *Nitrospira*, indicating the presence of bacteria capable of complete ammonia oxidation in the biofilter. Significant changes in the transcription level of the studied genes occurred in the AF_II sample. The number of transcripts of *amo*, *hao*, and *nxr* decreased significantly, indicating that the transcription level of genes related to the assimilation of ammonia (*gln*) and its transport into the cell (*amt*) increased. The *gln* gene encodes the enzyme glutamine synthase, which determines the ATP-dependent reaction of glutamine synthesis from glutamate and ammonium. Glutamine is the primary product of ammonium assimilation and plays an extremely important role in bacterial cells. It is not only one of the basic amino acids for building proteins, but is also required for the synthesis of other nitrogenous compounds. The increase in the transcription level of the *gln* gene in the sample AF_II could

indicate that with greater availability of organic compounds, ammonia was used to a greater extent for biomass growth than for the nitrification process. In both samples After Feeding, the transcription of genes related to dissimilatory nitrate reduction (*nar/nap* and *nirB/nirD*) also increased. The processes of transformation of nitrogen compounds took place at different intensities in the individual levels of the biofilter, as shown in Fig. 8. The largest number of transcripts related to nitrification is found in the lower two levels of the filter, while the proportion of transcripts related to denitrification increases at the top level. Only in the last sample (AF_II) was there a disturbance in these ratios, probably related to the excessive proliferation of heterotrophic bacteria.

4. Discussion

4.1. Abundance of the nitrifying bacteria

In many papers investigating the microbial community of RAS biofilters, *Nitrosomonas* is one of the most common nitrifiers. Hüpeden et al. [36], who investigated nine freshwater, brackish, and marine biofilters, classified *Nitrosomonas* as one of the “core taxa”, as it was present in all filters tested. In contrast to the works mentioned above, the number of typical AOB representatives was significantly lower in the system investigated in this study. The average number of *Nitrosomonas* bacteria was 0.1 %. The low abundance of *Nitrosomonas* could be due to the low ammonia concentrations. According to the r/K-strategist theory, *Nitrosomonas* belongs to the group of r-strategists, i.e. it has a low affinity for ammonia and develops better in environments where this compound is present in higher concentrations. This was the case in the above-mentioned work by Roalkvam et al. [37] where ammonia concentrations reached up to 17.6 mg N/L. This theory also seems to be confirmed by the work of Bartelme [17], where the mean ammonia concentration in the freshwater biofilter influent was $9.02 \pm 4.76 \mu\text{M}$ and the number of *Nitrosomonas* did not exceed 1 %.

The second important group of bacteria with regard to water treatment in RAS is *Nitrospira*. The number of *Nitrospira* in the tested system was stable, both in the samples before and after feeding. In addition, the

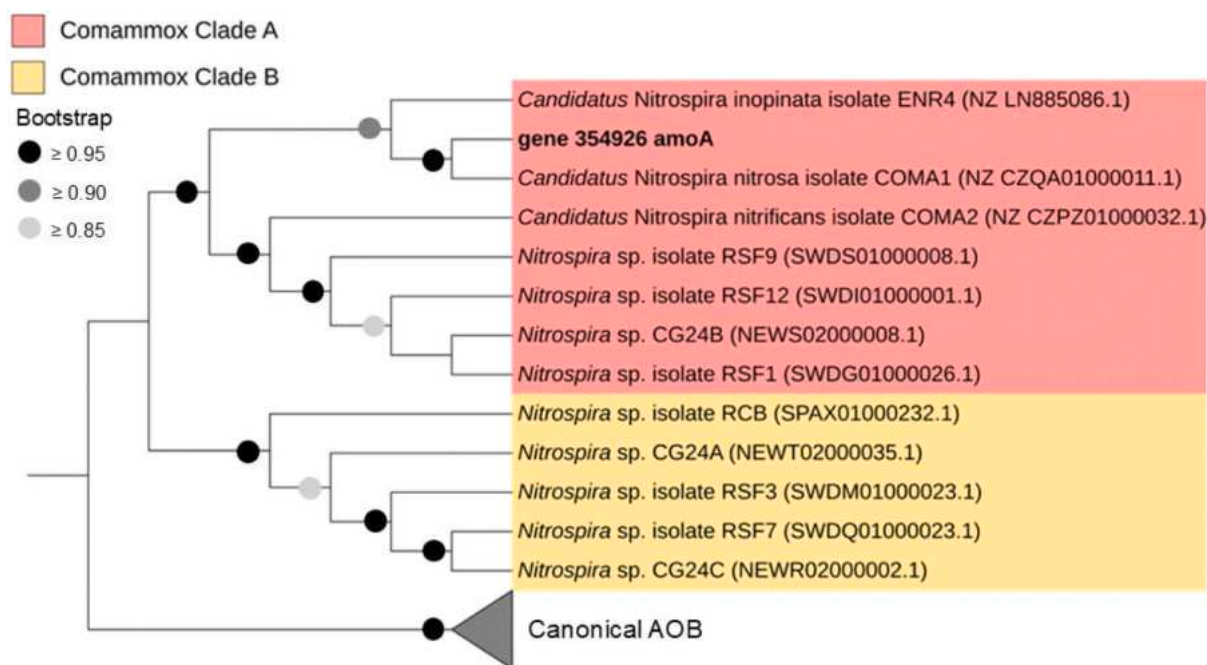


Fig. 6. Maximum likelihood phylogenetic tree generated from an alignment of identified in the contigs *amoA* gene and reference *amoA* genes from comammox *Nitrospira*, *Nitrosomonas* and *Nitrosospira*. Cluster representing *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* was collapsed and labeled as canonical AOB. Circles on the branches represent bootstrap values. The name of the sequence identified in this work is given in bold type. The accession numbers of the sequences from the NCBI are given in brackets.

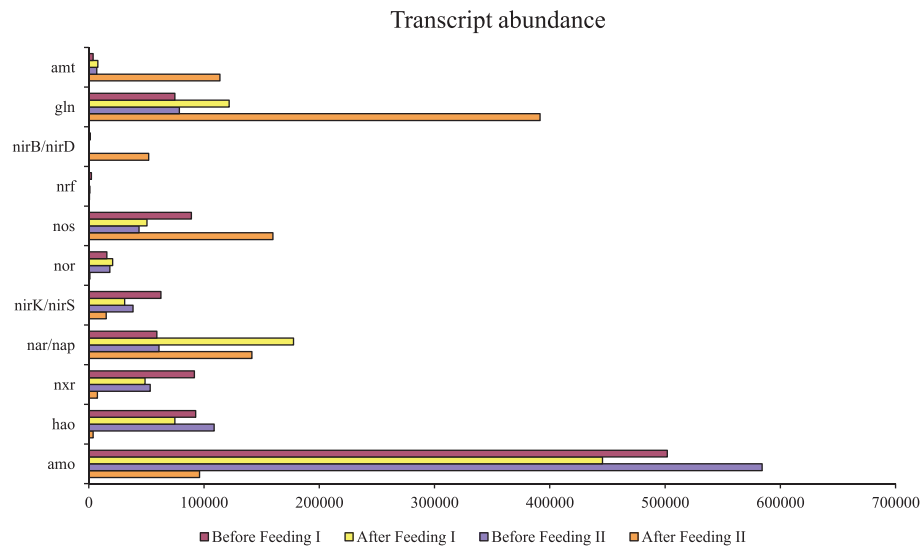


Fig. 7. Transcripts abundance of functional genes in the samples from first and second sampling, normalized by transcript length and to 1 million reads.

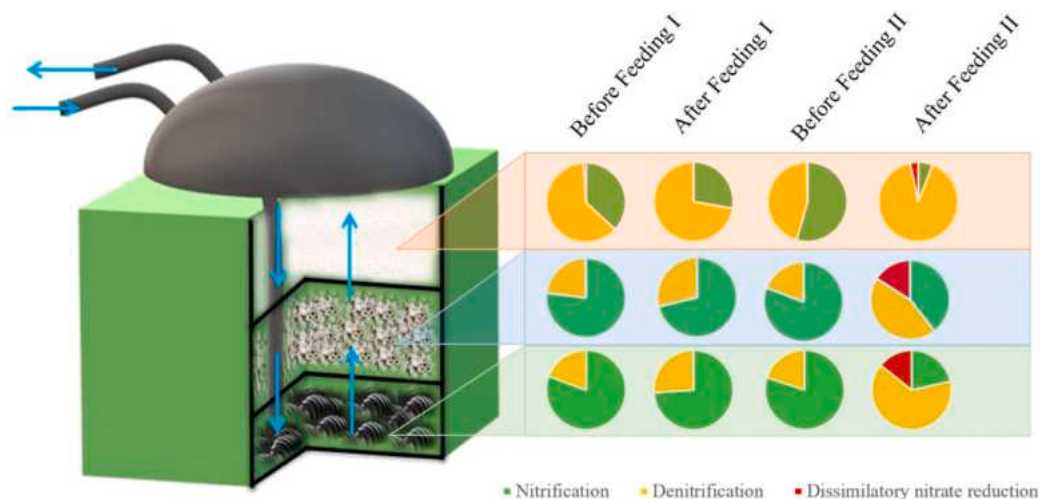


Fig. 8. The contribution of transcripts related to the nitrogen cycle in individual filter levels.

presence of the species *Candidatus Nitrospira nitrosa* and *Candidatus Nitrospira nitrificans*, which are classified as comammox *Nitrospira*, was detected. To further confirm the presence of comammox *Nitrospira* in the tested biofilter we performed phylogenetic analysis of the identified in the contigs *amoA* gene. The significant sequence similarity of *amoA* gene and the reference comammox *amoA* sequences, particularly *Candidatus Nitrospira nitrosa* [38] reinforces the presence of comammox bacteria within the studied biofilter. Additionally, we performed a simple correlation analysis between the abundance of *Nitrospira* and *Nitrosomonas* bacteria and the number of ammonium monooxygenase genes, which resulted in correlation coefficients of 0.86 and 0.26, respectively. Furthermore, *Nitrospira* emerged as the sole identified autotrophic nitrifier in the biofilter, while canonical AOB, such as *Nitrosomonas*, were only marginally detectable. This suggests that *Nitrospira* has assumed the role of ammonia oxidizer in this ecosystem.

The presence of comammox bacteria is common in RAS systems, but usually together with other nitrifiers, especially AOA [39]. However, in the system of this study, the abundance of AOA was negligible and the abundance of *Nitrospira* was many orders of magnitude greater than that of AOB or AOA. In the studies conducted by Yang et al. [40] on the bacterial community in a pond aquaculture system, the abundance of comammox *Nitrospira* was similar to the abundance of AOB, although

the ammonia concentrations were at a similar level (0.5–0.7 mg N/l) as in our RAS system. In the cited paper, the authors also found that the proportion of clade A in comammox *Nitrospira* was greater than clade B.

The advantages of comammox bacteria compared to conventional AOB are increasingly recognised, not only in the context of water treatment in RAS, but also in various other environments, highlighting their versatility. For example, a study by Zheng et al. [41] examined activated sludge samples from 25 full-scale wastewater treatment plants and found that comammox bacteria outnumbered both AOB and AOA in 19 of these plants. Importantly, the comammox bacteria not only had a higher population but also made a greater contribution to ammonia oxidation than other nitrifiers. In addition, the research by Zhang et al. [42] on the transformation processes of nitrogen compounds in wetlands showed that the role of comammox bacteria in nitrification is much greater than that of AOB. It was found that the ammonia oxidation rates of comammox *Nitrospira* were even twice as high as those of AOB.

The formation of the bacterial community is influenced by environmental factors and mutual ecological relationships [43]. Such relationships can be antagonistic when several populations of microorganisms compete for the same food substrate. Competition can be particularly intense in resource-limited environments, such as RAS biofilters. Comammox *Nitrospira* and AOA occur in different

environments, but it is generally assumed that they develop better in oligotrophic environments [44]. Because comammox bacteria have a greater affinity for ammonia than AOB [45,46], so they will have a clear advantage over AOB in a resource-limited environment. Therefore, there is a stronger competitive relationship between comammox bacteria and AOA adapted to oligotrophic environments, but little is known about the mechanisms of this competition. Ghimire-Kafle et al. [47] investigated the competitive relationships at different substrate concentrations between comammox bacteria and AOA *Nitrosarchaeum* from the freshwater lake Burr Oak. These studies showed that comammox *Nitrospira* always outcompeted AOA. The authors hypothesize that the reason for this advantage may be a more effective pathway of energy production through complete ammonia oxidation and reductive tricarboxylic acid cycle. The predominance of comammox bacteria in oligotrophic environments is further supported by microbiome studies conducted on RAS biofilters. McKnight et al. [48] studied the microbial community of over 30 biofilters in freshwater aquariums with relatively low ammonia concentrations ($\text{NH}_3\text{-N}$ concentration between: 0–0.1 mg N/l (32 samples), 0.1–0.25 mg N/l (5 samples)). Comammox *Nitrospira* was present in all biofilters and dominated in 30 of them, while AOA dominated only in 7, but it is not known which factors had a decisive influence on the selection of the dominant microorganism. Determining the parameters that determine the differentiation between comammox and AOA could be a promising and important direction for future research.

The microbiome in biofilters is influenced also by abiotic factors. The type of filling used in the biofilter can increase the prevalence of comammox bacteria. Different types of carriers that support the development of a bacterial biofilm contribute positively to an increase in the number of K-strategists, which have a slower growth rate compared to r-strategists. Therefore, these carriers are often used in environments where it is important to maintain ammonia levels at very low concentrations, which would be difficult to achieve with bacteria that have a low affinity for ammonia [49]. The bacterial structure of biofilters is influenced by hydraulic retention time (HRT). To maintain optimal water quality for the organisms being cultivated, it's important to choose the appropriate water recirculation ratio. In RAS, this often exceeds 20 cycles per day. Some studies suggest that a longer HRT in the fish tank can increase the risk of pathogenic bacteria growth [50]. Additionally, HRT affects the bacterial composition of the biofilter. In studies conducted by Chen et al. [51], three different water recirculation rates were tested in shrimp RAS. The results showed that at the highest tested water recirculation rate, the lowest concentrations of ammonia and nitrite were observed, along with the highest number of nitrifying bacteria in the biofilter.

4.2. Abundance of the denitrifying bacteria

Although nitrifying bacteria are a key group in RAS biofilters, due to their ability to oxidize ammonia and nitrate, their numbers usually range from 5 % to 10 % [48,52]. The remaining majority of the bacterial community is more diverse and shows greater variability between different systems. Sometimes it is even stated that this diversity is so great that each system has its own microbiological “fingerprint” [17]. Such great variability may result from the fact that individual RAS systems differ significantly from each other, for example in the species and stage of development of the fish bred, type of food, frequency and method of disinfection, as well as the design, filter material and capacity of the biofilter itself [53]. These diverse groups of bacteria participate in many biological processes and, together with nitrifiers, will contribute to ensuring the appropriate quality of the recirculating water. For example, the numerous types of denitrifiers and DNRA bacteria, participate not only in the transformation of nitrogen compounds, but as heterotrophs also degrade organic compounds. Due to the slightly different environmental requirements of different bacterial groups, and especially different tolerance to oxygen, bacterial biofilms in biofilters exhibit spatial organization [54]. In canister filters, where aerobic

conditions prevail, anaerobic representatives of these bacterial groups can develop in the deep layers of the biofilm, while aerobic nitrifiers develop in their outer layers.

Bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Flavihumibacter*, and *Dechloromonas*, which are representatives of the denitrifiers, were present in the investigated system. *Pseudomonas* was particularly abundant, especially in the samples after feeding, where the proportion reached 11.8 % and 13.6 %. They are facultatively anaerobic, i.e. they can also grow under aerobic conditions [55]. Bacteria of the genus *Pseudomonas* are also involved in the processes of converting nitrogen compounds. *Pseudomonas aeruginosa*, for example, can carry out complete denitrification under anaerobic conditions [56]. Many recent research results also indicate the existence of strains capable of removing ammonia via heterotrophic nitrification - aerobic denitrification (HN-AD) [57,58]. The genus *Aeromonas* is also common in the aquatic environment. Like *Pseudomonas*, it can cause infections in fish [59], but some strains also play an important role in the removal of toxic nitrogen compounds. For example, in the study by Chen et al. [60], the strain *Aeromonas* sp. HN-02 removed nitrogen compounds from wastewater by heterotrophic nitrification - aerobic denitrification, with ammonia being the preferred nitrogen source, followed by nitrate and nitrite. Aerobic denitrifiers, including *Flavobacterium* and *Dechloromonas*, were also in the majority in the study by Deng et al. [61] in zero-discharge, bioflock-based, recirculating aquaculture system, especially at higher C/N ratios. Furthermore, in this study, most of the nitrogen (approx. 75 %) was removed in gaseous form, i.e. by aerobic denitrification.

4.3. Functional profile of microbial community in the RAS biofilter

Most studies on microbial communities in RAS biofilters focus on the abundance of different bacterial groups that are crucial for the removal of toxic nitrogen compounds. However, detailed data on their activity and the expression profiles of functional genes are still lacking. An important advantage of metatranscriptome studies over metagenome studies is that they provide information on differences in the intensity of microbial processes taking place in different environments, even if they appear to have a similar bacterial composition. In this study, for example, the abundance of comammox *Nitrospira* was relatively stable, but its activity changed significantly. However, there was a significant difference in the abundance of *amo* and *nrx* transcripts. Some research indicates that comammox *Nitrospira* grows better on ammonia and prefers it as a substrate compared to nitrite [62,63]. In all samples except the AF_II sample, the abundance of *amo* transcripts was the highest. In the sample AF_II, the abundance of *amo* transcripts decreased significantly, while the abundance of *Nitrospira* increased slightly.

After feeding, the amount of organic compounds probably also increased, which intensified the competition between nitrifiers and heterotrophic bacteria. Faster-growing heterotrophs compete with slower-growing chemoautotrophs for nutrients, oxygen, and space under conditions of elevated organic carbon and can inhibit nitrification activity [64].

Most researchers emphasize the role of nitrification in the process of ammonia removal from the environment, while the role of ammonia assimilation is often neglected. Ammonia is the preferred nitrogen source for most bacteria, which is a vital component of many biomolecules, such as amino acids, purines, and pyrimidines [65], so ammonia assimilation is directly linked to biomass growth. When the amount of organic compounds is low, the amount of C is a limiting factor for the growth of heterotrophs and consequently the amount of N assimilated by them. The resulting excess nitrogen is available for nitrifiers. With a large amount of organic compounds, the limiting factor for both heterotrophs and nitrifiers is the amount of available N. In these conditions competition for nitrogen compounds between these two groups of bacteria becomes more intense [66,67]. Such a situation has probably occurred in the AF_II sample, in which the number of

transcripts related to nitrification (*amo*, *hao*, *nxr*) has decreased significantly, while the number of transcripts related to ammonia assimilation (*amt*, *gln*) has increased. In recent years, the process of ammonia assimilation has been increasingly described in bacteria of the genus *Pseudomonas*. Sun et al. [68] found in their studies on the utilization of ammonia by the representative of HN-AD bacteria, *Pseudomonas stutzeri* T13, that most of the ammonia was utilized by assimilation, not by heterotrophic nitrification. Furthermore, an increase in the amount of ammonia available enhanced the process of aerobic denitrification and thus contributed to increased nitrate degradation. When ammonia was depleted as the preferred nitrogen source for biomass growth, nitrate was also utilized as an alternative nitrogen source. Similar observations were made in studies by Huang et al. [69] with the strain *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions. After the depletion of ammonia in the environment, this strain utilized nitrate for assimilation rather than denitrification. In addition, nitrate was reduced to ammonia via the dissimilatory nitrate reduction pathway (DNRA), which is controlled by the *nirBD* and *nrfAH* genes. These results are consistent with the results obtained in this study. The increased abundance of *Pseudomonas* bacteria (and other aerobic denitrifiers) and the number of DNRA-related transcripts in the sample AF_II suggests that efficient nitrogen removal in the filter may not only depend on nitrification, but also on other bacterial groups and other metabolic pathways. The highest loss of ammonia was observed in the sample AF_II, which was probably mostly consumed by assimilation, as indicated by the high number of *gln* transcripts. Despite the high activity of the DNRA process, there was no accumulation of ammonia, as it was probably continuously used up for other metabolic pathways.

The type of biofilter used also had an influence on the activity of the bacteria in the RAS system. The layered canister filter is characterized by the fact that the water enters the lower part of the biofilter and flows upwards through the subsequent layers. This can create a gradient of dissolved oxygen, with more oxygen present in the lower layers. This is likely to result in a greater proportion of the nitrification process taking place in the lower layers. Lower oxygen availability in the last, highest layer could lead to a decrease in the intensity of nitrification in favor of denitrification.

4.4. Structure of microbial network

In network analysis, the betweenness centrality parameter is crucial as it indicates the extent to which a particular node is on the shortest path between other nodes in the network. A node with high betweenness centrality is likely to play a central role in the community, and its removal can disrupt the network structure unless new connections are formed between the remaining nodes [70]. In the studied network, the *Nitrospira* node was characterized by one of the highest values of betweenness centrality. It was the only nitrifier identified in the biofilter, so its importance to the system could result from the production of nitrate by nitrification, which can later be utilized by numerous denitrifiers in the studied biofilter. At the same time, *Nitrospira* showed a negative correlation, indicating a competitive relationship with several bacterial genera (e.g. *Acidovorax*, *Aquabacterium*, *Paucibacter*, *Rhodobacter*, *Tabrizicola*). However, the highest betweenness centrality values were found in the less numerous genera *Flaviumibacter*, *Reyranella*, *Ideonella*, and *Hydrogenophaga*. The role of these few genera is often poorly understood. In microbiome studies using network analysis methods, the highest betweenness centrality values are often found in less abundant taxa. The potential importance of these bacteria has recently attracted the interest of researchers [71].

Two competing populations have formed in the network under investigation. The pink-labeled population consists of genera that show a positive correlation with transcripts related to ammonia assimilation (*amt*, *gln*). These bacteria are also positively correlated with the ammonia concentration in the water flowing into the biofilter. The bacteria from this cluster were more numerous in the samples after

feeding, especially in the AF_II sample. The *Pseudomonas* described in the previous paragraphs belongs to this cluster, which further confirms its significant involvement in the ammonia assimilation process. Most of the relationships identified between the members of this cluster are positive, but there is also a sub-population composed of several heterotrophs (*Rhodobacter*, *Zoogaea*, *Dechloromonas*, *Cetobacterium*, *Tabrizicola*, *Microbacterium*, *Gemmibacter*) between which negative relationships exist. This is probably due to competition for the limited availability of organic compounds. The second population, marked in green, contains bacteria that were more abundant in the pre-feeding samples. In this cluster, the relationships between the nodes are only cooperative. Here there are comammox *Nitrospira* and denitrifying bacteria (e.g. *Aeromonas*, *Flaviumibacter*, *Flavobacterium*). In addition, this cluster also contains nodes representing *nirK*/*nirS* transcripts and nitrate concentrations. Such a division into two clusters indicates that two competing subpopulations have developed in the biofilter: the first one develops better at lower concentrations of organic carbon and mainly performs nitrification and denitrification, while the second one is characterized by a faster growth rate at higher C availability and uses ammonia for biomass growth.

5. Conclusions

This study explains the mechanisms of nitrogen conversions in a portable filter, during alternating feeding regime. The changes in the abundance and activity of key bacteria impact water quality in a RAS. The findings revealed that comammox *Nitrospira* were the sole nitrifiers in this system, likely due to their preference for oligotrophic environments with limited ammonia availability. Contrary to earlier studies suggesting competition between comammox *Nitrospira* and AOA or AOB, this study found that comammox *Nitrospira* faced no competition from other nitrifiers in the environment. The main competition for comammox bacteria came from heterotrophs, especially those of the genus *Pseudomonas*, whose populations increase after feeding. These heterotrophs assimilate ammonia for biomass growth. Consequently, toxic nitrogen compounds were more effectively removed through assimilation and aerobic denitrification than through nitrification. Even small changes in water quality parameters in the RAS can significantly impact the bacterial community of the biofilter. These findings provide insights into nitrogen transformations in canister filters on a molecular level and offer practical recommendations for optimizing conditions in fish farms using these filters. The increased competition between comammox bacteria and heterotrophs observed in the periods following fish feeding indicates that feeding must be planned to maintain organic compound levels at a constant and low level. Commercial preparations for inoculating biofilters typically include standard nitrifying bacteria. However, the low presence of classic AOB, such as *Nitrosomonas*, in biofilters suggests that these environments may not be ideal for their growth, contrary to previous beliefs. This insight should be considered when producing or using these preparations.

CRedit authorship contribution statement

Martyna Godzieba: Writing – original draft, Visualization, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Piotr Hliwa:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Resources, Methodology, Investigation, Data curation. **Jacek Mąkinia:** Writing – review & editing, Validation. **Slawomir Ciesielski:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Science Center under the project no. UMO-2021/41/N/NZ9/01749.

Data availability

Raw sequences were deposited in an NCBI SRA database, and the accession number is mentioned in the manuscript.

References

- [1] D.C. Little, R.W. Newton, M.C.M. Beveridge, Aquaculture: a rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential, *Proceedings of the Nutrition Society* 75 (2016) 274–286, <https://doi.org/10.1017/S0029665116000665>.
- [2] R.P. Bartelme, M.C. Smith, O.J. Sepulveda-Villet, R.J. Newton, Component microenvironments and system biogeography structure microorganism distributions in recirculating aquaculture and aquaponic systems, *MSphere* 4 (2019), <https://doi.org/10.1128/mSphere.00143-19>.
- [3] K. Nyakeya, F.O. Masese, Z. Gichana, J.M. Nyamora, A. Getabu, J. Onchieku, C. Odoli, R. Nyakwama, Cage farming in the environmental mix of Lake Victoria: an analysis of its status, potential environmental and ecological effects, and a call for sustainability, *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 25 (2022) 37–52, <https://doi.org/10.14321/ae-hm.025.04.37>.
- [4] K. Buchmann, Control of parasitic diseases in aquaculture, *Parasitology* 149 (2022) 1985–1997, <https://doi.org/10.1017/S0031182022001093>.
- [5] F.A. Bohnes, A. Laurent, Environmental impacts of existing and future aquaculture production: comparison of technologies and feed options in Singapore, *Aquaculture* 532 (2021) 736001, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736001>.
- [6] K. Li, R. Jiang, J. Qiu, J. Liu, L. Shao, J. Zhang, Q. Liu, Z. Jiang, H. Wang, W. He, P. He, How to control pollution from tailwater in large scale aquaculture in China: a review, *Aquaculture* 590 (2024) 741085, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741085>.
- [7] P.A. Suriasni, F. Faizal, C. Panatarani, W. Hermawan, I.M. Joni, A review of bubble aeration in biofilter to reduce total ammonia nitrogen of recirculating aquaculture system, *Water (Basel)* 15 (2023) 808, <https://doi.org/10.3390/w15040808>.
- [8] E. Rurangwa, M.C.J. Verdegem, Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management, *Rev. Aquac.* 7 (2015) 117–130, <https://doi.org/10.1111/raq.12057>.
- [9] D.M. Wambua, P.G. Home, J.M. Raude, S. Ondimu, Environmental and energy requirements for different production biomass of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in recirculating aquaculture systems (RAS) in Kenya, *Aquac. Fish* 6 (2021) 593–600, <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.019>.
- [10] Z. Xu, J. Cao, X. Qin, W. Qiu, J. Mei, J. Xie, Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review, *Animals* 11 (2021) 3304, <https://doi.org/10.3390/ani11113304>.
- [11] W. Lin, H. Luo, J. Wu, T.-C. Hung, B. Cao, X. Liu, J. Yang, P. Yang, A review of the emerging risks of acute ammonia nitrogen toxicity to aquatic decapod crustaceans, *Water (Basel)* 15 (2022) 27, <https://doi.org/10.3390/w15010027>.
- [12] R.O. Fossmark, K.J.K. Attramadal, K. Nordøy, S.W. Østerhus, O. Vadstein, A comparison of two seawater adaptation strategies for Atlantic salmon post-smolt (*Salmo salar*) grown in recirculating aquaculture systems (RAS): nitrification, water and gut microbiota, and performance of fish, *Aquaculture* 532 (2021) 735973, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735973>.
- [13] G. Nonnotte, D. Salin, P. Williot, Effects of exposure to ammonia in water: determination of the sublethal and lethal levels in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, in: *The Siberian sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 1 - Biology*, Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 391–404, https://doi.org/10.1007/978-3-319-61664-3_19.
- [14] V.P. Lobanov, J. Pate, A. Joyce, Sturgeon and paddlefish: review of research on broodstock and early life stage management, *Aquac. Fish* (2023), <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.04.001>.
- [15] D.B. Almeida, C. Magalhães, Z. Sousa, M.T. Borges, E. Silva, I. Blanquet, A. P. Mucha, Microbial community dynamics in a hatchery recirculating aquaculture system (RAS) of sole (*Solea senegalensis*), *Aquaculture* 539 (2021) 736592, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736592>.
- [16] S.W. Dahle, S.I. Gaarden, J.F. Buhang, R. Netzer, K.J.K. Attramadal, T. Busche, M. Aas, D. Ribicic, I. Bakke, Long-term microbial community structures and dynamics in a commercial RAS during seven production batches of Atlantic salmon fry (*Salmo salar*), *Aquaculture* 565 (2023) 739155, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739155>.
- [17] R.P. Bartelme, S.L. McLellan, R.J. Newton, Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox *Nitrospira*, *Front. Microbiol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00101>.
- [18] Y. Cheng, C.G. Hubbard, L. Zheng, B. Arora, L. Li, U. Karaoz, J. Ajo-Franklin, N. J. Bouskill, Next generation modeling of microbial souring – parameterization through genomic information, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 126 (2018) 189–203, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.06.014>.
- [19] M.-J. Mehrani, D. Sobotka, P. Kowal, S. Ciesielski, J. Makinia, The occurrence and role of *Nitrospira* in nitrogen removal systems, *Bioresour. Technol.* 303 (2020) 122936, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122936>.
- [20] S.L. Aalto, E. Syropoulou, K.J. de Jesus Gregersen, M. Tiirola, P.B. Pedersen, L.-F. Pedersen, Microbiome response to foam fractionation and ozonation in RAS, *Aquaculture* 550 (2022) 737846, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737846>.
- [21] A.P. Arkin, R.W. Cottingham, C.S. Henry, N.L. Harris, R.L. Stevens, S. Maslov, P. Dehal, D. Ware, F. Perez, S. Canon, et al., KBase: the United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 566–569, <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>.
- [22] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30 (2014) 2114–2120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [23] Andrews S., FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>, (2010).
- [24] P. Menzel, K.L. Ng, A. Krogh, Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju, *Nat. Commun.* 7 (2016) 11257, <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>.
- [25] D. Li, C.-M. Liu, R. Luo, K. Sadakane, T.-W. Lam, MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph, *Bioinformatics* 31 (2015) 1674–1676, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>.
- [26] S. Nurk, D. Meleshko, A. Korobeynikov, P.A. Pevzner, metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler, *Genome Res.* 27 (2017) 824–834, <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>.
- [27] W. Zhu, A. Lomsadze, M. Borodovsky, Ab initio gene identification in metagenomic sequences, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) e132, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq275>.
- [28] B. Buchfink, C. Xie, D.H. Huson, Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND, *Nat. Methods* 12 (2015) 59–60, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>.
- [29] S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski, M. Sanderford, S. Sharma, K. Tamura, MEGA12: molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing, *Mol. Biol. Evol.* 41 (2024), <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>.
- [30] I. Letunic, P. Bork, Interactive tree of life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool, *Nucleic Acids Res.* 52 (2024) W78–W82, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac268>.
- [31] L.A.L. Abueg, E. Afgan, O. Allart, A.H. Awan, W.A. Bacon, D. Baker, M. Bassetti, B. Batut, M. Bernt, D. Blankenberg, et al., The galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update, *Nucleic Acids Res.* (2024), <https://doi.org/10.1093/nar/gkac410>.
- [32] D. Kim, J.M. Paggi, C. Park, C. Bennett, S.L. Salzberg, Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 907–915, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>.
- [33] F. García-Alcalde, K. Okonechnikov, J. Carbonell, L.M. Cruz, S. Götz, S. Tarazona, J. Dopazo, T.F. Meyer, A. Conesa, Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data, *Bioinformatics* 28 (2012) 2678–2679, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503>.
- [34] M. Pertea, G.M. Pertea, C.M. Antonescu, T.-C. Chang, J.T. Mendell, S.L. Salzberg, StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 290–295, <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>.
- [35] M. Bastian, S. Heymann, M. Jacomy, Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks, *Proceedings of the International AAAI Conference on Web and Social Media* 3 (2009) 361–362, <https://doi.org/10.1609/icwsm.v3i1.13937>.
- [36] J. Hüpeden, B. Wemheuer, D. Indenbirken, C. Schulz, E. Spieck, Taxonomic and functional profiling of nitrifying biofilms in freshwater, brackish and marine RAS biofilters, *Aquac. Eng.* 90 (2020) 102094, <https://doi.org/10.1016/j.aquaceng.2020.102094>.
- [37] I. Roalkvam, K. Drønen, H. Dahle, H.I. Wergeland, A case study of biofilter activation and microbial nitrification in a marine recirculation aquaculture system for rearing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquac. Res.* 52 (2021) 94–104, <https://doi.org/10.1111/are.14872>.
- [38] M.A.H.J. van Kessel, D.R. Speth, M. Albertsen, P.H. Nielsen, H.J.M. Op den Camp, B. Kartal, M.S.M. Jetten, S. Lückner, Complete nitrification by a single microorganism, *Nature* 528 (2015) 555–559, <https://doi.org/10.1038/nature16459>.
- [39] Q. Li, R. Hasezawa, R. Saito, K. Okano, K. Shimizu, M. Utsumi, Abundance and diversity of nitrifying microorganisms in marine recirculating aquaculture systems, *Water (Basel)* 14 (2022) 2744, <https://doi.org/10.3390/w14172744>.
- [40] X. Yang, Y. Wu, L. Shu, H. Gu, F. Liu, J. Ding, J. Zeng, C. Wang, Z. He, M. Xu, F. Liu, X. Zheng, B. Wu, Unraveling the important role of comammox *Nitrospira* to nitrification in the coastal aquaculture system, *Front. Microbiol.* 15 (2024), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1355859>.
- [41] M. Zheng, Z. Tian, Z. Chai, A. Zhang, A. Gu, G. Mu, D. Wu, J. Guo, Ubiquitous occurrence and functional dominance of comammox *Nitrospira* in full-scale wastewater treatment plants, *Water Res.* 236 (2023) 119931, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119931>.
- [42] A. Zhang, M. Zhu, Y. Zheng, Z. Tian, G. Mu, M. Zheng, The significant contribution of comammox bacteria to nitrification in a constructed wetland revealed by DNA-based stable isotope probing, *Bioresour. Technol.* 399 (2024) 130637, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130637>.

- [43] X. Zheng, K. Xu, J. Naoum, Y. Lian, B. Wu, Z. He, Q. Yan, Deciphering microeukaryotic-bacterial co-occurrence networks in coastal aquaculture ponds, *Mar Life Sci Technol* 5 (2023) 44–55, <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00159-6>.
- [44] D. Sun, X. Tang, M. Zhao, Z. Zhang, L. Hou, M. Liu, B. Wang, U. Klümper, P. Han, Distribution and diversity of comammox *Nitrospira* in coastal wetlands of China, *Front. Microbiol.* 11 (2020), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589268>.
- [45] D. Sakoula, H. Koch, J. Frank, M.S.M. Jetten, M.A.H.J. van Kessel, S. Lüscher, Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification, *ISME J.* 15 (2021) 1010–1024, <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00827-4>.
- [46] K.D. Kits, C.J. Sedlacek, E.V. Lebedeva, P. Han, A. Bulaev, P. Pjevac, A. Daebeler, S. Romano, M. Albertsen, L.Y. Stein, H. Daims, M. Wagner, Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle, *Nature* 549 (2017) 269–272, <https://doi.org/10.1038/nature23679>.
- [47] S. Ghimire-Kafle, M.E. Weaver, M.P. Kimbrel, A. Bollmann, Competition between ammonia-oxidizing archaea and complete ammonia oxidizers from freshwater environments, *Appl. Environ. Microbiol.* (2024), <https://doi.org/10.1128/aem.01698-23>.
- [48] M.M. McKnight, J.D. Neufeld, Comammox *Nitrospira* among dominant ammonia oxidizers within aquarium biofilter microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 90 (2024), <https://doi.org/10.1128/aem.00104-24>.
- [49] Y. Li, Z. Chai, C. Song, J. Chen, A. Gu, G. Mu, R. Ge, M. Zheng, The superiority of hydrophilic polyurethane in comammox-dominant ammonia oxidation during low-strength wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 935 (2024) 173017, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173017>.
- [50] S.W. Dahle, K.J.K. Attramadal, O. Vadstein, H.I. Hestdahl, I. Bakke, Microbial community dynamics in a commercial RAS for production of Atlantic salmon fry (*Salmo salar*), *Aquaculture* 546 (2022) 737382, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737382>.
- [51] Z. Chen, Z. Chang, L. Zhang, Y. Jiang, H. Ge, X. Song, S. Chen, F. Zhao, J. Li, Effects of water recirculation rate on the microbial community and water quality in relation to the growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *BMC Microbiol.* 19 (2019) 192, <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1564-x>.
- [52] Y. Ma, X. Du, Y. Liu, T. Zhang, Y. Wang, S. Zhang, Characterization of the bacterial communities associated with biofilters in two full-scale recirculating aquaculture systems, *J. Oceanol. Limnol.* 39 (2021) 1143–1150, <https://doi.org/10.1007/s00343-020-0120-8>.
- [53] Q. Li, R. Hasegawa, R. Saito, K. Okano, K. Shimizu, M. Utsumi, Abundance and diversity of nitrifying microorganisms in marine recirculating aquaculture systems, *Water (Basel)* 14 (2022) 2744, <https://doi.org/10.3390/w14172744>.
- [54] K. Cremin, S.J.N. Duxbury, J. Rosko, O.S. Soyer, Formation and emergent dynamics of spatially organized microbial systems., *Interface, Focus* 13 (2023) 20220062, <https://doi.org/10.1098/rsfs.2022.0062>.
- [55] M. Zhang, A. Li, Q. Yao, B. Xiao, H. Zhu, *Pseudomonas oligotrophica* sp. nov., a novel denitrifying bacterium possessing nitrogen removal capability under low carbon–nitrogen ratio condition, *Front. Microbiol.* 13 (2022), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.882890>.
- [56] S. Arat, G.S. Bullerjahn, R. Laubenbacher, A network biology approach to denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 10 (2015) e0118235, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118235>.
- [57] M.-Q. Huang, Y.-W. Cui, J.-L. Huang, F.-L. Sun, S. Chen, A novel *Pseudomonas aeruginosa* strain performs simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and aerobic phosphate removal, *Water Res.* 221 (2022) 118823, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118823>.
- [58] X. Sui, X. Wu, B. Xiao, C. Wang, C. Tian, Denitrification mechanism of heterotrophic aerobic denitrifying *Pseudomonas humanensis* strain DC-2 and its application in aquaculture wastewater, *Water (Basel)* 16 (2024) 1625, <https://doi.org/10.3390/w16111625>.
- [59] S. Gomes, C. Fernandes, S. Monteiro, E. Cabecinha, A. Teixeira, S. Varandas, M. Saavedra, The role of aquatic ecosystems (River Tua, Portugal) as reservoirs of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. *Water (Basel)* 13 (2021) 698, <https://doi.org/10.3390/w13050698>.
- [60] M. Chen, W. Wang, Y. Feng, X. Zhu, H. Zhou, Z. Tan, X. Li, Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02, *Bioresour. Technol.* 167 (2014) 456–461, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.001>.
- [61] M. Deng, Z. Dai, Y. Senbati, L. Li, K. Song, X. He, Aerobic denitrification microbial community and function in zero-discharge recirculating aquaculture system using a single biofloc-based suspended growth reactor: influence of the carbon-to-nitrogen ratio, *Front. Microbiol.* 11 (2020), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01760>.
- [62] S. Xu, B. Wang, Y. Li, D. Jiang, Y. Zhou, A. Ding, Y. Zong, X. Ling, S. Zhang, H. Lu, Ubiquity, diversity, and activity of comammox *Nitrospira* in agricultural soils, *Sci. Total Environ.* 706 (2020) 135684, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135684>.
- [63] M.-J. Mehrani, P. Kowal, D. Sobotka, M. Godziewa, S. Ciesielski, J. Guo, J. Makinia, The coexistence and competition of canonical and comammox nitrite oxidizing bacteria in a nitrifying activated sludge system – experimental observations and simulation studies, *Sci. Total Environ.* 864 (2023) 161084, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161084>.
- [64] S. Navada, M.F. Knutsen, I. Bakke, O. Vadstein, Nitrifying biofilms deprived of organic carbon show higher functional resilience to increases in carbon supply, *Sci. Rep.* 10 (2020) 7121, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64027-y>.
- [65] A. Bizior, G. Williamson, T. Harris, P.A. Hoskisson, A. Javelle, Prokaryotic ammonium transporters: what has three decades of research revealed? *Microbiology (N Y)* 169 (2023) <https://doi.org/10.1099/mic.0.001360>.
- [66] F.J.M. Verhagen, H.J. Laanbroek, Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 3255–3263, <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3255-3263.1991>.
- [67] E. French, J.A. Kozłowski, A. Bollmann, Competition between ammonia-oxidizing archaea and bacteria from freshwater environments, *Appl. Environ. Microbiol.* 87 (2021), <https://doi.org/10.1128/AEM.01038-21>.
- [68] Y. Sun, L. Feng, A. Li, X. Zhang, J. Yang, F. Ma, Ammonium assimilation: an important accessory during aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13, *Bioresour. Technol.* 234 (2017) 264–272, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.053>.
- [69] X. Huang, Y. Luo, L. Luo, D. Xie, Z. Li, The nitrite reductase encoded by nirBDs in *Pseudomonas putida* Y-9 influences ammonium transformation, *Front. Microbiol.* 13 (2022), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982674>.
- [70] M.S. Machado, M. Lauber, S. Reitmeier, T. Kacprowski, J. Baumbach, D. Haller, M. List, Network analysis methods for studying microbial communities: a mini review, *Comput Struct, Biotechnol. J.* 19 (2021) 2687–2698, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>.
- [71] X. Liu, Y. Nie, X.-L. Wu, Predicting microbial community compositions in wastewater treatment plants using artificial neural networks, *Microbiome* 11 (2023) 93, <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01519-9>.