

## 嫌気性消化槽における生理的活性のある微生物群集構造の解明

浅野憲哉\*<sup>1</sup>・矢口淳一\*<sup>2</sup>

## Active Microbial Community in Anaerobic Digesters utilizing PMA (Propidium Monoazide)- and RNA-based 16S rRNA sequencing

ASANO Kenya and YAGUCHI Junichi

Propidium monoazide(PMA) reagent and RNA besides DNA were utilized to characterize the active microbial community of 5 full-scale anaerobic digesters via 16S rRNA amplicon sequencing. Beta diversity analysis showed PMA- and RNA-based sequencing caused a drastic change in the community composition and the relative abundance of microbial members, respectively, compared with DNA-based community profile. PMA- and RNA-based profiles indicated archaea belonging to *Methanosaeta* and bacteria belonging to *Bacteroidales* were physiologically active microorganisms in all anaerobic digesters. It was suggested *Treponema* and the W22 genus were viable in four mesophilic digesters.

キーワード：嫌気性消化，微生物群集，PMA，16S rRNA，アンプリコンシーケンス解析

## 1. はじめに

嫌気性消化は、下水汚泥、家畜糞尿、食品廃棄物などの有機性廃棄物を嫌気性条件下で分解し、メタン生成菌の働きによってバイオガスを回収してエネルギーとして利用するシステムである。下水汚泥に関しては、現在約 300 ヶ所の下水処理場で嫌気性消化施設が運転されている。消化槽内では、高分子有機物の加水分解、揮発性脂肪酸の生成、脂肪酸からの酢酸生成、酢酸や水素からのメタン生成など多様な微生物群による多段階のプロセスによって反応が進行する。近年遺伝子解析技術の発展により、嫌気性消化過程に関与するこれらの微生物群が明らかになってきた<sup>1)</sup>。しかし従来行われてきた研究は、DNA をベースとしていたため、死滅した活性のない微生物と活性のある微生物の分別ができず、下水汚泥の嫌気性消化槽では多数の好気性細菌が検出される場合も見られた<sup>1)</sup>。そこで、本研究では微生物細胞内の RNA や PMA(Propidium monoazide)試薬を使用した方法<sup>2)</sup>を利用して、死滅した活性の

ない微生物を除いて生理的活性のある微生物のみを計測し、実際に嫌気性消化槽で働いている微生物群を調査解析した。消化槽で活躍している主要な微生物群が判明すれば、それらに適合した反応条件や環境条件で運転操作することにより、嫌気性消化プロセスにおけるメタン生成を効率化及び安定化させることができる。

## 2. 実験方法

## 2-1 消化汚泥

青森、岩手県内の 5 つの下水処理場に設置された嫌気性消化槽の消化汚泥を採取して実験に用いた。表 1 にサンプリングした 5 つの嫌気性消化槽の概要を示した。TB 処理場の消化槽は 55℃で高温消化を行っており、残りの 4 つの処理場の施設は、35～41℃で中温消化を実施している。消化槽内の微生物群に含まれる核酸を保存するため、消化汚泥は採取後直ちに RNA-Later 試薬(Sigma-Aldrich)で処理され、速やかに冷凍保存された。PMA 処理用の消化汚泥は、窒素ガスで気相を置換した滅菌ピアーズバイアルにシリンジで採取した。採取後低温保存し、数時間以内に PMA 処理を行った。

## 2-2 PMA 処理

PMA 試薬として、PMAxx (Biotium, Inc)を使用

\* 2020 年 7 月第 57 回下水道研究発表会で一部報告

\*1 工学科・都市デザイン系・教授

\*2 八戸工業高等専門学校・名誉教授

原稿受付 2023 年 5 月 19 日

表 1 調査した 5 つの嫌気性消化槽の概要

下水処理場	所在地	投入基質	消化温度(°C)	TSS濃度(mg/L)	採泥日
YE	青森県	下水汚泥	37	12800	2019.9.13
NT	青森県	下水汚泥	41	25800	2019.9.13
TB	青森県	下水汚泥	55	10900	2020.11.02
KT	岩手県	下水汚泥	35	11600	2020.01.07
TN	岩手県	下水汚泥	35	7580	2020.01.07

した。汚泥濃度が 1,000mg/L 以下になるように消化汚泥を PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で希釈して 0.5mL の透明なマイクロチューブに準備し、PMAxx の最終濃度が 50 μM となるように添加して暗室で 5 分間放置した。その後、LED 光源 (タカラバイオ (株), LED Crosslinker12 EM200) を 15 分間照射した<sup>3)</sup>。PMA 処理した消化汚泥は PBS で 2 回洗浄して冷凍保存した。

### 2-3 DNA と RNA の抽出

サンプルからの DNA と RNA の抽出は、AllPrep DNA/RNA Kit (Qiagen)を用いて行った。PMA 処理及び未処理サンプルは、遠心分離して PBS で洗浄後、ガラスビーズ (M & S Instrument) と β-mercaptoethanol を添加した RTL Plus buffer(Qiagen)を含む滅菌ビーズチューブに全量移した。次にビードビーター-ShakeMan6 (Biomedical Chemicals, 4350RPM, 60sec×2) で粉砕後、キットのプロトコールに従って DNA と RNA の抽出を行った。RNA の抽出では、RNase-free DNase Set(Qiagen)を使用して DNA を除去した。抽出した DNA と RNA は-80°Cで冷凍保存した。

### 2-4 RNA の逆転写

逆転写反応には、ReverTra Ace®qRT-PCR KIT (TOYOBO)を使用した。抽出した RNA の逆転写は抽出後 2 日以内に実施した。RNA をインキュベーター(65°C,5min)し、氷上で急冷した後、PCR 装置の LifeECO (日本ジェネティクス(株))を用いてキットのプロトコールに従い、逆転写反応を行った。RNA から生成された cDNA は-80°Cで冷凍保存した。

### 2-5 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析

次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス解析は、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象に (株) 生物技研に委託して実施した。プライマー

セットには 341f\_MIX と 805r\_MIX を使い、2step tailed PCR 法でライブラリーを作成した。シーケンス解析は Miseq(Illumina)を使用して 2x300bp の条件で行い、使用プライマーと配列の読み始めが完全に一致する配列のみを Fastx toolkit<sup>4)</sup>によって抽出した。プライマー配列除去後、菌叢解析ツール Qiime2(ver. 2020.8)パイプライン<sup>5)</sup>を用いてキメラ配列とノイズ配列を除去して代表配列を取得した。取得した代表配列と Greengenes(ver.13\_8)の 97% OTU(Operational Taxonomic Unit)を比較して系統推定した。α多様性とβ多様性の解析は、QIIME2 の diversity プラグインで行った。

## 3. 実験結果と考察

### 3-1 α多様性解析

消化槽内の微生物群集構造の豊富さと均一性を示す α多様性指数を表 1 に示した。各サンプルの希薄化曲線より、α多様性解析のサブサンプリングは 19,126 リードとした。観察された OTU 数は、DNA に基づく解析では TB 以外の 4 つの処理施設の中温消化槽では 400~800 程度、TB 処理場の高温消化槽で 300 未満であり、高温消化では消化槽内の菌種が減少し、群集構造の豊富さを示す chao1 や faith\_pd 指数からも多様性の減少が確認された。また PMA 処理汚泥や RNA を基準とした解析では、OTU 数、chao1、faith\_pd の 3 つの指数とも DNA ベースの解析に比べて減少しており、消化槽中には細胞膜が破損したり、細胞活性のない微生物群が数多く存在することを表している。これらの指数の減少率は TB 処理場で大きく、高温消化では活性のない微生物群の割合が高いことを示唆している。これは阿部ら<sup>6)</sup>の報告とも一致している。PMA 処理した消化汚泥と RNA ベースの解析結果を比較すると、KT 処理場を除いて 3 つの指数とも RNA ベースの方が大きかった。

微生物群集構造の均等度を表す pielou\_e と shannon 指数は、YE と TB 処理場の shannon 指数を除いて 3 つの解析ともあまり変化しなかった。

### 3-2 微生物群集構造の変化

図 1 では各サンプル間の微生物群集構造を比較

表 2 5 つの消化汚泥に関する DNA, PMA, RNA ベースの α多様性解析結果

Index	YE			NT			TB			TN			KT		
	DNA	PMA	RNA												
observed OTUs	569	371	444	786	438	676	287	151	192	428	344	383	579	439	444
chao1	575	375	464	795	444	694	289	152	193	432	348	386	581	445	446
faith_pd	58.4	44.4	50.8	68.1	46.8	63.5	35.8	23.4	28.3	49.5	43.0	44.6	59.9	51.5	50.9
pielou_e	0.790	0.791	0.707	0.844	0.820	0.829	0.738	0.725	0.698	0.826	0.809	0.784	0.825	0.792	0.790
shannon	7.22	6.75	6.22	8.12	7.19	7.79	6.03	5.25	5.29	7.22	6.81	6.72	7.57	6.95	6.94

するため主座標分析（ $\beta$ 多様性解析）を行った。(a)図は、微生物群のリード数を考慮した定量的な Weighted UniFrac 解析, (b)図は微生物群の存在の有無のみで解析した定性的な Unweighted UniFrac 解析結果である。どちらの解析でも高温消化で運転している TB 処理場は他の 4 つの処理場から遠く離れてプロットされており、微生物群集構造が大きく異なっていることが分かる。(b)図の定性的解析では、比較的高い温度で中温消化を行っている NT 処理場の DNA と RNA の解析結果も他の中温消化汚泥と離れてプロットされ、微生物種が異なることを示している。また各処理場とも定量的解析では RNA ベースの解析が他の 2 つの解析結果からかなり離れており、定性的解析では PMA 処理汚泥が他の 2 つから離れてプロットされ、これらの結果から PMA 処理では微生物の種類が、RNA によるゲノム解析では微生物種より微生物群の存在割合が DNA ベースの解析と比べて大きく変化していると考えられる。

3 つの解析によって実際に微生物構造がどのように変化したか調べるため、門レベルの微生物群集構造を図 2 に示した。図 2 にはいずれかのサンプルで相対存在比率の平均が 1%以上の微生物群をグラフにまとめた。なお *Proteobacteria* については、綱レベル(greengene データベースによる)を含めた、微生物叢を構成する主要な門として、*Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, OP1, *Synergistetes*, *Thermotogae*, WWE1 が検出され、このうち *Thermotogae* は特に高温消化の TB 処理場で存在率が 10%以上となった。PMA 処理汚泥で相対存在比率が大きく減少したのは *Proteobacteria* 門で、特に *Alphaproteobacteria* と *Betaproteobacteria*

綱が減少しており、これは既往の報告<sup>6)7)</sup>と一致していた。また RNA のゲノム解析では、*Chloroflexi* と *Synergistetes* 門の微生物群の存在率が減少し、*Euryarchaeota* 門に属する古細菌は大幅に増加していた。*Proteobacteria* に関しては、*Alphaproteobacteria* は PMA 処理と同様に減少した。*Betaproteobacteria* も 4 つの処理場では減少したが、KT 処理場のみ増加した。

### 3-3 PMA と rRNA によるメタゲノム解析

嫌気性消化槽で働く活性のある微生物群を 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析で検出するため、事前に PMA 試薬で消化汚泥を処理して DNA をメタゲノム解析する方法<sup>6)7)</sup>や rRNA を逆転写して cDNA を解析する方法<sup>8)9)</sup>が試されてきたが、両者を同時に実施して比較した研究はほとんど為されていない。最近 Li ら<sup>10)</sup>は、4 種の細菌の生細胞と死細胞を様々に組み合わせて、DNA と RNA および PMA ベースでメタゲノム解析し、RNA による解析が生細胞の検出に最も有効であったことを報告している。また Hiwaki and Yaguchi<sup>11)</sup>は、熱処理した下水に培養した 2 種類の腸内細菌を添加して同様に 3 つのメタゲノム解析を行い、RNA ベースの解析がよりの確に生存している細菌を検出できたとしている。しかし、rRNA を用いたメタゲノム解析は休眠細胞等の存在のため増殖速度や活性度とは関係していないと従来から批判されており<sup>12)</sup>、実際に嫌気性消化槽内の消化汚泥に RNA によるゲノム解析を適用した研究では多数の好気性細菌が検出され<sup>8)9)</sup>、rRNA と rRNA 遺伝子の比(rRNA/rDNA)で表した好気性細菌の微生物活性は、消化される前の活性汚泥よりも消化汚泥で高くなった<sup>8)</sup>。

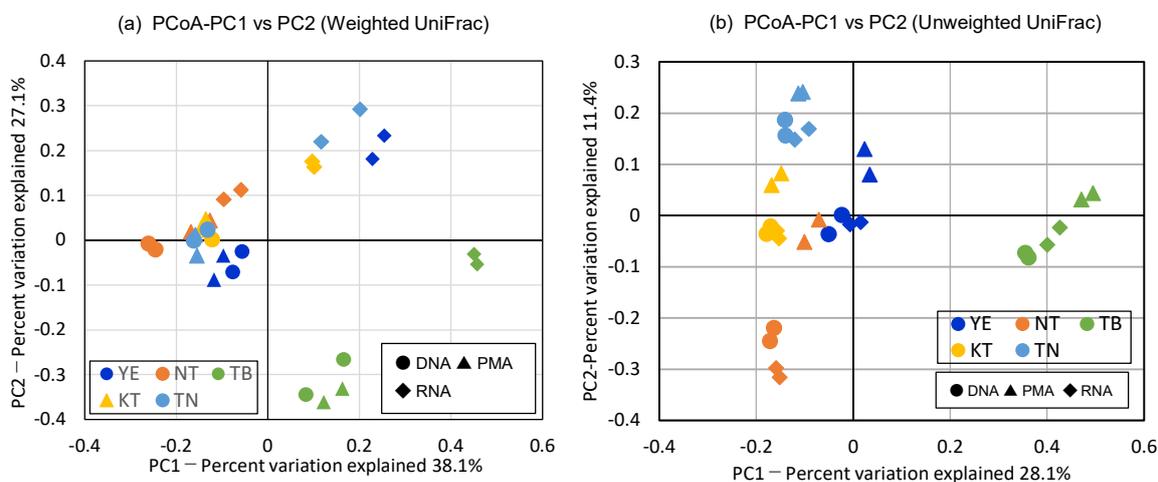


図 1 主座標分析（ $\beta$ 多様性解析）結果 (a) Weighted UniFrac 解析, (b) Unweighted UniFrac 解析

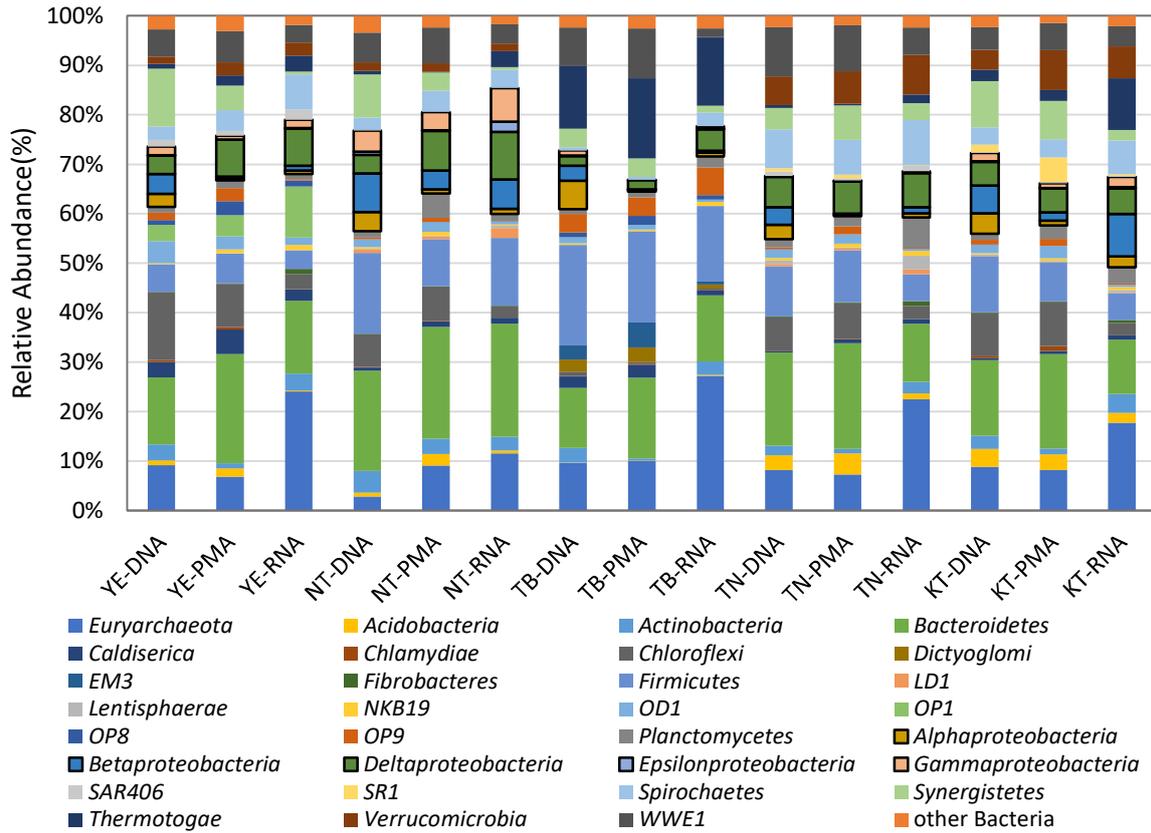


図2 門レベルの微生物群集構造 (Proteobacteria については網レベル) , 相対存在率 1%以上の微生物群

一方 PMA 試薬で前処理して DNA ゲノム解析すると、直接 DNA を解析した場合と比べて微生物叢に著しい変化が見られ、相対存在率が大きく減少した微生物群は消化プロセスで分解されなかった残存微生物(residual populations)の死細胞と見なされている<sup>67)</sup>。しかし最近 PMA ベースのメタゲノム解析を検証した研究では、簡単な人工微生物群集では半定量的に使用できるが、実際の複雑な群集では定性的評価しかできないと指摘され<sup>13)</sup>、前述の 3 つのゲノム解析を比較した研究結果<sup>10) 11)</sup>を裏付けている。

このように生理的活性のある微生物群を検出するための 2 つの方法とも限界があり、本研究でもそれを踏まえて消化槽中で活性のある微生物群を推定する必要がある。

### 3-4 生理的活性のある微生物群の推定

PMA 処理と RNA によるメタゲノム解析によって、属レベルで微生物群集構造がどのように変化したか探索するため、図 3 に DNA ゲノム解析による各属の相対存在比率と PMA と RNA ベースの解析による存在比率との関係をそれぞれ示した。3 つの解析の何れかで相対存在率の平均が 1%以上となった微生物群のみ解析し、図中には各処理場で構成

比が DNA による解析と比べて 2%以上増減する属名を記した。また(a), (b), (c) 図にはそれぞれ NT, TB 及び TN 処理場の嫌気性消化槽における解析結果を示した。PMA 処理では各処理場の消化槽で共通して増減する微生物群はみられなかったが、RNA による解析ではメタン生成菌 *Methanosaeta* 属の存在率が 5 つの消化槽とも大幅に増加し、DNA 解析結果の 2~3 倍となった。これは図 4 に示した属レベルの古細菌 (相対存在率 0.5%以上) の微生物群集構造でも確認でき、TB 処理場では存在率が 23.6%に達した。同様の傾向は他のメタン生成菌でも認められ、図 2 の RNA ベースの解析で増加した *Euryarchaeota* 門に属する古細菌は、*Methanosaeta* 属を始めとするメタン生成菌であることが分かった。

TB 処理場の消化汚泥を解析した既報<sup>11)</sup>では、PMA 処理汚泥で *Methanosaeta* 属の相対存在率が大幅に低下し、汚泥サンプリング時に使用した RNA-Later による細胞膜の損傷が疑われたが、今回 RNA-Later を使用せずに PMA 処理した汚泥では DNA ベースの解析と存在率はあまり変わらなかった。*Methanosaeta* は酢酸資化性のメタン生成古細菌として通常よく観察されているが、RNA メタゲ

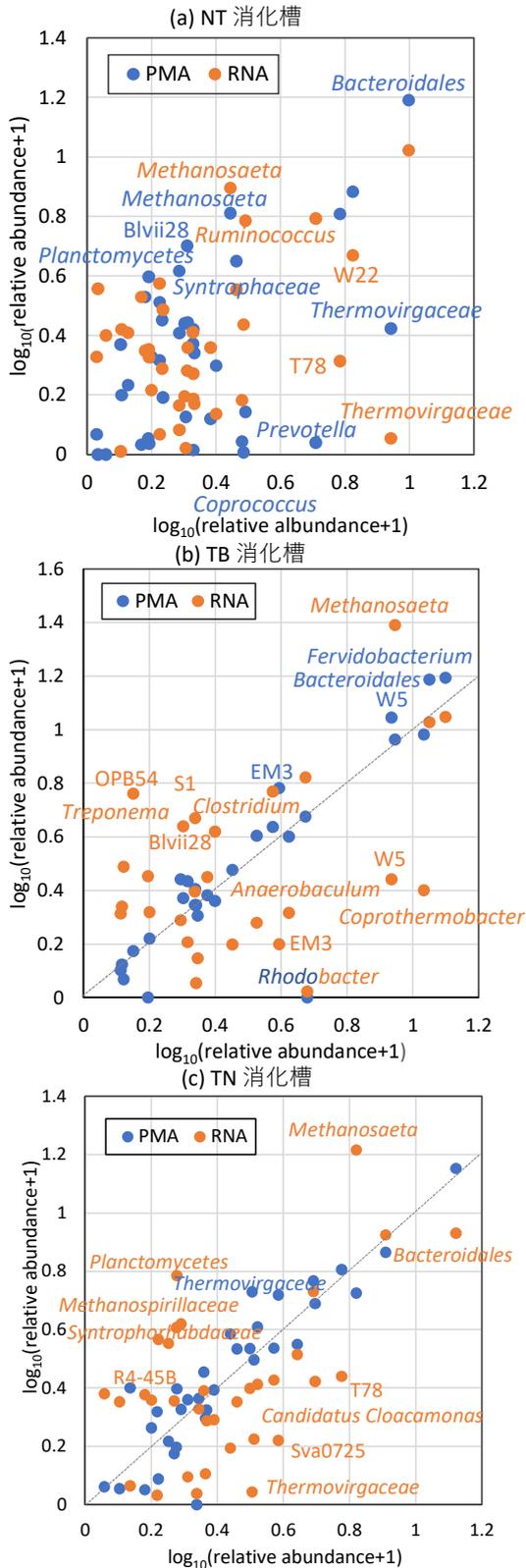


図3 属レベルの微生物群集構造の変化

ノム解析で存在率が大きく増加したという報告はいままでない<sup>8)9)</sup>。PMA 処理では存在比率はあまり変化せず、本研究で調査した 5 つの処理場の消化槽では *Methanosaeta* 属のメタン菌が rRNA を大量

に生産して活性が高く、メタン生成に大きく寄与していると考えられる。下水汚泥の嫌気性消化では生成したメタンの 7 割は酢酸経由だと報告されている<sup>14)</sup>。図 4 で観察されたメタン菌のうち酢酸からのメタン生成に関与しているのは *Methanosaeta* 属のみであり、RNA メタゲノム解析結果では構成比が全メタン生成菌のおおよそ 7 割を占めていることとよく符合している。

また *Bacteroidales* 綱に属する微生物群は、すべての消化槽で 3 つのゲノム解析とも常に 5.4~14.5% の構成比を占め、真正細菌では最も相対存在率が高く、消化槽中の主要な下水汚泥分解菌だと示された。*Bacteroidales* 綱の微生物群は、環境条件の異なる様々な消化槽で主要な細菌群として検出されており<sup>11)15)</sup>、PMA 処理した中温消化汚泥でも優占していた<sup>7)</sup>。

さらに調査した 4 つの処理場の中温消化槽では、*Treponema* 属と WWE1 門に含まれる W22 の微生物群は 3 つの解析ともそれぞれ 1.9~7.4% と 2.1~6.6% の範囲の相対存在率を示し、PMA 処理や RNA によるゲノム解析でも存在率に大きな変化はなく、活性のある微生物群と考えられる。*Treponema* 属の細菌群は、 $H_2$  と  $CO_2$  から酢酸を合成するホモアセトジェニック(homoacetogenic)細菌として知られており<sup>16)</sup>、食品廃棄物と下水汚泥を処理する南アフリカの嫌気性消化槽では調査した 7 つの処理施設すべてで検出された<sup>17)</sup>。一方、WWE1 門の微生物群は、セルロースの加水分解に関与していることが報告されているが<sup>18)</sup>、W22 の微生物群の嫌気性消化槽における役割はよく分かっていない<sup>19)</sup>。*Treponema* 属の細菌群は、TB 処理場の高温消化槽でも RNA ゲノム解析で存在率が大きく増加した。

次に生理的活性が低い 2 つの微生物群を示す。*Thermovirgaceae* 科に属する微生物群は、TB 処理場を除くすべての中温消化槽で RNA ベースの解析

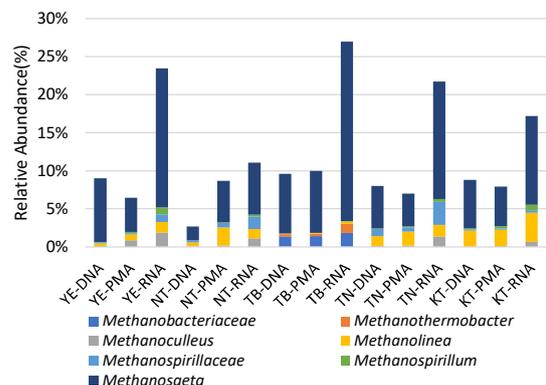


図4 メタン生成菌の微生物群集構造の変化

(相対存在率 0.5%以上)

による存在率が著しく低下していた。DNA のゲノム解析では 2.2~10.2%の構成比を占めていたが、RNA の解析ではすべて 0.3%以下となった。PMA 処理汚泥でも 3 つの消化槽で構成比は 2%以上減少したが、TN 処理場のみ増加した。 *Thermovirgaceae* 科に属する微生物群は、最近実験室規模の醤油工場廃水を処理する低温 UASB リアクターで優占種として報告されており、タンパク質やアミノ酸分解に関与する遺伝子を有しているとされる<sup>20)</sup>。しかし、本研究で解析した 4 つの中温消化槽では、RNA 解析の相対存在率から活性はかなり低く、汚泥分解で活躍している微生物群とは考えられない。

*Anaerolinaceae* 科に属する T78 の微生物群も、4 つの中温消化槽で RNA 解析による存在率が大きく低下している。T78 は実規模の汚泥消化槽で最も優占する微生物群としていくつか報告がある<sup>21)22)</sup>。また油や高級脂肪酸を分解する嫌気性消化槽でも最も優占していた微生物群であるとも報告されている<sup>23)</sup>。本研究では DNA ゲノム解析で 3.8~5.9%の存在率を占め、PMA 処理でもほとんどその存在率は変化しなかったが、RNA による解析では 0.77~2.0%まで低下し、従来報告されていたほど中温消化槽で働いている主要な微生物群とは考えられない。

高温消化を行っている TB 処理場の消化槽については図 3 の (b)に見られるように、*Coprothermobacter* 属と WWE1 門に属する W5 属の微生物群は、RNA ベースの解析で存在率が大きく低下していた。阿部ら<sup>6)</sup>は PMA ベースの解析から高温消化の主要な微生物群である報告したが、活性は高いとは考えられない。一方 *Thermotogaceae* 科に属する *Fervidobacterium* 属の微生物群は、3 つの解析とも存在率が 10%以上となり、この消化槽で働く主要な微生物群であると推定された。これらの結果は TB 処理場の消化槽を調査した既報の結果<sup>11)</sup>とも一致した。

#### 4. まとめ

本研究では、PMA 試薬と RNA ベースのメタゲノム解析を使用して DNA ベースの解析結果と比較することにより、下水汚泥を嫌気性消化している 5 つ消化槽の微生物群集構造を解析した。微生物群集の  $\beta$  多様性解析により、PMA 処理では微生物の種類が、また RNA によるゲノム解析では微生物種より微生物群の存在割合が DNA ベースの解析と比べて大きく変化したことが知られた。PMA と RNA を用いた解析から、*Methanosaeta* 属と *Bacteroidales* 綱に属する微生物群は 5 つの下水処理場のすべて

の消化槽で活発に働く微生物群であると推定された。また *Treponema* 属と WWE1 門に含まれる W22 の微生物群は、4 つの中温消化槽で活性を維持している微生物群であると考えられた。

謝辞：本研究を行うにあたり、八戸工業高等専門学校産業システム工学科環境都市・建築デザインコース学生（当時）一戸佳乃さんと下屋敷豊君にご協力いただきました。また消化汚泥のサンプリングでは自治体及び下水処理場の関係者の皆様にご支援、ご協力を賜りました。ここに記して深く感謝申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) Mei, R., Nobu, M.K., Narihiro, T., Kuroda, K., Muñoz Sierra, J., Wu, Z., et al.: Operation-driven heterogeneity and overlooked feed-associated populations in global anaerobic digester microbiome. *Water Research* 124: 77–84 (2017) <https://doi.org/10.1016/j.waters.2017.07.050>
- 2) 寺田昭彦, 堀知行, 久保田健吾, 栗栖太, 春日郁朗, 金田一智規, 伊藤司:水処理システムの微生物群の全容を診る解析技術の進展, 45(3), 91-105 (2022)
- 3) Ruike, W., Higashimori, A., Yaguchi, J., Li, Y.: Use of real-time PCR with propidium monoazide for enumeration of viable *Escherichia coli* in anaerobic digestion/ *Water Science & Technology*, 74(5), 1243-1254 (2016)
- 4) Hannon lab: FASTX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html))
- 5) Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R. et al.: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nat. Biotechnol.*, 37, 852–857 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- 6) 阿部天磨, 佐藤幹子, 矢口淳一, 李玉友, 久保田健吾:PMA-PCR法を用いた高温嫌気性消化汚泥の微生物群集構造の解明. 土木学会論文集G(環境), 77, III\_103-III\_109(2021)
- 7) Ni, J., Hatori, S., Wang, Y., Li, Y., Kubota, K.: Uncovering Viable Microbiome in Anaerobic Sludge Digesters by Propidium Monoazide (PMA)-PCR *Microb Ecol.*, 79(4), 925-932 (2020) <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01449-w>
- 8) Mei, R., Narihiro, T., Nobu, M.K., Kuroda, K., Liu, W.T.: Evaluating digestion efficiency in full-scale

- anaerobic digesters by identifying active microbial populations through the lens of microbial activity. *Sci. Rep.*, 6, 1–10 (2016) <https://doi.org/10.1038/srep34090>
- 9) Vrieze, J. D., Pinto, A.J., Sloan, W. T., Ijaz, U. Z.: The active microbial community more accurately reflects the anaerobic digestion process: 16S rRNA (gene) sequencing as a predictive tool. *Microbiome*, 6:63 (2018) <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0449-9>.
  - 10) Li, R., Tun, H., M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., W. G. Fernando, D., Farenhorst, A., Khafipour, A.: Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci. Rep.*, 7, 5752 (2017) <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02516-3>
  - 11) Hiwaki, R., Yaguchi, J.: Evaluation of method utilizing 16S rRNA amplicon sequencing for analysis of live bacterial community. *Memoirs of National Institute of Technology (Kosen), Nagano College*, 55 1-1 (2021)
  - 12) Blazewicz, S.J., Barnard, R.L., Daly, R.A., Firestone, M. K.: Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J.*, 7, 2061–2068(2013) <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.102>
  - 13) Wang, Y., Yan, Y., Thompson, K. N., Bae, S., Accorsi, E. K., Zhang, Y., Shen, J., Vlamakis, H., Hartmann, E. M., Huttenhower C.: Whole microbial community viability is not quantitatively reflected by propidium monoazide sequencing approach. *Microbiome*, 9:17 (2021) <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00961->
  - 14) Jeris, J. S., McCarty, P. L.: The biochemistry of methane fermentation using <sup>14</sup>C tracers, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 37, 178 (1965)
  - 15) Zeng, T., Hu, Q., Rene, E. R., Rene, Lens, P. N. L.: Microbial community and extracellular polymeric substances analysis of anaerobic granular sludge exposed to selenate, cadmium and zinc. *Microbial Biotechnology*, 16, 463-473 (2023) <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14187>
  - 16) Zhang, Q, Wang, M., Ma, X., Gao, Q., Wang, T., Shi, X.: High variations of methanogenic microorganisms drive full-scale anaerobic digestion process. *Environment Inter.*, 126, 543–551 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.005>
  - 17) Sposob, M., Moon, H., Lee, D., Yun, Y.: Microbiome of Seven Full-Scale Anaerobic Digestion Plants in South Korea: Effect of Feedstock and Operational Parameters. *Energies* 14, 665 (2021) <https://doi.org/10.3390/en14030665>
  - 18) Limam, R.D., Chouari, R., Mazeas, L., Wu, T., Li, T, Grossin-Debattista, J., Guerquin-Kern, J., Mouldi Saidi, M., Landoulsi, A., Sghir, A., Bouchez, T. : Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. *MicrobiologyOpen*, 3(2), 157–167 (2014) <https://doi.org/10.1002/mbo3.144>
  - 19) Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P.G., Hu, Z., McCabe, M., Cormican, P., Zhan, X., Gardiner, G.E.: Exploring the roles of and interactions among microbes in dry co-digestion of food waste and pig manure using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Biotechnol Biofuels*, 12:5 (2019) <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1344-0>
  - 20) Gao, M., Guo, B., Zhang, L., Zhang, Y., Liu, Y.: Microbial community dynamics in anaerobic digesters treating conventional and vacuum toilet flushed blackwater. *Water Research*, 160, 249 e258 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.077>
  - 21) Petriqlieri, F., Nierychlo, M., Nielsen, P.H.,McIlroy, S.J.: In situ visualisation of the abundant *Chloroflexi* populations in full-scale anaerobic digesters and the fate of immigrating species. *PLoS ONE*, 13(11), e0206255 (2018) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206255>
  - 22) Bovio-Winkler, P., Cabezas, A., Etchebehere, C.: Database Mining to Unravel the Ecology of the Phylum Chloroflexi in Methanogenic Full Scale Bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, 11, 603234 (2021) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603234>
  - 23) Nakasaki, K., Nguyen, K. K., Ballesteros Jr, F.C., Maekawa, M., Koyama, M.: Characterizing the microbial community involved in anaerobic digestion of lipid-rich wastewater to produce methane gas. *Anaerobe*, 61, 102082 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.10208>